酶法制备葛根素的丙酯衍生物

袁亭亭^{1,2},李晓凤¹,袁琨¹

(1.华南理工大学食品科学与工程学院,广东广州 510640)(2.乳业生物技术国家重点实验室,广东广州 510640) 摘要:本文研究了不同种类的水解酶催化非水相葛根素丙酰化反应的催化效率,并研究以 Novozym 435 脂肪酶催化葛根素丙酰 化反应为模型,几个关键反应因素对该模型的影响规律。研究发现固定化脂肪酶 Novozym 435、Lipozyme^{IM}TL、Lipozyme^{IM}RM 均 能高效催化葛根素丙酰化反应,且转化率高达 98%以上,但另外几种游离脂肪酶催化葛根素丙酰化反应活性及效率就特别低。相同 条件下,猪胰脂肪酶催化葛根素丙酰化反应的转化率为 67%左右;胰脂肪酶和 CRL 脂肪酶表现很低的催化活性,肽酶和蛋白酶没有 表现催化活性。以四氢呋喃为反应溶剂,2 mg/mL Novozym 435 脂肪酶,底物: 酰基供体之比为 1:30,水分含量为 0 的反应条件下, 反应 6 h,底物转化率达到 99.5%。反应产物经分离纯化后进行了结构鉴定,高效液相色谱、质谱、傅里叶红外光谱结果表明,非水 相酶催化葛根素酰化反应主要生成单酯,所得产物酯为葛根素丙单酯,区域选择性达 98%。

关键词:脂肪酶; 酰化反应; 葛根素; 结构鉴定 文章篇号: 1673-9078(2018)08-116-122

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.018

Enzymatic Preparation of Puerarin Ester Derivatives

YUAN Ting-ting^{1,2}, LI Xiao-feng¹, YUAN Kun¹

(1.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.State Key Laboratory for Biotechnology in Dairy Industry, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, the catalytic efficiency of different kinds of enzymes on the acylation reaction of puerarin was studied in non-aqueous phase. Among 8 kinds of enzymes, immobilized lipases Novozym 435, Lipozyme ^{IM}TL and Lipozyme ^{IM}RM could efficiently catalyze the acylation reaction of puerarin and conversion rate was as high as 98%, but the activity and efficiency of other free lipases catalyzed the acylation of puerarin were very low. Under the same conditions, the conversion rate of puerarin catalyzed by porcine lipase was about 67%, pancreatic lipase and CRL lipase showed low catalytic activity, and peptidase and protease did not exhibit catalytic activity. And Novozym 435 showed the highest catalytic activity. Using Novozym 435 as catalyst, the optimum reaction medium, dosage of lipase catalysts, mole ratio of substrates, initial water content and reaction time were determined as THF, 1:30, 2 mg/mL, 0 and 6 h, respectively. Under the above reaction conditions, conversion of puerarin reached 99.5%. The products were purified and structurally identified using HPLC, mass spectrometry (MS) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) which showed that the lipase catalyzed the acylation of puerarin, the resulting product was puerarin propionate monoester, where the regioselectivity reached 98%.

Key words: lipase; acylation reaction; puerarin; structure identification

葛根素有多种生理活性,在临床上主要用于治疗 冠心病、高血压、心绞痛和心率失常等心血管方面疾 病,且已显现出较好的疗效;除此之外,葛根素还可 以增加脑血流量,促进人体脑循环,因此,常用于治 疗脑动脉硬化、短暂脑缺血发作等脑血管疾病,且疗 效极佳^[1,2]。然而,由于其结构是异黄酮结构,脂溶性 收稿日期: 2018-04-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21676105);广州市科技计划民生 科技项目(201803020031);乳业生物技术国家重点实验室开放课题资助课 题(SKLDB2012-006)

作者简介:袁亭亭(1992-),女,硕士,研究方向:生物催化

通讯作者:李晓凤(1977-),女,博士,教授,研究方向:多羟基化合物的 结构修饰 较差,造成其生物利用度较低^[3]。已有研究表明,通 过对黄酮类化合物的酰化修饰可以有效提高其脂溶 性,进而能够增强其生物利用率^[4]。

