

• 研究论文 •

## 新型对称烷基咪唑离子液体介质中酶催化合成 *l*-乙酸薄荷酯

李明<sup>a</sup> 方银军<sup>b</sup> 李在均<sup>\*,a,b</sup> 任国晓<sup>b</sup>  
黄亚茹<sup>b</sup> 单海霞<sup>a</sup> 党万雪<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> 江南大学化学与材料工程学院 无锡 214122)

(<sup>b</sup> 浙江赞宇科技股份有限公司 杭州 310030)

**摘要** 设计合成三种新型对称烷基咪唑六氟磷酸盐离子液体——1,3-二正丁基咪唑六氟磷酸盐([DnBIM][PF<sub>6</sub>]), 1,3-二异丁基咪唑六氟磷酸盐([DiBIM][PF<sub>6</sub>])和 1,3-二仲丁基咪唑六氟磷酸盐([DsBIM][PF<sub>6</sub>])。以脂肪酶 *pseudomonas cepacia* 催化 *l*-薄荷醇和乙酸酐的酯化过程为模型反应, 分别考察不同介质中酶的活性、反应性和稳定性, 结果表明作为反应介质三种新型离子液体均优于经典离子液体 1-正丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐和有机溶剂正己烷。在三种新的离子液体中, [DiBIM][PF<sub>6</sub>]具有最好的亲生物性而被选择作为模型反应介质。此外, 影响 *l*-薄荷醇转化率的各种因素(包括反应温度、底物投料比、离子液体用量和含水量)及酶的重复利用性也被详细研究。在最佳反应条件下, *l*-薄荷醇转化率达到 97.4%, 酶促反应速度、平衡转化率和半衰期分别是正己烷中的 12.7、4.6 和 15.1 倍。脂肪酶重复使用 10 次后催化活性没有明显减少。由于三种新型离子液体互为同分异构体, 以上事实还表明除憎水性和亲核性以外离子液体的空间构型也是影响酶行为的一个重要因素。

**关键词** 离子液体; 脂肪酶; 薄荷醇; 乙酸薄荷酯

## Synthesis of *l*-Menthyl Acetate Catalyzed by Lipase in New Symmetrical 1,3-Dialkylimidazolium Ionic Liquids

Li, Ming<sup>a</sup> Fang, Yinjun<sup>b</sup> Li, Zaijun<sup>\*,a,b</sup> Ren, Guoxiao<sup>b</sup>  
Huang, Yaru<sup>b</sup> Shan, Haixia<sup>a</sup> Dang, Wanxue<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

(<sup>b</sup> Zhejiang Zanyu Technology Limited Corporation, Hangzhou 310030)

**Abstract** Three new symmetrical 1,3-dialkylimidazolium ionic liquids including 1,3-di(*n*-butyl)imidazolium hexafluorophosphate ([DnBIM][PF<sub>6</sub>]), 1,3-di(*iso*-butyl)imidazolium hexafluorophosphate ([DiBIM][PF<sub>6</sub>]) and 1,3-di(*s*-butyl)imidazolium hexafluorophosphate ([DsBIM][PF<sub>6</sub>]) were designed and synthesized. The esterification reaction of *l*-menthol with acetic anhydride catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase was used as a model reaction to investigate the activity, reactivity and stability of the lipase in different media. The results indicated that the new ionic liquids as reaction medium were obviously better than classical ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and organic solvent hexane. Among these, the [DiBIM][PF<sub>6</sub>] is of best biocompatibility and was then selected as medium of the model reaction. Moreover, various factors on the conversion of *l*-menthol including reaction temperature, molar ratio of the two substrates, the amounts of the ionic liquid, water content and reuse of the lipase were investigated in detail. Under optimal reaction conditions, the conversion of *l*-menthol was about 97.4%. Its initial reaction

\* E-mail: zaijunli@263.net

Received September 28, 2008; revised January 10, 2009; accepted February 17, 2009.

国家自然科学基金(Nos. 20771045 和 20676052)、国家高技术计划“863”(2007AA10Z428)、浙江省自然科学基金(No. Y407321)和江苏省“青蓝工程”资助项目。

rate, the equilibrium conversion of *l*-menthol and the half-lifetime of the lipase in the [DiBIM][PF<sub>6</sub>] medium were about 12.7, 4.6 and 15.1-fold those obtained in hexane. Because the three ionic liquids used in the study are isomeric compounds, the fact also confirmed that besides hydrophobicity and nucleophilicity the spatial configuration of ionic liquids should be considered a key factor effecting enzyme performance in ionic liquid.

