

# 脂肪酶催化微藻油脂制备生物柴油的工艺研究

张桐栋<sup>1</sup>, 杜培炎<sup>1</sup>, 刘永梅<sup>2,3</sup>, 林月绪<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002;  
2. 武汉大学药学院组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071;  
3. 武汉大学深圳研究院, 广东 深圳 518000)

**摘要:**以商业固定化脂肪酶复配的组合酶(米黑毛霉脂肪酶+南极假丝酵母脂肪酶)为催化剂、栅藻油为原料制备生物柴油,对反应体系和条件进行全面优化,得出最理想的酶催化反应体系和条件分别为:藻油与甲醇摩尔比为1:12、助溶剂(叔丁醇):藻油为1:1(V/m)、藻油与固定化脂肪酶质量比为50:1、反应温度为45℃、反应时间为9~12 h、摇床转速为250 r/min。在此条件下,制得的生物柴油(FAME)最高转化率达98.67%,为微藻生物柴油的工业化开发和应用提供了参考依据。

**关键词:**酶;微藻;生物柴油;生物催化;脂肪酸甲酯

**中图分类号:**TK6

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2020)12-0147-04

**DOI:**10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.12.030

## Preparation of biodiesel from microalgae oil via lipase catalysis

ZHANG Tong-dong<sup>1</sup>, DU Bei-yan<sup>1</sup>, LIU Yong-mei<sup>2,3</sup>, LIN Yue-xu<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and New Drug Discovery, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Shenzhen Research Institute, Wuhan University, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** Biodiesel is prepared by using *Scenedesmus* oil as raw materials and the combinatorial enzymes compounded by commercial immobilized lipase (*Mucor miehei* lipase combined *Candida antarctica* lipase) as catalyst, and the reactive system and conditions are systematically optimized. The optimum reaction system and conditions are obtained as follows: the molar ratio between algae oil and methanol is 1:12, the ratio of co-solvent (*t*-butanol) to algae oil is 1:1 (*v/m*), the mass ratio of algae oil to immobilized lipase is 50:1, reaction temperature maintains at 45℃, reaction lasts for 9–12 h, shaking speed is at 250 r·min<sup>-1</sup>. Under these conditions, high-purity biodiesel (FAME) can be produced with a maximum conversion rate of 98.67%. Results from this study will provide an important theoretical basis for the development and application of microalgae-based biodiesel.

**Key words:** enzyme; microalgae; biodiesel; biocatalysis; fatty acid methyl ester (FAME)

微藻与传统的油料作物或高等植物相比,易于实现规模化培养、产油量高,可达传统油料作物产量的25倍以上,含油量最高可以达到生物量干重的70%左右<sup>[1-2]</sup>。

近年来,人们初步探索了利用脂肪酶催化技术制备微藻生物柴油,发现该方法能够得到较高的生物柴油转化效率<sup>[3]</sup>,但酶催化反应体系和反应条件仍有待于深入优化,以获得较高的产物纯度和转化率,并降低微藻生物柴油的生产成本。

栅藻(*Scenedesmus*)隶属绿藻门栅藻科,生长迅速且生物量高,易于规模化培养,目前在污水处理和饲料开发中已有应用。有研究表明,栅藻属某些种的油脂质量可达其生物量的近50%,是制备微藻生

物柴油的理想原料,但目前有关脂肪酶催化栅藻油脂转化生物柴油的报道很少。为探讨其可行性并确定理想的反应条件和体系,笔者选用固定化脂肪酶催化栅藻油制备生物柴油,并将实验结果与传统的硫酸转化法进行对比,系统研究了脂肪酶催化转化栅藻油的过程,对反应工艺进行了优化,初步构建了脂肪酶催化栅藻油制备生物柴油的反应体系和方法。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

所用栅藻油由实验室培养栅藻经收集、浓缩并参照文献[4]中所述的方法进行制备。

收稿日期:2020-02-11;修回日期:2020-10-07

基金项目:福建省大学生创新创业训练计划(201910389055);深圳市知识创新计划(JCYJ20160531194422714)

