生 物 工 程 学 报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2009, June 25; 25(6): 941-945
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2009 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

工业生物技术

固定化脂肪酶催化毛油合成生物柴油

李俊奎, 鲁吉珂, 王芳, 谭天伟, 邓利

生物炼制教育部工程研究中心 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029

摘 要: 本研究开发了一种用石油醚提取毛油的工艺, 研究了以提取的毛油和甲醇为原料, 用固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化合成脂肪酸甲酯(FAMEs)的可行性。同时考察了磷脂对固定化酶活性、反应起始速率、固定化酶使用批次的影响以及毛油和精炼油对固定化酶使用批次等的影响。研究结果表明, 用磷脂质量分数为 1%的石油醚悬液浸泡过的脂肪酶比仅用石油醚浸泡过的脂肪酶初始转酯化速率显著下降。当大豆油中无磷脂时, 15 min 时 FAMEs 的产率为 26.2%; 磷脂质量分数为 5%时, FAMEs 降为 12.4%。当大豆油中磷脂质量分数小于 1%时, 固定化酶使用 10 个批次, FAMEs 产率无明显变化。固定化脂肪酶催化石油醚浸提得到的大豆和小桐子毛油, 经过 10 个批次反应 FAMEs 产率都保持在 70%以上, 该固定化酶直接催化毛油生产生物柴油具有良好的工业化前景。

关键词: 毛油, 磷脂, 固定化脂肪酶, 生物柴油

Synthesis of biodiesel from crude oil by immobilized lipase

Junkui Li, Jike Lu, Fang Wang, Tianwei Tan, and Li Deng

Beijing Key Laboratory of Bioprocess, The Biorefinery Research and Engineering Center of the Ministry of Education of China, Beijing 100029, *China*

Abstract: We used immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125 to produce fatty acid methyl esters (FAMEs) from crude oil and methanol. We studied the effects of phospholipids on activity of immobilized lipase, reaction velocity, stability of immobilized lipase and the stability of immobilized lipase in crude and refined oil. Results showed that the activity of the lipase immersed in petroleum ether with 1% phospholipids dropped more quickly than the lipase in petroleum ether without phospholipids. When soybean oil was used without phospholipids as material, the FAMEs yield of 15 min was 26.2%, whereas the yield decreased to 12.4% when there were 5% phospholipids in the soybean oil. However when the phospholipids content was below 1%, the stability of the lipase did not change obviously. The lipase was stable when used to catalyze crude soybean oil and crude jatropha oil, after 10 cycles the FAMEs yield was still above 70%. This lipase showed great potential for industrial production of biodiesel from crude oil.

Keywords: crude oil, phospholipids, immobilized lipase, biodiesel

生物柴油是指长链脂肪酸与低碳醇(甲醇、乙醇、丙醇、丁醇)组成的脂肪酸酯, 是一种可生物降解、空气污染物排放低的可再生的能源。目前生物柴油主要是用化学法生产, 即动植物油脂与甲醇在高强度酸或碱催化剂下制备。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。

Received: December 30, 2008; **Accepted:** April 24, 2009
Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20576013, 20876011), Hi-tech Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2006AA020203), State Key Development Program for Basic Research of China (973 Program)(No. 2007CB714304), Natural Science Foundation of Beijing, China (No. 2071002), Science and Technology Program of Beijing, China (No. D0205004040211).
Corresponding author: Li Deng. Tel: +86-10-66414543; E-mail: dengli@mail.buct.edu.cn
国家自然科学基金(Nos. 20576013, 20876011), 国家高技术研究发展项目 (863 计划) (No. 2006AA020203), 国家重点基础研究发展项目 (973 计划) (No. 2007CB714304), 北京市自然科学基金(No. 2071002), 北京市科技计划项目(No. D0205004040211)资助。

酶法合成生物柴油除具有条件温和、醇用量少、无污染物排放等优点[1–3]，而且酶法对原料油无选择性，植物油脂、动物油脂、废油脂等高酸值油脂等多种油脂都可以做为生产生物柴油的原料[4–8]。

