

酶法合成生物柴油工业化研究进展

谭天伟¹, 鲁吉珂^{1,2}, 聂开立¹, 张海霞¹, 邓利¹, 王芳¹

1 北京化工大学生命科学与技术学院 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029

2 郑州大学生物工程系, 郑州 450001

摘要: 介绍了北京化工大学近年来酶法合成生物柴油工业化研究的结果。主要内容包括以下几个方面: 高产脂肪酶菌株的选育、脂肪酶发酵工艺优化及放大、脂肪酶固定化方法、酶反应器放大、生物柴油分离精制及副产物甘油综合利用。该脂肪酶假丝酵母 *Candida* sp. 99-125 在 5 m³ 罐发酵活力不低于 8 000 IU/mL, 然后将该脂肪酶吸附固定在织物膜上并进行表面改性, 用于搅拌罐式反应器生产每吨甲酯的需酶量仅为 4.2 kg, 产品经分离精制调质后, 其各项指标完全符合德国生物柴油生产标准。副产物甘油可用于 1,3-丙二醇发酵, 30 L 发酵罐中 1,3-丙二醇的产量可达到 76.1 g/L。

关键词: 生物柴油, 酶催化转化, 脂肪酶固定化, 1,3-丙二醇联产

Progress on biodiesel production with enzymatic catalysis in China

Tianwei Tan¹, Jike Lu^{1,2}, Kaili Nie¹, Haixia Zhang¹, Li Deng¹, and Fang Wang¹

1 Beijing Bioprocess Key Laboratory, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: This paper reports the progress of biodiesel production with enzymatic catalysis in Beijing University of Chemical Technology, one of the leaders in biodiesel R & D in China, which includes screening of high-yield lipase production strains, optimization and scale-up of the lipase fermentation process, lipase immobilization, bioreactor development and scale-up, biodiesel separation and purification and the by-product glycerol utilization. Firstly, lipase fermentation was carried out at industrial scale with the 5 m³ stirred tank bioreactor, and the enzyme activity as high as 8 000 IU/mL was achieved by the species *Candida* sp. 99-125. Then, the lipase was purified and immobilized on textile membranes. Furthermore, biodiesel production was performed in the 5 m³ stirred tank bioreactor with an enzyme dosage as low as 0.42%, and biodiesel that met the German biodiesel standard was produced. And in the meantime, the byproduct glycerol was used for the production of 1,3-propanediol to partly offset the production cost of biodiesel, and 76.1 g/L 1,3-propanediol was obtained in 30 L fermentor with the species *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: biodiesel, enzymatic catalysis, lipase immobilization, 1,3-propanediol co-production

Received: June 26, 2010; **Accepted:** July 1, 2010

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714304), National Nature Science Foundation of China (No. 20576013), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2006AA020203, 2009AA03Z232), Natural Science Foundation of Beijing (No. 2071002).

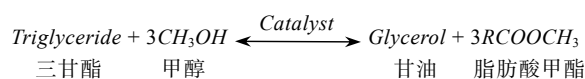
Corresponding author: Tianwei Tan. Tel: +86-10-64416691; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB714304), 国家自然科学基金 (No. 20576013), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2006AA020203, 2009AA03Z232), 北京市自然科学基金 (No. 2071002) 资助。

随着经济的发展和人民生活水平的提高,人类对能源的需求量持续上升,而在所有能源消费中一直居榜首的石化能源储量有限。从能源安全和环境保护的角度考虑,发展石油替代能源是世界许多国家缓解能源供应紧张、应对气候变暖(温室气体减排)的重要举措^[1]。生物质能源除了可再生和清洁外,它是可以直接大规模生产和替代运输燃料的能源产品,兼有提供能量和物质性生产(生物基产品)的功能。生物质能以有机废弃物或污染物为原料,可实现资源的循环利用与保护环境相结合。

生物柴油(Biodiesel, fatty acid methyl esters)是以油脂和短链醇为底物,经过酯交换反应而得到的脂肪酸短链醇酯。生物柴油环境友好、安全环保、燃烧性能优异,是一种绿色可再生的生物质能源。生物柴油中有害物质(硫和灰分等)的含量仅为中质烟煤的1/10左右,采用生物柴油燃烧尾气中颗粒物为石化柴油的20%,有毒有机物排放量仅为1/10,无SO₂、铅等有毒物质的排放。因此,生物柴油的开发利用是一种高度清洁的能源技术,是减少温室气体排放,防止全球环境恶化的一种有效选择。生物柴油也日益成为一种重要的可再生燃料油,用其替代石化柴油已成为国内外能源发展的必然趋势,在我国也同样拥有巨大的市场潜力和发展前景。

