

## 超声波辅助下脂肪酶催化高酸值废油脂制备生物柴油

# Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil with Ultrasonic Assistant

王建勋<sup>1,2</sup>, 黄庆德<sup>2,1\*</sup>, 黄凤洪<sup>2</sup>, 王江薇<sup>2</sup>, 黄沁洁<sup>2</sup>

WANG Jian-Xun<sup>1,2</sup>, HUANG Qing-De<sup>1,2\*</sup>, HUANG Feng-Hong<sup>2</sup>, WANG Jiang-Wei<sup>2</sup> and HUANG Qin-Jie<sup>2</sup>

1 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

2 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062

1 College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2 Institute of Oil Crops Research, CAAS, Wuhan 430062, China

**摘 要** 探讨了超声波辅助条件下脂肪酶催化高酸值废油脂转化为生物柴油的反应。来源于 *Aspergillus oryzae* 和 *Candida antarctica* 的固定化脂肪酶, 在超声波辅助下, 对高酸值废油脂转化为生物柴油具有高的催化活性。以来自于 *C. antarctica* 的固定化脂肪酶 Novozym435 为催化剂, 以酸价为 157mg KOH/g 的高酸值废油脂为原料在超声波辅助下与丙醇反应, 在脂肪酶用量为油质量的 8%、初始醇油摩尔比为 3:1、反应温度控制在 40~45℃、超声波频率和功率分别采用 28kHz 和 100W 的条件下, 反应 50min 转化率达到 94.86%。在此条件下, 不同碳原子数 ( $C_1 \sim C_5$ ) 的直链和支链醇均有较高的转化率, 在短链醇的选择上具有宽广的适应性。超声波还减少了反应产物和反应体系中其他黏性杂质在固定化脂肪酶表面的吸附, 回收的 Novozym435 相较单纯机械搅拌条件下回收的外观干净、分散良好无结块现象、易于洗涤和再次利用, 具有良好的操作稳定性。

**关键词** 脂肪酶, 超声波, 高酸值废弃油, 酯化, 转酯化, 生物柴油

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1121-08

**Abstract** Biodiesel fuel produced with the enzyme-catalyzed esterification and transesterification of high acid value waste oil through ultrasonic assistant was explored. Propyl oleate, biodiesel, converted from high acid value waste oil and 1-propanol catalyzed with immobilized lipases from *Candida antarctica* and *Aspergillus oryzae* in conditions of ultrasonic assistant. Commercial immobilized lipase Novozym 435 from *C. antarctica* was used as biocatalyst catalyzing high acid value waste oil and 1-propanol esterification and transesterification to propyl oleate under the ultrasonic assistant conditions and different conditions such as lipases amounts, initiatory molar ratio of propanol to oil, frequency of ultrasonic and power of ultrasonic were investigated and optimized. It is revealed that the enzymatic activity of Novozym435 is enhanced and, in particular, enzyme-catalyzed transesterification activity is enhanced obviously under the ultrasonic assistant conditions. Low frequency and mild energy ultrasonic is a key factor for enhancing enzymatic activity, emulsifying oil-propanol system and accelerating the speed of produce diffusing in the system. Under the optimal ultrasonic assistant reaction conditions, such as Novozym435 amounts 8% by oil quantity, initiatory molar ratio of propanol to oil 3:1, frequency of ultrasonic 28 KHz, power of ultrasonic 100 W and

Received: March 20, 2007; Accepted: April 25, 2007.

This work was supported by a grant from the National Research Project for the Tenth Five-year Plan (No. 2001BA501A20).

\* Corresponding author. Tel: +86-27-86827874; Fax: +86-027-86816321; E-mail: Huangqd@oilcrops.cn

国家“十五”科技攻关项目(No. 2001BA501A20).

temperature of water batch 40 ~ 45 °C, the conversion ratio to propyl oleate reached to 94.86% in 50mins in comparison with the highest conversion ratio to propyl oleate 84.43% under the conventional mechanical agitation conditions. Furthermore, it is demonstrated that various short chain linear and branched alcohols ( $C_1 \sim C_5$ ) show high conversion ratio to fatty acid alkyl esters (biodiesel) under the optimal ultrasonic assistant reaction conditions. On the other hand, ultrasonic energy is propitious to reduce the adsorption of product propyl oleate, by-product glycerol and other emplastics in system on the surface of immobilized lipase Novozym435 and recyclable Novozym435 possess clean appearances, well decentralizations, no agglomeration and easy washing and well operational stability.

