

文章编号:1673-1689(2007)05-0079-05

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油 醇解反应合成生物柴油的工艺条件

徐炜枫, 陆兆新, 吕凤霞, 别小妹, 房耀维

(南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 脂肪酶 Lipozyme TL IM 在有机相体系中能有效催化菜籽油醇解反应生成生物柴油。作者研究了酶量、底物比率、反应时间、反应温度、转速、水分质量分数、有机溶剂对产物得率的影响。最佳工艺条件为:在正己烷的反应介质中,酶量 50%,醇油摩尔比 3:1,反应温度 50℃,转速 150 r/min,添加质量分数 5%的水分,反应 12 h 后产物脂肪酸甲酯得率可达 92.3%。

关键词: 生物柴油;醇解反应;Lipozyme TL IM

中图分类号: Q 814.9;TQ 645

文献标识码: A

Study on Methanolysis of Rapeseed Oil by Lipozyme TL IM for Biodiesel Production

XU Wei-feng, LU Zhao-xin, LÜ Feng-xia, BIE Xiao-mei, FANG Yao-wei

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Lipozyme TL IM can efficiently catalyze methanolysis transesterification of rapeseed oil for biodiesel production. In this manuscript, the effects of enzyme concentration, substrate ratio, reaction time, reaction temperature, shaking speed, added water and organic solvent content were investigated. The optimal condition of the methanolysis transesterification was as follows: 50% enzyme based on oil weight; methanol/oil mole ratio 3:1; shaking speed 150 r/min; added water content 5%; reacting at 50℃ for 12 h. Under that condition, the maximum fatty acid methyl esters (FAME) yield was 92.3%.

Key words: biodiesel; methanolysis; Lipozyme TL IM

生物柴油(biodiesel)作为可再生能源的一种,主要指以任何天然的油或脂为原料与甲醇、乙醇等进行醇解化反应得到的脂肪酸甲酯(或脂肪酸乙酯)混合物,不仅可以作为燃料直接燃烧,而且也可作为柴油清洁燃烧的添加剂。生物柴油是一种新型的替代燃料,因其环保和可再生,日益被人们重

视。目前工业化生产主要使用化学法合成生物柴油,但存在工艺复杂、能耗较高、产品色泽较深、酯化产物难回收、成本高等缺点^[1-2]。为解决上述问题,人们研究用生物酶法合成生物柴油,即通过脂肪酶催化醇解反应,制备相应的脂肪酸甲酯(FAME)或乙酯。酶法合成生物柴油具有条件温

收稿日期:2007-01-11.

作者简介:徐炜枫(1981-),女,江苏海门人,食品生物技术硕士研究生,Email:2004108019@njau.edu.cn

通讯作者:陆兆新(1957-),男,江苏无锡人,教授,博导,主要从事食品微生物与生物技术方面的研究。Email:fmb@njau.edu.cn

和、醇用量小、无污染物排放等优点,但酶法反应过程中存在甲醇,容易导致脂肪酶失活、反应时间较长、转化率较低等问题^[1,3],仍需深入研究和解决。

目前我国采用酶法制备生物柴油的研究还处于实验室研究阶段,因酶本身的价格昂贵,采用固定化脂肪酶可以进行分离、再生、循环使用,降低成本。国内外研究较多的成品酶是固定化 *Candida antarctica* (Novozym 435),催化速率快,产率高,但其成本高。固定化脂酶 Lipozyme TL IM 价格低廉,但其酶活较低,反应所需酶量大,反应时间长,将其和 Novozym 435 混合使用,可以适当降低酶的成本^[20],而单独使用的较少。清华大学^[17]研究了单独使用 Lipozyme TL IM 催化大豆油合成生物柴油,当酶量为油的 60% 时,5 h 得率可以达到 92%。

为了进一步了解固定化脂酶 Lipozyme TL IM 的催化特性,作者研究了有机溶剂体系中固定化脂酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油进行甲醇解反应生产生物柴油,探讨了相关因素对反应得率的影响,如酶量、反应温度、底物比率、添加水分、有机溶剂加入量等。

1 材料与方法

1.1 材料

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM(75 IUN/g,来源于 *T. languginosa*),固定在硅胶颗粒上,购自于丹麦诺维信酶制剂公司。软脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯、芥酸甲酯、十七碳酸甲酯,均为色谱纯, Sigma 公司产品;二级菜籽油购自于南京江宁植物油厂;其他溶剂均为分析纯或者色谱纯。

