

秦皮甲素酰化反应中脂肪酶诱导剂对全细胞催化行为的影响及其产物结构鉴定

赖学能, 李晓凤, 赵光磊

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文探讨了一种合成黄酮酯的新方法。利用不同的诱导培养基, 培养 6 株不同来源的脂肪酶高产菌株, 并制备成全细胞催化剂, 在以吡啶为反应溶剂体系中催化秦皮甲素与丙酸乙烯酯反应。研究表明, 只有 2 株具催化秦皮甲素丙酰化活性的菌株, 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* GIM 1.46 和施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* GIM 1.273, 其中施氏假单胞菌显示出更高的催化活性。在基础培养基中分别添加大豆油、Tween 80、葡萄糖, 首次探究了不同脂肪酶产酶诱导剂对所获得的全细胞诱导合成的影响。含大豆油的培养基制备的施氏假单胞菌全细胞催化剂活性最高, 其催化秦皮甲素丙酰反应 48 h, 转化率为 47.9%。反应产物分离纯化后进行了结构鉴定。质谱、¹³C NMR 结果表明, 全细胞可催化秦皮甲素-6'-羟基发生酰化反应, 所得产物酯为秦皮甲素-6'-O-丙酯, 区域选择性达 99%。

关键词: 黄酮酯; 全细胞催化; 施氏假单胞菌; 秦皮甲素; 诱导剂

文章编号: 1673-9078(2015)7-37-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.007

Effect of Lipase Induction on Whole-cell Biocatalyst Behavior during Esculin Acylation and Structural Identification of Products

LAI Xue-neng, LI Xiao-feng, ZHAO Guang-lei

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A novel method to synthesize flavonoid ester was explored. Different induction media were used to culture six strains for high-yield lipase production. The whole-cell catalyst was prepared and used to catalyze the reaction of esculin and vinyl propionate with pyridine as the reaction solvent. The results indicated that two strains, *Pseudomonas aeruginosa* GIM 1.46 and *P. stutzeri* GIM 1.273, showed the ability to catalyze the propionylation of esculin, with *P. stutzeri* GIM 1.273 showing the highest catalytic activity. The effect of different lipase inducers on biomass and catalytic activity of the whole cells was investigated by adding soy oil, Tween 80, or glucose into the screening culture. The results showed that *P. stutzeri* GIM 1.273 cultivated in a medium containing soy oil exhibited the highest activity, where conversion rates for esculin propionylation reached 47.9% after 48 h. The products were purified and structurally identified using mass spectrometry (MS) and ¹³C-nuclear magnetic resonance (¹³CNMR) spectroscopy, which showed that the whole cells catalyzed the acylation of 6'-OH in esculin, the resulting product was esculin-6'-O-propionate, where the regioselectivity reached 99%.

Key words: flavonoid ester; whole cell catalysis; *Pseudomonas stutzeri*; esculin; inducers

黄酮类化合物具有多种活性, 在食品、化妆品等行业有着广泛应用。研究发现其溶解性与碳环和糖苷链上存在多个羟基及其他功能基有关^[1]。研究表明, 通过对黄酮类化合物的酰化修饰可以有效提高其脂溶性, 但是采用常规化学法进行酰化反应时, 选择性较

差, 且反应过程中往往结合或屏蔽了黄酮类化合物的主要官能团酚羟基, 故尽管产物的脂溶性增加但其功能性却降低了。若能对此类化合物的羟基进行选择性酰化, 则可以在提高其脂溶性的同时, 避免过多的功能基参与反应而导致本身功能性的降低甚至丧失。

利用化学法对黄酮进行选择性的酰化修饰一般要经过基团保护、酯化、脱保护基团等处理, 此类方法步骤繁杂, 引入溶剂较多。有研究表明, 利用酶法催化黄酮类化合物的酰化反应可以避免上述这些问题。酶法不仅具有高效、区域选择性, 且具有环境友好, 操作简单等特^[2]。然而, 研究同时发现, 酶促反

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(31270636); 广东省自然科学基金(S2013010012486); 新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-12-0192)

