

## 醇水介质中漆酶催化氧化漆酚及其类似物\*

詹东风 杜予民 钱保功

(武汉大学资源开发与应用技术研究所, 武汉)

### 摘 要

本文作者在醇水介质中对漆酚及其类似物的酶催化氧化反应进行了研究。探讨了混合溶剂中漆酶的行为。结果发现邻苯二酚被烷基取代后更有利于漆酶的催化氧化。反应可能经过两个步骤,先是底物氧化生成黄色苯醌类物质,然后醌类中间物偶联形成多聚酚。

**关键词** 漆酶、漆酚

漆树酶 (EC1, 10, 3, 1) 是一种多酚氧化酶,它能催化氧化多元酚和多氨基苯<sup>[1-3]</sup>。对漆树酶性质的研究,以往多采用水溶性底物,而对其天然底物漆酚的催化氧化过程反而研究得较少。这可能与漆酚的水不溶性有关。对此,我们以乙醇水溶液为介质,一方面考察漆酶在混合溶剂中的行为;另一方面对漆酚及其类似物的氧化聚合反应进行研究。

## 实 验 部 分

### 1. 漆酶的制备

根据文献方法<sup>[4]</sup>,从湖北建始漆液中分离制备出可供动力学实验用的漆酶样品 ( $A_{280}/A_{615} = 15.6$ )。

### 2. 混合漆酚

用分析纯丙酮从漆液中提取漆酚,滤除粉末后,漆酚丙酮溶液经减压蒸馏(20mmHg, 50°C)除去溶剂,即得混合漆酚。

### 3. 饱和漆酚 (PDC)

以 Raney-Ni 为催化剂,参照文献对上述混合漆酚进行氢化<sup>[5]</sup>,产物经硅胶柱层析(5 × 50cm, 苯作淋洗剂)后,再用正己烷(分析纯)重结晶三次,所得饱和漆酚为白色粉末,熔点 56—57°C。

### 4. 饱和栲如酚 (PDP)

工业腰果油 (Cashew nut shell liquid) 经加热脱羧后,按饱和漆酚的制备方法加氢饱和,得到白色针状晶体,熔点 51°C。

实验中所用其它化学品均为分析纯试剂。

### 5. 漆酶活性的测定

用 Shimadzu UV300<sub>2</sub> 仪,样品池配有恒温装置。漆酶比活定义为单位时间内每克漆

\* 1988年12月19日收到,国家自然科学基金资助项目。

酶催化氧化漆酚(或邻苯二酚),使得产物在 420nm(或 400 nm)处吸光度的变化值。用  $\Delta A/\text{分钟} \cdot \text{克酶}$  表示。

## 6. HPLC 分析

取饱和漆酚 1 克溶于 80ml 40%(V/V) 的乙醇水溶液中,加漆酶 0.6mg, 摇匀后室温(12°C)反应 5 小时,然后加 1N 的盐酸 10ml 终止反应。加 50ml 乙醚萃取底物及反应产物,并用水反复洗涤至中性。减压蒸除溶剂后,产物用分析纯氯仿溶解(样品浓度 50 mg/ml), 避光保存供 HPLC 分析用。

高效液相色谱(HPLC)为日本分析仪器公司的 LC-10 型,样品分离用两根 GPC 柱(AJ2H 330, 20 × 600mm)串联进行,流动相为分析纯氯仿,流速 3ml/min, RI 检测。

# 结果与讨论

## 1. 乙醇含量对漆酶活性的影响

自然条件下酶分子通常在水中发挥其催化功能。酶活性的发挥需要酶分子具有某种特定的空间结构。影响酶分子空间结构的因素很多,如溶剂极性、离子强度、温度、pH 等等。在有机溶剂中,酶分子内的作用力有很大变化,有机溶剂常常使酶分子发生不可逆变性。因此在酶学研究中尽量避免使用有机溶剂。然而随着酶工业的发展,为简化生产程序,提高工作效率,又要求某些工业用酶能在有机溶剂或混合溶剂中进行催化,因此酶分子在有机溶剂中的行为引起人们的关注。

