

# 新型反应介质中脂肪酶催化多种油脂制备生物柴油

李俐林, 杜伟, 刘德华, 李泽波, 王利

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

**摘要:** 用叔丁醇作为反应介质, 利用固定化脂肪酶催化油脂原料甲醇醇解反应制备生物柴油, 消除了甲醇和甘油对酶的负面影响, 酶的使用寿命显著延长. 用菜籽油作原料, 叔丁醇和油脂的体积比为 1:1, 甲醇与油脂的摩尔比为 4:1, 3%的 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 和 1%的 Novozym 435 结合使用, 35℃下 130 r/min 反应 12 h, 生物柴油得率可达 95%. 该工艺在 200 kg/d 的规模下制得的生物柴油产品完全满足美国和德国生物柴油标准, 脂肪酶重复使用 200 批次, 酶活性基本没有下降. 且在叔丁醇介质体系中大豆油、桐籽油、棉籽油、乌柏油、泔水油、地沟油和酸化油都能被有效转化成生物柴油且脂肪酶保持很好的稳定性.

**关键词:** 生物柴油; 叔丁醇; 脂肪酶; 稳定性

**中图分类号:** TQ22      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2006)05-0799-05

## 1 前言

酶法制备生物柴油就是采用生物酶(通常为固定化脂肪酶)作催化剂, 催化油脂原料与短链醇(通常为甲醇), 通过转酯化反应得到脂肪酸甲酯(Fatty Acid Methyl Ester, FAME), 即生物柴油. 目前酶法制备生物柴油的瓶颈主要在于反应物甲醇对酶存在毒性<sup>[1-6]</sup>以及副产物甘油吸附在酶表面阻碍了反应物向酶扩散而降低反应速率<sup>[6]</sup>, 从而影响了酶的活性及稳定性.

根据 Shimada 等<sup>[5,7]</sup>的报道, 甲醇在油中的溶解度为 1.4 mol/L, 过量甲醇与酶接触会引起酶失活. 将反应所需甲醇一次性加入反应体系中, 固定化脂肪酶会立刻失活, 回用第 2 批转化率急剧降低. Shimada 等<sup>[7]</sup>采用分步加入甲醇的方法可以大大降低甲醇对酶的毒性, 但吸附在酶表面的甘油不断累积, 需要定期用溶剂洗涤, 操作较繁琐, 且整个反应过程耗时较长, 3 步反应共需 48 h. 也有不少研究用有机溶剂作为反应介质, Mohamed 等<sup>[8]</sup>的研究表明, 亲水性强的有机介质如丙酮(辛醇/水分配系数  $\log P = -0.23$ )中多种脂肪酶的活性均很低, 48 h 油脂转化率均未超过 25%; 在疏水性的有机介质如正己烷( $\log P = 3.5$ )中酶保持较高的活性<sup>[8-10]</sup>, 但是甲醇和甘油不能在疏水性溶剂中充分溶解, 对酶催化反应的负面影响仍旧存在, 固定化酶回用几批后活性就开始下降<sup>[11,12]</sup>.

本工作首次提出以叔丁醇作为反应介质进行酶促不同油脂原料甲醇醇解反应制备生物柴油. 虽然叔丁醇也是短链醇, 但由于其支链化程度高, 具有 3 个甲基, 形成较大的空间位阻, 难与油脂进行转酯反应, 特别是

当有甲醇存在时, 叔丁醇几乎不与油脂反应, 只是作为反应介质.

叔丁醇本身对脂肪酶没有毒性, 而作为一种相对亲水的有机溶剂( $\log P = 0.8$ ), 又能促进甲醇和副产物甘油在反应体系中的溶解, 在适当比例下, 整个反应体系呈均相(除固定化酶外), 故甲醇及甘油对酶催化活性和稳定性的负面影响可以完全消除, 酶的使用寿命显著延长. 本工作对该体系中不同反应过程参数进行了系统优化, 同时, 为进一步降低生物酶成本, 提出可将不同催化性能的酶结合使用, 大大提高催化效率的同时, 大幅度降低了酶的成本, 并考察了新体系对多种油脂原料的适用性, 从而使该新工艺生物酶法生产生物柴油经济可行.

