

黑核桃内生真菌 HJ1 油脂制备生物柴油的研究

毛光瑞, 翟梅枝*, 陈汀汀, 史冠昭, 王 丹

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:对黑核桃内生真菌 HJ1 油脂制备生物柴油的关键技术进行研究。利用单因素试验和验证试验优化反应条件。用气相色谱-质谱联用仪(Thermo Finnigan Trace DSQ)对油脂的成分进行分析。选择甲醇为萃取剂进行降酸处理,根据植物油脂酸值测定法 GB/T5530-1985 进行酸值测定。采用均相碱催化酯交换法制备生物柴油,并用气相色谱内标法对所制备生物柴油的脂肪酸甲酯的组成和含量进行测定。较好的工艺条件是:醇-油摩尔比 8:1, 催化剂浓度 1%, 反应温度 60 ℃, 反应时间 2 h。在此条件下,甲酯含量超过 98%,生物柴油得率超过 66%。结果表明,HJ1 油脂制备的生物柴油可以被发展为石化柴油代替品之一。

关键词:生物柴油;微生物油脂;黑核桃

中图分类号:S713 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)06-0207-05

Preparation of Biodiesel Produced from Microbial Oil of Black Walnut Endophyte HJ1

MAO Guang-rui, ZHAI Mei-zhi*, CHEN Ting-ting, SHI Guan-zhao, WANG Dan

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The purpose of this research was to study the key technique of preparing biodiesel from endophyte HJ1 oil. Single factor experiment and verification test were adopted to evaluate the reaction conditions. The constituents of the HJ1 oil were identified by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Methanol was used to extract extra acid in endophyte HJ1 oil, and the acid value was determined. The base-catalyzed transesterification reaction was used in the biodiesel preparation. The composition and content of fatty acid methyl esters from biodiesel prepared by HJ1 oil were measured by gas chromatography internal standard method. The results showed that under the conditions of molar ratio of methanol to oil 8:1, the concentration of catalyst 1%, the reaction temperature 60 ℃, the reaction time 2 h, the yield of biodiesel and the fatty acid methyl esters were over 66% and over 98%, respectively.

Key words: biodiesel; microbial oil; black walnut

随着生态环境问题日益严重,石化燃料日益减少,其价格不断上涨,开发环境友好型的可再生能源越来越被人们重视。生物柴油具有矿物柴油不具有的很多优点,如:具有可再生性、燃烧性能好、污染物少等优点^[1],可用来替代矿物柴油。生物柴油常用动植物油作原料油,比如大豆油、菜籽油、葵花籽油、猪油、牛油、鱼油等^[2]。由于大豆油、菜籽油、葵花籽油等在我国为主要食用油,不宜用于生产生物柴油,

因此开发新的生物柴油原料油显得尤为重要。

微生物油脂指微生物在一定条件下产生的生物油,其主要成分为甘油三酯^[3-4]。利用产油微生物资源丰富、生产周期短等优点来制备生物柴油,前景广阔并且可以降低生产成本^[4-5]。在适当条件下酵母、薇藻等很多微生物能在体内积累大量油脂,其中酵母产油较高^[6],酵母菌含油量达到 25%左右^[7],黑核桃内生真菌 HJ1 油脂得率为 22.26%^[5]。目前对

收稿日期:2014-01-18 修回日期:2014-05-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31370552)。

作者简介:毛光瑞,男,在读硕士,研究方向:植物资源开发利用。E-mail: 154785632@qq.com

* 通信作者:翟梅枝,女,教授,硕士生导师,研究方向:植物资源利用和植物病虫害防治。E-mail: plum-zhai@163.com

微生物油脂提取研究较多,但对微生物油脂制备生物柴油的研究较少。对 HJ1 油脂制备生物柴油进行研究,以期为微生物油脂制备生物柴油提供借鉴以及为 HJ1 的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 葡萄糖、石油醚、丙酮、氢氧化钾、甲醇等试剂,西陇化工股份有限公司生产;气相色谱-质谱联用仪, Finnigan Trace DSQ;干燥箱 101-1 型,上海实验仪器厂;气相色谱仪, Agilent 6890。

