

• 药剂与工艺 •

去唾液酸糖蛋白受体配体胆固醇-半乳糖苷的酶促合成优化研究

陈 静, 程 怡*, 郑品劲, 聂 华, 陈宇潮, 仝一丹, 罗利华, 李 朝

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 在有机相中利用酶促反应合成能被去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)特异性识别的配体胆固醇-半乳糖苷分子, 对其合成工艺进行优化。方法 采用质谱和核磁共振谱鉴别产物结构; 单因素和正交设计法优化酶促合成条件。结果 酶促最佳条件为底物胆固醇癸二酸乙烯酯(CH-VS)与乳糖醇(LA)物质的量之比4:1, 脂肪酶 Novozym 435 25 mg, 反应32 h, 产率高达92%。结论 该方法高效、反应条件可行、产物专一。

关键词: 去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)配体; 胆固醇-半乳糖苷; 酶促合成; 单因素试验; 正交试验设计

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0502-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.008

Optimization of enzymatic synthesis of asialoglycoprotein receptor ligand cholesterol-vinyl sebacate-lactitol

CHEN Jing, CHENG Yi, ZHENG Pin-jin, NIE Hua, CHEN Yu-chao, TONG Yi-dan, LUO Li-hua, LI Zhao

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To synthesize asialoglycoprotein receptor (ASGPR) ligand cholesterol-vinyl sebacate-lactitol (CH-VS-LA) by using enzymatic reaction in organic phase and to optimize its synthesis process. **Methods** MS and ^{13}C -NMR were used to identify the structure of product, enzymatic synthesis conditions were optimized via single-factor test and orthogonal experimental design. **Results** The enzymatic optimum conditions were as following: the molar ratio of cholesterol-vinyl sebacate (CH-VS) and lactitol (LA) was 4:1, the amount of lipase Novozym 435 was 25 mg, reactional time was 32 h, and productive rate was 92%. **Conclusion** The method is highly efficient, the reaction conditions are reasonable, and the process produces no by-product.

Key words: asialoglycoprotein receptor ligand; cholesterol-vinyl sebacate-lactitol; enzymatic synthesis; single-factor test; orthogonal test design

去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是半乳糖/*N*-乙酰半乳糖胺受体^[1], 其表达在肝脏实质细胞^[2]。相关研究表明^[3-5], ASGPR能与末端为半乳糖基或*N*-乙酰半乳糖胺基的糖蛋白结合, 被肝实质细胞摄取, 为制备新型的肝靶向性药物提供新方法。根据ASGPR特性, 以胆固醇癸二酸乙烯酯(cholesterol-vinyl sebacate, CH-VS)和乳糖醇(lactitol, LA)为底物酶促合成ASGPR配体胆固醇-半乳糖苷(CH-VS-LA)。反应

机制为癸二酸二乙烯酯(vinyl sebacate, VS)两侧的酯键断裂, 分别与胆固醇(cholesterol, CH)上的羟基、LA中开链多元醇中的伯羟基酯化结合。CH是细胞膜的重要成分^[6], 使得含CH的配体易透过细胞膜; LA分子包含的半乳糖基团能与ASGPR特异性结合发挥靶向作用。Connolly等^[7]研究发现, 半乳糖苷的疏水基团可增加半乳糖苷与ASGPR的亲和力, 从而增加了配体与ASGPR的结合性。Markus等^[8]也类似地阐述“疏水性的桥梁”重要的

收稿日期: 2014-08-16

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20134425110010)

作者简介: 陈 静(1989—), 女, 广东人, 在读硕士研究生, 研究方向为药物载体及新型给药系统。

Tel: 13699738965 E-mail: gzschenj@163.com

*通信作者 程 怡, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事药物载体及新型给药系统。Tel: (020)39358041 E-mail: vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

