



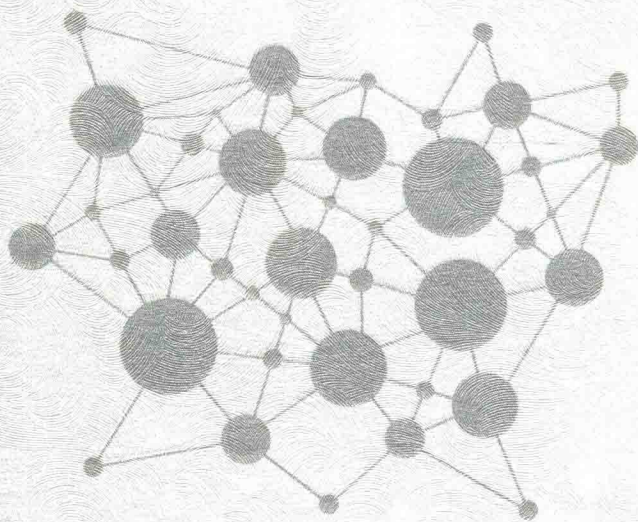
学术前沿研究文库

Library for the Frontiers of Academic Research

# 离子液体中生物催化 不对称反应研究

Study on the Biocatalytic Asymmetric Reactions in Ionic Liquids

姜文勇◎著



华南理工大学出版社  
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广东省重点出版物扶持项目 ·



学术前沿研究文库

Library for the Frontiers of Academic Research

# 离子液体中生物催化 不对称反应研究

Study on the Biocatalytic Asymmetric Reactions in Ionic Liquids

姜文勇◎著



华南理工大学出版社  
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广州 ·

图书在版编目(CIP)数据

离子液体中生物催化不对称反应研究/娄文勇著. —广州:华南理工大学出版社,2017.5

(学术前沿研究文库)

ISBN 978-7-5623-5137-5

I. ①离… II. ①娄… III. ①离子-液体-生物-催化-研究 IV. ①Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第322669号

离子液体中生物催化不对称反应研究

娄文勇 著

---

出版人:卢家明

出版发行:华南理工大学出版社

(广州五山华南理工大学17号楼,邮编510640)

<http://www.scutpress.com.cn> E-mail:scutc13@scut.edu.cn

营销部电话:020-87113487 87111048(传真)

总策划:卢家明

策划编辑:袁泽

责任编辑:王荷英 袁泽

印刷者:广州星河印刷有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:9.25 字数:198千

版次:2017年5月第1版 2017年5月第1次印刷

定价:42.00元

---

版权所有 盗版必究 印装差错 负责调换

## 学术前沿研究文库

# 编审委员会

名誉主任：王迎军 曹 镛

主任：朱 敏

委员（以姓氏拼音排序）：

安 然	陈春花	陈克复	陈少伟	程榕时	邓文基
扶 雄	管 霖	管少平	韩国强	何镜堂	黄培彦
季 飞	姜中宏	李 东	李立涅	李远清	廉哲雄
梁 军	林章凜	刘焕彬	刘社欣	刘正荣	刘正猷
卢家明	吕发创	孟庆林	裴海龙	彭俊彪	钱 宇
瞿金平	苏 成	苏宏元	孙一民	唐本忠	王 聪
王仁曾	王振宇	吴 波	吴克昌	吴青华	吴硕贤
吴振强	徐松林	徐向民	叶代启	张 军	张 平
张卫国	张宪民	张正国	章秀银	赵谋明	钟书能
朱长江	朱能武	庄 建			

# 前 言

离子液体替代有机溶剂作为绿色反应介质用于生物转化过程，逐渐引起国内外研究人员的广泛关注。早期的研究主要集中于讨论含离子液体介质中生物催化某一反应的可能性，许多酶在含离子液体介质中表现出较高的活性、选择性及稳定性。对离子液体中生物催化反应的研究将有助于认识酶的结构和功能之间的关系。

我国在离子液体的研究和应用方面已取得了长足的发展，尤其是在离子液体的设计合成及模拟计算、清洁能源与资源化利用、新型离子液体功能材料和基于离子液体的分离新技术等领域。本课题组主要从事物质预处理及离子液体中的生物催化反应两个方面的基础研究，对离子液体催化及绿色过程领域的发展起到了一定的促进作用。为了让更多的人对离子液体中生物催化不对称反应有更深入的了解，在笔者博士论文以及课题组近年所开展的研究的基础上，笔者撰写了《离子液体中生物催化不对称反应研究》一书，望对广大科研人员有所帮助。

