



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101381721 B

(45) 授权公告日 2011.01.05

(21) 申请号 200810223076.5

(22) 申请日 2008.09.26

(73) 专利权人 北京凯泰新世纪生物技术有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区中和街
22号

专利权人 北京中纺化工股份有限公司

(72) 发明人 张增伟 张文波 周浩 顾燕松

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004/035773 A1, 2004.04.29, 全文.

US 6025171 A, 2000.02.15, 全文.

JP 2886902 B2, 1999.02.12, 全文.

浜崎一夫 等. 不織布を担体とした固定化リパーゼによるエステル合成. 《日本醗酵工学会大会講演要旨集》. 1989, 241.

审查员 王大鹏

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种固定化脂肪酶及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种固定化脂肪酶及其制备方法。该固定化脂肪酶的制备方法,是将脂肪酶溶液与是所述脂肪酶溶液重量的 3%—60%的聚合物乳液混合均匀,将得到混合液浸渍无纺布,干燥得到固定化脂肪酶;所述聚合物乳液是聚丙烯酸酯乳液或者溶质为聚丙烯酸酯与聚氨酯的混合乳液。实验证明本发明的固定化脂肪酶催化性能高,使用寿命长,其连续进行多次催化酯化反应和转酯化反应后,催化效率仍能保持在 90%以上,其催化生产每吨生物柴油所需的固定化酶量 $\leq 4\text{kg}$ 。

1. 一种固定化脂肪酶的制备方法,是将脂肪酶溶液与是所述脂肪酶溶液重量的3% -60%的聚合物乳液混合均匀,将得到混合液浸渍无纺布,干燥得到固定化脂肪酶;所述聚合物乳液是聚丙烯酸酯乳液或者溶质为聚丙烯酸酯与聚氨酯的混合乳液;

所述脂肪酶溶液与聚合物乳液混合前,先在所述脂肪酶溶液中加入稳定剂;所述稳定剂为 PEG 和 / 或明胶;

所述聚丙烯酸酯是以丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸异辛酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、醋酸乙烯和丙烯酸中两种或两种以上为单体进行聚合反应得到的共聚物;

所述聚氨酯是多异氰酸酯与低聚多元醇的嵌段共聚物;所述低聚多元醇是聚醚二醇或聚酯二醇,所述低聚多元醇的相对分子质量为 0.3 ~ 3kDa;所述多异氰酸酯为芳香族异氰酸酯或脂肪族二异氰酸酯;所述芳香族异氰酸酯为甲苯二异氰酸酯或二苯甲烷二异氰酸酯,所述脂肪族二异氰酸酯为六次亚甲基二异氰酸酯;

所述无纺布的材质为涤纶、丙纶、锦纶或粘胶纤维;

所述混合乳液中聚丙烯酸酯与聚氨酯的质量比是 0.5 : 1 ~ 4 : 1。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述脂肪酶溶液中脂肪酶含量为 4000-20000U/g 溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 2 ~ 3 : 2 ~ 4 : 2 ~ 6 的比例聚合反应得到的共聚物;所述稳定剂的加入的质量百分浓度为 1 ~ 5%;所述干燥为 80℃ 以下烘干或自然晾干。

4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的方法,其特征在于:所述固定化脂肪酶的含水量质量百分含量为 10% 以下。

5. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的方法,其特征在于:所述聚合物乳液的含固量为 20% ~ 60%。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:所述聚合物乳液的含固量为 35% ~ 50%。

7. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的方法,其特征在于:所述无纺布浸渍的带液质量为所述无纺布质量的 100% -900%。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述脂肪酶液为脂肪酶配置的溶液或微生物发酵后得到的含有脂肪酶的液体。