连接作用。故 CH-VS 结构中的 VS 作为连接 LA 和 CH 的“桥梁”，为今后肝靶向性脂质体修饰物的研究提供新颖的思路。

配体分子合成一般采用化学法和生物酶法合成，但化学法通常在高温及酸或碱条件下进行，生成的产物没有区域选择性，副产物多；生物酶法具有反应条件温和、高区域选择性及无毒、环保等优势^[9-10]。本实验着重探讨了配体分子 CH-VS-LA 酶促合成的最优条件，最终达到了高效、反应条件可行、产物专一的目的。

1 仪器和材料

TSQ Quantum Access MAX 三重四级杆液质联用仪，赛默飞世尔科技有限公司；Bruker 400M 核磁共振波谱仪，瑞士布鲁克公司；Dionex 高效液相色谱仪，美国戴安公司；THZ-D 台式恒温振荡器，太仓市实验设备厂；XW-80A 微型漩涡混合仪，上海沪西分析仪器厂；MS，赛默飞世尔科技有限公司，ESI 源 (+) 模式，喷雾电压 3 kV，毛细管温度 350 °C；¹³C-NMR，Avance III 400 MHz，溶剂为氘代吡啶，分辨率 126 MHz，Switzerland。

CH-VS-LA，实验室自制，质量分数 92%，批号 20140529；CH-VS，实验室自制^[11]，批号 20140315；乳糖醇（拉克替醇散，乳糖醇质量分数 > 98%，批号 20131218），江苏正大天晴药业股份有限公司；脂肪酶 Lipozyme TLIM（TLIM）、Novozym 435 固定化脂肪酶（N435），诺维信生物技术有限公司；Candida rugosa lipase CRL（CRL），Sigma 公司；4Å 型分子筛，批号 20121216，阿拉丁公司。甲醇，色谱纯，批号 20140213；水为重蒸馏水，吡啶（批号 20140311）、丙酮、正己烷等试剂均为分析纯，均已用分子筛脱水处理。

2 方法与结果

2.1 CH-VS-LA 酶促反应

精密称取 LA 13.5 mg、一定物质的量比的 CH-VS，加入混合溶剂吡啶-丙酮（2：1）适量，置于 10 mL 锥形瓶，超声溶解后，再加 4Å 型分子筛 100 mg，添加酶 N435 25 mg，气浴摇床（55 °C，220 r/min，32 h），抽滤、溶剂洗涤，滤渣弃去，回收溶剂，得粗产物。

2.2 粗产物纯化

加混合溶剂环己烷-甲醇（10：1）适量，溶解后加入硅胶粉 2 g，减压回收溶剂，得干燥硅胶粉，过硅胶柱（ $d=1.5$ cm， $h=21$ cm），甲醇洗脱，HPLC

监测，100% 甲醇作流动相，监测到目标产物（保留时间 6~7 min），含目标产物接样液减压回收溶剂，得白色蜡状物（CHS-VS-LA），称定质量，并计算其产率。

$$\text{产率} = m_{\text{实际}} / m_{\text{理论}}$$

式中， $m_{\text{实际}}$ 表示实际产量， $m_{\text{理论}}$ 表示理论产量

2.3 单因素考察

2.3.1 反应溶剂 反应溶剂会影响底物的溶解性而影响产率，底物 CH-VS 在吡啶中溶解度较差，但底物 LA 通过试验得知在吡啶中溶解度较好。为了两底物都有较好的溶解度，采用双混合溶剂方法，包括吡啶-丙酮、吡啶-四氢呋喃、吡啶-二甲基甲酰胺、吡啶-二甲基亚砜、吡啶-叔戊醇、吡啶-乙二醇二甲醚（溶剂之间的比例均为 2：1）、吡啶，进行考察，其他因素溶剂比例、脂肪酶种类（N435）、酶量（25 mg）、底物 LA 与 CH-VS 物质的量之比（1：4）、反应温度（55 °C）、时间（32 h）不变，计算产率，结果产率分别为 71.60%、60.30%、9.98%、9.98%、24.94%、14.64%、15.83%。结果显示，在有机介质的酶促合成中，溶剂的性质对底物的溶解性有显著联系，影响到产率。在以上混合溶剂中，吡啶-丙酮的混合溶剂产率最高。

