

文章编号:1004-1478(2011)05-0070-05

酶在离子液体中的催化反应研究综述

马歌丽, 韩甜甜, 毛多斌

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要:综述了脂肪酶、蛋白酶、氧化还原酶、纤维素酶和糖苷酶在离子液体中的催化反应特性:与有机溶剂中的酶反应相比,在离子液体中大多数酶表现出较高的催化活性、稳定性和选择性,也能提高产物产率,且离子液体可循环使用.指出,今后应着力于研究离子液体中生物催化反应的机理、离子液体的结构与性质之间的关系、离子液体与酶的相互关系、酶在离子液体中的反应特征及特性变化等.

关键词:酶;离子液体;生物催化

中图分类号:Q55;TQ032

文献标志码:A

Research review of enzyme catalysis in ionic liquid

MA Ge-li, HAN Tian-tian, MAO Duo-bin

(College of Food and Bioeng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The catalytic reaction characteristics of different lipase, protease, oxidoreductase, cellulase and glycosidase in ionic liquid were reviewed. Compared with the organic solvent in the enzyme reaction, the majority of enzymes in ionic liquids show high catalytic activity, stability and selectivity, but also can improve the yield and recycle the ionic liquid. The focuses of future research are: the biocatalysis reaction mechanism in ionic liquid, the relationship between structure and properties of ionic liquid, the relationship between ionic liquid and enzyme, the enzyme reaction characteristics and properties changes in ionic liquid.

Key words: enzyme; ionic liquid; biocatalysis

0 引言

酶作为生物催化剂,具有催化效率高、专一性强、作用条件温和等特点.在生物催化反应的发展过程中,反应介质由水介质扩展到有机溶剂体系、反胶束体系、超临界体系等,但传统的有机溶剂通常会限制酶的活性和选择性,且有机溶剂易挥发和造成污染,因此一种绿色替代品超临界 CO₂ 被广泛用作酶催化反应的介质^[1].近年来,一种新型的绿

色化学溶剂——离子液体(ionic liquid)引起了人们的广泛关注.离子液体是由有机阳离子和无机或有机阴离子构成的、在 100 °C 以下呈液体状态的盐类.与普通有机溶剂相比,离子液体具有以下优点:离子液体不会挥发,对环境友好,用于工业生产相对比较安全;通过阴阳离子的设计可调节其对物质的溶解性;离子液体与一些有机溶剂互不相溶,可以形成有机溶剂-离子液体两相系统或者有机溶剂-水-离子液体三相系统.

收稿日期:2011-08-03

基金项目:国家自然科学基金项目(20676127)

作者简介:马歌丽(1963—),女,河南省漯河市人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为生物工程.

一般而言,离子液体以3种形式应用于生物催化过程:作为纯溶剂,在水相系统中作为共溶剂,在两相系统中作为共溶剂.在生物催化中所用的离子液体的阳离子主要是咪唑阳离子和吡啶阳离子,所用的阴离子主要是非配位性的氟硼酸根(BF_4^-)、氟磷酸根(PF_6^-)、三氟甲磺酸根(CF_3SO_3^-)、双三氟甲烷磺酰亚胺($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 或 TF_2N^-)等.这些阴阳离子所组成的离子液体如1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$)和1-丁基-3-甲基咪唑三氟甲磺酰亚胺盐($[\text{BMIM}](\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$)常作为纯溶剂或两相体系共溶剂,1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$)和1-丁基-3-甲基咪唑硫酸甲酯盐($[\text{BMIM}][\text{MeSO}_4]$)可用作水相共溶剂.研究发现大多数酶在离子液体中表现出较高的催化活性、稳定性和选择性.本文拟综述不同酶在离子液体中的催化反应及离子液体对酶催化性质的影响.

1 酶在离子液体中的催化反应

最早关于离子液体的研究是1984年D. K. Magnuson等^[2]在离子液体硝酸三乙基 $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ 和水的混合物中进行的实验,结果发现 $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ /水(4:1,体积比)体系对从*E. coli*中提取的碱性磷酸脂肪酶具有活化效应.从此拉开了离子液体在生物催化反应中应用研究的序幕.

