

椰子油为原料酶法制备脂肪酸甲酯

高伯良 聂开立 王 芳 邓 利* 谭天伟

(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: 以椰子油为原料利用固定化 *Candida antarctica* sp. 99-125 脂肪酶转酯化制备了脂肪酸甲酯。分析了椰子油的脂肪酸组成,并测定了椰子油平均分子量,考查了关键因素对反应的影响及反应历程。实验结果表明:椰子油平均分子量为 655.27;最优反应条件为:酶最小加入量为 20%,水加入量为 15%,正己烷加入量为 4 mL/2 g 椰子油。此反应条件下原料油转化率达到 90%。

关键词: 椰子油;固定化脂肪酶;转酯化反应;甲酯

中图分类号: TQ225.24

引 言

生物柴油是一种绿色能源,作为石化柴油的替代品和补充品具有可再生、易于生物降解、燃烧排放的污染物低、基本无温室效应等特点^[1-2]。菜籽油、大豆油、蓖麻油、动物脂肪、米糠油、桐油、餐厨废油等都可以作为生物柴油的原料油。目前研究和报道多为以大豆油、菜籽油、动植物油脂和餐厨废油等高产量油脂为原料^[3-7]。

大多数天然油脂脂肪酸主要为十六碳到二十碳^[8-9],而椰子油中链长较短的十二碳和十四碳脂肪酸含量丰富。植物油生物柴油主要由混合脂肪酸甲酯组成,其脂肪酸甲酯的分布与所用的植物油密切相关,并决定生物柴油的物性,故植物油的脂肪酸分布可预测生物柴油的物性。黏度是生物柴油最重要的理化性质之一,大多数油脂的脂肪酸甲酯的黏度在 3.31~3.94 mPa·s 范围内,油菜籽油甲酯的黏度较高为 4.72 mPa·s,椰子油为 2.25 mPa·s^[10]。以椰子油为原料生产的脂肪酸甲酯可调和其他类型脂肪酸甲酯的品质(降低动力粘度)以达到使用标准,所以椰子油为原料制备生物柴油有研究前景。

本文以气相色谱法分析了椰子油的脂肪酸组成和甘油酯组成,优化了影响椰子油甲酯化的关键因

素并考查了最优条件下的反应历程。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

甲醇、正己烷、三氟化硼、氢氧化钾、椰子油,北京市化学试剂公司。标准品:棕榈酸、棕榈酸单甘酯、棕榈酸二甘酯、棕榈酸三甘酯、油酸、油酸单甘酯、油酸二甘酯、油酸三甘酯, Sigma 化学试剂公司。固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶,实验室自制^[11],表观酶活力 25000 U/g。分析用试剂为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.2 主要仪器设备

HZQ-X100 型振荡培养箱,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;电子天平,赛多利斯公司;GC2010 气相色谱仪,岛津公司;空气发生器,氢气发生器,北京东西电子研究所。

1.3 酶催化实验

反应体系含椰子油、甲醇、正己烷和固定化酶,于 50 mL 具塞锥形瓶中密闭,恒温摇床内反应。将固定化酶、椰子油和正己烷置于锥型瓶中 40℃ 下振荡 10 min 使体系混合均匀。加入水和 361.99 μ L 甲醇(1 mol 当量)开始反应。反应中甲醇分 3 次等量加入,每次加入间隔为 4 h,总反应时间为 12 h。

1.4 气相色谱法分析椰子油组分

1.4.1 气相色谱仪升温程序

岛津 GC2010 型气相色谱仪, DB1-ht 毛细管柱(0.25 mm \times 15 mm, Agilent);高纯氮载气;二阶程序升温,升温速率:柱温 100~300℃, 10℃/min;300~350℃, 5℃/min;氢离子火焰检测器,检测器温度

收稿日期: 2009-03-17

基金项目: 国家“863”计划(2002AA514030);国家自然科学基金(20176002)

