

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2018.04.005

磁性材料固定化脂肪酶的制备及其催化性能研究

张宇,周少敏,朱孝霖,荣艳,蔡金燕,郭静,蔡志强

(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:采用新型载体磁性纳米 Fe_3O_4 对青霉菌 *Penicillium* sp. Y-29 发酵产生的脂肪酶粗酶液固定化,通过电镜和红外分析确定脂肪酶是否成功固定。研究固定化脂肪酶的最优催化条件并催化合成 L-丝氨酸十八醇酯。实验发现对于饱和脂肪酸来说,碳个数越多,在合成生物柴油时催化率越高,而对于短链醇,亚甲基个数的增加,酯化率降低。多次加甲醇的方式可有效避免短链醇对酶的变性作用,使酯化率提高。增加底物的量可以促进酯化率,但是过高的醇使酶活性降低,酯化率反而降低。最终获得最优催化条件:硬脂酸、甲醇物质的量比为 1:1.7,甲醇分 3 次加入,5 mL 石油醚,5% 固定化脂肪酶,160 r/min,30 °C 密闭震荡反应 24 h。采用水溶性有机溶剂体积分数为 5% DMF 时酯化率最高,而随着比例的升高,酯化率明显下降。

关键词:固定化;脂肪酶;生物柴油;L-丝氨酸十八醇酯;生物催化

中图分类号:TQ 925.6

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2018)04-0028-08

Preparation and Catalytical Performance of Immobilized Lipase on Nano-Magnetic Material

ZHANG Yu, ZHOU Shaomin, ZHU Xiaolin, RONG Yan, CAI Jinyan, GUO Jing, CAI Zhiqiang
(School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Immobilized lipase has more stable catalytic performance with longer life compared to free lipase. The lipase produced by *Penicillium* sp. Y-29 was immobilized on new carrier- magnetic nanoparticle Fe_3O_4 , and analyzed by SEM and IR. It was successfully immobilized. Catalytic performance of immobilized lipase was investigated including the reaction of different substrate, concentration, the way of adding methanol and its ratio to acid, as well as the reaction life. It was found that for saturated fatty acid, the higher the number of carbon, the higher the catalytic rate in the synthesis of bio-diesel. And the rate was decreased as the number of methylene increased for short chain alcohol. Multiple times adding of methyl alcohol is a good method to prevent denaturation of enzyme activity, and

收稿日期:2018-04-03。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11275033);江苏省自然科学基金面上项目(BK20151185)。

作者简介:张宇(1995—),男,吉林白山人,硕士生。通信联系人:蔡志强(1975—),E-mail:zhqcai@cczu.edu.cn

引用本文:张宇,周少敏,朱孝霖,等. 磁性材料固定化脂肪酶的制备及其催化性能研究[J].常州大学学报(自然科学版),2018,30(4):28-35.

the esterification rate was improved. The increase of substrate promoted the reaction process, but the production was lower when excessive alcohol was added. The attained condition of reaction is: 1:1.7 ratio of stearic acid to methanol, 3 adding times of methanol, 5 mL petroleum ether, 5% immobilized lipase with 160 r/min, 30 °C shaking for 24 h. Also, it was to investigate the solvent impact on catalytic performance to produce myristyl serinate. The product was analyzed by HPLC/LC-MS/MRI. When using 5% DMF as the solvent, the production rate was 30.83% with more than 93% purity. The higher percentage of DMF inversely impact the reaction. The study of *Penicillium* sp.Y-29 immobilized lipase and catalytic performance is significant in the development and industrialization of this lipase.

