

反胶束体系中脂肪酶催化合成生物柴油

刘伟东, 聂开立, 鲁吉珂, 谭天伟, 王芳

北京化工大学, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029

摘要: 本文采用了实验室自制的 *Candida* sp.99-125 脂肪酶, 研究了其在丁二酸二酯磺酸钠(AOT)反胶束体系中, 催化大豆色拉油合成生物柴油的新方法。考察了溶剂极性、AOT浓度、 W_0 (水与表面活性剂质量比)、缓冲溶液pH值、温度等因素对脂肪酶催化合成生物柴油的影响。研究结果表明: AOT/异辛烷反胶束体系为 *Candida* sp.99-125 脂肪酶催化提供了较为合适的微环境, 在 W_0 为 11, 表面活性剂浓度为 50 mmol/L, 温度为 40℃, 缓冲液pH值为 7 的 AOT/异辛烷反胶束体系中, 醇油摩尔比为 3:1, 摇床转速为 180 r/min, 采用 12h3 次流加 1 mol当量的甲醇, 单批最高酯转化率可以达到 90%。

关键词: 反胶束, 脂肪酶, 生物柴油, 酯交换

Biodiesel Production by Lipase in Reversed Micellar Systems

Weidong Liu, Kaili Nie, Jike Lu, Tianwei Tan, and Fang Wang

Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: We used *Candida* sp. 99-125 lipase in bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) reversed micellar systems to produce biodiesel from soybean oil. We studied the effects of solvent, concentration of AOT, ratio of water and AOT, buffer pH, temperature and rotating speed on the transesterification. Results showed that AOT reversed micellar systems provided a suitable micro-environment for biodiesel production. The optimal parameters were: the ratio of water and AOT 11, AOT concentration 50 mmol/L, temperature 40 °C, pH 7, molar ratio of methanol and oil 3, and rotating speed 180 r/min. The transesterification rate reached 90% when a 3-step methanolysis protocol was used.

Keywords: reversed micellar, lipase, biodiesel, transesterification

反胶束是表面活性剂在非极性有机溶剂中自发形成的纳米集聚体, 其内部可溶解水和其它水性分子, 反胶束具有独特的结构特征, 所成的膜能将油水两相分开, 高度分散的反胶束体系不仅为酶催化提供巨大的相界面, 且避免了酶和周围有机相接触,

从而使酶保持较高活性^[1]。

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3, 甘油酯水解酶)是一种作用于油水界面上的水解酶, 其底物油脂在水中不易分散, 需借助于有机溶剂才能溶解, 而酶直接暴露于有机溶剂中容易失活, 反胶束介质提高了脂肪

Received: April 20, 2007; Accepted: May 25, 2007.

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20576013); the National Science Found for Distinguished Young Scholars of China (No. 20325622); the Natural Science Foundation of Beijing, China (No. 2071002).

Corresponding author: Fang Wang. Tel: +86-10-64434815; E-mail: wangfang@mail.buct.edu.cn.

国家自然科学基金资助 (No. 20576013); 杰出青年基金资助 (No. 20325622); 北京市自然科学基金 (No. 2071002)。

酶的催化活性,一方面,反胶束介质能提供巨大的油水相界面;另一方面,增溶于反胶束中的脂肪酶又得到有效的保护,而且反胶束在一定程度上还可排除底物或产物对酶催化活性的抑制现象^[2,3]。聂开立等^[4]用织布固定脂肪酶来生产生物柴油;邓利等^[5]用固定化脂肪酶通过酯化和酯交换两条工艺路对色拉油催化合成生物柴油进行了初步研究;但在反胶束体系中用脂肪酶来生产生物柴油还尚未见报道。

本文采用丁二酸二酯磺酸钠(AOT)反胶束作为酶的催化介质,研究了AOT反胶束体系中,实验室自制的 *Candida sp.99-125* 脂肪酶催化大豆色拉油合成生物柴油的微环境,考察了各个因素-溶剂极性、含水量、温度、摇床转速等对酯转化率的影响。

1 实验部分

1.1 实验材料

大豆色拉油,福临门牌,购于北京市场,甲醇、异辛烷、苯、正己烷、环己烷、庚烷(均为化学纯),北京试剂公司; *Candida sp. 99-125* 脂肪酶(由实验室自制),磷酸缓冲液,橄榄油(化学纯),AOT(丁二酸二酯磺酸钠)纯度 96%。

