

离子液体中固定化光合细菌催化不对称还原反应的研究

王梦亮¹⁾, 崔丙健

(山西大学 应用化学研究所, 山西 太原 030006)

摘 要: 采用苯乙酮为模式底物, 选用了3种典型的离子液体作为反应介质系统研究了离子液体与缓冲液构成的均相及两相体系中固定化光合细菌催化不对称还原反应的特性. 通过对构建的离子液体反应体系进行条件优化, 发现与水相及有机相相比, 离子液体作为生物催化反应介质更有利于还原反应的进行, 并且离子液体及固定化细胞易回收重复利用. 研究表明, 在含15%体积分数的亲水性离子液体[EMIM][EtSO₄]/缓冲液反应体系中, 当底物苯乙酮浓度为35 mmol/L时, 在最佳的反应条件下, 催化生成的产物主要是S-苯乙醇, 产率和对映值分别达到82.7%和99.9%. 离子液体不仅提高了催化反应速率, 而且增加了固定化光合细菌的稳定性, 为反应介质和生物催化剂的循环使用提供了保证.

关 键 词: 离子液体; 固定化光合细菌; 不对称还原; 苯乙酮

中图分类号: O643.32

文献标识码: A

离子液体是由有机阳离子和无机或有机阴离子构成的、在室温或接近室温下(熔点 < 100 °C)呈液态的盐类. 作为一种极具应用前景的环境友好型溶剂被广泛应用于生物催化反应中. 其具有蒸汽压趋于零, 不可燃, 液态范围宽, 具有较宽的电化学窗口, 对大量的有机和无机物有较好的溶解能力等特性, 并且可以通过改变阴阳离子的种类来改变其性质, 因此也被称为“可设计型溶剂”^[1-3]. 作为备受大家关注的一类绿色溶剂, 离子液体具有很高的热稳定性和化学稳定性, 因此近年来其成为水和传统有机溶剂的替代介质被广泛应用于生物催化反应中.

全细胞生物催化制备对映纯化合物, 就是利用微生物、藻类和动植物细胞内的酶系及代谢途径将潜手性化合物转化为手性化合物的过程. 目前大多数的反应过程选择在传统的有机溶剂和水相中进行, 但大部分有机溶剂和底物对生物催化剂的毒性以及底物和产物的溶解性是催化反应产率不高的主要障碍. 而使用生物相容性好的离子液体来替代有机溶剂成为一种新的选择^[4], 将离子液体/缓冲液体系应用于生物催化, 可以克服底物或产物在水相中溶解度低、不稳定、反应物对催化反应产生抑制等缺点, 比传统的有机溶剂/水两相体系更具有优

势^[5]. Joshua Howarth 等利用固定化酵母细胞在离子液体[BMIM][PF₆]/水(V/V = 10: 1)两相体系中催化各种酮类的还原反应, 添加共底物甲醇, 所得的产率和对映值分别为75%和95%. 在离子液体/水两相体系中使用体内辅酶再生的重组大肠杆菌进行的全细胞不对称生物转化反应. 通过几种不同离子液体的比较发现[BMIM][PF₆]和[BMIM][NTF]有相似的作用方式, 分别应用于4-氯苯乙醇、S-4-氯-3-羟基丁酸乙酯以及S-氯苯乙醇的合成. 与水相体系相比产率提高了13倍, ee值达到99.7%.

我们使用的是实验室前期筛选出的一株能进行不产氧光合作用的光合细菌, 它能够在不添加任何共底物的情况下直接利用光能进行光电子传递实现细胞内辅酶体系的再生, 克服了其他生物催化剂的不足之处, 因此在制备重要手性中间体方面具有重要的开发和研究价值. 我们以苯乙酮作为模式底物, 系统探讨了在离子液体构建的反应介质体系中利用光合细菌作为生物催化剂进行不对称还原反应的机理.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 类球红杆菌(Rhodobacter spha-

收稿日期: 2011-08-25; 修回日期: 2011-10-11.

基金项目: 山西省催化技术平台建设(2008091001).

作者简介: 崔丙健, 男, 生于1985年, 硕士. Tel: 15135133549 E-mail: ayangchj@yahoo.com.cn.

