

深共熔溶剂的生物催化应用

鲁超¹, 苏二正^{1*}, 魏东芝², Alexander M. Klivanov³

(1. 南京林业大学 轻工科学与工程学院, 江苏 南京 210037; 2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;
3. 麻省理工学院 化学系, 麻省剑桥 02139)

摘要: 在绿色化学研究领域, 溶剂占据着重要的位置. 作为一个绿色溶剂必须满足廉价易得、可生物降解、无毒、可循环使用、无挥发性等标准的要求. 但是至今能满足这些要求的溶剂仍然非常有限. 近年来, 深共熔溶剂 (Deep Eutectic Solvents, DESs) 被认为可以作为绿色溶剂替代传统的有机溶剂而受到广泛关注. DESs 是由两个或多个成分在特定比例下形成的凝固点大大降低室温液态混合物. 与离子液体相比, DESs 具有廉价、低毒、可生物降解等特点, 在许多领域成为研究热点. 我们综述了 DESs 的生物降解性、毒性/细胞毒性及其作为生物催化反应介质的研究现状. 基于对研究现状的认识, 对 DESs 未来研究、应用需要解决的问题进行了讨论. 作者期望对 DESs 生物催化应用研究现状的综述更进一步促进 DESs 研究、应用的发展.

关键词: 绿色化学; 深共熔溶剂; 毒性; 生物催化

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

在过去的 30 年中, “绿色”在化学中体现了新的意义. 可持续发展和绿色化学的定义改变了化学工艺与工程的传统思维方式^[1-2]. 绿色化学的十二准则已应用到新生的绿色工程中. 在这种情况下, 必须最大限度地减少在化工生产中使用溶剂对环境的污染. 因此, 找到“绿色溶剂”代替任何种类的“非绿色溶剂”是一项重大的挑战^[3]. 新的方法是采取使用更安全、更环保的替代品. 例如, 使用从自然界容易获得的可再生资源生产的“生物溶剂”, 使用超临界二氧化碳替代挥发性有机溶剂, 以及使用没有蒸气压、没有挥发性的离子液体 (ILs)^[4].

2003 年, 英国 Leicester 大学的 Abbott 等^[5]发现氯化胆碱和尿素形成的液体具有特殊的溶剂性质, 首次提出了深共熔溶剂 (Deep eutectic solvents, DESs) 的概念. DESs 通常是由一定化学计量比的氢键受体 (hydrogen-bond acceptors, HBAs) 如氯化胆碱和氢键供体 (Hydrogen bond donors, HBDs) 如酰胺、羧酸和多元醇类化合物组合而成的低共熔混合物^[6]. 可用通式 Cat^+X^-zY 表示, Cat^+ 可为任何种类的铵、磷、硫阳离子, X^- 为 Lewis 碱, 通常为卤化物阴离子, 复合阴离子由 X^- 与 Lewis 或 Brønsted 酸 Y 构成, z 指 Y 的分子数^[7].

DESs 的制备方法简单、快速, 不需要纯化, 通

常可分两步: (1) 直接称取 HBA 和 HBD 放入烧瓶中; (2) 加热并搅拌直至形成均一的液体. 例如, 将 1 mol 的氯化胆碱 (熔点 302 °C) 与 2 mol 的尿素 (熔点 132 °C) 混合后在 80 °C 搅拌可形成 DES, 该 DES 的熔点为 12 °C, 在共熔点, 每个氯离子与两分子尿素复合^[8]. 与共熔点相对应的摩尔比随着 DES 的组成成分及其性质的变化而变化. 正确选择 HBD 和 HBA 才能形成 DES. 一般地, HBA 与 HBD 形成氢键的能力越强, 形成的 DES 凝固点越低. 目前, 文献报道的 DESs 多是以醇、酸、酰胺、胺或糖作为 HBDs, 氯化胆碱是使用最广泛的 HBA.

DESs 的物理化学性质与 ILs 极其相似, 因此也有人把它归为一类新型离子液体或离子液体类似物. 与 ILs 类似, DESs 是化学性质可调的溶剂. 通过选择不同的 HBAs 和 HBDs, 具有特定物理化学性质如凝固点、粘度、导电性、表面张力、蒸汽压、极性、酸碱性的 DESs 可以被定向合成, 从而满足不同应用的需求. 由于 DESs 的潜在应用前景, 自从其首次报道以来, DESs 日益受到科学界的关注, 特别是 2007 年以后, 大量关于 DESs 的文献得以发表, 在 ISI 网站以“Deep Eutectic Solvents”作为主题词查询可搜索到 467 篇相关论文, 论文发表数量几乎呈指数增长 (图 1), 这些论文主要集中在分离、

收稿日期: 2015-07-11; 修回日期: 2015-07-31.

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 生物反应器工程国家重点实验室开放课题.

作者简介: 鲁超, 女, 硕士生, 主要从事深共熔溶剂中的生物催化反应研究.

* 通讯联系人, E-mail: ezhsu@njfu.edu.cn.

化学、物理、材料科学和电化学领域，且主要以基础和基础研究为主。我们拟就 DESs 作为生物催化反应介质的研究情况作一综述。

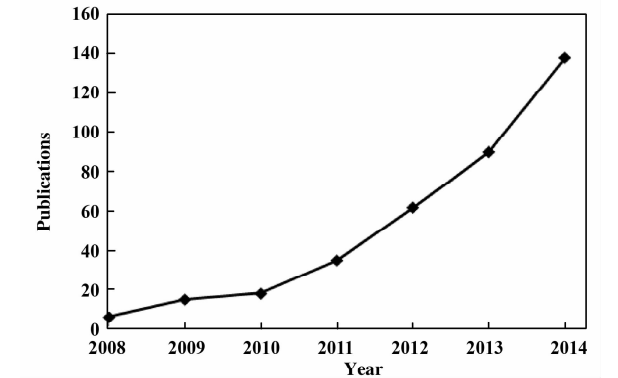


图1 过去7年来发表的深共熔溶剂 SCI 论文数
Fig. 1 Number of SCI publications about deep eutectic solvents in the past seven years

1 生物降解性与细胞毒性

作为生物催化反应的介质应该对生物催化剂酶或细胞没有毒性或毒性很低。与 ILs 相比，DESs 被提到的主要优点之一就是可以用天然的初级代谢产物合成。这个事实给人的感觉就是 DESs 的毒性应该比 ILs 低很多。国内外多个实验室对 DESs 的毒性、生物降解性进行了研究。

Hayyan 等用卤虫藻 (brine shrimp)、两个革兰氏阳性菌 *Bacillus subtilis* 和 *Staphylococcus aureus*，和