2.3.2 混合溶剂比例 根据“2.3.1”的结果，选择吡啶-丙酮混合溶剂，考察混合溶剂不同比例 3：1、2：1、1：1、1：2，其他因素脂肪酶种类（N435）、酶量（25 mg）、底物 LA 与 CH-VS 物质的量之比（1：4）、反应温度（55 °C）、时间（32 h）不变，计算产率，结果产率分别为 43.94%、71.60%、56.20%、18.80%。吡啶-丙酮混合溶剂的比例不同，其极性大小也不同。脂肪酶能达到最大的催化作用，需要合适的极性溶剂。吡啶-丙酮物质的量之比为 2：1 时，N435 达最大催化效应，产率最高。

2.3.3 脂肪酶种类 参考相关文献报道^[12-15]可知脂肪酶常用作高效的生物催化剂，其中催化糖酯合成的脂肪酶常见有 TLIM、N435 和 CRL，对此 3 种进行考察，其他因素反应溶剂（吡啶-丙酮）及其比例（2：1）、酶量（25 mg）、底物 LA 与 CH-VS 物质的量之比（1：4）、反应温度（55 °C）、时间（32 h）不变，计算产率，结果产率分别为 12.51%、83.25%、10.20%。结果显示，表明脂肪酶 N435 催化反应的产率最高，证实了脂肪酶的专一性。

2.3.4 底物 LA 与 CH-VS 物质的量之比 确定混合溶剂（吡啶-丙酮）及其比例（2：1）、脂肪酶种类

(N435)、酶量(25 mg)、反应温度(55 ℃)、时间(32 h)不变,以不同的LA与CH-VS物质的量之比(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6)进行反应,计算产率,结果产率分别为56.22%、73.33%、89.03%、91.22%、87.27%、83.09%。可以看出,当底物物质的量之比在1:1~1:4,底物CH-VS量与产率呈正相关,直至反应极限,当底物物质的量之比达1:5和1:6时,产率降低。证实在此反应中,CH-VS作为酰基供体,根据化学反应平衡移动原理,酰基供体的数量增多,使反应更加容易向减弱这种趋势的方向移动,即酯合成方向。

2.3.5 酶量 确定混合溶剂(吡啶-丙酮)及其比例(2:1)、脂肪酶种类(N435)、底物LA与CH-VS物质的量之比(1:4)、反应温度(55 ℃)、时间(32 h)不变,反应中添加不同质量(5、15、25、35、45 mg)的N435进行反应,计算的产率,结果产率分别为45.02%、80.17%、86.05%、83.03%、77.28%。结果显示,N435在5~25 mg时,反应产率与酶量呈正比,25 mg时达到最大催化效果;在N435量>25 mg时,反应产率与酶量成反比。

2.3.6 反应温度的考察 确定混合溶剂(吡啶-丙酮)及其比例(2:1)、脂肪酶种类(N435)、底物LA与CH-VS物质的量之比(1:4)、酶量(25 mg)、反应时间(32 h)不变,恒温振荡器设置不同的温度(40、45、50、55、60 ℃)进行反应,计算产率,结果产率分别为54.70%、62.97%、71.22%、79.53%、39.89%。温度在40~55 ℃,最佳反应温度是55 ℃。温度有利于酶提供底物分子反应所需要的能量,增加分子间的碰撞机率,加快反应速度,提高转化率;超出适当的温度范围,酶内部蛋白质空间结构发生改变,使酶失活,反应的效率降低。而且混合溶剂里含有丙酮,丙酮的沸点约为57 ℃,60 ℃使溶剂挥发,产率快速下降。故最佳温度选择55 ℃。