目前可以对黄酮化合物酰化修饰的方法有传统的 化学法和酶催化的方法,但是采用常规化学法对黄酮 化合物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;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。脂肪酶,即三酰甘油酯水解酶 (EC3.1.1.3),是一类具有特殊性质的酯酶,能在水 不溶性体系或油水界面进行催化反应,具有立体选择 性、对映选择性、底物专一性等诸多特点^[5]。脂肪酶 在有机溶剂体系和水体系中都具有较高的稳定性和有 效性,是一种非常重要的生物催化剂。在非水相介质中,脂肪酶能催化水解反应的逆反应,主要包括酯化反应和酯基转移反应(酯交换反应、醇解反应和酸解反应)等合成型反应^[6,7]。

基于上述研究现状,本研究探讨了酶催化葛根素 酰化反应的可行性,从 8 种水解酶中筛选出能高效催 化葛根素丙酰化反应的生物酶制剂;探讨了有机溶剂 的种类、反应时间、水分含量和底物摩尔比等反应参 数对葛根素丙酰化反应的影响规律;并通过高效液相 色谱、质谱、傅里叶红外光谱等技术对所制备的黄酮 酯类产物进行了结构鉴定,进一步确定了产物主要是 葛根素丙单酯。

1 材料与方法

1.1 材料

Novozym 435, 来源于 *Candida Antarctica*, type B; Lipozyme ^{IM}TL, 来源于 *Thermomyces lanuginosus*; Lipozyme ^{IM}RM, 来源于 *Rhizomucor miehei*; Novozym 435、Lipozyme ^{IM}TL、Lipozyme ^{IM}RM、猪胰脂肪酶、 CRL 酶均购自诺维信公司; 胰脂肪酶、肽酶、胃蛋白 酶来自华南理工大学蛋白中心赠送。

葛根素购自上海 Aladdin 公司; 丙酸乙烯酯(VP), 购自美国 Sigma 公司; 甲醇, 购自德国 Merck 公司, 色谱纯; 四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、 叔丁醇、乙腈、异丙醇、2-甲基四氢呋喃、石油醚、 异辛烷、甲醇均购自天津市科密欧化学试剂公司, 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 光电二极管矩阵 PDA 紫外检测器、717 Plus 自动进样 器。色谱柱: 4.6×250 mm(5 µm) 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; 移液枪 (20 µL、100 µL、200 µL、1 mL 和 5 mL): 德 国 Eppendorf 公司; FA2204B 电子天秤: 上海精密科 学仪器有限公司; TW-3021HR 冷冻离心机, 安徽嘉文 仪器装备有限公司; 高速离心机, 美国 Thermo 公司; HZQ-F100 全温气浴振荡培养箱。

1.3 实验方法

1.3.1 不同种类酶催化葛根素酯合成反应 在 5 mL 带塞三角瓶中加入 1 mL 四氢呋喃、20 mmol/L 葛根素、600 mmol/L 丙酸乙烯酯 (VP),分别 相应地加 40 mg/mL 酶,在恒温气浴培养箱中振荡反 应 (40 ℃、200 r/min)。定时取样 100 µL,12000 r/min 离心 5 min 后,取 20 µL 上清液,用 63%甲醇-水溶液 稀释 50 倍,液相色谱自动进样器进样 20 µL,供分析。 1.3.2 反应初速度、底物转化率、区域选择性 的计算^[8]

1.3.2.1 反应初速度 V₀ 值(Initial rate, mmol/(L·h))

根据反应开始阶段,单位时间内葛根素的减少量 来 计 算 初 始 反 应 速 度 : 反 应 初 速 度 V₀(mmol/(L·h))=(A₀-A_i)/t。

其中: A₀、A_i分别表示反应前后葛根素的浓度(mmol/L), t 为反应时间(h)。

1.3.2.2 底物转化率(Conversion,%)

根据底物反应前后葛根素的峰面积的差值与反应 前葛根素峰面积之比值来计算转化率:

转化率 C(%)=(S₀-S_i)/S₀×100%。

其中: So, Si分别表示反应前后葛根素的峰面积。

1.3.2.3 区域选择性 (Regioselectivity, %)

根据目的酰化产物的峰面积与所有酰化产物的峰 面积之比值来计算反应的区域选择性:

区域选择性 Regioselectivity(%)=W_i/W_{total}

其中: W_i表示目的酰化产物的峰面积, W_{total}表示所有酰 化产物的峰面积之和。

1.3.3 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 254 nm; 色谱柱: 4.6×250 mm, 5 μm Zorbax SB-C18 分析型色谱柱。

流动相: 63%甲醇-水溶液(含 0.1%冰醋酸);流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 µL。

1.3.4 产物的分离纯化与结构鉴定

利用薄层色谱 (TLC) 对产物进行分离纯化。首 先,将含有机溶剂的反应混合物在 10000 r/min 下离 心,除去脂肪酶催化剂,取上层反应溶液,用旋转蒸 发仪进行真空减压蒸馏,悬蒸 2~3 次,得到粗产物, 溶解于一定量的甲醇中,完全溶解后,经 15000 r/min 离心后,取上清液。利用薄层色谱对产物进行分离纯 化,首先在 GF254 25×75 mm 硅胶板上确定展开剂比 例,再在 GF254 100×200 mm 的制备板上点样,每次 点样 1 μL,重复点样 3~5 次。薄层层析结束后,用紫 外灯 (254 nm)观察底物和产物条带,收集含有产物 的硅胶颗粒,用甲醇溶解,溶液离心后,取上清液。 最后,真空干燥 24 h 得到葛根素酯。

葛根素和丙酸乙烯酯的反应产物,用氯仿/甲醇/ 水=8/2/0.3(V/V/V)作为层析液。产物经过分离纯化,并 通过 HPLC 进行纯度鉴定后,用超高分辨飞行时间质 谱(TOF-MS)、傅里叶红外光谱(FT-IR)进行结构 分析。

FT-IR 检测:称取 1~2 mg 经过 TLC 纯化的葛根 素酯产物,与 200 mg 左右的溴化钾研磨均匀,置于 模具中,用压片机将样品压成透明薄片,将产物样品 放到样品架上,置于红外光谱仪上分析,以葛根素为 对照组。

1.3.5 反应介质对酶催化葛根素酯合成反应的 影响

在多个5 mL 带塞三角瓶中分别加入1 mL 二甲基 亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈 (acetonitrile)、甲醇(methanol)、2-甲基四氢呋喃 (2-Me THF)、四氢呋喃(THF)、叔丁醇(tert-Butanol)、 异丙醇(isopropanol)、石油醚(petroleum)和异辛烷 (isooctane),再依次加入 20 mmol/L 葛根素、600 mmol/L 丙酸乙烯酯(VP),混合均匀。加入 40 mg/mL Novozym 435 催化剂后,在恒温气浴培养箱中振荡反 应(40 ℃,200 r/min)。定时取样 100 µL,12,000 r/min 离心 5 min 后,取 20 µL 上清液,用 63%甲醇-水溶液 稀释 50 倍,HPLC 进样 20 µL,进行检测与分析。 1.3.6 反应时间对酶催化葛根素酰化反应的影

响 在 5 mL 带塞三角瓶中加入 1 mL 四氢呋喃、20 mmol/L 葛根素、600 mmol/L 丙酸乙烯酯(VP) 和 2

mmol/L 褐秾素、600 mmol/L 内酸乙烯酯(VP)和 2 mg/mL Novozym 435 催化剂混合均匀,在恒温气浴培 养箱中振荡反应(40 ℃、200 r/min)。定时取样 100 μL, 12000 r/min 离心 5 min 后,取 20 μL 上清液,用 63% 甲醇-水溶液稀释 50 倍,液相色谱自动进样器进样 20 μL,供分析。

1.3.7 水分含量对酶催化葛根素酯合成反应的 影响

在 5 mL 带塞三角瓶中加入 1 mL 四氢呋喃、20

mmol/L 葛根素、600 mmol/L 丙酸乙烯酯,混合均匀; 再分别添加 0 µL/mL、10 µL/mL、20 µL/mL、30 µL/mL、 50 µL/mL; 加入 2 mg/mL Novozym 435 催化剂开始反 应,置于气浴恒温摇床上振荡(40 ℃,180 r/min)。 定时取样,12000 r/min 离心 5 min 后取 20 µL 上清液, 用 63%甲醇-水溶液稀释 50 倍,HPLC 进样 20 µL,进 行检测与分析。