1.1.2 菌株 HJ1 为黑核桃茎中分离到的菌株,初步鉴定为无孢科小核属(*Sclerotium*)真菌,菌株保存在西北农林科技大学核桃研究中心实验室内。4℃条件下,PDA(马铃薯 200 g、琼脂 15 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL)斜面培养基中保存。

1.2 方法

1.2.1 菌体预处理 将菌株活化 2 次后进行种子培养。取 1.5 mL 种子培养基接种至装有 200 mL PDA 液体培养基的锥形瓶中(500 mL),在一定条件下(培养温度 30℃、培养时间 10 d、搅拌速率 150 r·min⁻¹)进行发酵培养。取出锥形瓶后,培养液经过抽滤并收集菌丝,将菌丝在 40℃烘箱中烘干。将菌丝置于研钵中,加入少量细石英砂充分研磨,保存备用。

1.2.2 油脂提取和精炼 以石油醚(bp 60~90℃)为提取剂,采用索氏提取法提取油脂。提取条件为:料液比 1:6、提取温度 85℃、提取时间 4 h^[6]。油脂精炼与植物油精炼基本相同,主要包括水化脱胶、碱炼、脱色、脱臭^[8]。

1.2.3 油脂降酸处理 与甲醇相比,用无水乙醇萃取降酸,其效果要更好^[9-10],但生物柴油制备中选择了甲醇,因此,选择甲醇进行降酸处理。

酸值测定以植物油脂酸值测定法 GB/T5530-1985 和杨芳霞^[9]等方法进行。将一定量 HJ1 油脂置于锥形瓶中,加入 2 倍体积甲醇并充分混匀,完全溶解后滴入 2~3 滴酚酞。用 KOH 标准溶液(0.1 mol·L⁻¹)滴定,至溶液变为微红色且 30 s 内不褪色为止。2 次平行试验(误差不超过 0.2 mg KOH·g⁻¹油)的平均值即为酸值。

HJ1 油脂的酸值计算:

$$w=(v\times 5.61)/m$$

式中: w —酸值,单位:mg KOH·g⁻¹油
 v —氢氧化钾标准溶液体积,mL;

m —HJ1 油脂重量,g。

1.2.4 油脂成分分析 HJ1 油脂甲酯化后采用气相色谱-质谱联用仪(GC)进行油脂成分分析^[5]。GC 条件:石英毛细管柱 DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μm);高纯氦气为载气;流速 1 mL·min⁻¹;升温程序:初始温度 150℃,保持 2 min,以 6℃·min⁻¹速度升温至 230℃,保持 15 min;进样量 1 μL,进样温度 230℃,分流比 80:1。MS 条件:全扫描方式下,扫描范围为 40~400 amu,离子源温度 250℃,电子轰击(EI+),电子能量 70 eV,溶剂延迟 2 min,电子倍增器电压为 1.4 kV。

1.2.5 生物柴油制备 采用均相碱催化酯交换法制备生物柴油^[11],即将一定量 HJ1 油脂置于圆底烧瓶中,水浴加热,温度升高至预定值后打开搅拌器并加入一定量的甲醇、氢氧化钾溶液,使之充分混合并反应。反应一段时间后将烧瓶置于冷水中冷却,再将反应混合物转移至分液漏斗,静置 2~4 h 分层。取上层液,用旋转蒸发仪蒸馏回收甲醇,加入等体积热水(70℃左右),多次清洗至中性,再用旋转蒸发仪除去大量水分,然后在真空干燥箱中进一步干燥,得到的浅黄色产品,即为生物柴油。

生物柴油得率 = 生物柴油重量(g)×100%/油脂重量(g) (2)

1.2.6 生物柴油中脂肪酸甲酯测定 用气相色谱内标法^[12]对生物柴油中脂肪酸甲酯的组成和含量进行测定。

按照何荣^[13]的方法进行,即将 0.150 0 g 左右的生物柴油样品置于容量瓶(5 mL)中,加入丙酮定容,充分混匀后取 30 μL 溶液与等体积内标溶液混合,吸取 1 μL 进样,每个样品进样 3 次。

