

新型温控离子液体介质中脂肪酶催化合成乙酸苯乙酯

单海霞¹, 陆 杨¹, 李在均¹, 李 明¹, 蔡 燕¹, 孙秀兰², 张银志²¹江南大学化学与材料工程学院, 江苏无锡 214122²江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122

摘要: 设计合成了三种同分异构离子液体 1,3-二正戊基咪唑六氟磷酸盐 ([D(*n*-C₅)Im]PF₆)、1,3-二异戊基咪唑六氟磷酸盐 ([D(*i*-C₅)Im]PF₆) 和 1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐 ([D(2-mb)Im]PF₆)。以假单胞菌脂肪酶 *Pseudomonas cepacia* 催化合成乙酸苯乙酯为模型反应, 分别考察了反应介质对酶行为的影响。结果发现, 酶在离子液体 [D(2-mb)Im]PF₆ 中的活性及反应性能明显高于有机溶剂正己烷。基于 [D(2-mb)Im]PF₆ 离子液体的温控特点, 提出了一种高温反应与低温分离相结合的乙酸苯乙酯合成路线。通过优化实验, 得到合成乙酸苯乙酯的最佳反应条件为: 30 mg 酶, 1.0 g 离子液体, 2% 含水量, 反应温度 35 °C, 反应时间 48 h。此时, 乙酸苯乙酯产率达 92.3%。脂肪酶在 [D(2-mb)Im]PF₆ 中的稳定性是在正己烷中的 7.4 倍, 且重复使用 10 次后催化活性没有明显降低。此外, 采用圆二色谱和内源荧光光谱法研究了不同介质中脂肪酶结构的变化。结果表明, 脂肪酶在 [D(2-mb)Im]PF₆ 中有较大的氨基酸残基裸露程度和良好的二级结构稳定性。

关键词: 温控离子液体; 脂肪酶; 乙酸苯乙酯; 1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐

中图分类号: O643/Q55

文献标识码: A

A Novel Temperature-Controlled Ionic Liquid as the Medium for Phenylethyl Acetate Synthesis Catalyzed by Lipase

SHAN Haixia¹, LU Yang¹, LI Zaijun^{1,*}, LI Ming¹, CAI Yan¹, SUN Xiulan², ZHANG Yinzhi²¹School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Three 1,3-dipentylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid isomers, 1,3-di-*n*-pentylimidazolium hexafluorophosphate ([D(*n*-C₅)Im]PF₆), 1,3-di-isopentylimidazolium hexafluorophosphate ([D(*i*-C₅)Im]PF₆), and 1,3-di(2-methylbutyl)imidazolium hexafluorophosphate ([D(2-mb)Im]PF₆), were designed and synthesized. They were used as media for the synthesis of phenylethyl acetate catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase. The activity and reactivity of the lipase in [D(2-mb)Im]PF₆ is obviously higher than that in organic solvent hexane. Based on the temperature-controlled characteristics of [D(2-mb)Im]PF₆, we designed a new route to synthesize phenylethyl acetate catalyzed by lipase, in which the reaction and the separation of the product were carried out under a relatively high and low temperature, respectively. By investigating the influence of various factors on the yield of product, optimal conditions for the synthesis of phenylethyl acetate were obtained, i.e. the amount of lipase 30 mg, the ionic liquid 1.0 g, water content 2%, reaction temperature 35 °C and reaction time 48 h. Under the optimal conditions, the yield of phenylethyl acetate was up to 92.3%. Also, the stability of the lipase in the [D(2-mb)Im]PF₆ medium was 7.4-fold that in hexane. The lipase in [D(2-mb)Im]PF₆ was recycled 10 times without substantial diminution in activity. Moreover, circular dichroism and fluorescence spectroscopy were used to follow the changes of enzyme structure in different solvents. The results showed that the lipase in the ionic liquid has excellent secondary structure stability and slightly big exposure level of amino-acid residues.

Key words: temperature-controlled ionic liquid; lipase; phenylethyl acetate; 1,3-di(2-methylbutyl)imidazolium hexafluorophosphate

收稿日期: 2009-09-23.

