

酶法亚油酸氢过氧化反应的底物抑制的松弛因子^{*}

苏亚芬¹ 周建东² 方云^{*1} 徐宏丽¹

(1. 江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214036; 2. 杭州油脂化工厂, 杭州 311200)

摘要 研究了外加因子对大豆脂氧酶好氧催化大豆亚油酸氢过氧化过程中底物抑制的松弛作用。结果表明: 稀释剂 DMF 不仅可以解决高底物体系中的黏度问题, 改善底物在体系内的溶解性, 提高底物与酶的互溶性, 还可以提高产率; 初始体系氧饱和可减少底物的抑制作用。抗氧剂的加入可减少副反应的发生, 在底物浓度为 125 g/L, pH 9, 10℃, $[E] = 3.4 \times 10^5 \text{ U/mL}$, $\varphi(\text{DMF}) = 7\%$, $15 \text{ mL}(\text{O}_2)/\text{min}$, $\rho(\text{柠檬酸钠}) = 0.005 \text{ g/L}$ 的优化条件下, 反应开始 15 min 后加 $\rho(\text{抗氧剂}) = 0.08 \text{ g/L}$, 总反应时间 90min 的最终产率可高达 88.62%。

关键词 大豆脂氧酶; 亚油酸; 底物抑制效应; 松弛; 氢过氧化物

中图分类号 Q 814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)01-0052-04

大豆中的脂氧酶活性很高, 大豆脂氧酶(LOX) (EC 1.13.11.12) 能专一催化具有 cis, cis-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸, 通过分子加氧, 形成具有共轭双键的脂肪酸氢过氧化衍生物(HPOD)。由于脂氧酶的作用, 在大豆食品中会产生一些不良气味, 导致食品的质量下降。但同时脂氧酶催化生成的 HPOD 又是非常重要的药物合成和化学合成的中间体, 仅以亚油酸 HPOD 为前体制备的物质已有一百多种^[1], 如环氧化合物, 羟基化合物, 酮类及多官能团物质; 还可使其裂解形成醛、醛酸和二元酸。这些物质中具有生物活性者可作为合成药物^[2], 其它物质可作为风味物质, 还可用作染料、涂料、洗涤剂、聚氯乙烯增塑剂的原料^[3]。因此用来源于大豆饼粕的脂氧酶催化大豆亚油酸生产 HPOD 以及进一步获得其它高附加值、新用途产品是将生物技术应用于大豆综合利用的尝试, 具有重要的社会经济效应。

本实验室已经报道了从大豆中提取脂氧酶及影响酶活的因素^[4], 对其进行了固定化和增强稳定性的尝试^[5], 并探索在低底物浓度下用其酶促合成亚油酸 HPOD^[6]。底物浓度很低时(4g/L), HPOD 产率可以高达 90%; 提高底物浓度后的优化结果为

底物浓度达到 43g/L 时产率仅为 63%, 远未达到工业性开发的要求。因此底物抑制作用是目前开发大豆脂氧酶应用的主要障碍之一, 这也是困扰其它生物化工过程的共性问题。本文以大豆中提取的亚油酸为底物, 旨在探索适宜添加剂对大豆脂氧酶好氧催化的底物抑制作用的松弛效应, 从而达到增大底物浓度并提高 HPOD 反应产率的目的, 使该生物催化过程更接近实际应用的要求, 从而提高大豆制品的附加值。

1 实验与方法

1.1 试验材料

亚油酸(65%), 从大豆中提取; 过氧化氢异丙苯, Sigma; 大豆脂氧酶($8.6 \times 10^5 \text{ U/mL}$), 实验室自制^[4]; 其余试剂及溶剂均为 AR, 中国医药集团上海化学试剂公司。TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 81-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器厂。

1.2 试验方法

* 收稿日期: 2004-09-08

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004019)

