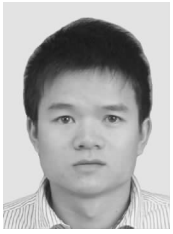
全细胞生物催化制备生物柴油研究
——固定化细胞的制备及其催化性能



LI Zhi-lin

李治林[1]，李 迅[1]，王 飞[1*]，蒋剑春[2]

（1. 南京林业大学 化学工程学院，江苏 南京 210037；2. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所；国家林业局 林产化学工程重点开放性实验室，江苏 南京 210042）

摘 要： 以硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝和海藻酸钠 4 种载体固定化米根霉细胞，探讨它们催化大豆油甲酯化反应生产生物柴油的能力。结果表明聚氨酯树脂为适宜的固定载体，在 80 mL 液体发酵培养基中，加入聚氨酯树脂 0.6 g 时所制备得到的固定化细胞性能最佳，此时固定上细胞干质量为 0.556 0 g，培养液酶活为 17.4 U/mL。将此固定化细胞用于催化大豆油甲酯化反应，在 m（甲醇）∶m（大豆油）为 5∶1 甲醇分批加入（每 12 h 加入 1 批）的情况下，甲酯得率可达 94 %。

关键词： 米根霉；固定化细胞；全细胞生物催化剂；甲酯化反应

中图分类号：TQ351；TQ517　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0253 - 2417(2009)01 - 0018 - 05

Study on Preparation of Biodiesel by Whole-cell Biocatalysis
——Preparation and Catalytic Capability of Immobilized Cells

LI Zhi-lin[1], LI Xun[1], WANG Fei[1], JIANG Jian-chun[2]

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;
2. Institute of Chemistry and Industry of Forest Products, CAF; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China)

Abstract: *Rhizopus oryzae* cells were immobilized respectively with 4 different supports, including diatomite, polyurethane foam resin (PUF), alumina and sodium alginate, and the immobilized cells were used to catalyze methylation of soybean oil with methanol. The results showed that PUF was the most suitable immobilizing support for *R. oryzae* cells. When 0.6 g PUF was added into 80 mL culture medium, the obtained immobilized cells biocatalyst had optimal performance, in which immobilized dry weight of cells and lipase activity of the culture fluid were 0.556 0 g and 17.4 U/mL, respectively. The yield of methyl esters (ME) from the methylation of soybean with methanol catalyzed by PUF immobilized cells could reach 94 % when m(methanol)∶m(soybean oil) was 5∶1 and methanol was added in 5 batches (12 h for each batch). The whole-cell biocatalyst of PUF immobilized cells can be simply prepared and separated, and it is environment-friendly and reusable.

Key words: *Rhizopus oryzae*; immobilized cells; whole-cell biocatalyst; methylation

固定化细胞技术是 20 世纪 70 年代兴起的一种生物技术，它是指用物理或化学的手段将游离细胞固定于限定的空间区域，并使固定后的细胞拥有良好的催化活性和重复使用性的一种方法[1]。这种以固定化细胞来催化的化学反应又称全细胞催化，近年来在生物柴油的制备研究中有所应用，有望成为一种新型、高效、无污染、低成本的生物柴油工业化生产方法[2-4]。米根霉（*Rhizopus oryzae*）作为一种培养简单、生长迅速、产酶能力强且对环境无毒的丝状真菌，在工业上有着广泛的用途。人们对米根霉细胞固定化研究也较快，目前用到的固定载体有海藻酸钙、海藻酸钠、聚丙烯酰胺凝胶、聚氨酯泡沫树脂等，主要是用于工业发酵产乳酸上[5-6]。在适当的培养条件下，米根霉能分泌很高活力的脂肪酶（包括胞外

收稿日期：2008 - 10 - 26
基金项目：国家“948”引进创新项目（2006-4-C05）；江苏省研究生科研创新计划项目（164030146）
作者简介：李治林（1982 - ），男，重庆丰都人，博士生，从事生物质资源生物化学加工研究
* **通讯作者：**王 飞，教授，博士生导师，主要从事生物质能源与化学品、天然产物化学研究；**E-mail:** hgwf@ njfu. edu. cn。

