

文章编号:1673-1689(2007)03-0075-05

固定化脂肪酶催化大豆油制备生物柴油

曾淑华, 周位, 杨江科, 闫云君

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要:研究了脂肪酶固定化及其催化大豆油制备生物柴油的工艺。采用溶胶-凝胶法对脂肪酶进行了固定化,考察了固定化酶催化大豆油转酯化的生产工艺中酶用量、醇油比、含水量、反应温度、反应时间、溶剂等参数对转酯过程的影响。实验结果表明,当大豆油4.5 g时,最佳的反应条件为:固定化酶646 mg,醇油摩尔比4:1,含水质量分数为6%,40℃,甲酯的最终转化率为96.33%。

关键词:生物柴油;脂肪酶;固定化;转酯化

中图分类号:TS 225.13

文献标识码:A

Immobilized Lipase Catalyzing Production of Biodiesel

ZENG Shu-hua, ZHOU Wei, YANG Jiang-ke, YAN Yun-jun

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: In this manuscript lipase from *Pseudomonas cepacia* was immobilized in sol-gel matrix and use to its transesterification of soybean oil with methanol into biodiesel was studied. The effects of water content, methanol/oil molar ratio, enzyme loading, temperature, organic solvents and time course on the transesterification were determined. The results showed that the optimal conditions for transesterification were as follows: soybean oil 4.5 g; temperature 40℃, 4:1 methanol/oil molar ratio, 6% water content and 646mg immobilized lipase. By combination with the optimum conditions, a high methyl esters formation (96.33%) was obtained.

Key words: biodiesel; lipase; immobilization; transesterification

生物柴油是一种可再生并能生物降解的良好石油替代能源,主要是以动植物油为原料,通过甲酯化或乙酯化而制备的长链脂肪酸甲酯或乙酯等酯类物质。与传统的矿物柴油相比,具有闪点高,润滑性能好,燃烧后不产生硫氧化物、芳香烃、多环芳烃等大气污染物,可有效减少尾气对环境的污染^[1-2]等优点。因此,生物柴油的发展已引起世界

各国的广泛关注。

目前生物柴油的生产方法主要有化学法和酶法。化学法存在工艺复杂、醇消耗量大,产物不易回收,环境污染大等缺点^[3]。而酶法制备生物柴油具有反应条件温和、醇用量小、产物易收集、对环境污染小等优点,因而报道日渐增多,但目前还只处在工艺探索阶段,未见有酶法制备生物柴油投入生

收稿日期:2006-07-13.

基金项目:国家863计划项目(2003AA214061).

作者简介:曾淑华(1980-),女,湖北汉川人,生态与生物技术硕士研究生.

通讯作者:闫云君(1969-),男,湖北罗田人,教授,博导,主要从事生物能源及生态能量研究. Email: yanyunjun@tom.com

产实践的报道^[4-6]。本文采用自制的固定化酶作为生物催化剂,以精制大豆油为原料,对酶促酯交换反应制备生物柴油的工艺进行了研究,探讨了酶用量、醇油比、含水量、反应温度、反应时间、溶剂等因素对生物柴油转化率的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

所有脂肪酶购于日本 Amano 公司,精炼大豆油购于南海油脂工业有限公司,甲醇、正己烷、叔丁醇、四氢呋喃均为分析醇,购于国药集团化学试剂有限公司;tetramethoxysilane(TMOS)、methyltrimethoxysilane(MTMS)、氟化钠等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