9. 权利要求 1-8 中任意所述的方法制备的固定化脂肪酶。

一种固定化脂肪酶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种固定化脂肪酶及其制备方法。

背景技术

[0002] 生物酶的固定化技术是酶工程的核心内容之一,它成功地克服了游离酶在工业化应用中稳定性差、耐热性差、不能重复利用以及不易与产物分离的缺点。固定化酶在稳定性和催化活性方面都有很大的提高,其重复利用性又可以大大降低生产的成本。酶的固定化技术能够改善酶分子催化的微环境,便于酶与底物的接触以及产物的扩散。另外,固定化载体赋予了固定化酶一定物理性状与机械性能,使其能够方便地应用于各式生物反应器中,便于实现催化反应的连续化与自动化。固定化酶在有机催化体系中的应用更凸现了其优越性。酶的固定化效果与载体性质和酶的固定化方法有着很大的关系,目前常用的酶固定化方法主要包括:吸附法、共价结合法、包埋法和交联法等。几种不同的方法各有其自身的优缺点,不同种类和性质的酶,也往往使用不同的固定化方法,必要时常常同时使用几种固定化方法。

[0003] 脂肪酶是工业上应用较广的一种酶,它能够在油-水界面上催化水解、酯化、转酯化、内酯合成、多肽合成及手性化合物的拆分等多种反应,不同来源的脂肪酶在催化活性和催化专一性上也往往不同。脂肪酶的固定化技术是决定脂肪酶应用的关键,文献报道已经有多种固定化方法用于脂肪酶的固定化。脂肪酶常用的固定化载体包括天然多孔材料、各类凝胶、合成树脂和复合改性材料等。现在市场上已经有许多种商品化的固定化脂肪酶,其中应用最广的是颗粒状固定化脂肪酶,它以合成树脂为载体,酶分子通过共价结合的方式实现固定化。这种固定化脂肪酶活力较高,酶载量大,使用寿命长,但是工艺复杂,成本较高,固定化过程酶活损失严重(一般损失60%以上),工艺对酶自身纯度要求也很高。此类固定化酶价格很高,一般在千元/公斤以上,有的甚至超过万元,不适于市场大规模应用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种固定化脂肪酶及其制备方法。

[0005] 本发明所提供的固定化脂肪酶的制备方法,是将脂肪酶溶液与所述脂肪酶溶液重量的3%~60%的聚合物乳液混合均匀,将得到混合液浸渍无纺布,干燥得到固定化脂肪酶;所述聚合物乳液是聚丙烯酸酯乳液或者含聚丙烯酸酯与聚氨酯的混合乳液,所述混合乳液中聚丙烯酸酯与聚氨酯比例不限,优选质量比的范围是0.5:1~4:1。所述聚合物乳液与所述脂肪酶溶液混合的比例范围可为5%-32%,5%-8%,5%-12%,8%-24%,24%-32%或12%-32%。

[0006] 所述方法中,所述脂肪酶溶液的脂肪酶活力范围为4000~20000U/g溶液,活力优选为6000~15000U/g溶液。

[0007] 所述方法中,所述脂肪酶溶液与聚合物乳液混合前,先在所述脂肪酶溶液中加入稳定剂;所述稳定剂为PEG或明胶;所述稳定剂的加入的质量百分浓度为1~5%。

[0008] 所述方法中,所述聚丙烯酸酯是以丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸异辛酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、醋酸乙烯和丙烯酸中两种或两种以上为单体进行聚合反应得到的共聚物;所述聚丙烯酸酯优选为丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 2~3:2~4:2~6 的比例聚合反应得到的共聚物。

[0009] 所述方法中,所述聚氨酯是多异氰酸酯与低聚多元醇的嵌段共聚物;所述低聚多元醇是聚醚二醇或聚酯二醇,所述低聚多元醇的平均分子质量为 0.3~3kDa;所述多异氰酸酯为芳香族异氰酸酯或脂肪族二异氰酸酯;所述芳香族异氰酸酯优选为甲苯二异氰酸酯或二苯甲烷二异氰酸酯,所述脂肪族二异氰酸酯优选为六次亚甲基二异氰酸酯。

[0010] 所述无纺布的材质为涤纶、丙纶、锦纶或粘胶纤维。当所述固定化脂肪酶为用于生物反应器的固定化脂肪酶时,所述无纺布优选为 30~80g/m² 长丝丙纶无纺布。