联系人: 李在均. Tel: 13912371144; Fax: (0510)88917763; E-mail: zaijunli@263.net

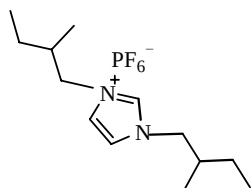
基金来源: 国家自然科学基金 (20771045 和 20676052); 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2007AA10Z428); 浙江省自然科学基金 (Y407321); 江苏省“青蓝工程”。

本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版 (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722067>)。

乙酸苯乙酯为无色油状透明液体,呈甜的玫瑰和蜂蜜香气,存在于苹果、葡萄及茶叶中,是一种常用的合成香料^[1],广泛应用于调制玫瑰、橙花、紫罗兰、野蔷薇以及果味香料中,同时也是我国允许使用的食用香料.以硫酸和磷酸等强酸为催化剂制备乙酸苯乙酯副反应多,产品品质低下,同时设备腐蚀严重.因此,开发一种绿色高效的乙酸苯乙酯生物合成方法具有重要的现实意义.

离子液体是一种环境友好的绿色溶剂,可替代易挥发的有机溶剂应用于非水生物催化过程^[2~6].离子液体与酶的作用比较复杂,酶在离子液体中可能表现为活性的增加、保持或丧失^[7~9].本课题组已成功开发出系列咪唑六氟磷酸盐类离子液体,并应用于生物催化转酯合成反应.研究表明,离子液体中阳离子构型对酶行为影响较大^[10,11],在离子液体介质中酶表现出较高的稳定性和选择性,有效抑制了副反应.同时发现,传统的离子液体甲基丁基咪唑六氟磷酸盐用于乙酸苯乙酯的生物合成时,脂肪酶活性不高,产率较低.这可能是由于该离子液体咪唑环上烷基较小,极性较大,使得离子液体与酶的亲和性差,从而导致酶催化活性下降.

本文在咪唑环的1,3位同时引入两个戊基,设计合成了三种1,3-二戊基咪唑六氟磷酸盐的同分异构体离子液体,即1,3-二正戊基咪唑六氟磷酸盐([D(*n*-C₅)Im]PF₆),1,3-二异戊基咪唑六氟磷酸盐([D(*i*-C₅)Im]PF₆)和1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐([D(2-mb)Im]PF₆),并应用于假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*, PCL)脂肪酶催化合成乙酸苯乙酯反应.[D(2-mb)Im]PF₆(见图式1)在室温下呈固态(熔点为57.3℃),温度高于25℃时它可完全溶于2-苯乙醇或乙酸苯乙酯,低于25℃又从体系中迅速析出.因此,本文利用[D(2-mb)Im]PF₆的温控特性,提出一种高温反应和低温分离相结合的新路线.



图式1 1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐的分子结构式
Scheme 1. Molecular structure of 1,3-di(2-methylbutyl)imidazolium hexafluorophosphate ([D(2-mb)Im]PF₆).

1 实验部分

1.1 离子液体的合成

在500 ml三口瓶中,加入100 ml (0.92 mol) *N*-三甲基硅烷基咪唑(上海国药集团,分析纯)和230 ml (1.86 mol) 1-溴-2-甲基丁烷(上海国药集团,分析纯),摇匀.将混合体系慢慢升温至80℃机械搅拌反应48 h,得到黄色粘稠液体1,3-二(2-甲基丁基)咪唑溴化盐[D(2-mb)Im]Br.加入200 ml去离子水后,将其转移至分液漏斗中振荡,静置分层,除去上层未反应的原料,下层液体移入1000 ml烧杯中,在机械搅拌下,分批加入170 g (0.92 mol) 六氟磷酸钾(上海国药集团,分析纯)固体,继续搅拌4 h,得到[D(2-mb)Im]PF₆粗品.用去离子水洗涤粗品,直到水洗后的水相中加入AgNO₃溶液无沉淀产生,然后转移至500 ml圆底烧瓶,在R-201型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司)上于90℃旋蒸,直至圆底烧瓶瓶底不出现气泡为止.纯化后的[D(2-mb)Im]PF₆离子液体为无色固体,熔点为57.3℃.其它离子液体按上述相似的方法合成与纯化,只是所使用的溴代烷烃不同.其中,1-正丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐[*n*-C₄MIm]PF₆按文献[12]方法自制.

