

研究报告

复合脂肪酶协同催化制备生物柴油的研究

李迅^{1,2} 邓若冰^{1,2} 段成元^{1,2} 王亮亮^{1,2} 王飞^{1,2*}

(1. 南京林业大学化学工程学院 江苏 南京 210037)

(2. 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室 江苏 南京 210037)

摘要: 【目的】探讨复合酶协同催化体系在含水量较高的体系中催化油脂制备生物柴油的工艺条件。【方法】通过基因工程手段在毕赤酵母中分别高效分泌表达南极假丝酵母脂肪酶(CALB)和米根霉脂肪酶(ROL), 构建 CALB 和 ROL 复合酶协同催化体系制备生物柴油, 利用单因素实验优化工艺条件, 以甲酯化得率作为复合酶协同催化体系效能的评价标准。【结果】优化工艺条件为: CALB:ROL 最佳复合酶配比为 7:3, 每克大豆油中加入 16 U 的复合脂肪酶, 甲醇与大豆油摩尔比为 4:1, 并按 0 h 时 2:1 醇油摩尔比, 12 h 和 24 h 时以 1:1 醇油摩尔比分批加入甲醇, 含水量为 30%–60%之间, 40 °C 反应 29–34 h, 甲酯得率达到 93%。【结论】该复合酶协同催化体系对环境友好, 与常规酶法制备生物柴油工艺相比对酶的使用量和催化时间减少幅度都在 50% 以上, 本复合酶协同催化体系能有效降低生物柴油制备成本, 具有较好的工业化应用前景。

关键词: 生物柴油, 协同催化, 南极假丝酵母, 米根霉, 脂肪酶

High efficient biodiesel production by synergistic catalysis with combined lipases

LI Xun^{1,2} DENG Ruo-Bing^{1,2} DUAN Cheng-Yuan^{1,2} WANG Liang-Liang^{1,2} WANG Fei^{1,2*}

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Biomass-Based Green Fuels and Chemicals, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

Abstract: [Objective] To optimize the process for transesterification reaction in biodiesel production by the synergistic biocatalyst in high water content system. [Methods] The synergistic biocatalyst of *Candida antarctica* lipase B (CALB) and *Rhizopus oryzae* lipase (ROL) were expressed and secreted in *Pichia pastoris* using genetic engineering techniques. The single factor experiment was used to optimize the process conditions, and the methyl ester (ME) yield was used to evaluate the transesterification ability of synergistical biocatalyst. [Results] The maximum ME yield of 93% could be achieved using 16 U/g oil combined with mixed lipase (CALB:ROL=7:3) for the methanolysis. The molar ratio of methanol to oil is 4:1 (initial methanol/oil molar ratio 2:1 and 1:1 at 12 h and 24 h, respectively), water content 30%–60% (W/W) (based on oil weight), temperature 40 °C for 29–34 h.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270612, 31170537); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-25-85427649; E-mail: hgwf@njfu.edu.cn

Received: May 27, 2015; Accepted: October 20, 2015; Published online (www.cnki.net): November 10, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270612, 31170537); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-25-85427649; E-mail: hgwf@njfu.edu.cn

收稿日期: 2015-05-27; 接受日期: 2015-10-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-10

[Conclusion] This synergistic catalytic system is environmental friendly. Furthermore, both the consumption of lipase and reaction time were decreased more than 50% compared with the conventional enzymatic preparation of biodiesel. Therefore, this study provides an effective way to decrease the cost of biodiesel preparation and also has great potential in biodiesel industry.

Keywords: Biodiesel, Synergistic catalysis, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, Lipase

生物柴油无毒且可生物降解, 这种液体燃料可以减少二氧化碳、颗粒物和硫的排放, 是环境友好的可再生能源^[1-3]。碱法催化油脂转酯化制备生物柴油应用最广泛、转化率高, 但其缺点也显而易见, 比如能耗高、对环境污染严重、对原料要求高及易皂化等^[4-5]。酶法催化反应因具有条件温和、对原料要求低和产物易分离等特点, 使其成为最具发展前景的制备生物柴油方法之一^[6]。目前多种来源的脂肪酶已经被有效应用于生物柴油的转酯化反应, 如荧光假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas fluorescens* lipase, PFL)、南极假丝酵母脂肪酶(*Candida antarctica* lipase B, CALB)、疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginose* lipase, TLL)、嗜热链状杆菌脂肪酶(*Bacillus thermocatenuatus* lipase, BTL)和米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)^[7-11]。其中具有广谱底物接受性的 CALB 和具有较高水含量耐受性的 ROL 在制备生物柴油中的应用较为广泛, 但这两种酶各自的催化特性限制了其在生物柴油生产中的应用。