## 2 材料与实验方法

### 2.1 实验材料

菜籽油、大豆油、桐籽油、棉籽油、乌柏油、酸化油、泔水油和地沟油当地购买; 固定化脂肪酶 Lipozyme TL<sup>TM</sup> (TL)和 Novozym 435(N435)由诺维信公司提供; 脂肪酸甲酯标准品: 肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯、花生酸甲酯、花生稀酸甲酯、芥酸甲酯和十七碳酸甲酯购于 Sigma 公司, 色谱纯. 其他试剂均为分析纯.

### 2.2 转酯化反应

(1) 摇瓶实验: 将油脂、甲醇和叔丁醇以一定的比例混合, 装入 50 mL 锥形瓶中, 混合均匀后加入适量脂肪酶, 置于恒温摇床中在 35℃和 130 r/min 条件下进行反应, 定时取样进行分析.

收稿日期: 2005-11-29, 修回日期: 2006-02-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2003AA2146061)

作者简介: 李俐林(1982-), 女, 四川省广安市人, 硕士研究生, 应用化学专业, E-mail: lililin03@mails.tsinghua.edu.cn; 刘德华, 通讯联系人, Tel: 010-62794742, E-mail: Dhliu@tsinghua.edu.cn.

(2) 中试反应器实验: 将油脂、甲醇和叔丁醇以一定比例混合, 装入储料罐中, 经泵打入环流反应器中, 加入适量脂肪酶, 在 35℃ 下反应, 定时取样进行分析。

### 2.3 酶的稳定性

一批反应结束后, 将剩余反应物和产物小心倒出, 再向锥形瓶中加入混合均匀的新鲜反应物, 酶不经任何处理继续进行下一次反应, 每批反应条件相同, 反应时间为 12 h。

### 2.4 分析方法

油脂皂化值的测定采用 GB5534-85, 油脂酸价的测定按照 GB5530-85. 反应混合物中脂肪酸甲酯的含量用气相色谱测定, 色谱条件为 GC-14B 气相色谱仪, FFAP 毛细管柱(0.32 mm×25 m), FID 检测器. 采用程序升温, 柱温 150℃, 维持 0.5 min 后以 15℃/min 的速度升温至 250℃, 再维持该温度 6 min. 进样口温度和检测器温度分别为 245 和 250℃。

$$\text{脂肪酸甲酯得率} = \frac{\text{测得的脂肪酸甲酯含量}}{\text{油脂完全甲酯化应得脂肪酸甲酯含量}} \times 100\%.$$

## 3 实验结果与分析

### 3.1 叔丁醇用量的影响

作为反应介质, 叔丁醇用量的确定对转脂反应非常重要. 叔丁醇用量太少, 甲醇和油脂在叔丁醇中不能完全溶解, 没有溶解的甲醇仍会对脂肪酶产生毒性; 用量过多则相当于稀释了反应物的浓度, 使反应速率降低. 图 1 为不同用量叔丁醇时的油脂转化情况, 选用的脂肪酶为报道较多且价格较便宜的商品化脂肪酶 Lipozyme TL<sup>TM</sup>. 由图可知, 在没有叔丁醇作反应介质的体系中, 一次性加入反应所需的全部甲醇, 酶会严重失活, 所以 12 h 的甲酯得率仅为 10%. 在反应体系中加入叔丁醇作为反应介质, 甲醇的溶解度提高, 对酶的毒性减小,

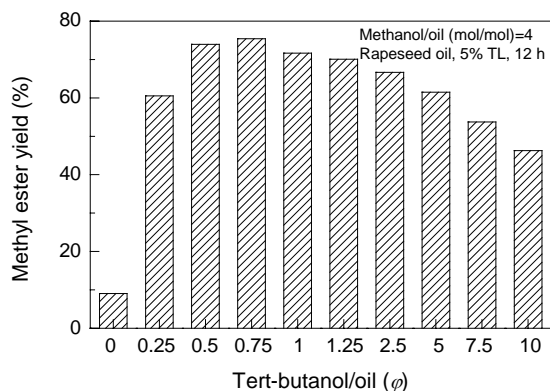


图 1 叔丁醇用量对油脂甲酯化的影响

Fig.1 Effect of tert-butanol quantity on the methanolysis of oil

甲酯得率大幅度提高. 当叔丁醇和油的体积比为 0.5~1.25 时, 甲酯得率较高, 在后续实验中叔丁醇和油的体积比采用 1:1. 继续增加叔丁醇时, 甲酯得率随着叔丁醇用量的增加而减少, 这是由于过度增加叔丁醇量稀释了反应体系中油和甲醇的浓度, 使转酯化反应的速率减慢, 所以 12 h 的甲酯得率减少。

