

УДК 665.1.09; 544.478.3

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИЯ ТРИГЛИЦЕРИДА ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СРЕДЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ДИОКСИДА УГЛЕРОДА

©2019 г. ¹Н. В. Лакина*, ¹Э. М. Сульман, ¹В. Ю. Долуда, ^{1,2}В. Г. Матвеева

¹ Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

² Тверской государственный университет, Тверь, Россия

*lakina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 06.09.2018 г. Прошла рецензирование: 23.09. 2018 г.

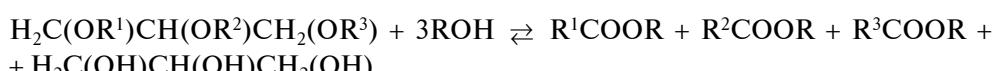
Принята к публикации: 23.09.2018 г.

Показана перспективность использования катализаторов на основе иммобилизованной липазы в реакции переэтерификации триглицерида олеиновой кислоты (ТГОК) метанолом в среде сверхкритического диоксида углерода. При оптимальной температуре 40 °C, давлении CO₂ 15,0 МПа и мольном соотношении ТГОК:метанол = 1:3 выход метилового эфира олеиновой кислоты существенно выше по сравнению с получаемым в среде метанола при атмосферном давлении.

Ключевые слова: биодизель, переэтерификация, сверхкритический CO₂, ферментативный катализ, липаза, магнитоотделяемый биокатализатор.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время особое внимание уделяется альтернативным способам получения топлива из возобновляемого растительного сырья [1—4]. Широкое применение получил способ получения эфиров жирных кислот («биодизеля») по реакции переэтерификации растительных масел (триглицеридов жирных кислот, ТЖК) с низшими спиртами (метанолом или этанолом) [5] по реакции:



Возможно проведение переэтерификации ТЖК низшими спиртами в присутствии гомогенных [1, 2] кислотных или основных катализаторов, которые обеспечивают протекание процесса переэтерификации в мягких условиях (30—65 °C) с высокой скоростью. В случае гетерогенных катализаторов, таких как оксиды щелочноземельных металлов, оксид циркония, цеолиты и другие, процесс осуществляется в более жестких условиях (до 200 °C) [1, 2, 6]. Недостатком гомогенного и гетерогенного катализитических процессов является сложность отделения и очистки продукта от катализатора [1, 2, 6].

Предлагалось проводить переэтерификацию ТЖК в присутствии фермента — липазы микробиологического, растительного и животного происхождения (липопротеинлипазы, панкреатической липазы, эндотепиальной липазы и др.) [2, 6, 7].

В литературе отмечается, что гетерогенные катализаторы снижают активность в присутствии воды, а щелочки чувствительны к наличию в сырье воды и свободных жирных кислот. При этом известно, что ферменты способны сохранять активность и проявлять высокую селективность в присутствии воды в исходном сырье [6].

Главное препятствие для проведения переэтерификации ТЖК ферментами — их термическая неустойчивость и склонность к инактивации низшими спиртами. Тем не менее, ведутся работы по созданию устойчивых биокатализаторов на основе липазы, иммобилизованной на различных носителях [8, 9].

В настоящее время основное внимание сосредоточено на разработке некатализических процессов переэтерификации ТЖК низшими спиртами в суб- и сверхкритических условиях [10–16]. В нормальных условиях из-за высокой полярности и наличия водородных связей низшие спирты, такие как метанол и этанол, ограниченно смешиваются с ТЖК. При проведении процесса в сверхкритических (СК) условиях (критические точки — 512,6 К и 8,09 МПа для метанола и 513,9 К и 6,14 МПа для этанола) растворимость триглицеридов увеличивается и они образуют со спиртами гомогенные системы. При оптимизации условий проведения процесса (давление, температура, состав растворителя, соотношение растворителя к исходному сырью и т.д.) может быть достигнут выход эфиров жирных кислот (ЭЖК) более 90 %. СК-СО₂, активно применяемый для извлечения ТЖК из растительного сырья [6, 17], до настоящего времени использовался при переэтерификации только как сорасторовитель для СК низших спиртов [6, 18].

