

脂肪酶催化合成生物柴油的研究

邓 利 谭天伟* 王 芳

(北京化工大学生物工程系,北京市生物加工过程重点实验室,北京 100029)

摘 要 生物柴油是用动植物油脂或长链脂肪酸与甲醇等低碳醇合成的脂肪酸甲酯,是一种替代能源。这里探讨了生物法制备生物柴油的过程,采用脂肪酶酯化和酯交换两条工艺路线进行催化合成。深入研究制备过程中,不同脂肪酶、酶的用量和纯度、有机溶剂、低碳醇的抑制作用、吸水剂的作用、反应时间和进程、底物的特异性和底物摩尔比等参数对酯化过程的影响。试验结果表明,采用最佳酯化反应参数和分批加入甲醇并用硅胶作脱水剂的工艺过程,酯化率可以达到 92%,经分离纯化后的产品 GC 分析的纯度可达 98% 以上,固定化酶的使用半衰期可达到 360h。同时对酯交换制备生物柴油过程中,甲醇的用量和甲醇的加入方式对脂肪酶催化过程的影响作了初步研究,优化后的酯交换率可达到 83%。

关键词 生物柴油,脂肪酸低碳醇酯,脂肪酶,催化,酯化,酯交换

中图分类号 TQ225.24 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0097-05

石化柴油应用的主要问题是燃烧效率较低,对空气污染严重,如产生大量的颗粒粉尘,CO₂ 排放量高等^[1]。为解决柴油的尾气污染问题及日益恶化的环境压力,一百年前,Rudolf 就开始研究用植物油直接代替柴油作燃料^[2],但是存在不完全燃烧物,对发动机的长期运转不利,需要经常清洗发动机。1983 年美国 and 德国等国的科学家研究了采用脂肪酸甲酯或乙酯代替柴油作燃料,即采用动物或植物油脂与甲醇或乙醇进行反应合成脂肪酸单酯代替柴油,这种改性后的油脂(脂肪酸低碳醇酯)有着与柴油十分相似的理化性质,而且燃烧完全,无污染排放,称之为“生物柴油”。

从生物柴油的制备原料来看,有着传统石化柴油不可比拟的优点,即原料可再生、产品本身环境友好、而且不用更换和经常清洗发动机等优点^[3]。目前生物柴油主要是用化学法生产,即动植物油脂与甲醇在高强度酸或碱催化剂下制备。化学法^[4]存在工艺复杂、醇消耗量大、产物不易回收、环境污染大等缺点。用脂肪酶代替酸碱催化剂催化合成生物柴油的报道已有很多^[5-7],酶法合成生物柴油具有条件温和、醇用量小、产品易于收集、无污染物排放等

优点,但目前主要问题:低碳醇转化率低,酶成本高,酶的寿命短等。本文采用酯化和酯交换两条工艺路线研究生物法合成生物柴油工艺。我们采用我们自己发酵提取的粗酶制剂,经固定化后作为生物催化剂,对酶促酯化工艺合成脂肪酸酰基酯工艺进行了研究,探讨了不同的脂肪酶、酶用量、底物特异性、底物浓度、摩尔比、水含量,以及固定化酶的寿命等因素对生物柴油合成的影响。并对酯交换过程的部分反应参数进行了初步研究。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

油酸(化学纯),硬脂酸,棕榈酸,甲醇,乙醇,丙醇,丁醇,均采购于北京试剂公司,菜子油(毛油),东营油品厂提供,硅藻土(上海化学试剂公司),各种脂肪酶(酵母脂肪酶,根霉脂肪酶,猪胰酶等)。

1.2 仪器

摇床(哈尔滨东联电子公司),电子天平(赛多利斯公司),磁力搅拌器,气相色谱(北京东西电子)。

1.3 实验方法

1.3.1 固定化脂肪酶:以硅藻土为载体,吸附法制

备。取 10mL 含 10mg 椰子油、10mg 吐温 80 的己烷溶液与 3.3mL 3%(W/V)的 $MgSO_4$ 溶液,搅拌制成乳浊液。与 10.00g 硅藻土混合,干燥。称出 8.57g,与 10mL 酶液(含 1.43g 酶粉)混合,室温放置直至干燥。

