

低豆粕用量下脂肪氧合酶好氧催化大豆油的反应研究

蔡燕,周红波,朱金丽

(南通大学 化学化工学院,江苏 南通 226019)

摘要:为实现低量豆粕($m_{\text{豆粕}}/m_{\text{豆油}} = 10\%$)高效催化氧化大豆油合成氢过氧化豆油,对此氧化反应进行了单因素优化,并探讨了添加表面活性剂和引入超声辐射对豆油催化效率的影响。结果表明:豆粕催化豆油的优化条件为:在15℃下,0.05 g 豆粕溶于3.3 mL pH6的磷酸盐缓冲液后,逐滴加入0.5 g 豆油和0.15 mL 乙醇,通氧反应3 h后产率为12%。加入表面活性剂CTAB或 β -环糊精后,反应产率呈现了不同程度的降低。超声辐射(100 W,40 Hz)提高了豆粕酶促催化氧化大豆油的效率,将反应的平衡时间减少为常规的1/3,将产率由12%提高到35%。

关键词:豆粕;脂肪氧合酶;大豆油;过氧化

中图分类号: O643.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)02-0683-04

Aerobic Catalyzed Lipoygenation of Soybean Oil with Low Level Soymeal

CAI Yan,ZHOU Hong-bo,ZHU Jin-li

(School of Chemistry and Chemical Engineering,Nantong University,Nantong 226019,China)

Abstract: The performance of low level soymeal($m_{\text{soymeal}}/m_{\text{soybean oil}} = 10\%$) in catalyzing the hydroperoxidation reaction using soybean oil as substrate was evaluated,and surfactants as well as ultrasonic wave were introduced to improve the lipoygenation reaction yield. The optimal conditions for soybean oil were 0.5 g soybean oil in 3.3 mL phosphate buffer solution of pH6 with 0.15 mL ethanol as co-solvent reacting for 3 h at 15℃. Under those optimal conditions the yield reached 12%. The addition of surfactants such as CTAB and β -CD reduced the hydroperoxide yield. The employment of ultrasonic wave(100 W,40 Hz) during the aerobic catalysis reached equilibrium after 60 min with the yield of 35%,which could both accelerate the enzymatic reaction and improve the reaction yield.

Key words: Soymeal;Lipoygenase;Soybean oil;Hydroperoxidation

脂肪氧合酶(lipoxygenase, LOX),能专一催化氧化具有 *cis*,*cis*-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸及其酯而形成具有共轭双键的氢过氧化衍生物。对 LOX 而言,亚油酸酯类与亚油酸相比是很不理想的底物。以甘油酯为例,LOX 对其的活性仅为以亚油酸为底物时活性的1%左右^[1],且甘油酯的最大转化率仅为15%^[2]。我们曾尝试用脱脂豆粕直接催化大豆油,将氢过氧化大豆油的产率提高到60%^[3]。但缺陷在于催化剂豆粕使用量过高(是底物豆油量的1.3倍),给产物的分离提纯带来一定困难;而通常反应体系中催化剂的用量不宜超过底物量的10%,但低量豆粕对乳化作用有限,产率偏低。传质效率是影响该反应产率非常重要的因素,引入适当辅助手段有望促进反应体系的传质效率来提高低量豆粕条件下氢过氧化豆油的产率。为此,本文主要研究低豆粕用量下 LOX 好氧催化大豆油的反应,对影响反应产率的主要因素进行单因素优化,并试图结合添加表面活性剂和引入超声辐射等辅助手段来提高催化效率,促使该酶催化过程更

适合于工业化生产的需要。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆(黑农37,2011年产于吉林省),非转基因大豆油(皂化价为191 mg-KOHg⁻¹,酸价为0.16 mg-KOHg⁻¹),过氧化氢异丙苯(质量分数80%,Sigma公司),二甲酚橙(AR,上海试剂三厂);2,6-叔丁基-4-甲基酚(BHT),Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, β -环糊精,甲醇,乙酸乙酯,乙醚,无水乙醇(AR,国药集团化学试剂有限公司);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为工业品。

T6紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),KQ2200型超声波清洗仪(100 W,40 Hz,上海绿宇生物)。

