

钙和钒离子对钒-溴过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化环己烯反应的影响章表明^{1,2}, 曹旭鹏¹, 薛松¹, 肖通虎³, 张卫^{1,4}¹中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连 116023²中国科学院研究生院, 北京 100049³宁波大学材料化学与工程学院, 浙江宁波 315211⁴弗林德斯大学海洋生物过程及生物产品研究中心, 阿德莱德 SA5042, 澳大利亚

摘要: 在溴化钾存在下, 大型海洋藻类珊瑚藻的钒-溴过氧化物酶(V-BPO)可在常温下催化 H_2O_2 环氧化环己烯生成环氧环己烷。通过用含 1.0 mmol/L 钒离子和 1.0 mmol/L 钙离子的缓冲溶液透析 V-BPO, 用恒流泵向反应体系中连续添加 H_2O_2 , 并优化其它反应条件, 可提高该催化反应时空收率。在优化的反应条件下, 产物环氧环己烷的时空收率为 4.79 g/(h·L), 对 H_2O_2 的收率为 74%, 均比文献最高值提高了 78%。

关键词: 溴过氧化物酶; 钙离子; 钒离子; 环己烯; 过氧化氢; 环氧化反应; 环氧环己烷

中图分类号: O643/Q55

文献标识码: A

Effects of Calcium and Vanadium Ions on the Epoxidation of Cyclohexene with H_2O_2 Catalyzed by Vanadium BromoperoxidaseZHANG Biaoming^{1,2}, CAO Xupeng¹, XUE Song¹, XIAO Tonghu³, ZHANG Wei^{1,4,*}¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China³Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China⁴Flinders Centre for Marine Bioprocessing and Bioproducts, Flinders University, Adelaide, SA5042, Australia

Abstract: Vanadium bromoperoxidase (V-BPO) from a marine macro-alga *Corallina officinalis* can catalyze the epoxidation of cyclohexene in the presence of KBr to form epoxycyclohexane using H_2O_2 as the oxidant. A process intensification strategy has been developed by the integration of V-BPO pretreatment, continuous feeding of H_2O_2 , and optimizing reaction conditions in order to improve the epoxidation productivity. The BPO activity and thermostability increased significantly when the V-BPO solution was dialyzed with a buffer containing 1.0 mmol/L vanadium ion and 1.0 mmol/L calcium ion. The apparent enzyme activity was improved when the H_2O_2 was fed continuously using a constant flow pump. When combined with the optimal reaction conditions (including buffer, pH, temperature, enzyme concentration, and KBr and H_2O_2 concentrations), the space-time yield of epoxycyclohexane and its yield to hydrogen peroxide reached 4.79 g/(L·h) and 74%, respectively. These values are 78% increasing than the highest values reported previously.

Key words: bromoperoxidase; calcium ion; vanadium ion; cyclohexene; hydrogen peroxide; epoxidation; epoxycyclohexane

卤素过氧化物酶是一类重要的生物催化剂, 在卤素离子存在下, 它可催化 H_2O_2 氧化一系列有机底物, 因而受到了广泛关注^[1~7]。以钒为辅基的卤素过氧化物酶发现较晚, 它可催化 H_2O_2 氧化卤素离子 (Br^- , I^-)^[8]。由于这类酶具有较好的热稳定性和操作

稳定性、较高的 H_2O_2 耐受性和良好的有机溶剂耐受性, 因而在有机合成研究及工业化应用中颇具优势^[9,10]。其中海洋珊瑚藻类 (*Corallina officinalis*) 的钒-溴过氧化物酶(V-BPO)近年来备受关注^[11~14]; 它可催化烯烃溴化氧化^[15,16]和环氧化^[17]、有机硫化物

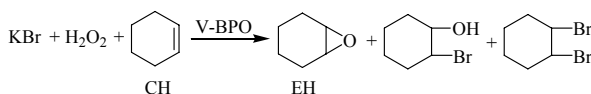
收稿日期: 2010-04-07.

联系人: 张卫. Tel: (0411)84379316; Fax: (0411)84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

基金来源: 国家重点基础研究发展计划(973计划, 2009CB724700); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-073); 浙江省自然科学基金(Y407353).