作者简介: 赖学能(1991-), 男, 硕士, 研究方向为全细胞催化

通讯作者: 李晓凤(1977-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为多羟基化合物的结构修饰

应也存在稳定性差,成本高等缺点。与酶催化反应相比,全细胞催化反应也具有高效区域选择性、绿色环保等特点。此外,该方法还具有很多独特的优点,例如全细胞催化剂较之纯酶更易于回收利用;全细胞本身可以给酶提供一个天然环境从而更有利于酶的稳定;全细胞中存在多酶体系与辅酶因子,可避免外源添加这些物质,并适用于多步复杂反应等等^[3]。目前,全细胞催化已经用于多种酯化反应的研究,包括拆分天然化合物、风味物质的产生、合成生物柴油、抗癌药物制备等方面^[4]。

基于上述研究现状,本研究首次把全细胞催化技术应用用于黄酮酯类化合物的催化制备,以秦皮甲素(图1)酰化反应为模型反应,从筛选具有催化柚皮苷酰化的微生物菌株着手,选择了6株高产脂肪酶的菌株包括2霉菌、4株细菌,并探讨了含不同诱导剂培养的菌株在有机溶剂中催化秦皮甲素酰化的可行性;并通过质谱、核磁共振等技术对所制备的黄酮酯类产物进行了结构鉴定,进一步确定了全细胞催化剂在该反应中的选择性催化位点。

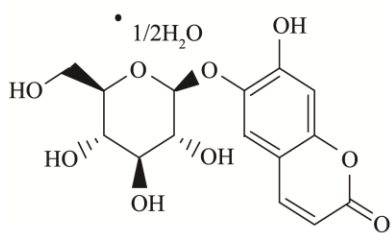


图1 秦皮甲素分子结构图

Fig.1 Structure of esculin

1 材料与方法

1.1 材料

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* GIM 1.46、施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* GIM 1.273、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* GIM 1.209、洋葱假单胞菌 *Pseudomonas cepacia* GIM 1.139、华根霉 *Rhizopus chinensis* GIM 3.144、米根霉 *Rhizopus oryzae* ATCC 96382, 华南理工大学食品安全与检测中心保藏菌种。

秦皮甲素半水合物购自日本 TCI 公司;丙酸乙烯酯(VP),购自 Sigma;甲醇,天津市科密欧化学试剂公司,色谱纯;酵母浸膏,营养肉汤,广东环凯微生物科技有限公司;大豆油,南海油脂厂;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 主要仪器设备

Waters 高效液相色谱仪,配备 600 控制器、2996 光电二极管阵列检测器、717 Plus 自动进样器。色谱柱:4.6×250mm(5μm) Zorbax SB-C18 分析型色谱柱(Agilent Technologies Co, Ltd, USA);液相色谱-质谱联用仪,型号:7890A/5975C,美国安捷伦公司;Bruker AV600 型核磁共振仪,瑞士布鲁克公司;全温摇瓶柜:HYG-A 太仓市实验设备厂;洁净工作台:SW-CF-IF 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;真空冷冻干燥机:LGJ-10D,北京四环科学仪器厂有限公司;TW-3021HR 冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;高速离心机,Thermo;YXQ-LX 立式压力蒸汽灭菌锅;HZQ-F100 全温气浴振荡培养箱。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种培养方法

细菌和酵母在营养肉汤培养基中活化 24 h,活化之后以 5% 的接种量(V/V)接种到不同的诱导培养基中,180 r/min,30 °C,摇瓶培养 48 h。霉菌用 PDA 活化 1 次,30 °C,60 h 后,用无菌水溶解孢子,把孢子悬浮液接种到筛菌培养基中,30 °C,180 r/min 培养 48 h。基础培养基 BM:0.5% 酵母浸膏,0.5% 硫酸铵,0.1% 磷酸氢二钾,0.02% 的硫酸镁。诱导培养基一(SM-1):BM+0.5% 大豆油,诱导培养基二(SM-2):BM+0.5% Tween 80,诱导培养基三(SM-3):BM+0.5% 葡萄糖。

1.3.2 全细胞催化剂制备方法

摇瓶培养 48 h 后,细菌在 10,000 r/m 离心 5 min 弃去上清液得到湿菌体,霉菌过滤除去培养液得到湿菌体。湿菌体用蒸馏水洗涤两次除去残留的培养基,-45 °C 真空冷冻干燥 24 h 获得冻干菌体即为细菌或霉菌全细胞催化剂。4 °C 条件下储存备用。

