

生物酶法制备生物柴油研究现状及展望

陈新, 里伟, 杜伟, 刘德华, 丁富新
(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要:就生物酶法制备生物柴油的研究现状进行了扼要的综述,探讨了固定化脂肪酶法、液体酶法和全细胞催化法制备生物柴油应用基础研究的进展及发展前景,指出影响生物酶法生产生物柴油产业化的因素及解决措施。

关键词:生物柴油;生物酶法;固定化脂肪酶法;液体脂肪酶法;全细胞催化法

中图分类号:TQ033;TK6

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2007)08-0023-03

Research status of biodiesel production by bio-enzymatic method and its prospect

CHEN Xin, LI Wei, DU Wei, LIU De-hua, DING Fu-xin

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In this paper, the research status of biodiesel production with lipases as catalysts is briefly reviewed, the advances and prospect of three biocatalytic technologies for biodiesel production including immobilized lipase, liquid-lipase and whole-cell catalysis, are discussed. The influences on the industrialization of bio-enzymatic method for biodiesel production are pointed out, and some effective measures are put forward.

Key words: biodiesel; biocatalysis; immobilized-lipase; liquid-lipase; whole-cell catalysis

随着世界石油资源的消耗和日益严重的环境污染,开发绿色可再生能源成为人类摆脱能源匮乏和环境污染困扰而势在必行的重要举措。生物柴油是可再生能源,具备良好的环境友好性,可生物降解,与传统的化石柴油相比,由于生物柴油氧含量高而燃烧充分,毒害物排放量低而释放较少的颗粒、二氧化碳、硫氧化物、碳氢化合物、烟尘等,因此全世界掀起了研究生物柴油的热潮。自生物柴油发展伊始,生产生物柴油的方法就相继面世^[1]。本文就生物酶法制备生物柴油应用基础研究的现状进行简要的综述。

1 制备方法

生物柴油制备方法见图 1。

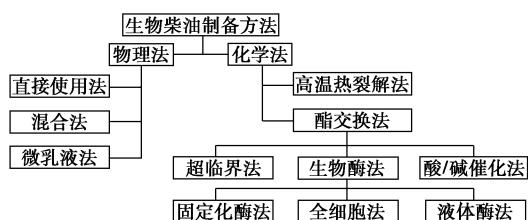


图 1 生物柴油制备方法示意图

1.1 固定化脂肪酶法

1.1.1 特点

利用固定化脂肪酶催化制备生物柴油是非水酶

学理论应用于实践的典型实例,也正因为如此,固定化脂肪酶催化制备生物柴油具备非水介质中酶催化的优势^[2]:可防止冻干的酶粉在反应过程中发生聚集从而增大酶与底物的接触面积;产物容易纯化;有利于酶的回收和连续化生产;酶的热稳定性及对甲醇等短链醇的耐受性显著提高;利用溶剂工程可提高酶与底物油脂、甲醇的接触频率,从而提高反应速率等。

1.1.2 影响因素

不同的固定化形式、反应介质体系、酰基受体及添加策略均会对酶活力、酶对甲醇的耐受性等有着显著的影响。

(1)不同的固定化形式。脂肪酶采用不同的固定化形式对酶活力、酶对甲醇的耐受性等有着显著的影响。Mamoru Iso 等^[3]以多孔高岭石 (Toyonite 200-M) 为载体固定化 *Pseudomonas fluorescens* 脂肪酶催化甘油三油酸酯醇解制备生物柴油,实验表明,固定化酶活性比游离酶的高。Hsu 等^[4]用凝胶包埋的方式固定化 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶,生物柴油得率可达 95%,脂肪酶可回用 5 次。邓利等^[5]以硅藻土和纺织品为载体固定化拥有自主知识产权的高产菌种生产的假丝酵母 99-125 脂肪酶后,硬脂酸与甲醇的酯化率可达 95%;间歇催化油酸与甲醇酯化

收稿日期:2007-04-27

作者简介:陈新(1976-),男,博士生;刘德华(1962-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事天然可再生资源综合利用的研究,通讯联系人,010-62794742, dhliu@mail.tsinghua.edu.cn.