作者简介: 苏亚芬(1980-), 女, 在读硕士生, 研究方向为酶催化。

** 通讯作者: 方云, E-mail: fangyun57@sina.com Tel: 0510-5867220

1.2.1 亚油酸 HPOD 的合成

准确称取 2.0 – 2.5 g 亚油酸底物置于 100mL 带恒温搅拌的气/液反应器中, 视需要加入定量稀释剂。在快速搅拌下缓慢加入 5mol/L NaOH 中和至 pH7 并过量 5%, 然后加入适量 0.2mol/L 的 pH9 硼酸缓冲液使达到设定的底物浓度。通氧搅拌 10min 后加入脂氧酶开始计时反应, 间隔一定时间取样分析。除特别说明外, 反应体系 pH 为 9, 反应温度为 10 ℃, 脂氧酶浓度[E] 为 3.35×105U/mL, 反应总体积为 20mL。

酶促反应生成的 HPOD 具有共轭双键, 在 234nm 处有特征吸收峰(A234), 而原料多元不饱和酸不具备此吸收峰。采用紫外分光光度法(234nm)^[6] 监测反应进程, 当 234nm 处的吸光度不再随反应时间增加时结束反应。

1.2.2 二甲酚橙法测定 HPOD 含量

反应结束后粗产品采用二甲酚橙法测定其中 HPOD 含量。(1) 指示剂组成^[7]: 100μmol/L 二甲酚橙, 250μmol/L 六水合硫酸亚铁铵, 25mmol/L H2SO4, 4mmol/L 2,6 – 叔丁基 – 4 – 甲基酚(BHT)的甲醇 – 水(90 : 10 V/V) 溶液。(2) 测定过程: 用 1 mol/L H2SO4 调节反应液 pH 到 3.5, 立即用无水乙醚萃取 HPOD 三次, 合并萃取液除去乙醚, 将残余的 HPOD 溶于 25mL 无水乙醇中保存。测定过程为 4 mL 指示剂中加入 10 50μLHPOD, 再

加入无水乙醇使总体积达到 4.2mL。室温放置 45 min, 然后在 590 nm 处测量吸光度, 空白为 4mL 指示剂加无水乙醇使总体积达到 4.2mL。样品吸光度测量值与过氧化氢异丙苯标准曲线对照求得 HPOD 的摩尔量, 并计算出产率(y %)。

2 结果与讨论

2.1 稀释剂对底物抑制作用的松弛效应

本实验室前期工作^[6] 表明在较高底物浓度下为维持脂氧酶催化所需的 pH 9 需补加一定量碱。亚油酸底物在水中溶解度极低, 加碱虽然有利于增大亚油酸在水中的溶解度, 从而增大底物与酶的接触反应机会, 但同时会导致体系黏度急剧增大, 不利于传质。加入适宜的有机稀释剂既有利于增大底物与溶剂的互溶度, 又有利于减小体系黏度及强化传质。表 1 结果表明, 在底物浓度 100 g /L, φ(稀释剂)= 5%, 5mL(空气)/min, V总= 5 mL 的反应条件下, 本实验的稀释剂中 DMF 的效果最佳, 可使 HPOD 产率达到 66.09%。这可能是由于 DMF 为偶极非质子溶剂, 既能增大底物与水互溶, 又能大幅度减小体系黏度, 而且在一定浓度范围内对酶活损伤不大, 因而得到了大幅度提高底物浓度及 HPOD 产率的结果。

