

固定化脂肪酶催化小桐子毛油合成生物柴油

李俊奎 王 芳 谭天伟 邓 利*

(北京化工大学 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘 要: 研究了以石油醚提取的小桐子毛油和甲醇为原料, 利用固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化反应合成生物柴油的可行性。考察了几种因素对酶法催化合成脂肪酸甲酯的影响。结果表明以小桐子毛油的质量为基准, 在水含量为 10%, 溶剂量为 2 mL/g, 脂肪酶量为 20%, 温度为 40 °C 的条件下, 3 次流加甲醇, 12 h 后单批最高产率可达 93%。在此条件下固定化酶连续使用 14 批, 产率仍然可保持在 70% 以上。

关键词: 生物柴油; 小桐子毛油; 固定化酶

中图分类号: Q814.9

引 言

生物柴油是直接用于石化柴油发动机, 环境友好的清洁能源^[1]。生物柴油生产过程多采用化学法生产, 但由于工艺复杂、醇消耗量大、产物不易回收、环境污染大等缺点, 使其工业推广受到限制。为此人们将目光投向用酶法合成生物柴油, 主要采用动植物油脂与甲醇进行转酯化反应合成脂肪酸甲酯(即生物柴油), 酶法合成生物柴油具有条件温和、醇用量小、无污染物排放等优点, 但低碳醇转化率低、酶成本高、酶的寿命短, 仍是亟待深入研究和解决的问题^[2-4]。

目前各国生产生物柴油的原料各不相同。美国多以大豆油为主, 欧洲以菜籽油为主, 东南亚以棕榈油为主。在我国原料的供应是限制生物柴油发展的关键因素。小桐子油含有毒素, 不能食用, 是生产生物柴油的良好原料。小桐子油是高酸值的油, 用化学催化法工艺非常复杂。Berchmans 等^[5]先用酸做催化剂, 催化酯化反应, 减小酸值, 除去催化剂无机酸后, 再用碱做催化剂, 进行转酯化反应, 反应工艺复杂, 产生大量废水, 污染环境。而生物催化可以将酯化反应和转酯化反应一步进行。

Tamalampudi 等^[6]用自制的固定化细胞 *Rhizopus oryzae* 经过 60 h 的反应转化率可以达到 80%, Novozym435 经过 90 h 的反应转化率可以达到 76%, 两者重复使用 5 个批次, 转化率仍然保持在 70% 以上。Shah 等^[7]将几种商业酶用于小桐子油的催化, 研究发现固定化酶 *Pseudomonas cepacia* lipase 在 50 °C, 水含量 4%~5% 的条件下, 最高转化率为 98%, 经过 4 个批次反应酶活没有明显下降。现有的固定化酶催化小桐子油的寿命较差。

本文利用石油醚萃取工艺得到的小桐子毛油为原料, 利用本实验室自制的固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶^[8]催化甲醇与小桐子毛油反应生成脂肪酸甲酯(FAMES), 研究不同条件下反应的转化率, 探讨了脂肪酶催化小桐子毛油制备生物柴油的可行性。

1 实验部分

1.1 原料和仪器

小桐子, 购于广西; 石油醚、甲醇, 分析纯, 北京化工厂; 固定化脂肪酶, 实验室自制^[8]。

HZQ-X100 型振荡培养箱, 哈尔滨东联电子公司; BL310 型电子天平, 赛多利斯公司; G103 型空气发生器, 北京东西电子研究所; G101 氢气发生器, 北京东西电子研究所。

1.2 小桐子毛油的制备

将 100 g 小桐子粉碎置于 1 L 三口烧瓶中, 加入 400 mL 石油醚, 在 40 °C, 130 r/min 条件下抽提 4 h。在 50 °C 下减压蒸去石油醚, 制得小桐子毛油。小桐子毛油中含脂肪酸 28.3%, 三甘酯 54.7%, 二甘酯

收稿日期: 2009-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(20576013); 国家“863”计划(2006AA020203); 国家“973”计划(2007CB714304)

第一作者: 男, 1983 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: dengli@mail.buct.edu.cn

