

L-天冬氨酸离子液体联合猪胰脂肪酶 催化油酸酯化工艺

郑礼, 汪文伟, 王昌梅, 王志山, 许津萍, 尹芳, 杨斌,

吴凯, 赵兴玲, 梁承月, 柳静, 杨红, 张无敌

(云南师范大学 能源与环境科学学院, 昆明 650500)

摘要:为绿色高效制备生物柴油, 利用 *L*-天冬氨酸离子液体([Asp]HSO₄)联合猪胰脂肪酶催化油酸制备油酸甲酯, 采用单因素实验探究了反应时间、醇酸物质的量比、[Asp]HSO₄用量、猪胰脂肪酶用量和反应温度对转化率的影响, 在此基础上, 采用正交实验进行优化, 得到[Asp]HSO₄联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应的最优工艺条件为[Asp]HSO₄用量6%、醇酸物质的量比5.5:1、猪胰脂肪酶用量4%、反应时间21 h、反应温度45℃, 在此条件下转化率可达91.91%。[Asp]HSO₄可降低甲醇和温度对猪胰脂肪酶催化活性的影响, 对猪胰脂肪酶催化油酸酯化具有协同效应。

关键词:油酸甲酯; 天冬氨酸离子液体; 脂肪酶; 酯化反应

中图分类号:TQ645; TK63 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)12-0126-05

Esterification of oleic acid catalyzed by *L*-Aspartic acid ionic liquid combined with porcine pancreatic lipase

ZHENG Li, WANG Wenwei, WANG Changmei, WANG Zhishan, XU Jinping,
YIN Fang, YANG Bin, WU Kai, ZHAO Xingling, LIANG Chengyue,
LIU Jing, YANG Hong, ZHANG Wudi

(School of Energy and Environment Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to prepare biodiesel greenly and efficiently, *L*-Aspartic acid ionic liquid ([Asp]HSO₄) combined with porcine pancreatic lipase was used to catalyze the esterification of oleic acid to prepare methyl oleate. The effects of reaction time, molar ratio of methanol to oleic acid, amount of [Asp]HSO₄, amount of porcine pancreatic lipase, and the reaction temperature on the conversion rate were investigated by single factor experiment. Then the esterification process conditions were optimized by orthogonal experiment as follows: amount of [Asp]HSO₄ 6%, molar ratio of methanol to oleic acid 5.5:1, amount of porcine pancreatic lipase 4%, reaction time 21 h, and reaction temperature 45℃. The

conversion rate could reach 91.91% under the optimal conditions. [Asp]HSO₄ can reduce the effects of methanol and temperature on the catalytic activity of porcine pancreatic lipase, and has synergistic effect on the esterification of oleic acid catalyzed by porcine pancreatic lipase.

Key words: methyl oleate; *L*-Aspartic acid ionic liquid; lipase; esterification reaction

收稿日期:2021-10-01;修回日期:2022-07-23

基金项目:云南省万人计划产业技术领军人才项目(20191096);云南省农村能源工程重点实验室基金项目(2017KF03);云南省教育厅科学研究基金项目(218JS146);云南师范大学2020年大学生科研训练基金项目(KX2020140)和云南师范大学研究生科研创新基金项目(YJSJJ21-A06)联合资助

作者简介:郑礼(1997),男,硕士研究生,研究方向为生物质能与环境工程(E-mail)1178120382@qq.com。

通信作者:王昌梅,讲师,硕士生导师,博士(E-mail)wangcmzf@163.com;张无敌,研究员,博士生导师(E-mail)wootichang@163.com。

