

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油 制备生物柴油稳定性的研究

徐炜枫, 陆兆新*, 吕凤霞, 别小妹, 房耀维
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 研究了固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油制备生物柴油的反应, 探索了酶的预处理方式、后处理方式、反应温度、甲醇的加入方式等对酶活稳定性的影响。结果表明: 将酶在油酸甲酯中浸泡 0.5h, 过滤后用菜籽油淋洗, 在菜籽油中浸泡 12h 可以提高酶活的稳定性; 多批次反应温度 40℃ 为适宜; 用丙酮洗涤酶除去甘油可以提高酶的稳定性; 分三步加入甲醇的方式可以减轻甲醇对酶的毒害。Lipozyme TL IM 经过预处理, 40℃ 下进行多批次反应, 每批反应 24h, 并在反应 0、8、16h 时加入 1 摩尔当量甲醇, 并在 8、16h 以及反应结束时用丙酮洗涤固定化酶并重新投入体系, 连续反应 10 批次, Lipozyme TL IM 相对酶活仍有 85%。

关键词: 生物柴油; Lipozyme TL IM; 菜籽油

Stability of Immobilized Lipozyme TL IM for Biodiesel Synthesis from Rapeseed Oil

XU Wei-feng, LU Zhao-xin*, LÜ Feng-xia, BIE Xiao-mei, FANG Yao-wei
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Lipozyme TL IM was used for the synthesis of biodiesel from rapeseed oil. The effects of pretreatment of the lipase,

收稿日期 2007-04-08

* 通讯作者

作者简介: 徐炜枫 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

- [3] ARMSTRONG G A. Genetics of eubacterial carotenoids biosynthesis: a colorful tale[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 628-659.
- [4] SANDMANN G, MISAWA N. New functional assignment of the carotenogenic genes crtB and crtE with constructs of these genes from *Erwinia* species[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 69(3): 253-257.
- [5] MATH S K, HEARST J E, POULTER C D. The crtE gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 6761-6764.
- [6] MISAWA N, NAKAGAWA M, KOBAYASHI K, et al. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene produce expressed in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(12): 6704-6712.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] RIGHETTI P G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications[M]. New York: Elsevier Biomedical Press, 1983.
- [9] BRADFORD M M. A novel method for protein estimation assay using brilliant blue G[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [10] OH S K, KIM I J, SHIN D H, et al. Cloning, characterization, and heterologous expression of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157: 535-542.
- [11] FRASER P D, MISAWA N, LINDEN H, et al. Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 19891-19895.
- [12] RUTHER A, MISAWA N, BOGE P, et al. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 162-167.
- [13] LOIS L M, RODRIGUEZ-CONCEPCION M, GALLEG0 F, et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase[J]. *The Plant Journal*, 2000, 22(6): 503-511.
- [14] MATTEWS P D, WURTZEL E T. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 396-400.
- [15] KUNTZ M, ROMER S, SUIRE C, et al. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening[J]. *Plant J*, 1992, 2(1): 25-34.
- [16] ENGPRASERT S, TAURA F, KAWAMUKAI M, et al. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Coleus forskohlii* Briq[J]. *BMC Plant Biol*, 2004, 18(4): 18-26.

rinsing the lipase with solvents, reaction temperature, way of addition of methanol on the stability of the lipase were investigated. The experiment showed that the lipase was more stable when Lipozyme TL IM was preincubated in oleic acid methyl ester for 0.5 h, and subsequently in rapeseed oil for 12 h. 40 °C was found to be the optimal reaction temperature of batch runs. The stability of the immobilized lipase was enhanced by rinsing the lipase with acetone to remove glycerol adsorbed on the support. A three-step methanolysis protocol was used to protect the immobilized lipase from inactivation by methanol. The pretreated Lipozyme TL IM was used to catalyse the methanolysis at 40 °C reacting 24 h as one batch. One molar equivalent of methanol was added at various reaction time in 0, 8 or 16 h respectively at each batch. Acetone was used to remove glycerol at 8, 16 or 24 h respectively at one time and the immobilized lipase was reused for the next step or batch. The residual activity of lipase is still about 85% after being continuously reacted for 10 batches.

