

# Lipozyme TL100L 催化米糠酸化油制备 生物柴油的工艺研究

窦伟国<sup>1,2</sup>, 陈明霞<sup>1</sup>, 孟晓鹏<sup>3</sup>, 吴安石<sup>4</sup>, 毕艳兰<sup>1,2</sup>, 陈竞男<sup>1,2</sup>

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 中原食品实验室, 河南 漯河 462300;  
3. 郑州远洋油脂工程技术有限公司, 郑州 450018; 4. 浙江得乐康  
食品股份有限公司, 浙江 台州 317306)

**摘要:**旨在为米糠酸化油的产业化应用提供参考,以米糠酸化油为原料,经丙酮提取预处理后,采用酶法催化制备生物柴油。通过单因素实验考察脂肪酶种类、酶添加量、醇油物质的量比和反应温度对生物柴油产率的影响,结合正交实验对生物柴油制备的工艺条件进行优化,并采用分子蒸馏对生物柴油进行精制,同时对精制生物柴油进行表征。结果表明:米糠酸化油经预处理后,过氧化值、谷维素及不皂化物含量无显著变化,酸值、皂化值显著升高,水分及挥发物含量、磷脂含量、灰分和皂含量显著降低;生物柴油制备的最优工艺条件为醇油物质的量比3:1、液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量4%、反应温度30℃、反应时间4 h,在此条件下生物柴油产率达(86.77±0.54)%,经分子蒸馏纯化后脂肪酸甲酯含量达(97.00±0.04)%;精制生物柴油理化指标均符合 GB 25199—2017 要求;傅里叶红外光谱分析证实了产物中含脂肪酸甲酯,热重分析表明精制生物柴油在178.0~293.2℃区间内失重最快,差示扫描量热分析表明-37.5~-47.2℃的峰与不饱和脂肪酸甲酯的晶体有关,-7.9~-3.7℃的峰与饱和脂肪酸甲酯的晶体相关,生物柴油的结晶起始温度为-8.87℃。综上,以米糠酸化油为原料采用酶法制备生物柴油具有极大的发展潜力。

**关键词:**米糠酸化油;脂肪酶;酯化反应;生物柴油

中图分类号:TQ645;TK63

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)10-0110-08

## Preparation of biodiesel from acidified rice bran oil catalyzed by Lipozyme TL100L

DOU Weiguo<sup>1,2</sup>, CHEN Mingxia<sup>1</sup>, MENG Xiaopeng<sup>3</sup>,  
WU Anshi<sup>4</sup>, BI Yanlan<sup>1,2</sup>, CHEN Jingnan<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;  
2. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, Henan, China; 3. Zhengzhou Ocean Oil Engineering  
Co., Ltd., Zhengzhou 450018, China; 4. Zhejiang Delekang Food Co., Ltd., Taizhou 317306,  
Zhejiang, China)

**Abstract:** Aiming to provide reference for the industrial application of acidified rice bran oil, biodiesel was prepared by enzyme catalysis of acetone extract of acidified rice bran oil. The effects of lipase type, enzyme dosage, alcohol-oil molar ratio and reaction temperature on biodiesel yield were investigated

收稿日期:2023-11-28;修回日期:2024-05-27

基金项目:河南省科技厅自然科学基金项目(232103810067);  
河南工业大学自然创新基金支持计划(2020ZKCJ10)

作者简介:窦伟国(1999),男,硕士研究生,研究方向为脂质  
化学(E-mail)2269342820@qq.com。

通信作者:毕艳兰,教授(E-mail)bylzy@126.com;陈竞男,  
副教授(E-mail)chenjingnan813@126.com。

through single factor experiments. The process conditions for biodiesel preparation were optimized by orthogonal experiments. The biodiesel prepared was refined by molecular distillation, and the refined biodiesel was characterized. The results showed that after the pretreatment of the acidified rice bran oil with acetone extraction, the peroxide

value, oryzanol content and unsaponifiable matters content did not change significantly, the acid value and saponification value increased significantly, and the contents of moisture and volatile matter, phospholipid, ash and soap reduced significantly. The optimal process conditions for biodiesel preparation were as follows: alcohol – oil molar ratio 3:1, liquid lipase Lipozyme TL100L dosage 4%, reaction temperature 30 °C, and reaction time 4 h. Under the optimal conditions, the biodiesel yield reached (86.77 ± 0.54)%, and the content of fatty acid methyl ester reached (97.00 ± 0.04)% after purification by molecular distillation. The physicochemical indexes of refined biodiesel were in accordance with the requirements of GB 25199 – 2017. Fourier infrared spectroscopy (FTIR) analysis confirmed that the product contained fatty acid methyl ester, thermogravimetric (TG – DTG) analysis showed that the weight loss of refined biodiesel was the fastest in the temperature interval of 178.0 – 293.2 °C; differential scanning calorimetry (DSC) analysis showed that the peaks at temperatures from –37.5 °C to –47.2 °C were related to the crystals of unsaturated fatty acid methyl ester, and the peaks at temperatures from –7.9 °C to –3.7 °C were related to the crystals of saturated fatty acid methyl ester, and the crystallisation starting temperature of biodiesel was –8.87 °C. In conclusion, the enzymatic preparation of biodiesel from acidified rice bran oil has great potential for development.