1) 通讯联系人, Tel: 0351-7016101 E-mail: mlwang@sxu.edu.cn..

eroides) 为本实验室保存菌种。

1.1.2 试剂 R-苯乙醇、S-苯乙醇, 购自 ACROS ORGANICS 公司; [BMIM][PF₆], [BMIM][BF₄], [EMIM][EtSO₄] (购自中科院兰州化学物理研究所); 苯乙酮、正己烷、正庚烷、正辛烷、十二烷、二甲基亚砜(DMSO)、聚乙烯醇(PVA)、海藻酸钠(SA)及其它均为国产分析纯化学试剂。

1.1.3 仪器 GC-7900 气相色谱仪(上海天美科学仪器公司), GP CHIRASIL-DEX 手性柱(25 m × 0.25 mm × 0.25 μm), D-7900 工作站, FID 氢火焰离子检测器, 20 mL 医用注射器, 磁力搅拌器, 微量进样器, 高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司), 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.1.4 类球红杆菌的培养 类球红杆菌(Rhodobacter sphaeroides)培养基: KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.6 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, NaCl 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.05 g, 酵母浸膏 0.1 g, 苹果酸 4 g, 微量元素生长因子溶液 2 mL, 加水至 1000 mL 并调节 pH 至 7.0。

微量元素生长因子: EDTA-2Na 2000 mg, FeSO₄ · 2H₂O 2000 mg, H₃BO₃ 100 mg, CoCl₂ · 6H₂O 100 mg, ZnCl₂ 100 mg, MnCl₂ · 4H₂O 100 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 20 mg, NiCl₂ · 6H₂O 20 mg, CuCl₂ · 2H₂O 10 mg, Na₂SeO₃ 1 mg, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却至室温后, 将对数期的菌体接入装有 500 mL 液体培养基的葡萄糖瓶中并充满氮气, 在 30 °C 光照条件下厌氧培养 7 ~ 10 d。

1.2 方法

1.2.1 菌体收集预处理 将培养 7 ~ 10 d 的光合细菌在 4000 × g 条件下离心 25 min 收集菌体, 无菌水洗涤两次, 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 类球红杆菌的固定化 将收集到的湿菌体称重, 加入一定体积的蒸馏水制成质量分数为 20% 的菌悬液, 然后与等体积的经过灭菌冷却至室温的聚乙烯醇(PVA): 海藻酸钠(SA) (5: 1) 溶液混合均匀, 混合液用医用注射器于 10 cm 处滴加到 20 g/L CaCl₂ 溶液中。然后在磁力搅拌器上搅拌持续固定 4 h 后, 用蒸馏水洗涤 3 次, 得到直径约为 3 ~ 4 mm 的固定化生物催化剂, 转入生理盐水中 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 离子液体/缓冲液体系中苯乙酮的不对称还原反应 选用两种中性离子液体: 疏水性的

[BMIM][PF₆] 和亲水性的 [BMIM][BF₄], 一种弱酸性的离子液体: 亲水性的 [EMIM][EtSO₄] 分别与缓冲液构建不同的反应体系

1.2.3.1 离子液体/缓冲液单相体系 选用两种亲水性的离子液体 [BMIM][BF₄] 和 [EMIM][EtSO₄] 分别与缓冲液构成催化反应体系, 在 50 mL 具塞三角瓶中构建 10 mL 反应体系, 取 4 g 固定化细胞加入到含有一定体积分数离子液体的 50 mmol/L pH 值为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液构成单相反应体系, 加入底物苯乙酮, 充满氮气, 盖上瓶塞, 140 r/min, 35 °C, 以白炽灯为光源, 光照反应 72 h。反应结束后离心(8 000 r/min, 10 min), 取上清液 2 mL, 用 2 mL 乙醚萃取两次, 合并萃取液, 采用 GC7900 气相色谱仪进行检测。

1.2.3.2 离子液体/缓冲液两相体系 选用疏水性离子液体 [BMIM][PF₆] 与缓冲液构成催化反应体系, 取 4 g 固定化细胞加入到含有一定体积分数离子液体的 50 mmol/L pH 值为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 然后加入底物苯乙酮, 充满氮气, 盖上瓶塞, 160 r/min, 35 °C, 以白炽灯为光源, 光照反应 48 h。反应结束后离心(8000 r/min, 10 min), 取上清液 2 mL, 用 2 mL 乙醚萃取两次, 合并萃取液, 采用 GC7900 气相色谱仪进行检测。

1.2.4 光合细菌的生物相容性 1.2.4.1 菌体代谢活力保留值的测定^[6] 光合细菌主要是通过利用苹果酸作为碳源物质进行代谢活动, 因此我们定义光合细菌的代谢活力保留值(R) 为一定量的细胞在有机溶剂或离子液体中浸泡 24 h 后, 在 4 h 内消耗的苹果酸量, 同时以水相中的耗酸量作为对照, 通过 $R = R_1/R_0 \times 100\%$ 计算公式来考察细胞的溶剂耐受性。式中, R₁ 和 R₀ 分别为在有机溶剂(或离子液体) 和水相中浸泡 24 h 后的菌体在 4 h 内消耗的苹果酸量。R 值越大, 表明细胞对溶剂的耐受性越好。