1.1 脂肪酶在离子液体中的催化反应

脂肪酶是目前在离子液体中进行生物催化反应报道最多的一类酶,它可在多种离子液体中存在并催化多种类型的反应,如酯交换反应、氨解反应、水解反应和环氧化反应等.R. M. Lau等^[3]首次利用南极假丝酵母脂肪酶(*Candida antarctica* lipase B, CALB)证明了其在离子液体中进行生物催化反应的潜力,如脂肪酶催化丁酸乙酯和丁醇的酯交换反应,此反应在无水的 $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ 或 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 中进行4 h后,产率可达到81%.该结果与其在传统有机溶剂中的反应结果相似,且发现参与生物催化的酶是否固定化对反应结果影响不大.P. Lazano等^[4]用脂肪酶催化丁酸乙酯与正丁醇通过转酯反应合成丁酸丁酯,结果表明在含有2% (体积分数)水的4种离子液体($[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{EMIM}][\text{TF}_2\text{N}]$, $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$, $[\text{BMIM}][\text{TF}_2\text{N}]$)和2种有机溶剂(1-丁烷、己烷)中进行反

应时,脂肪酶在离子液体中的催化活性高于其在有机溶剂中的活性,酶的催化活性随着离子液体极性的增强而升高,而且在连续操作过程中脂肪酶具有很高的稳定性.S. J. Nara等^[5]也证实离子液体有使酶催化活性提高的作用,他们通过比较在离子液体 $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 和有机溶剂 CH_2Cl_2 中进行2-羟甲基-1,4-苯丙二氧烷与乙酸乙烯酯的酯交换反应发现,脂肪酶在疏水性离子液体 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 中的催化活性比在 CH_2Cl_2 中高,在亲水性离子液体 $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ 中脂肪酶的催化活性与在 CH_2Cl_2 中相当,若在 CH_2Cl_2 中加入 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$,随着 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 含量的增加,脂肪酶的催化活性逐渐增强,且离子液体和酶可多次循环使用,对催化活性没有显著影响.但是,S. H. Schofer等^[6]发现CALB在 $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ 和 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 中几乎没有活性,而S. Park等^[7]发现CALB能在上述2种离子液体中保持活性,离子液体制备过程中的水洗次数也会影响酶的活性.早期对*Pseudomonas*脂肪酶的研究也表明反应介质中的含水量对酶的活性有重要影响^[8].

也有一些关于离子液体中脂肪酶的立体选择性报道.S. Park等^[7]在 $[\text{MOEMIM}][\text{BF}_4]$ (1-甲氧乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐)中进行脂肪酶催化葡萄糖的区域选择性酰基化反应,产率达99%,选择性为93%,此值远远高于酶在有机溶剂中反应的数值.J. Y. Xin等^[9]在被水饱和的 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 中利用皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)脂肪酶催化萘普生甲酯立体选择性水解生产s-萘普生,与有机溶剂中的反应相比,其转化率提高6倍,立体选择性也有显著提高.S. S. Mohile等^[10]在离子液体与水的混合体系中利用*Candida rugosa*脂肪酶催化2-(4-氯-苯氧基)丙酸丁酯不对称水解,结果表明在加入疏水性的离子液体($[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 和 $[\text{HMIM}][\text{BF}_4]$)后,可以获得非常高的反应转化率,且对映体过量 ee (enantiomeric excess)值达到99%.

1.2 蛋白酶在离子液体中的催化反应

嗜热菌蛋白酶是第1个被报道的进行生物转化的酶.M. Erbedinger等^[11]在离子液体 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 中以苄氧羰基-L-天冬氨酸和L-苯丙氨酸甲酯盐酸化物为原料催化合成Z-天冬氨酰苯丙氨酸甲酯(又名阿斯巴甜),悬浮在离子液体中的蛋白酶表现出很好的稳定性,产物收率高达95%.反应后,产物可通过水洗和沉淀而分离,并且酶能在离