1.3.3 微生物全细胞催化秦皮甲素丙酰化反应

在 10 mL 带塞三角瓶中加入 2 mL 吡啶、60 mmol 黄酮类化合物、1200 mmol 丙酸酸乙烯,混合均匀。加入 80 mg 全细胞催化剂开始反应,置于气浴恒温摇床上振荡(40 °C,180 r/min)。定时取样 20 μL,用 60% 甲醇-水溶液稀释 50 倍,15,000 r/m 离心 5 min 后取上清液,供液相色谱分析。

1.3.4 反应初速度和转化率的计算

1.3.4.1 初速度 V_0 值

根据反应初始阶段单位时间内黄酮类化合物的减少量来计算初始反应速度:

$$\text{反应初速 } V_0 = \frac{A - A_0}{t}$$

其中: A、 A_0 分别表示反应前后黄酮类化合物的浓度

(mmol/L), t 为反应时间 (h)。

1.3.4.2 底物转化率

根据底物的反应前后黄酮类化合物峰面积的差值与反应前黄酮类化合物峰面积的比值来计算转化率:

$$\text{转化率}C\% = \frac{S - S_0}{S_0} \times 100\%$$

其中: S 、 S_0 分别表示反应前后黄酮化合物或者柚皮苷的峰面积。

1.3.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析

仪器: Waters 高效液相色谱仪; 配备 PDA 紫外检测器; 检测波长为 336 nm。色谱柱: 4.6×250 mm, 5 μm , Zorbax SB-C18 分析型色谱柱。分析条件: 60% 甲醇-水溶液 (含 0.1% 乙酸); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

1.3.6 产物分离纯化与结构鉴定

含有机溶剂介质的反应混合物 10,000 r/min 离心除去菌体, 所得反应液经过真空减压蒸馏后得黄褐色糖浆状粗产物, 将其溶于一定量的甲醇中, 缓慢升温至其完全溶解, 离心 (15,000 r/min) 后取出上清液, 在 GF 254 100×200 mm 的硅胶板上点样 3 次, 每次 1 μL 。以氯仿/甲醇/水(8/2/0.3, V/V/V)为层析液, 薄层层析结束后, 于 254 nm 紫外灯下观察产物及底物条带, 收集含有产物的硅胶颗粒, 用 30 mL 甲醇分三次溶解产物, 离心取上清液, 真空干燥 12 h 得到秦皮甲素丙酯或者柚皮苷丙酯。

产物经纯化后用氘代 DMSO 作溶剂, 600 MHz 下用核磁共振碳谱 ($^{13}\text{C-NMR}$) 检测其结构。

2 结果与讨论

2.1 含大豆油组分培养基培养的微生物细胞

在秦皮甲素酰化反应中的催化行为

全细胞催化本质上是细胞连接/胞内脂肪酶起的催化作用。脂肪酶 (lipase, EC 3.1.1.3), 全称为三酰基甘油水解酶, 是一类能够将长链脂肪酸甘油酯水解成脂肪酸和二甘酯、单甘酯或甘油的生物酶。很多脂肪酶在非水有机溶剂中可催化一些在水溶液中本不可进行的反应包括酯化反应、转酯反应、多肽合成、转硫酯反应等并且可以具有一定的化学选择、区域选择性或者对映体选择性^[5]。微生物是脂肪酶最重要的来源, 目前超过 2% 的微生物产脂肪酶, 包括 65 个属的微生物, 其中 4 个放线菌属、10 个酵母属、23 个真菌属、28 个细菌属^[6]。产碱杆菌属、假丝酵母属、芽孢

杆菌属、曲霉属、根霉属、毛霉属特别是假单胞菌属等细菌、酵母或真菌都可以产脂肪酶。因此, 这些微生物是制备全细胞催化剂的重要选择。

对于不同的微生物全细胞, 能够产生胞链接酶的数量、种类以及活性都不同。考虑到从高产脂肪酶的菌株中筛选具有催化酯化活性的全细胞菌株可能性更大, 本研究选用四株假单胞菌, 分别为铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* GIM 1.46、施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* GIM 1.273、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* GIM 1.209、洋葱假单胞菌 *Pseudomonas cepacia* GIM 1.139; 2 株霉菌, 分别为华根霉 *Rhizopus chinensis* GIM 3.144、米根霉 *Rhizopus oryzae* ATCC 96382, 以此制备成全细胞催化剂, 并首先探讨了培养基中不同碳源组分对全细胞催化剂细胞生长量的影响。

