

微水相超声波协同固定化脂肪酶催化酯交换过程优化

廖凯波¹, 曾虹燕^{*}, 邓欣², 姜和¹, 夏葵¹

¹湘潭大学化工学院, 湘潭 411105 ²中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 昆明 650223

摘要: 超声波协同固定化脂肪酶催化制备生物柴油的最佳工艺条件为: 超声波功率 70 W、叔丁醇为反应介质、叔丁醇用量 3% (v/v)、醇油比 3:1 且甲醇分三批加入、反应温度 40℃、水含量为 2% (v/v)。副产物甘油对固定化脂肪酶使用寿命影响最大, 使用后的固定化脂肪酶用丙酮洗去表面的甘油, 进行酯交换反应, 酶的稳定性大为提高, 可连续使用 16 批次。

关键词: 固定化脂肪酶; 生物柴油; 超声波; 微水相; 酯交换

中图分类号: R 284.1; Q 946.91; TQ 645.1 文献标识码: A

Optimized Process of Biodiesel on Immobilized Lipase Catalyst Assisted with Ultrasonic Radicalization in Microaqueous Media

LIAO Kai-bo¹, ZENG Hong-yan^{*}, DENG Xin², JIANG He¹, XIA Kui¹

¹Chemical Engineering Xiangtan University, Xiangtan 411105, China; ²Biomass Group,

Xishuangbanna Tropical Botanical Garden Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China

Abstract Assisted with ultrasonic radicalization in microaqueous media, the optimized conditions of preparation biodiesel catalyzed by the immobilized lipase were confirmed. The optimized conditions such as ultrasonic power 70 W, *n*-butyl alcohol amount 3% (v/v of oil), molar ratio of the methanol to oil 3:1, 40℃, water 2% (v/v of oil) when adding methanol according to the same proportions three times obtained a maximum ester yield 98.6%. By-product glycerol was the key point to influence the catalyst service life. If removing the glycerol on the surface of the immobilized lipase, it could be used for 16 times.

Key words the immobilized lipase; biodiesel; ultrasonic; microaqueous media; transesterification

生物柴油是利用动植物油脂等可再生资源提取制造出来的可以替代石化柴油清洁安全的新型燃料, 具有可再生、易生物降解、无毒、含硫量低和废气中有害物质排放量小等优点, 属环境友好型燃料^[1-5]。以植物油、动物油和废食用油等为原料与醇(甲醇、乙醇、丁醇)酯交换反应, 产物即为生物柴油(脂肪酸甲酯), 副产物为甘油。

脂肪酶是一类特殊酯键水解酶。脂肪酶催化制备生物柴油由于其工艺简单, 条件温和, 反应时间短, 环境友好, 无三废, 副产物甘油易分离等优点, 成为国内外研究的热点。陈志锋等^[6]固定化脂肪酶 Novozym 435 催化高酸废油脂与乙酸甲酯酯交换生产生物柴油, 12 h 后甲酯收率达 85.9%。唐良华等^[7]用青霉 *Penicillium* sp. TS414 发酵产脂肪酶催

化制备生物柴油, 反应 72 h 甲酯收率达 96%。CN1923960 微生物发酵油脂及其用于制备生物柴油的方法, 采用未固定的啤酒酵母菌, 价格低廉, 但使用寿命短, 易失活。CN1891786 乌柏油制备生物柴油的生产技术和 CN1730613 生物催化高酸值油脂进行酯交换反应生产生物柴油的方法, 采用的菌株为南极假丝酵母, 其商品价格较高, 酶活化繁琐且易失活。CN1687313 一种不同脂肪酶细胞相结合生产生物柴油的工艺, 固定化细胞为 *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* 和 *Rhizomucor miehei*, 固定化后酯交换制备生物柴油, 但这些固定化细胞的商品价格昂贵, 酶活不稳定, 半衰期短。

针对脂肪酶催化制备生物柴油中反应时间长, 商品酶价格高, 酶的使用寿命短等问题, 本文提出超声波协同固定化脂肪酶催化制备生物柴油, 已申报专利 CN 101230320A。通过复合诱变筛选出面包酵母菌株 DX213, 该面包酵母产脂肪酶经纳米晶镁铝 LDH 固定化后酶活性强、使用寿命高长、价格低廉、

收稿日期: 2008-07-09 接受日期: 2009-03-25

基金项目: 国家“863”项目 (2003AA214061)

