

文章编号: 1001-3555(2011)03-0269-07

# 含离子液体介质中酶催化糖基化合成 4-羟基苯乙基 $\beta$ -D-葡萄糖苷

岳磊<sup>1</sup>, 林琼妹<sup>1</sup>, 许格<sup>1</sup>, 林磊<sup>1</sup>, 石贤爱<sup>1,2\*</sup>

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350108; 2. 福建省医疗器械和医药技术重点实验室 福建 福州 350002)

**摘要:** 探讨了  $\beta$ -葡萄糖苷酶在离子液体/有机溶剂/缓冲溶液介质中催化直接糖基化反应合成 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷. 考察了反应体系组成、反应条件等因素对反应的影响. 研究表明, 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐 ( $C_4Mim \cdot PF_6$ )/1,4-二氧六环/柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液是糖基化反应的合适介质. 当三者的体积含量分别为 17%、68% 和 15%, 底物 D-(+)-葡萄糖和 4-羟基苯乙醇的含量分别为 100 mg/mL 和 220 mg/mL、酶活力为 12 U/mL 时, 在 pH 6.0、50 °C、275 rpm 条件下进行直接糖基化, 产物浓度可达 18.9 mg/mL.

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷; 离子液体; 糖基化反应

中图分类号: O643.3 文献标识码: A

4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷(红景天苷)为传统中药红景天中的主要有效成分, 具有抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗辐射和延缓机体衰老、防止老年疾病的功能<sup>[1]</sup>, 可以红景天为原料直接提取, 或以化学法、植物细胞培养法以及微生物发酵法等方式制备<sup>[2-7]</sup>, 其缺点主要是产物浓度低、反应时间长等<sup>[8]</sup>, 难以投入实际应用.

酶催化糖基化反应的条件温和, 具有很高的区域选择性和立体专一性. 2004 年, Tong 等<sup>[4]</sup>利用苹果籽粉  $\beta$ -葡萄糖苷酶以 4-羟基苯乙醇和葡萄糖为底物首次进行了合成(见图 1); 此后, Yu<sup>[5]</sup>在叔丁醇体系中实现了 1.9 mg/(mL · d) 的时空产率; 王梦亮<sup>[6]</sup>在缓冲溶液-叔丁醇体系中反应 50 h 后产物浓度达到 6.0 mg/mL; 刘璘<sup>[7]</sup>在水-1,2-二乙酰氧基乙烷体系中产物浓度达到了 12.4 mg/mL.

在传统水相中因受水解-糖基化反应热力学平衡的限制而导致糖苷产物浓度较低<sup>[9]</sup>. 以传统非水有机溶剂为反应介质是近几年酶催化生物合成的研究热点<sup>[9-10]</sup>, 但  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷生物合成的困难之处在于: (1)  $\beta$ -葡萄糖苷酶、底物、产物均易溶于水, 难溶于有机溶剂; (2) 水相体系中, 虽然溶解问题得到解决, 但存在严重的水解反应; (3) 在极性有机溶剂中, 虽然底物和产物可部分溶解, 水解反应的平衡也有所改

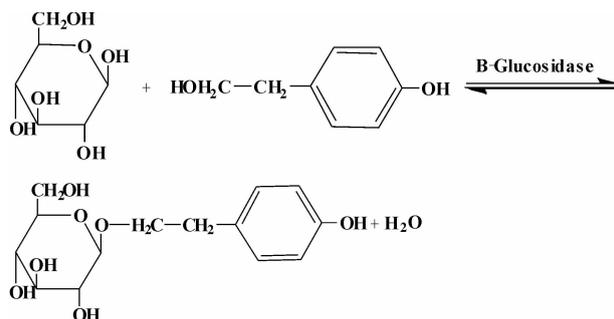


图 1 酶催化糖基化合成 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷  
Fig. 1 Enzymatic glycosylation for synthesis of salidroside

善, 但酶的溶解性、活性和稳定性差; (4) 高浓度葡萄糖对酶具有抑制作用, 且葡萄糖容易糖基化生成二糖. 因此, 选择适当的反应介质实现在同一个反应体系中协调以上困难之处, 是实现高效率合成的关键.