作者简介:张桐栋(1998-),男,本科,研究方向为固定化酶催化反应,zhang\_td\_academic@163.com;林月绪(1979-),男,硕士,实验师,研究方向为反应催化,通讯联系人,linyuexu@163.com。

## 1.2 仪器与试剂

恒温摇床;烘箱;离心机;气相色谱仪(FID-GC;毛细管色谱柱:HP-88, 100 m),美国安捷伦公司生产。

脂肪酸(甲酯)标准品、脂质标准品、不同商业化固定化脂肪酶, Sigma 公司(Sigma-Aldrich)生产;正己烷、叔丁醇、甲醇等,分析纯,赛默飞世尔(中国)有限公司(Thermo Scientific, China)生产;浓硫酸等其他试剂,国药集团化学试剂有限公司生产。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 酸催化栅藻藻油制备生物柴油的反应体系和方法

参照文献[3,5]中所述的方法并略加改进。将 50 mg 粗藻油和 5 mg 十七烷酸(内标物)加入带有 PTFE 内衬的 8 mL 旋盖玻璃反应瓶中,然后加入 2 mL 2%硫酸-甲醇溶液并混匀。将反应瓶在 80℃ 恒温箱中反应 2 h,每 15 min 取出快速振荡 1 次。反应结束后,将 2 mL 饱和氯化钠溶液和 2 mL 正己烷加入瓶中并混匀。离心(2 000 r/min)后小心取出含有 FAMES 的正己烷层, N<sub>2</sub> 吹干浓缩。最后,用 1 mL 正己烷溶解,进行薄层色谱(TLC)和气相色谱(GC)分析。

### 1.3.2 酶催化栅藻藻油制备生物柴油的反应体系和方法

固定化酶催化的酯交换反应在恒温摇床中进行,使用带有 PTFE 内衬的玻璃反应瓶。摇床参数:温度为 45℃、震荡速率为 250 r/min,反应时间为 9~12 h。反应体系包括粗藻油和不同剂量的脂肪酶、助溶剂和甲醇。反应结束后,将样品离心并进行 TLC 分析。取 10 μL 上清液,与 50 μL 十七烷酸甲酯标准品(1.05 mg/mL)和 440 μL 正己烷充分混匀,用 GC 进行分析<sup>[3,5]</sup>。

### 1.3.3 酶催化反应条件和参数优化

为提高酶催化法中藻油转化率和反应过程的经济性,分别考察了不同种类助溶剂、脂肪酶、藻油与甲醇摩尔比、助溶剂与藻油比、藻油与脂肪酶质量比、固定化酶的重复使用次数等因素对反应过程和转化率的影响。

### 1.3.4 转化产物的薄层色谱(TLC)和气相色谱(GC)分析

利用 TLC 和 GC 对酸催化法和酶催化法获得反应产物中生物柴油组分进行分析,以确定转化产物中 FAME 的纯度和藻油转化率。

TLC 分析中,展开剂为正己烷、乙醚、乙酸(体积比为 80:20:2),显影剂为磷酸:33%乙酸:硫酸:0.5%硫酸铜(体积比为 5:5:0.5:90),180℃ 加热 7 min<sup>[5]</sup>。

GC 分析中,选用极性毛细管柱(HP-88, 100 m)。色谱条件为:起始温度为 100℃,保留 5 min;然后以 3.5℃/min 加热到 240℃,保留 5 min。进样口温度为 260℃,载气(He)流速为 1.5 mL/min,进样量为 1 μL<sup>[5]</sup>。

### 1.3.5 藻油转化率计算

生物柴油转化率通过比较酶法和化学法(理论转化率为 100%)催化转酯化得到的气相色谱图相对应的峰面积进行计算,计算式为:

$$\text{生物柴油转化率}(\%) = Y(\text{脂肪酶})/Y(\text{化学}) \times 100\%^{[3]}$$

式中:Y(x)为不同条件下,相同剂量藻油转酯化后得到 FAME 的产量。进行平行实验,结果取平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 助溶剂对生物柴油转化率的影响