Key words: biodiesel; Lipozyme TL IM; rapeseed oil

中图分类号: Q814.9 TQ645

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0279-04

生物柴油作为(biodiesel)可再生能源的一种, 主要指以任何天然的油或脂为原料与甲醇、乙醇等进行醇解化反应得到的脂肪酸甲酯(或脂肪酸乙酯)混合物, 不仅可以作为燃料直接燃烧, 而且也可作为柴油清洁燃烧的添加剂。目前工业化生产主要使用化学法合成生物柴油, 但存在工艺复杂、能耗较高、产品色泽较深、酯化产物难于回收、成本高等缺点^[1-2, 4]。为解决上述问题, 人们研究用生物酶法合成生物柴油, 即通过脂肪酶催化醇解反应, 制备相应的脂肪酸甲酯(FAME)或乙酯。酶法合成生物柴油具有条件温和、醇用量小、无污染物排放等优点^[1, 4], 但利用酶法反应过程中存在甲醇容易导致脂肪酶失活、反应时间较长、转化率较低等问题^[1, 3], 仍需深入研究和解决。

目前我国采用酶法制备生物柴油的研究还处于实验室研究阶段, 因酶本身的价格昂贵, 采用固定化脂肪酶可以进行分离、再生、循环使用, 降低成本。国内外研究较多的成品酶是固定化 *Candida antarctica* (Novozym 435), 相比固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化速率较快, 产率较高, 但其价格昂贵, 研究较多的是二者混合使用, 可降低酶的成本^[5], 单独研究 Lipozyme TL IM 的较少。清华大学^[6-7]研究较多, 使用 Lipozyme TL IM 催化大豆油合成生物柴油, 5 h 得率可以达到 92%, 但对批次反应中 Lipozyme TL IM 酶活稳定性的报道仍然很少。本实验研究了酶的预处理方式、后处理方式、反应温度、甲醇的加入方式等对批次反应中酶活稳定性的影响, 探讨了提高生物柴油制备中 Lipozyme TL IM 酶活稳定性的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM(75 IUN/g, 来源于 *T. languginosa*, 固定在硅胶颗粒上) 丹麦诺维信酶制剂公司; 脂肪酸甲酯标样为色谱纯 Sigma 公司; 二级菜籽油 南京江宁植物油厂; 其他溶剂均为分析纯或者色

谱纯。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶稳定性测定

在具塞 50ml 烧杯中放入 9.75g 菜籽油和适量的甲醇混合物, 加入 5ml 正己烷混匀后, 置于自动控温往复水浴摇床中加热至一定温度后, 加入一定量的脂肪酶 Lipozyme TL IM 开始反应, 反应 24h 作为一个批次。取上层液 100 μ l 用正己烷稀释至 1ml, 与等量的 2mg/ml 十七碳酸甲酯(内标物)正己烷溶液混匀, 由气相色谱进行脂肪酸甲酯(FAME)含量测定。反应结束后, 将固定化脂肪酶过滤出、清洗、烘干。将烘干后的脂肪酶投入下一批次循环使用, 以第一批反应所得的脂肪酸甲酯得率为相对酶活 100%, 作为循环次数 0。

1.2.2 气相色谱分析

使用 Agilent 6890 气相色谱仪进行气相分析, DB-1701 毛细管柱(半径 0.32mm, 长 30m), FID 检测器。载气(氮气)流速 20ml/min, 氢气流速 30ml/min, 空气流速 300ml/min。采用程序升温, 220°C 维持 30s 后以 5°C/min 升温至 250°C, 维持该温度 55min。进样口与检测器温度分别为 245°C 与 280°C。

2 结果与分析

2.1 酶的预处理对酶活稳定性的影响

固定化酶预处理参照 TAICHI 等^[8]的方法进行。将一定量的固定化酶 Lipozyme TL IM 在油酸甲酯中浸泡 0.5h, 过滤后用菜籽油淋洗, 在菜籽油中浸泡 12h。分别使用经过预处理与未经过预处理的固定化酶 Lipozyme TL IM 进行稳定性测试, 每个批次反应结束后使用丙酮清洗固定化酶, 连续反应五个批次, 结果见图 1。

由图 1 可知, 经过预处理的固定化酶在四次循环利用后有约 70% 的相对酶活, 稳定性较好。而未经预处理的固定化酶在四次循环后, 相对酶活下降至 40% 左右。可见, 油酸甲酯浸泡 0.5h, 过滤后用菜籽油淋洗,

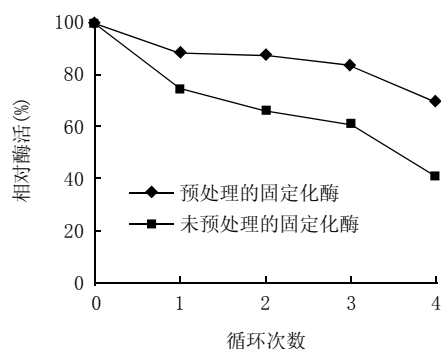


图1 预处理对酶活稳定性的影响

Fig.1 Effects of pretreatment of lipase on its stability

在菜籽油中浸泡 12h 这样一个预处理可以显著提高固定化酶的稳定性, 提高循环次数。这可能由于预处理使得部分油酸甲酯和菜籽油浸透到载体中, 而油酸甲酯是一种表面活性剂, 改善了固定化酶的表面性质, 提高油与固定化酶的亲和力^[14], 同时阻止了甲醇与脂肪酶的直接接触, 避免了甲醇所造成的脂肪酶失活。以后的实验中均对固定化酶作了预处理。