氧化^[18]、蛋白质溴化标记^[19]和氨基氧化^[20]等反应。但 V-BPO 也存在底物适用范围较小和反应活性较低等不足^[21]。酶的成本过高是生物催化过程工业化的瓶颈之一^[18]。因此,提高酶的稳定性和催化活性进而提高酶的催化效率是降低生物催化过程成本的有效手段,对推动 V-BPO 的工业化应用具有重要意义。

随着 V-BPO 催化特征和机制研究的不断深入,发现 V-BPO 不仅在活性中心具有钒离子的结合位点,而且在活性中心之外还具有钙离子的结合位点^[19]。钒离子和钙离子对提高 V-BPO 活性及稳定构象具有重要作用^[22]。因此,本文在含有钒和钙离子的缓冲液中透析处理纯化 V-BPO,然后用于催化 H₂O₂ 环氧化环己烯生成环氧环己烷(见图式 1)反应中;在文献[17]的基础上,进一步优化反应条件,以提高体系的催化效率。



图式 1 V-BPO 催化 H₂O₂ 氧化环己烯反应

Scheme 1. The epoxidation of cyclohexene (CH) to epoxycyclohexane (EH) catalyzed by V-BPO. V-BPO—vanadium bromoperoxidase.

1 实验部分

1.1 酶的制备和活力测定

珊瑚藻采自大连石槽海域,保存于 -20 °C 的冷冻柜中备用。通过改进的方法分离纯化 V-BPO^[23]。将 500 ml 缓冲液 (pH 8.3, 50 mmol/L, Tris-HCl) 加入到 500 g 珊瑚藻(湿重)中,匀浆破碎,14 000 g × 10 min 离心去除沉淀,上清液用硫酸铵盐析,收集 30%~60% 饱和度硫酸铵的蛋白质沉淀。将沉淀溶解透析除盐后,用 DEAE-52 柱 (2.6 cm × 30 cm) 层析纯化,用 0.4 mol/L 的 NaCl 洗脱 V-BPO,收集洗脱液。洗脱液透析除盐后用 DEAE-52 柱层析再次纯化,先用 0.21 mol/L 的 NaCl 洗脱杂蛋白,再用 0.30 mol/L 的 NaCl 洗脱 V-BPO,收集有活性部分,超滤浓缩之后,用含有 1.0 mmol/L 的 Na₃VO₄ 和 CaCl₂ 的缓冲液 (pH 8.3, 50 mmol/L, Tris-HCl) 透析 4 h,于 4 °C 储存备用。

在 0.1 mol/L 磷酸钾 (pH = 6.0) 缓冲液中,分别加入 50 μmol/L 底物单氯双甲酮 (MCD, 购于 Sigma, ε₂₉₀ = 19 900 L/(mol·cm)), 100 mmol/L 的 KBr, V-BPO 和 2.0 mmol/L 的 H₂O₂ (均为终浓度),混匀后,用紫外/可见分光光度计 (JASCO V-530 型) 测定体系在 290 nm

处吸光度。以每分钟消耗 1 μmol 的 MCD 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U),酶活测定均在 25 °C 下进行^[24]。

1.2 酶催化反应

于 100 ml 三颈圆底烧瓶中,依次加入缓冲液、KBr 和 V-BPO,混匀后再加入 19.6 mmol 环己烯,使反应体系的总体积为 10 ml,磁力搅拌 5 min 后,再加入一定量 H₂O₂ 开始反应。采用间歇批次补加 H₂O₂ 或用恒流泵以恒定流速连续补加 H₂O₂。用恒温水浴保持体系温度恒定,用磁力搅拌器以恒定速率进行搅拌。反应 3 h 后,取有机相进行产物分析。

使用 Agilent 6890 型气相色谱仪 (HP-5 毛细管柱, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 联用 Agilent 5973 型质谱仪对反应产物进行定性分析。用 FULI-9790 II 型气相色谱仪 (FID 检测器, Agilent DB-5 毛细管柱, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), 采用内标法 (甲苯内标) 对反应产物进行定量分析。定量分析条件: Ar 为载气,分流比 25:1,进样室和检测器温度均为 240 °C,程序升温 (80 °C 保持 12 min,以 10 °C/min 升至 230 °C,保持 5 min)。

产物环氧环己烷选择性 S_{EH} 及其对环己烯的收率 Y_{CH} 和对 H₂O₂ 的收率 Y_{HP},以及产物的时空收率 Y_{ST} 分别定义如下:

$$S_{EH} = A_{EH} / (A_{EH} + A_{BO} + A_{DA})$$

$$Y_{CH} = N_{EH} / N_{CH}$$

$$Y_{HP} = N_{EH} / N_{HP}$$

$$Y_{ST} = W_{EH} / Vt$$

其中 A_{EH}, A_{BO} 和 A_{DA} 分别为环氧环己烷、2-溴代环己醇和 1,2-二溴代环己烷的气相色谱峰面积与内标物峰面积之比值, N_{EH} 为环氧环己烷的摩尔数, N_{CH} 为加入体系中环己烯的摩尔数, N_{HP} 为加入体系中 H₂O₂ 的摩尔数, W_{EH} (g) 为环氧环己烷的质量, V (L) 为反应体系的体积, t (h) 为反应时间。

