

脂肪酶催化性能强化研究进展

杨 姣¹, 耿红冉², 江 凌¹, 胡 焱¹

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009;
2. 中国生物技术发展中心, 北京 100039)

摘要:分析了目前脂肪酶运用于工业生产存在的问题,从添加剂、化学修饰、酶的固定化、非水相介质等方面具体阐述了提高脂肪酶活性、稳定性、选择性的方法,并对脂肪酶催化性能强化的研究方向进行了展望。

关键词:脂肪酶; 添加剂; 化学修饰; 固定化; 非水相介质

中图分类号: Q55; Q814.2; TB383

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2011)09-0023-05

Research progress in enhancement of catalytic performance of lipase

YANG Jiao¹, GENG Hong-ran², JIANG Ling¹, HU Yi¹

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100039, China)

Abstract: The problems of lipase used in current industrial production are briefly analyzed in this paper. The methods to enhance the lipase's activity, stability and selectivity are introduced in detail from the aspects of additives, chemical modification, enzyme immobilization, non-aqueous solvents, and so on. The tendency of the enhancement of catalytic performance of lipase is proposed as well.

Key words: lipase; additives; chemical modification; immobilization; non-aqueous medium

脂肪酶主要是指一类能够催化甘油三酯水解生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯的酶^[1],其基本组成单位仅为氨基酸,通常只含有一条多肽链,是工业生物催化剂中一种最重要的酯解酶^[2]。脂肪酶催化的反应具有相当高的底物特异性和选择性,可以制备许多化学方法难以合成的手性化合物、农药等,使其成为一种重要的生物催化剂^[3]。脂肪酶能在油水界面上催化酯水解或醇解、酯合成、酯交换、高聚物合成及立体异构拆分等有机合成反应,其催化的转酯反应已经被应用于工业生产各种重要的酯^[4]。工业生产中,脂肪酶广泛应用于有机合成、造纸、洗涤剂、日化等工业。每年,全世界大概需要1 000 t以上的脂肪酶作为洗涤剂的添加成分^[1]。

酶的生物催化要在温和的环境条件下才能正常进行,所以利用天然的脂肪酶进行催化反应存在许多缺点:在一些条件下酶的操作稳定性较低,产品回收难度大,在工业生产过程中不能重复使用^[5]。当条件不适宜(高温、极端 pH)酶活就会降低,甚至失活。例如工业生产过程中的操作温度一般都高于45℃,因此使用的脂肪酶在50℃左右应该要有较高

的活力和稳定性,这样才能保证其有更高的市场竞争力^[6]。工业脂肪酶稳定性的提高可以延长其自身的半衰期、增加重复使用次数、扩大使用领域。

目前脂肪酶的失活机制已经得到了深入的研究和阐述,对脂肪酶性能进行强化以避免其在工业条件下失活,增加可操作性、活性、选择性及稳定性是当前研究的主要课题。各种物理和化学的方法被用来对脂肪酶进行性能强化并取得了较好的研究成果。常见的用于脂肪酶性能强化的方法主要有使用添加剂、非水介质、酶的化学修饰、固定化以及蛋白质工程等^[7]。本文主要从这几方面综述了强化脂肪酶催化性能的最新研究进展。

1 添加剂的影响

常用的添加剂主要有盐、大分子等,这些添加剂的类型、浓度、性质都会对酶的性能产生影响。添加剂一般添加于溶液、干燥以及固定化的过程中,它们能阻止酶在这些过程中构象的改变,使酶的活力不至于下降。

1.1 溶液中的添加剂

在液体为介质的反应过程中盐类离子对酶的

收稿日期:2011-04-02;修回日期:2011-07-11

基金项目:国家自然科学基金重点基金(20936002);国家自然科学基金青年基金(20906049);南京工业大学学科基金

作者简介:杨姣(1988-),女,硕士生,主要研究方向为生物催化、分子筛催化,025-83172094, yangjiao19880527@163.com;胡焱(1975-),男,博士,副教授,主要研究方向为化学催化与生物催化,精细化工产品开发与绿色化工工艺研究,通讯联系人,025-83172094, huyi@njut.edu.cn。