Key words: immobilization; lipase; biodiesel; myristyl serinate; biocatalysis

生物柴油是以油料作物、餐饮垃圾油等油脂原料通过酯交换或热化学工艺得到的脂肪酸单酯,它是可替代石化柴油的再生性柴油燃料^[1]。生产方法包含酸或碱催化^[2-4],超临界流体法^[5],工程微藻法^[6-7]和生物酶法^[8-9]。因利用生物酶法催化酯交换反应生产生物柴油具有条件温和,环境友好等优点^[9],从而成为研究的热点。

脂肪酶是一类具有多功能催化能力的酶,并且具有立体专一性,利用脂肪酶催化合成生物柴油的报道已有很多^[8-10]。而其中固定化脂肪酶又因稳定性高、易分离,反应过程中不会进入产物,不被污染,可重复利用等优势被深入研究^[8]。

传统的酶固定化方法,主要分为物理和化学两方面^[11]。而新的固定化技术的进展主要在3个方面:定向固定(按一定方向排列)、多酶共固(酶-酶、酶-细胞、细胞-细胞)、新型载体(acrylamide 共聚体、磁性纳米 Fe_3O_4)等^[12-13]。

L-丝氨酸十八醇酯是化妆品中保湿因子神经酰胺合成的关键中间体,由 L-丝氨酸和长链烷烃醇酯化而生成,生产方法是利用浓盐水作为催化剂,高温回流。传统的合成方式通常产率低,污染大,并且产物难以分离^[14]。

本课题组前期研究了固定化 *Candida antarcticac* 脂肪酶双相体系催化合成 L-丝氨酸十八醇酯,具有很高的催化产率^[15]。但使用的酶价格昂贵,成本过高,不易于大规模应用。青霉菌 *Penicillium* sp.Y-29 是本实验室在土壤中筛选,易于获得和制备。本文采用新型载体磁性纳米 Fe_3O_4 对该菌产生的脂肪酶进行固定化,考察了其催化合成生物柴油的最佳工艺条件,并研究了其催化合成 L-丝氨酸十八醇酯化合物的性能,以期应用该固定化脂肪酶生物催化合成提供指导。

1 实验材料与方法

1.1 材料

菌株:青霉菌 *Penicillium* sp.Y-29,保存在常州大学微生物实验室。

仪器与试剂:液质联用(LC-MS,6230B,Agilent),气质联用(GC-MS,7890/5975*,Agilent),高效液相色谱(HPLC 1260,Agilent);油酸(郑州超安化工有限公司,分析纯),其余均为国药,分析纯。

1.2 酶液的制备

将 *Penicillium* sp.Y-29 接种到斜面上活化,30 °C 恒温培养箱培养 48 h,将斜面放于 4 °C 冰箱中备用。活化时,在斜面上挑取少许菌于培养基中,于 30 °C,160 r/min 摇床,培养 2 d。再将 3% 的接种量

转接到发酵培养基中,玉米油 3.0%,牛肉膏 2.0%,镁离子 0.04%,钙离子 0.015%,pH 6.5),32 ℃,140 r/min 下产酶,发酵 5 d。采用双水相方法提取发酵液中脂肪酶,用二氯甲烷萃取上相酶液,并透析除盐,冻干。

1.3 脂肪酶固定化

0.5 g 磁性纳米 Fe_3O_4 于 $V(\text{乙醇}):V(\text{水})=1:2$ 液体中,超声 30 min,氨水 1.2 mL,磁力搅拌 1 h,加入 10 mL 100 mmol/LCTAB(十六烷基三甲基溴化铵)溶液,室温搅拌 1 h,缓缓加入 1.5 g TEOS(正硅酸乙酯)反应 1 d,过滤。乙醇冲洗 3 次,将产物放入 60 ℃ 真空烘箱 24 h 后转入 550 ℃ 高温反应器中处理 6 h,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MCM-41}$ 磁核-壳纳米颗粒。

将 1 g $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MCM-41}$ 磁核-壳纳米颗粒,6 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷分散于无水甲苯中,定容至 60 mL,于 N_2 保护下 110 ℃ 油浴 12 h,分离后放置 60 ℃ 烘箱中 24 h。