### 3.2 甲醇浓度的影响

甲醇浓度对酯交换反应的影响如图 2 所示. 从图可以看出, 1 mol 菜籽油中加入 4 mol 以上的甲醇并没有使甲酯得率有明显的提高, 故在后续实验中采用 1 mol 菜籽油与 4 mol 甲醇反应。

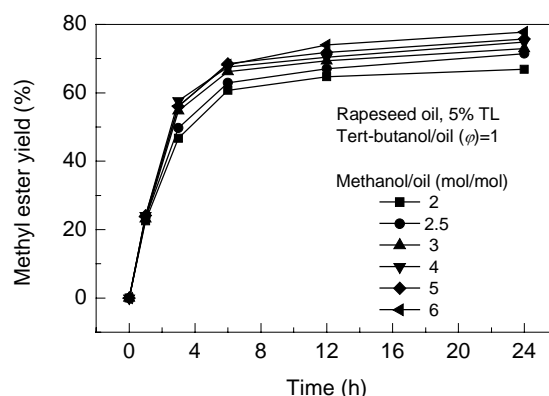


图 2 甲醇浓度对油脂甲酯化的影响

Fig.2 Effect of methanol concentration on the methanolysis of oil

### 3.3 酶量的影响

很多报道<sup>[6,7,10,13]</sup>表明, Lipozyme TL<sup>TM</sup> 和 Novozym 435 催化油脂的甲醇醇解时有较好的活性, 首先分别研究了这两种酶的用量对反应的影响(数据未给出). 因为 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 是一种具有 1, 3 位专一性的脂肪酶, 甲酯最高理论得率为 67%, 虽然油脂在反应过程中存在酰基转移作用, 使甲酯得率得以提高到 67% 以上. 不过由于受酰基转移速度的影响, 甲酯得率要提高到 90% 需要的酶量非常大(20%), 反应时间也较长(>24 h). 而 Novozym 435 催化油脂甲醇醇解时不存在专一性, 且有更高的催化活性, 采用 1% 的 Novozym 435 反应 24 h 的甲酯得率可达 90%. 但 Novozym 435 的价格(8500 元/kg)比 Lipozyme TL<sup>TM</sup>(800 元/kg)昂贵很多, 从甲酯得率和酶的成本两方面考虑, 将 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 和 Novozym 435 混合在一起催化油脂的甲醇醇解, 结果如图 3 所示. 采用 3% 的 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 和 1% 的 Novozym 435 反应 12 h 的甲酯得率能达到 95%. 再增加 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 用量到 4%, 甲酯得率仍为 95%; 而再增加 Novozym 435 用量到 2%, 甲酯得率提高到 97%, 但由于 Novozym 435 的价格昂贵, 生产成本大大增加, 从经济角度考虑, 选用 3% 的 Lipozyme TL<sup>TM</sup> 和 1% 的 Novozym 435.