[0011] 所述方法中,所述干燥为 80℃ 以下烘干或自然晾干。

[0012] 所述方法中,所述固定化脂肪酶的含水质量百分含量为 10% 以下。合理的含水量有助于保持固定化脂肪酶的催化活性和稳定性。

[0013] 所述方法中,所述聚合物乳液的含固量为 20%~60%,其中优选含固量为 35%~50%。含固量的确定是通过控制乳液合成时单体组成和含量来实现的。

[0014] 所述方法中,所述无纺布浸渍的带液质量为所述无纺布质量的 100%~900%。

[0015] 所述方法中,所述脂肪酶液为脂肪酶配置的溶液或微生物发酵后得到的含有脂肪酶的液体(如微生物发酵液、微生物发酵液浓缩液或微生物发酵液离心后的上清液)。

[0016] 本发明所提供的固定化脂肪酶是上述方法制备的固定化脂肪酶。

[0017] 本发明的固定化脂肪酶的制备方法工艺操作简单,便于工业化连续性生产,以价格低廉的无纺布为固定化载体,生产成本大大降低。本发明的方法对脂肪酶的纯度等性质要求不高,对发酵液、发酵离心液、发酵浓缩液和高纯酶粉都能够进行固定化。本发明的聚合物乳液对酶液的活力没有影响;酶液不破坏聚合物乳液自身的乳化性状。本发明所选用的聚合物乳液具有成膜的特性,能够为脂肪酶分子催化提供良好的微环境。本发明的方法使脂肪酶分子通过吸附、交联和包埋等复合方式固定于无纺布纤维上,这种结合方式特别牢固,被固定化脂肪酶无论是催化活性还是重复使用次数都有很大的提高,固定化过程的脂肪酶活损失较少,在 25% 以内,由不同活力酶液制得的固定化酶活力也不同,活力一般在 10000~130000U/g 之间。

[0018] 实验证明本发明的固定化脂肪酶催化性能高,使用寿命长,其连续进行多次催化酯化反应和转酯化反应后,催化效率仍能保持在 90% 以上,其催化生产每吨生物柴油所需的固定化酶量 ≤ 4kg。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明固定化脂肪酶多次催化棕榈酸和异辛酯的酯化率。

[0020] 图 2 为本发明的固定化脂肪酶多次催化油酸和甲醇的酯化率

[0021] 图 3 为本发明的固定化脂肪酶多次转酯化反应转化率。

具体实施方式

[0022] 下述实施例所述的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0023] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0024] 实施例 1、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0025] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0026] 将假丝酵母 *Candida sp 99-125* 在 1000L 发酵罐中扩大培养,培养基包括豆粕 50g/L、豆油 40g/L、 K_2HPO_4 1g/L、 KH_2PO_4 1g/L、消泡剂 3g/L,在 28℃下,搅拌半径 0.2m,搅拌频率 175r/min。取发酵液,用橄榄油水解方法(行业标准 QB/T1803-1993)检测表明发酵液的脂肪酶水解活力为 4000U/g 发酵液。

[0027] 取上述得到的 *Candida sp 99-125* 发酵液,经 2200g 离心取上清液,加入 PEG6000,使其质量百分浓度为 2%,完全溶解后,加入发酵液上清液质量的 5%的聚丙烯酸酯乳液(含固量 35%,粘度为 305cP,乳液中的聚丙烯酸酯由重量分数比为 1:1:2 的丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯聚合反应得到的共聚物,聚合物相对分子质量分布范围为 10~50kDa(重均分子量 36kDa))搅拌 10 分钟混匀,然后将涤纶无纺布(45g/m²)为载体浸渍于液体中 20 分钟后,取出,通过浸轧得到带液率(携带液体与无纺布重量的比例)为 300%的无纺布,置于 50℃烘干至含水量为 4%,即得到固定化脂肪酶。用橄榄油水解方法检测表明,该固定化脂肪酶的活力为 10000U/g。用测定的总活力除以无纺布所吸附酶液的总活力计算固定化过程中的酶活收率,上述制备固定化脂肪酶酶活收率为 76%。

[0028] 2、本发明固定化脂肪酶用于棕榈酸异辛酯的合成的效果验证

[0029] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶按照下述反应体系连续进行多次催化酯化反应:

[0030] 0.200g 步骤 1 制备的固定化酶,1.000g 棕榈酸,0.559g 异辛醇(酸醇摩尔比为 1:1.1),5mL 正己烷,40℃,160r/min 摇床,反应 12 小时。