活性影响很大,一般能够产生影响的离子主要有 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等。Salsin 等^[8] 在磷酸缓冲液与异辛烷双相反应介质中添加不同浓度 (50 ~ 500 mmol/L) 的 Li^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 的氯盐,并测定褶皱假丝酵母脂肪酶(CRL)在这些反应体系中的活力。结果发现,任一摩尔浓度的氯盐都能提高 CRL 对对硝基苯乙酸的水解活力,尤其是 Li^+ ,使酶在相同的条件下水解活力提高 1.24 ~ 1.75 倍。

1.2 干燥过程中的添加剂

工业化生产出来的脂肪酶一般都要经过脱水干燥的作用形成粉末,以便于运输和保藏,酶的干燥通常有 2 种方法——喷雾干燥和冷冻干燥^[9]。不管哪种干燥,脂肪酶的空间结构都很容易被破坏,引起酶失活。在干燥过程中,可以加入一些稳定剂,如多聚糖、蛋白质、麦芽糖糊精、聚乙二醇(PEG)。

Moniruzzaman 等^[10] 在 CRL 的冷冻干燥过程中加入海藻糖和 PEG 的混合物,与未加入任何保护剂的冷冻干燥酶相比,离子液体(ILs)中酶催化反应的初始速率提高了 24 倍,Secundo 等^[11] 在脂肪酶的冷冻干燥过程中加入了 18 冠 6 醚,实验证明,与未加入任何添加剂的冷冻干燥酶相比,添加低浓度的 18 冠 6 醚使洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶(BCL)在甲苯中的酯交换活力提高 2.4 倍,通过红外检测,加入添加剂使酶的构象发生一定改变。

另一种干燥方法是脱水喷雾干燥,在喷雾干燥过程中酶会遭受很大的压力,导致其容易解折叠丧失活性。Alloue 等^[9] 研究了脱脂乳粉、阿拉伯胶以及麦芽糖糊精、氯化钙、阿拉伯胶这 2 种混合添加剂体系对脂肪酶喷雾干燥活力的影响,结果表明在喷雾干燥过程中加入麦芽糊精、氯化钙、阿拉伯胶混合体系,可以保留全部的酶活。

1.3 固定化过程中的添加剂

在固定化过程中有很多因素会影响酶的性能,如果处理不好,酶活、稳定性、选择性都会降低,可以在固定化过程中加入一些添加剂来保护酶活,使用的添加剂主要有牛血清蛋白(BSA)、蛋白胨(PEP)等。

Rodrigues 等^[12] 比较了 PEP、BSA、PEG 对固定化脂肪酶活性的影响,分别将 PEP、BSA、PEG 的磷酸缓冲液与酶以及载体混合,在 28℃ 下搅拌 150 min,最终发现 PEP 和 BSA 能够提高固定化酶在正庚烷中丁酸丁酯的合成能力,PEG 能够显著提高酶固定化后的热稳定性。Lee 等^[13] 在酶的固定化过程中加入不同的 ILs 作为保护剂,固定化酶的活性和稳定性都得到提高,添加不同的 ILs,酶的活力能

提高 5 ~ 16 倍不等。

2 化学修饰提高酶活

化学修饰操作简便、方式灵活、周期短、见效快,几乎可以对脂肪酶进行无穷无尽的修饰,是一种颇具实用价值的生物工程技术。根据修饰剂的不同,可将脂肪酶的化学修饰分为小分子修饰、双功能交联剂的修饰以及大分子修饰。