两个革兰氏阴性菌 *Escherichia coli* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 考察了不同 DESs 的毒性和细胞毒性^[9-10]。研究发现 ChCl-U、ChCl-G 和 ChCl-EG 对所测试的细菌均没有毒性。而 3 个季磷盐基 DESs 对细菌有毒性，且细胞毒性比构成 DESs 的单一成分对细菌的毒性大，因而可以将这类 DESs 用作抗菌剂。至于 DESs 对 brine shrimp 的细胞毒性，研究表明毒性与 DES 的组成、粘度以及 DES 浓度有关。

Hou 等^[11]也考察了胆碱-氨基酸 DESs 的毒性和可降解性。研究表明，这些 DESs 对乙酰胆碱酯酶的抑制作用比咪唑基离子液体如 [Bmim][BF₄] 低一个数量级。另外，这些 DESs 对试验细菌如 *Escherichia coli* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 表现出低的毒性。此外，这些 DESs 的生物降解性也被考察，结果显示所有的 DESs 都可以归为“易生物降解的”，28 d 内生物降解率达到 65% ~ 87%，侧链上具有额外的羧基或酰胺基的氨基酸制备的 DESs 更容易降解。对于所有测试的 DESs 来说，具有低毒性的 DESs 一般具有高的生物降解性。低毒性和高生物降解性使这类 DESs 可以作为环境友好溶剂用于大规模生产。

Alexandre 等按照 ISO/EN 10. 993 的标准方法测定了 11 个 DESs 和两个 ILs 的细胞毒性^[8]。试验中，细胞与 25 mg/mL 的 DES 或 IL 溶液接触后的存活率被检测。结果如图 2 所示，酒石酸的存在对细胞的代谢活动有不利影响，但是对结果的分析显示

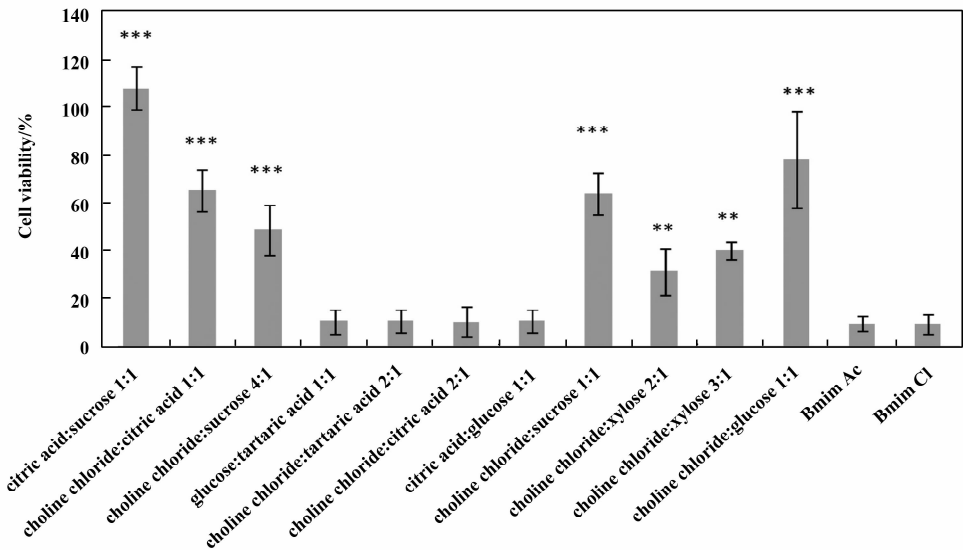


图2 11 个 DESs 和 2 个 ILs 的细胞毒性
Fig. 2 Citotoxicity studies of 11 DESs and 2 ILs.

* * denotes statistical significance at $P < 0.01$, and * * * denotes $P < 0.001$ level

DESs 成分与 DESs 的细胞毒性之间没有明确的关系. Frade 等^[12]用同样的实验方法考察了不同的磁性 ILs 的细胞毒性,发现细胞的存活率与 ILs 的浓度有关,但是总的说来,胆碱基 ILs 没有细胞毒性.

Yang 研究组^[13-14]也对 DESs 对酶活性的影响进行了考察.以 ChCl 和乙酰胆碱 (ChAc) 作为 HBAs 与 4 个 HBDs (尿素、甘油、乙酰胺、乙二醇) 在 3 个摩尔比(2 : 1, 1 : 1, 1 : 2)下制备了 24 个 DESs,然后:(1)考察这些 DESs 对辣根过氧化物酶 (HRP) 的活性、稳定性及结构的影响,结果发现,在促进 HRP 活性方面,ChCl 基 DESs 要优于 ChAc 基 DESs;具有相同 HBA 和 HBD 的 DES,其促进 HRP 的活性与浓度有关(1 : 2 < 1 : 1 < 2 : 1);荧光光谱和圆二色谱测定的 HRP 结构数据与酶活性数据吻合,DESs 可以提供更多的 α 螺旋含量和稍许松散的 3 级结构,从而促进了 HRP 的活性;所有 24 个 DESs 都可以稳定 HRP 的活性.(2)考察这些 DESs 对 *Penicillium expansum* 脂肪酶活性的影响,结果发现,DES 水溶液可以激活脂肪酶的活性,最高达到 2.4 倍,也能有效提高脂肪酶的稳定性,最高可达 18.4 倍,这种影响归因于 DES 的形成,而不是 DES 组成成分的协同作用.

2 深共熔溶剂中的生物催化反应

2.1 深共熔溶剂中脂肪酶的催化反应

脂肪酶是一种多才多艺的工业用酶,在食品、化妆品、医药、表面活性剂以及生物柴油等领域得到广泛的应用.有机溶剂以及离子液体中的脂肪酶催化已有大量的文献报道.目前为止,仅有很少的文献涉及到 DESs 体系中的脂肪酶催化.乍一看,就像其它质子溶剂一样,DESs 中强的氢键会使脂肪酶变性.此外,在脂肪酶催化酯化或转酯化反应中,构成 DESs 的 HBDs 可能参与反应,从而导致副产物的生成,进而造成 DESs 体系组成的变化^[15].但是,事实并非如此.