1.2 试验设计与测定方法

1.2.1 醇解反应 在 50 mL 具塞烧杯中放入 9.75 g 菜籽油和适量的甲醇混合物,加入 5 mL 有机溶剂混匀后,置于自动控温往复水浴摇床中加热至一定温度后,加入一定量的脂肪酶 Lipozyme TL IM 开始反应,定时取上层液 100 μ L 用正己烷稀释至 1 mL,再取 100 μ L 与等量的 2 mg/mL 十七碳酸甲酯(内标物)正己烷溶液混匀,由气相色谱仪进行脂肪酸甲酯(FAME)含量测定。

1) 温度试验:在正己烷体系下,选用 35、40、45、50、55、60、65、70、75 $^{\circ}$ C 作为温度研究的变量,醇油摩尔比率为 3:1,加入酶量 30%,摇床转速为 150 r/min,测各温度下反应 12 h 后的脂肪酸甲酯得率,重复 3 次。

2) 时间进程试验:在正己烷体系下,反应条件

为甲醇与菜籽油的底物摩尔比为 3:1,加入酶量为 30%,摇床转速为 150 r/min,反应温度为 50 $^{\circ}$ C。不同时间取样,观察 72 h。重复 3 次。

3) 酶量试验:在正己烷体系下,甲醇与菜籽油的底物摩尔比为 3:1,摇床转速为 150 r/min,反应温度为 50 $^{\circ}$ C。在此反应条件下,加入的脂肪酶占菜籽油的质量的 10%、30%、50%、60%。不同时间取样,观察 48 h。重复 3 次。

4) 底物比率试验:在正己烷体系下,底物醇油摩尔比率选择从 1:2~6:1,反应条件为反应温度 50 $^{\circ}$ C,30%酶量,摇床转速为 150 r/min,不同时间取样,观察 72 h。重复 3 次。

5) 水分含量试验:在正己烷体系下,研究水分含量(以脂肪酶的量来计)在 0~30% 下的产率,醇油摩尔比率为 3:1,加入酶量 30%,摇床转速为 150 r/min,反应温度 50 $^{\circ}$ C,测各个条件下反应 12 h 的脂肪酸甲酯得率。重复 3 次。

6) 转速试验:在正己烷体系下,摇床转速从 120 r/min 增至 200 r/min,醇油摩尔比率为 3:1,加入酶量 30%,反应温度 50 $^{\circ}$ C,测各摇床转速下反应 12 h 的脂肪酸甲酯得率。重复 3 次。

7) 有机溶剂试验:选用了异辛烷、正庚烷、正己烷、氯仿、乙醚、乙酰乙酯作为反应介质研究对象,加入量均为 5 mL,并与无溶剂体系进行比较,测各个体系下反应 12 h 的脂肪酸甲酯得率,重复 3 次。固定反应介质为正己烷条件下,选择加入 3、5、8、10 mL 作为研究对象,重复 3 次。其余反应条件固定为醇油摩尔比为 3:1,酶量 30%,摇床转速为 150 r/min,反应温度 50 $^{\circ}$ C。

1.2.2 气相色谱分析 使用 Angilent 6890 气相色谱仪进行气相分析,DB-1701 毛细管柱(半径 0.32 mm,长 30 m),FID 检测器。载气(氮气)流速 20 mL/min,氢气流速 30 mL/min,空气流速 300 mL/min。采用程序升温,220 $^{\circ}$ C 维持 30 s,之后以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C,维持该温度 55 min。进样口与检测器温度分别为 245 $^{\circ}$ C 与 280 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 温度对醇解反应得率的影响

图 1 研究了温度对脂肪酶醇解反应的影响。低于 50 $^{\circ}$ C 时,随着温度的升高,酶活增大,FAME 得率升高;50~75 $^{\circ}$ C 时,随着温度的升高,酶逐渐失活,FAME 得率降低。50 $^{\circ}$ C 时得率最高为 79.36%,故选择 50 $^{\circ}$ C 为最佳的反应温度。