离子液体结构采用核磁氢谱分析仪(UNITY INOVA, 美国瓦里安公司)进行表征(¹H NMR, CD₃COCD₃, 400 MHz). [D(*n*-C₅)Im]PF₆: δ 0.88 (t, *J* = 6.84 Hz, 6H), 1.29~1.33 (m, 4H), 1.34~1.39 (m, 4H), 1.91~2.06 (m, 4H), 4.34 (t, *J* = 7.32 Hz, 4H), 7.76 (d, *J* = 1.56 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 1.56 Hz, 1H), 9.01 (s, 1H); [D(*i*-C₅)Im]PF₆: δ 0.97 (d, *J* = 6.80 Hz, 12H), 1.61~1.68 (m, 2H), 1.83~1.89 (m, 4H), 4.38 (t, *J* = 7.32 Hz, 4H), 7.78 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 9.07 (s, 1H); [D(2-mb)Im]PF₆: δ 0.86 (t, *J* = 7.33 Hz, 6H), 0.95 (d, *J* = 6.35 Hz, 6H), 1.18~1.46 (m, 4H), 2.00~2.09 (m, 2H), 4.18 (d, *J* = 7.32 Hz, 4H), 7.75 (d, *J* = 1.60 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 1.60 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H).

1.2 乙酸苯乙酯的合成

在10 ml具塞锥形瓶中,依次加入2.0 ml (16.2 mmol) 2-苯乙醇(上海国药集团,分析纯),1.5 ml (16.2 mmol) 乙酸乙烯酯(上海国药集团,分析纯),1.0 g 离子液体(或正己烷1.0 ml),最优含量的超纯水,30 mg 假单胞菌脂肪酶PCL(Sigma公司).将具塞锥形瓶置于气浴恒温振荡器(金坛市医疗仪器厂)中,控制温

度为 35 °C, 转速为 180 r/min. 一定时间间隔取样 30 μ l, 加入 970 μ l 正己烷萃取, 摇晃 2 min. 取正己烷层 500 μ l, 加入 10 μ l 内标 (乙酸苄酯), 在 9790 型气相色谱仪 (温岭市福立分析仪器有限公司) 上分析并计算产率. 色谱柱为 SE-54 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m), FID 检测器; 柱温 190 °C; 进样器与检测器温度 300 °C; 载气为氮气, 流量 30 ml/min; 进样量 0.2 μ l; 分流比 50:1. 各物质保留时间为: 乙酸乙烯酯 1.2 min, 乙醛 1.4 min, 乙酸苄酯 1.8 min, 乙酸苯乙酯 2.1 min, 2-苯乙醇 2.8 min.

1.3 酶半衰期的测定

在 10 ml 具塞锥形瓶中加入 1.0 g [D(2-mb)Im]-PF₆ 或 1.0 ml 正己烷, 脂肪酶 30 mg, 于 35 °C 保温一定时间后依次加入 2.0 ml 2-苯乙醇, 1.5 ml 乙酸乙烯酯和优化的水量, 反应一定时间后取样分析. 由于本反应符合一级反应动力学模型, 因此, 剩余酶活 $A = A_0 e^{-kt}$, 其中, k 为速率常数, A_0 为初始酶活. 当 $A = A_0/2$ 时可得半衰期 $t_{1/2} = \ln(2/k)$. 酶活力定义为一定反应条件下, 单位时间内生成 1 μ mol 产物所需要的酶量.

1.4 离子液体极性的测定

移取 3 ml 的 10 μ mol/L 芘-甲醇溶液和 3 ml 离子液体于 10 ml 棕色瓶中. 混合液在 50 °C 真空干燥 6 h, 除去甲醇, 剩余溶液用 RF-530 型荧光分光光度计 (日本岛津公司) 进行检测. 激发波长 339 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 1.5 nm, 35 °C 氙灯检测, 扫描范围为 300~500 nm. 计算芘荧光发射光谱的第一振动带 ($I_I = 373$ nm) 和第三振动带 ($I_{III} = 384$ nm) 的强度比值 (I_I/I_{III}), 再根据 I_I/I_{III} 结果分析芘所处微环境的极性.