**Keywords** ionic liquid; lipase; menthol; menthyl acetate

香料的生理作用是通过与体内大分子之间严格的手性识别和匹配来实现的, 在许多情况下化合物的某一对映体在生物体内的生理活性、代谢过程、代谢速率及毒性等均存在显著差异. 如 *l*-薄荷醇的酯具有明显的清凉效果, 而这种性质在其他异构体中几乎不存在, 正是这种生理作用上的区别使 *l*-薄荷醇的酯的价值远远高于 *d*-薄荷醇的酯和外消旋混合物<sup>[1]</sup>. 因此, *l*-薄荷醇及其酯已成为重要的香料成分, 广泛应用于食品、烟草、医药和化妆品等领域<sup>[2]</sup>. 近年来, 生物酶催化合成 *l*-薄荷醇及其酯化合物受到广泛关注, 但现用的有机溶剂介质不能提供酶反应所需要的特殊微环境, 不仅导致产率较低, 而且带来环境污染<sup>[3]</sup>.

室温离子液体是一种环境友好的绿色溶剂, 它可替代易挥发性有机溶剂而广泛应用于非水生物催化过程<sup>[4,5]</sup>. 然而, 离子液体与酶的相互作用是极其复杂的, 酶在离子液体中表现为活性、稳定性和选择性的增加、保持或丧失<sup>[6-8]</sup>. 现代生物化学研究表明, 一个酶友好反应介质既可保持酶活性中心构型基本稳定, 又具有让酶行为正常发挥所必需的微环境. 因此, 寻找离子液体结构、性质及对酶行为的影响三者关系的规律性至关重要. 在前期工作中, 我们成功开发出系列 1-烷基-3-甲基咪唑类离子液体, 并应用于生物催化的转酯反应研究, 结果清楚地显示离子液体中阳离子构型对酶行为具有显著的影响<sup>[9]</sup>. 然而, 由于此类离子液体憎水性不够, 应用于生物催化合成 *l*-乙酸薄荷酯的反应效果并不理想. 为了解决这一问题, 我们设计合成了三种新型对称性烷基咪唑六氟磷酸盐室温离子液体——1,3-二正丁基咪唑六氟磷酸盐([DnBIM][PF<sub>6</sub>]), 1,3-二异丁基咪唑六氟磷酸盐([DiBIM][PF<sub>6</sub>])和 1,3-二仲丁基咪唑六氟磷酸盐([DsBIM][PF<sub>6</sub>]). 以脂肪酶催化合成 *l*-乙酸薄荷酯为模型反应, 考察不同离子液体中酶的活性、反应性和稳定性. 实验表明, 酶在三种新的离子液体中均具有比有机溶剂正己烷和常用离子液体 1-正丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐更高的催化性能, 尤其以离子液体[DiBIM][PF<sub>6</sub>]最佳. 在[DiBIM][PF<sub>6</sub>]介质中, *l*-薄荷醇转化率最高可达 97.4%, 明显高于文献报道值<sup>[5]</sup>.

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

HH-S 数显温控仪(金坛市医疗仪器厂); R-201 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司); SHZ-3 型循环水多用真空泵(河南省巩义市亚光仪器厂); SHA-C 型水浴恒温振荡器(金坛市医疗仪器厂); 9790 型气相色谱仪(温岭市福立分析仪器有限公司); RNDV-3 型流变仪(美国 Brook-field 公司); FTLA2000 型傅利叶红外光谱分析仪(美国 ABB 公司); UNITY INOVA 400 型核磁氢谱分析仪(美国瓦里安公司); vario ELIII 型元素分析仪(德国 Elementer 公司).

脂肪酶 PCL, 购于 SIGMA 公司(上海); *l*-薄荷醇(≥98%, 上海香料总厂); 1-正丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIM][PF<sub>6</sub>])(≥99%, 按文献方法自制<sup>[9]</sup>); *N*-三甲基硅烷基咪唑、溴代正丁烷、溴代异丁烷、溴代仲丁烷和六氟磷酸钾均为化学纯(国药集团化学试剂有限公司); 其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司).