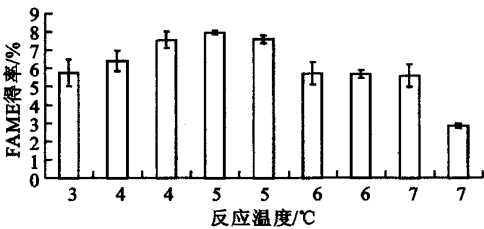


图 1 温度对脂肪酸甲酯得率的影响

Fig. 1 Effect of reaction temperature on the yield of FAME

2.2 反应时间对醇解反应得率的影响

在酶催化反应中,要以最低的生产费用获得最高产物量,反应时间是确定最佳反应条件中的一个关键因素。由图 2 可以看出,前 12 h 产物得率从 0 增至 66.5%,变化显著;后 12 h 产物得率从 66.5% 仅增至 78.5%;24 h 后产物得率几乎不变化。考虑生产效率,选择 12 h 作为反应终点。当然,反应所达平衡态所需的时间的长短还与反应温度有关。反应温度越高,酶催化速率越快,所需反应时间就

越短;反之,就越长。

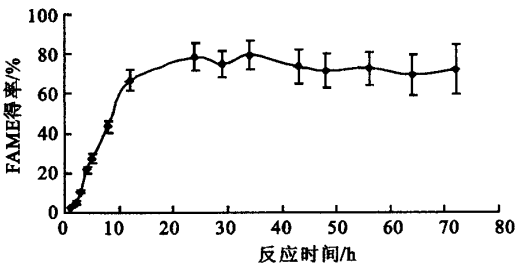


图 2 反应时间对脂肪酸甲酯得率的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on the yield of FAME

2.3 脂肪酶量对醇解反应得率的影响

从表 1 可知,随着反应时间的增加,FAME 的产量逐渐增加,同时发现随着酶量的增加,最终 FAME 得率增加,但当酶量增至 60% 时,最终得率反而有所下降。这说明酶的过量加入,酶与底物的接触已达饱和,FAME 产率不再增加,过量的酶反而会增加反应过程中的传质阻力。因而酶量选择 50% 为宜。

表 1 脂肪酶量对脂肪酸甲酯得率的影响

Tab. 1 Effect of lipase dosage on yield of FAME

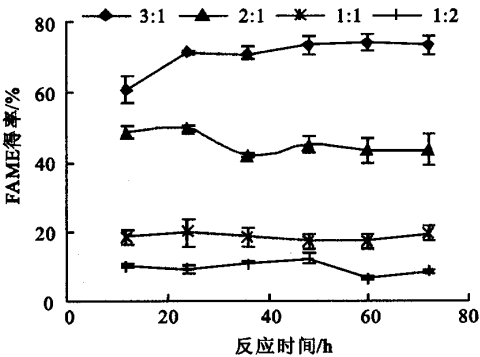
反应时间/h	加入不同酶量下的 FAME 得率 /%			
	10%	30%	50%	60%
7	22.74±1.91	56.76±3.31	75.13±3.84	73.41±2.88
12	25.72±3.41	72.28±4.55	81.86±4.87	84.66±8.09
24	28.66±6.19	72.32±5.16	89.51±0.93	84.92±5.53
36	33.20±3.78	76.32±3.56	93.70±6.24	89.38±6.60
48	32.67±7.83	79.08±1.95	92.75±0.22	88.63±0.73

2.4 底物比率对醇解反应得率的影响

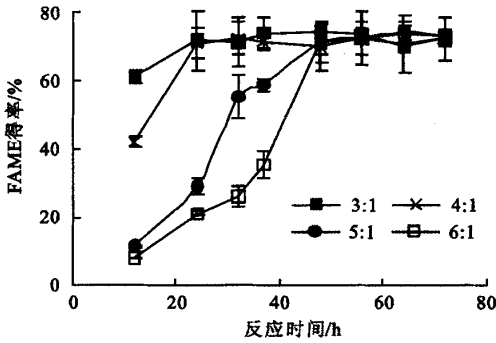
当甲醇与菜籽油的底物摩尔比小于 3 : 1 时,最终得率随着醇油比的增加而增加,见图 3(a)。当醇油摩尔比大于 3 : 1 时,最终得率并没有呈现递增或减小的趋势,见图 3(b)。这说明,甲醇为 3 摩尔时,底物与酶的接触已达饱和。从图 3(b)还可以看出,随着底物摩尔比的增加,虽然最终产率并未减少,但达到反应平衡点的时间在延长。

过量甲醇会导致脂肪酶的失活^[11-13]。图 3(b)中发现甲醇对脂肪酶的毒害作用并不体现在减少最终产率上,而是影响了反应初速度,体现在影响到达平衡态所需时间。这可能由于固定化酶 Lipozyme TL IM 是一种具有良好耐有机溶剂特性的脂肪酶,另外可能是脂肪酶在甲醇中为积累中毒,单次试验不影响产率,但仍会大大减少固定化酶的使用寿命,杜伟等人的试验中也得到这个结论^[15-16]。