2.1 小分子的化学修饰

游离的脂肪酶不易溶解在有机溶剂和无溶剂体系中,通常表现出较低的酯交换能力,可以利用小分子修饰的方法来提高酶在有机溶剂中的溶解度。Maruyama 等^[14] 利用脂肪酸对几种脂肪酶进行修饰,将长链烷基引入到脂肪酶中,修饰后的酶在极性与非极性的溶液中都溶,通过实验发现,酶活力变化主要依赖于修饰的脂肪酸,用饱和脂肪酸修饰哺乳动物、真菌和细菌的脂肪酶后,酶在正己烷中的转酯活力提高 1.3 倍,并且实验结果表明,饱和脂肪酸中硬脂酸的修饰效果最好。

2.2 双功能交联剂的共价修饰

可溶性的纯脂肪酶稳定性低,在高温和有机溶剂中容易失活,交联剂修饰过的酶在有机溶剂中更加稳定。通常使用的交联剂有戊二醛、乙二胺、双亚氨基酯等,其中戊二醛使用得最多。交联剂除用于酶之间的交叉连接外,还可用于酶和固定化载体之间的交叉连接,传统的方法是,先对载体进行修饰,再通过交联剂的作用将酶交叉连接到载体上,这种方法通称为“点交联”。Gao 等^[15] 利用戊二醛作为连接中间体,创造出一种新的“面交联”方法,最终脂肪酶和壳聚糖分子形成一个大的稳定的网络结构

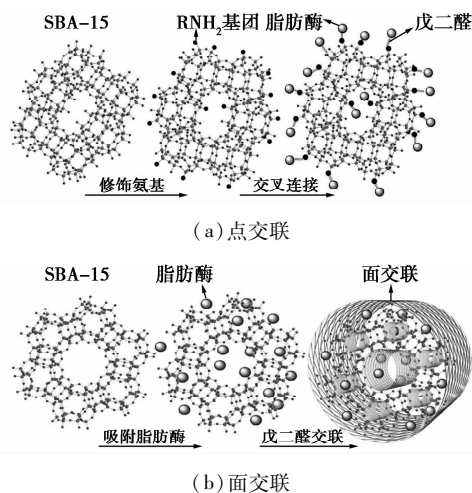


图 1 “点交联”与“面交联”

覆盖在载体的内外表面,如图1所示^[15]。这种固定方法很有效地防止了酶分子在操作的过程中从载体上脱落下来,增加了CRL的操作稳定性,与游离的CRL相比,固定的CRL活力明显提高,在重复使用6次后,酶活力仍为初始活力的85%。

2.3 大分子的化学修饰

通常所用的大分子修饰剂有PEG、蔗糖聚合物、葡聚糖、聚氨基酸等。Godoy等^[16]用一定的聚合物修饰某一固定化脂肪酶第64位半胱氨酸(Cys)的巯基,Cys64存在于蛋白质活性区域的附近。结果表明,修饰的酶活力主要依赖于固定的过程、用于修饰的聚合物以及底物,例如用改性后的PEG(PEG-COOH)修饰固定在琼脂糖上的脂肪酶,修饰后的酶在水相中对2-丁酰-2-苯乙酸的水解活力提高了5倍。Cabrer等^[17]通过离子交换的方法将右旋糖酐硫酸覆盖在CALB分子的表面,或用琥珀酸酐、1-乙基-3-碳二亚胺对酶进行琥珀酰化或氨化,酶在有机溶剂中对扁桃酸甲酯的选择性增加,*E*值从1上升到13。

3 固定化提高脂肪酶特性

酶在工业生产和绿色化学上的应用越来越多,微生物工程、蛋白质工程、蛋白质化学等领域在过去的几年都得到了很大的发展,同时一些老的技术(例如固定化)也被人们重新提出。固定化酶有一系列的优点:几乎能够提高所有工业化酶的特性;很容易从反应体系中分离,重复使用增加产率;酶的固定化为酶的催化反应提供了非水相的必要的的环境^[18]。一些固定化的酶,如葡萄糖异构酶和青霉素G酰化酶已经得到了工业化生产。固定化酶的活性在一定程度上依赖于固定化载体材料的物理化学特性^[19],载体的种类很多,分类也多种多样,但根据其化学组成可分为无机载体、天然高分子载体、合成高分子载体等。