2 结果与分析

2.1 HJ1 油脂降酸处理

表 1 为 HJ1 油脂用无水甲醇在料液比 1:2 下,萃取 3 次的酸值变化,可以看出,HJ1 油脂的酸值经过 3 次萃取后降到 2 mg KOH·g⁻¹以下,满足生物柴油制备对原料油酸值的要求。利用索氏提取法得到的 HJ1 油脂酸值(7.25 mg KOH·g⁻¹)与大豆油酸值(195~204 mg KOH·g⁻¹)、花椒籽油酸值(63 mg KOH·g⁻¹)等植物油脂的酸值相比,HJ1 油脂酸值较低,不必用催化酯化法进行降酸处理,降酸过程更加简便。

2.2 HJ1 油脂成分分析与比较

利用 GC-MS 分析了 HJ1 油脂成分,并与大豆油和菜籽油成分^[14-15]进行了比较(表 2)。HJ1 油脂

与大豆油、菜籽油一样,脂肪酸以不饱和脂肪酸为主,主要为油酸(38.91%)和亚油酸(41.89%),油脂成分与植物油脂相似。HJ1 油脂中不饱和脂肪酸含量高达 84.65%,因此可以作为生物柴油制备的原料油。

表 1 萃取降酸后酸值变化

Table 1 Change of acid values before and after deacidification by methanol extraction	
萃取次数/次	酸值/(mg KOH · g ⁻¹)
0	7.25
1	4.46
2	2.28
3	1.07

表 2 油脂成分比较结果

Table 2 Comparison on the compositions of different oils						
类别	HJ1 油脂		大豆油		菜籽油	
	成分	含量/%	成分	含量/%	成分	含量/%
饱和脂肪酸	棕榈酸	11.92	棕榈酸	11.75	棕榈酸	3.49
	硬脂酸	2.52	硬脂酸	3.15	硬脂酸	0.85
	油酸	38.91	油酸	23.26	油酸	64.40
不饱和脂肪酸	亚油酸	41.89	亚油酸	55.53	亚油酸	22.30
	棕榈油酸	3.85	亚麻酸	6.31	亚麻酸	8.23

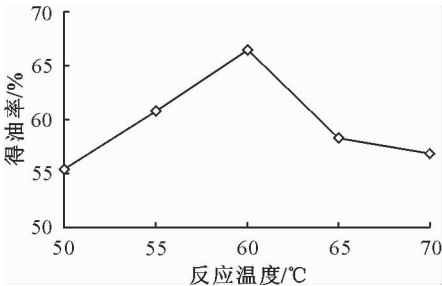


图 1 反应温度对得油率影响

Fig. 1 Effect of reaction temperature on the biodiesel yield

2.3.2 反应时间与生物柴油得率 在醇：油摩尔比 8：1、催化剂浓度 1%、反应温度 60℃、搅拌速度 700 r · min⁻¹ 的条件下,研究了反应时间对生物柴油得率的影响(图 2)。随着时间的延长,得油率逐渐增加,特别是在 1~2 h 的范围内,随着时间的延长,得油率显著增加,从反应 1 h 的 56.33% 增加到 66.44%。而在反应 2 h 后,随着时间的继续延长,得油率几乎不变,说明反应已达到平衡。因此,HJ1 油脂制备生物柴油适宜的反应时间为 2 h。

2.3.3 催化剂浓度与生物柴油得率 在醇：油摩尔比 8：1、反应温度 60℃、反应时间 2 h、搅拌速度 700 r · min⁻¹ 的条件下,研究了催化剂浓度对生物柴油得率的影响(图 3)。随着催化剂(KOH)用量从 0.6% 增加到 1%,得油率也由 61.35% 提高到 66.40%。当 KOH 用量超过 1% 后,得油率随催化

2.3 单因素对生物柴油得率的影响

2.3.1 反应温度与生物柴油得率 在醇：油摩尔比 8：1、催化剂浓度 1%、反应时间 2 h、搅拌转速 700 r · min⁻¹ 的条件下,研究了反应温度对生物柴油得率的影响(图 1)。可以看出,在 50℃~60℃ 之间,随着反应温度升高得油率显著增加,由 50℃ 时的 55.38% 增加到 66.47%。在 60℃ 以后,随着反应温度升高,得油率反而下降。到 70℃ 时,得油率降为 56.84%,可能是由于反应温度的继续升高,导致液相中甲醇不足,酯交换反应逆向进行,反而使得油率下降。因此,HJ1 油脂制备生物柴油的反应温度以 60℃ 为宜。

