

丝瓜络固定化米根霉 催化光皮树油制备生物柴油的研究

纪淑兰¹, 李迅¹, 王飞^{1*}

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 【目的】生物柴油作为一种新型可再生能源, 是化石燃料的理想替代品。它具有低硫、低碳和高十六烷含量的特点。与传统化学方法相比, 生物酶法制备生物柴油不需要额外去除催化剂和盐, 纯化费用低, 具有很大的应用潜力, 然而目前生物法中催化剂的高成本一直被认为是影响其产业化的一个重要因素, 利用固定化全细胞作为生物催化剂可以避免脂肪酶的复杂纯化过程, 有效降低生物催化剂的制备成本。【方法】本研究对一株高产脂肪酶的米根霉进行了固定化研究, 并将其应用于生物柴油的制备。首先通过比较固载率和甲酯化效果, 在生物基固定化材料丝瓜络、纳米纤维、水凝胶和椰壳活性炭中筛选出米根霉的最适固定化材料, 探索其适宜的固定化条件, 以获得的固定化米根霉作为全细胞催化剂催化光皮树油制备生物柴油。并进一步探讨了转酯化条件对生物柴油得率的影响。【方法】研究表明, 绿色环保、价格低廉的丝瓜络为米根霉的最适宜固定化材料, 其固载率达到 162±6%。丝瓜络是一种天然高分子材料, 不但具有高孔隙率(79%-93%)和低密度(0.02-0.04 g/cm³)的纤维血管网状结构利于米根霉菌丝的粘附, 而且具有优良的力学性能和坚韧的质地可以在后期应用过程中承受较大的剪切力。在 100 ml 米根霉发酵培养基中加入 2.25 g 丝瓜络作为固定化载体, 培养 72 h 即可收获效果最佳的固定化米根霉全细胞催化剂。为了提高丝瓜络固定化米根霉的催化效率, 研究了培养基成分对其影响。橄榄油含有较多的不饱和脂肪酸, 作为碳源具有一定的诱导作用, 可有效提高米根霉中的脂肪酶表达量, 以此获得的固定化米根霉催化光皮树油的甲酯得率达到 93%以上。通过评价固载率和甲酯得率, 选择多聚蛋白胨为有机氮源, NaNO₃ 为无机氮源的复合氮源来培养及固定化米根霉细胞。同时为了提高固定化细胞的使用寿命和重复使用次数, 研究了用浓度为 0.1%的戊二醛、双醛淀粉、京尼平溶液进行交联处理的可行性。结果发现, 在戊二醛处理的固定化细胞中脂肪酶活性损失较少, 在重复使用 6 次后, 转酯化效果依然保持在 80%以上。【结论】本研究获得的全细胞催化剂具有制备简单、稳定性良好、可重复利用等优点, 通过优化的培养基组成也具有价格较低廉的特点, 有效控制了全细胞催化剂的制备成本。

关键词: 全细胞催化剂 米根霉 丝瓜络 生物柴油 光皮树油

Immobilization of *Rhizopus oryzae* onto Loofah Sponge as a Whole-Cell Biocatalyst to preparation of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

Ji Shulan¹, Li Xun¹, Fei Wang^{1*}

(1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: 【Objective】 Biodiesel, as a new renewable energy, is an ideal substitute for fossil fuels. It has the characteristics of low sulfur, low carbon and high cetane content. Compared with traditional chemical methods, the preparation of biodiesel by biological enzyme method does not need to remove extra catalyst and salt, and the purification cost is low, so it has great application potential. However, the high cost of catalyst in biological method has always been considered as an important factor affecting its industrialization. Using immobilized whole cells as biocatalyst can avoid the complicated purification process of lipase and effectively reduce the preparation cost of biocatalyst. 【Method】 In this study, a strain of *Rhizopus oryzae* with high lipase production was immobilized and applied to the preparation of biodiesel. Firstly, by comparing the immobilization rate and the methyl esterification effect, the most suitable immobilized materials of *R. oryzae* were screened out from the bio-based immobilized materials of loofah sponge, nanofiber, hydrogel and coconut shell activated carbon, and the suitable immobilization conditions were explored. The immobilized *R. oryzae* was used as a whole cell biocatalyst to catalyze the preparation of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil. The effect of esterification conditions on the yield of biodiesel was discussed. 【Result】 The results showed that loofah sponge was the most suitable immobilization material for *R. oryzae*, and its immobilization rate reached 162±6%. Loofah sponge is a kind of natural polymer material. It not only has a fibrous vascular network structure with high porosity (79%-93%) and low density (0.02-0.04 g/cm³), which is beneficial to the adhesion of *R. oryzae*, but also has excellent mechanical properties and tough texture, which can bear large shear force in the later application process. Adding 2.25 g loofah sponge to 100 ml *R. oryzae* fermentation medium as immobilized carrier,

and culturing for 72 h, the best immobilized *R. oryzae* whole cell biocatalyst can be obtained. In order to improve the catalytic efficiency of *R. oryzae* immobilized on loofah sponge, the effects of medium components on it were studied. Olive oil contains more unsaturated fatty acids, which can be used as a carbon source to induce the expression of lipase in *R. oryzae*, and the methyl ester yield of immobilized *R. oryzae* catalyzed by it can reach over 93%. By evaluating the immobilization rate and methyl ester yield, the compound nitrogen source with polypeptone as organic nitrogen source and NaNO_3 as inorganic nitrogen source was selected to cultivate and immobilize *R. oryzae*. At the same time, in order to improve the service life and reuse times of immobilized cells, the feasibility of crosslinking with 0.1% glutaraldehyde, dialdehyde starch and genipin solution was studied. The results showed that the loss of lipase activity was less in the immobilized cells treated with glutaraldehyde, and the transesterification effect remained above 80% after repeated use for 6 times. 【Conclusion】 The whole-cell biocatalyst obtained in this study has the advantages of simple preparation, good stability and reusability. The optimized medium composition also has the characteristics of low price, which effectively controls the preparation cost of the whole-cell biocatalyst.