**Key words:** acidified rice bran oil; lipase; esterification; biodiesel

随着化石燃料的不断开采,能源日渐紧缺,化石燃料燃烧产生有害物质导致的环境污染问题也亟待解决。生物柴油是长碳链的单烷基脂肪酸酯,可通过油脂中游离脂肪酸与短链醇(甲醇、乙醇等)酯化或油脂醇解反应获得<sup>[1]</sup>。与化石燃料相比,生物柴油是一种绿色可持续能源,具有环境友好<sup>[2]</sup>、无毒无害等<sup>[3]</sup>优点,市场发展潜力巨大<sup>[4]</sup>。目前,制备生物柴油的原料包括大豆油、菜籽油、花生油、鸡油、牛油等食用动植物油,麻疯树籽油、蓖麻籽油等非食用植物油,藻油和菌油等微生物油脂,地沟油、酸化油等餐饮废油及油脂下脚料<sup>[5-7]</sup>。研究表明,原料成本占生物柴油总成本的65%~80%<sup>[8]</sup>。因此,开发廉价、来源广泛的生物柴油原料对于能源可持续发展和环境保护具有非常重要的意义。

米糠酸化油是米糠油碱炼脱酸主要副产物——皂脚酸化的产物<sup>[9]</sup>,其脂肪酸含量高,是生产生物柴油的优良原料<sup>[10]</sup>。据估算,目前世界米糠油年产量约750万t<sup>[11]</sup>,若将碱炼产生的皂脚全部酸化处理,理论上将产生75万t米糠酸化油(以米糠原油游离脂肪酸含量10%计)。米糠酸化油价格低廉,因此以米糠酸化油为原料制备生物柴油不仅能够降低生产成本,而且可以在一定程度上弥补化石燃料的短缺,更符合我国“不与人争粮,不与粮争地”的政策导向<sup>[12]</sup>。

生物柴油的制备方法主要有物理法和化学

法<sup>[7]</sup>。物理法指将原料油、柴油和添加剂直接混合制得生物柴油,包括微乳液法和直接混合法<sup>[6]</sup>。化学法包括高温裂解法、酶法、酸催化法、碱催化法。其中,酸、碱催化法是目前制备生物柴油较为成熟的方法<sup>[13]</sup>,但其对原料油的品质要求较高,对设备腐蚀严重<sup>[14-15]</sup>,反应结束后需多次水洗,能耗大,存在“三废”排放严重,易对环境造成二次污染等问题<sup>[12,16]</sup>,而采用酶法制备生物柴油可避免上述问题。米糠酸化油含有磷脂、蜡、色素等成分,杂质多、稳定性差,由其制备生物柴油存在一定的技术难题,且目前尚未有酶法催化米糠酸化油制备生物柴油的研究报道。因此,本研究以廉价的米糠酸化油为原料,采用酶法催化米糠酸化油制备生物柴油,探索最佳制备工艺条件,并对制备的生物柴油的理化指标和结构进行测定与分析,以期为米糠酸化油产业化应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

米糠酸化油,浙江得乐康食品股份有限公司;固定化脂肪酶 Novozym 435(来自于南极假丝酵母,酶活8 000 PLU/g)、固定化脂肪酶 Lipozyme RMIM(来自于米曲霉,酶活275 IUN/g)、固定化脂肪酶 Lipozyme TLIM(来自于疏棉状嗜热丝孢菌,酶活250 IUN/g)、液体脂肪酶 Lipozyme TL100L(来自于疏棉状嗜热丝孢菌,酶活10 000 U/g)、液体脂肪酶 Lipozyme CALB(来自于南极假丝酵母,

酶活 5 000 LU/g), 郑州贝莱德生物技术有限公司。

慢速定性滤纸(孔径 10 ~ 15  $\mu\text{m}$ ), 杭州富阳北木浆纸有限公司; 十七烷酸甲酯(纯度 98.85%), 上海皓鸿生物医药科技有限公司; 氧化锌、无水甲醇、无水硫酸钠、乙醚、冰乙酸、淀粉、硫酸联氨、盐酸、磷酸二氢钾、钼酸钠、氢氧化钾、正己烷, 均为分析纯; 异丙醇, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 三氟化硼乙醚, 国药集团化学试剂有限公司; 碱性蓝 6B 指示剂、甲醇钠溶液, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 正己烷、丙酮, 色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.1.2 仪器与设备

GC8860 气相色谱仪, 分析天平, 水浴磁力搅拌器, 顶置式磁力搅拌器, 台式高速离心机, 循环水式多用真空泵, 紫外分光光度计, 旋转蒸发仪, ALPHA 傅里叶变换红外光谱仪, VKL-70 分子蒸馏仪, STA 2500 同步热分析仪, 204F1 差示扫描量热仪。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 米糠酸化油预处理

将米糠酸化油加热至 30  $^{\circ}\text{C}$ , 按 1:10 的料液比与提取溶剂丙酮混合, 采用顶置式磁力搅拌器在 350 r/min 条件下混合 90 min, 然后用慢速定性滤纸过滤两次, 旋转蒸发仪除去溶剂后得预处理米糠酸化油。

