

磁性壳聚糖固定化皱褶假丝酵母脂肪酶 催化酸化油生产脂肪酸

张萍波¹, 滕士奇¹, 王鹏飞², 范修霖¹, 严 琴², 范明明¹

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 南通金利油脂工业有限公司, 江苏 南通 226017)

摘要:为了探索和建立生物催化在油脂副产品利用中的应用策略, 将皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL)固定在磁性壳聚糖($\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$)载体上制备磁性固定化脂肪酶($\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$)。采用X射线衍射仪(XRD)、扫描电子显微镜(SEM)和振动样品磁强计(VSM)对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 进行了表征, 测定了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的脂肪酶负载量、比活性及酶学稳定性, 并将其用于催化水解大豆酸化油生产脂肪酸, 通过单因素实验研究了催化反应条件对水解率的影响, 考察了催化剂的重复使用性。结果表明: 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 保留了 Fe_3O_4 的磁性晶型, 呈球形颗粒状, 饱和磁化强度为61.1 emu/g, 脂肪酶负载量为5.53 mg/g, 比活性为7.70 U/g; 相比游离CRL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 具有较好的热稳定性、pH稳定性、有机溶剂稳定性及储存稳定性; $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 催化水解大豆酸化油生产脂肪酸最佳反应条件为反应温度40℃、水油比2:1(PBS与大豆酸化油体积比)、催化剂用量15% (以大豆酸化油质量计)、反应时间36 h, 在该条件下大豆酸化油的水解率达到84.93%; $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 经过5次重复使用后保持了61.4%的初始水解活性。综上, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 在酸化油中进行催化反应拓宽了固定化CRL的应用范围, 该催化反应体系是一种油脂精炼行业副产品的可持续高效利用方式, 在代替传统高能耗工业反应中具有良好的前景。

关键词: 固定化; 脂肪酶; 水解; 酸化油; 脂肪酸

中图分类号: TQ255.1; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2024)10-0040-07

Production of fatty acids from acidified oil catalyzed by magnetic chitosan immobilized *Candida rugosa* lipase

ZHANG Pingbo¹, TENG Shiqi¹, WANG Pengfei², FAN Xiulin¹,
YAN Qin², FAN Mingming¹

(1. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids of Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Nantong Jinli Oil Industry Co., Ltd., Nantong 226017, Jiangsu, China)

Abstract: To explore and establish strategies for the application of biocatalysis in the utilization of oil by-products, *Candida rugosa* lipase (CRL) was immobilized on magnetic chitosan ($\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$) to prepare magnetic immobilized lipase ($\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$). The $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ was characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and vibrating sample magnetometer (VSM). The lipase loading, specific activity and enzymatic stability of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ were determined. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ was used to catalyze the hydrolysis of acidified soybean oil to produce fatty acids, and

the effect of the catalytic reaction conditions on the hydrolysis rate was studied through single factor experiment, and the reuse performance of the catalyst was investigated. The results showed that $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ retained the magnetic crystal form of Fe_3O_4 , with spherical granule, saturation

收稿日期: 2023-02-23; 修回日期: 2024-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21978112)

作者简介: 张萍波(1981), 女, 副教授, 博士, 研究方向为油脂化工与催化转化(E-mail) pingbozhang@126.com。

通信作者: 范明明, 教授(E-mail) fanmm2000@126.com。

magnetization strength of 61.1 emu/g, lipase load of 5.53 mg/g, and specific activity of 7.70 U/g. Compared with free CRL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ had better thermal, pH, organic solvent and storage stability, and the optimal reaction conditions for the production of fatty acids from acidified soybean oil catalyzed by $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ were reaction temperature 40 °C, water-oil volume ratio 2:1 (PBS to acidified soybean oil), enzyme dosage 15% (based on the mass of acidified soybean oil), and reaction time 36 h. Under the optimal conditions, the hydrolysis rate of acidified soybean oil reached 84.93%. In addition, the catalyst $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ maintained 61.4% of its initial activity after five times of reuse. In conclusion, the $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ catalytic reaction in acidified oil broadens the application range of immobilized CRL. The catalytic reaction system is a sustainable and efficient use of by-products of oil refining industry, and has a good prospect in replacing the traditional industrial reaction with high energy consumption.