* 通讯作者 Tel 86-015973236095; E-mail: hyzeng@xtu.edu.cn

抗酸性强。在超声波反应器中,该固定化酶催化制备生物柴油,反应 30 min 甲酯产率达 98.6%。

1 实验部分

1.1 固定化脂肪酶的制备

将 100 mg 脂肪酶溶解在 5 mL 0.1 mol/L pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中,5000 r/min 离心 4 次,每次 3 min,吸取 5 mL 脂肪酶上清液并加入 8 g 纳米晶镁铝水滑石,磁力搅拌 1.5 h,加 20 mL 冷丙酮,布氏漏斗过滤,再加 20 mL 冷丙酮洗涤,冷冻干燥,即得固定化脂肪酶。

1.2 生物柴油的制备

见文献^[4]。

1.3 生物柴油的分析方法

1.3.1 生物柴油气相色谱分析方法

见文献^[4]。

1.3.2 生物柴油薄层层析分析方法

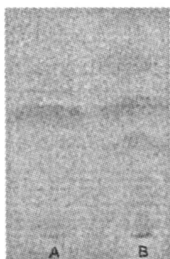


图 1 生物柴油成分薄层层析分析

Fig. 1 TLC analysis of biodiesel component

A. 脂肪酸甲酯标样; B 酶催化酯交换产物

A. Standard of methyl ester B. Component of biodiesel prepared by using immobilized lipase as catalyst

将上述制备的生物柴油精炼后,薄层层析检测。吸附剂:硅胶板 GF₂₅₄;展开剂:三氯甲烷-丙酮(24:1, v/v);显色剂:碘;薄层层析用量:2~5 μ L。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂

有机溶剂作为反应介质,在酶的有机相催化反应中起重要作用。有机溶剂由于其惰性使得脂肪酶的天然构型变化较小,此外有机溶剂在反应体系中可构建一个较低水活度的反应环境,提高酯化和水解反应的热力学和动力学进程。另外,根据相似相溶原理,有机底物会在有机溶剂中具有较高的溶解度,提高了传质传热效率,从而提高反应速度。同时,固定化脂肪酶不溶于有机介质,易于分离回收再

利用。本文选择正己烷、叔丁醇、丙酮、四氢呋喃、无溶剂等几种反应体系,在超声波功率 70 W,醇油比 3:1,甲醇均分三批(每隔 10 min)加入,反应 30 min,考察有机溶剂对酯交换反应的影响,其结果见图 2。从图 2 知,叔丁醇作为有机溶剂,在酯交换反应的甲酯收率为 97.1%。

以四氢呋喃作溶剂,甲酯收率为 96.1%,与叔丁醇的并无太大差异,但因四氢呋喃价格较高且对脂肪酶的毒副作用。因此,选叔丁醇作有机溶剂。

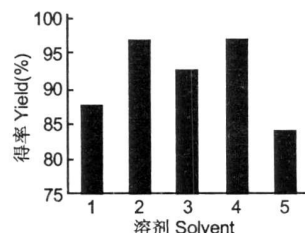


图 2 反应介质对酯交换反应的影响

Fig. 2 Influence of transesterification with different organic media

1 丙酮 Acetone 2 四氢呋喃 furaniline 3 正己烷 n-hexane 4 叔丁醇 tert-butyl alcohol 5 无溶剂 no solvent

2.2 叔丁醇用量

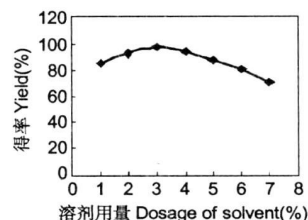


图 3 有机溶剂用量对酯交换反应的影响

Fig. 3 Influence of transesterification with different amount of tert-butyl alcohol

超声波功率 70 W,醇油比 3:1,甲醇均分三批(每隔 10 min)加入,反应 30 min,考察叔丁醇用量对酯交换反应的影响,其结果见图 3。从图 3 可知,随着叔丁醇的加入,酯交换反应收率缓慢上升,当叔丁醇用量为菜子油 3% (v/v) 时,酯交换反应收率高达 97.1%,叔丁醇用量进一步加大,反应收率逐渐降低。可能由于低含量叔丁醇可以降低反应体系的黏度,甲醇更易均匀分散于溶液中,使固定化酶与菜子油能够更有效地接触从而加速酯交换反应,所以适量的叔丁醇对反应是有利的。但过多的溶剂使得反应底物的浓度过低,从而使反应收率降低。所以,叔丁醇最佳用量为菜子油的 3% (v/v)。