1.3.8 底物摩尔比对酶催化葛根素酯合成反应的影响

在 5 mL 带塞三角瓶中加入 1 mL 四氢呋喃、20 mmol/L 葛根素,分别加入 100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L、600 mmol/L、700 mmol/L、800 mmol/L 丙酸乙烯酯 (VP),混合均匀。加入 2 mg/mL Novozym 435 催化剂后,开始反应,在恒温气浴培养箱中振荡反应(40 ℃,200 r/min)。定时取样 100 μL,12000 r/min 离心 5 min 后,取 20 μL 上清液,用 63%甲醇-水溶液稀释 50 倍,HPLC 进样 20 μL,进行检测与分析。

1.3.9 数据分析

用 Excel 软件对数据进行统计、分析,所有数据 取三次重复的平均值;用 Origin 8.0 软件对数据进行 拟合以及图形化处理。

2 结果与讨论

2.1 不同脂肪酶催化葛根素酯合成反应

为了筛选到能高效催化葛根素酰化反应的酶生物 催化剂,以有机溶剂为反应介质,研究了3种固定化 脂肪酶、3种游离脂肪酶、1种肽酶和1种胃蛋白酶在 该酰化反应中的催化效果。值得一提的是,从表1看, 并非所有酶制剂都能高效催化葛根素的酰化反应。这 主要是因为它们是不同来源具有底物^[9,10]不同的识别 特征的生物催化剂。

	Table .	I Acylation of puerarin with V	puerarin with VP catalyzed by different lipase"			
Strains		Initial rate/[mmol/(h·L)]	Conversion/%	6"-Regioselectity/%		
	Lipozyme ^{IM} RM	19.64±2.35	99.8±1.32	≥98		
	Lipozyme [™] TL	24.56±2.12	99.8±0.86	≥98		
	Novozym 435	25.00±1.56	99.8±0.29	≥98		
	Porcine pancreatic lipase	1.91±2.36	67.0±2.12	≥98		
	CRL lipase	0.72±2.05	4.8±2.45	≥98		
	Pancreatic lipase	1.40±0.65	10.1±1.41	≥98		
	Peptidase	NA^b	NA	NA		
	Pepsin	NA	NA	NA		

表 1 不同酶催化葛根素丙酰化的反应*

注: a 反应条件见 1.3.1,反应条件 24 h; b 没有检测到底物。

Table 1 Acylation of puerarin with VP catalyzed by differ

酶制剂是酶经过提纯、加工后的具有催化功能的 生物制品,一般具有较高的底物选择性,该特性与酶 结构、种类及其来源密切相关。表2表明,不同来源 的酶对葛根素丙酰化反应呈现出不同的催化活力。对 葛根素丙酰化反应来说,不同来源的脂肪酶均具有良 好的催化活性。其中,采用固定化脂肪酶 Lipozyme ^MTL、Lipozyme ^MRM 时,反应转化率达到 98%以上, 初始速度分别为 19.64 mmol/L 和 24.56 mmol/L; Novozym 435 也可以高效催化葛根素丙酰化反应,转 化率和初始速度分别为 99.8%和 25.0 mmol/L。采用 2 种游离脂肪酶的做催化剂时反应转化率不高;其中采 用猪胰脂肪酶时转化率为67%,与固定化脂肪酶相比, 催化效果不理想;肽酶和胃蛋白酶在非水相酶催化葛 根素丙酰化反应中没有表现出催化活性。

2.2 酶催化葛根素酯合成反应的高校液相色







acylation of puerarin catalyzed by Novozym 435

注: a: 反应前, b: 反应后; 1 号峰为葛根素峰, 2 号峰 为葛根素单酯, 3 号峰为葛根素双酯。

在本研究中,我们用 4.6×250 mm(5 μm)Zorbax SB-C18 分析型色谱柱 (Agilent Technolgies Co, Ltd, USA), 63%甲醇-水 (水中含 0.1%乙酸),流速 0.5

min/mL,获得了良好的底物和产物分离效果。在 254 nm 下可检测葛根素及酯。如图 1 所示,为葛根素反 应前后液相色谱图,其中峰 1 为葛根素保留时间分别 是 11.6 min,反应后在 15.9 min 位置出现了明显的产物峰 2,反应后在 20.9 min 位置出现了明显的产物峰 3,从图中很明显可以看出葛根素单酯的色谱峰比较高,选择性为 98%。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。