1.2 实验仪器

摇床,哈尔滨东联电子公司;电子天平,塞多利斯公司;GC-14A 气相色谱仪,岛津公司;空气发生器,氢气发生器,北京东西电子研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 AOT 反胶束体系的制备

按照一定的比例先后向 50 mL 平底烧瓶中加入 50 mmol/LAOT 异辛烷溶液和溶有 50 mg 脂肪酶(24000 u/g)的缓冲溶液,在振荡器上振荡 10 分钟,制成反胶束体系。

1.3.2 基本反应体系

在 50 mL 的具塞锥形瓶反胶束体系下依次加入 1 g 大豆色拉油和 139.5 微升甲醇^[4],采用不同的流加方式,然后在 40 °C 密闭条件下振荡反应。在改变

不同的反应条件(温度、含水量、pH、摇床转速)下进行实验。

1.3.3 产物的分析

产物采用气相色谱法分析,利用 GC-2010 气相色谱仪(日本岛津),DB1-1ht 毛细管柱 0.25 mm × 30 m, Agilent),高纯氮作载气,二阶程序升温,柱温 100 到 300 °C,升温速率 5 °C/min。利用氢火焰离子检测器,检测温度 375 °C,气化室温度 370 °C。

1.3.4 酶活的测定

采用橄榄油乳化液水解滴定法测定,一个酶活单位指在 40 °C, pH 8.0 条件下,每分钟内转化一微摩尔底物的酶量,酶的比活力指每克酶蛋白所具有的酶活力。本文采用 3 次平行测定。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂对反胶束体系酯转化率的影响

有机溶剂的疏水性是影响反胶束体系中酯转化率的主要因素,不管酶在何种介质中催化反应,都需要一定量的水分来维持酶的催化构象和催化作用,有机溶剂通过直接与酶相互作用或脱出表面的水影响反应,疏水性强的溶剂分子,不易破坏酶分子的水层,且渗透到胶核的能力越差,破坏酶分子构象的能力就相对较小^[6]。

实验结果(见表 1)表明:在本文所考察的五种有机溶剂中,随着疏水性增强,酯转化率升高,在异辛烷溶剂体系下,酯转化率达到最高为 73.4%,疏水性(LogP)强的有机溶剂比疏水性弱的有机溶剂更能发挥 *Candida sp.99-125* 脂肪酶的催化活性,因此本文采用异辛烷作溶剂。

2.2 表面活性剂(AOT)浓度对酯转化率的影响

表面活性剂的浓度关系到反胶束的形成和酶的催化活性。表面活性剂浓度要保证形成稳定的反胶束体系的同时还要考虑对脂肪酶的毒害作用。浓度太低,无法形成反胶束溶液,而浓度太高,阴离子表面活性剂对脂肪酶有毒害作用,抑制酶的活性。如图 1 所示,表面活性剂浓度控制在 50 mmol/L 时,

表 1 溶剂对酯转化率的影响

Table 1 Effect of solvent on transesterification rate

Organic solvents	Benzene	Cyclohexane	Hexane	Heptane	Isooctane
Conversion rate/%	29.17	54.89	63.81	68.68	73.38
LogP	2.0	3.2	3.5	4.0	4.5

即能维持反胶束的稳定又能保持酶的最高催化活性,在后续试验中采用 50 mmol/L 的 AOT 浓度。

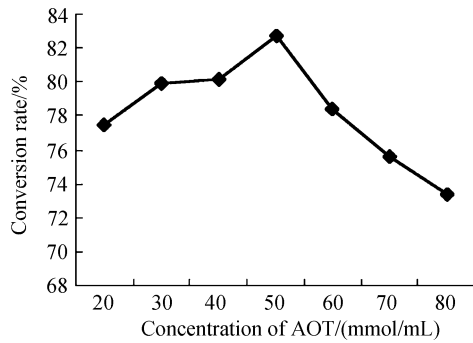


图 1 AOT 浓度对酯转化率的影响

Fig. 1 Effect of concentration of AOT on transesterification rate

2.3 水与 AOT 质量比对反胶束体系下酯转化率的影响

水含量和表面活性剂的质量比 W_0 对反胶束体系中酯转化率的影响如图 2 所示: 转化率随着 W_0 的增加而升高, W_0 为 11 时, 转化率达到最高为 73.4%, W_0 超过 11, 随着 W_0 的增加, 转化率降低。从反胶束的构成来说, 水含量的高低决定了反胶束水池直径的大小, W_0 较小时, 反胶束水池尺寸较小, 不能完全容纳酶分子, 导致部分酶分子在有机溶剂中失活, W_0 值太大, 酶分子虽然能完全增溶于反胶束水池内, 但反胶束的稳定性下降。从酶的角度而言, 当 W_0 小于 11 时, 整个反应体系含水量低, 反胶束体系中的绝大部分水以表面活性剂结合, 而不能提供足够保持反胶束里酶活性构象所需要的自由水, 导致酶的活力不高。对于本实验, W_0 为 11 是最佳的水分含量值。