酶和胞内酶),这种脂肪酶优先水解 C_8~C_{18}的饱和脂肪酸链,且具有 1,3 位置特异性,使得米根霉在油脂行业有极好的应用前景[7]。本研究在已经获得高产脂肪酶真菌米根霉的前提下,用不同的固定载体固定米根霉细胞,并探讨了固定化细胞的活性及催化生产生物柴油的能力。

1　实验部分

1.1　原料

米根霉,为本实验室分离筛选保藏。海藻酸钠、硅藻土、聚氨酯树脂、大豆油(福临门生产)均为市售;氧化铝、甲醇、氯化钙、氢氧化钠、硫酸、盐酸等均为分析纯。

1.2　主要仪器

BECKMANX-22R 型高速离心机,美国;岛津 GC-14B 气相色谱仪,日本;CHRIST ALPHA 1-2 LD 冷冻干燥机,德国。

1.3　培养基

斜面、平板保种培养基:采用马铃薯培养基。灭菌后接种,在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 2 d。

液体摇瓶发酵培养基:胰蛋白胨 2 %,大豆油 0.3 %,$NaNO_3$ 0.1 %,KH_2PO_4 0.1 %,$MgSO_4$ 0.05 %,初始 pH 值 5.5。在 250 mL 三角瓶中加入 80 mL 液体培养基,灭菌后接种,28 ℃ 下 180 r/min 摇床培养 2 d。

1.4　载体预处理

固定所用载体多为工业产品,使用前必须进行适当预处理,尽可能减少其对菌生长的毒性。本实验选用载体为 3 种吸附型固定载体(硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝)和一种包埋型固定载体(海藻酸钠)。

1.4.1　*硅藻土*[8]　取 100 g 硅藻土加入 33 % 硫酸溶液中,80 ℃ 恒温水浴保温 90 min,再用蒸馏水洗涤至中性,重复以上操作一次。然后在 105 ℃ 下烘干,再置于 250 ℃ 马福炉中焙烘 2 h,取出置于干燥器中。用于固定细胞前,取已处理过的硅藻土,用 5 % 盐酸浸泡 2 h,水洗至中性,再用 5 % 氢氧化钠浸泡 2 h,水洗至中性,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,干燥备用。

1.4.2　*聚氨酯树脂*[6]　将聚氨酯树脂剪成 5 mm × 5 mm × 5 mm 的立方体,用蒸馏水浸泡漂洗几次,121 ℃ 下高压蒸汽灭菌 20 min,再更换蒸馏水重复灭菌两次,取出后干燥备用。

1.4.3　*氧化铝*[9]　用蒸馏水浸泡漂洗数次,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,取出后干燥备用。

1.4.4　*海藻酸钠*[10]　称取一定量海藻酸钠,加入蒸馏水溶解配成 3.3 % 的溶液,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。同时配置 2 % 氯化钙溶液,亦除菌。

1.5　细胞固定化及其性能评价

1.5.1　*吸附型载体*　对于硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝这 3 种吸附型固定载体,冷冻干燥后称取一定量加到装有 80 mL 液体发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,接种米根霉孢子悬液,在 28 ℃ 下 180 r/min 摇床上培养 2 d,取出后抽滤固液分离。

载体颗粒进行冷冻干燥后称质量,计算其固定上的细胞干质量和固定率(固定率 = 细胞干质量/载体质量)。酶液用于测定脂肪酶酶活。以固定上的细胞干质量和酶活来初步评价载体的固定性能。进一步选取性能较好的固定载体颗粒用于催化甲酯化反应,以甲酯得率来最终判定其催化能力。

1.5.2　*包埋型载体*　首先液体发酵培养得到米根霉菌液,再将菌液与海藻酸钠溶液按一定比例混合,用注射器逐滴滴入到氯化钙溶液中,钙化包埋 18 h,形成 4~5 mm 的小球,贮于 4 ℃。将此固定化小球用于催化甲酯化反应来评价其催化能力。