第一作者: 男, 1981 年生, 硕士生

* 通讯联系人

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

375 ℃, 气化室温度 370 ℃。

1.4.2 甘油酯组成分析

20 μL 油脂溶于 1 mL 正己烷中, 分析确定游离脂肪酸(FFA), 单脂肪酸甘油酯(MAG), 二脂肪酸甘油酯(DAG), 三脂肪酸甘油酯(TAG)质量分数。

1.4.3 脂肪酸组成分析

三氟化硼-甲醇法进行油脂甲酯化。取椰子油 30 mg 于 10 mL 试管, 加入 1.0 mL 氢氧化钾-甲醇溶液, 60 ℃ 恒温水浴 10 min, 冷却后加入 1.0 mL 12.5% 三氟化硼-甲醇溶液, 恒温水浴煮沸 2 min; 冷却后加入 1.5 mL 石油醚震荡, 使脂肪酸甲酯转入醚层, 再向试管中加入一定量饱和氯化钠溶液, 使醚层上浮至管颈, 分析脂肪酸组成。

1.5 原料油转化率测定

取 20 μL 反应液, 加入 1 mL 正己烷, 充分混合, 取 1 μL 样品气相色谱分析。产品转化率采用峰面积归一化法计算。反应体系中脂肪酸甲酯(FAME)质量分数为原料油转化率。

2 结果与讨论

2.1 椰子油脂脂肪酸组成

图 1 为实验用椰子油甲酯化后的气相色谱图, 计算后椰子油脂脂肪酸组成见表 1。甲酯化常用植物油及动物油脂脂肪酸组成以 C16 碳以上脂肪酸为主, 而椰子油中含有大量 C12 和 C14 脂肪酸, 这使得椰子油平均分子量小于常用油脂。计算得椰子油脂脂肪酸平均分子量为 209.86。实验用椰子油甘油酯成分见表 2, 可见有少量酸败。由表 1 和表 2 结果计算得椰子油平均分子量 655.27。

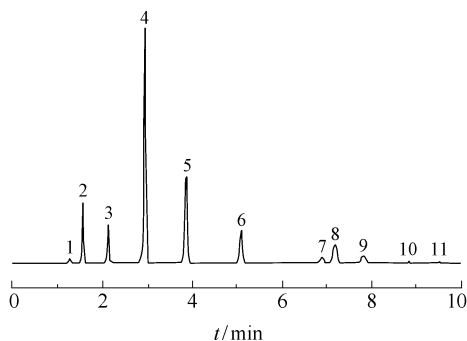


图 1 椰子油甲酯化后 GC 分析

Fig. 1 GC analysis of the coconut oil methyl esters

2.2 椰子油甲酯化反应条件优化

实验室前期大量工作表明, *Candida* sp. 99-125

固定化脂肪酶用于合成生物柴油具有良好的反应特性, 反应所需水含量较高^[3, 12-14], 并且原料不同, 所需水含量及溶剂量有所变化, 因此本文重点考察了酶用量、水加入量及溶剂量几个工艺参数, 并研究了最优反应条件下椰子油甲酯化历程。

表 1 椰子油脂脂肪酸组成

Table 1 Fatty acid composition of coconut oil

峰序号	脂肪酸种类	w/%
1	C6:0	0.4425
2	C8:0	6.9245
3	C10:0	5.528
4	C12:0	45.3944
5	C14:0	18.021
6	C16:0	9.5189
7	C18:0	2.5447
8	C18:1	8.0927
9	C18:2	3.186
10	C18:3	0.1841
11	C20:0	0.0767

表 2 椰子油甘油酯组成

Table 2 Glyceride composition of coconut oil

甘油酯成分	w/%	甘油酯成分	w/%
FFA	0.8	DAG	0.139
MAG	0.063	TAG	8.99

2.2.1 酶使用量

酶用量直接影响反应速度和转化率。酶剂量越大, 催化活性越强, 剂量达饱和后, 由于酶促反应界面的限制, 再增加酶用量不会提高催化效率。实验条件为 15% 外加水(水与油质量比), 正己烷 4 mL, 考察了 10% ~ 40% (酶质量与椰子油质量比) 酶用量, 反应结果如图 2。反应 12 h 后 10% 酶用量下反应转化率为 76%, 增加到 20% 后转化率提升至 90%, 再增加酶用量转化率没有提高。说明 20% 的固定化酶使用量对该反应体系达到饱和。