将 4 g 固定化光合细菌加入到体积比为 1: 1 的水/有机溶剂(或离子液体) 介质体系中, 在 30 °C 和转速 140 r/min 的条件下浸泡 24 h, 分别考察光合细菌在选用的有机溶剂及离子液体中的溶剂耐受性。

1.2.4.2 光合细菌细胞干重的测定^[7] 在 9 个含有接种量为 5 % 的 100 mL 光合细菌培养基具塞三角瓶中, 分别加入 1 mL 的有机溶剂和离子液体, 以未添加任何溶剂的水相体系作为对照。充满氮

气, 30 ℃, 140 r/min 条件下进行光照培养 7 d. 取样 10 mL, 4000 × g 离心 15 min 去除上清液, 菌体以去离子水洗涤三次, 80 ℃ 烘干至恒重, 即为测定的细胞干重, 以 DCW g/L 计, 这一指标被普遍用于衡量细胞的生长情况.

1.2.5 离子液体与光合细菌的循环试验 在预定条件下进行第一次的生物转化反应. 反应结束后, 在反应期间混合相形成乳状液, 通过 4000 × g 离心 10min 将离子液体/缓冲液, 固定化细胞各个组分完全分离. 用乙醚洗涤固定化细胞及反应液, 再使用蒸馏水将细胞充分洗涤, 反应液通过旋转蒸发去除杂质溶剂. 蒸馏结束后, 纯化的离子液体在接下来的生物转化反应中被重新使用. 离子液体的重复使用必须满足生物催化剂活性和稳定性的需要, 在新的转化反应中要保证两相间的体积比不变, 加入新的底物进行循环反应^[15].

循环试验的反应条件: 10mL 含离子液体的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值 7.5), 35mmol/L 苯乙酮, 充满氮气, 盖上瓶塞, 160 r/min, 35 ℃, 每批次光照反应 48 h.

1.2.6 气相色谱分析 采用天美气相色谱仪 GC7900, FID 检测器, CP CHIRASIL-DEX 手性柱 (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 对样品进行分析. 分析条件为进样器温度 280 ℃, 柱箱温度 100 ℃, 检测器温度 300 ℃, 载气为氮气, 流速为 2.5 mL/min, 进样量为 3 μl, 分流比 1: 50. 在该条件下, 苯乙酮、R-苯乙醇和 S-苯乙醇的保留时间分别为 3.521 min、5.942 min 和 6.204 min. 误差范围 ± 5% .

底物转化率定义为 $X = [(C_0 - C)/C_0] \times 100\%$, 式中 C_0 和 C 分别为反应起始和结束后底物的浓度. 利用面积归一法计算产率及 ee 值: 产率定义为 $Y = m_p M_s / (m_s M_p)$, 式中 m_s 和 m_p 分别代表反应初始时底物和产物的质量, M_p 和 M_s 分别代表产物苯乙醇和底物苯乙酮的分子量.

产物的对映体过量值定义为: $ee = (C_S - C_R) / (C_S + C_R) \times 100\%$, 其中 C_S 和 C_R 分别为 S 型产物和 R 型产物的浓度.

2 结果与分析

2.1 细胞的生物相容性

通过溶剂相毒性来考察生物相容性. 首先在 3 种离子液体及六种有机溶剂中考察这些溶剂对光合

细菌细胞的毒性. 光合细菌细胞在这些溶剂中培养 24 h 后的代谢活力保留值如图 1 所示, 不同的离子

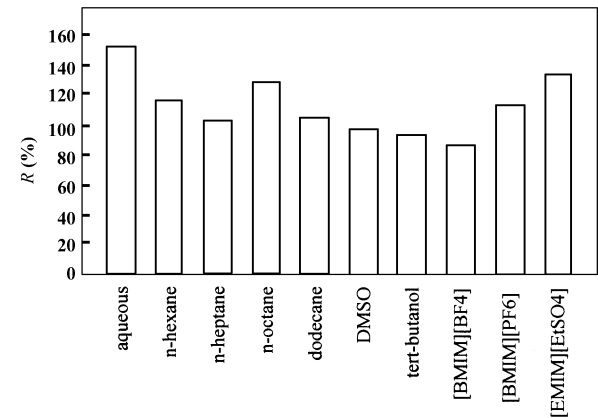


图 1 不同溶剂中光合细菌的代谢活力保留值

Fig.1 Metabolic activity retention (R) of photosynthetic bacteria in different solvents

Reaction conditions: 4 g immobilized photosynthetic bacteria, solvent: Tris-HCl buffer (50mmol/L, pH 7.5) (V/V, 1: 1), 30 ℃, 140 r/m, 24 h

液体和有机溶剂对光合细菌的代谢活力保留值结果各不相同. 疏水性的 [BMIM][PF₆] 和亲水性的 [EMIM][EtSO₄] 表现出良好的生物相容性, 亲水性的 [BMIM][BF₄] 则表现出较差的生物相容性. 研究发现使用传统的离子液体产率和酶活性降低, 可能是咪唑环的小烷基基团和传统离子液体相对高的极性, 导致差的生物相容性^[8]. 几种有机溶剂表现出的生物相容性与其 logP 值呈正相关.