2008 年 Kazlauskas 实验室^[16-18]的系列研究肯定了 DESs 可以用作脂肪酶催化反应的介质.他们在 8 个 DESs 体系中考察了几个脂肪酶催化戊酸乙酯与正丁醇的转酯化反应.结果发现(表 1),游离和固定化的南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 在所有 8 个 DESs 中都表现出催化活力,在其中 5 个 DESs 中 CALB 催化底物的转化率与甲苯体系中相当.南极假丝酵母脂肪酶 A (CALA) 在所有 8 个 DESs 中也表现出催化活力,但是只有在 ChCl-G 中 CALA

表 1 脂肪酶在不同反应介质中催化活力的比较
Table 1 Comparison of the lipase-catalyzed activity in different reaction mediums

Percentage coversion of ethyl valerate to butyl valerate						Initial specific activity		
Reaction medium	iCALB	CALB	CALA	PCL	No enzyme	Reaction medium	Transesterification activity	Aminolysis activity
ChCl-Ac	23	96	0.5	0.0	0.0	Toluene	37 (100%)	46 (100%)
ChCl-EG	11	32	3.0	0.2	0.0	ChCl-G	33 (89%)	52 (113%)
ChCl-G	96	96	70	22	0.0	ChCl-U	20 (54%)	22 (48%)
ChCl-MA (1)	30	58	0.7	0.0	0.7	EtNH ₃ Cl-G	50 (135%)	ND
ChCl-U	93	99	1.6	0.8	0.0	BMIM[Tf ₂ N]	24 (65%)	11 (24%)
EtNH ₃ Cl-Ac	63	92	2.7	0.0	0.0	BMIM[BF ₄]	7 (19%)	9 (19%)
EtNH ₃ Cl-EG	23	33	20	0.0	0.0			
EtNH ₃ Cl-G	93	91	2.1	0.5	0.0			
Toluene	92	92	76	5.0	0.0			

Note: iCALB=immobilized CALB; 40mM ethyl valerate, 400mM 1-butanol and 10 mg/mL enzyme were used for transesterification reaction; 100mM ethyl valerate and 110mM 1-butylamine and 10 mg/mL iCALB were used for aminolysis reaction.

催化底物的转化率与甲苯体系相当. 洋葱假单胞菌脂肪酶(PCL)与 CALA 和 CALB 相比, 在 DESs 中的催化活力较低, 但是在 ChCl-G 中 PCL 催化底物的转化率仍然高于甲苯体系. 进一步研究发现, ChCl-G 中 CALB 催化转酯活性在 60 ℃ 长达 90 min 都不会下降, 比在 ChCl-G 组成成分尿素或氯化胆碱水溶液中的稳定性高 20 ~ 35 倍.

上述研究中使用的一些 DESs (如 ChCl-EG、ChCl-G) 中含有醇类成分乙二醇和甘油. 这些醇类化合物在脂肪酶催化转酯反应时可能与正丁醇竞争. 在含乙二醇的 DESs 中, 乙二醇单酯是主要的副产物. 如在 EtNH₃Cl-EG 中 CALB 催化产生 31% 的乙二醇单酯和 23% 的正丁醇酯, 但是乙二醇在 DES 反应体系中的浓度是正丁醇的 25 倍, 这也就是说正丁醇的反应速度是乙二醇的 3 倍或者说当乙二醇形成 DES 后其参与转酯反应的速度下降了 9 倍. 类似地, 发现甘油形成 DES 后其参与转酯反应的速度下降了 600 倍.

作者还比较了 CALB 在 DESs 和一些常用 ILs 如 BMIM[TiF_2N] 和 BMIM[BF_4] 中催化转酯的能力 (表 1). 发现 CALB 在 DESs 中催化转酯反应活性与 ILs 中相当或高于 ILs. 比如, 在 EAC:Gly 中的转酯活力是 BMIM[TiF_2N] 中的 2 倍, 是 BMIM[BF_4] 中的 7 倍.

Kazlauskas 实验室的研究还发现脂肪酶在 DESs 中也可以催化戊酸乙酯与丁胺的胺解反应 (表 1). CALB 在 ChCl:Gly 和 ChCl:U 中催化胺解的速率和反应转化率与甲苯体系相当, 比 ILs 体系要高, 如在 ChCl:Gly 中的胺解活性是 BMIM[TiF_2N] 和 BMIM[BF_4] 的 5 倍. 另外, DESs 也可以作为水相体系的共溶剂, 如向对硝基苯乙酯水解反应体系中添加 10% 的 ChCl-G 作为共溶剂, 可以提高猪肝酯酶和米根霉酯酶的催化活性 3 倍, 提高荧光假单胞菌酯酶和 CALB 的活性 25%.

2011 年, Zhao 等^[19] 也尝试以 DESs 代替有机溶剂或离子液体作为脂肪酶催化反应的介质. 以氯化胆碱和乙酰胆碱作为 HBAs, 以甘油、尿素为 HBDs, 合成了多个 DESs. 首先考察了 HBA/HBD 摩尔比对脂肪酶活性和选择性的影响, 发现脂肪酶在甘油作为 HBD 的 DESs 中随着甘油比例的下降酶活也下降. 其次考察了 CALB 在制备的 DESs 中催化模式 Miglyol 812 油脂 (主要由辛酸、癸酸构成的三酰基甘油酯混合物) 与甲醇转酯化制备生物柴油, 发现在 3 h 以内, Miglyol 812 油脂转化率最高可达 97%, 说明 DESs 可以作为脂肪酶催化生物柴油制备的绿色溶剂. 2013 年, Zhao 等^[20] 以大豆油替代 Miglyol 812 油脂作为原料, 在不同 DESs 体系中考察了不同脂肪酶催化制备生物柴油的能力. 发现 DESs 中 *i*CALB 催化大豆油与甲醇的转酯化反应活力最高, 在优化条件下, 大豆油的最高转化率达到 88%. 2013 年, Huang 等^[14] 以水黄皮籽油作为原料, 在 15 种 DESs 中考察了不同脂肪酶催化制备生物柴油的能力, 发现 *i*CALB 为最佳脂肪酶, 乙酰胆碱-甘油 (1 : 2) 为最佳 DES.

2012 年, Durand 等^[21] 考察了一些 DESs 作为脂肪酶 *i*CALB 催化月桂酸乙酯与丁醇、辛醇、十八醇醇解反应的介质. 发现 ChCl-U 和 ChCl-G 两种 DESs 中 *i*CALB 催化醇解效果最好, 相反地, 在 Et-NH₃Cl-G 中几乎没有活力. 通过系统研究, 他们发现 DESs 中脂肪酶催化醇解反应不仅依赖于亲核底物的性质, 也依赖于 DES 构成成分的性质. 一些 HBDs 能与底物反应导致副产物的生成, 进而改变了 DESs 的原始比例. 然而, 大多数 DESs 是化学惰性的, 特别适合于作为脂肪酶催化醇解反应的介质. 2013 年, Durand 等^[22-23] 进一步考察了 DESs 中脂肪酶催化具有不同极性底物之间的反应. 以 *i*CALB 催化苯酚酯的醇解反应作为模式反应 (图 3). 研究发现水分的添加极大地改善了脂肪酶的活

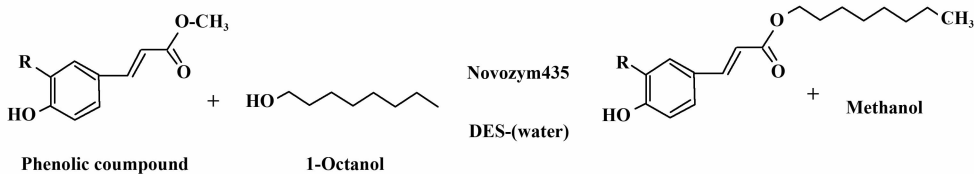


图 3 脂肪酶 *i*CALB 催化苯酚酯与正辛醇在 DES-水体系中的醇解反应

Fig. 3 *i*CALB-catalyzed alcoholysis of phenolic esters with 1-octanol in DES-water system
(R = H, methyl p-coumarate; R = OCH₃, methyl ferulate)