表 1 稀释剂对底物抑制作用的松弛效应

Tab.1 Relaxation of substrate inhibition from solvent

稀释剂 Solvent	沸点 /℃ Boil point	反应时间/min Reaction time	产率 /% Yield
空白 Blank		60	38.93
甲醇 Methanol	64.5	70	30.80
乙醇 Ethanol	78.3	50	33.63
N, N – 二甲基甲酰胺(DMF) N, N – Dimethylformamide	106.0	50	66.09
N, N – 二甲基乙酰胺(DMA) N, N – Dimethylacetamide	166.0	50	58.48
乙二醇二甲醚 Ethylene glycol dimethyl ether	85.2	50	37.36
乙二醇单甲醚 Ethylene glycol monomethyl ether	124.6	60	40.18
丙酮 Acetone	56.1	60	30.58
吡啶 Pyridine	115.3	75	32.、61
四氢呋喃(THF) Tetrahydrofuran	66.0	55	31.17
二甲亚砜(DMSO) Dimethyl sulfoxide	189.0	75	42.53

由于 DMF 为极性溶剂, 用量较大时可能会导致酶变性失活, 图 1 为对其用量的考察结果。当体系内 DMF 含量小于 4%时, 体系发黏, 不利于反应进

行; 而当体系内 DMF 含量大于 9%(V/V)时, DMF 的正作用就开始削弱, 因此体系内 DMF 的最佳含量是 5% – 8%(V/V)。

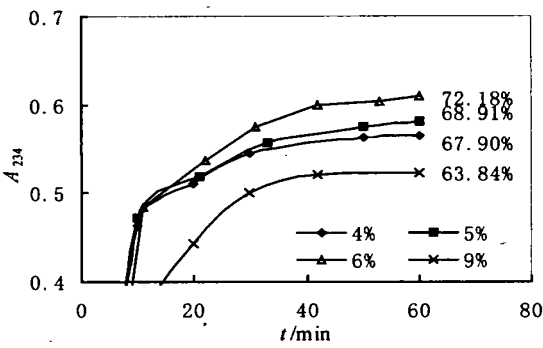


图1 DMF用量对反应的影响

Fig. 1 Effect of DMF level on substrate inhibition
100 g(底物)/L, 5 mL(O₂)/min

2.2 氧源对底物抑制作用的松弛效应

氧气作为反应物在反应过程中起着极其重要的作用,有文献报道提高亚油酸转化为亚油酸 HPOD

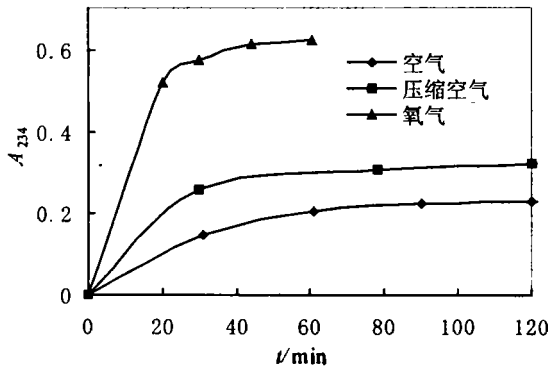


图2 氧源对底物抑制作用的松弛效应

Fig. 2 Relaxation effect of oxygen source

100g(底物)/L, φ(DMF)=6%, 15 mL(O₂)/min

2.4 抗氧化剂对抑制副反应的影响

提高 HPOD 反应产率的另一措施是尽量减少副反应,脂氧酶催化亚油酸氧化过程中可能发生的副反应是 HPOD 的碳-碳键裂解以及自由基聚合。