### 1.2 离子液体的合成

在 500 mL 三口烧瓶中加入 100 mL (0.92 mol) *N*-三甲基硅咪唑和 197 mL (1.84 mol) 溴代正丁烷, 开启电动搅拌器, 缓慢升温至 70 °C 并保温反应 48 h, 得到黄色粘稠液体溴代 1,3-二正丁基咪唑(简称[DnBIM][Br]). 将[DnBIM][Br]转移至 2000 mL 烧杯中, 加入 1000 mL 去离子水, 开启电动搅拌器, 分批加入 169 g (0.92 mol) 六氟磷酸钾, 室温下搅拌 4 h. 弃去水相, 用去离子水反复洗涤离子液体, 直至用 AgNO<sub>3</sub> 溶液检验无沉淀为止. 经浓缩、真空干燥得无色透明液体[DnBIM][PF<sub>6</sub>], 总产率为 60%. [DiBIM][PF<sub>6</sub>]和[DsBIM][PF<sub>6</sub>]按上述相似方法合成, 仅用溴代异丁烷或溴代仲丁烷替代溴代正丁烷, 它们的产率分别为 57%和 55%.

### 1.3 *l*-乙酸薄荷酯的合成

在 25 mL 具塞锥形瓶中, 依次加入 1.5 g (9.6 mmol) *l*-薄荷醇, 1.0 mL 离子液体(或正己烷), 910 μL (9.6 mmol) 乙酸酐和 30 mg 的脂肪酶 PCL. 将具塞锥形瓶置于水浴恒温振荡器中, 控制温度为 35 °C, 转速为 180 r/min, 在一定时间间隔取样 10 μL, 加入 400 μL 正己烷

萃取. 萃取液加入一定量内标(乙酸苄酯)后用气相色谱进行分析.

#### 1.4 气相色谱条件

色谱柱为 SE-54(30 m×0.32 mm×0.25 μm), FID 检测器; 柱温 170 °C; 进样器与检测器温度为 300 °C; 载气为氮气; 尾吹 30 mL/min; 分流比 1:50. 保留时间分别为: *l*-乙酸薄荷酯 2.89 min, *l*-薄荷醇 3.24 min, 乙酸苄酯(内标) 3.81 min. 采用内标法定反应混合物中酯的含量, 计算转化率.

#### 1.5 酶的半衰期测定

在 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 1.0 mL 离子液体或正己烷和 30 mg 的脂肪酶 PCL, 于 35 °C 水浴中保温一定时间后, 加入 1.5 g *l*-薄荷醇和 910 μL 乙酸酐后, 按 1.3 节方法反应一定时间, 取样测定 *l*-乙酸薄荷酯含量, 以此计算酶活 *A*. 酶活定义为单位时间内每生成 1 μmol 的产物所需要的酶量, 本实验中结果用酶的比活来表示 (U/mg). 由于本反应体系符合一级反应动力学模型, 因此, 其半衰期可以表示如下:

$$A = A_0 \times e^{-kt}$$

式中, *k* 为一级反应速率常数, *A*<sub>0</sub> 与 *A* 分别为初始酶活与剩余酶活. 当 *A* = *A*<sub>0</sub>/2 时, 可计算得半衰期 *t*<sub>1/2</sub> = ln2/*k*.

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子液体的合成与纯化

用于生物催化的离子液体必须具备高的纯度, 传统合成方法达不到这一要求. 为避免原料或产物的氧化, 在合成过程中需采用高纯氮气保护. 进一步研究表明, 影响季铵盐化反应的主要因素是反应温度. 当反应起始温度高于 70 °C 时, 初始反应会过于剧烈而导致产物颜色加深, 但温度过低反应速率会变慢. 所以, 实验设定反应起始温度为 40 °C, 再逐步升温至 60 °C 并保温反应 24 h, 当反应体系为粘稠状不易搅拌时, 再将反应温度迅速升至 70 °C 保温 2 h, 使反应充分进行. 在采用六氟磷酸钾置换出溴负离子的反应中, 大多数文献是采取将六氟磷酸钾配成水溶液后使用的. 但是六氟磷酸钾在水中的溶解度较低(室温下只有 83.5 g/L), 如果配成水溶液使用, 则整个反应的用水量很大, 而且部分产品会溶于水而使产率降低. 因此, 试验采用了向溴化烷基咪唑水溶液中分批次加入固体六氟磷酸钾的办法, 提高了产率.

