

固定酶法生产生物柴油

聂开立 王芳 谭天伟

(北京化工大学生物化工系, 生物加工过程北京市重点实验室, 北京 100029)

摘要:探讨了利用本实验室自制的 *Candida* sp.99-125 脂肪酶转酯化合成生物柴油的过程。深入研究了甲醇对反应的抑制作用, 酶用量、溶剂、底物浓度、反应温度、时间、水含量、pH 值对生物柴油合成的影响, 以及反应中固定化酶的寿命等问题。试验结果表明, 采用最佳转酯化反应条件和分批加入甲醇的工艺条件下, 最高单批转化率可以达到 96%, 固定化酶的使用半衰期可达到 200 h 以上。

关键词:生物柴油; 脂肪酸甲酯; 脂肪酶; 酯交换

中图分类号: TQ225.24

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)09-0035-04

Biodiesel production by immobilized lipase

NIE Kai-li, WANG Fang, TAN Tian-wei

(Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A *Candida* sp.99-125 lipase prepared by the authors was used to catalyze transesterification and was studied with the effects of the methanol toxicity, enzyme amount, solvent, water content, pH, temperature, reaction time and molar ratio of the substrate on the reaction, and the problem about the life-span of the immobilized lipase was involved as well. The results show that the transesterification degree under the optimal parameters and process can reach 96%, and the half-life of the immobilized lipase can be longer than 200 h.

Key words: biodiesel; fatty acid methyl ester; lipase; transesterification

1983 年美国科学家 Graham Quick 首先将亚麻籽油的甲酯用于发动机, 并将可再生的脂肪酸单酯定义为生物柴油 (Biodiesel)^[1-3]。目前生物柴油主要用化学法生产, 即动植物油脂与甲醇在高强度酸或碱催化下制备, 但该法工艺复杂, 醇消耗量大, 产物不易回收, 环境污染大^[4]。利用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, 而低碳醇转化率低, 酶成本高, 酶的寿命短等仍是此类方法需要解决的问题。

目前关于酶法生产生物柴油的报道日益增多^[4-10]。笔者采用本实验室发酵提取的粗酶制剂, 经固定化后作为生物催化剂, 对酶促酯交换反应合成脂肪酸甲酯工艺进行了研究, 经过优化工艺条件,

在采用 3 次流加甲醇的条件下, 利用 15% 的固定化酶 (相当于油的质量分数, 下同) 反应 30 h, 反应体系中甲酯含量达到 96%, 并且固定化酶的使用半衰期可以达到 200 h 以上。

1 实验部分

1.1 物料

甲醇、石油醚 (沸程 60 ~ 90℃)、正庚烷、正己烷、环己烷、三氯甲烷, 北京试剂公司; 大豆色拉油, 福临门牌; 假丝酵母脂肪酶, 由本实验室自制。

固定化脂肪酶采用本实验室研究的固定化方法将 *Candidia* sp.99-125 进行固定化处理, 下文中所指酶用量皆为固定后酶与载体的总质量, 具体方法

收稿日期: 2003-07-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA514030)、国家自然科学基金 (20176002)、国家“十五”攻关项目 (2001BA708B03-08) 及中石化 (202059) 资助项目

作者简介: 聂开立 (1979-), 男, 硕士生; 谭天伟 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 长江学者, 主要从事生物化学工程和酶工程研究, 通讯联系人, 010-64416691, tantw@mail.buct.edu.cn。

见专利(申请号 02117614.0)。酶活力采用橄榄油乳液化水解滴定法测定,1 个酶活力单位(1 U)是指酶在最适作用条件下(在 pH 值为 8,温度为 40℃时),在 1 min 内能转化 1 μmol 底物的酶量,或是转化底物中 1 μmol 的有关基团的酶量。酶的比活力指每克酶蛋白所具有的酶活力。

1.2 实验方法

基本的反应体系含有油、甲醇、正己烷和固定化 *Candidia* sp. 99-125 脂肪酶,在 50 mL 具塞锥形瓶中,40℃ 密闭振荡反应,摇床转速为 170 r/min。

1.3 产物的分析

产物采用气相色谱法分析,利用 GC-14A 气相色谱仪(日本岛津),DB1-ht 毛细管柱(0.25 mm \times 15 m, Agilent),高纯氮作载气,二阶程序升温,柱温由 100℃ 到 300℃,升温速率 10℃/min; 300℃ 到 350℃,升温速率 5℃/min。利用氢火焰离子检测器,检测器温度 375℃,气化室温度 370℃。