Key words: immobilization; lipase; hydrolysis; acidified oil; fatty acid

脂肪酸是由烷基链及其一端连有的单个羧基所构成的一类羧酸,常用于食品、化妆品、药品以及工业化学品等与人类生活息息相关的领域^[1-2]。酸化油是指皂脚经酸化后得到的混合物,其中包括甘油酯、磷脂、脂肪酸和色素等多种成分。酸化油由于含有高含量的游离脂肪酸,同时具有较低的生产成本,被视为良好的脂肪酸生产原料。在工业生产中,一般利用皂化酸化法、高压连续水解法、中压间歇水解法对脂肪酸进行大规模生产,但这些方法存在着腐蚀设备、污染环境、能耗大、水解效果不理想等缺点^[3]。与传统生产工艺相比,酶催化法因污染小、能耗低而降低了生产成本,同时酶的高专一性确保了反应的高效性和选择性,因此其在化工、制药、日用品和食品等行业引起了广泛的关注^[4-6]。然而,游离脂肪酶的稳定性和耐受性较差,重复使用性不佳,这导致其储存及应用成本高,为此脂肪酶的固定化技术应运而生。与游离脂肪酶相比,固定化脂肪酶已在多个领域被广泛应用,如精细化学品的制造、清洗剂使用性能的优化、新型能源的开发等。但固定化脂肪酶在酸化油水解方面的应用较少,主要原因在于酸化油中含有较多的酸性杂质及色素,影响固定化脂肪酶的催化效果,此外酸化油自身甘油酯含量较少、利用较困难等^[7-8]。

皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL)是目前化工领域应用较广泛的商品化脂肪酶之一,其能够催化甘油三酯完全水解为甘油和脂肪酸^[9]。目前一般利用多级孔 SiO_2 、壳聚糖和磁性颗粒等物质制备载体来固定化CRL,固定化CRL在中性及弱碱性环境中才能表现较高的催化活性^[10-12]。

壳聚糖(Chitosan, CS)是一种天然的氨基多糖,易于通过戊二醛对其氨基进行化学功能化的同时对CS分子进行交联,以便于将CS用作脂肪酶固定化

的载体;同时,CS由于具有成本低,生物相容性好,可生物降解等优良特性,目前已成为固定化脂肪酶最具前途的载体之一^[13-14]。 Fe_3O_4 颗粒由于其磁性,易于在外部磁场下从反应体系中分离。因此,将 Fe_3O_4 颗粒表面利用CS进行功能化修饰,结合两者在固定化脂肪酶方面的优势,不仅可以提高酶分子在催化反应中的稳定性,还有助于通过外部磁场实现酶与反应体系的分离,使脂肪酶可以多次重复使用。因此,本研究采用戊二醛交联法,利用 Fe_3O_4 颗粒和CS制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ 来固定化CRL,并将固定化CRL应用于催化大豆酸化油的水解,探究其反应条件及催化活性,以期拓宽固定化CRL的应用范围。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆酸化油,由金利油脂有限公司提供。皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL),Sigma-Aldrich(中国上海)公司;戊二醛(GA)和对硝基苯酚(*p*-NP),泰坦科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA),都莱生物技术有限公司;对硝基苯棕榈酸酯(*p*-NPP),安徽酷尔生物工程有限公司; Fe_3O_4 ,麦克林生化科技有限公司;HCl、KOH、KBr、氨水、乙酸、乙醇、壳聚糖(CS)、异丙醇、正己烷、甲苯、乙酸乙酯和丙酮,国药集团化学试剂有限公司;去离子水,实验室制备。

1.1.2 仪器与设备

AR1140电子分析天平,上海奥豪国际贸易有限公司;SHZ-B恒温水浴摇床,金坛区金城春兰实验仪器厂;ZNCL-CS数显电热恒温油浴锅,予华仪器有限责任公司;DHG-9075A电热恒温鼓风干燥箱,上海右一仪器有限公司;PH-3C pH计,上海越平科学仪器有限公司;HT-110X恒温振荡水浴摇床,江苏新春兰科学仪器有限公司;XRD-6000 X