我们选择离子液体 [BMIM][PF₆]、[BMIM][BF₄]、[EMIM][EtSO₄], 有机溶剂正己烷、正庚烷、正辛烷、十二烷、DMSO 和叔丁醇在光合细菌培养期加入, 考察它们对光合细菌生物活性的影响. 如表 1 所示, 根据培养后的菌体细胞干重, 我们可以看出, 离子液体 [EMIM][EtSO₄] 和有机溶剂正辛烷、正己烷和 DMSO 对细胞生长活性影响较小, [BMIM][BF₄] 可能是由于它的亲水性剥夺了酶表面的水分, 造成了酶活性中心构象的改变.

2.2 不同反应体系中光合细菌催化的不对称还原反应

一般的生物催化反应通常在水相及一些非极性有机溶剂(烷烃类)中进行, 容易造成产物回收困难和生物催化剂活性不高等问题, 离子液体的使用打破了这一局限. 据报道, 多种有机化合物在离子液体中有较好的溶解能力, 特别是芳香族化合物在离

表 1 不同溶剂中光合细菌细胞干重的测定

Table 1 The determination of cell dry weight (CDW) in different solvents

Solvent	CDW [g/L]					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
H ₂ O	0.28	0.83	1.17	1.54	1.56	1.76
<i>n</i> -hexane	0.07	0.13	0.33	0.84	1.13	1.34
<i>n</i> -heptane	0.07	0.11	0.24	0.88	1.02	1.27
<i>n</i> -octane	0.09	0.35	0.48	0.95	1.38	1.52
dodecane	0.06	0.15	0.34	0.56	0.71	0.83
[BMIM][BF ₄]	0.03	0.08	0.12	0.27	0.37	0.42
[EMIM][EtSO ₄]	0.08	0.38	0.52	1.26	1.48	1.51
[BMIM][PF ₆]	0.05	0.14	0.27	0.52	0.63	0.74
DMSO	0.07	0.22	0.4	0.83	1.17	1.38
<i>tert</i> -butanol	0.06	0.23	0.42	0.92	0.97	1.12

子液体中有相对较高的溶解度,这可能是通过苯环上的基团与离子液体阳离子间的相互作用造成的. 选用离子液体与缓冲液构建的反应体系底物能够很好的分散在两相中,离子液体作为第二相在缓冲液中形成乳状液,起着溶剂和助溶剂的作用,使催化

剂和底物能够充分接触,最大限度的提高转化效率. 实验分别用离子液体和有机溶剂与缓冲液构建的反应体系和缓冲液单相体系进行固定化光合细菌生物催化不对称还原反应的研究.

由表 2 可以看出,离子液体[EMIM][EtSO₄]与

表 2 不同介质体系对光合细菌催化不对称还原反应的影响

Table 2 Effect of different media on asymmetric reduced reaction catalyzed by photosynthetic bacteria

Medium	Reaction conditions					
	pH	Temperature (°C)	Substrate concentration (mmol · L ⁻¹)	Time (h)	Yield (%)	ee (%)
[EMIM][EtSO ₄]/Buffer	7.5	35	35	48	82.7	>99
[BMIM][PF ₆]/Buffer	7.5	35	35	48	—	—
[BMIM][BF ₄]/Buffer	7.5	35	35	48	—	—
Hexane/Buffer	7.2	30	40	72	35	92.6
Octane/Buffer	7.2	30	40	72	50.5	97.2
DMSO/Buffer	7.2	30	25	72	34.2	93.5
Buffer	7.2	30	20	72	56.8	95.8

缓冲液构建的反应体系中获得产率和 ee 值明显高于有机溶剂-缓冲液体系与缓冲液单相体系. 原因可能在于离子液体与细胞相互接触改变了膜表面电位差,使底物顺利通过细胞膜与胞内酶活性中心充分接触. 同时离子液体作为一种由氢键键合的聚合液体,具有极性和非极性两种纳米结构,避免了酶与溶剂直接接触造成的周围水环境缺失,活化了 S-构型酶的中心构象从而提高了产率和 ee 值.