Keywords: Whole cell catalyst; *Rhizopus oryzae*; Loofah Sponge; Biodiesel; *Comus wilsoniana* fruit oil

生物柴油(脂肪酸甲酯)作为一种清洁的柴油燃料,有望成为传统化石燃料的替代品^[1]。目前制备生物柴油的主要方法为化学法,但化学法存在能耗高,产品纯化复杂,对环境造成二次污染等缺点^[2]。生物法制备生物柴油不需要额外去除催化剂和盐,纯化费用低,具有很大的应用潜力,然而目前生物法中催化剂的高成本一直被认为是生物法制备生物柴油产业化的一个重要障碍,利用固定化全细胞作为生物催化剂可以避免脂肪酶的复杂纯化过程,有效降低生物催化剂的制备成本。全细胞催化剂具有更高的醇耐受性和热稳定性,具有更长的使用寿命,能有效降低生物柴油的催化剂使用成本,越来越受到人们的重视。

米根霉在工业上是糖化酶、淀粉酶和乳酸脱氢酶产生菌种,在适宜的培养条件下米根霉还可产生大量的脂肪酶,目前固定化米根霉在制备生物柴油中已取得了一定的研究进展。Ban 等人^[3]将米根霉细胞固定在聚氨酯泡沫颗粒体上,催化大豆油甲酯化制备生物柴油。Athalye 等人^[4]以聚乙烯塑料为载体,固定化米根霉,以此催化棉籽油制备生物柴油,脂肪酸甲酯(FAME)产率为 27.9% (228.2 g/L)。利用化工高分子(如聚氨酯和聚乙烯等)作为固定化材料,在细胞固定化中会遇到一系列问题,如载体稳定性欠佳和成本较高;由于合成聚合物的毒性和机械强度不足,从而会引起细胞破裂和酶活性下降,缺乏细胞生长所需的足够空间等。生物基材料除了具备作为细胞固定化载体材料的特质之外,还具有物美价廉、无毒害、可生物降解、生物相容性好等优点,可以解决全细胞法制备生物柴油中细胞固定化载体的后期处理问题,在理论上有很好的应用背景。

原料来源是限制生物柴油产业发展的又一瓶颈,我国人口多,人均占有耕地面积较少,选择植物原料油应注意不能违背国家发展可再生能源“不与农争地,不与人争食”的方针,开发一些非食用植物油作为生物柴油的原料是一个重要方向。光皮树的寿命可达 200 年以上,平均每株光皮树产油 15kg/年,其果实所含脂肪酸组分优于菜籽油,主要为油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸和亚麻酸等,适合用来制备生物柴油。本研究选用光皮树油作为原料,考察不同的廉价生物基固定化材料固定化米根霉制备全细胞催化剂,并探讨固定化全细胞催化光皮树油生产生物柴油的适宜条件。

1 实验材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 实 材料

米根霉 LY6 由本实验室保存。丝瓜络海绵购自中国镇江洛康公司。胰蛋白胨、酵母提取物等购于 Oxoid(Hampshire, England)公司。系列脂肪酸甲酯标准品(色谱级)均购于 Sigma 公司,以上试剂均为分析纯。光皮树油由湖南林科院馈赠。

1.1.2 培养基

采用液体摇瓶培养,探讨培养基碳源、氮源培养条件对米根霉产脂肪酶及转酯化的影响。基础培养基中含有 7%的多聚蛋白胨、0.1%的 NaNO_3 、0.1%的 KH_2PO_4 、0.05%的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 3%的橄榄油^[5]。

1.1.3 主要仪器

低温液相层析柜, 德国 Thermo 公司; 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 离心机, 德国 Eppendorf 公司; 超净工作台, 苏州安泰技术有限公司; 恒温培养振荡器, 上海知楚有限公司。

1.2 米根 细胞的固定化

将预处理的固定化材料称取一定量加到装有 100 ml 液体发酵培养基的 250 ml 摇瓶中, 于 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min, 冷却至室温后, 接种约 10^6 个米根霉孢子, 在 28℃、180 r/min 条件下摇瓶培养, 过滤分离得到固定化全细胞, 用去离子水洗涤数次, 于 -20℃ 下预冷冻 24 h, 然后置于 -40℃ 下真空冷冻干燥 24 h, 取出后称重, 计算固载率。4℃ 冰箱内保存备用。本文所有涉及实验均重复 3 次, 误差线为标准偏差的平均值。

$$\text{固定细胞干重 (g)} = \text{催化剂总重量 (g)} - \text{载体重量 (g)} \quad (1)$$

$$\text{固载率 (\%)} = \text{固定细胞干重 (g)} / \text{载体重量 (g)} \quad (2)$$

1.3 固定化米根 全细胞催化剂的交联剂处理

将催化剂置入装有 100 ml 0.1% 交联剂溶液的 250 ml 摇瓶中, 在 25℃、180 rpm 摇床内反应 1h, 过滤, 用去离子水洗涤催化剂数次, 再置入装有 100 ml 磷酸缓冲液 (0.1M, pH6.8) 的 250 ml 摇瓶中, 于 4℃ 保温 5 min, 通过过滤固液分离后, 用去离子水洗涤催化剂数次, 于 -20℃ 下预冷冻 24 h, 然后置于 -40℃ 下真空冷冻干燥 24 h。4℃ 冰箱内保存备用^[6]。

1.4 固定化米根 全细胞催化光皮树油甲酯化反应

在 25 ml 茄形瓶中, 加入 4.825 g 光皮树油和一定量的磷酸缓冲液 (0.1M, pH6.8) 做反应溶剂, 再加入一定量的固定化全细胞催化剂, 按醇油摩尔比 1:1 在反应 0、10、24、48 h 时各添加一次甲醇, 于 35℃、180 r/min 条件下反应一定时间, 定期取 100 μL 反应液进行气相色谱分析。反应过后, 过滤固液分离得到催化剂, 用蒸馏水和正己烷洗涤数次, 室温干燥 1d 后用于重复使用。

1.5 甲酯化产物分析

内标法测定甲酯得率。反应结束后, 离心取上层产物, 用正己烷稀释成一定浓度, 加入一定浓度的内标物 (十七烷酸甲酯, 正己烷配制), 混匀后进行气相色谱 (GC, Agilent 7890A) 分析。分析条件为: PEG-20M 极性毛细管柱, FID 检测器, 载气为高纯氮气, 流速为 30 ml/min。进样量 1 μl, 分流比 50:1, 进样口和检测器温度分别设为 250℃ 和 260℃, 初始温度 180℃, 保温 2 min, 然后以 3℃/min 升至 240℃, 保温 10 min^[7]。

$$\text{得率计算公式: 甲酯得率 (\%)} = \text{甲酯总重量 (g)} / \text{原料油重量 (g)} \quad (3)$$

图 1 为丝瓜络固定化米根霉全细胞催化光皮树油甲酯化反应的气相色谱图。图中产物脂肪酸甲酯从左到右依次为: 1-棕榈酸甲酯, 2-硬脂酸甲酯, 3-油酸甲酯, 4-亚油酸甲酯, 5-亚麻酸甲酯。各甲酯的种类及含量和光皮树油中的脂肪酸组成一致。

