

# 大豆脂氧酶催化亚油酸氢过氧化反应产物的漂白特性

蔡燕,方云,孟君

(江南大学化学与材料工程学院,无锡 214122)

**摘要** 利用大豆脂肪氧合酶催化氧化亚油酸可以生成氢过氧化亚油酸(LA-HPOD),后者是一种兼具低温漂白/洗涤双重功效的新型油脂基多功能表面活性剂。开发LA-HPOD将大为提高生物技术在豆加工中的应用水平和对大豆资源的高附加值利用水平。将LA-HPOD用于漂白洗涤配方,能促进漂白型洗涤剂向绿色、温和、多功能化方向发展。LA-HPOD在低于60℃时处于稳定状态,80℃时开始分解,至120℃完全分解。LA-HPOD漂白亚甲兰的合适质量分数为0.2%左右,作用0.5h后已显示良好的漂白效果。在pH11,60℃下,作用0.5h后,LA-HPOD的亚甲兰漂白率可接近100%;同期30℃下亚甲兰漂白率达40%左右。与PBS、PCS相比,LA-HPOD的低温漂白效果最佳。动力学研究表明LA-HPOD对亚甲兰的漂白反应属拟二级反应。

**关键词** 大豆脂氧酶;氢过氧化物;亚油酸;漂白;亚甲兰

**中图分类号** Q 814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0235-05

## THE BLEACHING PERFORMANCE OF THE PRODUCT OBTAINED FROM HYDROPEROXIDATION OF LINOLEIC ACID CATALYZED BY SOYBEEN-LIPOXYGENASE

CAI Yan, FANG Yun, MENG Jun

(School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

**Abstract** Lipoyxygenase obtained from soybeans can catalyze the oxidation of linoleic acid to linoleic acid hydroperoxide (LA-HPOD), the latter is a new type of soybean oil-derived multifunctional surfactant having both bleaching and washing performances at lower temperature. In this paper, the thermal stability of LA-HPOD, as well as its bleaching effect on methylene blue was investigated. LA-HPOD decomposed completely at 120℃ but kept stable at 60℃. The bleaching rate of methylene blue reached nearly 100% at 60℃, pH11 in 0.5 h, while 40% at 30℃ in 30min. Comparing with commonly used sodium perborate and sodium percarbonate, LA-HPOD performed the best on bleaching methylene blue. The bleaching of methylene blue by LA-HPOD follows second order reaction kinetics.

**Key words** Soybean-lipoyxygenase; Hydroperoxide; Linoleic acid; Bleach; Methylene blue

漂白型洗涤剂是当前洗涤剂研究的热点,其中漂白剂分为氯漂和氧漂两大类。由于氯元素

收稿日期:2006-09-28

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2004019);教育部新世纪优秀人才计划(2005)

作者简介:蔡燕(1983-),女,在读硕士生,研究方向为酶催化。

通讯作者:方云, Email: yunfang@126.com。

引起的环境问题突出,正逐步被氧漂取代<sup>[1]</sup>。目前市场上常用的氧漂剂是无机盐类过氧化物,如过硼酸钠(PBS)和过碳酸钠(PCS),两者在应用时都存在着明显的缺点:PCS自身不稳定,易分解,难以加入配方中;PBS则存在着低温释氧困难的问题,而我国的洗涤习惯是低温洗涤。目前主要是靠开发一些低温促漂助剂解决上述问题,其中最典型的是四乙酰四乙二胺(TAED),但PBS/TAED配伍仍要在50℃~70℃才达到最佳漂白效果;美国伊思曼·柯达公司开发的异壬酰氧苯磺酸盐(iso-NOBS)效果有所提高,但商业化前途尚未看好。若将研究思路从开发低温促漂剂迁移到合成一种兼具低温漂白/洗涤作用的多功能表面活性剂,就可能从根本上解决上述问题。

