

离子液体双相体系中的生物催化维生素 D₃ 羟基化反应

程兆鹏, 汤丹丹, 徐志南

(浙江大学化学工程与生物工程学院生物工程研究所, 浙江杭州 310027)

摘要: 为探究离子液体双相体系中蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) HDZJU1-11 羟基化维生素 D₃ 的生物催化反应, 比较了 5 种离子液体 ([PrMIIm][PF₆], [BMIIm][PF₆], [BMIIm][NTf₂], [HMIIm][PF₆], [OMIIm][NTf₂]) 对底物的溶解能力以及与实验菌株的生物相容性; 优化了离子液体双相体系中相比(水相与离子液体相的体积比)、pH 及底物浓度等条件, 选择 [BMIIm][PF₆], [BMIIm][NTf₂] 及 [OMIIm][NTf₂] 作为构建双相体系的离子液体. 对 [BMIIm][PF₆]/水双相体系而言, 菌体生长 12 h 后进行转化, 相比为 4 : 1, 水相 pH 为 7.5, 离子液体中底物浓度为 0.5 mg/mL 时, 24 h 后产物 25-羟基维生素 D₃ 浓度最高达 0.38 mg/mL. 结果表明, 离子液体双相体系可成功应用于蜡状芽孢杆菌羟基化维生素 D₃ 的转化反应, 为放大实验与工业化生产提供了理论支持.

关键词: 维生素 D₃; 羟基化; 离子液体; 双相体系; 蜡状芽孢杆菌

中图分类号: TQ466 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2018.07.003

引用格式: 程兆鹏, 汤丹丹, 徐志南. 离子液体双相体系中的生物催化维生素 D₃ 羟基化反应[J]. 中国科学技术大学学报, 2018, 48(7): 535-541.

CHENG Zhaopeng, TANG Dandan, XU Zhinan. Biocatalytic hydroxylation of vitamin D₃ in ionic liquid biphasic systems[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2018, 48(7): 535-541.

Biocatalytic hydroxylation of vitamin D₃ in ionic liquid biphasic systems

CHENG Zhaopeng, TANG Dandan, XU Zhinan

(Institute of Bioengineering, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: To explore the biocatalytic hydroxylation of vitamin D₃ catalyzed by *Bacillus cereus* HDZJU1-11 in ionic liquid biphasic systems, a comparison was conducted of the substrate solubility and biocompatibility in 5 ionic liquids ([PrMIIm][PF₆], [BMIIm][PF₆], [BMIIm][NTf₂], [HMIIm][PF₆], and [OMIIm][NTf₂]) and the optimization of phase ratio, pH, and substrate concentration in ionic liquid biphasic systems was performed. [BMIIm][PF₆], [BMIIm][NTf₂], and [OMIIm][NTf₂] were chosen to construct biphasic systems. In [BMIIm][PF₆]/water biphasic system, the optimal conversion condition is as follows: 0.5 mg/mL vitamin D₃ and [BMIIm][PF₆] ($V_{water} : V_{IL} = 4 : 1$) are added after 12 h fermentation of *Bacillus cereus*, and the pH of water phase is 7.5. The concentration of 25-hydroxyvitamin D₃ is increased to 0.38 mg/mL at 24 h fermentation. The optimal conversion conditions in ionic liquid biphasic systems are determined, which lays a foundation for expanding experiment and industrial applications.

Key words: vitamin D₃; hydroxylation; ionic liquid; biphasic system; *Bacillus cereus*

收稿日期: 2018-05-23; 修回日期: 2018-07-27

作者简介: 程兆鹏, 男, 1992 年生, 硕士生. 研究方向: 生物催化与转化. E-mail: czp920925@163.com

通讯作者: 徐志南, 博士/教授. E-mail: znxu@zju.edu.cn

0 引言

维生素 D₃ 是固醇类衍生物,基本结构是环戊氢烯菲环,分子式为 C₂₇H₄₄O,结构式如图 1.维生素 D₃ 作为一种脂溶性维生素,不溶于水,可溶于多种有机溶剂.自然界中,维生素 D₃ 原广泛存在于动物体内,被称为 7-脱氢胆固醇,经紫外照射后可转化为维生素 D₃.但动物体内的维生素 D₃ 是缺乏活性的激素前体.经过肝、肾等细胞中细胞色素 P450 酶的作用,转化为具有生理活性的羟基化形式.常见的活性羟基维生素 D₃ 有 25-羟基维生素 D₃、1 α -羟基

