

文章编号:1673-1689(2006)01-0045-05

有机介质中脂肪酶催化肌醇烟酸酯的合成

罗志刚, 杨连生, 李文志

(华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要:探讨了有机相中固定化脂肪酶催化肌醇和烟酸合成肌醇烟酸酯的可能性;系统地研究了有机溶剂特性、反应初始水活度、温度、pH 值、加酶量、底物浓度及摩尔比等因素对酯化反应的影响。

关键词:脂肪酶;肌醇烟酸酯;酯化反应

中图分类号:O 629.8

文献标识码:A

Synthesis of Inositol Nicotinate by Lipase in Organic Solvent

LUO Zhi-gang, YANG Lian-sheng, LI Wen-zhi

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

Abstract: The possibility of the inositol nicotinate formation from inositol and nicotinic acid catalyzed by immobilized lipase in organic solvent was explored in this paper. Systematic study was carried out in the term of effect of various factors on the reaction, including the hydrophobicity of organic solvent, water activity, temperature, pH, the amount of enzyme, substrate concentration and the molar ratio of inositol and nicotinic acid.

Key words: lipase; inositol nicotinate; esterification

非水相酶学的兴起和发展极大地拓宽了酶的应用范围。不少酶可在有机溶剂中发挥催化作用,且表现出许多新特性^[1]。非水相中的酶催化,已成为生物催化用于有机合成的重要途径。脂肪酶(甘油酯水解酶, EC3.1.1.3)是专门在异相系统即在油—水的界面上起催化作用的酶,它对均匀分散的或水溶性底物不起作用。脂肪酶在有机相中可以完成酯化、交换酯化及转酯等反应,具有区域选择性、立体选择性和较高的稳定性。近年来,利用脂肪酶生物催化有机化合物已成为非水相酶学的研究热点。

肌醇烟酸酯($C_{42}H_{30}N_6O_{12}$)是肌醇($C_6H_6O_6$)的

重要衍生物,1992 年列入英国药典。肌醇烟酸酯兼具肌醇的促进肝及组织中脂肪的代谢、降低血脂作用和烟酸的扩张周围血管作用,是治疗高血脂症、心血管疾病、老年痴呆症、脂肪肝等的药物,也可与其他药物配合使用。病人口服后,肌醇烟酸酯作为结合酯被吸收,然后在体内水解为游离的烟酸。目前,随着人口的老齡化,上述疾病的发病率明显增大,对肌醇烟酸酯的需求不断增加;同时,由于人们保健防病意识的增强,以肌醇烟酸酯作为添加物的保健食品、功能食品在国际上发展很快。

目前肌醇烟酸酯的生产方法基本采用化学法生产^[2,3],但酯化率低、反应温度高、精制分离纯化

收稿日期:2005-06-08; 修回日期:2005-07-29.

基金项目:广东省自然科学基金项目(000548).

作者简介:罗志刚(1975-),男,江西新干人,讲师,工学博士。

难、溶剂回收和残留等问题难以解决,生产成本也较高。因此,研究新的肌醇烟酸酯生化制备方法即酶法制备肌醇烟酸酯(见图 1),对我国肌醇和高血脂药物的研发具有重要意义。作者探讨了利用脂肪酶催化肌醇和烟酸合成肌醇烟酸酯的可能性,并系统地研究了各因素对脂肪酶催化合成肌醇烟酸酯的影响。

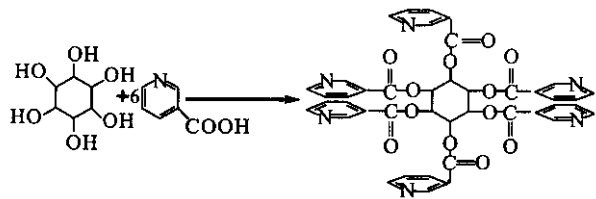


图 1 酶法合成肌醇烟酸酯

Fig. 1 Synthesis of inositol nicotinate by lipase

1 材料与方法

1.1 材料与设备

Novozyme 435,来源于 *Candida Antarctica*,物理吸附于大孔阴离子树脂,由 Novo Nordisk 公司赠送,其活力为 50 U/mg;氯仿、吡啶、二甲亚砜、丙酮、乙醇、四氢呋喃、正辛烷、四氯化碳、乙腈、苯、叔丁醇、二甲基甲酰胺为市售分析纯;4A 分子筛,大连催化剂厂生产。