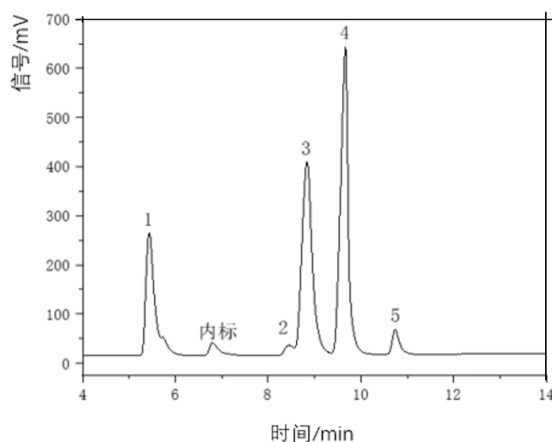


图 1. 固定化米根 催化光皮树油的产物气相色谱图

Fig 1. Gas chromatography of the product of immobilized *R. oryzae* catalyzed *Comus wilsoniana* fruit oil

2 结果与讨论

2.1 米根 固定化条件的优化

2.1.1 固定化材料对米根 固定化的影响

在相同培养条件下, 选用丝瓜络^[8]、纳米纤维^[9]、水凝胶^[9]、椰壳活性炭^[10]作为固定化材料, 研究不同生物基材料对米根霉固定化的影响。由图 2 可看出, 水凝胶与纳米纤维的固载率极低, 分析是由于其孔隙为纳米级, 能进入并被固定化的米根霉菌丝量较少, 因此这 2 种材料并不适于丝状真菌米根霉的固定化。活性炭在全细胞固定化如酵母以及酶的固定化中都有很多报道, 但是在本实验中, 椰壳活性炭的固载率也较低, 分析原因, 活性炭的吸附机理是依赖于分子之间相互吸附的“范德华力”或依靠自身独特的孔隙结构, 在固定化米根霉过程中, 活性炭的孔径大约 1.5 nm 左右, 而米根霉的孢子囊直径 60—250 μm , 所以椰壳活性炭固定化的菌体只是缠绕在其表面的一层, 并没有发挥其吸附作用, 后续甲酯化反应发现椰壳活性炭固定的菌丝容易在震荡过程中发生脱落现象。相比于纳米纤维、水凝胶和椰壳活性炭, 丝瓜络的固载率达 162%以上, 甲酯得率更是 90%以上, 分析原因, 丝瓜络是一种具有三维立体网状结构的多孔性生物基材料, 气通量高达 $63546\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 孔隙率达 79%—93%, BET (Brunauer-Emmertt-Teller equation) 比表面积平均值可达 $123\text{m}^2/\text{g}$ ^[11], 本研究采用的丝瓜络孔径为 $2\sim 4\text{mm}$, 主要成分是木质纤维素, 具有良好的生物亲和性, 有利于根霉菌丝的粘附生长, 在后续反应中也证实固定的菌丝不易脱落^[12-13]。纳米纤维、水凝胶和椰壳活性炭固定化米根霉不但固载率低, 而且由于细胞只是缠绕在材料表面, 在后续甲酯化反应过程中菌体脱落, 甲酯得率也极低, 所以不适于米根霉的固定化的实验。接下来的实验都用丝瓜络作为固定化材料。

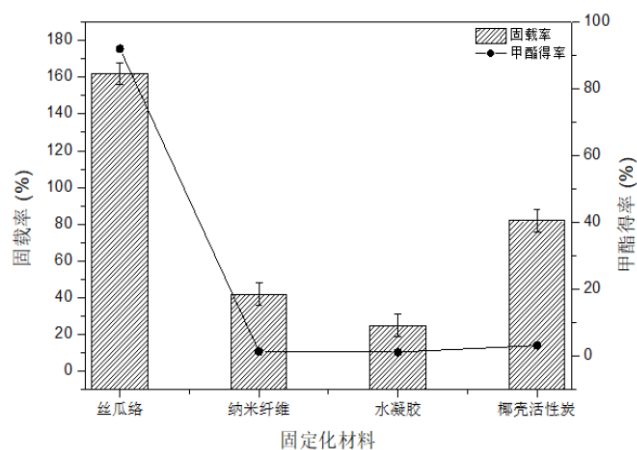


图 2 不同固定化材料对米根 固定化的影响

Fig. 2 Effects of different immobilization materials on *R. oryzae* immobilization.

固定化培养条件: 28°C , 180 rpm, 基础培养基。甲酯化反应条件: 35°C , 180 rpm, pH 值 6.8, 10% 的缓冲 (w/w, 占油重), 10% 的全细胞催化剂 (w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1。Immobilized culture conditions: 28°C , 180 rpm, basic medium. Methylesterification reaction conditions: 35°C , 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1.

2.1.2 载体添加 对米根 固定化的影响

丝瓜络的孔隙发达, 能够为细胞的黏附生长提供充足的空间。为了研究在发酵过程中载体添加量对米根霉细胞固定化的影响, 在发酵培养基中添加不同量的丝瓜络。由图 3 可知, 随着丝瓜络添加量的增加, 固载率开始逐渐增加, 当每 100ml 发酵液载体添加量为 2.25g 时, 固载率达到最高。当载体添加量较少时 (小于 2.25g), 培养基中有较多的菌丝球, 说明载体量不够。而当载体添加量为 2.25g 时, 固载率达到最高, 达到 163%, 且得到的固定化催化剂催化光皮树油甲酯得率最高, 达到 91%。说明在固定化培养过程中, 适宜的载体添加量可以使米根霉菌丝几乎全部固定在载体上, 米根霉细胞优先贴附于丝瓜络载体生长, 进一步验证了丝瓜络具有良好的生物亲和性, 同时获得的固定化细胞催化能力最强, 获得的生物柴油量最多。但是菌体的生长量主要受到培养基成分的限制, 当营养物质保持恒定时, 菌体的生长量也是一定的, 因此当载体添加量过多时 (大于 2.25g), 单位载体的固载量明显下降, 且得到的固定化催化剂催化光皮树油甲酯得率还有所下降, 仅为 88% (2.5g 载体添加量)。所以基于以上原因, 在固定化米根霉培养过程中, 以每 100ml 发酵液添加 2.25g 丝瓜络为最佳。

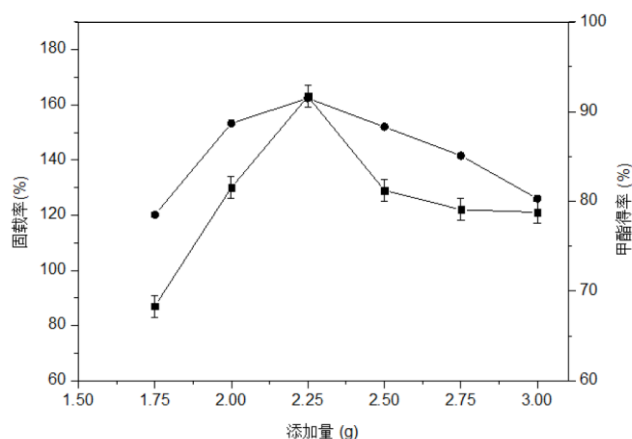


图 3 丝瓜络添加时 对细胞固定化的影响

Fig 3. Effect of adding time of loofah sponge extract on cell immobilization

固定化培养条件:28℃, 180 rpm, 基础培养基。甲酯化反应条件: 35℃, 180 rpm, pH 值 6.8, 10%的缓冲(w/w, 占油重), 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 固载率(□)、甲酯得率(●)。Immobilized culture conditions: 28℃, 180 rpm, basic medium. Methyl esterification reaction conditions: 35℃, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1. Immobilization rate (□)、Methyl ester yield (●).