2.3 醇油比

超声波功率 70 W, 3% 叔丁醇, 反应 30 min, 醇油摩尔比对菜子油酯交换反应的影响见图 4。从图 4 可知, 当反应混合物中的甲醇含量较低时 (醇油摩尔比小于 1), 甲醇收率均可达 99.3%, 甲醇几乎完全参加反应。醇/油摩尔比为 1~2.5:1 时, 甲醇收率随醇油摩尔比的增大缓慢下降, 醇油摩尔比超过 2.5:1 时, 甲醇收率随醇油摩尔比的增大而急剧下降。可能由于甲醇与油脂不相溶, 甲醇含量高, 从而使酶微环境中甲醇浓度高, 导致酶蛋白变性; 同时高浓度甲醇剥夺酶的“必需水”间接导致酶的失活。说明甲醇对脂肪酶有较强的毒副作用, 脂肪酶催化反应时, 不能一次性加入过多甲醇。综合考虑, 一次加入甲醇不宜过多, 一次性加入反应体系中最佳醇油摩尔比 1:1。

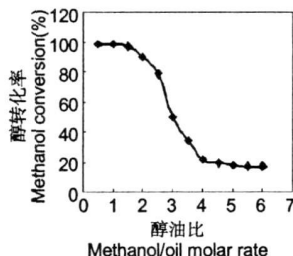


图 4 醇油比对酯交换的影响

Fig 4 Influence of transesterification with different methanol/oil molar ratio

2.4 甲醇加入次数

为了提高产物中甲酯含量, 避免酶的失活, 本文采用了分批加入甲醇, 实验结果如图 5 所示。甲醇 1 次加入和分批加入在相同条件下反应 30 min (图 5), 1 次加入甲酯收率仅为 54.1%; 而甲醇分 3 次加入甲酯收率高达 98.6%, 第 1 次加入甲醇反应 10 min 后甲酯收率为 32.7%, 第 2 次加入并继续反应 10 min, 甲酯收率为 65.8%, 第 3 次加入甲醇反应

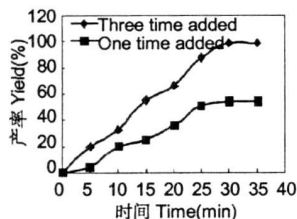


图 5 甲醇加入方式对酯交换的影响

Fig 5 Influence of transesterification with different added times

10 min, 甲酯收率高达 98.6%。甲醇不宜一次性加入, 否则易引起酶的失活^[8], 而采用分批加入甲醇是提高甲酯收率行之有效的方法。因此, 酶催化植物油酯交换反应最适醇与油摩尔比为 3:1, 甲醇分 3 次加入, 可提高甲酯收率。

2.5 温度对酯交换反应的影响

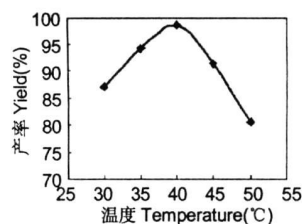


图 6 温度对酯交换反应的影响

Fig 6 Influence of transesterification with different temperature

温度是影响固定化酶催化反应的一个重要参数, 选择适当反应温度既可提高反应速率, 又有助于延长酶使用寿命, 利于反应平衡向产物生成的方向移动。在一定的温度范围内, 温度升高, 传质传热效率增高, 固定化酶反应速率加快; 但温度过大时, 由于酶蛋白变性, 酶活性下降, 酶催化反应速率下降。本实验考察温度 30、35、40、45、50 °C 时酶催化酯交换收率的影响, 其结果见图 6。从图 6 可知, 酯交换收率随温度的升高而升高, 温度 40 °C 时, 甲酯收率高达 98.6%。温度超过 40 °C, 收率随温度升高迅速下降。因为温度继续攀升, 固定化酶酶活性下降, 超声波空化作用导致反应系统中的甲醇挥发至气相中, 使液相中甲醇浓度降低, 致使反应收率下降。

2.6 水含量对酯交换反应的影响

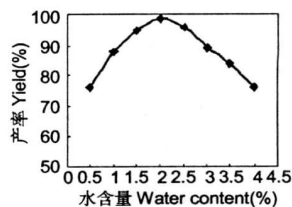


图 7 水含量对酯交换反应的影响

Fig 7 Influence of transesterification with different amount of water

在有机介质固定化酶催化反应中, 微量水对酶催化是必需的。这主要是因为, 酶的活性取决于被酶分子吸附的水分, 因此要有足够的水分吸附在酶分子的微环境中才能保证酶分子的正常催化功