为了降低生物柴油生产成本, 近年来开发出用复合脂肪酶生产生物柴油的新工艺^[12-15], 有的选择共溶剂系统, 有的选择超临界流体系统, 虽然复合脂肪酶能有效地克服单一脂肪酶的底物专一性, 提高复合脂肪酶的甲醇耐受性, 缩短反应时间, 降低酶的使用成本, 但都使用有机溶剂或特殊溶剂, 这些因素决定这些体系都无法最终解决生物柴油酶法制备成本过高的瓶颈问题。广谱底物接受性的 CALB 在含水量较高的体系中酶活较低, 在有机相体系中酶活较高^[16]; 而 ROL 具有较高的水含量耐受性, 但由于 Sn-2 酰基转移过程慢而使反应时间过长^[17]。有关 CALB 和 ROL 协同作用的研究尚未见报道, 构建重组 CALB 和 ROL 的协同催化体系,

研究在含水量较高的体系中复合酶催化油脂制备生物柴油的影响因素, 为解决生物柴油酶法制备成本过高、酶对甲醇的耐受性差及反应时间较长等瓶颈问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 南极假丝酵母(*C. antarctica*, NRRL No. Y-7954)来源于美国农业研究菌种保藏中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71H 和质粒 pPICZ α A 购自 Invitrogen (Carlsbad, California, USA) 公司。pPICZ α A-CALB 及 pPICZ α A-ROL 为实验室构建^[18-19]。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.2 试剂: 胰蛋白酶、酵母提取物购于 Oxoid (Hampshire, England) 公司; 棕榈酸甲酯(Methyl palmitate)、硬脂酸甲酯(Methyl stearate)、油酸甲酯(Methyl oleate)、亚油酸甲酯(Methyl linoleate)、亚麻酸甲酯(Methyl linolenate)、三辛酸甘油酯、对硝基苯酚辛酸酯(pNPO, 4-Nitrophenyl octanoate)、RNase A、Tris-HCl 和氨苄青霉素(Amp)等购自 Sigma 公司; ExTaq 聚合酶和限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司; PCR 纯化、低分子量标准蛋白质和 Gel/PCR Extraction Kit、质粒小量提取试剂, 购自 Biomiga 公司; 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 测序由上海捷瑞生物工程有限公司完成。其余生化试剂和药品均为分析纯。

1.1.3 培养基: 用于细菌常规培养的 LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 调 pH 至 7.0。用于重组载体转化的 YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, D-葡萄糖 20。用于重组菌筛选的 YPDS 培养基(g/L): 在 YPD 培养基的基础上添加 Sorbitol 182.2 和 100 g/L

Zeocin 1 mL。脂肪酶的诱导表达使用 BMGY 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, YNB 134 (含硫酸铵不含氨基酸的酵母氮基), 生物素 0.2 和甘油 100, 加 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液至 1 L。培养基配方参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。三辛酸甘油酯聚乙烯醇乳化液: 以三辛酸甘油酯:2%聚乙烯醇溶液体积比为 1:3 配制, 在 9 500 r/min 高速匀浆 7 min, 若不均匀或分层, 可稍微加热或增加搅拌次数和时间。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶工程菌的筛选: 重组质粒 pPICZαA-CALB 及 pPICZαA-ROL 分别以限制性酶 *Sac* I 进行线性化, 电击转入毕赤酵母 KM71H 感受态细胞中, 立即加入预冷的 1 mol/L 山梨醇, 于 30 °C 水浴静置培养 1–2 h, 取出菌液涂布于含适宜浓度 Zeocin 的 YPDS 平板上, 30 °C 培养 3–5 d, 分别获得分泌表达重组 ROL 和 CALB 的基因工程菌。具体步骤参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。三辛酸甘油酯平板筛选法: 挑取产 CALB 和 ROL 的重组酵母单菌落, 接种于含 5%三辛酸甘油酯的 YNB 基础培养基的平板上, 培养 3–5 d, 每隔 24 h 补充 100 μL 甲醇至平板盖上, 观察并选取水解圈较大的表达 ROL 和 CALB 的基因工程菌, 将菌体于含有 15%甘油的 YPD 管中–80 °C 保存。