时,可重复使用 15 批次(每批次 24 h),其操作半衰期约为 360 h。继而又将假丝酵母 99-125 脂肪酶固定在非极性树脂 NKA 载体上,单批转化率最高达 97.3%,连续反应 19 批次以后转化率仍保持为 70.2%。

(2)不同的反应介质体系。不同的反应介质体系对于固定化脂肪酶催化制备生物柴油的得率有着显著的影响,有机溶剂介质体系中脂肪酶催化制备生物柴油得率较高的可能原因主要有:①有机介质使底物更好的溶解,因此与酶的接触面积增大。Nelson 等^[6]在利用固定化 *R. miehei* 脂肪酶催化油脂与甲醇的转酯反应时发现,有机溶剂体系的反应效果要明显优于无溶剂体系:在无溶剂体系中,生物柴油得率只能达到 19.4%,而在正己烷体系中,生物柴油得率可达 94% 以上。Mittelbach 等^[7]分别在石油醚和无溶剂体系中使用 *P. fluorescens* 脂肪酶催化葵花油的甲醇醇解反应,结果发现,石油醚体系中的产物得率(79%)要远高于无溶剂体系(3%)。Soumanou 等^[8]研究了不同有机溶剂对脂肪酶催化葵花籽油醇解反应的影响,在正己烷和石油醚等非极性溶剂中生物柴油得率最高(80%),而在极性溶剂如丙酮中,生物柴油得率只有 20%。②有机介质促使脂肪酶发生界面活化而提高了酶活力。Nabil Miled 等^[9]分别以叔丁醇、二氧杂环己烷、甲酰胺、乙腈为介质体系,测定胰脂肪酶水解三丙酸甘油酯的比活力。实验发现,胰脂肪酶在叔丁醇中的比活力明显高于在二氧杂环己烷、乙腈、甲酰胺中的比活力。Nabil Miled 等认为这是由于与水互溶且介电常数较低的叔丁醇的存在而引起了胰脂肪酶界面活化效应,即促进了遮住胰脂肪酶活性部位的盖子打开,使得胰脂肪酶的活性部位暴露出来,继而以 ELISA 证实了在叔丁醇、胆汁盐等介质体系中发生的胰脂肪酶界面活化效应。正是由于在叔丁醇、胆汁盐等介质体系中盖子结构域发生复杂的构象改变使活性位点暴露而遮住了单克隆抗体(mAb248-31)的抗原结合位点。笔者所在实验室在以叔丁醇为反应介质的体系中使用 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435(丹麦 Novo Industries 公司生产)催化菜籽油制备生物柴油,生物柴油得率可达 95%,并且可重复使用 200 批次(每批次 12 h),从而使固定化脂肪酶的成本显著降低^[10]。

(3)不同的酰基受体及添加策略。大量的研究表明,甲醇、乙醇等短链醇因剥夺脂肪酶的必需水而破坏维持蛋白功能构象的氢键体系,从而使酶活性

降低或失去活性。Shimada 等^[11-14]研究发现,在油脂醇解体系中,甲醇难溶于油脂,局部甲醇浓度过高导致脂肪酶失活,从而提出分步甲醇解的工艺。利用固定化 *C. antarctica* 脂肪酶催化大豆油的三步甲醇解,甲醇分 3 次等摩尔加入,最终可以得到得率为 95% 以上的生物柴油。Bélafi-bakó 等^[15]采用连续流加甲醇的工艺,利用固定化 *Candida antarctica* 脂肪酶催化葵花籽油的甲醇解,生物柴油得率最高可达 97%。华南理工大学宗敏华等^[16]采用 3~4 级固定床反应器进行连续转酯反应,分批(3~4 次)流加甲醇,减小甲醇对脂肪酶的毒害,提高生物柴油得率,同时在线分离副产物甘油,减少甘油对反应体系的副作用。

笔者所在实验室^[17]针对传统酶法工艺中以甲醇作为酰基受体,过高的甲醇浓度会导致脂肪酶的严重失活,甲醇必须分步加入且醇解反应的副产物(甘油)容易吸附在固定化酶表面从而导致酶活性下降的现状,开发了采用新型酰基受体乙酸甲酯制备生物柴油的工艺,其单程得率可达 90% 以上,并且底物乙酸甲酯对脂肪酶没有毒害作用,乙酸甲酯可以一次性加入,副产物三乙酸甘油酯对脂肪酶的催化活性没有明显的负面影响,因此脂肪酶不需要经过任何处理就可直接回用,且在回用过程中表现出了很好的稳定性。

1.2 液体脂肪酶法

早在 20 世纪 70 年代许多研究者发现,在油水界面上脂肪酶催化反应速率较快,A. M. Brzozowski 等^[18]以原创性的实验解释了在油水界面催化反应速率较快的原因,即界面活化效应。一般而言,脂肪酶活性位点为一个盖子所罩住,所谓界面活化是指此盖子的打开使催化活性位点暴露出来。他们将酶与其不可逆的抑制物结合后结晶,通过 X 射线衍射解析其结构发现:不可逆抑制物与酶结合部位的疏水性表面积增加,从而推断界面活化而引起活性位点的暴露。