1.3.2 酯化过程合成脂肪酸甲酯:基本反应体系:50mL 具塞锥形瓶中,加入 1.68g 油酸和 0.2406mL 的甲醇(摩尔比为 1:1),5mL 石油醚,0.084g 固定化假丝酵母 99~125 脂肪酶(5% wt) 40℃ 密闭振荡反应 24h。改变不同的条件(流加方式、不同底物、不同溶剂、不同浓度脂肪酶等)。

体系一(一次加入甲醇):油酸和甲醇一次性加入,10h 加入硅胶吸水剂;

体系二(分批加入甲醇):甲醇分 2 次加入,在 10h 加入另一半甲醇,同时加入吸水剂硅胶。

1.3.3 酯化过程酯化率的测定:用 NaOH 滴定反应体系内酯化所减少的油酸的量,计算酯化率:酯化率 = 反应的油酸质量/初始加入的油酸的质量 $\times 100\%$

1.3.4 酯交换过程合成脂肪酸甲酯:基本体系为 50mL 具塞锥形瓶中,加入 2.99g(3.433mmol)油和 0.33g(10.3mmol)甲醇(摩尔比为 1:3),5mL 石油醚,0.15g 固定化酶(5% wt%) 40℃ 密闭振荡反应 24h。改变甲醇的加入方式。

1.3.5 酯交换合成酯化率的测定:气相色谱分析脂肪酸甲酯的含量,酯交换获得的样品中脂肪酸甲酯含量/油脂完全甲酯化后脂肪酸甲酯的含量 $\times 100\%$ 。

1.3.6 气相色谱分析生物柴油:取样 0.2mL,用 2mL 的石油醚(60~90℃)溶解,吸取 0.5 μ L 样品进样。

1.3.7 GC 分析条件:不锈钢填充柱,2m \times 3mm,10% DEGS 涂在 AW-DMCS 白色单体,载气 N_2 ,柱前压 0.12MPa(40~50mL/min),FID 检测器,柱箱温度:190℃,汽化室温度 250℃,检测器温度 250℃。

2 实验结果与讨论

2.1 酯化过程合成生物柴油

2.1.1 底物抑制作用:底物为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇,这些短链醇对蛋白质是有变性作用的,通过实验表明,见 Fig.1,当过量的醇底物对脂肪酶的催化作用有很强的抑制作用。对于甲醇和油酸体系(有溶剂体系)的反应中,我们采用理论最佳底物摩尔比(1:1),分别实验了甲醇一次加入、分 1 次、2 次、3 次或 4 次加入甲醇(总甲醇量不变)。

从 Fig.1 结果表明,甲醇的底物抑制量为 1mol

当量(0.2406mL)。如果一次性加入 1mol 当量甲醇将大大降低酯化率,这是因为体系中甲醇的浓度过大对脂肪酶产生很强的抑制作用;降低甲醇的浓度可明显降低对脂肪酶的活性抑制,当分批加入小于 1/2mol 当量的甲醇时,酯化率得到明显提高。但是并不是分批加入甲醇的次数越多酯化率越高。在后面的实验中,我们采用分 2 次加入甲醇的条件进行其他实验。

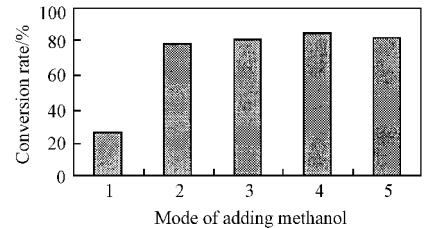


图 1 甲醇的对酯化过程的抑制作用

Fig.1 Inhibition of methanol to esterification
Number of adding methanol stepwise: 1. in one-off; 2. in separate two times; 3. in separate three times; 4. in separate four times; 5. in separate five times

2.1.2 溶剂对反应的影响:我们对比了无溶剂体系与有溶剂体系对反应的影响,以及不同溶剂对催化反应的影响。我们使用油酸和甲醇在石油醚(馏程 60℃~90℃)、异辛烷、正庚烷、正己烷、环己烷和无溶剂体系中进行酶促酯化反应。