15.8%, 其他 1.2%。

1.3 摇瓶反应实验方法

在 50 mL 的具塞锥形瓶中, 依次加入 1 g 小桐子毛油和 151.5 μL 甲醇, 采用不同的流加方式, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 密闭条件下 170 r/min, 反应 12 h。在改变不同的反应条件(水含量、溶剂量、脂肪酶的量、温度)下进行实验。

1.4 生物柴油产率计算方法

产物用气相色谱法分析, 采用 GC-2010 型气相色谱仪(日本岛津公司), 毛细管柱(0.25 mm \times 30 m, Agilent), 高纯氮作载气, 二阶程序升温, 柱温 100 ~ 300 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 300 ~ 350 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 利用氢火焰离子检测器, 检测器温度 375 $^{\circ}\text{C}$, 汽化室温度 370 $^{\circ}\text{C}$ 。利用面积归一法计算生物柴油产率(y)。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对生物柴油产率的影响

2.1.1 水含量

图 1 为不同水含量(基于油重的质量比)对生物柴油产率的影响。不同水含量条件下, 脂肪酶催化小桐子毛油生成脂肪酸甲酯的产率有很大差异。不含水时, FAMES 产率只有 41.3%。当水含量增加到 10%, 产率迅速增加到 90.6%。随着水含量的继续增加超过 20%, 产率逐渐降低。这是由于适量的水能够维持酶的活性结构, 而过量的水会在酶活性中心内部形成“水簇”, 改变酶的结构使酶活降低。同时过量的水影响反应平衡, 使反应向逆反应反向进行, 降低了产率。此外过量的水还容易造成固定在载体上的脂肪酶脱落。本研究最适水含量为 10%。

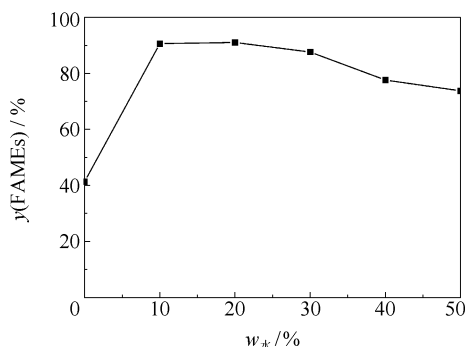


图 1 水含量对生物柴油产率的影响

Fig. 1 Effect of water content on the yield of fatty acid methyl esters

2.1.2 溶剂量

图 2 为溶剂量对生物柴油产率的影响。当石油醚含量增加到 2 mL/g 时, FAMES 产率最高为 93%。随着石油醚含量的继续增大, 产率显著逐渐降低, 当石油醚增加到 8 mL/g 时, 产率降为 26%。在反应体系中加入溶剂后, 反应底物的浓度降低, 与酶接触的表面积增大, 产率有所提高。同时还可以使甲醇更好地分散在溶液中, 使反应更快达到平衡。所以添加适量的溶剂可以提高转化率, 但是过量的溶剂使底物浓度降得太低, 影响了产率。本研究最适石油醚用量为 2 mL/g。

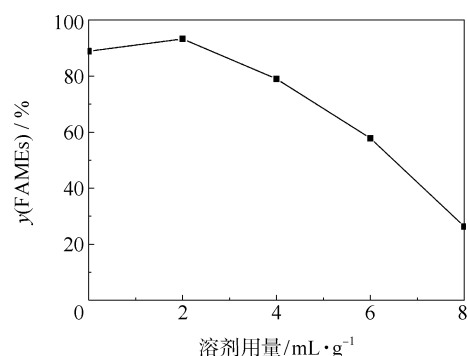


图 2 溶剂量对生物柴油产率的影响

Fig. 2 Effect of solvent content on the yield of fatty acid methyl esters

2.1.3 脂肪酶量

图 3 为脂肪酶用量(基于油重的质量比)对生物柴油产率的影响。当脂肪酶用量增加到 20% 后, 即使再增加酶量, 反应的产率也没有明显提高。从成本考虑选取酶量为 20%, 此时的产率达到 88.3%。

