

全细胞生物催化麻疯树油 制备生物柴油的研究

李 迅¹, 李治林¹, 何晓云¹, 王 飞¹, 蒋剑春²

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037;

2. 中国林业科学院林产化学工业研究所, 江苏 南京 210037)

摘要:利用石油醚直接浸提法抽提得到含油率达到 55.84% 的麻疯树籽油作为原料, 采用米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 菌株和聚氨酯泡沫制备成固定化全细胞生物催化剂, 通过对全细胞生物催化法制备生物柴油的主要工艺参数进行了优化, 获得最佳工艺条件为: 当甲酯化反应的醇油比为 6:1, 转酯化温度为 35℃, 转酯化体系中 2% ~ 20% 质量分数的含水率, 菌体量相当于油质量的 4%, 每 12 h 加入一次甲醇的条件下转酯化效果最好, 甲酯得率达到 82.29%。同时固定化全细胞生物催化剂的重复使用性达 4 次, 具有较高的催化性能。

关键词:米根霉; 麻疯树油; 全细胞生物催化; 生物柴油

中图分类号: S216.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)09-0057-03

Study on producing biodiesel fuel from *Jatropha Curcas* oil sources catalized by whole cell biocatalyst

LI Xun¹, LI Zhi-lin¹, HE Xiao-yun¹, WANG Fei¹, JIANG Jian-chun²

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. Institute of Chemistry and Industry of Forest Products, Nanjing 210037, China)

Abstract: The *Jatropha curcas* oil is extracted from *Jatropha curcas* seeds by petroleum ether with an oil-bearing rate reaching up to 55.84%. The immobilized *Rhizopus oryzae* cells as whole cell catalyst are used to catalyze transesterification of *Jatropha curcas* oil. Effects of different transesterification parameters on the cell growth and whole cell catalyzed transesterification of *Jatropha curcas* oils for biodiesel production are studied and gotten as follows: when the ratio of methanol to *Jatropha curcas* oil is 6:1 in the presence of 2% - 20% of water (w/w) and 4% of whole cell catalyst (w/w) at 35℃, the maximum methyl ester yield can reach 82.92%. The activity of whole cells catalyst shows a methyl ester yield of 53% at the forth batch cycle.

Key words: *Rhizopus oryzae*; *Jatropha curcas* oil; whole cell catalyst; biodiesel

在生物柴油的工业化生产中, 使用全细胞生物催化剂的方法可能是最有前途的。细胞中的脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3) 不仅能催化底物天然油脂水解, 也能在非水相中催化酯合成、转酯化等反应^[1-5], 此法提取简单、反应条件温和、醇用量小、甘油易回收和无废物产生, 还能进一步合成其他一些高价值的产品, 包括可生物降解的润滑剂以及燃料添加剂^[6]。米根霉所产脂肪酶具有较好的立体选择性、较高的转化率和稳定性等优点, 是全细胞法和酶法生产生物柴油的主要菌种之一^[7]。麻疯树含油量在 50% 以上^[8-9], 具有很大的原料成本优势。迄今尚未见有针对生物柴油生产用全细胞生物催化法转酯化麻疯树油制备生物柴油的报道, 笔者以石油醚为溶剂

从麻疯树籽中提取出麻疯树油, 将米根霉菌株制备成固定化全细胞生物催化剂, 对催化麻疯树油转酯化制备生物柴油的工艺条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 主要试剂和培养基

米根霉 (*Rhizopus Oryzae*), 由本实验室筛选保存。制备生物柴油用原料为食用大豆油 (上海福临门食品有限公司) 和本实验室制备的麻疯树油, 固定化材料为聚氨酯树脂 (市售), 其他如甲醇、石油醚、橄榄油 (国药集团化学试剂有限公司) 等试剂均为分析纯。