生物柴油是一种可再生能源,因其优良特性成为石化柴油的绿色替代品^[1],能减轻CO₂排放,减少

环境污染^[2-4]。生物柴油的主要成分包括棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯等^[5-6]。生物柴油的传统生产工艺使用酸或碱作为催化剂,但通常存在腐蚀和乳化问题,且回收困难^[7]。酶法催化制备生物柴油,在反应速度和成本上具有一定优势^[8],但普遍存在产物产率较低,且通常须添加有机溶剂才能最大限度发挥酶的催化潜力,而部分有机溶剂对环境有危害,从而限制了酶法的工业应用^[9-10]。离子液体是一类由阴离子和阳离子组成的低温熔融盐^[11],既可发挥有机溶剂的性质也具有催化作用,在药物合成、生物质降解、气体吸收等诸多领域均有研究应用^[12]。将离子液体用于酶法催化制备生物柴油中,可在一定程度降低甲醇对脂肪酶的破坏^[13],实现对脂肪酶的保护作用,有利于降低酶的使用成本,苗长林^[14]、朱广琪^[15]、Liu^[16]、Manurung^[17]等学者已开展了相关研究并获得了相应的成果。以氨基酸为原料合成的氨基酸离子液体不仅具有传统离子液体的优良特性^[18-20],还克服了部分传统离子液体易对环境造成危害的缺点^[21]。基于天然氨基酸合成的绿色离子液体联合脂肪酶催化制备生物柴油,可发挥氨基酸离子液体可生物降解、绿色环保、制备简单^[22]、可作为溶剂^[23]的特点,保护脂肪酶,提高催化效率,且目前相关报道较少,有待进一步探究。

本文以 *L*-天冬氨酸离子液体联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应制备油酸甲酯,在单因素实验的基础上,采用正交实验优化了 *L*-天冬氨酸离子液体联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应制备油酸甲酯的工艺条件,以期为进一步探究离子液体联合脂肪酶催化反应的机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

L-天冬氨酸(TX20302),上海颖心实验室设备有限公司;油酸、甲醇、硫酸(98%)、乙醇(95%)和乙酸乙酯,天津市致远化学试剂有限公司;猪胰脂肪酶(CAS:9001-62-1),阿拉丁试剂(上海)有限公司;氢氧化钾,天津市风船化学试剂科技有限公司;所有试剂均为分析纯。

DF-101S型恒温油浴磁力搅拌器,杭州明远仪器有限公司;101型电热鼓风恒温干燥箱,北京市光明医疗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 离子液体的制备

参考赵振兴等^[24]的方法,将一定量 *L*-天冬氨酸加入烧瓶中,加去离子水溶解,待 *L*-天冬氨酸溶解后,再按照与 *L*-天冬氨酸物质的量比为 1:1 的

比例缓慢加入硫酸,在 80℃ 下反应 12 h,反应结束后用乙酸乙酯反复洗涤,干燥后即得 *L*-天冬氨酸离子液体([Asp]HSO₄)。

1.2.2 [Asp]HSO₄ 联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应

将油酸、[Asp]HSO₄、猪胰脂肪酶、甲醇按照设计的量加入圆底烧瓶中,置于恒温油浴磁力搅拌器中反应一定时间后,取出圆底烧瓶,将反应物倒入分液漏斗中,静置分层,取上层油酸甲酯相采用热乙醇滴定法^[25]测定酸值,按下式计算转化率(*x*)。

$$x = (a - b) / a \times 100\% \quad (1)$$

式中: *a* 为油酸酸值, mg/g; *b* 为产物酸值, mg/g。

2 结果与讨论

2.1 离子液体的溶剂性能鉴定

在醇酸物质的量比为 5:1、反应时间为 6 h、反应温度为 45℃ (经预实验确定酶反应温度为 45℃)、猪胰脂肪酶用量为 4% (基于油酸的质量)的条件下,通过单独添加 5% (基于油酸的质量)的 [Asp]HSO₄、去离子水、正己烷作为溶剂来探究不同反应体系对猪胰脂肪酶催化油酸酯化的效果,结果见图 1。

