

大孔树脂固定化脂肪酶及在微水相中催化合成生物柴油的研究 Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media

高 阳, 谭天伟*, 聂开立, 王 芳

GAO Yang, TAN Tian-Wei*, NIE Kai-Li and WANG Fang

北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

摘 要 以不同大孔树脂吸附法固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶, 在微水有机相中的应用表明非极性树脂 NKA 是最佳的固定化载体。分别以正庚烷及磷酸盐缓冲液作为固定化介质, 发现在正庚烷介质中树脂 NKA 的固定化效率能够达到 98.98%, 与采用磷酸盐缓冲液作为介质相比, 固定化酶的水解活力和表观酶活回收率分别提高了 4.07 和 3.43 倍。考察了在微水相中固定化酶催化合成生物柴油的催化性能, 结果表明, 在给酶量为 1.92:1(初始酶粉与树脂的质量比), pH 值为 7.4, 体系水含量为 15%(水与油的质量比), 反应温度为 40℃ 条件下, 固定化酶具有最佳的催化能力; 以正庚烷为介质固定化脂肪酶催化合成生物柴油, 采用三次流加甲醇的方式, 单批转化率最高达到 97.3%, 连续反应 19 批以后转化率仍保持为 70.2%。

关键词 大孔吸附树脂, 固定化, 脂肪酶, 生物柴油

中图分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0114-05

Abstract Lipase from *Candida sp.* 99-125 was immobilized by physical adsorption onto macroporous resins. The results showed that the nonpolar resin NKA was the best carrier used in low aqueous media. 98.98% of degree of immobilization can be achieved when the adsorption procedure was performed in the presence of heptane. The hydrolytic activity and the apparent activity recovery of lipase adsorbed on resin in heptane was 4.07 and 3.43 times higher than that of lipase adsorbed in sodium phosphate buffer, respectively. The catalytic properties of immobilized lipase for production of biodiesel in low aqueous media were studied. Immobilized lipase displayed the highest activity when the crude enzyme/resin weight ratio was 1.92:1 and the water content(water/oil weight ratio) was 15% at 40℃ under pH 7.4. As lipase was adsorbed on NKA in heptane to produce biodiesel, the batch conversion rate can reach 97.3% when a three-step methanolysis protocol was used. After 19 consecutive batches, the conversion rate remained 70.2%.

Key words macroporous adsorption resin, immobilization, lipase, biodiesel

Received: July 13, 2005; Accepted: September 27, 2005.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development (863) Programme (No. 2002AA514030), National Natural Science Foundation of China(No. 20176002), National Research Project for the Tenth Five-year Plan(No. 2004BA411B05) (No. 2004BA71B08-02) and Commission Project by Sinopec(No. 202059).

* Corresponding author. Tel: 86-10-64416691; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家高技术研究发展计划项目(No. 2002AA514030)、国家自然科学基金(No. 20176002)、国家“十五”攻关项目(No. 2004BA411B05)(No. 2004BA71B08-02)及中石化(No. 202059)资助项目。

脂肪酶(EC3.1.1.3)是一类特殊的酰基水解酶,多被用来催化一些酯类合成和转化反应。随着世界范围内能源短缺和环境优化的需要,生物柴油(即脂肪酸单酯)的应用成为关注和研究的热点,其中生物酶法合成生物柴油已成为生物柴油研究的重要方向^[1,2],其途径就是利用动植物及废弃物油脂,经脂肪酶的催化进行酰基转移反应。但游离酶在反应过程中容易结块,仅能使用一次且造成产品分离困难,使得固定化成为必需^[3]。根据脂肪酶独特的理化特性,将酶固定化在大孔聚合物等疏水性载体上,不仅可以提高酶在反应体系中的扩散效果和热力学稳定性,调节和控制酶的活性与选择性,并且有利于酶的回收和产品的连续化生产^[4,5,6]。