2.1.3 固定化时 对全细胞催化剂的影响

固定化时间影响载体对细胞的固载率和全细胞催化剂的催化效率, 为获得最经济的高固载率和高催化活性的固定化全细胞催化剂, 本实验在载体加入 24 h~96 h 后分别取样, 探究固定化时间对全细胞催化剂的影响。结果如图 4 所示, 在米根霉加入固定化载体培养 36 h 之后, 固载率保持在 163%左右, 继续增加培养时间, 固载率没有太大变化, 而加入固定化载体培养到 96 h, 固载率却有所下降。分析其原因, 是由米根霉的生长期决定的, 细胞接种后, 24 h~36 h 进入快速生长期, 48 h~84 h 进入稳定期, 84 h 后培养基中的营养物质耗尽, 代谢废物含量呈上升趋势, 细胞的增殖和细胞内脂肪酶的合成受阻。结合固定化全细胞催化剂的甲酯化效果, 随着固定化时间的增加, 全细胞催化剂催化效果也呈增长趋势, 甲酯得率在 72 h 达到最高, 为 90%。继续增加固定化时间, 甲酯得率反而出现下降趋势。因此, 加入固定化载体丝瓜络培养米根霉 72 h 时即可收获高固载率、高催化活性的固定化全细胞催化剂。究其原因, 同样是由米根霉的生长期和产酶期决定的, 72 h 的细胞处于生长稳定期, 产酶量达最高, 催化效率也是最高的。

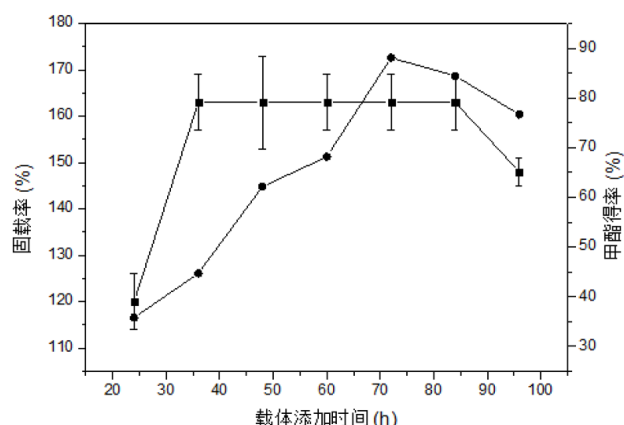


图 4 丝瓜络添加时 对细胞固定化的影响

Fig. 4 Effect of adding time of loofah sponge extract on cell immobilization

固定化培养条件:28℃, 180 rpm, 基础培养基。甲酯化反应条件: 35℃, 180 rpm, pH 值 6.8, 10%的缓冲(w/w, 占油重), 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 固载率(□)、甲酯得率(●)。Immobilized culture conditions: 28℃, 180 rpm, basic medium. Methyl esterification reaction conditions: 35℃, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1. Immobilization rate (□)、Methyl ester yield (●).

2.1.4 培养基成分对米根 固定化的影响

2.1.4.1 不同碳源对米根霉固定化的影响

不同的碳源对细胞生长和脂肪酶产生的影响不同，现有研究表明，以葡萄糖为碳源培养米根霉，可以获得更多的细胞生物量，但检测到的脂肪酶活性很少，而用植物油，如橄榄油，作为碳源，可以观察到更高的脂肪酶活性。为了获得更多的细胞生物量和脂肪酶活性，也有人提出将葡萄糖和油脂结合作为碳源^[14]。甚至有报道称碳源不仅影响脂肪酶的产生，而且对细胞壁的组成也有一定的影响，进而影响全细胞催化生产生物柴油的效率^[15]。本实验选用葡萄糖、橄榄油、50%葡萄糖和 50%橄榄油的组合、大豆油、糊精、淀粉作为碳源（加入量均为 3%），探究不同碳源对米根霉固定化细胞的影响。由图 5 可知，葡萄糖、糊精和淀粉作为碳源时，菌体生长较少，在相同的培养时间内，固载率较低，导致后期用相同重量的的催化剂做甲酯化反应时，甲酯得率不高，因此在本研究中不适宜作为培养米根霉的碳源。大豆油与橄榄油相比，不饱和脂肪酸含量较低，而培养基含有较多不饱和脂肪酸是提高脂肪酶活性的一种重要方法^[16]。橄榄油作为碳源时，固载率较高，且在获得的全细胞催化剂制备生物柴油的甲酯得率达到 90%以上（见图 6）。因此，选择 3%橄榄油作为诱导米根霉产脂肪酶的碳源。

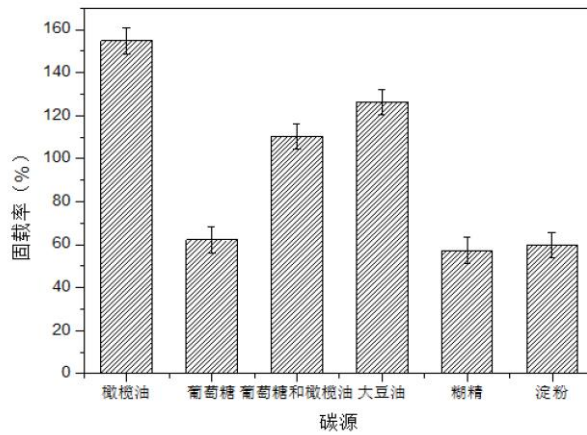


图 5 碳源对米根 固载率的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on the immobilization rate of *R. oryzae*

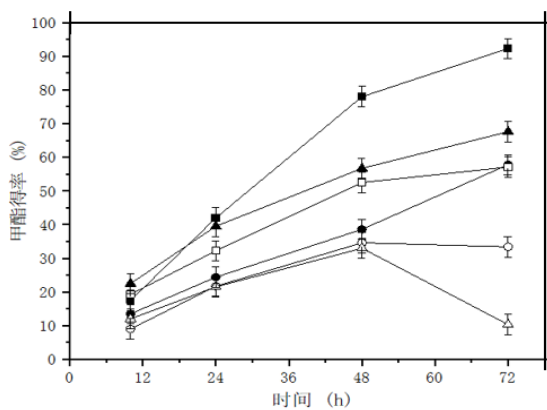


图 6. 碳源对米根 全细胞催化剂催化光皮树油制备生物柴油的影响

Fig. 6 Effect of carbon source on the whole cell catalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 35℃, 180 rpm, pH 值 6.8, 10% 的缓冲 (w/w, 占油重), 10% 的全细胞催化剂 (w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 橄榄油 (□)、葡萄糖 (●), 50% 葡萄糖和 50% 橄榄油组合 (▲), 豆粉 (▣), 糊精 (○) 和淀粉 (△)。Methylesterification reaction conditions: 35 °C, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1, olive oil (□)、glucose (●), Combination of 50% glucose and 50% olive oil (▲), Soybean flour (▣), dextrin (○) and starch (△)。