2 结果与讨论

2.1 钒和钙离子对 V-BPO 活性和稳定性的影响

研究表明, V-BPO 除在活性中心具有钒离子结合位点外,在活性中心之外还存在钙离子结合位点,钒、钙离子对 V-BPO 活性和热稳定具有重要作用^[22];去除钙、钒离子后的脱辅基 V-BPO,其活性和热稳定性均显著降低^[25]。因此,本文采用含 Na₃VO₄ 或/和

CaCl₂ 的缓冲液透析纯化后的 V-BPO, 以期提高 V-BPO 的活性和热稳定性.

表 1 为透析前后 V-BPO 的活性和热稳定性. 由表可见, 用 Na₃VO₄-CaCl₂ 联合透析之后, V-BPO 活性和热稳定性最高, 分别为透析前的 132% 和 160%. 这说明钒、钙离子联合透析处理酶溶液是提高 V-BPO 活性和热稳定性的合适方法.

表 1 钒离子或/和钙离子透析对 V-BPO 活性及热稳定性的影响

Table 1 Effect of calcium or/and vanadium ions on the V-BPO activity and thermostability

Salt	Activity (U/ml)	Thermostability ^a (%)
—	51.0	59.7
CaCl ₂	56.5	63.2
Na ₃ VO ₄	66.3	91.2
Na ₃ VO ₄ -CaCl ₂	74.3	95.9

^aThe activity ratio of the enzyme solution after and before heating at 70 °C for 180 min.

图 1 为不同浓度钒和钙离子对 V-BPO 活性的影响. 由图可见, 当 Na₃VO₄ 溶液大于 1 mmol/L 时, V-BPO 活性从 36 U/ml 上升到 52 U/ml 左右, 增加了 44%; 用含 CaCl₂ 的缓冲液透析, 酶活性上升约 10%.

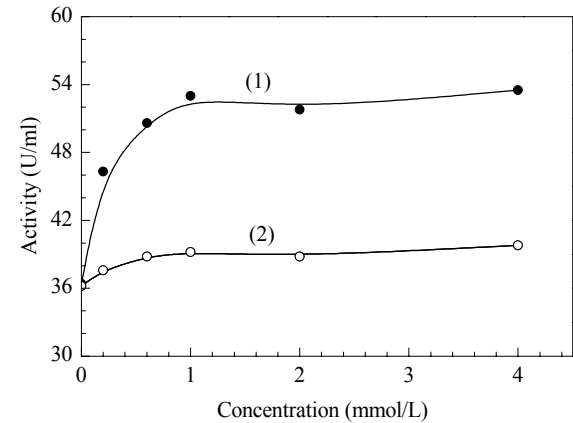


图 1 钒离子和钙离子浓度对酶活性的影响
Fig. 1. Effect of concentrations of vanadium and calcium ions on V-BPO activity. (1) Na₃VO₄; (2) CaCl₂.

实验还发现, 透析前后 V-BPO 的 K_m 值基本不变 (见表 2), 说明用含 Na₃VO₄ 和 CaCl₂ 的缓冲液透析并未改变酶的结构. 在 V-BPO 的分离纯化过程中, 有少量钒离子从酶上流失^[24], 故透析前的酶液中可能有部分酶没有活性. 当用含 Na₃VO₄ 和 CaCl₂ 的缓冲液透析后, 这部分蛋白质可能重新折叠, 形成具有

表 2 V-BPO 用钒和钙离子透析前后的 K_m 值
Table 2 The K_m of the V-BPO dialyzed with vanadium and calcium ions

Sample	K_m (MCD)/ (μ mol/L)	K_m (H ₂ O ₂)/ (mmol/L)	K_m (KBr)/ (mmol/L)
Before dialysis	14.7	0.203	9.71
After dialysis	14.7	0.227	11.1

MCD—Monochlorodimedone.

V-BPO 活性的蛋白.

2.2 反应条件的优化

2.2.1 缓冲液 pH 值的影响

图 2 为缓冲液 pH 值对环氧环己烷时空收率和选择性的影响. 由图可见, 当 pH=5.0~7.0 时, 随着 pH 值的升高, 产物时空收率逐渐上升; 当 pH=7.0~9.0 时, 随着 pH 升高, 时空收率逐渐降低. 其中 pH 在 6.0~8.0 间时, 时空收率的变化较小, 在 pH=7.0 时, 时空收率最高, 为 2.64 mg/(L·h). 而以 MCD 为底物时, pH=6.5 时催化速率最快^[24]. V-BPO 催化有机底物溴化的反应机理为^[17,26]: 在 V-BPO 作用下, H₂O₂ 先与 Br⁻ 作用生成氧化态溴中间体 (与酶结合或不结合的中间体), 当存在合适有机底物 (如 MCD) 时, 氧化态溴中间体与有机底物反应生成含溴有机物, 否则氧化态溴中间体进一步与过量的 H₂O₂ 反应生成单线态氧 (¹O₂), 单线态氧与烯烃反应生成环氧化物. 体系中 MCD 的存在抑制了 ¹O₂ 的产生^[27]; 而烯烃底物的反应与 ¹O₂ 的产生, 二者反应机理不同.