1.5.3　*固定化细胞催化甲酯化反应*　在 50 mL 具塞三角瓶中,加入 9.65 g 大豆油、0.35 g 甲醇和 0.5 mL 水,混匀,再加入一定量的各固定化细胞。于 35 ℃,150 r/min 摇床上反应,每隔 12 h 再加入 0.35 g 甲醇,即甲醇分批加入,每批加入量相当于甲醇与大豆油(醇油比)为 1∶1(物质的量之比,下同)。

甲酯化反应结束后,离心取上层反应产物,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),混匀后色谱分析。采用岛津 GC-14B 气相色谱仪,分析条件为:PEG-20M 毛细管柱,FID 检测器,进样量 1 μL,程序升温,柱温 180 ℃,保温 2 min 后以 5 ℃/min 升温至 240 ℃ 并保温 10 min,进样口温度 250 ℃,检测器温度 260 ℃,根据峰面积用内标法计算出甲酯得率。

2 结果与讨论

2.1 不同载体固定化米根霉细胞的效果及酶活性

硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝是吸附型固定载体,这类载体固定化细胞操作简单、成本低廉,在霉菌细胞固定中被广泛采用。吸附型载体固定细胞主要是物理吸附,将载体加入到培养瓶中,霉菌会自发地生长在载体上而被固定下来。霉菌在同一种载体上固定量越大,表明霉菌在此条件下的生长越好,其分泌到液体培养基中的酶也就越多[11-12]。前期研究也证明,米根霉培养时,胞外酶活和胞内酶活有相关性,即菌体量越高,胞外的酶活也高。所以在初步评价固定化细胞的性能时,以它们各自固定化细胞干质量、固定率和酶活作为依据。

图 1(a)为硅藻土固定米根霉细胞的情形,表明在 80 mL 培养基中,所用载体硅藻土质量为 3 g 时,所得的固定化细胞性能最佳,此时细胞干质量和酶活都达到最大值,分别为 0.603 4 g 和 15 U/mL,经计算此时固定率为 20 %。若再增加载体质量,固定上的菌体量会越来越少,而且酶活也越来越低。因为当载体增加时,培养摇瓶空间有限,载体自身碰撞接触频繁,不利于米根霉的吸附,这时米根霉主要以脱离载体而自聚集成团的形式生长。当载体量更大时,米根霉固定进一步受到抑制,这也可能是因大量的硅藻土本身或因预处理不当而产生了对米根霉的毒性。

图 1(b)为聚氨酯树脂固定米根霉细胞的情形,表明在 80 mL 培养基中,所用载体聚氨酯树脂质量为 0.6 g 时,所得的固定化细胞性能最佳,此时细胞干质量和酶活都达到最大值,分别为 0.556 0 g 和 17.4 U/mL,经计算此时固定率为 93 %。当载体质量大于 0.6 g 时,固定上的菌体量会下降,这与上述大量硅藻土固定时相似,因载体自身接触频繁而使米根霉不能很好的吸附在载体上。这时有少部分霉菌脱离载体而自聚成团;大部分霉菌形成层状菌丝膜将许多载体裹缚在其内部,导致内部载体无法吸附菌体。因为霉菌的生长需要一定的氧含量,层状菌丝膜阻碍了氧气和其它营养物质的传递,使内部载体不能长菌,仍然是空白载体。随着载体增加,酶活趋于稳定,反映了米根霉菌体生长量已达到最高值;另一方面,载体的增加并没有降低酶活,反映了较大量的聚氨酯树脂不会抑制米根霉的生长。