2.2 酶的后处理对酶活稳定性的影响

甘油是转酯法生产生物柴油反应过程中的副产物。Dossat^[10]等人证明了在使用 Lipozyme TL IM 催化转酯反应中, 甘油完全吸附在固定化酶的表面, 产生阻塞载体微孔、增大传质阻力、阻碍疏水性底物扩散等的负面效果。吴虹^[11]等人也证实了这一点, 而且发现使用亲水性而又对酶活影响小的有机溶剂冲洗固定化脂肪酶表面的甘油可以大大提高酶的稳定性^[9-10, 12]。在本实验中, 每次循环后分别选择了丙酮、异丙醇、正丁醇、叔丁醇冲洗固定化酶表面, 同时作无溶剂处理作为对照, 连续反应五个批次后结果如图 2。

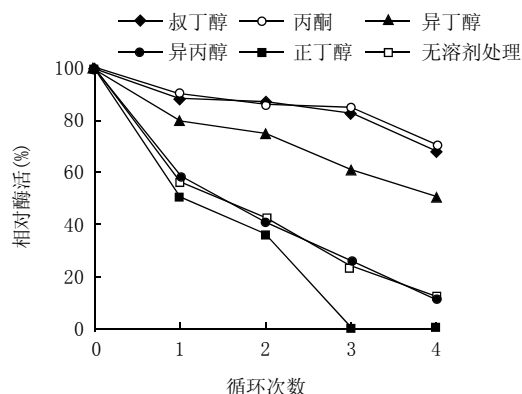


图2 有机溶剂冲洗对酶活稳定性的影响

Fig.2 Stability of lipase washed with solvents

从图 2 可知, 使用丙酮和叔丁醇的效果较好, 相对酶活下降相对平缓, 在四次循环后仍有约 70% 的酶活, 异丙醇次之, 而异丙醇与未进行溶剂处理的结果

相近, 四次循环后有约 10% 的酶活, 正丁醇则会破坏酶的稳定性, 三次循环后就几乎未检测到 FAME 的得率, 其相对酶活为 0。可见, 丙酮和叔丁醇可以提高酶的稳定性, 长链醇、支链醇分别比短链醇、直链醇更能提高酶的稳定性, 这与 JECH-WEI^[13]等人也在实验中所发现的相同。JECH-WEI 等人还发现叔丁醇可以使由于甲醇造成失活的脂肪酶再生。本实验中丙酮和叔丁醇的效果相近, 由于丙酮的易挥发性, 易于和脂肪酶分离, 从而在以后的实验中均采用丙酮冲洗脂肪酶。

2.3 反应温度对酶活稳定性的影响

温度是影响酶活稳定性的一个重要参数, 选择适当的反应温度可以延长酶的使用寿命。本实验中选择 30、40、50℃ 作为多批次反应温度的研究对象。从表 3 可知, 30℃ 的反应条件下, 四次循环后相对酶活最高, 但在此温度下 FAME 得率低, 第一个批次反应仅有 45.8% 的 FAME 得率; 50℃ 条件下, 前两次循环的得率都较高, 第一批次反应得率为最高, 为 80.4%, 但酶活损失较快, 四个循环后仅存 35.5% 的相对酶活。这说明单批反应中, 温度越高, 固定化酶 Lipozyme TL IM 的反应速率越快, 得率越高, 50℃ 为最佳的反应温度, 酶活下降得快, 在多批次反应中, 50℃ 不是适宜温度。因此, 在多批次反应中, 综合考虑 FAME 得率和酶活稳定性, 40℃ 为适宜的反应温度。

表1 温度对酶活稳定性以及脂肪酸甲酯得率的影响

Table 1 Effects of temperature on stability of lipase and yield of FAME

循环次数	相对酶活 (%)			FAME 得率 (%)		
	30℃	40℃	50℃	30℃	40℃	50℃
0	100	100	100	45.8	65.3	80.4
1	92.4	88.3	87.4	42.3	57.7	70.2
2	88.5	85.9	70.3	40.5	56.1	56.5
3	80.9	76.2	50.2	37.0	49.8	40.3
4	77.5	70.1	35.5	35.5	45.7	28.5

2.4 分次甲醇对酶活稳定性的影响

醇解反应的非水相体系中, 甲醇在油脂中溶解度差, 直接与酶接触可以使其变性失活, 同时也可通过剥夺酶分子的“必需水”间接使其失活。为了避免酶的失活, 本实验探索了分次加入甲醇的方式。醇油反应中甲醇所需的量为 3mol 当量, 一次性加入是在每批反应开始时加入 3mol 当量的甲醇; 分两次加入是在每批反应中 0、12h 分别加入 1.5mol 当量的甲醇, 同时在 12h 时将酶滤出, 使用丙酮进行冲洗并重新投入体系; 采取分三次加入方式是指, 在每批反应中 0、8、16h 分别加入 1mol 当量的甲醇, 同时在 8、16h 时将酶滤出, 使用丙酮进行冲洗并重新投入体系。反应进行四个循环结果如表 2。