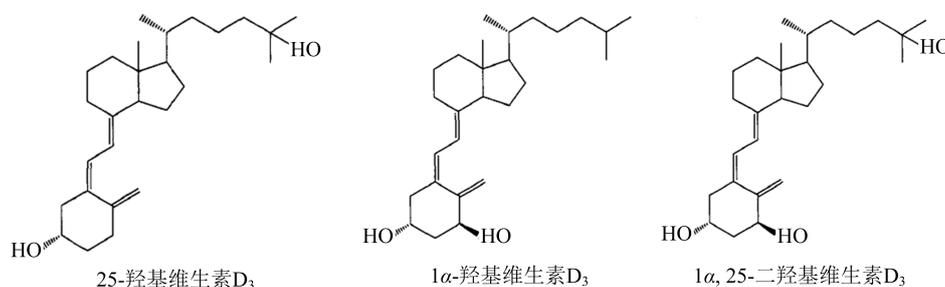


图 2 3 种羟基维生素 D₃ 的结构式

Fig.2 The structural formulas of hydroxyvitamin D₃

羟基维生素 D₃ 可以维持体内钙、磷的动态平衡,调节体内免疫及调控细胞的增殖与分化,现已广泛应用于医药、食品和饲料等行业^[1].羟基维生素 D₃ 最初是从生物组织中提取的,但分离困难、收率极低、成本高昂,严重制约了羟基维生素 D₃ 的应用^[2].因此目前生产羟基维生素 D₃ 的常用方法有化学合成与生物催化法.化学合成羟基维生素 D₃ 成本高昂,难以适应市场需要,而生物催化相比化学合成,具有反应条件温和、反应速率快、反应专一性强、污染物少、能耗低等优点^[3-5].近年来,相关研究方向主要是微生物全细胞催化维生素 D₃ 的羟基化反应^[6].微生物催化反应需要在水相中进行,但底物维生素 D₃ 在水相中极低的溶解度严重制约了羟化反应的速率.使用有机溶剂与水相构成双相体系可以解决该问题,但有机溶剂会抑制酶的活性、对全细胞产生毒害,且有机溶剂的大量使用会对环境造成严重污染.作为代替有机溶剂的绿色溶剂,离子液体与水相构成的双相体系在生物催化中具有应用潜力.

离子液体(ionic liquids)是一种由有机阳离子与无机或有机阴离子组成的盐类,因为其通常在室温下呈液态,也被称为“室温熔融盐”.离子液体的种类很多,研究较多的有机阳离子有:咪唑类、吡啶类、季铵盐类和季磷盐类等;常见无机阴离子有:Cl⁻,

维生素 D₃ 和 1 α ,25-二羟基维生素 D₃.它们的结构式如图 2.

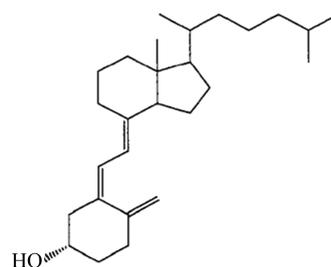


图 1 维生素 D₃ 的结构式

Fig.1 The structural formula of vitamin D₃

Br⁻, I⁻, [Al₂Cl₇]⁻, [AlCl₄]⁻, [PF₆]⁻, [BF₄]⁻等;常见有机阴离子有:[(CF₃SO₂)₂N]⁻, [CF₃SO₃]⁻, [CF₃COO]⁻, [CF₃CO₂]⁻等^[7-8].离子液体相比传统有机溶剂,具有不挥发、稳定性好、溶解性能好、环境污染小等优点^[9-11],其与水相构成的双相体系在全细胞催化酮类、酯类等物质的不对称还原,甾体类物质的羟基化等反应中报道较多.