2 结果与讨论

2.1 底物抑制作用

甲醇等短链醇对酶等蛋白质有变性作用,通过实验表明,在利用不同油醇摩尔比的物料进行反应时过量的甲醇对脂肪酶催化反应有很强的抑制作用,使酶变性。研究中发现当油醇摩尔比为 1:1 时,反应的转化率为 28.6%(理论转化率为 33.3%),当体系中甲醇含量低于或高于这个比例时转化率都会下降。因此甲醇的底物抑制量为 1 mol 化学计量(实验中为 0.2406 mL,醇油摩尔比为 1:1)。

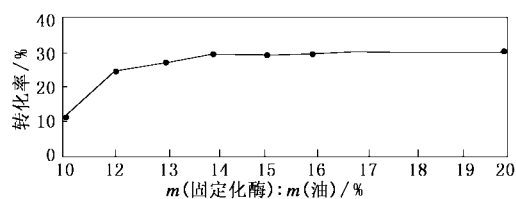
表 1 不同醇油摩尔比对反应的影响

醇油摩尔比	5:1	3:1	2:1	3:2	1.3:1	1.2:1
转化率/%	4.4	4.5	5.0	6.6	7.4	15.7
醇油摩尔比	1.1:1	1:1	1:1.5	1:2.0	1:3.0	
转化率/%	24.6	28.6	23.0	16.5	10.8	

注:2 g 色拉油,0.3 g 固定化脂肪酶,40℃ 下反应 10 h。

2.2 酶用量对反应的影响

在实验中分别加入不同质量的固定化酶反应,图 1 结果表明当使用 2 g 色拉油同等摩尔(93 μL)的甲醇反应 10 h 时,固定化酶的用量(相对于油的质量分数,下同)达到 15% 后即使再增加酶的用量,反应转化率也没有明显的提高。此时固定化酶活为 18 kU/g。

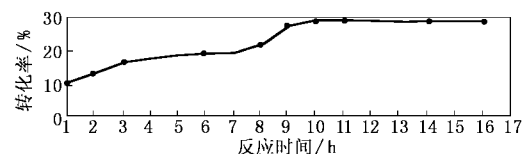


2 g 色拉油,93 μL 甲醇,油醇摩尔比为 1:1,40℃ 下反应 10 h

图 1 固定化酶用量对反应的影响

2.3 反应时间的确定

此反应为平衡反应,图 2 结果表明,当利用 15% 的固定化酶催化反应时,当油醇摩尔比为 1:1 时,反应 10 h 后,转化率几乎不再变化。此时反应转化率为 26.35%(理论转化率为 33.33%)。



2 g 色拉油,93 μL 甲醇,油醇摩尔比为 1:1,0.3 g 固定化脂肪酶,40℃ 下反应

图 2 反应时间对转化率的影响

2.4 溶剂极性以及对底物浓度对反应的影响

对比了不同溶剂对催化反应的影响,使用油醇比为 1:1 的反应体系,在石油醚(馏程 60~90℃)、正庚烷、正己烷、环己烷和三氯甲烷体系中进行酶催化反应(结果见表 2),发现极性小的溶剂有利于反应的进行,且当利用正己烷作溶剂时可使转化率略高于其他溶剂。

表 2 不同极性的溶剂对反应的影响

溶剂	正己烷	正庚烷	环己烷	石油醚	三氯甲烷
转化率/%	27.03	26.10	25.15	23.01	20.09

注:2 g 色拉油,93 μL 甲醇,油醇摩尔比为 1:1,0.3 g 固定化脂肪酶,40℃ 下反应 10 h。

同时也研究了底物浓度对反应转化率的影响,利用 3 次流加甲醇的反应体系按理论油醇摩尔比 1:3 反应(理论转化率为 100%),结果见表 3。发现在无溶剂的情况下反应的转化率比较低,随着溶剂量的增大转化率升高,但是当体系中溶剂量超过 6 mL 时,反应转化率又有所降低。这种现象说明反应体系中加入溶剂后,反应底物的浓度降低,活动空间大,有利于与酶活性中心进行立体定位接触,使反应转化率提高。但是底物浓度稀释到一定的限度之下,不利于反应的进行。

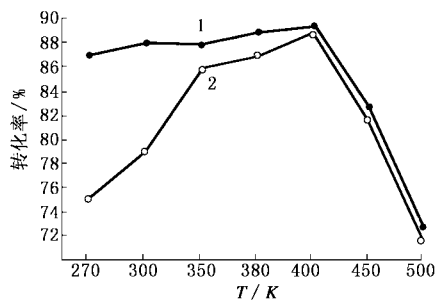
表3 底物浓度对转化率的影响

溶剂体积/mL	0	2	3	4	5	6	8	10
转化率/%	51	78	80	85	88	88	85	80

注:2 g 色拉油,每10 h加入93 μ L 甲醇,总油醇摩尔比为1:3,0.3 g 固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C下反应30 h。