目前合成生物柴油最常用的方法是以油脂和短链醇类进行酯交换反应合成脂肪酸短链醇酯。酯交换反应也称为醇解,类似于水解的过程,用一种醇置换酯分子中的醇,从而降低底物油脂的粘度。如果甲醇用于上述反应中,则称之为甲醇解。油脂中主要成分是三甘酯,一分子三甘酯与三分子甲醇在催化剂或高温高压下酯交换,生成三分子脂肪酸甲酯和一分子甘油,其反应可用下面的方程式表示:



醇解反应可以由碱、酸或酶催化剂来催化完成。碱催化剂包括NaOH、KOH、碳酸盐和钠、钾的对应醇类化合物,如甲醇钠、乙醇钠等。硫酸、磺酸和盐酸通常被用作酸性催化剂,脂肪酶也经常作为生物催化剂使用。由于碱催化的转酯化反应比酸催化

和酶催化的反应速率快,反应时间较短,其在实际生产中应用最广。但同时化学法也有一些缺陷,比如高能耗、甘油分离较困难、催化过程及产物分离精制过程会产生许多废液等^[2]。

酶法合成生物柴油,是利用脂肪酶能够催化转酯化反应的功能,完成酯交换反应的工艺。酶法具有反应条件温和、环境友好、可处理多种油脂、副产物少、产品易提取和精制等优点,目前已成为生物柴油研究的重要发展方向^[3]。但目前制约酶法合成生物柴油的关键在于催化剂脂肪酶的成本较高;底物甲醇、乙醇等短链醇对脂肪酶活力存在着较强的抑制作用,脂肪酶在短链醇中容易失活,催化剂的寿命较低;反应过程中产生的副产物甘油附着在脂肪酶表面,阻碍了底物和催化剂接触,从而降低反应效率。为了提高脂肪酶的操作稳定性、降低催化剂使用成本,前人做了大量的研究工作。首先采用各种固定化酶的手段,提高生物催化剂的使用寿命^[4]。为了减弱甲醇等短链醇对脂肪酶的毒性,经常采用以下3种策略:甲醇分批加入、溶剂选择和酰基受体的选择。其中分批加入甲醇的方式便于实现,可有效降低甲醇浓度从而提高最终反应转化率,因此应用很广^[5]。此外,也有研究者采用叔丁醇体系来改善甲醇和甘油在油脂中的溶解度,避免甲醇毒性和甘油附着,因此该体系中酶操作稳定性良好^[6]。乙酸甲酯代替甲醇参与反应,也可有效避免极性底物对脂肪酶的毒性,但反应速率较慢^[7]。总体来说,脂肪酶催化合成生物柴油的很多研究仍处于实验室阶段,脂肪酶成本仍然较高,高效稳定廉价的脂肪酶的生产 and 制备仍然是制约工业化酶法生产生物柴油的关键所在。

本课题组经过多年选育,得到了适合脂肪酸酯的专一性的假丝酵母脂肪酶,并开发出一种新的膜固定化方法,将该脂肪酶固定在织物膜上。该固定化脂肪酶是目前国内外用于酯化反应性价比较好的脂肪酶,大大降低了酶法合成生物柴油的催化剂成本。

1 脂肪酶菌种选育及发酵生产

首先针对得到的原始菌株,采用化学诱变技术,选育得到高产假丝酵母脂肪酶菌种 *Candida* sp.

