

多孔玻璃珠固定化脂肪酶及其催化合成生物柴油

罗文^{1,2}, 谭天伟³, 袁振宏^{1,2}, 吕鹏梅^{1,2}, 王芳³

(1. 中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640; 2. 中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室, 广东 广州 510640; 3. 北京化工大学, 北京 100029)

摘要:以多孔玻璃珠为载体, 采用共价法对假丝酵母 99-125 脂肪酶进行了固定, 对比了固定化酶与游离酶的最适反应温度、pH 值以及热稳定性。并以所制备的固定化酶为催化剂, 在微水体系中利用菜籽油合成生物柴油, 考察了溶剂量、体系含水量、甲醇等因素对固定化酶催化性能的影响, 研究了固定化酶的操作稳定性。

关键词:多孔玻璃珠; 固定化; 脂肪酶; 生物柴油

中图分类号: Q81412

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)11-0040-03

Immobilization of lipase by controlled pore glass and its application in biodiesel synthesis

LUO Wen^{1,2}, TAN Tian-wei³, YUAN Zhen-hong^{1,2}, LU Peng-mei^{1,2}, WANG Fang³

(1. Guangzhou Institute of Energy Conversion, CAS, Guangzhou 510640, China;

2. Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate, CAS, Guangzhou 510640, China;

3. Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The lipase from *Candida* sp. 99-125 is immobilized on aminated controlled pore glass surfaces by the cross-linking process. The comparison between immobilized lipase and free lipase is carried out in the optimal catalytic temperature and pH value, and thermal stability. The catalytic properties of immobilized lipase for producing biodiesel in low aqueous media are also studied. The effects of solvent volume, water content (water/oil weight ratio), methanol/oil ratio on the immobilized lipase is investigated and the operational stability of the immobilized lipase is studied.

Key words: controlled pore glass; immobilization; lipase; biodiesel

生物柴油的生产方法主要有化学法和生物酶法。生物酶法转化克服了化学法的一些缺点, 日益受到重视^[1-3], 但生物酶法制备生物柴油目前也存在一些瓶颈问题: 短链醇及产物甘油对脂肪酶具有毒性、脂肪酶寿命短、价格昂贵等^[4]。寻找好的固定化方法和载体, 提高酶在反应体系中的稳定性及其使用寿命, 降低酶成本显得尤为重要。常用的酶固定化方法有包埋法、交联法、吸附法和共价结合法^[5], 其中共价结合法以其结合力强、酶不易脱落、稳定性良好的优点而备受关注。对于固定化载体, 选择多孔玻璃珠等为疏水性载体, 可以使得亲脂性的脂肪酶分子以开放构象形式强烈吸附于载体疏水表面^[6], 并有利于生物柴油体系中黏度大的疏水性底物油脂分配到载体周围及疏水产物甲酯的扩散。另外多孔玻璃珠具有比表面积大、化学稳定性好、机

械强度高的优点, 能使催化剂易于分散^[7]。笔者利用多孔玻璃珠为载体, 以 3-氨基丙基三乙氧基硅烷对载体表面进行修饰, 再以戊二醛为交联剂, 对假丝酵母 99-125 脂肪酶进行了固定, 比较了固定化脂肪酶与游离脂肪酶的部分性质, 并考察了所制备的固定化酶在微水相中催化合成生物柴油的催化性能, 研究了固定化酶的操作稳定性。

1 实验部分

1.1 主要实验材料和仪器

假丝酵母 (*Candida* sp. 99-125) 脂肪酶, 北京化工大学; 多孔玻璃珠 (80 目), 唐山市兆亿玻璃有限公司; 菜籽油, 市售; 橄榄油为化学纯, 其他试剂均为分析纯。气相色谱仪, 日本岛津 GC-2010; TGL-16 高速台式离心机, 上海医用分析仪器厂。

收稿日期: 2007-08-16

作者简介: 罗文 (1981-), 女, 硕士, 研究助理, 主要从事生物柴油的研究; 吕鹏梅 (1973-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事生物柴油新工艺和生物质能源利用研究, 通讯联系人, 020-87057760, lvpm@ms.giec.ac.cn。

1.2 多孔玻璃珠的活化

多孔玻璃珠的预处理:将多孔玻璃珠置于110℃烘箱中加热3 h,去除有机吸附物;然后放于5%(m/V)的硝酸溶液中于75℃下加热45 min;用蒸馏水洗净,干燥过夜;将10 g处理后的载体于15% HCl(m/m)中煮沸30 min,过滤,充分干燥,备用。

载体表面与有机硅烷的衍生化^[8-9]:将10 g处理后的载体加入到10 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷与40 mL 甲苯的混合物中,搅拌,110℃下加热回流8 h;冷却、抽滤,用甲苯浸泡,洗涤3次,再用乙醚洗去甲苯,真空干燥,得到烷基胺载体。