2.5 温度的影响

相对高的温度可以加快反应的速度,但是随温度的升高,甲醇等短链醇对脂肪酶的毒性也增大,固定化酶的使用寿命降低,在相对高的温度下,反应的转化率呈下降趋势,即使增加反应时间也无法增加转化率(见图3)。通过优化选择40 $^{\circ}$ C作为反应温度。

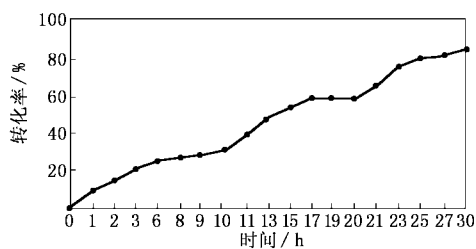


1—每10 h加入93 μ L 甲醇,反应30 h;
2—每20 h加入93 μ L 甲醇,反应60 h
2 g 色拉油,油醇摩尔比为1:3,0.3 g 固定化脂肪酶

图3 温度对转化率的影响

2.6 流加甲醇对反应的影响

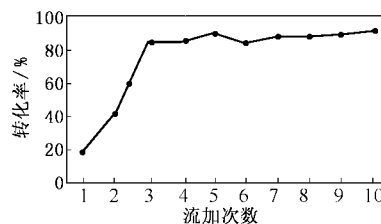
每1 mol 油需要3 mol 的甲醇与其反应(理论转化率100%),然而反应体系中的甲醇不能超过1 mol,否则会对脂肪酶造成不可逆的失活。利用分段添加甲醇的操作使反应可以达到83%左右的转化率:第一步加入1:1的油及甲醇,反应10 h,转化率达到29.5%;再加入同量的甲醇,10 h后转化率达到58.4%;第三次加入同量的甲醇,反应30 h后,总转化率达到82.9%(如图4)。



2 g 色拉油,第0、10、20 h时各加入93 μ L 甲醇,总油醇摩尔比为1:3,0.3 g 固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C下反应30 h

图4 3次流加甲醇的反应进程

研究了总反应时间相同的情况下分不同次数流加甲醇对反应的影响(见图5),发现在流加次数超过3次后,转化率仍然随流加次数的增加有缓慢的升高,当流加次数达到10次时转化率可以达到90.2%,所以连续流加甲醇使酶法连续生产生物柴油成为可能。

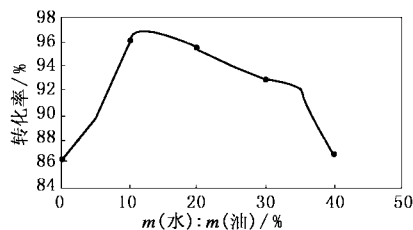


2 g 色拉油,总油醇摩尔比为1:3,0.3 g 固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C下反应总共30 h

图5 流加甲醇的影响

2.7 反应体系中水含量的影响

实验中发现,在反应物料中加入一些水会大大提高反应的转化率(如图6所示)。当反应体系中没有水时,反应转化率只有83%;当加入水量达到油质量的20%时,反应转化率可以达到96%;但是再增加水的比率,反应转化率又开始下降。水的加入可以提高反应的转化率,分析其原因可能有以下3点:①可能是由于水的加入,改变了酶的活性中心的构象,降低了甲醇对酶的毒性;②水的加入,稀释了反应体系中的产物甘油,使反应平衡向正方向移动;③水加入后,油脂会在脂肪酶的催化下发生水解反应,水解生成的脂肪酸又会和甲醇发生酯化反应,致使甲酯由酯化和转酯化两反应同时生成。然而过量的水引起了酶的失活,同时造成固定化酶的脱落引起反应转化率下降。



2 g 色拉油,每10 h加入93 μ L 甲醇,油醇摩尔比为1:3,0.3 g 固定化脂肪酶,40 $^{\circ}$ C下反应30 h

图6 水含量对转化率的影响

2.8 pH值对反应的影响

采用2 g 油在pH值4~9的情况下进行酶反应,表4显示当pH值为7时,反应的转化率最高,可

以达到 96%, pH 值升高或降低时转化率均降低。

表 4 pH 值对反应的影响

pH 值	3	4	5	6	7	8	9
转化率/%	87	94	95	96	97	95	92

注: 2 g 油, 0.4 g 水, 5 mL 正己烷, 每 10 h 添加 93 μ L 甲醇, 总油醇摩尔比为 1:3, 0.3 g 固定化脂肪酶, 40 $^{\circ}$ C 下反应 30 h。