1.5 酶内源荧光光谱的测定

转酯化反应结束后, 将瓶中溶液迅速过滤, 如果反应体系中含有离子液体, 先用冷乙酸乙烯酯冲洗至 PCL 脂肪酶红外光谱检测显示无 PF₆⁻ 存在时, 再用 4 °C 冷乙醚洗去吸附于酶上的底物和溶剂^[13]. 室温挥发除去乙醚后, 准确称取干燥的脂肪酶溶于 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液, 配制成 0.1 mg/ml 酶溶液, 低温保存备用. 酶液的荧光光谱用 RF-530 型荧光分光光度计进行测定, 荧光光谱激发波长为 285 nm, 激发与发射光狭缝宽度分别为 5 和 10 nm, 35 °C 氙灯检测, 扫描范围为 300~450 nm.

1.6 酶圆二色谱的测定

按 1.5 节中酶液配制的方法处理后, 在 MOS-450

型圆二色谱仪 (法国 bio-logic 公司) 上进行圆二色谱 (CD) 分析. 样品池光程为 0.1 cm, 灵敏度为 2 mdeg/cm, 扫描波长范围为 190~250 nm, 扫描速度为 3.3 nm/s, 在室温下进行测定. 平均残基分子量取 112, CD 谱用残基摩尔椭圆度 (deg·cm²/mol) 表示, 得出圆二色谱图后, 用 K₂D₂ 分析脂肪酶的二级结构含量.

1.7 水含量测定

测定离子液体的水含量时, 准确称取离子液体样品 0.2 g, 放入 WS-100 水分测定仪 (江苏科迪仪器有限公司) 电解池中. 测定反应体系水含量时, 在含有 2.0 ml 的 2-苯乙醇, 1.5 ml 的乙酸乙烯酯, 1.0 g 的离子液体 (或正己烷 1.0 ml) 和 30 mg 脂肪酶的具塞锥形瓶中, 加入不同量的水, 并置于气浴恒温振荡器中计时反应, 温度 35 °C, 转速 180 r/min, 用气相色谱进行产率分析. 产率最高时对应的体系水含量定义为体系最优水含量.

2 结果与讨论

2.1 离子液体的选择

介质性质是影响非水生物催化反应中酶活性和反应性至关重要的因素, 本文分别考察了在四种离子液体和正己烷中乙酸苯乙酯产率随时间的变化, 结果见图 1. 可以看出, 仅在 [D(2-mb)Im]PF₆ 离子液体中, 脂肪酶催化反应的初始反应速率和产率高于有机溶剂正己烷介质, 效果最好. 可见, 尽管三种离

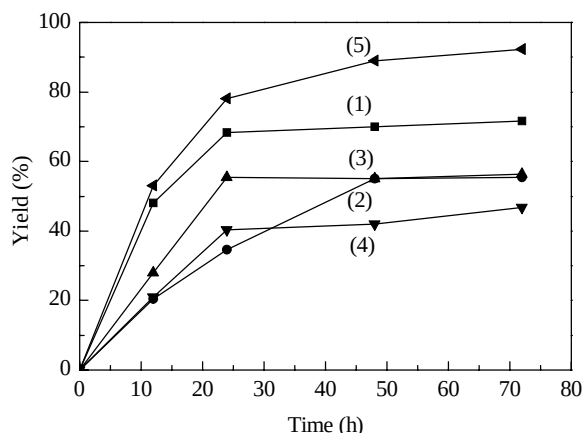


图 1 不同介质中乙酸苯乙酯合成反应进程

Fig. 1. Time courses for the synthesis of phenylethyl acetate in different media. (1) Hexane; (2) [n-C₄MIm]PF₆; (3) [D(n-C₅)Im]PF₆; (4) [D(i-C₅)Im]PF₆; (5) [D(2-mb)Im]PF₆. Reaction conditions: vinyl acetate 1.5 ml, 2-phenylethanol 2.0 ml, ionic liquid 1.0 g or hexane 1.0 ml, pseudomonas cepacia lipase (PCL) 30 mg, optimal water content for different solvents.