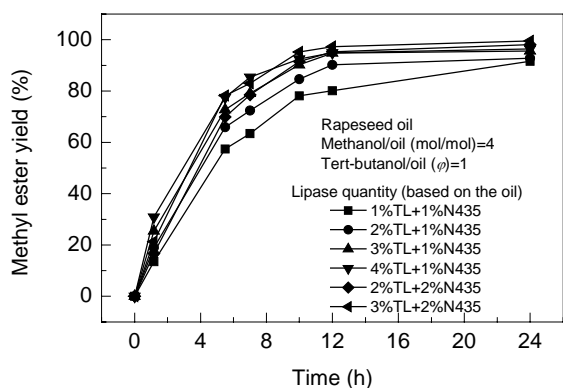


图 3 两种酶相结合催化油脂甲酯化  
Fig.3 Methanolysis of oil using combined lipases

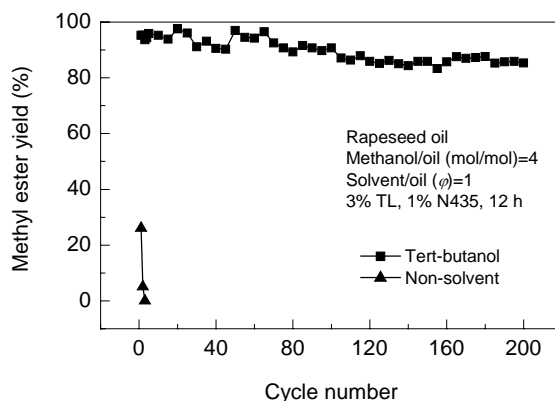


图 4 叔丁醇介质中酶的稳定性  
Fig.4 Operational stability of lipases in tert-butanol medium

### 3.4 酶的稳定性

将固定化酶重复用于催化新鲜底物, 分别研究了无溶剂体系和叔丁醇体系中酶的稳定性, 每批反应均进行 12 h, 反应结果如图 4 所示. 在无溶剂体系中, 甲醇一次性加入反应体系, 脂肪酶迅速失活, 第 1 次反应的甲酯得率仅为 20%, 脂肪酶回用第 3 次就完全失活. 而用叔丁醇作反应介质时, 第 1 次反应的甲酯得率能达到 95%, 酶回用 200 次活性仍没有明显下降.

### 3.5 生物柴油性能检测

用精制菜籽油作原料进行了产 200 kg/d 的中试试验, 在与摇瓶实验相同的反应条件下(图 4), 第 1 次反应的甲酯得率也能达到 95%, 酶在反应器上连续使用 3 个多月后, 甲酯得率仍保持在 85%以上.

通过蒸馏回收溶剂和甲醇, 粗产品再进一步精馏得到精制生物柴油产品(纯度>99%), 产品由中石化石油化工科学研究院石油产品检验实验室检测, 各种物理化学

表 1 精制生物柴油品质  
Table 1 Quality of refined biodiesel

Index	Biodiesel product	ASTM PS121-99	DINE51606	0# diesel	Test method
Sulfur content (%)	0.0009	<0.05	<0.01	<0.2	SH/T 0253
Acid value (KOH) (mg/g)	0.0127	<0.8	<0.5	<0.5	GB/T 7304
Ash content (% , ω)	0.001	<0.02	<0.03	<0.01	GB/T 508
Copper corrosion grade (50 °C, 3 h)	1a	<3	1	1	GB/T 5096
Water content (mg/kg)	Trace	<500	<300	Trace	GB/T 260
Mechanical impurity	None	-	-	None	GB/T 511
Kinematic viscosity (mm <sup>2</sup> /s, 40 °C)	4.362	1.9~6.0	3.5~5.0	3.0~8.0	GB/T 265
Solidifying point (°C)	-10	-	-	-	GB/T 510
Cold filter plug point (°C)	-8	-	0/-10/-20	<4	SH/T 0248
Flash point (°C)	146	>100	>110	>65	GB/T 261
Cetane value	50.1	>40	>49	>45	GB/T 386
Distillation range (°C, 95%)	342.0	-	<360	<365	GB/T 6536
Density (kg/m <sup>3</sup> , 20 °C)	877.1	-	870~900	-	GB/T 1884, GB/T 1885

表 2 不同油脂的品质及脂肪酸组成  
Table 2 Quality and fatty acids composition of different oils

	Rapeseed oil	Soybean oil	Tung oil	Cottonseed oil	Sapium fat
Saponification value (KOH) (mg/g)	175	192	193	195	197
Acid value (KOH) (mg/g)	0.28	0.15	1.17	0.31	0.26
Content of fatty acids (%)					
Myristic acid 14:0	-	-	-	0.5	-
Palmitic acid 16:0	5.2	11.1	2.3	20.4	9.5
Stearic acid 18:0	3.8	4.8	1.9	1.3	2.3
Oleic acid 18:1	41.2	31.2	6.2	14.2	14.6
Linoleic acid 18:2	15.5	50.6	7.4	63.6	29.2
Linolenic acid 18:3	6.1	2.3	-	-	44.4
Elaeostearic acid 18:3	-	-	82.2	-	-
Eicosanoic acid 20:0	0.8	-	-	-	-
Eicosnoic acid 20:1	7.5	-	-	-	-
Erucic acid 22:2	19.9	-	-	-	-
Saturated fatty acids	9.8	15.9	4.2	22.2	11.8
Unsaturated fatty acids	90.2	74.1	95.8	77.8	88.2