3.1 无机载体

无机载体成本低、稳定性好、表面性质易调控、不会产生环境污染,是当前酶固定化载体的主要研究方向^[20],应用于固定化的无机材料主要有二氧化硅、无机陶瓷、碳纳米管等。

在众多的无机载体中,介孔材料有着较高的表面区域、一致的孔径、较大的孔体积,因此很适用于酶的固定,例如蛋白酶、脂肪酶、过氧化物酶。在很多情况下,固定在介孔材料上的脂肪酶活力和重复使用能力都得到了提高。本实验室采用介孔材料

中的SBA-15进行了多种脂肪酶的固定,都取得了比较好的研究成果。关于这方面研究的文献也比较多,Hu等^[21]系统地介绍了酶在介孔材料上固定化研究的新进展,并对介孔材料固定化酶的发展前景进行了展望。本实验室的Zou等^[22]用合成的咪唑ILs修饰介孔材料SBA-15表面的羟基,PPL通过吸附作用固定在修饰的SBA-15上,和PPL-SBA相比,PPL-ILs-SBA的活力由594 U/g增加到975 U/g,随着温度、pH的大幅度变化PPL-ILs-SBA活力仅有微小波动,稳定性明显增强。

3.2 天然高分子载体

天然高分子通常无毒害作用、易得、传质性能好、有适合催化反应的微环境,很适合用于酶的固定化。使用较多的天然高分子材料主要有海藻酸钠、壳聚糖、纤维素、琼脂糖等。

海藻酸钠是一种天然多糖,具有较好的稳定性、溶解性、黏性和安全性,作为一种高分子材料广泛应用于酶的固定化。Mondal等^[23]通过简单的吸附作用将脂肪酶固定在海藻酸钠上,和未固定的酶相比,固定的酶在55℃下更加稳定,测定酶在缓冲液中对橄榄油的水解活性,酶重复使用4次后的活力几乎没有降低,荧光光度计在280 nm的激发波长下测定游离和固定化酶的荧光光谱,结果显示340 nm波长下固定化酶的荧光强度明显降低,酪氨酸和色氨酸的微环境发生了很大的变化,固定化脂肪酶的结构发生了改变。

3.3 合成高分子载体

与上述2种载体相比,合成的高分子材料抗微生物能力强、机械强度高、加工性能好、物理化学性能都有很大的可变性,常用的合成高分子材料有合成纤维、脂类载体等。

改性的聚合纤维是一种研究得比较多的合成高分子载体,通常用于固定化的聚合纤维有聚氯乙烯纤维、聚乙烯醇纤维、硝酸纤维、壳聚糖纳米纤维等。Huang等^[24]将壳聚糖、聚乙烯醇的混合溶液进行静电处理制得直径为80~150 nm的纳米纤维薄膜,制成的壳聚糖纳米纤维薄膜有相当好的生物相容性、高的体表面积和大的孔隙,通过戊二醛的偶联作用,将CRL共价连接到载体上,结果表明,脂肪酶的固载量为63.3 mg/g,酶的pH和热稳定性都得到了提高,储存30 d后酶活仍能保持在56.2%,这些特性都优于游离的酶。

3.4 新型载体

3.4.1 交联酶聚集体

最近几年研究者提出了一种新型的固定化

技术——交联酶聚集体 (CLEAs)。CLEAs 是一种无载体的固定化技术,制备过程是,先通过简单的方法(加有机溶剂、非离子型高聚物等)让可溶性的酶沉淀,然后通过交叉连接,使酶形成直径为 50 ~ 100 μm 的聚合物,如图 2 所示。Zhao 等^[25]以丙酮作为沉淀剂,将假单胞菌脂肪酶 (PSL) 制成交联酶聚集体 (CLEA-PSL),在动力学拆分 *N*-(2-乙基-6-甲基苯基)-丙氨酸的实验中, CLEA-PSL 不仅表现出了相当高的选择性 ($E > 100$),还表现出高的催化活力和稳定性,在重复使用 10 次后,活力仅丢失 19.1%。但是 CLEAs 也存在一些技术上的瓶颈: CLEAs 制备工艺通用性不强;一种酶的优化制备条件对另一种酶不适用等^[26]。