离子液体所具备的优良性质使其适合于同时含有极性底物和非极性底物的溶解、以及同时还需控制水活度的酶催化糖基化反应<sup>[11]</sup>, 从而打破水解-糖基化反应的平衡而促进糖基化反应的进行. 同时离子液体具有较好的生物相容性, 酶在其组成的单相或两相体系中能够保持较高活力的报道较多<sup>[12-14]</sup>. 本文研究了  $\beta$ -葡萄糖苷酶在含离子液体的介质中催化 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷的直接

收稿日期: 2011-03-10; 修回日期: 2011-05-10.

基金项目: 福建省发改委资助项目(No. 闽发改投资[2008]256号).

作者简介: 岳磊(1986-), 男, 硕士研究生.

\* 通讯联系人, Tel: 86-591-22866379; Fax: 86-591-22866379; E-mail: shixa@fzu.edu.cn.

糖基化合成,并对反应的影响因素进行考察,以期  
为建立有效的反应体系提供依据.

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

4-羟基苯乙醇(酪醇)为 TCI 公司产品; D-(+)-葡萄糖为 Alfa Aesar 公司产品; 4-羟基苯乙基  $\beta$ -D-葡萄糖苷购自中国药品生物制品鉴定所; 苦杏仁  $\beta$ -葡萄糖苷酶为 Sigma 公司产品(6 U/mg); 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐( $C_4MIm \cdot BF_4$ )、1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐( $C_6MIm \cdot BF_4$ )、1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐( $C_4MIm \cdot PF_6$ )、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐( $C_6MIm \cdot PF_6$ )均购自中科院兰州化物所;其他试剂均为分析纯.

### 1.2 实验方法

糖基化反应在带有温控装置的恒温培养振荡器中进行. 在 10 mL 磨口三角瓶中,加入预定量的 D-(+)-葡萄糖和 4-羟基苯乙醇,再加入预定量的离子液体、有机溶剂和 pH 值 6.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液. 在特定温度及转速下预混合 30 min,再向反应体系中加入预定量的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,使反应液总体积为 550  $\mu$ L 并开始反应,并在预定时间取样分析.

### 1.3 检测方法

在 550  $\mu$ L 反应液中加入 4 mL 甲醇终止反应并超声波震荡 20 min 后,于 14000 rpm 下离心 5 min,上清液用 0.45  $\mu$ m 的滤膜进行过滤,产物用 HPLC (日本岛津, LC-10A)测定. 色谱条件: SPD-10A 紫外检测器; 依利特  $C_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm  $\times$  5  $\mu$ m); 流动相为甲醇:水(15:85),流速 1 mL/min; 检测波长 275 nm; 柱温室温; 进样量 20  $\mu$ L.

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子液体种类对糖基化反应的影响

离子液体对酶催化反应的影响因其种类和浓度的不同而迥异<sup>[10-17]</sup>. 本实验考察了 4 种离子液体对糖基化反应的影响,结果见图 2.

Zhao 等<sup>[15]</sup>报道离子对酶活性和稳定性的影响通常遵循 Hofmeister 序列,即 kosmotropic 阴离子和 chaotropic 阳离子组成的盐使酶更加稳定,而 chaotropic 阴离子和 kosmotropic 阳离子组成的盐对酶有失活作用. 由图 3 可知,  $BF_4^-$  和  $PF_6^-$  属于 chaotropic 阴离子,根据 Hofmeister 序列,酶应在含  $BF_4^-$  和