摇床:金坛市新航仪器厂生产;电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司产品;气相色谱仪 GC-9790:温岭福立分析仪器有限公司生产,离心机:Eppendorf 公司产品;旋涡混匀器:Scientific Industries 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 脂肪酶的固定化 在 15 mL falcon tube 中加入 200 mg Lipase PS 和 2.16 mL Tris-HCl buffer(pH 7.0, 0.05 mol/L),混匀,加入 200 μ L NaF(1 mol/L)、适量 PEG 400 和异丙醇,混匀 5 min,再加入 2 mmol TMOS 和 10 mmol MTMS,将混合物在混匀器上剧烈震荡 5 s,然后轻轻震荡,看到凝胶颗粒在数秒内形成。将反应物置于空气中,经 37 $^{\circ}$ C 干燥后,刮下白色凝胶,用 10 mL Tris-HCl buffer(pH 7.0, 0.05 mol/L)震荡洗涤 2 h,除去未固定上和结合松散的酶,离心,收集上清液,分析得酶的固定化效率为 94%。将固体颗粒分别用 10 mL 丙酮、10 mL 正己烷洗涤,冻干,置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 酶促转酯化合成生物柴油 在 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 4.5 g 大豆油,适量甲醇和水,一定量的固定化酶,在摇床转速 200 r/min、一定的温度条件下,密封振荡反应。定时取出反应液,离心之后用于甲酯含量分析。

1.3.3 气相色谱分析方法 取样 5 μ L,用 295 μ L 正己烷溶解,加入 300 μ L 内标物(十七碳酸甲酯正己烷溶液),混匀,取 1 μ L 样品进样。

1.3.4 GC 分析条件 INNOWAX 毛细管柱,30 mm \times 0.25 mm \times 0.25 μ m,载气 N₂,柱前压 0.1MPa,一阶程序升温,温度由 200 $^{\circ}$ C 升到 235 $^{\circ}$ C,升温速率 3 $^{\circ}$ C/min,FID 检测器,气化室温度

280 $^{\circ}$ C,检测器温度 280 $^{\circ}$ C。

1.3.5 生物柴油转化率的测定 将生物柴油的转化率定义为经气相色谱分析得到的脂肪酸甲酯的含量/大豆油完全甲酯化后脂肪酸甲酯的含量 \times 100%。

2 结果与讨论

2.1 不同来源的游离脂肪酶催化大豆油转酯化的比较

为了选出转酯活力较高的脂肪酶用于固定化,对表 1 中 Amano 公司的 7 种不同来源的脂肪酶进行了转酯实验比较。其初步考察反应体系为 4.5 g 大豆油,甲醇 793 μ L(醇油摩尔比为 4:1),135 mg 游离酶,0.225 g 水,摇床转速 200 r/min,40 $^{\circ}$ C 密封振荡反应 24 h,该条件不是酶催化的最适条件。实验结果见图 1, Lipase PS 的转酯效率最高,为 63.24%,而其他几种酶的转酯效率都很低,只有百分之几。这表明 Lipase PS 在生物柴油的合成过程中具有很强的应用潜力,因此,对该种酶进行了固定化,并将其固定化酶应用于后面的生物柴油制备实验。

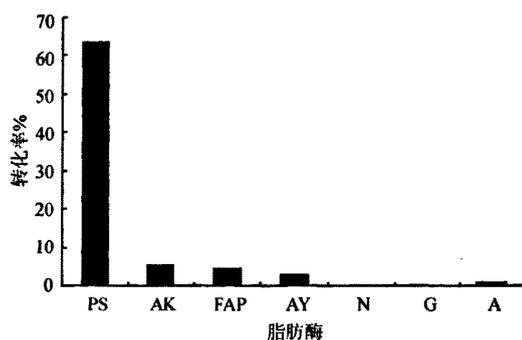


图 1 不同的游离酶催化大豆油转酯化的影响

Fig. 1 Effect of different free lipases on transesterification of soybean oil

表 1 用于筛选的 7 种脂肪酶

Tab. 1 Free lipase tested in the transesterification screening

脂肪酸	来源
PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>
AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
FAP	<i>Aspergillus niger</i>
AYC	<i>andida rugosa</i>
N	<i>Rhizopus niveus</i>
G	<i>Penicillium camemberittii</i>
A	<i>Aspergillus niger</i>