从 Fig.2 的结果中发现,反应体系中加入溶剂后,反应底物的浓度降低,与酶接触的面积增大,酯化率明显提高。不同溶剂对脂肪酶酯化反应的影响主要是由于溶剂的疏水性的不同引起的。疏水性从左至右由大变小,疏水性影响脂肪酶的活性,疏水性越强,脂肪酶的活性越高,酯化效果越好,但是该体系中甲醇的亲水性太强,在反应中起着控制因素的作用,因此溶剂体系的极性大小对脂肪酶的活性和酯化效果影响不大,从经济角度考虑选用石油醚较为合适。

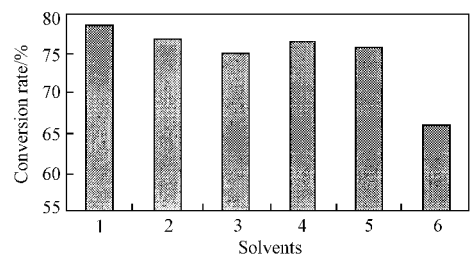


图 2 溶剂对酯化过程的影响

Fig.2 Effect of solvent on esterification
1. Petroleum ether(60~90℃); 2. Isooctane; 3. n-heptane; 4. n-hexane; 5. Cyclohexane; 6. Free solvent

2.1.3 不同脂肪酶对反应的影响:

表 1 不同脂肪酶对酯化过程的影响

Table 1 Effect of various lipase on esterification

Lipase	Conversion rate/%
Procine Pancreas(from Sigma Co.)	22.45
Immobilized Procine Pancreas	13.79
Lipolase 100K(from Novo Co.) immobilized lipase)	42.17
Free lipase from <i>Rhizopus arrhizus</i> (from our lab)	66.39
Immobilized lipase from <i>Rhizopus arrhizus</i>	26.31
Free lipase from <i>Rhizopus usami</i> (from our lab)	61.18
Immobilized lipase from <i>Rhizopus usami</i>	20.60
Free <i>Candida Cylindracea</i> (from Sigma)	19.72
Immobilized <i>Candida Cylindracea</i>	17.20
Free lipase from <i>Candida sp. 99-125</i> (from our lab)	80.50
Immobilized lipase from <i>Candida sp. 99-125</i>	81.51

Amount of lipase 3%(free) 5%(IM); other conditions is same as 1.3.2 ; to add methanol stepwise.

上述表 1 的结果表明, *Candida sp. 99-125* 获得的脂肪酶(实验室自己发酵提取获得)对于生物柴油的合成具有很强的实用潜力,从生产经济性考虑,固定化酶是首选,以后的实验中均采用该种酶的固定化形式。

2.1.4 吸水剂的加入:酯化反应是水解反应的逆反应,反应中产生等摩尔的水,必须及时除去,否则会抑制反应的进行,同时破坏酶的微环境而导致活性和稳定性的下降。

表 2 吸水剂对酯化过程的影响

Table 2 Effect of absorbent agent on esterification

Time adding into absorbent agent	Conversion rate/%	
	Fed-batch methanol	No fed-batch methanol
0 th h	62.48	20.94
4 th h	78.33	20.79
7 th h	80.3	20.35
10 th h	78.56	20.89
No adsorbent agent added	64.23	20.45

Absorbent agent : anhydrous silica gel

Table 2 的结果表明,反应体系中以不流加方式加入甲醇,反应的控制步骤是底物甲醇的抑制作用,加吸水剂对反应影响不大。流加甲醇后消除了底物的抑制作用,加吸水剂能够明显提高反应转化率,而且在反应的初期加入吸水剂效果不明显,其主要原因可能是初期加入的吸水剂与甲醇的亲和作用而影响反应过程。

2.1.5 反应进程和反应时间的确定:Fig. 3 是反应体系加吸水剂和不加吸水剂条件下,酯化反应的反应历程。

结果表明,油酸和甲醇在摩尔比为 1:0.5 的条

件下,酯化反应速度很快,也很快达到了平衡(甲醇的转化达到 96% 以上),在 10h 流加甲醇和吸水剂以后,反应速度明显减慢,24h 达到反应终点。加入吸水剂(Fig. 3 中 2 号线)与不加吸水剂(1 号线)相比较,能够明显加快进程和最终反应得率。主要因素是水的抑制作用,甲醇加入后可能也被吸水剂吸附从而影响酶催化。