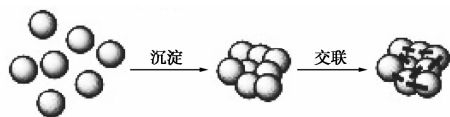


图 2 交联酶制备过程

3.4.2 磁性高分子微球

磁性高分子微球不溶于水和有机溶剂,比表面积大,吸附性能好,用磁性高分子微球制备的固定化酶易于从反应体系中分离和回收,操作简便。Yong 等^[27]将聚甲基丙烯酸缩水甘油酯和甲基丙烯酸三甲基氯化铵嫁接到修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子表面,形成功能化的超顺磁性粒子,和游离酶相比,固定在修饰后的载体上的脂肪酶热稳定性提高,最适温度范围扩大,80 $^\circ\text{C}$ 时,游离酶的活力不超过 10%,固定化酶活力仍保持在 35%,且固定的酶重复使用 5 次后,活力仍然保持初始活力的 75%。

现在,研究者正致力于研究一些更新型的固定化载体与固定化技术,例如微波辅助固定化技术、点击化学技术、多步固定技术、纳米单酶等。

4 新型非水相介质

脂肪酶在拆分中表现出优良的特性,当前国内外很多研究者在有机溶剂体系中利用脂肪酶进行手性醇和药物中间体的拆分。但以有机溶剂为反应介质通常效率较低、结果不佳,最近研究人员发现,和传统的有机溶剂相比,一些新型的绿色非水相介质如 ILs、(超临界二氧化碳) SC-CO₂、ILs/SC-CO₂ 等都能显著提高脂肪酶的特性。

4.1 ILs

ILs 有很多良好的性能,基本无蒸汽压,高导电导热性,对生物催化有相当好的稳定性,以 ILs 为介

质能提高脂肪酶的选择性、反应速率、转化率,还能够实现酶在有机溶剂中不能进行的化学反应,通过精心设计、选择合适的阴阳离子可以在很大程度上改善 ILs 的物理性质,ILs 中常见的阴阳离子如图 3 所示,因此 ILs 成为一种很有潜力的新型绿色介质^[28]。

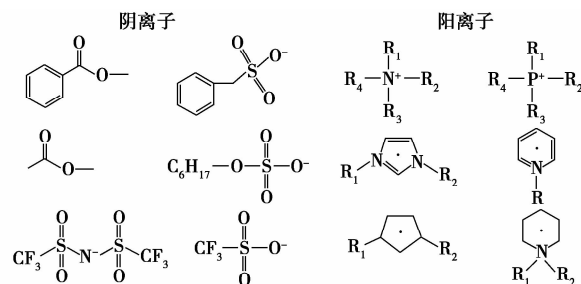


图 3 ILs 中一些典型的阴阳离子

Shan 等^[29]以 1,3-二异丁基咪唑六氟磷酸盐 ([D(i-C4)Im][PF6]) ILs 为介质,以脂肪酶催化拆分 1-苯乙醇为模型反应,结果显示,1-苯乙醇的转化率达 50%, $e_{\text{ep}} > 99\%$,酶的半衰期高达 348 h,此外通过圆二色谱、内源荧光光谱和光学显微镜研究表明,酶在 [D(i-C4)Im][PF6] 中保温 6 d 后氨基酸残基的裸露程度略有增加,但其二级结构仍保持稳定,且以天然的折叠球形存在。Adamczak 等^[30]比较了以丙酮和 ILs 为介质时脂肪酶催化合成抗坏血酸油脂的能力,结果发现,不管是游离的还是固定的酶,以 ILs 为介质时起始反应速率都较高,比丙酮高了 9 倍左右。除此之外,ILs 还可以作为酶的涂层剂,在恶劣的反应条件中使酶展现更高的催化活性、稳定性以及选择性。

