

# 固定化脂肪酶催化合成棕榈酸异辛酯的反应器制备研究

张跃冬 陈必强 谭天伟\*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 开发了填充床式固定化酶反应器合成高档化妆品原料棕榈酸异辛酯的生产工艺,以棕榈酸,异辛醇为原料,使用实验室自制的固定化假丝酵母脂肪酶 99-125 为催化剂。并对反应器的固定化酶用量,底物浓度,循环流速,填充柱径高比等操作参数以及稳定性进行了研究,反应 12 h 最终的酯化率可达 97%,固定化酶使用 31 批以后,12 h 酯化率仍然可以达到 93%。

**关键词:** 固定化酶反应器; 棕榈酸异辛酯; 合成

**中图分类号:** Q814.3

## 引言

棕榈酸异辛酯 iso-octyl palmitate (IOP), 又称棕榈酸 2-乙基己酯, 是高档化妆品的重要油性原料<sup>[1]</sup>, 在纺织和其他化工行业也具有巨大的用途<sup>[2-4]</sup>, 具有巨大的市场潜力。前期的研究中, 已经报道了使用纺织物膜为载体固定化假丝酵母脂肪酶催化合成棕榈酸异辛酯<sup>[5-6]</sup>, 酯化率可以达到 96% 以上, 使用其催化合成其他的中长链脂肪酸酯也有很好的效果, 具有很大的应用价值。但大部分的工作都处于摇瓶阶段, 固定化酶反应器的开发工作目前尚无人进行, 本文在前人研究的基础上, 针对本固定化酶的特点, 设计出填充床式酶反应器合成棕榈酸异辛酯, 通过研究反应器生产棕榈酸异辛酯的工艺, 希望建立一个适合本固定化酶的反应器平台, 对其工业化的应用有着积极的意义。

## 1 实验部分

### 1.1 原料与器材

棕榈酸(北京化学试剂公司), 分析纯; 异辛醇(北京化学试剂公司), 分析纯; 石油醚(沸点 60~90

℃), 分析纯; 固定化酶, 实验室自制。

5 L 酶反应器, 双柱塞计量泵, 电子天平, 蠕动泵, 水浴锅。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 固定化酶的制备** 采用实验室自行开发的固定化方法, 脂肪酶来源为实验室自生产发酵液, 使用吸附法, 将脂肪酶固定于织物膜上, 具体固定方法见文献<sup>[7]</sup>

**1.2.2 固定化酶反应器** 将酶布固定在 20 目的不锈钢网上, 卷制成紧密的筒状, 放入酶填充床, 基本的反应体系: 固定化酶质量为 150 g, 表观酶活为 8000 U/g, 酶填充床外面夹套由恒温水浴槽提供 40℃ 的水保持恒温。搅拌罐体积为 5 L, 反应底物在搅拌罐中溶解, 升至指定温度后由计量泵从下部打入固定化酶填充床内, 反应液流出填充床后再回到搅拌罐, 整个反应属于循环批次反应。反应时从填充柱上端的取料口取料, 测其酯化率。反应器简图如图 1 所示。

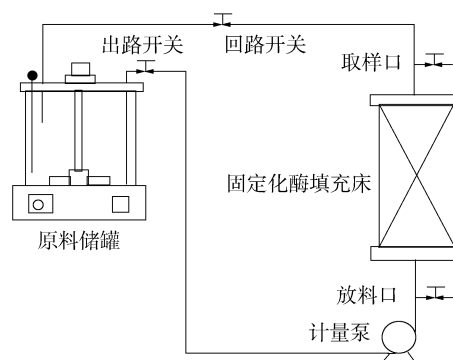


图 1 填充床式固定化酶反应器

Fig. 1 Immobilized lipase packed-bed reactor

收稿日期: 2007-01-10

基金项目: 国家“863”计划(12002AA514030); 国家“十五”科技攻关项目(12001BA708B03208); 国家自然科学基金(120176002); 国家“973”计划(12003CB716002); 中石化资助项目(1202059)

第一作者: 男, 1982 年生, 硕士生

\* 通讯联系人

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

### 1.3 分析方法

在反应中量取 5 mL 反应液, 加入 20~40 mL  $V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{无水乙醚}}=2:1$  的混合液作溶剂和分散剂, 加入 2 滴酚酞作为指示剂, 用 0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液进行滴定。以反应体系内减少的棕榈酸的质量来计算酯化率