生物柴油的原料成本占了生产成本的很大部分。植物油从提取到精炼要经过预处理、机械提取、溶剂浸出、脱胶、碱炼、脱色、脱臭、脱蜡等工序，精炼成本很高。一般毛油中磷脂的质量分数为 1%~3%，游离脂肪酸的质量分数为 0.5%~5%，有的植物油如小桐子油中脂肪酸可以高达 20%，毛油中除了脂肪酸外的臭味组分仅占 0.1%左右，色素和蜡含量极微[9]。研究表明毛油中的磷脂等胶质会抑制脂肪酶的活性[10]，而毛油中色素、臭味组分和蜡的含量极微，它们对脂肪酶的影响也未见报道。此外固定化脂肪酶 *Candida* sp. 99-125 可以用于高酸值油和脂肪酸的催化[4,11]，所以磷脂可能是毛油中影响脂肪酶活性的主要成分。

文献中报道油脂中磷脂的质量分数超过 0.2%时会对商业化脂肪酶 Novozym 435 产生很明显的不可逆抑制，大豆毛油经过脱胶后才可以用于生产生物柴油[10]。目前市售的植物毛油多为压榨法得到，磷脂的质量分数太高(1%~3%)，而不适合直接作为反应原料，需要经过脱胶处理除去大部分磷脂后才能用于反应。李俐林等以乙酸甲酯浸提得到的菜籽毛油(磷脂质量分数为 0.038%)和乙酸甲酯为底物进行酶促酯交换反应，其反应效果与精炼菜籽油一致[12]。但乙酸甲酯浸提毛油成本太高，笔者尝试用价格便宜的石油醚浸提油料种子，得到磷脂含量较低的毛油，不经过脱胶等其他油脂精炼工序直接用于生产生物柴油。

本研究考察了大豆和小桐子毛油(石油醚提取)与精炼油对固定化酶的使用批次的影响，同时研究了在石油醚体系下磷脂质量分数对固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶甲醇解反应速率，酶使用批次的影响。结果表明该脂肪酶对磷脂有较好的耐受性，可以直接催化石油醚提取的毛油。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甲醇、正己烷、石油醚(60°C~90°C)，购自北京化学试剂厂；*Candida* sp. 99-125 脂肪酶，由本实验室发酵提供；大豆精炼油，金龙鱼牌食用油，小桐子精炼油，购于北京；大豆，购于北京；小桐子，购于广西。

1.2 实验仪器

摇床，哈尔滨东联电子公司；电子天平，赛多利斯公司；GC2010 气相色谱仪，岛津公司；空气发生器，北京东西电子研究所；氢气发生器，北京东西电子研究所。

1.3 固定化酶的制备

以纺织物膜为载体，通过吸附法对 *Candida* sp.99-125 脂肪酶发酵液固定化处理。载体先与含有吐温 80 及 PEG6000、明胶的固定剂溶液混合，晾干后与酶溶液充分混匀，室温下晾干待用。酶量都是固定化后脂肪酶与载体的总质量。具体固定化步骤见文献[13]。

1.4 毛油的制备

将 100 g 油料作物粉碎置于 1 L 三口烧瓶中，加入 400 mL 石油醚，在 40°C、130 r/min 摇床条件下浸提 4 h。在 50°C 下减压蒸去石油醚，制得毛油。

1.5 毛油的中磷脂的检测和脱胶方法

毛油中磷脂检测：重量法，具体步骤见磷脂测定法 GB 5537-85。

脱胶方法：取 20 g 油脂，加热至 70°C，加入油重 3%的质量浓度为 50%的柠檬酸，均匀混合 5 min，冷却至 25°C。加入油重 3%的 50°C 热水，90 r/min 转速下搅拌 1 h，改为 30 r/min 转速慢转 1 h，65°C 静置 12 h 后，取上清油液。

1.6 反应体系

在 50 mL 的具塞锥形瓶中加入 1 g 豆油，0.2 g 固定化酶，2 mL 石油醚，100 μL 水，139.5 μL 甲醇(甲醇:油=3:1)，甲醇分 3 次加入，每 8 h 一次，在 40°C、170 r/min 摇床条件下反应 24 h。反应结束将酶布转入新瓶，加入底物进行下一次反应。