**Key words** lipase, ultrasonic, high acid value waste oil, esterification, transesterification, biodiesel

生物柴油是指利用植物油、动物脂肪或废油脂等与短链醇进行酯交换或酯化反应而形成脂肪酸烷基酯混和物,与常规石油柴油相比,具有环境友好性和可再生性两大突出优点,是一种新型的石油柴油替代能源。自上世纪 70 年代以来,由于化石能源的大量开采和消耗,造成能源危机频发和生态环境恶化,调整能源结构,走可持续发展道路成为普遍共识。而生物柴油作为新兴可再生能源,由于其独特的优势成为新能源开发热点领域。

目前生物柴油技术研究有三个方面:化学催化油脂转化技术、酶催化油脂转化技术、无催化的超临界甲醇转化技术。目前生物柴油的工业生产均采用化学催化法,这种方法存在醇必须大大过量、能耗高、产物难于回收和废碱液污染环境等缺点,并且对原料要求高。我国每年直接产生下脚酸化油 250 万吨,大中城市餐饮业的发展也产生废油脂 500 万吨,但餐饮业和工业废油脂酸败严重,游离脂肪酸含量通常较高,若经过复杂的前处理过程,难于用作化学法生产生物柴油的原料。酶催化技术不仅具有生产过程反应条件温和、醇用量少、产物易于分离及无污染物排放等优点,而且是对原料要求低,能够很好的适应废油脂中高含量的游离脂肪酸,在利用废油脂为原料的生物柴油生产中具有独特的优势,成为生物柴油技术研究的热点。目前,如何提高酶催化效率是酶催化废油脂转化为生物柴油研究中的重点问题。

超声波是物质介质中一种弹性机械波,在物质介质中形成介质粒子的机械振动,这种含有能量的超声振动在亚微观范围内引起的机械作用有机械传质作用、加热作用和空化作用。超声波辅助技术已应用于化学法生产生物柴油中,Stavarache<sup>[1,2]</sup>等人认为超声波的空化作用和机械传质作用促进了醇油相互混和、增加了反应界面和强化了传质作用,在超声波辅助下,反应时间可以明显缩短,碱催化剂量降低 2 ~ 3 倍。朱宁<sup>[3]</sup>等人研究了超声波频率对醇油

反应体系温度和空化作用的影响,对比了超声波辅助和传统化学法生产的生物柴油的理化性质和发动机燃烧性能,认为超声波不仅缩短了碱催化生产生物柴油的反应时间,而且还改善了生物柴油的分子结构,减少了生物柴油分子簇的大小,从而提高了生物柴油产品的理化性质和燃烧性能。王建黎<sup>[4]</sup>等人研究了低频超声外场辐射下碱催化酯交换生产生物柴油,结果表明,超声波外场乳化作用和强化反应起到了很好的协同作用,与机械搅拌反应体系相比,极大的缩短了反应时间和提高了生物柴油的转化率。超声波除了对部分不相溶的反应体系有着很好的乳化作用和反应强化作用外,有研究表明,适宜频率和功率的超声波还可以增强蛋白酶<sup>[5,6]</sup>、纤维素酶<sup>[7]</sup>、磷脂酶<sup>[8]</sup>和脂肪酶<sup>[6]</sup>等的活性和提高酶催化反应速度。将超声波辅助技术应用于酶法催化生产生物柴油中,则有望降低脂肪酶用量和缩短反应时间。

杂醇油是工业发酵生产乙醇的蒸馏副产物,主要含有戊醇、异戊醇以及其他短链醇,是一种低价值的工业杂醇混和物。如果应用于酶法催化生产生物柴油的生产中,不仅能够降低生物柴油的生产成本,还可以改善生物柴油的低温性能<sup>[9]</sup>。这就要求酶催化生产生物柴油在短链醇的选择上具有宽广的适应性。对此,本文采用丙醇和酸值高达 157mg KOH/g 的高酸值废油脂为原料,对几种不同来源的脂肪酶进行了筛选,开展了超声波辅助条件下酶催化高酸值废油脂转化为生物柴油的研究,并考察了不同碳原子数( $C_1 \sim C_5$ )短链醇的反应特异性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

固定化脂肪酶 Novozym435 来源于 *Candida antarctica*, 吸附在丙烯酸大孔树脂上;固定化脂肪酶 Lipzyme TL IM 来源于 *Aspergillus oryzae*, 固定在颗粒硅胶上;液体脂肪酶 Lipozym TL 100L 来源于 *Aspergillus oryzae*, 液体脂肪酶 Palatase 20000L 来源于

*Rhizomucor miehei* 由诺维信(中国)投资有限公司赠送。固定化脂肪酶 Lipase AY“ Amano ”30 来源于 *Candida rugosa* 固定化脂肪酶 Lipase AK“ Amano ”20 来源于 *Pseudomonas fluorescens* 来自于日本天野酶制品株式会社。棕榈酸甲酯(99%)、硬脂酸甲酯(99%)和油酸甲酯(99%)购于上海至鑫化工有限公司。高酸值废油脂来源于北京奔骥公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

KQ3200VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JJ-1 大功率电动搅拌器(常州国华电器有限公司);电热恒温水浴锅(天津中环);电子分析天平(梅特勒公司);安捷伦 6890N 型气相色谱仪,配备 ChemStation BC.01.01 色谱工作站,FID 检测器和 DB-17HT 毛细管柱(30m × 0.32mm × 0.15μm,最高使用温度 340℃)。