本文利用几种疏水大孔树脂吸附法固定假丝酵母99-125脂肪酶,通过固定化条件的优化,比较了不同树脂的固定化效率和固定化酶的催化效果,并在微水体系中利用大豆油合成生物柴油,考察了给酶量、温度、pH值、体系水含量、甲醇流加等因素对固定化酶催化性能的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

假丝酵母(*Candida* sp. 99-125)脂肪酶,实验室自行发酵;大孔树脂 NKA-9、AB-8、H103、D4020 和 NKA,南开大学化工厂馈赠;大豆色拉油,福临门牌,市场购置;橄榄油(化学纯),其它试剂(均为分析纯),北京韦斯化学试剂公司。

1.2 方 法

1.2.1 固定化脂肪酶:

(1)在磷酸盐缓冲液中固定化脂肪酶:150mg 假丝酵母脂肪酶溶解在 5mL 0.1 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液中,2400r/min 离心 3min 除去杂质,吸取 4mL 上清酶液并加入 250mg 大孔吸附树脂,室温过夜。抽滤,用相同缓冲液淋洗,室温干燥。不同 pH 值条件下酶的固定化分别采用不同 pH 值的磷酸盐缓冲液处理。酶在不同介质中固定化进行对比实验时,略去离心步骤。

(2)在正庚烷中固定化脂肪酶^[7]:120mg 假丝酵母脂肪酶、250mg 大孔树脂与 5mL 正庚烷混合均匀,室温过夜。抽滤,用正庚烷淋洗,室温干燥。

1.2.2 固定化脂肪酶催化合成生物柴油^[8]:基本反应体系为 50mL 具塞锥形瓶中,加入 1 g 大豆油,139.5 μ L 甲醇,3mL 正庚烷,150 μ L 去离子水,约 250mg 以磷酸盐缓冲液为介质固定所得固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C 条件下磁力搅拌反应 12~24h。

1.2.3 脂肪酶水解活力的测定:采用经典的橄榄油乳化法^[9]。酶活单位定义为在 40 $^{\circ}$ C, pH8.0 条件下每 min 催化产生 1 μ mol 脂肪酸的酶量定义为一个酶活单位(u)。

表观酶活回收率按下式计算:表观酶活回收率 = 固定化酶表观活力/固定化时加入的总酶活力 \times 100%。

1.2.4 蛋白质含量的测定:蛋白质含量分析采用 Bradford 法^[10],以牛血清蛋白为标准蛋白。

酶固定化效率按下式计算:固定化效率 = (初始酶粉或酶液总蛋白 - 残液总蛋白)/初始酶粉或酶液总蛋白 \times 100%。

1.2.5 产物脂肪酸甲酯含量的测定:采用气相色谱法分析,利用 GC-2010 气相色谱仪,DB-1ht 毛细管柱(0.25mm \times 30m \times 0.1 μ m, Agilent),高纯氮作载气,二阶程序升温,柱温由 100 $^{\circ}$ C 到 300 $^{\circ}$ C,升温速率 10 $^{\circ}$ C/min;由 300 $^{\circ}$ C 到 350 $^{\circ}$ C,升温速率 5 $^{\circ}$ C/min。利用氢火焰离子检测器,检测器温度 375 $^{\circ}$ C,气化室温度 370 $^{\circ}$ C。

2 结 果

2.1 固定化载体的选择

2.1.1 固定化载体对脂肪酶水解活力的影响:固定化载体的物理化学性质是影响固定化效率和固定化酶催化能力的重要因素。从表 1 中可以看出,对于比表面积相当的大孔树脂,非极性系列树脂的固定化效率相对较高,并且随着树脂孔径的增大固定化效率逐渐增大。