特性参数的检测结果见表 1。由表可以看出, 中试试验得到的生物柴油产品既达到了美国和德国的生物柴油标准, 也符合我国 0#柴油的相应指标要求。

### 3.6 油脂原料

考察了其他不同油脂作为反应底物的情况, 各种油脂的化学参数及脂肪酸组成如表 2 所示。由表可以看出, 各种油脂的脂肪酸(Fatty acids)组成有较大差别。采用表 2 中的油脂作为甲酯化反应的底物, 几种植物油均能有效地转化成生物柴油, 反应的结果如图 5 所示, 甲酯得率均在 90%以上。同时也考察了采用不同油脂原料作为反应物时酶的稳定性, 酶回用 200 批次(100 d)后各种油的甲酯得率均没有下降, 表明在叔丁醇反应体系中, 脂肪酶能有效催化多种植物油生成生物柴油并保持很好的操作稳定性。

考察了在叔丁醇介质中酶催化各种酸化废油制备

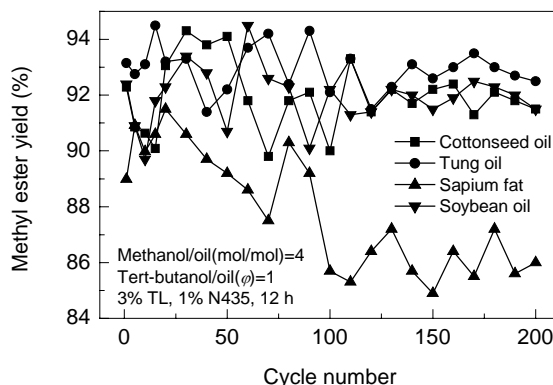


图 5 不同植物油中酶的稳定性

Fig.5 Stability of lipases catalyzing different oils

生物柴油的情况, 酸化废油与精制植物油的差别主要在于脂肪酸含量的不同, 各种酸化废油的脂肪酸含量及甲酯得率如表 3 所示。

表 3 各种酸化废油转化成生物柴油

Table 3 Conversion of different waste oils into biodiesel

	Swilling oil	Underground oil	Discolored acidified oil	Acidified oil
Saponification value (KOH) (mg/g)	193	173	175	175
Acid value (KOH) (mg/g)	18	135	131	135
Content of fatty acids (%)	9.3	77	74	77
Methyl ester yield at 12 h (%)	75	65	74	75

酸化废油反应的最终甲酯得率比精制油低, 这是由于酸化废油中的脂肪酸在反应过程中会产生水, 脂肪酸甲酯的水解反应是脂肪酸甲醇醇解反应的逆反应, 反应体系中存在过量的水会抑制甲醇醇解反应<sup>[5,14]</sup>, 故酸化废油反应的最终甲酯得率比精制油低。催化酸化废油时脂肪酶回用的稳定性如图 6 所示。虽然反应过程生成的水会影响反应最终的平衡, 但对脂肪酶的稳定性没有明显的负面影响, 酶回用 200 次后活性仍没有下降。

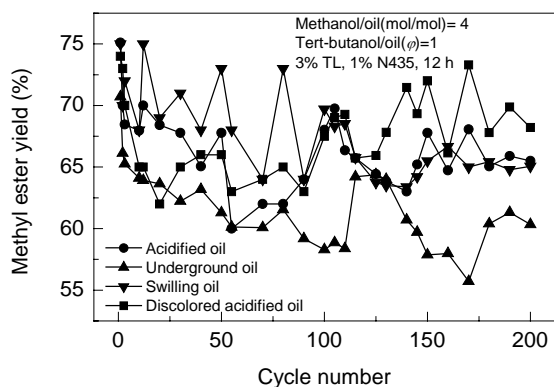


图 6 酸化废油中酶的稳定性

Fig.6 Stability of lipases catalyzing waste oils

## 4 结论

(1) 以叔丁醇为溶剂, 脂肪酶可以有效地催化植物

油脂甲醇醇解制备生物柴油, 与传统的酶法制备生物柴油相比, 采用叔丁醇作为反应介质, 甲醇的毒性和副产物甘油的抑制作用等问题都得到了很好的解决。

(2) 在叔丁醇介质中, 脂肪酶表现出很好的操作稳定性, 反应进行 200 批次(100 d)后仍保持很高的甲酯得率。采用精制菜籽油为原料制备的生物柴油产品符合美国和德国生物柴油标准。

