超声辐照对酶促反应影响的研究进展*

肖咏梅[1†] 赵 贞[1] 毛 璞[1] 王 伟[2]

(1 河南工业大学化学化工学院 郑州 450001)

(2 河南天方药业股份有限公司 驻马店 463003)

摘要 综述了超声辐照对于酶活性和酶催化反应的影响,以及各种超声参数对反应的影响,并展望了超声辐照在酶促反应中的应用前景。

关键词 超声辐照,酶活性,酶催化反应

A review on effects of ultrasound treatment on the reactions catalyzed by enzymes

XIAO Yong-Mei[1] ZHAO Zhen[1] MAO Pu[1] WANG Wei[2]

(1 *College of Chemistry&Chemi-engineering , Henan University of Technology , Zhengzhou* 450001)

(2 *Henan Topfond Pharmaceutical Co. Tld , Zhumadian* 463003)

Abstract The effects of ultrasound on activity of enzymes and velocity of the reactions catalyzed by enzymes are reviewed in this paper. The effects of ultrasound parameters such as power, ultrasonic frequency and reaction time are also discussed. The prospect of the application of ultrasound in the enzymes catalysis reactions is presented.

Key words Ultrasound, Enzyme activity, Enzymes catalysis reaction

1 引言

所谓超声化学,就是利用超声波来加速物质的化学反应或启动新的反应途径或改善其溶解、结晶、分配等物化性能,以提高化学反应产率或获得新的化学反应物质、提高物质的分离、提取效率。

随着声化学的蓬勃发展,超声在各研究领域的应用越来越多,超声作用应用于酶促反应的研究也引起了关注。超声作为一种环保型方法,广泛地用于有机合成中以提高反应速率和反应的选择性[1],包括可应用于酶方面[2]。超声波对酶的作用很复杂,超声处理的条件和强度不同,会激活或者钝化酶的催化作用;酶性质不同也会产生不同的作用,不同的酶在相同超声条件下会有不同的表现。本文对于超声辐照作用于酶促反应时对酶活性、反应速率、酶催化选择性等的影响以及不同超声参数

2008-04-28 收稿; 2009-01-12 定稿

* 河南省基础与前沿技术研究课题[072300420070];2008 年度河南省科技攻关项目[82102330014]。

作者简介:肖咏梅(1969 -),女,郑州市人,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:超声促进非水介质中的酶促反应。

赵贞(1983 -),女,河南工业大学硕士研究生。 毛璞(1965 -),男,副教授,硕士生导师。

王伟(1957 -),男,高级工程师。

† 通信联系人 E-mail:xuewu319@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对于反应的影响的研究进展做一综述。

2 超声对酶活性的影响

大量的研究表明:超声作用对酶的活性有影响,选择适宜的超声处理条件可提高酶促反应速度。

1996年,Barton[3]等人在研究中发现,功率为60W的超声波可以激活任意底物浓度下的淀粉酶和葡萄糖淀粉酶;α-淀粉酶催化淀粉水解的速度经超声处理后提高了50%。超声辅助从新鲜番木瓜中提取木瓜蛋白酶,在超声功率300W、频率20kHz、时间200s条件下,酶活力是未经超声处理的1.71倍。研究外加超声条件下玉米秸秆的纤维素酶水解,结果表明超声可有效地提高纤维素酶的催化活性。玉米秸秆的酶解得率比未加超声波时提高了48.3%[4]。

超声波应用于固定化酶的活化也早有研究。固定化脂肪酶催化的酯交换反应速度可经超声处理提高。Ishimori[5]利用超声处理固定化葡萄糖氧化酶时发现,超声作用时酶表现出活性,停止时,酶的活性消失。频率为20 kHz、功率为20 W的超声波可促进固定化菊糖酶的催化作用,对促进经超声波作用发酵后生产的菊糖酶的作用更为明显,以蔗糖为底物的酶活力提高了60%[6]。