4.2 SC-CO₂、ILs/SC-CO₂

在所有的超临界流体中,SC-CO₂ 有着对环境无毒害、不燃性、高度的重复使用性、低毒、高扩散能力和低黏度等特点。但是以 SC-CO₂ 为介质也有一些缺点,例如 SC-CO₂ 会化学修饰游离的氨基酸群组、溶液本身的 pH,由于液体的压力影响酶空间结构等,不利于酶的活力。

最近研究人员证实了将 ILs、SC-CO₂ 联系起来进行绿色催化的可行性,ILs/SC-CO₂ 解决了它们单独使用时的许多缺点,如可以降低 ILs 的黏度,解决 ILs 引起的产物分离困难等。因此,人们将 ILs 与 SC-CO₂ 的优点充分结合,形成一种新的反应介质,使催化反应在均相下进行,反应结束后,通过 SC-CO₂ 萃取分离产物及回收催化剂,实现化学过程的绿色化。Lozano 等^[31]在 50 $^\circ\text{C}$ 和 10 MPa 的条件下,以 ILs/SC-CO₂ 双相体系为反应介质,使用固定化脂肪酶 CRL 进行动力学拆分 1-苯乙醇,结果发现酶

的选择性高达 97.3%, 产率达到了 98%, 酶在此体系中使用 14 d 后几乎没有丧失任何活力。

5 结论与展望

脂肪酶是一种重要的生物催化剂, 但酶的价格昂贵, 易失活, 不易分离, 重复使用率低, 工业应用受到很大限制, 因此其性能的提高成为工业生产中亟需解决的问题。目前对脂肪酶催化性能强化的研究报道已有很多, 诸如添加稳定剂、酶的固定化等, 这些方法被广泛应用到脂肪酶催化性能强化的研究中, 取得了较好的效果, 此外在化学修饰、非水相介质的使用等方面也取得了一定的进展。值得注意的是, 对于酶的相关修饰不是孤立的, 有些研究者已经将几种修饰方法相结合进行相关研究, 这也是通过酶修饰策略强化脂肪酶催化性能未来的研究热点。虽然对于脂肪酶的催化性能强化已经取得了很好的成就, 但是目前仍然存在着一一定的问题, 例如对脂肪酶活性中心的化学修饰、酶改性或固定化后空间结构的变化、从本质上揭示酶性能提高的原因还没有进行很好的研究, 因此酶修饰和固定化方法的创新、新型固定化载体的制备与分子生物学和生物信息学等相关学科的交叉应用将会是未来脂肪酶催化性能强化研究的主要方向。