尽管按上述优化方法合成的离子液体有较高纯度, 但为了结构表征与后期酶反应研究仍需进一步提纯. 在前期工作中, 我们发现离子液体中所含杂质主要包括未反应的卤代烃和反应过程中因温度较高原料氧化的有

色化合物. 因离子液体沸点大多在 400 °C 以上, 而原料卤代烃沸点大多在 200 °C 以下, 故可采取减压蒸馏除去. 但是原料氧化所产生的有色化合物, 因离子液体黏度较大, 采用常规的脱色方法难以去除, 从而成为离子液体纯化中的难点. 实验发现, 当离子液体加入适当稀释剂后其黏度可大幅度降低, 便于进行纯化操作. 我们考察了对称性烷基咪唑六氟磷酸盐离子液体在各种有机溶剂中的溶解情况(包括甲醇、甲苯、丙酮和四氯化碳), 结果表明离子液体极易溶于丙酮和甲醇, 却难溶于甲苯和四氯化碳. 因此, 实验选取丙酮作为离子液体的稀释剂. 离子液体中加入丙酮后, 黏度迅速变小. 当丙酮体积达到离子液体两倍时, 溶液黏度接近水的黏度. 将此溶液过滤, 除去包埋在离子液体中的六氟磷酸钾后, 加入活性炭, 在磁力搅拌器上搅拌, 过滤, 再真空旋蒸除去丙酮, 在真空干燥箱内干燥 24 h, 得无色离子液体. 纯化后的离子液体在 400~800 nm 之间进行光谱扫描, 没有发现明显的吸收峰, 表明离子液体中的有色化合物已去除.

[**DnBIM**][PF<sub>6</sub>]: <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 0.87 (t, *J* = 7.32 Hz, 6H), 1.29~1.35 (m, 4H), 1.84~1.88 (m, 4H), 4.24 (t, *J* = 6.83 Hz, 4H), 7.56 (d, *J* = 1.56 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 1.56 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H); IR (neat) ν: 1113, 1164, 1335, 1380, 1465, 1567, 2876, 2939, 2965, 3118, 3164, 3364 cm<sup>-1</sup>. Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>: C 40.49, H 6.49, N 8.59; found C 39.24, H 6.80, N 8.41.

[**DiBIM**][PF<sub>6</sub>]: <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 0.94 (d, *J* = 6.84 Hz, 12H), 2.20~2.27 (m, 2H), 4.17 (d, *J* = 7.32 Hz, 4H), 7.72 (d, *J* = 1.95 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 1.95 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H); IR (neat) ν: 1164, 1371, 1397, 1469, 1566, 2881, 2967, 3162 cm<sup>-1</sup>. Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>: C 40.49, H 6.49, N 8.59; found C 40.41, H 6.67, N 8.52.

[**DsBIM**][PF<sub>6</sub>]: <sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 0.87 (t, *J* = 7.32 Hz, 6H), 1.93~1.99 (m, 4H), 1.61 (d, *J* = 6.35 Hz, 6H), 4.54~4.60 (m, 2H), 7.87 (d, *J* = 1.60 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 1.60 Hz, 1H), 9.10 (s, 1H); IR (neat) ν: 1153, 1170, 1391, 1429, 1463, 1555, 2884, 2944, 2976, 3162 cm<sup>-1</sup>. Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>: C 40.49, H 6.49, N 8.59; found C 40.24, H 6.78, N 8.41.

### 2.2 酶促反应条件优化

固定[**DiBIM**][PF<sub>6</sub>]为反应介质, 反应时间 24 h, 对脂肪酶 PCL 催化 *l*-薄荷醇与乙酸酐的酰化反应条件进行优化.

#### 2.2.1 反应温度

通常, 温度升高可使反应速率显著加快, 酶的活力

也增加, 在某一温度达到最大值. 但随着温度继续升高, 酶的热变性速度也加快. 因此, 温度是影响酶促反应的关键因素. 当脂肪酶固定在  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$  介质, 温度对 *l*-薄荷醇转化率的影响列于图 1. 从图 1 可知, 反应温度低于  $35\text{ }^\circ\text{C}$  时 *l*-薄荷醇的转化率随着反应温度的升高而增加, 这可能是由于反应温度的升高使得离子液体黏度的降低和反应体系中的活化分子数增加的缘故; 反应温度在  $35\sim 38\text{ }^\circ\text{C}$  时, 转化率达到最高且变化不大, 因为在此温度范围内酶的活性构象能够得以维持, 而超过  $38\text{ }^\circ\text{C}$  后酶的活性构象受到破坏, 从而导致酶的活性降低, 反应的转化率急剧下降. 因此, 选择反应温度为  $35\text{ }^\circ\text{C}$ .