Spain<sup>[6,7]</sup> 和 Stevens<sup>[8]</sup> 曾指出,漆酶在 50% 的乙醇溶液中仍有活性,但未作详细报道。我们用乙醇和水按不同的比例配制成混合溶剂,分别以饱和漆酚和邻苯二酚为底物,考察了反应介质中乙醇含量对漆酶活性的影响。从图 1 看,随着介质中乙醇含量的增大,漆酶活性出现一个最大值。天然条件下,漆酶与饱和漆酚分别处于水相和油相,彼此借助漆液中的多糖和其它生物表面活性剂而均匀分散在生漆乳液中,一旦这些生物表面活性物质被除去,酶和底物不能有效结合,阻碍了酶功能的发挥。单一使用水或有机溶剂都不利于酶对漆酚的催化,而乙醇属两性溶剂,具有亲油和亲水双重功能。适量的乙醇起到了沟通酶与底物的桥梁作用。因而有助于酶活的发挥,而过量的乙醇又会使漆酶从反应体系中析出,降低酶的活力。此外选用醇水介质,较添加表面活性剂而言,简化了反应体系,便于研究。

图 1 中漆酶的活性是以反应中生成醌类物质(最大吸收波长 400—420nm)的初速度为依据的。值得一提的是反应生成的醌类物质并不稳定,最终转化为联苯酚类低聚物(最大吸收波长 280—295nm)。反应过程可能与漆酚类物质的自然氧化类似<sup>[9]</sup>,以图 2 表示。

随着乙醇含量的增大,有色醌转化为无色终产物的速度加快。图 3 示出漆酶催化氧化邻苯二酚时,产物在 400nm 处吸光度随反应时间的变化。

## 2. 醇水介质中温度对漆酶活性的影响

在 1:1 的醇水介质中,测定了不同温度下漆酶对饱和漆酚的催化活性(图 4)。反应的最适温度为 22°C, 低于最适温度该反应的温度系数  $Q_{10} = 4.3$ 。而在磷酸盐缓冲液

(0.1M, pH7.5)中,漆酶催化反应的温度系数  $Q_{10} = 1.8^{[10]}$ .

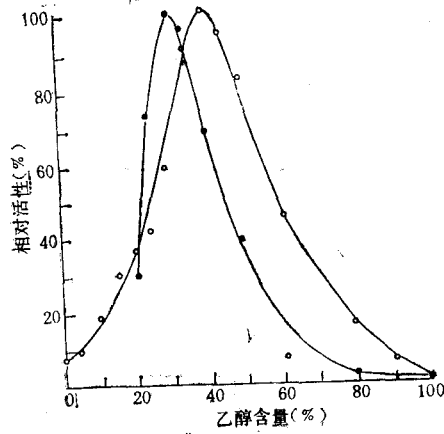


图1 反应介质中乙醇含量对漆酶活性的影响(25°C)