性及底物的反应性. 在纯的 DESs 中, 脂肪酶的活性低, 底物转化率低, 而在 DES-水二元体系中, 转化率大大提高. 纯 DESs 中脂肪酶的活力低可归因于极性底物与 DES 网络的强的作用力以及体系中非常低的水活度. 尽管向 DESs 中添加了大量的水, 但是这样的系统中脂肪酶催化水解的活性还是很低, 可能是因为 DESs 与水之间通过氢键形成了超分子复合物, 从而降低了水参与反应的能力. 因此, 对于特定的反应, 向 DESs 中添加水可能有以下好处: 大大提高脂肪酶催化的活力, 并进而提高最终的转化率; 降低体系粘度, 改善传质效果; 维

持酶的催化活性. DESs 的酸碱性主要取决于 HBD 的性质, 向 DESs 中添加水分不会导致 pH 的显著变化. Gorke^[24] 在其博士论文研究中, 也发现脂肪酶可以在 DESs 中催化一些其它反应, 如转酯化拆分反应、过氧解环氧化反应和链开聚合反应(图4). 2012 年, Borse 等^[25] 首次报道米根霉脂肪酶(ROL)在 DESs 中催化一系列二氢嘧啶-2(1*H*)-酮衍生物的合成(表2), 发现 ROL 在 DESs 中具有高的催化效率和选择性, 相比传统介质, 反应时间短、反应条件温和、产率大大提高, 而且 ROL 和 DES 可以重复使用 4 批以上.

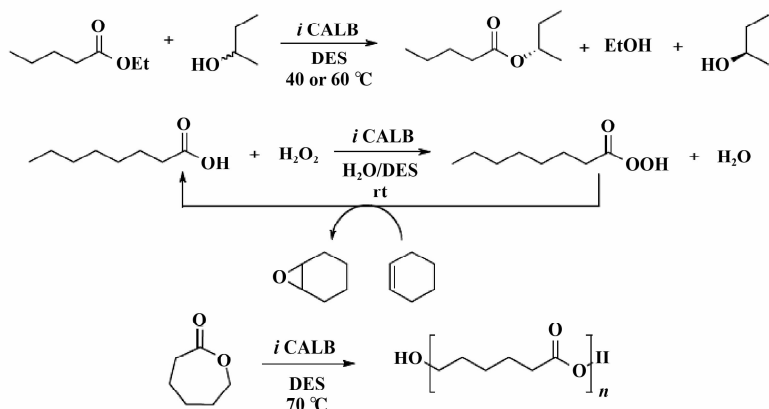


图4 *i*CALB 在 DESs 中催化仲醇的转酯拆分(上), 过氧解环氧化(中)和链开聚合反应(下)

Fig. 4 *i*CALB-catalyzed reactions in DESs. Transesterification of ethyl valerate with 2-butanol in DES (top), perhydrolysis of octanoic acid in water/DES mixtures with the simultaneous epoxidation of cyclohexene (center), and ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in DES (bottom).

2014 年, Muller 等^[26] 第一次报道了 DESs 中脂肪酶-有机催化剂的串联反应. 在 CHCl_3 中 *i*CALB 催化原位醛产生与有机催化剂催化醛-醛 C—C 键形

成相串联(图5). DESs 中的这个串联反应可以直接实现产物、催化剂的回收, 可以在温和的条件下实现多个高附加值光学砌块化合物的合成.

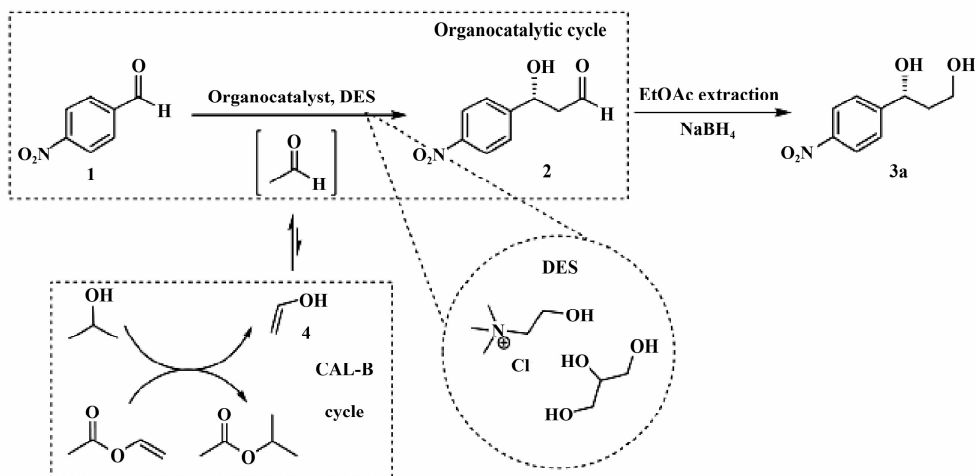


图5 脂肪酶-有机催化剂串联反应合成光学化合物

Fig. 5 Tandem lipase-organocatalyst for synthesis of optically active compounds

Table 2 Rhizopus Oryzae lipase catalyzed the synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-ones derivatives



Reaction Conditions: a. All reactions were carried out with aldehyde **1a-g** (2 mmol), AMG **2a-b** (2.1 mmol), urea/ thiourea (2.2 mmol), Lipase (5% w/w with respect to aldehyde), DES (3 mL), Temperature (55 °C); b. Isolated yields.

2.2 深共熔溶剂中蛋白酶的催化反应

最早 1994 年, Gill 和 Vulfson^[27] 考察了几个蛋白酶在底物共熔混合物(即将参与反应的底物制成 DES)中的催化行为, 发现所有试验的蛋白酶在底物共熔混合物中可以保持它们的催化活性, 这种方法可以用来合成多个生物活性寡肽, 产率可达 80% 以上.

Zhao 等^[28] (2011 年) 以氯化胆碱和乙酰胆碱作为 HBAs, 以甘油作为 HBD, 制备了不同的 DESs.