酯化率 = 反应的棕榈酸质量 / 初始加入的棕榈酸的质量  $\times 100\%$

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化酶用量的确定

研究了反应器放大时酶用量的确定, 考察了固定化酶的用量对单位固定化酶的催化能力的影响。固定化酶的质量从 16~137 g, 体系中棕榈酸 200 g, 异辛醇 122 g, 石油醚 1500 mL, 使用反应器时, 固定化酶的比活力随固定化酶用量的变化, 以及摇瓶实验的比较如图 2 所示。摇瓶反应条件: 棕榈酸 1 g; 异辛醇 0.667 g; 石油醚 5 mL。

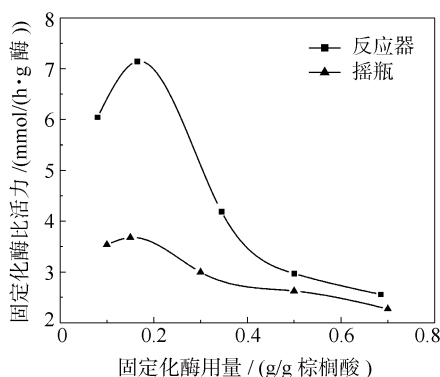


图 2 固定化酶用量的影响

Fig. 2 Effect of the amount of immobilized lipase on esterification

因为发酵水平提高使得酶液酶活提高的原因, 反应器使用的固定化酶比活力比摇瓶时使用的要高。反应器和摇瓶反应的固定化酶比活力都在固定化酶用量为 0.15 g/g 酸左右达到最大值, 然后随着固定化酶用量的增加而下降。但反应器反应时下降的速率远远大于摇瓶时下降的速率。目前固定化酶的填充方式是将膜状固定化酶固定在不锈钢丝网上卷成紧密的卷筒填于柱内, 将其放大时, 会遇到流体短路或壁流的现象, 很多固定化酶接触不到底物使得酶的利用率下降, 如何进一步改进填充方式以增大固定化酶的利用率还将继续研究。

### 2.2 底物浓度对反应的影响

底物摩尔比为  $n_{\text{醇}}:n_{\text{酸}}=1.2:1$ , 采用基本的反应体系, 改变底物的浓度, 对酯化速度进行比较, 结果见图 3。由图 3 可以看出, 随着底物浓度的增加, 总体酯化速率与初速度都随之增大, 而且近似为线性变化。从 2.3 节的结果可以知道基本体系的固定化酶质量相对底物质量已经过量, 说明不存在底物抑制或者底物抑制很小, 但是在 40 °C 时溶剂中底物溶解度有限, 而且棕榈酸浓度过高会使底物溶液黏度增大, 并且在通过管路时因为温度下降导致酸析出而堵塞管路, 所以, 实验多采用的棕榈酸质量浓度为 0.13 g/mL。

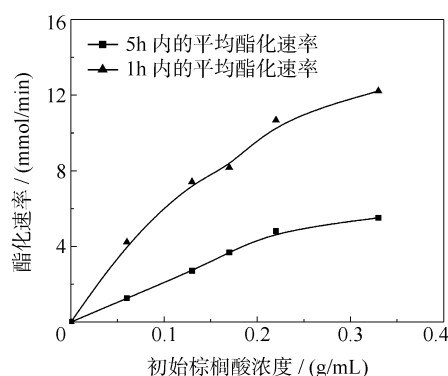


图 3 底物浓度对反应速率的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of acid on esterification