将 0.5 g 生成物,4.5 mL 0.1 mol/L pH=7.0 磷酸缓冲液,超声 30 min,加入 10 mL 10% 戊二醛,30 ℃ 下反应 12 h,缓冲液洗涤,加入 10 mL 脂肪酶溶液(0.1 mg/mL,0.1 mol/L pH=7.0 磷酸缓冲液),30 ℃,160 r/min 反应 12 h,缓冲液洗涤。

1.4 固定化脂肪酶催化性能研究

1.4.1 固定化脂肪酶催化合成生物柴油

反应体系:油酸和甲醇物质的量比为 1:1,甲醇分 2 次添加,5 mL 石油醚,5% 的固定化脂肪酶,于 100 mL 的锥形瓶中,30 ℃,160 r/min 密闭震荡反应 1 d。改变条件:不同底物、流加方式、不同溶剂等。

检测方法:采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进行检测。实验条件:毛细管柱,程序升温,FID,初始温度 100 ℃,保持时间 3 min,升温速率 10 ℃,终温 280 ℃,保持时间 5 min,汽化温度 250 ℃,检测器温度 230 ℃,高纯 N_2 ,1.0 mL/min,分流比 30:1,进样量 2 μL 。

1.4.2 L-丝氨酸十八醇酯生物合成

称取一定质量的十八醇和 L-丝氨酸(由十八醇/L-丝氨酸的物质的量之比来定,其反应式见图 1),与固定化脂肪酶一起加入具塞磨口锥形瓶中,放入 30 ℃ 恒温摇床,150 r/min,反应 24 h 后,过滤除去脂肪酶,用相同体积的乙酸乙酯萃取,40~60 ℃ 真空蒸馏,得到酯粗品。

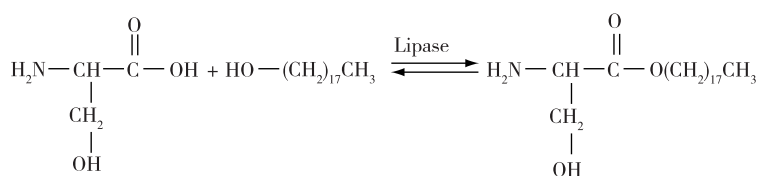


图 1 L-丝氨酸与十八醇发生酯化反应

L-丝氨酸十八醇酯的 HPLC 检测:检测器蒸发光散射检测器(ELSD),分析柱 OD-H 手性柱,流动相 $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=90:10$,流速 1 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 20 μL 。LC-MS 条件为:SCAN 正离子检测模式,曲线脱溶剂管(CDL)温度 250 ℃,曲线脱溶剂单元(Heat Block)温度 250 ℃,喷雾毛细管电压 4.5 kV,检测电压 1.3 kV,喷雾气流速度 1.5 L/min,流动相 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=90:10$ 。

2 结果与讨论

2.1 固定化脂肪酶电镜扫描

采用透射电镜和红外光谱分析固定化脂肪酶的固定化型态,由电镜扫描图2可知,图2(a)中磁性纳米 Fe_3O_4 之间结构紧凑,是由于磁性纳米 Fe_3O_4 之间具有强磁偶极-偶极相互作用,图2(b)显示呈现灰色的磁核-壳纳米复合材料接近球形,且 Fe_3O_4 之间距离变大,这意味着纳米 Fe_3O_4 表面包裹的 SiO_2 层能减弱纳米颗粒的聚合。这种现象表明纳米 Fe_3O_4 表面成功涂覆一层二氧化硅膜。图2(c)表明酶接上核壳磁结构时,不改变结构的形态和大小。