2000年,Cull等^[12]在[BMIIm][PF₆]/H₂O的离子液体双相体系中用红球菌 R312 全细胞催化还原 1,3-苯二氰生成 3-氰基苯酰胺,这是离子液体双相体系在全细胞催化中应用的首次报道.Wu等^[13]以 16 α ,17-环氧黄体酮为底物,用黑色根霉菌(*Rhizopus nigricans*)作为生物催化剂,在[BMIIm][PF₆]或[BMIIm][NTf₂]/缓冲液的离子液体双相体系中催化了 11 α -羟基化的反应,在最优条件下反应最高转化率大于 90%,体现了离子液体双相体系在生物催化甾体羟基化反应中的优良性能.姚韧辉等^[14]在 5 种不同种类的离子液体双相体系中,以赤霉菌(*Gibberella intermedia*)作为生物催化剂,催化了去氢表雄酮(DHEA)7 α ,15 α -羟基化生成三羟基雄甾烯酮(7 α ,15 α -diOH-DHEA)的反应,实验经过对比后选择[EMIIm][EtSO₄]作为构建该体系的离子液体,并优化了双相体系中离子液体的浓度、底

物的投料浓度及投料时间等条件,大大提高了产率,表明离子液体筛选与条件优化对相关研究具有十分重要的意义。

基于以上分析,生物催化维生素D₃羟基化具有重要意义,而在离子液体双相体系中进行该反应中具有独特的优势。本文将使用1-丙基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([PrMIm][PF₆])、1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIm][PF₆])、1-丁基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐([BMIm][NTf₂])、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([HMIm][PF₆])、1-辛基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐([OMIm][NTf₂])这5种离子液体分别构建双相体系,考察其对蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)HDZJU1-11催化维生素D₃羟基化反应的影响,选择合适的离子液体;进一步优化反应条件,以期获得更高的底物转化率和产物产率;最后回收离子液体以循环利用。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验使用菌株为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)HDZJU1-11,为本实验室筛选并保藏。

1.2 实验试剂

离子液体1-丙基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([PrMIm][PF₆])、1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIm][PF₆])、1-丁基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐([BMIm][NTf₂])、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([HMIm][PF₆])、1-辛基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐([OMIm][NTf₂])均购自中国科学院兰州化学物理研究所,纯度>99%。绘制标准曲线所用维生素D₃、25-羟基维生素D₃及1 α ,25-二羟基维生素D₃均为标准分析品,转化底物维生素D₃纯度 \geq 98%,均购自Sangon Biotech公司。其他试剂均为市售化学纯或分析纯。

1.3 培养基

LB培养基(质量浓度):1%蛋白胨,0.5%酵母抽提物,1%氯化钠。121℃灭菌20 min。

转化培养基(每升含量):葡萄糖20.0 g,酵母提取物5.0 g,氯化铵7.0 g,磷酸氢二钾1.55 g,磷酸二氢钠0.85 g,七水硫酸镁2.5 g,七水硫酸锌0.01 g,二水氯化钙0.01 g,氯化铁0.1 mg。调节pH至7.5。115℃灭菌30 min。

1.4 菌株的培养及摇瓶转化

挑取斜面保藏的菌株,接入LB培养基中,220

r/min,37℃下培养12 h。再以1%接种量将菌液接入LB培养基中,220 r/min,37℃下培养12 h。

经上述操作活化后,以1%接种量将菌液接入转化培养基中进行转化。转化条件为:培养基pH 7.5,转化温度37℃,转速220 r/min,转化时间48 h,相比9:1,底物浓度随离子液体而定。进行不同转化条件实验时,需设置目标优化条件的系列梯度,其他条件保持不变。反应过程中,每次取样测定pH,需保持水相pH不变,取得水相和离子液体相样品处理后进行HPLC(高效液相色谱)检测。