1.2.2 酶活测定方法: 以对硝基苯酚辛酸酯(pNPO)为底物测定脂肪酶酶活^[20]。13.5 mmol/L pNPO 50 μL 和 0.05 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 850 μL 缓冲液混合均匀, 在 40 °C 预热, 加入 100 μL 适宜浓度的酶液反应 5 min, 在 410 nm 处测吸光值。空白样则用缓冲代替酶液。一个酶活单位(U)定义为在 pH 7.5、40 °C 条件下, 每分钟释放 1 μmol 对硝基苯酚(pNP)所需要的酶量。蛋白浓度的测定方法采用 Bradford 法^[21]。

1.2.3 重组酶 CALB 和 ROL 的制备: 将脂肪酶基因工程菌挑取单菌落接种于 BMGY 培养基中 30 °C、200 r/min 培养, 再转接 BMGY 培养基中获得种子

液。将种子液接种于生物反应器(BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf, USA)中, 工作体积为 7 L, 培养温度为 28 °C, 控制溶氧值 DO 为 35%, 自动流加 25%氨水维持 pH 值为 6.0, 发酵 24 h 至基础培养基碳源耗尽, 以 40%的流速恒速补加甘油, 至 OD_{600} 达到 200, 停止补加甘油。2 h 后进入甲醇诱导阶段, 为了减少高密度发酵中的重组脂肪酶被蛋白酶降解, 采用优化的诱导条件培养至 72–84 h^[22]。分别收集 2 种重组菌的发酵上清液, 分别进行酶活测定及保存。

1.2.4 复合酶催化大豆油甲酯化方法: 5 g 大豆油中, 加入 20–100 U 的复合酶(CALB 与 ROL 的酶活配比为 1:9–9:1), 含水量为 5%–110% (相对于大豆油重量), 分批加入一定量的甲醇, 醇油比为 3:1–5:1, 在 50 mL 具塞三角瓶中混合, 在 40 °C、200 r/min 条件下进行转酯化反应。反应结束后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层油状液体进行气相色谱分析。

1.2.5 复合酶催化大豆油甲酯化产物分析: 将上层油状液体用正己烷稀释成一定浓度, 加入等体积的 1 g/L 内标(十七烷酸甲酯, 正己烷配制), 混匀后进行色谱分析。采用 Agilent-7890A 气相色谱仪, 分析条件为: HP-5 毛细管柱, FID 检测器, 进样量 2 μL, 初始温度 170 °C, 以 3 °C/min 升温至 200 °C 保温 10 min, 以 20 °C/min 升温至 260 °C, 进样口温度 250 °C, 检测器温度 260 °C, 以内标法计算甲酯得率^[23]。以碱法催化大豆油甲酯化(1% NaOH 为催化剂, 醇油摩尔比为 7:1, 40 °C 反应 70 min)获得的脂肪酸甲酯量为油脂完全甲酯化后脂肪酸甲酯的质量。每组实验重复 3 次, 数据为 3 次的平均值, 误差线显示标准差值。

甲酯得率(%) =

$$\frac{\text{复合酶催化获得甲酯化产物中脂肪酸甲酯的质量分数}}{\text{油脂完全甲酯化后脂肪酸甲酯的质量分数}} \times 100。$$

对甲酯化反应后所得脂肪酸甲酯产品进行气相质谱 GS-MS 分析, 以确定产物组成。采用 Agilent

GC-MS Trace DCQ 气质联用仪, 分析条件为: HP-5M (0.25 mm×30 m×0.25 μm)毛细管柱, 离子源温度 230 °C, MS 四极杆温度 150 °C, 载气高纯 He, 载气流速 1 mL/min, 分流比 50:1, 进样量为 1 μL。汽化室温度 250 °C。程序升温: 初始柱温 150 °C 保温 0 min 后, 以 5 °C/min 升至 190 °C, 再以 1 °C/min 升至 205 °C, 然后以 10 °C/min 升至 260 °C 并保温 5 min。