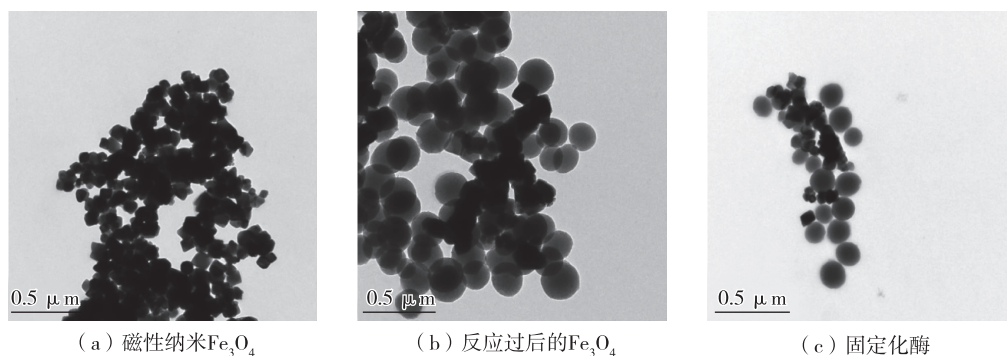


图2 电镜扫描图

图3中, $2\,864\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,935\text{ cm}^{-1}$ 为亚甲基对称和非对称伸缩振动的甲硅烷基化的丙基链(席夫碱键), $1\,632\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,545\text{ cm}^{-1}$ 分别为酰胺I峰、酰胺II峰, $1\,656\text{ cm}^{-1}$ 反对称 $\text{Si}-\text{O}$, 970 cm^{-1} $\text{Si}-\text{OH}$, 807 cm^{-1} 对称 $\text{Si}-\text{O}$, 564 cm^{-1} $\text{Fe}-\text{O}$, 469 cm^{-1} SiO_4 四面体。结果表明,在固定化过程中,席夫碱键是该酶的氨基和戊二醛的醛基基团之间形成的。戊二醛,作为交联试剂,具有两个醛基基团,其可以与两个终端胺基团的酶和磁性核-壳纳米复合材料反应,表明脂肪酶已经成功地固定在磁性核-壳复合材料的表面上。这与2015年谢文磊^[16]报道结果一致。

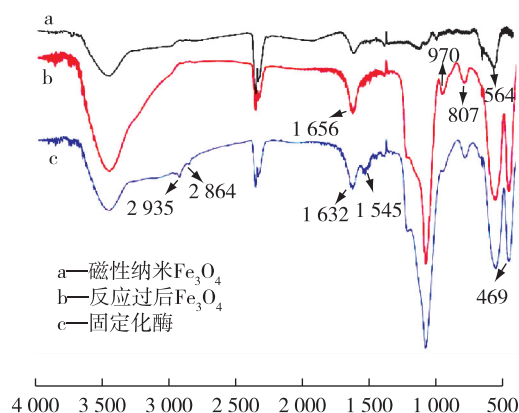


图3 红外图谱

2.2 催化合成生物柴油的研究

2.2.1 不同底物对反应的影响

将基本反应体系中的油酸($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$)用月桂酸($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$)、棕榈酸($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$)和硬脂酸($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$)这3种酸替换,从这3种酸的结构可明显看出他们是碳原子个数不同的饱和脂肪酸,由图4可知,其酯化率依次为28.69%,37.60%和

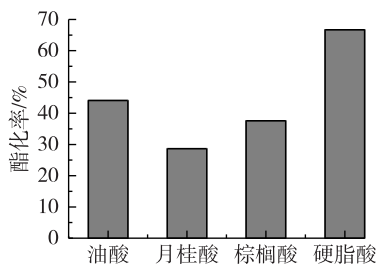


图4 不同酸对反应的影响

66.73%,由此表明:对于饱和脂肪酸来说,碳个数越多,在合成生物柴油时催化率越高。而从油酸($C_{18}H_{34}O_2$)与硬脂酸($C_{18}H_{36}O_2$)的酯化率可得出,碳个数相同饱和脂肪酸的酯化率要高于不饱和酸的酯化率^[17]。因此反应体系中酸优选硬脂酸,这与邓利报道的结果相吻合^[9]。