2.3 酶催化葛根素酯合成反应的质谱和红外



图 2 葛根素单酯(a)和葛根素双酯(b)的高分辨率质谱图

Fig.2 The mass spectrogram of PME (a) and PDE (b)

质谱法是利用电场和磁场将运动的离子按它们的 质荷比分离后进行检测的方法,测出离子准确质量即 可确定离子的化合物组成。图2是葛根素单酯(a)和 葛根素双酯(b)的高分辨率质谱图。从图中分析结构 显示,能检测到与葛根素单酯(C₂₄H₂₄NaO₁₀,495.13 m/z [M+Na]⁺)和葛根素双酯(C₂₇H₂₈NaO₁₁,551.15 m/z [M+Na]⁺)的相对分子量。根据物质对不同波长的红 外辐射的吸收特性,进行分子结构和化学组分分析, 所以利用 FT-IR 能有效鉴定出官能团或化学键的存在 或变化。图3是葛根素(a)和葛根素酯(b)的傅里 叶红外光谱图。相较于图3 a,在图3 b中1718 cm⁻¹ 和 2900 cm⁻¹处出现了新的羰基伸缩振动吸收峰,分别 为 C=O 特征峰(酯的典型吸收峰)和 C-H 特征峰,

2018, Vol.34, No.8



2.4 反应介质对酶催化葛根素酯合成反应的

影响

有机溶剂体系是影响黄酮类化合物合成的一个重

要因素,它通过改变酶的活性和稳定性,影响反应的 初始速率和转化率^[11]。同样,脂肪酶催化剂也显示溶 剂依赖性和细胞活性在不同有机溶剂体系变化较大 ^[12,13]。因此,我们对不同有机溶剂系统对 Novozym 435 催化剂葛根素酰化催化活性的影响进行了研究。

在前期实验中,我们发现强极性有机溶剂能较好 地溶解葛根素,但据报道,强极性有机溶剂会夺取酶 活性中心的必需水,使之失去活力^[14,15]。正如我们所 预期的那样(如表2所示),在强极性有机试剂DMSO 和DMF中,葛根素有很高的溶解度,但Novozym435 在催化葛根素丙酰化反应中,并没有表现出催化活性; 在一般极性的异丙醇、叔戊醇有机溶剂体系中, Novozym435催化剂表现出很低的催化活性,在反应 24h时,转化率分别仅为10.3%和8.7%。除了强极性 有机溶剂对酶活性的影响,也可能与溶剂溶解底物的 能力有关,也就是说底物分子葛根素很难离开反应介 质进入酶的活性部位,从而导致转化率低^[16]。因此, 在DMSO和DMF反应介质完全失去了Novozym435 催化剂的活性,而在异丙醇、叔丁醇反应介质中保持 一点催化活力。

Novozym 435 在催化葛根素丙酰化反应中,在有 机溶剂 THF 和 2-Me THF 表现出很高的催化活性,转 化率分别为 98.7%和 97.5%,又因为葛根素在 THF 溶 剂中比 2-Me THF 溶剂有较好的溶解度,Novozym 435 催化葛根素酰化反应中,选择有机试剂 THF 为最优的 试剂。

Table 2 Effect of pure organic solvents on acylation of puerarin catalyzed by Novozyme. 435 lipase ^a					
Solvents	LogP	Solubility/(mg/mL)	Coversion/%	6"-Regioselectiity/%	
DMSO	-1.3	608.6±2.2	NA ^b	NA	
DMF	-1.0	569.2±2.5	NA	NA	
methanol	-0.76	259.3±3.0	NA	NA	
acetonitrile	-0.33	1.4±1.8	90.2±1.2	≥98	
isopropanol	0.33	7.8±1.4	10.3±2.3	≥98	
THF	0.49	30.1±1.3	98.7±1.7	≥98	
2-Methyl THF	1.85	12.3±2.1	97.5±1.3	≥98	
tert-butanol	1.15	2.6±1.1	8.7±2.4	≥98	
petroleum	3.5	0.2±1.3	NA	NA	
isooctane	4.3	0.1±1.6	NA	NA	

