

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松 博士

建立以 *Candida rugosa* 和 Novozym 435 兩步驟酵素方法

製備生質柴油

Establishing two-step enzymatic method by *Candida rugosa* and Novozym 435 to produce biodiesel

研究生：郭亮均 撰

中華民國 100 年 7 月

中文摘要

石油蘊藏量漸趨枯竭和溫室效應的影響，逼迫人們尋找能夠代替石油的能源。生質燃料具有生物可分解、沒有毒性、來源不會匱乏且不會增加大氣中二氧化碳的淨排放量等特性，吸引世人的目光去廣泛研究和大量採用，用生質燃料取代石油是替代方案之一。依照目前的發展趨勢看來，人們會從過去大量使用碳氫化合物(hydrocarbon)轉變為使用碳水化合物(carbohydrate)。

本研究採用酵素二步驟方法來生產生質柴油，第一階段 *Candida rugosa* 酵素先把大豆油經水解反應生成脂肪酸；第二階段 Novozym 435 酵素把水解反應得到的脂肪酸經酯化反應生成生質柴油。在第一階段的水解反應中，*Candida rugosa* 酵素在 35°C、pH 7.0 以及酵素使用量為大豆油重量的 0.25 wt% 條件下反應 12 小時，可得到脂肪酸產率 93.4%。第二階段的酯化反應中 Novozym 435 酵素使用量是甲醇和脂肪酸總重的 2.0 wt%，甲醇/脂肪酸的莫耳比 15/1，於 30°C 下反應 12 小時可獲得脂肪酸轉化率 97.8%。此結果跟鹼製程、酵素單步驟反應、酵素水解-HCl 酯化複合式製程相比，具有反應條件溫和、酵素可以回收再利用、縮短酵素單步驟反應時間和反應過程對環境友善的優點，不過略高的產物酸價是待克服的問題。

關鍵字：生質柴油、*Candida rugosa* 酵素、Novozym 435 酵素、酯化
反應、酸價

Abstract

Due to the depletion of petroleum deposits and the impacts of greenhouse effects, human beings are forced to look for some alternative energy in order to substitute for petroleum. Biofuel has attracted considerable interests for extensive researches and large-scale application by its specificities including biodegradation, non-toxicity, inexhaustible source and not increase carbon dioxide quantity in the atmosphere. Besides, there is a trend to replace petroleum by biofuel and a present tendency to apply carbohydrate instead of hydrocarbon.

In this study, we produce biodiesel by exploiting enzymatic two-step method. In the first step, *Candida rugosa Lipase* hydrolyses soybean oil to get fatty acid; in the second step, Novozym 435 esterifies fatty acid to biodiesel. The better reaction condition for hydrolysis step is established, such as using 0.25% weight ratio of lipase to soybean oil in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) under 35 °C for 12 hours, and then we can get the fatty acid yield 93.4 %. The preferable esterification condition is 2.0 % of weight ratio to methanol and fatty acid, the methanol / fatty acid molar ratio 15 under 30 °C for 16 hours, and then we can receive the esterification ratio 97.8 %. In addition, there are some advantages including moderate reaction, recyclable enzyme, shortened enzymatic reaction time and friendly reaction process when comparing the enzymatic two-step method with other three methods. However, the higher acid value for final product is the major consideration for the current procedure and needed to be overcome before industrial utilization.

Keywords: biodiesel, *Candida rugosa lipase*, Novozym 435, acid value

致謝

終於畢業了！不僅讓自己鬆一口氣，也讓關心我的家人親戚朋友師長們放下心中的石頭，可以通過研究所這關，展開人生下一階段。從當初剛進研究所對很多事情感到迷惘困惑，到現在完成學業且不會感到像入學時那樣的徬徨，在這過程中我學到很多也得到好多人的幫助，首先要感謝指導教授顧野松博士耐心的教導，讓我不僅建立起做研究的方法，也養成面對問題並解決問題的習慣；此外老師也協助我如何面對一些遇到的難題，並幫助我調整心態去面對及解決那些難題，在此跟老師致上最誠摯的感謝。另外感謝口試委員杜景順老師、林其昌老師、林松池老師、楊怡寬老師在百忙中抽空幫我修改論文和口試，找出我思路上的盲點並提出指正，讓我的論文可以更加完整。

感謝實驗室華良、建中學長在研究上的指導，並教導實驗和跟廠商應對的技巧。特別感謝華良學長在我研究上遇到困難時，盡心盡力地想辦法解決，也教會我許多解決問題的方法，修正我欠缺邏輯思考的思維模式。感謝東柏學長在生活上的指導，你陽光的態度紓解我不少煩悶的心情。感謝大學同學兼實驗室學長孟村在生活上、實驗上不私藏的指導提醒和鼓勵，你也帶起實驗室輕鬆的氣氛，讓大家都用歡笑聲趕走研究上的壓力。感謝戰友小綠貼心且超有默契的幫忙，也常聽我訴說心裡話。感謝另一個戰友滷蛋幫我解決很多實驗相關的難題，

畢業後也常回來鼓勵我。此外也感謝實驗室學長筱惇、kenji、大師、學姊方婷，你們讓我很快地熟悉整個實驗室的運作。感謝政峰學弟時常耐心且有默契地幫忙解決一堆實驗室相關的雜物事，感謝佳霖學弟幽默風趣的流行話語，沖淡不少研究上遇到的不愉快，讓實驗室的歡笑聲沒有停過。感謝學弟建成、森迪，你們超有默契的模仿為實驗室帶來更多的歡笑聲，口試前後不斷提醒我該準備哪些文件。感謝學妹心潔，平時幫我解決些我忽略掉的事情，更在提口試申請當天幫我解決不少突發狀況。感謝實驗室的專題生裕暉畢業後到成大唸書時幫我下載一堆文獻，也感謝實驗室的專題生芳雯、俐穎、淑雯、姿岑、勝育、蔥頭、玉如、國樺、小光，你們讓我的研究所生活更多彩多姿。

感謝北極學長經常來探訪和鼓勵，感謝亦師亦友的偉佑學長不停地糾正我許多不好的觀念和做事心態，也常常提醒我哪些事情還沒做完並要儘早完成。感謝大學同一家族的炯龍學長，從我上大學到我碩班畢業這段時間不停關心我這個問題學弟，也常幫我想辦法克服學習上遇到的瓶頸。感謝研究所同學老子、阿彰、小強、良源、熊(柏勳)、毓琳、懷慶、慧如，學弟俊瑩、智勇、學妹琳育，因為你們才讓我的碩班生活變得更加美好。感謝大一勞作小組長世遠、宏文、燕伶學姊，在我心情不好時不停鼓勵我，讓我繼續往前走。

感謝最漂亮的羅婷蕙老師在我遭遇困難時教我怎樣用智慧渡過

關卡，也有耐心告知我一定要修改的缺點，正妹老師謝謝妳。感謝超級好友煜程、芳芳、岳達和鍾爸爸、復宗、小導、國岳，陪我破過一個又一個難關，謝謝你們。感謝東海山社的智祥、檳榔、真妙、立心等人，跟你們一群狂人在一起時讓我暫時忘卻課業上的煩惱。感謝英文班的雨辰老師、Rose、Grace、Grace junior、Alber 等同學，跟你們在一起學習、分享經驗、聚會是非常快樂的事情，期待往後的仍有機會再聚首。

感謝大堂哥昱園，幾次談話裡給我當頭棒喝讓我驚醒過來要早日完成自己的論文，告誡我很多處事的態度和方法，並提醒我要改正的缺點。感謝英三伯父把我當成自己孩子那樣，用超有耐心和有智慧地態度給我教誨，糾正我不少偏差想法，也陪我渡過大大小小的事件。感謝姑姑和姑爹把我當成你們的小孩那樣無微不至地照顧，也陪我渡過我不喜歡的事件。我要特別謝謝我的家人特別是老爸，你們讓我在沒有經濟壓力下全力唸書，也是我的精神支柱；還有阿嬤、外婆、大伯、二伯和二伯母、阿姨等親友。最後感謝最疼我的阿公在天上保佑我考上碩士班，也保佑我平安度過一個又一個事件。僅以此篇文章感謝大家對我的幫助，也跟大家分享我終於畢業的喜悅。

目 錄

中文摘要	I
Abstract	III
致謝	IV
第一章 序論	1
1.1 前言	1
1.2 能源的開發	4
1.3 研究動機	8
第二章 文獻回顧	10
2.1 植物燃料油	10
2.1.1 柴油引擎和使用植物油	10
2.1.2 植物燃料油的缺點	10
2.1.3 解決植物油缺點的方法	11
2.2 生質柴油	14
2.2.1 生質柴油的介紹	14
2.2.2 生質柴油規格與標準規範	17
2.2.3 生質柴油發展現況與趨勢	22
2.3 轉酯化反應	26
2.3.1 鹼觸媒催化反應	28
2.3.2 酸觸媒催化反應	32
2.3.3 酸鹼觸媒兩步驟反應	35
2.3.4 超臨界流體反應	37
2.3.5 酵素催化反應	39
2.4 油脂水解反應	41

2.5	酯化反應	42
2.6	脂肪分解酶 Lipase	43
2.7.1	酵素 Novozym 435 的介紹	50
2.7.2	<i>Candida rugosa</i> Lipase 的介紹	51
第三章 實驗方法及分析		55
3.1	實驗藥品	55
3.2	實驗儀器	56
3.3	實驗方法	57
3.3.1	緩衝溶液的配製	57
3.3.2	配製 <i>Candida rugosa</i> 酵素溶液	60
3.3.3	油脂水解反應	60
3.3.4	脂肪酸酯化反應	60
3.3.5	酸價測定	60
3.3.6	標定 0.1 M KOH 乙醇溶液	61
3.3.7	酸價分析方法	61
3.3.8	水解轉化率計算	63
3.3.9	脂肪酸轉化率計算	63
3.3.10	脂肪酶活性分析	64
3.3.11	Bio-Rad 蛋白質分析	65
3.4	實驗流程	66
第四章 實驗結果		67
4.1	Novozym 435 的水解	68
4.1.1	緩衝液 pH 值對酵素 Novozym 435 水解反應的影響	68
4.1.2	反應時間對酵素 Novozym 435 進行水解反應的影響	70
4.1.3	反應溫度對酵素 Novozym 435 水解反應的影響	72
4.1.4	酵素 Novozym 435 使用量對水解反應的影響	76
4.1.5	酵素 Novozym 435 水解反應的結論	78
4.2	<i>Candida rugosa</i> 酵素水解反應	79
4.2.1	pH 值對 <i>Candida rugosa</i> 酵素的影響	79
4.2.2	反應溫度對 <i>Candida rugosa</i> 酵素的影響	82
4.2.3	反應時間對 <i>Candida rugosa</i> 酵素的影響	84
4.2.4	<i>Candida rugosa</i> 酵素使用量對水解反應的影響	86

4.2.5	<i>Candida rugosa</i> 酵素水解反應結論.....	88
4.3	Novozym 435 酵素和 <i>Candida rugosa</i> 酵素的比較.....	89
4.4	Novozym 435 酵素進行酯化反應.....	91
4.4.1	反應溫度對酯化反應轉化率的影響.....	91
4.4.2	反應時間對酯化反應轉化率的影響.....	93
4.4.3	Methanol/FFA 莫耳比對酯化反應轉化率的影響.....	95
4.4.4	酵素使用量對酯化反應轉化率的影響.....	97
4.4.5	Novozym 435 酵素進行酯化反應的結論.....	99
4.5	酵素 <i>Candida rugosa</i> 回收再利用的探討.....	100
4.5.1	用分光光度計測量 <i>Candida rugosa</i> 酵素水解反應前的活性.....	101
4.5.2	用 Bio-Rad 測水相酵素的濃度.....	102
4.5.3	酵素水解反應後的活性分析和酵素濃度的測量.....	104
4.5.4	重複使用 <i>Candida rugosa</i> 酵素進行水解反應的結果.....	105
4.6	Novozym 435 的活性分析.....	108
4.7	不同反應方法的比較.....	109
 第五章 結論與未來建議.....		119
5.1	實驗結論.....	119
5.1.2	酯化反應.....	120
5.1.3	<i>Candida rugosa</i> 酵素.....	121
5.1.4	Novozym 435 酵素.....	121
5.1.5	四種製程的比較.....	121
5.2	未來建議.....	122
 參考文獻.....		124
 簡歷.....		128

圖 目 錄

圖 1-1	全球電能生產預測圖 (http://www.eia.doe.gov)	6
圖 1-2	生物質經提煉後得到各種產物的示意圖	8
圖 2-1	三酸甘油酯熱裂解反應的反應機構	13
圖 2-2	不同生質柴油原料之單位面積產量比較	23
圖 2-3	轉酯化反應的反應機構圖	27
圖 2-4	轉酯化反應的總反應式	27
圖 2-5	游離脂肪酸和鹼行皂化反應的反應式	30
圖 2-6	三酸甘油酯和水進行水解反應的反應式	30
圖 2-7	鹼觸媒催化轉酯化反應的反應機構	31
圖 2-8	酯化反應的反應式	34
圖 2-9	酸觸媒催化轉酯化反應的反應機構	34
圖 2-10	脂肪分解酶催化反應機制圖	49
圖 2-11	<i>Candida rugosa</i> 酵素在油水界面水解三酸甘油酯的示意圖	53
圖 2-12	<i>Candida rugosa</i> 酵素的蛋白質二級結構	54
圖 4-1	pH 值對 Novozym 435 酵素水解效能的影響	69
圖 4-2	反應時間對 Novozym 435 水解效能的影響	71
圖 4-3	溫度對酵素 Novozym 435 水解效能的影響	74
圖 4-4	以 UV-vis 測得溫度對 Novozym 435 比活性的影響	75
圖 4-5	Novozym 435 使用量對脂肪酸產率的影響	77
圖 4-6	pH 值對 <i>Candida rugosa</i> 酵素水解效能的影響	81
圖 4-7	反應溫度對 <i>Candida rugosa</i> 酵素水解反應效能的影響	83
圖 4-8	反應時間對 <i>Candida rugosa</i> 酵素進行水解反應的影響	85
圖 4-9	<i>Candida rugosa</i> 酵素使用量對水解反應效能的影響	87
圖 4-10	反應溫度對酯化反應轉化率的影響	92
圖 4-11	反應時間對酯化反應轉化率的影響	94
圖 4-12	Methanol/FFA 莫耳比對酯化反應轉化率的影響	96
圖 4-13	酵素使用量對酯化反應轉化率的影響	98
圖 4-14	BSA 標準濃度檢量線	103
圖 4-15	CRL 使用次數對 FA yield 及 CRL 濃度的影響	107
圖 4-16	鹼催化轉酯化反應後的情況	110
圖 4-17	Novozym 435 酵素進行轉酯化反應後的情況	110
圖 4-18	鹼製程製造的生質柴油 GC 圖譜	113
圖 4-19	酵素-鹽酸混合製程之酯化反應前情況	117
圖 4-20	酵素-鹽酸混合製程進行	117
圖 4-21	酵素二步驟反應之水解反應後的情況	117
圖 4-22	酵素二步驟反應之酯化反應後的情況	117

表 目 錄

表 2-1	植物油和 D2 石化柴油性質比較	11
表 2-2	生質柴油與石化柴油標準之比較	16
表 2-3	生質柴油 B100 與 B20 排放量與石化柴油之比較 (in%).....	17
表 2-4	美國生質柴油標準 ASTM D6751	18
表 2-5	歐洲生質柴油標準 (EN 14214)	19
表 2-6	台灣生質柴油標準 (CNS-15072)	20
表 2-7	脂肪分解酶可進行的反應	48
表 2-8	五種不同 <i>Candida rugosa</i> Lipase 基本性質	52
表 3-1	不同 pH 值磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉緩衝溶液配法	57
表 3-2	不同 pH 值磷酸氫二鉀-磷酸二氫鉀緩衝溶液配法	58
表 3-3	不同 pH 值磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液配法	59
表 3-4	大豆油中脂肪酸的組成成分表	63
表 4-1	脂肪酸產率在不同反應溫度和反應時間的結果	70
表 4-2	Novozym 435 酵素使用量對水解反應的影響	76
表 4-3	反應時間和酵素量造成不同的脂肪酸產率	85
表 4-4	反應時間對酯化反應的影響	94
表 4-5	甲醇/FFA 莫耳比對酯化反應的影響	95
表 4-6	Novozym 435 酵素使用量對酯化反應轉化率的影響	98
表 4-7	酵素 <i>Candida rugosa</i> 水解反應前的活性	101
表 4-8	水解反應前後水相中 <i>Candida rugosa</i> 酵素濃度的變化	104
表 4-9	水解反應後 <i>Candida rugosa</i> 酵素的活性	104
表 4-10	CRL 酵素使用次數對 FA yield 及 CRL 酵素濃度的影響	106
表 4-11	Novozym 435 酵素酯化反應前的水解活性	108
表 4-12	Novozym 435 酵素酯化反應後的水解活性	108
表 4-13	四種方法的反應條件	110
表 4-14	七個標準品名稱及對應的縮寫	112
表 4-15	七個標準品在 GC 檢測過程中的詳細資訊	112
表 4-16	鹼製程生產的生質柴油 GC 標定結果	114
表 4-17	四種方法製造的產物性質比較	118
表 4-18	四種製程產物的處理方法	118
表 4-19	四種製程的優缺點	118

第一章 序論

1.1 前言

自從瓦特改良蒸氣機開啟十八世紀的工業革命後，人類對於能源的需求以及化石原料的消耗與日俱增，其中對石油的消耗越來越多。但是原油的價格受到國際政局變化、儲存量遞減等因素影響，價格從平均每桶 25 美金(2001 年)上升到平均每桶 134 美金(2008 年 7 月)，甚至在 2008 年 7 月 11 日升破每桶 147 美金的歷史記錄。除了高昂的價格，長期使用汽油所排放的廢氣引發溫室效應的影響日益嚴重，根據聯合國於 1988 年成立的跨政府氣候變遷小組 (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)在 2007 年的報告中指出:人類活動確實造成氣候變暖和海平面上升的現象，地表溫度在過去 100 年(1906-2005)已經增加約攝氏 0.74 度；若僅記算海洋範圍擴大與冰川融化的影響，在 21 世紀末海平面將上升 28 - 58 公分。全球人口密集的大都市有一半以上集中在沿海地區或河口附近，海平面的上升將造成淹沒陸地減少人民居住空間、損壞港口建築物、增加土壤鹽分使農耕地降低、下雨天就容易淹水等危機；加上全球暖化造成氣候異常，熱帶氣旋的威力越趨猛烈，降下暴雨的頻率越來越高，讓近幾年來全球多處地區發生大洪水，不僅低窪地區受到波及，離河口海口稍遠的地區也難逃洪水侵襲。此外據估計全球原油蘊藏量只能再開採 40 年

左右。這對人類來說是個不小的警訊—能源危機已漸漸逼近，因此尋找新能源一直是世界各國努力的方向。

能源可分成化石能源 (fossil energy)、再生能源 (renewable energy) 和裂變能源 (fissile energy)三種。化石能源包含石油、煤、天然氣等長時間經地殼變動所形成的不可再生能源。受限於開採技術和開發成本的限制，煤礦約可再開採 218 年，天然氣約可再開採 63 年。另外在北極圈和海床下皆有發現甲烷水合物，若開採出來使用可以暫時舒緩能源危機的困境。不過甲烷造成溫室效應的影響比二氧化碳大，若開採過程有疏失，會讓大量的甲烷氣體逸散出來增加大氣中溫室氣體的含量，使溫室效應的影響更加明顯。天然的化石燃料除含量固定外，開採及提煉的過程也會讓環境受到不小的汙染。此外這些化石燃料通常都是深埋地底甚至是在海底，開採過程的安全性常遭到質疑。國際間頻頻發生的礦災除了造成環境及生態的嚴重破壞外，也賠上的不少人的性命。在 2010 年 4 月 20 日墨西哥灣漏油事件，估計有一億八千四百萬加侖的原油漏出，受汙染區域超過整個墨西哥灣，重創墨西哥灣的漁業。另外全球只有少數幾個國家及地區埋藏有化石能源，在資源越趨匱乏的現在，為爭奪這些能源極有可能成為區域衝突的導火線。裂變能源 (fissile energy)指的就是核能，最常使用的是鈾元素。使用核能可以穩定產生大量的能源且過程中不會排放溫室氣體，操作

技術經過幾十年的努力也趨於成熟可靠，是眾多發電過程中能夠大量減少排放溫室氣體的一個好方法；這也是近十年內國際間興起蓋核能電廠風潮的主要原因。使用核能亦可以降低對進口能源的依賴，這對化石能源匱乏的國家是個不錯的選擇。核能的缺點是放射性核廢料的處理，處理過程的瑕疵會逸散出放射線物質，造成永久性環境汙染及生物基因突變等重大危害。因此尋找不論在生產及使用過程都對環境生態友善的能源，長久以來都是世界各國追尋的目標，尤其是天然資源匱乏的國家。

希冀追求的能源是非原油 (nonpetroleum)，兼具可再生(renewable)和不會污染 (nonpolluting)的特性。再生能源 (renewable energy)是指自然界中可以循環再生，使用不盡的天然資源，例如太陽能、水力、風力、地熱、潮汐能、生物質 (biomass)等，皆具備有可再生性和不會污染環境的要求，在未來能源供應中會扮演極重要的角色。據估計在 2040 年再生能源將可供應全球一半以上的能源需求，生產超過 80%的電能。人類使用風力、水力、太陽能已有幾世紀，除了利用來協助生產有些亦用來發電。因環保觀念的興起和人們意識到能源危機的到來，再生能源比以往受到更廣大的關注，使用量也快速增加；其具有取之不盡與生產電能過程中對環境友善的特色，是除了核能發電外另一個可以大量減少排放溫室氣體的發電方法，亦是所

有能源中最具未來性，其發展前景也最備受期待。對化石能源匱乏的國家，想要減少對進口能源的依賴，發展再生能源是唯一的辦法。此外大量使用再生能源亦可以大量減少大氣中的溫室氣體的淨排放量，減緩低溫室效應的惡化程度。在眾多再生能源中只有生質燃料 (biofuel) 可當作內燃機的燃料使用，取代日益枯竭的原油；內燃機只要稍作修改或不須要變更及可直接使用生質燃料。由於生質能源大都使用植物或藻類產生的碳水化合物，燃燒過程中釋放到大氣的碳（以二氧化碳的形式存在），則由植物/藻類於行光合作用過程中吸收自大氣裡的二氧化碳，因此會形成一個碳循環，不會增加大氣中總二氧化碳的含量。在可預見的未來，人們會從大量使用碳氫化合物 (hydrocarbon) 變成廣泛使用碳水化合物 (carbohydrate) (Demirbas, 2008)。

在生質能源中以生質酒精 (bioethanol) 和生質柴油 (biodiesel) 最受矚目，因為他們可以分別添加到汽油和柴油中，以混參或直接使用的方式用於內燃機，具有很大的實用價值。生質柴油早已經商品化且生產規模在近幾年內快速放大，希望藉此能大量降低對石油的消耗。

1.2 能源的開發

工業革命後人類對化石能源的需求與日俱增，隨著世界人口的增

加和都市化快速的成長，在經過兩百多年的大量開採後，現今地球上的存量已減少許多。據估計煤炭約可再開採 218 年，石油約可再開採 41 年，天然氣約可再開採 63 年(Agarwal, 2007)。裂變能源（也就是核能）是現今提供能源方式中，供應量僅次於化石能源的方法。不過核能發電的燃料鈾礦，依目前的開採速度約只可再使用不到 200 年；且核能發電只有在運轉過程中不排放二氧化碳，在建廠、設備更新、關廠、核燃料開採純化、核廢料的處理過程中，都要消耗大量的能源和資金；核廢料的處理是棘手的問題，目前仍沒有一個讓人滿意又安心的方法。歷史上發生的核能電廠事故中，輕則造成輻射外洩，重則讓核子反應器內的爐心受損，讓大量的輻射外洩污染整個環境，使半徑 30 公里甚至 200 公里內的居民健康受到損傷和人民死亡，也造成當地物種基因的突變；另外受污染的土地和器具將永遠無法再使用。前蘇聯車諾比核能意外、美國三哩島事件，讓世人認真審視核能發電的價值；最近發生的日本福島核電廠意外，減緩近年來國際間興建及使用核能發電的熱潮，德國更因此立法訂出在 2022 年要全面廢止核能發電。另一個跟核能相關的發電方式為核融合發電，是個潔淨且受期待的發電方式，它可以使用海水中的成分做燃料，完全不會產生空氣污染和放射性廢料的問題。不過此方法現在仍在實驗階段，還有很多瓶頸有待克服，材料是其中最大的問題；因此距離商業運轉還有好