以预处理后脂肪酸质量与预处理前的比值计算脂肪酸提取率。

### 1.2.2 生物柴油的制备

在两口圆底烧瓶中分别加入预处理米糠酸化油、无水甲醇、脂肪酶, 充分混合均匀, 置于一定温度的磁力搅拌器上, 调节转速为 350 r/min, 连接冷凝装置, 反应一定时间后, 于 10 000 r/min 离心 10 min, 用无水硫酸钠除水得粗生物柴油。

### 1.2.3 生物柴油的纯化

参考于涵等<sup>[17]</sup>的方法, 采用分子蒸馏对粗生物柴油纯化, 分子蒸馏条件: 真空度 -0.099 MPa, 刮膜转速 90 r/min, 进料温度 70  $^{\circ}\text{C}$ , 进料速度 95 mL/h, 蒸馏温度 164  $^{\circ}\text{C}$ , 重相出料温度 40  $^{\circ}\text{C}$ , 轻相出料温度 40  $^{\circ}\text{C}$ , 冷凝温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2.4 生物柴油产率计算

参考 Jin 等<sup>[18]</sup>方法并稍作修改。称取 0.01 g (精确至 0.000 1 g) 产物, 加入 2 mL 质量浓度 10 mg/mL 十七烷酸甲酯溶液为内标, 无水硫酸钠除水后, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 进气相色谱仪分析。气相色谱条件: DB-Fast FAME 色谱柱(30.0 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ); FID 检测器; 进样口、检测器

温度 260  $^{\circ}\text{C}$ ; 分流比 20:1; 柱升温程序为初始温度 80  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 0.5 min, 以 40  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 165  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 1 min, 以 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 230  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 4 min;  $\text{N}_2$  流速 25 mL/min,  $\text{H}_2$  流速 40 mL/min, 空气流速 400 mL/min; 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

按式(1)计算生物柴油产率( $Y$ )。

$$Y = \frac{\sum A - A_{17}}{A_{17}} \times \frac{\rho_{17} \times V_{17} \times \omega}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $\sum A$  为所有脂肪酸甲酯的色谱峰面积;  $A_{17}$  为十七烷酸甲酯的色谱峰面积;  $\rho_{17}$  为十七烷酸甲酯溶液的质量浓度, mg/mL;  $V_{17}$  为十七烷酸甲酯溶液的体积, mL;  $\omega$  为十七烷酸甲酯的纯度;  $m$  为称样(产物)质量, mg。

### 1.2.5 米糠酸化油理化指标测定

参照 GB 5009.236—2016 测定水分及挥发物的含量; 参照 GB 5009.4—2016 测定灰分的含量; 参照 GB 5009.229—2016 测定酸值; 参照 GB 5009.227—2016 测定过氧化值; 参照 LS/T 6121.1—2017 测定谷维素含量; 参照 GB/T 5534—2008 测定皂化值; 参照 GB/T 5537—2008 测定磷脂含量; 参照 GB/T 5533—2008 测定皂含量; 参照 GB/T 5535.2—2008 测定不皂化物含量; 参照 GB/T 265—1988 测定运动黏度。

### 1.2.6 生物柴油的表征

#### 1.2.6.1 理化指标测定

参照 GB/T 258—2016 测定酸值; 参照 SH/T 0246—1992 测定水分含量; 参照 GB/T 265—1988 测定运动黏度; 参照 SH/T 0796—2007 测定单甘酯含量; 参照 GB/T 511—2010 测定机械杂质; 参照 GB/T 13377—2010 测定密度; 参照 GB/T 261—2021 测定闪点(闭口); 参照 SH/T 0248—2017 测定冷滤点; 参照 GB/T 23801—2009 测定脂肪酸甲酯含量; 参照 GB/T 17144—2021 测定残碳质量分数; 参照 GB/T 5096—2017 测定铜片腐蚀; 参照 SH/T 0689—2000 测定硫含量; 参照 GB/T 6540—1986 测定色度。

#### 1.2.6.2 傅里叶红外光谱(FTIR)分析

采用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行分析。分析条件: 光谱范围 500 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 32 次。

#### 1.2.6.3 热重-微商热重(TG-DTG)分析

采用同步热分析仪对生物柴油进行热重分析。分析条件: 样品 10 mg,  $\text{N}_2$  流量 50 mL/min, 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率从室温升至 500  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.2.6.4 差示扫描量热(DSC)分析

采用差示扫描量热仪对生物柴油进行 DSC 分析。分析条件:氮气条件下,样品 10 mg,在 40 ℃ 保持 3 min,以 10 ℃/min 的速率降至 -80 ℃,在 -80 ℃ 保持 3 min,再以 10 ℃/min 的速率升至 40 ℃。

#### 1.2.7 数据处理

实验均重复 3 次,结果以“平均值 ± 标准偏差”表示,使用 SPSS 22 软件处理数据, $p < 0.05$  表示差异显著, $p < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原料米糠酸化油和预处理米糠酸化油理化指标分析