子液体互为同分异构体,但对脂肪酶催化行为的影响却表现出较大差异.这主要是由于离子液体[D(2-mb)Im]PF₆的弱极性可保持酶表面必需水的缘故;同时可能由于该离子液体结构与脂肪酶发挥作用的催化活性口袋有较好的配合性,更好地维持了酶发挥催化特性所需要的结构.另外,与[n-C₄MIm]PF₆相比,[D(2-m)Im]PF₆离子液体本身有较大的阳离子,有机特性和疏水性增加,更加适合需要良好憎水性环境的非水生物催化,因此表现出更高的初始反应速率和产率.

为考察三种离子液体对脂肪酶催化反应的影响存在较大差异的原因,利用芘荧光探针测定了它们的内部极性,结果见表1.可以看出,[D(i-C₅)Im]PF₆极性较小,[D(n-C₅)Im]PF₆极性最大,这表明带有支链的离子液体的极性比直链的低.然而,离子液体极性与反应初始速率或产率并不完全相对应,这表明离子液体极性仅是影响酶行为的因素之一.因此,D(2-mb)Im]PF₆良好的亲生物性应归功于它特殊的分子构型,为脂肪酶PCL保持结构稳定和发挥催化作用提供了所需要的微环境.有关离子液体介质微环境的问题较复杂,还需要进一步研究.

表1 不同离子液体的极性
Table 1 Polarity of different ionic liquids

Ionic liquid	I _I /I _{III}
[n-C ₄ MIm]PF ₆	1.85 (1.84 ^[14])
[D(n-C ₅)Im]PF ₆	1.57
[D(i-C ₅)Im]PF ₆	1.42
[D(2-mb)Im]PF ₆	1.55

The pyrene solvent polarity is defined as I_I/I_{III} emission intensity ratio, where band I corresponds to an emission intensity of 373 nm and band III is of 384 nm.

2.2 反应条件的优化

考察了离子液体[D(2-mb)Im]PF₆介质中酶用量对乙酸苯乙酯产率的影响(反应时间均为48 h).结果表明,当酶用量为30 mg时,产率最大,继续增加酶用量,反应转化率趋于平缓.因此,适宜酶用量为30 mg.

温度是影响酶促反应的关键因素.在[D(2-mb)Im]PF₆介质中,当反应温度低于35 °C时,产率随反应温度的升高而增加,这可能是由于温度的升高使得离子液体黏度降低以及反应体系中的活化分子数增加所致;反应温度在35~38 °C时,产率达到最高且变化不大,这是由于在此温度范围内酶的活性构

象能够得以维持.超过40 °C后,酶的活性构象遭到破坏,酶活性降低,导致反应产率急剧下降.因此,适宜反应温度为35 °C.

本文还考察了离子液体加入量对酰化反应性能的影响.结果表明,产率先随离子液体加入量的增加而增加,当达到1.0 g后,继续增加其用量,产率基本不变.同时离子液体加入量太大,也不利于最终产物的分离.因此,[D(2-mb)Im]PF₆的加入量为1.0 g较为适宜.

对于非水生物催化体系而言,微量水的加入可能导致酶反应速率显著增加.因为水分子可以直接或间接地参与酶天然构象中所有的非共价相互作用,包括氢键、静电作用、疏水作用和范德华力.加入适量水可使酶外层紧密结合形成单层水分子,同时使脂肪酶在其蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间达到最佳平衡点,从而提高了酶的立体选择性,酶活力最高,产率增加.

表2给出了不同体系的最优水含量.由表可见,酶在干燥离子液体中的活性很低,当加入微量水后,酶发生可逆性复活现象.当向[D(2-mb)Im]PF₆体系加入少量水后,产率急剧增加,但当含水量超过2%时,产率基本维持不变.这是由于水中氢键作用使得反应体系极性增加,而生成乙酸苯乙酯的反应本身是要求有一定极性的.由于游离水较多将导致乙酸乙烯酯和乙酸苯乙酯水解,不利于产物生成.因此,适宜的含水量为2%.