1.3 实验方法

1.3.1 高酸值废油脂的预处理及部分理化性质的检测 过滤废油脂,除去其中食物残渣和其他固体杂质,磷酸水化脱胶法除去废油脂中残留的少量磷脂物质,再利用活性白土 100℃真空脱色,然后减压蒸馏出废油脂中残留的水分。参照国家标准 GB/T17376-1998、GB5530-85 和 GB/T5534-1995 分别检测预处理后的废油脂的脂肪酸组成、皂化价和酸价。气相色谱分析表明,废油脂中主要含有棕榈酸、亚油酸、油酸和硬脂酸,含量分别为 17.069%, 31.000%, 36.099%和 3.638%。皂化价为 196,由皂化价可知废油脂的平均分子量为 858.7。废油脂的酸价是 157mg KOH/g,属于高酸值废油脂。

1.3.2 酶催化反应 将一定量的废油脂放入 100mL 两孔瓶中,外接搅拌器搅拌,参照废油脂的质量按一定质量百分比添加脂肪酶,放入已开启超声波的水浴中(装置自制,见图 1),水浴温度控制在 40 ~ 45℃,然后依据不同醇油摩尔比加入一定量丙醇,定时取样 0.5mL,高速离心,取上层酯层参照国家标准 GB5530-85 进行酸价测定,同时取 50μL 溶于一定量色谱纯正己烷中,进行气相色谱分析,测定样品中丙酯含量,计算酯化率。

1.3.3 分析方法 实验采用的废油脂的酸价高达 157mg KOH/g,其中含有大量的游离脂肪酸和少量的甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯,在酶催化高酸值废油脂转化为生物柴油的过程中,同时发生着酯化反应和转酯化反应,可以通过检测反应后样品酸价和丙酯含量的变化来分别来考察反应过程中脂肪酶酯

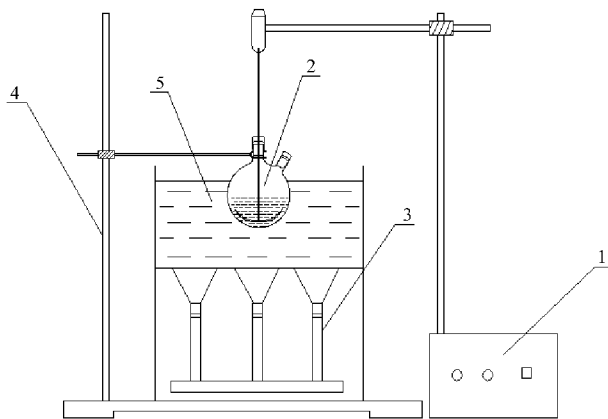


图 1 超声波辅助反应装置

Fig. 1 Experimental instrument with assistant of ultrasonic  
1: beater; 2: reaction vessel; 3: ultrasonic instrument;  
4: bracket; 5: water bath.

化活力和转酯化活力的变化。

(1)酸价测定 参照国家标准 GB5530-85 对定时所取样品进行酸价测定。

(2)转化率的测定:

$$\text{转化率} = \frac{\text{反应后样品中脂肪酸丙酯的含量}}{\text{油脂完全丙酯化后的脂肪酸丙酯的含量}} \times 100\%$$

脂肪酸丙酯由气相色谱测定,测定条件为:气室温度 260℃,检测室温度 330℃。程序升温为:初始柱温 160℃,保持 0.5min 后,以 10℃/min 升到 200℃,保持 1min,然后以 0.2℃/min 升到 201℃,保持 0.5min,后再以 50℃/min 升到 320℃,保持 5min。载气为氮气,流速为 1.6mL/min;分流比 25:1,进样量为 0.2μL;H<sub>2</sub> 流量为 45mL/min,空气流量为 450mL/min。

2 实验结果与讨论

2.1 脂肪酶的筛选

不同的脂肪酶在不同的反应条件下表现出的催化特性和催化活性不同。根据反应后测定的酸价,结果见表 1,在无水无溶剂的反应体系下,催化高酸值废油脂和丙醇发生酯化反应转化为生物柴油的反应过程中,来源于 *P. fluorescens* 的固定化脂肪酶 Lipase AK“ Amano ”20 和来源于 *C. rugosa* 固定化脂肪酶 Lipase AY“ Amano ”30 的催化酯化反应的活性极低,这可能是由于这两种脂肪酶催化特性更有利于催化甘油酯水解或者是反应体系中水分的缺失限制了其催化酯化反应的活性,这与已有的研究报道<sup>[10]</sup>结果相一致。来源于 *A. oryzae* 的液体脂肪酶 Lipozym TL 100L 和来源于 *R. miehei* 的液体脂肪酶

Palatase 20000L 具有一定的酯化催化能力,但催化活性较低,其中 Lipozym TL 100L 要优于 Palatase 20000L,这与这两种脂肪酶的催化特性有关,Palatase 20000L 利于催化甘油酯的水解,尤其是水解小分子脂肪酸。来源于 *A. oryzae* 的固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 和来源于 *C. antarctica* 的固定化脂肪酶 Novozym435 具有极高的酯化催化活性,能够很好的适应高酸值废油脂中大量的游离脂肪酸,可以