2.9 不同油脂的影响

分别采用豆油、亚麻油、红花油、棕榈油、玉米油和色拉油反应, 表 5 结果显示除棕榈油转化率稍低外, 其余油脂的转化率差别不大, 说明本反应体系适用于大多数油脂。

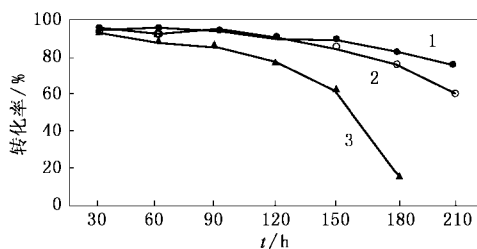
表 5 不同油脂对反应的影响

油的种类	豆油	红花油	亚麻油	玉米油	棕榈油	色拉油
转化率/%	91.99	92.48	91.81	91.99	88.55	92.45

注: 油醇比 1:3, 每 10 h 流加甲醇, 0.3 g 固定化脂肪酶, 40 $^{\circ}$ C 下总反应时间 30 h。

2.10 固定化酶的使用寿命

笔者所选用的固定化载体, 易于回收和反复使用, 制备的固定化酶可以连续使用多次。在 15%、20%、25% 三种水质量分数下采用 2 g 油反应(见图 7), 发现水质量分数为 20% 时固定化酶的使用寿命最长, 半衰期为 200 h 以上反应 180 h 时, 反应转化率下降约 15%, 这是由于水的加入改变了酶的构相, 使甲醇对酶的毒性降低, 增加了酶的使用寿命。但大量的水造成固定化酶脱落, 同时又会使酶失活。

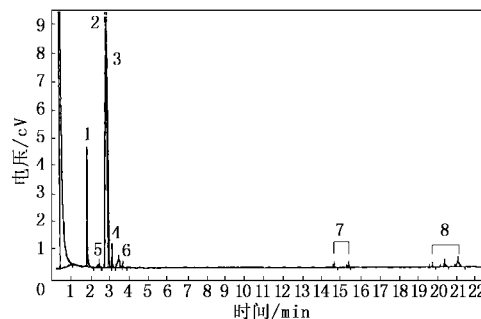


2 g 色拉油, 每 10 h 添加 93 μ L 甲醇, 总油醇摩尔比为 1:3, 0.3 g 固定化脂肪酶, 40 $^{\circ}$ C, 每批反应 30 h
水含量: 1—20%; 2—15%; 3—25%

图 7 不同水含量下固定化酶的寿命

2.11 反应产物分析

产物的气相色谱见图 8。



1—棕榈酸甲酯; 2—油酸甲酯; 3—亚油酸甲酯; 4—硬脂酸甲酯;
5—棕榈酸; 6—油酸、亚油酸混合物; 7—二甘酯; 8—三甘酯

图 8 产物气相色谱分析结果

3 结语

酶法合成生物柴油是一个有潜力的生物催化过程。通过初步试验, 证实了利用笔者所在实验室发酵提取的脂肪酶(*Candida* sp. 99-125) 采用吸附法固定化, 可以用于酯交换反应来制备生物柴油。当采用正己烷作溶剂, 使用 15% 固定化脂肪酶(相对于油的质量, 酶活 18 000 U/g) 加入 20% 质量分数的水, 温度为 40 $^{\circ}$ C 在 pH 值为 7 时, 采用每 10 h 流加 1 mol 当量的甲醇共分 3 次流加, 反应的最高转化率可以达到 96%, 并且固定化酶使用半衰期达 200 h 以上。

参考文献

- [1] Fangrui Ma. [J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70: 1 - 15.
- [2] 忻耀年, 等. [J]. *中国油脂*, 2001, 26(5): 72 - 77.
- [3] 谭天伟, 等. [J]. *现代化工*, 2002, 22(2): 4 - 6.
- [4] Nelson L A, et al. [J]. *JACOS*, 1996, 73(8): 1191 - 1194.
- [5] Yuji Shimada, et al. [J]. *JACOS*, 1999, 76(7): 789 - 792.
- [6] Yoshitsugu Kosugi, et al. [J]. *Biotech and Bioeng*, 1990, 36: 617 - 622.
- [7] Taichi Samukawa, et al. [J]. *J Biosci & Bioeng*, 2000, 90(2): 180 - 183.
- [8] Kamini N R, Lefuji H [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 37(37): 405 - 410.
- [9] Matsumoto T, Takahashi S, et al. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(57): 515 - 520.
- [10] 邓利. [J]. *生物工程学报*, 2003, 18(1): 97 - 101. ■

欢迎订阅《现代化工》合订本!