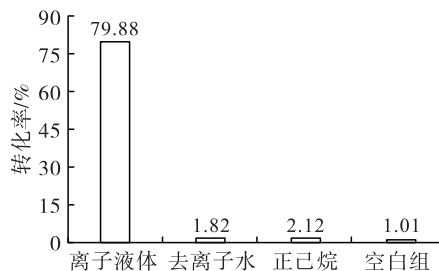


图1 不同溶剂实验结果

从图 1 可以看出,使用猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应,不使用任何溶剂时,油酸甲酯的转化率仅为 1.01%,使用正己烷作为溶剂时转化率为 2.12%,说明正己烷的加入有利于脂肪酶活性的提高,但对转化率提升较小。而使用离子液体作为溶剂时,转化率可达 79.88%,说明离子液体的加入可以明显提升转化率,说明离子液体在体系中既发挥了溶剂作用也发挥了催化作用,且相对于正己烷更易促使脂肪酶发挥催化作用。

2.2 酯化反应单因素实验

2.2.1 反应时间对酯化反应的影响

在醇酸物质的量比为 3:1、反应温度为 35℃、[Asp]HSO₄用量为 8%、猪胰脂肪酶用量为 2% 的条件下,考察反应时间对转化率的影响,结果如图 2 所示。

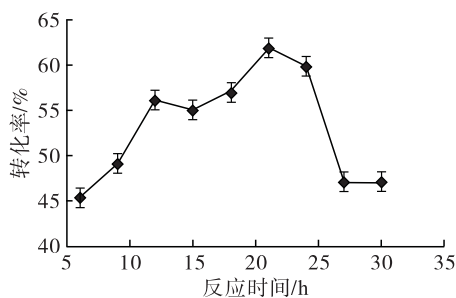


图2 反应时间对酯化反应的影响

从图2可以看出,反应时间在6~21 h时,转化率随着反应时间的延长基本呈增大趋势,且增加速度总体较快。在反应21 h时,转化率达到最大,为61.78%,继续延长反应时间转化率降低,这是因为酯化反应是一个可逆的化学过程,反应21 h时已经达到了正反应的极限,继续延长反应时间会导致反应向负反应方向进行。继续延长反应时间不仅提高了成本,还会导致产物产率降低。因此,最适反应时间确定为21 h。

2.2.2 醇酸物质的量比对酯化反应的影响

在反应温度为35℃、[Asp]HSO₄用量为8%、猪胰脂肪酶用量为2%、反应时间为21 h的条件下,考察醇酸物质的量比对转化率的影响,结果如图3所示。

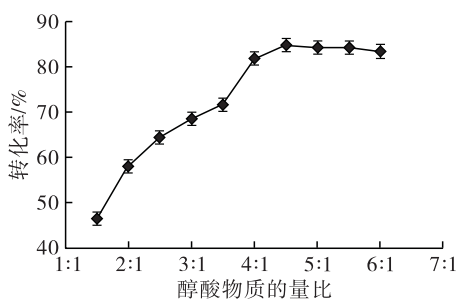
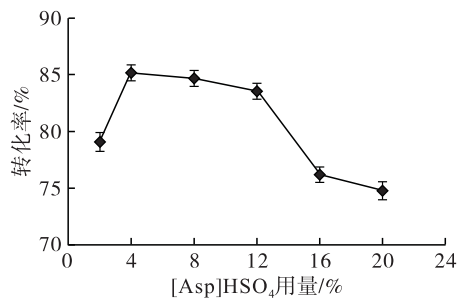


图3 醇酸物质的量比对酯化反应的影响

从图3可以看出,随着甲醇用量的增大,转化率也随之增大。在醇酸物质的量比为1.5:1时,转化率仅有46.59%,在醇酸物质的量比为4.5:1时转化率达到最大,为84.83%,而当醇酸物质的量比为5:1时,转化率略有降低,为84.29%,继续增加醇酸物质的量比,转化率基本不变。考虑到实验能耗、成本等因素,最适醇酸物质的量比为4.5:1。