综上所述,以[D(2-mb)Im]PF₆为介质,脂肪酶催化合成乙酸苯乙酯的最佳反应条件为:温度35 °C,酶用量30 mg,离子液体用量1.0 g,反应48 h,含水量

表2 不同介质中脂肪酶PCL催化合成乙酸苯乙酯反应的初始速率、最优水含量、离子液体含水量及产率

Table 2 Initial reaction rate of enzyme, optimal water content of system, water content of ionic liquid, and yield of phenylethyl acetate in different solvents catalyzed by lipase PCL

Medium	Initial reaction rate (μmol/(h·mg))	Yield (%)	Water content of ionic liquid (%)	Optimal water content (%)
Hexane	0.0121	71.6	—	3.0
[n-C ₄ MIm]PF ₆	0.0090	55.8	0.05900	4.0
[D(n-C ₅)Im][PF ₆]	0.0098	56.4	0.00199	3.0
[D(i-C ₅)Im][PF ₆]	0.0071	46.7	0.00152	1.5
[D(2-mb)Im][PF ₆]	0.0138	92.3	0.00159	2.0

Reaction conditions: vinyl acetate 1.5 ml, 2-phenylethanol 2.0 ml, ionic liquid 1.0 g or hexane 1.0 ml, lipase PCL 30 mg.

2%, 在此条件下, 产率随时间的变化结果表明, 反应 48 h 时达平衡, 产率为 92.3%. 同时也优化了其他介质中脂肪酶催化 2-苯乙醇转酯化生成乙酸苯乙酯的最佳条件, 其初始反应速率及最终产率结果见表 2.

2.3 酶的稳定性

酶的稳定性是酶催化反应的一个重要指标. 本文分别考察了脂肪酶 PCL 在 $[D(n-C_5)Im]PF_6$, $[D(i-C_5)Im]PF_6$, $[D(2-mb)Im]PF_6$, $[n-C_4MIm]PF_6$ 和正己烷中反应的半衰期, 结果分别为 377, 400, 522, 291 和 71 h. 可见酶在离子液体中的稳定性均高于有机溶剂正己烷, 其中, 酶在 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中的稳定性是在正己烷中的 7.4 倍.

内源荧光是研究酶结构变化的重要工具. 不同介质中脂肪酶 PCL 的荧光光谱见图 2. 可以看出, 脂肪酶 PCL 在 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中的特征荧光发射峰 (329 nm 处)^[13] 的强度明显高于在正己烷和其他两种离子液体中的特征峰. 特征峰强度越大, 酶蛋白分子中含此杂环结构的氨基酸残基裸露程度越高. 脂肪酶 PCL 分子构象上的改变使酶能更好地与底物结合, 促使酶发挥催化活性. 这与离子液体 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中脂肪酶 PCL 催化合成乙酸苯乙酯活性高于在正己烷和其他两种离子液体中的活性相一致.

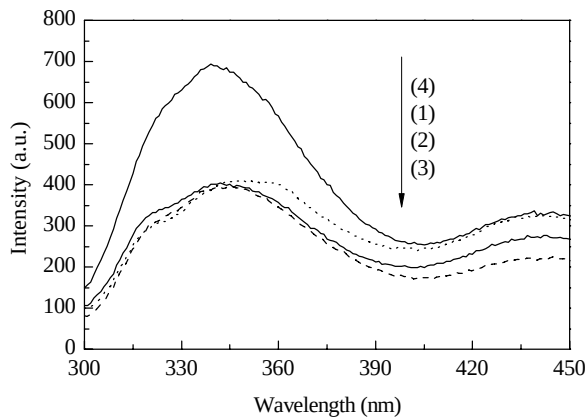


图 2 不同介质中脂肪酶 PCL 的荧光光谱

Fig. 2. Fluorescence spectra of the lipase PCL in different media. (1) Hexane; (2) $[D(n-C_5)Im]PF_6$; (3) $[D(i-C_5)Im]PF_6$; (4) $[D(2-mb)Im]PF_6$.