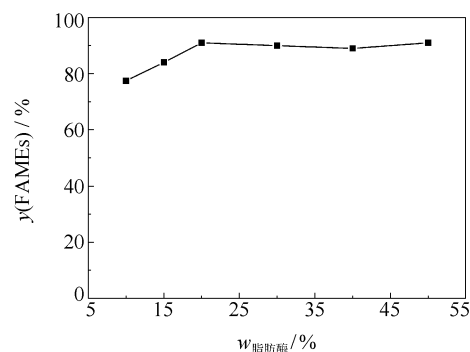


图 3 脂肪酶用量对生物柴油产率的影响

Fig. 3 Effect of lipase amount on the yield of fatty acid methyl esters

2.1.4 温度

图 4 为反应温度对生物柴油产率的影响。可以

看出固定化酶在 30 ~ 50 ℃ 的范围内比较稳定,产率维持在 87% 以上。适当提高温度,可以增大反应产率,但达到最适温度 40 ℃ 后,随着温度升高,脂肪酶逐渐失活。

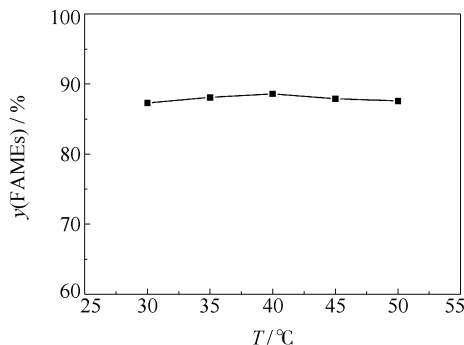


图4 温度对生物柴油产率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the yield of fatty acid methyl esters

2.1.5 甲醇流加次数

甲醇对酶有抑制作用,不溶于反应体系的甲醇“小液滴”可以使酶中毒,通常采用分步流加甲醇来减小对酶的毒害。现在对甲醇的流加次数进行了研究,将等量的甲醇分别以不同的次数加入反应体系。结果如图 5 所示,甲醇流加次数从 1 到 3 时,转化率显著升高,超过 3 次后,流加次数对产率的影响不大。

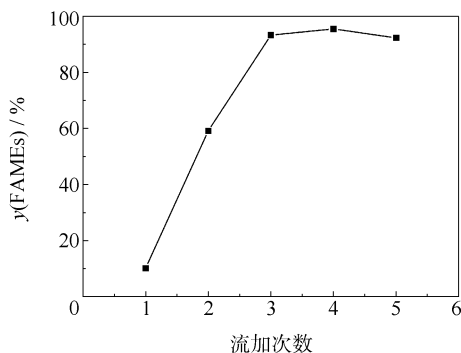


图5 甲醇流加次数对生物柴油产率的影响

Fig. 5 Effect of the number of additions of methanol on the yield of fatty acid methyl esters

综合各种因素,最佳反应条件为:水含量 10%,溶剂量 2 mL/g,脂肪酶量 20%,反应温度 40 ℃,3 次流加甲醇。

2.2 酶催化合成生物柴油的反应过程

在以上最佳反应条件下,采用醇/油物质的量比为 3:1,3 次流加甲醇,170 r/min 摇瓶反应 12 h,反应过程见图 6,3 次加入甲醇后产率分别为 34.7%,

69.5% 和 92.7%。第 3 次初始速率比前 2 次小,这是由于逆反应速率增加造成的。可见每次当甲醇反应 4 h 后,甲醇反应完全,反应 12 h 已经平衡。

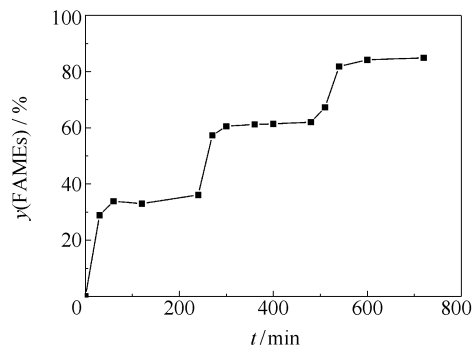


图6 小桐子毛油的甲醇解反应过程

Fig. 6 The time course of methanolysis of crude jatropha oil

2.3 脂肪酶的稳定性

按照以上最佳反应条件,进行连续反应,每批反应结束后,直接将固定化酶移入新的反应体系继续反应,同时测定每批产物的转化率,结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出经过 14 个批次反应,转化率仍然保持在 70% 以上,与文献中报道的 *Rhizopus oryzae*^[6], *Novozym435*^[6], *Pseudomonas cepacia*^[7] 脂肪酶相比,固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化高酸值的小桐子毛油和甲醇合成生物柴油,固定化酶的使用寿命优势显著。