### 2.3 循环流速对反应的影响

反应器中料液流速影响底物与固定化酶界面的传质, 反应液对固定化酶的剪切力等, 反应进行 1 h 后与 6 h 后的酯化率随流速的变化如图 4。

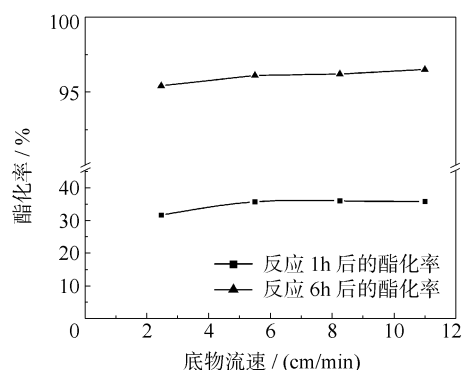


图 4 不同流速下的反应速度对反应的影响

Fig. 4 Effect of the flow velocity on esterification

由图 4 可以看出, 流速的变化对反应速度影响并不是很大, 反应 1 h 后和 6 h 后的转化率随流速变大略有增加但变化都不明显。实验室采用的固定化

酶方式是直接将酶液吸附在纺织物膜上,酶大部分吸附在膜状的固定化载体表面,相对其它颗粒状的大孔树脂吸附或者使用凝胶等物质交联包埋得到的固定化酶,催化反应时的外扩散效应更小,试验结果说明了这点。但在实验时,高流速会产生较大的柱压,所以尽量选择较低的流速,以 5.5 cm/min 为最优流速。

## 2.4 填充柱的径高比

为了给以后的放大的填充柱形状的确定提供参考,在填充柱体积不变的情况下,改变其高径之比,反应时,底物浓度与质量,流速,固定化酶酶活与质量都相同。反应进程的比较如图 5,由图 5 可以看出,填充柱过粗或者过细对反应都不利,使用径高比 9:12 的填充柱酯化率始终低于径高比 6:27 的填充柱,径高比 4:63 的填充柱虽然在开始时速度与 6:27 的填充柱相当,但反应后期酯化速度明显低于 6:27 的填充柱。填充柱过粗使反应速率变慢可能是因为反应物优先从柱中央流出,出现短路或者壁流使平均保留时间变小;而填充柱过细使反应在后期变慢的原因可能是因为虽然保留时间并未受影响,但其流程太长,不利于反应产生的水的排出,水较快的积累在柱内,阻碍反应的进行。在实验室阶段,暂定径高比为 6:27 的填充柱为最佳。

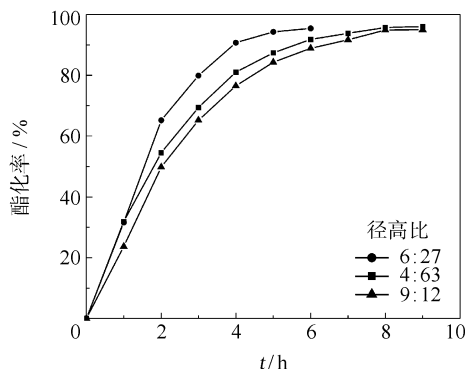


图 5 使用不同填充柱的反应进程

Fig. 5 Time course of esterification in different packed-beds

## 2.5 固定化酶的稳定性

每次投料棕榈酸 200 g, 异辛醇 132 g, 石油醚 1500 mL, 连续几批反应完后, 将固定化酶取出填充柱于室温晾干, 再填入柱中使用, 12 h 内的酯化率以及摇瓶试验的对比如图 6。摇瓶反应条件: 棕榈酸 1 g, 异辛醇 0.667 g, 石油醚 5 mL, 固定化酶 0.2 g, 反应时间 12 h。