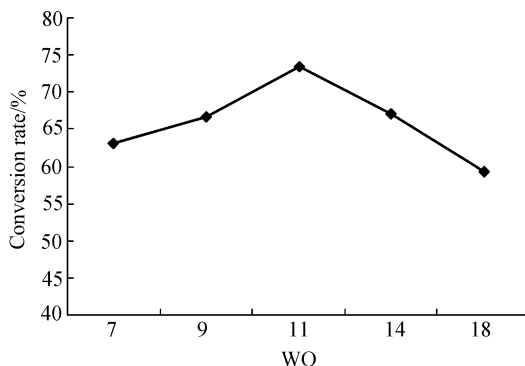


图 2 水与 AOT 质量比对酯转化率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of water and AOT on transesterification rate

2.4 温度对反胶束体系酯转化率的影响

温度对酯转化率的影响如图 3 所示: 在较低的温度范围内, 随温度升高, 酯转化率升高, 温度为 40 时, 转化率达到最高为 73.4%, 超过 40 后, 酯转化率降低, 一方面可能是反胶束结构不稳定; 另一方面是温度升高改变了酶的活性构象, 酶活降低。当温度升至 50 时, 转化率仅有 51.5%, 说明反胶束体系中 *Candida sp.99-125* 脂肪酶的活性对高温相对较敏感。因此在实验中采用 40 为最佳的反应温度。

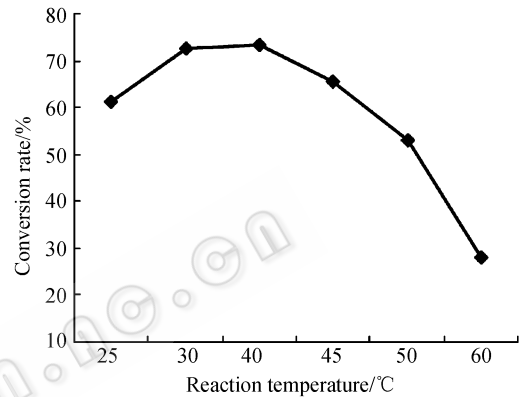


图 3 温度对酯转化率的影响

Fig.3 Effect of temperature on transesterification rate

2.5 反胶束体系中缓冲液 pH 值对酯转化率的影响

反胶束体系核心水团的 pH 值决定酶分子和反胶束膜所带电荷的种类, 所以, pH 值不仅决定酶的催化构象和在反胶束体系中的溶解能力等, 而且其变化也可能引起酶分子与反胶束膜之间相互作用的改变, 从而多方面地影响酶的催化活力^[7]。

如图 4 所示: 随着 pH 值增加, 酯转化率升高, pH 值为 7 时到达 72.3%, 超过 7, 转化率又随着 pH

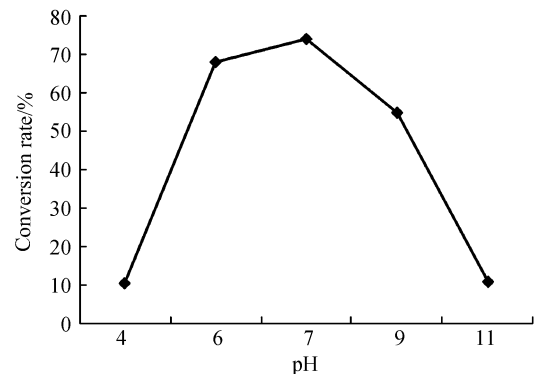


图 4 pH 值对酯转化率的影响

Fig.4 Effect of pH value on transesterification rate

值得增加而降低。脂肪酶分子上有许多酸性、碱性氨基酸的侧链基团,它随着pH的变化处于不同的解离状态,直接影响底物的结合和进一步反应,从而影响酶的活性^[8],即体系pH的改变将引起酶构象的变化,导致酶的催化活力改变。本实验采用pH值为7的缓冲液。