表 2 不同有机溶剂对 Novozyme	435催化葛根素酰化反应影响 *

注: a 反应条件见 1.3.1,反应条件 24 h; b 没有检测到底物。

2.5 反应时间对酶催化葛根素酰化反应的影

加。在反应 0~3 h 时间内, 酶促反应转化率急剧上升, 这是由于反应初始阶段葛根素与丙酸乙烯酯浓度较高 且产物浓度较低,反应向正向进行;反应 3~6 h 时间 内, 酶促反应速度不断下降底物转化率逐渐趋缓;在 反应 6 h 左右,转化率达到 98%, 然后通过进一步延

响

从图4可以看出,转化率随反应时间的增加而增

长反应时间,反应转化率几乎没有改变,反应基本达 到平衡状态。因此,通过 Novozym 435 催化葛根素酰 化反应达到热力学平衡状态时,反应时间为 6 h,值得 一提的是,在这项研究中,Novozym 435 催化葛根素 丙酰化反应中获得的转化率高于以往的研究报道。我 们可以得出结论,Novozym 435 催化剂能高效催化葛 根素丙酰化反应。



图 4 反应时间对 Novozym 435 催化葛根素酰化反应的影响 Fig.4 Effect of time on acylation of puerarin by Novozyme. 435

2.6 水分含量对酶催化葛根素酯合成反应的

影响





Fig.5 Effect of water content on acylation of puerarin by

Novozyme. 435

很多研究认为酶分子需要一定的水分来保持酶的 活性与反应的进行,但是高水分会使酶分子结合导致 反应速率的大幅度下降^[17],所以说,酶分子水分含量 需要保持在一个很窄的范围内。一般研究水分对反应 的影响有两种方法,一是研究水分活度 a_w来确定最佳 水分用量^[18,19],二是溶剂中添加的水分的含量,这种 方法操作方便,特别是适用于工业应用,便于操作 ^[19,20];本研究中也采用水分体积含量考察水对脂肪酶 催化葛根素丙酰化反应的影响。从图 5 中可以看出反 应初速度与转化率都是随着水分含量的增加呈现递减 的;但是区域选择性没有发生较大变化。对于该催化 反应体系来说,水分的存在反而会降低酶的活性,水 分含量为0,Novozym 435 催化葛根素酰化反应的催 化效率最高。

2.7 底物摩尔比对酶催化葛根素酯合成反应







puerarin by Novozyme. 435

转酯反应是一个可逆反应,即葛根素的转酯合成 与酯的水解会同时发生。当一种反应底物过量时,有 利于热力学平衡向酯合成方向进行。本研究考察了丙 酸乙烯酯与葛根素的摩尔比对 Novozym 435 催化葛根 素丙酰化反应的影响(图 6)。VP/葛根素的摩尔比从 5 增加到 30 (mol/mol),反应速率和反应转化率显著 提高,区域选择性变化不大。VP/葛根素的摩尔比从 30 增加到 40 (mol/mol),反应速率和反应转化率几乎 没有变化,区域选择性变化不大。因此,综合考虑转 化率和底物摩尔比之间的关系,我们选择 30:1 (VP: 葛根素 (mol/mol))作为该反应的最佳底物摩尔比, 此时葛根素的酰化反应的转化率为 99.5%,初始速度 22.1 mmol/(L·h)。

3 结论

本研究从 8 种不同种类的水解酶中筛选可以高效 催化葛根素丙酰化反应的酶,成功筛选到 3 种脂肪酶 能高效催化非水相葛根素丙酰化反应,并以脂肪酶 Novozym 435 催化葛根素丙酰化反应为模型,研究了 反应时间、有机溶剂种类、水分含量、底物摩尔比等 对该模型的影响规律。研究结果表明:选择以四氢呋 喃为反应溶剂,2 mg/mL Novozym 435 脂肪酶,底物: 酰基供体之比为 1:30,转速 200 r/min,水分含量为 0 的反应条件下,反应 6 h,底物转化率达到 99.5%。反 应产物经分离纯化后进行了结构鉴定,高效液相色谱、 质谱、傅里叶红外光谱结果表明,非水相酶催化葛根