本书分为三个部分：第一部分介绍了离子液体的性质及其用于生物催化反应的优点。第二部分主要论述了含离子液体介质中几类典型的不对称转化过程（水解、氨解、酰化、还原及氧化），并就离子液体对上述反应的影响规律进行分析，进一步揭示含离子液体介质中生物催化反应的特性，以此为基础，建立可用于高效制备对映体纯手性化合物的生物催化体系。同时介绍了新一代离子液体（深度共熔溶剂 DES）中的全细胞催化不对称反应，所用 DES 表现出良好的生物相容性及生物降解性，且能很好地溶解底物和产物，显著提高细胞的活性、稳定性及所催化反应的选择性。第三部分则从机理研究入手，简要阐述离子液体对微生物细胞催化特性的影响机制。由于全世界每年发表的有关离子液体的

文献高达数千篇，本书只选择有代表性的参考文献并附于每章之后。

本书不仅有助于深化对酶的结构与功能关系等酶学基础理论问题的认识，丰富离子液体用于生物催化的理论基础，还提供了高效制备对映体纯手性化合物的新途径，促进了绿色化学过程的应用。

由于作者学识有限，书中难免存在疏漏，敬请读者赐教。

娄文勇

2016年9月于广州

## 化学式缩写说明

缩 写	中 文
$C_2MIm \cdot BF_4$	1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$C_3MIm \cdot BF_4$	1-丙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$C_4MIm \cdot BF_4$	1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$C_6MIm \cdot BF_4$	1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$C_8MIm \cdot BF_4$	1-辛基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$C_4MIm \cdot PF_6$	1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐
$C_6MIm \cdot PF_6$	1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐
$C_8MIm \cdot PF_6$	1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐
$C_1MIm \cdot MeSO_4$	1-甲基-3-甲基咪唑甲基硫酸盐
$C_2MIm \cdot Tf_2N$	1-乙基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$C_2MIm \cdot TfO$	1-乙基-3-甲基咪唑三氟甲烷磺酸盐
$C_2MIm \cdot EtSO_4$	1-乙基-3-甲基咪唑乙基硫酸盐
$C_2Py \cdot TFA$	N-乙基吡啶三氟乙酸盐
$C_4MIm \cdot Cl$	1-丁基-3-甲基咪唑氯盐
$C_4MIm \cdot Br$	1-丁基-3-甲基咪唑溴盐
$C_4MIm \cdot Tf_2N$	1-丁基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$C_4MIm \cdot TfO$	1-丁基-3-甲基咪唑三氟甲烷磺酸盐
$C_4MIm \cdot NO_3$	1-丁基-3-甲基咪唑硝酸盐
$C_4MIm \cdot TOS$	1-乙基-3-甲基咪唑对甲苯磺酸盐
$C_4MIm \cdot OAc$	1-丁基-3-甲基咪唑醋酸盐
$C_4MIm \cdot lactate$	1-丁基-3-甲基咪唑乳酸盐
$C_4MIm \cdot MeSO_4$	1-丁基-3-甲基咪唑甲基硫酸盐

续上表

缩 写	中 文
$C_4MIm \cdot EtSO_4$	1-丁基-3-甲基咪唑乙基硫酸盐
$C_4MPyr \cdot BF_4$	1-丁基-1-甲基吡啶四氟硼酸盐
$C_4MPyr \cdot Br$	1-丁基-1-甲基吡啶溴盐
$C_6MIm \cdot Cl$	1-己基-3-甲基咪唑氯盐
$C_6MPL \cdot Tf_2N$	1-己基-1-甲基吡咯烷鎓双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$AMIm \cdot BF_4$	1-烯丙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$MOEMIm \cdot BF_4$	1-乙基甲基醚-3-甲基咪唑四氟硼酸盐
$MOEMIm \cdot PF_6$	1-乙基甲基醚-3-甲基咪唑六氟磷酸盐
$(E_2OH)MIm \cdot NO_3$	1-(2-羟乙基)-3-甲基咪唑硝酸盐
$(E_2OH)MIm \cdot Tf_2N$	1-(2-羟乙基)-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$(P_3OH)Pyr \cdot Tf_2N$	1-(3-羟丙基)吡啶双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$EtNH_3 \cdot NO_3$	硝酸乙基铵
HCN	氢氰酸
$[N_{a,b,c,d}]^+$	季铵盐( $a, b, c, d$ 为氮原子上四个烷基碳原子数)
$[P_{i,j,k,l}]^+$	季磷盐( $i, j, k, l$ 为磷原子上四个烷基碳原子数)
$[C_n, quin]^+$	喹啉
$[N(CN)_2]^-$	双氰胺
$[FAP]^-$	三(五氟乙基)三氟磷酸根离子
$N_{1,1,1,1} \cdot Cys$	四甲基胺半胱氨酸盐
$N_{1,8,8,8} \cdot BTA$	三辛基甲基胺双(三氟甲烷磺酰)酰胺盐
$PP_{1,4} \cdot Tf_2N$	N-丁基-N-甲基哌啶双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐
$Py_{1,4} \cdot Tf_2N$	N-丁基-N-甲基吡咯烷鎓双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐



# 目 录

1 绪 论 .....	1
1.1 离子液体中的生物催化与生物转化 .....	1
1.1.1 离子液体中酶催化水解反应 .....	1
1.1.2 离子液体中酶催化转酯反应 .....	2
1.1.3 离子液体中酶催化酯化反应 .....	2
1.1.4 离子液体中酶催化氨解反应 .....	3
1.1.5 离子液体中酶催化氰化反应 .....	3
1.1.6 离子液体中酶催化胺的酰化反应 .....	3
1.1.7 离子液体中酶催化氧化反应 .....	4
1.1.8 离子液体中生物催化还原反应 .....	4
1.2 手性药物 .....	5
1.2.1 手性药物的制备 .....	6
1.2.2 手性药物的研究现状和开发前景 .....	7
1.3 离子液体作为生物催化反应介质所面临的挑战 .....	8
1.3.1 离子液体的纯度 .....	8
1.3.2 离子液体的高黏度 .....	9
1.3.3 离子液体的 pH 值和水活度 .....	9
1.3.4 离子液体的回收 .....	9
1.3.5 相关的基础研究 .....	9
参考文献 .....	10
2 离子液体 .....	15
2.1 离子液体的定义 .....	15
2.2 离子液体的种类 .....	15
2.3 离子液体的理化性质 .....	16
2.3.1 极性 .....	16
2.3.2 溶解性 .....	17

2.3.3	黏度	17
2.3.4	密度	17
2.3.5	酸碱性	18
2.3.6	热稳定性	18
2.3.7	熔点	18
2.4	离子液体的毒性	18
2.4.1	咪唑基离子液体的毒性	18
2.4.2	吡啶基离子液体的毒性	19
2.4.3	季铵盐类离子液体的毒性	19
2.4.4	其他阳离子型离子液体的毒性	20
2.5	离子液体的降解性	20
2.6	离子液体的优点	21
	参考文献	22
3	离子液体于酶促反应中的应用	25
3.1	酶在离子液体中的特性	25
3.1.1	酶的活性	25
3.1.2	酶的选择性	26
3.1.3	酶的稳定性	26
3.2	酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应	27
3.2.1	反应初速度、产率、转化率、对映体过剩值	27
3.2.2	不同酶催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解	28
3.2.3	离子液体含量对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	28
3.2.4	底物浓度对离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	30
3.2.5	酶量对离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	31
3.2.6	振荡速度对离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	32
3.2.7	反应温度对离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	33
3.2.8	缓冲液的 pH 值对离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应的影响	33

3.2.9 减压和常压条件下离子液体/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应	34
3.2.10 离子液体/缓冲液和有机溶剂/缓冲液混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应之比较	35
3.3 脂肪酶促对羟基苯甘氨酸酯不对称氨解反应	40
3.3.1 离子液体含量对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	41
3.3.2 不同脂肪酶对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	43
3.3.3 氨源对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	44
3.3.4 铵盐浓度对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	44
3.3.5 初始水活度对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	45
3.3.6 振荡速度对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	46
3.3.7 反应温度对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	47
3.3.8 pH 值对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	48
3.3.9 底物结构对酶促对羟基苯甘氨酸酯不对称氨解反应的影响	49
3.3.10 底物浓度对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应的影响	49
3.3.11 离子液体和有机溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应之比较	50
3.3.12 离子液体/叔丁醇和有机溶剂/叔丁醇混合溶剂中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯不对称氨解反应之比较	51
3.4 离子液体中酶促不对称酰化反应	56
3.4.1 离子液体中不同酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应	58
3.4.2 酰基供体对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	59
3.4.3 两底物摩尔比对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	60
3.4.4 初始水活度对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	60
3.4.5 底物浓度对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	61
3.4.6 反应温度对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	62
3.4.7 pH 值对离子液体中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应的影响	