斜面 and 种子培养基: PDA 培养基^[10]。发酵培养

收稿日期: 2008-06-20

基金项目: 国家“948”引进创新项目 (2006-4-C05); 南林大高学历人才基金 (163030024)

作者简介: 李迅 (1975-), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物转化方面的研究, 025-85427635, xunlee@njfu.com.cn; 王飞 (1962-), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物化学、生物质能源与生物质化学品方面的研究, 通讯联系人, 025-85427635, feiwang@njfu.com.cn。

基(质量分数):胰蛋白胨 2%,麻疯树籽油 0.3%, NaNO_3 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%,初始 pH 5.5。

1.2 脂肪酶活力测定

脂肪酶的水解酶活力测定使用橄榄油乳化液法^[11]。在测定条件下,每分钟催化脂肪水解产生 1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量定义为 1 个脂肪酶水解酶活单位。

1.3 麻疯树籽油的抽提和理化分析

采用石油醚直接浸提法抽提麻疯树籽油。粉碎好的麻疯树籽仁,加入适量石油醚,使其充分接触混匀,放到 75℃ 恒温水浴锅加热 4 h,真空抽滤,旋转蒸发,即可得到麻疯树籽油。重复浸提 2~3 次,将油完全提出。重复操作,直至提到所需量的麻疯树籽毛油。取麻疯树籽毛油,加入适量磷酸,在 65℃ 恒温水浴锅搅拌加热 15 min,再加入适量水,继续搅拌 30 min,再加入适量 NaOH,升温至 80℃ 后停止搅拌,保温 1 h,蒸馏水洗涤,离心后取上层油液继续水洗离心 2 次,弃下层含水杂质。

麻疯树籽油皂化值的测定:称取样品 2.0000 g,加入 0.5 mol/L KOH 的乙醇溶液 50 mL,然后装上回流冷凝管,置于水浴上维持微沸状态 1 h。取下后加入酚酞指示剂 6~10 滴,趁热用盐酸标准溶液滴定至红色恰好消失为止。同时在相同条件下做空白试验。

麻疯树籽油酸值的测定:称取样品 1.0000 g,加入乙醇约 70 mL,加热使其溶解。后加入酚酞指示剂 6~10 滴,立刻以 KOH 标准溶液滴定至微红色,并能维持 30 s 不褪色即为终点。

麻疯树籽油脂肪酸组成分析:麻疯树籽油经过碱催化甲酯化后,进行气质联用(GC-MS)分析,分析条件为 DB-5 毛细管柱,FID 检测器,载气为 N_2 ,进样口温度 250℃,检测器温度 260℃,程序升温 180~280℃,升温速度 2℃/min。

1.4 固定化全细胞催化剂的制备

将聚氨酯树脂泡沫剪成 5 mm×5 mm×5 mm 的立方体,用蒸馏水浸泡漂洗多次,121℃ 下高压蒸汽灭菌 2 次,取出后干燥备用。发酵培养基中加入适量上述预处理后的聚氨酯树脂泡沫,在 121℃ 下灭菌 20 min。以聚氨酯泡沫固定米根霉细胞,在 28℃ 180 r/min 培养 2 天,抽滤,经冷冻干燥后,称重备用。

1.5 麻疯树籽油转酯化制备生物柴油的条件优化

在 50 mL 具塞三角瓶中,将固定米根霉细胞的聚氨酯泡沫分别放入 28.95 g 麻疯树籽油、1.05 n g

(摩尔比为 $n:1$) 甲醇中和适量水的体系中,在一定温度下,160 r/min 摇床上反应,定期加入甲醇,进行酯交换反应制备生物柴油。分别探讨了甲酯化反应的醇油比、温度、含水率、菌体量和加入甲醇的适宜间隔时间、以及固定化载体的重复使用性。

产物脂肪酸甲酯含量的测定采用气相色谱法分析,以十七烷酸甲酯作为内标,用岛津 GC-14B 气相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 麻疯树籽油的性质