2.2 不同的加酶量对转酯反应的影响

在 4.5 g 大豆油, 甲醇 793 μL (醇油摩尔比为 4 : 1), 0.27 g 水, 摇床转速 200 r/min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 的反应体系中, 加入 0~300 mg 的游离酶 (10% 蛋白质含量) 和 0~1.5 g 的固定化酶 (2% 蛋白质含量), 反应 24 h 后, 结果见图 2。图 2 表明, 随着酶量的增加, 转化率陡然上升, 并且固定化酶催化体系的转化率上升速率明显高于游离酶催化体系, 当体系中 Lipase PS 的质量大于 100 mg 后, 甲酯转化率增长趋势趋于平缓, 其最大值分别为 89.81% 和 70.32%。参考多种因素, 选择加入固定化酶 646 mg (相当于 135 mg lipase PS) 最为合适。酶经过固定化后转酯活力明显高于游离酶, 该结果与 H. Noureddini 等^[7]、Mamoru Iso 等^[8] 的研究结果一致。可能的原因是溶胶前驱体中烷基基的疏水性与脂肪酶结构中 α 螺旋疏水性的侧链发生疏水作用, 导致酶的活性中心的盖子结构被打开^[9], 出现界面活化现象, 使酶分子的活性得到提高。另外, 酶浓度过大时, 会使酶分子堆积, 限制其催化空间, 导致比活力下降。

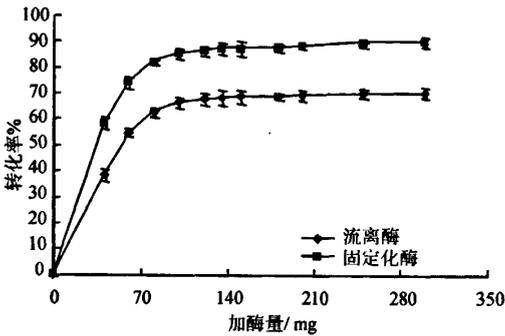


图 2 加酶量对转酯反应的影响

Fig. 2 Effect of enzyme loading on transesterification of soybean oil

2.3 醇油比对转酯反应的影响

通过预实验发现, 采用分 3 次等摩尔流加甲醇的反应体系的最终转化率要低于一次性加入甲醇体系的最终转化率, 故选择在一次性加入甲醇的条件下, 比较了 4.5 g 大豆油, 646 mg 固定化酶, 醇油摩尔比为 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 含水质量分数为 6%, 反应温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 的反应体系的甲酯转化率。结果见图 3。从图 3 可以看出, 4 : 1 的反应体系的转化率最高, 其次是 3 : 1 的体系, 再次是 5 : 1 的体系。在醇油摩尔比高于理论摩尔比 3 : 1 的条件下固定化 Lipase PS 能表现出非常高的催化活性, 这一结果与 An-Fei Hsu 等^[10-11] 人的研究结果一致。但是过高的醇油比反过来也会抑制酶的转酯活性, 以醇油

摩尔比 4 : 1 最合适。

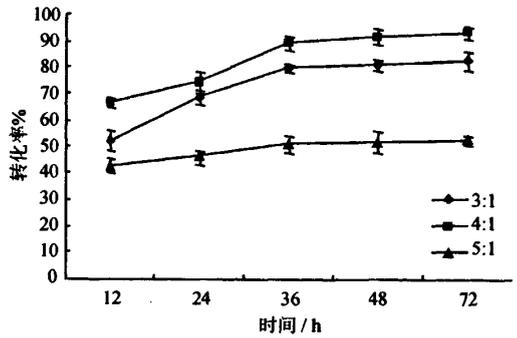


图 3 醇油比对转酯反应的影响

Fig. 3 Effect of methanol/oil molar ratio on transesterification

2.4 含水量对转酯反应的影响

脂肪酶只有在油-水界面才具有催化活性, 因此水在反应体系中是必不可少, 但是过多的水会促进脂肪酶催化底物水解而不是转酯反应。我们在醇油摩尔比 4 : 1, 摇床转速 200 r/min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 、反应 24 h 的条件下, 探讨了不同含水量对转酯反应的影响, 结果见图 4。从图 4 可知, 在低水环境中脂肪酶的转酯活力随着含水量的增加而急剧增大, 在质量分数 6% (水与油的质量比) 时, 甲酯转化率达到 89.81% 的最大值, 随后开始降低。低水环境中不能充分的形成油-水界面, 脂肪酶活性很低, 而过多的水分则会导致脂肪酶催化底物的水解, 最适含水质量分数约为 6%。该结果比其他人的研究结果略为偏高, 可能原因是溶胶-凝胶固定化颗粒本身吸收了部分水份, 导致表观上需要更多的水才能充分的形成油-水界面。