2.3.7 反应时间的考察 控制混合溶剂(吡啶-丙酮)及其比例(2:1)、脂肪酶种类(N435)、底物LA与CH-VS物质的量之比(1:4)、酶量(25 mg)、温度条件(55 ℃)不变,设定不同的反应时间(8、16、24、32、40 h),计算产率,结果产率分别为41.97%、52.38%、85.32%、86.49%、70.65%。结果显示,8~24 h反应时间与产率成正比;24~32 h的产率约86%,基本不再增长,揭示反应达到平衡。再反应到40 h,HPLC检测发现产率下降,出现水解峰,原因可能是部分产物被水解。

2.4 正交试验设计

2.4.1 试验设计 通过单因素考察,分别考察脂肪酶N435量(A, mg)、反应时间(B, h)、底物LA与CH-VS物质的量之比(C)3因素3水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。正交试验设计及结果见表1,方差分析结果见表2。

由表2可知,A、B、C3个因素的影响都有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01),由表1分析得知,极差(R)的大小显示各因素的影响程度,影响程度大小依次为 $A>C>B$,即脂肪酶N435量>底物物质的量之比>反应时间,最优组合为 $A_2B_3C_2$,即脂肪酶量为25 mg,反应时间为32 h,底物LA与CH-VS物质的量之比为1:4。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/mg	B/h	C	D(空白)	产率/%
1	20(1)	16(1)	1:3(1)	1(1)	46.35
2	20(1)	24(2)	1:4(2)	2(2)	69.42
3	20(1)	32(3)	1:5(3)	3(3)	66.18
4	25(2)	16(1)	1:4(2)	3(3)	81.13
5	25(2)	24(2)	1:5(3)	1(1)	84.75
6	25(2)	32(3)	1:3(1)	2(2)	78.75
7	30(3)	16(1)	1:5(3)	2(2)	68.52
8	30(3)	24(2)	1:3(1)	3(3)	64.79
9	30(3)	32(3)	1:4(2)	1(1)	85.27
K_1	60.65	65.33	63.30	72.12	
K_2	81.54	72.99	78.60	72.23	
K_3	72.86	76.73	73.15	70.70	
R	20.89	11.40	15.31	1.53	

表2 方差分析
Table 2 Variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	661.02	2	150.99	$P<0.01$
B	202.57	2	46.27	$P<0.05$
C	361.26	2	82.52	$P<0.05$
D(误差)	4.38	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

2.4.2 优化工艺验证试验 以最优组合 $A_2B_3C_2$ 重复试验3批次(批号20140623、20140715、20140730),结果产率分别为90.86%、91.18%、91.22%,平均产率可达 $(91.08\pm0.22)\%$,说明该优化工艺合理。

2.5 定量测定方法学的建立

2.5.1 HPLC 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-正己烷 (94:6), 等度洗脱; 进样量 10 μL; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称定 CH-VS-LA 0.1 g, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配得质量浓度为 10 mg/mL 对照品储备液。

2.5.3 空白对照溶液的制备 按照“2.1”项制备操作不加 LA 与 CH-VA 反应液, 反应 32 h, 取 1 mL 反应液于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液即得。

2.5.4 供试品溶液的制备 按照“2.1”项制备酶促反应液, 反应 32 h, 取 1 mL 反应液于 5 mL 量瓶, 用甲醇稀释到刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液即得。

2.5.5 CH-VS-LA 标准曲线制备 精密量取对照品 CH-VS-LA 适量, 置于容量瓶中, 加入流动相定容至 5 mL, 依次稀释至 6.80、5.10、4.08、3.40、2.72、1.70 mg/mL, 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 按“2.5.1”项色谱条件测定, 记录峰面积, 以质量浓度 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=8.1172X-2.7151$, $r=0.9995$; 结果表明, CH-VS-LA 在质量浓度 1.70~6.80 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.5.6 专属性考察 取对照品溶液、空白对照溶液和供试品溶液依次进样, 记录色谱图, 见图 1。结果显示, LA 没有紫外吸收 (结构中不含不饱和键), 底物 CHS-VS 的保留时间为 16~17 min, CHS-VS-LA 的保留时间为 6~7 min, 底物 LA 和 CH-VS 不影响 CH-VS-LA 的测定, 分离度良好, 专属性强。