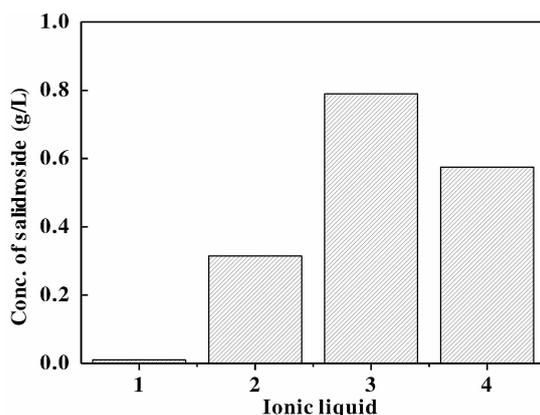


图 2 离子液体种类对糖基化反应的影响

Fig. 2 Effect of ionic liquids on glycosylation

Note: 1-  $C_4MIm \cdot BF_4$ ; 2-  $C_6MIm \cdot BF_4$ ; 3-  $C_4MIm \cdot PF_6$ ; 4-  $C_6MIm \cdot PF_6$

Reaction conditions: Buffer 50  $\mu$ L, glucose 40 mg/mL, tyrosol 60 mg/mL,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 200 rpm, 48 h

$PF_6^-$  介质中活性较低. 然而, Yang 等<sup>[16]</sup>发现离子液体对糖苷酶催化活性的影响并不遵循该序列, Lou 等<sup>[17]</sup>在研究中也发现类似规律. 从图 2 中可以看出,  $\beta$ -葡萄糖苷酶在含  $BF_4^-$  和  $PF_6^-$  介质中表现出了一定的糖基化活性,其中在  $C_4MIm \cdot PF_6$  中产物浓度最大达到 0.8 mg/mL,高于阴离子为  $BF_4^-$  的离子液体,这可能与两者的极性差别有关:其一,组成中含  $PF_6^-$  的离子液体极性小于含  $BF_4^-$  的离子液体,而极性较高的环境中酶分子构象变化大,可能导致酶催化位点的部分失活,因而在  $PF_6^-$  构成的离子液体中产物浓度略大,且在比  $C_4MIm \cdot BF_4$  极性略小的  $C_6MIm \cdot BF_4$  中产物浓度也略大;其二,阴离子为  $BF_4^-$  的离子液体亲水性高于阴离子为  $PF_6^-$  的离子液体,这也可能导致  $\beta$ -葡萄糖苷酶的部分结构水被溶剂剥夺,引起酶的部分失活. 此外,虽然随离子液体烷基链长的增加,其极性降低,但同时粘度增大,其中  $C_6MIm \cdot PF_6$  粘度( $\eta = 207 Pa \cdot s$ , 298 K)过大,影响底物和酶分子的结合及产物的分离,导致产物浓度降低. 而阴离子为  $BF_4^-$  的两种离子液体粘度均很小,因而对传质没有太大影响.

但在以纯离子液体为反应介质时,产物浓度偏低,这可能是离子液体的高粘度和高离子强度造成了底物扩散和酶的活性与稳定性受到影响,进而影响产物浓度,因此考虑通过向体系中加入有机溶剂以改善这一不足.



可利用水含量低于临界水平,致使酶活力减弱,产物浓度减少.产物浓度并未达到预期水平,这可能由于1,4-二氧六环具有很强的亲水性,致使反应体系中酶表面可利用的自由水含量过低,因此需要提高反应体系中的水活度,从而提高产物浓度.

### 2.3 缓冲溶液含量对糖基化反应的影响

酶催化的逆水解反应中,控制反应体系的水活度是非常重要的.根据本实验的前期研究结果,通过向反应体系中加入pH为6.0的柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液,构成不同水活度的反应体系,考察了其对该反应的影响,结果见图6.