有效的降低高酸值废油脂的酸价,其中 Novozym435 酯化催化活性更为突出。固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 虽然和液体脂肪酶 Lipozym TL 100L 同样来源于微生物 *A. oryzae*,但可能液体脂肪酶固定化处理改变了脂肪酶的某些催化特性并提高了脂肪酶的催化活性。由于 Novozym435 能够很好的适应高酸值废油脂中高含量的游离脂肪酸,具有极高的催化活性,故选用 Novozym435 作为酶催化剂。

表 1 不同脂肪酶在无溶剂无水反应体系下催化高酸值废油脂酯化反应后酸价的变化

Table 1 Acid value of waste oil after esterification catalyzed by various lipases in absence of water in solvent free system

Lipase	State	Acid values after reaction( mgKOH/g )
Lipase AK Amano 20( <i>P. fluorescens</i> )	Immobilized lipase	146.61
Lipase AY Amano 30( <i>C. rugosa</i> )	Immobilized lipase	149.74
Lipozyme TL IM( <i>A. oryzae</i> )	Immobilized lipase	25.4
Novozym435( <i>C. antarctica</i> )	Immobilized lipase	16.65
Lipozym TL 100L( <i>A. oryzae</i> )	Free lipase	68.44
Palatase 20000L( <i>R. miehei</i> )	Free lipase	102.79
CK		157

10g waste oil ; 6% Novozym435 ; initiatory molar ratio of propanol to oil 1 : 1 , residual 1-propanols were added twice at 40min and 1.5h , respectively ; 45kHz ; 40W ; 40 ~ 45℃ ; 3h )

## 2.2 脂肪酶用量对酶促酯化转酯化反应的影响

脂肪酶的用量直接影响到酶促酯化和转酯化反应速率并决定最终转化率,脂肪酶用量存在着一个最佳浓度范围。如图 2 所示,高酸值废油脂酶促反应 3h 后酸价和转化率随着 Novozym435 用量的增大而分别降低和提高,并逐步达到平衡。Novozym435 用量由 2% 增加到 8% 时,反应后酸价和转化率变化显著,酸价从 85.7 mg KOH/g 迅速的降低到 7.41 mg KOH/g,最终转化率从 44.37% 迅速的提高到 94.73%,此阶段酶用量的增加对酯化和转酯化反应影响很大;而在 Novozym435 用量由 8% 增加到 10% 时,反应后酸价和转化率变化不明显,此阶段酶用量的增加对酯化和转酯化反应几乎没有影响,说明反应体系中的底物已经被 Novozym435 所饱和,再增加酶用量几乎影响不到酯化和转酯化反应。综合考虑节约酶制剂,Novozym435 的用量以废油脂质量 8% 为宜。

## 2.3 初始醇油比对酶促酯化转酯化反应的影响

初始醇油摩尔比的变化会影响到反应体系中底物浓度的变化,理论上,初始醇油摩尔比越大,底物初始浓度越高,酶促反应速率就越大,最终转化率就可能达到更高。而在 Novozym435 催化高酸值废油脂和丙醇发生酯化转酯化反应转化为生物柴油的过程中,过量的丙醇有可能会对 Novozym435 产生失活

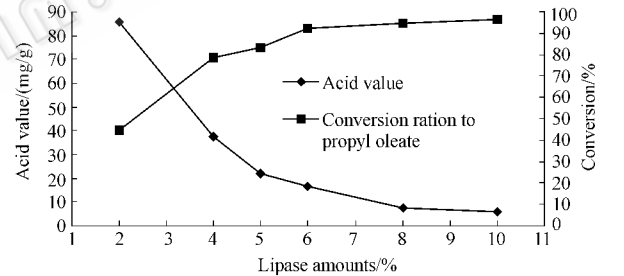


图 2 脂肪酶用量对酶促酯化转酯化反应的影响

Fig. 2 Effect of lipase amounts on enzyme-catalyzed esterification and transesterification

20 g waste oil ; initiatory molar ratio of propanol to oil 1 : 1 , residual 1-propanols were added twice at 40min and 1.5h , respectively ; 45kHz ; 40W ; 40 ~ 45℃ ; 2h .

作用,所以初始醇油摩尔比并不是越大越好。如图 2 所示,当初始醇油摩尔比由 1 : 1 提高到 2 : 1 时,酯化和转酯化反应初速率都逐步的提高,初始醇油摩尔比由 2 : 1 提高到 3 : 1 时,酯化和转酯化反应初速率几乎没有差别,当初始醇油摩尔比提高到 4 : 1 时,酯化和转酯化反应初速率反而都下降,说明反应体系中丙醇开始过量,已经影响到 Novozym435 的活性。此外,当初始醇油摩尔比分别为 1 : 1 和 2 : 1 时,由于不能及时向反应体系添加丙醇,酯化和转酯化反应受丙醇含量的限制,反应后的酸价和转化率都呈明显的阶梯状下降和增长。因此,当反应体系中初始醇油摩尔比为 3 : 1 时,反应体系中的丙醇既能