另外两种离子液体[BMIM][PF₆]与[BMIM][BF₄]无反应现象发生. 离子液体具有烷基链效应,随着烷基链长度的增加,离子液体亲脂性增加,导致其对细胞膜的通透性变大,进而影响了细胞活性. 从生物相容性来说,离子液体[BMIM][BF₄]对细胞毒性较大,这是因为[BF₄]⁻阴离子发

生水解作用致使 F 离子的出现,导致了其对毒性的增加^[9]. 而[BMIM][PF₆]则对细胞活性影响不大,但细胞却未表现出生物催化活性. 可能是因为光合细菌被离子液体与缓冲液形成的乳状液包裹,在底物进出细胞内的通道形成了屏障,致使交换能力减弱. 底物被胞内两种构型的氧化还原酶作用时,两种对映体具有相似的自由能导致了无效的手性识别.

2.3 不同体积分数的离子液体对光合细菌催化不对称还原反应的影响

在离子液体与缓冲液构成的两相体系中,相体积比影响相界面面积从而影响催化反应的速率,在此考察不同体积分数的离子液体在转化率、产物产率和对映体过量值方面的变化规律. 在 10 mL Tris-

HCl 缓冲液反应体系中，分别按以下比例添加离子液体 [EMIM][EtSO₄]：5%、10%、15%、20%、25%、30%。

如图 2 所示，随着离子液体体积分数的增加，

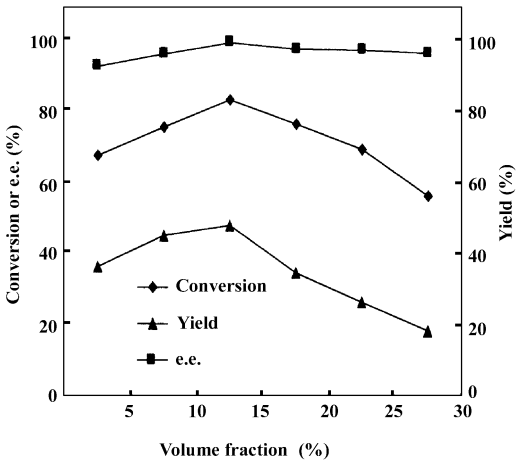


图 2 不同体积分数对光合细菌催化不对称还原反应的影响
Fig. 2 Effect of different volume fraction on asymmetric reduced reaction catalyzed by photosynthetic bacteria

反应的转化率先增后降，离子液体体积分数在 10%~15% 范围产率基本不变。说明尽管离子液体与传统有机溶剂相比较有较好的生物相容性，但其浓度过大或过小对两相体系中的生物转化均不利^[10]，这是由于随着水分含量的减少增加了离子液体与光合细菌细胞的接触，通过作用于细胞膜上的磷脂双分子层，增加了膜的通透性^[11]，过高浓度的离子液体与胞内酶系接触相互作用，导致部分酶的失活。最终转化率会随着相比的增加而降低，当反应体系中离子液体含量为 15% 时转化率达到最大。但反应体系中离子液体含量的改变对产物的对映体过量值并没有太大的影响。

2.4 底物浓度对离子液体中不对称还原反应的影响

反应体系中底物浓度的大小直接影响生物催化剂的反应速率和反应的立体选择性。在生物催化反应体系中控制底物浓度的原因有两个^[12]：第一，底物量达到一定浓度时，会对生物催化剂产生毒性或者抑制作用等负面影响，因此将底物量控制在一定临界浓度以下是必须的；第二，在大量的实验中观察到生物催化反应中底物浓度与产物的对映体选择性呈负相关。因此，通过控制底物在生物催化反应中的溶解度，可以控制对映体过量值和总的产率。

在含 15% 体积分数的离子液体 [EMIM][EtSO₄]/缓冲液体系中，利用光合细菌全细胞转化底

物苯乙酮生成苯乙醇能力明显增加，结果见图 3 所示，当底物浓度为 35 mmol/L 时，产物主要是 S 构

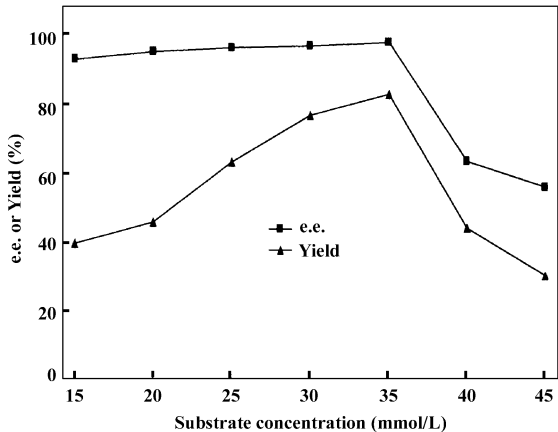


图 3 不同底物浓度对不对称还原反应的影响
Fig. 3 Effect of different substrate concentration on asymmetric reduced reaction