2.2.2 水加入量

酶需要少量水保持其活性三维构象。酶周围的水能降低酶分子中极性氨基酸的相互作用, 防止产生不正确构象结构。有证据表明, 酶分子周围水化层作为酶表面和反应介质之间的缓冲剂, 它是酶微环境主要成分。有机溶剂中酶含水量低于最适含水量时酶构象过于“刚性”而失去催化活性; 含水量过

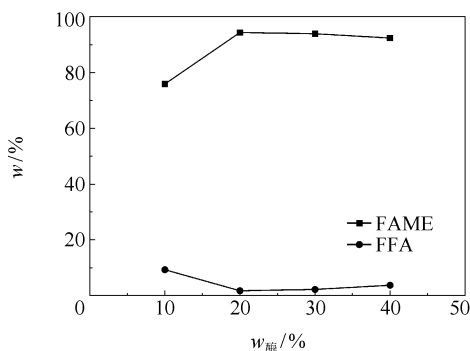


图 2 酶使用量对原料油转化率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme dosage on the conversion rate of the raw oil

高时,酶结构柔性过大,酶的构象将向疏水环境下热力学稳定状态变化,引起酶结构改变和失活。只有在最适水量时蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间达到平衡,酶才表现出最大活力。

实验条件为 20% 酶, 4 mL 正己烷。实验研究了 0 ~ 40% (水与油质量比) 外加水量对反应的影响, 结果如图 3 所示。发现无外加水条件下, 反应转化率极低 (22%), 反应甲酯产率随反应外加水含量升高而迅速增大, 并在 15% 外加水条件下出现一极值 (91%); 继续增加外加水量, 反应甲酯产率开始缓慢下降。分析其原因可能有 3 点: ①水改变了酶的活性中心的构象, 降低了甲醇对酶的毒性; ②水稀释了反应体系中底物甲醇, 减少了甲醇对脂肪酶的毒性作用, 同时也稀释了产物甘油, 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, 并且研究表明, *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化水解及酯化反应的能力远远高于其催化转酯化反应能力。

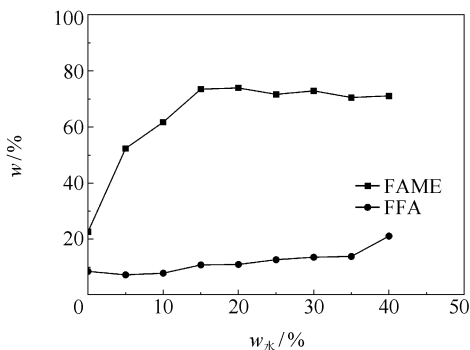


图 3 水加入量对原料油转化率的影响

Fig. 3 Effect of water dosage on the conversion rate of the raw oil

过量水的加入引起了酶活性中心水簇形成, 影响脂肪酶活力, 并造成固定化酶脱落, 反应转化率下降。确定最佳水加入量为 15%。

2.2.3 溶剂加入量

溶剂可能与许多因素有关, 如体系传质, 反应体系匀质性, 底物抑制等等。实验选择了文献中经常使用的几种酶促反应体系^[15] 有机溶剂, 并对比了无溶剂体系与各种溶剂体系对 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化效果的影响。使用的有机溶剂为正己烷、正庚烷、环己烷、石油醚和三氯甲烷, 正己烷做溶剂转化率最高。因此, 对正己烷作溶剂条件下的溶剂量进行优化。实验条件为 20% 酶, 15% 水, 结果如图 4 所示。