表 1 不同树脂对脂肪酶固定化效果的影响
Table 1 Effect of resin on immobilization of lipase

Resin	Polarity	Specific area/(m ² /g)	Pore diameter/nm	Degree of immobilization/%	Hydrolytic activity/(u/g)	Apparent enzyme recovery/%
NKA-9	Polar	250 ~ 290	15.5 ~ 16.5	16.84	10.53	16.53
AB-8	Weakly polar	480 ~ 520	13 ~ 14	62.06	38.88	60.98
H103	Nonpolar	1000 ~ 1100	8.5 ~ 9.5	84.13	16.96	26.60
D4020	Nonpolar	540 ~ 580	10 ~ 10.5	65.80	63.76	100
NKA	Nonpolar	570 ~ 590	20 ~ 22	72.85	25.92	40.65

* 100% of apparent enzyme recovery was dictated to D4020.

脂肪酶被固载在多孔载体以后,固定化酶催化活性的高低与酶所处的微环境密切相关。结果表明,由于弱极性或非极性树脂与非极性底物油脂分子存在较强的吸附作用力,酶蛋白进行催化时酶分子与微环境中底物的相互作用得以增强,以及产物能够及时排除,从而使得酶活力得以提高。

2.1.2 固定化载体对酯交换活力的影响:在微水有机相体系中,载体 NKA-9 以及 D4020 易遭有机溶剂正己烷的腐蚀,虽然 D4020 固载酶后酯交换活力最高,但考虑固定化酶不利于回收利用而不予选择。由图 1 可以看出,NKA 固定化酶催化活力高于 AB-8 和 H103,可能是由于 NKA 的平均孔径大于 AB-8 和 H103,因而内传质阻力较小而有利于酶蛋白与底物的接触,酶的酯交换活力较高。

另外,由于 NKA 固载酶后固定化效率和表观酶活回收率较高,后续实验均采用 NKA 作为载体。

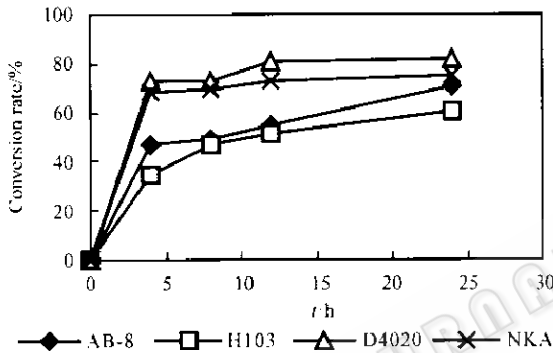


图 1 不同树脂对脂肪酶酯交换活力的影响
Fig. 1 Effect of resin on interesterification activity of immobilized lipase

2.2 固定化方法的比较

分别在不同极性的固定化介质磷酸盐缓冲液和正庚烷中固载脂肪酶,结果见表 2,在正庚烷中不仅获得了较高的固定化效率(98.98%),并且水解活力和表观酶活回收率分别提高了 4.07 和 3.43 倍。这可能与介质极性的改变使得酶分子的空间构象改变有关。

表 2 不同固定化介质对脂肪酶固定化效果的影响
Table 2 Effect of coupling media on immobilization of lipase

Coupling medium	Degree of immobilization/%	Hydrolytic activity / (u/g)	Apparent enzyme recovery/%
Buffer	80.83	156.18	29.15
Heptane	98.98	635.65	100

* 100% of apparent enzyme recovery was dictated in heptane.

脂肪酶可以在疏水的界面进行活化,疏水底物、有机试剂等的存在可与酶活性中心周围的疏水域相互作用,从而暴露出活性中心使得酶活性增加^[5]。

在水溶液介质中酶分子表面更多亲水性强的氨基酸残基暴露给介质,酶蛋白以一种紧密的构象存在;而在低极性的正庚烷(logP = 4.0)中,可能是酶分子活性中心附近的疏水域更易与介质发生作用,通过所谓的“界面活化机理”,酶分子的空间构象以开放的形式存在,活性中心暴露出来十分利于催化反应的进行,从而酶的催化活力较高^[3,6]。