满足 Novozym435 所需的底物浓度 ,又可以避免过量丙醇对 Novozym435 产生失活作用 ,与理论上废油脂

全部转化为生物柴油所需的醇摩尔数相等 ,简化了操作过程 ,因此初始醇油摩尔比采用 3:1 为宜。

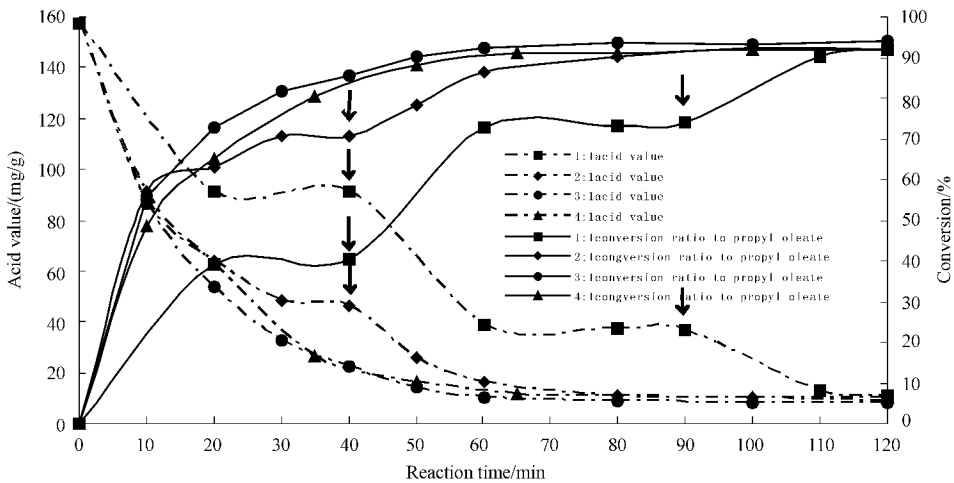


图 3 醇油比对酶促酯化转酯化反应的影响

Fig. 3 Effect of initiatory molar ratio of propanol to oil on enzyme-catalyzed esterification and transesterification  
20g waste oil ; 8% Novozyme435 ; 45kHz ; 40W ; 40 ~ 45℃ ; 2h.

2.4 超声波对酶促酯化转酯化反应的影响

2.4.1 超声波频率对酶促酯化转酯化反应的影响：

如图 4 所示 ,反应初期 ,28kHz 超声波频率下酶促转酯化反应速率明显高于 45kHz 频率下的 ,而酶促酯化反应速率却相差不大 ,反应体系的最终平衡也没有受到影响。酯化反应的速率无明显差别说明在较低频率范围内 ,超声波产生的空化作用对反应体系的乳化和传质的促进和强化作用的相差不大。类似的 ,Stavarache<sup>[2]</sup>等人和王建黎<sup>[4]</sup>等人分别在比较 40kHz、28kHz 和 39kHz、19.7kHz 两组低频超声波对

化学法生产生物柴油影响的研究中 ,发现了相同的现象。但是 ,超声波频率的变化可能会改变稳态空化泡<sup>[11,12]</sup>在振动过程中产生的辐射压力和微射流对 Novozym435 酶分子的影响 ,在更低频率 28kHz 的超声波下 ,有利 Novozym435 酶分子形成转酯化活性更强的空间构象 ,因此能够在反应初期迅速的催化高酸值废油脂中少量的甘油酯(约 20% 质量比)发生转酯化反应。综上 ,超声波频率采用较低频率 28kHz 为宜。

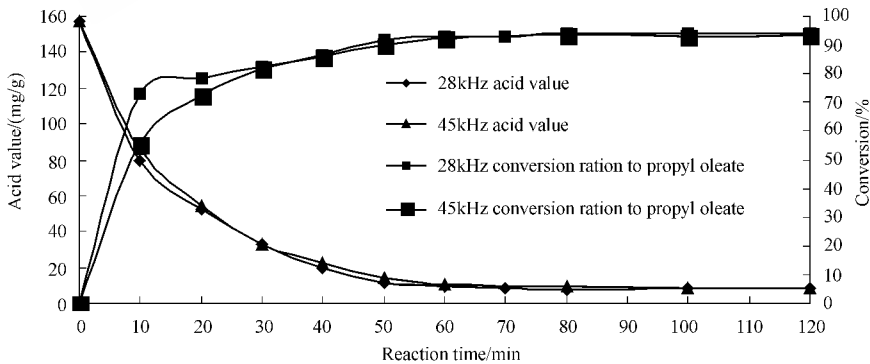


图 4 超声波频率对酶促酯化转酯化反应的影响

Fig. 4 Effect of frequency of ultrasonic on enzyme-catalyzed esterification and transesterification  
20g waste oil ; 8% novozym435 ; initiatory molar ratio of propanol to oil : 3:1 ; 40W ; 40 ~ 45℃ ; 2h.