2.5.7 精密度试验 取 3.4 mg/mL 的对照品溶液,

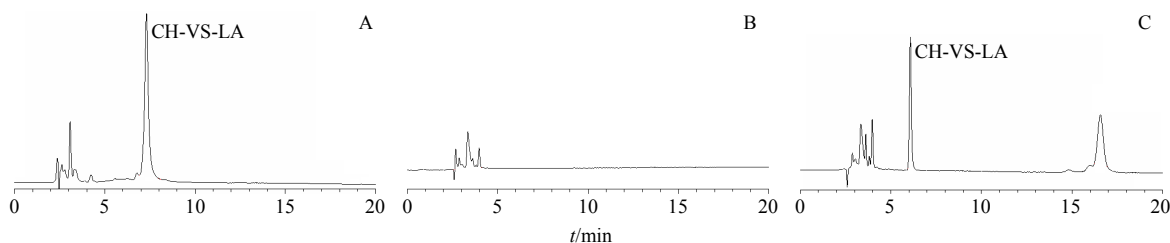


图1 CHS-VS-LA 对照品 (A)、空白对照 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of CHS-VS-LA reference substance (A), blank control (B), and sample (C)

重复进样 5 次, 记录峰面积, CH-VS-LA 的峰面积 RSD 为 2.3%, 实验结果表明本方法的精密度良好。

2.5.8 稳定性试验 取 3.4 mg/mL 供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、8、12 h 进样, 记录峰面积, 得 RSD 为 2.7%, 说明样品在 12 h 内能保持稳定。

2.5.9 加样回收率试验 取 3.4 mg/mL 的反应液 9 份, 置于 10 mL 量瓶中, 分为 3 组, 每组各 3 份。每组分别精密加入“2.5.2”项方法制备的对照品储备液适量, 使其质量浓度分别为供试品质量浓度的 80%、100%及 120%, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。按照“2.5.1”项色谱条件进样, 记录峰面积, 外标法计算高、中、低质量浓度的回收率, 结果平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.3%。

2.6 产物结构分析

2.6.1 MS 谱 MS 谱图显示 $[M+Na]^+$ 峰 919.5, 故产物相对分子质量为 896.5, 与目标产物相对分子质量 896 相吻合。

2.6.2 碳谱 ¹³C-NMR (126 MHz, pyridine-d₅) δ:

173.45 (C-28), 172.80 (C-37), 139.81 (C-6), 122.55 (C-9), 106.23 (C-44), 84.68 (C-40), 76.80 (C-48), 74.96 (C-2), 73.61 (C-46), 72.74 (C-42), 72.67 (C-45), 71.46 (C-39), 70.15 (C-41), 69.62 (C-47), 66.50 (C-38), 63.63 (C-43), 61.59 (C-49), 56.55 (C-14), 56.13 (C-15), 50.02 (C-7), 42.25 (C-4), 39.70 (C-13), 39.49 (C-12), 38.36 (C-22), 37.01 (C-3), 36.58 (C-5), 36.25 (C-20), 35.78 (C-18), 34.50 (C-29), 34.12 (C-36), 31.90 (C-10), 31.80 (C-8), 29.08 (C-31, 34), 29.03 (C-32, 33), 28.25 (C-1), 27.98 (C-16), 27.95 (C-23), 25.10 (C-30), 24.93 (C-35), 24.24 (C-17), 23.90 (C-21), 22.68 (C-25), 22.44 (C-24), 21.03 (C-11), 19.13 (C-27), 18.71 (C-19), 11.75 (C-26)。δ 173.45、172.80 是 VS 的 C-28/37; δ 139.81、122.55 是 CH 环内 C=C 所对应的峰, δ 74.96 是 CH 的 C-2, 与 AIST 数据库 δ 71.81 相比, 向低场移动了 3×10^{-6} , 符合酯化反应规律; δ 66.50 属于 LA 末端的 C-38, 与 AIST 数据库 δ 63.74 相比, 向低场移动了