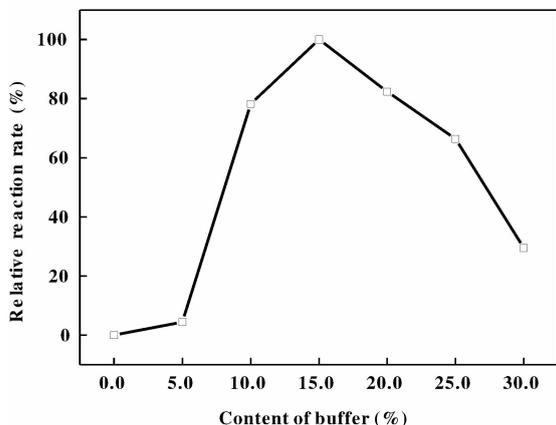


图6 缓冲溶液含量对糖基化反应的影响

Fig. 6 Effect of buffer content on glycosylation

Reaction conditions:  $C_4MIm \cdot PF_6$  77 ~ 110  $\mu L$ , 1,4-dioxane 308 ~ 440  $\mu L$ , buffer 0 ~ 165  $\mu L$ , Glucose 100 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 200 rpm, 48 h

由图6可知,随缓冲溶液含量的不断增加,产物浓度先升高随后迅速下降,当缓冲溶液含量为15%时,反应速率达到最大,反应48 h后产物浓度可达14.5 mg/mL.而在不含缓冲溶液的体系中产物浓度最高仅为3.6 mg/mL,含15%缓冲溶液的1,2-二氧六环体系中产物浓度为10.2 mg/mL,均明显低于该反应体系中的产物浓度,可见离子液体的存在有利于糖基化反应的进行.

离子液体在含水反应介质中会离解为具有极性区域和非极性区域的微小结构,形成离子强度很高的溶剂环境,这些微小结构通过改变酶分子电荷分布、影响底物和产物的溶剂化状态、与介质中的其他成分进行相互作用而改变反应介质特性等方式影响反应<sup>[12-14]</sup>,进而达到提高产物浓度的目的.

在含离子液体和1,4-二氧六环的反应体系中,实际的水活度可能远低于表观的缓冲液含量.一般酶催化反应的必需水活度在1%以下,而本反应体系中的最适缓冲溶液含量为15%,这一现象值得进一步研究.当缓冲溶液含量超过15%时,反应体系中多余的自由水将加快水解反应,导致无法获得更高的产物浓度.

### 2.4 温度对糖基化反应的影响

$\beta$ -葡萄糖苷酶催化糖基化合成4-羟基苯乙基 $\beta$ -D-葡萄糖苷的反应是一个可逆反应,该反应的平衡常数受到反应温度的影响.因此本实验考察了温度对反应的影响,结果如图7所示.

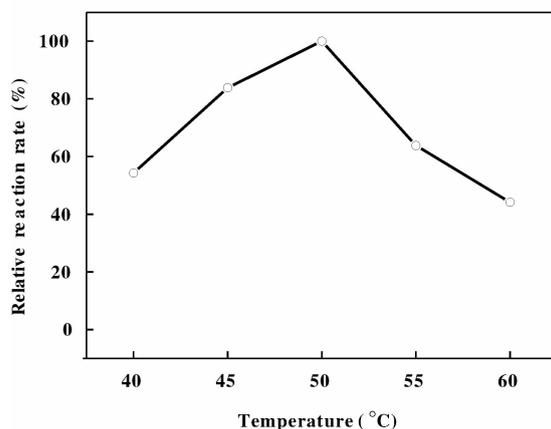


图7 温度对糖基化反应的影响

Fig. 7 Effect of temperature on glycosylation

Reaction conditions:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu L$ , 1,4-dioxane 374  $\mu L$ , buffer 82.5  $\mu L$ , Glucose 100 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, pH 6.0, 200 rpm, 48 h

图7表明,在不同温度条件下,酶催化活性受到显著影响,在50  $^{\circ}C$ 时,酶的催化活性最大.在低于50  $^{\circ}C$ 时,产物浓度随温度的升高快速上升,但反应温度超过50  $^{\circ}C$ 后,反应速率急剧下降,这可能是过高的温度导致了糖基化反应的平衡常数下降.

### 2.5 底物浓度对糖基化反应的影响

4-羟基苯乙基 $\beta$ -D-葡萄糖苷的糖基化合成属于糖苷逆水解反应,受热力学控制,可以通过向反应体系中加入高浓度底物以提高反应推动力,使反应向逆水解反应的方向进行.底物浓度对糖基化反应活性的影响如图8所示.