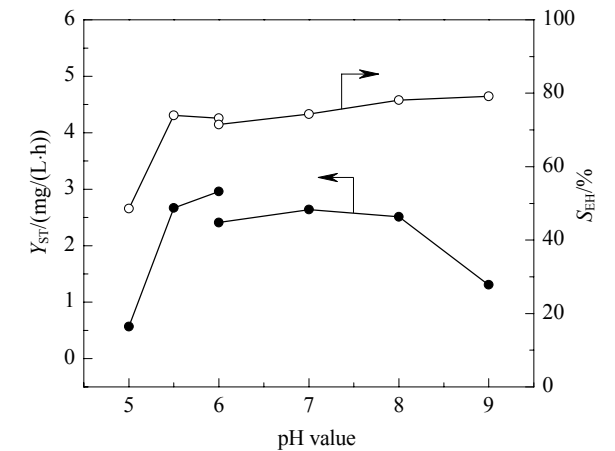


图 2 缓冲液 pH 值对环氧环己烷时空收率和选择性的影响

Fig. 2. Effect of pH values on space-time yield (Y_{ST}) and selectivity (S_{EH}) of epoxycyclohexane. Reaction conditions: 4 U/ml V-BPO, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 50 mmol/L, 65 °C, 3 h, pH 5.0–6.0 citric acid buffer (50 mmol/L) or pH 6.0–9.0 Tris-HCl buffer (50 mmol/L).

2.2.2 缓冲液组成的影响

常用缓冲液来控制生物催化反应体系的 pH 值; 由于酶的构象与其离子化程度有关, 所以即使 pH 值相同, 不同种类的缓冲液对酶离子化的影响也可能有所不同. 在油/水两相反应体系中, 一些有机底物在水相中的溶解度较小, 这通常是油/水两相体系反应速率限制因素之一; 而有机底物在缓冲液中的溶解度可能与缓冲液的组成有关. 因此, 本文选择了五种缓冲体系 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, $\text{Tris-NaH}_2\text{PO}_4$, Tris-HCl , $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 为柠檬酸) 和 $\text{Tris-C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (均为 pH 7.0, 60 mmol/L) 作为反应介质, 考察了它们对时空收率和选择性的影响, 结果示于图 3. 由图可见, 当以 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 为反应介质时, 产物的时空收率和选择性最低, 分别为 0.80 mg/(h·L) 和 74.8%; 以 $\text{Tris-C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 为反应介质时, 产物的时空收率和选择性最高, 分别为 3.28 mg/(L·h) 和 89.4%. 实验发现, 在含有磷酸盐的缓冲体系中反应时, V-BPO 失活较快. 这可能是由于磷酸根取代了酶活性中心的钒酸根所致^[25]. 含有柠檬酸和 Tris 的缓冲液中的反应速率比在磷酸盐缓冲液中大. 经测定, 底物环己烯在 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, $\text{Tris-NaH}_2\text{PO}_4$, Tris-HCl , $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $\text{Tris-C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 五种缓冲液中的溶解度比值为 1:1.26:1.17:1.17:1.22. 由此可见, 底物在 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中的溶解度最低, 因而酶的活性也最低.

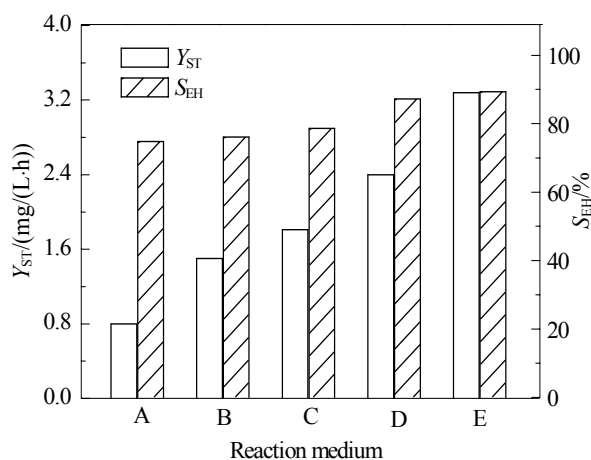


图 3 缓冲体系组成对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 3. Effect of different buffers on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$; (B) $\text{Tris-NaH}_2\text{PO}_4$; (C) Tris-HCl ; (D) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-Na}_2\text{HPO}_4$; (E) $\text{Tris-C}_6\text{H}_8\text{O}_7$. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 50 mmol/L, pH = 7.2, 65 °C, 3 h.