長的時間。

第三種再生能源是三種能源中公認成長最快、發展潛力最大，也最環保的方式。和石化能源相比，再生能源具有自然界可以再生，取之不盡用之不竭的特性；和裂變能源相比，沒有放射性和設備建造成本過於高昂的問題。在圖 1-1 全球電能生產來源預測圖中可看到再生能源的使用比例皆超過核能，也是各種能源中成長速度最快者。

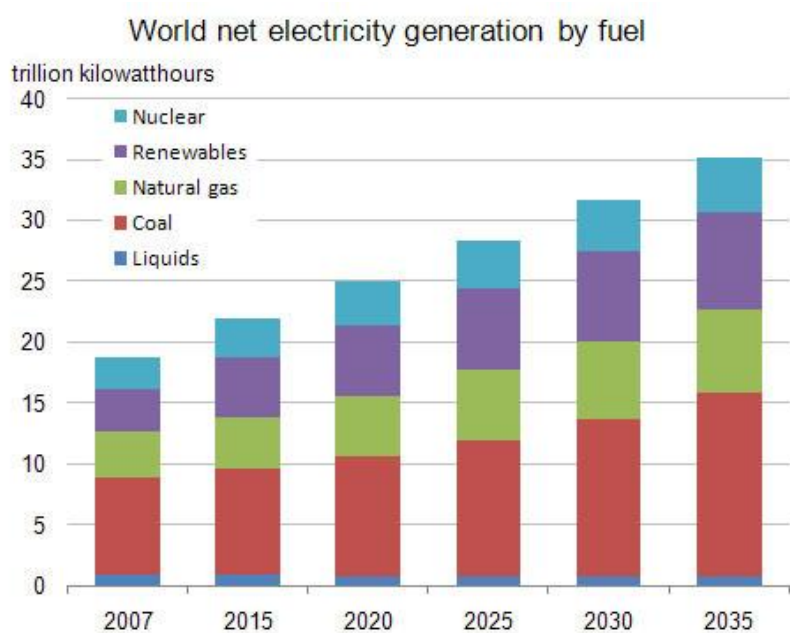


圖 1-1 全球電能生產預測圖 (<http://www.eia.doe.gov>)

再生能源包含太陽能、風力、水力、地熱能、潮汐能和生物質 (biomass)。生物質是各種有機體的整體重量，例如：草本或木本植物、農作物、農林畜牧業廢棄物等，經過光合作用把太陽能以化學能的方

式儲存在生物體的一種能量形式，經過生物提煉 (biorefinery)後可以得到生質燃料 (biofuel)、生物材料 (biomaterial)、醫藥食品、特殊化學物質等東西，如圖 1- 2 所示。過程中產生的二氧化碳可以被藻類培養器中的海藻吸收，培養的海藻可以萃取體內豐富的油脂做成生質柴油。生質酒精屬於生質燃料的一部份，可和石化汽油混參或直接使用在汽機車引擎中。除含糖分量高的農作物（例如：甘蔗）可製生質酒精外，科學家把目標放在形成植物體骨幹的纖維素，把多醣體的纖維素轉換成生質酒精。如此可以擴大原料來源，讓所有植物皆可製造生質酒精，不會為了特定的原料而降低糧食耕地引發糧食短缺的問題。美國前總統小布希 2006 年 12 月 31 日發表的國情咨文中提到：不只用玉米，還要使用木片、芒草當作纖維素來源生產生質酒精。

「 We'll also fund additional research in cutting-edge methods of producing ethanol, not just from corn, but from wood chips and stalks, or switch grass. 」

生質柴油的原料來源是植物油、動物油、藻類、廢食用油等含三酸甘油酯的油脂，經過簡單的轉換即可獲得。生質柴油可和現有的石化柴油混參或直接使用在柴油引擎上，除使用於汽車柴油引擎上，近年來船舶引擎也開始使用生質柴油。生質酒精和生質柴油大量生產和採用可以降低對石油的使用，朝向有朝一日不使用原油的目標邁進。

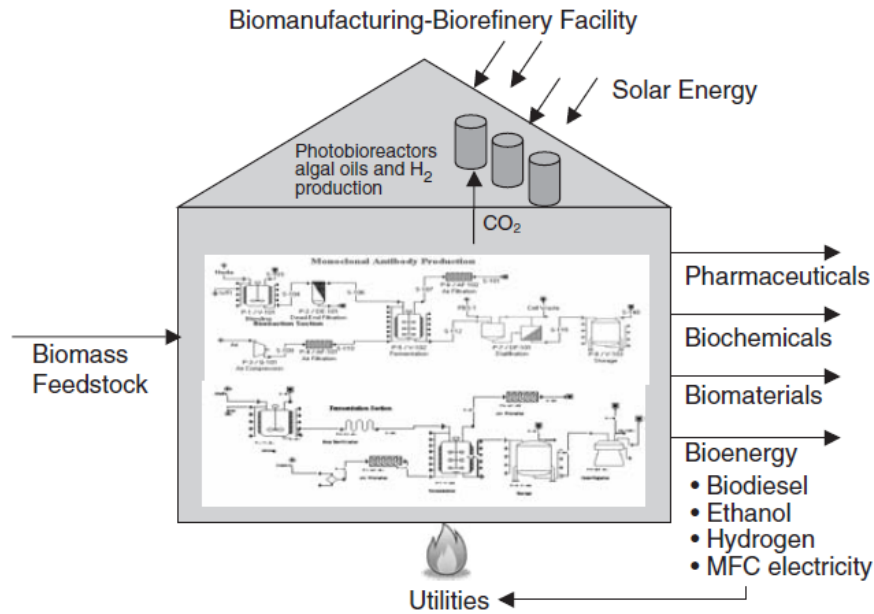


圖 1-2 生物質經提煉後得到各種產物的示意圖

(Drapcho et al., 2008)

1.3 研究動機

柴油引擎的熱效率高於汽油引擎，油耗量也較低。拜引擎科技的進步讓小型車使用以往只能應用在大型車的柴油引擎，其表現已跟汽油引擎相近，在很多方面甚至表現更好，柴油的價格也比汽油低。這些因素讓柴油的使用者比以往還多。生質柴油的特性與石化柴油相近，可以單獨使用或以特定比例混入石化柴油，引擎需要少許修改甚至不用修改即可使用。相較於石化柴油，生質柴油具有來源不虞匱乏、使用方便、沒有毒性、可自然分解對環境友好等特性，很早就吸引學者來研究各種生產方法；目前普遍的生產方式有鹼製程、酸製程、酸鹼兩階段製程、酵素製程。鹼製程常以氫氧化鈉或氫氧化鉀為

催化劑，優點是反應快速、成本低廉；不過也有產物純化時會產生大量廢水、反應油脂純度要很高的缺點。

相較於鹼製程，酸製程可以忍受較低品質、含脂肪酸和水較高的反應油脂，不過反應緩慢需要長時間的反應；此外，催化劑會殘留在產物中，需要多量的清水才能去除，產生的廢水也會危害環境。酸鹼兩階段製程結合了酸製程和鹼製程的優點，具有工業應用的價值，不過也統包的兩製程在反應後需要大量清水去除反應觸媒，產生多量的廢水的困擾。

酵素製程近年來漸漸受到重視，具有產物單純、容易分離、反應過程對環境友善的優點。不過酵素價格高昂、反應時間長、容易受到反應醇類的毒害喪失活性，讓酵素製程不具有商業生產的價值。本研究中使用酵素水解—酵素催化的反應方式，使用酵素水解反應快的特性，先將油脂水解成脂肪酸，再利用酵素酯化反應速度比轉酯化反應快的特性，把脂肪酸轉化成脂肪酸酯：先利用 *Candida rugosa* 酵素把油脂水解成游離脂肪酸 (Free Fatty Acid, FFA)，再使用固定化酵素 Novozym 435 把游離脂肪酸經酯化反應變成生質柴油。期待使用此方法降低酵素反應時間、減少酵素在反應過程中被醇類毒害喪失活性的機會。此外再跟鹼製程、酸製程、酵素水解-酸觸媒兩階段製程相比，找出酵素二階段反應的優缺點。

第二章 文獻回顧

2.1 植物燃料油

2.1.1 柴油引擎和使用植物油

1897 年德國發明家 Dr. Rudolf Diesel 發明了柴油引擎，其展現的熱效率明顯高於當時的汽油引擎和蒸汽機，並且在 1900 年巴黎世界博覽會上展出以花生油為燃料的柴油引擎。他相信植物油可以拿來作為柴油引擎的燃料，並且有朝一日會變的跟石油一樣重要。植物油具有高熱含量、超低含硫量、無毒性、生物可分解及可再生的特性，是非常有潛力的燃料；使用植物油做為燃料，除了可以減少對石油的依賴，還可以促進農業的發展。在二十世紀初期和二次大戰後有些國家採用，但是慢慢浮現一些操作上的問題。

2.1.2 植物燃料油的缺點

和石化柴油相比植物油的熱值較低，分子量約為 D2 石化柴油的 4 倍，黏度約為 D2 石化柴油的 12 倍，如表 2- 1 所示。這會影響油脂在引擎中的噴射時程，讓噴射效果不彰、與空氣的混合效果不好，造成燃燒不完全。此外因為植物油的分子量比較大，揮發性比石化柴油低，讓油脂容易黏在噴射器頭或蓄積在引擎氣缸內而影響運轉效率；另外，植物油的氧化穩定性較低容易產生熱聚合作用，會蓄積在

噴射器頭，影響燃燒效率。這些不完全燃燒導致更多的油脂蓄積，噴射器頭的碳化，降低其潤滑性，引起冷車不易起動和點火遲延等問題。

表 2-1 植物油和 D2 石化柴油性質比較 (Demirbas, 2008)

Comparisons of some fuel properties of vegetable oils with D2 fuel

Fuel type	Heating value (MJ/kg)	Density (kg/m ³)	Viscosity at 300 K (mm ² /s)	Cetane number ^a
D2 fuel	43.4	815	4.3	47.0
Sunflower oil	39.5	918	58.5	37.1
Cottonseed oil	39.6	912	50.1	48.1
Soybean oil	39.6	914	65.4	38.0
Corn oil	37.8	915	46.3	37.6
Opium poppy oil	38.9	921	56.1	–
Rapeseed oil	37.6	914	39.2	37.6

^a Cetane number is a measure of the ignition quality of diesel fuel.

2.1.3 解決植物油缺點的方法

無法拿植物油當作柴油引擎燃料的重要原因之一是黏度偏高，如何降低植物油黏度是解決此問題的關鍵。常用的方法有以下幾種：

1. 稀釋 (Dilution)
2. 微乳化 (Microemulsion)
3. 熱裂解 (Pyrolysis)
4. 轉酯化 (Transesterification)

植物油的稀釋是使用柴油或溶劑（如醇類），依不同比例混合。Ziejewski 等學者使用 75%柴油和 25%的葵花油混合，發現可把植物

油黏度降低至 4.88 cSt (在 40°C)，但黏度比 ASTM 的標準值 4.0 cSt 略高，也不適合柴油引擎長時間使用(Ziejewski, 1986)。微乳化是加入乳化劑或是溶劑(如甲醇、乙醇、1-丁醇)，讓油脂能夠有效地分散，成為比膠體 (colloid)更細小的液體粒子，改善噴霧特性而易在引擎汽缸內點火燃燒，提升引擎運轉效率。2-辛醇是個不錯的雙親分子 (amphiphile)，讓大豆油可以跟甲醇形成微膠體(Demirbas, 2008)。雖然效果不錯，不過添加物的成本偏高，不適合商業上的應用。熱烈解顧名思義即把油脂經過高溫高壓裂解，就像原油經過裂解反應產生柴油，其反應機構如圖 2- 1 所示。此方法具有反應過程相當麻煩、生產成本很高、反應途徑複雜會產生很多副產物、產品的穩定性不好等缺點。最好的方法是將植物油經轉酯化反應，生成脂肪酸甲酯(生質柴油)，也是到目前為止最常用的方法。

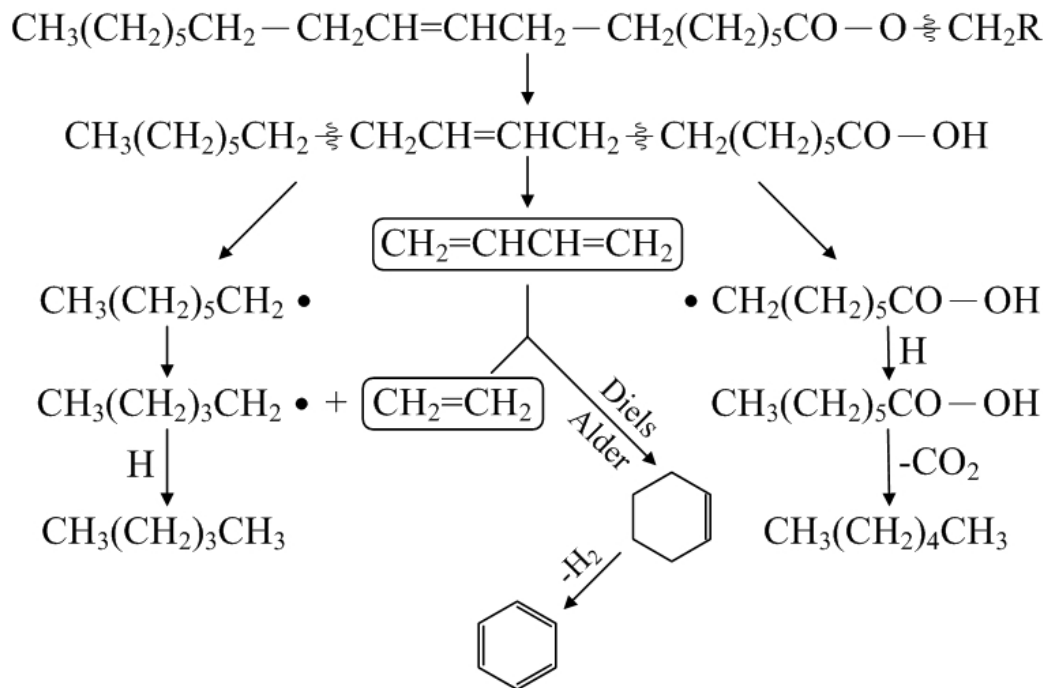


圖 2-1 三酸甘油酯熱裂解反應的反應機構(Schwab et al., 1988)

2.2 生質柴油

2.2.1 生質柴油的介紹

生質柴油是烷基酯類，跟石化柴油的特性相近，如表 2-3 所示，是種乾淨的替代能源，也可以作為添加劑，提升石化柴油的潤滑性。生質柴油除了可以單獨使用，還可以依照一定比例和石化柴油相混合；混合後的柴油以 BXX 表示，其中的 XX 表示混合柴油中生質柴油的體積比率，例如 B100 表示純的生質柴油，B20 表示由 20% 的生質柴油和 80% 的石化柴油組成。生質柴油的定義是利用可再生的生物油脂 (renewable biolipids)，例如植物油、動物油和藻類油脂 (algae lipids)，經反應後得到長鏈脂肪酸的單烷基酯 (monoalkyl esters of long-chain fatty acids) (Demirbas, 2008)。生質柴油的特性如下：

1. 沒有毒性、是無窮盡的可再生能源，而且生化可分解性良好，可以避免環境污染。
2. 使用後產生的二氧化碳返回生態圈，讓植物和藻類吸收成長，植物和藻類產生的油脂可製造生質柴油，植物本身又是動物的食物來源。如此形成一個密閉型的碳循環 (Carbon cycle)，所以二氧化碳的淨排放量為零。
3. 芳香族烴類碳氫化合物 (Aromatic Hydrocarbons) 含量低，燃燒後廢氣的致癌性可大幅降低；如表 2-2 所示：生質柴油產生的 Sox

可減少 100%，CO 可減少 48%，空氣毒物可減少 60-90%。

4. 十六烷值 (Cetane number)較高可達 50 以上，D2 石化柴油為 42；此外生質柴油含氧量 11%，可促進燃燒點火效果。
5. 閃火點 (Flash point)較高為 118°C，比石化柴油 52°C 高，可避免意外點燃而著火，所以在儲存、運輸、使用上會比較安全。
6. 除可代替部份石化柴油減少石油進口量，還可使用回收的廢食用油當作為原料製造生質柴油，達到節省外匯和環保的雙重效果。
7. 熱值為 128000 BTU/gal 比 D2 石化柴油的熱值 130500 BTU/gal 低，但其燃料消耗量與石化柴油略同，最大扭力曲線呈現與石化柴油相近，運轉效率和石化柴油類同而無不及。
8. 氮氧化物排放量比石化柴油高是其缺點（見表 2-4），不過只要調整引擎噴射時程或是增加觸媒就可以改善。
9. 與石化柴油的混合性良好，也可藉由本身較佳的潤滑度，提升混合後的石化柴油潤滑性。在歐洲是添加 5%的生質柴油，在美國則是添加 20%的生質柴油供應卡車或公車使用。
10. 通過美國食品藥物管理局 (FDA)和美國環保署 (EPA)的認可，是清潔環保代替燃料或燃料添加劑。

表 2-3 生質柴油與石化柴油標準之比較 (Lotero et al., 2005)

比較項目	石化柴油	生質柴油
Standard	ASTM D975	ASTM D6751
Composition	HC (C10–C21)	FAME (C12–C22)
Kinematic viscosity (mm ² /s) at 40 °C	1.9–4.1	1.9–6.0
Specific gravity (g/mL)	0.85	0.88
Flash point (°C)	60–80	100–170
Cloud point (°C)	-15 to 5	-3 to 12
Pour point (°C)	-35 to -15	-15 to 16
Water (vol%)	0.05	0.05
Carbon (wt%)	87	77
Hydrogen (wt%)	13	12
Oxygen (wt%)	0	11
Sulfur (wt%)	0.05	0.05
Cetane number	40–55	48–60
High Frequency Reciprocating Rig. (µm)	685	314
Ball-on-cylinder lubricity evaluator scuff (g)	3600	> 7000

表 2-4 生質柴油 B100 與 B20 排放量與石化柴油之比較 (in%)

(Loterio et al., 2005)

Emission	B100	B20
二氧化碳 (Carbon monoxide)	-48	-12
未燃燒的碳氫化合物 (Total unburned hydrocarbons)	-67	-20
懸浮微粒 (Particulate matter)	-47	-12
氮氧化物 (Nitrogen oxides)	+10	+2
硫化物 (Sulfates)	-100	-20
空氣毒性 (Air toxics)	-60 to -90	-12 to -20
誘發突變性 (Mutagenicity)	-80 to -90	-20.0

2.2.2 生質柴油規格與標準規範

由於製造生質柴油的原料種類、原料來源不同，使用的製造方法不一樣，皆導致生產的生質柴油物性、化性等諸多性質不一樣；製造的生質柴油燃料特性必須符合柴油引擎性能規格才可安全使用。燃料品質優劣的關鍵在於油脂轉化過程必須完全，讓生質柴油的純度超過 96.5%，以及需要徹底去除副產物甘油；倘若產物純度不佳，殘留的雜質會造成引擎不正常運轉，排放廢氣成分不良等問題。此外，生質柴油的氧化穩定性也是影響燃料性質的重要因素，若脂肪酸酯受到氧化容易改變燃料性質，產生的膠質或油渣可能會阻塞過濾器。用大豆油等含不飽和脂肪酸油脂合成的生質柴油，必須特別注意其氧化穩定

性，確保燃料油的品質。為有效規生質柴油的品質，目前已有的標準包括美國的 ASTM D6751（表 2-5）與歐洲的 EN14214（表 2-6）；台灣也在 2007 年公佈生質柴油的標準 CNS-15072，規範生質柴油的各種性質（表 2-7）。

表 2-5 美國生質柴油標準 ASTM D6751

Property	Units	Limits	Test method
閃火點 (Flash point)	°C	> 130	D 93
水和沉積物 (Water and sediment)	% volume	< 0.05	D 2709
動黏度 (Kinematic viscosity, 40°C)	mm ² /s	1.9 - 6.0	D 445
硫酸鹽灰份 (Sulfated ash)	% mass	< 0.02	D 874
硫 (Sulfur)	% mass	0.0015	D 5453
銅片腐蝕性 (Copper strip corrosion)	—	No.3 max	D 130
十六烷值 (Cetane number)	—	> 47	D 613
雲點 (Cloud point)	°C	Report	D 2500
殘碳量 (Carbon residue)	% mass	< 0.05	D 4530
酸價 (Acid number)	mgKOH/g	< 0.8	D 664
游離甘油含量 (Free glycerin)	% mass	0.02	D 6584
總甘油含量 (Total glycerin)	% mass	0.240	D 6584
磷含量 (Phosphorus content)	% mass	< 0.001	D 4951
蒸餾溫度 (Distillation temperature atmospheric equivalent temperature, 90% recovered)	°C	< 360	D1160

表 2-6 歐洲生質柴油標準 (EN 14214)

項目	Units	Lower limit	Upper limit	Test-Method
酯含量 (Ester content)	% (m/m)	96.5	—	prEN 14103
密度 (Density at 15°C)	kg/m ³	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
黏度 (Viscosity at 40°C)	mm ² /s	3.5	5.0	EN ISO 3104
閃火點 (Flash point)	°C	120	—	ISO/CD 3679
硫含量 (Sulphur content)	mg/kg	—	10	DIN 51680
殘碳量 (Carbon residue)	% (m/m)	—	0.3	EN ISO 10370
十六烷值 (Cetane number)	—	51.0	—	EN ISO 5165
硫酸鹽灰份 (Sulphated ash content)	% (m/m)	—	0.02	ISO 3987
水份含量 (Water content)	mg/kg	—	500	EN ISO 12937
總污染量 (Total contamination)	mg/kg	—	24	EN 12662
銅片腐蝕性 (Copper band corrosion, 3 hours at 50°C)	—	Class 1	Class 1	EN ISO 2160
氧化穩定性 (Oxidative stability, 110 °C)	hour	6	—	pr EN 14112
酸價 (Acid value)	mgKOH/g	—	0.5	pr EN 14104
碘價 (Iodine value)	—	—	120	pr EN 14111
Linolenic acid Methyl ester	% (m/m)	—	12	pr EN 14103
甲醇含量 (Methanol content)	% (m/m)	—	0.2	pr EN 14110
單酸甘油酯含量 (Monoglyceride content)	% (m/m)	—	0.8	pr EN 14105
二酸甘油酯含量 (Diglyceride content)	% (m/m)	—	0.2	pr EN 14105
三酸甘油酯含量 (Triglyceride content)	% (m/m)	—	0.2	pr EN 14105
游離甘油含量 (Free glycerine)	% (m/m)	—	0.02	pr EN 14105 pr EN 14106
總甘油含量 (Total glycerine)	% (m/m)	—	0.25	pr EN 14105
第 I 族金屬 Alkali Metals (Na+K)	mg/kg	—	5	pr EN 14108 pr EN 14109
磷含量 (Phosphorus content)	mg/kg	—	10	pr EN 14107

表 2-7 台灣生質柴油標準 (CNS-15072)

項目	Units	Lower limit	Upper limit	Test-method
酯含量 (Ester content)	% (m/m)	96.5	—	CNS-15051
密度 (Density at 15°C)	kg/m ³	860	900	CNS-12017 CNS-14474
黏度 (Viscosity at 40°C)	mm ² /s	3.5	5.0	CNS-3390
閃火點 (Flash point)	°C	120	—	CNS-3574
硫含量 (Sulfur content)	mg/kg	—	10	CNS-14505
殘碳量 (10%蒸餾物) Tar remnant (at 10% distillation remnant)	% (m/m)	—	0.3	CNS-14477
十六烷值 (Cetane number)	—	51.0	—	CNS-5165
硫酸鹽灰份 (Sulphated ash content)	% (m/m)	—	0.02	CNS-3576
水份 (Water content)	mg/kg	—	500	CNS-4446
總污染量 (Total contamination)	mg/kg	—	24	CNS-15055
銅片腐蝕性 3 小時 50°C (Copper band corrosion, 3 hours, 50°C)	rating	Class 1	Class 1	CNS-1219
氧化穩定性 (Oxidation stability, 110°C)	hours	6	—	CNS-15056
酸價 (Acid number)	mgKOH/g	—	0.5	CNS-14669 CNS-14906
碘價 (Iodine value)	—	—	120	CNS-15060
次麻油酸甲酯 (Linolenic acid methyl ester)	% (m/m)	—	12	CNS-15051
Polyunsaturated (≥ 4 Double bonds) Methyl ester	% (m/m)	—	1	
甲醇含量 (methanol content)	% (m/m)	—	0.2	CNS-8523
單甘油酯含量 (Monoglyceride content)	% (m/m)	—	0.8	CNS-15018
雙甘油酯含量 (Diglyceride content)	% (m/m)	—	0.2	CNS-15018
三甘油酯含量 (Triglyceride content)	% (m/m)	—	0.2	CNS-15018