烷基胺载体的活化^[10]:将2 g烷基胺载体加入至100 mL 0.5%(V/V)戊二醛溶液(溶解于pH 7.4的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液中),75℃下振荡90 min,此间载体颜色变成橘黄色;用大量磷酸盐缓冲溶液浸泡清洗,直至无戊二醛残留,过滤。

1.3 脂肪酶的固定化

将800 mg脂肪酶溶于100 mL磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 7.4)中,离心(2 400 r/min),取100 mL酶液,加入2 g已活化的载体;在室温下振荡混合物;反应8 h后,用大量缓冲液清洗过滤,真空冷冻干燥后于4℃下保存。

1.4 固定化脂肪酶催化合成生物柴油

基本反应体系含有菜籽油、甲醇、石油醚和固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶,在50 mL具塞锥形瓶中,40℃密闭振荡反应,摇床转速为180 r/min。

脂肪酶水解活力橄榄油乳化液水解滴定法测定^[11]。1个酶活单位(u)定义为在最适作用条件下(40℃, pH 8.0时),在1 min催化产生1 μmol 脂肪酸的酶量。脂肪酸甲酯含量采用气相色谱法分析。

2 结果与讨论

2.1 载体活化及脂肪酶固定化反应历程

多孔玻璃珠表面的羟基与硅烷化试剂3-氨基丙基三乙氧基硅烷反应,载体表面接入氨基;再用交联剂戊二醛对载体进行活化:戊二醛的一个醛基与载体表面的氨基以共价键结合后,载体表面接入醛基。载体上的醛基将与酶蛋白分子的氨基结合而将脂肪酶固定。

2.2 固定化酶的性质

温度升高既可以加快酶促反应速度,提高酶活力,又会导致酶热失活,降低活力。实验发现固定化酶的最适温度为40~45℃,比游离酶最适反应温度(40℃)范围有所变宽,并且温度在40℃以上时,固

定酶的相对活力大于同一温度下游离酶的相对活力。这说明了游离酶经固定化后热稳定性升高,这可能是因为固定化过程稳定了酶分子的构象,因而使固定化酶的临界变性温度提高。

固定化处理对酶反应最适pH的影响主要取决于固定化载体的性质以及酶蛋白的电荷状态^[12]。活化后的载体上的醛基在作用固定化脂肪酶时,消耗了脂肪酶上的一些氨基,改变了其微观环境,造成局部羧基含量增大,造成酶分子微环境与主体溶液之间的H⁺的浓度差,使固定化酶偏碱性条件下的稳定性优于游离酶,而酸性条件下比游离酶差。实验结果显示,当缓冲液pH为8.0时,固定化酶与游离酶的活力均达到最高值。随着溶液酸性的增强,固定化酶酶活力比游离酶下降快,而在pH大于8.0的碱性范围内固定化酶的稳定性比游离酶高。

关于酶的热稳定性,实验测定了酶在各个温度下保持1 h后的活力。随着温度的增加,游离酶活力逐渐下降,在60℃已基本失活;固定化酶活力则随着温度的增加,酶相对活力在轻微增加后才下降,在50℃下保存1 h后,固定化酶相对酶活达到最高值(143%),固定化酶在70℃下,酶活还能维持为初始酶活的86%。可见经改性多孔玻璃珠固定化工艺后,脂肪酶的热稳定性明显提高。可见改性多孔玻璃珠对脂肪酶的固定,稳定了脂肪酶构象,使其热稳定性提高。固定化酶相对活力随着温度的变化情况则可能与酶分子在载体上的状态有关。

2.3 固定化酶合成生物柴油的催化性能

2.3.1 不同溶剂量量的影响

在实验条件下,转化率随着溶剂量量的增大而升高,但是当体系中溶剂量超过5 mL/g(针对每克菜籽油)时,反应转化率又有所降低。有机溶剂的加入能改善底物的溶解性,提高底物和产物之间的传质,更能降低短链醇在底物中的浓度,降低酶蛋白的毒性;另外有机溶剂的加入也有利于反应底物与酶活性中心进行立体定位接触^[13]。但底物浓度稀释到一定的限度后则不利于反应进行。

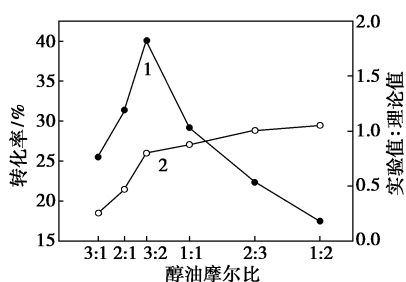
2.3.2 初始水分含量的影响

随着初始水分含量增加,生物柴油转化率升高,当初加水量达到油质量的20%时,转化率达到最大;继续增加水量,转化率反而降低。可见只有适量水分吸附在酶分子微环境中才能保证酶分子的正常催化活性。非水相中酶的稳定性与非水相中的微量水对酶蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性的影响有关^[14]。水含量的影响还可能与体系的传质