2.2.3 缓冲液浓度的影响

图 4 为 $\text{Tris-C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (pH = 7.0) 浓度对产物时空收率和选择性的影响. 由图可见, 当缓冲液浓度为 10 mmol/L 时, 时空收率为 2.05 mg/(L·h), 选择性为 93.2%. 随着缓冲液浓度的升高, 产物的时空收率先逐渐升高后逐渐降低, 当浓度为 40 mmol/L 时, 时空收率最高 (为 3.44 mg/(L·h)). 另外, 反应选择性则随缓冲液浓度的增加而缓慢下降. 因此, 选择 40 mmol/L 的缓冲液作为反应介质.

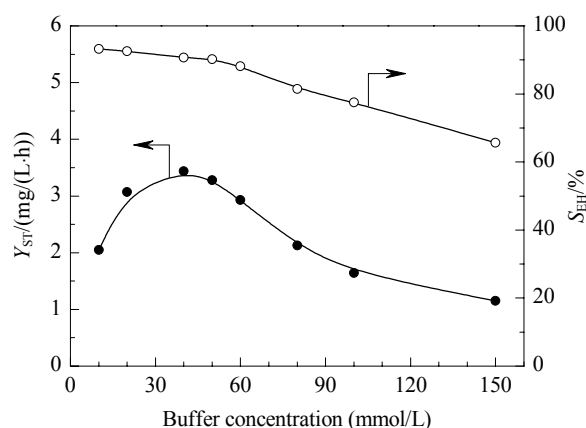


图 4 缓冲液浓度对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 4. Effect of buffer concentration on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 50 mmol/L, H_2O_2 11 $\mu\text{mol/min}$, pH = 7.2, 65 °C, 3 h.

2.2.4 反应温度的影响

图 5 为反应温度对产物时空收率和选择性的影响. 由图可见, 在 40~65 °C 时, 随着反应温度的升高,

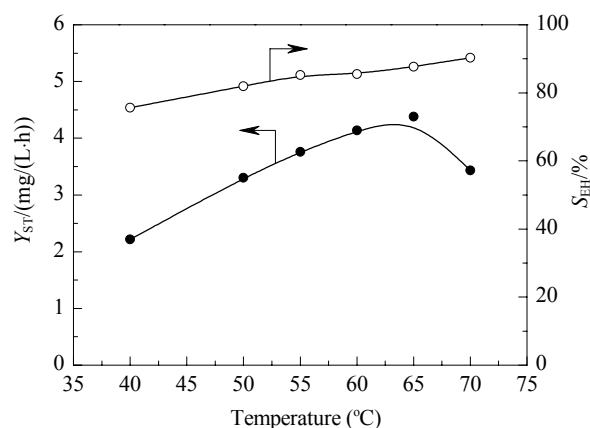


图 5 反应温度对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 5. Effect of reaction temperature on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 60 mmol/L, H_2O_2 1 $\mu\text{mol/min}$, pH = 7.2, 3 h.

时空收率不断升高; 在 65°C 时, 时空收率为 $4.38 \text{ mg}/(\text{h}\cdot\text{L})$, 选择性为 87.7% ; 当反应温度超过 65°C 时, 时空收率急剧下降, 说明此时酶迅速失活. 反应选择性由 40°C 时的 75.7% 缓慢上升至 75°C 时的 90.0% . 这说明提高反应温度有利于提高反应选择性.

2.2.5 V-BPO 浓度的影响

图 6 为 V-BPO 浓度对产物时空收率和选择性的影响. 由图可见, 当未加 V-BPO 时, 体系中未检测到环氧环己烷产物; 随着体系中 V-BPO 浓度增加, 产物时空收率迅速上升, 至 4.0 U/ml 时, 产物的时空收率达 $4.52 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 选择性为 88.0% . 进一步增加 V-BPO 浓度, 时空收率和选择性的增速均较缓慢. 因此, 本文选择 V-BPO 量为 4.0 U/ml .