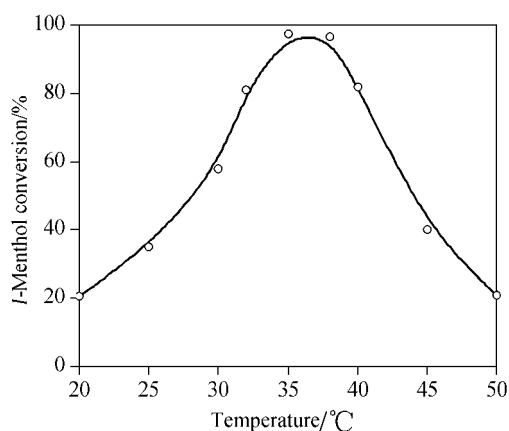


图 1 反应温度对 *l*-薄荷醇转化率的影响

Figure 1 Effect of reaction temperature on conversion of *l*-menthol

Reaction conditions: 9.6 mmol of *l*-menthol, 9.6 mmol of acetic anhydride, 1.0 mL  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$ , 30 mg of lipase, 24 h of the reaction time

### 2.2.2 底物醇和酸酐物质量的比率

底物 *l*-薄荷醇与乙酸酐物质量的比率对 PCL 催化 *l*-乙酸薄荷酯合成反应的影响显著, 结果见图 2. 由图 2 可知, 随着乙酸酐物质的量增大 *l*-薄荷醇的转化率升高, 在比率为 1:1 时达到最高; 进一步增加乙酸酐的量, *l*-薄荷醇的转化率反而下降, 这与文献报道结果一致<sup>[5]</sup>. 其原因可能是: 在高浓度的乙酸酐存在时, 大量酸酐的脱水作用致使酶的活性降低<sup>[10]</sup>, 同时反应产生高浓度的副产物乙酸也可能抑制酶活性, 从而导致转化率明显下降. 而在很低浓度的乙酸酐条件下, 反应速率将会降低, 同时随着反应进行, 酸酐量不断的减少和反应产生乙酸的增加, 乙酸可能成为优势的酰基供体, 而乙酸的酰化能力远低于乙酸酐, 从而在反应结果上表现出 *l*-薄荷醇的转化率降低的现象. 因此, 酰化反应时底物醇和酸酐物质量的最佳比率为 1:1.

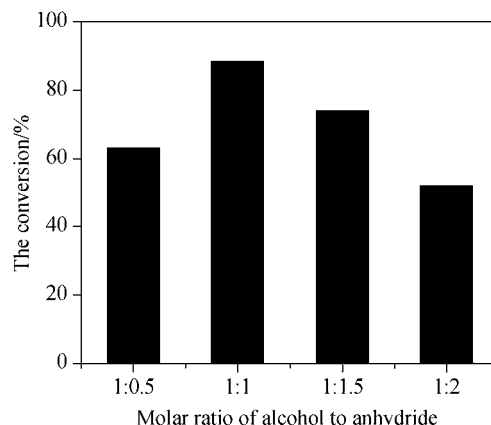


图 2 底物醇与酸酐物质量的比率对 *l*-薄荷醇转化率的影响  
Figure 2 Effect of the molar ratio of alcohol to anhydride on conversion of *l*-menthol

Reaction conditions:  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , 9.6 mmol of *l*-menthol, 1.0 mL  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$ , 30 mg of PCL, 24 h of the reaction time

### 2.3 介质的选择

固定反应温度为  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , 底物 *l*-薄荷醇与乙酸酐物质量的比率为 1:1 条件下, 分别考察了不同离子液体作为反应介质时酰化反应的可能性, 所得结果见图 3. 结果表明: 脂肪酶 PCL 在这五种介质中都可以催化合成 *l*-乙酸薄荷酯; PCL 在三种新型对称型离子液体  $[\text{DnBIM}][\text{PF}_6]$ ,  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$  和  $[\text{DsBIM}][\text{PF}_6]$  中的催化性能均明显优于传统有机溶剂正己烷和离子液体  $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ , 在  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$  中平衡转化率在 24 h 时达到最大值 97.4%, 而其他四种介质在相同条件下平衡转化率分别为 88.4% ( $[\text{DsBIM}][\text{PF}_6]$ ), 71.5% ( $[\text{DnBIM}][\text{PF}_6]$ ), 58.3% ( $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ ) 和 21.2% (正己烷).