射线衍射仪(XRD),日本岛津公司;BioTek Synergy H1 酶标仪,美国伯腾公司;S-3400N II 场发射扫描电子显微镜(SEM),日本日立公司;LakeShore Model 7304 振动样品磁强计(VSM),美国 LakeShore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Fe₃O₄@CS 的制备

称取 1 g CS 粉末溶于 100 mL 体积分数为 1% 的乙酸溶液中,得到 1 g/100 mL CS 溶液,再加入 2.0 g Fe₃O₄,超声 10 min 分散后,在室温下电动搅拌 2 h,磁倾析分离后,用去离子水缓和冲洗,再加入 100 mL 体积分数为 0.5% 的 GA 溶液,超声 10 min 分散后,加入 1.0 mL 氨水,使 CS 沉淀交联的同时活化为带有醛基的载体。上述体系继续搅拌 2 h 后,磁倾析分离,去离子水洗涤 3 次后在 60 °C 下烘干,得到 Fe₃O₄@CS。

1.2.2 固定化脂肪酶 Fe₃O₄@CS-CRL 的制备

将 0.5 g CRL 粉末溶解于 20 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.1 mol/L,pH 7.0)中,取上清液,加入 1.0 g Fe₃O₄@CS,在室温下电动搅拌 12 h 进行固定化。磁倾析分离后,用上述 PBS 洗涤 3 次,并在室温下干燥,得到固定化脂肪酶 Fe₃O₄@CS-CRL。

1.2.3 Fe₃O₄@CS-CRL 催化水解大豆酸化油

称取一定量的大豆酸化油、PBS(0.1 mol/L,pH 7.0)和 Fe₃O₄@CS-CRL,在锥形瓶中充分混合。将锥形瓶置于水浴摇床中,在一定温度下振荡反应一定时间。取样测定体系酸值和皂化值,按式(1)计算大豆酸化油的水解率(y)。

$$y = \frac{V_t - V_0}{S_0 - V_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: V_0 和 S_0 分别为大豆酸化油的酸值(KOH)和皂化值(KOH),分别为 123.77 mg/g 和 184.45 mg/g; V_t 为水解反应 t 时间后体系的酸值(KOH),mg/g。

1.2.4 样品的表征

使用配备 Ni 过滤的 Cu K α 辐射源($\gamma=0.1542$ nm)的 XRD 记录样品的 X 射线衍射图,设置管电压和管电流分别为 40 kV 和 40 mA。使用 SEM 观察样品的表面形态及尺寸,加速电压为 15 kV。在室温下使用 VSM 分析样品的磁滞回归线。

1.2.5 脂肪酶的负载量测定

参考文献[15]使用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度。通过酶标仪分别测定固定化前后 CRL 上清液在 595 nm 处的吸光度,并根据 BSA 标准曲线计算其蛋白质质量浓度,根据式(2)计算脂肪酶的负载量(x)。

$$x = \frac{c_1 V_1 - c_2 V_2}{m} \quad (2)$$

式中: c_1 和 c_2 分别为固定化前后蛋白质的质量浓度,mg/mL; V_1 和 V_2 分别为固定化前后脂肪酶溶液的体积,mL; m 为 Fe₃O₄@CS 的质量,g。

1.2.6 Fe₃O₄@CS-CRL 的活性测定

参考文献[16],以 p -NPP 为底物,通过比色法测定 Fe₃O₄@CS-CRL 的活性。测试原理为 p -NPP 在脂肪酶催化作用下水解反应生成 p -NP, p -NP 在溶液中呈黄色,在 405 nm 下有吸光值。利用酶标仪测定水解反应后溶液在 405 nm 处的吸光度,并根据 p -NP 标准曲线计算所生成的 p -NP 浓度。按式(3)计算 Fe₃O₄@CS-CRL 的比活性。脂肪酶活性的一个单位(U)定义为在测定条件(pH 7.0,25 °C)下每分钟生成 1 μ mol 的 p -NP。

$$x = \frac{n(p-NP)}{mt} \quad (3)$$

式中: x 为比活性,U/g; $n(p-NP)$ 为催化水解 p -NPP 生成的 p -NP 的量, μ mol; m 为催化剂的质量,g; t 为反应时间,min。