[0031] 每次催化反应后,将所用固定化酶取出,经正己烷清洗洗后,重新放入新的上述相同体系继续反应。每次反应后,采用酸碱滴定确定酯化率,记录反应酯化率仍保持在 80%以上的反应次数。

[0032] 结果如图 1 所示,结果表明,步骤 1 制备的固定化脂肪酶能够很好地催化棕榈酸和异辛醇的酯化反应,连续进行 50 次催化反应,其催化酯化率仍然很高,连续催化反应第 36 次酯化率为 90.22%,第 47 次反应酯化率为 80.99%。说明本发明的固定化脂肪酶不仅具有很好的催化效率,而且具有很长的使用寿命。

[0033] 实施例 2、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0034] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0035] 用有机溶剂沉淀法从实施例 1 的步骤 1 得到的发酵液中沉淀脂肪酶,脂肪酶经干燥后制得酶粉。

[0036] 酶粉加适量的水溶解后,得到的脂肪酶粉溶解液,用橄榄油水解方法(行业标准 QB/T1803-1993)检测表明酶液的脂肪酶水解活力 5000U/g 酶液。

[0037] 取上述得到的酶粉溶解液,加入 PEG6000,使其质量百分浓度为 4%,完全溶解后,加入酶液质量的 8%的聚丙烯酸酯乳液(粘度为 200cP,含固量为 46%;聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸异辛酯和丙烯酸按照质量比为 3:2:1:1 聚合反应得到的共聚物,聚合物相对分子质量分布范围为 20~50kDa(重均分子量 40kDa))搅拌 10 分钟混匀,然后将锦纶无纺布(42g/m²)为载体浸渍于该含酶液的聚合物乳液中 15 分钟后,取出,通过浸轧得到带液率(携带液体与无纺布重量的比例)为 360%的无纺布,置于 70℃烘干至含

水量为 5%，即得到固定化脂肪酶。用橄榄油水解方法检测表明，该固定化脂肪酶的活力为 16000U/g。用测定的总活力除以无纺布所吸附酶液的总活力计算固定化过程中的酶活收率，上述制备固定化脂肪酶酶活收率为 79%。

[0038] 2、本发明固定化脂肪酶用于油酸甲酯的合成的效果验证

[0039] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶按照下述反应体系连续进行多次催化酯化反应：

[0040] 0.200g 步骤 1 制备的固定化酶，1.680g 油酸，0.191g 甲醇（分 3 次加入），5mL 正己烷，40℃，180r/min 摇床，反应 12 小时。

[0041] 每次催化反应后，将所用固定化酶取出，经正己烷洗涤后，重新放入新的上述相同体系继续反应。每次反应后，采用酸碱滴定确定酯化率，记录反应酯化率仍保持在 90% 以上的反应次数。

[0042] 结果如图 2 所示，结果表明，步骤 1 制备的固定化脂肪酶能够很好地催化油酸与甲醇的酯化反应，连续进行 25 次催化反应，其催化酯化率保持在 90% 以上。说明本发明的固定化脂肪酶不仅具有良好的催化效率，而且具有较长的使用寿命。

[0043] 实施例 3、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0044] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0045] 发酵液来自 5 吨发酵罐，菌株和培养基同实施例 1 的步骤 1，搅拌半径 0.35m，搅拌频率 136r/min。

[0046] 取新下罐发酵液，该发酵液脂肪酶水解活力为 8000U/g 发酵液，过滤除去菌体等杂质，加入明胶，使其质量百分浓度为 3%，充分溶解，加入发酵液质量的 12% 的聚合物乳液（该乳液是溶质为质量比为 2:1 的聚丙烯酸酯与聚氨酯的混合乳液，粘度为 280cP，总含固量 36%，其中聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按重量份数比为 3:4:6 的比例聚合反应得到的共聚物，聚合物相对分子质量分布范围为 20 ~ 50kDa（重均分子量 30kDa）；聚氨酯是甲苯二异氰酸酯与聚醚二醇（相对分子质量分布范围为 1.8 ~ 2.6kDa（重均分子量 2.2kDa））聚合得到的共聚物，聚合物分子量分布范围为 20 ~ 60kDa（重均分子量 45kDa）），搅拌 15 分钟混合均匀后，分别将 33g/m² 的长丝纺粘丙纶无纺布，35g/m²、40g/m² 和 45g/m² 的短纤维热轧丙纶无纺布浸入 15 分钟后，取出，通过浸轧控制带液率为 500%，置于 70℃ 烘干至含水量为 7%，即分别得到以 33g/m² 的长丝纺粘丙纶无纺布，35g/m²、40g/m² 或 45g/m² 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶。用橄榄油水解方法检测表明，以 33g/m² 的长丝纺粘丙纶无纺布，35g/m²、40g/m² 或 45g/m² 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶的活力分别为 32000U/g、31000U/g、31000U/g、32500U/g，制备此以 33g/m² 的长丝纺粘丙纶无纺布，35g/m²、40g/m² 或 45g/m² 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶酶活收率分别为 80%、78%、79%、81%。