2.4.2 超声波功率对酶促酯化转酯化反应的影响：

超声波功率的改变会影响到超声波能量 ,能量温和的超声波能提高酶的活力 ,能量剧烈的超声波会破坏酶分子结构 ,造成酶的失活<sup>[12,13]</sup> ,因此实验将超声波功率控制在 100W 的范围内。如图 5 所示 ,超声波功率由 40W 向 80W 增加时 ,酶促酯化和转酯化反

应速率都随之增加 ,反应平衡时间缩短 ,说明此超声波功率范围内 ,超声波能量的提高有助于提高 Novozym435 的催化活性和进一步强化反应体系中质量传递作用。而 80W 和 100W 超声功率下酶促反应初速度和反应平衡时间相差不大 ,说明此阶段超声能量的提高对 Novozym435 和反应体系的影响作用

逐渐饱和。综上,在 28kHz 超声波频率下,超声波功率采用 100W 为宜。

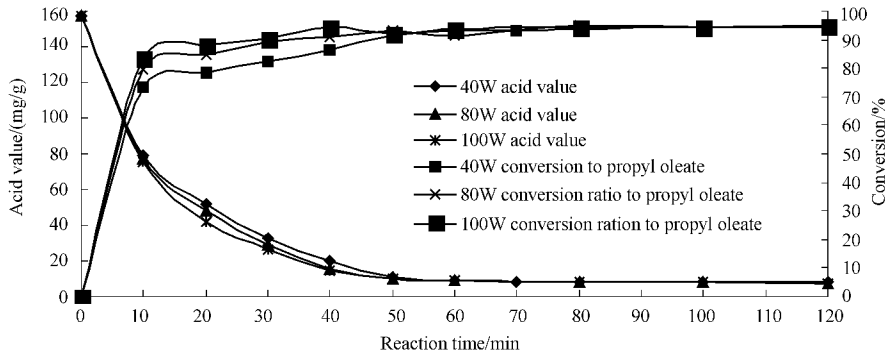


图 5 超声波功率对高酸值废油脂酶促酯化转酯化反应的影响

Fig. 5 Effect of power of ultrasonic on enzyme-catalyzed esterification and transesterification  
20g waste oil ; 8% novozym435 ; initiatory molar ratio of propanol to oil : 3:1 ; 28kHz ; 40 ~ 45℃ ; 2h.

2.5 超声波对酶促酯化转酯化反应的强化作用

如图 6 所示,和单纯机械搅拌相比,超声波辅助条件下,提高了酶促酯化和转酯化反应速率,尤其是转酯化反应速率提高明显,反应 50min 后将单纯机械搅拌条件下达到的最高转化率 84.43% 和混和产物最低酸价 18.3mgKOH/g 分别提高到 94.86% 和降低到 7.52mgKOH/g。此外,从两种反应条件下回收的 Novozym435 的外观上看,单纯机械搅拌条件下回收的 Novozym435 上吸附了较多的黏性物质和油,存在严重的结块现象,而超声波辅助条件下回收的 Novozym435 外观干净,颗粒分散良好,便于洗涤和再次利用。一般认为,超声波对酶促反应主要有两方面的促进作用<sup>[11,12,14]</sup>,一是低频率能量温和的超声波产生的空化作用是稳态空化作用,稳态空化过程中产生的稳态空化泡在振动过程中引发的辐射压力

和微射流,使其周围的悬浮的酶生物大分子的构象发生改变,可能会使酶分子的构象更加合理,外观上其活性升高;二是在超声波的空化作用和机械传质作用下,反应体系中底物和产物分子以较高的频率振动,使固定化酶活性中心与底物的接触频率大大提高,同时也加快产物的释放,从而使固定化酶的表现米氏常数减少,外观上反应速率增加。在 28kHz, 100W 超声波作用下,Novozym435 形成了酯化和转酯化催化活性更高的构象,提高了底物游离脂肪酸、甘油酯和醇与 Novozym435 酶活性中心的接触几率,使产物丙酯和少量甘油迅速的与酶分离扩散到反应体系中,同时机械振动作用还避免和减少了少量副产物甘油在载体表面上的吸附,从而提高了酶促反应速率,使反应进行的更加彻底。

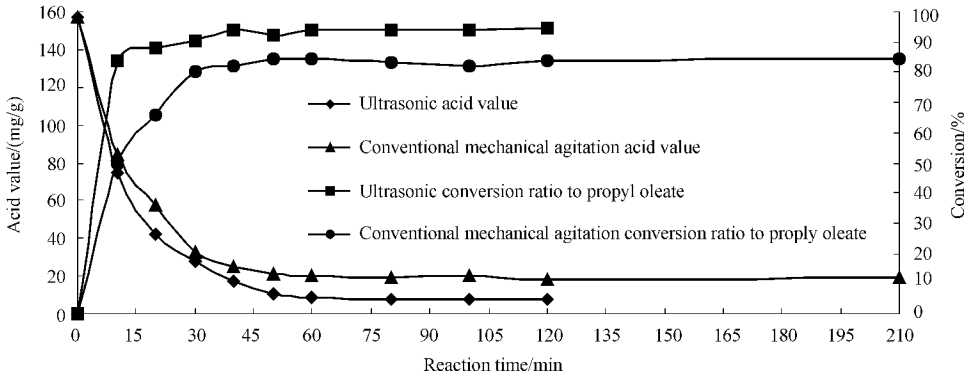


图 6 超声波对酶促酯化转酯化反应的强化作用

Fig. 6 Intensifying effect of ultrasonic on enzyme-catalyzed esterification and transesterification