●以饱和漆酚为底物 ○以邻苯二酚为底物

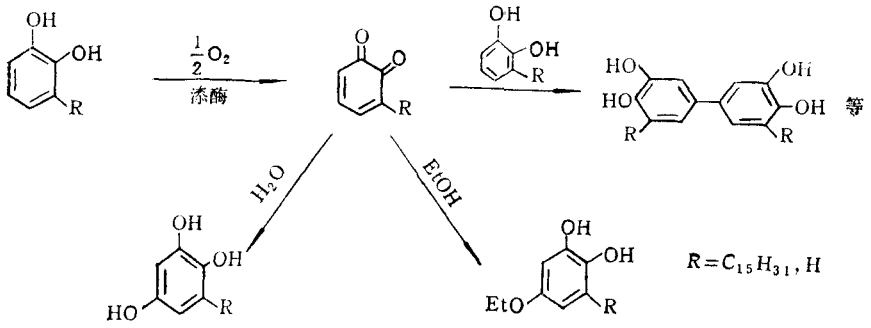


图2 醇水介质中漆酚及其类似物的酶促氧化

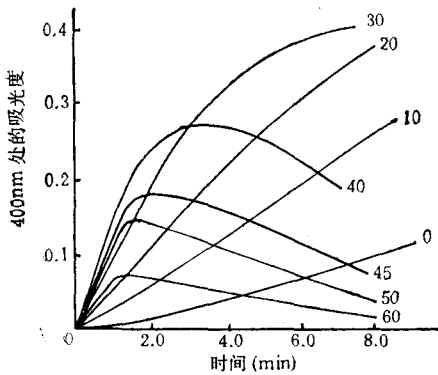


图3 漆酶催化氧化邻苯二酚的时间扫描图  
(乙醇含量标于相应的线上)  
底物浓度  $7.9 \times 10^{-3}M$ , 25°C

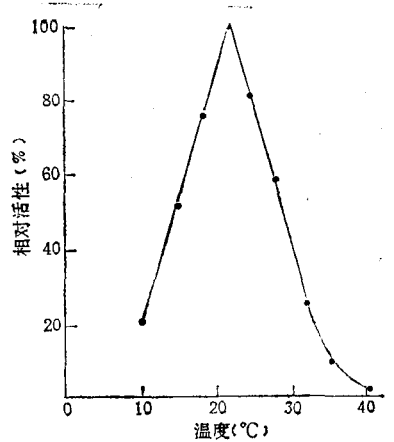


图4 乙醇水溶液中漆酶在不同温度下催化氧化饱和漆酚  
EtOH/H<sub>2</sub>O = 1/1 (V/V)

### 3. 漆酶对不同底物催化活性的差异

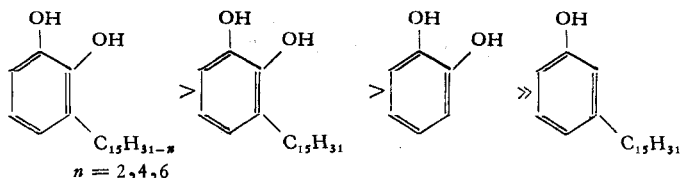
底物不同,漆酶催化反应的活性也有所不同。但反应生成的醌类物质在 400nm 附近都有最大吸收(表 1)。以表 1 所列数据作为衡量漆酶对不同底物活性的标准尽管不够严格(因为不同底物氧化生成的醌类物质在最大吸收波长处的摩尔消光系数不同),因此只作为一种定性或半定量的说明。

表 1 漆酶对不同底物的催化活性

底 物	产物最大吸收波长 (nm)	漆酶活性 (u/mg)
饱和漆酚	420	56.5
混合漆酚	420	85.2
邻苯二酚	400	1.2
饱和檀如酚	—	0

\* 底物浓度均为  $2.5 \times 10^{-3} M$  (混合漆酚平均分子量为 316)  $25^{\circ}C$ , EtOH/H<sub>2</sub>O = 30/70(V/V)。

据此得出漆酶对不同底物的催化活性顺序为:



以上结果说明漆酶不能催化氧化烷基取代的单酚,但能催化氧化邻苯二酚。当邻苯二酚被烷基取代后酶活明显增大,这与磷酸盐缓冲液中反应的情形一致<sup>[10]</sup>。如果取代基是不饱和烷基,酶活进一步增大。说明漆酶的不饱和链结构不仅在漆成膜的后期参与了自然氧化,也可能在漆酶催化

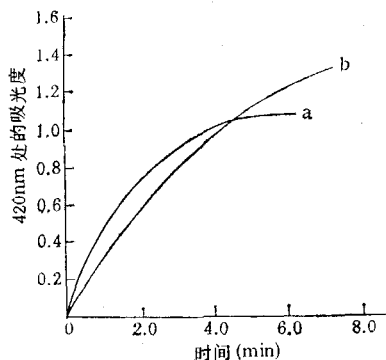


图 5 漆酶催化氧化混合漆酚(a)和饱和漆酚(b)的时间扫描图底物浓度均为  $2.5 \times 10^{-3} M$ ,  $25^{\circ}C$  EtOH/H<sub>2</sub>O = 30/70(V/V)