[0047] 2、本发明的固定化脂肪酶用于转酯化反应的效果验证

[0048] 将步骤 1 制备的以 33g/m² 的长丝纺粘丙纶无纺布，35g/m²、40g/m² 或 45g/m² 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶分别连续进行多次催化转酯化反应，该转酯化摇瓶反应体系为：2g 油（福临门一级大豆油），4ml 石油醚，0.15g 水，279 μ l 甲醇（分 3 次加入），0.6g 步骤 1 制备的固定化酶，40℃，170r/min 水浴摇床，反应 12 小时。每次反应后，固定化酶经石油醚清洗后重新放入新的上述体系继续反应。每次反应后均用气相色谱法测定脂肪酸甲酯的含量，计算转酯化率。

[0049] 结果如图 3 所示,连续反应 12 次,步骤 1 制备的以 $33\text{g}/\text{m}^2$ 的长丝纺粘丙纶无纺布, $35\text{g}/\text{m}^2$ 、 $40\text{g}/\text{m}^2$ 或 $45\text{g}/\text{m}^2$ 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶均仍保持转酯化率都在 90% 以上,各固定化酶催化活性基本保持不变。固定化酶对甲醇、甘油等表现出良好的耐受性。图 3 中,1 为 $33\text{g}/\text{m}^2$ 的长丝纺粘丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶连续 12 次催化转酯化反应的结果,2—4 分别为 $35\text{g}/\text{m}^2$ 、 $40\text{g}/\text{m}^2$ 和 $45\text{g}/\text{m}^2$ 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶连续 12 次催化转酯化反应的结果。将上述反应 12 批的固定化脂肪酶经正己烷清洗后凉干,放置 2 天,继续重复上述反应,继续反应 8 批,转酯化率仍保持在 90%。

[0050] 结果表明此步骤 1 制备的以 $33\text{g}/\text{m}^2$ 的长丝纺粘丙纶无纺布, $35\text{g}/\text{m}^2$ 、 $40\text{g}/\text{m}^2$ 或 $45\text{g}/\text{m}^2$ 的短纤维热轧丙纶无纺布为载体的固定化脂肪酶均能够连续 20 批催化上述转酯化反应,且转酯化率均在 90% 以上。

[0051] 实施例 4、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0052] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0053] 发酵液来自 5 吨发酵罐,菌株和发酵条件同实施例 3 的步骤 1。发酵液经 2000g 离心得上清液,测得上清液脂肪酶活力为 6500U/g 上清液。取离心上清液加入 PEG6000 和明胶,使 PEG6000 质量百分含量为 2%,明胶质量百分含量为 1%。加入发酵离心液质量的 24% 的聚合物乳液(该乳液是含质量比为 3:1 聚丙烯酸酯与聚氨酯的混合乳液,粘度为 360cP,总含固量 42%;其中聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸乙烯酯和甲基丙烯酸甲酯按照质量比为 2:2:1:3 聚合反应得到的共聚物,聚合物相对分子质量分布范围为 40~60kDa(重均分子量 49kDa);聚氨酯是二苯甲烷二异氰酸酯与聚酯二醇(相对分子质量分布范围为 0.8~1.6kDa(重均分子量 1.2kDa))聚合得到的共聚物,聚合物分子量分布范围为 30~50kDa(重均分子量 37kDa)),搅拌 20 分钟混合均匀后,浸入克重 $38\text{g}/\text{m}^2$ 的丙纶长丝无纺布,10 分钟后取出,通过浸轧得到带液率(携带液体与无纺布重量的比例)为 900% 的无纺布,自然凉干,测定含水量为 9%,即得到固定化脂肪酶。用橄榄油水解方法检测表明,该固定化脂肪酶的活力为 42000U/g,制备此固定化脂肪酶酶活收率为 75%。