影响	63
3.4.8 脂肪酶 Novozym 435 和离子液体重复使用对酶反应的影响	64
3.4.9 离子液体和有机溶剂中酶促( <i>R,S</i> )-1-三甲基硅乙醇不对称酰化反应之比较	64
3.5 离子液体中酶促不对称转氨反应	67
3.5.1 离子液体对水/异丙醚双相体系中非酶促转氨反应的影响	68
3.5.2 离子液体对水/异丙醚双相体系中苦杏仁醇脲酶促转氨反应的影响	68
3.5.3 离子液体对水/异丙醚双相体系中木薯醇脲酶促转氨反应的影响	70
参考文献	71
4 离子液体对木瓜蛋白酶催化的影响机制	76
4.1 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶催化特性的关系	76
4.1.1 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶催化活性的关系	76
4.1.2 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶对映体选择性的关系	79
4.1.3 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶稳定性的关系	80
4.2 离子液体对木瓜蛋白酶分子构象的影响	82
4.2.1 木瓜蛋白酶的结构及其催化机制	83
4.2.2 含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶分子的荧光光谱	84
4.2.3 含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶分子的红外光谱	87
4.2.4 含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶的荧光光谱与热稳定性关系	89
参考文献	91
5 含离子液体介质中全细胞催化不对称反应	93
5.1 还原反应	94
5.2 氧化反应	96
5.3 水解反应	97
5.4 转酯反应	98
5.5 含离子液体介质中固定化酵母细胞催化乙酰基三甲基硅烷不对称还原反应	99
5.5.1 $C_4MIm \cdot PF_6$ /缓冲液双相体系中固定化酵母细胞催化乙酰基三甲基硅烷不对称还原反应	99
5.5.2 $C_4MIm \cdot BF_4$ /缓冲液双相体系中固定化酵母细胞催化乙酰基三甲基硅烷不对称还原反应	103

---

---

参考文献	108
6 含深度共熔溶剂介质中全细胞催化不对称反应	111
6.1 深度共熔溶剂	111
6.1.1 概述	111
6.1.2 理化性质	111
6.2 含深度共熔溶剂介质中的生物催化反应	116
6.2.1 含深度共熔溶剂体系中的酶促反应	116
6.2.2 含深度共熔溶剂体系中的全细胞催化反应	117
参考文献	121
7 离子液体对全细胞催化反应过程的影响机理	123
7.1 细胞活性	123
7.2 细胞膜通透性	124
7.3 底物和产物的分配系数	127
7.4 胞内酶	128
参考文献	130

# 1 绪论

## 1.1 离子液体中的生物催化与生物转化

离子液体替代传统的有机溶剂作为绿色反应介质应用于生物催化与生物转化,近年来才引起人们的重视。2000年, Cull 等<sup>[1]</sup>首次报道了离子液体  $C_4MIm \cdot PF_6$ /水双相体系中红球菌属(*Rhodococcus*) R312 细胞催化 1, 3-二氰基苯水解生成 3-氰基苯酰胺的反应, 他们发现  $C_4MIm \cdot PF_6$  对细胞的毒性远远小于有机溶剂(如甲苯)的毒性。Erbeldinger 等<sup>[2]</sup>成功地将水含量<sup>①</sup>为 5% 的疏水性离子液体用于天门冬氨酰苯丙氨酸甲酯的合成, 所用的生物催化剂嗜热菌蛋白酶在  $C_4MIm \cdot PF_6$  中不但具有较高的催化活性, 而且特别稳定。随后, 有关离子液体中酶催化反应的报道日渐增多, 大部分的研究结果表明, 酶在离子液体中具有较高的活性、(立体、区域)选择性及稳定性<sup>[3-7]</sup>。可见, 离子液体中的生物催化是一个崭新的研究领域, 其为生物催化的广泛应用提供了新的可能和机遇, 具有相当诱人的应用前景。迄今, 离子液体中生物催化与生物转化的主要研究可概括为下述几个方面。