短链醇对酶活有抑制作用,不同的醇对酶活抑制效果不同。图5中,甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇之间,甲醇的酯化率最高64.41%,表明醇类随着亚甲基个数的增多,合成生物柴油的酯化率越来越低。

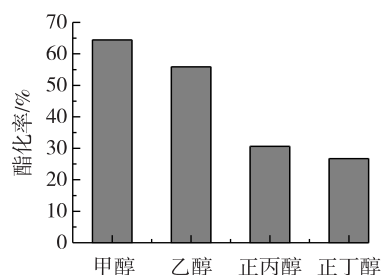


图5 不同醇对反应的影响

2.2.2 底物添加方式、物质的量比及酶量的影响

短链醇对酶具有变性作用,过多的甲醇可能会对催化反应产生抑制效果,使酶失活。图6表明当甲醇分加3次时,酯化率最高,达到80.58%。这也与Mohamed HemidaAbd-Alla等^[18]在2015年的报道,利用ASU32菌生产脂肪酶催化酯交换的研究结果一致。

酶催化成酯理论上酸醇物质的量比为1:1,从理论上增加某一底物的量,可加速转化率。如图7所示,当油酸与甲醇物质的量比增大到1:1.7时,酯化率达到85.79%,但随着物质的量比继续上升,酯化率却逐渐减少。可能由于一方底物浓度增大,增加催化速率,从而提高转化率,当物质的量比到达一定值后,甲醇对酶产生失活作用,从而导致酯化率降低。

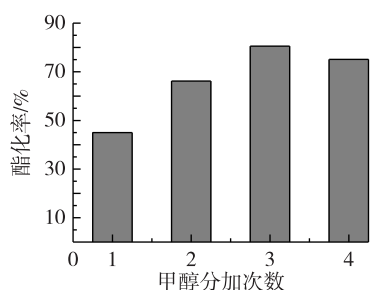


图6 甲醇分加次数对酯化率的影响

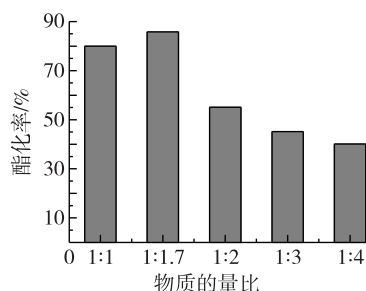


图7 不同酸醇物质的量比对反应的影响

由图8可看出,酶量的增加甲醇的催化率也会随之提高,加入的固定化酶的量5%酸的量时,酯化率达到最高为86.69%,再加入酶量,酯化率变化不大,而另一方面,固定化酶的酯化率比普通干燥的酶高出3倍多,因此固定化酶量选用5%酸量。

2.2.3 固定化酶的使用寿命

在最优的反应条件下:硬脂酸、甲醇物质的量比为1:1.7,甲醇分3次加入,5 mL石油醚,5%固定化脂肪酶,160 r/min,30℃密闭震荡反应1 d。

如图9所示,固定化脂肪酶进行催化的酯化反应,反应6 d时,反应酯化率下降了16.89%。

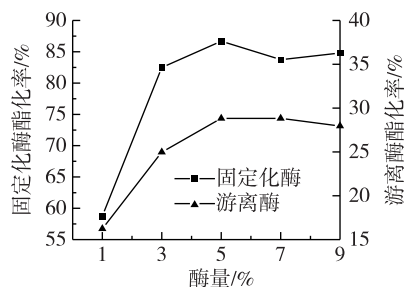


图8 酶量对反应的影响

2.3 固定化脂肪酶催化合成 L-丝氨酸十八醇酯

研究报道酶催化的酯化反应中,当水分存在时会使酶具有更高的催化活性^[19-21]。而有机溶剂对产物有更大的分配系数,使产物更多的转移到有机相中,从而促进酯化反应的发生。本文设计不同的反应体系,考察有机溶剂对脂肪酶催化效果的影响,并与水相反应体系作比较。以有机溶剂名称+有机溶剂体积数(水溶剂作为唯一溶剂则以水溶剂名称+水体积数)作为各体系区分标志,结果见图 10。