Taichi Samukawa^[14]等人研究甲醇浓度与反应初速率的关系认为,随着甲醇浓度的增加,反应初速度增大,而超过一定量,随着甲醇浓度的增大而反应初速度的减小。本试验中甲醇浓度与反应初速度也呈现此规律。



(a) 底物醇油比 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 下的时间进程曲线



(b) 物醇油比 3:1,4:1,5:1,6:1 下的时间进程曲线

图 3 底物醇油比对脂肪酸甲酯得率的影响

Fig. 3 Effect of substrate ratio on the yield of FAME

2.5 水分质量分数对醇解反应的影响

在有机介质中,微量水对维持酶的构象以及发挥催化作用是必需的。在一定范围内,随着水分的增加,酶活也逐渐提高,但过多的水分会导致酶活降低^[4]以及甘油三酯的水解^[5-6]。因而特定反应须要确定其水分含量。本研究中使用的固定化酶 *Lipozyme TL IM*,其固定介质是硅胶,水分含量过高,会使脂肪酶溶解。试验发现水分质量分数在 5% 时,产率最高,结果见图 4。

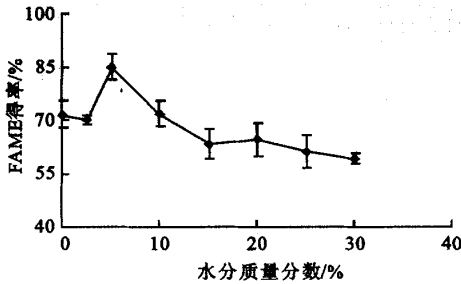


图 4 水分质量分数对脂肪酸甲酯得率的影响

Fig. 4 Effect of water content on the yield

2.6 转速对醇解反应的影响

提高摇床转速可以减小传质阻力,增加底物与酶的接触,因此可提高其反应得率。由图 5 可见,当转速增加时,FAME 得率增加,但当转速大于 150 r/min 时,不影响产率,说明此时传质阻力已达最小。

2.7 有机溶剂对醇解反应的影响

大量研究证明,有机溶剂可以改变酶的催化活性^[7-9],但有机溶剂改变酶催化活性的机制还存在争议^[7,10]。有人建议用溶剂的极性参数 $\lg P$ 来反映有机溶剂对酶活的影响^[10]。表 2 表明,选用 $\lg P > 2$ 的有机溶剂适用于 *Lipozyme TL IM* 催化醇解反应的反应介质,正己烷是最适宜的反应介质。这可能由于在 $\lg P < 2$ 的极性溶剂中,溶剂极性极强,容易夺取酶分子表面水分而降低酶活,而疏水性强的

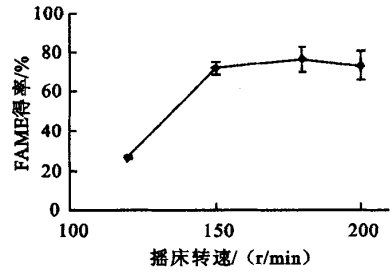


图 5 转速对脂肪酸甲酯得率的影响

Fig. 5 Effect of shaking speed on the yield of FAME

溶剂可以保持酶分子的必需水分。

表 3 表明,正己烷加入量大于 8 mL 时,底物浓度的降低显著影响了产物得率。同时考虑到反应过程中的多次取样不影响底物浓度以及成本问题,选择 5 mL 的加入量最适宜。

表 2 溶剂对脂肪酸甲酯得率的影响

Tab. 2 Effect of solvent on the yield of FAME

溶剂	lgP	FAME 得率/%
异辛烷	4.5	60.42±3.14
正庚烷	4.0	49.18±2.12
正己烷	3.5	70.75±4.56
氯仿	2.0	16.11±2.30
乙醚	0.85	24.87±1.24
乙酰乙酯	0.68	18.42±2.12
无溶剂	—	35.42±1.73