1.2 方法

1.2.1 脱脂豆粕的制备 大豆洗净后晾干去皮。取10 g浸泡于30 mL石油醚中,每次3 h,浸泡至石油醚呈无色为止。脱脂大豆用粉碎机搅碎后过40

收稿日期:2013-05-02

基金项目:国家自然科学基金(21006054);南通大学引进人才科研启动基金(12R038)。

第一作者简介:蔡燕(1983-),女,博士,讲师,主要从事酶催化研究。E-mail:Yancai2010@ntu.edu.cn。

目筛,得新鲜脱脂豆粕于4℃储存备用。

1.2.2 豆粕好氧催化大豆油的釜式反应 将一定量新鲜脱脂豆粕充分溶解于缓冲液中,依次逐滴加入大豆油和乙醇。通入 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 氧气开始反应,整个反应过程在带磁力搅拌的气/液酶反应器中进行,保持水浴恒温。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液调节反应液至 pH3 结束反应,与反应液等体积的乙醚萃取3次,合并萃取液水洗2次后,加入无水硫酸钠。过滤后滤液在氮气流中除去乙醚即得淡黄色氢过氧化豆油粗产物。

以氢过氧化豆油的产率为考察指标,利用单因素试验对温度、pH、缓冲液和助溶剂酒精量4个主要影响因素进行优化。

考察表面活性剂对反应的影响时,将底物量1% (w/w) 的表面活性剂 (CTAB 或 β -环糊精) 充分溶解至 pH6 的磷酸缓冲液中,于15℃恒温水浴中预热5 min 后,搅拌下逐滴加入大豆油,其余反应步骤同上所述。

考察超声辐射对反应的影响时,将气/液酶反应器置于超声波仪内槽 (23 cm × 14 cm × 10 cm) 的正中央,水浴温度控制在 $(15 \pm 1) ^\circ\text{C}$,其余反应过程同上。

1.2.3 氢过氧化豆油的产率测定 用二甲酚橙法测定氢过氧化豆油的产率^[4],按下式计算。

$$\text{产率}(\%) = \frac{n_{\text{氢过氧化豆油}} \times M_{\text{豆油}}}{3W_{\text{豆油}} \times 62.6\%} \times 100$$

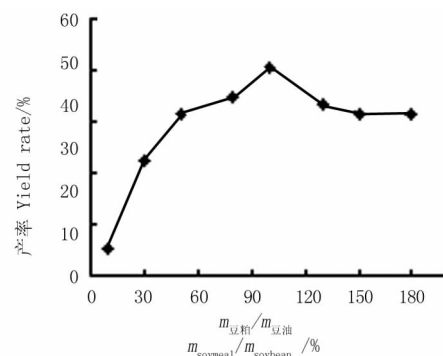
式中 n 为氢过氧化豆油的摩尔数, $M_{\text{豆油}} = 878$, $W_{\text{豆油}}$ 为豆油质量,3 代表每摩尔大豆油分子中含3摩尔脂肪酸,62.6% 为豆油中亚油酸和亚麻酸的含量。

2 结果与分析

2.1 不同因素对 LOX 好氧催化豆油反应的影响

如图1所示,氢过氧化豆油的产率在 $m_{\text{豆粕}} : m_{\text{豆油}} = 1:1$ 时达最大,为50%。豆粕用量同时影响着体系中脂肪氧合酶的浓度和传质效率。在豆粕用量低于底物豆油量时,反应产率随豆粕用量的增加而明显提高,说明此时体系中 LOX 酶量的增加和粘度的提高对反应有利。过高的豆粕用量反而使产率下降,可能是体系过于黏稠阻碍了氧气的扩散。虽然结果表明豆粕用量占底物豆油量100%时效果最佳,但一般来说反应体系中催化剂用量不应超过底物量的10%,因此研究低豆粕用量时 ($m_{\text{豆粕}}/m_{\text{豆油}} = 10\%$) LOX 好氧催化豆油的反应。现对影响氢过氧化豆油产率的4个主要因素:温度、pH、缓冲

液和助剂酒精量进行单因素优化。



0.5 g 豆油,0.15 mL 酒精,3.3 mL pH6 磷酸缓冲液,10℃, 3 h

0.5 g soybean oil,0.15 mL ethanol,3.3 mL pH6 phosphate buffer,10℃,3 h

图1 豆粕量对 LOX 好氧催化豆油反应的影响

Fig.1 Effects of soybean meal level on the yield of lipoxygenation of soybean oil catalyzed by LOX