所用原料麻疯树籽的含水率,经测定为种子 6.36%、壳 9.46%、仁 4.2%。抽提得到的麻疯树籽毛油的含油率为 55.84%,皂化值(以 KOH 计,下同)为 $\text{SV} = 186.55 \text{ mg/g}$,酸值 8.25 mg/g,平均分子质量为 943.91 g/mol。通过精制得到的麻疯树籽精油皂化值为 $\text{SV} = 189.85 \text{ mg/g}$,酸值为 0.99 mg/g,平均分子质量为 891.14 g/mol。麻疯树籽油所含脂肪酸主要有棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸和亚油酸,其中棕榈油酸相对含量较少。

2.2 麻疯树籽毛油和精制油对转酯化反应的影响

分别取麻疯树籽毛油和精制油作为反应底物,在相同条件下(醇油比为 3:1),利用全细胞催化剂进行转酯化反应,结果显示麻疯树籽毛油和精制油作为反应底物的甲酯得率相近,分别为 53.64% 和 53.28%。这进一步说明了全细胞生物催化法特别适用于游离脂肪酸含量高的油品。从节约成本和催化效果来看,毛油无需经过精制就可直接应用此法制备生物柴油。以下实验均直接以粗麻疯树籽油作为反应原料。

2.3 转酯化最适宜的醇/油比

为防止催化剂中毒,采用了分批加入甲醇的方法。笔者探讨了不同醇油比甲酯化的得率以确定转酯化的反应周期。理论上完全酯化 1 mol 脂肪酸甘油三酯,需要 3 mol 甲醇,实验从理论值所需的醇油比开始探讨。结果显示,当醇油比达 6:1 时,甲酯得率为 76.11%,甲酯化得率趋于稳定。继续添加甲醇,转酯化得率没有上升,反而略微下降,过量甲醇造成催化剂中毒,还造成浪费和污染。所以最佳醇油比确定为 6:1。

2.4 转酯化最适宜温度

米根霉脂肪酶在 35℃ 时活力最高,在 25~40℃ 内也可保持较高活力。笔者探讨了 25、30、35、40℃ 下的转酯化反应,结果见图 1。所以确定最适宜的

转酯化反应温度为 35℃。

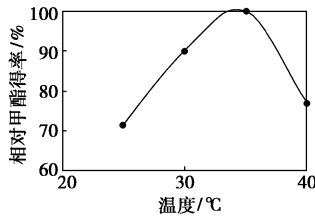


图1 温度对甲酯化反应的影响

2.5 转酯化适宜的含水率

生物法转酯化反应中水作为溶剂,有利溶解加入的甲醇和转酯化反应中产生的甘油,减少催化剂的中毒。不同含水率对转酯化的影响,结果见图2,2%~20%(质量分数)的含水率时,甲酯得率能稳定在90%以上,说明这种全细胞生物催化剂具有很强的原料适应性,含水率适应范围广。

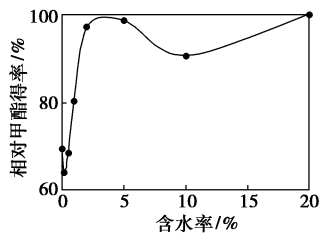


图2 含水率对甲酯化反应的影响

2.6 转酯化适宜的催化剂用量

图3表明麻疯树籽油甲酯化的得率随菌体量增加呈上升的趋势。当菌体量相当于油质量的4%时,呈最佳结果。如果继续增大催化剂用量,不仅造成回收困难,且转酯化得率升高空间不大,故确定最佳菌体量为4%。