1.7 分析方法

产物用气相色谱法分析，采用 GC-2010 气相色谱仪(日本岛津)，DB1-ht 毛细管柱(0.25 mm×30 m, Agilient)，高纯氮作载气，二阶程序升温，柱温 100°C~300°C，升温速率 10°C/min; 300°C~350°C，升温速率 5°C/min。利用氢火焰离子检测器，检测器温度 375°C，汽化室温度 370°C。

2 结果与讨论

2.1 石油醚的量对毛油提取率的影响

用石油醚提取毛油, 石油醚的量对提油率的影响很大, 考察了石油醚的用量对提油率的影响, 结果如图 1 所示。随着石油醚用量的增加, 提油率增加。但考虑到成本因素, 石油醚最优用量为 400 mL, 提油率为 94%, 大豆磷脂含量为 0.75%。

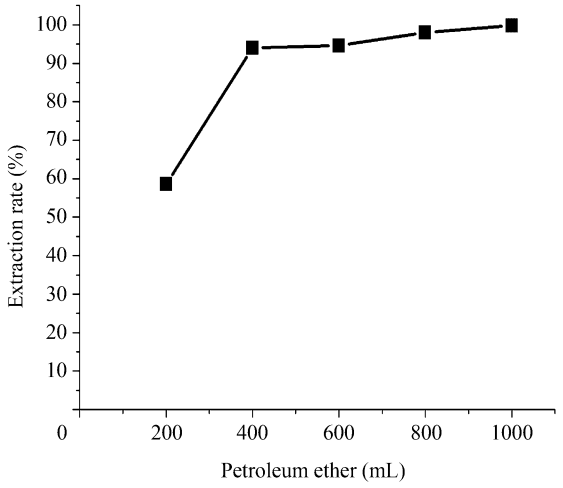

图 1 石油醚用量对提油率的影响

Fig. 1 Effect of petroleum ether content on extraction rate.

2.2 磷脂浸泡对酶活性的影响

用磷脂质量分数为 1%的磷脂的石油醚悬浊液(PLs)和石油醚(Pet)浸泡酶布, 每隔一定的时间(3 d、6 d、15 d)取出, 用石油醚漂洗后, 按醇油比 1:1 加入甲醇, 测不同时间 FAME 的产率。从图 2 中可以看出, 浸泡相同的时间, 磷脂悬浊液处理过的固定化酶在反应的前 30 min 的反应速率要慢于不含磷脂的石油醚处理过的酶, 尤其在浸泡 15 d 后, 磷脂悬液处理过的酶, 反应 30 min 后 FAMEs 产率为 10.9%, 比仅用石油醚处理过的酶(FAMEs 产率 27.6%), 下降了 60%。说明磷脂可以造成固定化酶的失活, 这与 Yomi Watanabe 的结论相符[10]。磷脂对固定化酶的活性的抑制, 可能是磷脂分子与固定化酶分子之间有比较牢固的共价键作用, 从而屏蔽了固定化酶分子的活性部位, 影响了酶活性部位和底物的接触, 从而抑制了酶的活性。

2.3 磷脂对反应速率的影响

用磷脂的质量分数为 0%~15%的大豆油为底物, 按醇油比 1: 1 加入甲醇, 测定 5 min、15 min、8 h 时 FAMEs 的产率, 结果如图 3 所示。当磷脂的质量分数为 0%~5%时, 5 min 和 15 min 的产率都随着磷脂质量分数的增大而减少, 这是由于一方面由于磷脂可以与酶分子结合; 另一方面磷脂含量过高, 易吸附在固定化酶表面, 阻碍了底物和固定化酶的接触, 影响了传质, 从而影响反应的速率。当磷脂的质量分数在 5%~15%时, 5 min 和 15 min 产率变化不明显, 这可能是因为油脂相对含量有所减少造成的。