2.6 反胶束体系中底物摩尔比对酯转化率的影响

底物的摩尔比对酯化率的影响如图5所示:随着醇和油的摩尔比增大,酯转化率升高,当甲醇和油的摩尔比达到3:1时,酯转化率达到最高为82.7%,底物摩尔比继续增加,酯转化率迅速降低,到5:1时,酯转化率仅为6.5%。随着甲醇浓度的增加,反应向正方向进行,酯转化率升高,甲醇浓度继续增加,超过一定量时,较高甲醇浓度降低了酶的活性,酯化率随之降低。在后续试验中,采用甲醇与油的摩尔比为3:1较为理想。

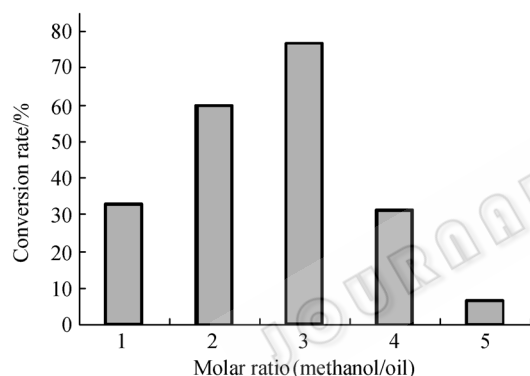


图5 油醇摩尔比对酯转化率的影响

Fig. 5 Effect of molar ratio of methanol and oil on transesterification rate

2.7 摇床转速对反胶束体系下酯转化率的影响

摇床转速影响着反胶束体系下酶催化反应的传质和传热,同时还影响底物和酶的接触几率。如图6所示:随着转速增加,酯转化率升高,到180 r/min时,酯转化率达到最大为75.6%,但随着转速的进

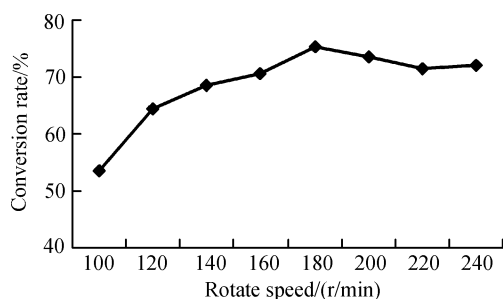


图6 转速对酯转化率的影响

Fig. 6 Effect of rotate speed on transesterification rate

一步增加,酯转化率略有降低。转速升高,更多的底物易与反胶束中的酶接触,增加了酶的活性;但转速继续增加,反胶束的稳定性可能受到影响,各胶束之间的碰撞几率增加,导致反胶束破裂重新并合和形成,使得部分酶在有机溶剂中失活。在试验过程中,摇床转速控制在180 r/min。

2.8 甲醇流加对酯转化率的影响

如图7所示:本试验对同一反应采用不同的甲醇流加方式来研究甲醇对酯转化率的影响。采用1次甲醇流加,酯转化率仅达到74.1%,在3次流加后,酯转化率高达90.7%,采用多次流加后,转化率没有明显的变化。在转酯化过程中,较高浓度甲醇容易进入反胶束内部的水相,对酶产生毒害作用,直接影响着酶的活性。所以在后续的试验过程中,考虑到经济可行,采用3次流加1 mol当量的甲醇较为理想。

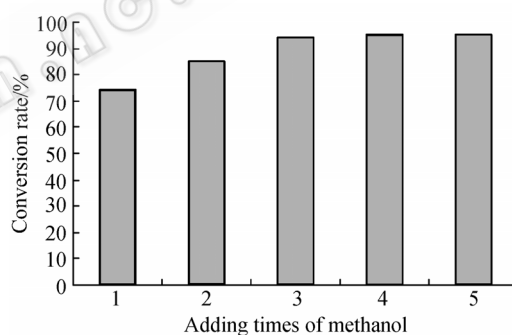


图7 甲醇流加对酯转化率的影响

Fig. 7 Effect of adding methanol on transesterification rate

3 结语

AOT反胶束体系为*Candida sp.99-125*脂肪酶催化大豆色拉油合成生物柴油提供了合适的微环境。通过试验,证实了利用实验室发酵提取的脂肪酶(*Candida sp.99-125*脂肪酶)在AOT/异辛烷反胶束体系下,AOT浓度为50 mmol/L,水与表面活性剂质量比为11,温度为40℃,pH值为7,醇油摩尔比为3:1,摇床转速为180 r/min,采用12小时3次流加1 mol当量的甲醇,最高酯转化率可以达到90%。反胶束体系下脂肪酶的重复利用和动力学研究正在进行中。