2.2.3 [Asp]HSO₄用量对酯化反应的影响

在醇酸物质的量比为4.5:1、反应温度为35℃、猪胰脂肪酶用量为2%、反应时间为21 h的条件下,考察[Asp]HSO₄用量对转化率的影响,结果如图4所示。

图4 [Asp]HSO₄用量对酯化反应的影响

从图4可以看出,在[Asp]HSO₄用量为2%时,转化率就达到79.10%,呈现较高的转化效率。继续增加[Asp]HSO₄用量到4%时,转化率达到最大,为85.19%。之后继续增加[Asp]HSO₄用量,转化率反而降低。推测可能是因为[Asp]HSO₄由L-天冬氨酸和浓硫酸合成,反应体系整体呈酸性,大量离子液体存在时,H⁺增加,体系酸性增强,继而影响了猪胰脂肪酶的活性,导致转化率降低。因此,最适[Asp]HSO₄用量为4%。

2.2.4 猪胰脂肪酶用量对酯化反应的影响

在醇酸物质的量比为4.5:1、反应温度为35℃、[Asp]HSO₄用量为4%、反应时间为21 h的条件下,考察猪胰脂肪酶用量对转化率的影响,结果如图5所示。

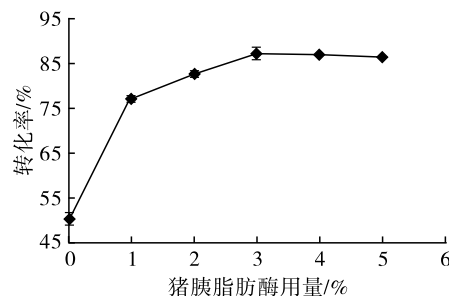


图5 猪胰脂肪酶用量对酯化反应的影响

从图5可以看出,仅在离子液体催化下,转化率为50.37%,随着猪胰脂肪酶的加入,转化率有了明显提高,当猪胰脂肪酶用量为1%时,转化率增加至77.21%,继续增加猪胰脂肪酶用量到3%时,转化率达到最大,为86.71%,此时的猪胰脂肪酶用量在反应体系中趋于饱和。继续增加猪胰脂肪酶用量,转化率略有下降,可能是猪胰脂肪酶用量的增加提高了与离子液体直接接触的机会,导致部分猪胰脂肪酶活性降低。因此,最适猪胰脂肪酶用量为3%。

2.2.5 反应温度对酯化反应的影响

在醇酸物质的量比为4.5:1、反应时间为21 h、[Asp]HSO₄用量为4%、猪胰脂肪酶用量为3%的条件下,考察反应温度对转化率的影响,结果如图6所示。

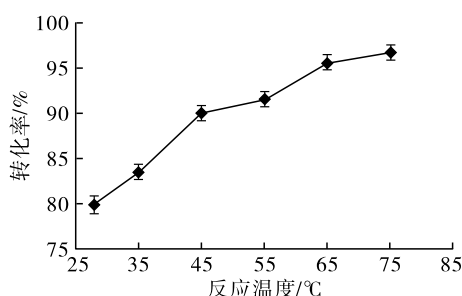


图6 反应温度对酯化反应的影响

由图6可以看出,在常温(28 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 反应时,转化率就达到了79.75%,说明 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 联合猪胰脂肪酶催化体系在低温时具有较好效果。提高反应温度至 35°C (经前期研究得到),猪胰脂肪酶在此温度下呈现最优的催化效果,转化率达到83.42%。继续升高反应温度至 65°C ,此时反应温度已经接近猪胰脂肪酶失活温度^[26],猪胰脂肪酶的活性可能大幅降低,但实际上转化率继续增加,说明 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 在此时发挥了良好的催化效果。 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 能在高温时展现其优良的催化效果^[24],但高温影响酶的活性,考虑到酶的活性以及能耗问题,以 45°C 作为该实验的最优反应温度,此时转化率达到89.96%。结合课题组前期研究成果^[24],即在催化剂 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量20%、醇酸物质的量比7:1、反应温度(85 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间24 h的条件下,可实现油酸转化率为97.72%,认为 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 与猪胰脂肪酶联合催化油酸酯化反应可促进猪胰脂肪酶高效反应,减少离子液体的用量,降低催化剂制备成本,使酯化反应可以在较低温度下取得较好效果。