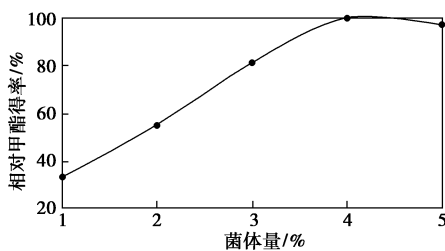


图3 菌体量对甲酯化反应的影响

2.7 加入甲醇适宜的时间间隔

生物法制备生物柴油的反应周期比化学法的更长。采用分批加入甲醇,为了确定加入甲醇适宜间隔时间,每隔2h取样分析,直至甲酯反应稳定,再加入下一批甲醇,这样可以确定反应周期。每隔2h取样分析结果见图4,结果表明加入甲醇后,麻疯树籽油转酯化得率逐渐升高,当加入甲醇12h左

右,甲酯得率趋于稳定,所以分批加入甲醇最适宜间隔时间为12h。

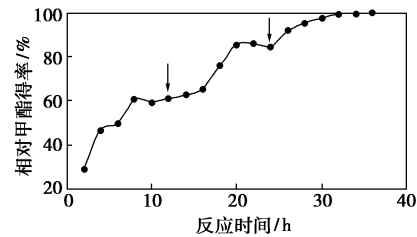


图4 反应时间对甲酯化反应的影响

根据单因素实验的结果,反应在温度35℃、醇油比6:1、含水率为5%、菌体量为4%的条件下,每隔12h分批加入甲醇,优化后的甲酯得率比优化前提高了5%~6%,达到82.92%,基本与大豆油为原料的转酯化水平相当。

2.8 固定化细胞催化剂的重复使用性

检验固定化细胞催化剂使用寿命,进行重复反应,结果见图5,重复反应2次,相对甲酯得率都在95%以上,基本没有下降。重复第3次以后,甲酯得率开始快速下降,重复到第5次,甲酯得率很低,催化剂基本失活。每一次重复反应周期为3天,催化剂可以重复4次。催化剂使用寿命为12d,相对甲酯得率为65%。

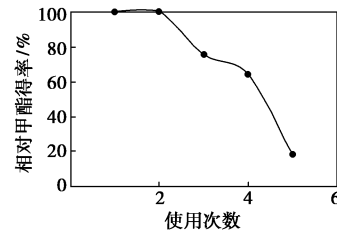


图5 固定化细胞生物催化剂的重复催化性能

3 结语

采用麻疯树籽作为起始原料,以石油醚为溶剂抽提麻疯树籽油,毛油无需经过精制就可直接应用于全细胞生物催化法制备生物柴油。用聚氨酯泡沫固定化米根霉细胞制备成全细胞生物催化剂,在麻疯树籽油和甲醇的反应体系中催化合成生物柴油,探索适用于全细胞生物催化麻疯树籽油制备生物柴油的工艺条件。该工艺催化剂具有较高性能,原料成本较低,操作的连续性也基本令人满意。

参考文献

- [1] Jaeger K E, Eggert T. Lipase for biotechnology[J]. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13: 390 - 397.

1 实验部分

1.1 主要原料与仪器

聚乙烯醇(PVA),聚合度 1750 ± 50 ,醇解度 $\geq 97\%$,上海精析化工科技有限公司; Fe_3O_4 粉末,化学纯,国药集团化学试剂有限公司。

D3-200型低温实验箱,天津市庆达实验仪器制造有限公司;D8 focus型XRD衍射仪,德国布鲁克公司;SHT-V型特斯拉计,沈阳汇博思宾尼斯传感技术有限公司;FEI Quanta 200型扫描电子显微镜,美国FEI公司。