图 1(c)为氧化铝固定化米根霉细胞的情形,这时细胞干质量和酶活都非常低,且随着载体量增加两者均明显下降,表明氧化铝不适宜作为米根霉细胞固定化的载体。

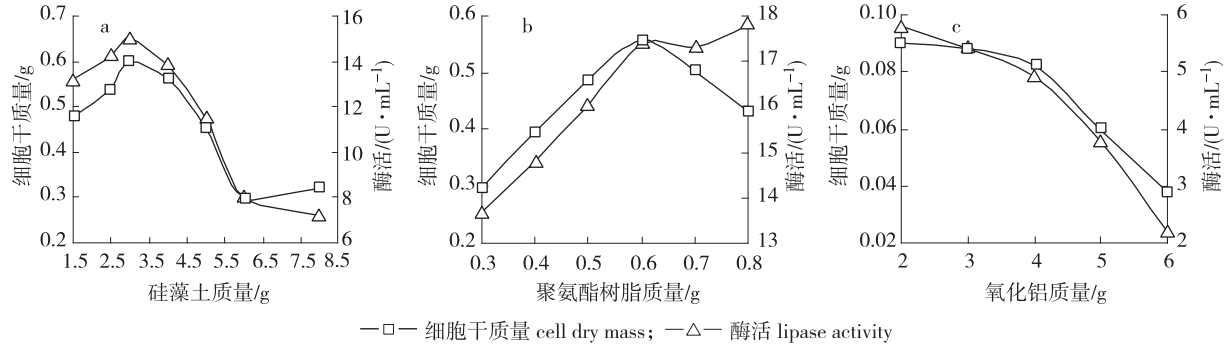


图 1 硅藻土(a)、聚氨酯树脂(b)、氧化铝(c)固定化米根霉细胞的细胞干质量和培养液酶活

Fig. 1 Dry mass and lipase activity of culture fluid of immobilized *R. oryzae* cells on diatomite(a), PUF(b), alumina(c)

海藻酸钠(钙化成海藻酸钙)是包埋型固定载体,无法测定其固定上的菌丝干质量,以其固定化细胞来催化反应,通过检测产物含量来评价其固定效果的方法就非常直接方便。实验中,将载体与菌液按不同比例钙化包埋,以形成的固定化小球催化甲酯化反应,产物经气相色谱检测。结果显示,产物中甲酯含量非常低,醇油比为 3∶1 时,甲酯得率仅有约 7 %。说明这种方法固定化米根霉效果较差,不能用作催化甲酯化反应的催化剂。这可能是,包埋法固定化细胞所用的载体形成的凝胶阻碍了物质的传递,使反应物和酶不能很好地接触反应。

根据上述细胞干质量和酶活的初步评价得出,硅藻土和聚氨酯树脂这两种载体固定的米根霉细胞有相对较好的性能。因此,将其用于催化甲酯化反应来进一步确定更适宜的载体。

2.2　硅藻土固定化细胞催化甲酯化反应

反应醇油比为 3∶1,甲醇分 3 批加入,每隔 12 h 加入一次,反应结果如表 1 所示。当所用硅藻土质量为 3 g,所制备的固定化细胞催化反应甲酯得率最高,这与此时其固定上细胞干质量和酶活最高一致。第一次反应时,最高甲酯得率为 55 %,比聚氨酯树脂固定化细胞催化反应时的最高甲酯得率略低。第一次反应结束后,分离得到载体,加入新的反应物进行第二次反应。由表中可知,硅藻土固定化细胞甲酯得率较第一次时下降明显,说明这种全细胞生物催化剂重复使用性较差。而且由于硅藻土颗粒相对较细,在反应结束后不易分离,这将给实际生产中带来较大的麻烦。

表 1　硅藻土和聚氨酯树脂固定化米根霉细胞催化大豆油甲酯得率比较

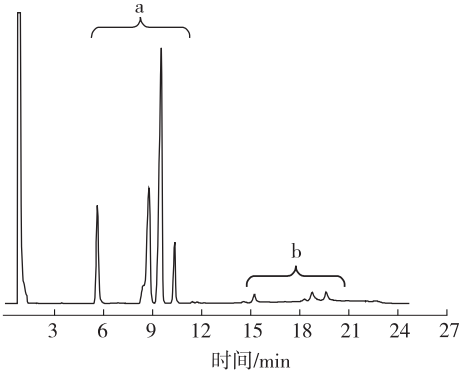
Table 1　Comparison of ME yields catalyzed by diatomite and PUF immobilized *R. oryzae* cells

条件 conditions		甲酯得率 ME yield/%	
		第一次反应 the 1st reaction	第二次反应 the 2nd reaction
硅藻土质量/g mass of diatomite	1.5	45	35
	2.5	51	34
	3.0	55	36
	4.0	47	26
	5.0	35	19
聚氨酯树脂质量/g mass of PUF	0.3	43	42
	0.4	48	45
	0.5	52	47
	0.6	61	58
	0.7	56	55
	0.8	51	48