生物大分子的圆二色谱是获得其二级结构最为简捷的手段之一. 新鲜的以及在离子液体 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中反应后的脂肪酶的圆二色谱图见图 3. 由图可见, 与新鲜酶相比, 脂肪酶在离子液体中

完成反应后, 圆二色谱吸收峰均发生蓝移, 这表明脂肪酶在与介质以及底物分子发生作用后部分二级结构发生改变.

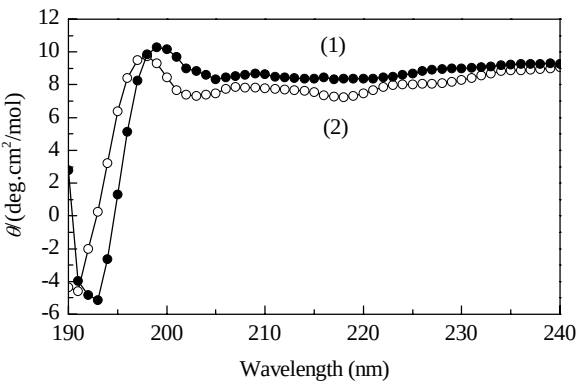


图 3 新鲜的脂肪酶和在离子液体 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 介质中反应后的脂肪酶的圆二色谱图

Fig. 3. Circular dichroism spectrometry of lipase PCL. (1) Fresh; (2) After reaction in $[D(2-mb)Im]PF_6$ medium.

新鲜的和反应 48 h 后的脂肪酶 PCL 二级结构 α -螺旋和 β -折叠含量见表 3. 可以看出, 在离子液体中反应后的脂肪酶 α -螺旋和 β -折叠含量与纯酶的基本相同, 这表明脂肪酶 PCL 在 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中结构较为稳定. 为了考察酶在介质 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中的长期稳定性, 本文将脂肪酶 PCL 30 mg 和离子液体 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 1.0 g 混合均匀后, 分别于 35 °C 连续保温 1, 2, 3, 4, 5 和 6 d, 测定其圆二色谱, 计算酶的二级结构中 α -螺旋和 β -折叠的含量. 结果表明, 脂肪酶在 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 中保温 6 d 后其二级结构几乎不变. 可见, $[D(2-mb)Im]PF_6$ 比正己烷具有更好的亲生物性, 可作为绿色介质用于非水生物催化反应体系.

表 3 脂肪酶 PCL 的二级结构测定结果
Table 3 Secondary structure content for different lipase PCL

Lipase PCL	Content (%)	
	α -Helix	β -Strand
Fresh	29.58	4.68
After reaction in $[D(2-mb)Im]PF_6$	29.66	6.69

2.4 酶的重复利用

在普通有机溶剂中酶催化反应结束后, 须先将酶滤出, 经清洗和干燥后再利用. 这势必造成酶量的减少及酶活性降低. 但在温控型离子液体 $[D(2-mb)Im]PF_6$ 为反应介质的酶催化反应中, 酶不溶于离子液体, 且在室温下酶同离子液体一并析出

而沉于瓶底,因此可以直接过滤进行重复使用,从而避免了因预处理而导致酶催化活性的下降.同时滤液成分主要包括产物乙酸苯乙酯及未反应的少量底物,采用旋转蒸发的方法即可将产物提纯.转酯化反应 48 h 后的脂肪酶 PCL 在 $[D(2\text{-mb})\text{Im}]\text{PF}_6$ 中的重复使用性见图 4. 由图可见, PCL 重复使用 10 次后,其催化活性没有明显降低. 这表明离子液体 $[D(2\text{-mb})\text{Im}]\text{PF}_6$ 提供了酶发挥作用的友好微环境,是生物催化反应的优良介质.