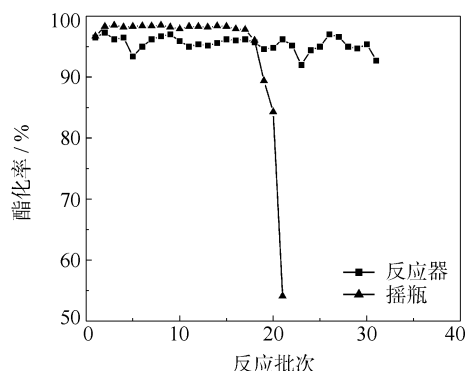


图 6 反应器和摇瓶连续反应的固定化酶寿命

Fig. 6 Stability of immobilized lipase in batch reaction

由图 6 看出, 反应器放大后, 固定化酶的使用寿命比之摇瓶反应时的寿命要长, 当摇瓶反应 12 h 酯化率降到 50% 时, 反应器 12 h 内的酯化率还在 93% 以上, 原因可能是反应器时单位质量底物使用的固定化酶量要大于摇瓶时的缘故。摇瓶反应时已经发现固定化酶的使用寿命随固定化酶的用量延长的现象, 反应器阶段的具体规律还将进一步研究。在实验中也发现, 水对酯化反应的影响很大, 连续反应时, 由于反应生成的水在填充柱内的不断累积, 初始酯化速率不断降低, 但将固定化酶取出晾干后, 发现酯化速度又恢复。脂肪酶催化时, 控制水常用的方法有使用活化的分子筛或者吸水盐, 使用真空体系, 或者采用渗透蒸发<sup>[8]</sup>等方法。小试实验时, 除去酯化时产生的水采用的方法, 是向体系中加入分子筛, 放大后的水的控制方法还需进一步研究。

## 3 结论

采用将膜状固定化酶固定于不锈钢网上卷成筒状填充于反应柱内, 使底物循环经过固定化酶填充柱的反应器放大方式, 在催化棕榈酸和异辛醇合成棕榈酸异辛酯的反应时, 效果良好, 最后的酯化率和固定化酶的使用寿命都达到或者好于摇瓶实验。实验室自制的固定化酶造价低廉, 稳定性好, 加之酶法催化生产较之化学法生产具有耗能低, 生产过程环保等特点, 使得脂肪酶催化合成棕榈酸异辛酯的工艺具有很大的工业化前景。

## 参 考 文 献

- [1] 黄洪周. 工业表面活性剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [2] OPDYKE D L J. Fragrance raw materials monographs [J]. Food Cosmet Toxicol, 1981, 19(2): 273-249.

- [3] BRETON L, LIVIERO C. Cosmetic compositions containing cinnamic acid or its derivatives for assisting skin peeling: FR, 2778560-A1[P]. 1999-11-19.
- [4] 吕世光. 塑料助剂手册[M]. 北京:北京轻工业出版社,1986.
- [5] He Xiangling, Chen Biqiang, Tan Tianwei. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from candida sp. 99-125[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 18: 333-339.
- [6] 陈必强,叶华,谭天伟. 固定化假丝酵母脂肪酶合成棕榈酸异辛酯[J]. 化工学报,2004,55(3):422-425.
- [7] 谭天伟,陈必强. 固定化脂肪酶催化合成脂肪酸低碳醇酯: 中国, 1456674A[P]. 2003-11-19.
- [8] 咸漠,康亦兼,杨丽,等. 脂肪酶催化反应的研究进展[J]. 青岛化工学院学报, 2000,21(3):189-191.

## Synthesis of iso-octyl palmitate in an immobilized lipase reactor

ZHANG YueDong CHEN BiQiang TAN TianWei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Iso-octyl palmitate (IOP) has been synthesized from palmitic acid and 2-ethyl hexanol in a packed-bed reactor with immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 as the catalyst. The effects of varying the dosage of immobilized lipase, the concentration of raw materials, the velocity of reactant flow, and the diameter to height ratio of the packed bed on the reaction were investigated. Under optimum conditions, the maximum esterification extent reached 97%. The stability of the immobilized lipase was found to be excellent, with the extent of esterification remaining above 93% when the material was reused in 31 batch cycles.

**Key words:** immobilized lipase reactor; iso-octyl palmitate(IOP); synthesis

(上接第 113 页)

## Performance of biodiesel made from ditch oil

WANG Yu<sup>1</sup> SUN HaiYang<sup>1</sup> WANG Fang<sup>2</sup> TAN TianWei<sup>2</sup>

(1.College of Life Science and Technology;2.Beijing Key Laboratory of Bioprocess Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Biodiesel has been produced from ditch oil by catalysis with immobilized lipase and its composition and performance tested. The purity of the product reached 97.8%. The Flash Point was above 170 °C, the Sulfur Content was below 0.0005% and the maximum Cetane Number was 73.6. The emission characteristics, output power and fuel economy of a diesel engine were studied. A 20% biodiesel-diesel blend, gave reductions of 28% and 36% in exhaust carbon monoxide and unburned hydrocarbons, respectively, compared with pure diesel. The amount of oxides of nitrogen decreased by 24%, while the smoke emission decreased by 0.2 to 0.9 Rb depending on the operating conditions. The data confirm the high quality of the biodiesel produced.

**Key words:** biodiesel; ditch oil; quality; burn; emission