### 1.1.1 离子液体中酶催化水解反应

Zhao 等<sup>[8]</sup>用离子液体  $C_2Py \cdot TFA$ /水(15/85, 体积比)替代乙腈/水(15/85, 体积比)作为反应介质, 显著提高了枯草杆菌蛋白酶催化 N-乙酰氨基酸酯水解反应的产率及对映体选择性, 并发现离子液体的浓度对酶反应速度、产率及产物的对映体纯度均有较大的影响。Mohile 等<sup>[9]</sup>研究了离子液体/水混合体系(1/1, 体积比)中脂肪酶 CRL(*Candida rugosa* lipase, 褶皱假丝酵母脂肪酶)催化 2-对氯苯氧基丙酸丁酯的水解, 发现离子液体的种类及含量对水解反应有重要的影响。脂肪酶 CRL 在疏水性较强的离子液体  $C_4MIm \cdot PF_6$  和  $C_6MIm \cdot BF_4$  中的催化活性及对映体选择性明显高于其在疏水性较弱的离子液体  $C_4MIm \cdot BF_4$  中的相应值。在最适离子液体体积分数(50%)的反应体系中进行该反应, 底物转化率为 48%, 产物的对映体纯度为 99% 以上。离子液体回收重复使用四批次后, CRL 仍具有颇高的水解活性和对映体选择性。Yu 等<sup>[10]</sup>以来源于绿豆的环氧化物水解酶交联酶聚集体为催化

① 除特别注明外, 本书中的含量均指体积分数。

剂,研究了含  $C_4MIm \cdot PF_6$  的双相体系中氧化苯乙烯的不对称水解反应。研究发现,同其他离子液体相比,  $C_4MIm \cdot PF_6$  具有极好的生物相容性,产物产率为 49%,对映体选择比  $E$  值高达 151,远高于早期研究数据。同时,交联酶聚集体在含离子液体双相体系中具有很好的操作稳定性,而在正己烷体系中的操作稳定性较差。2002 年,有人证实了离子液体  $C_4MIm \cdot Cl$  能溶解大量未衍生化的纤维素<sup>[11]</sup>,于是 Kudou 等<sup>[12]</sup> 利用离子液体对纤维素生物质进行预处理,并考察了离子液体对来源于海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的  $\beta$ -葡萄糖苷酶(TmBgl1A)活性的影响,结果发现  $C_4MIm \cdot OAc$  可显著提高 TmBgl1A 的活力;另外,在  $C_4MIm \cdot OAc$  中酶分子结构发生了较大变化,推测与 TmBgl1A 构型的灵活性有关。

### 1.1.2 离子液体中酶催化转酯反应

2001 年, Laszlo 等<sup>[13]</sup> 研究了  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶在离子液体中催化  $N$ -乙酰- $L$ -苯丙氨酸乙酯与 1-丙醇的转酯反应,结果表明酶在水的体积分数为 0.25% 的  $C_8MIm \cdot PF_6$  中具有较高的转酯活性,并与超临界二氧化碳组成转酯反应体系,实现了产物的在线分离,提高了反应速度和产率,且酶特别稳定,重复利用多次后仍具有颇高的催化活性。随后,离子液体中  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶催化的反应得到了广大研究者的持续关注。Liu 等<sup>[14]</sup> 对比研究了在  $C_2MIm \cdot TfO$  和多种有机溶剂中混合脂肪酶催化的酶促转酯反应,发现酶在  $C_2MIm \cdot TfO$  中具有较高的转酯活性,生物柴油的产率高达 99%;另外,热动力学研究表明,混合酶在离子液体中具有协同作用,可消除反应中的限速因素。由于脂肪酶在离子液体中具有较高的热稳定性,有人以离子液体  $C_4MIm \cdot PF_6$  作为反应介质,在较高的温度(90℃ 以上)下,成功地利用固定化脂肪酶 CALB(*Candida antarctic lipase B*, 南极假丝酵母脂肪酶 B) 促转酯反应制备聚丙交酯<sup>[15]</sup>。Sun 等<sup>[16]</sup> 研究了由三种阴离子( $[BF_4]^-$ 、 $[PF_6]^-$  和  $[Tf_2N]^-$ ) 和五种阳离子( $[C_4MIm]^+$ 、 $[C_8MIm]^+$ 、 $[C_6MIm]^+$ 、 $[C_4MIm]^+$ 、 $[C_2MIm]^+$ ) 构成的离子液体中脂肪酶 Novozym 435 催化的阿魏酸乙酯和甘油的转酯反应,结果表明反应介质对反应有显著的影响。脂肪酶在  $C_2MIm \cdot Tf_2N$  中表现出较高活力,且离子液体对酶的热失活具有一定的保护作用。最近, Wang 等<sup>[17]</sup> 建立了一个新型化学-酶法合成咖啡酸丙酯的体系,反应在以 Novozym 435 为催化剂,  $C_4MIm \cdot CF_3SO_3$  为反应介质,反应温度 60℃ 的条件下,咖啡酸甲酯和 1-丙醇转酯得到咖啡酸丙酯的产率高达 98.5%。