Ultrasonic assistant : 20g waste oil ; 8% novozym435 ; initiatory molar ratio of propanol to oil : 3:1 ; 28kHz ; 100W ; 40 ~ 45℃ ; 2h. Conventional mechanical agitation : 45℃ ; 3.5h ; the rest conditions were the same as that of ultrasonic assistant.

2.6 不同碳原子数(C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub>)的短链醇的反应特性

为了避免过量甲醇乙醇等低碳醇对酶催化反应的抑制作用,反应过程中采用分流加入甲醇和乙醇

的方式。不同碳原子数的短链醇在超声波辅助反应条件下反应 2 h 后的转化率见图 7。异丙醇转化率较低的原因可能是叔醇增大了空间位阻,反应活性要低于伯醇,而其他几种短链醇均能以较高的转化

率与高酸值废油脂反应生成相应的脂肪酸烷基酯生物柴油,说明直链醇和支链醇的反应活性相差不大。在其他研究中,Shimada 等<sup>[15]</sup>以煎炸废油为原料,分别采用间歇式和连续式生产方式在分流添加甲醇的条件下酶催化反应 48 h 后,转化率达到 90.4%。谭天伟<sup>[16]</sup>等人利用在正庚烷介质中大孔树脂吸附固定的自主选育假丝酵母 99-125 脂肪酶采用分流加入甲醇的方式,甲酯化率可以达到 97.3%。Kose<sup>[17]</sup>等人利用 Novozym435 催化棉子油与不同醇转酯化反应 7h 后,异戊醇的转化率最高达到 94%,而异丙醇的转化率仅为 72.3%。Salis<sup>[9]</sup>等人利用固定在硅藻土上的 *P. cepacia* 脂肪酶催化甘油三油酸酯与丙醇、异丙醇、丁醇、异丁醇及戊醇异构体混和醇转酯化反应 12h 后,转化率可以达到 100%。实验中不同碳原子数的短链醇在较短的反应时间内获得较高转化率可能有两方面的原因:一是实验采用的高酸值废油脂与其他研究采用的精炼油、毛油或废油脂有所差别,其中游离脂肪酸高达 80% 左右,酶催化反应主要以酯化反应为主,副产物甘油生成较少,减轻了甘油对脂肪酶的毒害作用;二是超声波辅助对反应的强化作用。综上,此方法在短链醇的选择上具有宽广的适应性,适用于范围很广的直链或支链醇和高酸值废油脂反应转化为生物柴油。这样可以降低对醇原料的要求,有望能够利用杂醇油等工业废醇,进一步降低生产成本。

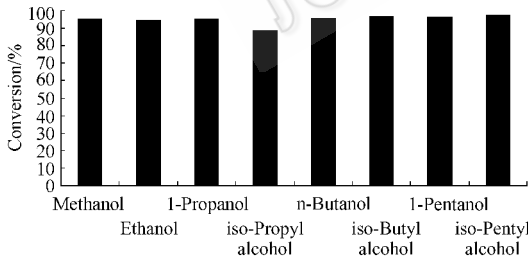


图 7 不同碳原子数(C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>)的短链醇的反应特异性

Fig. 7 Specificities of different short chain alcohols

10g waste oil ; 8% Novozym435 ; initiatory molar ratio of alcohol to oil : 1:1 and residual alcohols were added twice at 30min and 1h ; 28kHz ; 100W ; 40 ~ 45℃ ; 2h.

### 2.7 固定化脂肪酶 novozym435 操作的稳定性

脂肪酶制剂高昂的成本是制约酶催化生产生物柴油产业化一个重要的因素,固定化脂肪酶的回收再利用是降低脂肪酶成本的关键手段,因此,固定化脂肪酶操作的稳定性是脂肪酶催化生产生物柴油研究中一个重要方面。在上述超声波辅助反应条件下,将每批次回收的 Novozym435 利用少量的正己烷和丙酮交替洗涤,在相同的条件下重复使用,考察了

Novozy435 操作的稳定性,结果见图 8,Novozy435 在连续使用 10 个周期,催化活性基本无变化。

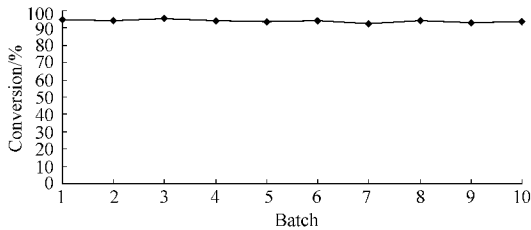


图 8 固定化脂肪酶 novozym435 操作稳定性

Fig. 8 Operational stability of novozym435 in esterification and transesterification of high acid value waste oil with through assistant of ultrasonic

20g waste oil , 8% Novozyme435 , initiatory molar ratio of propanol to oil : 3:1 , 28kHz , 100W , 40 ~ 45℃ , 2h.