2 结果与分析

2.1 CALB 和 ROL 的制备

三辛酸甘油酯平板的筛选结果如图 1 所示, 阴性对照的原始菌在三辛酸甘油酯平板上无透明圈, 重组菌在三辛酸甘油酯平板上的透明圈大小不一, 显示重组菌分泌表达的 CALB 和 ROL 降解三辛酸甘油的能力不一, 挑选透明圈直径与菌落直径之比较大的菌落供后续研究。30 °C、200 r/min 培养重组菌, 经诱导, CALB 重组酶酶活达 42.9 U/mL, 蛋白浓度为 0.5 g/L, ROL 重组酶脂肪酶酶活最高为 137.2 U/mL, 蛋白浓度为 0.3 g/L。如图 2 所示, CALB 和 ROL 以胞外酶的形式分泌表达于发酵液中, 胞外酶以重组蛋白为主, 重组酶无需纯化即可使用。筛选到的 CALB 和 ROL 的重组酵母菌株分别进行

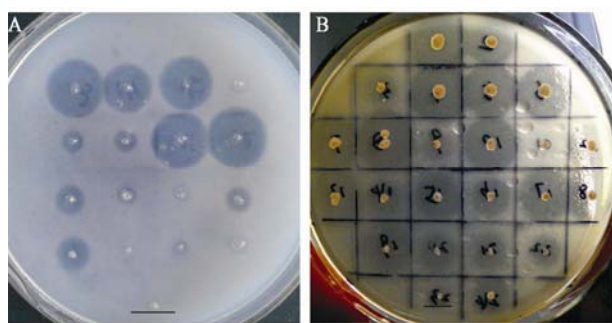


图 1 三辛酸甘油酯筛选平板

Figure 1 Tricaprylin screening plate of recombinant *P. pastoris* with high lipase activity

注: 黑线标注为阴性对照。A: pPICZαA-CALB+KM71H 重组菌; B: pPICZαA-ROL+KM71H 重组菌。

Note: The strains with black line marked are negative control. A: pPICZαA-CALB+KM71H recombinant strain; B: pPICZαA-ROL+KM71H recombinant strain.

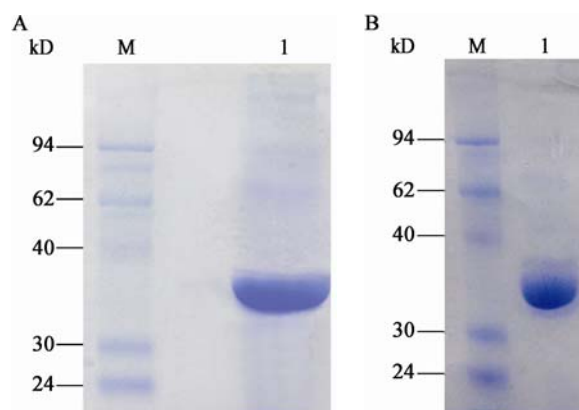


图 2 重组菌发酵液上清 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of supernatants of recombinant *P. pastoris*

注: M: 蛋白质标准分子量。A: pPICZαA-CALB+KM71H 重组菌发酵液上清 SDS-PAGE 分析; 1: pPICZαA-CALB+KM71H 重组菌发酵液上清。B: pPICZαA-ROL+KM71H 重组菌发酵液上清 SDS-PAGE 分析; 1: pPICZαA-ROL+KM71H 重组菌发酵液上清。

Note: M: Protein marker. A: SDS-PAGE analysis of supernatants of pPICZαA-CALB+KM71H; 1: Supernatants of pPICZαA-CALB+KM71H. B: SDS-PAGE analysis of supernatants of pPICZαA-ROL+KM71H; 1: Supernatants of pPICZαA-ROL+KM71H.