2.1.1 温度对 LOX 好氧催化豆油反应的影响

LOX 对温度比较敏感,而且温度也影响体系的传质效果。将0.05 g 豆粕溶于3.3 mL pH6 的磷酸盐缓冲液中,逐滴加入0.5 g 豆油和0.15 mL 酒精,通氧反应3 h,研究温度对氢过氧化豆油产率的影响。由图2可知,随反应温度升高,豆油产率呈先增后减的趋势,且在温度为15℃时,产率达最高值。说明在低豆粕量条件下,15℃是适合的温度。

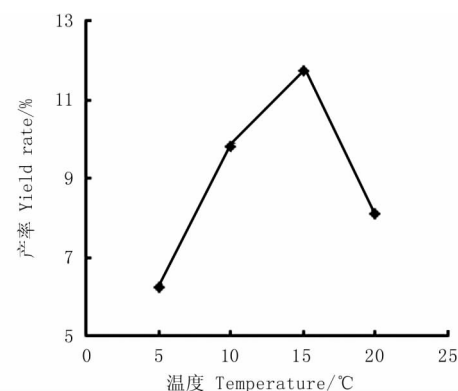


图2 温度对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

Fig.2 Effects of temperature on soybean meal of low level catalyzed lipoxygenation of soybean oil

2.1.2 pH 对 LOX 好氧催化豆油反应的影响 pH 通过改变酶的构象从而影响酶与底物的结合,而且还影响底物豆油的离子状态。将0.05 g 豆粕溶于3.3 mL 磷酸盐缓冲液中,逐滴加入0.5 g 豆油和0.15 mL 酒精,在10℃下通氧反应3 h,研究 pH 对氢过氧化豆油产率的影响。结果表明,氢过氧化豆油产率随 pH 的增加呈先增后减的趋势,当 pH6 时产率最高,pH > 6 时,产率迅速降低(图3)。因此,

pH6 适合豆粕催化氧化豆油的反应。

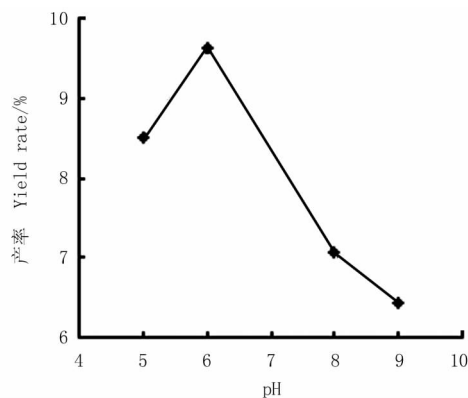


图3 pH 对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

Fig.3 Effects of pH on soymeal of low level catalyzed lipoxygenation of soybean oil

2.1.3 缓冲液量对 LOX 好氧催化豆油反应的影响

缓冲液量影响反应体系中豆粕的浓度。将 0.05 g 豆粕溶于磷酸盐缓冲液中,逐滴加入 0.5 g 豆油和 0.15 mL 酒精,在 15℃ 下通氧反应 3 h,研究缓冲液量对产率的影响。结果表明,当缓冲液量占体系总体积低于 75% 时,由于缓冲液量过少,豆粕浓度过高,体系过于粘稠使得传质受阻;高于 75% 时,由于缓冲液量过多,酶浓度太低,降低了催化效率(图 4)。因此,缓冲液量占体系总体积为 75% 时,氢过氧化豆油产率最大。

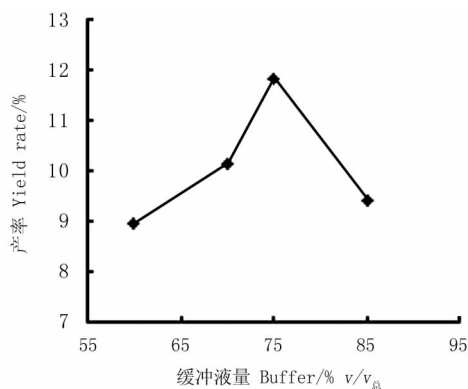


图4 缓冲液对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

Fig.4 Effects of buffer on soymeal of low level catalyzed lipoxygenation of soybean oil