恒温水浴振荡器:SHZ-88 台式恒温振荡器,江苏太仓市试验设备厂制造;真空冷冻干燥机:德国 Martin Christ 公司制造;电子分析天平:德国 Sartorius 公司制造,精确度 0.1 mg。

1.2 方法

1.2.1 有机溶剂的脱水 将 4A 分子筛于 180 °C 干燥箱内活化 2 h,置干燥器中冷却后,加入有机溶剂中,室温振荡 48 h,滤去分子筛,得脱水有机溶剂^[4]。

1.2.2 反应初始水分活度的控制 在一定的温度下,将溶剂、酶分别在密闭容器中与不同的盐水饱和溶液进行相平衡 72 h,以此来控制不同的反应初始水活度:Ca(NO₃)₂ ($a_w = 0.09$),LiCl ($a_w = 0.12$),MgCl₂ ($a_w = 0.33$),Mg(NO₃)₂ ($a_w = 0.45$),NaNO₃ ($a_w = 0.66$),NaCl ($a_w = 0.75$),KCl ($a_w = 0.85$),K₂SO₄ ($a_w = 0.97$)^[5]。

1.2.3 脂肪酶水解活力测定和单位 在 4 mL 4% 的 PVA(聚合度 1750)橄榄油乳化液和 5 mL 0.025 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中加入 Novozyme 435 50 mg,37 °C 反应 15 min 后,加入 15 mL 95% 乙醇终止反应,用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定,酚

酞指示剂。

一个脂肪酶活力单位 U 定义为:在测定条件下,每分钟释放出 1 μg 分子脂肪酸的酶量。

1.2.4 脂肪酶合成肌醇烟酸酯反应体系 在 50 mL 具塞三角瓶中,加入 1 mmol/L 的肌醇和 6 mmol/L 的烟酸,然后加入 20 mL 溶剂,再加入 100 mg Novozyme 435 组成反应体系,在一定温度下以 150 r/min 的速度搅拌。

1.2.5 液相色谱分析 仪器:Waters 600S 控制器, WatersTM 泵, Waters 996 二极管阵列检测器, Millennium³² 色谱软件,色谱柱:ResolveTM C₁₈ 钢柱 (3.9 mm×300 mm, 4 μm)。分析条件:流动相为水—甲醇—四氢呋喃(40:40:20),流速为 1 mL/min,进样量为 10 μL。

1.2.6 脂肪酶酯化程度的测定和转化率的计算

取 1 mL 反应液,(取样时停止振荡 5 s,待酶沉降分层后取上清液),用流动相稀释至 10 mL,用液相色谱专用的过滤膜过滤,进样。按 1.2.5 的方法检测烟酸含量。

酯化转化率(%) = 烟酸减少的量/按肌醇摩尔数理论消耗的烟酸的量×100%

酯化速率 = 烟酸减少的量/(按肌醇摩尔数理论消耗的烟酸的量×时间)

1.2.7 肌醇、肌醇烟酸酯和溶剂的液相色谱检测

取 1 mL 反应液,(取样时停止振荡 5 s,待酶沉降分层后取上清液),用流动相稀释至 10 mL,用液相色谱专用的过滤膜过滤,进样。按 1.2.5 的方法检测产物含量。

产物生成率(%) = 肌醇烟酸酯量/按肌醇摩尔数理论生成肌醇烟酸酯量×100%

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂特性对脂肪酶催化酯化反应的影响

作为酶反应介质的有机溶剂是影响非水相酶反应的最重要的因素。为了保持酶的活性构象,必须保证酶分子表面有一层水化外壳,而有机溶剂往往会破坏酶分子表面的水化外壳,导致酶分子直接与有机溶剂接触而变性、失活。此外,有机溶剂除直接或间接地改变底物和产物的能量状态外,还可以通过影响底物或产物在水相和有机相的分配来改变底物或产物在酶分子表面的浓度,从而影响酶促反应。作者考察了多种有机溶剂对脂肪酶酶促反应的影响,结果见表 1。

由表 1 可知,Novozyme 435 在叔丁醇中催化酯化反应有较高的反应活性,在 48 h 后测定的转化率

为 87.5%，肌醇烟酸酯质量浓度为 0.8 mg/mL。在其它溶剂中测定的转化率为 0，这是由于底物肌醇在这两种溶剂中的溶解度极低，底物分子相互接触的机会较小。

表 1 Novozyme 435 在不同反应介质中的酶促反应
Tab. 1 Reaction in different media by Novozyme 435