[0054] 2、本发明的固定化脂肪酶用于鱼油乙酯化的效果验证

[0055] 将步骤 1 制备得固定化脂肪酶用于鱼油乙酯化反应,鱼油乙酯化反应体系:2.2g 鱼油,乙醇与鱼油摩尔比为 3:1,0.1g 水,5ml 正己烷,0.8g 步骤 1 制备的固定化酶,40℃,170r/min 水浴摇床,反应 15 小时,反应完成后固定化酶经正己烷清洗后放入新上述反应体系重复反应。用气相色谱法测定脂肪酸乙酯含量,计算转化率。

[0056] 测定结果显示,步骤 1 所制备的的固定化酶能够连续 26 批次催化鱼油的乙酯化反应,且转化率在 92% 以上。此酶可用于鱼油的改性及乙酯化 DHA 的生产制备。

[0057] 实施例 5、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0058] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0059] 发酵液来自 5 吨发酵罐,菌株和发酵条件同实施例 3 的步骤 1。发酵液经 2000r/min 离心得上清液,上清液经卷式超滤膜浓缩得浓缩液。

[0060] 取发酵离心浓缩液,活力 15000U/g,加入明胶和 PEG8000,使明胶和 PEG8000 的质量百分浓度均为 2%,充分溶解后,加入发酵离心浓缩液质量的 32% 的聚合物乳液(该乳液是含质量比为 1:1 的聚丙烯酸酯和聚氨酯的混合乳液,总含固量 44.6%,粘度为 420cP,其中聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、醋酸乙烯按照 3:1:4:10 的质量比

聚合反应得到的共聚物, 聚合物相对分子质量分布范围为 40 ~ 52kDa (重均分子量 45kDa); 聚氨酯是六次亚甲基二异氰酸酯与聚酯二醇 (相对分子质量分布范围为 1.2 ~ 2.1kDa (重均分子量 1.8kDa)) 聚合得到的共聚物, 聚合物分子量分布范围为 60 ~ 110kDa (重均分子量 80kDa), 搅拌 20 分钟混合均匀后, 浸入克重 60g/m² 的粘胶纤维无纺布, 10 分钟后取出, 通过浸轧得到带液率 (携带液体与无纺布重量的比例) 为 600% 的无纺布, 36℃ 暖风烘干至含水量为 6%, 即得到固定化脂肪酶。用橄榄油水解方法检测表明, 该固定化脂肪酶的活力为 68000U/g, 制备此固定化脂肪酶活收率为 76%。

[0061] 2、本发明的固定化脂肪酶用于生物柴油生产的效果验证

[0062] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶连续进行多次催化生物柴油生产, 生物柴油生产反应体系: 在圆柱型反应器 (直径 15cm, 高 0.6m) 中加入步骤 1 制备的固定化酶, 330g, 进行若干批料液连续反应; 每批反应加入储料罐的原料: 40kg 净化地沟油, 2kg 水, 5.6L 甲醇 (分 6 次加入), 反应原料经搅拌混合均匀后, 经泵循环流经上述圆柱型反应器, 流速为 350g/min, 循环保留时间为 8hr, 圆柱型反应器和储料罐中以 40℃ 水浴加热。完成一批反应后将料液放出, 往储料罐中加入新料继续进行与上述相同的反应, 每次反应后用气相色谱测定甲酯含量, 计算测转化率, 当反应转化率在 80% 以下时停止反应。根据转化率计算连续反应总共得到的生物柴油量。上述连续反应能够进行 3-4 批次。

[0063] 结果表明, 处理生产每吨生物柴油所需的酶量 ≤ 4kg。此固定化酶为酶法生产生物柴油 (特别是以地沟油为原料) 开辟了广阔的道路, 具有十分重要的意义。