剂用量的升高反而下降,分析其原因,主要是由于催化剂(KOH)浓度过大容易发生皂化反应,增加了反应混合物的粘度,使得副产物分离困难,反而降低了生物柴油得率^[17]。因此,HJ1 油脂制备生物柴油的催化剂浓度以 1% 为宜。

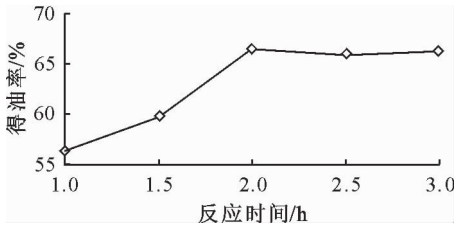


图 2 反应时间对得油率影响

Fig. 2 Effect of reaction time on the biodiesel yield

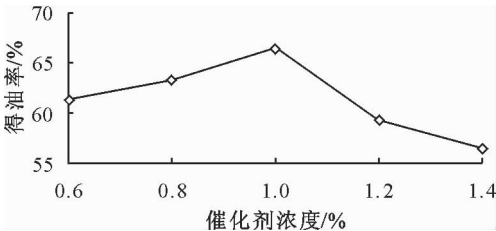


图 3 催化剂浓度对得油率影响

Fig. 3 Effect of catalyst concentration on the biodiesel yield

2.3.4 醇-油摩尔比与生物柴油得率 在催化剂浓度 1%、反应温度 60℃、反应时间 2 h、搅拌速度 700 r · min⁻¹ 的条件下,研究了醇：油摩尔比对生物柴

油得率的影响(图 4)。当醇-油摩尔比从 5 : 1 增加到 8 : 1 时,得油率也相继增加,在醇-油摩尔比为 8 : 1 时达到最大值 66. 37%。随着甲醇浓度的继续增加,得油率反而略微降低,当醇 : 油摩尔比为 10 : 1 时,得率降为 66. 04%。分析其原因,主要是由于酯交换反应是可逆反应,随着醇浓度不断增加,反应向正方向进行,得油率增加,但当醇浓度太大时,甘油在溶液中分离难度增加,反应向左移动,反而影响生物柴油得率^[18],同时也增加了成本。综合考虑,醇 : 油摩尔比 8 : 1 为 HJ1 油脂制备生物柴油的适宜浓度。

2. 3. 5 验证试验 根据单因素试验所得结果,进行

表 3 酯交换验证试验

Table 3 Validation experiment of transesterification reaction

项目	反应温度/℃	反应时间/h	催化剂浓度/%	醇油摩尔比	生物柴油得率/%	生物柴油甲酯含量/%
试验 1	60	2. 0	1. 0	8 : 1	66. 53	99. 16
试验 2	60	2. 0	1. 0	8 : 1	65. 84	98. 85
试验 3	60	2. 0	1. 0	8 : 1	67. 24	98. 51
平均值					66. 54	98. 84

2.4 生物柴油的化学成分

利用 GC-MS 对生物柴油化学成分进行了分析,相对含量(表 4)可知,HJ1 油脂制备的生物柴油主要成分为亚油酸甲酯(42. 44%)、油酸甲酯(39. 15%),占生物柴油组分的 81. 59%;其次为棕榈酸甲酯(12. 04%);此外有少量的棕榈油酸甲酯(3. 62%)和硬脂酸甲酯(2. 75%)。由于 HJ1 油脂制备的生物柴油含有 5 种酯类,其分子结构中不含芳香烃结构,具有较长的碳直链并且没有碳支链。

表 4 HJ1 油脂制备的生物柴油化学成分

Table 4 The composition of biodiesel made by HJ1 oil

化学成分	保留时间/min	相对含量/%
棕榈酸甲酯	9. 73	12. 04
棕榈油酸甲酯	10. 14	3. 62
硬脂酸甲酯	12. 58	2. 75
油酸甲酯	12. 90	39. 15
亚油酸甲酯	13. 54	42. 44