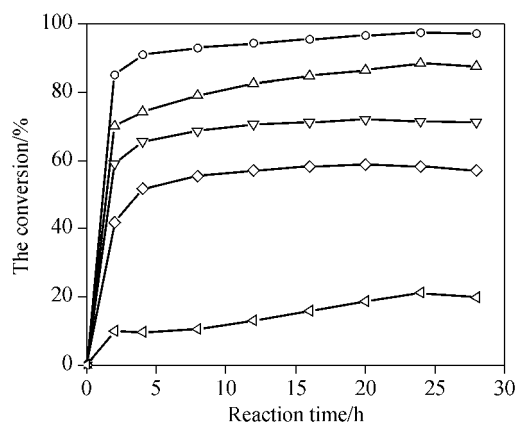


图 3 不同介质中 *l*-薄荷醇的反应进程

Figure 3 Time-courses of *l*-menthol conversion of the reaction in different media

Reaction in media  $[\text{DiBIM}][\text{PF}_6]$  (○),  $[\text{DsBIM}][\text{PF}_6]$  (△),  $[\text{DnBIM}][\text{PF}_6]$  (▽),  $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$  (◇) and hexane (⊞). Reaction conditions:  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , 9.6 mmol of *l*-menthol, 9.6 mmol of acetic anhydride, 30 mg of PCL

以[DiBIM][PF<sub>6</sub>]的性能最好, 酶促反应速度为正己烷的12.7倍, 平衡转化率为正己烷的4.6倍, 而在这两种介质中的酶活力分别为  $9.8 \pm 0.1 (10^{-2} \text{ U/mg})$  ([DiBIM][PF<sub>6</sub>])和  $7.7 \pm 0.1 (10^{-3} \text{ U/mg})$ (正己烷). 从上面的数据可以看出, 尽管对称型离子液体[DiBIM][PF<sub>6</sub>], [DsBIM][PF<sub>6</sub>]和[DnBIM][PF<sub>6</sub>]互为同分异构体具有相似的理化性质, 但脂肪酶 PCL 在这三种介质中的催化性能却有明显差异. 为了进一步研究离子液体结构对酶行为的影响, 我们采用 RVDV-3 型流变仪分别测定了各离子液体的黏度, 并运用 HyperChem7.0 化学软件分别计算出各离子液体中阳离子的偶极矩(见表1). 从表1可以看出, 离子液体与普通分子溶剂相比具有较高的黏度, 高黏度会减慢化学反应过程中热和质的转换, 从而降低反应速率. 然而, 实验却给出完全相反的结果. 我们认为这与一般规则并不矛盾, 原因之一在于加入相当量的反应底物 *l*-薄荷醇和乙酸酐之后, 各反应体系之间的差值会显著减少至具有相近的黏度. 另一方面, 各离子液体中阳离子的偶极矩以[DiBIM][PF<sub>6</sub>]最小, 表示其极性为最小, 可能因此维持了酶分子表面的必需水层而导致了最优的催化性能. 现代生物化学研究表明, 作为生物催化的理想溶剂能够维持酶结构的稳定, 实现酶催化时活性构象的转变. 因此, 反应体系中微环境的性质是影响酶活性和稳定性的重要因素. 目前, 人们对离子液体内部微环境性质与对酶行为影响的关系仍缺乏足够的认识, 这为构建成生物友好的离子液体带来极大的难度<sup>[11~14]</sup>. 然而, [DiBIM][PF<sub>6</sub>], [DsBIM][PF<sub>6</sub>]和[DnBIM][PF<sub>6</sub>]互为同分异构体, 它们在组成和结构上的差异只在于咪唑环上烷基的不同空间构型. 由此, 我们认为[DiBIM][PF<sub>6</sub>]的特殊空间构型可能促成了酶催化活性构象的转变, 提供了酶发挥作用友好的微环境, 所以转化率最高.

表 1 离子液体在 35 °C 时的黏度和极性

Table 1 Apparent viscosity and polarity of the ionic liquid at 35 °C

离子液体	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	[DnBIM][PF <sub>6</sub> ]	[DiBIM][PF <sub>6</sub> ]	[DsBIM][PF <sub>6</sub> ]
黏度/cP	165	209	612	385(55 °C)
阳离子偶极矩/D	3.17	0.4466	0.1445	0.2318

## 2.4 离子液体的加入量与体系含水量的影响

选择不同的离子液体加入量进行酰化反应, 结果表明, *l*-薄荷醇的转化率随离子液体加入量的增加而增大, 当加入的质量分数达到 30%后, 进一步提高其质

量分数, 转化率基本不变. 但当离子液体质量分数超过 50%, 转化率开始下降, 这与我们前期工作所得的结果一致<sup>[9]</sup>. 因此, 选择[DiBIM][PF<sub>6</sub>]的加入量为 1.0 mL (质量分数为 33.2%).