溶剂	转化率/%	肌醇烟酸酯浓度/ (mmol/L)
	48 h	48 h
二甲亚砜	5.0	0.056
丙酮	0	0
氯仿	0	0
乙醇	0	0
四氢呋喃	28.0	0
正辛烷	0	0
四氯化碳	0	0
乙腈	0	0
苯	0	0
叔丁醇	87.5	0.987
二甲基甲酰胺	8.0	0.067
吡啶	0	0

2.2 脂肪酶催化酯化反应的反应历程

在脱水叔丁醇有机介质中，Novozyme 435 能催化肌醇和烟酸合成肌醇烟酸酯，其反应历程见图 2。在最初的几个小时内，酯化反应的转化率是直线上升的，12 h 后反应基本平衡。

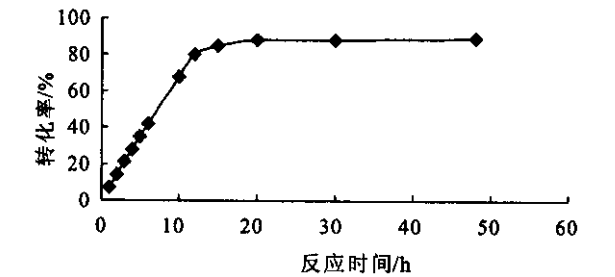


图 2 脂肪酶催化酯化反应的反应历程
Fig. 2 The reaction course with lipase catalysis

2.3 反应初始水活度对 Novozyme 435 催化酯化反应的影响

在叔丁醇中，脂肪酶为了维持酶分子的活性构相，其表面必须有一层单分子水层。这是维持酶活不可缺少的“必需水”，它就像润滑剂和增塑剂，用于维持酶活性所需构象的“柔性”，或称最适水量。当系统中的水量过高时，酶结构的柔性过大，酶向热力学不稳定的状态变化，容易造成酶的失活和酶结构的改变。而且，过量的水还可能在酶分子表面形成水簇，影响传质，降低酶促反应速度，并且可导

致酶的稳定性下降。当水量低于最适水量时，酶的构相过于“刚性”，从而失去其催化活性。只有在酶的蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性达到最佳点时，酶才表现出最大活力^[6,7]。由图 3 可知，随着反应初始水活度的增加，肌醇烟酸酯产物生产率增加，在水活度为 0.66~0.85 时，脂肪酶的酶活性较高。

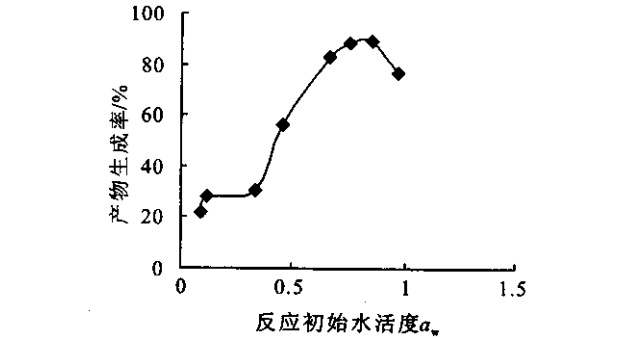


图 3 反应初始水活度对肌醇烟酸酯合成的影响
Fig. 3 Effect of initial water activity on inositol nicotinate synthesis

2.4 温度对 Novozyme 435 催化酯化反应的影响

在本反应体系中，温度对酶的催化活性有显著的影响。由图 4 可知，随着温度的升高，脂肪酶的活性增大，40℃后酶的活性随温度的升高下降。由于该酶在溶剂相中的不溶性以及酶的固定化促使酶构象的刚性增强，因此具有较好的热稳定性。随着温度的升高，分子扩散加快，有利于提高脂肪酶酯化反应的速率。超过最佳的温度作用点后，一方面由于载体对水有相当强的亲水性，微孔内的水提供了酶失活的条件，从而使酶蛋白变性，酶活力下降；另一方面，过高的温度不利于底物在溶剂中的溶解，故 Novozyme 435 催化酯化反应的酯化速率降低。