3 结论与讨论

用甲醇萃取 HJ1 油脂中的游离脂肪酸 3 次,可将 HJ1 油脂的酸值降低到 1. 07 mgKOH · g⁻¹,满足制备生物柴油对原料油品质的要求。相对于碱炼降酸,HJ1 油脂降酸过程更简便,且甲醇可回收再利用,能够降低成本。利用 GC-MS 分析了 HJ1 油脂组成。结果表明,HJ1 油脂与植物油脂相同,富含不饱和和脂肪酸(84. 65%),该 HJ1 油脂制备的生物柴油品质满足要求,可用来替代矿物柴油,作为制备生

重复验证(表 3)。HJ1 油脂制备生物柴油适宜的反应条件:醇 : 油摩尔比 8 : 1、催化剂浓度 1%、反应温度 60℃、反应时间 2 h。此条件下,得油率基本稳定在 66%左右,其甲酯的总含量达到 98%以上。

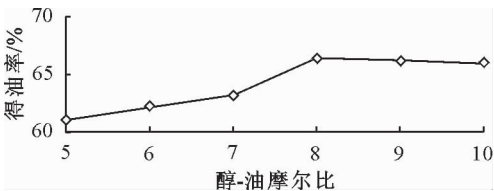


图 4 醇-油摩尔比对得油率影响

Fig. 4 Effect of mole ratio of methanol to the oil on the biodiesel yield

物柴油的原料油,与 K. J. Harrington^[19]的研究结果相似。

HJ1 油脂由均相碱催化酯交换法制备生物柴油,其适宜的反应条件为:醇-油摩尔比 8 : 1、催化剂(KOH)浓度 1%、反应温度 60℃、反应时间 2 h。与张学林^[20]等的醇 : 油摩尔比 4 : 1、酶添加量 105 U · g⁻¹、反应温度 20℃、反应时间 12 h、水添加量为油质量的 20%和刘光斌^[21]等油 : 醇物质的量比 1 : 6、催化剂(KOH)浓度 1. 2%、反应时间 2 h、反应温度 60℃有所差异。究其原因,主要是由于原料油组成不同以及所用方法不同所造成。本研究生物柴油得率为 66%,与丁立军^[22]等报道的生物柴油得率 65. 58%相当,说明 HJ1 油脂用均相碱催化酯交换法来制备生物柴油是可行的。

虽然制备生物柴油的原料油来源很广,但用大豆油、菜籽油等食用油来发展生物柴油并不符合我国国情。因此,微生物油脂的开发利用为我国新能源的发展开辟了一条新的途径。本试验仅采用均相碱催化酯交换法来研究 HJ1 油脂制备生物柴油的关键技术,为其他高产油微生物的开发利用提供了借鉴。

参考文献:

[1] MA F, HANNA M A. Biodiesel production: a review[J]. Bioresour. Teelmol. , 1999, 70(1):1-15.
[2] 陈俏, 李聪, 方治国, 等. 利用沙生植物长柄扁桃油制备生物柴油[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2013, 43(2):229-232.

CHENG Q, LI C, FANG Z G, *et al.* Preparation of biodiesel from desert *Amygdalus pedunculata* pall oil[J]. Journal of Northwest University; Natural Science Edition, 2013, 43(2): 229-232. (in Chinese)

[3] 刘波, 孙艳, 刘永红, 等. 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展[J]. 微生物学报, 2005, 45(1):153-155.

LIU B, SUN Y, LIU Y H, *et al.* Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(1): 153-155. (in Chinese)

[4] 马艳玲. 微生物油脂及其生产工艺的研究进展[J]. 生物加工过程, 2006, 4(4):7-11.

MA Y L. Microbial oils and its research advance[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2006, 4(4): 7-11. (in Chinese)

[5] 翟梅枝, 陈汀汀, 李秀红, 等. 黑核桃内生真菌 HJ1 油脂提取工艺的研究[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(3):151-153.