系统含水量在非水生物催化中起着重要的作用, 它能维持酶活性所需构象的柔性. 因此, 系统含水量是影响酶活性、选择性和稳定性的关键因素. 不同含水量 (*V/V*)对 PCL 催化 *l*-薄荷醇酯合成反应的影响如图 4 所示. 由图 4 可知, *l*-薄荷醇的转化率随着体系含水量的增加而显著减少, 但当体系中仅加入微量水 0.2%时, 转化率(94.8%)与无水条件相比略有减少. 酶催化 *l*-薄荷醇和乙酸酐合成 *l*-薄荷醇酯反应示意图见图 5, 可见水在酯的生成、酶的水合和酸酐水解过程中都有着非常重要的作用. 系统中的含水量过高时, 太多的水分会使酶积聚成团, 使疏水底物较难进入酶的活性部位引起传质阻力, 导致酶的活性降低; 同时反应底物乙酸酐遇水易分解为乙酸, 而使酰化能力减弱, 因而转化率迅速下降. 但是在微水系统中, 微量水的存在能提供酶的“必需水”而加强酶的柔性, 提高了酶的活性和选择性, 这将与酸酐的水解形成竞争. 另据文献报道<sup>[15]</sup>, 即使经过干燥处理的离子液体中仍然不可避免地存在极微量水, 这些水也可提供酶的“必需水”, 从而得到高转化率. 因此, 针对本反应体系, 采取在不外加水的条件下进行.

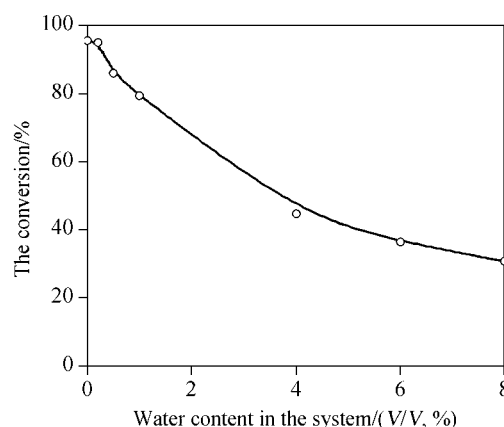


图 4 系统含水量对 *l*-薄荷醇转化率的影响

Figure 4 Effect of water content in the system on conversion of *l*-menthol

Reaction conditions: 9.6 mmol of *l*-menthol, 9.6 mmol of acetic anhydride, 1.0 mL of the [DiBIM][PF<sub>6</sub>], 30 mg of PCL, 35 °C, 24 h of the reaction time

## 2.5 酶的稳定性

选择离子液体作为酶催化反应的一个重要标准是酶在离子液体中的稳定性. 按照 1.5 节的方法分别检测了脂肪酶 PCL 在三种新型对称型离子液体 1,3-二丁基咪唑六氟磷酸盐和正己烷中反应的半衰期, 结果列于表 2.

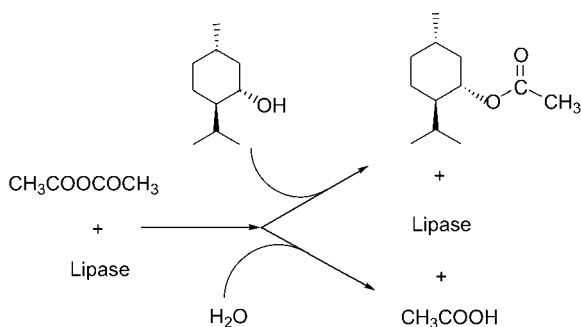


图 5 脂肪酶 PCL 催化 *l*-薄荷醇和乙酸酐合成 *l*-乙酸薄荷酯反应示意图

Figure 5 Scheme of synthesis of *l*-menthyl acetate from *l*-menthol and acetic anhydride catalyzed by PCL

从表 2 中可知, 酶在三种新型对称型离子液体中的稳定性明显优于正己烷; PCL 在 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 中与正己烷相比, 酶的半衰期增大 15.1 倍. 这可能是由于在离子液体中维持了酶分子表面的必需水层而造成的.