1.5 分析方法

1.5.1 蜡状芽孢杆菌生长曲线的测定

挑取斜面保藏的菌株,接入LB培养基中,220 r/min,37℃下培养12 h。以1%接种量将菌液接入LB培养基中,220 r/min,37℃下培养24 h。前16 h每2 h取样1次,16 h开始每4 h取样1次。样品稀释至合理范围后用紫外/可见光分光光度计测定波长600 nm处的吸光值(OD₆₀₀)。

1.5.2 溶解度和分配系数的测定

溶解度:取1 mL离子液体,分别加入过量维生素D₃粉末,超声处理3 h。5000 r/min离心10 min。过滤后样品进行HPLC检测。

分配系数:分别配制0.5 mg/mL的各离子液体溶液。取1 mL离子液体溶液,加入9 mL去离子水,恒温振荡2 h。常温10000 r/min离心20 min,分别取上下相进行HPLC检测。记HPLC分析得到的离子液体相溶质浓度为C_{IL},水相溶质浓度为C_{aq},则分配系数 $D=C_{IL}/C_{aq}$,本实验该值取对数,即lgD。

1.5.3 生物相容性的测定

在液体培养基中接入菌株,培养12 h后测定培养基中葡萄糖浓度。菌液每9 mL分装1瓶,每瓶分别加入不同离子液体1 mL,对照组加入PBS缓冲液1 mL。37℃,220 r/min条件下培养24 h。测定此时培养基中葡萄糖浓度。

记培养12 h时培养基中葡萄糖浓度为C₀,培养24 h时培养基中葡萄糖浓度为C₁,则加入离子液体后菌体消耗葡萄糖浓度为C_c=C₀-C₁。以此作为生物相容性的衡量数据,消耗葡萄糖浓度越高说明生物相容性越好。

以加入PBS缓冲液的对照组菌体消耗葡萄糖浓度C_{CPBS}为基准,用每组实验离子液体的菌体消耗葡萄糖浓度C_{CHL}除以C_{CPBS}得到相对消耗葡萄糖浓度。即将加入PBS缓冲液的对照组菌体消耗葡萄糖

浓度化为 1, 实验所用离子液体组数据化为无量纲的数, 以便于对比各组生物相容性。

1.5.4 高效液相色谱测定底物与产物浓度

离子液体相样品处理: 将样品用甲醇稀释 20 倍, 0.22 μm 过滤头过滤后, 用 HPLC 分析样品, 记录峰面积。

水相样品处理: 将样品用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取 30 min 后离心, 取上相挥发干溶剂, 再加入与乙酸乙酯等量的甲醇溶解, 0.22 μm 过滤头过滤后, 用 HPLC 分析样品, 记录峰面积。

利用底物和产物标准曲线, 可将峰面积换算为浓度。

实验使用色谱柱为 Agilent SB-C18 柱。

HPLC 仪条件: 紫外波长 265 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 分析时间 40 min, 流量 1 mL/min。

流动相条件: 梯度洗脱。0 min 时, 甲醇 40%, 水 60%; 16 min 时, 甲醇 60%, 水 40%; 18 min 时, 甲醇 70%, 水 30%; 25 min 时, 甲醇 95%, 水 5%; 35 min 时甲醇 40%, 水 60%。

转化率 = (样品初始底物浓度 - 样品最终底物浓度) / 样品初始底物浓度 $\times 100\%$

产率 = 样品产物浓度 / 样品初始底物浓度 $\times 100\%$

上式中浓度均为质量浓度。

1.6 离子液体的回收

转化反应完成后, 离心收集离子液体。用 3 倍体积于离子液体的有机溶剂连续 3 次萃取离子液体中的底物和产物。弃去有机溶剂后, 干燥除去残留溶剂。回收的离子液体处理后 HPLC 测定残留底物和产物浓度。