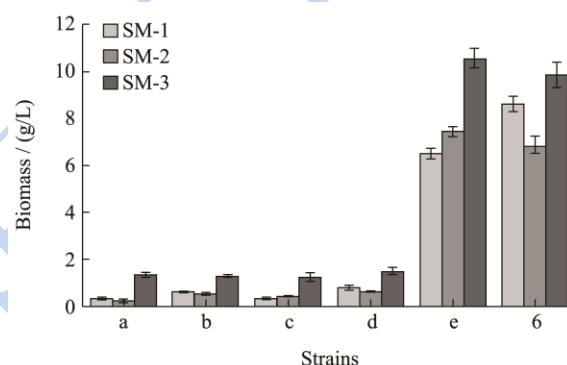


图2 培养基中诱导剂组分对细胞生长量的影响

Fig.2 Effect of inducers in medium on cell biomass

注: a 为 *Pseudomonas stutzeri* GIM 1.273, b 为 *Pseudomonas aeruginosa* GIM 1.46, c 为 *Pseudomonas fluorescens* GIM 1.209, d 为 *Pseudomonas cepacia* GIM 1.139, e 为 *Rhizopus chinensis* GIM 3.144, f 为 *Rhizopus oryzae* ATCC 96382。

大多数脂肪酶是诱导酶, 在培养基中添加用不同碳源作为诱导剂无论是对全细胞的生物量以及全细胞脂肪酶催化反应活性都有重要影响^[7]。从图 2 中可以看出, 含大豆油的 SM-1 培养基获得的细菌的生物量普遍偏低, 都在 1.0 g/L 以下, 生物量最低的是施氏假单胞菌, 只有 0.34 g/L。而霉菌生物量都很高, 华根霉 *R. chinensis*、米根霉 *R. oryzae* 的生物量分别为 6.50g/L、8.62 g/L。霉菌在含土温 80 的培养基 SM-2 中依然保持较高的生物量, 华根霉 *R. chinensis* 生物量增加了 0.93 g/L, 米根霉 *Rhizopus oryzae* 生物量却降低了 1.8 g/L。细菌的生物量依然很低, 不同细菌的生物量略有增减, 但变化不大。用含葡萄糖的 SM-3 培养基培养的细菌、霉菌、酵母的生物量都有极大的增加。细菌的生物量都达 1 g/L 以上, 其中洋葱芽孢杆菌 *P. cepacia* 的生物量最大, 达 1.48 g/L, 几乎是 SM-1、

SM-2 培养基中所培养细胞生物量的 2 倍。

2.2 含大豆油组分培养基中全细胞催化剂催

化秦皮甲素酰化反应的研究

有研究发现,长链不饱和脂肪酸可以作为微生物脂肪酸的有效诱导剂^[8]。油脂可以在微生物酶的作用下逐渐水解成脂肪酸供微生物利用,又可以避免脂肪酸的过多积累而对细胞产生不利影响,是很好的脂肪酶诱导物。在前期研究基础上,本研究选择大豆油为

典型油脂类诱导剂,探讨了添加大豆油培养基培养的微生物细胞催化剂在秦皮甲素酰化反应中的催化行为。表 1 表明,所筛选菌种在含大豆油的 SM-1 培养基培养条件下,施氏假单胞菌 *P.stutzeri* GIM 1.273 和铜绿假单胞菌 *P.aeruginosa* GIM 1.46 显示了催化秦皮甲素丙酰化的能力,活性偏低,转化率只有分别是 47.90%、22.30%;然而这两株菌均显示了较高的区域选择性,6'-区域选择性达 98% 以上。两株霉菌和 1 株酵母菌均未显示催化活性。

表 1 SM-1 培养基中不同菌种全细胞催化剂催化秦皮甲素丙酰化反应情况^a

Table 1 Result of propionylation of esculin by whole-cell catalysts from different origins in SM-1 medium

Strains	V ₀ /(mmol/h L)	Conversion/%	6'-regioselectivity/%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> GIM 1.273	0.25±0.03	47.90±0.34	98.90±0.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GIM 1.46	0.27±0.06	18.30±1.20	99.30±0.24
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GIM 1.209	NA ^b	NA	NA
<i>Pseudomonas cepacia</i> GIM1.139	NA	NA	NA
<i>Rhizopus chinensis</i> GIM 3.144	NA	NA	NA
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 96382	NA	NA	NA