99-125。根据脂肪酶的部分氨基酸序列设计引物, PCR 扩增得到脂肪酶成熟肽序列, 该脂肪酶成熟肽氨基酸序列由 301 个氨基酸组成。将该序列克隆到 pPICZαA 载体中, 然后转化到毕赤酵母中进行脂肪酶的分泌重组表达。将重组质粒转化毕赤酵母 GS115 后, 利用质粒 pPICZαA 上的 Zeocin 筛选标记, 通过高抗生素浓度 (500 μg/mL Zeocin) 成功筛选得到脂肪酶高产菌株 YILip 的 2 个多拷贝菌株^[8]。摇瓶产酶实验证实, 胞外重组脂肪酶活性可达到 350 U/mL; 在 5 L 发酵罐内发酵液中酶活达到 11 000 U/mL, 重组蛋白含量达到了 2.3 g/L 发酵液。优良菌株的选育和对应基因工程菌的构建为大规模发酵生产高活力脂肪酶奠定了基础。

研究发现利用油脂诱导脂肪酶合成方法, 可以显著提高脂肪酶产量, 用界面响应方法优化了脂肪酶发酵工艺, 小罐脂肪酶产量可达 9 000 IU/mL 以上^[9]。在 1 m³ 生产罐中成功地进行了放大试验, 脂肪酶发酵水平达到 8 200 IU/mL, 在此基础上进一步放大至 5 m³ 发酵罐, 脂肪酶活力均不低于 8 000 IU/mL。发酵水平的提高大大降低了催化剂的成本, 脂肪酶的成本已降至 60 元/kg。

2 脂肪酶固定化

吸附法固定化酶具有操作简单、载体便于重复利用、酶活损失小以及成本较低等优点, 是目前最普遍采用的一种固定化方法。我们自主开发的固定化酶为一种新的膜固定化方法, 用廉价的织物布, 经过表面改性, 将该脂肪酶固定在织物膜上。并进一步研究了织物膜表面亲疏水性对固定化酶酶活和稳定性的影响, 利用疏水界面的活化作用提高固定化酶在有机相中的催化活性。利用改性剂对载体进行表面处理, 提高载体的表面疏水性。经表面改性后载体制备的固定化酶, 在 10%(V/V) 的高含水量体系中仍然保持高催化活力, 重复使用稳定性提高 1 倍, 大大提高了生物柴油酶促合成体系中脂肪酶的耐受性。

3 生物柴油反应器及放大

在脂肪酶的高效表达系统构建、脂肪酶发酵工

艺优化和新型固定化方法的研究基础上, 将该固定化酶布应用在生物柴油反应器中。将酶布平铺在 36 目的不锈钢丝网上, 卷成紧密的筒状, 放入填充床反应器中, 反应器外有夹套通过水浴保持 35°C~40°C 恒温。反应底物在 40°C 下充分搅拌, 溶解混匀后由反应器底部打入填充床, 反应液经填充床后由顶部流出。以此种形式填充在减小流体的压力同时又起到了液体再分布器的作用。该反应器具有操作压力小、反应液体在反应器内分布均匀、固定化酶利用率高等优点。对于植物油及废油等原料生产生物柴油转化率均可达到 90% 以上, 最高转化率可以达到 96%。在优化反应条件下, 该固定化酶在可连续使用 10 d 以上, 显示了良好的操作稳定性^[10]。

由于该固定化酶催化生物柴油反应时间较长, 尝试采用搅拌罐式反应器来提高脂肪酶的使用效率。在实验室 5 L 三口烧瓶试验基础上, 将反应器放大 40 倍, 搅拌罐体积放大至 200 L。投入 150 kg 原料油, 投入 480 g 酶, 在最优条件下, 产物中甲酯含量为 85%。进一步将反应器放大至 1 m³ 规模, 每次投入原料油 818 kg (酸价 133 mg KOH/g), 固定化酶 3.2 kg, 在最优反应条件下, 最终产物酸价 24.97 mg KOH/g, 甲酯含量达到 85%。经过计算, 该放大实验生产每吨甲酯的需酶量为 4.2 kg 酶/t 甲酯, 结果重复性良好。在工业规模 5 m³ 搅拌罐上进一步放大, 也得到了相似的结果, 表明该方法在工业上是非常可行的。

4 生物柴油分离及精制

针对生物柴油的分离精制, 采用降膜蒸发器串联刮板式薄膜蒸发器的工艺。利用降膜蒸发器来分离除去粗产品的甲醇、水等低沸点物质, 然后利用刮板式薄膜蒸发器或分子蒸馏装置来分离脂肪酸甲酯即生物柴油。该方法分离后产品中甲酯含量大于 97%, 方法收率大于 85%。分离之后的生物柴油粗甲酯, 经过脱酸、真空脱水, 再加入调制其低温性能与氧化稳定性能的降凝剂抗氧化剂之后, 即得到生物柴油产品。该工艺制得的生物柴油, 其产品各项指标完全符合德国生物柴油生产标准 (表 1), 生产成本同化学法相当, 但能耗和三废排放大大降低。