利用生物技术加工生物质资源、特别是大豆油脂中的长链脂肪酸合成表面活性剂,在石油资源日益枯竭的今天已成为一个热门课题。大豆脂肪氧合酶(Lipoxygenase, EC1.13.11.12,以下简称LOX)存在于大豆豆粕中,活性很高。LOX在有氧条件下能专一催化氧化具有顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸如亚油酸,生成具有共轭双键的亚油酸氢过氧化物(LA-HPOD)。LA-HPOD常用作重要的药物合成和化学合成的中间体<sup>[2,3]</sup>,其结构中除了含有共轭双键外,还含有一个过氧基和一个羧基。LA-HPOD在碱性条件下形成脂肪酸皂,既可以发挥洗涤去污作用,又通过释氧提供漂白功效,是一种潜在的兼具低温漂白/洗涤作用的多功能表面活性剂。目前已经可以高得率地提取大豆LOX<sup>[4]</sup>,由LOX催化氧化亚油酸制取LA-HPOD的工艺也已得到优化<sup>[5,6]</sup>。本实验室采取措施松弛底物抑制作用,在高底物质量浓度(125 g/L)时使LA-HPOD产率接近90%<sup>[7,8]</sup>。若LA-HPOD取代PBS或PCS用于低温漂白型洗涤剂,其在发挥漂白作用的同时可兼作具有漂白效果的脂肪酸皂,将大为提高生物技术等高新技术在大豆加工中的应用水平和大豆资源的高附加值利用,并促进漂白型洗涤剂向绿色、温和、多功能化方向发展。本文考察了LA-HPOD对模拟可漂污垢亚甲兰的漂白作用及漂白动力学,并与PBS及PCS的漂白效果进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

LOX ( $8.6 \times 10^5$  U/mL),自制;亚油酸,工业级(65%),苏州吴中天然乳化剂厂;过氧化氢异丙苯,sigma;亚甲兰,生化试剂,上海试剂三厂;正己烷,异丙醇,HPLC级,江苏汉邦科技有限公司;其余试剂及溶剂均为AR级。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;752型紫外光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂;81-2型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器厂;PHS-3B精密PH计,上海雷磁仪器厂;LD4-2型离心机,北京医用离心机厂;液相色谱仪,Waters 515;2487双波长紫外检测器;氰基柱Kromasil ( $4.6 \times 250$  mm)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 LA-HPOD的制取 将1.8 g亚油酸置于100 mL带恒温搅拌的气/液反应器中,加入1 mL DMF溶剂,并在快速搅拌下缓慢滴加5 mol/L NaOH中和至pH 9,然后加入适量0.2 mol/L的pH 9硼酸缓冲液。10℃下通氧搅拌10 min后加入LOX反应2 h。LOX浓度[E]为 $3.35 \times 10^5$  U/mL,反应体系总体积为20 mL。反应结束后,用1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>调节反应液pH到3.5,立即用无水乙醚萃取粗产品三次,合并萃取液除去乙醚,将得到的HPOD溶于pH 11的硼酸缓冲液中保存。

1.2.2 LA-HPOD浓度的测定<sup>[5]</sup> 采用二甲酚橙法测定粗产品中LA-HPOD含量。二甲酚橙指示剂:将9.8 mg六水合硫酸亚铁铵以及88 mg 2,6-叔丁基-4-甲基酚(BHT)溶于90 mL甲醇-水溶液中(V(甲醇):V(水)=90:10),加入0.13 mL浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使溶液pH达到1~2,最后溶入7.6 mg二甲酚橙并在100 mL容量瓶中定容。在4 mL上述指示剂中加入10~50 μL LA-HPOD,再加入无水乙醇使总体积达到4.2 mL。室温下放置45 min,然后在590 nm处测量紫外吸光度;在4 mL指示剂中加入无水乙醇使总体积达到4.2 mL,并以此溶液为空白。将样品吸光度测量值与用参比过氧化氢异丙苯制得的标准曲线对照求得LA-HPOD物质的量。

1.2.3 LA-HPOD热稳定性分析 采用HPLC分析加热后的反应物。选用双波长紫外检测器,波长为234 nm和205 nm,以氰基柱Kromasil ( $4.6 \times 250$  mm)作为色谱柱,流动相组成V(异丙醇):V(正

己烷) = 5: 95。流速为 0.6 mL/min,柱温为 25 ℃。

1.2.4 LA-HPOD 的漂白试验 配制指定浓度的亚甲兰待漂液,将已标定浓度的 LA-HPOD 溶液等梯度加入上述溶液中。在 664 nm 处测定待漂液吸光度随时间的变化情况。根据亚甲基兰在最大吸收 664 nm 处的标准工作曲线,可以得到亚甲兰的浓度衰减的时间进程,得到 LA-HPOD 的最佳作用浓度后,将其固定为后续实验的测试浓度,分别改变温度和 pH,便可得到温度和 pH 对亚甲兰漂白率的影响。

2 结果与分析

2.1 LA-HPOD 的热稳定性研究

LA-HPOD 中的过氧基赋予自身两个特点,即氧化作用 and 高温不稳定性,因此有必要考察其热稳定性。将 LA-HPOD 分别于 60、80、100、120 和 150 ℃下加热半小时,同时通入 N<sub>2</sub>作为保护气。加热后的产物用 HPLC 分析,如图 1 所示,保留时间 25 min 的吸收峰为 LA-HPOD 的特征吸收。LA-HPOD 在 60 ℃下反应半个小时后,出峰位置和峰面积没有发生太大的变化,可见 LA-HPOD 在 60 ℃以下是稳定的。在 80 ℃ LA-HPOD 开始不稳定,120 ℃下已经完全分解。