表 3 添加正己烷的量对脂肪酸甲酯得率的影响

Tab. 3 Effect of hexane volume on the yield of FAME

加入正己烷体积/mL	FAME 得率/%
3	74.14±2.15
5	73.35±4.76
8	73.33±6.22
10	53.30±1.78

2.8 最佳条件试验

综合以上单因子实验的最佳条件,即在加入 5 mL 正己烷的有机体系下,醇油比为 3:1,加入酶量 50%,反应温度选择 50℃,添加 5% 的水分,摇床转速 150 r/min,反应 12 h 后脂肪酸甲酯得率可以达到(92.3±5.12)%。

3 结 语

1)作者将酶量、底物比、反应时间、反应温度、转速、水分添加量、有机溶剂作为产物得率的影响因素,所得的最佳反应条件为 5 mL 正己烷的有机体系,醇油比为 3:1,酶量 50%,反应温度 50℃,添加 5% 的水分,摇床转速 150 r/min。

2)试验中采用的 *Lipozyme TL IM* 是一种 1,3-

位置特异性的脂肪酶,理论上最高产率应为66%,但由于实际反应过程中发生了酰基转移,2位的酰基转移到了1位和3位,因而继续被脂肪酶催化^[6,11],从而产率会远大于66%。因而 Lipozyme TL IM 可应用于生物柴油生产。

3)据文献[16—19]可知,一次性加入甲醇所需最适酶量远远大于分次加入甲醇试验中所需的酶量^[17],且分次加入甲醇后的产率会增高。从降低生产成本来考虑,分次加入甲醇是本研究的一个可行改进方法。

参考文献(References):

- [1] Yuji Shimada, Yomi Watanabe, Akio Sugihara, et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17: 133—142.
- [2] Mohamed M Soumanou, Uwe T Bornscheuer. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33: 97—103.
- [3] Yuanyuan Xu, Wei Du, Dehua Liu, et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1239—1241.
- [4] Volklin D B, Staubli A, Langer R, et al. Enzyme thermo inactivation in anhydrous organic solvents[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 843—853.
- [5] Zaks A, Russell A J. Enzymes in organic solvents properties and applications[J]. *J Biotechnol*, 1988, 8: 259—270.
- [6] Xu X B. Enzyme production of structured lipase; process reactions and acyl migration[J]. *INFORM*, 2000, 11: 1121—1130.
- [7] Hirata H, Higuchi K, Yamashina T. Lipase-catalysed transesterification in organic solvent: effect of water and solvent thermal stability and some application[J]. *J Biotechnol*, 1990, 14: 57—167.
- [8] Welsh W F, Murray W D, William R E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1989, 9: 105—108.
- [9] Lanne C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30: 81—87.
- [10] Lanne C, Boeren S, Vos K. Optimizing organic solvents in multi-liquid phase biocatalysis[J]. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 251—252.
- [11] Hideki Fukuda, Akihiko Kond, Hidei Noda. Biodiesel fuel production by transesterification of oils[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(5): 405—416.
- [12] Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu, et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production[J]. *Journal of Molecular Catalysis B*, 2005, 37: 68—71.
- [13] Masaru Kaieda, Taichi Samukawa, Akihiko Kondo, et al. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(1): 12—15.
- [14] Taichi Samukawa, Masaru Kaieda, Takeshi Matsumoto, et al. Pretreatment of immobilized candida antarctica lipase for biodiesel fuel production from plant oil[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(2): 180—183.
- [15] Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, 38: 103—106.
- [16] 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(7):1727—1730.
GAO Jing, WANG Fang, TAN Tian-wei, et al. Synthesis of biodiesel from waste oil by Immobilized Lipase[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2005, 56(7): 1727—1730. (in Chinese)
- [17] 徐圆圆,杜伟,刘德伟,等.非水相脂肪酶催化大豆油脂合成生物柴油的研究[J].现代化工,2003,23:167—169.
XU Yuan-yuan, DU Wei, LIU De-wei, et al. Study on lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in non-aqueous medium[J]. *Modern Chemical Industry*, 2003, 23: 167—169. (in Chinese)
- [18] 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):98—101.
DENG Li, TAN Tian-wei, WANG Fang. Studies of enzymatic synthesis of biodiesel[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19(1): 98—101. (in Chinese)
- [19] 张晓鸣,周健,刘巧瑜,等.有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):120—126.
ZHANG Xiao-ming, ZHOU Jian, LIU Qiao-yu, et al. Application of lipase-catalyzed synthesis in organic solvent for food and related industry[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1): 120—126. (in Chinese)
- [20] Lilin Li, Wei Du, Dehua Liu, Li Wang et al. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006(43): 58—62.

(责任编辑:李春丽)