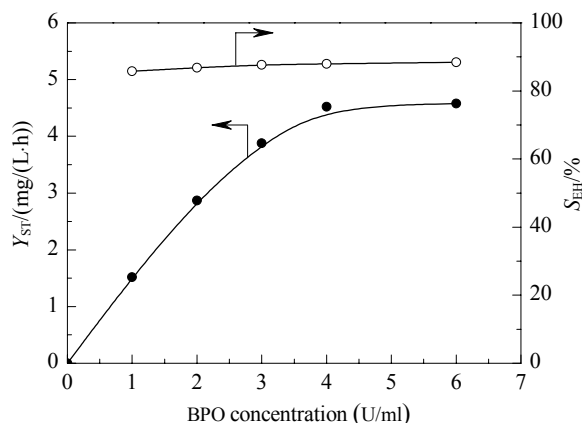


图 6 酶浓度对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 6. Effect of BPO concentration on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. Reaction conditions: cyclohexene 19.6 mmol , KBr 60 mmol/L , H_2O_2 $11 \mu\text{mol/min}$, $\text{pH} = 7.2$, 65°C , 3 h .

2.2.6 KBr 浓度的影响

图 7 为 KBr 浓度对时空收率和选择性的影响. 由图可见, 当 KBr 浓度为 10 mmol/L 时, 时空收率仅为 $0.24 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$. 随着 KBr 浓度的增加, 时空收率和选择性迅速升高; 当 KBr 浓度大于 50 mmol/L 时, 时空收率和选择性增速缓慢. 至 60 mmol/L 时, 产物的时空收率达最大值 ($4.63 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$), 选择性为 89.9% . 因此, 本文使用 60 mmol/L 的 KBr, 其 K_m 值为 38.5 mmol/L .

2.2.7 H_2O_2 浓度的影响

H_2O_2 既是底物, 又是 V-BPO 催化溴化有机底物的竞争性不可逆抑制剂^[28]. 因此, 若体系中 H_2O_2 浓度过低, 不利于充分发挥酶的催化效率; 过高则会对酶产生抑制作用. 图 8 考察了 H_2O_2 浓度对产物时空

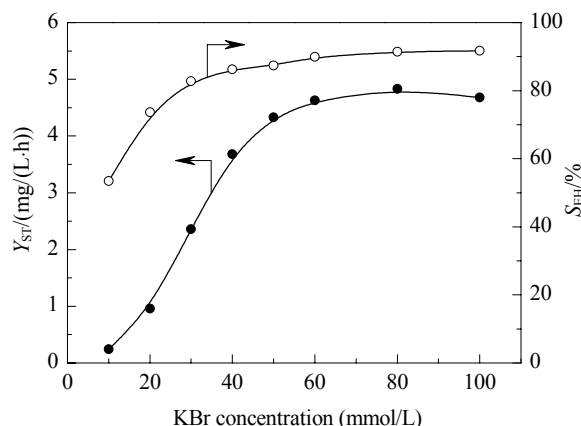


图 7 KBr 浓度对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 7. Effect of KBr concentration on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml , cyclohexene 19.6 mmol , H_2O_2 $11 \mu\text{mol/min}$, $\text{pH} = 7.2$, 65°C , 3 h .

收率和选择性的影响. 由图可见, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 产物的时空收率不断增加, 当 H_2O_2 浓度为 $20\sim 28 \text{ mmol/L}$ 时, 时空收率达最大 (为 $4.57\sim 4.70 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$). 产物选择性在 H_2O_2 浓度大于 16 mmol/L 时, 基本维持在 89% ; 甚至当 H_2O_2 浓度大于 28 mmol/L 时, 即使时空收率逐渐降低, 选择性也未见下降. 研究还发现 (图未示出), H_2O_2 浓度较低时, 环氧环己烷对 H_2O_2 的收率较高. 这可能是由于体系中 H_2O_2 浓度较高时, 部分 H_2O_2 与反应中间物发生反应生成氧分子^[26], 造成 H_2O_2 损耗, 因而收率降低. 当 H_2O_2 浓度为 20 mmol/L 时, 收率达最大 (70%), 为文献^[17]值的 168% . 综合考虑, H_2O_2 为 20 mmol/L 比较合适.

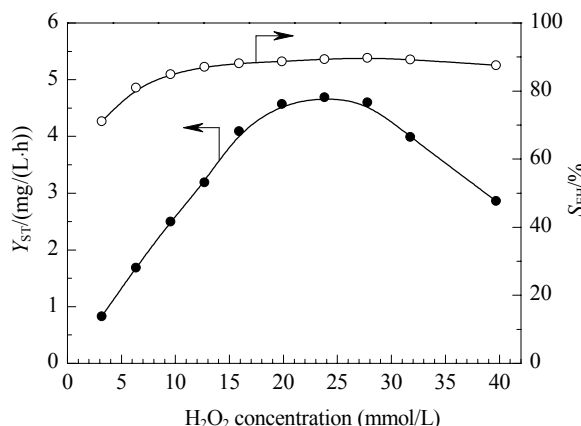


图 8 H_2O_2 浓度对产物时空收率和选择性的影响

Fig. 8. Effect of H_2O_2 concentration on space-time yield and selectivity of epoxycyclohexane. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml , cyclohexene 19.6 mmol , KBr 60 mmol/L , $\text{pH} = 7.2$, 65°C , 3 h .

