

离子液体中脂肪酶催化酯类合成的新进展

李 晶^a 王 俊^{*,a} 张磊霞^a 顾双双^a
 吴福安^{a,b} 郭跃伟^{a,c}

(^a 江苏科技大学生物与化学工程学院 镇江 202018)

(^b 中国农业科学院蚕业研究所 镇江 212018)

(^c 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室 上海 201203)

摘要 作为 21 世纪最具发展潜力的绿色溶剂, 离子液体用于酶促合成的反应介质具有得天独厚的优势. 与传统的有机溶剂相比, 离子液体能够提高脂肪酶的稳定性和选择性, 减少有机合成中的副反应和有毒气体的产生, 后处理简单, 可重复利用. 参考 10 年来的文献, 从脂肪酶催化酯类合成的常用离子液体种类、过程因素及场/反应器强化等方面进行了综述, 同时展望了离子液体在未来酯类酶促合成领域的发展趋势.

关键词 离子液体; 脂肪酶; 酯类合成; 过程因素; 场/反应器强化

Progress of Lipase-Catalyzed Ester Synthesis in Ionic Liquid

Li, Jing^a Wang, Jun^{*,a} Zhang, Leixia^a Gu, Shuangshuang^a
 Wu, Fuan^{a,b} Guo, Yuewei^{a,c}

(^a School of Biological and Chemical Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018)

(^b The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

(^c State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203)

Abstract As one of the most potential green solvents in the 21st century, ionic liquid has been used as reaction media in the enzymatic synthesis with enormous advantages. Compared with conventional organic media, ionic liquid could improve the stability and selectivity of lipase, reduce side reactions, eliminate toxicant organic gas, simplify the post-processing, and be renewable. Combined with the recent decade's references, this review is focused on summarizing various ionic liquids as the media, process factors, strengthening effect of field and bioreactors in the lipase-catalyzed ester synthesis process. Moreover, some future perspectives on enzymatic synthesis in ionic liquid are discussed.

Keywords ionic liquids; lipase; ester synthesis; process factor; strengthening effect of field and bioreactor

脂肪酶(EC 3.1.3.3)即三酰基甘油酰基水解酶, 具有催化酯类化合物水解、醇解、酯化及酯交换等功能, 因此被广泛应用于生物能源、生物材料以及药物中间体合成等领域^[1]. 脂肪酶催化反应中, 有机溶剂作为反应介质虽然具有提高反应速率、缓和反应条件以及提高酶稳定性等优势, 但存在副反应多、易产生有毒气体以及反应选择性低等缺点^[2], 因此, 酶促酯类合成亟需寻求更

优异的反应介质. 离子液体(Ionic liquids, ILs)作为 21 世纪最具潜力的新型反应介质, 由有机阳离子与阴离子组成, 常温呈液态, 具有饱和蒸气压小、不可燃性、疏水性、可重塑性以及良好的热力学稳定性等性质^[3,4]. 近年来, 离子液体在提高酶的热稳定性、反应选择性和底物溶解性等方面展现出优越的介质特性^[5]. 特别是, 离子液体为介质的酶促酯类合成已成为生物有机合成领域

* E-mail: jimwang_js@hotmail.com

Received October 19, 2011; revised December 25, 2011; published online February 17, 2012.

Project supported by the Surface Project of the National Natural Science Foundation of China (No. 20876076), the "Youth Project" Outstanding Young Teachers Aid of Jiangsu Province Colleges (No. 2010), the Surface Project of the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2009213), the Scientific Support Plan of Jiangsu Province (Agriculture) (No. BE2010419), the Construction of the Modern Agricultural Industrial Technology System (No. CARS-22) and the Scientific Projects of Jiangsu University of Science and Technology (Nos. 35211002, 33201002).

国家自然科学基金面上(No. 20876076)、江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师资助计划(No. 2010)、江苏省自然科学基金面上(No. BK2009213)、江苏省科技支撑计划(农业)(No. BE2010419)、现代农业产业技术体系建设专项(No. CARS-22)及江苏科技大学科研(Nos. 35211002, 33211002)资助项目.

的前沿方向. 我们收集近 10 年来的文献, 主要从脂肪酶催化酯类合成的常用离子液体种类、过程因素以及场/反应器强化等方面的新进展进行了综述和展望.

1 用于酯类合成的离子液体

离子液体中阳离子主要是含氮杂环化合物^[6], 如咪唑、吡咯、噻唑等; 而阴离子则既包括无机离子如 Cl^- , F^- , Br^- , NO_3^- 等, 也有少量有机离子^[7], 如 CH_3CO_2^- , Tf_2N^- , CF_3CO_2^- 等. Chart 1 列举了离子液体中一些代表性的阴、阳离子组成, 理化参数见表 1^[9~16]. 用作酯类合成介质的离子液体一般分为三种类型, 溶解性和亲水性依次降低^[8].

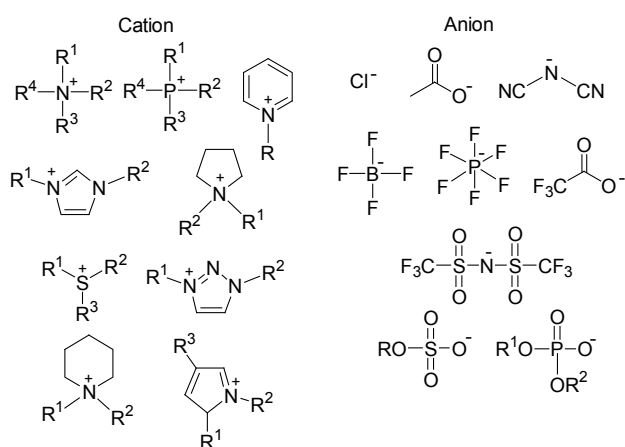


Chart 1

第一类以氯化 1-己基-3-甲基咪唑([Hmim][Cl])、溴化 1-丁基-3-甲基咪唑[Bmim][Br]及 1-丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐([Bmim][HSO₄])为代表, 溶解性较强, 阴离子(如 Cl^- , OAc^- , HCOO^- , dca^- 等)能够与底物中的醇产生氢键作用, 从而增强醇在离子液体中的溶解度, 但这类阴离子也能够与脂肪酶分子产生氢键作用, 改变酶分子的空间构型, 从而降低酶的催化性能^[17,18]; 第二类以 1-