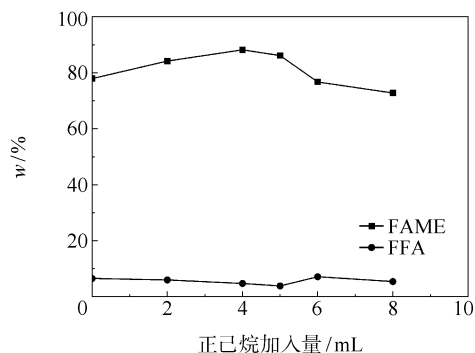


图 4 溶剂用量对原料油转化率的影响

Fig. 4 Effect of solvent dosage on the conversion rate of the raw oil

在无正己烷情况下反应的转化率为 78%, 随着溶剂量增大甲酯产率升高, 并在溶剂量为 4 mL 时出现最大值 90%。当体系中溶剂量超过 5 mL 后, 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程度后, 底物与酶的接触机率变小, 不利于反应的进行。确定 4 mL 正己烷/2 g 油的比例为最佳溶剂比例。

2.3 椰子油甲酯化反应历程

在单因素实验基础上对实验体系以进行了放大, 采用 40 g 油, 20% 酶, 15% 水, 80 mL 正己烷的实验条件。甲醇分 3 次等量加入, 为了减小反应体系中累积甲醇对脂肪酶毒性, 每次加入甲醇间隔增加至 5 h。15 h 后 FAME 质量分数为 87.8%, FFA 质量分数为 5.72%。图 5 为该反应体系的反应历程。

3 次加入甲醇反应过程中, FAME 质量分数增加趋势基本一致, 每次加入甲醇后 20 min, FAME 质

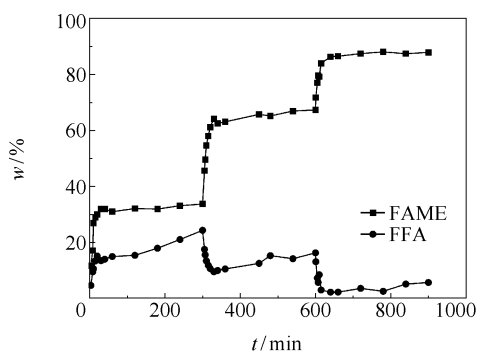


图5 椰子油甲酯化反应历程

Fig. 5 Variation in the contents of fatty acid and fatty acid methyl ester during the methylesterification of coconut oil

量分数迅速增长,之后 FAME 质量分数增长缓慢,说明在固定化 *Candida* sp. 99-125 酶催化下,甲酯化反应初速度非常高,20 min 内反应可进入减速阶段,之后反应速度较慢。

酯肪酸含量在反应开始后持续升高,体系内 TAG 不断被水解;第 2 次加入甲醇后,由于 FFA 同甲醇酯化生成酯肪酸甲酯,体系内 FFA 质量分数迅速下降;360 min 后,FFA 质量分数又有提高的趋势,此时,体系内的甲醇消耗殆尽,水解反应又成为反应体系内主导反应。从 FAME 质量分数变化情况可知,反应达平衡时间较长,超过 300 min,平衡时间过长可能是受传质条件制约。

3 结论

以椰子油(平均分子量 655.27)为原料,利用固定化 *Candida* sp. 99-125 酯肪酶制备酯肪酸甲酯的最优反应条件为:酶用量 20%,水加入量 15%,4 mL 正己烷/2 g 椰子油。最优反应条件下原料转化率达 90%。反应分为 2 个阶段,第 1 阶段反应速度快;第 2 阶段反应速度慢且平衡时间长。

参考文献:

- [1] Bünger J, Krahel J, Frank H U, et al. Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel[J]. Mutation Research, 1998, 415(1/2): 13-23.
- [2] 忻耀年, Sondermann B, Emersleben B. 生物柴油的生产和应用[J]. 中国油脂, 2001, 26(5): 72-77.
Xin Y N, Sondermann B, Emersleben B. Production and application of biodiesel fuel[J]. China Oils and Fats, 2001, 26(5): 72-77. (in Chinese)
- [3] 聂开立, 王芳, 谭天伟. 固定酶法生产生物柴油[J]. 现代化工, 2003, 23(9): 35-38.
Nie K L, Wang F, Tan T W. Biodiesel production by immobilized lipase[J]. Modern Chemical Industry, 2003, 23(9): 35-38. (in Chinese)
- [4] Saka S, Kusdiana D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol[J]. Fuel, 2001, 80(2): 225-231.
- [5] 赵贵兴. 绿色液体燃料—大豆生物柴油的制备研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 202-205.
Zhao G X. Study on soybean biodiesel production-green liquid fuel[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 202-205. (in Chinese)
- [6] 吴虹, 宗敏华, 娄文勇. 无溶剂系统中固定化酯肪酶催化废油脂转酯生产生物柴油[J]. 催化学报, 2004, 25(11): 903-908.
Wu H, Zong M H, Lou W Y. Transesterification of waste oil to biodiesel in solvent free system catalyzed by immobilized lipase[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2004, 25(11): 903-908. (in Chinese)
- [7] 马新起, 连仲宾, 王树立, 等. 棉籽油酯交换法合成生物柴油的工艺研究[J]. 应用化工, 2007, 36(5): 440-442.
Ma X Q, Lian Z B, Wang S L, et al. Study on the transesterification method of biodiesel with cottonseed oil[J]. Applied Chemical Industry, 2007, 36(5): 440-442. (in Chinese)
- [8] Hui Y H. 贝雷: 油脂化学与工艺学: 1 卷[M]. 5 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 10-29.
Hui Y H. Bailey's Industrial Oil and Fat Products; Vol 1 [M]. 5th ed. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 10-29. (in Chinese)
- [9] 巫森鑫, 邹国英, 韩瑛, 等. 6 种食用植物油及其生物柴油中酯肪酸成分的比较研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(12): 65-67.
Wu M X, Wu G Y, Han Y, et al. Fatty acid composition of six edible vegetable oils and their biodiesel fuels[J]. China Oils and Fats, 2003, 28(12): 65-67. (in Chinese)
- [10] Allen C A W, Watts K C, Ackman R G, et al. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition[J]. Fuel, 1999, 78(11): 1319-1326.
- [11] 谭天伟, 陈必强, 叶华, 等. 固定化酯肪酶催化合成酯肪酸低醇酯: CN 1279174C[P]. 2002-05-10.
Tan T W, Chen B Q, Ye H, et al. Preparation of fatty acid lower alcohol esters catalysed by immobilized lipase:

- CN 1279174C[P]. 2002-05-10. (in Chinese)
- [12] 邓利, 刘柳, 董贤, 等. 固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化酯化脂肪酸低碳醇脂反应条件的研究[J]. 现代化工, 2002, 22(9): 30-37.
- Deng L, Liu L, Dong X, et al. Study on esterification reaction of fatty acids short chain ester by immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125[J]. Modern Chemical Industry, 2002, 22(9): 30-37. (in Chinese)
- [13] 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.
- [14] Lu J K, Chen Y W, Wang F, et al. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 in organic solvent system[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(2/3): 122-125.
- [15] 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.

Preparation of fatty acid methyl esters from coconut oil by an enzymic method

GAO BoLiang NIE KaiLi WANG Fang DENG Li TAN TianWei

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

Abstract: Fatty acid methyl esters have been prepared from coconut oil using immobilized *Candida antarctica* sp. 99-125 lipase. The fatty acid composition of the coconut oil was also analysed. The key factors influencing the transesterification reaction and the reaction mechanism were investigated. The average molecular weight of fatty acid methyl esters obtained was 655.27 and the optimum conditions were found to be: enzyme dosage of 20% (mass fraction based on oil); water dosage of 15% (mass fraction based on oil); hexane, 4 mL/2 g oil. A transesterification yield of 90% can be obtained under the optimum conditions.

Key words: coconut oil; lipase immobilization; transesterification; methyl esters