2.2.8 H₂O₂加入方式的影响

于瑶等^[17]考察了 V-BPO 催化氧化环己烯体系中 H₂O₂ 添加方式对反应收率的影响,发现每隔 10 min 添加一次 H₂O₂ 时的收率(对 H₂O₂ 的收率)为每隔 60 min 添加一次时的 2.3 倍. 本文较为系统地考察了 H₂O₂ 加入方式对收率的影响(维持 H₂O₂ 加入总量不变(2.0 mmol)),考察了 5 种 H₂O₂ 加入方式,即: 每间隔 60 min 添加一次,共 3 次(A 方式); 每间隔 30 min 添加一次,共 6 次(B 方式); 每间隔 10 min 添加一次,共 18 次(C 方式); 用恒流泵连接注射针管,将注

射针管插入反应液面下滴加(D 方式); 用恒流泵连接注射针管,悬空在反应液面上方连续滴加(E 方式). 反应结果列于表 3. 可以看出,从产物对 H₂O₂ 的收率来看,C 方式是 A 方式的 2.1 倍. 这与文献[17]结果基本一致. 另外,采用恒流泵连续滴加 H₂O₂,产物对 H₂O₂ 的收率与时空收率均明显升高. 如,利用 E 方式时, Y_{HP} 为 74.0%, Y_{ST} 为 4.79 mg/(h·L),二者均是 A 方式的 2.9 倍和 C 方式的 1.4 倍. 因此,采用恒流泵流加 H₂O₂ 有利于产物环氧环己烷的生成和 H₂O₂ 充分利用.

表 3 不同 H₂O₂ 加入方式的影响
Table 3 Effect of the way for H₂O₂ addition

H ₂ O ₂ addition way	S _{EH} /%	Y _{HP} /%	Y _{CH} /%	Catalytic efficiency (mg/(U·h))	Y _{ST} /(mg/(L·h))
A	80.2	25.2	2.56	4.1	1.64
B	83.3	33.3	3.38	5.4	2.16
C	86.5	53.3	5.40	8.7	3.46
D	87.6	72.1	7.30	11.7	4.68
E	87.6	74.0	7.50	12.0	4.79

A: One time every 60 min for 3 times; B: One time every 30 min for 6 times; C: One time every 10 min for 18 times; D: Fed in batch with pump (under liquid); E: Continuously fed with pump (above liquid).

Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 60 mmol/L, pH = 7.2, 65 °C, 3 h.

2.3 优化条件下反应动力学曲线

图 9 为体系在上述优化反应条件下的反应动力学曲线. 由图可见,副产物 2-溴环己醇在反应 30 min 时达到最大值,此后有逐渐下降的趋势. 而环氧环己烷和另一副产物 1,2-二溴代环己烷均随着反应的进行而逐渐增加,至 210 min 时,二者均不再继续增加. 经测试,此时体系中 V-BPO 已完全失活. 由于 2-溴环

己醇在反应中很快达最大值,而另两种产物却持续增加,故有可能通过延长反应时间抑制 1-溴环己醇的生成,从而提高环氧环己烷选择性.

3 结论

优化了 V-BPO 催化 H₂O₂ 氧化环己烯生成环氧环己烷反应的条件,使环氧环己烷的时空收率及其对 H₂O₂ 收率均比前期结果有所提高(分别达 4.79 g/(L·h) 和 74%). 对 V-BPO 溶液进行钒和钙离子透析,是提高酶活力和热稳定的有效手段. 用恒流泵向反应体系中添加 H₂O₂,有利于减少副反应,大大提高环氧环己烷对 H₂O₂ 的收率. 不含磷酸根,但含有机物的缓冲介质有利于提高 V-BPO 的催化效率.

参 考 文 献

- 智丽飞, 蒋育澄, 胡满成, 李淑妮. 化学进展 (Zhi L F, Jiang Y Ch, Hu M Ch, Li Sh N. *Progr Chem*), 2006, **18**: 1150
- Dembitsky V M. *Tetrahedron*, 2003, **59**: 4701
- 聂艳艳, 蒋育澄, 胡满成, 李淑妮, 翟全国. 化学学报 (Nie Y Y, Jiang Y Ch, Hu M Ch, Li Sh N, Zhai Q G. *Acta Chim Sin*), 2010, **68**: 982
- 张红霞, 吴霞琴, 后雯璟, 陆中庆, 谢文, 王荣, 李和兴.