乙基-3-甲基咪唑硫酸辛酯([Bmim][OctSO₄]), 1-乙基-3-基吡啶二氢铵([BMPY][N(CN)₂])以及 1-丁基-3-甲基吡啶二氢铵([BMPY][N(CN)₂])为代表, 溶解性居中; 第三类以三辛基甲基胺双三氟甲磺酰亚胺盐([TOMA][Tf₂N]), 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([Bmim][PF₆])及 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Emim][BF₄])为代表, 溶解性较弱, 阳离子具有较强的疏水作用, 能够防止脂肪酶与水的氢键作用, 保护酶分子的空间构型, 从而能最大程度地维持酶的催化活性^[19]. 因此, 在脂肪酶催化酯类合成的过程中, 一般选择第三类离子液体作为反应介质.

2 离子液体中的脂肪酶催化酯类合成

2.1 反应类型

2.1.1 酯化反应

脂肪酶催化酯化反应, 即酸与醇在脂肪酶的催化反应下生成酯, 反应机理如 Scheme 1 所示. 酯化反应的过程中产生的水分子在体系中积累较多时, 会促使酯化反应向逆方向进行, 不利于酯合成, 因此选择疏水性离子液体为介质可有效解决此类问题^[20]. 在亲水性离子液体中, 酯类产物的得率往往比疏水性离子液体中的得率要低, 如 Yuan 等^[21]在[Bmim][PF₆]中合成薄荷醇酯的得率达 47.5%, 而在[Bmim][BF₄]中得率仅为 9.21%.

2.1.2 酯交换反应

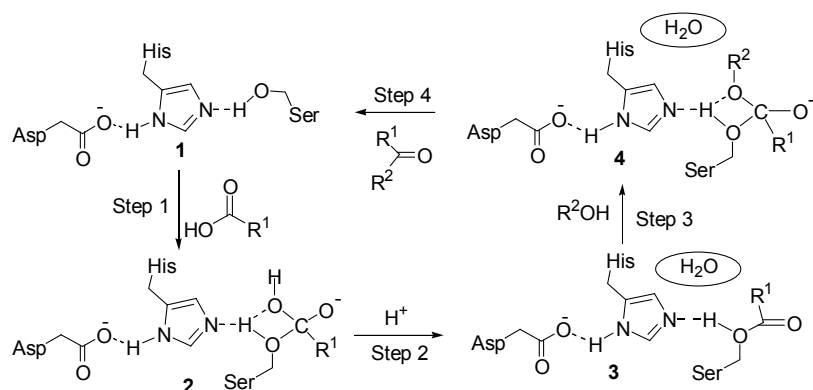
脂肪酶催化酯交换反应, 即通过酯和醇在脂肪酶的催化反应下生成新的酯和醇, 其反应机理与酯化反应基本一致, 但略有差异, 具体表现在: 酯交换过程中, 酯中的羰基对脂肪酶中活性位点 1 进行亲核攻击, 形成酯-酶中间体 5, 然后在 H⁺的作用下, 5 脱去新形成的醇分子后, 再与底物醇分子结合形成酯-酶-醇中间体 7, 最后酶分子脱去新的酯, 并还原到本体构象 1 (Scheme 2). Kurata 等^[22]在[Bmim][Tf₂N]中进行咖啡酸甲酯与苯

表 1 酯类合成中代表性离子液体以及理化性质^a

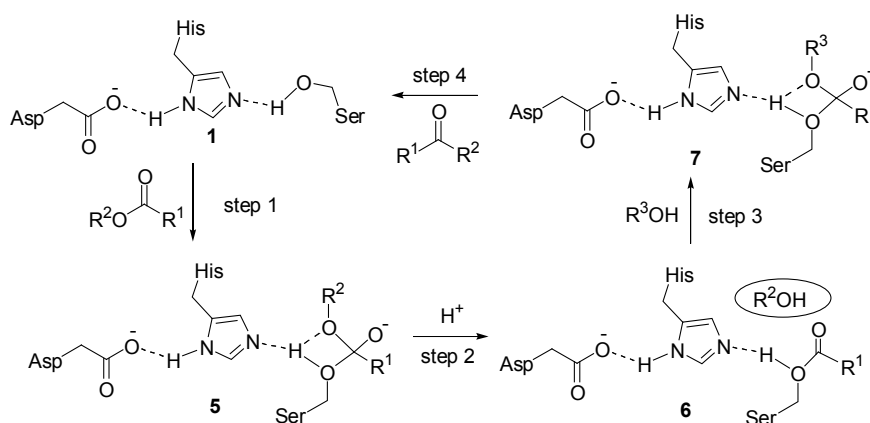
Table 1 Properties of representative ionic liquids in synthesis of ester

Type	Name	Abbr.	$M_w/(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	m.p./°C	Miscib.	$\rho/(\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$	Ref.
I	1-Hexyl-3-methylimidazolium chloride	HMIM•Cl	202.79	-85	Y (8.0)	1.04	[9]
I	Trioctylmethylammonium trifluoroacetate	TOMA•TFA	481.73	N.d.	N.d.	N.d.	[10]
II	1-Ethyl-3-methylimidazolium octylsulfate	EMIM•OctSO ₄	320.45	-9	Y (2.9)	1.095	[10]
II	1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate	BMIM•CF ₃ SO ₃	288.3	N.d.	Y (8.9)	1.305	[10]
II	1-Butyl-3-methylpyridinium dicyanamide	EMPY•C ₄ F ₉ SO ₃	421.3	-6	Y (5.2)	1.522	[11]
II	1-Butyl-3-methylpyridinium dicyanamide	BMPY•N(CN) ₂	216.3	N.d.	Y (6.5)	1.052	[12]
III	1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate	BMIM•PF ₆	284.2	15	N	1.38	[13]
III	1-Methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate	OMIM•PF ₆	340.3	<-65	N	1.245	[14]
III	1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate	BMIM•BF ₄	226	<-65	Y (3.9)	1.212	[15]
III	1-Methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate	OMIM•BF ₄	282.1	<-65	N	1.105	[16]

^aMiscib.: 水溶性; Y: 水可溶; N: 水不可溶; N.d.: 无数据.