另一方面,从图 2 可见,利用磷酸盐缓冲液作介质固定化脂肪酶催化合成生物柴油,转化率在 4 h 以内仅达 20%,而利用正庚烷作介质固载酶生物柴油转化率就可达 70%,酯交换活力能够极大地提高。

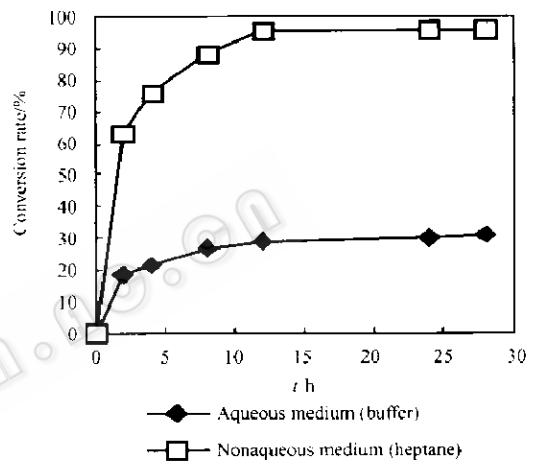


图 2 不同固定化介质对脂肪酶酯交换活力的影响
Fig. 2 Effect of coupling media on interesterification activity of immobilized lipase

2.3 固定化酶合成生物柴油的催化性能

2.3.1 给酶量对固定化酶活性的影响:从图 3 的结果可以看出,粗酶粉与树脂的质量比为 1.92:1 时,生物柴油的转化率相对最高;但是不断增加给酶量,转化率反而下降。原因可能是载体上偶联的酶蛋白随着给酶量的增大而增加,但给酶量越来越多,造成的空间位阻效应就越大,固定化酶的相对活力不断

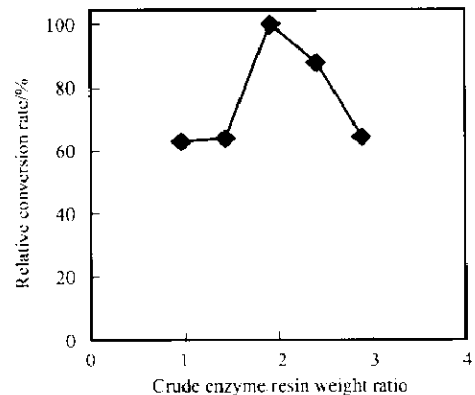


图 3 给酶量对固定化酶活性的影响
Fig. 3 Effect of enzyme loading on immobilized lipase

降低。因此存在一最佳给酶量来满足实验需求。

2.3.2 pH 值对固定化酶活性的影响:脂肪酶在固定化过程中经历的缓冲液中的表面离子状态可以在有机溶剂中维持,即脂肪酶表现出“记忆”效应。从图 4 可以看出,在 pH7.4 的条件下固定所得酶的酯交换活力最高。这是由于只有在特定的 pH 值下,酶分子上的活性基团才能处于最佳的离子状态。

由图 4 可知,在偏酸性条件下的酶活力高于在偏碱性条件下的酶活力,在 pH 值超过 8 以后酶活开始大幅下降。这与 Wisdom 等的结论相一致,可能是干燥过程使酶周围环境的 pH 值再次上升,发生了碱催化的 β -消除反应^[11],酶蛋白中胱氨酸部分降解而使酶失活。

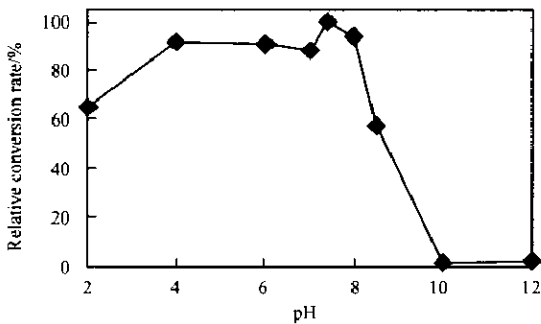


图 4 pH 值对固定化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on immobilized lipase