游離甘油含量 (Free glycerine)	% (m/m)	—	0.02	CNS-15018
總甘油含量 (Total glycerine)	% (m/m)	—	0.25	CNS-15018
第 I 族金屬 (鈉+鉀) (Alkali metals, Na+K)	mg/kg	—	5	CNS-15052 CNS-15053
第二族金屬 (鈣+鎂) (Alkali metals, Ca+Mg)	mg/kg	—	5	CNS-15054
磷含量 (Phosphorus content)	mg/kg	—	10	CNS-15019 CNS-15058
冷濾點 (Cold filter plugging point)	°C	—	-5 (C 級)	CNS-15061

2.2.3 生質柴油發展現況與趨勢

2.2.3.1 國際發展現況

生質柴油的發展近年來在全球發展快速，在 2008 年全球生質柴油的產量約為 1610 萬公秉，比 2007 年增加 52%，其中歐洲佔了 55%。德國是生質柴油發展最成功的國家，產量居全球首位，在 2008 年生 317.5 萬公秉；美國是歐洲以外的主要發展國，為世界第二大生產國，2008 年生 265 萬公秉。歐洲過去以柴油為主要的交通運輸，發展也以生質柴油為主，所以生質柴油主要使用在歐洲，2005 年全球使用量中歐盟就佔了八成以上。為達成歐盟於 2003 年的設定，西歐地區許多國家以獎勵、補助、強制參配等政策促進生質柴油產業的發展。使用原料方面：歐洲主要使用菜籽油與葵花油，美國使用大豆油，巴西與馬來西亞主要用棕櫚油，日本使用回收的廢食用油和進口棕櫚油。不過因為用糧食為生產原料，導致糧食價格上升，產生與民爭食的爭議後讓發展受到些許遲緩；不過整體依舊持續成長。為了降低使用糧食作物、不引發糧食危機、消除「要糧食還要是燃料」的巨大爭議，各國紛紛研究使用其他原料來生產生質柴油，例如：藻類。美國再生能源實驗室研究發現：相較於大豆，藻類在同樣的土地面積上具有生產 200 倍以上的生質柴油潛能，如圖 2- 2 所示。用藻類生產生質柴油的技術中，關鍵在於藻種的選擇與養殖，以及放大生產規

模；不過到 2008 年以前還沒有成功商轉的案例。在現今全球氣候異常引起糧食短缺的問題，使用藻類不會造成排擠糧食作物用地，還可以吸收大氣中或火力電廠、煉鋼廠等工廠排放大量的 CO₂ (經濟部能源局, 2010a; 謝志強, 2008)。

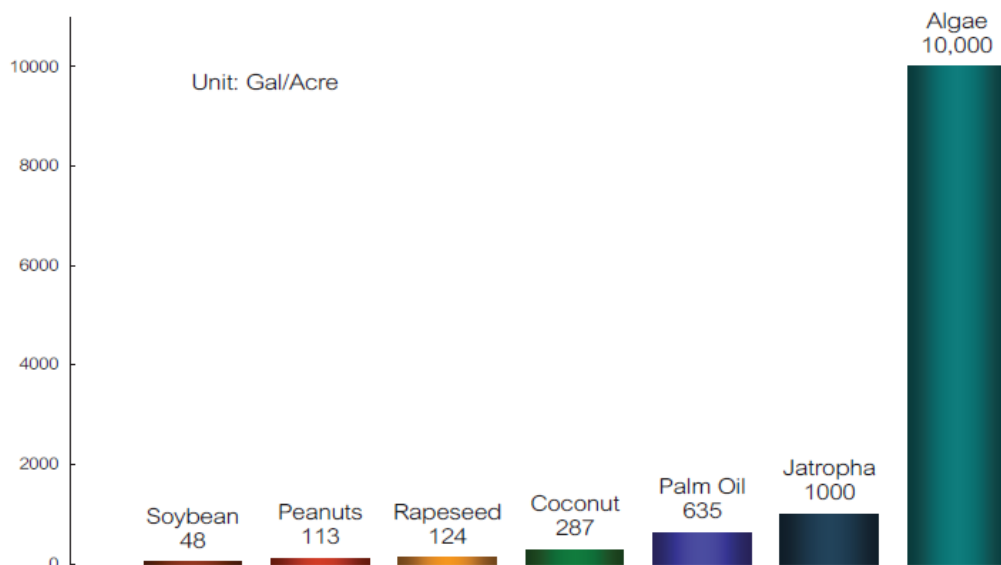


圖 2-2 不同生質柴油原料之單位面積產量比較

(Pienkos, 2007; 謝志強, 2008)

2.2.3.2 國內生質柴油發展現況

2004 年在經濟部能源局推動下，台灣第一個量產生質柴油的公司正式啟用；並在同年，能源局與環保局陸續在台灣 16 個縣市堆動「生質柴油道路試行工作計畫」，把生質柴油應用在資源回收車上。我國推動生質柴油的策略是以開發自產能源和扶植國內產業為主，政策推動可分成四個階段。第一階段在 2007 年年初展開「綠色公車計畫」，鼓勵大眾交通工具添加使用生質柴油；高雄市公車是第一個使用生質柴油的車隊，共有 428 輛公車使用 B5 生質柴油，為全台第一個，亞洲第二個公車全面使用添加生質柴油的城市。第二階段在 2007 年 7 月展開「Green County 綠色城鄉」計畫，選定桃園縣、嘉義縣市為示範區域，總共有 297 座加油站販售 B1 生質柴油，供一般柴油車輛使用。第三階段在 2008 年 7 月起全面推行使用 B1 生質柴油，並於 2010 年 1 月 1 日起全面銷售 B1 生質柴油。第四階段從 2010 年 6 月起將生質柴油的添加量提升到 2%，估計年使用量可達 10 萬公秉，減少使用 250 萬桶進口原油，並預估減少排放 33 萬公噸的 CO₂，相當於 343 座大安森林公園的吸收量；並出計年產值約 30 億元。

國內生質柴油技術開發與推動的中程計畫（～2020 年），是每年使用 15 萬公秉的生質柴油、建立運轉高純度甘油回收廠(每年 1 萬公秉)，並開發整合微藻產油程序，讓微藻培養生產能力可達到每天

60 g/m²。長程計畫(~2025 年)是每年使用 25 萬公秉的生質柴油、建立運轉高純度甘油回收廠(每年 2 萬公秉)、生物轉酯化製造廠的商業化運轉、能源作物推廣面積達到 20 萬公頃。整體而言我國生質柴油產業已漸具雛形，未來產業發展的關鍵在原料的取得。(車用柴油全面添加 2%生質柴油, ; 經濟部能源局, 2010a; 經濟部能源局, 2010b; 謝志強, 2008)

2.3 轉酯化反應

轉酯化反應是目前眾多解決植物油黏度過高的方法中，最常用也最普遍的方法。植物油的轉酯化反應在 1853 年由科學家 E. Duffy 和 J. Patrick 發展出來，比 Dr. Diesel 發明柴油引擎還早。轉酯化反應是一個三階段的連續可逆反應組成，如圖 2-3 所示。圖中 R1、R2、R3 表示碳數相同或不同的烷基。轉酯化反應將三酸甘油酯(Triglyceride)依序變成二酸甘油酯 (Diglyceride)、單酸甘油酯(Monoglyceride)、甘油 (glycerol)，每個反應階段都消耗一份醇類，釋放出一份脂肪酸酯。若用甲醇反應每階段就消耗一份甲醇，釋放出一份脂肪酸甲酯。總反應式如圖 2-4 所示，從中得知：醇類的莫耳數是油脂莫耳數的 3 倍，為了使這一系列三個可逆反應往產物的方向進行，在實際操作上會加入過量的醇類。常使用的醇類是低碳數醇，例如：甲醇、乙醇、1-丁醇等。經轉酯化反應後得到的生質柴油，需要把參與反應的低碳數醇去除乾淨，不然會大幅降低閃火點 (flash point)，嚴重影響生質柴油的性能表現。使用不同的觸媒會造成不同的反應物質，引起不同的反應途徑，進而導致不同的反應速率。依據使用觸媒的種類，有幾種反應方式：鹼觸媒法、酸觸媒法、酵素法、金屬觸媒法、離子交換樹脂法；另外也有不使用觸媒的超臨界流體方法。本文僅介紹鹼觸媒、酸觸媒、酵素觸媒和超臨界流體這幾種方法。

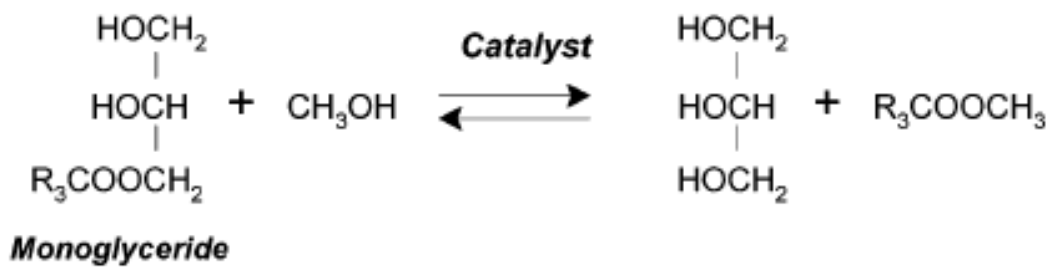
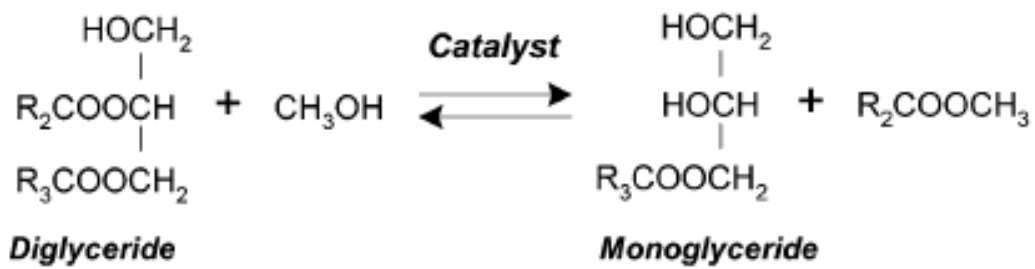
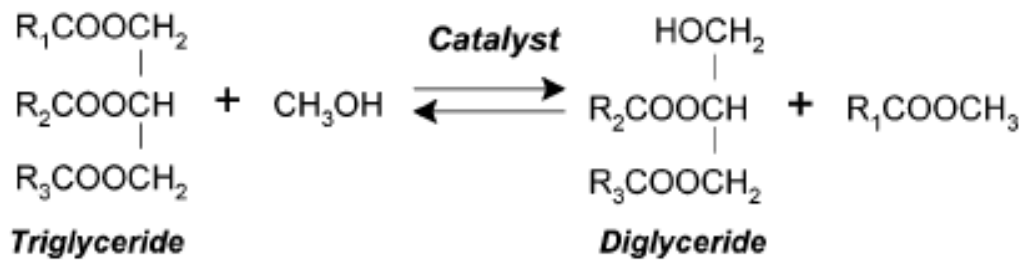


圖 2-3 轉酯化反應的反應機構圖 (Lotero et al., 2005)

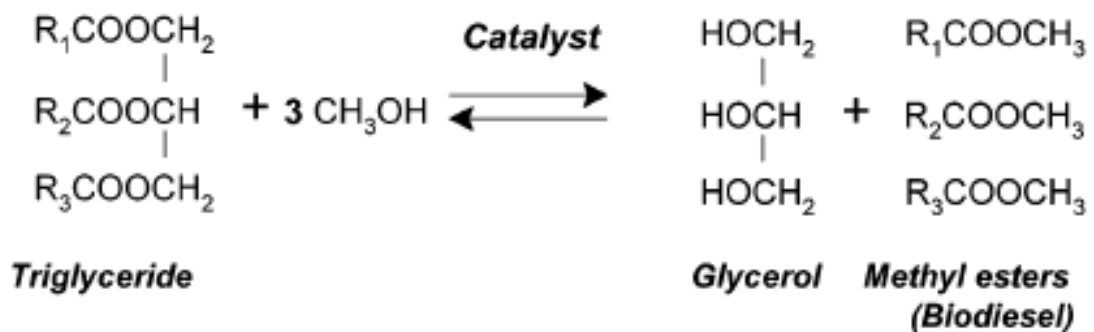


圖 2-4 轉酯化反應的總反應式 (Lotero et al., 2005)

2.3.1 鹼觸媒催化反應

鹼觸媒的最大的優點是觸媒成本低廉、反應速度快，在短時間內（約一小時）可得到高轉化率；反應結束後產物（生質柴油）和副產物（甘油）之間會出現明顯的分層現象，此有助於產物的分離。用強鹼當催化劑是目前工業上生產生質柴油最主要的方法。有學者發現：使用相同量的觸媒，鹼觸媒催化轉酯化反應的速度是酸觸媒的 4000 倍(Fukuda et al., 2001)。Freedman 在 1984 年使用氫氧化鈉當催化劑，在甲醇/植物油的莫耳比為 6:1，反應溫度 60 °C 的條件下，反應 1 小時後得到脂肪酸甲酯 98 % 的高轉化率(Freedman et al., 1984)。鹼觸媒轉酯化反應機構如圖 2- 7 所示，鹼觸媒先移除醇類分子中的一個質子 (proton)，當做一個強的親核試劑，引發三酸甘油酯變成二酸甘油酯，並釋出一份脂肪酸酯的連續反應。

此方法最大的缺點是反應油脂的品質要很高，幾乎不可含有水及游離脂肪酸，否則將導致皂化反應的發生，產生脂肪酸鹽，反應式如圖 2- 5 所示。油脂中的水會跟三酸甘油酯進行水解反應，產生游離脂肪酸，反應式如圖 2- 6 所示；游離脂肪酸遇到強鹼會進行皂化反應，生成脂肪酸鹽和水，生成的水又會和三酸甘油酯反應生成游離脂肪酸。在此循環下會使脂肪酸鹽的產量隨時間增加。脂肪酸鹽是介面活性劑的一種，當產物中含有這些物質，不僅會提高分離純化的難

度，更會顯著地降低生質柴油的產率。油品中游離脂肪酸含量不可超過 0.5 wt%，含水量需要低於 0.06 wt% (Ma and Hanna, 1999)；若脂肪酸含量超過此數值，油脂就要先經過前處理，降低游離脂肪酸的含量以及去除水分才可以使用。

在反應開始前先把鹼觸媒溶解在醇類裡，使整個轉酯化反應成為均一相 (homogeneous)。有很多學者認為：醇油比是影響生質柴產率的主要因素(Dennis Y.C. Leung, 2010)。反應醇和三酸甘油脂的莫耳數比以 6：1 最為常見，偏高的醇油比雖然會增加反應速率，不過也會增加反應結束後從甘油層分離出來的難度，亦會增加反應成本；偏低的醇油比需要更長的反應時間才能完成反應(Pandey, 2008)。若油脂中含有較多游離脂肪酸，例如廢食用油，則醇油比需要到 15：1 甚至更高的比例才可完成反應。較高的反應溫度可以增加反應速率減少反應時間；若超過適當的範圍則會降低生質柴油的產率。反應溫度的設定要接近醇類的沸點但不可超過，以確定在反應過程中醇類不會因為反應溫度超過本身沸點而逸散出去(Dennis Y.C. Leung, 2010)。

反應結束後靜置一段時間，整個系統會出現明顯的分層現象，上層相是生質柴油，下層相是甘油。生質柴油的純化過程包括：酸鹼中和、醇類的去除和水洗。酸鹼中和的目的是為了去除殘留的鹼觸媒，接著可用減壓蒸餾的方法式去除醇類，再以溫的軟水清洗，直到水洗

廢液呈現透明無色為止；最後再除去生質柴油中的水分。甘油的純化過程包含：殘留鹼觸媒的酸鹼中和、去除醇類和水這些步驟(Dennis Y.C. Leung, 2010; Fukuda et al., 2001)。

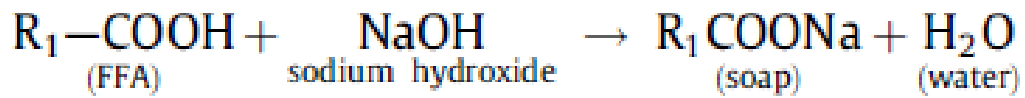


圖 2-5 游離脂肪酸和鹼行皂化反應的反應式

(Dennis Y.C. Leung, 2010)

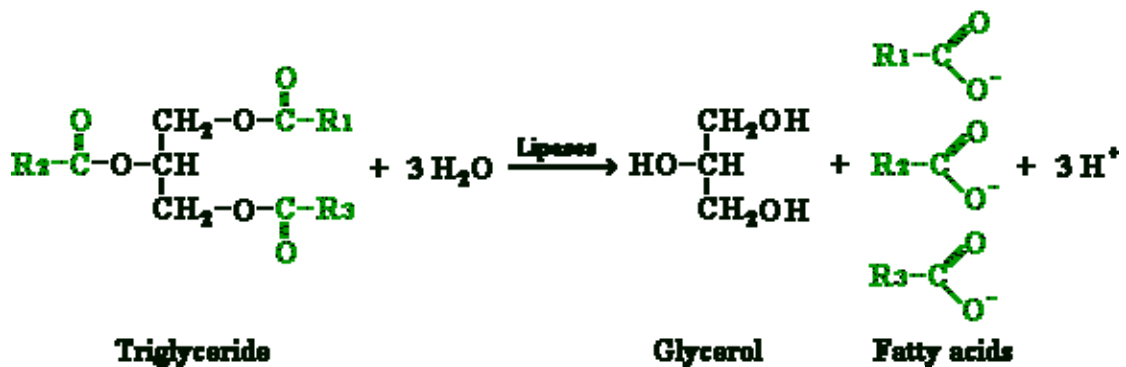
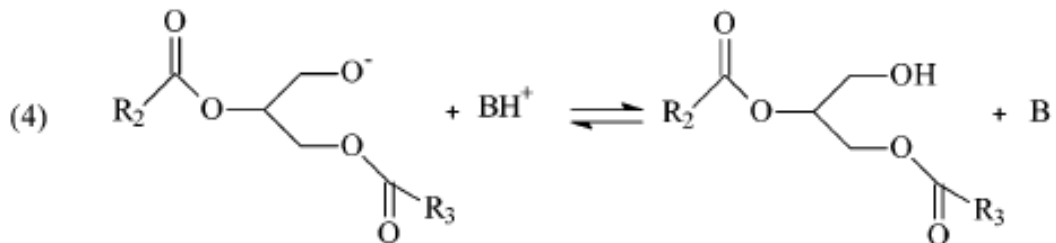
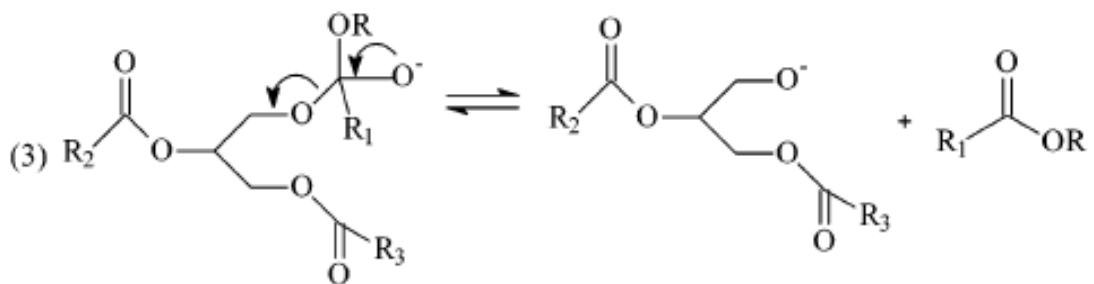
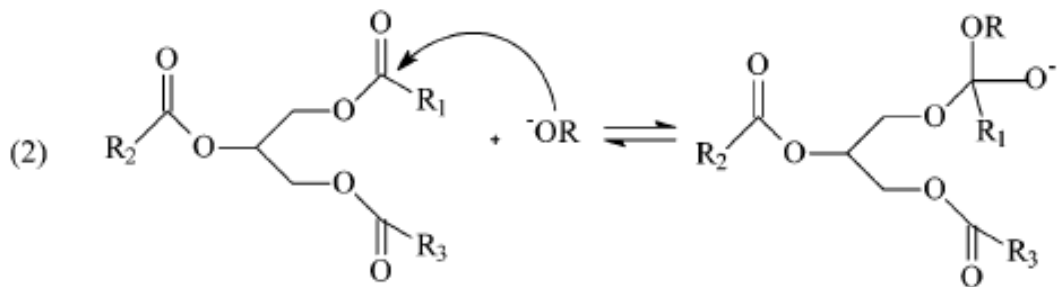


圖 2-6 三酸甘油酯和水進行水解反應的反應式

(Natuurlijkerwijs.com)



B: base catalyst
 $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$: carbon chain of the fatty acids
 R: alkyl group of the alcohol

圖 2-7 鹼觸媒催化轉酯化反應的反應機構

(Lotero et al., 2005)

2.3.2 酸觸媒催化反應

對於游離脂肪酸含量較高的油脂，可以利用酸(如：硫酸、鹽酸、硝酸、三氟化硼、磷酸)來催化進行轉酯化反應(Pandey, 2008)。酸觸媒有幾個優點：一、油脂中含有游離脂肪酸時，酸觸媒的活性不會受到影響。二、可以同時進行把三酸甘油酯和游離脂肪酸轉變成生質柴油。三、不會因為游離脂肪酸的酸鹼中和而降低觸媒含量(Goff et al., 2004)。酸觸媒的轉酯化反應機構如圖 2-9 所示，酸觸媒提供一個質子給羰基(carbonyl group)，使羰基質子化形成一個親電子物質(electrophilic species)，讓它對親核性物質比較敏感。在轉酯化反應中，此親電子物質會跟醇類進行三個連續不斷的反應，把三酸甘油酯逐步轉變成二酸甘油酯、單酸甘油酯，最後轉變成甘油，並且在每一步轉換過程中皆釋出一個脂肪酸酯(Lotero et al., 2005)。Goff *et al.* 以硫酸當催化劑將大豆油轉化成生質柴油，在甲醇和大豆油的莫耳比為 9 : 1，硫酸用量為大豆油和甲醇總重量的 1 wt%，於 120 °C 下反應 19 小時得到脂肪酸甲酯的轉化率是 99 %。此反應過程需要在密閉的反應器中進行，防止甲醇大量散溢出去(Goff et al., 2004)。

Haas *et al.* 以硫酸當催化劑，跟游離脂肪酸含量 59.3 wt% 的大豆油，油脂/甲醇/硫酸莫耳比為 1 : 15 : 1.5，在 65 °C 下反應 26 小時得到脂肪酸甲酯轉化率 85 %；當游離脂肪酸含量 96.2 wt% 以油脂/甲醇/

硫酸莫耳比 1 : 1.8 : 0.17，在 65 °C 下反應 14 小時可得到脂肪酸甲酯轉化率 89 % (Haas et al., 2003)。由此可發現脂肪酸含量較高的油脂，到達相同轉化率的時間會比較短。Goff *et al.* 在實驗中也發現：游離脂肪酸轉換成脂肪酸酯的速度比較快(Goff et al., 2004)。

酸觸媒的缺點是反應時間比較長且反應條件比鹼觸媒還苛刻；另外酸觸媒會腐蝕金屬管線，這些因素都會使生產成本增加，讓酸觸媒很少被應用在商業上生產生質柴油。酸觸媒雖然可以忍受富含高脂肪酸量的原料油將其轉換成生質柴油，但是在把游離脂肪酸經酯化反應產生脂肪酸酯的過程中會釋放出水。水不僅會降低觸媒和反應物的混合性，還會鍵結在觸媒的活性點上降低觸媒效用。酯化反應是可逆反應，其反應式如圖 2- 8 所示，水的存在會造成逆反應的發生，把產物生質柴油經過水解反應產生脂肪酸和醇類，降低產物的轉化率 (Loterio et al., 2005)。Canakci 和 Van Gerpen 研究發現水份的含量要低於 0.5 wt% 才能達到 90 % 的產率，水份高達 5 wt% 時反應會被抑制 (Canakci and Van Gerpen, 1999)。因此要使用低品質的原料油之前要先經過前處理把水份去除，才能讓酸觸媒發揮最大功用。