从图8A中可以看出,在葡萄糖浓度为

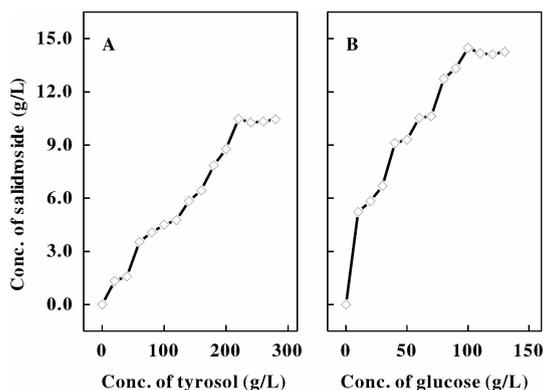


图8 底物浓度对糖基化反应的影响

Fig. 8 Effect of substrate concentration on glycosylation

Reaction condition:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu$ L, 1,4-dioxane 374  $\mu$ L, buffer 82.5  $\mu$ L,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 200 rpm, 48 h. A: Glucose 40 mg/mL; B: tyrosol 220 mg/mL

40 mg/mL时, 随4-羟基苯乙醇浓度的不断升高, 产物浓度不断增大, 当4-羟基苯乙醇浓度为220 mg/mL时, 产物浓度达到最大值; 另一方面, 当固定4-羟基苯乙醇浓度为220 mg/mL时, 随着葡萄糖浓度不断增加, 产物浓度随之增大, 当葡萄糖浓度为100 mg/mL时, 产物浓度达到最大值(14.5 mg/mL, 见图8B)。体系中葡萄糖浓度不宜过大, 以减少副产物寡糖的生成。

## 2.6 金属离子对糖基化反应的影响

在探讨了反应中影响反应平衡产率的各种因素后, 进一步考察了部分影响反应速率的因素, 以期在较短的反应时间内达到平衡产率。

金属离子对苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶催化合成4-羟基苯乙基 $\beta$ -D-葡萄糖苷并不是必须的, 但其对糖基化反应的速率仍表现出一定的调节作用, 这可能是金属离子通过影响酶催化反应过程中的电子传递过程而影响酶的糖基化活性所致, 因为有些金属离子能与酶催化活性中心或以外的结合位点相结合, 从而对酶催化活性造成影响。本实验考察了6种金属对反应的影响, 实验结果如图9所示。

不同种类金属离子对糖基化的平均速率的影响是不同的。从图9中看出, 在所选择的金属离子中, 只有 $Mg^{2+}$ 对反应速率有促进作用, 在加入 $Mg^{2+}$ 条件下, 反应速率为对照的113%。进一步优化后发现, 当 $Mg^{2+}$ 离子浓度为5 mmol/L时, 反应48 h后产物浓度可达17.2 mg/mL。而 $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Zn^{2+}$ 对糖基化活性均具有不同程度的

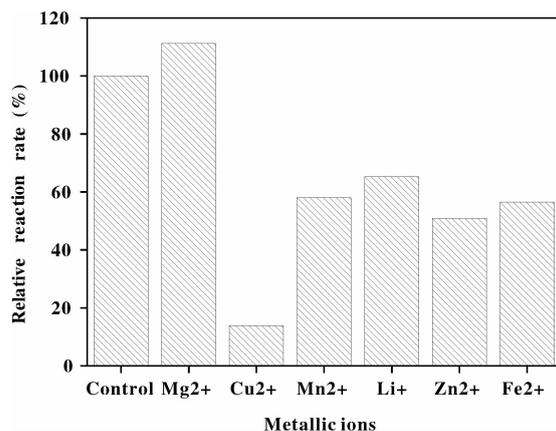


图9 金属离子种类对糖基化反应的影响

Fig. 9 Effect of metallic ions on glycosylation

Reaction condition:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu$ L, 1,4-dioxane 374  $\mu$ L, buffer 82.5  $\mu$ L, Glucose 100 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL, metallic ions 5 mmol/L,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 200 rpm, 48 h