2.3.3 体系水含量对固定化酶活性的影响:在有机相反应体系中为使酶分子表现出最大活力,存在一个最佳含水量,这些“必需水”与酶分子表面的亲水基团相互作用,改变酶分子内氢键,使酶分子结构变得松散,酶的活性构象处于最佳状态。从图 5 可见,当水含量为 15% 时固定化酶催化活力最高。继续增加水含量产物转化率反而下降,酶活性不断降低,可能是水含量增加有利于水解反应的进行,对于转酯反应来说,活性降低。

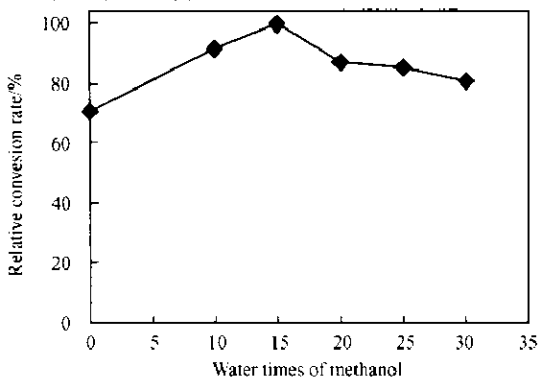


图 5 体系水含量对固定化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of water content in reaction system on immobilized lipase

2.3.4 反应温度对固定化酶活性的影响:图 6 给出了温度对固定化酶活性的影响,结果显示固定化脂肪酶的最适作用温度为 40℃,反应温度高于 45℃ 以后生物柴油的转化率迅速下降,说明酶失活相对较快。

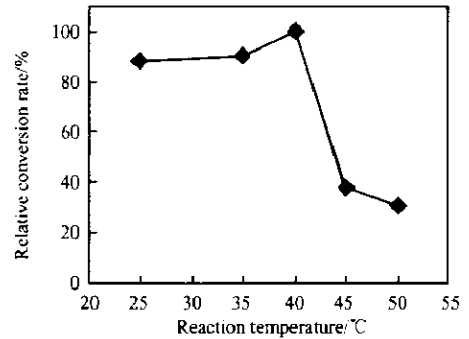


图 6 反应温度对固定化酶活性的影响

Fig. 6 Effect of reaction temperature on immobilized lipase

2.3.5 甲醇对固定化酶活性的抑制作用:甲醇等低碳醇因其强极性和强亲水性对酶蛋白有很强的破坏能力,能够影响酶的稳定性和活性,对酶促反应有着很强的抑制作用。可以采用在反应过程中分段加入甲醇的方法来消除过量的低碳醇对酶催化的抑制作用^[12]。

采用理论最佳油醇摩尔比(1:3),将相同质量的甲醇平均分 1 次、2 次、3 次或 4 次均匀加入反应体系中,由图 7 可知,流加甲醇可以较好地改善甲醇的抑制作用提高转化率。流加次数增多,甲醇对酶促反应的抑制越弱,转化率提高,当流加次数为 3 次时,生物柴油的转化率达到最高,但是当流加次数大于 3 次,转化率反而降低。

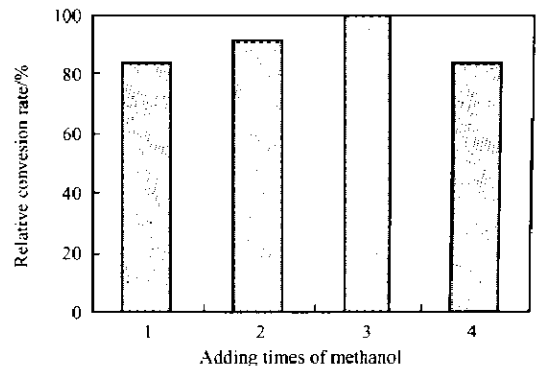


图 7 甲醇流加次数对固定酶活性的影响

Fig. 7 Effect of adding times of methanol on immobilized lipase

2.3.6 固定化脂肪酶的操作稳定性:在正庚烷介质中将脂肪酶固定在树脂 NKA 上,在微水正己烷中采用三次流加甲醇的方式合成生物柴油,每一批次反应后过滤出固定化酶继续进行下一批次的反应,结