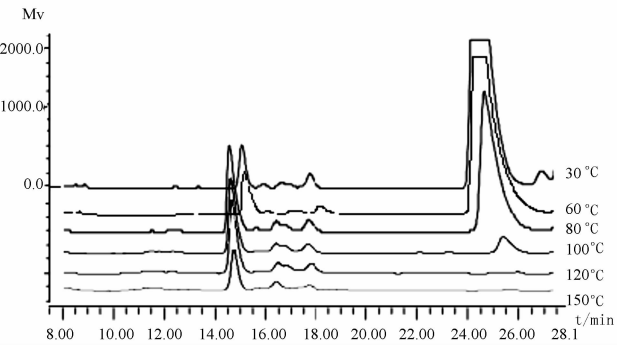
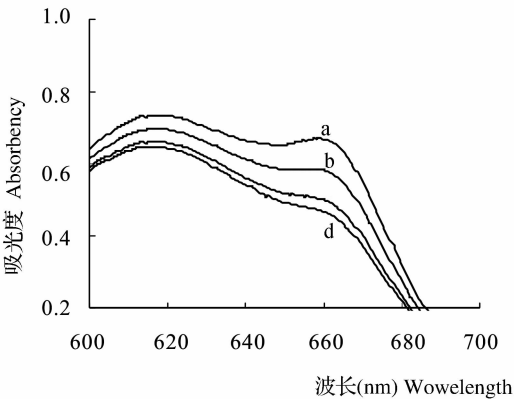


图 1 LA-HPOD 的热稳定性  
Fig. 1 Thermal stability of LA-HPOD

2.2 LA-HPOD 漂白亚甲兰

图 2 显示加入 LA-HPOD 后亚甲兰在 600 ~ 700 nm 间的吸光度随时间的变化规律,亚甲兰的吸光度随时间延长而降低,表明 LA-HPOD 具有漂白性能。

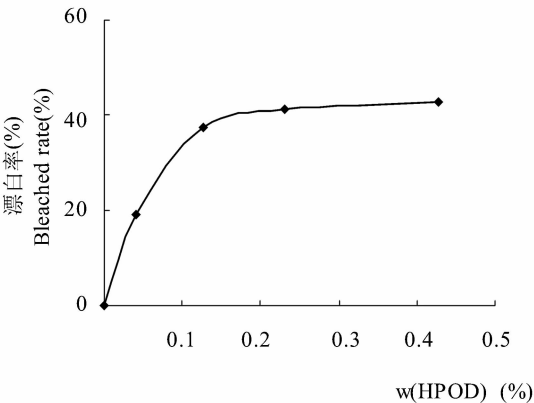
2.2.1 LA-HPOD 的质量浓度对漂白亚甲兰的影响 图 3 表明提高 LA-HPOD 加入量,亚甲兰漂白率随之提高。LA-HPOD 质量分数达到 0.2% 时



pH = 11, 30 ℃, 亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L,  
反应时间: a - 0, b - 11, c - 20, d - 30 min

图 2 LA-HPOD 漂白亚甲兰

Fig. 2 The bleaching of methylene blue by LA-HPOD  
亚甲兰漂白率开始达到一平台,为 40% 左右,故在以后的试验中固定 LA-HPOD 加入的质量分数为 0.2%。



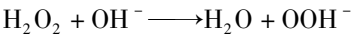
pH = 11, 30 ℃, 30 min, 亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L  
Initial concentration of methylene blue is 8 mg/L

图 3 LA-HPOD 质量浓度对亚甲兰漂白率的影响

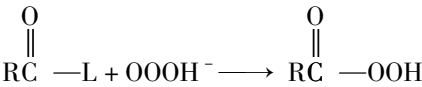
Fig. 3 Effect of LA-HPOD concentration on  
the bleaching of methylene blue

2.2.2 温度对 LA-HPOD 漂白亚甲兰的影响

图 4(a) 表示温度对漂白率的影响很大,在 20 ~ 30 ℃下,0.5 h 时的亚甲兰漂白率在 25% ~ 50% 之间;图 4(b) 显示亚甲兰漂白率变化与温度成较好的线性,60 ℃时亚甲兰漂白率接近 100%。过氧化氢在溶液中生成氢过氧阴离子 OOH<sup>-</sup> [1]:

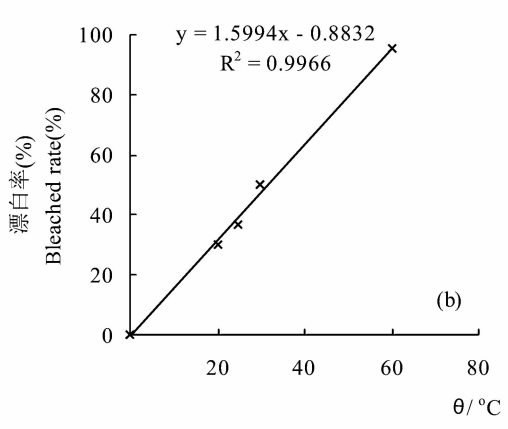
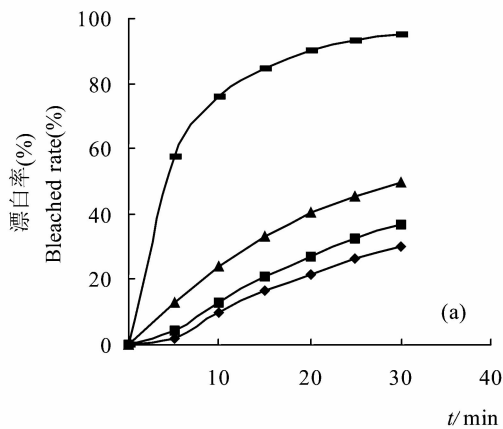


在有酰基激活剂存在时,酰基和过羟基阴离子反应生成比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更易释氧的过羧酸 RCOOH:



温度越高,则 LA - HPOD 越易释氧,释放的过氧化氢立即又与脂肪酸形成过氧酸,能促使 LA -

HPOD 进一步释氧。同时温度升高加速了布朗运动,增加了接触几率,并为体系提供了能量,导致了亚甲兰漂白率迅速上升。



pH = 11, 30 min, w (HPOD) = 0.2%, 亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L, 反应温度 20, 25, 30, 60  
Initial concentration of methylene blue is 8 mg/L, Reaction temperature: ◆ 20, ■ 25, ▲ 30, ● 60 °C

图4 温度对亚甲兰漂白率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the bleaching of methylene blue

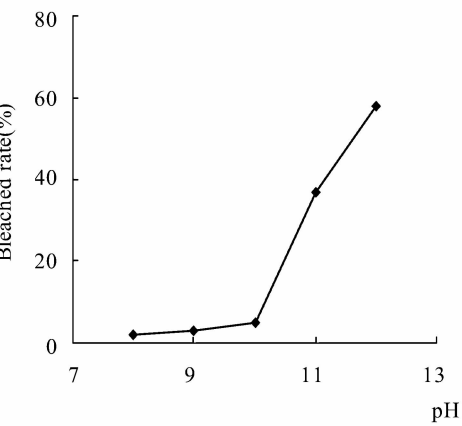
2.2.3 pH 对 LA - HPOD 漂白亚甲兰的影响

LA - HPOD 在不同 pH 的溶液中稳定性不一样,而且洗涤、漂白对 pH 值也有特定要求。图 5 表示溶液的 pH 值对亚甲兰漂白率的影响较大。在 pH = 8、9、10 的环境下,LA - HPOD 的亚甲兰漂白率很低且相差不大,只有 5% 左右。而在 pH = 11 时,亚甲兰漂白率开始明显上升。

HPOD、PBS 或 PCS 来漂白亚甲兰溶液,结果如图 6 所示。低温 30 °C 时,LA - HPOD 的漂白效果明显优于 PBS 和 PCS,显示了良好的低温释氧性能。随着温度的升高,三者的漂白效果均上升较快,但 LA - HPOD 的效果仍保持最好。至 80 °C 三者间已几无差距,均在较短时间内使亚甲兰的漂白率达 100。

2.3 LA - HPOD 漂白亚甲兰的动力学初探

考察亚甲兰残余量与时间的关系,用以确定漂白亚甲兰的速率方程,从而求得反应级数与漂白速率常数。图 7 表明亚甲兰残余质量浓度(w)的倒数与时间成正比,因此 HPOD 对亚甲兰的漂白反应为拟二级反应。



30 °C, 30 min, w (HPOD) = 0.2%, 亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L  
Initial concentration of methylene blue is 8 mg/L