参考文献

- [1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(2): 235 - 251.
- [2] Yang J K, Guo D Y, Yan Y J. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, 45(3/4): 91 - 96.
- [3] Yang G, Wu J P, Xu G, *et al.* Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods[J]. *Colloids Surf B*, 2010, 78(2): 351 - 356.
- [4] Rufino A R, Biaqqio F C, Santos J C, *et al.* Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate[J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47(1): 5 - 9.
- [5] Li Y, Gao F, Wei W, *et al.* Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2010, 66(1/2): 182 - 189.
- [6] Sifour M, Zaghoul T I, Saeed H M, *et al.* Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs[J]. *New Biotechnol*, 2010, 27(4): 330 - 336.
- [7] Villeneuve P, Muderhwa J M, Graille J, *et al.* Customizing lipases for biocatalysis; a survey of chemical, physical and molecular biological approaches[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, 9(4/5/6): 113 - 148.
- [8] Salgin S, Takac S. Effects of additives on the activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase a in a biphasic medium[J]. *Chem Eng Technol*, 2007, 30(12): 1739 - 1743.
- [9] Alloue W A M, Destain J, Amighi K, *et al.* Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives[J]. *Process Biochem*, 2007, 42(9): 1357 - 1361.
- [10] Moniruzzaman M, Kamiya N, Goto M. Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids[J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(13): 2887 - 2899.
- [11] Secundo F, Barletta G L, Dumitriu E, *et al.* Can an inactivating agent increase enzyme activity in organic solvent? Effects of 18-crown-6 on lipase activity, enantioselectivity, and conformation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 91(1): 12 - 18.
- [12] Rodrigues D S, Cavalcante G P, Silva G F, *et al.* Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(6): 833 - 829.
- [13] Lee S H, Doan T T N, Ha S H, *et al.* Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, 45(1/2): 57 - 61.
- [14] Maruyama T, Umezaki S, Nakajima M, *et al.* Interesterification and hydrolysis catalyzed by fatty acid-modified lipases[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2002, 104(5): 255 - 261.
- [15] Gao S L, Wang Y J, Diao X, *et al.* Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 3830 - 3837.
- [16] Godoy C A, de las Rivas B, Filice M, *et al.* Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers[J]. *Process Biochem*, 2010, 45(4): 534 - 541.
- [17] Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, *et al.* Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification[J]. *Process Biochem*, 2009, 44(2): 226 - 231.
- [18] Da Ros P C M, Silva G A M, Mendes A A, *et al.* Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(14): 5508 - 5516.
- [19] Bajaj A, Lohan P, Jha P N, *et al.* Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification; An overview[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2010, 62(1): 9 - 14.
- [20] Lü Y J, Lu G Z, Wang Y Q, *et al.* Functionalization of cubic Ia3d mesoporous silica for immobilization of penicillin G acylase[J]. *Adv Funct Mater*, 2007, 17(13): 2160 - 2166.
- [21] Hu Y, Liu W M, Zou B, *et al.* Enzyme Immobilization on Mesoporous Materials[J]. *Prog. in Chem*, 2010, 22(8): 1656 - 1663.
- [22] Zou B, Hu Y, Yu D H, *et al.* Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 53(1): 150 - 153.

89.7% ; 四川大学^[4]采用水溶性铈磷络合催化剂, 在水溶液中催化经过提浓的炼厂尾气中的乙烯, 生成丙醛的选择性在98%以上。这类水溶性的催化剂可以在氢甲酰化反应后, 通过简单的两相分离将溶解在水中的催化剂分离出来。王琪等^[5]报道了Pt/Sn/P系新型络合物催化剂, 该催化剂在较缓和的反应条件下具有优良的醛化性能, 如80℃, 6 MPa, 反应3 h, 乙烯转化率在95%以上, 醛选择性达97%左右, 其活性比钴系催化剂高5倍, 与铈系催化剂相当, 如果成功应用于工业化, 能显著降低催化剂成本。有关乙烯羰基化合成丙醛的文献报道很多, 部分公开文献的催化剂基本上可以和工业化报道的催化剂催化效率接近, 也有很多文献报道了非均相乙烯羰基化合成丙醛的研究^[6], 在文献^[7]中有较为详细的述评。

2 乙烯氢羧基化合成丙酸

乙烯、一氧化碳和水在一定温度、压力及催化剂作用下可直接合成丙酸。该过程首先由BASF公司开发并投入工业化生产, 因此又称为BASF法。BASF工艺在250~320℃, 10~30 MPa下, 以Ni(CO)₄为催化剂, 乙烯一次通过转化率为90%~92%, 丙酸选择性为80%。相对于乙烯羰基合成丙醛, 丙醛再氧化制丙酸过程工艺而言, 该工艺具有过程简单、转化率高、收率高和操作简便等优点。但在高温高压下, 丙酸的腐蚀性接近于同样条件下的醋酸, 因此对设备材质和耐压要求高, 投资大; 又由于催化剂Ni(CO)₄有剧毒, 易挥发, 所以在工艺制备过程中安全防护要求高, 导致该工艺没有得到推广, BASF也只建了1套。为了进一步缓和乙烯羰基合成丙酸的工艺, 学术界和工业界做了大量的研究。研究结果表明, Fe、Co、Ru、Rh、Pd、Ir、Pt等金属络合