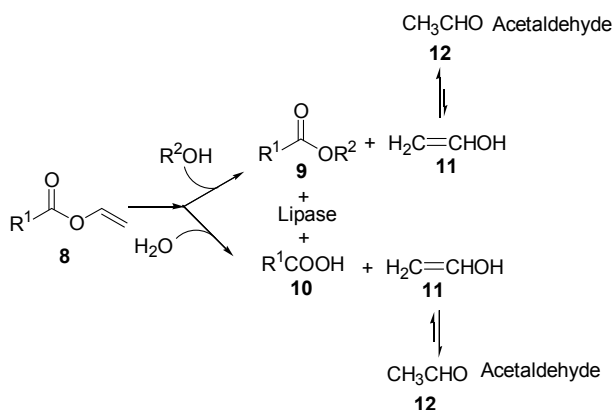


Scheme 1



Scheme 2

乙醇的酯交换反应生成咖啡酸苯乙酯的过程中,发现其转化速率比有机相中的速率快,且转化率达 93.8%。酯交换反应的过程中,为促进反应向生成酯的方向进行,一般选择用乙烯醇酯 **8** 和对应的醇进行酯交换生成甲醛(**12**)挥发,使反应一直向产物生成方向进行^[23],其反应通式如 Scheme 3 所示。



Scheme 3

2.2 催化酯合成的脂肪酶

酯类合成需要无水或微水环境,因此一般选择在反应介质中活性较高的脂肪酶作为催化剂^[17,24],离子液体

中常用于催化酯类合成的脂肪酶见表 2。其中,南极假丝酵母脂肪酶(*Candida antarctica* lipase B, CaLB)是最常用的生物催化剂,原因在于与其他脂肪酶相比, CaLB 在离子液体中具有更高的热稳定性和催化选择性^[24,25]:在[Bmim][PF₆]和[Bmim][BF₄]中, CaLB 比 RmL 的催化效率高 1.5 倍^[3];与正己烷作为介质相比,在[Bmim]-[PF₆]中的 CaLB 活性增强 1.7 倍^[26];在不同的离子液体

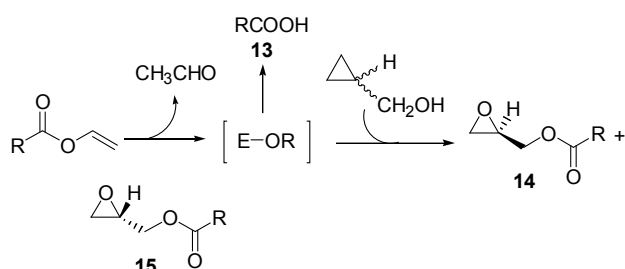
表 2 常用于酯化反应的脂肪酶

Table 2 Lipases of esterification

Name	Abbr.	Ref.
<i>Candida antarctica</i> lipase B	CaLB	[28]
<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	PcL	[29]
<i>Candida antarctica</i> lipase A	CaLA	[27]
<i>Mucor Miei</i> lipase	MmL	[30]
<i>Candida rugosa</i> lipase	CrL	[27]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	TLL	[31]
<i>Rhizomucor miehei</i> lipase	RmL	[32]
<i>Burkholderia cepacia</i> lipase	BcL	[33]
<i>Pig pancreas</i> lipase	PpL	[34]
<i>Alcaligenes sp.</i> lipase	AsL	[35]
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> lipase	BtL	[13]
<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	PcL	[20]
<i>Pseudomonas sp.</i> lipase	PsL	[36]

中, 脂肪酶的催化效率有所差异, CaLB 大多情况下在 [Emim][Tf₂N] 中的催化效率较高^[27].

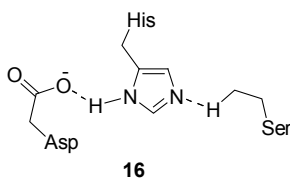
除 CaLB 之外, 其他脂肪酶用于催化酯类合成也有不俗的表现, 如 PsL, CrL, CaLA 及 PcL 等. Lozano 等^[27] 研究了 CaLA 和 MmL 在离子液体中催化合成环氧丙酯 (**14**, **15**) 的能力, 发现用 [Emim][Tf₂N] 作为介质、乙烯丁酯作为酰基供体时, MmL 的催化效率比传统溶剂提高 95 倍, 反应机理如 Scheme 4 所示. 因此, 脂肪酶与化学催化剂相比, 在微水相体系中催化酯类合成具有催化效率高、副反应少及选择性强等诸多独特优势.



Scheme 4

2.3 离子液体对脂肪酶催化性能的影响

脂肪酶在离子液体中催化酯合成的过程, 总体上分为四个阶段^[37]: (1) 酸与酶活性位点结合, 形成酸-酶中间体; (2) 该中间体消除一个水分子, 形成较稳定的酸-酶复合物; (3) 醇羟基亲核攻击复合物, 形成醇-酸-酶中间体; (4) 复合体消除一个水分子, 同时得到的酯从酶分子中游离^[38]. 离子液体作为反应介质, 主要从三个方面影响酶分子的催化性能: (1) 破坏酶分子周围的微水相环境, 从而改变脂肪酶的空间构象; (2) 透过微水相环境, 与脂肪酶直接作用, 改变其活性位点 **16**^[39]; (3) 与底物和产物间的相互作用, 改变两者在两相间的分配行为.



Scheme 5

2.3.1 影响脂肪酶的微环境

脂肪酶催化酯类合成过程中, 需要少量的水分子维持脂肪酶的空间构象(机理见图 1)^[40]. 在“疏水离子液体-酶”组成的微环境中(图 1a), 离子液体的疏水作用导致酶周围的水分子层具有比离子液体更高的介电常数, 使得水分子不易与酶分离, 空间结构稳定. 在一定的范围内, 离子液体的疏水性越大, 水分子与酶的相互作用力越强, 酶的空间结构越稳定^[40]; 但当离子液体的疏水性

超过界限值后, 酶活性随着离子液体疏水性增大而降低, 原因在于离子液体的疏水性过高会抑制底物与酶分子的相互接触, 降低底物在离子液体中的溶解度, 阻碍底物与酶分子的相互作用^[41]. 而“在亲水性离子液体-酶”组成的微环境中(图 1b), 离子液体由于本身具有更高的介电常数, 从而取代结合在酶表面的水分子, 引起脂肪酶的肽链解折叠, 最终表现为酶的活性降低甚至失活^[3].