助溶剂种类对转化率的影响如表 1 所示。由表 1 中可以看出,助溶剂的引入极大地提高了转化效率,其中,叔丁醇作为酶催化反应助溶剂得到最高转化效率 98.20%。叔丁醇的引入,稀释了反应体系,同时对脂肪酶起到独特的保护作用,提高了固定化酶的催化活性和再利用能力。此外,从生物柴油的商业发展前景分析,助溶剂的成本和其环境效应也需要考虑。因此,叔丁醇是较为理想的栅藻生物柴油转化制备工艺中的助溶剂。

表 1 助溶剂种类对转化率的影响

助溶剂	丙酮	甲基叔丁醚	叔丁醇
转化率/%	94.60	91.72	98.20

注:实验条件:南极假丝酵母脂肪酶;n(藻油):n(甲醇)=1:12;V(助溶剂):m(藻油)=1:1;m(藻油):m(脂肪酶)=50:1;摇床转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

### 2.2 固定化脂肪酶种类对生物柴油转化率的影响

为探究不同脂肪酶对藻油的转化效果,考察了酶种类对生物柴油转化率的影响,结果如表 2 所示。由表 2 中可以看出,南极假丝酵母脂肪酶的催化效率(93.91%)显著高于其他种类固定化脂肪酶,米黑毛霉脂肪酶的催化效率较低,但其与南极假丝酵母脂肪酶复配的复合酶(质量比为 1:1)的催化效率

进一步提高,达到最高转化率 96.60%。这是因为将单一品种脂肪酶复配后,可以加合多种酶的底物特异性催化活性,扩大了脂肪酶的底物催化范围,从而使藻油中不同脂类都可被有效催化转化。综合分析,米黑毛霉脂肪酶+南极假丝酵母脂肪酶的复合酶(质量比为 1:1)是一种催化栅藻油转酯化制备微藻生物柴油较为理想的脂肪酶选择方案。

表 2 酶种类对生物柴油转化率的影响

酶种类	1	2	3	4	1+2
转化率/%	50.68	71.83	93.91	25.11	73.19
酶种类	1+3	1+4	2+3	2+4	3+4
转化率/%	86.88	65.89	96.60	71.09	92.62

注:1 为南极假丝酵母脂肪酶 B;2 为米黑毛霉脂肪酶;3 为南极假丝酵母脂肪酶;4 为洋葱假单胞菌脂肪酶。实验条件:复合酶质量比为 1:1; $n(\text{藻油}):n(\text{甲醇})=1:12$ ; $V(\text{助溶剂}):m(\text{藻油})=1:1$ ; $m(\text{藻油}):m(\text{脂肪酶})=50:1$ ;摇床转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

### 2.3 藻油与甲醇摩尔比对生物柴油转化率的影响

甲醇对酶具有毒性,促使酶构象改变,从而降低固定化酶循环利用的能力。固定助溶剂和藻油添量,考察藻油与甲醇摩尔比对生物柴油转化率的影响,结果如图 1 所示。由图 1 中可以发现,藻油与甲醇摩尔比从 1:3 增加到 1:12 后,生物柴油转化率提高约 20%,继续增加甲醇添加量,转化率逐渐下降,支持了前期相关的研究结果<sup>[3,6]</sup>。脂肪酶催化的藻油转酯化反应是一个可逆的过程,甲醇作为反应物,浓度过低不利于反应平衡正向移动,其结果表现为转化率较低;而当甲醇浓度过高会加剧脂肪酶变性,使其催化活性下降,转化率降低。因此,通过实验分析, $n(\text{藻油}):n(\text{甲醇})=1:12$  有利于复合酶体系催化的藻油制备生物柴油的反应。

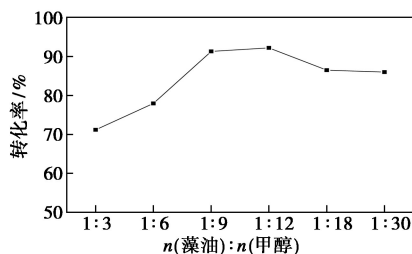


图 1 藻油与甲醇摩尔比对转化率的影响

注:实验条件:米黑毛霉脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶复合酶; $V(\text{助溶剂}):m(\text{藻油})=1:1$ ; $m(\text{藻油}):m(\text{脂肪酶})=50:1$ ;转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