物对乙烯羰基合成丙酸都具有明显活性。如采用CoI₂为主催化剂, 丙酸为溶剂, 添加适当助催化剂, 乙烯和CO气体按1:1的比例通入反应釜, 在7 MPa, 195℃, 反应2.5 h, 乙烯转化率达99%, 丙酸产率94%以上, 且此体系无醛、酮和内酯等副产物生成^[8]; 用NiI₂/Mo(CO)₆及适当助剂混合而成的复合催化剂体系, 在172℃, 低压下, 使乙烯、CO和丙酸很容易反应制得丙酸酐, 丙酸酐水解后制得丙酸^[9]; The Research Triangle Institute(RTI)-Eastman-Bechtel研究团队开发了一种乙烯一步法制丙酸的新方法, 他们使用6价金属钼的化合物如Mo(CO)₆为主催化剂, 在2.5~7.0 MPa, 150~200℃的温和条件下, 一步反应合成丙酸及其酯, 该法既不采用贵金属作催化剂, 又避免了BASF公司采用的高压条件和强毒性的催化剂^[10]; Mckoy等^[11]发现在硼酸的存在下, BASF催化体系的丙酸合成的速度加快, 同时还能缓解催化剂沉淀失活。尽管Rh、Ir、Pd具有更高的活性和温和的工艺条件^[12], 然而由于该类贵金属催化剂价格昂贵, 因而至今无工业化应用的报道。也有文献报道, 在Rh、Pd、Ni等金属络合物及适当助剂催化下, 乙烯与二氧化碳反应可生成丙酸或酯。

国内丙酸的研究和生产起步较晚, 直到20世纪90年代, 北京化工研究院开展了以乙烯和合成气为原料, 用铈磷络合物为催化剂, 羰基合成丙醛再氧化合成丙酸的研究, 取得了丙醛转化率95%, 丙酸选择性98%。中科院兰州物化所进行了以炼厂干气稀乙烯为原料, 担载型液相铈基络合物为催化剂, 羰基合成丙醛再氧化为丙酸的研究, 在兰州炼油厂进行侧线试验, 取得了1300 h的催化剂寿命试验。还有成都有机所、广东工业大学等单位也先后开展过乙烯制丙酸的研究工作, 国家“七五”、“八五”和

(上接第27页)

[23] Mondal K, Mehta P, Mehta B R, *et al.* A bioconjugate of Pseudomonas cepacia lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(6): 1080-1086.

[24] Huang X J, Ge D, Xu Z K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization[J]. *Eur Polym J*, 2007, 43(9): 3710-3718.

[25] Zhao L F, Zheng L Y, Gao G, *et al.* Resolution of *N*-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of Pseudomonas sp. Lipase[J]. *J Mol Catal B; Enzym*, 2008, 54(1/2): 7-12.

[26] Wang M F, Qi W, Su R X, *et al.* Advances in Cross-Linked Enzyme Aggregates[J]. *Prog in Chem*, 2010, 22(1): 173-178.

[27] Yong Y, Bai Y X, Li Y F, *et al.* Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization[J]. *J*

Magn Magn Mater, 2008, 320(19): 2350-2355.

[28] Fan Y X, Qian J Q. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications[J]. *J Mol Catal B; Enzym*, 2010, 66(1/2): 1-7.

[29] Shan H X, Lu Y, Li Z J, *et al.* Resolution of (*R,S*)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipase in Novel 1,3-Dibutylimidazolium Ionic Liquid[J]. *Acta Chim Sin*, 2010, 68(10): 1010-1016.

[30] Adamczak M, Bornscheuer U T. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates[J]. *Process Biochem*, 2009, 44(3): 257-261.

[31] Lozano P, De Diego T, Vaultier M, *et al.* Dynamic Kinetic Resolution of Sec-Alcohols in Ionic Liquids/Supercritical Carbon Dioxide Biphasic Systems[J]. *Int J Chem Reactor Eng*, 2009, 7: A79. ■