2.3 酯化反应正交实验

根据单因素实验结果,固定反应温度为 45°C ,以转化率为指标,以 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量(A)、醇酸物质的量比(B)、猪胰脂肪酶用量(C)、反应时间(D)为因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,用SPSS 19.0对数据进行分析,优化 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 联合猪胰脂肪酶催化油酸制备油酸甲酯工艺条件。正交实验因素水平见表1,正交实验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表1 正交实验因素水平

水平	$[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量/%	醇酸物质的量比	猪胰脂肪酶用量/%	反应时间/h
1	2	3.5:1	2	18
2	4	4.5:1	3	21
3	6	5.5:1	4	24

表2 正交实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	转化率/%
1	1	1	1	1	73.60
2	1	2	2	2	79.26
3	1	3	3	3	86.25
4	2	1	2	3	84.78
5	2	2	3	1	86.87
6	2	3	1	2	91.90
7	3	1	3	2	89.55
8	3	2	1	3	90.57
9	3	3	2	1	91.47
k_1	79.70	82.64	85.36	83.98	
k_2	87.85	85.57	85.17	86.90	
k_3	90.53	89.87	87.56	87.20	
R	10.83	7.23	2.39	3.22	

表3 方差分析

来源	平方和	自由度	F	p
A	602.378	2	1401.446	<0.01
B	231.468	2	538.516	<0.01
C	23.464	2	54.590	<0.01
D	50.476	2	117.434	<0.01
误差	3.868	2		

从表2可知, $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 联合猪胰脂肪酶催化油酸制备油酸甲酯实验中主次影响因素为 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量>醇酸物质的量比>反应时间>猪胰脂肪酶用量。从表3可以看出, $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量、醇酸物质的量比、猪胰脂肪酶用量、反应时间都对该实验有极显著性影响,影响大小与表2结果一致,最优组合为 $A_3B_3C_3D_3$ 。对表2中k值进行分析,可以看出反应时间中 k_2 和 k_3 值接近,考虑到工程中应兼具高效和低耗,因此选择 D_2 作为最优反应时间。因此,最优工艺条件组合调整为 $A_3B_3C_3D_2$,即 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量6%、醇酸物质的量比5.5:1、猪胰脂肪酶用量4%、反应时间21 h,重复3次实验得出转化率为91.91%。

3 结论

(1)在单因素实验基础上,通过正交实验优化 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化工艺,得出 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量、醇酸物质的量比、猪胰脂肪酶用量、反应时间对转化率有显著性影响,且影响的主次顺序为 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量>醇酸物质的量比>反应时间>猪胰脂肪酶用量。最优工艺条件为 $[\text{Asp}]\text{HSO}_4$ 用量6%、醇酸物质的量比5.5:1、猪胰脂肪酶用量

4%、反应时间 21 h,在此条件下油酸的转化率为 91.91%。

(2)[Asp]HSO₄联合猪胰脂肪酶催化油酸酯化反应,发挥了[Asp]HSO₄催化剂和溶剂的双重特性,降低了甲醇和温度对脂肪酶的影响,使酯化反应可以在更低温度下进行并获得较高的转化率。

参考文献:

- [1] 张无敌,尹芳,李建昌,等. 生物柴油的开发利用现状分析[J]. 中国建设动态:阳光能源, 2006(2): 59-61.
- [2] RAJAEIFAR M A, AKRAM A, GHOBADIAN B, et al. Environmental impact assessment of olive pomace oil biodiesel production and consumption: a comparative lifecycle assessment[J]. Energy, 2016, 106: 87-102.
- [3] NAUTIYAL P, SUBRAMANIAN K A, DASTIDAR M G, et al. Experimental assessment of performance, combustion and emissions of a compression ignition engine fuelled with *Spirulina platensis* biodiesel[J/OL]. Energy, 2020, 193: 116861 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116861>.
- [4] GENG L M, CHEN Y, CHEN X B, et al. Study on combustion characteristics and particulate emissions of a common-rail diesel engine fueled with *n*-butanol and waste cooking oil blends[J]. J Energ Inst, 2018, 92(3): 438-449.
- [5] CHEN Y, MA J, HAN B, et al. Emissions of automobiles fueled with alternative fuels based on engine technology: a review[J]. J Traffic Transp Eng (English Ed), 2018, 5(4): 318-334.
- [6] CHEN H, XIE B, MA J, et al. NO_x emission of biodiesel compared to diesel: higher or lower? [J]. Appl Therm Eng, 2018, 137: 584-593.
- [7] 王屹然,祝媛媛. 新型固体碱催化剂在生物柴油合成中的应用分析[J]. 当代化工研究, 2021(2): 155-156.
- [8] FASIM A, MORE V S, MORE S S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses[J]. Curr Opin Biotechnol, 2021, 69: 68-76.
- [9] TAN T, LU J, NIE K, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(5): 628-634.
- [10] 李成,王胜杰,季敏,等. 脂肪酶在催化酯交换过程中的稳定性[J]. 上海大学学报, 2017, 23(4): 623-627.
- [11] MOHAMMAD F A H, AMIN N A S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis [J]. Renew Sustain Energ Rev, 2012, 16: 5770-5786.
- [12] 史会兵,彭黔荣,杨敏,等. 氨基酸离子液体应用研究进展[J]. 化工新型材料, 2013, 41(7): 161-163.
- [13] LOTTI M, PLEISS J, VALERO F, et al. Enzymatic production of biodiesel: strategies to overcome methanol inactivation [J/OL]. Biotechnol J, 2018, 13(5): 1700155 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.1002/biot.201700155>.
- [14] 苗长林,吕鹏梅,王忠铭,等. 微藻直接离子液体脂肪酶制备生物柴油[J]. 太阳能学报, 2021, 42(2): 233-238.
- [15] 朱广琪,李芳浩,刘妍,等. 微乳体系中脂肪酶催化棕榈酸制备生物柴油及其工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(5): 30-36.
- [16] LIU Y, WU H, YAN Y, et al. Lipase-catalyzed transesterification for biodiesel production in ionic liquid [Emim] Tfo [J]. Int J Green Energ, 2013, 10(1): 63-71.
- [17] MANURUNG R, HASIBUAN R, TASLIM T, et al. Enzymatic transesterification of DPO to produce biodiesel by using lipozyme RM IM in ionic liquid system [J]. Procedia - Soc Behl Sci, 2015, 195: 2485-2491.
- [18] SWATLOSKI R P, HOLBREY J D, ROGERS R D. Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [J]. Green Chem, 2003, 5(4): 361-363.
- [19] BERNOT R J, BRUESEKE M A, EVANS-WHITE M A, et al. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna* [J]. Environ Toxicol Chem, 2005, 24(1): 87-92.
- [20] HAN X X, CHEN K K, YAN W, et al. Amino acid-functionalized heteropolyacids as efficient and recyclable catalysts for esterification of palmitic acid to biodiesel [J]. Fuel, 2016, 165: 115-122.
- [21] 苑华飞,魏海燕,曹江宇,等. 离子液体[C₁₄mim]BF₄对大鼠的急性毒性[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2021, 44(9): 1268-1272.
- [22] 韩本勇. 吡咯烷酮与氨基酸离子液体的合成及其催化剂制备生物柴油的研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2018.
- [23] ANDREANI L, ROCHA J D. Use of ionic liquids in biodiesel production: a review [J]. Braz J Chem Eng, 2012, 29: 1-13.
- [24] 赵振兴,汪文伟,韩本勇,等. L-天冬氨酸离子液体催化油酸酯化反应合成油酸甲酯的研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(6): 50-53.
- [25] 汪文伟,赵振兴,郑礼,等. L-天冬氨酸离子液体催化不同脂肪酸酯化的实验研究[J]. 现代化工, 2021, 41(5): 153-157.
- [26] 刘芝君,黄业传,马志鹏. 热处理对猪肉中酸性脂肪酶活性的影响[J]. 肉类工业, 2016(7): 45-48.