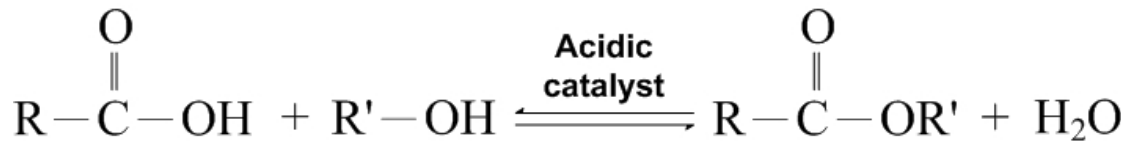
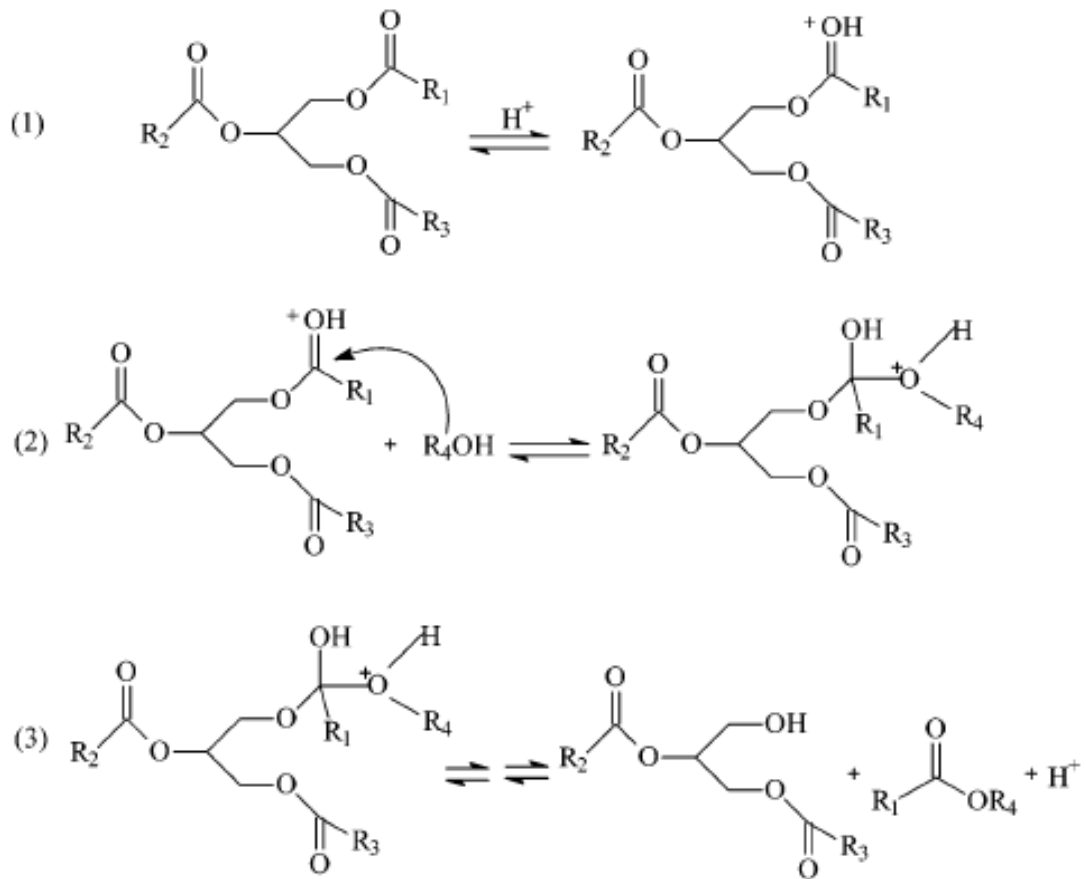


圖 2-8 酯化反應的反應式



R₁, R₂, R₃: carbon chain of the fatty acids
 R₄: alkyl group of the alcohol

圖 2-9 酸觸媒催化轉酯化反應的反應機構 (Lotero et al., 2005)

2.3.3 酸鹼觸媒兩步驟反應

鹼觸媒無法將富含游離脂肪酸的低階油脂轉化成生質柴油，酸觸媒要使用較多的醇類和反應時間才能獲得預期產物，兩方法對低階油脂的表現都不讓人滿意。除去低階油脂中的 FFA 可藉由油脂精製的製程，不過會提高不少生產成本。

因此有人提出兩步驟方法，先用酸觸媒反應之後再用鹼觸媒催化反應。在第一個反應步驟中，利用酸觸媒可以把游離脂肪酸轉換成生質柴油的特性，將低階原料油中的游離脂肪酸含量降低到鹼觸媒可以有較佳轉酯化反應的程度，再利用鹼觸媒反應快且效率高的特性，把油脂中未反應的油脂轉變成生質柴油。Canakci and Van Gerpen 在第一階段的反應中將含有 20 % FFA 的油脂，以硫酸當觸媒且硫酸用量是 FFA 的 15 %，甲醇/FFA 莫耳比為 9 : 1 在 60 °C 下反應 1 小時，把油脂的酸價從 41 mg KOH/g 降到 0.67 mg KOH/g ；但若反應油脂中含有 40 % 的 FFA，使用相同量的硫酸和甲醇，在 60 °C 下反應 1 小時，只能把油脂的酸價從 91 mg KOH/g 降到 8 mg KOH/g，無法降到較適合鹼觸媒進行酯化反應的酸價 2 mg KOH/g (Canakci and Van Gerpen, 1999)。這顯示對含 FFA 較高的油脂，使用這方法來降低 FFA 含量，有應用上的限制。因此 Canakci and Van Gerpen 仿照 Hammond 的方法多做幾次酸觸媒催化反應。實驗結果發現在第二次反應只需使用比

第一次反應更少的甲醇，即可把油脂酸價降到目標值 2 mg KOH/g 以下(Canakci and Van Gerpen, 2001)。Ghadge and Raheman 在第一步反應中用硫酸當觸媒，把含 19 % FFA 的麻花油 (mauha oil)以甲醇/油脂比 0.3 - 0.35 v/v，在 60 °C 下反應 1 小時；於第二步反應中用氫氧化鉀當觸媒，最後得到 98 % 轉化率的生質柴油(Ghadge and Raheman, 2005)。此方法具有工業應用的價值，不過跟鹼觸媒反應和酸觸媒反應一樣，依舊有產物分離純化的需求。

2.3.4 超臨界流體反應

一般轉酯化反應製造生質柴油過程中都會加入催化劑以提高反應速率，但是存有兩個問題：一是反應時間較長，二是產物的分離與純化。前者是因為醇油混合時自然產生 Two-phase 現象，增加物質傳導的阻力讓反應速率降低，後者則是要移除催化劑和副反應（皂化反應）的產物。日本學者 Kusdiana *et al.* 提出不使用催化劑，將油脂在超臨界甲醇中進行反應的方法，藉由甲醇在超臨界狀態下電介質常數 (dielectric constant) 會降低，增加油脂在甲醇的溶解度，使醇油系統變成單一相，解決 Two-phase 的問題增快反應速度。他們使用醇油比為 42 : 1，反應壓力 45 - 65 MPa，反應溫度為 350 °C 的條件下，於 4 分鐘後得到的生質柴油和鹼觸媒反應相類似，但產率更高且反應時間更短；此外因為沒有使用任何觸媒，讓產物的分離純化變的簡單 (Kusdiana and Saka, 2001)。

Kusdiana *et al.* 也研究用兩步驟酯化的方法去製造生質柴油，也就是先把油脂經水解反應變成 FFA，再經酯化反應得到生質柴油。在第一階段反應過程中於水的次臨界條件 (270 °C，10 MPa) 下，反應 20 分鐘即可把油脂完全水解成 FFA；在第二步反應中以相同的反應溫度和壓力，用超臨界甲醇反應 20 分鐘就可把 FFA 完全轉化成生質柴油。在酯化反應試驗中發現：使用不到甲醇/FFA 莫耳比 10/1 的條

件就可以完成反應。這有利於降低甲醇的使用量和反應過程的能量耗損。此兩階段做生質柴油所需要的時間雖比轉酯化反應（反應溫度是 350 °C，反應壓力是 45 - 65 MPa）所需的時間更長，但只需使用少量的甲醇跟更溫和的條件即可達成反應。此外在相同的反應條件（270 °C 和 10 MPa）下，轉酯化反應的產率只能達到 70 % (Kusdiana and Saka, 2004)。

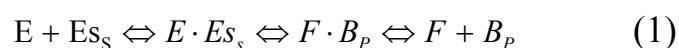
使用超臨界流體製造生質柴油具有容易將產物分離純化、反應時間短和不受油脂含水量干擾反應的優勢，適合用來轉化低階原料油脂成生質柴油。不過嚴苛的反應條件是造成生產成本高昂的主因；此外也因為超高溫超高壓的反應條件，讓生產設備容易出現金屬疲勞等問題。綜觀這些原因，超臨界流體生產生質柴油的方法鮮少商業化運轉。

2.3.5 酵素催化反應

為了降低前面四種方法所造成的環境衝擊和高能源耗損等問題，有學者使用酵素當催化劑來製造生質柴油。用酵素催化轉酯化反應具有反應條件溫和、可以重複使用、產物組成單純、副產物甘油的品質高、可同時進行油脂的轉酯化反應和游離脂肪酸的酯化反應，並且反應不受游離脂肪酸含量高低的影響。這樣的反應方法具有環境友好的特性，不過此反應具有酵素的價格高昂、反應時間比鹼觸媒催化反應時間長、酵素的活性會受到短鏈醇類的毒害而失活、酵素保存不當容易喪失活性等缺點(Fjerbaek et al., 2009; Pandey, 2008)。酵素 *Candida Antarctica LipaseB* (Novozym 435)在甲醇/植物油比超過 1.5/1 容易導致酵素失活，因此 Shimada 等人嘗試用分批加入甲醇的方式，在 4% 的酵素量（反應物重）於 30 °C 反應 72 小時，脂肪酸甲酯轉化率達到 98.4 %；用此方法酵素重複使用 50 次後，脂肪酸甲酯依然有超過 95 % 的轉化率(Shimada et al., 1999)。此外油脂中的磷脂 (phospholipid) 也會讓影響酵素反應，降低轉酯化反應產率。Novozym 435 酵素在含磷脂的大豆油中進行反應發現磷脂的含量越高，產物脂肪酸甲酯的產率就越低。此外轉酯化反應的副產物甘油，亦會影響脂肪媒的催化表現。甘油會在酵素上形成一個覆蓋層，甚至鍵結在酵素的活性點上降低酵素的活性。對此問題可以使用異丙醇來移除覆蓋在

酵素表面的甘油，進而恢復酵素活性(Du et al., 2003)。

酵素的轉酯化反應可由兩個反應步驟組成，第一個步驟是脂鍵的水解，釋放出單酸甘油酯或二酸甘油酯或甘油；第二步驟是將第一個反應步驟水解出的脂肪酸進行酯化反應(Fjerbaek et al., 2009; Kaieda et al., 1999)。整個反應過程如下列兩個反應式所示：



其中下標 s 和 p 分別表示受質 (substrate)和產物 (product)。E 表示酵素， Es_s 表示脂類受質 (ester substrate, 三酸甘油酯或二酸甘油酯或單酸甘油酯)，F 表示脂肪酸， B_p 表示二酸甘油酯或單酸甘油酯或甘油， A_s 表示參與反應的醇類 (例如甲醇、乙醇)， Es_p 表示脂肪酸酯 (生質柴油)。由反應中可看出：酵素的催化反應不會受到油脂中游离脂肪酸含量多寡來影響反應的效能；相對地脂肪酸含量越高，越有利於酵素反應生產生質柴油。

2.4 油脂水解反應

前面在介紹酸製程和超臨界流體製造生質柴油的方法中有提到，脂肪酸進行酯化反應的速度比油脂進行轉酯化反應的速度還快，可以利用這個特點來縮短轉酯化反應的時間。另外在酵素的轉酯化反應中也發現，酵素先打斷油脂中的脂鍵釋放出脂肪酸，再把脂肪酸進行酯化反應產生生質柴油。在這兩個反應中脂肪酸的水解反應速度較慢，是轉酯化反應的速率決定步驟。若能加快水解反應的速率，就可以縮短整體反應的時間。油脂的水解反應是三酸甘油脂和水的反應，在觸媒的催化下生成脂肪酸和甘油。傳統上使用 Colgate-Emery Process 在高溫高壓 (250 °C, 50 atm) 下把油脂水解成脂肪酸，缺點是需要耗費大量的能源，也會產生很多副產物。脂肪分解酶具有水解油脂釋放出脂肪酸的功能；不同的脂肪分解酶具有不同的水解速度，挑選適合酵素可在短時間內得到高純度的脂肪酸。脂肪分解酶兼具水解和酯化反應的能力，油脂的水解反應和酯化反應互為正逆反應；利用脂肪分解酶進行油脂水解的反應中必須加入大量的水，控制反應往產生脂肪酸的方向進行。

2.5 酯化反應

酯化反應是有機酸和醇類作用，產生酯類和水的反應。傳統上進行酯化反應的過程中會加入酸當催化劑加速反應的進行。目前有眾多文獻利用酸性觸媒將脂肪酸和醇類反應產生生質柴油。此外也可以利用脂肪分解酶當催化劑，把脂肪酸經過酯化反應生成生質柴油。酸性觸媒在酯化反應後有殘留在產物中的困擾，若沒有把觸媒清除乾淨而留在生質柴油中，在使用時會有腐蝕汽車引擎零件的問題。

本研究以脂肪分解酶水解油脂，並再使用脂肪分解酶進行酯化反應，找出較佳的反應條件，並跟幾種傳統的生質柴油製造方法比較，探討完全使用酵素方法的優缺點，並改善酵素轉酯化過程中反應時間過長、酵素容易被甲醇毒化導致減少使用次數的問題。

2.6 脂肪分解酶 Lipase

酵素 (enzyme)是具有催化反應功能的蛋白質，在生物體內協助各種化學反應的發生，並且維持生物體的生命表徵。酵素不僅可改變化學反應的反應途徑，使化學反應能在生物體的體溫下進行，酵素的反應速率是傳統化學反應的上千倍以上，因此可以提升反應效率，使反應可以在體內迅速完成。沒有酵素在的協助，生物體就無法存活。酵素具有對受質 (substrate)專一的特性，可以催化特定的反應物和產生特定的產物。酵素擁有特定的三維空間構造，此結構一旦被破壞後酵素即失去活性，變成普通的蛋白質或胺基酸聚合物。藉由生物科技和回收純化技術的大力進展，酵素才能大量生產並用來製造藥物和應用在工業上，有些還被製成商品改善人們的日常生活。

脂肪分解酶(lipases or triacylglycerol acylhydrolases, E.C. 3.1.1.3)是普遍存生物體中，在動植物、微生物(細菌、真菌和酵母菌)在中皆可發現。脂肪分解酵素在脂肪分解的過程中是不可缺少的；他們可以協助新陳代謝的進行，在油脂的儲存和轉換脂肪當作能量來源的過程中扮演相當重要的地位(Abu Bakar Salleh, 2006)。在眾多脂肪分解酶的來源中，相較於源自動植物的脂肪分解酶，來自微生物的脂肪分解酶因為具有較佳的熱安定性，受到較多重視也比較具有工業上利用的潛力(Dong-Woo Lee and Hak-Jong Choi, 1999)。

脂肪分解酶是水溶性的酵素，喜歡存在油-水的介面且酵素活性在油水的介面處有明顯的上升(kuo, 2002)。界面活化作用 (interfacial activation)是脂肪酵素的重要特徵之一，其是指當酵素在界面接觸到不溶於水的脂質當作受質，酵素的催化活性會大幅提高的現象(王惠民, 2003)。脂肪分解酶可進行水解反應，把三酸甘油酯水解成脂肪酸 (fatty acid)、單酸甘油酯 (monoglycerides)、二酸甘油酯(diglycerides)和甘油；也可以進行逆反應—酯化反應 (esterification)，把酸和醇合成酯；此外還可進行轉酯化反應 (transesterification)、交酯化反應 (interesterification)和酸解反應 (acidolysis)，其相關反應式如表 2- 8 所示。酯化反應是水解反應的逆反應，水量的多寡可以控制反應的平衡和反應進行的方向。

酵素活性點 (activity site)被一個活動式的蓋子 (lid or loop)覆蓋，蓋子的開關是控制酵素界面活性 (interfacial activation)的重要原因。當脂肪分解酶接觸到油-水系統的介面時，疏水性的蓋子會折疊回來露出酵素活性點，讓酵素具有活性；反之沒有受質存在時，蓋子就會關起來而脂肪酶就不會具有活性。活性點由 serine (Ser), aspartate (Asp)或 glutamate (Glu), histidine (His)三個胺基酸組成，其反應途徑如圖 2- 10 所示(Abu Bakar Salleh, 2006)。

一般來說，酵素可依對受質的專一性分成三類：位置專一性

(positional specificity)，脂肪酸專一性 (fatty acid specificity) 和部分甘油酯專一性 (partial glycerides specificity)。酵素的位置專一性有 1,3-positional specificity 和 non-specificity 兩種；前者是指酵素只能水解位在三酸甘油酯中最外圍，也就是第一和第三個脂肪酸，留下第二個脂肪酸。Non-specificity 是指酵素可以水解三酸甘油酯中任何一個脂肪酸成為游離脂肪酸。1,3-positional specificity 脂肪水解酶因為可以留下第二個脂肪酸在三酸甘油酯中，製造結構不同且性質獨特的產物，因此具有最大的工業應用潛力(Gazzillo, 1991)。可以應用在藥物、醫療、化妝品和皮革工業上。

脂肪酶可用來生產食品添加劑、廢水的處理、精密化學品 (fine chemicals) 的合成、皮革的處理、清潔劑、製造藥物和化妝品等用途，僅選擇幾個項目略述如下：

清潔劑 (Detergents)

脂肪酶最主要的商業應用範圍是在清潔工業，約佔總量的 32%。

Lipases 要作為清潔劑的添加物須符合下面 3 個條件：

1. 可以水解各種脂肪
2. 可以承受高 pH 值 (pH 10 - 11) 和較高溫度 (30 - 60 °C) 的洗滌環境
3. 能忍受清潔劑所造成的傷害

在 1994 年 Novo Nordisk 公司推出第一款應用在清潔方面的商業化產品 Lipolase，其源自於真菌 *Thermomyces lanuginosus*，經過基因重組後用 *Aspergillus oryzae* 來表現並生產。

食品工業

酯類是調味料和香味的成份，因此酯類產品在食品工業中佔有重要地位。油脂的營養價值、口感和物理性質是由脂肪酸在甘油酯骨幹上的位置、脂肪酸的鏈長及不飽和程度（雙鍵多寡）決定。藉由脂肪分解酶的催化反應，可以把較低價值的油脂轉變成較高價值的可可油取代物。在乳品業和甜食工業上，脂肪分解酶可以水解牛奶製造具有特殊風味的起司；此外還可以拿來製造麵包和飲料中的特殊風味。

紙漿和造紙工業

脂肪分解酶和纖維酵素及木質酵素共同使用在造紙工業。在造紙的過程中，脂肪分解酶用來移除紙漿中的樹脂；和傳統製法相比，紙漿經過脂肪分解酶的處理後可讓品質大大提升。日本的 Nippon Paper Industries 公司使用從真菌 *Candida rugosa* 生產的酵素水解造紙過程中來自木材的三酸甘油酯，其分解率超過 90%。

其他方面

脂肪分解酶可用在皮革的處理上，其移除殘餘的油脂和毛髮效率比傳統化學法還好，也沒有傳統方法造成的環境問題。其可進行轉酯化反應，把油脂轉變成脂肪酸甲酯或脂肪酸乙酯，也就是俗稱的生質柴油 (biodiesel)，降低對石化能源的依賴。脂肪酶還可以拿來製造傳統化學法難以合成的酯類，也可以用在合成藥物、農藥、除草劑和化妝品，特別是具有光學異構的物質，例如消炎藥奈普生 (Naproxen)，其 S-對應體 (s-enantiomer) 的活性是 R-對應體 (R-enantoimer) 的 28 倍，酵素可以合成特定光學異構的藥物，大大降低分離純化的難度 (Arora, 2003)。近年來綠色化學 (Green chemicals) 具有對使用者安全、對環境友善、生物可迅速分解反應物及較低毒性，受到很大的矚目，應用酵素來幫助生產或處理物質的製程越來越多；脂肪分解酶的高度專一性和多功能用途，加上基因工程和生物科技飛快的進展，可預見在未來有更大的應用價值 (Abu Bakar Salleh, 2006)。

表 2-8 脂肪分解酶可進行的反應 (Abu Bakar Salleh, 2006)

<p>HYDROLYSIS</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{R}_2-\text{OH}$
<p>ESTER SYNTHESIS</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{R}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$
<p>TRANSESTERIFICATION</p> <p>Alcoholysis</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_3 + \text{R}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
<p>Interesterification</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_4$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_4 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2$
<p>Acidolysis</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	$\text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$

2.7.1 酵素 Novozym 435 的介紹

Novozym 435 是脂肪分解酶 *Candida Antarctica lipase B* (簡寫 CALB) 固定在丙烯酸樹脂 (acrylic resin) 上的商業酵素，其來源是酵母菌。*Candida Antarctica lipase B* 的分子量是 33 kD，等電點 (isoelectric point, pI) 是 6.0，位置專一性上屬於 1,3-positional specificity (Kirk and Christensen, 2002)；此酵素的活性點由 Ser105、His224 和 Asp187 三個胺基酸組成 (Rosa Margesin, 1999)。CALB 對反應基質展現高程度的立體選擇性 (regioselective) 和對掌異構選擇性 (enantioselectivity)，最大的應用範圍在外消旋醇 (racemic alcohol)、胺基酸的分辨，或製備具有光學活性的產物。CALB 具有很大的潛力來進行合成反應，產生較簡單結構的物質。高昂的價格是限制 Novozym 435 酵素應用發展的主因，因此主要被用來生產高價位的化學品；若價格可以降低，可以被使用來製造更多的商品，例如脂肪族的合成、生質柴油的生產等方面 (Kirk and Christensen, 2002)。

2.7.2 *Candida rugosa Lipase* 的介紹

Candida rugosa Lipase (CRL, EC 3.1.1.3)是一種脂肪分解酶，其來源自單細胞的酵母菌，目前發現有五種不同的型態，由 534 個胺基酸組成，分子量約為 60 kDa；基因解碼後發現彼此間有 80 % 相似，但酵素的等電點 (isoelectric point)皆不一樣，如表 2- 9 所示。*Candida rugosa Lipase* 的蛋白質二級結構由 14 個 β -sheet，16 個 α -helices 和 3 個 loop 組成，如圖 2- 12 所示。酵素的活性中心（活性點）由 3 個胺基酸組成，分別是 Ser-209、His-449、Glu-341。活性點皆有 flap 覆蓋在其上，以避免活性點暴露在溶劑中造成失活；flap 也是由蛋白質構成，本身結構和開啟關閉的行為是影響酵素活性的重要因素(Tsung Min Kuo, 2002)。也因為其來自酵母菌，為了在環境中生存下來所以演化出可以利用最多種類的受質；因此到有學者認為到目前為止，在所有脂肪分解酶中，*Candida rugosa Lipase* 是可以使用最多種受質的脂肪分解酶。*Candida rugosa Lipase* 在分類上屬於 non-specificity，表示三酸甘油脂上任一個脂肪酸都可以被水解脫離甘油的骨幹。另外在酯化反應中，有學者發現：*Candida rugosa Lipase* 偏好短鏈的脂肪酸。

Candida rugosa Lipase 可應用在食品業製造或改良乳製品風味，以及做出新口味的香料；在化妝品工業上可來合成新味道的香水；在醫學上可用來作為生物感測器，協助精確診斷心血管疾病。另外利用

其不錯的水解油脂能力，*Candida rugosa Lipase* 可用作生物降解試劑和生物清潔劑。*Candida rugosa Lipase* 一個很重要的用途是用在製藥上，可用來合成傳統上難以分離、具有光學異構的藥物，像是非類固醇且具有光學異構的消炎藥奈普生 (Naproxen)，更被看好可用來生產下一世代的藥物(Benjamin and Pandey, 1998)。*Candida rugosa Lipase* 常跟其他酵素共同作用，以遠超過傳統方法的效率完成許多工作，例如在造紙業，跟纖維酵素和木質酵素合作，完成去除木頭上油脂類和纖維素的等物質，讓往後的製程更加順利並顯著提升紙張的品質。

表 2-9 五種不同 *Candida rugosa Lipase* 基本性質
(Benjamin and Pandey, 1998)

Gene	Amino acid mature protein	MW (kDa)	pI
<i>LIP1</i>	534	57.223	4.5
<i>LIP2</i>	434	57.744	4.9
<i>LIP3</i>	534	57.291	5.1
<i>LIP4</i>	534	57.051	5.7
<i>LIP5</i>	534	56.957	5.5