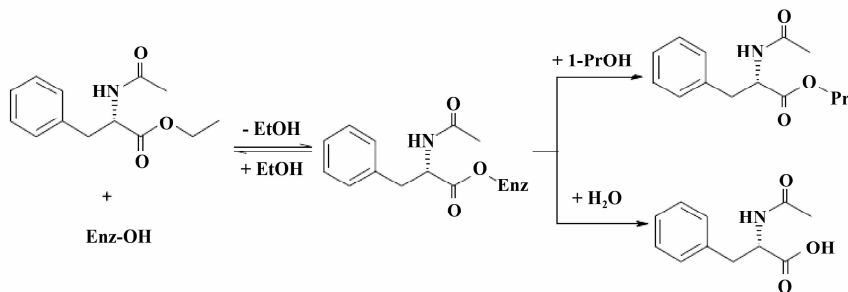


图 6 蛋白酶在含水深共熔溶剂中催化转酯、水解反应

Fig. 6 Protease-catalyzed transesterification of N-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester with 1-propanol in competition with the hydrolysis reaction

Maugeri 等^[29] (2013 年) 在深共熔溶剂中考察了 α -胰凝乳蛋白酶催化肽的合成(图 7). 在 ChCl-G 中 α -胰凝乳蛋白酶表现出高的肽合成活力, 几乎没有水解反应发生. 通过反应优化最终生产率达到 20

$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 在此体系中未固定化的蛋白酶通过简单的过滤可以重复使用多批. 该体系用于生物催化合成肽类化合物显示了诱人的前景.

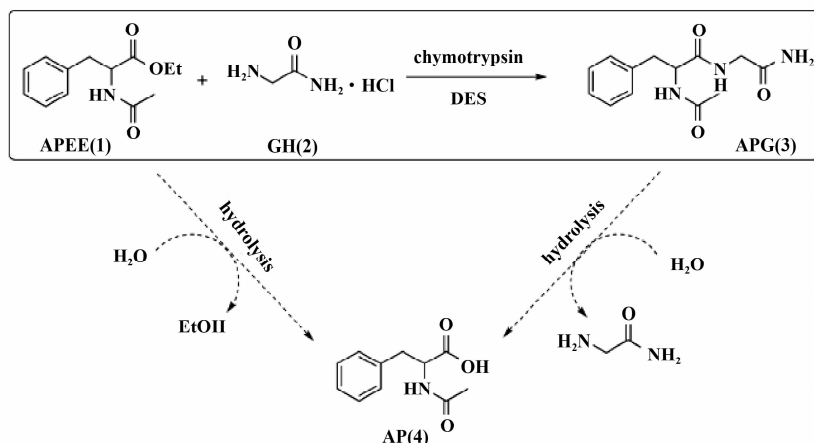


图 7 蛋白酶在深共熔溶剂中催化肽的合成

Fig. 7 Chymotrypsin-catalyzed the synthesis of peptide in DESs

2.3 深共熔溶剂中的全细胞催化的氧化还原反应

Maugeri 等^[30-31] (2014 年) 在不同的 DES-水共溶剂中考察了面包酵母催化 β -酮酯乙酰乙酸乙酯的还原反应. 面包酵母在 DES-水共溶剂中仍然保

持活力, 只是催化还原反应的能力下降. 通过改变 DES-水共溶剂中 DES 的比例, 可以实现光学选择性的完全反转(纯水中 95% ee (S), 纯 DES 中 95% ee (R)), 可能是因为一些面包酵母中的一些

S 型氧化还原酶被 DES 所抑制(图 8).

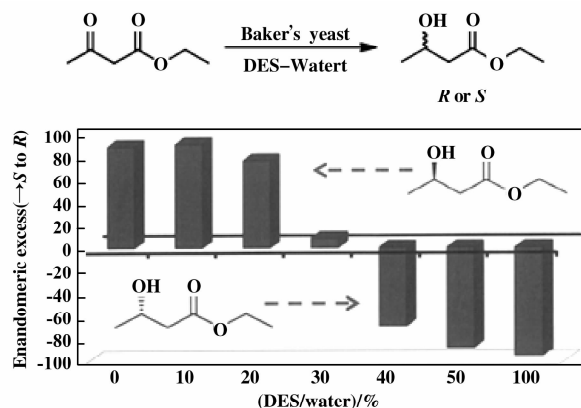


图 8 面包酵母全细胞在 DES-水体系中催化 β -酮酯乙酰乙酸乙酯的还原反应

Fig. 8 Whole-cell baker's yeast catalyzed the reduction of ethyl acetoacetate in DES-water system

2015 年, 国内华南理工大学姜文勇课题组^[32-33]连续发表两篇论文报道了 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 在 DES-水体系中催化氧化还原反应制备重要的光学化合物. 首先, 该课题组在不同 DESs-水体系中考察了 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 催化外消旋 1-(4-甲氧基苯基)乙醇 (MOPE) 不对称氧化制备 (S)-MOPE (图 9), 发现 ChCl-G 是最佳的 DES, 而且其在 DES-水体系中的

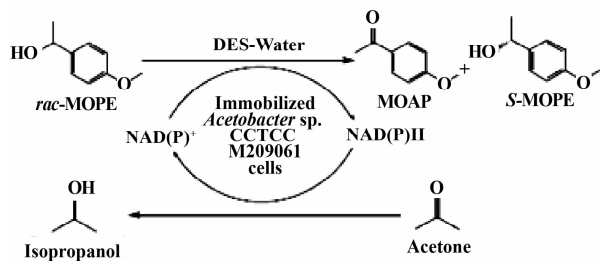


图 9 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 全细胞在 DES-水系统中催化外消旋 MOPE 不对称氧化反应

Fig. 9 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 whole cell catalyzed the asymmetric oxidation of racemic MOPE in DES-water system

浓度对反应影响很大, 最佳浓度为 10% (v/v). 与纯水相体系相比, 在 ChCl-G-水体系中, 底物 MOPE 的浓度大大提高, 而且底物的 e. e. 仍可以保持 99.9%. ChCl-G 与 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞有很好的生物相容性, 也可以改善细胞的通透性, 这些可能是 ChCl-G 提高反应效率的原因. 在这个研究的基础上, 该课题组进一步考察了用 DESs

改善 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 全细胞催化 3-氯-苯丙酮 (CPE) 不对称还原制备 (S)-3-氯-苯丙醇的可能性 ((S)-CPL) (图 10). 研究发现, 不同的 DESs 作为共溶剂对不对称还原反应的影响显著不同. ChCl-U 具有最好的生物相容性, 并且可以适度提高细胞的通透性, 因而对不对称还原反应催化效率提高最为明显. 通过反应优化, 反应 6 h 产率达到 82.3%, e. e. 值为 99.0% 以上, 生产率为 1.37 mmol/L/h. 将离子液体 $C_4MIM \cdot PF_6$ 与 ChCl-U 配合使用可以进一步将产率提高到 93.3%, 生产率提高到 1.87 mmol/L/h.