### 2.4 助溶剂与藻油比对生物柴油转化率的影响

反应体系中助溶剂的含量是影响酶促酯交换反

应的关键因素,会改变甲醇在底物中的分散程度<sup>[7]</sup>。助溶剂与藻油比( $V/m$ )对转化率的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,助溶剂与藻油的比例从 0:1 升至 1:1 的过程中,转化效率快速提高;继续增加助溶剂与藻油的比例至 30:1 的过程中,转化效率逐渐下降。表明少量助溶剂的加入可保护脂肪酶,同时降低天然藻油的黏度,提高酶与底物结合效率。而当助溶剂过量使用,将会大幅稀释反应体系,降低反应物浓度,造成反应速率下降。因此,选择  $V(\text{助溶剂}):m(\text{藻油})=1:1$  以获得最大的转化效率。

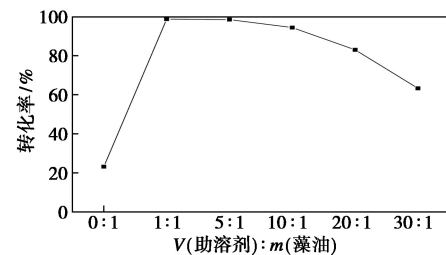


图 2 助溶剂与藻油比( $V/m$ )对转化率的影响

注:实验条件:米黑毛霉脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶复合酶; $n(\text{藻油}):n(\text{甲醇})=1:12$ ; $m(\text{藻油}):m(\text{脂肪酶})=50:1$ ;转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

### 2.5 藻油与脂肪酶质量比对生物柴油转化率的影响

脂肪酶的添加量对生物柴油生产中的转化效率和成本控制具有决定性意义<sup>[8]</sup>。为获得理想的转化效率和最优的酶用量,考察了藻油与脂肪酶质量比对栅藻生物柴油转化率的影响,结果如图 3 所示。由图 3 中可以看出,随着体系中酶用量的增加,转化率显著升高;当藻油与酶质量比达到 50:1 后,转化率趋向平稳,即使再继续提高酶的用量,转化率也几乎不再升高,而酶用量的增加会使生产成本快速上升。因此,复合酶催化转化藻油制备生物柴油的反应体系中,藻油与脂肪酶的最佳质量比为 50:1。

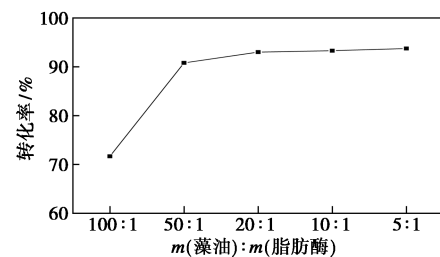


图 3 藻油与脂肪酶之比( $m/m$ )对转化率的影响

注:实验条件:米黑毛霉脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶复合酶; $n(\text{藻油}):n(\text{甲醇})=1:12$ ; $V(\text{助溶剂}):m(\text{藻油})=1:1$ ;转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

## 2.6 固定化酶的循环利用

固定化脂肪酶可以从产物中通过过滤、溶剂清洗的步骤回收而继续使用,从而降低生物柴油的生产成本<sup>[9-10]</sup>。考察了所选复合酶的回收再利用能力,结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,固定化脂肪酶在第 5 次重复利用时,生物柴油的转化效率仍能达到 89.89%,与首次使用没有显著差异。

表 3 固定化复合脂肪酶重复使用次数对转化率的影响

使用次数	1	2	3	4	5
转化率/%	95.40	93.40	91.21	91.60	89.89

注:实验条件:米黑毛霉脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶复合酶; $n(\text{藻油}):n(\text{甲醇})=1:12$ ;  $V(\text{助溶剂}):m(\text{藻油})=1:1$ ;  $m(\text{藻油}):m(\text{脂肪酶})=50:1$ ; 摇床转速为 250 r/min,反应温度为 45℃,反应时间为 9~12 h。