В данной работе представлены результаты исследования биокатализической переэтерификации триглицерида олеиновой кислоты (ТГОК) метанолом в среде СК-СО₂. Для проведения процесса использовались как нативная липаза, так и липаза, иммобилизованная на магнитных частицах Fe₃O₄. Выбор магнитных частиц в качестве носителя фермента обусловлен легкостью отделения от продукта реакции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реагенты и растворители: хлорид железа(III) шестиводный FeCl₃·6H₂O (квалификации «ч», «Реахим»); сульфат железа(II) семиводный Fe₂(SO₄)₃·7H₂O («Реахим»); фосфатный буфер состава Na₂HPO₄·2H₂O + + K₂PO₄ (рН = 6,86, ЗАО НПИП «Уралхиминвест»); гидроксид натрия NaOH, 98 % («ч.д.а.», «Нева-реактив»); метанол («х.ч.», «Реахим»); этанол («х.ч.», «Реахим»); триглицерид олеиновой кислоты (99 %, «Sigma-Aldrich»); липаза, стандартизованная по сывороточному альбумину L3126 Type II (100—400 ед./мг, «Sigma-Aldrich»); 3-аминопропилтриэтоксисилан NH₂(CH₂)₃Si(OCH₂H₅)₃ (98 %, «Sigma Aldrich»); глутаровый диальдегид (25 %, «Fluka»); дифениламин (C₆H₅)₂NH («ч.д.а.», «Нева-реактив»); диоксид углерода (99,8 %, ООО ПО «Тверь-газсервис»).

Для приготовления магнитных наночастиц (МНЧ) водный раствор (25 мл) смеси солей железа в эквимолярном количестве (2,8 г FeSO₄·7H₂O и 2,7 г FeCl₃·6H₂O) добавлялся по каплям к раствору NaOH (1,5 М, 250 мл) при постоянном перемешивании. Полученный черный осадок Fe₃O₄ отделяли от реакционной среды с помощью неодимового магнита, промывали водой до нейтрального значения pH, после чего помешали в 50 мл 95 %-ного этанола. К этанольной суспензии полученных 2 г МНЧ для модификации их поверхности аминогруппами добавляли 0,3 мл раствора 3-(аминопропил)-триэтоксисилана, перемешивали в течение 7 ч, после чего промывали до нейтрального значения pH. Для ковалентной сшивки с ферментом (образования азометиновой связи на поверхности биокатализатора) к модифицированным МНЧ добавляли 25 мл 1 %-ного раствора глутарового диальдегида, перемешивали в течение 2 ч, после чего промывали пятикратным избыtkом дистиллированной воды. Полученные модифицированные МНЧ перемешивали в течение 6 ч с 50 мл буферного раствора липазы (1 г

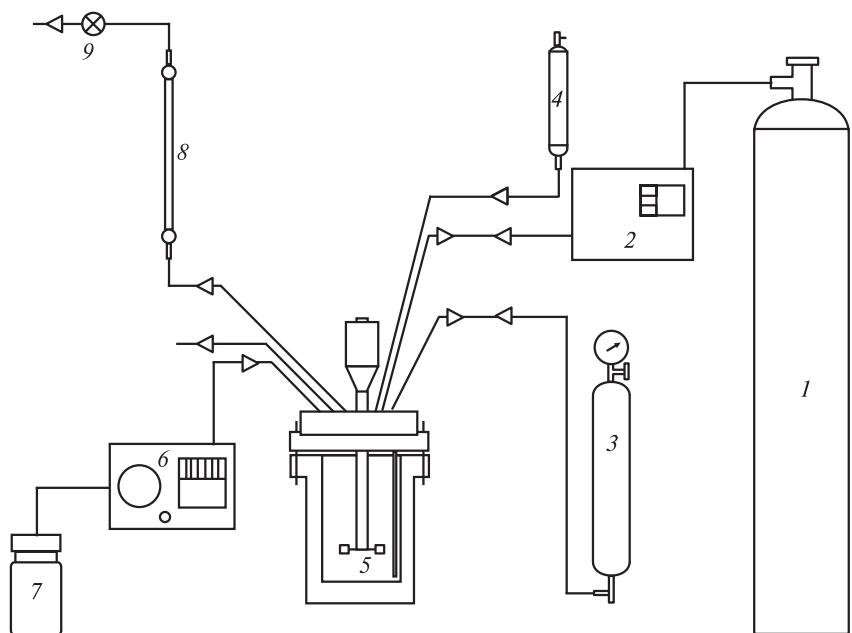


Рис. 1. Схема установки для переэтерификации в среде СК-СО₂:

1 — баллон с СО₂; 2 — насос для подачи СО₂; 3 — газовая бюретка; 4 — пипетка для жидкости; 5 — реактор высокого давления; 6 — насос для подачи реагентов; 7 — емкость для реагентов; 8 — обратный холодильник; 9 — обратный клапан

липазы на 50 мл фосфатного буфера). Все операции по отделению МНЧ биокатализатора липаза/Fe₃O₄ от раствора проводили с помощью неодимового магнита.