能^[9]。水参与酶天然构象中所有的非共价键间的相互作用,包括氢键、静电作用、疏水相互作用和 Van der Waals 力^[10]。有机溶剂中存在着少量的水时可以增加酶的水化程度,在结构上增加酶的柔韧性,提高酶活。水含量对酯交换反应的影响见图 7。从图 7 可知,固定化脂肪酶催化酯交换,甲酯收率随水含量(0.5% ~ 2.0%)的增加而增大。水含量为 2% 时,甲酯收率最高,为 98.4%。此时,固定化脂肪酶分子表现出最大活性,脂肪酶具最佳含水量,这些“必需水”与酶分子表面的亲水基团相互作用,改变酶分子内氢键,使酶分子结构变得松散,酶的活性构象处于最佳状态。当水含量(大于 2.0%)继续增加时,甲酯收率随之降低。由于过量的水使酶聚集成团,增大了传质阻力,降低了固定化酶的催化活性,加速酶的失活过程^[11]。试验结果可知,酯交换反应最佳水含量为 2.0%。

2.7 催化剂使用寿命

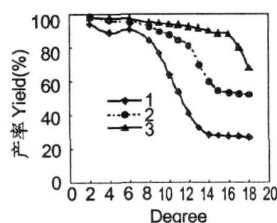


图 8 催化剂使用寿命

Fig 8 Service life of catalyst

1. 游离酶 Free lipase 2. 固定化酶(未洗脱) Immobilized lipase 3. 固定化酶(洗脱甘油) Immobilized lipase (de-glycerin)

叔丁醇为反应介质,醇油摩尔比 3:1,甲醇分三次加入,超声波反应器中反应 30 min,考察固定化脂肪酶使用寿命对酯交换反应的影响,其结果见图 8。从图 8 知,固定化脂肪酶催化剂重复使用 9 次,酯交换率仍高达 90%,催化剂使用 12 次,甲酯收率降至 81.4%,此后随使用次数的增加,甲酯收率急剧下降。其原因可能由于叔丁醇为一种支链化程度很高的短链醇,具有 3 个甲基,形成较大的空间位阻,可促进甲醇和甘油在反应体系中的溶解,在适当比例下,使整个反应体系呈均相,有效地解除了底物甲醇和产物甘油对固定化脂肪酶的抑制作用。但随着反应的进行,甘油在酶表面富集,从而导致酶在使用 12 次后酯交换收率急剧下降。

为确定甲酯收率受副产物甘油的影响,将已用固定化酶从反应液中滤出,正己烷洗涤固定化酶,除去植物油及甲酯。水洗涤固定化酶,离心,得到粘稠

液体。将粘稠液体配制成 0.7 g/100 mL 溶液,其紫外吸收曲线与甘油标准紫外吸收曲线一致。为进一步证明固定化脂肪酶表面吸附的为甘油,将粘稠液体的红外图谱与甘油标准红外图谱相比较(图 9),从图 9 可知,粘稠液体的红外图谱与甘油标准红外图谱基本一致,即可表明附着于固定化脂肪酶表面的粘稠状液体为甘油。一些亲水性的有机溶剂可溶解甘油,对酶活影响较小,故用丙酮替代水洗脱固定化脂肪酶表面甘油,进行酯交换反应,结果发现,水洗脱固定化脂肪酶催化所得甲酯收率为 58.7%,丙酮洗脱后固定化脂肪酶催化所得甲酯收率 98.4%。丙酮洗脱后固定化酶的稳定性大为提高,连续反应 16 批次后,甲酯收率 88.1%。从结果可知,吸附在固定化酶载体表面的甘油可降低固定化酶催化活性。

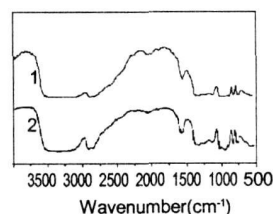


图 9 甘油的红外图谱

Fig. 9 IR spectra of glycerol

1. 甘油标准红外图谱 Standard IR spectra of glycerol 2. 甘油图谱 IR Spectra of glycerol

3 结论

3.1 超声波协同固定化脂肪酶催化酯交换制备生物柴油的最佳工艺条件: 超声波反应器功率 70 W、叔丁醇为反应介质、叔丁醇用量 3% (v/v)、醇油比 3:1 且甲醇分三批加入、反应温度 40 °C、水含量为 2% (v/v)。在此最优条件下,脂肪酸甲酯产率高达 98.6%。

3.2 影响固定化脂肪酶使用寿命的主要物质是副产物甘油,使用后的固定化脂肪酶用丙酮洗去表面的甘油,进行酯交换反应,酶的稳定性大为提高,可连续使用 16 批次。

参考文献

- Demibas A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterification and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management*, 2003, 44: 2093-2109

(下转第 865 页)