1.2.7 Fe₃O₄@CS-CRL 的酶学稳定性测定

1.2.7.1 热稳定性

分别称取一定量的游离 CRL 和 Fe₃O₄@CS-CRL 在一定温度(40、50、60、70、80 °C)下保存 2 h 后测定活性,并以 40 °C 所测得的活性为 100% 计算其他温度下的相对活性。

1.2.7.2 pH 稳定性

分别称取一定量的游离 CRL 和 Fe₃O₄@CS-CRL 在一定 pH 的 PBS(pH 5、6、7、8、9、10)中保存 2 h 后测定活性,并以在 pH 7 时的活性为 100% 计算其他 pH 下的相对活性。

1.2.7.3 有机溶剂稳定性

分别称取一定量的游离 CRL 和 Fe₃O₄@CS-CRL 于不同有机溶剂(乙醇、正己烷、甲苯、乙酸乙酯、丙酮)中保存 2 h 后测定活性,并以在 PBS 中的活性为 100% 计算在其他有机溶剂中的相对活性。

1.2.7.4 储存稳定性

分别称取一定量的游离 CRL 和 Fe₃O₄@CS-CRL 在 4 °C 下储存一段时间(7、14、21、28 d)后测定活性,以初始活性为 100% 计算其他储存时间下的相对活性。

1.2.8 Fe₃O₄@CS-CRL 的重复使用性

按照 1.2.3 方法,在优化条件下进行 Fe₃O₄@CS-CRL 催化水解大豆酸化油,反应结束后,分离

催化剂,分别用正己烷和去离子水洗涤后,再用于催化水解反应,计算每次催化反应的水解率。将首次反应的水解率设置为100%,计算催化剂不同重复利用次数的相对水解率。

1.2.9 数据处理

利用 IBM SPSS Statistics 软件中的单因素 ANOVA 检验模块进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 样品的表征

Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的XRD图谱如图1所示。

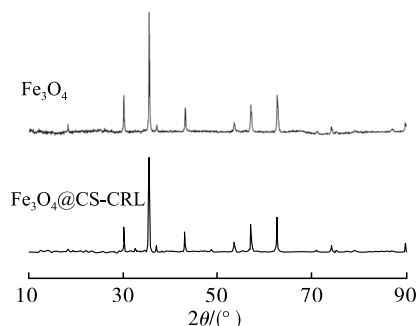


图1 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的XRD图谱
Fig.1 XRD patterns of Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$

由图1可看出, 2θ 为 30.1° 、 35.5° 、 43.1° 、 53.4° 、 57.0° 和 62.6° 的衍射峰,对应于 Fe_3O_4 立方尖晶石晶体结构的晶面(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)的典型衍射特征。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的XRD图谱仍存在 Fe_3O_4 的特征衍射峰,表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 保留了 Fe_3O_4 的磁性晶型。

Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的SEM图像如图2所示。

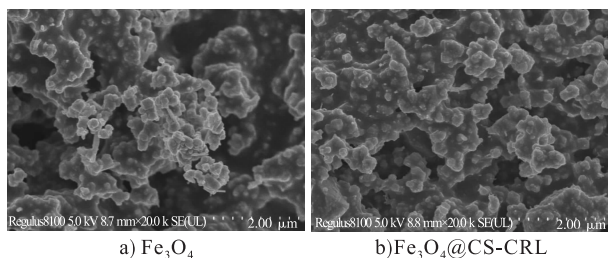


图2 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的SEM图像
Fig.2 SEM images of Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$

由图2a可看出, Fe_3O_4 呈易聚集的球形颗粒状。由图2b可看出, Fe_3O_4 在CS的修饰改性与固定化CRL后仍保持其形态和尺寸,说明CS的覆涂和脂肪酶的固定化均不影响 Fe_3O_4 原有的骨架结构和形貌。

Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的磁滞回归线如图3所示。

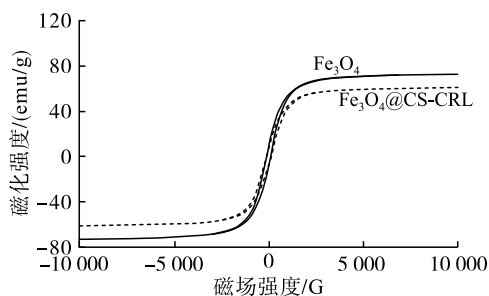


图3 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的磁滞回归线
Fig.3 Hysteresis loops of Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$

由图3可看出, Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的饱和磁化强度分别为72.5、61.1 emu/g。说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 具有足够的磁化强度,有利于其从反应体系中简易分离,满足反应磁分离要求。

2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的脂肪酶负载量和活性

经测定,制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的脂肪酶负载量为5.53 mg/g,比活性为7.70 U/g。

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的酶学稳定性

2.3.1 热稳定性

游离CRL和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的热稳定性测试结果如图4所示。

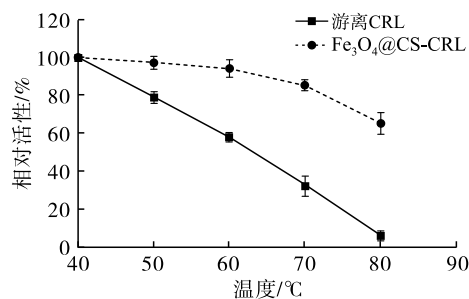


图4 脂肪酶的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of lipase

由图4可看出,脂肪酶活性随温度的升高而降低。这是因为高温容易使脂肪酶的氢键不稳定,破坏脂肪酶的活性构象而使其失活。与游离CRL相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 具有更好的热稳定性,说明载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ 和CRL通过共价结合固定化增强了CRL的刚性,提高了其热稳定性^[17]。

2.3.2 pH稳定性

游离CRL和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的pH稳定性测试结果如图5所示。

pH影响脂肪酶的稳定电离状态和活性构象,极端pH会破坏脂肪酶的活性基团,导致脂肪酶失活。由图5可看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的最佳pH与游离CRL一致,均为7。随着溶液的pH偏离最佳pH,脂肪酶的活性降低,相比游离CRL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$

的活性下降幅度较小。研究表明,经过共价固定化在载体上有利于提高脂肪酶活性位点的刚性,减少其活性区域受到极端 pH 的不利影响^[18-19]。酸化油中含有酸性杂质与脂肪酸,进行催化水解反应时催化剂所处环境 pH 较低,利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ 对 CRL 进行固定化则大大提高了游离 CRL 的酸稳定性,有利于催化酸化油水解率的提高。

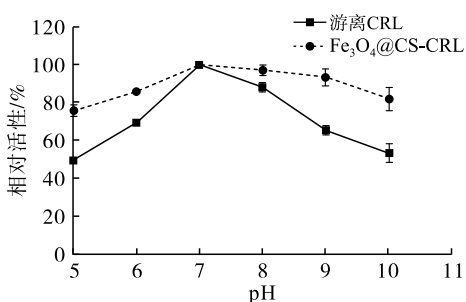


图5 脂肪酶的 pH 稳定性
Fig. 5 pH stability of lipase

2.3.3 有机溶剂稳定性

游离 CRL 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的有机溶剂稳定性测试结果如图 6 所示。

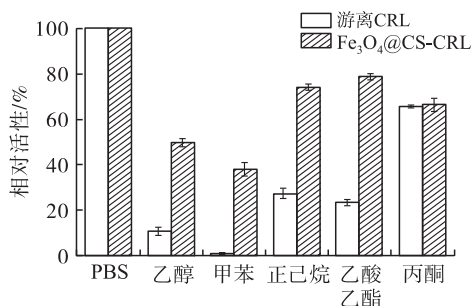


图6 脂肪酶的有机溶剂稳定性
Fig. 6 Organic solvent stability of lipase

有机溶剂通过破坏氢键和疏水键来破坏脂肪酶的水合层和二级结构,导致脂肪酶快速失活。然而,在油脂水解工业中不可避免地使用有机溶剂。因此,提高脂肪酶的有机溶剂稳定性有利于降低脂肪酶的应用成本^[20-21]。由图 6 可看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的有机溶剂稳定性明显高于游离 CRL,这归因于共价结合处理对 CRL 的保护和刚性的增强,这有利于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 在含有大量有机杂质的油脂副产品的催化体系中保持活性。