高密度发酵, 蛋白浓度和单位体积酶活都获得有效提高, 发酵液中 CALB 重组酶酶活可达 179.2 U/mL, 蛋白浓度为 1.4 g/L, 发酵液中 ROL 重组酶酶活可达 171.4 U/mL, 蛋白浓度为 1.0 g/L。分别保存重组 CALB 和 ROL 酶液, 供后续大豆油甲酯化制备生物柴油的生物催化剂。

2.2 CALB 和 ROL 的酶量对转酯化效果的影响

利用重组 CALB 及 ROL 酶液构建复合酶催化体系, 酶用量为 16 U CALB-ROL/g 油, 醇油比为 4:1, 其他条件同 1.2.4, 尝试了不同的 CALB 与 ROL 的酶活配比, 复合酶以 CALB:ROL 为 7:3 配比时转酯化效率最高, 甲酯得率达到 87.4%。当 CALB:ROL 为 7:3、6:4、5:5 的复合配比时甲酯得率均较高(85.8%–87.4%), 而当 CALB:ROL 为 3:7 时, 甲酯得率下降至 78.1%, 由此可以推断复合酶催化体系中需要较多的 CALB 和较少的 ROL 可达到较好的催化效果。

在确认 CALB:ROL 为 7:3 是最佳复合酶配比的

基础上, 选取 CALB:ROL 为 10:0、7:3、5:5、3:7、0:10 的具有代表性的复合酶配比, 探讨复合酶用量对催化效果的影响。结果如图 3 所示, 当复合酶用量仅为 ROL 单一酶用量的 50% 时, 即复合酶用量约为 60 U (16 U/g 油) 时即可达到 ROL 用量为 120 U (32 U/g 油) 的催化效果。复合酶的最佳酶活用量为 80 U (18 U/g 油), 且复合酶配比 CALB:ROL 为 7:3 效果最好, 甲酯得率为 88.6%。该实验结果显示, 复合酶的催化效率明显优于单一的脂肪酶, 不仅有效减少了酶的使用量, 且最终的甲酯得率获得提高。

2.3 含水量对转酯化效果的影响

探讨含水量对催化效率的影响, 酶用量为 18 U CLAB-ROL/g 油, 复合酶配比 CALB:ROL 为 7:3, 其他反应条件同 2.2, 结果如图 4 所示, 当含水量为 50% 时催化效果最好, 甲酯得率达 91.8%。这个结果验证了 ROL 具有较高的含水量耐受性, 且当含水量为 6%–90% 之间时复合酶催化甲酯化得率都为 75% 以上。

2.4 甲醇流加方式对转酯化效果的影响

已验证甲醇与大豆油的摩尔比为 4:1 时甲酯得率最高(数据未显示), 因此固定醇油摩尔比为 4:1。为了获得该复合酶体系最佳的甲醇流加方式, 比较在 0 h 加入醇油摩尔比 1:1–4:1 的甲醇添加方式(表 1), 其他反应条件同 2.3, 结果如图 5 所示, 发现

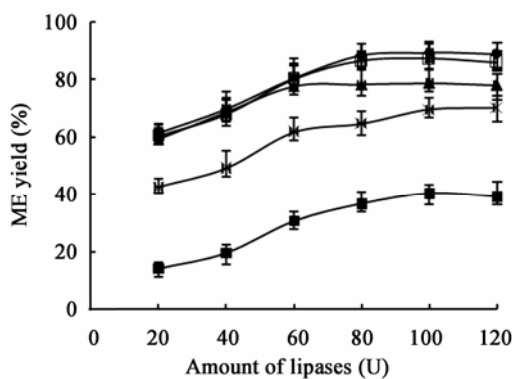


图 3 CALB 和 ROL 的酶量对转酯化效果的影响
Figure 3 Effect of different amount of lipases on transesterification

Note: ◆: C3R7; □: C5R5; ▲: C3R7; ※: ROL; ■: CALB.