从实验中我们发现,第一份甲醇(0.5mol 当量)加入后,2h 很快达到平衡,酸的转化率为 48% 以上,醇的转化率为 96% 以上。于是我们将第二次流加甲醇和吸水剂的时间提前到 2h(Fig. 3 中 3 号线),达到反应终点仍然需要 24h。酯化反应体系的最佳反应时间控制在 24h。

2.1.6 底物特异性:月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、山嵛酸和芥酸分别与甲醇、乙醇、丙醇和丁醇反应合成脂肪酸低碳醇酯,这些不同性质的生物柴油在酯化过程中的酶促反应不同。酶对不同的底物是有特异性的。Fig. 4 结果表明,对于不同链长的饱和脂肪酸来说,C 原子数越多,酯化率越高,相同 C 数的不饱和脂肪酸的酯化率要低于饱和酸的酯化率。对于不同长度的低碳醇来说,C 原子数越多,酯化率相对较高。

为了更接近真实反应体系,我们采用等摩尔量的混合脂肪酸(棕榈酸、油酸和硬脂酸)与甲醇反应,相同条件下可以得到 83% 的酯化率。

2.1.7 底物摩尔比对反应的影响:在基本反应体系中两种底物是按照等摩尔比加入的,但是等摩尔比不一定是最佳的反应比例,因而对于酸与醇的比例也需进行优化。分别试验了油酸与甲醇的摩尔比为 1:0.8、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:2.0、1:2.5 几种情况,甲醇等比例分 2~5 次加入反应体系(使每次加入的甲醇为 0.5 摩尔当量),其结果见 Fig. 5。从图中可以看出,最佳的反应底物摩尔比应该是 1:1.4,酯化率可以达到 92%。

2.1.8 酶的用量和纯度:酶量的不同直接影响着酯化反应速度和酯化率,我们实验了不同浓度的固定化酶, Fig. 6 结果表明当酶的用量为 5% w(酶:酸)是最佳的,再增加酶的用量,反应转化率没有明显的提高。此时固定化酶活为 5000u/g。

2.1.9 固定化酶的寿命:固定化酶的使用寿命和半衰期是评价它的重要指标。我们选用硅藻土和纺织品(一种无纺布的边角余料)两种载体固定化酶,最终确定使用廉价的纺织品作为固定化载体,易于回收和反复使用,制备的固定化酶可以连续使用多次,提高了酶的使用寿命。从 Fig. 7 中可知,当采用酸

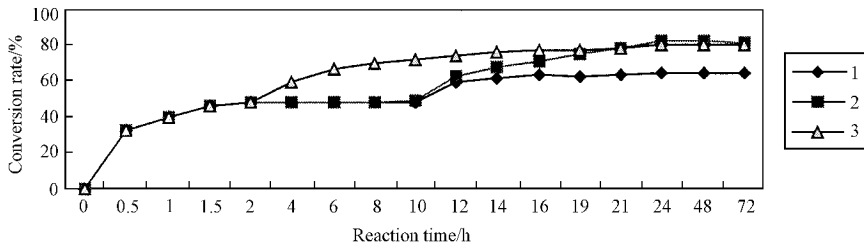


图3 酯化过程的反应历程

Fig.3 Time courses of esterification

1. No absorbent agent added (fed-batch methanol at 10h);
2. Absorbent agent added (fed-batch methanol and absorbent agent at 10h);
3. Absorbent agent added (fed-batch methanol and adsorbent agent at 2h)

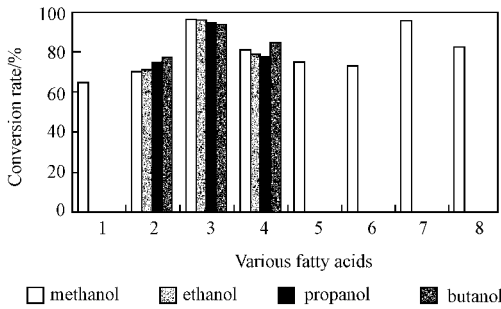


图4 不同底物对酯化的影响

Fig.4 Effect of substrate on esterification

1. Lauric acid system ; 2. Palmitic acid system ;
3. Stearic acid system ; 4. Oleic acid system ;
5. Linoleic acid system ; 6. Linolenic acid system ;
7. Docosanoic acid ; 8. Docosenoic acid

