

水溶性有机介质中漆树酶催化氧化对茴香胺

张金梅^① 杜予民^②

(①暨南大学化学系, 广东 广州 510632; ②武汉大学环境科学系, 湖北 武汉 430072)

摘要 采用分光光度法, 考察不同水/水溶性有机溶剂体系中漆树酶的催化氧化性能, 以及影响反应的因素. 研究表明, 漆树酶在醇溶剂中的活性要强于在非醇溶剂中, 醇分子中羟基数量对漆树酶活性也有影响. 在温度 45 ℃, pH 值为 7.5, 体积比为 1:1 的水/丙三醇溶液中, 漆树酶的活力最高, 活力比达 150% 以上, 超出漆树酶在纯水中的活性. 以漆树酶催化氧化对茴香胺, 采用 TLC 和 HPLC 分离纯化反应产物. 根据光谱分析法, 鉴定主要产物为偶氮茴香醚.

关键词 漆树酶, 有机介质, 对茴香胺, 催化氧化

中图分类号 O 629.8; O 621.25⁺ 1; O 625.63

文献标识码 A

漆酶能在十分温和的条件下能利用空气中的氧, 进行多种有机物的催化氧化, 特别是能催化氧化木质素^[1], 因而一直是化学及生物学等领域十分活跃的研究课题^[2]. 国内外对于漆酶的研究多以真菌漆酶为研究对象, 采用水为介质的酶反应体系^[3,4]. 对漆树酶在有机介质中的催化氧化行为, 相关研究的报道不多见^[5,6]. 酶在催化反应中的行为, 既与酶的种类、来源有关, 又与反应介质及底物等有关. 本文以中国漆树酶为研究对象, 以对茴香胺为底物, 对漆树酶的催化氧化行为进行研究. 同时, 就影响酶活力的各种因素进行探讨, 以期寻求对提高或保持漆树酶活性有利的溶剂体系. 经过 TLC 和 HPLC 等方法分离纯化反应产物, 最终确认氧化产物为对偶氮茴香醚.

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

(1) 主要试剂. 漆树酶(参照 Reinhammar 的方法^[7]制备, 比活力为 $2.3 \times 10^4 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$, 以对苯二胺为底物), 对茴香胺(用甲醇和水重结晶), 其它试剂均为 AR 级. (2) 主要仪器. Varian EM-360 型核磁共振仪, 170 SX FT-IR 红外分析仪, VG-7070EHF 质谱分析仪, WG-1 显微熔点测定仪, Shimadzu UV-300 紫外分析仪, Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪等.

1.2 漆树酶活力检测^[8]

用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液与有机溶剂配成一定体积的底物, 其浓度为 $1.35 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 分别移取 3 mL 于 1 cm 测量池和参比池中, 恒温水浴中预热 10 min. 注入 20 μL 漆树酶溶液(含酶 2~3 μg)于测量池中, 立即搅匀, 测定 350 nm 处吸光度 A 随时间的变化值. 漆酶比活力定义为一定温度下, 单位酶量催化反应的初速度, 单位记为 $\Delta A_{350 \text{ nm}} (\text{mg} \cdot \text{min}^{-1})$. 将漆树酶在不同溶剂体系中的比活力与漆树酶在纯水体系中的比活力相比, 其比值称活力比(u).

1.3 酶促反应及产物分离

取 300 mg 经重结晶的对茴香胺溶解于 2.5 mL 无水乙醇中, 加入 1:1 的丙三醇:水的混合溶液(其中水为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 7.50 的磷酸盐缓冲液), 稀释到 25 mL, 转移至 50 mL 的三锥瓶中. 加入漆树酶 12.5 mg, 置于电磁搅拌器上搅拌, 恒温 45 ℃. 反应开始, 溶液立即变红, 渐有深红色沉淀出现. 反应达 39 h, 用 $6.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸终止反应, 过滤. 沉淀以蒸馏水反复洗涤后放置风干, 得固体物约

20 mg, 将固体物溶于丙酮, 选用体积比为 1:5:4 的乙酸乙酯-环己烷-无水乙醚混合溶液作为展开剂, 分离, 共分离得到 5 个不同的组分, 其中 R_f 值为 0.815 的组分量较大. 溶于甲醇中, 进行 HPLC 制备分离, 收集保留值 20~25 min 流出组分. 将收集到的组分浓缩蒸干得褐色固体, 质量约为 10 mg, 经 HPLC 检测显示单峰. 高效液相色谱仪柱型号为 ODS 4.6 mm × 15 cm, 流动相为甲醇-水=80:20(体积比), 进样量为 0.4~1.0 mL, 流速为 1.2 mL·min⁻¹, 柱压为 9.73 MPa, 检测波长为 254 nm.