抑制作用, 其中 $Cu^{2+}$ 的抑制作用最为强烈。

## 2.7 传质效率对糖基化反应的影响

含 $C_4MIm \cdot PF_6$ 的反应体系粘度较高, 提高体系的传质系数可望提高反应速率。结果见图10。

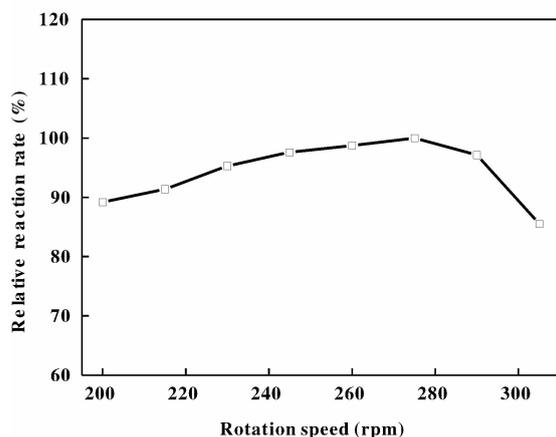


图10 振荡速率对糖基化反应的影响

Fig. 10 Effect of rotation speed on glycosylation

Reaction condition:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu$ L, 1,4-dioxane 374  $\mu$ L, buffer 82.5  $\mu$ L, Glucose 100 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL,  $Mg^{2+}$  5 mmol/L,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 48 h

从图10可以看出, 在振荡速率达到275 rpm时, 反应速率最大, 此条件下反应48 h后产物浓度达到17.6 mg/mL。当振荡速率继续增大时, 产物浓度降低, 在290 rpm和305 rpm时的反应速率分别

只有 275 rpm 时的 97% 和 85%，这可能与粘度过大时剪切力可能导致酶的部分失活有关。

## 2.8 酶催化糖基化反应动力学参数测定

目前以  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化合成对羟基苯乙基- $\beta$ -D-葡萄糖苷的反应均在有机溶剂中进行, 为进一步了解离子液体的加入对糖基化反应的影响, 分别对含 15% 缓冲溶液的 1,4-二氧六环和上述含离子液体反应介质中的反应动力学参数进行了测定, 结果见图 11。

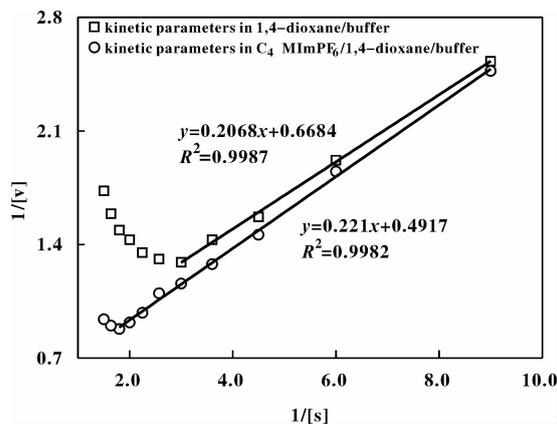


图 11 不同反应介质中动力学参数

Fig. 11 Kinetic parameters in different reaction mediums

Reaction condition: Buffer 82.5  $\mu$ L, Glucose 20-120 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL,  $Mg^{2+}$  5 mmol/L,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 275 rpm, 16 h, A: 1,4-dioxane 467.5  $\mu$ L; B:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu$ L, 1,4-dioxane 374  $\mu$ L