2.3.4 储存稳定性

游离 CRL 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的储存稳定性测试结果如图 7 所示。

由图 7 可看出,随着储存时间的延长,游离 CRL 活性降低,这可能与蛋白质结构的缓慢变性和脂肪酶分子的聚集有关。与游离 CRL 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 在储存 28 d 后仍保持较高的活性。这是因为

固定化有利于减少蛋白质结构的变性,同时保持了脂肪酶分子良好的分散性,减少其聚集,从而增强了其储存稳定性。

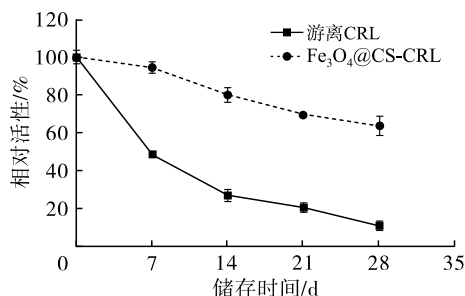
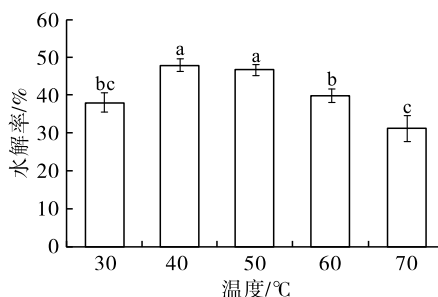


图7 脂肪酶的储存稳定性
Fig. 7 Storage stability of lipase

2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 催化水解大豆酸化油条件优化

2.4.1 反应温度的优化

在水油比 1:1 (PBS 与大豆酸化油体积比)、催化剂用量 10% (以大豆酸化油质量计)、反应时间 12 h 的条件下,考察反应温度对水解率的影响,结果如图 8 所示。



注:不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

The same below

图8 反应温度对水解率的影响

Fig. 8 Effect of reaction temperature on hydrolysis rate

由图 8 可看出,随着反应温度的升高,大豆酸化油水解率先升高后降低,40 °C 时水解率最高。这是由于反应温度升高,反应体系的底物分子运动和碰撞加快,从而提升反应速率;然而,反应温度过高,脂肪酶结构受到破坏而使其活性降低甚至失活,进而导致水解率降低。因此,适宜的反应温度为 40 °C。

2.4.2 水油比的优化

在反应温度 40 °C、催化剂用量 10%、反应时间 12 h 的条件下,考察水油比对水解率的影响,结果如图 9 所示。

由图 9 可看出,随着水油比的降低,水解率先增加后降低,在水油比为 2:1 时,水解率达到最大。水油比为 3:1 和 2:1 时的水解率显著高于水油比为 1:1、1:2、1:3 时的 ($p < 0.05$),可以看出体系反应中水的适当增加有利于水解反应。因此,适宜的水油比为 2:1。