原料米糠酸化油组分复杂,影响生物柴油的酶法制备,因此需要对其进行预处理<sup>[19]</sup>。按 1.2.1 方法以丙酮为溶剂对米糠酸化油进行预处理后,脂肪酸提取率为  $(92.09 \pm 0.15)\%$ ,表明经过丙酮预处理大部分脂肪酸被提取出来。米糠酸化油预处理前后理化指标变化如表 1 所示。

表 1 米糠酸化油预处理前后理化指标对比

理化指标	原料酸化油	预处理后酸化油
过氧化值/(mmol/kg)	$1.74 \pm 0.08^a$	$1.76 \pm 0.05^a$
酸值(KOH)/(mg/g)	$144.49 \pm 0.20^b$	$178.17 \pm 0.95^a$
灰分/%	$1.58 \pm 0.04^a$	$0.26 \pm 0.01^b$
水分及挥发物/%	$3.42 \pm 0.70^a$	$0.35 \pm 0.01^b$
皂化值(KOH)/(mg/g)	$163.64 \pm 0.37^b$	$185.67 \pm 0.57^a$
磷脂/%	$0.92 \pm 0.34^a$	$0.31 \pm 0.00^b$
皂/%	$8.24 \pm 0.06^a$	$0.42 \pm 0.01^b$
谷维素/%	$0.90 \pm 0.00^a$	$0.90 \pm 0.01^a$
不皂化物/%	$3.39 \pm 0.16^a$	$3.26 \pm 0.11^a$
运动黏度(40 ℃)/(m <sup>2</sup> /s)	$743.00 \pm 2.11^a$	$76.00 \pm 1.35^b$

注:同行不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ )

Note: Different letters in the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

由表 1 可知:米糠酸化油的过氧化值、谷维素及不皂化物含量在预处理前后无显著变化;预处理后,米糠酸化油的酸值、皂化值显著升高,高脂肪酸含量的米糠酸化油有利于生物柴油的制备<sup>[20]</sup>;预处理后,米糠酸化油的水分及挥发物、灰分和磷脂含量显著下降,改善了米糠酸化油的品质,而水分含量的降低可使脂肪酸酯化反应向促进脂肪酸甲酯生成的方向进行<sup>[21]</sup>,有利于生物柴油的制备;此外,预处理后,米糠酸化油的皂含量显著下降,致使其运动黏度显著下降(降幅高达 89.77%),运动黏度

下降有利于液体脂肪酶与底物更充分接触,使反应更易进行。

### 2.2 米糠酸化油制备生物柴油的工艺条件优化

#### 2.2.1 单因素实验

##### 2.2.1.1 脂肪酶种类对生物柴油产率的影响

在醇油物质的量比 4:1、酶添加量 4% (以预处理米糠酸化油的质量为基准)、反应温度 30 ℃ 条件下,探究脂肪酶种类对生物柴油产率的影响,结果如图 1 所示。

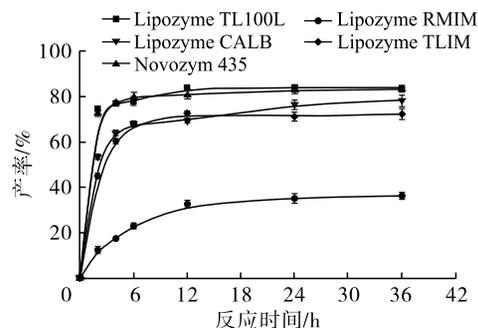


图 1 脂肪酶种类对生物柴油产率的影响

Fig. 1 Effect of lipase type on the yield of biodiesel

由图 1 可知,随着反应时间的延长,生物柴油产率均先快速增加后趋于平缓。其中,Lipozyme TL100L 的催化效果最好,反应 36 h 时,生物柴油产率达  $(84.83 \pm 1.11)\%$ ,是 Lipozyme RMIM 的 2.5 倍左右。与固定化脂肪酶 Lipozyme RMIM、Lipozyme TLIM 相比,液体脂肪酶 Lipozyme CALB 和 Lipozyme TL100L 具有更强的油-水界面作用力<sup>[22]</sup>,且与底物接触更充分,因而其催化效果更好。与 Lipozyme CALB 相比,Lipozyme TL100L 的催化活性位点更难被甲醇破坏<sup>[23]</sup>,甲醇耐受性更强,因而其催化活性更好,这与 Sun 等<sup>[24]</sup>研究 Lipozyme TL100L 催化梧桐籽油制备生物柴油的结果一致。尽管固定化脂肪酶 Novozym 435 也具有较好的催化效果,但液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 价格更为低廉。因此,选择液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 作为催化用酶。

##### 2.2.1.2 酶添加量对生物柴油产率的影响

在醇油物质的量比 3:1、反应温度 30 ℃ 条件下,探究液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量对生物柴油产率的影响,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,在反应时间 12 h 时,随着酶添加量的增加,生物柴油产率总体先增加后趋于平缓,但反应达到平衡的时间缩短,这主要由于酶添加量的提高增加了脂肪酶与酸化油反应的活性位点<sup>[24]</sup>,从而提高了反应速率。酶添加量过高会增加生产成本,因此选择酶添加量为 4%。