2.1.4 酒精量对 LOX 好氧催化豆油的反应的影响

助溶剂酒精的添加有利于水油两相的互溶,提高水相酶 LOX 与大豆油的接触几率,从而提高反应产率,但过高的酒精量会引起 LOX 的失活。将 0.05 g 豆粕溶于 3.3 mL pH6 磷酸盐缓冲液中,逐滴加入 0.5 g 豆油,在 10℃ 下通氧反应 3 h,结果表明酒精量占体系总体积的 4% 时最利于反应的进行(图 5),氢过氧化豆油产率达 12%。

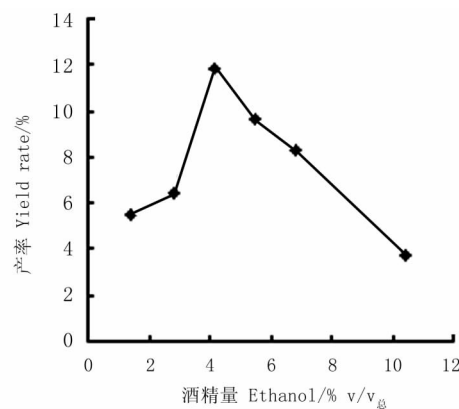
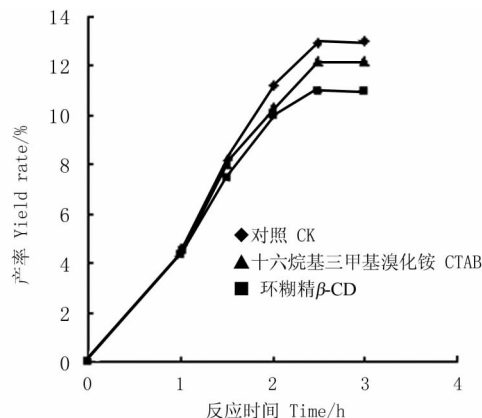


图5 酒精量对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

Fig.5 Effects of ethonal on soymeal of low level catalyzed lipoxygenation of soybean oil

2.2 表面活性剂对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

表面活性剂能通过改变酶的构像和发挥乳化作用而改变酶催化反应的效率^[5]。在低量豆粕及单因素试验确定的温度、pH、缓冲液和助剂酒精量条件下,加入表面活性剂 CTAB 或 β -环糊精后,反应产率呈现了不同程度的降低(图 6),没有达到预期效果。



0.5 g 豆油,0.05 g 豆粕,0.15 mL 酒精,3.3 mL pH6 磷酸缓冲液,15℃,3 h

0.5 g soybean oil,0.05 g soymeal,0.15 mL ethanol,3.3 mL pH6 phosphate buffer,15℃,3 h

图6 表面活性剂对低量豆粕好氧催化豆油反应的影响

Fig.6 Effects of surfactants on soymeal of low level aerobic catalyzed lipoxygenation of soybean oil

2.3 超声辅助低量豆粕好氧催化豆油的反应

如图 7 所示,超声辐射(100 W,40 Hz)提高了豆粕酶促催化氧化大豆油的效率,将反应的平衡时间减少至 1 h,为对照的 1/3,将产率从 12% 提高到 35%。超声能加速脂肪氧合酶从豆粕中溶出,并且加快氢过氧化产物从活性中心的脱离而再生活性中心,有效减少平衡时间。超声的空穴作用能增强

乳化,大大增加了豆油与脂氧酶活性中心的接触几率,空化过程的局部微环境可能有利于促使氧化反应进行得更完全。

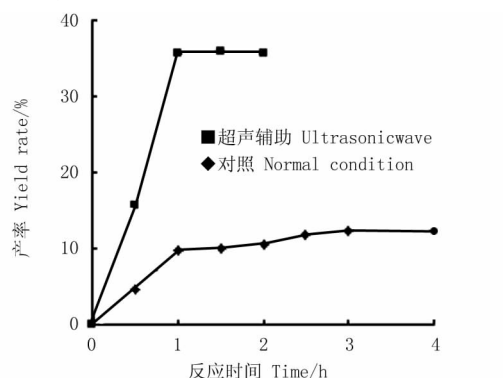


图7 超声辅助低量豆粕酶促催化氧化豆油

Fig.7 Soymeal of low level aerobic catalyzed soybean oil reaction under ultrasonic radiation