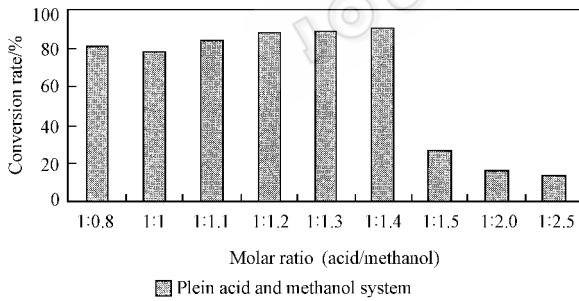


图5 底物摩尔比对酯化过程的影响

Fig.5 Effect of substrate molar ratio on esterification

醇摩尔比为 1:1 的条件进行油酸和甲醇酯化反应, 固定化酶的半衰期为 360h, 反应 240h 时, 反应酯化率下降 12%。

2.1.10 酯化产物的纯度分析 将产物与酶分离后, 碱中和除去未反应的酸, 然后水洗除去甲醇和盐, 分层, 再用水和石油醚反复萃取, 最后蒸发去有机溶剂, 得到淡黄色、基本无味的液体。经 GC 分析, 见图 8。酶法合成的油酸甲酯、棕榈酸甲酯和硬脂酸甲酯的纯度 > 98%。

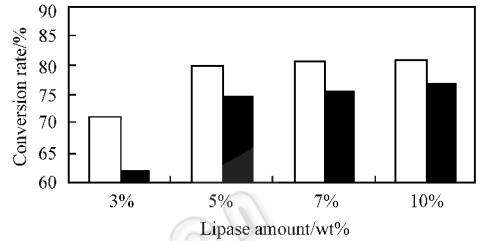


图6 酶浓度对酯化的影响

Fig.6 Effect of lipase amount on esterification (oleic acid and methanol system)

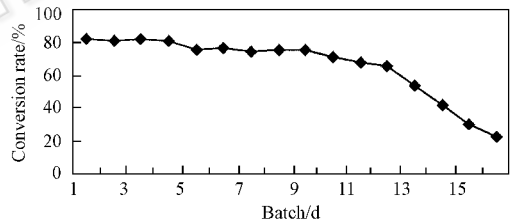


图7 固定化酶的使用寿命

Fig.7 Effect of reaction batch on esterification (oleic acid and methanol system)

2.2 酯交换合成脂肪酸甲酯

生物柴油合成的另一条途径是酶促动植物油脂与甲醇的酯交换。我们选用理论底物摩尔比(1:3), 在石油醚体系下进行了初步实验, 实验结果表明, 甲醇的抑制作用是同样存在的, 我们采取分批流加甲醇的方式效果明显。反应初期, 反应体系中底物摩尔比为 1:1(菜子油/甲醇, mol/mol), 12h 的酯化率可达到 32.1%, 然后再加入 1mol 当量的甲醇继续反应 12h, 酯化率可以达到 58%, 最后第三次加入 1mol 当量的甲醇继续反应 12h, 酯化率最终可以达到 83%。从 Fig.9 的结果可以看到, 与 3mol 当量的甲醇一次性加入相比, 三步流加甲醇的反应体系其酯化率可得到明显提高。

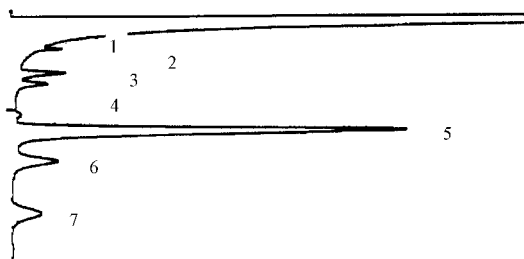


图 8 脂肪酸甲酯气相色谱谱图

Fig.8 GC analysis of fatty acid methyl ester

1. C14 0; 2. C16 0; 3. C16 1; 4. C18 0;
5. C18 1; 6. C18 2; 7. C18 3

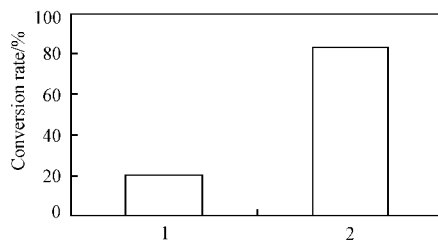


图 9 甲醇对酶促酯交换过程的抑制作用

Fig.9 Resistance effect of methanol on methanolysis
(rap oil and methanol system)