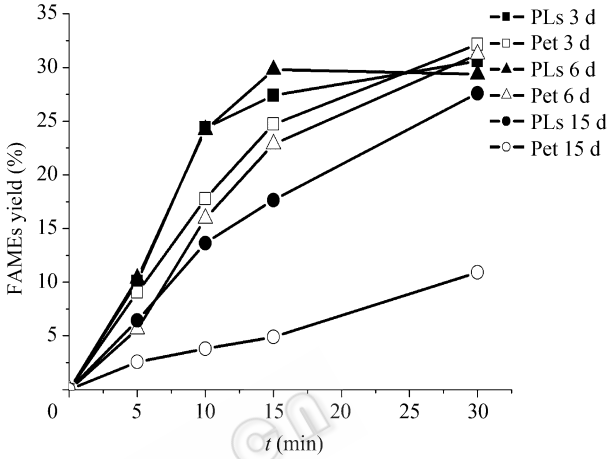

图 2 磷脂浸泡处理对酶反应速率的影响

Fig. 2 Effect of immergence in phospholipids sovlent on reaction velocity.

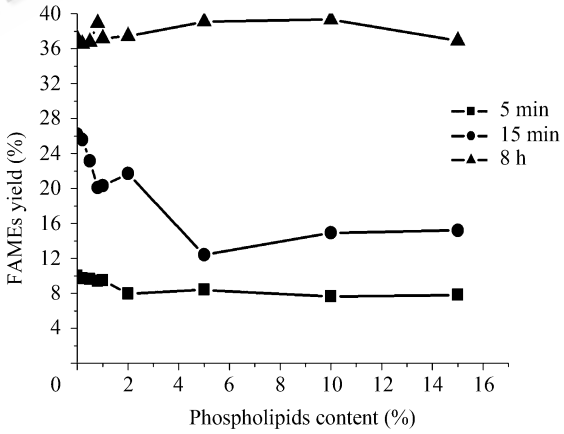

图 3 磷脂质量分数对反应速率的影响

Fig. 3 Effect of phospholipids content on reaction velocity.

图 4 为以磷脂质量分数不同的油脂为底物进行甲醇解反应, 对固定化酶寿命的影响。在油脂中磷脂质量分数为 0%~0.8%时, 转酯反应保持了较好的稳定性, 7 个批次内的 FAMEs 产率都高于 65%。但当磷脂质量分数为 1%时, 第 7 批 FAMEs 的产率就降为 47.6%; 磷脂为 2%时, 第 7 批降为 40.9%, 磷脂 5%时, 第 5 批就降为 32.3%。这是因为如上所述, 磷脂可以与酶分子结合, 同时磷脂在固定化酶表面吸

附的更多，两者都阻碍了底物与酶活性部位的接触，在两者的相互作用下(磷脂在固定化酶表面的吸附占主要因素)，底物甲醇的消耗速率减少，甲醇造成了酶的严重失活。但是当磷脂质量分数小于 1%时，虽然会对反应速率造成影响，当反应时间为 24 h，从固定化脂肪酶的使用次数来看没有明显的变化。当磷脂质量分数超过 1%时，酶的寿命明显下降。

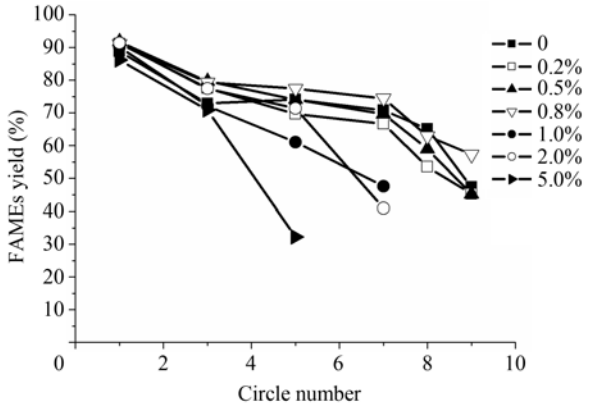

图 4 磷脂质量分数对 ***Candida* sp. 99-125** 的稳定性的影响

Fig. 4 Effect of phospholipids content on stability of *Candida* sp. 99-125.