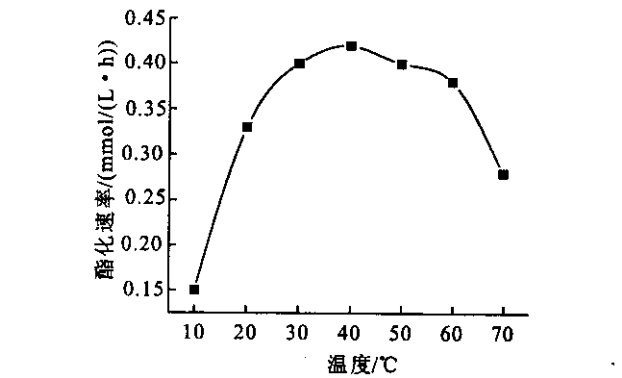


图 4 温度对脂肪酶催化肌醇烟酸酯合成的影响
Fig. 4 Effect of temperature on inositol nicotinate synthesis

2.5 pH 值对 Novozyme 435 催化酯化反应的影响
所用的缓冲溶液由 Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄ 配制

而成。由图5可知,在pH值为4~10的范围内,酶的酯化能力相差不大,而pH值6~8时,酶的酯化能力较大。一方面,在有机介质中酶分子微环境的pH值一般由其冻干前缓冲液的pH值所决定,但当酶分子置于酯化反应体系中时,反应体系中烟酸的存在使得酶分子表面水化层的实际pH值几乎一致;另一方面,脂肪酶固定化在大孔的阴离子树脂上,树脂可能有一定的缓冲能力,也降低了pH值对酶酯化能力的影响。

2.6 加酶量对Novozyme 435催化酯化反应的影响

酶的添加量不仅影响到反应的速度,而且对产品的成本、工业化生产的可能性也有重要的影响。实际上,在有机溶剂中的催化反应也遵循在水相中的相同原理。在溶剂相中,在一定浓度范围内,酶的添加量控制了酯合成转化率。由图6可见,当加酶量低于5 mg/mL时,酯化反应的速率随着加酶量的增加而提高,当超过5 mg/mL时,基本不影响反应速率。

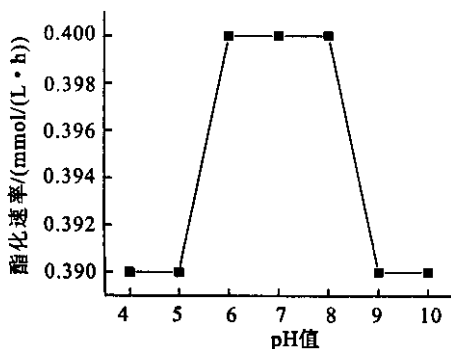


图5 pH值对脂肪酶合成肌醇烟酸酯的影响

Fig. 5 Effect of pH on inositol nicotinate synthesis

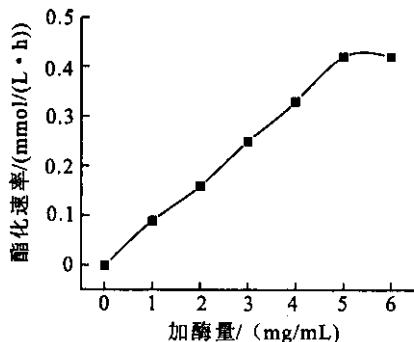


图6 加酶量对脂肪酶合成肌醇烟酸酯的影响

Fig. 6 Effect of the amount enzyme on inositol nicotinate synthesis

2.7 底物浓度及比例对Novozyme 435催化酯化反应的影响

溶剂的极性对脂肪酶酶促合成的影响很大。作为肌醇烟酸酯合成的反应底物——烟酸的极性

较强。因此,反应体系中的浓度直接影响到脂肪酶的催化活力、底物的转化率、产物浓度,从而影响下游工程的成本。另外,从反应热力学平衡分析,底物的浓度比对反应转化率的影响相当大,因此确定合适的底物浓度和浓度比是非常重要的。

图7为肌醇和烟酸摩尔比为1:6时对反应的影响。结果表明,在烟酸浓度低于6.0 mmol/L时,产物生成率基本保持不变,当烟酸浓度达到7.2 mmol/L时,产物生成率下降,这可能不是烟酸对酶活的抑制作用,而是随着底物中肌醇的增加,肌醇在叔丁醇中溶解度不大,当肌醇的浓度达到1.2 mmol/L时,继续加大肌醇量,由于反应体系中有固体肌醇存在,分子间相互接触的机会减少,从而导致了测定产物生成率的下降。图8的结果表明,随着烟酸和肌醇之间摩尔比的增加,肌醇烟酸酯的浓度增大,达到6:1时,其产物浓度达到稳定。