型，底物的产率和对映体过量值达到最大分别为 82.7% 和 97.6%。随着底物浓度的增加，通透过细胞膜的底物与胞内酶系形成中间复合物，反应速率增加，当酶被底物饱和后，由于没有多余的酶，底物浓度即使再增加也不会有更多的中间复合物产生^[13]。本实验中当底物浓度大于 35 mmol/L 时，随着底物量的增加，产率和对映值显著降低，主要原因是底物分散在介质中的浓度过大，有副反应的发生，明显抑制了细胞的活性。同时在光合细菌细胞内存在的催化还原反应的 S 构型和 R 构型的酶具有不同反应动力学参数，当底物浓度过大时，催化生成产物 S 构型和 R 构型的反应速率不同，底物抑制了 S 构型酶的活性，造成了 R 构型的产物过量，S 构型的对映值降低。当考虑到最大转化率时，体系中较低的底物浓度表现出更满意的结果。因而在反应体系中选择底物浓度 35 mmol/L 较为合适。

2.5 振荡速度与温度对离子液体反应体系中不对称还原反应的影响

离子液体作为溶剂介质，为反应提供了不同于传统分子溶剂的微环境，可能改变反应机理使催化活性、稳定性更好，转化率和产率更高。但是离子液体具有比一般有机溶剂更大的黏性，这会造成生物催化剂与底物之间的传质，从而影响反应的初速度、摩尔转化率和产物的 ee 值^[14]。这一问题主要从反应过程中振荡速度和温度这两方面来解决。

振荡速度会影响底物和产物在反应体系中的扩散和分配，从而影响反应速率。增加振荡速度会使

生物催化剂和底物在反应体系中均有分散,有利于两者充分接触,提高反应速率. 在含 15% 体积分数的离子液体[EMIM][EtSO₄]/缓冲液体系中,转速在 160 r/min 时,转化率达到最大. 大于 160 r/min 时,转化率没有显著的提高.

离子液体能够增加生物催化剂的催化活性与稳定性. 随着温度的升高离子液体的黏性明显降低,转化率有所提高. 相应地,反应温度对酶促反应速率和酶活性都有影响,合适的反应温度有利于提高活化分子数,加快细胞内酶反应速度,但过高的温度会引起酶蛋白变性失活,降低有效催化剂的含量,从而减弱转化效率. 如图 4 所示当温度在 35 ℃

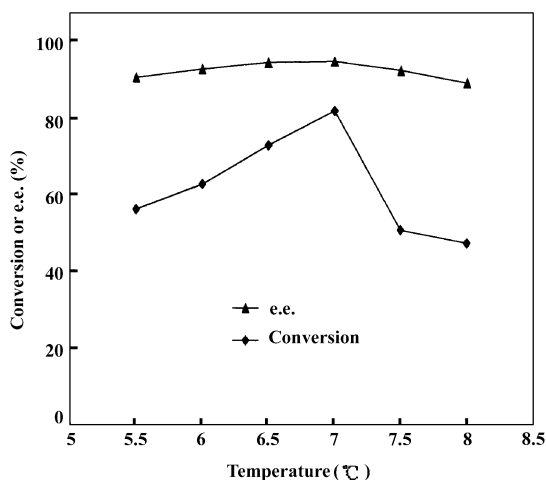


图 4 不同温度对还原反应的影响

Fig. 4 Effect of different temperature on asymmetric reaction

时,转化率达到最大,继续提高温度对反应体系中的生物催化剂体内酶系的活性会有影响,因此 35 ℃为合适的反应温度.

2.6 pH 值对离子液体反应体系中不对称还原反应的影响

任何细菌都有它生长的最适 pH 环境, pH 值是微生物生长的重要因素,影响着胞内酶系的活性和辅酶的再生. 在此选择离子液体[EMIM][EtSO₄]构建反应体系. 最佳 pH 值会随着溶剂类型的改变而变化,与反应介质中的含水量有关. 离子液体在 Tris-HCl 缓冲液中所含不同体积分数对 pH 值的影响变化不大,因此主要是调节 Tris-HCl 缓冲液的 pH 值来考察对还原反应体系的影响.