2 结果与讨论

2.1 蜡状芽孢杆菌的生长曲线

蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 的生长曲线如图 3 所示。由图可见, 保藏的蜡状芽孢杆菌经活化后在液体培养基中培养 12~15 h 后, 菌体进入稳定期, 此后 OD 值基本稳定在 11 左右。通常当菌体量达到最大时, 表达的羟化酶量也会达到最大, 在菌体对数生长中后期时羟化酶活性最强, 因此在后续实验中, 菌体在接入转化培养基前将经过 12 h 的预培养, 以获得较高的羟化酶活性。

2.2 离子液体的选择

实验根据底物在离子液体中的溶解度、两相分

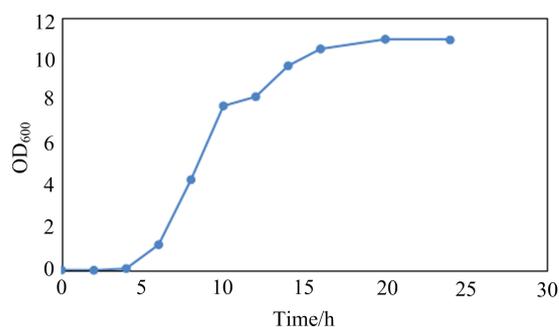


图 3 蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Bacillus cereus* HDZJU1-11

配系数以及蜡状芽孢杆菌对离子液体的生物相容性, 选择了适合构建离子液体双相体系作为羟化反应介质的离子液体。维生素 D₃ 在不同离子液体中的溶解度和两相分配系数见表 1。

表 1 维生素 D₃ 在不同离子液体中的溶解度和两相分配系数

Tab.1 Solubility and partition coefficient of vitamin D₃ in different ionic liquids

离子液体	维生素 D ₃ 溶解度 / (g · L ⁻¹)	维生素 D ₃ 分配系数
[BmIm][PF ₆]	0.62	0.97
[BmIm][NTf ₂]	3.51	1.66
[HmIm][PF ₆]	0.82	1.22
[PrMIm][PF ₆]	0.21	0.72
[OMIm][NTf ₂]	34.90	2.62

由表 1 可见, 阴离子为 [NTf₂]⁻ 的离子液体溶解底物能力较强, 而阳离子侧链碳数越高, 离子液体溶解底物能力越强。对离子液体溶解度的研究较少, 可从色散力和相似相溶理论两方面解释^[15]: 推测一方面由于阴离子为 [NTf₂]⁻ 的离子液体中离子间色散力较大, 阳离子侧链碳数越高色散力也越大, 增大了甾体在离子液体中的溶解度; 另一方面由于阴离子为 [NTf₂]⁻ 的离子液体极性相比阴离子为 [PF₆]⁻ 的离子液体小, 根据相似相溶理论, 离子液体对维生素 D₃ 的溶解性能增加。

蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 对不同离子液体的生物相容性如图 4 所示。图 4 中不同纹理代表不同的初始底物维生素 D₃ 投加浓度。结果表明, 阳离子侧链碳数越低, 离子液体与菌体的生物相容性越好。虽然 [OMIm][NTf₂] 底物溶解度相当高, 但生物相容性较差。