运动负荷的适应性降低及蛋白质和含氮化合物的分解代谢作用加强, 血尿素氮增加就越明显。本实验研究可见, 霞水母糖蛋白中、高剂量组的肝糖原储备量明显高于对照组, 具有增加机体肝糖原的储备作用; 血尿素氮明显低于对照组, 具有减少血清尿素氮产生的作用; 运动后的血乳酸值均明显低于对照组, 因此能够加快运动后血乳酸水平的恢复^[3]。本研究中各项实验结果有剂量一效应关系, 剂量越高效应越明显。

根据功能学评价检验方法, 实验小鼠负重游泳实验结果阳性, 血乳酸、血清尿素、肝糖元三项生化指标中任二项指标阳性, 可判定该受试样品具有缓解体力疲劳功能的作用^[7]。本实验在实验小鼠负重游泳实验结果阳性基础上, 其余三项生化指标均阳性, 因此可判定霞水母糖蛋白能改善机体能量代谢, 加速肝糖原分解供能, 减少蛋白质和含氮化合物分解, 从而降低血尿素氮, 具有抗疲劳作用。

参考文献

- 1 Ge LJ(葛利君), He DM(何德民). The marking signal of ecosystem crisis *Chin Marine Products*(中国水产), 2004 9 23-25.
- 2 Huang JS(黄建设), Long LJ(龙丽娟), Zhang S(张僊), *et al* Progress in the research on marine natural products and their physiological activities *Marine Sci Bull*(海洋通报), 2001, 20 83-91.
- 3 Wang YW(王彦武), Fu WZ(傅伟忠), Tan ZY(谭宗艳), *et al* Experimental study on the anti-fatigue action of wolfberry fruit *China Trop Med*(中国热带医学), 2006 6 1522-1523.
- 4 Zhang WJ(张惟杰). The Sugar Compound Bio-chemical Studies and Technique(糖复合物生化研究技术). Hangzhou Zhejiang University Press 1999 12-13.
- 5 Suo YR(索有瑞), Wang HL(王洪伦), Li YL(李玉林), *et al* The anti-fatigue effect of *Nitraria tangutorum* Bobr seed oil from Qaidam basin on the mice *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2006 18 88-91.
- 6 Chen YM(陈玉满), Zhang HR(章荣华), Wu HL(吴惠岭), *et al* The experiment observation of the Chinese herbal medicine anti-fatigue function *Zhejiang Prev Med*(浙江预防医学), 2004 16 39.
- 7 Zhang RP(张荣平), Zhao Y(赵昱). The Theories and The Experiment of Chinese Food and Health Care Food(中国食品和保健食品的理论与实践). Kunming Yunnan Science and Technology Press 2003 105.
- 2 Stat FP, Gateau C. The effects of rapeseed oil methyl ester on diesel engine performance, exhaust emissions and Long-Term behavior-A summary of three years of experimentation *Transaction of the ASAE*, 1995, 26 164-169.
- 3 Deng X(邓欣), Zeng HY(曾虹燕), Feng Z(冯震). The preparation mechanism and anti-toxicity study on nano-crystalline Mg-Al hydrotalcite *Function Material*(功能材料), 2007, 38 965-97.
- 4 Deng X(邓欣), Zeng HY(曾虹燕), Feng B(冯波). Optimization preparation of biodiesel on immobilized lipase catalyst *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008 20 113-116.
- 5 Goering CE, Campion RN. In vegetable oil fuels, proceeding of the international conference on plant and vegetable oils as fuels North Dakota American Society of Agricultural Engineers 1982 279-286.
- 6 Chen ZF(陈志锋), Wu H(吴宏), Zong MH(宗敏华). Transesterification of waste oil with high acid value to biodiesel catalyzed by immobilized lipase *Chin J Catalysis*(中国催化学报), 2006 27: 146-150.
- 7 Tang LH(唐良华), Su M(苏敏). Research on synthesis of biodiesel by enzymatic catalysis *Biotechnology*(生物技术), 2003 13 42-44.
- 8 Shimada Y, Watanabe Y, Sanukawa A, *et al* Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized candida antarctica lipase *J Am Oil Chem Soc* 1999, 76 789-793.
- 9 Watanabe Y, Sugihara A, Tanigawa Y. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized Candida antarctica lipase *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002 17 151-155.
- 10 Gao J(高静), Wang F(王芳), Tan TW(谭天伟), *et al* Synthesis of biodiesel from waste oil by immobilized lipase *J Chem Indus Engin China*(化工学报), 2005 56 1727-1730.
- 11 Wang XW(王学文), Chang J(常军). Preparation of biodiesel oil from soybean oil on immobilized lipase catalyst *Petrochem Tech*(石油化工技术), 2005 32 855-858.

(上接第 874 页)