液体脂肪酶通过催化双相(油相/水相)体系界面的转酯/酯化反应而制备生物柴油。基于双相体系、油水界面活化效应的特点,液体酶法催化制备生物柴油的反应速率较快,不受底物、产物的扩散限制,产物、副产物易分离。另外,液体脂肪酶生产工艺简单,成本低廉。

目前关于液体酶法催化生物柴油的研究还未见报道。笔者所在实验室与丹麦诺维信(Novozymes)公司合作对液体酶法催化制备生物柴油进行了初步

的应用研究,实验结果表明,单批次反应 8 h(蠕动泵恒速流加甲醇)生物柴油得率接近 100%,酶的重复利用研究正在进行中。

由于甲醇的积累毒害作用,维持液体脂肪酶功能构象的氢键体系逐渐被破坏,酶活力随着反应时间的延长而降低或者消失。Yan Ming 等^[19]对辣根过氧化物酶进行化学修饰及原位聚合而制成纳米酶制剂,显著地提高了辣根过氧化物酶热稳定性和有机溶剂(甲醇、二氧杂环己烷等)的耐受性。因此通过化学修饰或蛋白质工程等手段提高酶对甲醇耐受性的研究可望成为热点。

1.3 全细胞法

国内外利用微生物胞内脂肪酶催化合成生物柴油的报道还不多。目前的报道主要来自日本 Kobe 大学的化学科学和工程实验室^[20-22],Kazuhiro 等人将根霉菌 *Rhizopus oryzae* 固定在聚氨酯泡沫体颗粒上,为了避免过量甲醇对脂肪酶及细胞带来的毒害,采用分 3 步加入甲醇的方式。当反应体系中含有质量分数为 15% 的水时,甲酯得率可以高达 90%。为了提高 *R. oryzae* IFO4697 的回用稳定性,Kazuhiro 等人还考察了戊二醛交联处理对固定化米根霉细胞脂肪酶活性的影响。用质量分数为 0.1% 的戊二醛溶液处理后,经过 6 次回用,胞内脂肪酶的活性并没有明显的下降。同时还发现利用不同的脂肪酸作为碳源,细胞膜的脂肪酸组成不同,细胞催化剂的催化活性和稳定性也不同,饱和脂肪酸有利于提高细胞膜的通透性,使酶催化活性提高,而饱和脂肪酸有利于提高细胞的刚性,使酶稳定性提高。

笔者所在实验室以聚氨酯泡沫为载体固定 *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) IFO4697 全细胞在叔丁醇介质体系中催化制备生物柴油,研究发现其回用稳定性得到显著提高,而且原料油脂中游离脂肪酸、水分、磷脂等成分对其催化性能及回用稳定性无明显影响。

直接利用微生物胞内脂肪酶作为催化剂利于反应后产物的分离及细胞的回用,但存在传质阻力的问题。因为在脂肪酶不泄漏到胞外的情况下,反应底物需要通过细胞壁进入细胞内与酶结合,因此细胞的通透性是影响传质阻力的主要因素。Matsumoto 等^[23]构建高表达米根霉脂肪酶的菌株酿酒酵母 MT8-1,采用冻融和风干的方法来增强细胞的通透性,生物柴油得率可达 71%。Matsumoto 等^[24]还利用基因工程表面展示技术将脂肪酶重组蛋白表达在细胞表面催化合成生物柴油,反应 72 h 甲酯得率达

到 78.3%。

2 展望

随着能源危机和环境污染的加剧,开发绿色的可再生能源是人类摆脱此窘境的蹊径。生物酶法催化制备生物柴油反应条件温和,无污染物排放,符合绿色化学发展的方向,但脂肪酶生产成本高,酶易失活,使用寿命短等成为其产业化的瓶颈。相信通过非水酶学与化学、生物学、微生物学、分子生物学等学科的有机结合,生物酶法制备生物柴油的上述问题有望得到解决。