### 1.1.3 离子液体中酶催化酯化反应

Ulbert 等<sup>[18]</sup> 对比研究了离子液体和有机溶剂中脂肪酶 CRL 催化一系列 2-取代烷基-丙酸与正丁醇的酯化反应,发现介质的疏水性和水含量对酯化反应影响很大。在三种离子液体( $C_4MIm \cdot BF_4$ 、 $C_4MIm \cdot PF_6$ 、 $C_8MIm \cdot PF_6$ ) 或有机溶剂(四氢

呋喃、甲苯、正己烷)中, CRL 的酯化活性随离子液体或有机溶剂疏水性的增大而降低, 但对映体选择性随之显著提高。与有机溶剂相比, 酶在离子液体中具有更高的酯化活性及对映体选择性, 并且在离子液体中可通过减压蒸馏在线除去反应生成的水, 降低反应体系中的水含量, 抑制逆反应(酯水解)的进行, 从而提高产物的产率及对映体纯度。CRL 在疏水性较强的离子液体  $C_4MIm \cdot PF_6$ 、 $C_8MIm \cdot PF_6$  中重复利用 8 次, 其酯化活性及对映体选择性未见下降, 这表明离子液体不仅能提高 CRL 的活性及对映体选择性, 还大大提高了酶的稳定性。Yu 等<sup>[19]</sup>报道了利用离子液体中脂肪酶 CRL 催化的不对称酯化反应动力学拆分外消旋(*R*, *S*) - 布洛芬, 他们的研究表明, 酶在  $C_4MIm \cdot PF_6$  中的对映体选择性是在异辛烷中的两倍, 其稳定性也提高了 25%。尽管脂肪酶 CRL 在其他离子液体如  $C_4MIm \cdot BF_4$ 、 $C_4MIm \cdot MeSO_4$  中具有较高的酯化活性, 但呈现出很低的对映体选择性(*E* 值为 1.1 ~ 6.4)。脂肪酶 CRL 促(*R*, *S*) - 布洛芬酯化生成的 (*S*) - 异丁苯基丙酸酯从反应体系中分离出来后, 进一步水解才得到所需 (*S*) - 布洛芬, 其步骤繁多, 产物分离纯化难度大。

#### 1.1.4 离子液体中酶催化氨解反应

酶促氨解反应是 20 世纪 90 年代中期发现的一种新反应, 其在功能性酰胺的合成、手性化合物的动力学拆分方面表现出诱人的应用前景。Lau 等<sup>[20]</sup>用氨气作为氨源, 对比研究了脂肪酶 CALB 在  $C_4MIm \cdot BF_4$  和叔丁醇中催化辛酸乙酯及辛酸的氨解反应, 发现在离子液体中底物转化率显著降低, 并且游离脂肪酶的活性远远低于固定化酶。

#### 1.1.5 离子液体中酶催化氰化反应

手性氰醇是一类重要的手性合成子, 它易于转化为  $\alpha$ -羟基酸、 $\beta$ -羟基酰胺和  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸等许多重要的光学活性化合物, 因而在医药、农药和精细化工等领域具有广阔的应用前景<sup>[21]</sup>。醇腈酶能有效地催化酮、醛与 HCN 或丙酮氰醇不对称氰化或转氰合成手性氰醇<sup>[22-25]</sup>。2004 年, Gaisberger 等<sup>[26]</sup>首次研究了含离子液体介质中来源于三叶胶的醇腈酶催化一系列醛与 HCN 不对称氰化反应, 发现醇腈酶在纯离子液体中没有对映体选择性, 生成的氰醇为外消旋体。但是, 以离子液体( $C_2MIm \cdot BF_4$ 、 $C_3MIm \cdot BF_4$ 、 $C_4MIm \cdot BF_4$ )与磷酸缓冲液组成的混合溶剂为反应介质, 醇腈酶表现出颇高的催化活性及对映体选择性。与水/叔丁基甲基醚双相体系相比, 醇腈酶催化不对称氰化反应的速度更快, 对映体选择性相当, 得到产率及产物的对映体纯度均在 97% 以上。