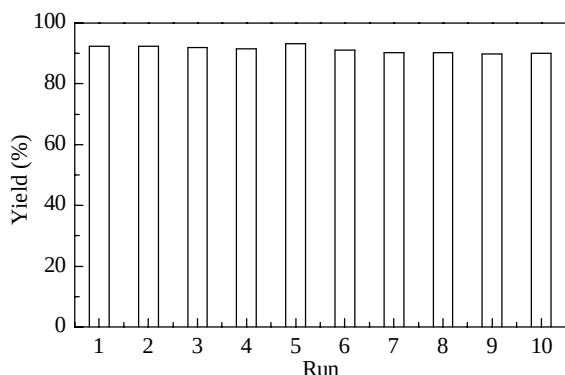


图 4 脂肪酶的重复使用性

Fig. 4. Recycling of the lipase PCL.

另外, $[D(2\text{-mb})\text{Im}]\text{PF}_6$ 熔点为 57.3°C , 当高于 25°C 时, $[D(2\text{-mb})\text{Im}]\text{PF}_6$ 能完全溶于乙酸乙酯或乙酸苯乙酯溶液, 而低于 25°C 时又迅速从体系中析出. 利用这一温控特性, 本文提出“高温反应”和“低温分离”相结合的乙酸苯乙酯生物催化合成新路线, 为工业应用奠定了良好基础.

3 结论

脂肪酶在 1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐离子液体中具有较高的稳定性, 该离子液体的亲生

物性使其用于转酯及其他非水生物催化反应时可提高酶的活性、稳定性及消除目前因使用有机溶剂带来的环境污染. 此外, 1,3-二(2-甲基丁基)咪唑六氟磷酸盐离子液体的温控特性使得“高温反应”和“低温分离”相结合连续生产过程成为可能.

参 考 文 献

- 1 刘树文. 合成香料技术手册. 北京: 中国轻工业出版社 (Liu Sh W. Technical Manual of Perfume Synthesis. Beijing: China Light Industry Press), 2000. 511
- 2 王永泽, 梅乐和, 钟春龙, 姚善涇, 朱自强. 催化学报 (Wang Y Z, Mei L H, Zhong Ch L, Yao Sh J, Zhu Z Q. *Chin J Catal*), 2006, **27**: 799
- 3 陈志刚, 宗敏华, 顾振新. 有机化学 (Chen Zh G, Zong M H, Gu Zh X. *Chin J Org Chem*), 2009, **29**: 672
- 4 Pavlidis I V, Gournis D, Papadopoulos G K, Stamatidis H. *J Mol Catal B*, 2009, **60**: 50
- 5 De Diego T, Lozano P, Abad M A, Steffensky K, Vaultier M, Iborra J L. *J Biotechnol*, 2009, **140**: 234
- 6 Yang Zh, Pan W B. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **37**: 19
- 7 Shah S, Gupta M N. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**: 921
- 8 Tsukada Y, Iwamoto K, Furutani H, Matsushita Y, Abe Y, Matsumoto K, Monda K, Hayase S, Kawatsura M, Itoh T. *Tetrahedron Lett*, 2006, **47**: 1801
- 9 delos Ríos A P, Hernández-Fernández F J, Rubio M, Gómez D, Villora G. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, **82**: 190
- 10 Shan H X, Li Z J, Li M, Ren G X, Fang Y J. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, **83**: 886
- 11 李明, 方银军, 李在均, 任国晓, 黄亚茹, 单海霞, 党万雪. 化学学报 (Li M, Fang Y J, Li Z J, Ren G X, Huang Y R, Shan H X, Dang W X. *Acta Chim Sin*), 2009, **67**: 1252
- 12 许建和, 朱洁, 川本卓男, 田中渥夫, 胡英. 生物工程学报 (Xu J H, Zhu J, Kawamoto T, Tanaka A, Hu Y. *Chin J Biotechnol*), 1997, **13**: 387
- 13 吴红平, 方云, 万会达, 夏咏梅. 化学学报 (Wu H P, Fang Y, Wan H D, Xia Y M. *Acta Chim Sin*), 2008, **66**: 823
- 14 Fletcher K A, Storey I A, Hendricks A E, Pandey S. *Green Chem*, 2001, **3**: 21