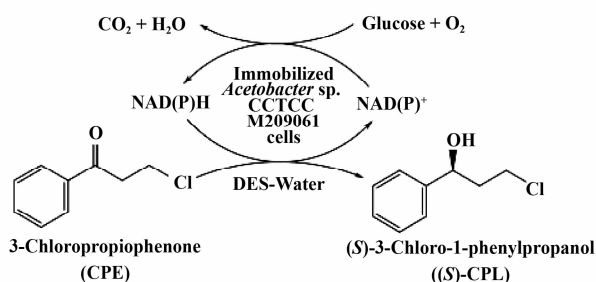


图 10 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 全细胞在 DES-水系统催化 CPE 不对称还原反应

Fig. 10 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 whole cell catalyzed the asymmetric reduction of CPE in DES-water system

2015 年, Mao 等^[34]考察了不同 DESs-水体系中 *Arthrobacter simplex* 催化醋酸可的松 (CA) 生物脱氢制备醋酸泼尼松 (PA). 在所试验的 DESs 中, ChCl-U 可以作为共溶剂改善 *Arthrobacter simplex* 催化脱氢反应的效率. 在 ChCl-U 浓度为 6% 时, 反应转化率可达到 93%, 远高于纯水相体系 68% 的转化率. 更重要的是, ChCl-U 和静息细胞可以容易地实现回收再使用, 使用 5 批以后, 转化率仍然达到 80% 以上.

2.4 深共熔溶剂中其它酶的生物催化反应

环氧化物水解酶的催化反应 Lindberg 等^[35] (2010 年) 以 ChCl-EG、ChCl-G 和 ChCl-U 作为共溶剂考察了马铃薯环氧化物水解酶 StEH1 催化 1, 2-环氧乙基苯的水解反应. DESs 可以显著地提高酶的 K_m 值 (高达 20 倍), 对催化反应的转化数影响不大, 仅提高 2 倍. DESs 可以提高环氧化物的溶解度, 比缓冲液中高 1.5 倍. 此外, DESs 也可以改变环氧化物酶的区域选择性、立体选择性. Gorke 等^[18, 26] (2010 年) 也在 ChCl-G-水体系中考察了 *Agrobacterium radiobacter* 环氧化物水解酶 EHAD1 催

化氧化苯乙烯的水解情况, 向水相中添加 25% 的 ChCl-G, 可以将底物的转化率从水相的 4.6% 提高到 92%, 而且光学选择性没有发生改变. 而向水相中添加 10% 或 25% 的 DMSO 或乙腈, 不能提高底物的转化率, 这说明 ChCl-G 对底物转化率的提高不仅仅是因为其提高了底物氧化苯乙烯在反应体系中的溶解度.

苯甲醛裂解酶的催化反应 Maugeri 等^[31, 36] (2014 年) 报道了苯甲醛裂解酶 (BAL, 一种硫胺素二磷酸依赖裂解酶 (ThDP-lyase)) 在不同 DESs-缓冲液体系中催化 C—C 键形成反应. 研究发现, 用 ChCl-G 作为共溶剂, BAL 在 60 : 40 (*v/v*) 的 DES-缓冲液体系中保持 100% 的催化活性, 并具有高的对映体选择性, 但是当 DES-缓冲液体系的比例为 70 : 30 (*v/v*) 时, BAL 失活严重. 可是, 用 ChCl-U 作为共溶剂, BAL 在 DES-缓冲液体系的比例为 70 : 30 (*v/v*) 时却可以保持 100% 的催化活性. 上述现象说明, 通过合理设计、选择 DES 可以构建合适的非传统反应介质用于生物催化. 图 11 为该研究选择的一些模式反应.

脱卤酶的催化反应 Stepankova 等^[37-38] (2014 年) 比较了 3 个脱卤酶 (DbjA, DhaA 和 LinB) 在 ChCl-EG 共溶剂体系和 3 个有机溶剂 (乙

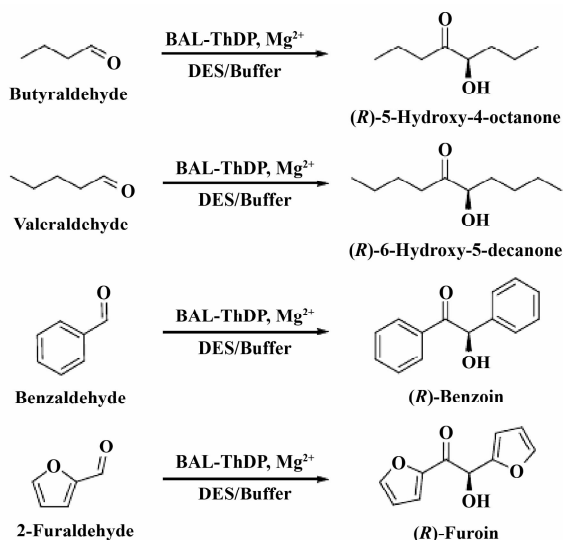


图 11 BAL 在 DES-缓冲液体系中催化光学选择性 C-C 键形成用于合成 α -羟基酮

Fig. 11 BAL-catalyzed enantioselective C-C bond formations for synthesis of α -hydroxy ketones in DES-buffer system

二醇、甲醇、丙酮) 共溶剂体系中的催化活性, 发现 ChCl-EG 可以作为环境友好溶剂代替传统的有机溶剂作为共溶剂构建新型脱卤酶反应体系, 以避免卤代烷烃 (如 1-碘己烷) 底物的低水溶性和非酶催化水解 (图 12). 此外, 所有 3 个脱卤酶在 ChCl-EG 共

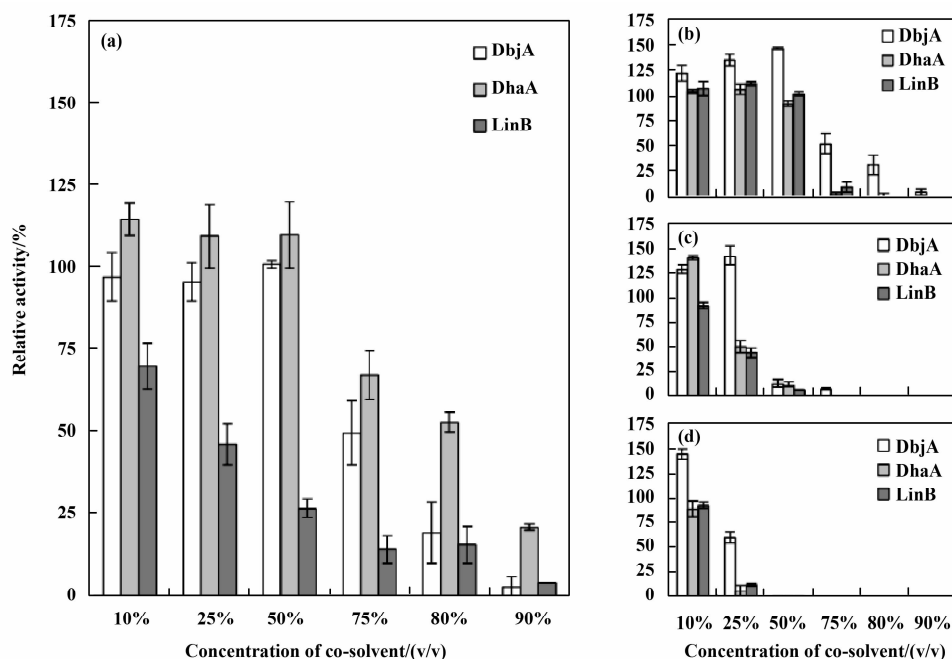


图 12 在不同共溶剂体系中脱卤酶 DbjA, DhaA 和 LinB 对卤代烷 1-碘己烷催化活性的比较

Fig. 12 Comparison of the catalytic activity of DbjA, DhaA and LinB on haloalkane 1-iodohexane in the presence of various concentrations of a) ChCl-EG, b) ethylene glycol, c) methanol and d) acetone