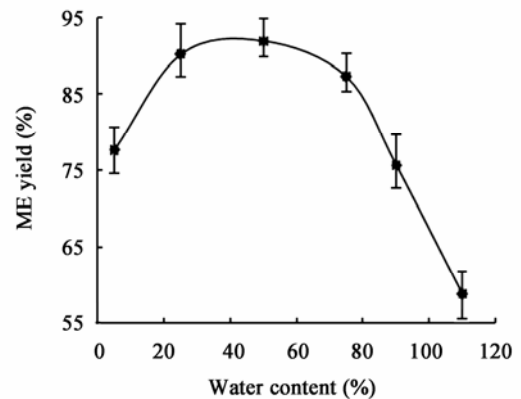


图 4 含水量对转酯化效果的影响

Figure 4 Effect of water content on transesterification

反应时间与甲醇的流加方式直接相关。起始醇油比为 2:1 时, 甲酯得率较原有方法有很大提高, 且有效缩短了反应时间; 而起始醇油比高于 2:1 时, 甲酯得率较原有方法下降较多, 分析为过多甲醇对脂肪酶产生了毒害作用。方法 1 和方法 2 的差别是在 12 h 时加入的甲醇量不同, 结果显示 12 h 加入过多甲醇(方法 1 和方法 3), 使得甲酯得率有明显下降, 分析原因为在 12 h 不能添加过多甲醇, 否则会导致甲醇积累而对脂肪酶产生毒性。综合以上实验结果, 显示复合酶对甲醇的耐受性有明显提高, 特别是在起始阶段, 所以可选择 0 h 时, 使醇油比为 2:1 加入甲醇; 12 h 和 24 h 时, 为了防止过多的甲醇积累, 适当减少甲醇的加入量, 使醇油比为 1:1 加入甲醇, 甲酯得率快速上升, 反应时间为 36 h 时, 甲酯得率已达 92.6% (图 5)。

2.5 最佳转酯化反应条件的验证

由以上结果得出, 该复合酶协同催化体系制备生物柴油的反应优化条件为: 40 °C、200 r/min, CALB:ROL 最佳复合酶配比为 7:3; 加入的复合酶的总酶活为 18 U/g 大豆油; 甲醇与大豆油摩尔比为 4:1; 并按 0 h 加入 2:1, 12 h 加入 1:1, 24 h 加入 1:1 的醇油摩尔比分批加入甲醇; 含水量为 50%。在最佳条件下进行甲酯化反应, 绘制时间曲线, 结果如图 6 所示, 反应了 29 h, 甲酯得率即达 90.2%, 之

表 1 甲醇流加方式
Table 1 Methanol addition methods

方法 Method	0 h 醇油摩尔比 The molar ratio of methanol and oil on 0 h	12 h 醇油摩尔比 The molar ratio of methanol and oil on 12 h	24 h 醇油摩尔比 The molar ratio of methanol and oil on 24 h	36 h 醇油摩尔比 The molar ratio of methanol and oil on 36 h
方法 1 Method 1	2:1	2:1	—	—
方法 2 Method 2	2:1	1:1	1:1	—
方法 3 Method 3	1:1	2:1	1:1	—
方法 4 Method 4	1:1	1:1	1:1	1:1
方法 5 Method 5	3:1	1:1	—	—
方法 6 Method 6	4:1	—	—	—

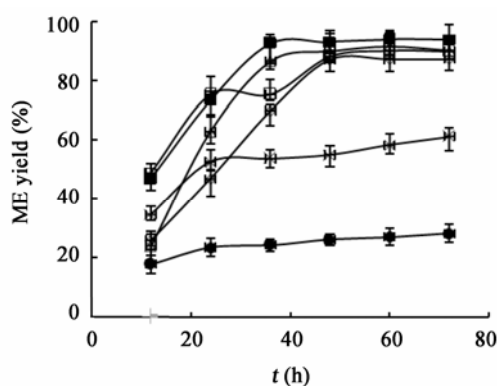


图 5 甲醇流加方式对转酯化效果的影响

Figure 5 Effect of methanol addition method on transesterification

Note: □: Method 1; ■: Method 2; △: Method 3; ◇: Method 4; ※: Method 5; ●: Method 6.

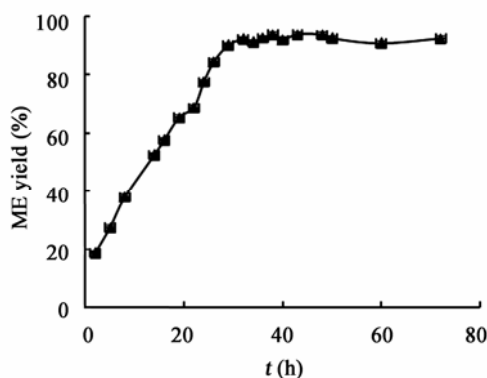


图 6 最佳条件下转酯化反应的时间曲线

Figure 6 Typical time-course profiles of the ME yield in transesterification reaction with optimal conditions