图5 pH 对亚甲兰漂白率的影响

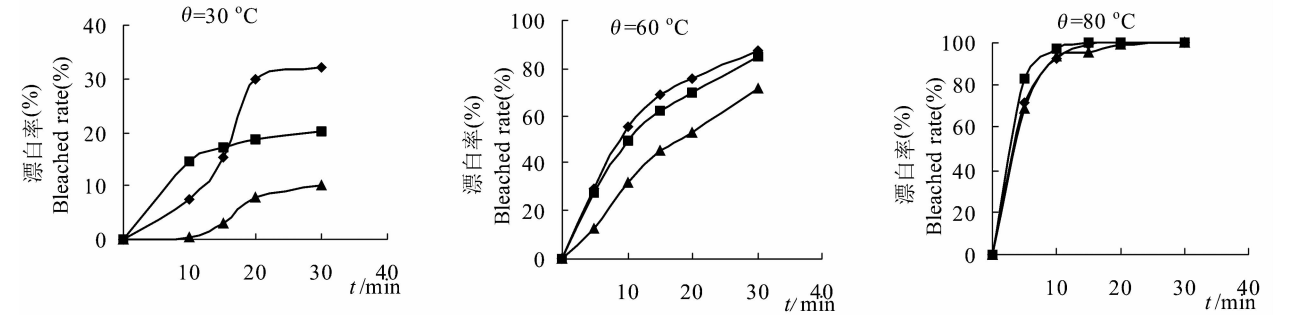
Fig. 5 Effect of pH on the bleaching of methylene blue

2.2.4 LA - HPOD 与 PBS 及 PCS 的比较 分别在 30、60 及 80 °C 下用质量分数为 0.2% 的 LA -

3 结论

LA - HPOD 在低于 60 °C 时处于稳定状态,80 °C 时开始分解,至 120 °C 完全分解。LA - HPOD 漂白亚甲兰的合适质量分数为 0.2% 左右,作用 0.5 h 后已显示良好的漂白效果。pH = 8 ~ 11 时,碱性越强,LA - HPOD 漂白效果越明显。在 pH 11,60 °C 下,作用 0.5 h 后,LA - HPOD 的亚甲兰漂白率可接近 100%,同期 30 °C 下亚甲兰漂白率在 40% 左右。与 PBS、PCS 相比,LA - HPOD 的低温漂白效果最佳。动力学研究表明 LA - HPOD 对亚甲兰的

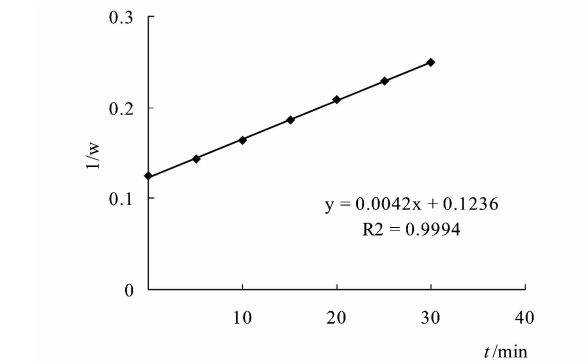
漂白反应属拟二级反应。



pH 11, 30 °C, 30 min, 亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L  
Initial concentration of methylene blue is 8 mg/L, ◆ HPOD; ▲ PBS; ■ PCS

图 6 LA - HPOD、PBS、PCS 漂白亚甲兰

Fig. 6 The bleaching effect of LA - HPOD, PBS and PCS on methylene blue



pH 11, 30 °C, 30 min, w (HPOD) = 0.2% ,  
亚甲兰初始质量浓度: 8 mg/L  
Initial concentration of methylene is 8 mg/L

图 7 漂白亚甲兰的动力学

Fig. 7 Kinetics of the bleaching of methylene blue

参 考 文 献

[1] 尼尔丁米尔恩,武华平.家用洗涤剂中的氧漂体系[J].日用化学品科学,2000,23(1): 4-5.

[2] Feussner I., Wastack C.. The Lipoxygenase pathway[J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 275-297.

[3] 蔡琨, 方云, 夏咏梅. 植物脂肪氧合酶的研究进展[J]. 现代化工, 2003, 23(增刊): 23-27.

[4] 蔡琨, 方云, 夏咏梅. 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): 52-56.

[5] Kermasha S, Dioum N, Bisakowski B. Biocatalysis of lipoxygenase in selected organic solvent media[J]. Journal of molecular Catalysis, 2001: 909-919.

[6] 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶催化合成亚油酸氢过氧化物[J]. 精细化工, 2004, 22(1): 74-77.

[7] 苏亚芬, 周建东, 方云, 等. 酶法亚油酸氢过氧化反应的底物抑制的松弛因子[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 52-55.

[8] 夏咏梅, 苏亚芬, 蔡燕, 等. DMF 竞争性抑制大豆脂氧酶好氧催化及其松弛底物抑制的综合作用[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(12): 261-264.