溶剂体系中的稳定性要明显高于有机溶剂共溶剂体系,而且,脱卤酶 DbjA 在 50% (v/v) ChCl-EG 共溶剂体系中的对映体选择性明显提高 ($E>200$)。

ATC 酶系的催化反应 Youn 等^[39] (2013 年)将用于 L-半胱氨酸合成的底物 D, L-2-氨基-2-噻唑啉-4-羧酸 (D, L-2-amino-D2-thiazoline-4-carboxylic acid, DL-ATC) 与丙二酸制成 DES, 该 DES 可稳定存在 24 h, 向底物 DES 中加入 ATC 酶系, 6 h 内可催化 670 mmol/L ATC DES 溶液生成 550 mmol/L L-半胱氨酸, ATC 在底物 DES 中的浓度是至今文献报道的最高值, 为其它文献报道的 10 倍。本研究为构建高底物浓度反应体系提供了一个新的思路。

纤维素酶、辣根过氧化物酶的反应 Lehmann 等^[40] (2012 年)通过蛋白质工程改造纤维素酶, 以期望提高纤维素酶在 DES-水体系中的催化活力。研究获得一纤维素酶突变体 4D1, 与野生型相比, 4D1 在 ChCl-G-水 (3:7) 体系中的催化活力提高 7.5 倍。Wu 等^[13]考察了 DESs 添加对辣根过氧化物酶催化废水中苯酚去除效果的影响, 发现 DESs 的添加可以加快苯酚的去除速率, 随着 DESs 添加量的增加, 去除速率也增加。

3 总结与展望

从 DESs 概念提出至今的 10 多年里, DESs 的常规和非常规物理化学性质被广泛研究, 作为一种新的“可设计溶剂”, DESs 被认为是一种比离子液体更“绿色”、“环保”的替代溶剂, 除了具备室温离子液体的诸多优点之外, DESs 还具有如下特点: (1) DESs 原料价格低廉, 制备过程中原子利用率达 100%, 不产生废物, 且制备简单, 无需纯化, 容易实现大规模工业化生产; (2) 易生物降解, 生物相容性优于离子液体; (3) DESs 是多元体系, 因此比离子液体更容易进行结构设计和修饰, 以适应不同的应用要求^[41]。我们就 DESs 的毒性/细胞毒性、作为生物催化反应介质的应用进行了综述, 从作为生物催化反应介质方面来看, 笔者认为: (1) 应加强 DESs 的毒性、细胞毒性、生物降解性能研究和数据分析; (2) 应加强 DESs 组成成分参与酶催化反应问题的研究, 获得降低成分反应活性的解决方案; (3) 应加强 DESs 的理化性质与生物催化剂催化性能的关联性研究, 为特定生物催化剂 DESs 反应体系的构建提供指导; (4) 应加强 DESs 体系中,

生物催化剂催化性能调控手段的研究, 为高效生物催化反应体系构建提供指导。另外, 作为一种新型的溶剂, 笔者认为 DESs 的研究未来应关注以下几个问题的解决: (1) 现在的 DESs 主要是以 ChCl 作为 HBA, 且多为二元混合物, 未来应该考虑使用更多的其它 HBAs 制备 DESs, 并使 DESs 的制备向三元甚至多元发展; (2) 系统地研究 HBAs、HBDs 以及它们的摩尔比对 DESs 性质的影响规律, 为 DESs 理性设计、性质预测提供指导; (3) DESs 性质研究方法、手段的非标准化, 使不同文献报道的 DESs 性质存在差异, 应着手建立标准统一的 DESs 性质研究手段; (4) 更深入地研究 DESs 组成成分之间的相互作用、构成原则, 以便更清楚地了解 DESs 的性质, 应用于新的领域; (5) 作为溶剂, DESs 具有较高的粘度, 怎样降低 DESs 粘度也是 DESs 能否大规模应用需要解决的问题; (6) 目前 DESs 制备主要是热制备法, 会产生少量的杂质, 针对不同应用领域对 DESs 纯度的要求, 积极探索新的制备手段如研磨法、冷冻干燥法的应用; (7) 进一步开拓新的应用领域。

参考文献:

- [1] Anastas P T, Kirchhoff M M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry [J]. *Acc Chem R*, 2002, **35**(9): 686-694.
- [2] a. Brundtland report: our common future [C]. 1987, WCED.
b. Zhang Xin (张欣), Yang Cai-ling (杨彩玲), Song Wei-wei (宋伟伟), *et al.* IL-Based nanoparticles palladium: A highly efficient catalyst for double carbonylation reaction to the preparation of α -keto amide (离子液体制备纳米钯催化碘代芳烃双羰化反应合成 α -酮酰胺) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(4): 312-316.
c. Zhou Yu-lu (周玉路), Lin Sha-sha (林莎莎), Xia Dao-hong (夏道宏), *et al.* An environmentally friendly liquid-liquid heterogeneous oxidation of ethylbenzene catalyzed by NHPI, CoSPc and TBAB (NHPI, CoSPc 和 TBAB 催化的乙苯液-液非均相绿色氧化反应研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(1): 16-22.
- [3] Jessop P G. Searching for green solvents [J]. *Green Chem*, 2011, **13**(6): 1391-1398.
- [4] Capello C, Fischer U, Hungerbühler K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmen-