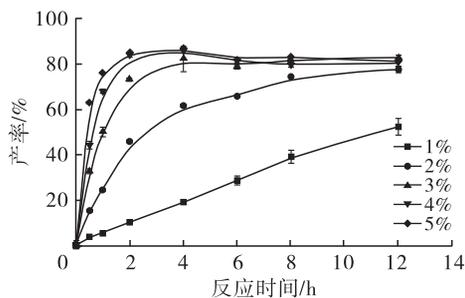


图2 酶添加量对生物柴油产率的影响

Fig. 2 Effect of lipase dosage on the yield of biodiesel

### 2.2.1.3 醇油物质的量比对生物柴油产率的影响

在液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量 4%、反应温度 30 °C 条件下,探究醇油物质的量比对生物柴油产率的影响,结果如图 3 所示。

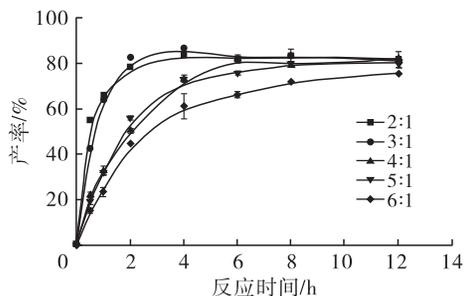


图3 醇油物质的量比对生物柴油产率的影响

Fig. 3 Effect of alcohol-oil molar ratio on the yield of biodiesel

由图 3 可知,当醇油物质的量比从 2:1 增加至 3:1 时,生物柴油产率均在 4 h 达到最大,且产率由  $(83.54 \pm 0.42)\%$  升高至  $(86.45 \pm 0.35)\%$ 。进一步提高醇油物质的量比,过量的甲醇对酶、酸化油的催化稀释作用变强,导致生物柴油产率下降,且反应达到平衡的时间延长。高浓度的甲醇还可改变脂肪酶的活性位点,破坏酶的三级结构,使脂肪酶不稳定,从而引起酶催化活性降低甚至失活<sup>[25-26]</sup>。另外,过量的甲醇使生产成本增加,且加大了甲醇的回收难度。因此,选择醇油物质的量比为 3:1。

### 2.2.1.4 反应温度对生物柴油产率的影响

在醇油物质的量比 3:1、液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量 4% 条件下,探究反应温度对生物柴油产率的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,在反应时间 12 h 时,当反应温度从 25 °C 升高至 30 °C 时,生物柴油产率相差不大,但随着反应温度继续升高,生物柴油产率不断下降。这是因为在一定温度下,升高反应温度可增加甲醇与酸化油的混溶性,降低体系的黏度和扩散阻力<sup>[27]</sup>,同时,可增加脂肪酶的催化活性,促进脂肪酶-底物复合物形成<sup>[28]</sup>,更有利于生物柴油的合成。但过高

的温度会破坏脂肪酶结构甚至使酶失活<sup>[29-30]</sup>,从而使生物柴油产率下降。因此,选择反应温度为 30 °C。

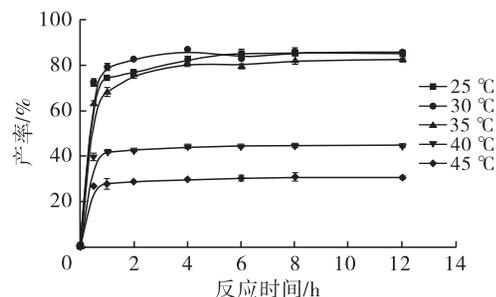


图4 反应温度对生物柴油产率的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on the yield of biodiesel

### 2.2.2 正交实验

根据单因素实验结果固定反应时间 4 h,以液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量、醇油物质的量比和反应温度为因素,生物柴油产率为指标,设计正交实验,确定制备生物柴油最优工艺条件。正交实验因素水平见表 2,正交实验设计与结果见表 3。

表2 正交实验因素水平

Table 2 Factor levels of orthogonal experiment

水平	A 酶添加量/%	B 醇油物质的量比	C 反应温度/°C
1	3	2:1	25
2	4	3:1	30
3	5	4:1	35

表3 正交实验设计与结果

Table 3 Design and results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	产率/%
1	1	1	1	82.55
2	1	2	2	83.49
3	1	3	3	63.67
4	2	1	2	81.21
5	2	2	3	78.11
6	2	3	1	82.06
7	3	1	3	73.25
8	3	2	1	80.63
9	3	3	2	82.62
$k_1$	76.57	79.00	81.75	
$k_2$	80.46	80.74	82.44	
$k_3$	78.83	76.12	71.68	
R	3.89	4.63	10.76	

由表 3 可知,影响生物柴油产率的因素主次顺序为  $C > B > A$ ,即反应温度 > 醇油物质的量比 > 酶添加量,制备生物柴油的最优反应条件为  $A_2B_2C_2$ ,即液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量 4%、醇油物质的量比 3:1、反应温度 30 °C。在最优条件下,生物柴油产率达  $(86.77 \pm 0.54)\%$ 。