(3) 该新型反应介质体系还具有广泛的油脂原料适用性, 多种油脂如菜籽油、大豆油、桐籽油、棉籽油、乌柏油、泔水油、地沟油、酸化油等都能被有效转化成生物柴油。

参考文献:

- [1] Ma F, Hanna M A. Biodiesel Production: A Review [J]. *Bioresour. Technol.*, 1999, 70(1): 1-15.
- [2] Nelson L A, Foglia T A, Marmer W N. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel [J]. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, 73(8): 1191-1195.
- [3] Du W, Xu Y Y, Liu D H. Lipase-catalyzed Transesterification of Soybean Oil for Biodiesel Production during Continuous Batch Operation [J]. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 38: 103-106.
- [4] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 92(5): 405-416.
- [5] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase [J]. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, 76(7): 789-793.
- [6] Bélafi-Bakó K, Kovács F, Gubicza L, et al. Enzymatic Biodiesel

- Production from Sunflower Oil by *Candida antarctica* Lipase in a Solvent-free System [J]. *Biocatal. Biotransform.*, 2002, 20(6): 437–439.
- [7] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, et al. Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, 17(3/5): 133–142.
- [8] Mohamed M, Soumanou Uwe, Bornscheuer T. Improvement in Lipase-catalyzed Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Sunflower Oil [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, 33: 97–103.
- [9] Lara P V, Park E Y. Potential Application of Waste Activated Bleaching Earth on the Production of Fatty Acid Alkyl Esters Using *Candida cylindracea* Lipase in Organic Solvent System [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 34: 270–277.
- [10] Ghanguia H, Karra-Cha'abouni M, Gargouri Y. 1-Butyl Oleate Synthesis by Immobilized Lipase from *Rhizopus Oryzae*: A Comparative Study between N-Hexane and Solvent-free System [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35: 355–363.
- [11] Stevenson D E, Stanley R A, Furneaux R H. Near-quantitative Production of Fatty Acid Alkyl Esters by Lipase-catalyzed Alcoholysis of Fats and Oils with Adsorption of Glycerol by Silica Gel [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16: 478–484.
- [12] Dossat V, Combes D, Marty A. Continuous Enzymatic Transesterification of High Oleic Sunflower Oil in a Packed Bed Reactor: Influence of the Glycerol Production [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, 25: 194–200.
- [13] Xu Y Y, Du W, Zeng J, et al. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL<sup>TM</sup> in a Solvent-free Medium [J]. *Biocatal. Biotransform.*, 2004, 22(1): 45–48.
- [14] Kaieda M, Samukawaa T, Kondoa A, 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]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 91(1): 12–15.

## Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from Several Oils in a Novel Reaction Medium

LI Li-lin, DU Wei, LIU De-hua, LI Ze-bo, WANG Li

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Tert-butanol was adopted as a reaction medium for lipase-catalyzed methanolysis of oils for biodiesel production, in which both the negative effects caused by excessive methanol and by-product glycerol could be eliminated. The optimum conditions of methanolysis of rapeseed oil were as follow: tert-butanol/oil (volumetric ratio) 1:1, methanol/oil (molar ratio) 4:1, 3% Lipozyme TL<sup>TM</sup> and 1% Novozym 435 based on oil weight, 35°C, 130 r/min and 12 h. The highest biodiesel yield was 95% and the lipases could be reused 200 cycles without obvious loss of their activity. The technology was further tested in a pilot plant and the product was up to the biodiesel standards of US (ASTM PS121-99) and Germany (DINE51606). Furthermore, soybean oil, tung oil, cottonseed oil, sapium fat and acidified waste oil were also explored for biodiesel production, and lipases also showed good stability in tert-butanol reaction medium.

**Key words:** biodiesel; tert-butanol; immobilized lipase; stability