2.5 毛油、脱胶油和精炼油对固定化酶稳定性的影响

自制的大豆毛油中磷脂质量分数为 0.75%，小桐子毛油中磷脂质量分数为 0.43%，都小于 1.0%。毛油经过脱胶后磷脂都降为 0.02%以下。图 5 是酶催化大豆毛油、精炼油、脱胶油的寿命对比实验，图 6 是酶催化小桐子毛油、精炼油、脱胶油的寿命对比实验。可以看出 2 种油料的毛油、脱胶油和精炼油对酶的寿命影响不明显，2 种毛油经过 10 个批次 FAMEs 的产率还保持 70%以上。

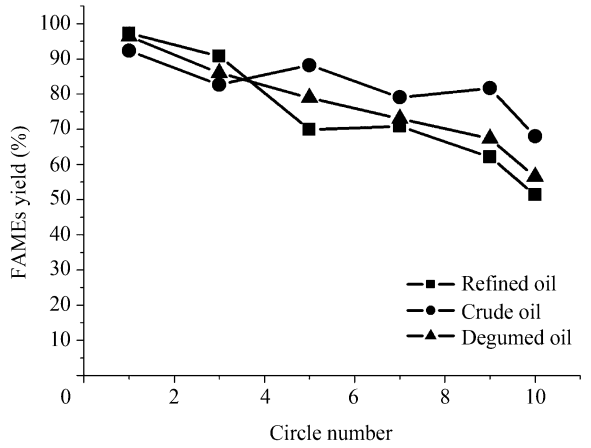

图 5 大豆油对 ***Candida* sp. 99-125** 稳定性的影响

Fig. 5 Stability of *Candida* sp. 99-125 for soybean oil.

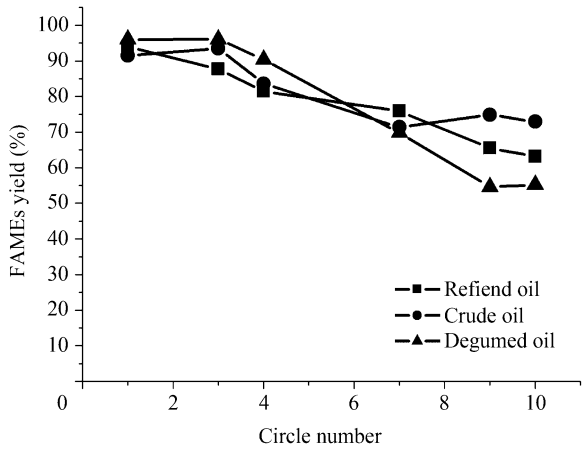

图 6 小桐子油对 ***Candida* sp. 99-125** 稳定性的影响

Fig. 6 Stability of *Candida* sp. 99-125 for jatropha oil.

2.6 毛油和精炼油反应历程

图 7 和图 8 分别为大豆和小桐子两种油料的精炼油和毛油的酶促甲醇解反应历程。在反应过程中以精炼油和毛油为底物时，FAMEs 的产率无明显变化。反应 24 h，最终 FAMEs 产率都在 88%以上。

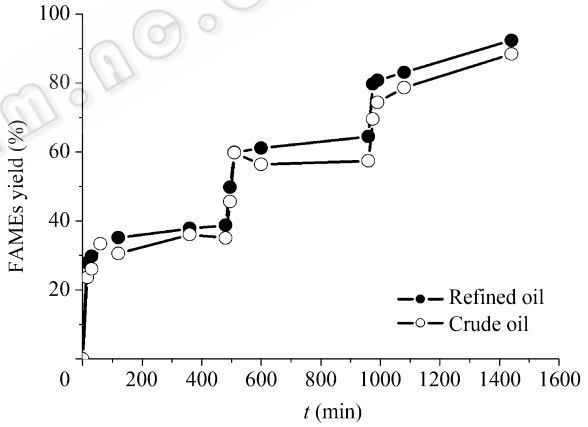

图 7 大豆精炼油和毛油的甲醇解反应历程

Fig. 7 Time course of crude and refined soybean oil methanolyses.