## 2.3 生物柴油的表征

### 2.3.1 理化指标

采用分子蒸馏技术对最优条件下制备的粗生物柴油进行精制,结果表明,进料量 1 254.5 g 时,经分子蒸馏后得 1 056.64 g 轻相、112.28 g 重相,轻相(精制生物柴油)得率为 84.23%,经分子蒸馏纯化后脂肪酸甲酯含量达(97.00 ± 0.04)%。测定精制生物柴油的理化指标,并与 GB 25199—2017 中 BD100 生物柴油标准进行对比,结果见表 4。

表 4 生物柴油的理化指标

Table 4 Physicochemical indicators of biodiesel

理化指标	生物柴油	GB 25199—2017 要求
酸值(KOH)/(mg/g)	0.30 ± 0.00	≤ 0.50
水分含量/(mg/kg)	200 ± 0.00	≤ 500
运动黏度(40℃)/(mm <sup>2</sup> /s)	5.00 ± 0.40	1.9 ~ 6.0
单甘酯含量/%	0.04 ± 0.00	≤ 0.80
机械杂质	无	无
密度(20℃)/(kg/m <sup>3</sup> )	866.00 ± 1.58	820 ~ 900
闪点(闭口)/℃	179.00 ± 0.52	≥ 130
冷滤点/℃	0.00 ± 0.04	报告
脂肪酸甲酯含量/%	97.00 ± 0.04	≥ 96.5
残碳质量分数/%	0.02 ± 0.00	≤ 0.050
色度(号)	0.5	
铜片腐蚀(50℃, 3 h)(级)	1	≤ 1
硫含量/(mg/kg)	2.50 ± 0.03	≤ 50(S50)

由表 4 可见,精制生物柴油的各项理化指标均符合 GB 25199—2017 中 BD100 生物柴油的要求。

### 2.3.2 红外光谱分析

对预处理前后的米糠酸化油和精制生物柴油进行红外光谱分析,结果见图 5。

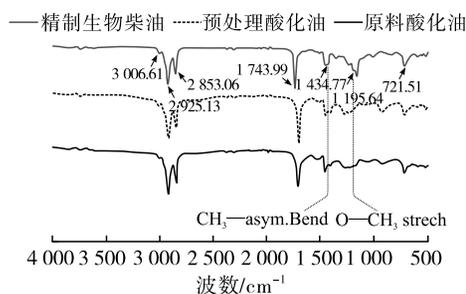


图 5 预处理前后的酸化油和精制生物柴油的 FTIR 图

Fig. 5 FTIR spectrum of acidified oil before and after pretreatment and refined biodiesel

如图 5 所示,3 006.61 cm<sup>-1</sup> 处为 C=C—H 上碳氢键伸缩振动峰,2 925.13 cm<sup>-1</sup> 和 2 853.06 cm<sup>-1</sup> 处分别为亚甲基碳氢单键和甲基不对称伸缩振动峰<sup>[31]</sup>,1 459.51 cm<sup>-1</sup> 处属于 C—H 的弯曲振动峰,1 195.64,1 168.84 cm<sup>-1</sup> 附近为—CH<sub>2</sub>—COOCH<sub>3</sub> 基团的伸缩振动峰,721.51 cm<sup>-1</sup> 处为甲基振动峰,1 743.99 cm<sup>-1</sup> 处为典型的—C=O 伸缩振动峰<sup>[32]</sup>。

精制生物柴油在 1 434.77 cm<sup>-1</sup> 与 1 195.64 cm<sup>-1</sup> 处有峰,而预处理前后的米糠酸化油在此区域无峰,表明米糠酸化油在脂肪酶的催化下成功转化为脂肪酸甲酯,这与先前的研究<sup>[33-34]</sup>一致。由此证明了精制生物柴油中含有脂肪酸甲酯。

### 2.3.3 TG-DTG 和 DSC 分析

图 6 为生物柴油的 TG-DTG 曲线。图 7 为生物柴油 DSC 曲线。

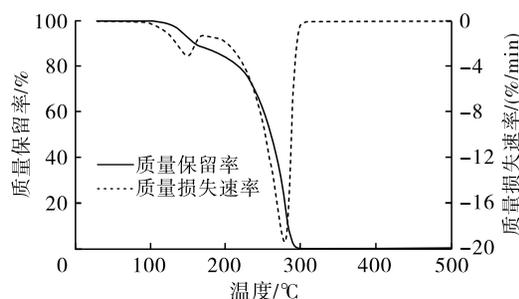


图 6 生物柴油的 TG-DTG 曲线

Fig. 6 TG-DTG curve of biodiesel

由图 6 可知,生物柴油在 148.6℃ 时开始失重分解,随着温度的继续升高,生物柴油失重速率不断加快,在 178.0 ~ 293.2℃ 区间内失重最快,失重率为 87.51%,并在 278.1℃ 达到 DTG 曲线峰值。178.0 ~ 293.2℃ 区间快速失重表明生物柴油的着火性能和可燃性良好,可充分燃烧<sup>[35]</sup>。