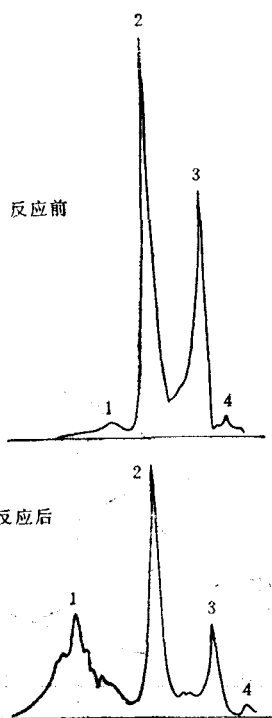


图 6 饱和漆酚氧化反应前后的 HPLC 图  
GPC 柱 (AJ2H 330,  $20 \times 600mm$ ) 流动相: 氯仿;  
流速: 3ml/min; RI 检测

过程中具有某种协同作用。

从反应速度的变化看, 尽管混合漆酚氧化生成漆酚醌的速度大于饱和漆酚, 但前者生成有色醌的速度随反应的进行迅速减慢 (图 5), 这有待于进一步研究。

对饱和漆酚与混合漆酚氧化产物的紫外和可见光谱进行比较发现, 随着反应的进行, 饱和漆酚的氧化产物在 600nm 附近出现一个新的吸收峰, 而混合漆酚的氧化产物则没有<sup>[11]</sup>。说明二者不仅在氧化速度上有差异, 可能在氧化偶联的方式及产物结构上有所不同。

借助高效液相色谱对饱和漆酚催化氧化前后分子量的变化进行了初步考察(图 6)。图 6 中峰 1 是漆酚聚合体。峰 2 是饱和漆酚。峰 3 是溶剂峰, 也有少量漆酚单体。峰 4 完全是溶剂峰<sup>[12]</sup>。反应前峰 1 与峰 2 之比为 0.06, 反应 5 小时后增至 1.35。聚合体由反应前的 3.48% 增加到反应后的 47.09%。

### 参 考 文 献

- [1] Omura, T., J. Biochem. (Tokyo), 1961, 50, 264.
- [2] Nakamura, T., Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30, 44.
- [3] Benfield, G. et al, Phytochem., 1964, 3, 79.
- [4] Reinhammar, B., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 205, 35.
- [5] 陈泽民、郭明高, 分析化学, 1980, 8(6), 509.
- [6] Spain, W. C., J. Immunol., 1922, 7, 179.
- [7] Spain, W. C. J. Immunol., 1927, 13, 93.
- [8] Stevens, F. A., J. A. M., 1945, 127, 912.
- [9] Balint, A. V. et al, Analyt. Biochem., 1975, 66, 340.
- [10] 詹东风、杜予民、钱保功, 全国高分子学术报告会预印集, 1987, p 503.
- [11] 詹东风、杜予民、钱保功, 国际水溶性高分子学术讨论会论文摘要集, 1988, 132.
- [12] 杜予民, 林产化学会林木提取物化学与利用学术讨论会, 1986.

## OXIDATION OF URUSHIOL AND ITS ANALOGUES CATALYSED BY RHUS VERNICIFERA LACCASE IN AQUEOUS SOLUTION OF ETHANOL

ZHAN Dongfeng, DU Yumin and QIAN Baogong

(Institute of Resource Development and Applied Science, Wuhan University, Wuhan)

### ABSTRACT

Laccase-catalytic oxidations of urushiol and its analogues have been investigated in various aqueous solutions of ethanol. Alkyl substituted pyrocatechol will favor the enzymatic oxidation. The results suggest that the reaction consists of formation of yellow quinones and then coupling of them to produce polyphenylphenols.

**Key words** Laccase, Urushiol