ZHAI M Z, CHEN T T, LI X H, *et al.* Oil extraction from black walnut endophyte HJ 1[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3):151-153. (in Chinese)

[6] MENG X, YANG J M, XU X, *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms [J]. Renewable Energy, 2008, 34 (1):1-5.

[7] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 高产油脂酵母菌选育及摇瓶发酵条件的研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(2):93-97

LIU S J, YANG W B, SHI A H. Screeing of the high lipid production strains and studeles on its flask culture conditions [J]. Microbiology, 2000, 27(2):93-97. (in Chinese)

[8] 何东平. 油脂精炼与加工工艺学[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:22-110

[9] 杨芳霞, 李秀红, 张军华, 等. 催化剂浓度对花椒油酯化产物酸值的影响[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(6):166-169

YANG F X, LI X H, ZHANG J H, *et al.* Effect of catalyst concentration on the acid values of esterified *Zanthoxylum bungeanum* seed oil[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(6):166-169. (in Chinese)

[10] 刘大川, 余珠花, 刘金波, 等. 麻疯树籽油溶剂萃取脱酸工艺的研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(6):26-28.

LIU D C, SHE Z H, LIU J B, *et al.* Deacidification of *Jatropha curcas* L. seed oil with solvent extraction[J]. China Oils and Fats, 2005, 30(6):26-28. (in Chinese)

[11] 肖志红, 刘汝宽, 李昌珠, 等. 光皮树油溶剂萃取脱酸工艺研究[J]. 粮油加工, 2006 (11):45-50.

[12] 王志华, 孙小嫫, 孙桂芳, 等. 碱催化法菜籽油制备生物柴油实验研究[J]. 现代化工, 2006, 26(2):124-126.

WANG Z H, SUN X S, SUN G F, *et al.* Experimental study on preparation of biodiesel from vegetable seeds oil by KOH catalysis[J]. Modem Chemical Industry, 2006, 26(2): 124-126. (in Chinese)

[13] 何荣. 油松籽油制备生物柴油的研究[D]. 西安, 陕西科技大学, 2009.

[14] RAMADHAS A S, JAYARAJ S, MURALEEDHARAN C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil[J]. Fuel, 2005, 84(4):335-340.

[15] DMYTRYSHYN S L, DALAI A K, CHAUDHARI S T, *et al.* Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties [J]. Resource Technology, 2004, 92(1):55-64

[16] 刘传武, 杨蒸, 戴小安, 等. 植物油制备生物柴油的研究[J]. 河南化工, 2005, 22(6): 19-21.

LIU C W, YANG Z, DAI X A, *et al.* Study on the preparation of bio-diesel by vegetable oil[J]. Henan Chemical Industry, 2005, 22(6):19-21. (in Chinese)

[17] 杨芳霞. 花椒籽油和水冬瓜籽油制备生物柴油的研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学, 2006.

[18] ANTOLIN G, TINAUT F V, BRICENO Y, *et al.* Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification[J]. Bioresource Technology, 2002. 83(2): 111-114.

[19] HARRINGTON K. J. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance [J]. Biomass, 1986, 9(1):1-17

[20] 张学林, 唐湘华, 李俊俊, 等. 低温脂肪酶酶促酯交换制备生物柴油[J]. 中国油脂, 2013, 38(2): 66-68.

ZHANG X L, TANG X H, LI J J, *et al.* Biodiesel production by low temperature lipase catalyzed transesterification [J]. China Oils and Fats, 2013, 38(2):66-68. (in Chinese)

[21] 刘光斌, 赵晓霞, 胡冬南, 等. 无患子油脂的提取、理化性质及其制备生物柴油的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(3): 59-63.

LIU G B, ZHAO X X, HU D N, *et al.* Study on extraction and physiochemical properties of *Sapindus mukorossi* seed oil and preparation of biodiesel [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(3):59-63. (in Chinese)

[22] 丁立军, 王喜明, 郝一男, 等. 文冠果种仁一步法制取生物柴油的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2013, 29(6):202-208.

DING L J, WANG X M, HAO Y N, *et al.* Optimization of accomplishing oil extraction and biodiesel synthesis by single-step technique from *Xanthoceras sorbifolia* bunge kernel[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(6):202-208. (in Chinese)