1. No feed batch methanol (add 3 molar equivalent methanol once);
2. Feed batch methanol (add methanol in Separate three times)

3 结 论

酶法合成生物柴油是一个十分有潜力的生物催化过程。通过我们的初步试验,我们实验室发酵提取的脂肪酶(*Candida* sp. 99-125)采用吸附法固定化,可以用于酯化和酯交换两条途径来制备生物柴

油。其中酯化工艺的最佳条件是,在石油醚体系中,5%(wt%)固定化脂肪酶,温度为 40℃,油酸和甲醇摩尔比为 1:1.4,低碳醇分两次等摩尔流加,在反应过程中加入硅胶吸水剂,反应时间为 24h,酯化率可以达到 92%。试验结果表明,脂肪酸和低碳醇的碳原子数越多,酯化率越高。对于硬脂酸体系醇摩尔比为 1:1 的条件下,酯化率可达到 95% 以上。酯化后产物经初步分离纯化后进行 GC 分析,脂肪酸甲酯的纯度可达到 98%。

酯交换过程同样存在甲醇对酶反应的抑制作用,我们采用三步流加流加甲醇可消除底物对酶的抑制,转化率可达到 83%。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tom Kranwczyk. Biodiesel. *INFORM*, 1996, 7(8): 801 - 803
[2] Shay E G. Diesel fuel from vegetable oils : status and opportunities. *Biomass and Bioenergy*, 1993, 4 : 227 - 242
[3] Gerhard Knothe, Robert O, Dun, Marvin O, Bagby. Technical aspects of biodiesel standards. *INFORM*, 1996, 7(8): 827 - 829
[4] Yuji Shimada, Yomi Watanbe, Tachi Samukawa, Akio Sugihara *et al.* Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *JAACS*, 1999, 76(7): 789 - 792
[5] Botulbaba Selmi, Daniel Thomas. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. *JAACS*, 1998, 75(6): 691 - 695
[6] Mukesh D, Barji A A, Bevinakatti H S. A note on transesterifications of vegetables oils catalysed by lipase in a packed tubular reactor. *Indian Chem Engr (Sec A)*, 1994, 36(4): 193 - 196
[7] Krisnangkura K, Simamahamnop R. Continuous transmethylation of palm oil in an organic solvent. *JAACS*, 1992, 69(2): 166 - 169

Studies of Enzymatic Synthesis of Biodiesel

DENG Li TAN Tian-Wei* WANG Fang

(Beijing Bioprocess Key Lab , Beijing University of Chemical Technology , Department of Bioengineering , Beijing 100029 , China)

Abstract Biodiesel , an alternative diesel fuel , fatty acid alkyl ester , is made from renewable biological sources such as vegetable oils and animal fats . Two processes for biodiesel synthesis , enzymatic lipase catalytic esterification from fatty acid and transesterification from oils and fats , was investigated . The effects of various lipases , enzyme amount and purity , solvent , water absorbent , inhibition of short chains alcohol , specificity of substrate , molar ratio of substrate on esterification were studied in detail . The esterification degree with the optimal parameter and process can reach up to 92% . The purity of biodiesel obtained by separation and purification is up to 98% , and the half - life of the immobilized lipase for the esterification process can be up to 360hr , Moreover , the preliminary studies of the transesterification including the amount of methanol and mode of adding methanol into reaction system were made . The transesterification degree with adding methanol stepwise can reach 83% .

Key words biodiesel , fatty acid short chain alcohol ester , lipase , catalysis , esterification , transesterification

Received : 06-26-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China(No.20176002) .

* Corresponding author. Tel and Fax 86-10-64416691 , E-mail : dengli13@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>