2 结果与讨论

2.1 溶剂的影响

在温度为 30 ℃, pH 值为 7.5 的条件下, 考察不同水溶性有机溶剂/水体系中漆树酶活力. 以活力比对体系中水体积分数($V_{H_2O}/(V_{H_2O}+V_{solvent})$)作图, 如图 1, 2 所示. 从图可以看出, 水中加入有机溶剂多, 会使漆树酶活性降低, 溶剂不同, 降低程度不尽相同. 一般说来, 酶只有在其构象严格确定时, 才表现出完全的催化活性. 这一构象的保持依赖于酶分子周围的水化层, 在水化层中氢键和疏水作用力发挥主导作用. 有机溶剂对酶的影响, 一方面是破坏酶分子周围水化层, 从而破坏酶的活性构象; 另一方面, 有机溶剂分子中具有可形成氢键的基团, 能部分补偿水化层对酶构象的保护作用. 好的有机溶剂能大大降

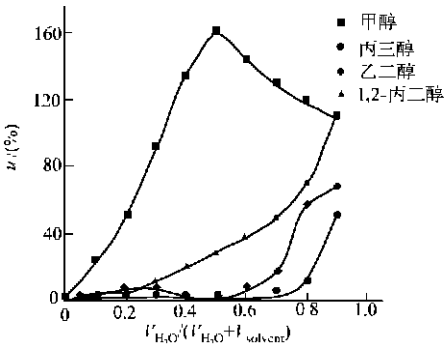


图 1 醇分子中羟基数与酶活性的关系

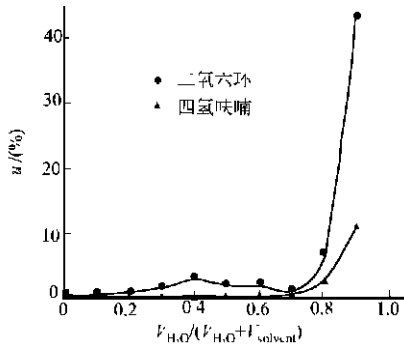


图 2 非醇溶剂体系中漆树酶活力

低反应体系中水的含量, 而不引起酶活力明显丧失. (1) 漆树酶在醇溶剂体系中的活性. 从图 1 可以看出, 醇分子中羟基个数对漆树酶活性影响甚大, 醇羟基个数增多, 活性也明显提高. 有如下顺序为三元醇 > 二元醇 > 单元醇. 尤其在丙三醇与水体积比为 1:1 时, 酶活性最大. 其值甚至超出漆树酶在纯水水中的活力, 活力比达 150% 以上. 这是由于该比例下酶分子周围水化层中的水没有被丙三醇完全夺取, 而丙三醇分子中又含有多个可形成氢键的中心. 它与水分子一起维护酶的活性构象, 使酶表现出高活性. (2) 漆树酶在非醇溶剂体系中的活性. 从图 2 可知, 漆树酶在四氢呋喃和二氧六环中的活性远不如在醇溶液中. 与其它有机溶剂相比, 氢键能力较强的缘故. 醇类在构造上更接近水分子, 它能利用氢键较多补偿水分子对酶构象的保护作用. 漆树酶在二氧六环中的活性, 高于在四氢呋喃中. 这是由于前者分子中有两个氧原子, 在水溶液中形成

2.2 反应条件对漆树酶活性的影响

在 pH 值为 7.5, 体积比为 1:1 的丙三醇/水溶液中, 考察温度对酶活性的影响, 如图 3 所示. 从图中可知, 当温度为 45 ℃时, 漆酶表现最佳. 在此条件下, 固定温度为 45 ℃, 寻找最适 pH 值(图 4). 从图中还可看出, 漆树酶最适 pH 值为 7.50.

2.3 产物鉴定

通过质谱、核磁、红外、紫外等分析手段, 确认产品为对偶氮茴香醚. 其结构为 $H_3CO-\text{Ar}-N=N-\text{Ar}-OCH_3$. (1) MS(m/z). 波谱数据为 243($M^+ + 1$), 242(M^+), 135($M^+ - C_6H_5OCH_3$), 107($M^+ - N=N - C_6H_5OCH_3$), 77($C_6H_5^-$). (2) UV. 以 CH₃OH 作溶剂, λ_{max} 为 350 nm. (3) IR. 以丙酮溶样, KBr 涂片. 2927 cm⁻¹及 2836 cm⁻¹, 1598 cm⁻¹及 1500 cm⁻¹, 1458 cm⁻¹, 1250 cm⁻¹及 1023 cm⁻¹, 843 cm⁻¹ 芳基. (4) ¹HNMR(CD₃COCD₃): δ 7.08~7.91(8H, m, Ar-H); 3.91(6H, s, -OCH₃). (5) MP. 160~162 ℃, 与文献[9]相符.