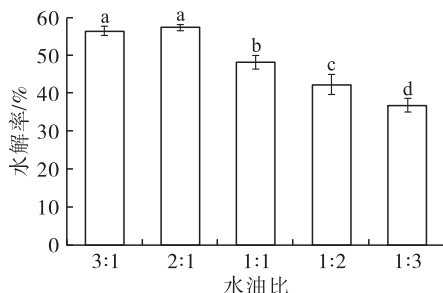


图9 水油比对水解率的影响

Fig.9 Effect of water - oil ratio on hydrolysis rate

2.4.3 催化剂用量的优化

在反应温度 40℃、水油比为 2:1、反应时间 12 h 的条件下,考察催化剂用量对水解率的影响,结果如图 10 所示。

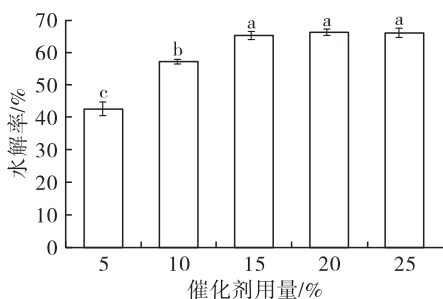


图10 催化剂用量对水解率的影响

Fig.10 Effect of catalyst dosage on hydrolysis rate

由图 10 可看出,随着催化剂用量的增加,大豆酸化油的水解率增大,催化剂用量大于或等于 15% 时水解率无显著性差异 ($p > 0.05$)。这是由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 处于油水界面处进行催化,水解速率随着催化剂用量的增加而增大,在催化剂用量达到 15% 时,催化剂在油水界面的浓度达到饱和,再继续增加催化剂用量,水解速率保持不变。因此,最佳催化剂用量为 15%。

2.4.4 反应时间的优化

在反应温度 40℃、水油比 2:1、催化剂用量 15% 的条件下,考察反应时间对水解率的影响,结果如图 11 所示。

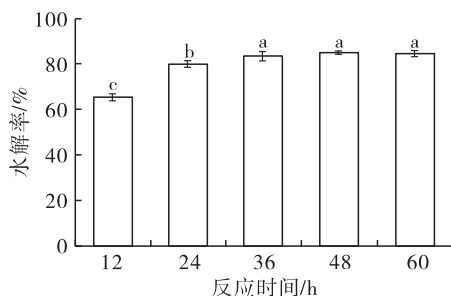


图11 反应时间对水解率的影响

Fig.11 Effect of reaction time on hydrolysis rate

由图 11 可看出,大豆酸化油的水解率随反应时间的延长而提高,反应时间超过 36 h 时水解率增加

不显著 ($p > 0.05$)。随着反应的进行,甘油酯的浓度降低,同时脂肪酸的浓度逐渐升高,导致脂肪酶与甘油酯的碰撞频率下降,而与脂肪酸的碰撞频率上升,进而导致反应时间超过 36 h 时水解速率减慢,水解率增加不明显。综合考虑,适宜的反应时间为 36 h。

综上,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 催化水解大豆酸化油最佳条件为反应温度 40℃、水油比 2:1、催化剂用量 15%、反应时间 36 h,在此条件下大豆酸化油的水解率达到 84.93%。

2.5 催化剂的重复使用性

按 1.2.8 方法,考察 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 的重复使用性,结果如图 12 所示。

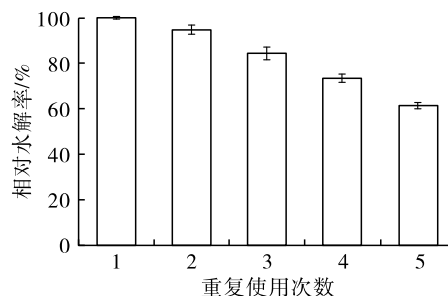


图12 催化剂的重复使用性

Fig.12 Reusability of the catalyst

固定化酶的重复使用性结果与各种酶学稳定性有关,包括温度稳定性、pH 稳定性、有机溶剂稳定性和储存稳定性,在重复使用的过程中,受少量酶不可避免地载体上脱落的影响,催化效果会有所降低^[22]。由图 12 可看出,在重复使用 5 次后, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 保持了初始水解活性的 61.4%,表明其具有良好的重复使用性。

3 结论

本研究将磁性固定化脂肪酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 用于催化水解大豆酸化油制备脂肪酸。经过共价固定化于磁性壳聚糖载体 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$) 上后,CRL 保持了良好的活性,同时提高了其稳定性。在 pH 处于 5~10 内 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 均具有较高的稳定性,减少了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 在酸化油中进行催化反应时由于酸性环境受到的不利影响,拓宽了固定化 CRL 的应用范围。此外, $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 在大豆酸化油的水解中表现出令人满意的催化性能。通过单因素实验确定了最佳反应条件为反应温度 40℃、水油比 2:1、催化剂用量 15%、反应时间 36 h,在最佳反应条件下,大豆酸化油的水解率达到 84.93%。此外,催化剂 $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS-CRL$ 经过 5 次

重复使用后保持了 61.4% 的初始水解活性。结果表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CS} - \text{CRL}$ 用于催化酸化油水解的反应体系是一种油脂精炼行业副产品的可持续高效利用方式, 在代替传统高能耗工业反应中具有良好的前景。