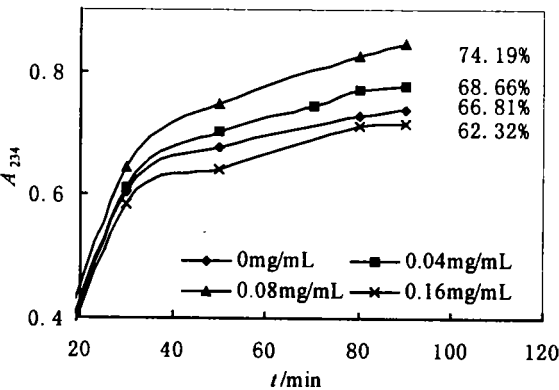


图4 抗氧化剂量的对酶促反应的影响

Fig. 4 Effect of antioxidant level on LOX catalysis

125g(底物)/L, φ(DMF)=7%, 15mL(O₂)/min,

ρ(柠檬酸钠)=0.005 g/L, 抗氧化剂反应 6 min 后加入

的关键性因素是亚油酸与氧气在体系内的溶解度^[8]。图 2 的结果表明用纯氧作为氧源,不仅反应速度最快,平衡时间也大大缩短。在反应体系中溶解大量的氧不仅可以阻止酶的失活,而且较强的底物抑制作用在初始高氧浓度下可以得到缓解。这种松弛底物抑制作用的效应可能与酶对氧气的饱和程度有关,在空气泡或压缩空气泡中酶难以达到对氧饱和。

2.3 抑泡剂对底物抑制作用的松弛效应

由于底物在 pH=9 的条件下具有表面活性易起泡,可能会干扰传质,为此考察了抑泡剂对酶促反应的影响。由图 3 可知在高底物浓度下抑泡剂并不明显松弛底物抑制作用,这可能是泡沫给酶提供了更大的与氧接触表面的缘故。

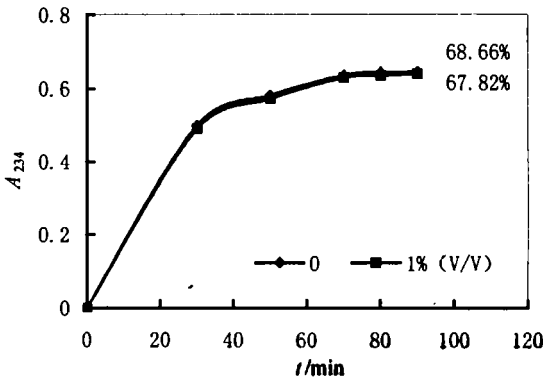


图3 抑泡剂对底物抑制作用的松弛效应

Fig. 3 Relaxation effect of antifoam

125g(底物)/L, φ(DMF)=7%, 15mL(O₂)/min

通过加入抗氧化剂可以阻止这些副反应的发生。由于脂氧酶催化亚油酸氧化亦属自由基反应,体系内抗氧化剂浓度过高也会产生抑制正反应的逆效应。由图 4 可知,反应 6min 后加抗氧化剂且使抗氧化剂在体系内

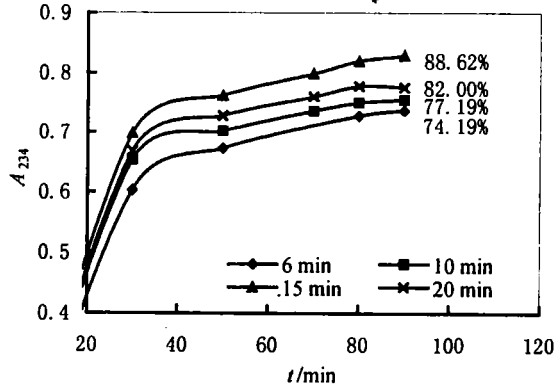


图5 抗氧化剂加入时间对酶促反应的影响

Fig. 5 Effect of oxidant on LOX catalysis

125g(底物)/L, φ(DMF)=7%, 15mL(O₂)/min,

ρ(柠檬酸钠)=0.005g/L, ρ(抗氧化剂)=0.08g/L

的含量达到 0.08mg/mL 时, 产率达到 74.19%。由图 5 可知, 当反应开始 15min 后加入抗氧化剂可使产率高达 88.62%, 20min 后加入则产率反而降为 74.19%, 这说明 20min 时副反应可能已经发生。由此可见, 抗氧化剂虽然能抑制副反应, 但它的加入量及加入时间均与效果有关, 只有当加入的抗氧化剂能抑制全部副反应而不抑制正反应时, 反应的产率才能达到最大值。