从表 2 可见, 采取三次加入甲醇的方式使酶活稳定

表2 甲醇加入方式对酶活稳定性以及脂肪酸甲酯得率的影响
Table 2 Effects of addition ways of methanol on stability of lipase and yield of FAME

循环次数	相对酶活 (%)			FAME 得率 (%)		
	一次性加入	两次加入	三次加入	一次性加入	两次加入	三次加入
0	100	100	100	62.8	65.4	70.3
1	89.6	90.6	97.3	56.3	59.3	68.4
2	86.3	87.6	95.7	54.2	57.3	67.3
3	78.9	81.3	92.6	49.6	53.2	65.1
4	65.1	76.7	91.3	40.9	50.1	64.2

性显著提高,反应四个循环后相对酶活可达91.3%,而对应的一次性加入甲醇的方式仅有65.1%的相对酶活。在第一批反应的结果可以看到,分三次加入甲醇后所得的FAME得率最高,分两次加入次之,均比一次性加入提高了FAME得率,说明分次加入甲醇可以使反应体系中甲醇始终保持较低的浓度水平,降低甲醇对酶的毒害作用,提高了产率。因此,分次加入甲醇既可以提高酶的稳定性,也可以提高FAME的得率,分三次加入为最佳。

3 结 论

固定化脂肪酶Lipozyme TL IM预处理、丙酮或叔丁醇洗涤酶,较低反应温度以及分多次加入甲醇等方式均有利于提高酶活的稳定性。Lipozyme TL IM在油酸甲酯中浸泡0.5h,过滤后用菜籽油淋洗,在菜籽油中浸泡12h,40℃下进行多批次反应,单批反应24h,每批反应结束后均用丙酮冲洗酶。每一批次反应均采取三步加入的方式加入甲醇,并在第二、三步加入甲醇同时将酶滤出,丙酮洗涤后重新投入反应体系,连续反应10批次,9个循环后Lipozyme TL IM仍有85%的相对酶活(见图3)。

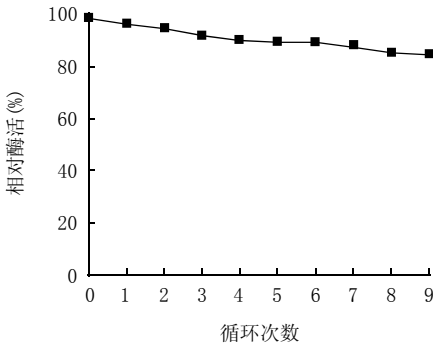


图3 固定化酶Lipozyme TL IM的酶活稳定性
Fig.3 Stability of immobilized lipzyme TL IM

参考文献:

- [1] SHIMADA Y, WATANABE Y, SUGIHARA A, 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: 133-142.
- [2] SOUMANOU M M, BORNSCHEUER U T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 97-103.
- [3] XU Yuan-yuan, DU Wei, LIU De-hua, et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 1239-1241.
- [4] 张晓鸣, 周健, 刘巧瑜, 等. 有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 120-126.
- [5] LILi-lin, DUWei, LIUDe-hua, et al. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43: 58-62.
- [6] 徐圆圆, 杜伟, 刘德华, 等. 非水相脂肪酶催化大豆油脂合成生物柴油的研究[J]. 现代化工, 2003, 23: 167-169.
- [7] DU Wei, XU Yuan-yuan, LIU De-hua, et al. Study on acyl migration in immobilized lipzyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 37: 68-71.
- [8] SAMUKAWA T, KAIEDA M, MATSUMOTO T, et al. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(2): 180-183.
- [9] DUWei, XU Yuan-yuan, LIUDe-hua. Lipase-catalysed transesterification of soybean oil for biodiesel production during continuous batch operation [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2003, 38: 103-106.
- [10] DOSSAT V, COMBES D, MARTY A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(3/5): 194-200.
- [11] 吴虹, 宗敏华, 娄文勇. 无溶剂系统中固定化脂肪酶催化废油脂转酯生产生物柴油[J]. 催化学报, 2004, 25(11): 903-908.
- [12] MOHAMED M M, BORNSCHEUER U T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(1): 97-103.
- [13] JECH-WEI C H, WEN-TENG W. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(5): 466-469.
- [14] 盛梅, 郭登峰. 固定化酶催化菜籽油合成生物柴油稳定性研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(5): 68-70.