Candida rugosa Lipase 在油水界面的反應過程如圖 2-11 表示：

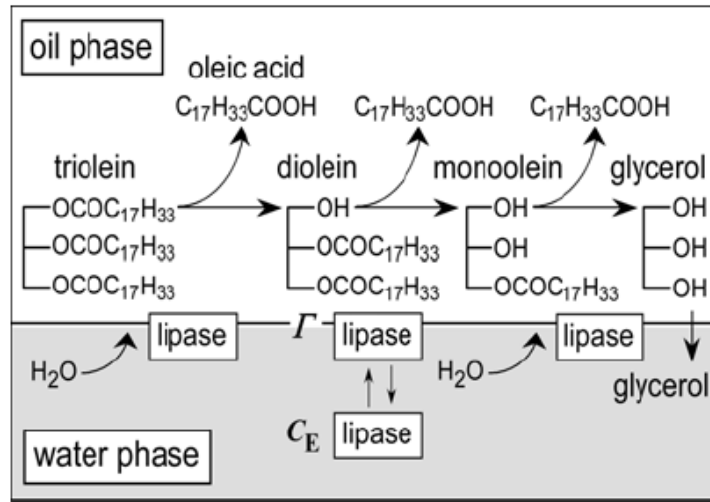
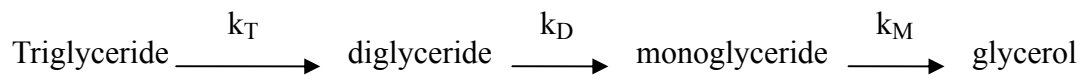


圖 2-11 *Candida rugosa* 酵素在油水界面水解三酸甘油脂的示意圖
(Heri Hermansyah, 2007)

酵素進行水解反應的反應式如下所示：



k_T 、 k_D 、 k_M 分別是三酸甘油脂、二酸甘油脂、單酸甘油脂的反應速率常數。文獻中查到的數值不盡相同但皆顯示 $k_T < k_D < k_M$ ，表示酵素要打斷三酸甘油脂中的脂鍵釋放出脂肪酸，打斷在三酸甘油脂中的難度最高，其次是二酸甘油脂；從單酸甘油脂中水解並釋放脂肪酸的難度最低(Francisco J. Plou, 1996; Heri Hermansyah, 2007)。

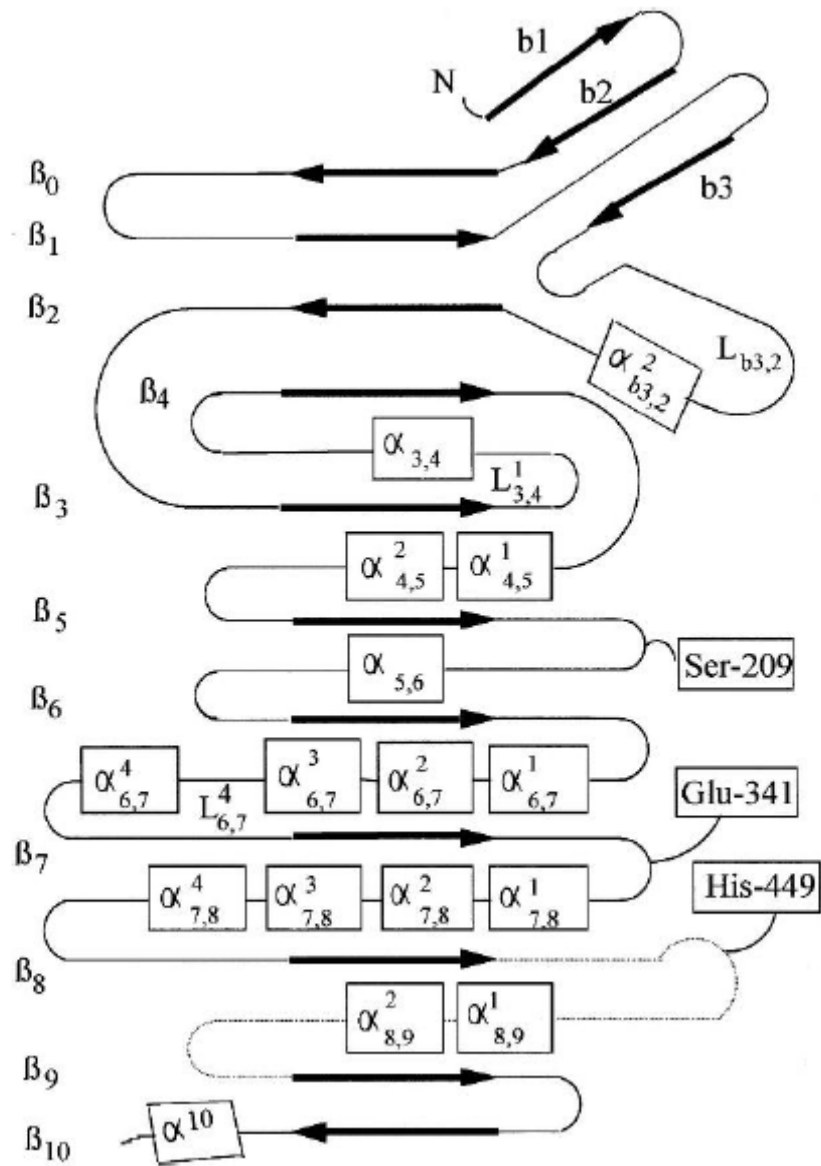


圖 2-12 *Candida rugosa* 酵素的蛋白質二級結構

(Tsung Min Kuo, 2002)

第三章 實驗方法及分析

3.1 實驗藥品

藥品名稱	廠商	藥品等級
統一大豆沙拉油	統一企業	
<i>Candida rugosa Lipase</i> TypeVII 1175 U/mg	Sigma	> 98.0 %
Novozym 435 酵素	Sigma	
Ethanol 95 %	景明化工	95.0 %
Ethanol 99.9 %	景明化工	HPLC 級
Methanol ≥ 95 %	景明化工	ACS grade
Diethyl ether	景明化工	ACS grade
Citric acid	Sigma	Reagent grade
Disodium hydrogen phophate	CANTO	99.0 %
Sodium dihydrogen phosphate	SHOWA	99.0 %
Potassium dihydrogenphosphate	SHOWA	99.0 %
Dipotassium hydrogenphosphate	SHOWA	99.0 %
n-hexane	景明化工	99.0 %
Acetone	景明化工	95.0 %
Acetonitrile	Mallinckrodt	HPLC 級
Potassium hydroxide	MERCK	GR 級
p-Nitrophenyl palmitate	Sigma	> 98.0 %
Potassium hydrogen phthalate	J.T.Baker	ACS grade
Sodium carbonate	Sigma	99.0 %
Albumin Bovin (BSA)	Sigma	electrophoresis
Phenol phthalein	Riedel-deHaen	ACS grade
Hydrogen chloride	MERCK	30 % ~ 37 %

3.2 實驗儀器

儀器名稱	製造廠商	型號
pH meter (酸鹼度計)	Suntex (Taiwan)	SP-701
一般冰箱 (4 °C)	東元	RE7222
大冰箱 (4 °C)	均泰	1000L
-20 °C 冰箱	Fisher & Paykel	Stadard H160
Micro-pipette (微量移液吸取器)	ependorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/100
Drying Oven (烘箱)	DENGYNG (Taiwan)	DOV30
UV/visible Spectrophotometer (紫外/可見光光譜儀)	SHIMADZU (Kyoto, Japan)	UVmini-1240
Ultrapure water system (超純水機)	Barnstead (Dubuque, USA)	NANO pure Dlamond™
Vortex-Genie2 (試管震盪機)	Scientific Industries (New York, USA)	G560
Centrifuge (高速離心機)	Labnet	Spectrafuge 16 M Microcentrifuge
Centrifuge (高速離心機)	ependorf	Centrifuge 5804R
Stirring (電磁攪拌器)	Fargo	MS-90
Stirring (電磁攪拌器)	CORNING	420 D
Hotplate Stirring (電磁攪拌加熱器)	Labtech (Beijing, China)	LMS-1003
Ultrasonic cleaner (超音波震盪器)	DELTA	DC 150H
電子天秤	METTLER TOLEDO	AB54-S
電子天秤	Sartorius	BT 423S
高溫爐	NEY (U.S.A)	3-130
Thermostate Bath (恆溫水浴槽)	YIH DER	BL-720
Gas chromatography (氣相層析儀)	Thermo	Focus GC

3.3 實驗方法

3.3.1 緩衝溶液的配製

3.3.1.1 0.1 M 磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉緩衝溶液 (sodium phosphate buffer)

先配製 0.2 M 磷酸氫二鈉水溶液和 0.2 M 磷酸二氫鈉水溶液，再依表 3-1 配成所需 pH 值的緩衝溶液。

表 3-1 不同 pH 值磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉緩衝溶液配法

pH	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (ml)	pH	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (ml)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	59.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

3.3.1.2 0.1 M 磷酸根緩衝溶液 (potassium phosphate buffer)

先配製 1 M 磷酸氫二鉀水溶液和 1 M 磷酸二氫鉀水溶液，再依照表 3-2 配成所需 pH 值的磷酸根緩衝溶液。

表 3-2 不同 pH 值磷酸氫二鉀-磷酸二氫鉀緩衝溶液配法

pH 值	1 M K_2HPO_4 (ml)	1 M KH_2PO_4 (ml)
5.65	6.0	94.0
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

3.3.1.3 磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液

先配製 0.2 M 磷酸氫二鈉和 0.1 M 檸檬酸緩衝溶液，再依表 3-3

配成所需 pH 值的磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液

表 3-3 不同 pH 值磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液配法

pH 值	0.2 M 磷酸氫二鈉 (ml)	0.1 M 檸檬酸 (ml)	pH 值	0.2 M 磷酸氫二鈉 (ml)	0.1 M 檸檬酸 (ml)
2.2	0.4	10.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

3.3.1.4 PBS 緩衝液配法

在 800 毫升去離子水中溶解 8 克 NaCl，0.2 克 KCl，1.44 克 Na_2HPO_4 和 0.24 克 KH_2PO_4 ，用鹽酸調整 pH 值到 pH 7.4，再加水到 1 公升。接著再把配好的緩衝液放入滅菌爐，以 15 psi 的壓力滅菌 20 分鐘。

3.3.2 配製 *Candida rugosa* 酵素溶液

取要反應大豆油重量 0.1 % 的 *Candida rugosa* 酵素溶在 15 ml，0.1 M 磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉緩衝溶液，在 30 °C 下以轉速 260 rpm 攪拌 1 小時。

3.3.3 油脂水解反應

在取 15 ml 大豆油，再加入事先配製好的 *Candida rugosa* 酵素溶液，在 35 °C 下反應 12 小時。反應後以離心的方式（8000 rpm，15 分鐘，25 °C）取得上層相。

3.3.4 脂肪酸酯化反應

取水解後的脂肪酸 12.97 克，再利用測得脂肪酸的酸價和脂肪酸轉化率計算所要反應的甲醇 6.78 克；倒入甲醇並攪拌使油脂層溶解在甲醇中。加入 Novozym 435 酵素 0.39 克，在 30 °C 下反應 16 小時。

3.3.5 酸價測定

藉由測定油品中的酸價 (Acid Value, 簡稱 AV)，可以得知游離脂肪酸的含量，酸價也是判斷生質柴油品質的一個指標；另外也可以藉由反應前後油品酸價的變化，計算油脂的水解轉化率和游離脂肪酸的酯化反應轉化率。酸價的定義是：中和 1 克油脂中所含游離脂肪酸所

需要的氫氧化鉀(KOH)毫克數(ASTM, ; Mahajan et al., 2006)。使用的藥品配製實驗方法如下所述：

0.1 M 氫氧化鉀乙醇溶液：取 1.203 克的 KOH 並加入 214.438 毫升 95 %乙醇，在室溫下攪拌至 KOH 完全溶解。

1 % 酚酞酒精溶液：取 1 克酚酞粉末，再加入 99 毫升 99.9 % 乙醇，在室溫下攪拌直到酚酞完全溶解。

1 : 1 v/v 乙醇-乙醚溶液：取等體積 95 %乙醇和乙醚混合，用來溶解油脂樣品。

3.3.6 標定 0.1 M KOH 乙醇溶液

把鄰苯甲酸氫鉀 (Potassium hydrogen phthalate, 簡寫 KHP) 放入高溫爐內，以 110 °C 加熱 45 分鐘。之後取 0.2 克 KHP 並加入 50 毫升去離子水，完全溶解後加入 0.2 毫升 1 %酚酞酒精溶液，再用 0.1 M 氫氧化鉀乙醇溶液去滴定。當溶液變成粉紅色並在劇烈搖晃下維持 30 秒，即到達滴定終點。

3.3.7 酸價分析方法

1. 取 1.000 克油脂樣品，溶於 20 ml 的乙醇-乙醚混合液 (1:1, v/v)。
2. 加入 0.2 ml 的酚酞酒精溶液。
3. 用 0.1 M KOH 乙醇進行酸鹼滴定直到出現粉紅色，並在劇烈搖晃

下維持 30 秒，即判定到達滴定終點。紀錄所使用 0.1 M KOH 乙醇溶液體積 (ml)。

4. 使用計算 (式 3-1) 來計算酸價

$$\text{Acid value} = \frac{(A - B) \times N_S \times 56.1}{W} \quad (\text{式 3-1})$$

其中：

A = 滴定樣品所需的 0.1 M KOH 乙醇溶液體積 (ml)

B = 空白滴定所需的 0.1 M KOH 乙醇溶液體積 (ml)

N_S = 標定 0.1M KOH 乙醇溶液的當量濃度 (normality)

W = 測定油脂樣品的重量 (g)

N_S 的計算依照式 3-2 計算

$$N_S = \frac{W_{KHP} \times 1000}{204 \times V} \quad (\text{式 3-2})$$

其中：

W_{KHP} = 標定 0.1 M KOH 乙醇溶液時秤取 KHP 的重量 (g)

V = 滴定 KHP 水溶液所耗費的 0.1 M KOH 乙醇溶液體積 (ml)

3.3.8 水解轉化率計算

以大豆油反應前後脂肪酸莫耳數的變化並依照式 3-3 計算

$$FA\ yield = \frac{\text{amount of FA produced in mole}}{\text{theoretical value in mole}} \times 100\% \quad (\text{式 3-3})$$

其中 theoretical value 的計算結果是 $\frac{1}{874.53} \times 3,874.53$ 是大豆油的分子量 (g mol^{-1})，其數值依表 3-4 計算出來。

表 3-4 大豆油中脂肪酸的組成成分表 (Andrea Salis, 2008)

Fatty Acid composition	Mw (g mol^{-1})	Unit (mol%)
Palmitic acid (C16:0)	256.42	10.4
Stearic acid (C18:0)	284.48	3.7
Oleic acid (C18:1)	282.46	28.1
Linoleic acid (C18:2)	280.45	52.8
Linolenic acid (C18:3)	278.43	5.1

3.3.9 脂肪酸轉化率計算

脂肪酸轉化率 (ester conversion) 是根據酯化反應前後酸價的變化計算而得，其計算過程如式 3-4 所示：

$$\text{Ester conversion} = \left(1 - \frac{AV}{AV_0}\right) \times 100\% \quad (\text{式 3-4})$$

其中：

AV = 酯化反應後油脂的酸價 (mg KOH/g)

AV₀ = 酯化反應前油脂的酸價 (mg KOH/g)

3.3.10 脂肪酶活性分析

以 0.5 % (w/v) 的 p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) 溶在 95 % 乙醇溶液中當作反應受質，用來測量脂肪酶酵素活性。脂肪分解酶會把 p-NPP 分解成 palmitic acid 和黃色的 p-nitrophenol (pNP)，pNP 在波長 410 nm 時有吸收值。測定步驟如下所示：

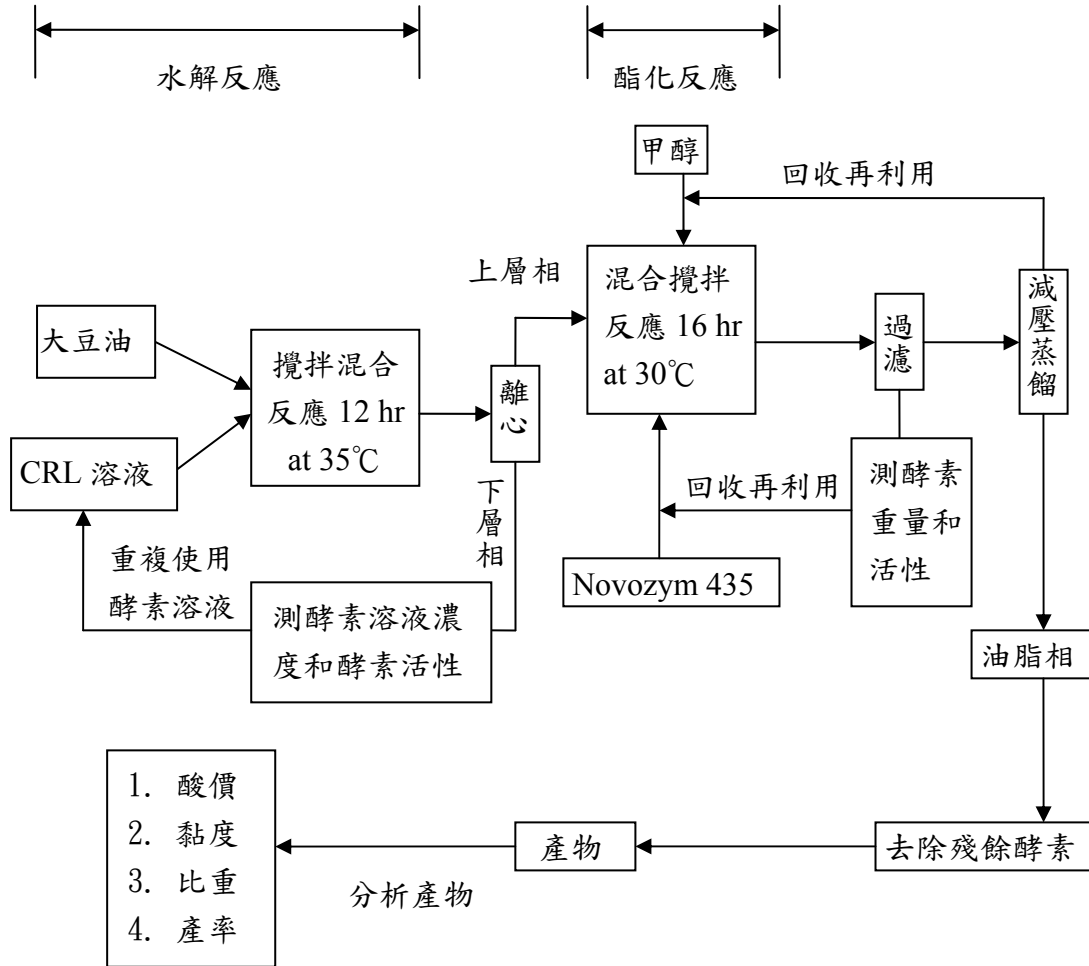
1. 取 1 ml 0.05 M 的 PBS buffer (pH 7.4) 和 0.1 ml、0.05 % 的 *Candida rugosa* 酵素溶液(或 200 mg 固定化酵素)，加入 1 ml p-NPP 酒精溶液，以磁石攪拌器 260 rpm 轉速在 30 °C 下反應 5 分鐘。
2. 加入 2 ml, 0.5 M 的碳酸鈉水溶液終止反應。
3. 以 12000 rpm 的轉速離心 5 分鐘。
4. 取 0.5 ml 上清液並以去離子水稀釋 10 倍後用分光光度計(UV-vis) 測在波長 410 nm 的吸收值。
5. 以 $A = \epsilon \times b \times c$ 的公式計算 p-NP 產量，其中 A 表示吸收值，b 表示光在比色槽的路徑長度 (1 cm)，c 表示 p-NP 濃度(M)， ϵ 是 15000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997)。酵素活性單位 U 的定義是在此實驗條件下，每分鐘可產生多少 $\mu mole$ 的 p-NP (Kaushal Rege, 2009)。

3.3.11 Bio-Rad 蛋白質分析

Bio-Rad 蛋白質分析是根據 Bradford 方法，具有簡單、靈敏度高、可以準確測得溶解蛋白質濃度的特性。蛋白質分析試劑含 Coomassie Brilliant Blue G-250 的酸性染色劑，主要和鹼性與芳香族胺基酸鍵結，染劑顏色會從茶褐色變成藍色，染劑的最大吸收波長會從 465 nm 平移至 595 nm，測 595 nm 的吸收質就可以定量蛋白質濃度。在測蛋白質濃度前可先用牛血清蛋白(bovine serum albumin,簡寫 BSA)製作標準濃度檢量線，再用內插法求得待測蛋白質的濃度。實驗步驟如下：

1. Bio-Rad 染劑和去離子水以 1 : 4 (v/v)的比例稀釋並攪拌
2. 用 Whateman 1 號濾紙過濾。此稀釋液在室溫下可放置二星期。
3. 以 5 ml 稀釋液加入 0.1 ml BSA 標準液，在室溫下至少反應 5 分鐘，用分光光度計測量 595 nm 的吸收值。用數個不同濃度的 BSA 標準液來製作標準濃度檢量線。
4. 用同樣方法測未知濃度的吸收值，經換算即可得到蛋白質濃度。

3.4 實驗流程



第四章 實驗結果

文獻指出使用 Novozym 435 酵素以一步驟轉酯化反應生產生質柴油具有在室溫下進行反應的優點，不過需要 43 小時來進行反應 (Shimada et al., 1999)。文獻指出 Novozym 435 酵素催化脂肪酸和甲醇進行酯化反應的速度，比 Novozym 435 酵素進行一步驟轉酯化反應的速度快 10 倍以上 (Watanabe et al., 2007)，本實驗嘗試採用酵素二階段法來生產生質柴油，期望酵素二階段反應的總反應時間可以比 Novozym 435 酵素一步驟轉酯化反應的時間短，讓使用新方法(酵素二步驟反應)來生產生質柴油比舊方法(酵素一步驟反應)更有效率。

實驗第一階段是利用酵素將大豆油進行水解得到脂肪酸，在這部份中會測試緩衝液 pH 值、溫度、時間、酵素使用量分別對 Novozym 435 酵素和 *Candida rugosa* 酵素進行水解反應的影響。實驗第二階段是使用 Novozym 435 酵素把第一階段得到的脂肪酸進行酯化反應得到生質柴油，而在這部份中會測試溫度、時間、甲醇/脂肪酸莫耳比、酵素使用量對 Novozym 435 酵素進行酯化反應的影響，期待能從這一系列的試驗中找出較佳的反應條件。

4.1 Novozym 435 的水解

4.1.1 緩衝液 pH 值對酵素 Novozym 435 水解反應的影響

酵素在不同 pH 值環境中有不同的活性表現，找出最適合酵素進行反應的 pH 值可以讓酵素發揮最大功能。緩衝液可以抵消外加的強酸或強鹼對溶液系統造成酸鹼值大幅度改變的衝擊，在水解反應中用緩衝液取代純水，除了可以讓酵素在能發揮最佳活性的環境中進行反應外，更可避免反應過程中整個系統 pH 值劇烈變化的不良影響，穩定溶液 pH 值，讓酵素能夠發揮最佳的水解效能。

圖 4-1 的反應條件為油/緩衝溶液/酵素量=10 g : 5 g : 1 g，反應時間為 16 小時，反應溫度是 40°C。藉由脂肪酸產率的高低來判斷酵素水解活性的好壞。圖 4-1 顯示脂肪酸產率在酸性環境下比較高，在 pH 8.0 的脂肪酸產率 (12.91%) 不到 pH 5.0 脂肪酸產率 (28.90%) 的一半；這表示 Novozym 435 的水解活性在酸性環境中比較好。在 pH 值低於 6.5 的幾個試驗中脂肪酸產率曲線出現變化不大的趨勢，這顯示酵素的水解活性在弱酸性環境中彼此差異不大 (不到 4.5%)。為了減少酸性過高的緩衝液於丟棄時對環境的衝擊，往後若選擇使用 Novozym 435 酵素進行水解反應時，會選擇 pH 5.0 作為水解反應的酸鹼值條件。