### 3 结论

超声波辅助下,来源于 *A. oryzae* 的商品化固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 和来源于 *C. antarctica* 的商品化固定化脂肪酶 Novozym435 对酶催化高酸值废油脂转化为生物柴油是一种高效催化剂。在能量温和的低频率超声波辅助下,Novozy435 可以高效催化高酸值废油脂与丙醇等短链醇发生酯化和转酯化反应转化为生物柴油。与单纯机械搅拌相比,提高了酶促转化反应速率,促进了反应平衡的正向移动。在 Novozym435 用量为高酸值废油脂质量的 8%,初始醇油摩尔比为 3:1,超声波频率和功率分别为 28kHz 和 100W,反应温度控制在 40 ~ 45℃ 的反应条件下,反应 50min 后,酸值为 157mg KOH/g 的高酸值废油脂和丙醇酶促生产生物柴油的转化率为 94.86%。在此条件下,不同碳原子数(C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub>)的直链和支链醇均能以很高的转化率与高酸值废油脂反应生成生物柴油,此工艺在短链醇的选择上具有宽广的适应性。回收的 Novozym435 较单纯机械搅拌下回收的外观干净,黏性物质和油吸附较少,分散良好且无结块现象,易于洗涤和再次利用,具有良好的操作稳定性。能量温和的低频率超声波在酶催化生产生物柴油中极具应用潜力,而在此基础上如何实现工业杂醇的利用将是一个很有价值的课题。

### REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Stavarache C , Vinatoru M , Nishimura R , et al . Conversion of vegetable oil to biobiesel using ultrasonic irradiation . *Chemistry Letters* , 2003 , **32** ( 8 ) : 716 ~ 717 .  
[ 2 ] Stavarache C , Vinatoru M , Nishimura R et al . Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy . *Ultrasonic*

- [ 3 ] Zhu N, Tsuchiya T. Study on Synthesizing BDF by Using Ultrasonic Sonochemistry Effect, 3rd. International Energy Conversion Engineering Conference, San Francisco, CA, USA, 2005, pp. 15 - 18.
- [ 4 ] Wang JI(王建黎), Li YQ(李永超), Xu ZQ(徐之超), *et al.* Effect of ultrasonic on the transesterification of methanol-oil immiscible system. *China Oils and Fats(中国油脂)*, 2006, **34** (4): 61 - 63.
- [ 5 ] Zhu SX(朱少娟), Shi YH(施用晖), Le GW(乐国伟). Effect of ultrasonic on the hydrolysis of casein by trypsin. *Journal of Food Science and Biotechnology(食品与生物技术学报)*, 2005, **24** (2): 50 - 54.
- [ 6 ] Xiao YM, Wu Q, Cai Y, *et al.* Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research*, 2005, **340**: 2097 - 2103.
- [ 7 ] Li C Z, Yoshimoto M, Tsukuda N, *et al.* A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **19**: 155 - 164.
- [ 8 ] Wan CY(万楚筠), Huang FH(黄凤洪), Li WL(李文林), *et al.* Effect of ultrasonic on removing nonhydratable phospholipids in oil by phospholipase A1. *China Oils and Fats(中国油脂)*, 2007, **33** (2): 33 - 36.
- [ 9 ] Salis A, Pinna M, Monduzzi M, *et al.* Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 2005, **119** (3): 291 - 299.
- [ 10 ] Kaieda M, Samukawa T, Kondo 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **99** (1): 12 - 15.
- [ 11 ] Liu QH(刘全宏), Dai L(代乐), Qi H(齐浩). Research progresses about the mechanism of ultrasonic cavitation and its applications in anticancer domain. *Journal of Ultrasound in Chinese Medicine(临床超声医学杂志)*, 2006, **8** (4): 235 - 238.
- [ 12 ] Sinisterra JV. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, 1992, **30** (3): 180 - 185.
- [ 13 ] Feng R, Zhao YY, Ciguang B. Sonochemistry in China. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1997, **4**: 183 - 187.
- [ 14 ] Zhu GH(朱国辉), Huang ZL(黄卓烈), Qiu TQ(丘泰球), *et al.* Effect of power ultrasound on the reactions catalyzed by enzymes. *Applied Acoustics(应用声学)*, 2001, **20** (4): 45 - 47.
- [ 15 ] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17**: 133 - 142.
- [ 16 ] Gao Y(高阳), Tan TW(谭天伟), Nie KL(聂开立), Wang F(王芳). Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2006, **22** (1): 114 - 118.
- [ 17 ] Kose O, Tuter M, Aksoy HA, *et al.* Immobilized Candida antarctica lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*, 2002, **83**: 125 - 129.