2.3　聚氨酯树脂固定化细胞催化甲酯化反应

反应条件与硅藻土固定化细胞催化时一致,反应结果亦列于表 1。当所用聚氨酯树脂质量为 0.6 g,所制备的固定化细胞催化反应甲酯得率最高,这与此时其固定上细胞干质量和酶活最高一致。第一次反应时,最高甲酯得率为 61 %。第二次反应,甲酯得率仅有少许下降,相比于硅藻土固定化细胞有明显的优势,说明了这种全细胞生物催化剂可以重复使用,而且其颗粒较大,分离容易、操作简单,有较高的应用价值。

研究了醇油比对聚氨酯树脂固定化米根霉细胞催化大豆油甲酯化反应的影响。当醇油比为 1∶1、2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1、7∶1 时,其甲酯得率分别为 31 %、49 %、61 %、82 %、94 %、94 %、96 %。由此看出,在醇油比为 5∶1 时,第一次反应甲酯得率可达 94 %。国内外许多学者研究过固定化酶法催化制备生物柴油,一般在醇油比为 3∶1~6∶1,分批加入甲醇的条件下,甲酯得率可达 90 % 以上[13-16]。综合目前已报道的生物法催化生产生物柴油的文献,认为所制备的这种聚氨酯树脂固定化细胞催化剂应具有一定的竞争力和优势,不仅节省了生产成本,而且缩短了生产周期。



a. 脂肪酸甲酯 fatty acid methyl esters;
b. 游离脂肪酸 free fatty acids

图 2　聚氨酯树脂固定化细胞催化甲酯化产物气相色谱图

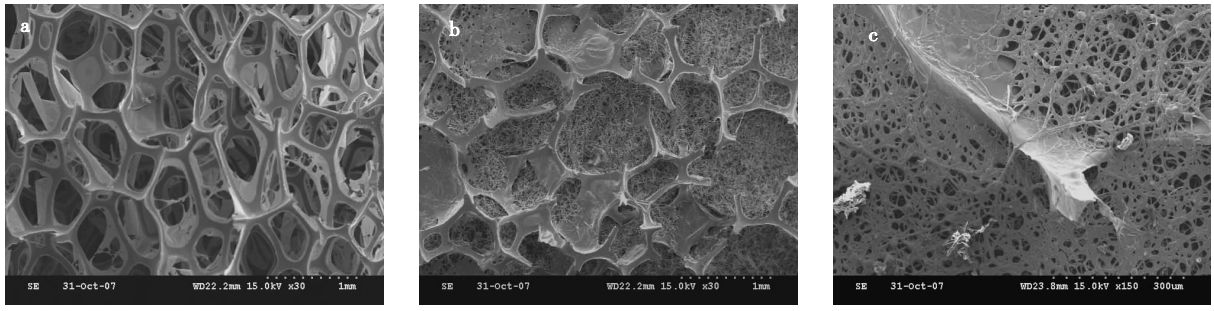
Fig. 2　GC spectrum of methylation products of soybean oil catalyzed by PUF immobilized *R. oryzae* cells

图 2 为聚氨酯树脂固定化米根霉细胞催化大豆油甲酯化反应的气相色谱图,可见该全细胞生物催化剂具有很好地催化大豆油水解为脂肪酸并与甲醇酯化合成脂肪酸甲酯的能力。

通过扫描电镜观察了米根霉菌体在聚氨酯树脂上的固定情况,见图 3。米根霉菌丝发达,生长迅速,通过吸附被固定在载体上。菌丝之间交错缠绕、均匀分布,使其不易脱落,有利于固定化细胞重复使用。借助载体本身强大的孔隙结构,在催化反应时能与反应物很好接触。载体本身的强度和韧性也确保了菌丝细胞内酶不易失活。这种全细胞生物催化剂制备简单,分离容易,可重复使用,与固定化酶相比节省了大量资金和时间,是一种新型环保的生物催化剂,有很好的工业应用前景。

3　结 论

选择硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝和海藻酸钠 4 种常见的固定化载体,分别固定化米根霉细胞,来制备生物柴油用全细胞生物催化剂,并探讨了其细胞固定化效果及催化性能。结论如下:



a. 空白聚氨酯树脂 blank PUF (×30)；b. 固定化细胞 PUF immobilized cells (×30)；c. 固定化细胞 PUF immobilized cells (×150)