2.1.4.2 不同氮源对米根霉固定化的影响

不同氮源对微生物的生长和酶的性质也有着不同的影响。几种有机氮源（胰蛋白胍^[17]、牛肉膏^[18]和酵母膏^[19]）和无机氮源（NaNO₃）对米根霉生长的影响见图7。结果表明,单纯以NaNO₃为氮源时,米根霉基本不生长。多聚蛋白胍作为氮源时,固载率最高,可达160.7%,且以此获得的固定化全细胞催化油脂的甲酯化效果也最好(见图8)。牛肉膏作为氮源的全细胞固载率达到154.2%,但是催化剂甲酯化效果相对较差。酵母膏则相反,催化剂甲酯化效果较好,但是全细胞固载率相对于胰蛋白胍较低。胰蛋白胍的全细胞固载率和甲酯化效果在这几种有机氮源中都处于中间水平。各种研究和生产实践表明,复合氮源对微生物发酵和产酶比单一无机氮和有机氮更有效,所以结合对米根霉细胞生长和后期转酯化的效果,选择多聚蛋白胍作为米根霉产酶的有机氮源,NaNO₃为无机氮源。

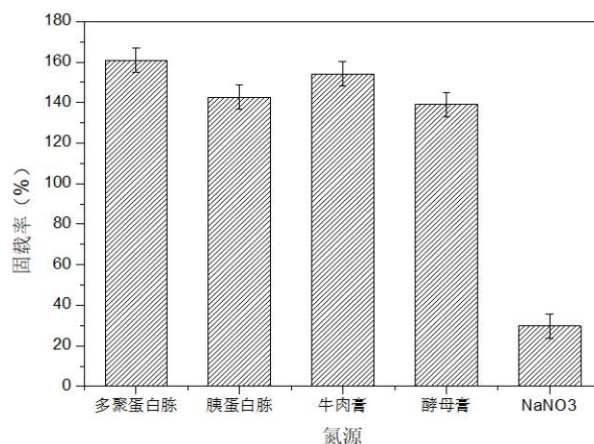


图7 氮源对米根霉固载率的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen source on the immobilization rate of *R. oryzae*

注：有机氮源为有机氮与0.1% NaNO₃复合

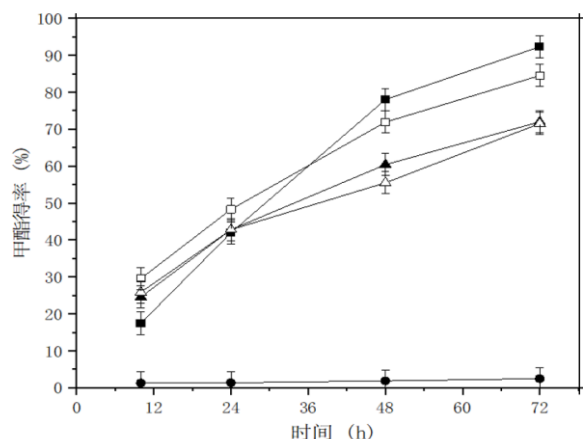


图8 氮源对米根霉全细胞催化剂催化光皮树油制备生物柴油的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen source on the whole cell catalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 35℃, 180 rpm, pH 值 6.8, 10%的缓冲(w/w, 占油重), 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为4:1, 多聚蛋白胍(□)、酵母膏(○)、胰蛋白胍(▲)、牛肉膏(△)和NaNO₃(●)。Methylesterification reaction conditions: 35 °C, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4:1, Polypeptide Peptone (□), yeast extract (○), tryptone (▲), beef extract (△) and NaNO₃ (●)。

2.1.5 交联剂对米根霉固定化的影响

为提高全细胞催化剂的催化稳定性和重复使用性, 以此降低生产成本并提高生产效率, 研究了不同交

联剂对全制备细胞催化剂的影响。将固定化米根霉细胞分别用 0.1% 戊二醛、双醛淀粉、京尼平^[20]溶液进行交联处理。如图 9 所示, 未经交联剂处理的全细胞催化剂在第 6 批反应的甲酯得率仅为 66%, 相比较之下, 经交联剂处理后的全细胞催化剂在第 6 批反应的甲酯化得率均高于未交联处理的全细胞催化剂, 特别是经戊二醛交联处理的全细胞催化剂, 在第 6 批反应的甲酯化得率能保持在 80%以上, 戊二醛处理使催化剂稳定性提高归因于较少的脂肪酶从固定化细胞中泄漏^[21]。用戊二醛处理的全细胞催化剂, 无论是分子内交联结构还是分子间交联结构都比较稳定。双醛淀粉虽然比戊二醛有更多醛基, 但交联效果比戊二醛稍差, 这是因为: 一方面, 双醛淀粉的分子量大, 空间位阻明显; 另一方面, 双醛淀粉中两个醛基的距离近, 其内部会发生交联, 具有反应活性的醛基含量要比真实的醛基含量少些^[22]。且双醛淀粉的生产成本高, 不适用于工业化使用。京尼平是栀子苷经 β -葡萄糖苷酶水解后的产物, 分子式为 $C_{11}H_{14}O_5$, 化学结构具有羟基、羧基等多个活性基团, 具有自发与氨基酸或蛋白质反应的能力。然而京尼平的交联反应机理尚不明确, 根据反应观察和检测推测认为京尼平自发与氨基酸反应生成一个环烯醚萜的氮化物, 再经过一个脱水作用形成一个芳香族单体, 最后该单体可能由于自由基反应的二聚作用而形成环状的分子间和分子内交联结构。与其他交联剂相比, 京尼平的最大优势在于其极低的细胞毒性^[23], 但是在本实验中, 京尼平交联处理的全细胞催化剂效果一般, 且其价格更昂贵, 因此选择戊二醛为米根霉全细胞催化剂的交联剂。

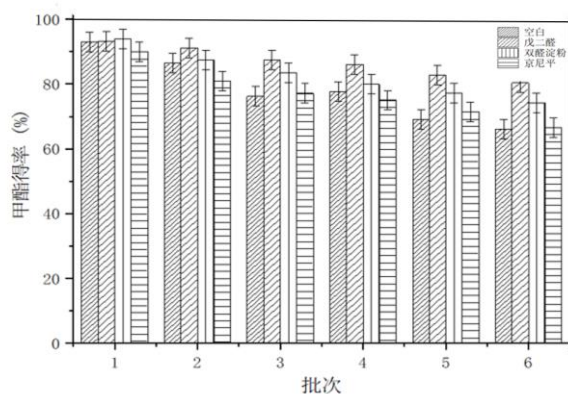


图 9 (未) 经不同交联剂交联处理的全细胞催化剂的 复使用次数

Fig. 9 (Not) Reuse Times of Whole Cell Catalyst Crosslinked with Different Crosslinking Agents

单批反应条件: 35℃, 180 rpm, pH 值 6.8, 10%的缓冲(w/w, 占油重), 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油摩尔比 4:1。Methylesterification reaction conditions: 35℃, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4:1.