约 3×10^{-6} , 符合酯化反应规律。综上所述, 合成产物为目标分子。

3 讨论

本实验选用 CH-VS 和 LA 作为底物, N435 催化合成 CH-VS-LA。合成工艺证实了酶法合成条件简单(脂肪酶直接催化 LA 与 CH-VS 的反应)、反应条件温和, 而且底物组分少(LA 与 CH-VS), 产率高、副产物少, 简化了分离纯化的步骤。LA 选用的是药品拉克替醇散(LA 98%), 拉克替醇散不仅提供了半乳糖配体被 ASGPR 特异识别, 实现肝靶向作用, 同时具有治疗肝性脑病疗效, 为今后以含半乳糖的肝靶向药物作为前药提供设计方案。CH-VS 为半乳糖和脂质体提供足够空间距离, 提高被 ASGPR 识别能力。乙烯基作为酰基供体与羟基发生酯交换, 副产物乙醇转化成为乙醛而挥发, 促进反应向正方向进行。因此, 酶法合成肝靶向性脂质体配体 CH-VS-LA 设计思路是有效可行的。

同时作了单因素和正交设计法优化肝靶向性脂质体配体 CH-VS-LA 合成工艺考察, 先考察影响酶促反应的各单因素, 包括脂肪酶种类、反应溶剂、混合溶剂比例、底物物质的量之比、酶量、反应温度、反应时间。再根据单因素考察的结果, 确定正交设计法的因素与水平。正交设计法针对脂肪酶 N435 量、反应时间以及底物 LA 与 CH-VS 物质的量之比 3 因素 3 水平, 运用 $L_9(3^4)$ 正交表得出正交试验的结果, 分析出 CH-VS-LA 合成工艺优化是合理可行的。同时进行了方法学考察, 其线性、专属性、精密度、加样回收率良好, 适用于检测 CH-VS-LA 的量。因此, 酶催化 LA 与 CH-VS 合成肝靶向性脂质体配体 CH-VS-LA, 奠定了制备新型肝靶向性药物的基础, 为今后脂质体的修饰物的研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Ashwell G, Morell A G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins [J]. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1974, 41: 99-128.
- [2] Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver [J]. *Annu Rev Biochem*, 1982, 51: 531-554.
- [3] 田宝磊, 张永亮, 陈成功. 肝脏去唾液酸糖蛋白受体及其应用 [J]. *生命的化学*, 2001, 21(4): 276-279.
- [4] Martin S. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(43): 10009-10018.
- [5] Stockert R J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression [J]. *Phys Rev*, 1995, 75(3): 591-609.
- [6] 熊祥玲. 漫谈胆固醇 [J]. *云南科技管理*, 2013(3): 69-70.
- [7] Connolly D T, Townsend R R, Kawaguchi K, et al. Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes: Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257(2): 939-945.
- [8] Markus G, Felicitas L, Joanna E A, et al. Receptor specific targeting with liposomes *in vitro* based on Sterol-PEG1300 anchors [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 529-538.
- [9] Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic polymerization [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(12): 3793-3818.
- [10] 毛勇, 徐达, 杨博, 等. 有机相脂肪酶催化合成棕榈酸植物甾醇酯 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(12): 25-27.
- [11] 聂华, 程怡, 郑品劲, 等. 有机相脂肪酶催化合成脂质体修饰物胆固醇癸二酸单烯酯 [J]. *中草药*, 2013, 44(23): 3289-3295.
- [12] Xin J Y, Wang Y, Liu T, et al. Biosynthesis of corn starch palmitate by lipase Novozym 435 [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 7226-7236.
- [13] Guat K K, Jia H S, Azlina H K, et al. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TLIM in biodiesel production via enzymatic transesterification [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(16): 6558-6561.
- [14] Huang Y, Zheng H, Yan Y J. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(2): 504-515.
- [15] Yomi W, Toshihiro N, Yoshinori H, et al. Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step *in situ* enzymatic reaction [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2004, 81(4): 339-345.