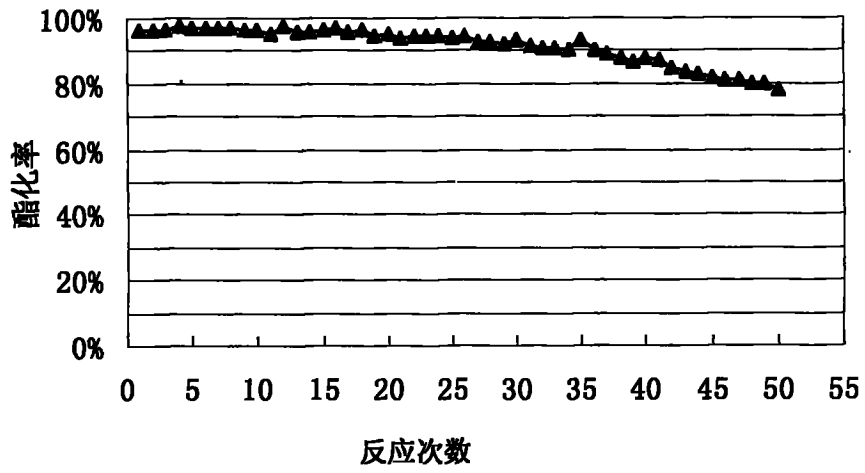


图 1

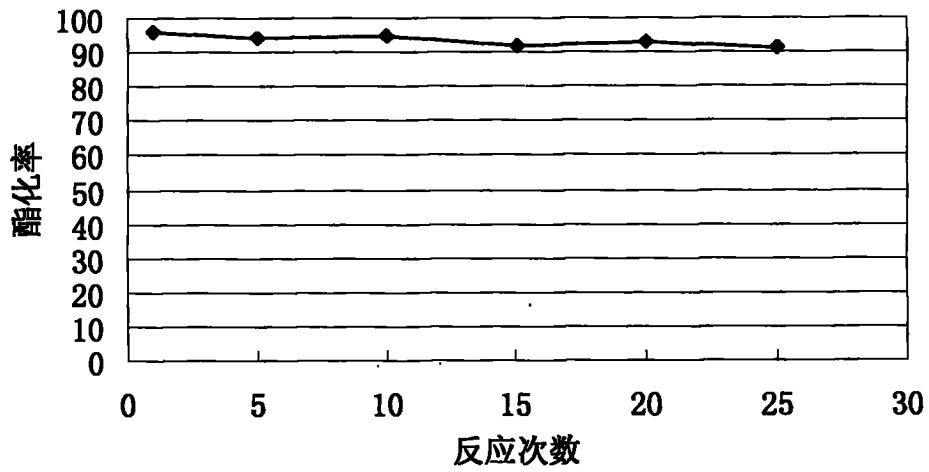


图 2

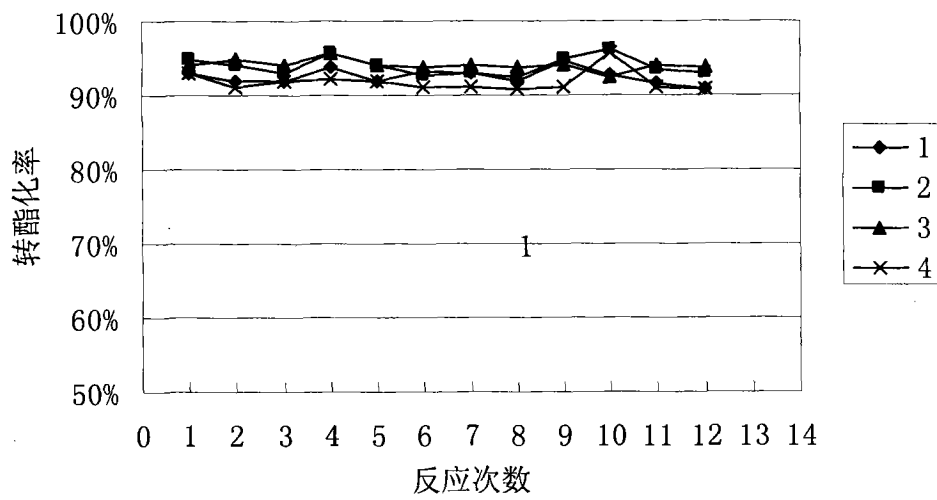


图 3