子液体中重复使用而不影响产率。

此后,人们对 α -胰凝乳蛋白酶在离子液体中的催化反应进行了研究。M. Eckstein等^[12]发现 α -胰凝乳蛋白酶在离子液体[EMIM][$(CF_3SO_2)_2N$]和[BMIM][$(CF_3SO_2)_2N$]中催化N-乙酰-L-苯丙氨酸乙酯和1-丁醇的酯交换反应时,蛋白酶的活性受水活度的影响。在较低水活度下,离子液体中酶的活性高于其在有机溶剂中的活性。J. A. Laszlo等^[13]研究了 α -胰凝乳蛋白酶在不同离子液体[BMIM][PF₆]和[OMIM][PF₆]中进行的酯交换反应,结果发现其催化速率和有机溶剂(乙腈或己烷)中的反应速度为同一个数量级。P. Lozano等^[14]比较了有一定量水存在的条件下,不同离子液体和1-丙醇中的酯交换转化率及酶的稳定性,虽然离子液体中酶的活性只有1-丙醇中酶活性的10%~50%,但与在1-丙醇中的酶反应相比,较高的酶稳定性使得反应结束时离子液体中的产物浓度更大、转化率更高。

枯草杆菌蛋白酶是一种胞内蛋白,可用于N-乙酰基-L-氨基酸酯的不对称催化手性水解制备相应的氨基酸,反应中经常需要加入一种有机溶剂以增强氨基酸衍生物的溶解性。以往该反应常在乙腈-水体系中进行,其缺点是耗用大量的挥发性有毒有机溶剂,造成环境污染。H. Zhao等^[15]研究发现枯草杆菌蛋白酶水解乙酰氨基酯的反应体系完全可由离子液体替代有机溶剂,当反应在离子液体-水(15/85,V/V)体系中进行时,不仅避免了挥发性有毒有机溶剂的使用,而且比乙腈-水体系中的反应表现出更高的立体选择性。

1.3 氧化还原酶在离子液体中的催化反应

2002年,G. Hinckley等^[16]首次报道了在含离子液体[4-MBP][BF₄]和[BMIM][PF₆]的体系中,漆酶、辣根过氧化物酶和大豆过氧化物酶等几种氧化酶能保持其催化活性,但随着离子液体浓度的增加,氧化酶的催化活性逐渐降低。同年,J. A. Laszlo等^[13]证实了离子液体可以作为过氧化物酶生物催化的介质,他们对离子液体和有机溶剂中用过氧化物酶催化邻甲氧基苯酚的氧化反应进行研究,发现血晶素过氧化物酶、细胞色素c过氧化物酶和微过氧化物酶在[BMIM][$(CF_3SO_2)_2N$],[BMIM][PF₆]和[OMIM][PF₆]中的活性高于在甲醇或DMSO(二甲基亚砷)中的活性。之后,C. Sanfil-

ippo等^[17]在多种亲水性离子液体/缓冲盐混合溶剂中用氯过氧化物酶催化二氢化萘不对称氧化,发现离子液体的含量对酶活性有一定的影响,当离子液体体积分数为10%时,得率最高达到43%;而当离子液体体积分数增加或减少时,得率均有所下降。此结果同有机溶剂对酶活性的影响规律基本一致。S. Sgalla等^[18]在不同浓度的[BMIM][BF₄]/缓冲盐混合溶剂中用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)催化不溶于水的4-苯基苯酚发生聚合反应,HRP在pH=9,离子液体含量为50%~75%的体系中能保持一定的活性,催化生成的二聚体纯度达85%,而在缓冲盐或有机溶剂单相体系中进行该反应时,均会生成其他多种聚合物,这表明离子液体可以减少酶催化反应中副产物的生成。

除了氧化酶外,也有一些关于还原酶在离子液体中的催化反应的报道。T. Maruyama等^[19]发现*Candida boidinii*甲酸脱氢酶在[MMIM][MeSO₄]/缓冲液混合溶剂中能保持稳定的活性。M. Eckstein等^[20]报道了脱氢还原酶在离子液体[BMIM][$(CF_3SO_2)_2N$]/缓冲液双相体系中选择性催化2-辛酮的不对称还原,其反应速度明显高于甲基叔丁基醚/缓冲液体系,转化率接近100%,对映体过量值大于99%,且酶在离子液体中有更好的稳定性。石贤爱等^[21]研究了马肝醇脱氢酶在含离子液体[BMIM][Cl]的反应介质中催化乙醇氧化的特性,发现该酶在[BMIM][Cl]含量 ≤ 0.15 g/mL的体系中的活性高于它在不含离子液体的反应介质中的活性,而离子液体含量 >0.15 g/mL时对酶活性有明显的抑制作用;[BMIM][Cl]含量 ≤ 0.1 g/mL时,离子液体能提高酶的热稳定性,含量 >0.1 g/mL时则能降低酶的热稳定性。