2.2 米根 全细胞催化剂催化光皮树油制备生物柴油条件优化

2.2.1 温度对生物柴油得率的影响

温度是影响脂肪酶催化反应的一个重要参数, 与一般化学反应一样, 提高温度可以增加酶促反应的速度, 而酶是一种活性蛋白质, 在化学键的维持下具有高度的立体结构, 温度过高将导致化学键的断裂, 引起蛋白质变性, 从而导致酶的失活。因此, 每一种脂肪酶都有自身的最适反应温度。如图 10 所示, 当温度从 25℃逐渐升高时, 米根霉全细胞催化剂的转酯化效果越来越好, 在 35℃时甲酯得率达到最高值, 进一步升高反应温度, 导致脂肪酶蛋白变性, 甲酯得率下降, 说明米根霉全细胞催化剂的最适催化温度为 35℃。

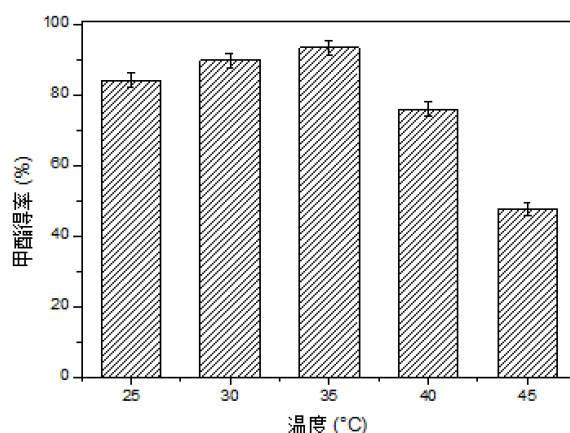


图 10. 温度对全细胞催化光皮树油甲 分解的影响

Fig. 10 Effect of temperature on the whole cell biocatalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 不同温度, 180 rpm, 10%缓冲(w/w, 占油重), 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1。Methylesterification reaction conditions: Different temperatures, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1.

2.2.1 含水 对生物柴油得率的影响

脂肪酶催化反应主要发生在油水界面上, 适当的含水量可以为脂肪酶反应提供反应场所^[24], 进而提高甲酯化产率; 此外, 由于甲醇是一种亲水化合物, 易溶于水, 适当的含水量可以防止甲醇对整个细胞的抑制^[25]。如图 11 所示, 当反应的含水量从 0 逐渐提高时, 甲酯得率也迅速上升, 在 10%时达到最高, 随后进一步提高含水量到 15%时, 甲酯化得率反而下降。因为在脂肪酶生物催化体系中, 酯化反应是一个可逆过程, 水是油脂酯化反应第二步酯化反应的副产物, 过多的含水量会阻碍反应向正向进行, 从而降低甲酯化产率。此外, 大量的水会阻碍传质, 从而降低反应效率。所以, 含水量以 10%最为适宜。

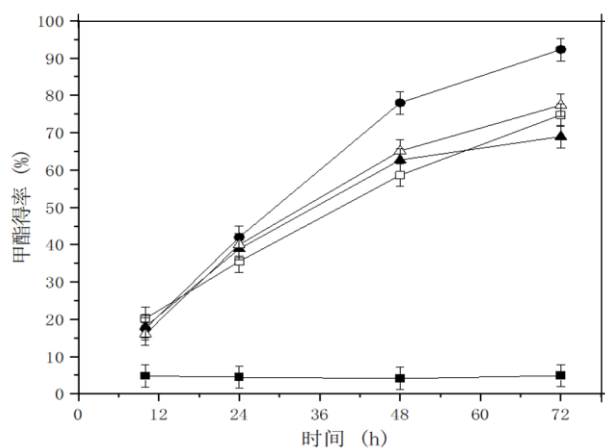


图 11. 含水 对全细胞催化光皮树油甲 分解的影响

Fig. 11 Effect of water content on the whole cell biocatalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 35°C, 180 rpm, 10%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 0(□)、3%(○)、5%(▲)、10%(◆)和 15%(△)。Methylesterification reaction conditions: 35 °C, 180 rpm, 10% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1, 0(□)、3%(○)、5%(▲)、10%(◆) and 15%(△).

2.2.2 催化剂用 对生物柴油得率的影响

在含水率 10% (占油重) 的反应体系中, 分别加入占光皮树油重 8%、10%、12%、15%和 18%的全细胞催化剂, 对催化剂的用量进行了探索。在反应体系一定的情况下, 随着催化剂用量的增加, 反应速率和最终甲酯化得率均有所提升, 但是在增加到一定量之后, 过多的催化剂不仅不利于反应的进行, 反而会因

为过多的催化剂影响反应的传质传热,造成催化效率的下降,所以由图 12 的结果表明,全细胞催化剂用量以 12%最佳,甲酯得率可达 94%以上。

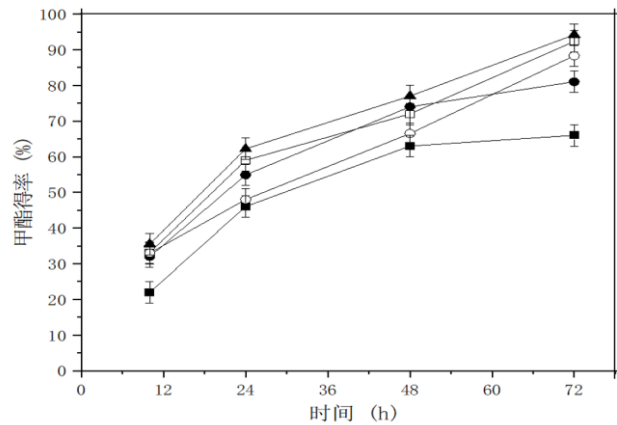


图 12. 催化剂 对全细胞催化光皮树油甲 分解的影响

Fig. 12 Effect of the amount of biocatalyst on the whole cell biocatalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 35℃, 180 rpm, 10%的缓冲(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 8%(□)、10%(●), 12%(▲), 15%(◻)和 18%(○)。Methylesterification reaction conditions: 35 °C, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), the ratio of alcohol to oil is 4: 1, 8%(□), 10%(●), 12%(▲), 15%(◻) and 18%(○).