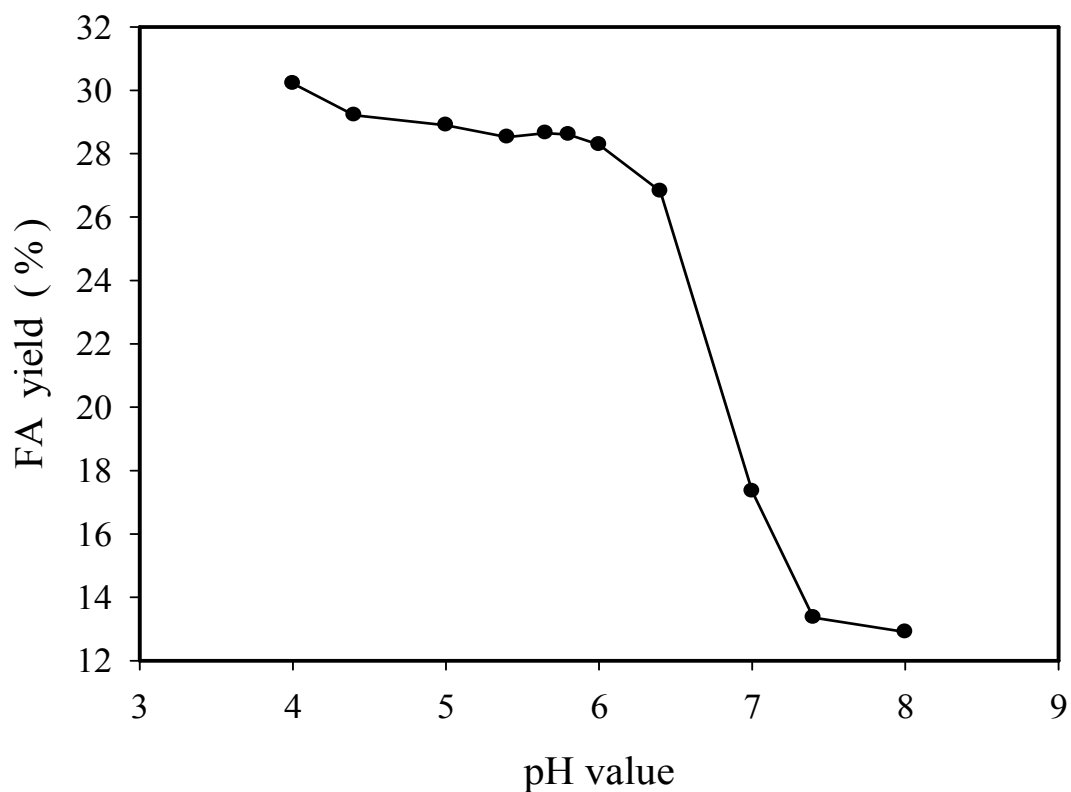


圖 4-1 pH 值對 Novozym 435 酵素水解效能的影響

反應條件：油/緩衝液/酵素=10 g : 5 g : 1 g，酵素為 Novozym 435，

反應溫度 40°C，反應時間 16 小時。

pH 4.0, 4.4, 5.0, 5.4 用 0.1M 磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝液(Na_2HPO_4 -citric acid buffer)。

pH 5.65, 5.8, 6.0, 6.4, 7.0, 7.4, 8.0 用濃度為 0.01 M 磷酸根緩衝溶液 (potassium phosphate buffer)。

4.1.2 反應時間對酵素 Novozym 435 進行水解反應的影響

找出酵素反應最適合時間是提升酵素反應效率的一個方法，也可以縮短總反應時間。圖 4-2 的反應條件是油/緩衝溶液/酵素量=10 g : 5 g : 1 g，緩衝液為 0.1M 的磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液 (pH 5.0)。從圖 4-2 看到當反應時間增長，脂肪酸產率跟著增加。以反應溫度 50°C 為例，當反應時間從 12 小時增加到 16 小時，脂肪酸產率從 31.9% 上升到 38.7%。從表 4-1 中可看到 Novozym 435 酵素在 70°C 反應 24 小時得到的脂肪酸產率比反應 16 小時多 10%，從圖 4-2 發現反應 70°C 這條曲線在反應 16 小時後，每延長 4 小時脂肪酸產率就增加 5%，推測在反應 16-24 小時這段期間，Novozym 435 酵素還沒有達到水解反應的平衡。往後若採用 Novozym 435 酵素進行水解反應，會以 24 小時做為反應的時間條件。

表 4-1 脂肪酸產率在不同反應溫度和反應時間的結果

反應時間	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr
反應溫度(°C)	FA yield (%)	FA yield (%)	FA yield (%)	FA yield (%)
40	24.1	28.9	30.1	35.4
50	31.9	38.7	41.1	45.8
60	42.0	45.5	49.3	55.9
70	50.9	51.4	56.2	61.4
80	58.6	60.4		58.3

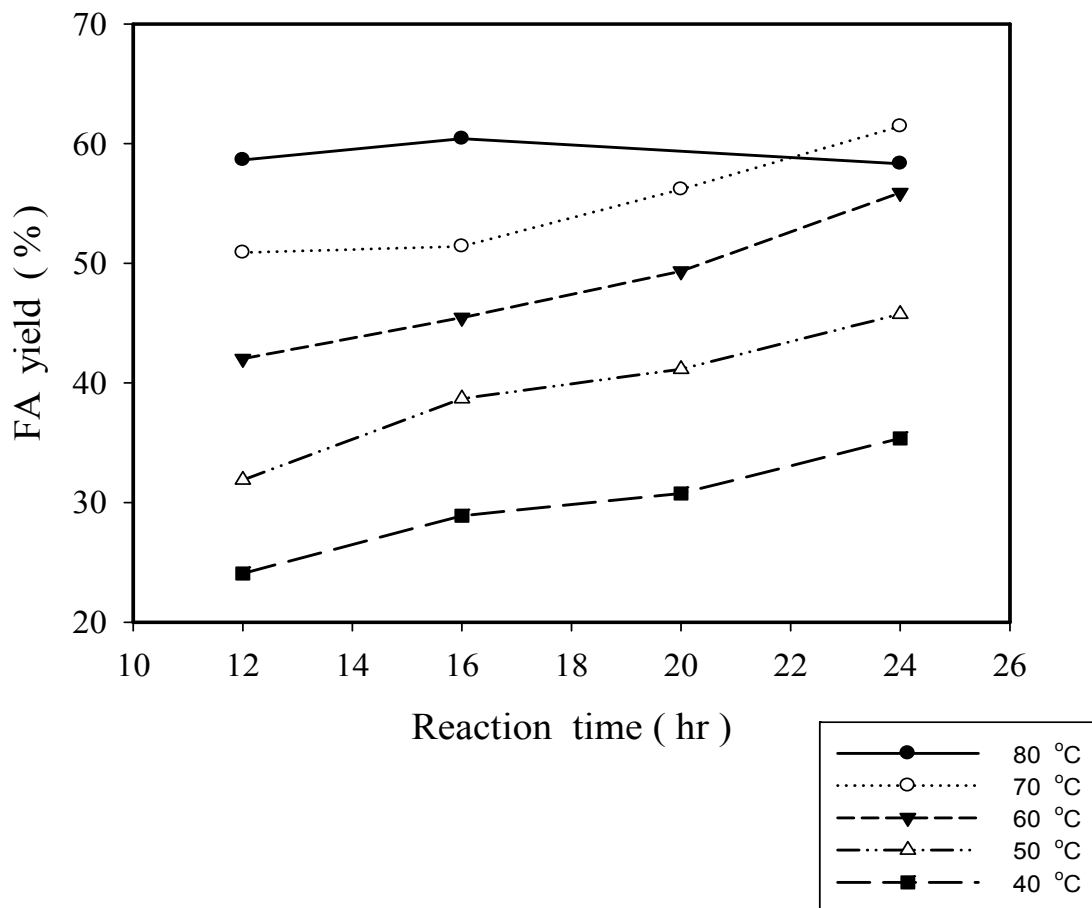


圖 4-2 反應時間對 Novozym 435 水解效能的影響

反應條件：油/緩衝溶液/酵素量 = 10 g : 5 g : 1 g，緩衝液為 0.1M 磷

酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液 (pH 5.0)。

4.1.3 反應溫度對酵素 Novozym 435 水解反應的影響

每種酵素都有本身最適合的反應溫度，偏高或偏低的溫度都會降低酵素的催化效能；此外酵素本質是蛋白質，過高或過低的溫度會改變蛋白質三級結構，讓酵素失去催化的功用。因此找出最適合酵素反應的溫度可以發揮酵素最佳的水解功能。圖 4-3 的反應條件為油/緩衝溶液/酵素=10 g : 5 g : 1 g，緩衝液為 0.1M 的磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液(pH 5.0)。圖 4-3 中呈現在各個反應時間裡(12, 16, 20, 24 hr)，脂肪酸產率會隨著反應溫度的上升出現平穩增加的情況，其中反應 12, 16, 20 小時的遞增趨勢相當類似，溫度每增加 10°C，脂肪酸產率就增加 6—10%。這表示 Novozym 435 酵素的水解活性可以承受較高的反應溫度，在 80°C 反應 16 小時後依然具有催化功能。

整個系統是在密閉的反應瓶中進行，大大降低水從系統中因高溫散逸出去的機會；此外反應系統中水的莫耳數約 0.28，遠超過一次水解反應中最低的需求 0.01 莫耳，因此反應系統不會因為水量的缺乏讓 Novozym 435 酵素難以進行水解反應，降低脂肪酸產率。在空白實驗(沒有酵素參與反應，油水重量比 2 : 1，在 80 °C 下反應 24 小時)得到的脂肪酸產率僅 0.26%，因此可以忽略大豆油和水在 70°C 或 80 °C 下自然反應生成的脂肪酸量。

圖 4-4 是用分光光度計測 Novozym 435 酵素在不同溫度下水解

p-nitrophenyl palmitate (簡寫 p-NPP) 乙醇溶液後，得到的黃色產物 p-nitrophenol (簡寫 p-NP) 在波長 410 nm 的吸收值，經換算後得到酵素的反應活性。在圖 4-4 可看到酵素的水解活性隨著溫度上升而提高，在 40°C – 60°C 提升最為顯著；到 60°C 時上升速度變慢，開始出現水解活性不再隨溫度上升而明顯增加的趨勢。在 70°C 出現最大的水解活性，在 80°C 時則有些微降低。這表示提高溫度有助於增加酵素的水解活性，不過到特定溫度後酵素的活性就不會再提升。在 4.1.2 節中選定反應時間為 24 小時，在圖 4-3 中可看到 70°C 反應 24 小時的結果比 80°C 好；油脂水解反應的主要目的是要讓油脂盡量變成脂肪酸，讓接下來的酯化反應可以更順利。圖 4-4 中顯示 70°C 的水解活性和 80°C 一樣好。升高溫度不會得到更高的脂肪酸轉化率，往後若選擇 Novozym 435 酵素進行水解反應，會以 70°C 當做反應的溫度條件。

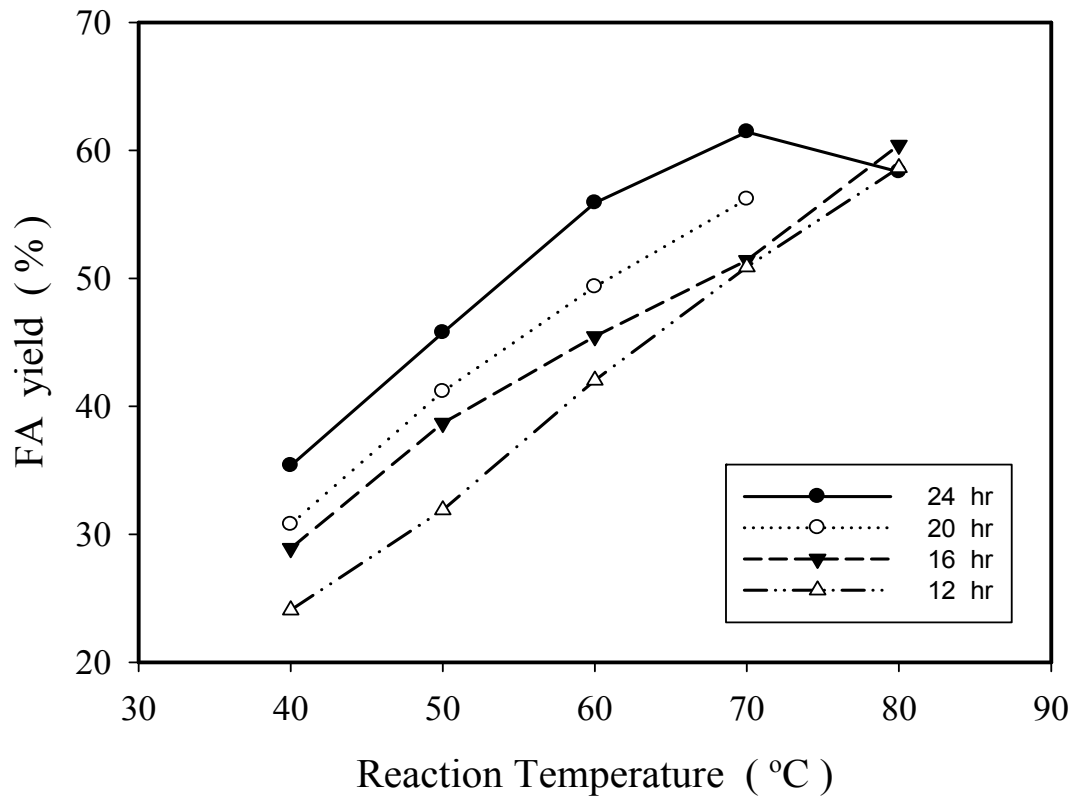


圖 4-3 溫度對酵素 Novozym 435 水解效能的影響

反應條件：油/緩衝溶液/酵素量=10 g : 5 g : 1 g，緩衝液為 0.1M 磷酸

氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液(pH 5.0)。

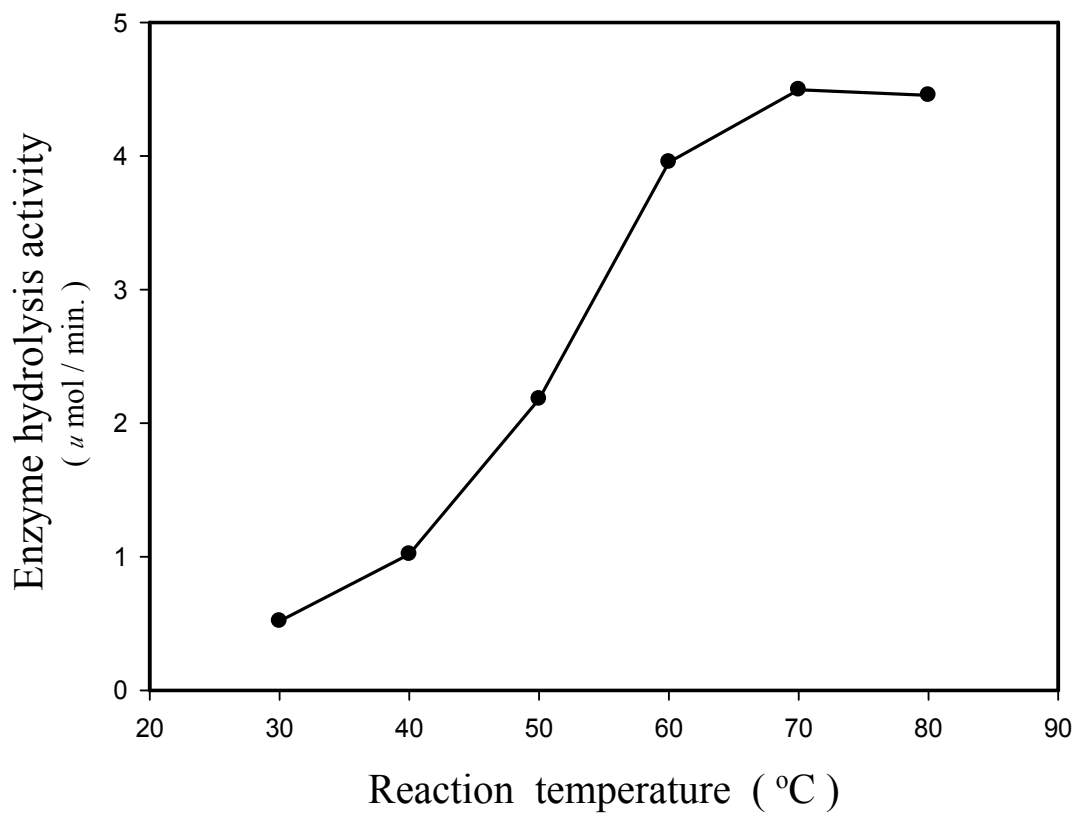


圖 4-4 以 UV-vis 測得溫度對 Novozym 435 比活性的影響

反應條件是酵素 0.2 g，水解反應受質是 0.5 % (w/v) p-NPP 酒精溶液，緩衝液為稀釋 10 倍的磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液 (pH 5.0)，反應 5 分鐘。

4.1.4 酵素 Novozym 435 使用量對水解反應的影響

酵素在反應過程中的角色是催化反應，催化劑越多理論上可以增加與受質接觸的機會，進而縮短反應時間。不過酵素量使用量存在著一個最適當的數值，過多酵素不會對反應有額外幫助。找出這個最適當的參數對使用酵素來進行反應是必要的。

圖 4-5 的反應條件是油/緩衝液=10 g : 5 g，緩衝液為 0.1M 磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液 (pH 5.0)，反應溫度是 70°C，反應時間為 16 小時。酵素使用量分別是大豆油重量的 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 wt%。在表 4-2 中可看到酵素使用量低於 10.0 wt%大豆油重量，脂肪酸產率隨著酵素量的增加而遞增，從 19.7%上升到 50.9%；當酵素用量超過 10.0 wt%增加到 12.5 wt%大豆油重量，脂肪酸產率只有 50.6%，和 10.0 wt%的 50.9%幾乎一樣。因此往後若使用 Novozym 435 酵素進行水解反應時，酵素使用量會採用大豆油重量的 10.0 wt%。

表 4-2 Novozym 435 酵素使用量對水解反應的影響

酵素使用量 (wt%)	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
脂肪酸產率 (%)	19.7	29.6	35.9	50.9	50.6

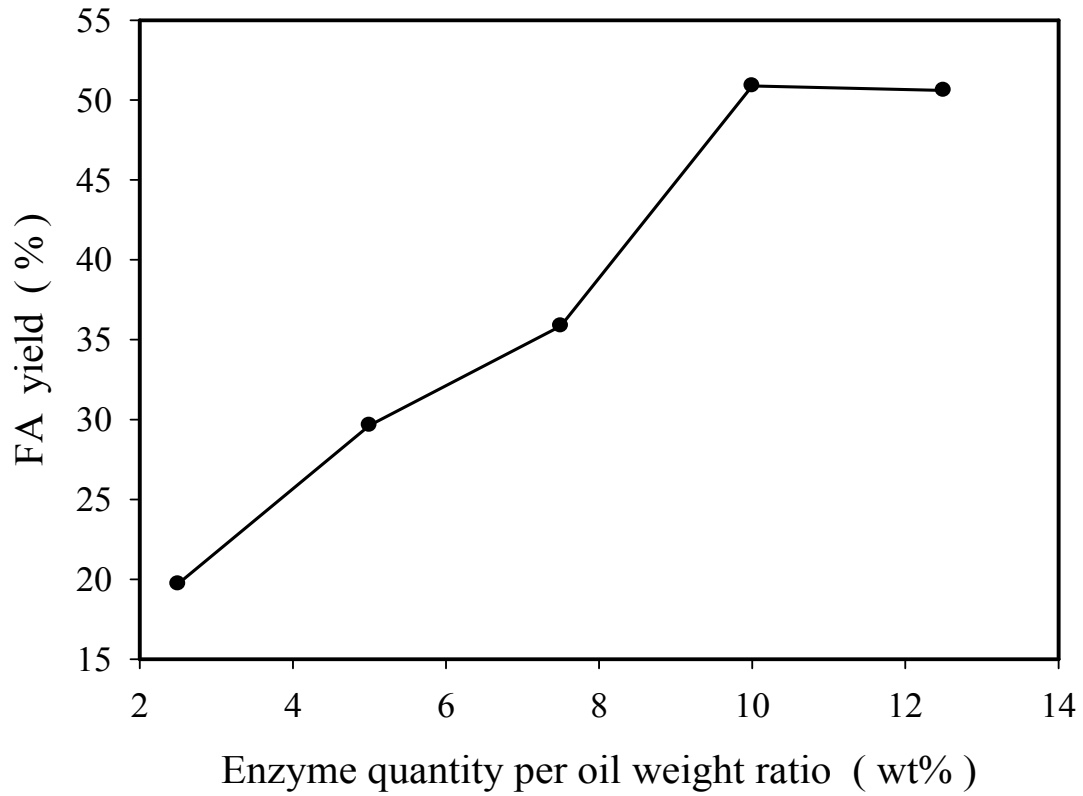


圖 4-5 Novozym 435 使用量對脂肪酸產率的影響

反應條件：油/緩衝液 (w/w) = 10 g : 5 g，緩衝液為 0.1M 磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液 (pH 5.0)，反應溫度 70°C，反應 16 小時。

4.1.5 酵素 Novozym 435 水解反應的結論

Novozym 435 是固定化酵素，實驗過程中發現可以承受較高的反應溫度，從油脂水解反應和水解 p-NPP 這兩個實驗中皆得到在 70°C 有最佳的效果，當升高溫度到 80°C 前酵素就已達到水解反應的平衡。70°C 下催化水解反應的效果會隨時間拉長而增加，反應進行 24 小時後得到 61.4% 的脂肪酸產率。Novozym 435 在弱酸性環境 (pH 5.0) 中進行水解反應的效果比中性環境 (pH 7.0) 還好，所以選擇 pH 5.0 做為日後反應的酸鹼值。在酵素用量的實驗上發現當使用量是大豆油重量的 10.0 wt% 時會得到最佳的效果，過多的酵素不會得到更高的脂肪酸產率。若往後採用 Novozym 435 酵素進行水解反應生產脂肪酸，較適當的反應條件為在 pH 5.0 的緩衝溶液中，酵素使用量為反應油脂重量的 10.0 wt%，於 70°C 下反應 24 小時。

4.2 *Candida rugosa* 酵素水解反應

Candida rugosa 酵素也是脂肪分解酶，在搜索文獻的過程中發現，*Candida rugosa* 酵素比 Novozym 435 酵素更常被使用來進行油脂的水解反應，也被認為具有更好的水解效能(Watanabe et al., 2007)。因此選擇 *Candida rugosa* 酵素來進行一系列的大豆油水解反應，測試緩衝液 pH 值、反應溫度、反應時間、酵素使用量等變因對 *Candida rugosa* 酵素生產脂肪酸產率造成的影響，並從這一系列試驗中找出適合的反應條件，讓往後進行反應時可以獲得較佳的結果。

4.2.1 pH 值對 *Candida rugosa* 酵素的影響

緩衝溶液可以維持反應過程中溶液酸鹼值的穩定，讓系統的 pH 值變動幅度降到最低，協助 *Candida rugosa* 酵素在最適合的水解反應 pH 值環境中發揮最大水解效能。此外本實驗中使用的 *Candida rugosa* 酵素沒有包覆在載體上，這會讓環境酸鹼值對 *Candida rugosa* 酵素的衝擊更大；此時使用緩衝溶液亦具有穩定 *Candida rugosa* 酵素活性的功能。

酵素在不同 pH 值緩衝溶液中會展現出不同的水解活性，藉由改變水解反應中緩衝溶液的 pH 值，會得到不同的脂肪酸產率；再由脂肪酸產率高低判斷酵素水解效果的好壞，找出反應條件較適當的 pH

值。圖 4-6 的反應條件為大豆油/緩衝液的體積比 (v/v) 是 1 / 1，酵素用量是大豆油重量的 0.1%，在 35°C 下反應 12 小時。從圖 4-6 中可以看到 *Candida rugosa* 酵素在緩衝溶液 pH 7.0 有最好的反應結果，脂肪酸產率達 84.9%。當 pH 值超過 7.0 到達 pH 7.5，脂肪酸產率微幅下降 4% 到 80.7%；當上升至 pH 8.0 時脂肪酸產率大幅下降 50%，只剩下 34.4%，這顯示 *Candida rugosa* 酵素不適合在鹼性環境下進行水解反應。當緩衝溶液從中性轉變成酸性時，酵素的水解效能也隨之下降，緩衝液酸鹼值從 pH 7.0 降低到 pH 5.0，脂肪酸產率即從 84.9% 下降到 76.5%。不同於鹼性環境中酵素水解效能出現快速降低的情況，酸性環境中酵素水解活性出現緩慢下降的趨勢。為發揮酵素最佳的催化能力，往後若選擇 *Candida rugosa* 酵素進行大豆油的水解反應時，緩衝溶液的酸鹼值會選定 pH 7.0。