表 2 不同溶剂中脂肪酶的半衰期

Table 2 Half-life time ( $t_{1/2}$ ) of the lipase in different media

溶剂	半衰期/h
[DiBIM][PF <sub>6</sub> ]	121 ± 0.8
[DsBIM][PF <sub>6</sub> ]	36 ± 0.2
[DnBIM][PF <sub>6</sub> ]	15 ± 0.3
Hexane	8 ± 0.1

近年来, 通过分光光度法研究蛋白质在离子液体中的稳定性结果表明, 离子液体提供的热稳定性效果可能与蛋白质发生的结构变化有关<sup>[16-18]</sup>. 三种新型对称型离子液体中都含有亲核性较强的阴离子 PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, 它能与酶结构中的正电部分结合从而促使酶倾向于活性构象的转变<sup>[18]</sup>. 从表 2 中还可以看出, 酶在 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 中的稳定性显著高于 [DsBIM][PF<sub>6</sub>] 和 [DnBIM][PF<sub>6</sub>], PCL 在 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 中的半衰期分别是 [DsBIM][PF<sub>6</sub>] 和 [DnBIM][PF<sub>6</sub>] 中的 3 倍和 8 倍.

## 2.6 酶的重复利用

在普通有机溶剂中进行的酶催化反应, 酶的再利用之前, 必须进行预处理, 先将其滤出, 然后清洗、干燥. 但在离子液体 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 中反应时, 酶不溶于离子液体, 并且在反应相当时间后, 反应体系的黏度大幅度降低, 因此可以直接将酶过滤回收, 重复反应而无须纯化. 这样既避免了预处理过程中酶催化活性的下降, 又给操作带来了极大的方便, 节约了成本. 结果表明, PCL 重复使用 10 次后催化活性都没有明显减少, 反应转化率降低幅度很小. 这证明离子液体 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 提供了酶发挥作用友好的微环境, 是作为生物催化反应的优良介

质.

## 2.7 离子液体的循环利用

离子液体的优点之一在于它的蒸汽压低、挥发少而对环境友好, 且可以回收并进行反复利用. 在优化条件下反应 24 h 后, 将酶滤出, 在滤液中加入 3.0 mL 正己烷萃取, 分液, 取下层离子液体, 再用正己烷洗涤两次, 真空干燥后考察其重复利用性. 实验表明, 离子液体 [DiBIM][PF<sub>6</sub>] 重复使用 10 次后反应转化率都没有明显减少, 显示了良好的回收利用性能.

## 3 结论

与常用离子液体 1-正丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐和有机溶剂正己烷相比, 离子液体 1,3-二异丁基咪唑六氟磷酸盐具有优异的亲生物性, 可应用于非水生物催化反应. 实验表明, 除憎水性和亲核性以外, 离子液体中的阳离子空间构型也是影响酶行为的一个重要因素, 这可为设计新的离子液体提供理论指导.

## References

- Akoh, C. C.; Phillips, R. S.; Wu, W. H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 435.
- Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *16*, 169.
- Wang, D. L.; Nag, A.; Lee, G. C.; Shaw, J. F. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 262.
- Sheldon, R. A.; Lau, R. M.; Sorgedraeger, M. J.; Rantwijk, F. V.; Seddon, K. R. *Green Chem.* **2002**, *4*, 147.
- Yuan, Y.; Bai, S.; Sun, Y. *Food Chem.* **2006**, *97*, 324.
- Shah, S.; Gupta, M. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 921.
- Tsukada, Y.; Iwamoto, K.; Furutani, H.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Matsumoto, K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1801.
- Wu, H.-P.; Fang, Y.; Wan, H.-D.; Xia, Y.-M. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 823 (in Chinese). (吴红平, 方云, 万会达, 夏咏梅, 化学学报, **2008**, *66*, 823.)
- Shan, H.-X.; Li, Z.-J.; Li, M.; Ren, G.-X.; Fang, Y.-J. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 886.
- Xu, J.-H.; Zhu, J.; Takuo, K.; Atsuo, T.; Hu, Y. *Chin. J. Biotechnol.* **1997**, *13*, 387 (in Chinese). (许建和, 朱洁, 川本卓男, 田中渥夫, 胡英, 生物工程学报, **1997**, *13*, 387.)
- Morrow, T. I.; Maginn, E. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12807.
- Dzyuba, S. V.; Bartsch, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4657.
- Law, G.; Watson, P. R. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *345*, 1.
- Miskolczi, Z.; Sebok-Nagy, K.; Biczok, L.; Gokturk, S.

- Chem. Phys. Lett.* **2004**, *400*, 296.
- 15 Huddleston, J. G.; Visser, A. E.; Reichert, W. M.; Willauer, H. D.; Broker, G. A.; Rogers, R. D. *Green Chem.* **2001**, *3*, 156.
- 16 Baker, S. N.; McCleskey, M.; Pandey, S.; Baker, G. A. *Chem. Commun.* **2004**, *4*, 940.
- 17 De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 916.
- 18 De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1457.

(A0809284 Cheng, F.)