Для получения метилового эфира олеиновой кислоты (МЭОК) в среде СК-СО₂ использовали реактор высокого давления Parr Instruments 4307 (США) с общим объемом колбы 250 см³ и максимальным рабочим давлением 60 МПа (рис. 1). Для перекачивания углекислоты применяли плунжерный насос Supercritical 24 Pump CP (SSI, USA). Стандартный эксперимент проводили следующим образом.

В тefлоновую колбу реактора вносили навеску биокатализатора (1,0 г липазы/Fe₃O₄ или 0,5 г свободной липазы), 50 мл ТГОК (плотность 0,915 г/мл) и 6,3 мл метанола (мольное соотношение ТГОК : метанол = 1 : 3). Реактор трижды продували диоксидом углерода под давлением 20 МПа; после достижения стабилизации давления насосом подавали еще некоторое количество жидкого СО₂ до заполнения реактора. Реактор нагревали до заданной температуры и начинали отсчет времени реакции. Опыт проводили в течение 3 ч. Давление СО₂ варьировали от 10 до 30 МПа.

Сравнительные опыты по переэтерификации ТГОК проводили в этом же реакторе при атмосферном давлении азота в температурном интервале 30—60 °C при том же мольном соотношении ТГОК и метанола (1 : 3).

Анализ реакционной смеси осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием веществ на газовом хроматографе GS-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном капиллярной колонкой HP-1MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм и квадрупольным масс-спектрометром GSMS-QP2010S (Shimadzu, Япония). Анализ проводили в режиме термопрограммирования: выдержка 5 мин при 80 °C, линейный нагрев от 80 до 105 °C (10 °C/мин), линейный нагрев от 105 до 250 °C (25 °C/мин), выдержка при 250 °C в течение 3 мин. В

качестве газа-носителя использовали гелий ОСЧ 6.0 (54,5 мл/мин, линейная скорость в колонке — 36 см/с), температура инжектора 300 °C, температура интерфейса 280 °C, температура источников ионов 260 °C. В качестве внутреннего стандарта использовали дифениламин.

Эффективность биокатализаторов оценивали по величине выхода МЭОК ($Y, \%$), достигаемого за 180 мин в присутствии свободного и иммобилизованного фермента, количество которого рассчитывали по формуле: $Y = 100 \cdot C_i / C_0$, где C_0 — теоретически достижимая концентрация МЭОК в реакционной смеси, C_i — практически достигаемая за 180 мин концентрация МЭОК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлена зависимость выхода МЭОК от температуры в присутствии разных биокатализаторов. Представленная зависимость показывает, что эффективность нативной липазы в процессе переэтерификации ТГОК в метаноле при атмосферном давлении выше ($Y=30\%$) по сравнению с иммобилизованной ($Y=24\%$). При проведении процесса в среде СК- CO_2 , наоборот, иммобилизованная липаза более эффективна по сравнению с нативной (Y составляет 67 и 55 % соответственно).

Как следует из данных, приведенных на рис. 3, максимальное значение выхода, в присутствии как нативной, так и иммобилизованной липазы достигается при давлении CO_2 15 МПа (55 и 67 % соответственно). С дальнейшим повышением давления CO_2 наблюдается снижение выхода продукта

На рис. 4 представлена диаграмма максимальных значений выхода продукта в процессе переэтерификации ТГОК в метаноле (атмосферное давление) и в СК- CO_2 . Представленные данные свидетельствуют о том, что в среде СК- CO_2 эффективность нативной и иммобилизованной липазы выше в 1,8 и 2,8 раза соответственно.

Для обоих биокатализаторов максимальная эффективность достигается при 40 °C, что может быть связано с инактивацией фермента при более высокой температуре вследствие денатурации.