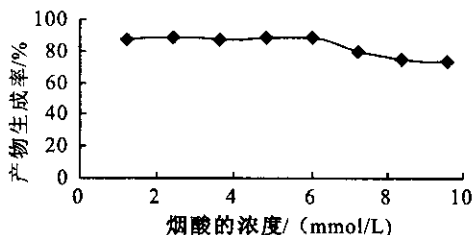


图7 底物浓度对脂肪酶合成肌醇烟酸酯的影响

Fig. 7 Effect of substrate concentrations on inositol nicotinate synthesis

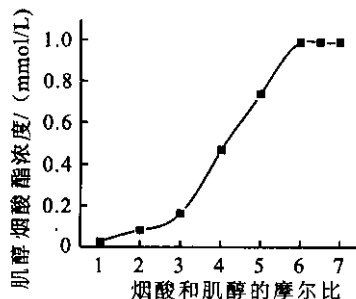


图8 肌醇和烟酸的摩尔比对脂肪酶催化肌醇烟酸酯合成的影响

Fig. 8 Effect of inositol and nicotinic acid molar ratio on inositol nicotinate synthesis

3 结论

有机溶剂、反应初始水活度、温度、pH值、加酶量、底物浓度以及浓度比分别对Novozyme 435催化酯化反应有不同程度的影响。最适的反应介质为叔丁醇;最适的温度为40℃;反应初始水活度维持在0.66~0.85时,脂肪酶的活性较高;pH值在4~10范围内对酯化反应影响不大;加酶量达到5

mg/mL 时,酯化反应的速率保持稳定;肌醇和烟酸的最适摩尔比为 1 : 6;而烟酸的浓度在低于 6. 0 mmol/L 时,产物生成率较高,为 89. 0%,且基本保持不变。

参考文献:

[1] 杜伟,宗敏华,凌均建,等. 反应介质对酶选择性的影响[J]. 工业微生物,2000,30(2):58—60.
[2] 梁峰,程浩文. 烟酸肌醇酯的合成[J]. 应用化工,2001,30(3):19—20.
[3] 王书勤. 世界有机药物专利制备方法大全(第二卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社,1996. 5.
[4] Ame L D,Trani M, Robert L. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1998,22:212—216.
[5] Gillies B, Yamada H , Armstrong D W. Production of flavor esters by immobilized lipase[J]. **Biotechnology Letters**,1987, 9(10):709—714.
[6] Han D , Rhee S J. Characteristics of lipase catalyzedglycerolysis of triglyceride in AOT-iosctane reversed micelles[J]. **Biotech Bioengin**,1986,28:1250—1255.
[7] Pleiss J,Fisher M, Schmid R D. Anatomy of lipase binding sites:the scillile fatty acid binding site[J]. **Chemistry and Physics of Lipids**,1999,41(2):404—407.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 30 页)

按最佳条件提取两次,第一次提取率 96. 29%,第二次提取率 3. 11%,两次即可提取完全。

3 结 论

1) 常规有机溶剂浸提法提取元宝枫叶中总黄酮物质的优化条件为:溶剂体积分数 50%乙醇,料液比为 1 g : 25 mL,提取时间为 1. 5 h,浸提温度为 70 ℃。正交实验 4 个因素对浸提效果影响的主次顺序为乙醇浓度→提取温度→料液比→提取时间。

2) 超声辅助法提取元宝枫叶中总黄酮物质的优化条件为:溶剂为体积分数 50%的乙醇溶液,料液比为 1 g : 15 mL,提取时间为 30 min,浸提温度为 60 ℃。几个因素对浸提效果影响的主次顺序为浸提温度→超声作用时间→料液比→乙醇浓度。

3) 两种方法都可以有效地提取元宝枫总黄酮;两种方法第一次提取率差别不大,但超声辅助法提取时间缩短 1 h,料液比减少 40%,温度低 10 ℃。

参考文献:

[1] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1990.
[2] 尉芹,王兰珍,马希汉,等. 元宝枫开发利用研究[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1996.
[3] 庄向平. 银杏叶中总黄酮含量的测定和提取方法[J]. 中草药,1992,23(3):122—124.
[4] 李红兵,孙立华,孙国才. 超声波提取法在中国药典中的应用探讨[J]. 中国药品标准,2001,2(4):18—20.
[5] 尹莲. 超声法提取茶多酚的实验研究[J]. 食品工业,1999,(3):10—11.

(责任编辑:朱 明)