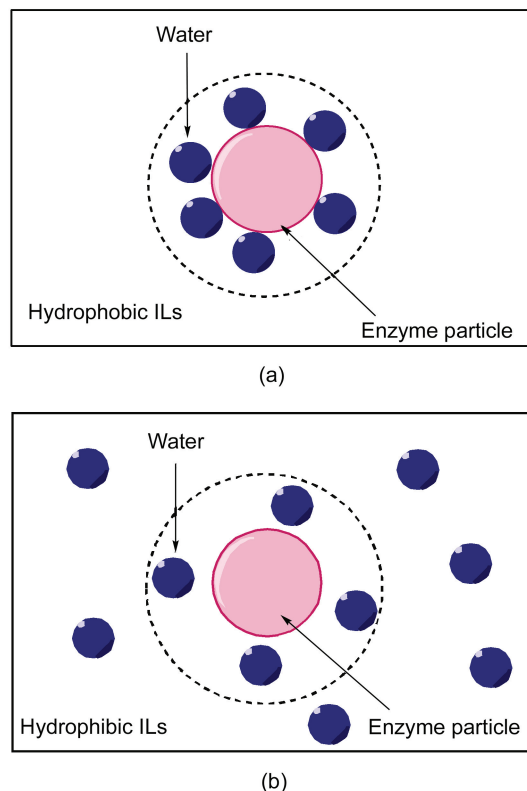


图 1 疏水性和亲水性离子液体对酶表面微环境的影响
Figure 1 Hydrophobic and hydrophilic ILs' effects on micro-environment on the surface of lipase

Rubio 等^[42]在离子液体中以向日葵和废弃食用油为原料进行酯交换反应, 结果表明 CaLB 在亲水性较强的 [Bmim][BF₄] 中的催化效率比亲水性较弱的 [Omim][Tf₂N] 低, 前者产率为 5%, 而后者高达 48%. 此外, 促进脂肪酶催化酯类反应的疏水性离子液体, 还有 [Bmim][PF₆], [Hmim][PF₆], [Emim][Tf₂N], [Omim][Tf₂N] 以及 [Hmim][Tf₂N] 等^[5]. 因此, 脂肪酶催化酯类合成中, 常选择疏水性离子液体作为反应介质.

由于 pH 值决定酶活性位点的氨基酸残基离子化状态, 因此它对脂肪酶催化活性具有重要的调控功能^[43]. 离子液体的极性越大, 与酶分子表面的相互作用力越强, 导致脂肪酶周围的 H⁺ 不断富集, 从而降低蛋白周围微环境的 pH 值, 宏观上表现为抑制酶活. Salis 等^[44]

发现 pH 的降低会导致酶分子中的 Glu³⁴¹ 和 His⁴⁴⁹ 残基质子化, 不能协助 Ser²⁰⁹ 的氧对底物中的碳进行亲核攻击, 从而降低脂肪酶的活性. De Los Rios 等^[16]也验证了这个规律, CaLB 在 [Bmim][PF₆]₂ 中催化合成乙烯醇酯, 当 pH 值处于 6.2~8.2 范围时对产率的影响较大, 而当 pH 为 7 时达到极值.

2.3.2 影响脂肪酶的空间构象

离子液体不仅直接影响脂肪酶周围的水分子层, 还会透过水分子层, 进而与脂肪酶作用并影响其活性. 主要是通过阴、阳离子与脂肪酶的带电基团结合, 或与酶分子中含氢键基团发生静电作用来改变酶的空间构象^[19,45]. 特别是, 阳离子的非极性越强, 对脂肪酶的空间结构的影响越大^[46], 主要原因有两方面: (1)非极性强的离子与酶的非极性亚基的相互作用力强, Constantinescu 等^[43]利用扫描量热法检测阳离子对核糖核酸酶的热降解程度, 证实离子液体使脂肪酶空间构象的转变温度按照 Hofmeister 顺序依次降低, 即 $K^+ > Na^+ > [C_{1,1,1,1}N]^+ > [C_{2,2,2,2}N]^+ \approx [Emim]^+ > [Bmim]^+ \approx [C_{3,3,3,3}N]^+ > [Hmim]^+ \approx [C_{4,4,4,4}N]^+$; (2)非极性阳离子具有疏水性, 能保护酶分子周围的微水相环境, 有助于维持脂肪酶的稳定性, 总体上脂肪酶催化性能呈贝尔曲线分布, 当碳链长度为 C₄~C₆ 时脂肪酶活力达到最大值^[47].

显然, 离子液体中的阴离子也能影响脂肪酶活性^[48]. 由于阴离子具有较强的电负性, 会与醇羟基竞争, 通过亲核攻击脂肪酶的靶位点, 改变其空间结构, 使醇不能结合到酶的活性位点, 从而降低其活性. 本课题组^[49,50]在研究中非水相中合成咖啡酸苯乙酯的过程中, 离子液体中脂肪酶催化性能明显优于异辛烷. 在离子液体中, Novozym435 在 [Bmim][BF₄]₂ 中几乎不催化酯化反应, 而在 [Bmim][PF₆]₂ 中反应速率提高 14 倍, 其原因是 BF₄⁻ 离子的电负性比 PF₆⁻ 大, 亲核能力强, 与酶中亲电基团结合力强, 从而导致脂肪酶的空间构象发生改

变, 导致脂肪酶的活性降低^[26].