3 结论

利用大豆脂氧酶催化大豆亚油酸氢过氧化反应合成 HPOD 的油脂类制品, 将生物技术用于改造传统化工生产过程, 并进一步提高了大豆的附加值。稀释剂 DMF 的加入可增大底物的溶解性, 避免底物浓度增高所产生的黏度问题, 而且可提高底物与酶的互溶性, 其最佳添加量 $\varphi(\text{DMF})$ 为 5%~8%。以纯氧为氧源, 初始的高氧浓度可以缓解底物抑制作用。研究发现抗氧化剂可以很好的抑制副反应的进行, 在底物浓度为 125 g/L, pH 9, 10 °C, $[E] = 3.4 \times 105 \text{ U/mL}$, $\varphi(\text{DMF}) = 7\%$, 15 mL(O_2)/min, $\rho(\text{柠檬酸钠}) = 0.005 \text{ g/L}$ 的条件下, 反应开始 15 min 后加 $\rho(\text{抗氧化剂}) = 0.08 \text{ g/L}$, 总反应时间 90min 的最终产率可高达 88.62%。

参 考 文 献

- 1 Gardner Harold W. Lipoxygenase as a versatile biocatalyst[J]. JAOCS, 1996, 73(11): 1347-1356.
- 2 Gargouri Mohamed, Legoy Marie Dominique. Chemoenzymatic production of (+)-coriolic acid from trilinolein: coupled synthesis and extraction[J]. JAOCS, 1997, 74(6): 641-645.
- 3 Márczy Judit Sz, Németh Ágnes Sz, Samu Zsuzsanna, et al. Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24: 1673-1675.
- 4 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶的提取及影响酶活因素的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 10-15.
- 5 蔡琨, 方云, 胡学铮, 等. 大豆脂肪氧合酶(LOX)的固定化及增强稳定性[J]. 精细化工, 2004, 21(4): 33-37.
- 6 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶酶促合成亚油酸氢过氧化物[J]. 精细化工, 2004.
- 7 Jiang Zhen - Yue, Woollard Alison C. S., Wolff Simmon P.. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of Xylenol orange comparison with the TBA assay and an iodometric method[J]. Lipids, 1991, 26(10): 853-856.
- 8 Elsholf M. B. W., Janssen M., Veldink G. A., et al. Biocatalytic large-scale production of 13(S)-hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecadienoic acid from hydrolyzed safflower oil by a crude soybean-flour extract as lipoxygenase source[J]. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 1996, 115: 499-504.

FACTORS RELAXING THE SUBSTRATE INHIBITION IN LIPOXYGENASE - CATALYZING HYDROPEROXIDATION OF LINOLEIC ACID

Su Yafen¹ Zhou Jiangdong² Fang Yun^{*1} Xu Hongli¹

(1. School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036;

2. Hangzhou Factory of Oil Chemicals, Hangzhou 311200)

Abstract The relaxation of substrate inhibition from additives in aerobic catalysis of hydroperoxidation of soybean linoleic acid by soybean lipoxygenase was studied in this paper. The results show that the addition of DMF can not only overcome the higher viscosity resulting from higher substrate level, improve the substrate solubility and enhance the coexistence of substrate with enzyme, but increase the yield of hydroperoxide (HPOD). The higher initial oxygen is found also favorable to relaxing the excess substrate inhibition. Antioxidant can control the side reaction of carbon-carbon fission of the HPOD and free radical initiated polymerisation. Under the optimal conditions of pH 9, 10 °C, $[E] = 3.4 \times 105 \text{ U/mL}$, $\varphi(\text{DMF}) = 7\%$, 15 mL(O_2)/min, $\rho(\text{sodium citrate}) = 0.005 \text{ g/L}$, and 125 g(substrate)/L, 0.08 g(antioxidant)/L was added 15 mins after and up to 88.62% HPOD was obtained 90 mins later.

Key words Soybean-lipoxygenase; Linoleic acid; Substrate inhibition; Relaxation; Hydroperoxide