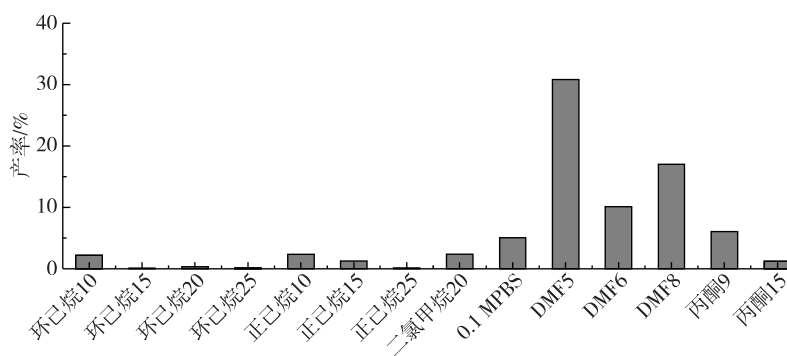


图 10 单相体系对产率的影响

由图 10 可知,在单一溶剂反应体系中,二氯甲烷产率最高达到 2.37%。而水相反应体系的产率达到了 6.05%,远远大于有机相反应体系,说明有机溶剂对脂肪酶的酶活有一定的抑制作用。DMF 作为水溶性有机相溶剂产率高于丙酮,达到 30.83%。随着 DMF 比例的升高,酯化反应产率下降明显。说明对于固定化脂肪酶而言,每种有机溶剂都有着各自的上限值,当比例超出一定界限后,酶分子表面催化反应所需的水份将会被有机溶剂夺走,而使酶催化功能下降,甚至丧失。

利用固定化脂肪酶在最优催化条件下,催化合成 L-丝氨酸十八醇酯的 HPLC 图谱见图 11,保留时间在 2.560 min 时有一明显的峰形,其他地方无明显的杂峰,表明产物的纯度很高。经峰面积估算,L-丝氨酸十八醇酯的含量大于 93%。

经过柱层析分离纯化后得到的产物,主要为纯度较高的 L-丝氨酸十八醇酯。本法所合成出的产品为白色粉末,相对分子质量为 357,熔点 101.5~102.5 °C,纯度达 93%,经 LC-MS 检测 m/z 358 $[M+H]^+$ (见图 12)。由图 13 L-丝氨酸十八醇酯的氢核磁共振图可知,¹H NMR (400M Hz, CH₃OH) δ 4.25 (2H, br, CH₂), 4.10 (H, br, CH), 3.92 (2H, br, CH₂), 1.70 (2H, br, CH₂), 1.28 (30H), 0.89 (3H, br, CH₃), 根据上述数据,确定该化合物为 L-丝氨酸十八醇

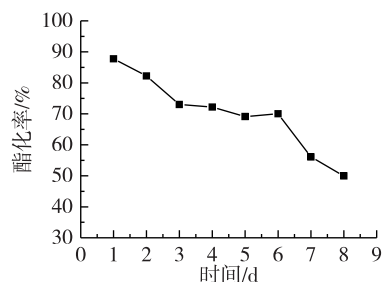


图 9 固定化酶的使用寿命

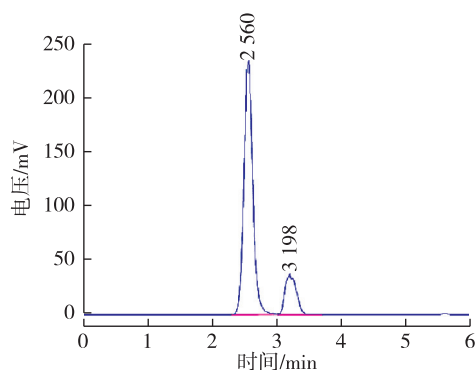


图 11 L-丝氨酸十八醇酯的 HPLC 图谱

酯($C_{21}H_{43}O_3N$)。

3 结 论

通过透射电镜和红外图谱可知,诱变菌 *Penicillium* sp.Y-29 所产的脂肪酶粗酶成功与纳米载体 Fe_3O_4 固定。固定化脂肪酶在最优反应条件下,具有较高的酯转换率,达到 86.69%。该反应的最佳条件为:硬脂酸、甲醇物质的量比为 1:1.7,甲醇分 3 次加入,5 mL 石油醚,5% 固定化脂肪酶,160