综合上述结果, 由于 [PrMIm][PF₆] 的底物溶解度过低, 将限制转化效率, 而 [HmIm][PF₆] 室温

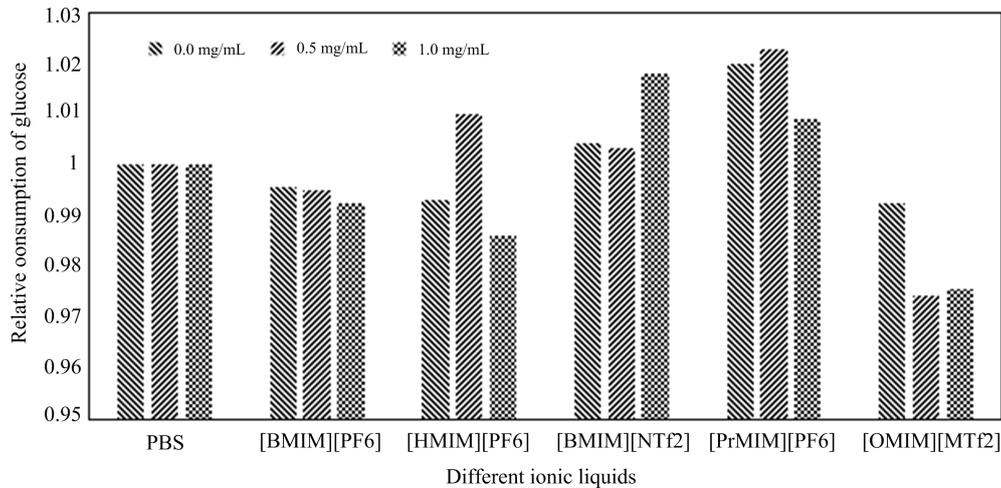


图 4 蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 对不同离子液体的生物相容性

Fig.4 Biocompatibility of *Bacillus cereus* HDZJU1-11 in different ionic liquids

下为固态,不便于操作,因此后续实验使用[BMI_m][PF₆],[BMI_m][NTf₂]和[OMI_m][NTf₂]这 3 种离子液体构成双相体系,进行维生素 D₃ 的羟基化反应。

2.3 双相体系相对转化的影响

本节考察双相体系相对转化的影响,因此将相比(水相与离子液体相的体积比)设为需考察的变量,其他条件保持一致,且离子液体相中溶解的底物绝对质量相等,使用[BMI_m][PF₆]/水两相体系时底物浓度 0.5 mg/mL.结果如表 2 所示。

表 2 [BMI_m][PF₆]/水双相体系相对转化的影响

Tab.2 Effects of phase ratio on the biotransformation

相比	转化率/%	产率/%
19:1	28.9	19.8
12:1	29.9	24.3
9:1	32.0	28.7
6:1	31.2	26.5
4:1	46.0	31.7
3:1	49.1	32.1
2:1	48.9	31.7

可见,随着相比减小,转化效果有所增强.相比 6:1~19:1 时产率变化不大,相比 4:1 时产率有较高提升,达到 31.7%.推测相比减小,即离子液体比例增加,可以增加体系的传质效率.相比 3:1 与 2:1 的实验结果与相比 4:1 时差别较小,可能由于传质效率已达到上限.另外,由节 2.2 的实验可见,离子液体对菌体有一定毒害作用,增加离子液体比例可

能导致转化效率降低,因此从转化效率与成本方面考虑,宜选择一定的离子液体比例。

使用[BMI_m][NTf₂]/水双相体系转化,相比 9:1,底物浓度 1.0 mg/mL,其他条件与上实验一致.最终底物转化率为 42.5%,产物 25-羟基维生素 D₃ 产率为 36.0%。

2.4 水相 pH 对转化的影响

本节考察双相体系中水相 pH 对转化的影响,因此将水相 pH 设为需考察的变量,其他条件保持一致,使用[BMI_m][PF₆]/水双相体系时底物浓度 0.5 mg/mL.结果如表 3 所示.结果表明,pH 为 6.5 时反应产率较低,当 pH 调节为 7.0 和 7.5 时,产物 25-羟基维生素 D₃ 浓度分别达到 0.33 mg/mL 和 0.38 mg/mL,产率显著提高.推测菌株表达的羟基化酶最适 pH 在 7.5 附近。

表 3 [BMI_m][PF₆]/水双相体系 pH 对转化的影响Tab.3 Effects of pH on the biotransformation in [BMI_m][PF₆]/water biphasic system

pH	产率/%
6.5	27.6
7.0	66.3
7.5	76.1

使用[OMI_m][NTf₂]/水双相体系转化,设定不同水相 pH,底物浓度 10.0 mg/mL,其他转化条件与上实验一致.结果如表 4 所示.结果与[BMI_m][PF₆]/水双相体系实验相似,pH 为 7.5 时反应产率最高,越偏离 7.5,产率越低,证明了菌株表达的羟基化酶最适 pH 在 7.5 附近.由于底物在[OMI_m]

[NTf₂]中溶解度达到 30 mg/mL 以上,故投加底物量远大于其他离子液体,但转化后产率较低,说明底物溶解度大并不一定能提高反应效率.