从光合细菌本身来说,反应体系的 pH 值不但影响细胞内酶的活性中心构象和稳定性,还影响底物的解离状态,如图 5 所示 pH 值变化对反应的产

率影响较大,而对产物的光学纯度影响则不明显. 产率在 pH 值为 5 时很低,但随着 pH 值的升高产率也随之增加. 当 pH 值达到 7.5 时产率达到最大值,之后 pH 值继续升高而产率逐渐降低. 这说明

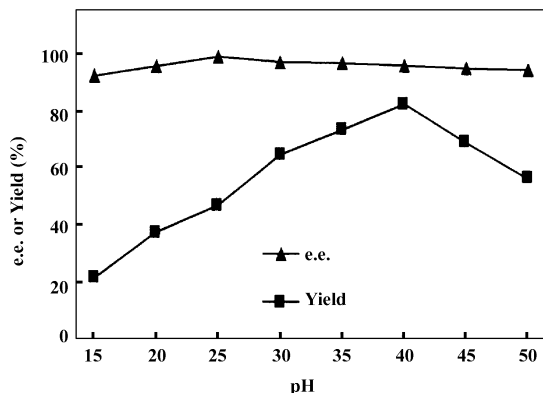


图 5 不同 pH 值对反应的影响

Fig. 5 Effect of pH on asymmetric reaction

过高或过低的 pH 值使细胞内起催化作用的酶部分失活或变性,而降低了细胞的催化活性. 同时,外界环境 pH 值的变化可能导致光合细菌为了维持细胞内原来相对稳定的微环境而引发了额外的能量消耗,影响了参与立体异构反应的辅酶量,间接导致反应效率的下降. 同样地,水相中 pH 值的改变可导致离子液体发生电离,其亲和力随着电离程度的增加而逐渐减小,这都会影响底物与产物在离子液体中的溶解度和分配比.

2.7 离子液体与生物催化剂的循环使用

离子液体的回收必须满足两个条件:第一,必须保证在循环使用过程中对涉及到的反应产率没有影响;第二,在反应过程中随着反应时间的延长离子液体没有分解成有害物质,对生物催化剂造成危害或抑制^[15].

离子液体从相中分离后通过旋转蒸发. 在 150 ℃,压力 <5 mbar 条件下,持续 6 h,该步骤由产物的回收和离子液体的纯化两部分组成. 首先,由于离子液体缺乏蒸气压,催化反应结束后,通过旋转蒸发可使反应产物与离子液体分离,实现产物的回收;其次,反应后的离子液体中只含有水、苯乙酮及苯乙醇等几种常见溶剂,因此可以通过减压蒸馏将它们清除,得到的离子液体通过干燥处理后用于新的反应体系中.

如图 6 所示,固定化光合细菌在介质中重复使用 6 次产率开始缓慢下降. 原因可能是随着离子液体多次重复利用,导致其中的杂质增加,对光合细

菌菌体的催化性能造成抑制. 这表明了离子液体作为反应介质为生物催化剂提供了不同于传统分子溶剂的环境, 使生物催化剂的活性和稳定性更好. 同时离子液体的重复使用能够有效的降低应用成本, 这也是绿色化学和清洁生产的基本要求.

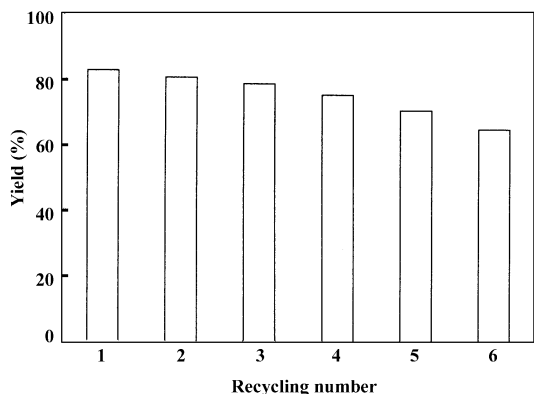


图6 离子液体反应体系的重复利用

Fig. 6 Recycling of ionic liquid reaction system

3 结 论

综上所述, 利用离子液体作为反应介质进行光合细菌生物催化不对称还原苯乙酮反应的研究, 结果表明与传统介质体系相比, 生物催化剂在离子液体中具有较高的活性、(立体、区域)选择性及稳定性. 催化苯乙酮还原反应的最适条件为: pH 值 7.5, 反应温度 35 °C, 离子液体[EMIM][EtSO₄]体积分数 15%, 底物浓度 35 mmol/L. 在此条件下, 主要生成产物为 S-苯乙醇, 底物苯乙酮的转化率为 82.7%, ee 值达到 99% 以上. 与传统的水相及有机相对比实验表明, 该体系催化反应所得产率与 e. e. 值都有相应的提高, 离子液体的存在能够有效地降低底物的抑制效应, 显示了其作为反应介质的优势. 大范围筛选适用于光合细菌催化反应的离子液体以及体系中细胞反应动力学和离子液体毒性机理的问题, 有待进一步研究探讨.