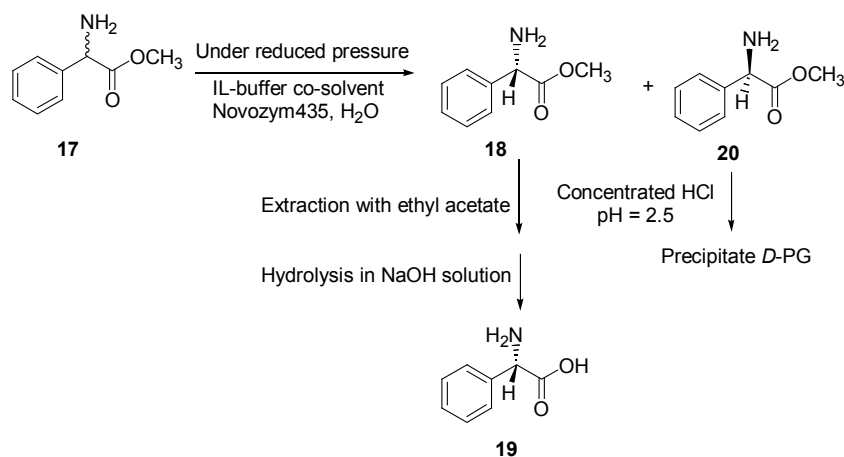
此外, 离子液体的阴阳离子对脂肪酶空间构象的影响存在差异. Ha 等^[51]发现阴离子的极化与水合作用的能力比阳离子强, 因此阴离子对脂肪酶的空间构象影响更大; 此外, 阳离子一般通过与阴离子相互作用后, 对酶分子间接产生影响: 亲电性的阳离子导致阴离子亲核性降低, 影响其与脂肪酶亲电基团的相互作用, 且阴离子和脂肪酶的相互作用不遵循前述的 Hofmeister 顺序.

2.3.3 影响脂肪酶的选择性

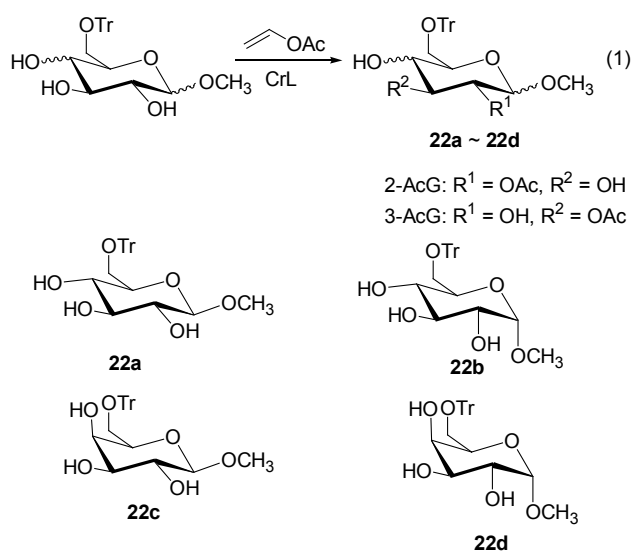
离子液体既能够影响脂肪酶的催化性能, 也能影响脂肪酶的对映体选择性^[52]. Lou 等^[53]发现脂肪酶 CaLB 在有机溶剂中催化 (*D,L*)-苯甘氨酸甲酯 (**17**) 水解反应得到 *L*-苯甘氨酸 (**19**) 和 *D*-苯甘氨酸 (**20**) 的混合物, 而在 [Bmim][BF₄]₂ 中却能够得到较纯的 *L*-苯甘氨酸 (**19**), 反应过程见 Scheme 6. 此外, Durand 等^[54]也报道了咪唑类离子液体 ([C₄C₁im][BF₄]₂, [C₄C₁im][PF₆]₂) 的不对称诱导效应的能力比有机溶剂强. 尽管离子液体影响脂肪酶对映选择性的机理尚未明了, 但可以确定的是: 离子液体的疏水性、阴离子的亲核能力及阳离子中碳链长度对脂肪酶对映体选择性具有较大的影响^[55].

离子液体除了影响脂肪酶的对映选择性, 还影响脂肪酶的区域选择性. 离子液体中产物比有机溶剂中的合成速率和产量更高, 主要原因是离子液体对脂肪酶的区域选择性有较大的影响^[44]. Ganske 等^[56]发现脂肪酶 CrL 在有机溶剂四氢呋喃中催化葡萄糖 (**21**) 进行酯化反应一般生成四种不同的葡糖酯 **22a**~**22d**, 而在 [Bmim][BF₄]₂ 中 CrL 只选择性地催化葡萄糖生成 **22a**, 反应过程见 Eq. 1.

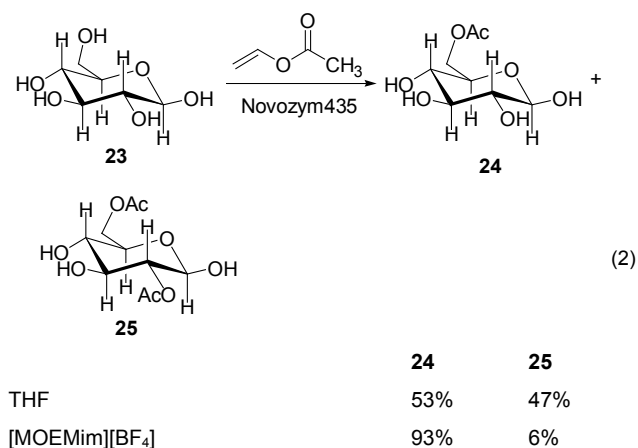
类似的, Kennedy 等^[57]的报道发现, CaLB 在四氢呋喃中催化 **23** 合成 **24** 和 **25**, 且二者比例接近; 而在 [MOEMim][BF₄]₂ 中 CaLB 能够高选择性地催化合成 **24**, 见 Eq. 2. 目前, 离子液体影响脂肪酶区域选择性的



Scheme 6



机理尚未研究清楚, 有一种可能的解释是: 离子液体具有特异的溶剂性与脂肪酶分子相匹配, 引起脂肪酶特异性地生成某一产物^[57].



脂肪酶作为高效生物催化剂, 其催化活性与选择性跟脂肪酶的空间结构密切相关^[59]. 因此, 在研究离子液体对脂肪酶催化酯类合成过程的影响因素时, 需要对离子液体、pH、黏度、脂肪酶的空间结构及催化活性等诸多因素进行综合考虑.