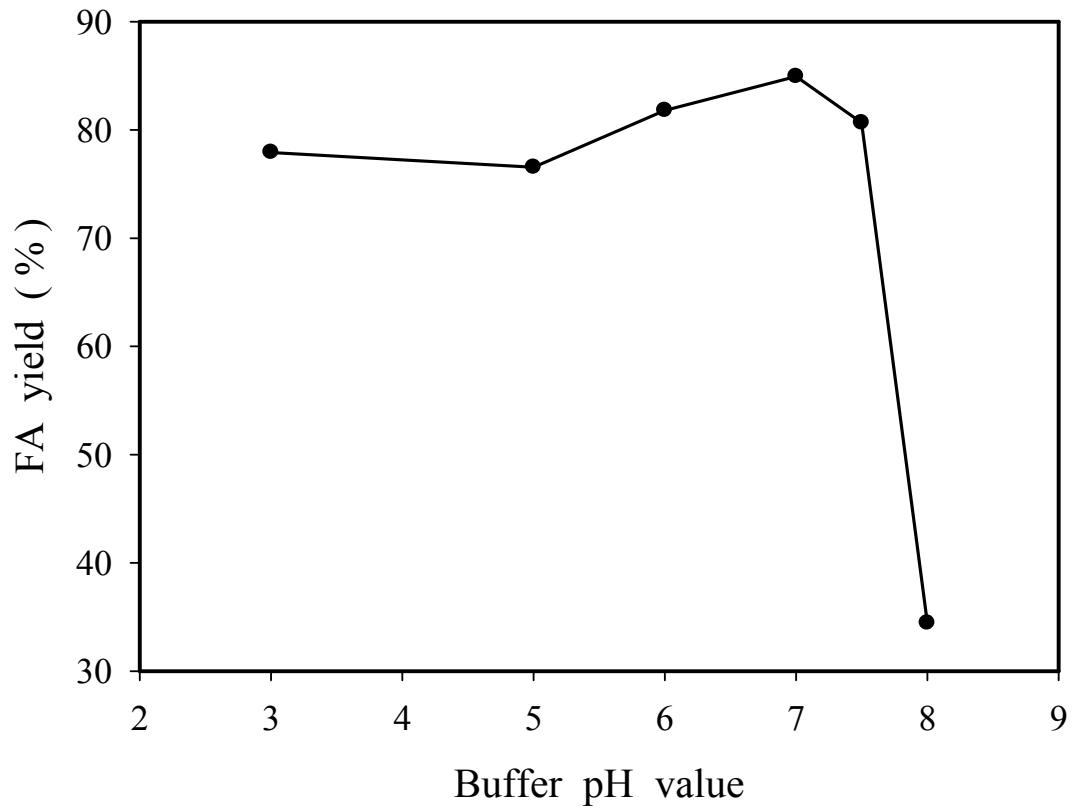


圖 4-6 pH 值對 *Candida rugosa* 酵素水解效能的影響

反應溫度為 35°C，反應時間是 12 小時，*Candida rugosa* 酵素使用量是大豆油重量的 0.1%，大豆油和緩衝溶液的體積比 (v/v) 是 1 / 1。

4.2.2 反應溫度對 *Candida rugosa* 酵素的影響

Candida rugosa 酵素沒有固定在載體上，少了載體的保護會讓溫度直接影響酵素的蛋白質三級結構，進而減低酵素的水解效能。圖 4-7 的反應條件是緩衝溶液 pH 7.0，大豆油/緩衝溶液的體積比是 1 / 1，酵素用量是大豆油重量的 0.1%，反應時間為 4 小時。也是以脂肪酸產率高低判定酵素水解效果的好壞。在圖 4-7 中可以看到 *Candida rugosa* 酵素在室溫附近(30°C –40°C)有不錯的水解反應表現，脂肪酸產率都有 60%；當反應溫度升高到 50°C 時會出現酵素水解效能變差的情況，脂肪酸產率下降到 29.4%。這顯示偏高的溫度對酵素 *Candida rugosa* 酵素的水解反應效能有明顯不良影響；在 30°C, 35°C, 40°C 三個反應溫度中，在 35°C 下 *Candida rugosa* 酵素有最高的平均脂肪酸產率，所以往後若選用 *Candida rugosa* 酵素進行大豆油的水解反應，會以 35°C 作為反應溫度的條件。

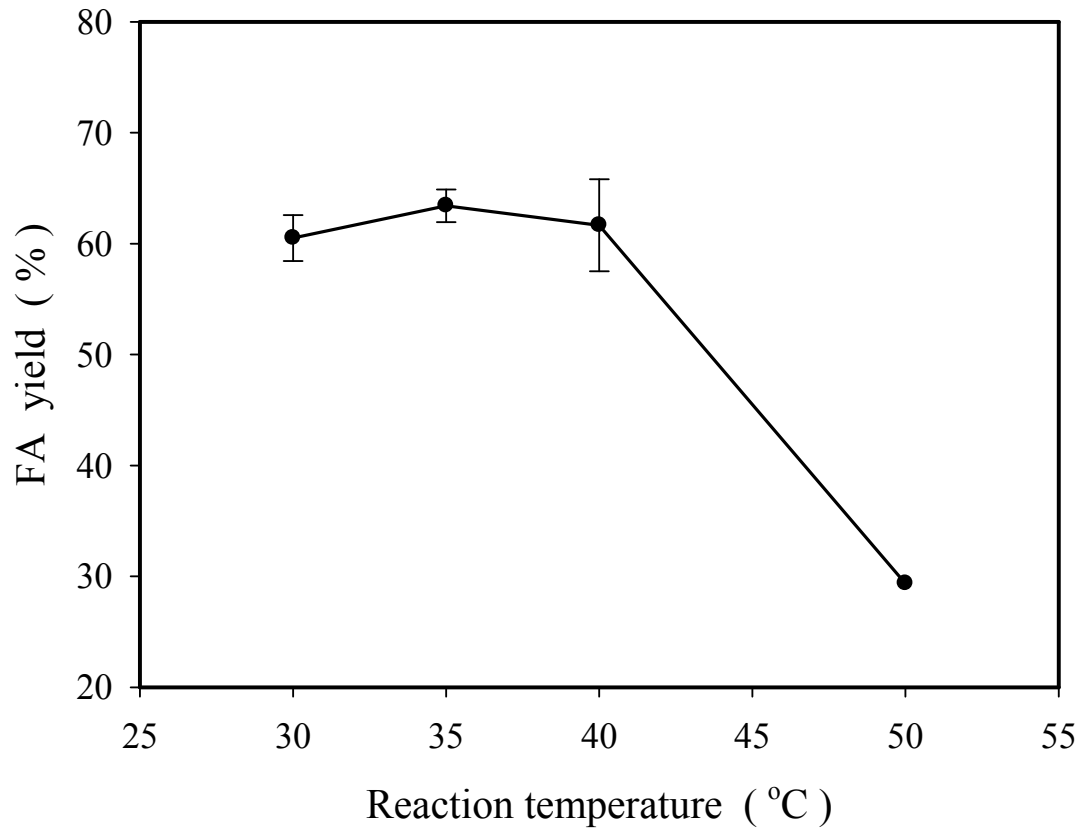


圖 4-7 反應溫度對 *Candida rugosa* 酵素水解反應效能的影響

反應條件是緩衝溶液 pH= 7.0，大豆油/緩衝溶液的體積比是 1 / 1，酵素使用量是 0.1 wt%，反應時間 4 小時。

4.2.3 反應時間對 *Candida rugosa* 酵素的影響

Candida rugosa 酵素在最適合反應的溫度和 pH 值環境中進行水解反應，反應時間的長短是一個左右水解反應效果的原因，也是決定脂肪酸產率高低的關鍵因素。圖 4- 8 是脂肪酸產率對反應時間的關係圖，反應條件為緩衝溶液 pH 7.0，大豆油/緩衝溶液的體積比 (v/v) 是 1 / 1。從圖 4- 8 中可以看到脂肪產率會隨著反應時間改變，並出現兩種情況：第一種情況是脂肪酸產率隨反應時間的增加而平穩上升，如圖 4- 8 中酵素使用量 0.1 wt% 這條曲線，顯示在該條件下 *Candida rugosa* 酵素還沒有達到水解反應的平衡，因此脂肪酸產率會隨時間繼續平穩上升。第二種情況是過了特定的反應時間，脂肪酸產率的增幅變得非常微小似乎停滯，如圖 4- 8 中 0.2 、0.25 和 0.5 wt% 這三條曲線，在過了 8 小時後脂肪酸產率微幅增加。由圖 4- 8 和表 4- 3 中可以得知在 0.2 wt% 和 0.25 wt% 兩條曲線中，反應 4 小時到 8 小時之間脂肪酸產率的增加幅度最大，皆增加超過 10%；8 小時到 12 小時間脂肪酸產率增加幅度變小約 4.0% 左右。12 小時到 16 小時間脂肪酸產率增幅不到 1%，這表示反應 12 小時已經達到 *Candida rugosa* 酵素水解反應的平衡狀態，再延長反應時間很難讓脂肪酸產率繼續有所變動。所以往後若選擇 *Candida rugosa* 酵素進行水解反應時，會選擇 12 小時作為反應條件。

表 4-3 反應時間和酵素量造成不同的脂肪酸產率

酵素量 (wt%)	0.1	0.2	0.25	0.5
反應時間 (hr)	FA yield (%)	FA yield (%)	FA yield (%)	FA yield (%)
4	60.5	77.9	80.9	81.4
8	68.6	90.0	91.6	92.2
12	81.3	94.1	93.4	93.8
16	88.3	92.9	94.2	94.4

註:酵素使用量皆為大豆油重量的百分比

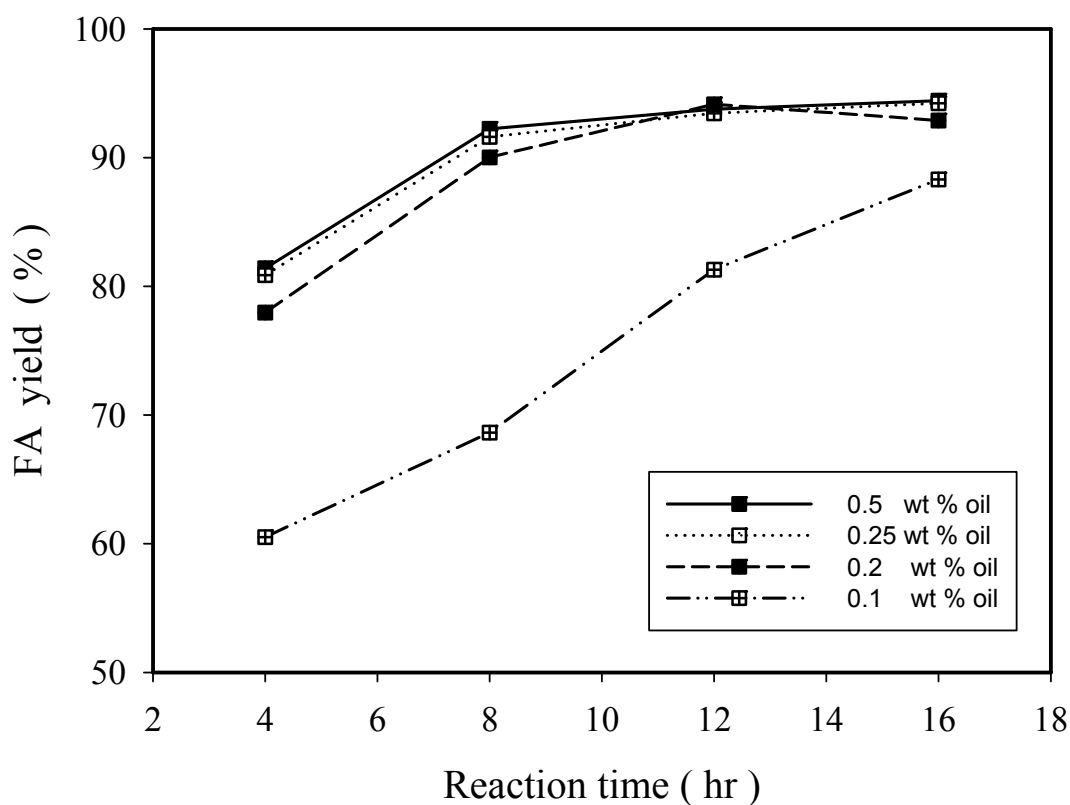


圖 4-8 反應時間對 *Candida rugosa* 酵素進行水解反應的影響

反應條件是緩衝溶液 pH 值 7.0，大豆油/buffer (v/v) = 1 : 1，

反應溫度 35°C。

4.2.4 *Candida rugosa* 酵素使用量對水解反應的影響

酵素使用量的高低除了會左右反應成本的高低外，也會影響 *Candida rugosa* 酵素進行水解反應的時間長短。因此找出最合適的 *Candida rugosa* 酵素使用量，除了可以縮短反應時間外，也可以降低水解反應需要的 *Candida rugosa* 酵素量，降低進行水解反應的成本。

圖 4-9 是酵素用量對脂肪酸產率的關係圖，反應條件為緩衝溶液 pH 7.0，大豆油/緩衝溶液的體積比是 1 / 1。圖 4-9 中 4 條曲線代表 4 個不同的反應時間，這 4 條曲線皆顯示一個現象，在相同的反應時間內增加酵素使用量會讓脂肪酸產率增加。當酵素使用量超過 0.25 wt% 大豆油重量來到 0.5 wt% 大豆油重量後，脂肪酸產率就不再隨酵素使用量的增加而上升，表示水解反應在 *Candida rugosa* 酵素使用量達到 0.25 wt% 時已達到平衡。在不同 *Candida rugosa* 酵素量影響脂肪酸產率的試驗中，以酵素使用量從 0.1 wt% 增加到 0.2 wt% 之間脂肪酸產率的增幅最為明顯；過了 0.2 wt% 後脂肪酸產率變化幅度趨緩，平均增幅從 14.1% 下降到 1.3%，顯示 0.2 wt% 的 *Candida rugosa* 酵素使用量已接近使水解反應達到平衡的數值。另外也發現延長反應時間可以讓使用少量的酵素，獲得不低脂肪酸產率，例如在圖 4-9 中用 0.1 wt% 大豆油重量的酵素反應 16 小時後得到脂肪酸產率 88.3%，和使用 0.2 wt% 大豆油重量的酵素，在反應 16 小時得到脂肪酸產率 92.9%

只相差 4.6%。

在 4.2.3 小節的實驗中已經找到 *Candida rugosa* 酵素需要 12 小時進行水解反應，從圖 4-9 中反應 12 小時這條曲線可以明顯得到，若要使用 *Candida rugosa* 酵素進行大豆油的水解反應，需要使用超過 0.2 wt% 大豆油重量的酵素。

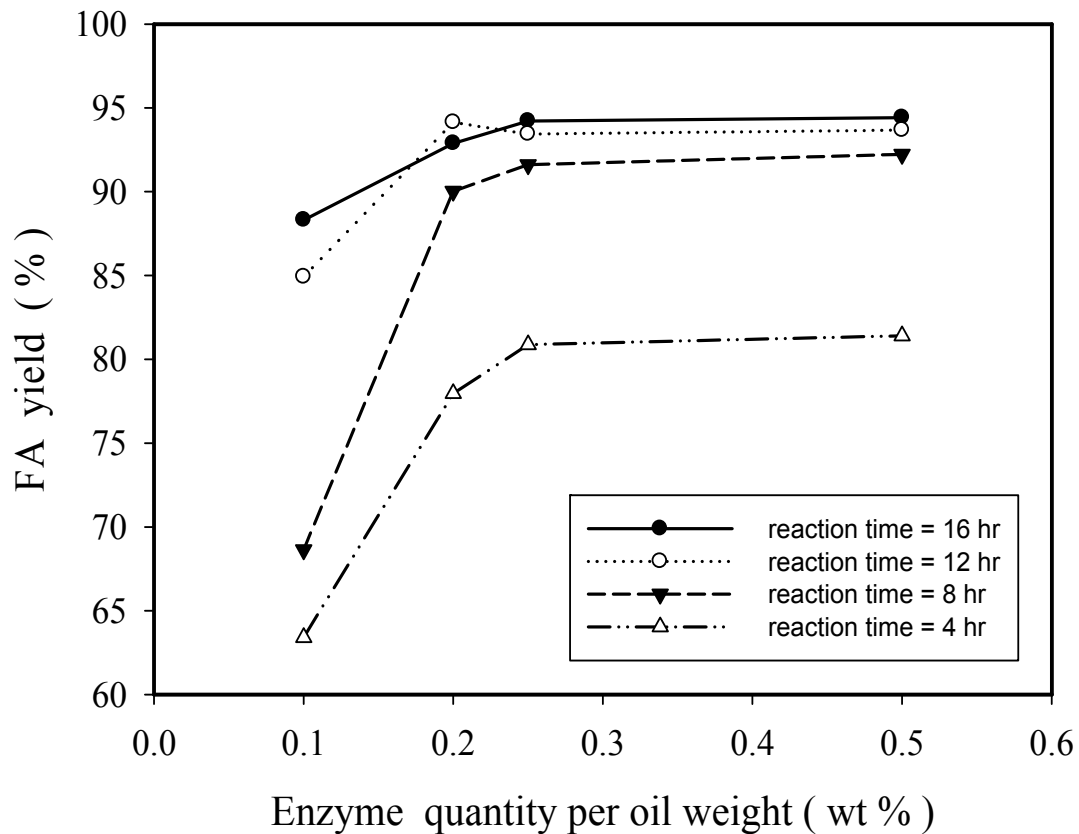


圖 4-9 *Candida rugosa* 酵素使用量對水解反應效能的影響

反應條件是緩衝溶液 pH 值=7.0，大豆油/緩衝溶液的體積比 1：1，反應溫度 35°C。

4.2.5 *Candida rugosa* 酵素水解反應結論

Candida rugosa 酵素在中性環境 (pH 7.0) 有最好的催化水解反應效果，酸性環境對其催化效果略有影響，弱鹼性環境讓反應效能的減少十分明顯。*Candida rugosa* 酵素只能在室溫附近進行反應，於 35°C 時有不錯的水解反應結果；當溫度升高到 50°C 時酵素催化能力會快速下降。*Candida rugosa* 酵素進行水解反應時，使用 0.25 wt% 大豆油重量的酵素反應 8 小時就可以讓脂肪酸產率超過 90%。在測試酵素使用量對水解效能影響的實驗上發現，採用 0.25 wt% 大豆油重量的 *Candida rugosa* 酵素有最佳的反應效果，再增加酵素使用量無法讓脂肪酸產率增加。

4.3 Novozym 435 酵素和 *Candida rugosa* 酵素的比較

在前面一系列的試驗中皆對 Novozym 435 酵素和 *Candida rugosa* 酵素進行緩衝液 pH 值、反應溫度、反應時間和酵素使用量對脂肪酸產率的影響，若在同一個變因下比較對這兩酵素的影響，可以對 Novozym 435 酵素和 *Candida rugosa* 酵素有更多的認識。

在緩衝液 pH 值的影響上，比較圖 4- 1 和圖 4- 6 可以發現，Novozym 435 和酵素 *Candida rugosa* 這兩個脂肪分解酶都不適合在鹼性環境下進行水解反應，在 pH 8.0 鹼性環境中得到的脂肪酸產率分別是 12.9%和 34.4%，跟最佳條件（分別是 pH 5.0 和 pH 7.0）得到的脂肪酸產率（分別是 28.9%和 84.9%）相比遜色不少；其中 *Candida rugosa* 酵素在鹼性環境中受到的影響比 Novozym 435 酵素大，脂肪酸產率比在最適合反應的 pH 7.0 環境中短少 50.5%。

在反應溫度的影響上，比較圖 4- 3 和圖 4- 7 可以發現 Novozym 435 酵素在 80°C 時依然可以進行水解反應，效果跟在最佳的反應溫度 (70°C) 相比相差不多；Novozym 435 酵素比 *Candida rugosa* 酵素能承受更高的反應溫度，*Candida rugosa* 酵素在 50°C 時出現水解反應效能明顯下降的現象。另外 Novozym 435 酵素最適當的反應溫度是 70°C，也比 *Candida rugosa* 酵素的最佳反應溫度 35°C 高。因此 Novozym 435 酵素比 *Candida rugosa* 酵素適合在超過室溫的環境下進行水解反應。

在反應時間的影響上，比對圖 4-2 和圖 4-8 這兩張圖可發現，*Candida rugosa* 酵素的水解效率比 Novozym 435 酵素要好，*Candida rugosa* 酵素反應 12 小時可以得到 94.1% 的脂肪酸產率，Novozym 435 酵素在反應 12 小時後只能得到 50.9% 的脂肪酸產率。另外比較圖 4-2 和圖 4-8 可以觀察到，這兩酵素進行水解反應時皆符合酵素動力學的情況：在達到反應平衡前脂肪酸產率會隨時間明顯增加，到達反應平衡後脂肪酸產率隨時間的變化不明顯或不再隨時間改變。

在酵素使用量的影響上，比較圖 4-5 和圖 4-9 可看到同一個情況，使用脂肪分解酶催化水解反應，脂肪酸產率不會一直隨著酵素量而不停上升；酵素使用量到達某一個數值後，增加酵素使用量不會讓脂肪酸產率上升。這表示酵素催化水解反應會受到水解反應平衡的限制，無法藉由不斷提高酵素量來得到脂肪酸產率 100%，必須要藉助其他的方法才有可達成，例如移除反應系統中的產物脂肪酸，讓大豆油的水解反應可以繼續進行。

很明顯地 *Candida rugosa* 酵素比 Novozym 435 酵素更適合進行大豆油的水解反應，它可以在酵素使用量是大豆油重量的 0.25 wt%，緩衝液 pH7.0，於 35°C 下反應 12 小時得到超過 90% 的脂肪酸產率。這是使用 Novozym 435 酵素無法在相同反應條件下達成。因此往後實驗將使用 *Candida rugosa* 酵素進行大豆油水解反應。

4.4 Novozym 435 酵素進行酯化反應

大豆油經過脂肪分解酶進行水解反應後會得到脂肪酸，再經過脂肪分解酶進行酯化反應後即可得到生質柴油。為了讓酯化反應後酵素方便回收再利用，這部份會使用固定化的 Novozym 435 酵素進行一系列酯化反應條件的探討，期望能找出最適當的條件，獲得高品質的生質柴油；希望整個製程的條件也能符合能源消耗低、減少副產物和降低反應物使用量的目標。

4.4.1 反應溫度對酯化反應轉化率的影響

Novozym 435 酵素在進行酯化反應時的反應過程和進行水解反應的過程不相同，因此要找出在酯化反應過程中最適當的反應溫度才讓 Novozym 435 酵素發揮最大的功能。圖 4-10 的反應條件是甲醇和脂肪酸 (FFA) 的莫耳數比為 5，Novozym 435 酵素使用量是脂肪酸和甲醇總重量的 1%，反應 12 小時。從圖 4-10 中看到，在室溫附近 (25 和 30 °C) Novozym 435 酵素進行酯化反應轉化率分別是 92.1% 和 92.4%，彼此差異只有 0.3 %。當溫度從 30°C 漸漸上升到 40°C 時，轉化率從 92.4% 下降到 86.6%；溫度上升到 50°C 脂肪酸轉化率降低到 62.16%。很顯然地 Novozym 435 酵素適合在室溫附近進行酯化反應，偏高的溫度會影響酵素催化酯化反應的進行。從圖中可看到在 30°C