有些文献也报道了当改变超声处理条件,如频率、功率、处理时间等,酶活性有可能被钝化。ZhongM T[7]报导,胰蛋白酶活性随着超声波功率从100~500W变化以及处理时间(1~20 min)的延长,呈降低趋势。有报道,在温和的超声条件下作用某些酶,也会导致酶活力的降低,用20 kHz的超声波处理过氧化物酶3h后酶活力下降了90%[8]。

3 超声对酶催化反应速率以及选择性的影响

大量文献报道超声辐照对于酶催化反应具有促进作用。早在1991年Vulfson[9]等人研究在超声辐照下枯草杆菌蛋白酶催化转酯化合成N-酰基-苯基丙氨酸乙酯时,就发现超声作用对于该反应具有明显的促进作用。连续超声与反应前超声预处理酶相比,前者反应速率更快。以不同的醇类和水作为溶剂发现,枯草杆菌蛋白酶在有机溶剂中比在水中具有更高的稳定性。

吴虹[10]等人探讨了超声对无溶剂体系中固定化脂肪酶Novozym435催化废油脂转酯反应的促进作用。研究了超声功率、超声处理方式等对酶反应速度及酶操作稳定性的影响。结果表明:对酶进行适宜的超声预处理(20kHz,80 W,30min)能显著提高酶催化转酯反应的速度;经超声预处理的Novozym 435有良好的操作稳定性,反应10批次后,酶活下降甚微。超声条件:酶超声预处理时间分别为:10,20,30,40,60min;超声功率为40,60,80,100W。

Yong-mei Xiao[11]等人报道了在超声作用下非水介质中酶催化合成葡萄糖酯,并与振荡作用下的反应进行了对比。探讨了溶剂、酶、酰基供体链长、超声功率以及间歇超声作用对酶促酯化反应的影响。在所选的八种溶剂中,无论是在超声作用还是震荡作用下,吡啶都是碱性的枯草杆菌蛋白酶的最佳溶剂。在超声加速Novozym435和碱性枯草杆菌蛋白酶催化的酯交换反应时,反应速率随着酰基供体链长的增长而降低。在研究超声功率(50,100,120W)和不同超声方式(连续超声、10/20min超声)对反应的影响时发现:高功率的超声和连续超声可以加速反应,超声作用没有影响酶的特性以及选择性。

Zhi-Gang Chen[12]等比较了超声和振荡两种形式,在叔丁醇中Novozym 435酶催化乙烯酯酰化魔芋葡甘露聚糖(KGM)反应中的促进作用。在超声或振荡中,Novozym 435在所选择的13种酶中都表现出最高的酰化KGM的活性。超声辐射代替振荡则可以提高酰化反应的初速度、产率和KGM的取代度。超声强度选择为20,40,60,80,100和120 W,在适当的超声强度(100 W)和水活性(0.75)可以加速该酶促反应。Novozym 435催化酰化产物随

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酰基供体链长的增长而下降。而且在叔丁醇中,KGM 的酰化产物选择性的发生在 C_6-OH 上,超声作用也没有改变 Novozym 435 催化酰化作用的选择性。

Yang K[13]等人报道了超声预处理底物对于脂肪酶催化有机溶剂中纤维素的酰化反应的影响。将纤维素溶解在二甲亚砜或多聚甲醛中,以黑曲霉中得到的脂肪酶 A12 来催化反应。超声预处理可以使底物分子尺寸减小从而加速反应,使酰化率提高了 14%。

Sang Hyun Lee[14]等人研究发现超声辐照对于离子液体中酶促反应也具有促进作用。在超声作用下,以月桂酸乙烯酯或月桂酸为酰基供体脂肪酶催化酯化葡萄糖,其酶活性增加了 1.4 倍。超声辐照可以提高蔗糖在粘稠的离子液体中的溶解度,增加酶活性部位的传质效率和释放产物的速率,从而提高酶活性和该酶促反应速率,并且没有破坏酶的稳定性。