现代食品科技

素酰化反应,所得产物酯为葛根素丙单酯,区域选择 性达 98%。Novozym 435 可以快速、高效催化葛根素 丙酰化反应,本研究工作将为脂肪酶 Novozym 435 为 代表的生物催化剂在黄酮类化合物中的酰化修饰反应 提供理论依据。

参考文献

- Wong K H, Li G Q, Li K M, et al. Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 134(3): 584-607
- [2] 于继强,高尔.葛根素对心脑血管系统药理作用研究进展[J].
 现代中西医结合杂志,2008,17(24):3880-3882

YU Ji-qiang, GAO Er. Advances in pharmacological effects of Puerarin on cardio cerebral vascular system [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2008, 17(24): 3880-3882

- [3] 吴正红,朱延勤,严汉英,等.葛根素的溶解性及高分子聚合物助溶作用的研究[J].江苏药学与临床研究,1999,7(1):9-11
 WU Zheng-hong, ZHU Yan-qin, YAN Han-ying, et al. Studies on the solubility of puerarin and the solubilizing effect of polymer [J]. Jiangsu Pharm Clin Res, 1999, 7(1): 9-11
- [4] Zhang M, Xuan X, Lai F, et al. Cellular transport of esculin and its acylated derivatives in Caco-2 cell monolayers and their antioxidant properties *in vitro* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65(34): 7424-7432
- [5] Davis B G, Borer V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis [J]. Natural Product Reports, 2001, 18(6): 618-640
- [6] Sharma S, Kanwar S S. Organic solvent tolerant lipases and applications [J]. Scientific World Journal, 2014, 62: 52-58
- [7] Aulakh S S, Prakash R. Optimization of medium and process parameters for the production of lipase from an oil-tolerant *Aspergillus* sp (RBD-01) [J]. Journal of Basic Microbiology, 2010, 50(1): 37-42
- [8] 赖学能.秦皮甲素/柚皮苷的全细胞催化酰化反应研究[D]. 广州:华南理工大学,2015

LAI Xue-neng. Whole cell mediated acylation of esculin and naringin [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015

[9] Wang Z Y, Bi Y H, Li X Q, et al. Influence of substituent groups in regioselective acylation of nucleosides by Novozym 435 lipase [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(8): 1208-1211

- [10] Wang Z Y, Li N, Zong M H. A simple procedure for the synthesis of potential 6-azauridine prodrugs by *Thermomyces* lanuginosus, lipase [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2009, 59(1-3): 212-219
- [11] Schrittwieser J H, Coccia F, Kara S, et al. One-pot combination of enzyme and Pd nanoparticle catalysis for the synthesis of enantiomerically pure 1,2-amino alcohols [J]. Green Chemistry, 2013, 15(12): 3318-3331
- [12] Kazlauskas R J, Bornscheuer U T. Biotransformations with lipases [J]. Biotechnology Set, Second Edition, 1998, 37-191
- [13] Ducret A, Trani M, Lortie R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(4): 212-216
- [14] Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents [J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 30: 81-87
- [15] Ye R, Hayes D G, Burton R, et al. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of technical-grade sugar esters and evaluation of their physicochemical and bioactive properties [J]. Catalysts, 2016, 6(6): 78
- [16] Degn P, Zimmermann W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from Candida Antarctica [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 74(6): 483-491
- [17] Hari Krishna S, Karanth N G Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media [J]. Catalysis Reviews, 2002, 44(4): 499-591
- [18] Yang R L, Li N, Ye M, et al. Highly regioselective synthesis of novel aromatic esters of arbutin catalyzed by immobilized lipase from *Penicillium* expansum [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2010, 67(1-2): 41-44
- [19] Li W, Wu H, Liu B, et al. Highly efficient and regioselective synthesis of dihydromyricetin esters by immobilized lipase[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 199: 31-37
- [20] Alston M J, Freedman R B. The water-dependence of the catalytic activity of bilirubin oxidase suspensions in low-water systems [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 77(6): 651-657