REFERENCES

- [1] Wang NX, Liu W, Wang L. Progress of enzymatic reaction. *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2004,

- 12(2): 131-136.
王乃兴, 刘薇, 王林. 酶催化反应研究进展. 合成化学, 2004, 12(2): 131-136.
- [2] Ou ZM, Zhou XY, Liu CB. The catalysis of lipase in reversed micelles systems, *Journal of Tianjin Institute of Light Industry*, 2000, 15(4): 21-27
欧志敏, 周晓云, 柳彩波. 逆胶束系统中脂肪酶的催化. 天津轻工业学报, 2000, 15(4):21-27.
- [3] Xu JH, Mao QC, Ying XG, *et al.* The study of lipase Lipase-catalyzed in reversed micellers. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1991, 7(4): 345-350.
许建和, 茅庆成, 英徐根, 等. 反胶团中脂肪酶催化性能的研究. 生物工程学报, 1991, 7(4): 345-350.
- [4] Nie KL, Wang F, Tan TW. Biodiesel production by immobilized lipase. *Modern Chemical Industry*. 2003, 23(9): 35-38.
聂开立, 王芳, 谭天伟. 固定酶法生产生物柴油. 现代化工, 2003, 23 (9): 35-38.
- [5] Deng L, Liu L, Dong X, *et al.* Study on esterification reaction of fatty acids short chain ester by immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125. *Modern Chemical Industr*, 2002, 22 (9): 30-33.
邓利, 刘柳, 董贤, 等. 固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化酯化脂肪酸低碳醇酯反应条件的研究. 现代化工., 2002, 22 (9): 30-33.
- [6] Zhou MH, Zhao XW, Wu RR, *et al.* Studies on production of erucic acid by enzyme-catalyzed hydrolysis in AOT/isooctane reversed micelle system. *Bulletin of Science and Technology*, 2006, 22(3): 367-371.
周茂红, 赵肖为, 吴蓉蓉, 等. 反胶束酶水解法生产芥酸的工艺研究. 科技通报, 2006, 22(3): 367-371.
- [7] Zhu H, Shi N, *et al.* The enzymological researches in reverse micellar systems. *Prog Biochem Biophys*, 1998, 25(3): 204-210.
朱浩, 施霖, 等. 反相胶束体系中的酶学研究. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(3): 204-210
- [8] Wang YH, Chu Y, Liu JL, *et al.* Lipase catalyzed synthesis of Isoamyl Isobutyrate in reversed micelle system. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, 9: 1468-1688.
王元鸿, 褚莹, 刘景林, 等. 反胶束体系中脂肪酶催化合成异丁酸异戊酯. 高等学校化学学报, 2004, 9: 1468-1688.

多途径开发优质生物能源

人们很熟悉从生物质, 特别是一些有机废弃物如农业秸秆、树枝落叶等, 通过生物技术途径生产醇类燃料等产品, 如乙醇、甲醇及其他等等。这是一个长期探究的方向。从物质循环再利用、循环经济的发展以及人类生存环境及其保护方面思考, 把握这个方向, 既有现实意义, 又有长远之所需。美国威斯康星大学研究人员开发一种新的液体燃料, 即从植物的果糖转化成二甲基呋喃液体燃料, 其能量密度和石油相当, 比乙醇高 40%。植物果糖不仅可从一些水果如苹果、柑桔等获取果糖, 亦可从那些废弃植物(如纤维素等)糖转化索取果糖, 借助酶技术将其转化成可以燃烧产生能量的燃料(如同石油一样高效能的燃料), 也即果糖转化成二甲基呋喃的液体燃料。据研究人员称, 目前, 乙醇是唯一大规模生产的可再生液体燃料, 但也有一些不足, 它的能量密度相对较低、易挥发、会吸收空气中的水分而受污染; 而且将乙醇与水分分离的蒸馏过程消耗大量能量。尽管如此, “混合乙醇”燃料已商品化, 在实际应用中有所发展。因此, 二甲基呋喃液体燃料的优越性日益引起注意, 它不仅能量含量高, 而且没有植物乙醇的缺点。它不吸水, 而且挥发性弱, 储存起来更方便。虽然目前这种液体燃料的产业化、商业化仍面临一些困难, 但因其既有助于降低对石油的依赖、又可以与石油燃料相媲美的优越性, 研究人员将致力于克服这些困难, 使其发挥更大的作用。

(柯 为)