注: ^a SM-1 培养基配方见 1.3.1, 反应条件见 1.3.4, 反应时间为 48h。b 表示没有检测到产物。

2.3 含吐温 80 培养基培养的微生物全细胞催

化秦皮甲素酰化反应的研究

天然油脂基表面活性剂也可以在微生物酶的作用下逐步水解成脂肪酸供微生物利用,从而避免脂肪酸的过量积累。因此此类化合物也是很好的脂肪酶诱导物^[8]。不仅如此,表面活性剂还可以增加细胞膜的通透性,使难以通过细胞膜的物质进入细胞^[9]。Molinari 用含 Tween 80 诱导培养基制备戴尔根酶 *Rhizopus delemar* 全细胞催化剂,催化乙酸香叶酯的合

成,转化率达 90%^[10]。因此,本研究选用 Tween 80 为代表性油脂基表面活性剂,探讨了添加 Tween80 培养基培养的微生物细胞催化剂在秦皮甲素酰化反应中的催化活性和选择性。从表 2 可知,在加入 Tween80 产酶诱导剂的培养基中,原来具有催化活性的施氏假单胞菌催化活性降至 14.50%,而铜绿假单胞菌催化活性略有增加,转化率达 19.70%。可见对不同的细胞连接脂肪酶,诱导剂不同对其的影响也是不同的。结合图 1 结果可见,对于施氏假单胞菌和来说,无论从生物量还是催化活性上讲,培养基 SM-1 都比培养基 SM-2 更佳。

表 2 SM-2 培养基中不同菌种全细胞催化剂催化秦皮甲素丙酰化反应情况^a

Table 2 Result of propionylation of esculin by whole-cell catalysts from different origins in SM-2 medium

Strains	V ₀ /(mmol/h L)	Conversion/%	6'-regioselectivity/%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> GIM 1.273	0.20±0.01	33.40±0.23	99.30±0.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GIM 1.46	0.19±0.02	19.70±0.65	99.70±0.32
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GIM 1.209	NA ^b	NA	NA
<i>Pseudomonas cepacia</i> GIM1.139	NA	NA	NA
<i>Rhizopus chinensis</i> GIM 3.144	NA	NA	NA
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 96382	NA	NA	NA

注: ^a SM-2 培养基配方见 1.3.1, 反应条件见 1.3.4, 反应时间为 48h。b 表示没有检测到产物。

2.4 含葡萄糖培养基中不同菌种全细胞催化

秦皮甲素酰化反应的研究

葡萄糖本身是一种良好的碳源,能极大的地促进微生物的增长。本课题组研究诱导培养的施氏假单胞菌催化葡萄糖酯反应中发现葡萄糖的诱导效果最佳,24 h 转化率达 96.6%,6'-OH 区域选择性达 99% 以上

[11], 但在另一项有关阿糖胞苷催化酯化的研究中, 却发现细胞培养过程中添加葡萄糖反而会阻遏催化阿糖胞苷酯化的米曲霉全细胞脂肪酶的合成^[23]。因此, 接下来我们也探讨了葡萄糖对秦皮甲素丙酰化的反应影响。

如表 3 所示, 用 SM-3 培养基培养的微生物中, 也只有施氏假单胞菌和铜绿假单胞菌有催化活性, 并且与 SM-1 培养基相比, 催化活性分别降低了 34.1%、

6.3%, 说明葡萄糖在细胞生长中也可能起了阻遏脂肪酶合成的作用。有研究表明在脂肪酶的合作中存在葡萄糖的代谢阻遏作用, 葡萄糖浓度过高时, 会阻碍 mRNA 的转录, 使酶蛋白的翻译过程终止, 微生物脂肪酶的合成量减少^[12]。综合考虑生物量与全细胞生物活性, 选择含大豆油的 SM-1 培养基培养的施氏假单胞菌为最佳催化秦皮甲素酰化的全细胞催化剂, 用于以后的研究。

表 3 SM-3 培养基中不同菌种全细胞催化秦皮甲素丙酰化反应情况^a

Table 3 Result of propionylation of esculin by whole-cell catalysts from different origins in SM-3 medium