果见图 8。固定化酶连续反应 19 批以后,生物柴油的转化率仍然保持为 70.2%,固定化酶的酶活为初始值的 85.1%,显示出固定化酶具有良好的操作稳定性。

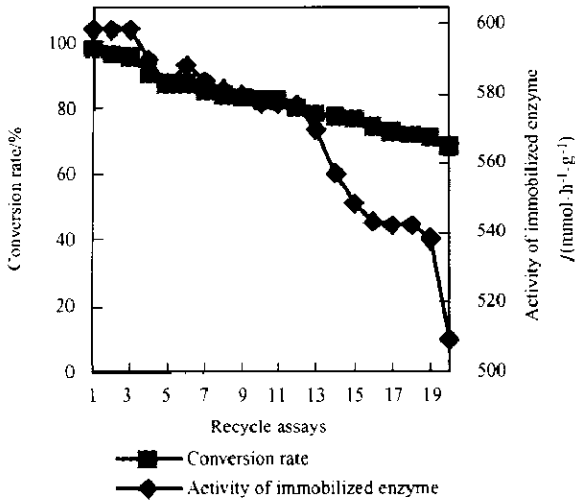


图 8 固定化脂肪酶的操作稳定性

Fig. 8 The operational stability of immobilized lipase

综上所述,大孔吸附树脂是固定化假丝酵母脂肪酶的优质载体,在正庚烷介质中固定化效果显著。非极性树脂 NKA 固定化假丝酵母脂肪酶在微水有机相中能够有效地催化大豆油脂与甲醇的酯交换反应,对于生物柴油(即脂肪酸单酯)的生物合成具有很大的应用潜力。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Yuji Shimada, Yomi Watanabe, Akio Sugihara *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17** (3-5): 133-142
- [2] Karl-Erich Jaeger, Thorsten Eggert. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**(4):390-397
- [3] Iso M, Chen B, Eguchi M *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2001, **16**(1):53-58
- [4] Mattias Persson, Irina Mladenoska, Ernst Wehtje *et al.* Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31** (6): 833-841
- [5] Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P *et al.* A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(5): 486-493
- [6] José M. Palomo, Gloria Muñoz, Gloria Fernández-Lorente *et al.* Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **19-20**:279-286
- [7] Pedro C de Oliveira, Gizelda M Alves, Heizir F de Castro. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, **5** (1):63-71
- [8] Nie KL(聂开立), Wang F(王芳), Tan TW(谭天伟). Biodiesel production by immobilized lipase. *Modern Chemical Industry(现代化工)*, 2003, **23**(9):35-38
- [9] Wanabe N, Ota Y, Minoad Y *et al.* Isolation and identification of kaline lipase producing microorganisms cultural conditions and properties of crude enzymes. *Agric Biol Chem*, 1977, **41**: 1353-1358
- [10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry*, 1976, **72**:248-255
- [11] Wisdom RA, Rosa MF, Aries Barrus MR. Enzymic enteresterification of fats, laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, **29**(9): 1081-1085
- [12] Deng L(邓利), Liu L(刘柳), Dong X(董贤) *et al.* Study on esterification reaction of fatty acids short chain ester by immobilized lipase from *Candida* sp.99-125. *Modern Chemical Industry(现代化工)*, 2002, **22**(9):30-33

《生物工程学报》加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,我刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览,并订阅本刊([Http://swgxcb.periodicals.com.cn](http://swgxcb.periodicals.com.cn))。