以上研究说明适宜的超声条件对于酶催化下的酯化,转酯化等反应具有明显的促进作用,对反应加以超声作用可以大大缩短反应时间或者提高反应产率。

关于超声对酶催化水解反应的影响也同样有大量研究。在适宜的超声参数作用下,也可以加速酶催化水解反应。Ribeiro[15]等人研究在超声辐照下酶催化水解 3-羟基-3-苯基丙酸乙酯,发现在超声条件下对比磁力搅拌条件下,可以缩短反应时间。在所选用的三种酶催化中,反应时间都缩短了一半,而没有改变对映体异构选择性和酶的活性。在研究超声辐照加速酶催化水解固体皮革废品,当底物浓度为 10g/L 时,超声作用可使水解速率增加 31.1%[16]。Wang LF[17]等人用中性蛋白酶和高强度超声分离来米淀粉。发现酶在超声下,活性没有被破坏。在 50% 振幅的超声辅助下,用蛋白酶分离淀粉时,产率提高 30%。Yaxuan Liu[18]等人研究了超声对无溶剂体系中脂肪酶催化水解大豆油的影响。在最适反应条件下,超声作用下可使该酶催化水解反应速率较振荡条件下提高两倍。

在温和超声条件下用转化酶催化水解蔗糖,随着超声强度增强转化酶的活性增大。在蔗糖浓度较低时,控制温度在 25℃,pH =4,转化酶活性可以达到 130%,反应速率明显提高[19]。

超声作用对于酶促反应的影响依赖于反应中酶的活性的变化,反应酶活力的表现必须依赖酶分子的构象。超声作用提高酶活的原因可能有两种:(1)超声波产生的微流效应可能促进底物迅速进入酶的催化部位及产物进入介质,从而提高了酶的催化效率;(2)超声的空化作用所产生的冲击波改变酶分子的构象,从而影响酶促反应的进程。

4 超声参数对反应的影响

4.1 超声功率的影响

研究表明,不同的超声功率对酶促反应具有不同的影响,选择适当的超声功率可以大大加速酶催化反应的速率。

Novozym 435 酶催化乙烯酯酰化魔芋葡甘露聚糖(KGM),超声功率为 20W ~ 120W,当功率低于 100W 时,随着超声功率的增大,反应速率明显增大,产率由 82.5% 增加至 96.1%;而当功率高于 120W 时,反应速率开始下降,产率降至 90.2%[20]。

在超声波条件下 α-淀粉酶降解壳聚糖,和没有超声作用(即超声功率为 0W)时相比,30W、60W、90W 的超声功率能够促进 α-淀粉酶对壳聚糖的降解,并且 30W 时增加降解速率的作用最大,而 120W 时,降解速度反而比无超声条件时还低。降解时间相同时,随着超声功率的提高,降解速率增大;但是当功率较大时,降解速率随功率的增加而增加幅度变慢,尤其是降解时间较长的情况[21]。

超声辐照用于促进有机相中脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应时,对固定化酶 Lipozyme,反应 6h 后,在超声条件下的酶反应转化率为对比实验的 4.5 倍;而在同样条件下,游离酶 CCL 催化酯化反应的转化率仅为对比实验的 2.8 倍。超声功率低于 72W 时,反应 6h 后的转化率随超声功率的提高而增大;当超声功率提高到 96W 时,酶反应的初速

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度虽然大大高于超声功率为 72W 时的值,但反应 2h 后转化率几乎没有提高,且酶从固定化载体上脱落并失活,可见低强度的超声辐照才具有促进有机相酶反应的作用[22]。

超声功率对反应速率的影响,对于不同的酶存在一个最适功率值,当低于该值时,可能是由于在超声波的驱动下,酶与反应液中的底物和产物分子接触次数大为增加,同时产物的释放也加快,从而使反应速率增加;而当超声功率高于该值时,反应速率反而会下降。这可能与超声功率过高时,空化效应使得反应温度升高而可能导致酶失活有关。