3 结 论

低量豆粕($m_{\text{豆粕}}/m_{\text{豆油}} = 10\%$)好氧催化氧化豆油的优化条件为:在 15°C 下, 0.05 g 豆粕溶于 3.3 mL pH6 的磷酸盐缓冲液后,逐滴加入 0.5 g 豆油和 0.15 mL 乙醇,通氧反应 3 h 后产率为 12% 。加入表面活性剂CTAB或 β -环糊精后,反应产率呈现了不同程度的降低,没有达到预期的效果。超声辐射(100 W , 40 Hz)提高了豆粕酶促催化氧化大豆油的效率,将反应的平衡时间减少为对照的 $1/3$,将产率

从 12% 提高到 35% 。因此探索适合的辅助手段能够实现低量豆粕高效催化豆油合成氢过氧化豆油,促使该酶催化过程更适合于工业化生产需要。

参考文献

- [1] Garbe L A, Almeida R B, Nagel R, et al. Dual positional and stereospecificity of lipoxygenase isoenzymes from germinating barley (green malt): biotransformation of free and esterified linoleic acid [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2006, 54: 946-955.
- [2] Piazza G J, Nuñez A, Foglia T A. Epoxidation of fatty acids, fatty methyl esters, and alkenes by immobilized oat seed peroxidase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 21: 143-151.
- [3] Cai Y, Liu Y J, Xu H, et al. Soybean-catalyzed facile and economic bioproduction of soybean oil hydroperoxide [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2011, 29(1): 31-36.
- [4] Jiang Z Y, Woolland A C S, Wolf S 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: 853-856.
- [5] 蔡燕, 石玉刚, 周红波, 等. 生物法高效合成氢过氧化亚油酸乙酯[J]. 精细化工, 2012, 29: 560-563. (Cai Y, Shi Y G, Zhou H B, et al. Efficient synthesis of ethyl linoleic acid hydroperoxide by biotransformation [J]. Fine Chemicals, 2012, 29: 560-563.)
- [6] Sinisterra J V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview [J]. Ultrasonics, 1992, 30: 180-185.
- [7] Ozbek B, Ulgen K O. The stability of enzymes after sonication [J]. Process Biochemistry, 2000, 35: 1037-1043.

(上接第 682 页)

参考文献

- [1] 马汇泉, 靳学慧, 辛惠普, 等. 大豆菌核病原菌生物学特性的研究 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(3): 82-84. (Ma H Q, Jin X H, Xin H P, et al. The biological characteristics of *Sclerotinia blight* in soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(3): 82-84.)
- [2] 董志敏, 王曙明, 刘玉芝, 等. 大豆抗菌核病研究进展 [J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1053-1057. (Dong Z M, Wang S M, Liu Y Z, et al. Progress on resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1053-1057.)
- [3] 张毅瑞, 滕卫丽, 李文滨, 等. 国内外大豆菌核病鉴定方法研究现状 [J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 161-167. (Zhan Y R, Teng W L, Li W B, et al. Comparison on the methods of evaluating soybean *Sclerotinia sclerotiorum* in China and foreign countries [J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 161-167.)
- [4] 战宇航, 宋巍巍, 范冬梅, 等. 黑龙江不同地区大豆菌核病原菌分离物的形态学分析 [J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 72-76. (Zhan Y H, Song W W, Fan D M, et al. Morphological trait analysis of soybean *Sclerotinia sclerotiorum* isolates derived from different location of Heilongjiang province [J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 72-76.)
- [5] 矫洪双, 程志明, 许修宏, 等. 大豆对菌核病室内抗性鉴定方法研究 [J]. 大豆科学, 1996, 15(4): 295-301. (Jiao H S, Cheng Z M, Xu X H, et al. Studies on the methods of evaluating varietal resistance of soybean to *Sclerotinia* rot under laboratory conditions [J]. Soybean Science, 1996, 15(4): 295-301.)
- [6] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. (Tang Q Y, Feng M G. The utility of statistical analysis and data processing system of DPS [M]. Beijing: Science Press, 2002.)
- [7] 陈士花, 吴兴泉, 杜春梅, 等. 寒地春油菜菌核病流行预测方法 [J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 89-91. (Chen S H, Wu X Q, Du C M, et al. Predicting model of *Sclerotinia sclerotiorum* on spring oilseed rape [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(4): 89-91.)
- [8] 宋淑云, 张伟, 刘影, 等. 大豆品种对大豆菌核病的抗性分析 [J]. 吉林农业科学, 2009, 34(3): 30-32. (Song S Y, Zhang W, Liu Y, et al. Analysis on resistance of soybean varieties to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2009, 34(3): 30-32.)