- tal assessment of solvents [J]. *Green Chem*, 2007, **9** (9): 927–934.
- [5] Abbott A P, Capper G, Davies D L, *et al.* Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem Comm*, 2003, **1**: 70–71.
- [6] Zhang Q H, Vigier K D O, Royer S, *et al.* Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**: 7108–7146.
- [7] Smith E L, Abbott A P, Ryder K S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications [J]. *Chem Rev*, 2014, **114**(21): 11060–11082.
- [8] Alexandre P, Rita C, Ivo A, *et al.* Natural deep eutectic solvents-solvents for the 21st century [J]. *ACS Sus Chem Eng*, 2014, **2** (5): 1063–1071.
- [9] Hayyan M, Hashim M A, Al-Saadi M A, *et al.* Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents [J]. *Chemosphere*, 2013, **93**: 455–459.
- [10] Hayyan M, Hashim M A, Hayyan A, *et al.* Are deep eutectic solvents benign or toxic? [J]. *Chemosphere*, 2013, **90**: 2193–2195.
- [11] Hou X D, Liu Q P, Smith T J, *et al.* Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e59145.
- [12] Frade R F M, Simeonov S, Rosatella A A, *et al.* Toxicological evaluation of magnetic ionic liquids in human cell lines [J]. *Chemosphere*, 2013, **92**: 100–105.
- [13] Wu B P, Wen Q, Xu H, *et al.* Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure [J]. *J Mol Catal-B: Enzym*, 2014, **101**: 101–107.
- [14] Huang Z L, Wu B P, Wen Q, *et al.* Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers [J]. *J Chem Technol Biot*, 2014, **89**: 1975–1981.
- [15] Durand E, Lecomte J, Villeneuve P. Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2013, **115**: 379–385.
- [16] Gorke J T, Kazlauskas R J, Sreenc F. US [P], 2009/0117628, 2009.
- [17] Gorke J T, Sreenc F, Kazlauskas R J. Toward advanced ionic liquids. polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis [J]. *J Biote Biopro Eng*, 2010, **15**: 40–53.
- [18] Gorke J T, Sreenc F, Kazlauskas R J. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents [J]. *Chem Comm*, 2008, **10**: 1235–1237.
- [19] Zhao H, Baker G A, Holmes S. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel [J]. *Org Biomol Chem*, 2011, **9**: 1908–1916.
- [20] Zhao H, Zhang C, Crittle T D. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil [J]. *J Mol Catal-B: Enzym*, 2013, **85/86**: 243–247.
- [21] Durand E, Lecomte J, Barea B, *et al.* Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida Antarctica B* lipase catalyzed reactions [J]. *Pro Biochem*, 2012, **47**: 2081–2089.
- [22] Durand E, Lecomte J, Barea B, *et al.* Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids [J]. *Green Chem*, 2013, **15**: 2275–2282.
- [23] Durand E, Lecomte J, Villeneuve P. Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant for lipase catalyzed lipophilizations? [J]. *OCL*, 2015, **22**: D408.
- [24] Gorke J T. Doctoral dissertation of the University of Minnesota [D]. 2010.
- [25] Borse B N, Borude V S, Shukla S R. Synthesis of novel dihydropyrimidin-2 (1H)-ones derivatives using lipase and their antimicrobial activity [J]. *Curr Chem Lett*, 2012, **1**: 59–68.
- [26] Muller C R, Meiners I, Dominguez de Maria P. Highly enantioselective tandem enzyme-organocatalyst crossed aldol reactions with acetaldehyde in deep-eutectic-solvents [J]. *RSC Adv*, 2014, **4**: 46097–46101.
- [27] Gill I. Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates [J]. *Trends Biote*, 1994, **12** (4): 118–122.
- [28] Zhao H, Baker G A, Holmes S. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents [J]. *J Mol Catal-B: Enzym*, 2011, **72**: 163–167.
- [29] Maugeri Z, Leitner W, Domínguez de María P. Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents [J]. *Eur J Org Chem*, 2013, **20**: 4223–4228.
- [30] Maugeri Z, Domínguez de María P. Whole-cell biocatalysis in deep-eutectic-solvents/aqueous mixtures [J]. *ChemCatChem*, 2014, **6**: 1535–1537.
- [31] Maugeri Z. Doctoral dissertation of the RWTH Aachen University [D]. 2014.
- [32] Xu P, Cheng J, Lou W Y, *et al.* Using deep eutectic solvents to improve the resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol through *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cell-mediated asymmetric oxidation [J]. *RSC Adv*, 2015, **5**: 6357–6364.
- [33] Xu P, Xu Y, Li X F, *et al.* Enhancing asymmetric re-

- duction of 3-chloropropiophenone with immobilized acetobacter sp. CCTCC M209061 cells by using deep eutectic solvents as cosolvents[J]. *ACS Sust Chem Eng*, 2015, **3**: 718–724.
- [34] Mao S H, Yu L, Ji S X, *et al.* Evaluation of deep eutectic solvents as co-solvent for steroids 1-en-dehydrogenation biotransformation by *Arthrobacter simplex* [J]. *J Chem Technol Biote*, 2015, doi: 10.1002/jctb.4691.
- [35] Lindberg D, de la Fuente Revenga M, Widersten M. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis[J]. *J Biote*, 2010, **147**: 169–171.
- [36] Maugeri Z, Domínguez de María P. Benzaldehyde lyase (BAL)-catalyzed enantioselective C-C bond formation in deep-eutectic-solvents-buffer mixtures[J]. *J Mol Catal-B: Enzym*, 2014, **107**: 120–123.
- [37] Stepankova V, Vanacek P, Damborsky J, *et al.* Comparison of catalysis by haloalkane dehalogenases in aqueous solutions of deep eutectic and organic solvents[J]. *Green Chem*, 2014, **16**: 2754–2761.
- [38] Stepankova V. Doctoral dissertation of the Masaryk University, Czech Republic [D]. 2013.
- [39] Youn S H, Park H W, Choe D, *et al.* Preparation of eutectic substrate mixtures for enzymatic conversion of ATC to L-cysteine at high concentration levels[J]. *Biopro Bios Eng*, 2014, **37**: 1193–1200.
- [40] Lehmann C, Sibilla F, Maugeri Z, *et al.* Reengineering CelA2 cellulase for hydrolysis in aqueous solutions of deep eutectic solvents and concentrated seawater[J]. *Green Chem*, 2012, **14**: 2719–2726.
- [41] Francisco M, Bruinhorst A V D, Kroon M C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2013, **52**: 3074–3085.

The Applications of Deep Eutectic Solvents in Biocatalysis

LU Chao¹, SU Er-zheng^{1*}, WEI Dong-zhi², Alexander M. Klibanov³

(1. College of Light Industry Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

3. Department of chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA)

Abstract: Within the framework of green chemistry, solvents occupy a strategic place. To be qualified as a green medium, the solvent has to meet different criteria such as availability, non-toxicity, biodegradability, recyclability, flammability, and low price among others. Up to now, the number of available green solvents is rather limited. In recent years, deep eutectic solvents (DESs) have been considered green solvent alternatives to conventional solvents and have attracted considerable attention. DESs are defined as a mixture of two or more components, which may be solid or liquid and that at a particular composition present a high melting point depression becoming liquids at room temperature. DESs are considered as a new class of ionic liquids (ILs). Comparing to traditional ILs, DESs are low-toxic, biodegradable, the price is generally low and their performances can be adjusted. Owing to these remarkable advantages, DESs are now of growing interest in many fields of research. This paper summarizes the toxicity and biodegradability of DESs, and the applications of DESs in biocatalysis. Future perspectives on the major directions toward the research on DESs are also discussed. This work is expected to be helpful for the further development of DESs based on a summary of the research in the field of biocatalysis.

Key words: green chemistry; Deep Eutectic Solvents; toxicity; biocatalysis