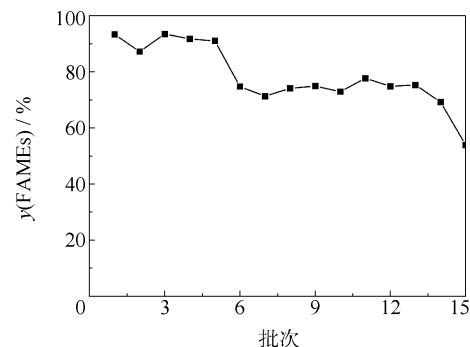


图7 *Candida* sp. 99-125 回用稳定性

Fig. 7 Stability of *Candida* sp. 99-125

3 结论

固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化小桐子毛油合成生物柴油的最适反应条件为水含量 10%,溶剂石油醚 2 mL/g,脂肪酶量 20%,温度 40 ℃,在此条件下,按醇/油物质的量比为 3:1,3 次流加甲醇,170 r/min 摇瓶反应 12 h。最高单批产率可达 93%。在此条件下连续反应,该脂肪酶重复使用

14批,产率仍维持在70%以上。

参考文献:

- [1] 闵恩泽,唐忠,杜泽学,等. 发展我国生物柴油产业的探讨[J]. 中国工程科学, 2005, 7(4): 1-5.
Ming N Z, Tang Z, Du Z X, et al. Perspective of biodiesel industry in China[J]. Engineering Science, 2005, 7(4): 1-5. (in Chinese)
- [2] 邓利,谭天伟,王芳. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(1): 97-101.
Deng L, Tan T W, Wang F. Studies of enzymatic synthesis of biodiesel[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(1): 97-101. (in Chinese)
- [3] Nie K L, Xie F, Wang F, et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43(1/2/3/4): 142-147.
- [4] Lu J K, Nie K L, Xie F, et al. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(9): 1367-1370.
- [5] Berchmans H J, Hirata S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1716-1721.
- [6] Tamalampudi S, Talukder M R, Hama S, et al. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-wholecell and commercial lipases as a biocatalyst[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39(1): 185-189.
- [7] Shah S, Gupta M N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(3): 409-414.
- [8] 谭天伟,陈必强,叶华,等. 固定化酶催化合成脂肪酸低碳醇酯: 中国, 1456674[P]. 2003-11-19.
Tan T W, Cheng B Q, Yie H, et al. Synthesis of fatty acids short chain ester by immobilized lipase: CN, 1456674[P]. 2003-11-19. (in Chinese)
- [9] 高静,王芳,谭天伟,等. 固定化脂肪酶催化废油合成生物柴油[J]. 化工学报, 2005, 56(9): 1727-1730.
Gao J, Wang F, Tan T W, et al. Synthesis of biodiesel from waste oil by immobilized lipase[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2005, 56(9): 1727-1730. (in Chinese)

Synthesis of biodiesel from crude *jatropha* oil using immobilized lipase

LI JunKui WANG Fang TAN TianWei DENG Li

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

Abstract: The enzymatic production of fatty acid methyl esters (FAMES) from crude *jatropha* oil and methanol using the immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 has been studied. The crude oil was extracted by a simple method. The effect of varying water content, solvent content, enzyme amount, temperature and number of additions of methanol on the reaction were investigated. The optimal conditions for processing 1 g of crude *jatropha* oil were found to be: 10% water, 2 mL petroleum ether as solvent, 20% lipase based on the weight of oil, temperature 40 °C, and three-step addition of methanol. The maximum yield of FAMES was 93% after 12 h and after 14 cycles the yield of FAMES was still above 70%.

Key words: biodiesel; crude *jatropha* oil; immobilized lipase