后甲酯得率维持在 93%左右。与已报道的其他复合酶体系所取得的效果相比,本复合酶体系效果相当^[24-25]。

3 结论与讨论

获得重组脂肪酶 CALB 及 ROL,在高水含量体系中复合酶催化油脂制备生物柴油。ROL 为 1、3 位特异性的脂肪酶,催化甲酯化反应到后期,2 位酯键的酰基迁移过程会使得反应时间加长,且其最终转酯得率要低一些^[26]。然而 CALB 无位置特异性,1、2、3 位酯键均直接被 CALB 有效水解,提高了最终的甲酯得率,但在含水体系中 CALB 的酶活要低于 ROL。酶量对转酯化效果影响的实验结果验证了以上分析,复合酶体系在催化过程中产生了协同效应,不仅有效减少了酶的使用量,且最终的甲酯得率获得提高。

选择合适的含水量对于构建复合酶制备生物柴油的体系十分重要。甲酯化反应为可逆反应,因而过量的水存在时可能导致平衡向逆反应方向移动,从而导致甲酯得率下降。水量过少,酶的活动空间受限,也会使脂肪酶因失水而失活^[27]。重组米根霉脂肪酶在催化制备生物柴油时,最佳的含水量为 80%^[19],而南极假丝酵母脂肪酶 B 在非水相环境中较好的稳定性^[28],协同催化体系显示当含水量为 50%时催化效果最好,与文献[19]对比,协同催化体系需水量与所含 ROL 酶量呈正比关系,实验

结果验证了 ROL 具有较高的水含量耐受性, 而 CALB 的需水量极小。

甲酯化反应中理论醇油摩尔比为 3:1, 甲酯化反应为可逆反应, 甲醇需过量才可使反应正向进行, 但甲醇量过大会对脂肪酶有抑制作用, 影响其催化活性及效率。为了使加入的甲醇既与大豆油充分反应, 又能减少对脂肪酶的毒性作用, 前期实验还尝试了以少量多次的方式加入甲醇, 实验结果并未达到预期的目的, 甲酯得率较原有方法均有较多下降, 且甲酯得率的提升速度也更为缓慢。同时发现在转酯化反应的最初 12 h, ROL 的反应速度比 CALB 快, ROL 与混合酶的反应初速度接近(数据未显示), 且在催化反应的最初 12 h 混合酶的反应速度是最快的。之后尝试在 0 h 加入多量甲醇, 满足复合酶较高的反应初速度所需要的甲醇, 快速生成大量的脂肪酸甲酯, 甲醇的快速消耗降低了甲醇对酶催化剂的毒害作用。同时 CALB 又确保 1、2、3 位酯键均直接被脂肪酶催化水解, 提高了最终的甲酯得率。复合酶体系的甲醇流加方式实验验证了反应时间与甲醇的流加方式直接相关, 通过优化, 使反应时间减少了 50%以上, 即该复合酶协同催化体系的工艺有效缩短了甲酯化反应的时间, 反应 29 h 即可获得 90%以上的甲酯得率。

总之, 本复合酶协同催化体系无需加入任何有机溶剂, 对环境友好, 并能适应高水含量的体系; 克服单一脂肪酶的底物专一性, 提高了对甲醇的耐受性; 与常规酶法制备生物柴油工艺相比, 酶的使用量和催化时间都减少 50%以上, 有效提高了酶法催化制备生物柴油的效率, 并降低了催化剂使用成本; 甲酯得率大于 93%, 产品易于分离, 因此该复合酶体系较单酶体系具有更多工业化应用的优势。