图 3 聚氨酯固定化米根霉细胞扫描电镜照片

Fig. 3 SEM photographs of PUF immobilized *R. oryzae* cells

3.1 吸附型载体较适宜用来固定化米根霉细胞，尤其是聚氨酯树脂固定效果最佳。在 80 mL 培养基中，加入 5 mm ×5 mm ×5 mm 的聚氨酯载体 0.6 g 时所吸附得到的固定化细胞性能最好，此时其固定上米根霉细胞干质量为 0.556 0 g，发酵液酶活为 17.4 U/mL，固定率为 93 %。

3.2 将聚氨酯树脂固定化细胞和硅藻土固定化细胞用于催化大豆油甲酯化反应，在甲醇与大豆油物质的量之比（醇油比）为 3∶1 且分批加入甲醇时，第一次反应前者甲酯得率为 61 %，比后者甲酯得率 55 % 略高。第二次反应，聚氨酯树脂固定化细胞催化反应的甲酯得率基本稳定，而硅藻土固定化细胞催化的反应甲酯得率下降明显。

3.3 电镜观察聚氨酯树脂固定化细胞，表明米根霉细胞被均匀地吸附在载体聚氨酯树脂上，借助于载体本身的孔隙、强度和韧性保证了固定化细胞的催化活性和效率。

3.4 在醇油比为 5∶1 且分批（每 12 h 加入 1 批）加入甲醇时，聚氨酯树脂固定化细胞催化反应的甲酯得率可达 94 %。可以认为，这种固定化的全细胞生物催化剂将具有较好的应用前景。

参考文献：

[1] 孙志浩. 生物催化工艺学[M]. 北京：化学工业出版社，2005.

[2] KAZUHIRO B，MASARU K，TAKESHI M，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.

[3] SHINJI H，HIDEKI Y，MASARU K，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.

[4] 曾静，杜伟，徐圆圆，等. 培养过程参数对霉菌 *Rhizopus oryzae* IFO 细胞催化植物油脂合成生物柴油的影响研究[J]. 食品与发酵工业，2005，31(10)：17-20.

[5] 李学梅，林建平，岑沛霖. 霉菌固定化综述[J]. 生物工程进展，1999，19(4)：62-66.

[6] 陈育如，夏黎明，岑沛霖. 聚氨酯吸附固定米根霉发酵 *L*-乳酸的优化[J]. 南京师范大学学报，2002，2(1)：52-55.

[7] ABEL H，MARIE D，NATHALIE R，et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit[J]. Enzyme and Microbial Technology，2000，26(5)：421-430.

[8] 王琳，罗启芳. 硅藻土吸附固定化微生物对邻苯二甲酸二丁酯的降解特性研究[J]. 卫生研究，2006，35(1)：23-25.

[9] 黄磊，程振民. 无机材料在酶固定化中的应用[J]. 化工进展，2006，25(11)：1245-1249.

[10] 李超敏，韩梅，张良. 细胞固定化技术——海藻酸钠包埋法的研究进展[J]. 安徽农业科学，2006，34(7)：1281-1282，1284.

[11] 尹春华，傅四周，徐家立，等. 固定化少根根霉发酵产脂肪酶及催化合成单甘酯[J]. 过程工程学报，2002，2(6)：534-538.

[12] 张欣，袁其朋，蒋利伟，等. 固定化玫瑰微球菌发酵产海藻糖合成酶系[J]. 北京化工大学学报，2007，34(1)：9-13.

[13] YOMI W，YUJI S，AKIO S，et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel with immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic，2002，17(3)：151-155.

[14] MAMORU I，BAOXUE C，MASASHI E，et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic，2001，16(1)：53-58.

[15] ZNUR K，MELEK T，AYSE A. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium[J]. Bioresource Technology，2002，83(2)：125-129.

[16] 王学伟，常杰，吕鹏梅. 固定化脂肪酶催化制备生物柴油[J]. 石油化工，2005，34(9)：855-857.