3 场/反应器强化酶促酯类合成

3.1 场强化

3.1.1 超声强化

超声波强化酶促酯合成, 可增强非均相体系的传质, 是一种有效的强化手段^[60]. 表 3 列举了机械搅拌和超声作用两种传质条件下酯类合成的产率结果, 表明超声强化的效率明显高于传统传质方式. Xiao 等^[61]发现在离子液体中合成葡萄糖苷, 超声强化能显著降低反应平衡时间, 同时能提高产量. 作为机械波, 超声往往通过

两个方面影响酶促反应: (1)超声波的作用下, 底物和酶分子间产生空穴作用, 分子微环境间产生强烈的冲击波和微射流, 导致离子液体与酶表面的边界层减薄、强化分子间的微孔扩散以及增大传质表面积; (2)超声引起酶分子振动, 导致脂肪酶的空间结构发生变化; 此外, 超声作用由于增强酶、底物以及产物之间的传质, 从而对脂肪酶的催化性能有较大影响^[62].

表 3 机械搅拌和超声作用下不同酯类的产率

Table 3 Yield of products under stirring and ultra-sound assistance of different esters

Product	Yield/%		Ref.
	Stirring	Ultra-sound	
Xylitol ester	39.82	60.3	[63]
Glucose ester	15.76	81.29	[60]
Sugar ester	73.1	93.21	[61]

3.1.2 微波强化

近年来, 微波化学的兴起和发展使得微波辐射强化酯类合成的报道较多. 表 4 比较了微波辐射和传统加热两种作用下的酯类合成产率结果, 表明微波强化的效率明显高于传统加热方式. Yu 等^[64]在研究微波和离子液体对合成生物柴油协同作用的过程中, 发现在相同的离子液体中, 与传统加热相比, 微波处理的脂肪酶稳定性提高了 2.3 倍. 作为电磁波, 微波强化的机理与超声强化不同: 离子液体对微波强烈吸收, 形成底物、产物共溶体系, 促进分子之间的传质^[65]; 此外, 脂肪酶多为电偶极子, 在微波电场中电偶极子会产生强烈振动, 分子之间增大了相互碰撞, 从而在脂肪酶微环境中产生较多的热量, 提高反应的速率^[66]. 需要注意的是, 微波对脂肪酶活力的影响并不明显^[40]. 此外, Lamare 等^[67]比较了在反应前和反应过程中两种情况下对脂肪酶微波处理, 结果表明在反应过程中微波处理的脂肪酶稳定性更强.

表 4 微波和传统加热条件下不同酯类的产率变化

Figure 4 Yield of products under conventional heating with microwave irradiation of different esters

Product	Yield/%		Ref.
	Conventional heating	MW	
FAME	73	92	[64]
Methyl salicylate	36.6	93.6	[68]
CaLB acitivity	30	57	[40]
Xylitol ester	39.82	63.1	[63]

3.2 生物反应器强化

3.2.1 酶膜反应器

生物反应器对反应体系的传质、传热以及产物分离具有重要的影响, 因此反应器强化近年来受到格外关注. 酶膜反应器通过将脂肪酶固定在膜表面, 保证酶具

有活性, 反应底物与酶分子结合并反应生成产物, 产物透过膜的另一侧, 实现酶促反应与产物分离的同时进行(图 2)^[69]. 酶膜反应器中, 酶膜通常用疏水有机相和水相组成的两相系统^[70], 产物原位转移到溶剂相, 实现反应-分离耦合, 简化下游工艺, 节省生产成本^[71].

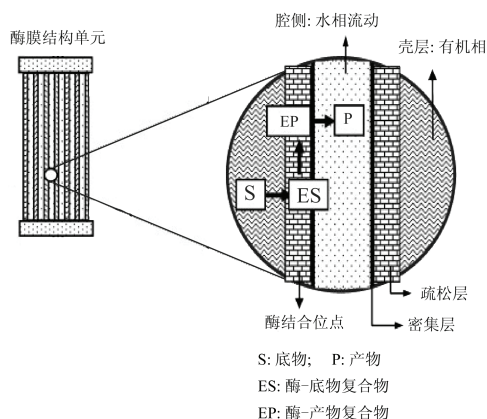


图 2 酶促反应器中的物料运输

Figure 2 Materials transport in an enzymatic reactor

在酶膜反应器中, 酶促合成以及传质过程主要受操作条件、流体性质以及膜表面的脂肪酶活性等因素的调控^[72]. 流体在膜表面形成的污垢与反应器中的流体黏度直接相关, 同时, 有机相的极性和疏水性对膜表面酶活性也有较大影响^[73]; 因此, 要提高酶膜反应器中的传质速率, 降低能量消耗, 需要选择理化性质最适于反应体系的流体. 此外, 随着反应的进行, 脂肪酶活性逐渐降低, 原因在于酶的流失以及失活^[74](由反应器中温度、pH 值、剪切力及器壁吸附作用引起); 同时, 脂肪酶的吸附作用降低膜表面的传质速率, 因此需要通过调节 pH 值、搅拌速率以及添加润滑剂等措施来降低酶分子在反应器壁的吸附以及失活, 使反应体系在长时间内维持稳定的反应速率.

3.2.2 分段微反应器

近年来, 出现了一种采用多相流动方式(气-液、液-液两相系统等)的分段式微反应器用于酯类合成. 在该反应器的微通道中, 流体的黏度和表面张力等理化因素在两相界面产生的作用力导致流体以不同的速率流动, 两相流体在微通道中形成连续的流体微团(即分段的流体), 同时不互溶的微团相互分离. 当微团形成后, 微团内部产生涡流循环, 促使微团内部以及反应底物和产物在流体微团间的传质(图 3)^[75], 可以构建高效的反应-分离耦合催化体系. 为使两相流体形成分段流动, 微反应器中常使用 T 形接口, 其中一相流体从通道中流动, 另一相流体被挤压到 T 形接口的通道中, 通过两相流体的界面作用力形成分段式流动(图 4)^[76], 分段长度受通道

压力、流体黏度和相界面表面张力等因素的影响.