表 4 [OMIm][NTf₂]/水双相体系 pH 对转化的影响

Tab.4 Effects of pH on the biotransformation in [OMIm][NTf₂]/water biphasic system

pH	产率/%
6.5	2.8
7.0	6.2
7.5	19.0
8.0	3.9
8.5	3.3

2.5 底物浓度对转化的影响

本节考察底物浓度对转化的影响,因此将底物浓度设为需考察的变量,其他条件保持一致,使用 [BMIm][PF₆]/水双相体系时底物浓度由 0.1 mg/mL 至 0.5 mg/mL.结果如表 5 所示.结果表明,底物浓度增大,转化率和产率会有所下降.推测适当的底物浓度会提升转化效率,但过高的底物浓度可能对微生物细胞产生毒性作用.不过随着底物浓度的增加,产物的绝对质量是增加的.不同底物浓度下,转化率的上升却导致产量的下降,这在放大实验乃至工业化生产中是需要衡量的问题.

表 5 [BMIm][PF₆]/水双相体系底物浓度对转化的影响

Tab.5 Effects of substrate concentration on the biotransformation

底物浓度/(mg · mL ⁻¹)	转化率/%	产率/%
0.1	82.9	40.4
0.2	83.5	42.0
0.3	77.4	35.1
0.4	77.5	36.0
0.5	63.6	26.3

2.6 离子液体的回收

实验分别使用乙醇、40%乙醇、环己烷和正己烷对溶解有底物维生素 D₃ 的离子液体 [OMIm][NTf₂]进行萃取,回收得到的离子液体底物去除率如表 6 所示.其中乙醇与离子液体互溶,因此无数数据.结果表明,40%乙醇、环己烷和正己烷都有良好的萃取去除离子液体残留底物的效果,底物去除率均达 90%以上.由于环己烷和正己烷毒性较大,综合考虑材料易得性与环境保护原则,选择使用 40%乙

醇萃取回收离子液体.

表 6 不同有机溶剂萃取回收离子液体 [OMIm][NTf₂]

Tab.6 Retrieve of [OMIm][NTf₂] using different organic solvents

有机溶剂	粗回收 IL 中底物浓度/(mg · mL ⁻¹)	回收后 IL 中底物浓度/(mg · mL ⁻¹)	底物去除率/%
乙醇		—	—
40%乙醇	11.08	1.10	90.1
环己烷		0.67	94.0
正己烷		0.82	92.6

获得 40%乙醇萃取粗回收的离子液体后,蒸发除去乙醇,得到的离子液体继续进行维生素 D₃ 羟基化的转化实验,实验结束后用同样方法回收离子液体,循环使用 3 次.相比新离子液体,回收离子液体进行羟化反应的转化率分别达到新离子液体的 95%,88%和 86%.结果表明,使用 40%乙醇萃取回收离子液体,组成双相体系后,菌体仍能保持较好的转化能力.

3 结论

通过测定底物在不同离子液体中的溶解度和分配系数,以及分析蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 对不同离子液体的生物相容性,实验选择 [BMIm][PF₆],[BMIm][NTf₂]和 [OMIm][NTf₂]这 3 种离子液体与缓冲液构成双相体系,用蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 催化维生素 D₃ 的羟基化反应.实验测定了蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 的生长曲线,明确了转化时使用的菌株菌龄为 12 h.

实验分别考察了双相体系相比、水相 pH 和底物浓度对转化的影响.结果表明,相比减小有利于转化反应的进行,对 [BMIm][PF₆]/水两相体系而言,相比减小至 4:1 时,产率最高达 46.0%.推测相比减小,即离子液体比例增加,可以增加体系的传质效率,但离子液体对菌体有一定毒害作用,所以不能一味增加离子液体比例.水相 pH 在 7.5 附近时,产物 25-羟基维生素 D₃ 浓度最高达 0.38 mg/mL,产物浓度随 pH 偏离 7.5 而下降,证明蜡状芽孢杆菌 HDZJU1-11 的羟基化酶最适 pH 在 7.5 附近.底物浓度实验的结果表明,底物浓度增大,转化率和产率会有所下降,最高转化率达 82.9%,最低转化率为 63.6%.