表 1 生物柴油产品质量检验

Table 1 Report of the biodiesel product quality

Items	Analytical results	Analytical methods
Density (20°C)	869 (kg/m ³)	GB/T 2540
Kinematic viscosity (40°C)	4.39 (mm ² /s)	ASTM D445
Flash point (Closed cup)	169 (°C)	ASTM D93
Sulfur	0.0005 (wt, %)	SH/T 0689 ^b
Acid value	0.26 (mg KOH/g)	GB/T 7304
Methyl esters content	>98% (wt, %)	GC
Carbon residue	<0.05 (wt, %)	ASTM D4530
Cetane number	73.6	GB/T 386
Water content	0.029 (wt, %)	SH/T 0246
Copper strip corrosion (3 h 50°C)	1a	ASTM D130
Total glycerine	Not detected	ASTM D6584

5 副产物甘油高附加值化

为了进一步降低生物柴油的生产成本, 将副产物甘油进行选择性的脱羟基制备 1,3-丙二醇。以克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 为研究对象, 进行了微生物代谢途径的改造, 构建了一株高产 1,3-丙二醇的重组克雷伯氏菌。之后将酶催化工段的废甘油进行了预处理, 通过简单的减压蒸馏浓缩除去甲醇。摇瓶发酵结果显示, 经过预处理的甘油溶液可以用于 1,3-丙二醇发酵, 且产物浓度与使用纯甘油相当。然后在 30 L 发酵罐进行了批式发酵, 最终发酵液中 1,3-丙二醇的产量可达到 76.1 g/L。由此可见, 使用生物柴油副产物甘油作为原料用于 1,3-丙二醇发酵, 可以较好地实现甘油的综合利用, 提高产品的附加值, 降低整个过程的成本。

6 结论

酶法合成生物柴油因为其反应条件温和、反应过程绿色环保等优点, 是近年来研究的热点。酶法合成生物柴油的关键在于催化剂脂肪酶的活性和稳定性。目前研究中应用较广的 Novozym435 脂肪酶由于其成本较高, 限制了其在工业生产中的应用。我们经过多年研究, 成功开发出一种新的高效假丝酵母脂肪酶, 通过菌种选育、基因工程菌构建、发酵工艺优化及放大, 最终在 5 m³ 罐中脂肪酶发酵活力不低于 8 000 IU/mL, 脂肪酶的成本仅为 60 元/kg。采用廉价的无纺布及丝绸布等, 通过表面改性, 成

功地使脂肪酶固定在廉价的膜布上, 使用完后的膜布洗涤后可重复使用多次。分别在固定床和搅拌罐中进行生物柴油合成反应, 自制的固定化脂肪酶显示了良好的催化性能。生物柴油经分离精制调质后, 其产品各项指标完全符合德国生物柴油生产标准, 生产成本同化学法相当, 但能耗和三废排放大大降低。副产物甘油可以经过克雷伯氏菌发酵脱羟基制备 1,3-丙二醇, 降低整个生物柴油生产的工艺成本, 提高产品附加值。

REFERENCES

- [1] Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, *et al.* Production of biodiesel using immobilized lipase-A critical review. *Crit Rev Biotechnol*, 2008, **28**(4): 253-264.
- [2] Lara Pizarro AV, Park EY. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochem*, 2003, **38**(7): 1077-1082.
- [3] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, **17**(3/5): 133-142.
- [4] Cao L. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol*, 2005, **9**(2): 217-226.
- [5] Soumanou MM, Bornscheuer UT. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **33**(1): 97-103.
- [6] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, *et al.* Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(3): 648-653.
- [7] Xu Y, Du W, Liu D, *et al.* A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(15): 1239-1241.
- [8] Yu M, Lange S, Richter S, *et al.* High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Express Purif*, 2007, **53**(2): 255-263.
- [9] He YQ, Tan TW. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida sp.* 99-125. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **43**(1/4): 9-14.
- [10] Nie K, Xie F, Wang F, *et al.* Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **43**(1/4): 142-147.