参考文献

- [1] Meher LC, Sagar DV, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2006, 10(3): 248-268
- [2] van Gerpen JH. Biodiesel processing and production[J]. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86(10): 1097-1107
- [3] Marchetti JM, Miguel VU, Errazu AF. Possible methods for biodiesel production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2007, 11(6): 1300-1311
- [4] Haas MJ, Mcaloon AJ, Yee WC, et al. A process model to estimate biodiesel production costs[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(4): 671-678
- [5] Suehara K, Kawamoto Y, Fujii E, et al. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(4): 437-442
- [6] Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(5): 1298-1315
- [7] Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, et al. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(1): 12-15
- [8] Ban K, Hama S, Nishizuka K, et al. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/5): 157-165
- [9] Wang G, Luo Y, Jiang ZB, et al. Production of biodiesel catalyzed by a novel lipase LipB52 from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2008, 34(2): 197-201 (in Chinese)
王刚, 罗宇, 江正兵, 等. 新型脂肪酶 LipB52催化生物柴油[J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(2): 197-201
- [10] Mao YJ, Ou XJ, Du W, et al. High-level expression of lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *E. coli* and its application in biodiesel production[J]. *CIESC Journal*, 2012, 63(7): 2100-2105 (in Chinese)
茅羽佳, 欧先金, 杜伟, 等. 大肠杆菌高水平表达脂肪酶 BTL2及其催化油脂制备生物柴油[J]. *化工学报*, 2012, 63(7): 2100-2105
- [11] Li X, He XY, Li ZL, et al. Enzymatic production of biodiesel from *Pistacia chinensis* bge seed oil using immobilized lipase[J]. *Fuel*, 2012, 92(1): 89-93
- [12] Lee JH, Kim SB, Kang SW, et al. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 2105-2108
- [13] Li Q, Zheng JJ, Yan YJ. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent[J]. *Fuel Process Technology*, 2010, 91(10): 1229-1234
- [14] Huang Y, Gao H, Zheng H, et al. Immobilized lipases cooperates to catalyze transesterification reaction of lard[J]. *China Biotechnology*, 2008, 28(1): 30-35 (in Chinese)
黄瑛, 高欢, 郑海, 等. 脂肪酶协同催化猪油合成生物柴油工艺研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(1): 30-35
- [15] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, et al. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as solvent[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(3): 648-653
- [16] Lutz S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15(18): 2743-2748
- [17] Kaieda M, Samukawa T, Matsumoto T, et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88(6): 627-631
- [18] Li X, Deng RB, Wang F. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and studying of enzyme properties[J]. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)*, 2014, 37(6): 911-916 (in Chinese)
李迅, 邓若冰, 王飞. 南极假丝酵母脂肪酶 B 在毕赤酵母中的分泌型表达及酶学性质初探[J]. *四川师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 37(6): 911-916
- [19] Li ZL, Li X, Wang Y, et al. Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel

- production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9810-9813
- [20] Zhang J, Liu JF, Zhou J, et al. Thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*: high-level expression, purification and characterization[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(17): 1463-1467
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254
- [22] Li X, He XY, Li ZL, et al. Combined strategies for improving the production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*[J]. *BioResources*, 2013, 8(2): 2867-2880
- [23] Wang YD, Shen XY, Li ZL, et al. Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67(1/2): 45-51
- [24] Yan YJ, Xu L, Dai M. A synergetic whole-cell biocatalyst for biodiesel production[J]. *RSC Advances*, 2012, 2(15): 6170-6173
- [25] Lee JH, Lee DH, Lim JS, et al. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 18(12): 1927-1931
- [26] Li W, Li RW, Li Q, et al. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-position specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(12): 1888-1893
- [27] Oda M, Kaieda M, Hama S, et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 23(1): 45-51
- [28] Watanabe Y, Pinsirodom P, Nagao T, et al. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, 82(11): 825-831

2016年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	鼠疫菌生态与遗传研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	3月	100	北京	
2	2016年全国微生物毒素与急危重症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	4月	400	上海	陈德昌 13901674318
3	生物过程优化与放大研讨会	中国微生物学会生化工程模型化与控制专业委员会	4月	260	湖北宜昌	尤舸浩 13908607687
4	第四届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及高效利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5月 13-15日	120	湖北武汉	吴悦 027-87287254
5	第二届噬菌体学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	5月	150	湖北武汉	童贻刚 133611272813
6	第二届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	6月	200	浙江杭州	李永泉 13735591622
7	第七届传染病基础与技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	400	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
8	酿造食品的营养化学学术研讨会	中国微生物学会酿造分会	6月	120	浙江杭州	张秀梅 13503213265
9	第十届全国海洋生物技术与创新药物学术讨论会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8月	250	江苏南京	王梁华 13386271017
10	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8月	200	北京	010-53218310
11	第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8月 22-25日	400	内蒙古 呼和浩特	阮志勇 13001101231
12	第二届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	200	浙江宁波	李祥 13811495603