在转化反应结束后,使用有机溶剂回收了离子液体.40%乙醇、环己烷和正己烷都有良好的萃取去除离子液体残留底物的效果,底物去除率均达90%以上.由于实验初衷是减少有机溶剂的污染,所以选择污染较小、同时离子液体回收效果较好的40%乙醇进行回收工作.使用回收离子液体组成双相体系后,菌体仍能保持较好的转化能力.

实验结果表明,本文构建的离子液体双相体系可成功应用于蜡状芽孢杆菌羟基化维生素D₃的转化反应中.实验中反应条件的优化为放大实验与工业化生产奠定了基础,离子液体回收对降低生产成本、减少环境污染具有积极意义.

参考文献(References)

- [1] 王国盼, 韦春葵, 黄飞, 等. 生物转化制备活性维生素D₃的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(12): 157-160.
WANG Guopan, WEI Chunkui, HUANG Fei, et al. Research progress of biological translation of active vitamin D₃ [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014, 42(12): 157-160.
- [2] PRICE P. 1. 25-Dihydroxyvitamin D₃ increase synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 255(24): 11600-11662.
- [3] MALHOTRA S V, ZHAO H. Enantio separation of the esters of α -N-acetylamino acids by lipase in ionic liquid[J]. Chirality, 2005, 17(S1): S240-S242.
- [4] ECKSTEIN M, VILLELAFILHO M, LIESE A, et al. Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalyzed reduction [J]. Chemical Communications, 2004, 6(9): 1084-1085.
- [5] HOWARTH J, JAMES P, DAI J F. Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [BmIm] PF₆ and water mix[J]. Tetrahedron Letters, 2001, 42(42): 7517-7519.
- [6] 冯海婷, 陆凌霄, 文鹏, 等. 微生物转化制备活性维生素D₃的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, 4(5): 55-58.
- FENG Haiting, LU Lingxiao, WEN Peng, et al. Advances in Research of Preparing Active Vitamin D₃ by Microbial Transformation [J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 4(5): 55-58.
- [7] 李汝雄. 绿色溶剂——离子液体的合成与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-20.
- [8] 邓友全. 离子液体——性质、制备与应用[M]. 北京: 中国石化出版社, 2006: 1-9.
- [9] TOM W. Ionic liquids in catalysis[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2004, 248: 2459-2477.
- [10] HELEN L N, KAREN L, LIESL H, et al. Thermal properties of imidazolium ionic liquids [J]. Thermochimica Acta, 2000, 357-358: 97-102.
- [11] DANIELLE D, WILLIAM-ROBERT P, DIRK W. Recycling of the ionic liquid phase in process integrated biphasic whole-cell biocatalysis [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(5): 1132-1137.
- [12] CULL S G, HOLBREY J D, VARGAS-MORA V, et al. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(2): 227-233.
- [13] WU D X, GUAN Y X, WANG H Q, et al. 11 α -Hydroxylation of 16 α , 17-epoxyprogesterone by *Rhizopus nigricans* in a biphasic ionic liquid aqueous system [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 9368-9373.
- [14] 姚韧辉, 董卓, 李会, 等. 离子液体-水双相体系中 *Gibberella intermedia* C1 双羟化去氢表雄酮(DHEA) [J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 859-864.
YAO Renhui, DONG Zhuo, LI Hui, et al. Dihydroxylation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Gibberella intermedia* C1 in an ionic liquid-water biphasic system[J]. Microbiology China, 2017, 44(4): 859-864.
- [15] 党延树. 离子液体的合成及其溶解性能研究[J]. 甘肃石油和化工, 2010(1): 18-20, 34.