1.4 纤维素酶在离子液体中的催化反应

纤维素的利用是目前清洁能源研究的一个热点,可用纤维素酶降解纤维素获得还原糖,进而由还原糖发酵得到氢气和燃料乙醇。研究表明,离子液体的组成对纤维素的溶解度和酶活有很大影响。R. P. Swatoski等^[22]在2002年探讨了不同阴阳离子结构的离子液体对纤维素溶解性能的影响,这是离子液体[C₄MIM][Cl]用作纤维素溶剂的首次公开报道。2003年任强等^[23]发现离子液体1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐[AMIM][Cl]对纤维素具有较好的溶解性能。2007年卢嫚等^[24]证明了在反应体系

中加入适量的离子液体[AMIM][Cl]可以提高纤维素酶的活性.反应体系中[AMIM][Cl]的量为0.05 g时酶活最高,比对照值提高了68.3%;当体系中离子液体的量大于0.10 g时酶活开始下降,离子液体的量为0.2 g时酶活达到一个平台.这说明少量的[AMIM][Cl]可以提高纤维素酶活,而反应体系中[AMIM][Cl]用量过高则会抑制酶活.2008年N. Kamiya等^[25]探讨了在水-离子液体中纤维素酶的催化作用.当离子液体与水的比例大于3:2时,观察到纤维素酶的活性很低,但液体与水的体积比减小至1:4时酶活显著提高,有70%的纤维素转化成葡萄糖和纤维二糖.

1.5 糖苷酶在离子液体中的催化反应

糖苷酶通常用来水解糖苷键,也被用于生物体外合成碳水化合物.糖苷酶在离子液体中反应的报道较少.N. Kaftzik等^[26]用离子液体[MMIM][MeSO₄]作为溶剂,用从轮状杆菌中分离的 β -半乳糖苷酶催化乳糖和N-乙酰葡萄糖胺进行转糖基化反应合成N-乙酰乳糖胺.该反应在水相中很难进行,因为此条件下 β -半乳糖苷酶同时催化反应产物的水解,产物的竞争性二级水解限制了产率,使其不到30%;而在水相中加入体积分数为25%的[MMIM][MeSO₄],组成[MMIM][MeSO₄]/水(25/75, V/V)的体系,产物的二级水解得到有效抑制,产率增加到60%.动力学研究表明,在该体系中,不仅酶的活性不受影响,而且酶的稳定性得到改善.近来,S. Ferdjani等^[27]研究了一种 β -糖苷酶和2种 α -半乳糖苷酶在不同比例的亲水性离子液体/水体系中的活性和稳定性,发现糖苷酶在[MMIM][MeSO₄]和[TMIM][MeSO₄]中表现出最佳的活性和稳定性,且观察到在离子液体中酶的耐热性与其稳定性有密切关系,耐热酶的紧密结构可防止离子液体破坏其蛋白结构,因此在水溶性离子液体中使用耐热性高的糖苷酶进行生物催化反应是极好的.

2 结论

酶的种类和特性、离子液体的组成和性质(如极性和亲水性、配位能力、黏度等)以及水的活度等都是影响离子液体中酶催化反应的因素.离子液体作为生物催化的反应溶剂可使酶保持较高的活性和稳定性、反应选择性和较高的产物产率.这是因为离子液体可被看做一种更高级的通过氢键键合的聚合液体,具有极性和非极性2种区域的纳米结

构,因此可溶解一般有机溶剂不能溶解的底物,并且酶可进入离子液体的网中,从而避免酶直接与极性溶剂接触,失去其周围的水^[28].

离子液体已成为生物催化反应的研究热点,但是从目前的研究现状来看,离子液体的理论研究还处于初始阶段,对离子液体中生物催化反应的机理、离子液体的结构与性质之间的关系、离子液体与酶的关系、酶在离子液体中的反应特征及特性变化等还需要进行深入研究,从而开发出更多种离子液体以应用于酶催化反应,使酶在离子液体中能保持良好的催化效果且产物易分离.相信随着研究的不断深入,离子液体的种类将不断增多,其独特的溶液特性在生物催化领域会得到越来越广泛的应用.