## 2.7 中性脂和极性脂的酯交换反应

与传统的生物柴油原料不同,微藻油富含糖脂、磷脂等极性脂质。为避免高成本的油品纯化或精炼,减少油脂浪费,将极性脂高效转化为生物柴油是很有必要的探索。研究了 3 种脂肪酶催化转化栅藻提取出中性脂、极性脂的效果,结果如表 4 所示。

表 4 栅藻藻油中性脂、极性脂的酶促转酯化反应 %

酶种类	1	2	3
中性脂	67.36	70.54	70.98
极性脂	36.85	71.51	78.93

注:1 为南极假丝酵母脂肪酶 B;2 为米黑毛霉脂肪酶;3 为南极假丝酵母脂肪酶。

由表 4 可知,作为藻油主要成分的中性脂和极性脂都可以被米黑毛霉脂肪酶、南极假丝酵母脂肪酶有效地转化为生物柴油,转化率在 70% 以上。南极假丝酵母脂肪酶 B 对中性脂具有较好的转化效果,但不适于催化极性脂的酯交换反应,这主要由酶对底物的选择性催化导致。此外,对于多种糖脂和磷脂标准品进行的复合酶催化转化实验(见表 5),也得到了较高的转化率。

表 5 磷脂、糖脂标准品的酶促转酯化反应

脂标准品	PE	PG	PC	MGDG	DGDG	SQDG
转化率/%	94.70	77.42	73.83	84.68	76.35	58.05

注:PE 为磷脂酰乙醇胺;PG 为磷脂酰甘油;PC 为磷脂酰胆碱;MGDG 为单半乳糖甘油二酯;DGDG 为双半乳糖甘油二酯;SQDG 为硫代异鼠李糖甘油二酯。

## 3 结论

系统地探索了固定化复合脂肪酶(米黑毛霉脂肪酶+南极假丝酵母脂肪酶,质量比为 1:1)催化天然栅藻藻油制备生物柴油的反应过程,对主要的反应工艺进行了优化,以提高生物柴油转化率和降低生产成本。通过对比研究获得最优化的栅藻藻油脂肪酶催化转化反应工艺:反应温度为 45℃、反应时间为 9~12 h、以叔丁醇作为助溶剂、栅藻藻油与甲醇摩尔比为 1:12、叔丁醇与藻油比为 1:1、藻油与脂肪酶质量比为 50:1、摇床转速为 250 r/min。

在该反应体系和最优条件下,藻油的转化率最高可以达到 98.67%。对生物柴油产物的 TLC 分析表明,生物柴油产品杂质极少(谱图未列出)。为后续以固定化脂肪酶为催化剂催化转化微藻生物柴油的实验研究和产业化开发提供了参考依据。

## 参考文献

- [1] Ahmad A L, Yasin N H M, Derek C J C, *et al.* Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2011, 15(1): 584-593.
- [2] Mata T M, António A M, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2010, 14(1): 217-232.
- [3] Wu S, Song L R, Sommerfeld M, *et al.* Optimization of an effective method for the conversion of crude algal lipids into biodiesel [J]. *Fuel*, 2017, 197: 467-473.
- [4] Liu A Y, Chen W, Zheng L L, *et al.* Identification of high-lipid producers for biodiesel production from forty-three green algal isolates in China [J]. *Prog Nat Sci: Mater Int*, 2011, 21(4): 269-276.
- [5] Lee Y K, Chen W, Shen H, *et al.* Basic culturing and analytical measurement techniques [M]. New Delhi: Aptara Inc, 2013: 37-68.
- [6] 陈锋亮. 废油脂酶法清洁制备生物柴油工艺研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [7] Fu B Y, Vasudevan P T. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil [J]. *Energ Fuel*, 2010, 24(9): 4646-4651.
- [8] Sivaramakrishnan R, Muthukumar K. Direct transesterification of *Oedogonium* sp. oil by using immobilized isolated novel *Bacillus* sp. lipase [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117(1): 86-91.
- [9] Bajaj A, Lohan P, Jha P N, *et al.* Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2010, 62(1): 9-14.
- [10] 张桐栋, 刘永梅, 束海永, 等. 酯酶催化法合成结构化磷脂的研究进展 [J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(12): 5-7. ■