#### 1.1.6 离子液体中酶催化胺的酰化反应

Irimescu 等<sup>[27]</sup>对比研究了在离子液体和无溶剂系统中脂肪酶 CALB 促 1-苯基



乙胺和 2-苯基-1-丙胺与脂肪酸的不对称酰化反应,发现脂肪酶在  $C_4MIm \cdot PF_6$  离子液体中催化酰化反应速度明显高于无溶剂系统中的反应速度,但在  $C_2MIm \cdot BF_4$  中的酰化反应速度远远低于无溶剂系统中的反应速度;在上述几种反应体系中酶反应的对映体选择性相当( $E$  值均在 500 以上),产物的对映体纯度均为 99% 以上。随后,他们研究了离子液体的溶剂特性(如极性)和离子液体的组成(阴、阳离子)对脂肪酶催化酰化反应的影响<sup>[28]</sup>。随着  $C_nMIm \cdot BF_4$  ( $n=2 \sim 8$ ) 离子液体中阳离子上取代烷基链的延长,离子液体的极性减弱,酶促酰化反应速度随之降低,但对映体选择性变化甚微;但脂肪酶在  $C_4MIm \cdot PF_6$  离子液体中催化酰化反应速度比在  $C_nMIm \cdot BF_4$  ( $n=2 \sim 8, n \neq 4$ ) 离子液体中更快。Nascimento 等<sup>[29]</sup>考察了在不同离子液体中脂肪酶 CALB 催化的( $R, S$ )-苯乙胺的酰化反应,在由  $C_4MIm \cdot Cl$  构成的双相体系中,脂肪酶催化的选择性远高于有机溶剂中的选择性,同时也发现,酶的选择性与离子液体的阴离子有关。

### 1.1.7 离子液体中酶催化氧化反应

目前,许多研究者就离子液体中的生物催化氧化反应进行了综述<sup>[30]</sup>,早期离子液体的研究多聚焦在二代离子液体,当下新型离子液体的制备推动了生物催化反应研究的不断进步。Hinckley 等<sup>[31]</sup>报道了漆酶和过氧化物酶在  $C_4MPyr \cdot BF_4$  和  $C_4MIm \cdot PF_6$  中具有活性,并能催化葱和邻甲氧基苯酚的氧化,但酶活性随着离子液体浓度的增大而迅速降低。随后,Okrasa 等<sup>[32]</sup>以  $C_4MIm \cdot PF_6$  离子液体替代水溶液作为葡萄糖氧化酶/过氧化物酶催化硫化物对映体选择性氧化反应的介质,发现氧和硫化物在离子液体中的溶解度比在水中大,因此氧化反应速度较快。此外,离子液体中水含量对酶促氧化反应的影响较大,当水的体积分数为 10% 时,产率及产物的对映体纯度最高。Moldes 等<sup>[33]</sup>报道了来源于嗜热毁丝菌(*Myceliophthora thermophila*)中的漆酶在  $C_2MIm \cdot EtSO_4$  中的催化反应,低体积分数离子液体(<50%)对酶的稳定性影响较弱,体积分数在 75% 时,酶活性明显降低。同时,固定化可以显著提高酶在离子液体中的稳定性。近来,Tzani 等<sup>[34]</sup>用羟胺及甲酸制备了多种新型离子液体,并以细胞色素 C 为模型考察了离子液体中酶结构的变化。圆二色谱(CD)及傅里叶变换红外(FT-IR)光谱证实离子液体对酶的微环境有影响,所用离子液体可增强细胞色素 C 对  $H_2O_2$  的抗性并使其活性提高达 20 倍,另外该离子液体具有较高的重复使用率。

### 1.1.8 离子液体中生物催化还原反应

在有机合成中,微生物细胞常被用于催化潜手性酮不对称还原制备光学活性醇,这是因为辅酶 NAD(P)H[烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)]可在细胞内再生,不必额外添加,故生产成本较低。通常,为保持细胞活性,反应在水相中进行,底物多为水溶性物质。采用有机溶剂(通常为正己烷、甲苯、苯、石醚等)与水形成