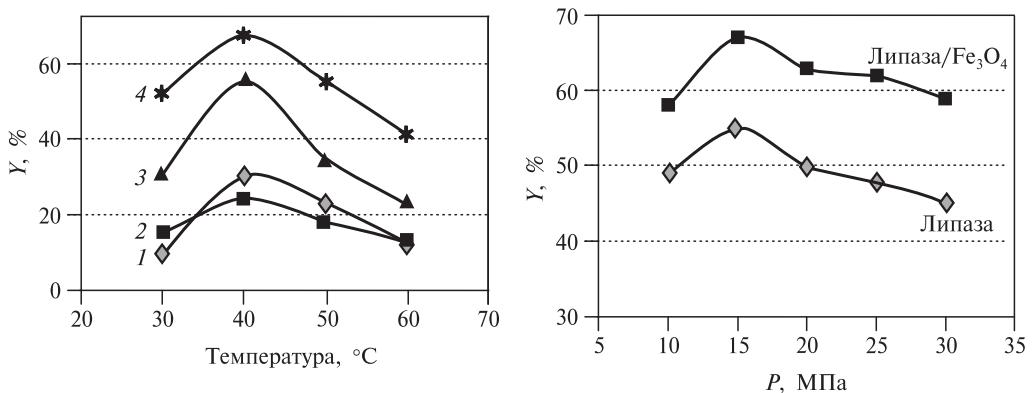


Рис. 2. Зависимость выхода МЭОК (Y) от температуры в процессе переэтерификации ТГОК: 1, 3 — липаза, 2, 4 — липаза/ Fe_3O_4 ; 1, 2 — в среде метанола (атмосферное давление); 3, 4 — в среде CO_2 (15 МПа); время реакции 180 мин

Рис. 3. Зависимость выхода МЭОК (Y) от давления CO_2 в процессе переэтерификации ТГОК (40 °C, время реакции 180 мин)

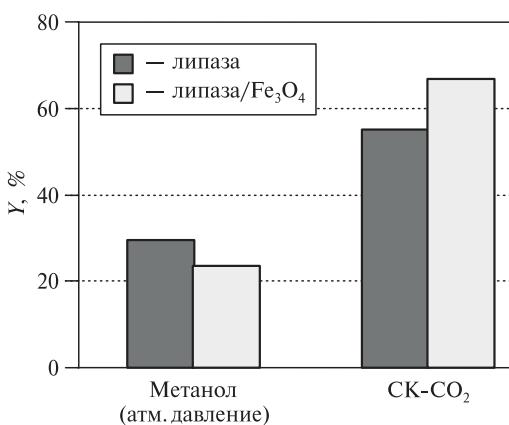


Рис. 4. Диаграмма значений выхода МЭОК (Y) в присутствии биокатализаторов в процессе переэтерификации ТГОК в метаноле (атмосферное давление) и СК-СО₂

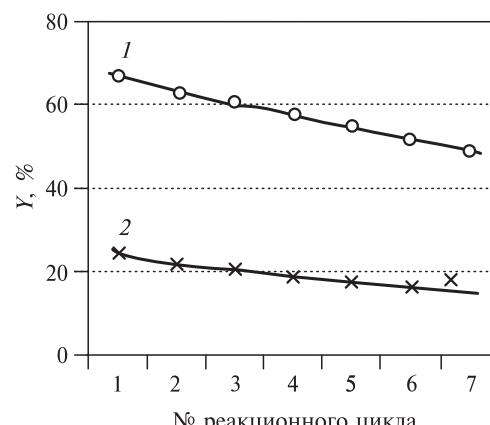


Рис. 5. Выход МЭОК (Y) в присутствии биокатализатора липаза/Fe₃O₄ при 40 °C в семи последовательных циклах переэтерификации ТГОК:

1 — в СК-СО₂ при 15 атм; 2 — в метаноле при атмосферном давлении

В присутствии биокатализатора липаза/Fe₃O₄ полная конверсия ТГОК в среде СК-СО₂ при 40 °C и 15 МПа достигается в течении 340 мин, тогда как в среде метанола при атмосферном давлении для этого требуется 610 мин.

Для иммобилизованных ферментов большее значение имеет стабильность и возможность повторного использования. Нами исследована стабильность биокатализатора липаза/Fe₃O₄ в семи последовательных циклах переэтерификации ТГОК в среде СК-СО₂ и метанола. Полученные данные (см. рис. 5) показывают, что этот биокатализатор может быть повторно использован в обеих средах. При этом его стабильность в СК-СО₂ выше, чем в метаноле: после семикратного использования в этих средах он теряет 28 и 37 % эффективности соответственно.