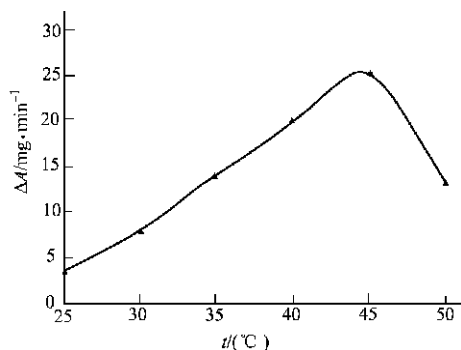


图 3 酶活性与温度的关系

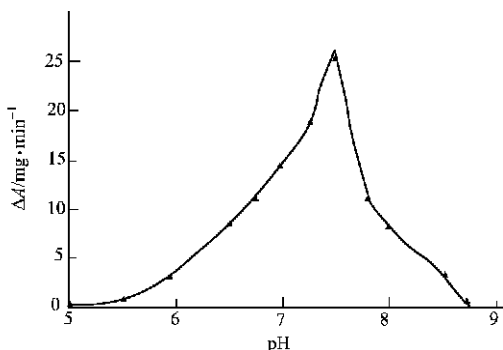


图 3 酶活性与 pH 值的关系

3 结 束 语

本文探讨了水/水溶性有机溶剂中,漆酶催化氧化对茴香胺的行为,找到了较佳的溶剂体系及其最佳反应条件.通过 HPLC 和 TLC 分离纯化产物,鉴定出产物结构为偶氮茴香醚.至于其用途,有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 王习文,詹怀宇.漆酶/介体系统生物漂白技术[J].西南造纸,2002,(3):7~10
- 2 季立才,胡培植.漆酶催化氧化研究进展[J].林产化学与工业,1997,17(1):79~84
- 3 Mayer A M, Staples R C. Laccase: New functions for an old enzyme[J]. Phytochemistry, 2002, 60: 551~565
- 4 Rodakiewicz Nowak J, Kasture S M, Dudek B, et al. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases[J]. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2000, 11: 1~7
- 5 詹东风,杜予民,钱保功.醇水介质中漆酶催化氧化漆酚及其类似物[J].高分子学报,1990,(3):327~331
- 6 杜予民,张金梅.反胶团中漆酶催化氧化性能与反应产物鉴定[J].高等学校化学学报,1995,16(5):715~718
- 7 Reinhammar B. Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*[J]. Biochim. Biophys. Acta., 1970, 205(1):35~49
- 8 何 为,詹怀宇,王习文等.一种改进的漆酶酶活检测检测方法[J].华南理工大学学报(自然科学版),2003,31(12):46~50
- 9 伊凡海耳编.汉译海氏有机化合物词典:第2册[M].中国科学院自然科学名词编订室译.北京:科学出版社,1965.318~319

Catalytic Oxidation of *P*-Anisidine with *Rhus* Laccase in Water Soluble Organic Solvents

Zhang Jinmei^① Du Yumin^②

(^①Dept. of Chem., Jinan Univ., 510632, Guangzhou, China;

^②Dept. of Environ. Sci., Wuhan Univ., 430072, Wuhan, China)

Abstract By adopting spectrophotometry, the authors inspected the performance of *Rhus* laccase catalytic oxidation in different water/water soluble organic solvent systems; and the factors influencing the reaction. It was found that *Rhus* laccase shows better activity in alcohols than in nonalcoholic organic solvent; and the number of hydroxyl groups in alcohol molecule also exerts influence on the activity of *Rhus* laccase. In water/glycerin solution where volume ratio of water and glycerin was 1:1 and temperature was around 45 °C and pH was around 7.5, *Rhus* laccase showed the highest activity, which was for better than that in pure water, with an activity ratio over 150%. Then the *p*-anisidine was catalytically oxidized with *Rhus* laccase as catalyst, the reaction product was separated and purified by HPLC and TLC. According to spectrophotometry, the main product was determined to be *p*-azoisol.

Keywords *Rhus* laccase, organic media, *p*-anisidine, catalytic oxidation

本期英文审校 李 坚