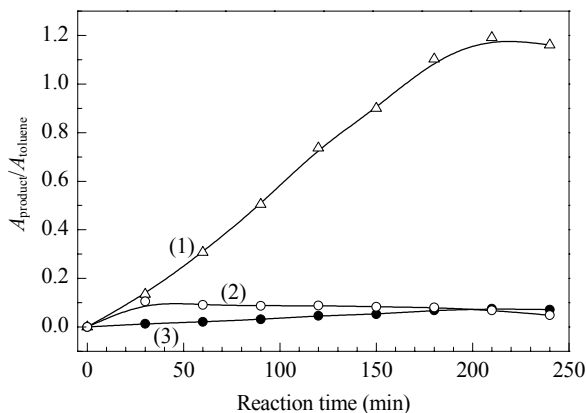


图 9 反应动力学曲线

Fig. 9. Kinetics curves of the epoxidation of cyclohexene. (1) Epoxycyclohexane; (2) 2-Bromo-cyclohexanol; (3) 1,2-Dibromo-cyclohexane. Reaction conditions: V-BPO 4 U/ml, cyclohexene 19.6 mmol, KBr 60 mmol/L, H₂O₂ 11 μmol/min, pH = 7.2, 65 °C, 3 h.

- 高等学校化学学报 (Zhang H X, Wu X Q, Hou W J, Lu Zh Q, Xie W, Wang R, Li H X. *Chem J Chin Univ*), 2008, **29**: 1863
- 5 Liu J Z, Wang M. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 23
- 6 Narayanan R, Zhu G Y, Wang P. *J Biotechnol*, 2007, **128**: 86
- 7 Winter J M, Moore B S. *J Biol Chem*, 2009, **284**: 18577
- 8 Vilter H. *Phytochemistry*, 1984, **23**: 1387
- 9 de Boer E, Plat H, Tromp M G M, Wever R, Franssen M C R, van der Plas H C, Meijer E M, Schoemaker H E. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 607
- 10 Sheffield D J, Smith A J, Harry T R, Rogers L J. *Biochem Soc T*, 1993, **21**: 445S
- 11 Butler A. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2**: 279
- 12 李海燕, 靳艳, 张卫, 虞星炬, 张锦友, 吴佩春. 生物工程学报 (Li H Y, Jin Y, Zhang W, Yu X J, Zhang J Y, Wu P Ch. *Chin J Biotechnol*), 2008, **24**: 622
- 13 Littlechild J, Rodriguez E G, Isupov M. *J Inorg Biochem*, 2009, **103**: 617
- 14 Salgado L T, Cinelli L P, Viana N B, de Carvalho R T, Mourao P A D, Teixeira V L, Farina M, Amado G M. *J Phycol*, 2009, **45**: 193
- 15 Moreno G, Moore C, Okuda R K. *Abst Pap Am Chem Soc*, 1998, **216**: U215
- 16 Zhang J, Roberge C, Reddy J, Connors N, Chartrain M, Buckland B, Greasham R. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24**: 86
- 17 于瑶, 靳艳, 吴佩春, 张卫. 催化学报 (Yu Y, Jin Y, Wu P Ch, Zhang W. *Chin J Catal*), 2007, **28**: 915
- 18 Andersson M A, Allenmark S G. *Tetrahedron*, 1998, **54**: 15293
- 19 Lambert F, Slegers G. *Appl Radiat Isotopes*, 1994, **45**: 11
- 20 Itoh N, Morinaga N, Kouzai T. *Biochem Mol Biol Int*, 1993, **29**: 785
- 21 van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon R A. *Trends Biotechnol*, 2001, **19**: 73
- 22 Littlechild J, Garcia-Rodriguez E. *Coordin Chem Rev*, 2003, **237**: 65
- 23 Ohshiro T, Hemrika W, Aibara T, Wever R, Izumi Y. *Phytochemistry*, 2002, **60**: 595
- 24 Butler A, Walker J V. *Chem Rev*, 1993, **93**: 1937
- 25 Garcia-Rodriguez E, Ohshiro T, Aibara T, Izumi Y, Littlechild J. *J Biol Inorg Chem*, 2005, **10**: 275
- 26 Butler A. *Coordin Chem Rev*, 1999, **187**: 17
- 27 Everett R R, Soedjak H S, Butler A. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 15671
- 28 Soedjak H S, Walker J V, Butler A. *Biochemistry*, 1995, **34**: 12689