参考文献

- [1] Fangrui M, Milford A H. Biodiesel production: A review[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70: 11 - 15.
- [2] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 203 - 204.
- [3] Iso M, Chen B X, Eguchi M, et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 16(1): 53 - 58.
- [4] Hsu A F, Jones K, Marmer W N, et al. Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2001, 78(6): 585 - 588.
- [5] 邓利, 刘柳, 董贤, 等. 固定化假丝酵母 992125 脂肪酶催化酯化脂肪酸低碳醇酯反应条件的研究[J]. *现代化工*, 2002, 22(9): 30 - 33.
- [6] Nelson L A, Foglia T A, Marmer W N. Lipase-catalyzed production of biodiesel[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1996, 73(8): 1191 - 1195.
- [7] Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1990, 67(3): 168 - 170.
- [8] Soumanou M M, Bornscheuer U T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(1): 97 - 103.
- [9] Nabil M, Alain D C, Josiane D C, et al. A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1476: 165 - 172.
- [10] Li Lilin, Du Wei, Liu Dehua, et al. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43: 58 - 62.
- [11] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1999, 76(7): 789 - 793.
- [12] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, et al. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2000, 77(4): 355 - 360.

(下转第 29 页)

括3个子过程,即燃气净化过程、再生过程和冷却过程。

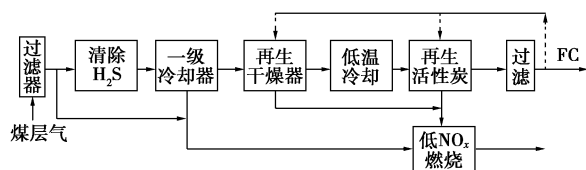


图2 燃料电池预处理过程

从本质上说,燃料电池是一个固态发电机,能把经过处理的燃料(煤层气)的化学能转化成电能和热能,主要包括3个单元:燃料处理单元、发电单元和电流转换单元。燃料处理单元主要用于将含高浓度甲烷的煤层气转化成富氢燃料,然后和来自空气中的氧在催化剂作用下在发电单元中发生电化学反应,产生直流电;未反应的燃料连同回热中的水蒸气重新循环到燃料处理单元。电流转换单元是把燃料电池产生的直流电转换成交流电,连同发电单元中产生的热量提供给用户。然而,燃料电池面临的主要问题是使用寿命短、造价高。目前认为,只要燃料电池的寿命达到4万h,造价在1500~2000美元/kW(对于500k~2MW),即比常规发电费用高出5倍左右就可走向工业化。在达到大规模商业化之前,还必须克服一些技术上的障碍。在此过程中,只有不断地深化基础研究,才能克服燃料电池工业化

过程中遇到的障碍。

4 结语与建议

(1)煤层气是一个技术密集型的能源产业,其商业化应用刚刚起步,它的资源估算存在重大基础问题没有解决,并且,由于煤层气开采的前1~4年产量较小,投资回收期较长,同时,我国政府对煤层气开发利用政策扶持力度不够、基础管网薄弱、市场机制不完善,使得我国煤层气的产业化步伐明显落后于国外;

(2)煤层气用于燃料具有稳定的经济效益,但要解决输送管网问题;

(3)煤层气用于发电具有就地转化,运输方便的特点;

(4)煤层气用于生产炭黑并联合产甲醇经济效益可观;

(5)煤层气的利用刚刚起步,许多工程衔接与经济技术评估还有待完善。

参考文献

(上接第25页)

- [13] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2001, 78(7): 703 - 707.
- [14] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/4/5): 133 - 142.
- [15] Bélafi-bakó K, Kovács F, Gubicza L, *et al.* Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2002, 20(6): 437 - 439.
- [16] 华南理工大学. 生物催化油脂转酯生产生物柴油的方法: CN, 03114294. X[P]. 2003 - 04 - 24.
- [17] 徐圆圆. 脂肪酶催化合成生物柴油新方法及其酶催化特性的研究 [D]. 北京: 清华大学, 2005.
- [18] Brzozowski A M, Derewenda U, Derewenda S Z, *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex[J]. *Nature*, 1991, 351: 491 - 494.
- [19] Yan Ming, Ge Jun, Liu Zheng, *et al.* Encapsulation of single enzyme in nanogel with enhanced biocatalytic activity and stability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128: 11008 - 11009.
- [20] Kazuhiro B, Masaru K, Takeshi M, *et al.* Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8: 39 - 43.
- [21] Kazuhiro B, Shinji H, Keiko N, *et al.* Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17: 157 - 165.
- [22] Hama S, Yamai H, Kaieda M, *et al.* Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21(2): 155 - 160.
- [23] Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, *et al.* Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus Oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(4): 515 - 520.
- [24] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, *et al.* Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the flo1p flocculation functional domain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4517 - 4522. ■