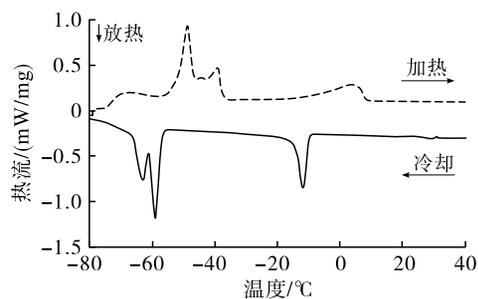


图 7 生物柴油的 DSC 曲线

Fig. 7 DSC curve of biodiesel

由图 7 可知,沿着加热方向,生物柴油有 3 个清晰的吸热峰,-37.5 ~ -47.2℃ 区间的 2 个峰与不饱和脂肪酸甲酯(油酸甲酯、亚油酸甲酯)的晶体有关<sup>[36]</sup>,-7.9 ~ -3.7℃ 区间的峰与饱和脂肪酸甲酯(棕榈酸甲酯)的晶体相关。沿着冷却方向,可知生物柴油的结晶起始温度为 -8.87℃,表明精制生物柴油有较好的低温流动性<sup>[37]</sup>。

## 3 结论

以生物柴油产率为指标,通过单因素实验和正交实验对酶法催化米糠酸化油制备生物柴油的工艺条件进行优化,确定生物柴油制备的最优工艺条件

为醇油物质的量比 3 : 1、液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 添加量 4%、反应温度 30 ℃、反应时间 4 h, 在此条件下生物柴油产率达(86.77 ± 0.54)%, 经分子蒸馏纯化后脂肪酸甲酯含量达(97.00 ± 0.04)%, 且精制生物柴油理化指标均符合 GB 25199—2017 要求。FTIR 分析证实了产物为脂肪酸甲酯; 热重分析表明精制生物柴油着火性能和可燃性良好; DSC 分析表明生物柴油的结晶起始温度为 -8.87 ℃, 有较好的低温流动性。液体脂肪酶 Lipozyme TL100L 作为一种游离酶难以回收重复利用, 若能将其改性或固定化修饰, 不仅能降低酶法生产生物柴油的成本, 也可增加脂肪酶对甲醇的耐受性, 使生物柴油的产率更高, 增加工业化利润, 未来可以在此方向进行尝试。

#### 参考文献:

- [1] MUANRUKSA P, KAEWKANNETRA P. Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate[J]. *Renew Energ*, 2020, 146: 901–906.
- [2] 杨建军, 关卫省. 脂肪酶催化合成生物柴油的现状与展望[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(16): 128–132.
- [3] 邹晓霞, 杨江科, 刘云, 等. 复合酶法制备乌柏梓油生物柴油工艺优化[J]. *中国油脂*, 2010, 35(6): 33–37.
- [4] 魏书梅, 徐亚荣, 张力, 等. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>一步法催化棉籽酸化油制备生物柴油的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(2): 65–67.
- [5] DU W, XU Y Y, ZENG J, et al. Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 40(2): 187–190.
- [6] 陈冠益, 夏晒歌, 李婉晴, 等. 面向碳中和的生物柴油制备及应用研究进展[J]. *太阳能学报*, 2022, 43(9): 343–353.
- [7] ISSARIYAKUL T, DALAI A K. Biodiesel from vegetable oils[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2014, 31: 446–471.
- [8] SUN S D, GUO J J, CHEN X W. Biodiesel preparation from Semen abutili (*Abutilon theophrasti* Medic.) seed oil using low-cost liquid lipase Eversa<sup>®</sup> transform 2.0 as a catalyst[J/OL]. *Ind Crop Prod*, 2021, 169(1): 113643 [2023-11-28]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113643>.
- [9] 陈艳凤, 曾建立, 杜泽学, 等. 生物柴油原料中不皂化物和脂肪酸分析[J]. *中国油脂*, 2024, 49(4): 83–87.
- [10] SHI W, HE B, LI J. Esterification of acidified oil with methanol by SPES/PES catalytic membrane [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(9): 5389–5393.
- [11] 徐学兵. 米糠: 一种潜在的食用资源[J]. *粮油食品科技*, 2021, 29(5): 5–8.
- [12] 徐丹, 陈可娟. 棕榈酸化油制备生物柴油的工艺优化研究[J]. *当代化工*, 2015, 44(4): 661–663, 666.
- [13] DHAWANE S H, KUMAR T, HALDER G. Biodiesel synthesis from *Hevea brasiliensis* oil employing carbon supported heterogeneous catalyst: Optimization by Taguchi method[J]. *Renew Energ*, 2016, 89: 506–514.
- [14] WEI H, WANG Q, ZHANG R, et al. Efficient biodiesel production from waste cooking oil by fast co-immobilization of lipases from *Aspergillus oryzae* and *Rhizomucor miehei* in magnetic chitosan microcapsules [J]. *Process Biochem*, 2023, 125: 171–180.
- [15] HAMA S, KONDO A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 386–395.
- [16] SANDOVAL G, CASAS-GODOY L, BONET-RAGEL K, et al. Enzyme-catalyzed production of biodiesel as alternative to chemical-catalyzed processes: Advantages and constraints[J]. *Current Biochem Eng*, 2017, 4(2): 109–141.
- [17] 于涵, 郑晓宇, 陈海玲, 等. 棉籽油脂肪酸甲酯的提纯及组成分析[J]. *中国油脂*, 2014, 39(12): 80–83.
- [18] JIN B, ZHU M, FAN P, et al. Comprehensive utilization of the mixture of oil sediments and soapstocks for producing FAME and phosphatides [J]. *Fuel Process Technol*, 2008, 89(1): 77–82.
- [19] 熊欢. 亮斑扁角水虻油脂提取、分离及回收工艺的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2019.
- [20] ZHANG Y, DUBÉ M A, MCLEAN D D, et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis [J]. *Bioresour Technol*, 2003, 90(3): 229–240.
- [21] DU W, WANG L, LIU D. Improved methanol tolerance during Novozym 435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production[J]. *Green Chem*, 2007, 9(2): 173–176.
- [22] 邵文泰. 液体脂肪酶催化地沟油制备生物柴油的工艺优化[D]. 山东烟台: 烟台大学, 2023.
- [23] LI C, TAN T, ZHANG H, et al. Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents: Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28434–28441.
- [24] SUN S, LI K. Biodiesel production from phoenix tree seed oil catalyzed by liquid lipozyme TL100L [J]. *Renew Energ*, 2020, 151: 152–160.