Strains	V ₀ /(mmol/h L)	Conversion/%	6'-regioselectivity/%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> GIM 1.273	0.16±0.03	13.80±0.13	98.90±0.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GIM 1.46	0.12±0.01	12.00±0.22	99.30±0.34
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GIM 1.209	NA ^b	NA	NA
<i>Pseudomonas cepacia</i> GIM1.139	NA	NA	NA
<i>Rhizopus chinensis</i> GIM 3.144	NA	NA	NA
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 96382	NA	NA	NA

注: ^a SM-1 培养基配方见 1.3.1, 反应条件见 1.3.4, 反应时间为 48h。b 表示没有检测到产物。

2.5 全细胞催化黄酮丙酰化反应产物的高效

液相色谱分析

反相液相色谱是测定黄酮类化合物含量的重要方法。黄酮类化合物由于本身结构中有苯环的存在, 在 250~400 nm 有紫外吸收, 因此可以用紫外检测器检测黄酮类化合物及其衍生物的含量。由于黄酮类化合物带有酚羟基, 在水中会部分解离, 而未解离的羟基与固定相作用较强, 从而导致拖尾; 因此黄酮类化合物的反相 HPLC 中还常常会加入乙酸、甲酸、磷酸或高氯酸等调节 PH, 抑制黄酮类化合物的解离, 克服拖尾现象。Athina Kontogianni^[13]用反相 C18 (300 mm×3.9 mm, Bondapak), 254nm, 以 60% 乙腈-水 (水中含 0.1% 乙酸) 为流动相, 在 254 nm 下检测柚皮苷、芦丁及其酯化物, Melika Ardhaoui^[14]也用反相 C18 (Purospher® RP-18e 5, 250 ×4.0 mm, Merck) 柱, 以 30% 甲醇水 (水中含 3% 乙酸) 为流动相, 在 280 nm 下检测芦丁、秦皮甲素及其酯化物。

在本研究中, 我们用 4.6×250mm(5μm) Zorbax SB-C18 分析型色谱柱 (Agilent Technologies Co, Ltd, USA), 60% 甲醇-水 (水中含 0.1% 乙酸), 流速 0.9 min/mL, 获得了良好的底物和产物分离效果。在 336nm 下可检测秦皮甲素及酯化物。如图 3 所示, 为秦皮甲素反应前后液相色谱图, 其中峰 1 为秦皮甲素保留时间分别是 3.3 min。反应后在 4.3 min 位置出现了明显的产物峰 2, 经过薄层层析等分离纯化过程,

该产物被纯化出来进行了进一步的结构鉴定。

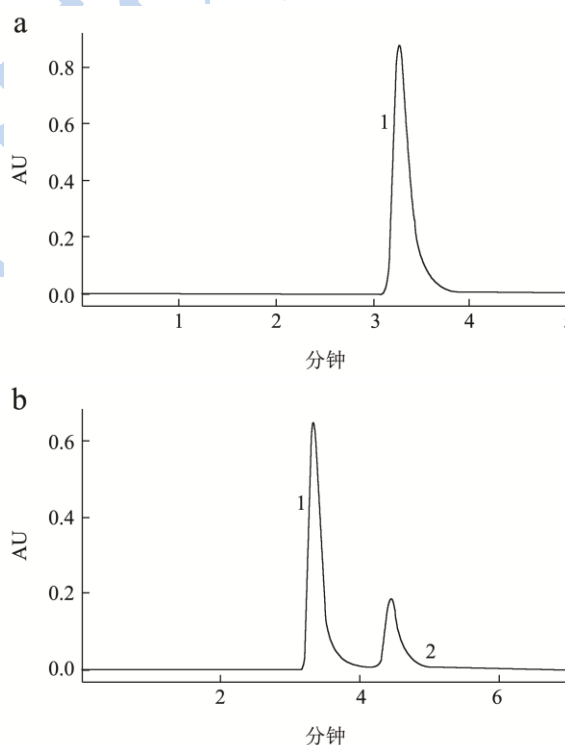


图 3 施氏假单胞菌全细胞催化秦皮甲素酰化反应前 (a) 后 (b) 色谱图

Fig.3 Chromatograms of samples before (a) and after (b) acylation of esculin catalyzed by *P. stutzeri* whole cells