参考文献:

- [1] FENG S, NGO H H, GUO W, et al. Volatile fatty acids production from waste streams by anaerobic digestion: A critical review of the roles and application of enzymes [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2022, 359: 127420 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127420>.
- [2] KOSE A. Chemical composition and tyrosinase inhibitory activities of fatty acids obtained from heterotrophic microalgae, *S. limacinum* and *C. cohnii* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023, 195(1): 369 - 385.
- [3] 胡瑶, 蒋筑阳, 章楚君, 等. 常见植物油水解工艺研究进展[J]. *广州化工*, 2018, 46(12): 16 - 18, 20.
- [4] BUNZEL H A, ROSS ANDERSON J L, MULHOLLAND A J. Designing better enzymes: Insights from directed evolution[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, 67: 212 - 218.
- [5] DU C, HU P, REN L. Nucleic acid - based scaffold systems and application in enzyme cascade catalysis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107(1): 9 - 23.
- [6] XU G, POELARENDIS G J. Unlocking new reactivities in enzymes by iminium catalysis [J/OL]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61 (30): e202203613 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1002/anie.202203613>.
- [7] FRAGA J L, SOUZA C P L, PEREIRA A D S, et al. Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse [J/OL]. *3 Biotech*, 2021, 11(4): 191 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02748-1>.
- [8] JIANG X, LONG F, ZHAI Q, et al. Catalytic cracking of acidified oil and modification of pyrolytic oils from soap stock for the production of a high - quality biofuel [J]. *New J Chem*, 2022, 46(4): 1770 - 1778.
- [9] 肖潇. 皱褶假丝酵母脂肪酶 LIP1 在毕赤酵母中的高效表达与高密度发酵研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [10] BAYRAMOGLU G, CELIKBICAK O, KILIC M, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis [J/OL]. *Food Chem*, 2022, 366: 130699 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699>.
- [11] WANG S, LI S, LIU R, et al. Immobilization of interfacial activated *Candida rugosa* lipase onto magnetic chitosan using dialdehyde cellulose as cross - linking agent [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 946117 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946117>.
- [12] 李笑迎, 白文静, 陶凯, 等. 大孔/介孔多级孔 SiO_2 的制备及其在固定化脂肪酶中的应用 [J]. *材料导报*, 2018, 32(10): 1695 - 1700, 1715.
- [13] BADOEI - DALFARD A, TAHAMI A, KARAMI Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate [J/OL]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 209(Pt 2): 112151 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112151>.
- [14] RIBEIRO E S, DE FARIAS B S, SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR T R, et al. Chitosan - based nanofibers for enzyme immobilization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 1959 - 1970.
- [15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [16] GUPTA N, RATHI P, GUPTA R. Simplified para - nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases [J]. *Anal Biochem*, 2002, 311(1): 98 - 99.
- [17] RODRIGUES R C, BERENQUER - MURCIA Á, CARBALLARES D, et al. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies [J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2021, 52: 107821 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.
- [18] TIPTON K F, DIXON H B. Effects of pH on enzymes [J]. *Methods Enzymol*, 1979, 63: 183 - 234.
- [19] WONG W K L, WAHAB R A, ONOJA E. Chemically modified nanoparticles from oil palm ash silica - coated magnetite as support for *Candida rugosa* lipase - catalysed hydrolysis: Kinetic and thermodynamic studies [J]. *Chem Pap*, 2020, 74(4): 1253 - 1265.
- [20] GUO H, LEI B, YU J, et al. Immobilization of lipase by dialdehyde cellulose crosslinked magnetic nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 287 - 296.
- [21] ALAGÖZ D, TOPRAK A, YILDIRIM D, et al. Modified silicates and carbon nanotubes for immobilization of lipase from *Rhizomucor miehei*: Effect of support and immobilization technique on the catalytic performance of the immobilized biocatalysts [J/OL]. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 144: 109739 [2023 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109739>.
- [22] IYER P V, ANANTHANARAYAN L. Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non - aqueous environment [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(10): 1019 - 1032.