- [25] LI B, WANG F, LI K, et al. Biodiesel preparation from high acid value phoenix seed oil using Eversa transform 2.0 as a novel catalyst[J]. *Biomass Convers Biorefin*, 2023, 13(11): 9821–9830.
- [26] LOTTI M, PLEISS J, VALERO F, et al. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel[J]. *Biotechnol J*, 2015, 10(1): 22–30.
- [27] SUBHEDAR P B, GOGATE P R. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification [J]. *Ultrason Sonochem*, 2016, 29: 67–75.
- [28] 郭静静. 脂肪酶催化制备苘麻籽油脂肪酸乙酯的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2022.
- [29] AARTHY M, SARAVANAN P, GOWTHAMAN M K, et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview[J]. *Chem Eng Res Des*, 2014, 92(8): 1591–1601.
- [30] 柏晓辉, 樊燕, 周娟, 等. 一株产耐有机溶剂脂肪酶伯克霍尔德氏菌的分子鉴定及酶学性质分析[J]. *中国油脂*, 2023, 48(8): 90–95.
- [31] UĞUZ G, ATABANI A E, MOHAMMED M N, et al. Fuel stability of biodiesel from waste cooking oil: A comparative evaluation with various antioxidants using FT-IR and DSC techniques [J/OL]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2019, 21: 101283 [2023–11–28]. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101283>.
- [32] 王豪缘. 桃仁油的提取及制备生物柴油的试验研究[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2020.
- [33] TORRES A, FUENTES B, RODRÍGUEZ K E, et al. Analysis of the content of fatty acid methyl esters in biodiesel by Fourier – transform infrared spectroscopy: Method and comparison with gas chromatography [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2020, 97(6): 651–661.
- [34] 吕雯. 大豆油脱臭馏出物的酶法综合利用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
- [35] 张蓉仙, 陈秀. 热分析在生物柴油中的应用[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(10): 75–78.
- [36] GARCIA – PEREZ M, ADAMS T T, GOODRUM J W, et al. DSC studies to evaluate the impact of bio – oil on cold flow properties and oxidation stability of bio – diesel[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(15): 6219–6224.
- [37] LIN R, ZHU Y, TAVLARIDES L. Effect of thermal decomposition on biodiesel viscosity and cold flow property [J]. *Fuel*, 2014, 117: 981–988.
- 
- (上接第109页)
- [15] 张淑杰, 姜宏伟, 康玉凡. 豌豆芽菜多糖超声辅助提取优化及抗氧化研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(10): 217–223.
- [16] YANG W, HUANG G. Extraction, structural characterization, and physicochemical properties of polysaccharide from purple sweet potato [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, 98(6): 979–985.
- [17] ZHAN G Y, GU M, WANG K, et al. Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 1163–1170.
- [18] LIU D, TANG W, YIN J Y, et al. Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 116: 106641 [2023–11–29]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106641>.
- [19] TANG W, LIU D, YIN J Y, et al. Consecutive and progressive purification of food – derived natural polysaccharide: Based on material, extraction process and crude polysaccharide [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 99: 76–87.
- [20] BEĆ K B, GRABSKA J, HUCK C W. Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1133: 150–177.
- [21] 辜明. 香菇多糖 LT1 的提取纯化及结构鉴定 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [22] 徐阳阳. 不同提取方法对灵芝活性成分提取率及抗氧化活性的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [23] ZHOU L, LUO S, LI J, et al. Optimization of the extraction of polysaccharides from the shells of *Camellia oleifera* and evaluation on the antioxidant potential *in vitro* and *in vivo* [J/OL]. *J Funct Foods*, 2021, 86: 104678 [2023–11–29]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104678>.
- [24] 许盈盈. 灰树花多糖的提取、分离纯化、表征及生物活性的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- [25] 董文霞. 桦褐孔菌多糖结构、硫酸化修饰及其降血糖活性研究 [D]. 山东 曲阜: 曲阜师范大学, 2018.
- [26] 林欣颖, 谢传奇. 油茶果壳多糖的提取工艺及免疫活性研究 [J]. *生物化工*, 2022, 8(5): 24–28, 59.