注: a: 反应前, b: 反应后; 1 号峰为秦皮甲素峰, 2 号峰为秦皮甲素 6'-O-丙酯。

2.6 全细胞催化秦皮甲素酰化反应产物的质

谱分析

质谱是纯物质鉴定的最有力的方式之一，其中包括相对分子量的测定，化学式确定及结构鉴定。在黄酮含量很少时，电子电离质谱测定是一种有效办法。在质谱仪的高真空中黄酮类化合物充分气化，在质谱仪中被原子轰击，产生原来黄酮类化合物的带电荷碎片，根据所得的数据可以为分子离子及其他所有的碎片离子列出精确的分子式，从而得到结构信息。图 4 显示施氏假单胞菌催化秦皮甲素酰化不仅有单酯还有少量双酯生成，其中单酯 $C_{18}H_{20}O_{10}$ (m/z) 为 397.1142 $[H^+]^+$ ，少量双酯 $C_{21}H_{24}O_{11}$ m/z 比为 453.1377 $[H^+]^+$ ，根据单酯和双酯峰强度的比例可推知，秦皮甲素单酯的含量占 99% 以上。

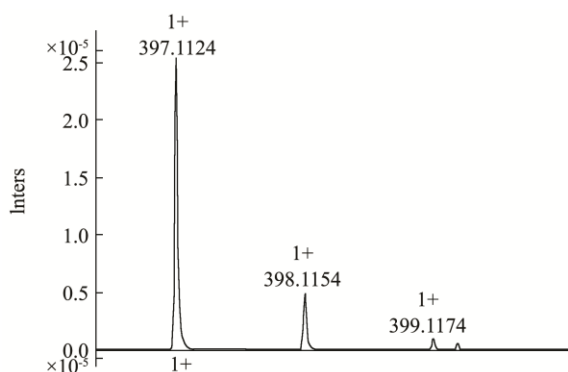


图 4 秦皮甲素丙酸单酯超高分辨的飞行时间质谱图

Fig.4 TOF-MS spectrum of naringin monopropionate

2.6 全细胞催化秦皮甲素酰化反应产物的核磁共振碳谱分析

如表 4 所示，秦皮甲素 A 环和 C 环碳原子信号峰没有明显位移，葡萄糖苷链上的 C5' 和 C6' 分别有 2.07、2.62ppm 的位移变化，并且 C6' 信号峰的化学位移由高场向低场移动，C5' 信号峰的化学位移是由低场向高场移动；另外产物的核磁图谱中还出现了 C=O 和 -CH3 的信号峰，而这两个峰都是底物没有的，因此可以确定酰化位点发生在 C6' 上，即生成了秦皮甲素-6'-O 丙酯。Latifa^[15]认为酶催化黄酮类化合物的区域选择性酰化位点取决于羟基的类型（初级羟基、二级羟基、苯环羟基）以及它们的位置。当有伯羟基时，酰化首先是发生在伯羟基上，比如异槲皮苷，因此伯羟基具有高活性以及可接近性。当只有苯环羟基时，比如槲皮素，酰化反应一般发生在 4'-OH, 3'-OH 或者 7-OH。Eduardo B. De Oliveira^[16]深入研究后认为，只有黄酮苷元的糖环伯羟基 6''-OH 和仲羟基 4''-OH 才可以稳定的同时接近催化组氨酸和与丝氨酸连接的

酰基。

表 4 秦皮甲素及其酯化物 ^{13}C -NMR 谱的化学位移

Table 4 Chemical shifts of esculin and its esters in ^{13}C -NMR spectra

Carbons	Esculin /ppm	Esculin ester /ppm	Chemical shift /Δppm
C=O	- ^a	173.94	-173.94
C2	160.99	160.99	0.00
C3	112.56	112.34	-0.22
C4	144.93	144.72	-0.21
C5	115.08	114.65	-0.43
C6	151.78	152.33	0.55
C7	143.11	143.05	-0.06
C8	103.6	103.73	0.13
C9	150.89	151.02	0.13
C10	111.23	110.87	-0.36
C1'	102.62	102.05	-0.57
C2'	73.73	73.61	-0.12
C3'	77.7	76.24	-1.46
C4'	70.18	70.29	0.11
C5'	76.48	74.41	-2.07
C6'	61.13	63.75	2.62
CH3 (aliphatic chain)	-	9.43	-9.43