参考文献:

[1] a. Zhang Suo-jiang(张锁江), Lu Xing-mei(吕兴梅). Ionic liquids-from basic research to industrial applications (离子液体-从基础研究到工业应用) [M], Beijing: Science Press (科学出版社), 2006
b. Wei Xiao-fei(魏晓飞), Du Chuang(杜创), Wang Ren(王任), et al. *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2009, **23**(3): 273–276
c. Wang Kan(王刊), Wang Ju-fang(王菊芳). *J.*

Mol. Catal. (China) (分子催化) [J], 2009, **23**(1): 73–77
[2] a. Joshua Howarth, Paraic James, Jifeng Dai. *Tetrahedron Letters* [J], 2001, **42**: 7 517–7 519
b. Li Xue-li(李雪礼), Li Zuo-peng(李作鹏), Liu Shi-min(刘士民), et al. *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2010, **24**(6): 483–491
c. Zhang Gui-qin(张桂琴), Bi Xian-jun(毕先钧). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2010, **24**(6): 542–548
[3] a. Stefan Brautigam, Stephanie Bringer-Meyer, Dirk Weuster-Botz. *Tetrahedron: Asymmetry* [J], 2007, **18**: 1 883–1 887
b. Lu Zhi-guo(吕志果), Wang Heng-sheng(王恒生), Guo Zhen-mei(郭振美), et al. *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2010, **24**(5): 417–421
c. Zeng Jia-yu(曾家豫), Liu Xiong-xiong(刘雄雄), Kong Wei-bao(孔唯宝), et al. *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2010, **24**(4): 378–386
[4] Zhu Hai-yan(朱海燕), Lu Xian-bo(卢宪波), Tang Feng-mei(汤凤梅), et al. *Metallurgical Analysis* (冶金分析) [J], 2010, **30**(7): 24–29
[5] Gao Fei(高飞), Jia Ying-ping(贾颖萍), Cui Ying-na(崔颖娜), et al. *Huaxue Shiji* (化学试剂) [J], 2011, **33**(2): 133–137
[6] Shan Hai-xia, Lu Yang, Li Zai-jun, et al. *Chin. J. Catal.* [J], 2010, **31**: 289–294
[7] Lou Wen-yong, Zong Min-hua, Thomas J. Smith. *Green Chem.* [J], 2006, **8**: 147–155
[8] Zhang Fan(张帆), Ni Hua(倪晔), Sun Zhi-hao(孙志浩), et al. *Chinese Journal of Catalysis* (China) (催化学报) [J], 2008, **29**(6): 577–582
[9] Yuan Jing(袁静), Liu Shu-shen(刘树深), Wang Li-juan(王丽娟). *Environmental Science & Technology* (环境科学与技术) [J], 2010, **33**(12F): 46–49
[10] Huang Min(黄敏), Zong Min-hua(宗敏华). *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* (生物加工过程) [J], 2005, **3**(3): 52–57
[11] Evans K O. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [J], 2006, **274**: 11–17
[12] Pei-Yi Kim, Pollard D J, John M. Woodley. *Biotechnol Prog.* [J], 2007, **23**: 74–82
[13] Liu Xiang(刘湘), Sun Pei-dong(孙培冬), Li Ming(李明), XU Jian-he(许建和). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2002, **16**(2): 107–110
[14] Muhammad Moniruzzaman, Kazunori Nakashima, Noriho Kamiya, Masahiro Goto. *Biochemical Engineering Jour-*

nal[J], 2010, **48**(3): 295 – 314

ster-Botz. Process Biochemistry[J], 2011, **46** : 1 132

[15] Danielle Dennewald, William-Robert Pitner, DirkWeu-

– 1 137

Immobilized Photosynthetic Bacteria Asymmetric Reduction of Acetophenone in Ionic Liquid

WANG Meng-liang, Cui Bing-jian

(*Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

Abstract: Acetophenone was selected as the model substrate, and monophasic and biphasic ionic liquid/buffer reaction systems were built respectively through three typical ionic liquids. The systematic study to the reaction characteristics of immobilized photosynthetic bacteria has been investigated. Based on optimization of reaction conditions and systems, we found that the use of ionic liquids instead of conventional solvents give better results than aqueous phase and organic phase systems. Furthermore, ionic liquids and immobilized cells can be recycled. The results indicate that immobilized photosynthetic bacteria can catalyze acetophenone to product corresponding (S)-phenylethanol mainly under the optimised conditions, such as in hydrophilic ionic liquid [EMIM] [EtSO₄] with 15% volume fraction as monophasic ionic liquid/buffer reaction system. The yield and the enantiomeric excess values (ee) of (S)-phenylethanol were 82.7% and up to 99% , respectively. Ionic liquids not only enhance the catalytic reaction rate, but also increase the stability of biocatalysts. The reaction medium can be recycled and improve environmental friendliness of the systems.

Key words: ionic liquids; immobilized photosynthetic bacteria; asymmetric reduction; acetophenone