2.2.3 甲 添加时 对生物柴油得率的影响

本研究中甲醇与光皮树油的总摩尔比为 4: 1, 因为甲醇对酶有抑制作用, 所以添加甲醇的方式必须考虑避免这种抑制作用。分步加入甲醇已被广泛用于防止甲醇对酶活性的抑制, 并被证明是成功的方法^[26]。本研究通过优化甲醇分步加入方式, 不仅获得了更高转化率的生物柴油, 而且有效缩短了催化时间。

先前的研究表明, 在反应 0、12、24、48h 时添加甲醇, 生物柴油的初始转化率和最终转化率较高, 72h 的甲酯得率达 90%以上^[5]。以此为基础设计了不同的甲醇添加时间, 如图 13 所示, 每隔 12h 和 10 h 添加甲醇, 反应 60h 后的最终转化率分别为 75.6%和 72.5%, 说明简单缩短添加甲醇时间间隔会导致甲醇过量累积。根据甲酯化时间曲线, 发现 36 h 后甲酯得率增长趋势放缓, 所以进一步改进添加甲醇的时间间隔分别为 0、10、24、48 h 和 0、10、20、48 h 和 0、10、24、40h, 反应 60h 最高甲酯化得率分别为 85.5%、94.15%和 84.8%。因此, 最佳的添加甲醇方式是以醇油摩尔比 4: 1, 等摩尔的甲醇分别在 0、10、24、40h 时添加, 不仅获得了最高的甲酯化得率, 且把催化时间由 72 h 缩短为 52h。

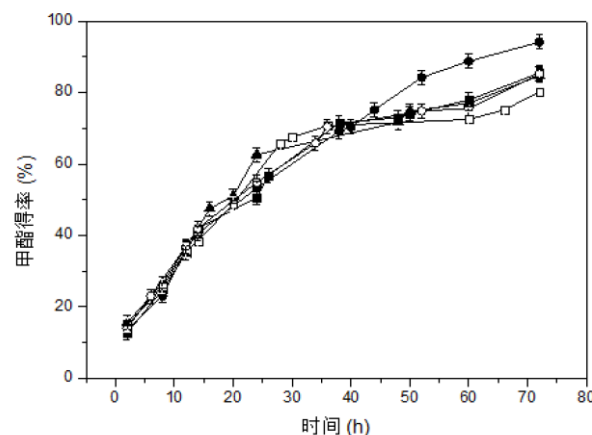


图 13. 甲 添加时 对全细胞催化剂催化光皮树油甲酯得率的影响

Fig. 13 Effect of methanol addition time t on the whole cell biocatalyst of *R. oryzae* for production of biodiesel from *Comus wilsoniana* fruit oil

反应条件: 35℃, 180 rpm, 10%缓冲(w/w, 占油重), 12%的全细胞催化剂(w/w, 占油重), 醇油比为 4: 1, 0-10-24-48 (□)、0-10-24-40

(●), 0-10-20-48 (▲), 每隔 10h (⊖) 和每隔 12h (○)。Methylesterification reaction conditions: 35 °C, 180 rpm, pH 6.8, 10% buffer (w/w, weight of oil), 12% whole cell biocatalyst (w/w, weight of oil), and the ratio of alcohol to oil is 4: 1, 0-10-24-48 (⊖)、0-10-24-40 (●)、0-10-20-48 (▲), Interval 10h (⊖) 和 Interval 12h(○)。

3. 讨论

尝试丝瓜络、纳米纤维、水凝胶、椰壳活性炭生物基材料作为米根霉的固定化材料, 通过比较其固载率和甲酯化效果, 选定丝瓜络作为米根霉的最适宜固定化材料, 其固载率达到 162±6%。丝瓜络是一种天然高分子材料, 不但具有高孔隙率(79%–93%)和低密度(0.02–0.04 g/cm³)的纤维血管网状结构利于米根霉菌丝的粘附, 而且具有优良的力学性能和坚韧的质地可以在后期应用过程中承受较大的剪切力。在 100 ml 米根霉发酵培养基中加入 2.25 g 丝瓜络作为固定化载体, 培养 72 h 即可收获效果最佳的固定化米根霉全细胞催化剂。为了提高丝瓜络固定化米根霉的催化效率, 研究了培养基成分对其影响。橄榄油含有较多的不饱和脂肪酸, 作为碳源具有一定的诱导作用, 可有效提高米根霉中的脂肪酶表达量, 以此获得的固定化米根霉催化光皮树油的甲酯得率达到 93%以上。通过评价固载率和甲酯得率, 选择多聚蛋白胨为有机氮源, NaNO₃ 为无机氮源的复合氮源来培养及固定化米根霉细胞。同时为了提高固定化细胞的使用寿命和重复使用次数, 研究了用浓度为 0.1%的戊二醛、双醛淀粉、京尼平溶液进行交联处理的可行性。结果发现, 在戊二醛处理的固定化细胞中脂肪酶活性损失较少, 在重复使用 6 次后, 转酯化效果依然保持在 80%以上。本研究获得的全细胞催化剂具有制备简单、稳定性良好、可重复利用等优点, 通过优化的培养基组成也具有价格较低廉的特点, 有效控制了全细胞催化剂的制备成本。有关全细胞催化剂的后续工作将围绕丝瓜络的改性及机理研究, 通过探讨其表面基团、粒径、比表面、孔径和机械强度等参数和催化性能的比较, 进一步提升全细胞催化剂的催化性能和稳定性, 加大其在生物柴油的工业化应用潜力。

米根霉脂肪酶催化的油脂转酯化生产生物柴油过程中的酰基迁移, 发现随着水含量在一定范围内的增加, 可以促进酰基转移, 并以此可有效提高生物柴油的产量。当反应体系中含水量是光皮树油质量的 10%, 催化剂用量是 12%时, 最终催化光皮树油的甲酯得率达到 94%以上。此外, 甲醇对脂肪酶的抑制也是限制生物柴油得率的原因之一, 本实验尝试了不同的甲醇添加方式, 发现以总醇油摩尔比 4:1, 在反应 0、10、24、40h 时逐步添加, 能在 52h 获得 85%以上的甲酯得率, 有效缩短了催化时间。与现有文献报道中用米根霉脂肪酶法制备生物柴油相比, 本文研究结果在简化催化剂制备操作步骤, 降低其制备成本之外, 更是进一步提高了催化效率, 缩短了反应时间。而且后期使用过程中, 丝瓜络固定化米根霉更容易从反应混合物中分离出来进行重复使用。有关利用全细胞催化剂制备生物柴油的后续工作将继续围绕缩短催化时间进行研究, 通过筛选耐甲醇米根霉、混合菌催化和优化反应器等方法, 进一步提升全细胞催化剂在生物柴油的工业化应用潜力。