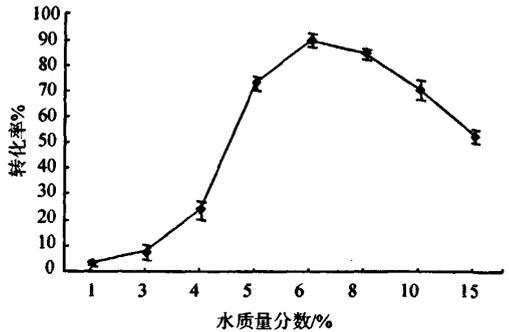


图 4 含水量对转酯反应的影响

Fig. 4 Effect of water content on transesterification

2.5 反应温度对转酯反应的影响

我们在 4.5 g 大豆油, 646 mg 固定化酶, 醇油

摩尔比 4 : 1, 质量分数为 6% 含水量, 摇床转速 200 r/min 的条件下探讨了不同温度对转酯反应的影响, 反应 24 h 后, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 40 °C 时甲酯转化率最高, 约为 86.35%。温度过高, 脂肪酶更倾向于催化底物水解^[12], 温度更高酶易失活, 从而降低甲酯转化率。

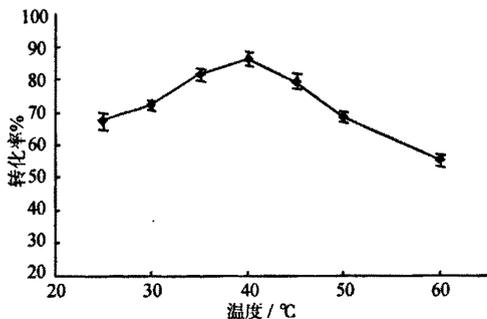


图 5 温度对转酯反应的影响

Fig. 5 Effect of temperature on transesterification

2.6 反应时间与甲酯转化率的关系

在醇油摩尔比 4 : 1, 6% 含水量, 摇床转速 200 r/min, 40 °C 的反应条件下测定了不同时间下的甲酯转化率, 结果见图 6。从图 6 可知, 转化率在前 12 h 急剧上升, 达到 78.04%, 随后上升缓慢, 24 h 达到 89.81%, 最后趋于平缓, 48 h 后达到 95.42%, 之后基本无变化, 72 h 后达到 96.33%。

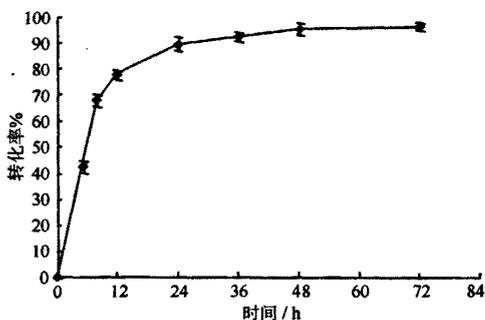


图 6 不同时间下的甲酯转化率

Fig. 6 Time course of the transesterification

2.7 有机溶剂对转酯反应的影响

对比了无溶剂体系与溶剂体系对反应的影响, 分别以正己烷、叔丁醇、四氢呋喃为溶剂进行了研究。结果见图 7。从图 7 可以看出, 无溶剂体系的转化率最高, 其次为四氢呋喃体系, 再次为叔丁醇体系, 最后为正己烷体系。结果说明溶剂体系并不利于 Lipase PS 催化转酯反应地进行。目前, 利用 Lipase PS 催化转酯反应的体系基本为无溶剂体