4.2　超声频率的影响

不同的超声频率对于酶活性以及酶催化反应速率都有影响。

黄卓烈[23]等用微超声处理酵母过氧化氢酶(CAT)和多酚氧化酶(PPO),结果表明,在一定参数范围内 CAT 和 PPO 活性都升高。在 CAT 中,用 4 种频率,40W/cm^2 的超声作用 10min 后,12.5kHz、13.5kHz 和 16.5kHz 超声作用都能使酶活性升高,其中,13.5kHz 的作用效果最好。但当使用 18.5kHz 时,CAT 活性却比对照下降了 18.52%。在 PPO 中,在使用的 4 种频率都使酶活性比对照升高,但效果最好的是 13.5kHz,这种频率处理的酶活性比对照升高了 103.24%。

Suchkova[24]等人作了低频率超声加速酶催化纤维蛋白溶解的研究,发现频率在 27、40、100 kHz 的超声作用可以显著加速纤维蛋白溶解,其中以 27 kHz 时效果最好。在连续超声下,最好的效果可使纤维蛋白溶解率提高约 60%。

在超声波促进脂肪酶水解橄榄油反应的研究[21]中发现,超声作用对该水解反应具有促进作用,且超声频率对脂肪酶活力的影响较大。超声频率为 20 kHz 时,酶活力比对照值提高 39 %,而超声频率为 40 kHz 时,酶活力低于对照值。

超声辐照的频率对于某一种特定的酶和特定的反应也存在一个最适值,在该值时酶活最大,反应速率加快,效果最好,而超声频率低于或高于此值时,酶活和反应速率都相对较低。

4.3　超声作用时间的影响

以玉米油、乙醇和 Lipozyme TL IM 脂肪酶为主要原料,采用声酶法合成生物柴油,随着超声时间的增长产率不断增大,反应前 3h 时,产率随时间延长增加的幅度大,而当反应时间大于 3h 后,产率增加逐渐趋于平缓[25]。

肖琼[4]等人研究纤维素酶水解玉米秸秆,经超声波辐射后酶解得率较未加超声波的酶解得率有大幅度提高,超声 5、10、20、30、40 min 的酶解得率分别为 12.0%、14.4%、14.7%、15.4%和 13.2%,比未加超声波的酶解得率(6.41%)提高了 87.5%、125%、130%、141%和 106%。在超声功率 30W 条件下,随着超声波处理时间的延长,酶解得率呈上升趋势,在超声时间 30 min 时达到最大值,此后有所下降。

从众多文献中比较发现,超声时间对酶促反应的影响较超声功率和超声频率等因素的影响小,反应产率一般随着超声时间的延长而增加,但是到一定时间后,产率增加会趋于平缓或稍有下降。

5　结语

超声波是一种物理波,具有高效、廉价、无污染等特点,特别适合现代工业、农业和生物医药中应用。超声辐照对于酶活性以及酶催化反应的影响已经受到广泛关注。以上研究都说明适当的超声条件可以促进酶促反应,显示出了将超声作用于酶促反应,对于提高酶促的反应速度,节约能源和资源等都有着重要的意义。

超声辐照对酶的作用很复杂。不同的酶分子有不同的立体构象,而相同的酶分子在不同的环境条件下立体构象也会不同。所以在超声辐照处理同一酶促反应的时候,不同的条件下得到的结果会不相同,甚至相反。同样的,在同一超声参数下处理不同的酶促反应,其表现也会不同。这是由不同种类的酶适应能力和超声参数的大小决定的。所以在适宜

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的超声辐照可提高酶的活性,加速有机相中的酶促反应。但是超声强度过大时,又有可能降低酶活力甚至造成酶的失活,降低反应产率。现有的研究展示了超声在酶催化技术中具有令人鼓舞的应用前景。

但是对于超声对酶催化反应影响的研究仅是刚刚起步,超声在酶学中的研究大部分仅限于酶在超声下活性的研究,而对在化学合成反应中酶活性和选择性的研究很少,对超声作用于酶的机理、超声对酶催化选择性的影响和最佳超声条件都存在很大的研究空间,超声作用于酶促的机理、超声-酶-反应动力学和超声-酶-产物结构等的关系都存在很大的研究空间,有待于我们进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Nüchter M, Ondruschka B, Jungnickel A, et al. Organic processes initiated by non-classic alenergy sources. Journal of Physical Organic Chemistry, 2002, 13(10) 579-586.