4. 结论

本研究对一株高产脂肪酶的米根霉进行了固定化研究, 并将其应用于生物柴油的制备。首先筛选不同的生物基固定化材料, 探索其适宜的固定化条件, 以获得的固定化米根霉作为全细胞催化剂催化光皮树油制备生物柴油。探讨了转酯化条件对生物柴油得率的影响。研究表明, 丝瓜络作为固定化材料的固载率最高, 以橄榄油作为碳源, 多聚蛋白胨和 NaNO₃ 作为复合氮源, 获得的固定化细胞的固载率及脂肪酶活性最强。以丝瓜络固定化米根霉催化光皮树油, 在 10%的含水量, 催化剂用量为 12%的反应体系中, 总醇油摩尔比 4:1, 甲醇分别在 0、10、24、40h 以 1:1 添加, 甲酯得率可达 94%以上。固定化全细胞重复使用 6 次后, 转酯化效果依然保持在 80%以上。

参考文献

- [1] AYHAN Demirbas. Progress and Recent Trends in Biofuels[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2007, 33(1):1-18.
- [2] Du Wei, LI Wei, SUN Ting, et al. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2008, 79(3):331-337.
- [3] BAN Kazuhiro, KAIEDA Masaru, MATSUMOTO Takeshi, et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 8(1):39-43.
- [4] SNEHA Athalye, RATNA Sharma-Shivappa, STEVEN Peretti, et al. Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC:#34612 whole cell biocatalysts: Culture media and cultivation period; optimization[J]. Energy for Sustainable Development, 2013, 17(4):331-336.
- [5] HAMA Shinji, YAMAJI Hideki, FUKUMIZU Takahiro, et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34(3):273-278.
- [6] SUN Ting, DU Wei, LIU Dehua. Comparative study on stability of whole cells during biodiesel production in solvent-free system[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(3):661-664.
- [7] 张昕怡,许蕊,王钰棋,等. 新型嗜热耐碱脂肪酶的纯化表征及应用[J]. 化工学报,2020,71(11):5246-5255.
ZHANG Xinyi, XU Rui, WANG Yuqi, et al. Purification and characterization of novel thermo-alkaline lipase and its application[J]. CIESC Journal, 2020,71(11):5246-5255.
- [8] HE Qiyang, SHI Hao, GU Huaxiang, et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* LY6 onto Loofah Sponge as a Whole Cell Biocatalyst for Biodiesel Production[J]. Bioresources, 2016, 11(1): 850-860.
- [9] 刘亮,吕鹤婵,蒋杰,等. 几丁质纳米纤维/壳聚糖复合气凝胶微球的制备与表征[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2016, 38(02):51-55.
LIU Liang, LV Hechan, JIANG Jie, et al. Preparation and characterization of chitin nanofiber/chitosan composite aerogels[J]. Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 38(02):51-55.
- [10] 刘红梅,汪沙,熊迪,等. 椰壳活性炭共价固载木瓜蛋白酶的研究[J]. 复旦学报(自然科学版),2012,51(05):553-558.
LIU Hongmei, WANG Sha, XIONG Di, et al. Covalent Immobilization of Papain on Coconut Shell Activated Carbon [J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2012,51(05):553-558.
- [11] 艾小林,陈燕丹,黄彪,等. 丝瓜络纤维的综合利用研究进展[J]. 化工进展, 2015.34(6):1708-1713.
AI Xiaolin, CHEN Yandan, HUANG Biao, et al. Progress in comprehensive utilization of loofah sponge fibers[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2015.34(6):1708-1713.
- [12] MARTINEZ C O, RUIZ S P, FENEION V C, et al. Characterization of curdlan produced by *Agrobacterium sp.* IFO 13140 cells immobilized in a loofa sponge matrix, and application of this biopolymer in the development of functional yogurt[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2016, 96(7):2410-2417.
- [13] MELEIGY S A, KHALAF M A. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(1):374-379.
- [14] BAN Kazuhiro; HAMA Shinji; NISHIZUKA Keiko, et al. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production[J]. Journal of Molecular Catalysis.B, Enzymatic, 2001, 17(3):157-165.
- [15] HAMA Shinji, YAMAJI Hideki, KAIEDA Masaru, et al. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21(2):155-160.
- [16] SUN Ting, DU Wei, LIU Dehua. Prospective and impacts of whole cell mediated alcoholysis of renewable oils for biodiesel production[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2010, 3(6):633-639.
- [17] SKORY C D. Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. [J]. Molecular genetics and genomics: MGG, 2002, 268(3):397-406.
- [18] 陈雪松,杨胜利. 高产木糖醇菌株的诱变选育及其发酵培养基优化[J]. 上海化工,2021,46(01):11-15.

- CHEN Xuesong, YANG Shengli. Mutagenesis Breeding on High-productive Strain of Xylitol and Optimization of Its Fermentation Medium[J]. Shanghai Chemical Industry, 2021, 46(01):11-15.
- [19] 马义芝. 培养基及红光培养条件对红曲霉次生代谢的影响研究[D]. 河北: 河北科技大学, 2013.
- MA Yizhi. Study of Medium and red light effect on secondary metabolites of *Monascus* [D]. Hebei: Hebei University of Science and Technology, 2013.
- [20] 王旻, 笪琳萃, 谢艳, 等. 京尼平作为交联剂在天然生物材料改性中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 027(05):580-585.
- WANG Min, DA Lincui, XIE Yan, et al. Application of genipin for modification of natural biomaterials as a crosslinking agent[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2013, 027(05):580-585.
- [21] SUN Ting, DU Wei, LIU Dehua, et al. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(7):1192-1195.
- [22] 王保金. 双醛淀粉及其交联效率的研究[D]. 广东: 广东工业大学, 2004.
- WANG Baojin. Study on dialdehyde starch and its crosslinking efficiency[D]. Guangdong: Guangdong University of Technology, 2004.
- [23] 林海, 但卫华, 但年华, 等. 胶原改性的研究进展[C]//中国生物医学工程进展——2007 中国生物医学工程联合学术年会论文集(下册), 2007:42-45.
- LIN Hai, DAN Weihua, DAN Nianhua, et al. Progress of collagen modification[C]// Progress of Biomedical Engineering in China -- Proceedings of 2007 China Biomedical Engineering Joint Academic Annual Meeting (Volume II), 2007:42-45.
- [24] SANKARAN Revathy, SHOW Pau Loke, CHANG Jo - Shu. Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2016, 10(6):896-916.
- [25] ARU Arumugam, VENKATACHALAM Ponnusami. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams[J]. Renewable Energy, 2014, 64:276-282.
- [26] NIE Kail, XIE Feng, WANG Fang, et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production[J]. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 2006, 43(1):142-147.