注：a 表示没有检测到信号峰。核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 在黄酮类化合物的结构鉴定中有广泛的应用，可以用来确定甲氧基的数目和位置、三个环的氧化型、碳氢侧链、糖的个数及空间结构 (如 β -/ α -)，从而确定黄酮类化合物的结构信息，并且所需的样品含量很少。黄酮类化合物在 DMSO 中有很好的溶解度，并且在 ^{13}C -NMR 中 DMSO- d_6 的溶剂位移不超过 0.5，对于化学位移范围在 200 的 ^{13}C -NMR 来说，可以忽略不计。因此对产物进行纯化分离后，以 DMSO- d_6 为溶剂^[28]，对样品结构进行了 ^{13}C -NMR 分析。

3 结论

本研究从 6 株产脂肪酶的微生物菌株中成功筛选到两株细菌型全细胞催化剂，分别为铜绿假单胞菌和施氏假单胞菌，可用于催化秦皮甲素丙酰化反应。诱导剂的种类对所制备的全细胞催化剂催化行为及细胞生物量均有显著影响。在含有油脂、油脂基表面活性剂、糖等三种典型诱导剂的不同培养基中，发现含大豆油的 SM-1 培养基制备的施氏假单胞菌全细胞催化剂的活性最高，催化秦皮甲素丙酰化的转化率 47.9%。而铜绿假单胞菌则在含 Tween80 的 SM-2 培养基中培养获得最大活性，催化秦皮甲素转化率 19.7%。用含葡萄糖的 SM-3 培养基制备的施氏假单胞菌和铜绿假

单胞菌全细胞生物量最高分别为 1.34 g/L、1.27 g/L，但催化秦皮甲素酰化的活性却是最低的，分别为 13.8% 和 12.0%。经 SM-1 培养基制备的施氏假单胞菌全细胞在催化秦皮甲素酰化中显示了高区域选择性，主要产物为秦皮甲素-6'-O-丙酯，其区域选择性在 99% 左右。

参考文献

- [1] 张甘良,汪钊,鄢洪德.生物类黄酮化合物的结构与生物活性的关系[J].生物学杂志,2005,22(1):4-7
ZHANG Gan-liang, YAN Hong-de. The Relationship between Structure and Biological Activity of Flavonoids [J]. Journal of Biology, 2005, 22(1): 4-7
- [2] 段煜,杜宗良,李瑞霞,等.天然多羟基化合物在酶催化下的选择性酯化[J].天然产物研究与开发,2006,18(4): 702-708
DUAN Yu, DU Zong-liang, LI Rui-xia, et al. Enzyme-catalyzed Regioselective Esterifications of Polyhydroxylated Natural Products [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18:702-708, 685
- [3] Kafarski P, Lejczak B. Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxyphosphonates [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29(1): 99-104
- [4] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology [J]. Current opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 390-397
- [5] Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases [J]. Biotechnology advances, 2001, 19(8): 627-662
- [6] 汪小锋,王俊,杨江科,等.微生物发酵生产脂肪酶的研究进展[J].生物技术通报,2008,4:47-53
WANG Xiao-feng, WANG Jun, YANG Jiang-ke, et al. Recent Progress on the Production of Lipase by Microbial Fermentation [J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 4: 47-53
- [7] Loo J L, Lai O M, Long K, et al. Fatty acid preference of mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(12): 1771-1778
- [8] Teng Y, Xu Y, Wang D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 57(1): 292-298
- [9] Dalmau E, Montesinos J L, Lotti M, et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(9): 657-663.
- [10] Molinari F, Villa R, Aragozzini F. Production of geranyl acetate and other acetates by direct esterification catalyzed by mycelium of *Rhizopus delemar* in organic solvent [J]. Biotechnology letters, 1998, 20(1): 41-44
- [11] Feng G, Wu H, Li X, et al. A new, efficient and highly-regioselective approach to synthesis of 6-O-propionyl-D-glucose by using whole-cell biocatalysts [J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 95: 56-61
- [12] Rapp P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17(9): 832-838
- [13] Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, et al. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001, 103(10): 655-660
- [14] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110(3): 265-272
- [15] Chebil L, Anthoni J, Humeau C, et al. Enzymatic acylation of flavonoids: effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(23): 9496-9502
- [16] De Oliveira E B, Humeau C, Chebil L, et al. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 59(1): 96-105