和所存在的反应种类有关,底物油脂不溶于水,过量的水必将影响反应体系的传质;另外对于油脂的醇解过程,通常存在着水解和酯化过程^[15-16],水含量过高,将导致三甘酯的水解作用加强。

2.3.3 甲醇对固定化酶活性的抑制作用

甲醇等低碳醇因其较强的极性和亲水性对酶有很强的破坏能力,影响其活性和稳定性,因而对酶促反应有着很强的抑制作用。从图 1 可看出,随着醇油比的增加,生物柴油转化率逐渐升高。当醇油比 3:2 时达到最大值,随后迅速下降,这是因醇对酶产生强烈的抑制作用而使生物柴油转化率迅速下降。同时从转化率的实验值/理论值变化情况还可以看出,随着醇/油比的增大,醇的抑制作用先缓慢增大,当醇油比大于 3:2 时,醇对酶催化反应的抑制作用迅速增强。当醇油比为 3:2 时,反应转化率远高于 1:1 时,而实验值/理论值比值相近。可以采用分步加入甲醇的方法来减少过量的甲醇对酶催化的抑制作用。若从节省反应时间的角度来考虑,可以选择反应的第一步流加醇油比为 3:2。



反应条件:1 g 菜籽油,5 mL 石油醚,200 μ L 去离子水,
2.5 g 固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C 下反应 10 h
1—转化率;2—实验值/理论值

图 1 不同醇油比对固定化酶活性的影响

2.3.4 固定化脂肪酶的操作稳定性

在实验条件下,采用 3 次流加甲醇的方式在石油醚中合成生物柴油,每一批次反应后过滤出固定化酶,用叔丁醇清洗后继续进行下一批次的反应,固定化酶连续反应 13 批(每批 30 h)后,生物柴油反应转化率仍维持在 70% 以上。固定化脂肪酶的半衰期在 390 h 以上。此固定化脂肪酶具有良好的操作稳定性。

3 结语

以氨基化多孔玻璃珠为载体、戊二醛为交联剂对游离脂肪酶进行共价法固定后,热稳定性及 pH

大于 8.0 的碱性范围内的稳定性均得到了提高。所制备的固定化脂肪酶在微水有机相中能有效地催化菜籽油和甲醇的酯交换反应,并有着良好操作稳定性(半衰期大于 390 h)。其在生物柴油的生物合成方面具有应用前景。

参考文献

- [1] Öznur K, Melek T, Ayse A H. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(2): 125 - 129.
- [2] Yuji S, Yomi W, Akio S, et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/4/5): 133 - 142.
- [3] Wang L, Du W, Liu D H, et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43(12): 29 - 32.
- [4] 张呈平, 杨建明, 吕剑. 生物柴油的合成和使用研究进展[J]. *工业催化*, 2005, 13(5): 9 - 13.
- [5] 李彦锋, 李军荣, 伏莲娣. 固定化酶的制备及应用[J]. *高分子通报*, 2001, 4(2): 13 - 17, 23.
- [6] Roberto F L, Pilar A, Pilar S. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998, 93: 185 - 197.
- [7] 袁启华, 罗大兵, 雷丽文. 载体多孔玻璃微珠的制备及其应用[J]. *硅酸盐通报*, 2000(3): 52 - 55.
- [8] 柏正武, 尹传奇, 吴莉, 等. 用氨基化硅胶和甲醛固定脂肪酶的研究[J]. *化学与生物工程*, 2004(1): 29 - 31.
- [9] Zhang Q, Ziu H F, Wang H L, et al. Synthesis of a silica-bonded bovine serum albumin s-triazine chiral stationary phase for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 866: 173 - 181.
- [10] Warakorn L, Panote T, Proespichaya K, et al. Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004(19): 813 - 821.
- [11] Wanabe N, Ota Y, Minoad Y, et al. Isolation and identification of kaline lipase producing microorganisms cultural conditions and properties of crude enzymes[J]. *Agric Biol Chem*, 1977, 41: 1353 - 1358.
- [12] 王燕, 张凤宝, 朱怀工, 等. 弱碱性大孔树脂固定化氨基酰化酶的性能研究[J]. *化学反应工程与工艺*, 2005, 21(1): 60 - 64.
- [13] 聂开立, 王芳, 谭天伟. 固定化酶法生产生物柴油[J]. *现代化工*, 2003, 23(9): 35 - 38.
- [14] Wang Z, Feng Y, Cao S. Effect of micro-water on the lipase in organic solvent and its control[J]. *Adv Nat Sci*, 2002, 12(2): 130 - 134.
- [15] 罗贵民, 曹淑桂, 张今. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [16] Sulaiman A Z. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study[J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21: 1442 - 1448. ■