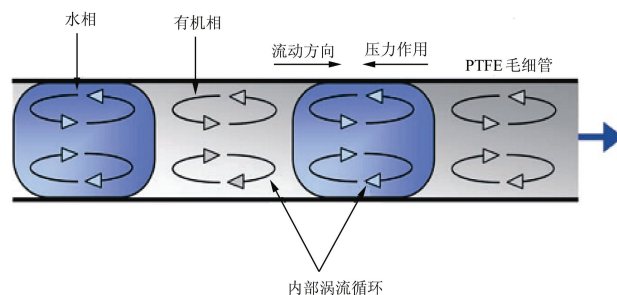


图 3 微反应器中的两相流体分段流动

Figure 3 Segmented flow of two-phase liquids in microreactor

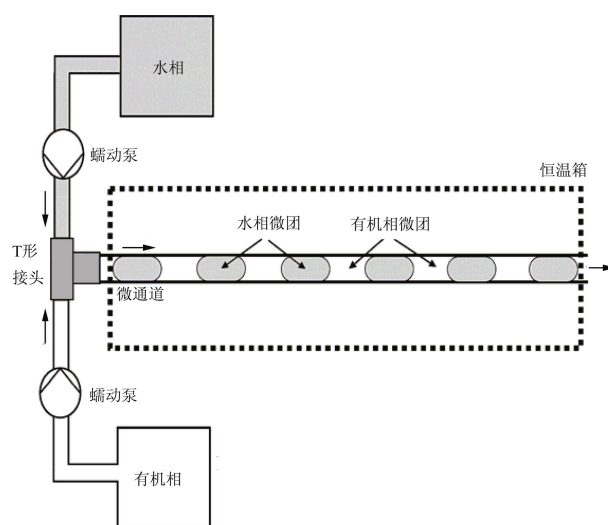


图 4 液-液分段微反应器结构

Figure 4 Formation of segmented flow of microreactor

与传统的搅拌槽式反应器相比, 分段流式反应器内微通道里两相流体的界面积要大 2~3 倍^[77]. 增大界面积, 虽然有利于底物与产物之间的传质, 但会增大酶分子在两相界面的接触, 失去其结构的完整性和活力^[78]. 因此, 在分段式反应器中往往采用固定化酶以及在水相中添加表面活性剂等措施, 来提高酶分子的稳定性以及催化性能^[76].

4 结语

与传统的有机溶剂相比, 离子液体在脂肪酶催化酯类合成过程中具有提高脂肪酶的催化性能、热稳定性、对映选择性及区域选择性等优越的介质特性. 此外, 离子液体和场致强化及新型生物反应器手段相结合, 能够提高脂肪酶催化酯类合成的反应速率, 增强脂肪酶的稳定性, 构建高效的反应-分离耦合体系.

离子液体中脂肪酶催化酯类合成随着今后研究的深入, 重点主要侧重于: (1)以离子液体对脂肪酶及其催

化反应体系的作用机理为基础, 采用计算机模拟、分子识别等手段设计、合成专用于酯类合成的新型离子液体; (2) 设计和创新匹配离子液体的高效脂肪酶, 采用定向进化、分子对接等手段高通量筛选用于离子液体中酯类合成的新型生物催化剂, 并探索新型脂肪酶固定化及修饰方法在酯类合成中的新应用; (3) 设计和构建新型高效的场致强化效应, 发展酶膜、分段流式微反应器, 采用化工计算、过程模拟等手段优化合成过程, 提高脂肪酶催化酯类合成的催化效率。