Таким образом, в среде СК-СО₂ фермент липаза проявляет более высокую эффективность в реакции переэтерификации триглицерида олеиновой кислоты до ее метилового эфира, чем в среде метанола. Увеличение выхода продукта может быть связано с тем, что в среде СК-СО₂ обеспечивается более быстрый массоперенос. Использование магнитных частиц Fe₃O₄ для иммобилизации липазы обеспечивает легкое отделение биокатализатора от продукта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках проектов, финансируемых РФФИ (гранты № 18-29-06004 и № 16-08-00158).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shemelis N.G., Jorge M.M. // AIMS Energy. 2017. Vol. 5. No 3. P. 425.
2. Saifuddin N., Samiuddin A., Kumaran P. Trends in Applied Sciences Research. 2015. Vol. 10. No 1. P. 1.
3. Gray R. Russian Federation. Biofuels Annual. United States Department of Agriculture. 2016. P. 1.
4. Dhar A., Agarwal A.K. // Fuel. 2014. Vol. 119. P. 70.

5. Lokanathan R., Ravindranath K. // Int. J. of Engineering Research and Development. 2013. Vol. 6. No 5. P. 35.
 6. Lee K.T., Lim S., Pang Y.L., Ong H.C., Chong W.T. Progress in Energy and Combustion Science. 2014. Vol. 45. P. 54.
 7. Рогожин А.Е. Дис. ... кан. хим. наук. Дзержинск. 2017.
 8. Melo A.D.Q., Silva F.F.M., dos Santos J.C.S., Fernández-Lafuente R., Lemos T.L.G., Filho F.A.D. // Molecules. 2017. Vol. 22. P. 2165.
 9. Carvalho N.B., Vidal B.T., Barbosa A.S., Pereira M.M., Mattedi S., Freitas L.S., Lima Á.S., Soares C.M.F. // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. P. 1829.
 10. Bogolitsyn K.G., Krasikova A.A., Gusakova M.A. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2016. Vol. 10. P. 1048.
 11. Mazanov S.V., Gabitova A.R., Miftahova L.H., Usmanov R.A., Gumerov F.M., Zaripov Z.I., Vasil'ev V.A., Karalyn E.A. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2016. Vol. 10. Is. 7. P. 1099.
 12. Аникеев В.И., Степанов Д.А., Ермакова А.Б. // Журнал физической химии. 2011. Т. 85. № 8. С. 1449.
 13. Navarro-Díaz H.J., González S.L., Irigaray B., Vieitez I., Jachmanián I., Hense H., Oliveira J.V. // J. of Supercritical Fluids. 2014. Vol. 93. P. 130.
 14. Bunyakiat K., Makmee S., Sawangkeaw R., Ngamprasertsith S. // Energy & Fuels. 2006. Vol. 20. No 2. P. 812.
 15. Cheng J., Li T., Peng N., Huang R., Zhou J.H., Cen K.F. // Fuel Processing Technology. 2015. Vol. 131. P. 409.
 16. Zhou D., Qi L., Qiao B.Q., Xu Q.Q., Yin J.Zh. // J. of Supercritical Fluids. 2017. Vol. 120. P. 395.
 17. Bogdan V.I., Koklin A.E., Krasovsky V.G., Lunin V.V., Sergeeva Ya.E., Ivashechkin A.A., Feofilova E.P. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2014. Vol. 8. P. 1004.
 18. Bertoldi C., da Silva C., Bernardon J.P., Corazza M.L., Filho L. C., Oliveira J.V., Corazza F.C. // Energy Fuels. 2009. Vol. 23. P. 5165.
-

BIOCATALYTIC TRANSESTERIFICATION OF OLEIC ACID TRIGLYCERIDE IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

¹N.V. Lakina, ¹E.M. Sulman, ¹V.Yu. Doluda, ^{1,2}V.G. Matveeva

¹Tver State Technical University ,Tver,Russia

²Tver State University, Tver, Russia

The prospects of using catalysts based on immobilized lipase in the transesterification of oleic acid triglyceride (THC) with methanol in supercritical carbon dioxide was shown. At an optimum temperature of 40 °C; a CO₂ pressure of 15.0 MPa and a THC:methanol = 1 : 3 molar ratio the yield of oleic acid methyl ester is significantly higher than that obtained in methanol at atmospheric pressure.

Key words: biodiesel, transesterification, supercritical CO₂, enzymatic catalysis, lipase, magnetocompatible biocatalyst.