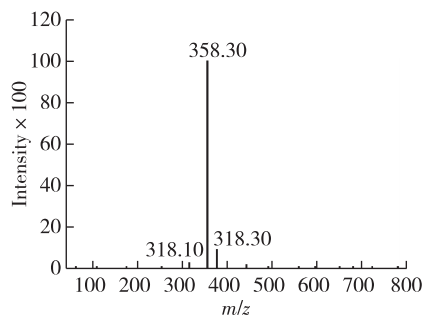


图 12 L-丝氨酸十八醇酯的 LC-MS 图谱

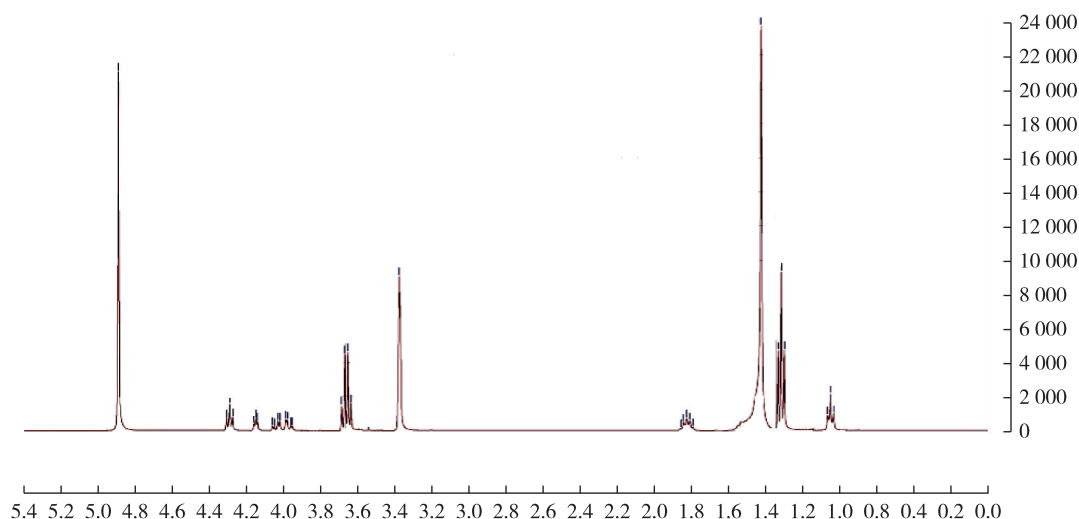


图 13 L-丝氨酸十八醇酯的核磁共振图谱

r/min, 30 °C 密闭震荡反应 24 h。催化合成 L-丝氨酸十八醇酯的初步研究发现有机溶剂 DMF 作为水溶性有机相溶剂,当体积比为 5 时,可达到 30.83%,高于单项反应体系,并且纯度大于 93%。固定化脂肪酶的条件优化及催化性能的研究对后续进一步研究和规模化生产及工业应用具有重要意义。

参考文献:

- [1]王常文,崔方方,宋宇. 生物柴油的研究现状及发展前景[J]. 中国油脂, 2017, 39(5): 44-47.
- [2]杨丽特,朱金华,文庆珍. 酸催化制备生物柴油的研究概况及发展[J]. 化工技术与开发, 2007, 36(2): 33-35.
- [3]吴梅,张慧,姚闽娜. 超声波-微波辅助浓硫酸催化油酸制备生物柴油[J]. 中国油脂, 2017, 42(7): 97-100.
- [4]张爱华,李昌珠,贾维肖. 固体碱催化沉香籽油制备生物柴油的研究[J]. 湖南林业科技, 2016, 43(3): 11-15.
- [5]李琪,银建中. 超临界甲醇法连续制备生物柴油工艺研究[J]. 应用科技, 2016, 43(2): 75-78.
- [6]徐春明,焦志亮,王晓丹. 微藻作原料生产生物柴油的研究现状和前景[J]. 现代化工, 2015, 35(8): 1-6.
- [7]孔维宝,华绍烽,宋昊. 利用微藻生产生物柴油的研究进展[J]. 中国油脂, 2010, 35(8): 51-56.
- [8]赵兴秀,何义国,赵长青,等. 脂肪酶固定化及其催化生物柴油研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(22): 159-164.
- [9]邓利,谭天伟,王芳. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(1): 97-101.
- [10]LIU J F, DENG L, WANG M, et al. Lipase catalyzed synthesis of medium-chain biodiesel from cinnamonum camphora seed oil[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2014, 22(Z1): 1215-1219.

- [11]MATEO C, PALOMO J M, FERNANDEZ-LORENTE G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007,40(6): 1451-1463.
- [12]王苗苗,李群艳,韦奇,等. 介孔 $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 中空磁性微球的漆酶固定化[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(2): 299-305.
- [13]秦胜利,于建生. 酶固定化技术研究进展[J]. 河南化工,2011, 28(3):24-25.
- [14]蔡志强,杨广花,朱孝霖,等.一种脂肪酶催化制备肉豆蔻丝氨酸酯的方法:102876741A[P]. 2013-01-16.
- [15]CAI Z Q, CAI J Y, LI S S, et al. Biosynthesis of myristyleserinate by immobilized *Candida antarctica* lipase in two-phase system[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014,108(10):118-122.
- [16]XIE W L, ZANG X Z. Immobilized lipase on core-shell structured Fe_3O_4 -MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard[J]. Translational Neuroscience, 2015, 194(2): 160-166.
- [17]LI Y, WANG X Y, JIANG X P, et al. Fabrication of graphene oxide decorated with Fe_3O_4 @ SiO_2 for immobilization of cellulase[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2015, 17(1):1-12
- [18]MOHAMED H A, MAGDY M K, FATTHY M M, et al. Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis[J]. Fuel, 2015, 160(15): 196-204.
- [19]FORESTI M L, PEDERNEIRA M, FERREIRA M L, et al. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems[J]. Applied Catalysis A: General, 2008, 334(1/2):65-72.
- [20]WANG X S, JIN Q Z, WANG T, et al. An improved method for the synthesis of 1-monoolein[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013,97(15):130-136.
- [21]YANG H L, MU Y, CHEN H T, et al. Enzymatic synthesis of feruloylatedlysophospholipid in a selected organic solvent medium[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4):3317-3322.

(责任编辑:殷丽莉)

【上接第12页】

- [9]WANG C Y, CAO S J, CHEN W T, et al. Synthesis and properties of fluorinated polyimides with multi-bulky pendant groups[J]. RSC Advances, 2017, 7:26420-26427.
- [10]陈文涛,汪称意,陈云云,等. 一种含氟芳香二胺及其聚砜酰亚胺的合成与表征[J]. 高分子学报, 2014(2):226-232.
- [11]WANG C Y, CHEN W T, XU C, et al. Fluorinated polyimide/POSS hybrid polymers with high solubility and low dielectric constant[J]. Chinese Journal of Polymer Science, 2016, 34(11):1363-1372.
- [12]YANG C P, SU Y Y. Synthesis and properties of organosoluble polyimides based on 4,4'-bis(4-amino-2-trifluoromethylphenoxy)-benzophenone[J]. Journal of Polymer Science, 2004, 42 (2):222-236.

(责任编辑:李艳)