[2] Gupta M N, Roy I. Enzymes in organic media: Forms, functions and applications. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(13): 2575-2583.

[3] Barton S, Bullock C. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18(3): 190-194.

[4] 肖琼,姚春才,勇强等. 玉米秸秆超声辅助酶水解. 南京林业大学学报(自然科学版),2007,31(4): 85-88.

[5] Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. Ultrasound sensitive enzyme-membrane. Applied Microbiology and Biotechnology, 1981, 13(4): 197-201.

[6] 林影,高大维,李国基等. 超声波对菊糖酶催化作用的影响. 华南理工大学学报(自然科学版),1997,25(9): 142-144.

[7] ZhongM T. Ming X W. Su PW. Ju Q K. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. Ultrasonic Sonochemistry, 2004, 11(6): 399-404.

[8] Raviyan P, Zhang Z, Feng H. Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. Journal of Food Engineering, 2005, 70(2): 189-196.

[9] Evgeni N. Vulfson, Douglas B. Sarney, Barry A. Law. Enhancement of subtilisin-catalysed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation. Enzyme and Microbial Technology, 1991, 13(2): 123-126.

[10] 吴虹,宗敏华,娄文勇等. 超声作用下的酶促废油脂转酯反应. 华南理工大学学报(自然科学版),2006,34(5): 68-71.

[11] Xiao Yong-mei, Wu Qi, Cai Ying, et al. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. Carbohydrate Research, 2005, 340: 2097-2103.

[12] Chen Zhi-Gang, Zong Min-Hua, Gu Zhen-Xin, et al. Effect of ultrasound on enzymatic acylation of konjac glucomannan. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2007, 10: 1-6.

[13] Yang K, Wang YJ, Kuo MI. Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase-catalyzed cellulose acetylation in organic media. Biotechnology progress, 2004: 20(4): 1053-1061.

[14] Sang Hyun Lee, Hiep Minh Nguyen, Yoon-Mo Koo, et al. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. Process Biochemistry, 2008, 43: 1009-1012.

[15] Carlos Magno R. Ribeiro, Elisa N. Passaroto, Eugenia C. S. Brenelli. Ultrasound in enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate. Tetrahedron Letters, 2001, 42: 6477-6479.

[16] Song Jian, Tao Wen-yi, Chen Wu-yong. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. Journal of Cleaner Production, 2007, 2: 1-7.

[17] Wang LF, Wang YJ. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. Journal of cereal science, 2004, 39(2): 291-296.

[18] Liu Ya-xuan, Jin Qing-zhe, Shan Liang. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(4): 402-407.

[19] Sakakibara. M, Wang. D, Takahashi. R, et al. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18: 444-448.

[20] 黄永春,谢清若,容元平. 超声作用下淀粉酶降解壳聚糖的研究. 食品科技,2006,10: 74-77.

[21] Valentina Suchkova, Edwin L. Carstensen, Charles W. Francis. Ultrasound Enhancement of Fibrinolysis at Ferquencies of 27 to 100 KHz. Ultrasound in Medicine and Biology, 2002, 28(3): 377-382.

[22] 宗敏华,杜伟,李慧青等. 超声辐照对有机相脂肪酶催化酯化反应的促进. 华南理工大学学报(自然科学版),2000,28(3): 101-104.

[23] 黄卓烈,林茹,何平等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响. 中国生物工程杂志,2003,23(4): 89-93.

[24] 马歌丽,董文惠,张勇等. 超声波对脂肪酶酶学特性的影响. 现代食品科技,2007,23(8): 17-19.

[25] 胡爱军,郑捷. 声酶法合成生物柴油的比较研究. 声学技术,2007,26(2): 243-247.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net