1.2 Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶的制备

按水和PVA的失量比 $m(\text{H}_2\text{O}):m(\text{PVA})=1:5$ 称取PVA颗粒试剂,量取蒸馏水。把PVA和水置于烧杯中在搅拌条件下加热至 $80 \sim 90^\circ\text{C}$ 直到PVA完全溶解,得到PVA溶液。根据所用PVA的质量,按不同质量比例(Fe_3O_4 /PVA + Fe_3O_4 质量比)称取 Fe_3O_4 粉末,将所称得的 Fe_3O_4 粉末(D_{50} 为 $2.92 \mu\text{m}$)加入到上述PVA溶液中进行混合,得到 Fe_3O_4 /PVA混合溶液。将混合溶液注入到内径 5.2 mm 左右的圆柱形玻璃管内,对装有混合溶液的玻璃管进行封口,然后放置于 -20°C 的冰箱内冷冻 24 h ,将样品取出在室温下解冻 2 h ,这称为一次冻融(freeze-thaw)循环。如此得到经一次冻融的 Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶。实验中对不同 Fe_3O_4 含量的 Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶分别制备8个试样备用。

1.3 测试与表征

对纯PVA水凝胶进行X射线衍射扫描并对纯PVA水凝胶结晶性能分析。采用SEM对 Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶的断面进行形貌分析,具体分析磁性

Fe_3O_4 粒子与PVA中的结合及磁性 Fe_3O_4 粒子在PVA中的分散均匀情况。通过电磁铁磁力对同含量、不同冻融次数和同冷冻次数、不同含量磁性水凝胶进行磁滞伸缩测试。

Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶的磁场阈值测量:固定磁性水凝胶两端,将磁铁缓慢移向磁性水凝胶,磁性水凝胶在磁铁的吸引下每移动 1 mm 用特斯拉计记录一次磁场强度,直至磁性水凝胶中心突然并快速跳向磁铁为止。

对同冻融次数、不同 Fe_3O_4 含量及不同冻融次数、同 Fe_3O_4 含量的 Fe_3O_4 /PVA磁性水凝胶进行磁性能测试。试样均带水测试,扫描速度为 2000 e/sec ($1 \text{ Oe} = 79.6 \text{ A/m}$)。

2 结果与讨论

2.1 磁性水凝胶的形貌结构

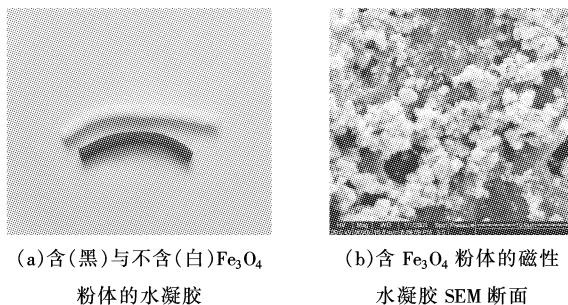


图1 水凝胶样品及SEM断面形貌(放大5000倍)

图1为不含 Fe_3O_4 粉体的水凝胶和含 Fe_3O_4 粉体的磁性水凝胶照片和含 Fe_3O_4 磁性水凝胶样品SEM断面形貌图。图1(b)中,样品内部呈网状结构交联在一起,从断面可以看到 Fe_3O_4 颗粒在磁性

(上接第59页)

- [2] Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus Oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 8(1): 39 - 43.
- [3] Ban K, Hama S, Nishizuka K, 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(5): 157 - 165.
- [4] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(4): 328 - 333.
- [5] Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells im-

obilized within biomass support particles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007(34): 273 - 278.

- [6] Yasuhisa A, Hideki F, Yuji S, et al. Biofuel production process by novel biocatalysts[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17(3): 111 - 123.
- [7] 颜兴和,王栋,徐岩.根霉脂肪酶的研究进展[J].工业微生物, 2005, 35(3): 45 - 49.
- [8] 李维莉,杨辉,谢金伦.麻疯树属植物化学成分及其生物活性研究进展[J].中药材, 2006, 29(5): 5000 - 5006.
- [9] 陈元雄,毛宗强,吴宗斌,等.麻疯果油料的综合开发利用[J].中国油脂, 2006, 31(3): 63 - 65.
- [10] 无锡轻工大学.微生物学[M].北京:中国轻工业出版社, 1990: 597.
- [11] 李建武,余瑞元,袁明秀,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社, 1994: 311 - 312. ■