References

- [1] Jegannathan, K. R.; Abang, S.; Poncelet, D.; Chan, E. S.; Ravindra, P. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 253.
- [2] Gupta, M. N.; Roy, I. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575.
- [3] De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M. A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 234.
- [4] Zhong, T.; Le, Z.-G.; Xie, Z.-B.; Cao, X.; Lü, X.-X. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 981 (in Chinese).
(钟涛, 乐长高, 谢宗波, 曹霞, 吕雪霞, 有机化学, **2010**, *30*, 981.)
- [5] Lozano, P.; De Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 9.
- [6] Cao, X.; Le, Z.-G. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 816 (in Chinese).
(曹霞, 乐长高, 有机化学, **2010**, *30*, 816.)
- [7] Zhao, H. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 891.
- [8] Guo, Z.; Lue, B.; Thomasen, K.; Meye, A. S.; Xu, X. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1362.
- [9] Chiappe, C.; Leandri, E.; Tebano, M. *Green Chem.* **2006**, *8*, 742.
- [10] Kahveci, D.; Guo, Z.; Özçelik, B.; Xu, X. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1358.
- [11] Lue, B.; Guo, Z.; Xu, X. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1198*~*1199*, 107.
- [12] Lancaster, N. L.; Salter, P. A.; Welton, T.; Young, G. B. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8855.
- [13] Martín, J. R.; Nus, M.; Gago, J. V. S.; Sánchez-Montero, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 162.
- [14] Pereiro, A. B.; Legido, J. L.; Rodríguez, A. *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39*, 1168.
- [15] Shah, S.; Gupta, M. N. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 94.
- [16] De Los Ríos, A. P.; Hernández-Fernández, F. J.; Tomás-Alonso, F.; Gámez, D.; Villora, G. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 892.
- [17] De Los Ríos, A. P.; Hernández-Fernández, F. J.; Martínez, F. A.; Rubio, M.; Villora, G. *Biocatal. Biotransform.* **2007**, *25*, 151.
- [18] Toral, A. R.; De Los Ríos, A. P.; Hernández, F. J.; Janssen, M. H. A.; Schoevaart, R.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1095.
- [19] Van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2006**, *8*, 282.
- [20] Itoh, T.; Han, S.; Matsushita, Y.; Hayase, S. *Green Chem.* **2004**, *6*, 437.
- [21] Yuan, Y.; Bai, S.; Sun, Y. *Food Chem.* **2006**, *97*, 324.
- [22] Kurata, A.; Kitamura, Y.; Irie, S.; Takemoto, S.; Akai, Y.; Hirota, Y.; Fujita, T.; Iwai, K.; Furusawa, M.; Kishimoto, N. *J. Biotechnol.* **2010**, *148*, 133.
- [23] Hernandez-Fernandez, F. J.; Des los Rios, A. P.; Lozano-Blanco, L. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1423.
- [24] Madeira, L. R.; Sorgedragger, M. J.; Carrea, G.; Van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2004**, *6*, 483.
- [25] Ha, S. H.; Lan, M. N.; Lee, S. H.; Hwang, S. M.; Koo, Y. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 480.
- [26] Nara, S. J.; Harjani, J. R.; Salunkhe, M. M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1979.
- [27] Lozano, P.; De Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *214*, 113.
- [28] Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565.
- [29] Park, S.; Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 432.
- [30] Gamba, M.; Lapis, A. A. M.; Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 160.
- [31] Katsoura, M. H.; Polydera, A. C.; Tsironis, L.; Tselepis, A. D.; Stamatis, H. *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 491.
- [32] Lee, S.; Ha, S.; Lee, S.; Koo, Y. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1335.
- [33] Lee, J. K.; Kim, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 275.
- [34] Domínguez De María, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6960.
- [35] Schofer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Chem. Commun.* **2001**, 425.
- [36] Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K.; Itoh, T. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 81.
- [37] Fujita, K.; Macfarlane, D. R.; Forsyth, M. *Chem. Commun.* **2005**, 4804.
- [38] Foresti, M. L.; Ferreira, M. L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*, 289.
- [39] Mantarosie, L.; Coman, S.; Parvulescu, V. I. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2008**, *279*, 223.
- [40] Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 149.
- [41] Zhang, Q.; Zhang, S.; Deng, Y. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2619.
- [42] De Los Ríos, A. P.; Hernández-Fernández, F. J.; Gómez, D.; Rubio, M.; Villora, G. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1475.
- [43] Constantinescu, D.; Weingärtner, H.; Herrmann, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8887.
- [44] Salis, A.; Bilaničová, D.; Ninham, B. W.; Monduzzi, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1149.
- [45] Adamczak, M.; Bornscheuer, U. T. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 257.
- [46] Lue, B.; Guo, Z.; Xu, X. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1375.
- [47] Li, X.; Eli, W. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2008**, *279*, 159.
- [48] Van Rantwijk, F.; Madeira, L. R.; Sheldon, R. A. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 131.
- [49] Lu, D.-Q.; Jiang, B.; Wang, J.; Zhao, H.; Lin, X.-Q.; Chai, H.; Xia, T. *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38*, 1657 (in Chinese).
(卢定强, 蒋奔, 王俊, 赵辉, 林岫泉, 柴宏, 夏亭, 分析化学, **2010**, *38*, 1657.)
- [50] Lu, D.-Q.; Jiang, B.; Wang, J.; Zhao, H.; Lin, X.-Q.; Liu, J. *Modern. Chem. Ind.* **2009**, *29*, 20 (in Chinese).
(卢定强, 蒋奔, 王俊, 赵辉, 林岫泉, 刘骥, 现代化工, **2009**, *29*, 20.)
- [51] Ha, S.; Hiep, N.; Lee, S.; Koo, Y. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, *33*, 63.
- [52] Yang, Z.; Pan, W. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 19.
- [53] Lou, W.; Zong, M.; Liu, Y.; Wang, J. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 64.
- [54] Durand, J.; Teuma, E.; Gómez, M. C. *R. Chim.* **2007**, *10*, 152.
- [55] Sheldon, R. A.; Lau, R. M.; Sorgedragger, M. J.; Van Rantwijk, F.; Seddon, K. R. *Green Chem.* **2002**, *4*, 147.
- [56] Ganske, F.; Bornscheuer, U. T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3097.
- [57] Kennedy, J. F.; Kumar, H.; Panesar, P. S.; Marwaha, S. S.; Goyal, R.; Parmar, A.; Kaur, S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 866.
- [58] Park, S.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8395.
- [59] Lang, D. A.; Mannesse, M. L. M.; De Haas, G. H.; Verheij, H. M.;

- Dijkstra, B. W. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 333.
- [60] Lee, S. H.; Nguyen, H. M.; Koo, Y.; Ha, S. H. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1009.
- [61] Xiao, Y.; Wu, Q.; Cai, Y.; Lin, X. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2097.
- [62] Huang, J.; Liu, Y.; Song, Z.; Jin, Q.; Liu, Y.; Wang, X. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17*, 1115.
- [63] Rufino, A. R.; Biaggio, F. C.; Santos, J. C.; De Castro, H. F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 5.
- [64] Yu, D.; Wang, C.; Yin, Y.; Zhang, A.; Gao, G.; Fang, X. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1869.
- [65] Rejasse, B.; Lamare, S.; Legoy, M.; Besson, T. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1086.
- [66] Kumar, R.; Ravi, K. G.; Chandrashekar, N. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6617.
- [67] Rejasse, B.; Lamare, S.; Legoy, M.; Besson, T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 519.
- [68] Shi, H.; Zhu, W.; Li, H.; Liu, H.; Zhang, M.; Yan, Y.; Wang, Z. *Catal. Commun.* **2010**, *11*, 588.
- [69] Agustian, J.; Kamaruddin, A. H.; Bhatia, S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2011**, *86*, 1032.
- [70] Deng, H.; Xu, Z.; Dai, Z.; Wu, J.; Seta, P. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 996.
- [71] Giorno, L.; Piacentini, E.; Mazzei, R.; Drioli, E. *J. Membr. Sci.* **2008**, *317*, 19.
- [72] Vrijenhoek, E. M.; Hong, S.; Elimelech, M. *J. Membr. Sci.* **2001**, *188*, 115.
- [73] Graber, M.; Irague, R.; Rosenfeld, E.; Lamare, S.; Franson, L.; Hult, K. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2007**, *1774*, 1052.
- [74] Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.; Rios, G. M. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *76*, 273.
- [75] Ahmed, B.; Barrow, D.; Wirth, T. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1043.
- [76] Karande, R.; Schmid, A.; Buehler, K. *Langmuir* **2010**, *26*, 9152.
- [77] Kashid, M. N.; Harshe, Y. M.; Agar, D. W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 8420.
- [78] Tanaka, Y.; Slyadnev, M. N.; Sato, K.; Tokeshi, M.; Kim, H.; Kitamori, T. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 809.

(Zhao, C.)