系^[7-13]。通过预实验发现 Lipase PS 用甲醇处理 24 h 之后酶活无明显变化, 并且在较高的醇油比的条件下转酯活力极高(如图 3 所示), 而有机溶剂的加降低了反应体系中甲醇的浓度, 导致底物之间不能充分接触, 从而降低甲酯转化率。同时, 无溶剂体系更加有利于产物的分离和纯化。因此, 无溶剂体系更加适合作为 Lipase PS 的转酯反应体系。

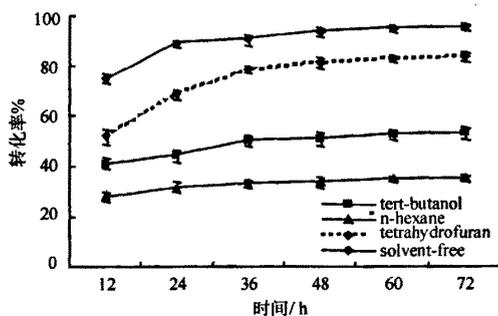
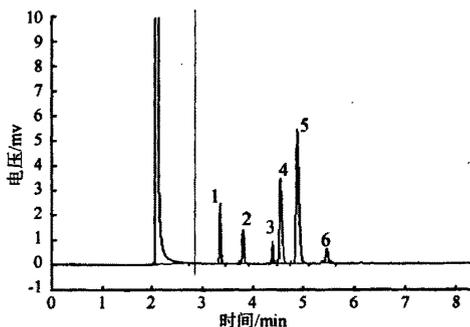


图 7 有机溶剂对转酯反应的影响

Fig. 7 Effect of organic solvent on transesterification

2.8 生物柴油成分分析

产物的气相色谱分析结果如图 8 所示。



1. 棕榈酸甲酯; 2. 十七碳酸甲酯; 3. 硬脂酸甲酯; 4. 油酸甲酯; 5. 亚油酸甲酯; 6. 亚麻酸甲酯

图 8 脂肪酸甲酯气相色谱分析图

Fig. 8 GC analysis of methyl esters

3 结论

酶法合成生物柴油是一种环境友好型、高效的生物合成工艺催化过程。本实验研究了溶胶-凝胶法固定的 Lipase PS 催化大豆油合成生物柴油的反应工艺条件。在 4.5 g 大豆油, 646 mg 固定化酶, 793 μ L 甲醇(醇油摩尔比为 4 : 1), 0.27 g 水, 摇床转速 200 r/min, 40 °C 的反应体系中, 甲酯的最终转化率可达到 96.33%。此外, 固定化酶回收方便, 在有机溶剂中的分散性好, 这为酶法生产生物柴油的工业化应用奠定了良好的技术基础。

参考文献(References):

- [1] Nelson L A, Foglia T A, Marmer W N. Lipase-catalyzed production of biodiesel[J]. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 1996, 73: 1191—1195.
- [2] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92: 405—416.
- [3] Fangrui M, Milford A H. Biodiesel production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70, 1—15.
- [4] Gemma V, Mercedes M, Jos A. Optimization of brassica carinata oil methanolysis for biodiesel production[J]. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 2005, 82: 899—904.
- [5] Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, et al. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil[J]. *Journal of Bioengineering*, 2000, 90: 180—183.
- [6] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel with immobilized *Candida Antarctica* lipase[J]. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17: 151—155.
- [7] Nouredini H, Gao X, Philkana R S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 769—777.
- [8] Mamoru I, Baoxue C, Masashi E, et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase [J]. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, 2001, 16:53—58.
- [9] Brady L, Brzozowski A M, Derewenda Z S, et al. A Serine protease triad from the catalytic center of a triacylglycerol lipase[J]. *Nature*, 1990, 343: 767—770.
- [10] An-Fei H, Kerby J, Thomas A F, et al. Transesterification activity of lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 917—921.
- [11] An-Fei H, Kerby J, Thomas A F, et al. Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1713—1716.
- [12] Nouredini H, Gao X, Wagner P R. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil[J]. *Journal of American Oil Chemists Society*, 2004, 79: 33—39.
- [13] An-Fei H, Kerby J, Thomas A F, et al. Immobilized lipase-catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2002, 36: 181—186.

(责任编辑:杨萌)