由图 11 可知, 在不含离子液体的反应介质中当 D-(+)-葡萄糖浓度为 60 mg/mL 时即产生底物抑制效应, 而在含离子液体的介质中 100 mg/mL 时才产生底物抑制效应. 同时, 通过 Lineweaver-Burk 作图法可计算得到酶在含 15% 缓冲溶液的 1,4-二氧六环中的  $V_{max}$  为  $1.50 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $K_m$  为  $0.31 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_i$  为  $1.16 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 而在含 15% 缓冲溶液和含 17%  $C_4MIm \cdot PF_6$  1,4-二氧六环中  $V_{max}$  为  $2.03 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $K_m$  值为  $0.45 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_i$  为  $0.17 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

以上现象可能与底物的去溶剂化和过渡态稳定化的能量有关. 由于离子液体的存在, 可能导致反应介质中的水活度低于含缓冲溶液的 1,4-二氧六环中的水活度, 因而极性底物 D-(+)-葡萄糖在后者的基态能量更低, 从而引起反应的活化能垒提高, 最大反应速率  $V_{max}$  下降, 且反应底物与酶结合

能力的  $K_m$  也下降, 底物抑制常数  $K_i$  上升, 导致临界底物抑制浓度下降. 除此之外, 该现象还可能与底物的扩散性、酶结构的变化及酶的构象可塑性的变化等因素也有关系, 但揭示这些因素的影响程度有待进一步的研究。

## 2.9 反应的时间进程

反应的平衡产率和达到平衡产率的时间是可逆反应的重要参数. 从图 12 中可以看出, 在上述条件下, 随反应时间的延长, 产物浓度不断增加, 在 120 h 时达到最大值, 继续延长反应时间, 产物浓度基本不变, 说明水解反应与糖基化反应达到平衡, 此时的产物浓度可达 18.9 mg/mL。

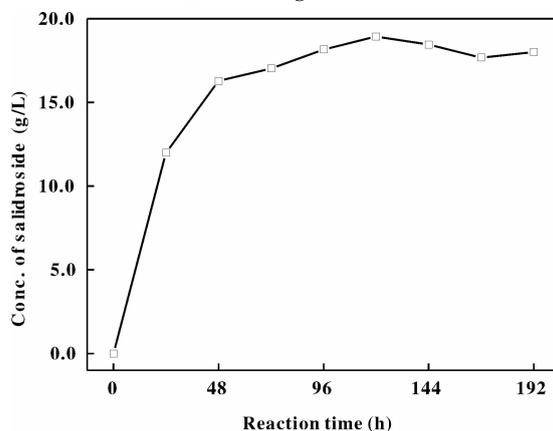


图 12 反应的时间进程

Fig. 12 Time course of glycosylation

Reaction condition:  $C_4MIm \cdot PF_6$  93.5  $\mu$ L, 1,4-dioxane 374  $\mu$ L, buffer 82.5  $\mu$ L, Glucose 100 mg/mL, tyrosol 220 mg/mL,  $Mg^{2+}$  5 mmol/L,  $\beta$ -Glucosidase 12 U/mL, 50  $^{\circ}C$ , pH 6.0, 275 rpm

## 3 结 论

在  $C_4MIm \cdot PF_6$ /1,4-二氧六环/缓冲溶液的反应体系中, 当三者的体积比例为 17:68:15, 4-羟基苯乙醇浓度为 220 mg/mL,  $\beta$ -D-葡萄糖浓度为 100 mg/mL 时, 在 275 rpm, 50  $^{\circ}C$  条件下反应 48 h, 产物浓度可达 17.2 mg/mL, 继续反应至 120 h 后达到平衡, 产物浓度为 18.9 mg/mL. 理论上产物浓度为 1.3 mg/mL 时即具有工业生产价值<sup>[5]</sup>, 因此研究结果具有明显的实际应用价值。

## 参考文献:

- [1] Ma Li (马莉), Master dissertation of second military medical university (第二军医大学硕士学位论文) [D].