参考文献:

- [1] Darr J A, Poliakoff M. New directions in inorganic and metal-organic coordination chemistry in supercritical fluids[J]. Chem Rev, 1999, 99(2):495.
- [2] Magnuson D K, Bodley J W, Evans D F, et al. The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate[J]. Sol Chem, 1984, 13(8):583.
- [3] Lau R M, Van Rantwijk F, Shaddon K R. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids[J]. Organ Lett, 2000, 2(2):4189.
- [4] Lazano P, Diego T, Carrie D, et al. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide[J]. Chem Commun, 2002, 43:692.
- [5] Nara S J, Harjani J R, Salunkhe M M. Lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids and organic solvents—A comprehensive study[J]. Tetrahedron Lett, 2002, 43:2979.
- [6] Schofer S H, Kaftzik N, Wasserscheid P, et al. Enzyme catalysis in ionic liquids; Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity[J]. Chem Commun, 2001(1):425.
- [7] Park S, Kazlauskas R J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio and regioselective acylations[J]. J of Organic Chem, 2001, 66(25):8395.
- [8] Itoh T, Akasaki E, Nishimura Y. Efficient lipase-catalyzed enantioselective acylation under reduced pressure conditions in an ionic liquid solvent system[J]. Chem Lett, 2002, 31(2):154.

- [9] Xin J Y, Zhao Y J, Shi Y G, et al. Lipase-catalyzed naproxen methyl ester hydrolysis in water-saturated ionic liquid; Significantly enhanced enantioselectivity and stability [J]. *World J of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(2):193.
- [10] Mohile S S, Potdar M K, Harjani J R, et al. Efficient additives for *Candida rugosa* lipase-catalysed enantioselective hydrolysis of buty 1-2-(4-chlorophenoxy) propionate [J]. *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 30(5/6):185.
- [11] Erbeltinger M, Mesiano A J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid—An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents [J]. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(6):1129.
- [12] Eckstein M, Sesing M, Kragl U. At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in nonionic organic solvents [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(11):867.
- [13] Laszlo J A, Compton D L. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids [J]. *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 18(1):109.
- [14] Lozano P, Diego T, Guegan J P, et al. Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 75(5):563.
- [15] Zhao H, Malhotra S V. Enzymatic resolution of amino acid ester using ionic liquid N-ethyl pyridinium trifluoroacetate [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(15):1257.
- [16] Hinckley G, Mozhaev V V, Budde C, et al. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(24):2083.
- [17] Sanfilippo C, D'Antona N, Nicolosi G. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is active in the presence of an ionic liquid as co-solvent [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(23):1815.
- [18] Sgalla S, Fabrizi G, Cacchi S, et al. Horseradish peroxidase in ionic liquids reactions with water insoluble phenolic substrates [J]. *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 44(3):144.
- [19] Maruyama T, Nagasawa S, Goto M. Poly (ethylene glycol) lipase complex that is catalytically active for alcoholysis reactions in ionic liquids [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24:1341.
- [20] Eckstein M, Filho M V, Liese A, et al. Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction [J]. *Chem Commun*, 2004(9):1084.
- [21] 石贤爱, 宗敏华, 孟春, 等. 含离子液体 [BMMIM]Cl 的反应介质中马肝醇脱氢酶的催化特性 [J]. *催化学报*, 2005, 26(11):982.
- [22] Swatloski R P, Spear S K, Holbrey J D, et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids [J]. *J of the American Chem Soc*, 2002, 124(18):4974.
- [23] 任强, 武进, 张军, 等. 1-烯丙基-3-甲基咪唑室温离子液体的合成及其对纤维素溶解性能的初步研究 [J]. *高分子学报*, 2003(3):448.
- [24] 卢嫒, 胡萍, 余少文, 等. 纤维素的新型溶剂 [J]. *东北林业大学学报*, 2007, 35(10):76.
- [25] Kamiya N, Matsushita Y, Hanaki M, et al. Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(6):1037.
- [26] Kaftzik N, Wasserscheid P, Kragl U. Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the β -galactosidase catalysed synthesis of N-acetyllactosamine [J]. *Org Process Res Dev*, 2002, 6(4):553.
- [27] Ferdjani S, Ionita M, Roy B, et al. Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(6):1215.
- [28] Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N. Enzyme catalysis in ionic liquids [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(6):565.