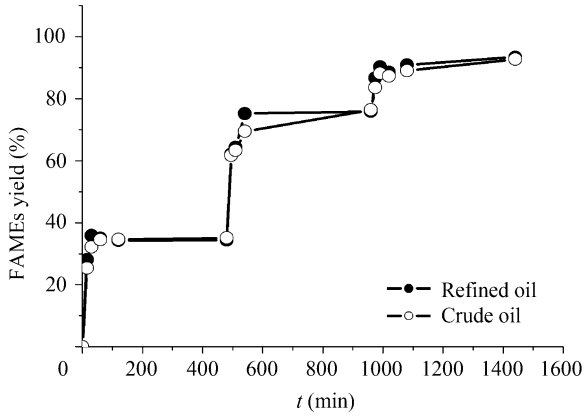

图 8 小桐子精炼油和毛油的甲醇解反应历程

Fig. 8 Time course of crude and refined jatropha oil methanolyses.

3 结语

目前国内生物柴油的原料主要是地沟油、酸化油等, 原料供应不足限制了生物柴油的发展。以植物毛油尤其是非食用植物毛油为原料扩大了生物柴油的原料来源。毛油中磷脂是影响脂肪酶活性的重要微量成分, 一般压榨法得到的毛油中磷脂含量太高, 必须经过精炼处理。研究表明: 在石油醚的反应体系下, 固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶催化油脂的甲醇解过程中, 磷脂质量分数在 0%~5%时, 初始反应速率显著下降。但从固定化酶的使用次数来看, 当油脂中磷脂质量分数低于 1.0%时, 不会对固定化酶使用寿命产生影响, 与商业化的脂肪酶比, 有较好的耐受性。经过石油醚提取的大豆和小桐子毛油中磷脂质量分数小于 1.0%, 反应 24 h, FAMEs 转化率都在 88%以上, 经过 10 个批次反应, FAMEs 转化率保持在 70%以上, 与精炼油的反应效果相同。该提取方法获得的毛油不需要其他精炼处理可直接用于酶法生产生物柴油, 具有良好的工业化前景。

REFERENCES

[1] Kann J, Heino R. Advances in biodiesel fuel research. *Proc Estonian Acad Sci Chem*, 2002, **51**(2): 75–117.

[2] Karl EJ, Thorsten E. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13** (4): 390–397.

[3] Deng L, Tan TW, Wang F. Studies of enzymatic synthesis of biodiese1. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(1): 97–101.
邓利, 谭天伟, 王芳. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究. 生物工程学报, 2003, **19** (1): 97–101.

[4] Nie KL, Fang W, Tan TW, *et al*. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **43**: 142–147.

[5] Lu JK, Wang F, Tan TW, *et al*. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. *Proc Biochem*, 2007, **42**, 1367–1370.

[6] Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol*, 2005, **96**: 769–777.

[7] Gao J, Wang F, Tan TW, *et al*. Synthesis of biodiesel from waste oil by immobilized lipase. *J Chem Ind Eng*, 2005, **56**: 1727–1730.
高静, 王芳, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化废油合成生物柴油. 化工学报, 2005, **56**: 1727–1730.

[8] Ramadhas AS, Jayaraj S, Muraleedharan C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*, 2005, **84**: 335–340.

[9] He DP. Oil Refinery and Process Techniques. 1st Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
何东平. 油脂精炼与加工工艺学. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[10] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, *et a1*. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, **17**: 151–155.

[11] Deng L, Tan TW, Wang F, *et al*. Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida* sp. 99–125. *Eur J Lipid Technol Sci*, 2003, **105**: 727–734.

[12] Li LL, Du W, Liu DH, *et al*. Study on rapeseed oil extraction by methyl acetate coupling with lipase-catalyzed transesterification for bio-diesel production. *Food Ferm Ind*, 2006, **32**(5): 5–7.
李俐林, 杜伟, 刘德华, 等. 乙酸甲酯萃取菜籽油制备生物柴油的研究. 食品与发酵工业, 2006, **32** (5): 5–7.

[13] Tan TW, Cheng BQ, Ye H, *et al*. Synthesis of fatty acids short chain ester by immobilized lipase: China patent, CN1456674. 2003-11-19.
谭天伟, 陈必强, 叶华, 等. 固定化脂肪酶催化合成脂肪酸低碳醇酯: 中国专利, CN1456674. 2003-11-19.

Journals.im.ac.cn