- 2006
- [2] Deng Mei(邓梅). Master dissertation of fourth military medical university(第四军医大学硕士学位论文)[D]. 2007
- [3] Xu Jian-feng(许建峰), Han Ai-ming(韩爱明), Feng pu-sun(冯朴荪), *Chin J Biotechnol*(生物工程学报)[J], 1996, **12**(4): 460–465
- [4] Tong Ai-min, Xu Jian-he, *Bioorg Med Chem Lett* [J], 2004, **14**(9): 2 095–2 097
- [5] Yu Hui-lei, Xu Jian-he. *J Biotechnol* [J], 2008, **133**(4): 469–477
- [6] Wang Meng-liang(王梦亮), Zhang Fang(张芳), Liu Dian-sheng(刘滇生), *Chin J Catal*(催化学报)[J], 2006, **27**(3): 233–236
- [7] Liu Lin(刘璘), Mei Le-he(梅乐和), *et al. Chem React Eng Technol*(化学反应工程与工艺)[J], 2007, **23**(4): 332–336
- [8] Wu Sh-X, Zu Y-G, Madeline Wu. *J Biotechnol* [J]. 2003, **106**(1): 33–43
- [9] a. Faijes M, Planas A. *Carbohydr Res* [J], 2007, **342**(12–13): 1 581–1 594  
b. Meng Zhao-wei(孟昭伟), Yuan Qi-peng(袁其朋). *J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2010, **24**(1): 82–86  
c. Zeng Jia-yu(曾家豫), Liu Xiong-xiong(刘雄雄), Kong Wei-bao(孔维宝), *et al. J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2010, **24**(4): 378–386
- [10] a. Zhou Chen(周晨), Wu Xue-ming(吴薛明), He Bing-fang(何冰芳), *Chem Ind Eng Prog*(化工进展)[J], 2010, **29**(7): 1 292–1 299  
b. Wang Kan(王刊), Wang Ju-fang(王菊芳). *J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2009, **23**(1): 73–77
- [11] Earle M J, Seddon K R, *Pure Appl Chem* [J], 2000, **72**(7): 1 391–1 398
- [12] Rogers R D, Seddon K R, *Science* [J], 2003, **302**(5646): 792–793
- [13] Kim K W, Song B, Choi M Y, *et al. Org Lett* [J], 2001, **3**(10): 1 507–1 509
- [14] Eckstein M, Sesing M, Kragl U, *et al. Biotechnol Lett* [J], 2002, **24**(11): 867–872
- [15] Zhao H, Malhotra S V, *et al. Biotechnol Lett* [J], 2002, **24**(15): 1 257–1 259
- [16] Yang Z. *J Biotechnol* [J], 2009, **144**(1): 12–22
- [17] Lou W Y, Zong M H, Liu Y Y, *et al. J Biotechnol* [J], 2006, **125**(1): 64–74

## Enzymatic Glycosylation for Synthesis of 4-Hydroxyl Phenylethyl $\beta$ -D-Glucoside in Medium Containing Ionic Liquids

YUE Lei<sup>1</sup>, LIN Qiong-Mei<sup>1</sup>, XU Ge<sup>1</sup>, LIN Lei<sup>1</sup>, SHI Xian-Ai<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2. Fujian Key Laboratory of Medical Instrument and Pharmaceutical Technology, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The glycosylation catalyzed by  $\beta$ -glucosidase for synthesis of 4-hydroxyl phenylethyl  $\beta$ -D-glucoside (salidroside) in mixed medium of ionic liquids/organic solvent/buffer solution was studied. The effects of some important factors on the glycosylation such as the constitution of the medium, and the reaction conditions were investigated. The results showed that 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $C_4MIm \cdot PF_6$ )/1,4-dioxane/citric acid-phosphate buffer was the proper mixed medium for biosynthesis of salidroside. When the volume proportions of these components were 17%, 68% and 15% respectively, the product concentration would reach 18.9 mg/mL under these conditions: D-(+)-glucose 100 mg/mL, 4-hydroxyphenethyl alcohol (tyrosol) 220 mg/mL,  $\beta$ -glucosidase 12 U/mL, pH 6.0, 50 °C and 275 rpm for 120 h.

**Key words:**  $\beta$ -Glucosidase; salidroside; ionic liquid; glycosylation