有最佳的酯化反應轉化率，故選 30°C 作為反應條件。

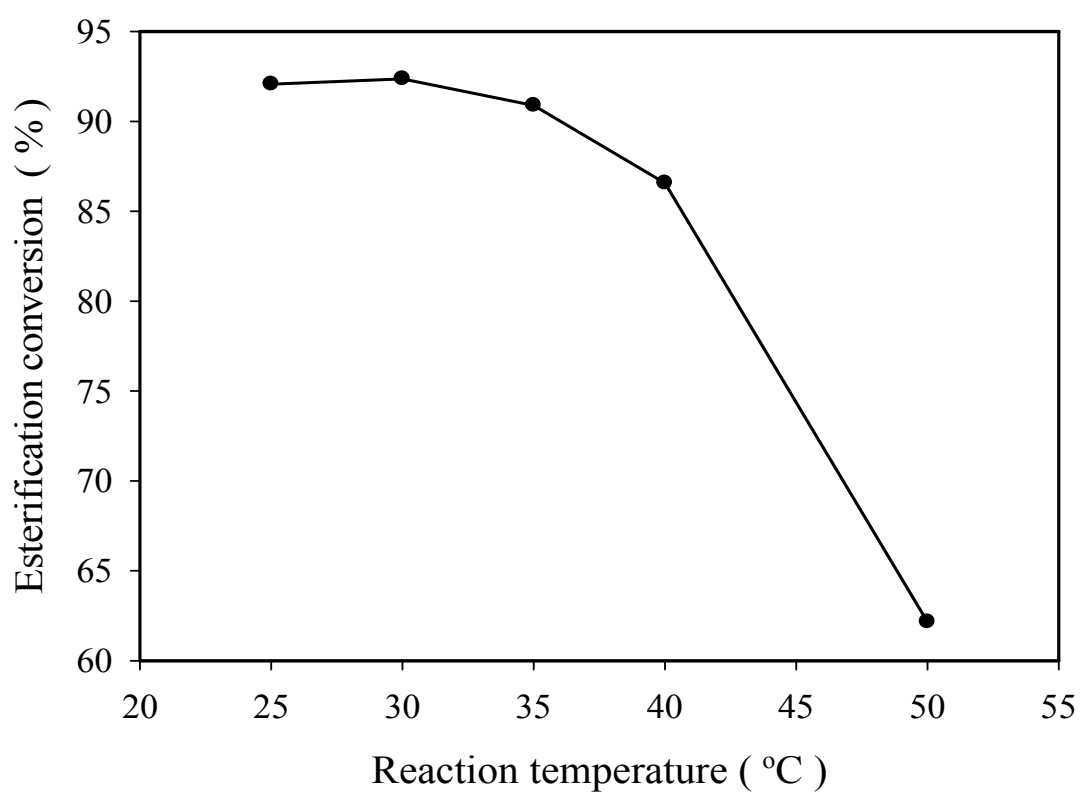


圖 4-10 反應溫度對酯化反應轉化率的影響

反應條件是反應時間 12 小時，Methanol/FFA 比為 5，酵素使用量是脂肪酸和甲醇總重量的 1%。

4.4.2 反應時間對酯化反應轉化率的影響

找出 Novozym 435 酵素進行反應的最適當時間可以減少不必要的時間浪費，縮短酵素二階段反應的總反應時間。圖 4-11 是反應時間對酯化反應轉化率的影響，反應條件是 Methanol/FFA 莫耳比 5，酵素 Novozym 435 用量為甲醇和 FFA 總重量的 1%，反應溫度 30°C，詳細的數據可由表 4-4 獲得。反應時間從 4 小時增加到 8 小時，脂肪酸轉化率從 78.8% 增加到 87.9%；當反應時間增加到 12 小時，脂肪酸轉化率上升到 92.4%，反應時間再增加到 20 小時，脂肪酸轉化率達到 95.2%。以上數據顯示反應時間的增加有助於提升脂肪酸轉化率。在反應時間 12 小時前脂肪酸轉化率的上升比較明顯，過了 12 小時後脂肪酸轉化率的增幅減小，甚至有停滯的趨勢。Novozym 435 酵素可進行酯化反應和水解反應，這兩個反應彼此互為正逆反應，可以用系統內的水量來控制反應進行方向 (Abu Bakar Salleh, 2006)。反應 12 小時的轉化率已經達到 92.4%，表示系統中早已產生許多酯化反應的副產物—水，使逆反應發生，讓酯化反應的轉化率增加幅度減小；在到達反應平衡時酯化反應的轉化率會出現不隨時間增加的現象。反應 8 小時和 12 小時的轉化率有明顯差異，表示在 8 小時內 Novozym 435 酵素還沒使酯化反應到達平衡；反應 12 小時和 20 小時的結果相近，顯示 12 小時已接近反應平衡。故以 12 小時做為酯化反應的條件。

表 4-4 反應時間對酯化反應的影響

反應時間 (hr)	4	8	12	16	20	24
轉化率 (%)	78.8	87.9	92.4	93.9	95.2	95.7

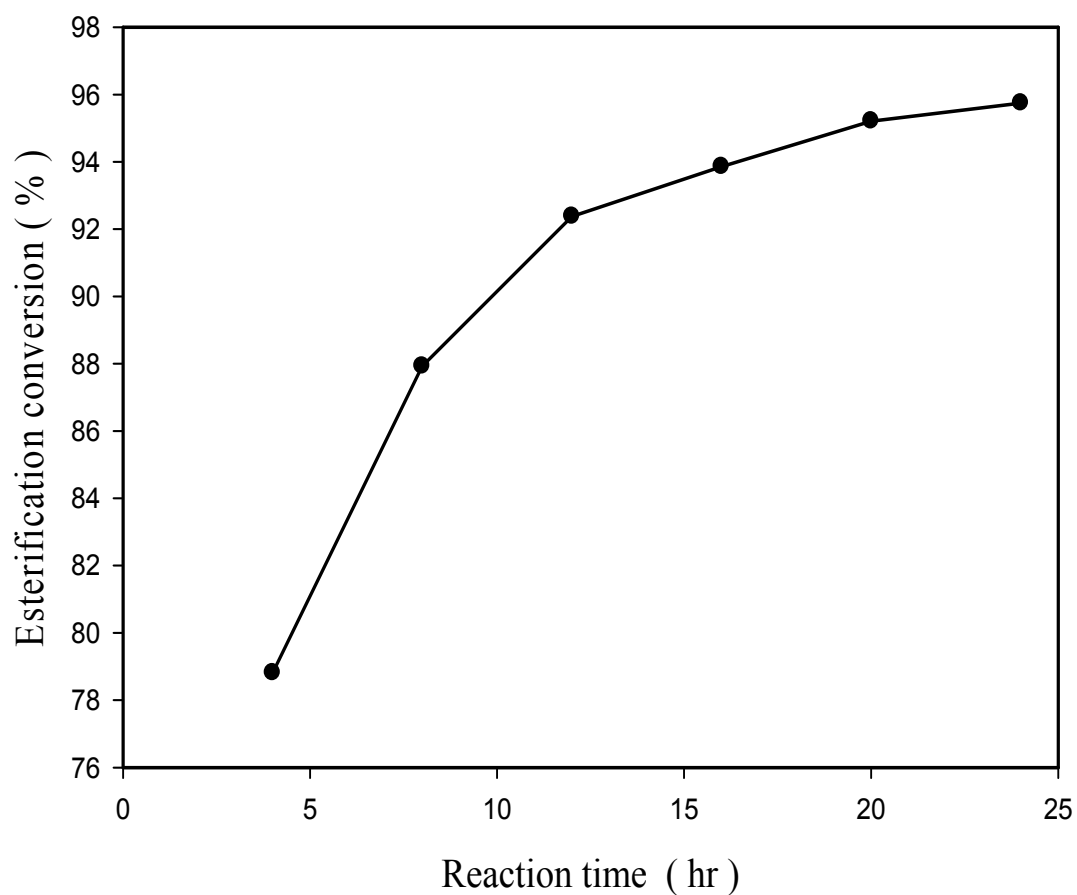


圖 4-11 反應時間對酯化反應轉化率的影響

反應條件是 Methanol/FFA 莫耳比 5，酵素 Novozym 435 用量為甲醇和 FFA 總重量的 1%，反應溫度 30°C。

4.4.3 Methanol/FFA 莫耳比對酯化反應轉化率的影響

文獻中發現反應中甲醇的莫耳數超過酯化反應過程中脂肪酸莫耳數的 1 倍時，可以增加酯化反應的轉化率：甲醇/脂肪酸莫耳比為 1, 5, 10，脂肪酸轉化率分別為 86.6, 95.6, 95.2%，顯示提高甲醇/脂肪酸莫耳比有助於提升酯化反應轉化率(Watanabe et al., 2007)。找出合適的甲醇/脂肪酸莫耳比除了可以提高酯化反應的轉化率，更重要的是可讓產物中的脂肪酸含量盡量降低，到達生質柴油的油品規範。

圖 4- 12 是 Methanol/FFA 莫耳比對酯化反應轉化率的影響，反應條件是 Novozym 435 酵素用量為甲醇和 FFA 重量的 1%，在 30°C 下反應 12 小時，詳細結果可從表 4- 5 獲得。Methanol/FFA 莫耳比從 1 上升到 5，脂肪酸轉化率從 81.22% 上升到 92.37%；把 Methanol/FFA 莫耳比向上增加到 10 或 15 時，脂肪酸轉化率小幅度上升來到 94.4% 或 96.9%，每增加一倍的甲醇用量，酯化反應轉化率增加 2%。當 Methanol/FFA 莫耳比達到 15 可獲得此實驗中最高的脂肪酸轉化率，因此以 Methanol/FFA 莫耳比 15 作為往後反應的條件。

表 4- 5 甲醇/FFA 莫耳比對酯化反應的影響

MeOH/FFA 莫耳比	1	5	10	15	20
轉化率 (%)	81.2	92.4	94.5	96.9	95.6

註: MeOH 是 methanol 的縮寫

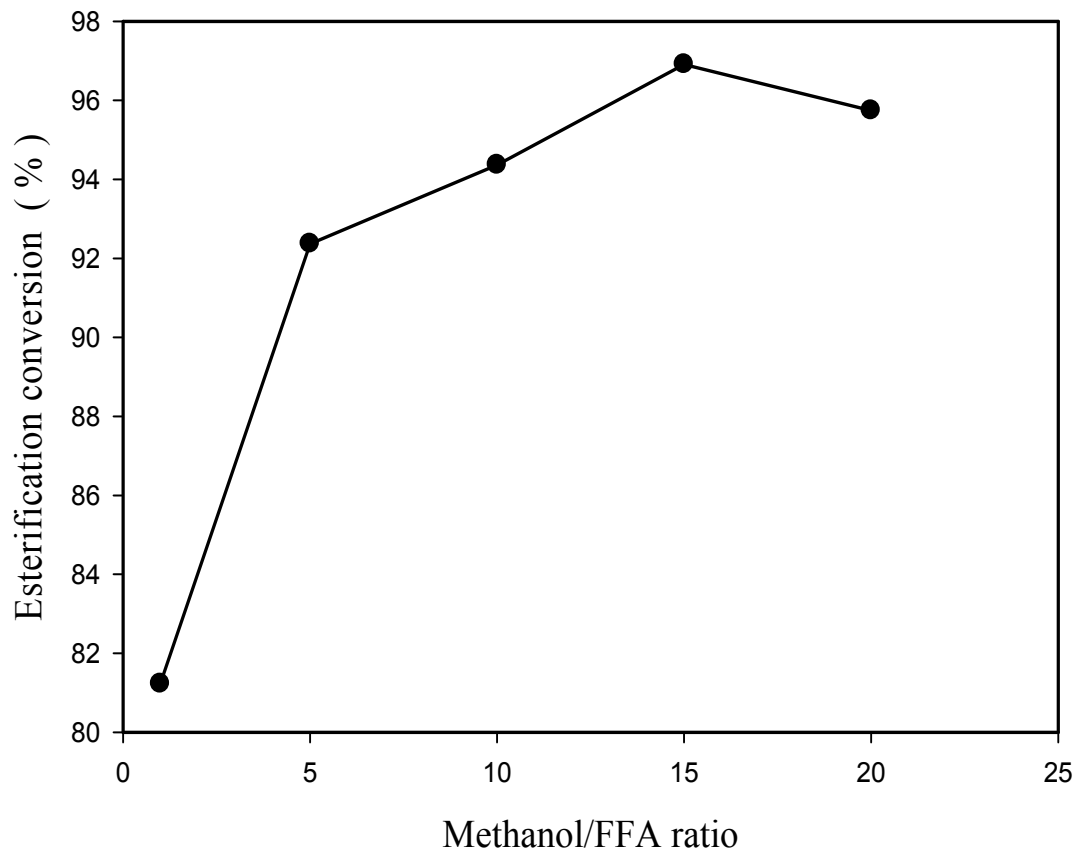


圖 4-12 Methanol/FFA 莫耳比對酯化反應轉化率的影響

反應條件是 Novozym 435 酵素用量為甲醇和 FFA 重量的 1%，反應溫度 30 °C，反應 12 小時。

4.4.4 酵素使用量對酯化反應轉化率的影響

酵素使用量的提高可以縮短到達反應平衡的時間，進而減少酵素二階段反應的總反應時間；此外也可以提升酯化反應的轉化率，進而降低產物酸價值，提高生質柴油的品質。因此找出適當的酵素使用量是重要的。

圖 4-13 是酵素 Novozym 435 使用量對酯化反應轉化率的影響，反應條件 Methanol/FFA 莫耳比 15，反應溫度 30 °C，反應時間 12 小時，詳細的結果可從表 4-6 得知。酵素使用量算法是酵素重量佔 Methanol 和 FFA 總重量的百分比，當酵素使用量是 1.0 wt% 脂肪酸轉化率為 96.0%，酵素使用量是 2.0 wt% 脂肪酸轉化率是 97.8%，當酵素使用量增加 2 倍到 4.0 wt% 脂肪酸轉化率增加到 98.8%。由此可以看到酯化反應轉化率會隨著酵素使用量增加而提高。但是在酵素使用量達到 6% 時，轉化率只有 98.9%，再增加 2 wt% 的酵素用量沒有得到轉化率上升的情況。酵素用量從 2 wt% 增加兩倍到 4 wt% 時，脂肪酸轉化率只上升 1%。因為酵素用量在超過 2 wt% 後轉化率增加幅度不明顯，產物酸價值又比酵素使用量 1wt% 低，所以選酵素使用量 2 wt% 作為往後酯化反應的酵素用量。

表 4-6 Novozym 435 酵素使用量對酯化反應轉化率的影響

酵素量 (wt%)	1	2	2.5	4	6
轉化率 (%)	96.0	97.8	98.3	98.8	98.9

註: 酵素使用量算法是酵素重佔甲醇和 FFA 總重的百分比

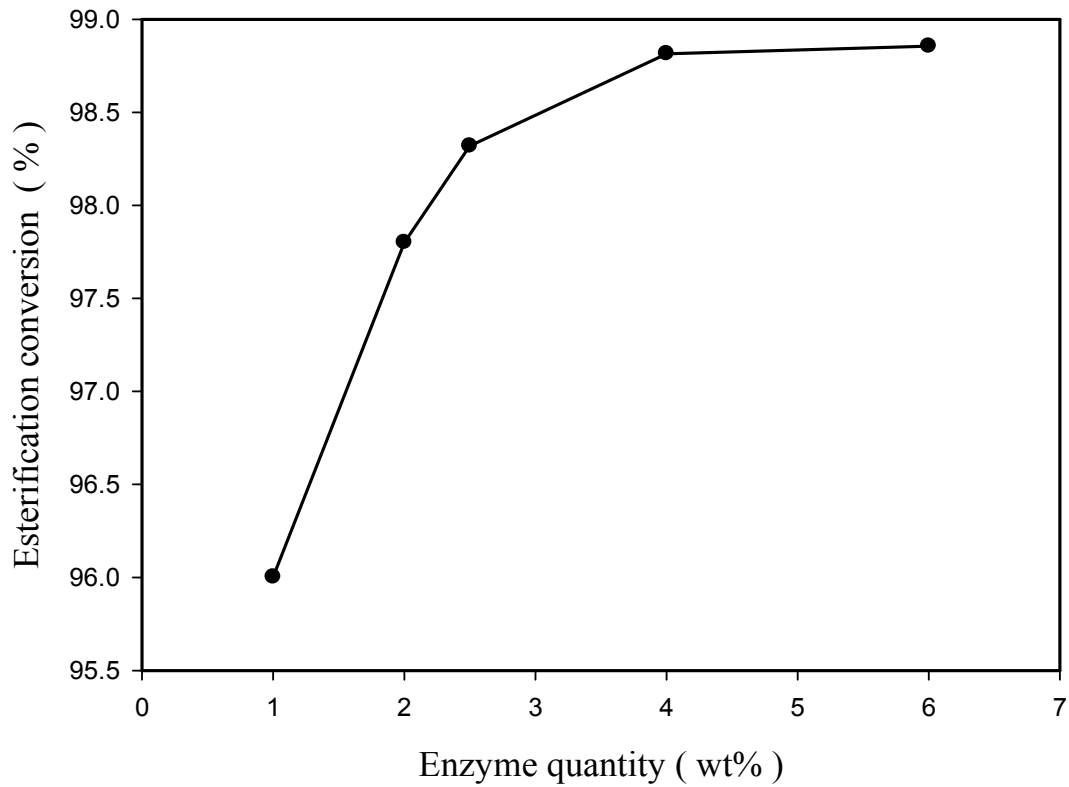


圖 4-13 酵素使用量對酯化反應轉化率的影響

反應條件是 Methanol/FFA 莫耳比 15, 反應溫度 30 °C, 反應時間 12 hr。

4.4.5 Novozym 435 酵素進行酯化反應的結論

酯化反應的反應式如圖 2- 8 所示，一個脂肪酸分子跟一個甲醇分子反應會產生一個脂肪酸甲酯和一個水分子，水分子的存在會干擾 Novozym 435 酵素行酯化反應，讓 Novozym 435 酵素有機會進行逆反應（水解反應）。這使得不論改變酯化反應的四個反應條件，到最後都會因為到達酯化反應的平衡狀態，出現脂肪酸轉化率不再隨時間繼續增加的情況。

測試反應溫度對轉化率影響的試驗上發現，在室溫下 (30°C) 有較佳的脂肪酸轉化率，當溫度從 30°C 漸漸上升到 40°C，脂肪酸轉化率漸漸降低，從 92.4% 降到 86.6%。當到達 50°C 時下降至 62.2%，降幅非常明顯。在測試反應時間對轉化率的影響上看到，延長反應時間對酯化反應轉化率的提升也是有幫助，到 12 小時可到達 92.4%，但反應時間超過 12 小時到達 16 小時，脂肪酸轉化率只有改變 1% 來到 93.9%。在探討 Methanol/FFA 的莫耳比對 Novozym 435 酵素進行酯化反應轉化率的影響時發現，Methanol/FFA 莫耳比從 5 增加到 15，轉化率從 92.4% 上升到 96.9%，表示脂肪酸轉化率會隨著 Methanol/FFA 莫耳比的增加而上升。當酵素使用量對轉化率影響的實驗中發現，酵素使用量從 1% 增加到 2%，脂肪酸轉化率從 96.0% 增加到 97.8%，酵素使用越多確實可以提升脂肪酸轉化率。

不過跟水解反應一樣，脂肪酸轉化率就會因為達到反應平衡，使脂肪酸轉化率到達某一數值後增加的速度就會趨緩，甚至不再隨時間改變。因此從這些實驗中發現 Novozym 435 酵素進行酯化反應較佳的條件為酵素使用量 2 wt% 脂肪酸和甲醇的重量總和，Methanol/FFA 莫耳比 15，反應溫度 30°C，反應時間 12 小時。用這些反應條件進行 Novozym 435 酵素的酯化反應實驗，可以得到 97.8% 的脂肪酸轉化率。使用固定化的 Novozym 435 酵素最大的優點是實驗後可以用濾紙過濾的方式把酵素回收再利用。

4.5 酵素 *Candida rugosa* 回收再利用的探討

利用分光光度計的測量 *Candida rugosa* 酵素跟 p-nitrophenyl palmitate 進行水解反應後的 p-nitrophenol 吸收值，經過計算後可以得到 *Candida rugosa* 酵素的活性，藉此方法直接測得水解反應前後 *Candida rugosa* 酵素的活性變化。也利用分光光度計測量 *Candida rugosa* 酵素溶液和蛋白質分析試劑混合後的吸收值，比對蛋白質標準濃度曲線後即可知道水解反應前後 *Candida rugosa* 酵素濃度的改變，進而算出有多少比例的酵素被回收。

4.5.1 用分光光度計測量 *Candida rugosa* 酵素水解反應前的活性

取適量的 *Candida rugosa* 酵素用 0.1 M 磷酸鈉緩衝溶液 (pH 7.0) 配成濃度 0.14 g/ml 的 *Candida rugosa* 酵素溶液，再依照 3.3.10 小節的方法，用分光光度計測量並計算出酵素的活性，結果如表 4- 7 所示，可看到測得的酵素活性彼此相當接近，平均為 6.535×10^2 U，酵素活性單位 U 的定義是酵素在每分鐘可產生 1 μmole 的 p-nitrophenol (p-NP)。

表 4-7 *Candida rugosa* 酵素水解反應前的活性

樣本	活性 (U)
1	6.953×10^2
2	5.816×10^2
3	6.836×10^2
平均	6.535×10^2

4.5.2 用 Bio-Rad 測水相酵素的濃度

以 BSA 配成濃度 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/ml 的標準液濃度，取 20 μ l 加入 1 ml 以去離子水稀釋 5 倍的 BioRad 染劑；用分光光度計在波長 595 nm 下分別測量這些標準品的吸收值並製作出蛋白質檢量線如圖 4- 14，詳細的實驗步驟見 3.3.11 BioRad 蛋白質分析這小節。用分光光度計測量未知酵素在波長 595 nm 的吸收值，再用內插法比對此檢量線可求出水解反應前 *Candida rugosa* 酵素溶液的濃度，與水解反應後水相中酵素的濃度，分別乘上反應前和反應後酵素溶液的體積即可得知酵素的總重量；把反應後酵素的重量和反應前酵素的重量相除就可知道有多少比例的酵素被回收，實驗結果如表 4- 8 所示。

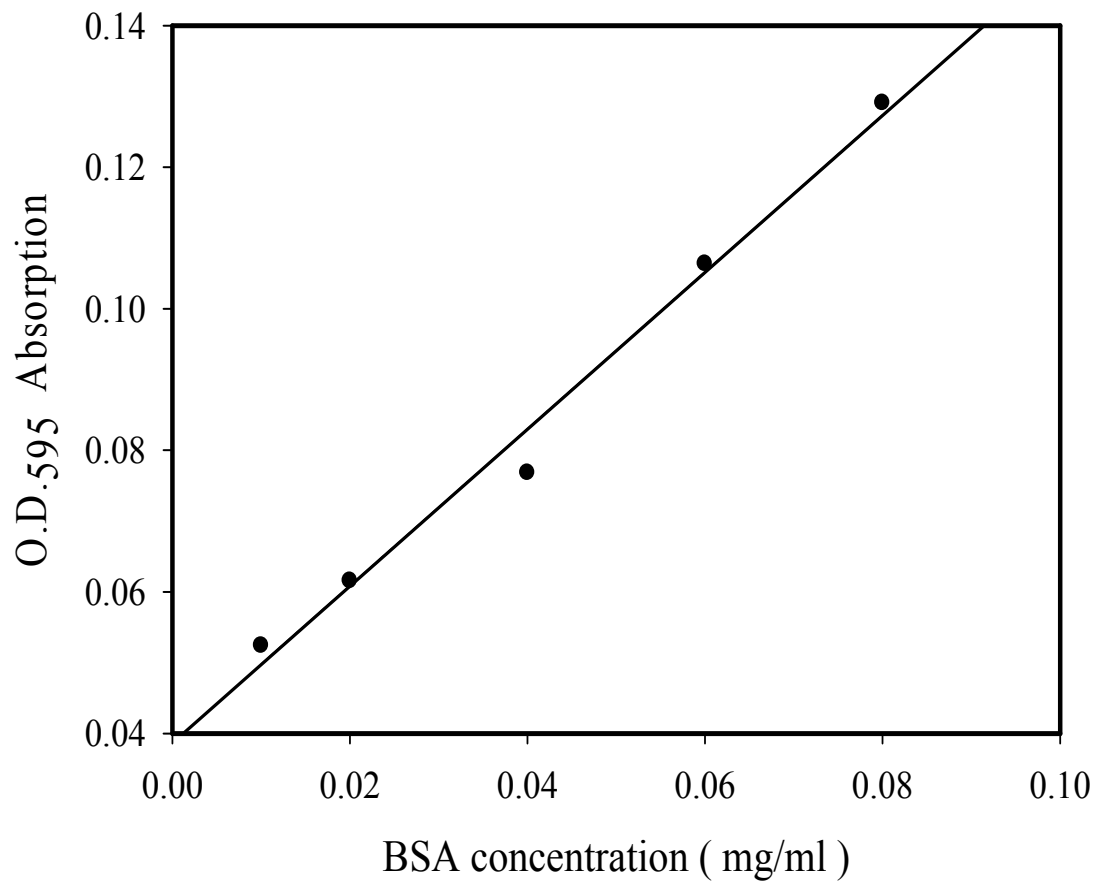


圖 4-14 BSA 標準濃度檢量線

$$y = 1.1079 X + 0.0387 \quad R^2 = 0.9877$$

4.5.3 酵素水解反應後的活性分析和酵素濃度的測量

水解反應後把反應物經過離心處理後會看到油水分層的現象，下層的水相中含有 *Candida rugosa* 酵素可以回收再次使用。使用分光光度計並藉由圖 4-14 可以測得水相中 *Candida rugosa* 酵素的濃度，再跟水解反應前的濃度相比即可知道有多少量的酵素被回收回來，其結果如表 4-8 所示。經過計算有 80.6 % 的 *Candida rugosa* 酵素會留在水相中，酵素活性的高低會影響重複使用時水解反應效果的好壞。用分光光度計測得水解反應後 *Candida rugosa* 酵素活性如表 4-9 所示。跟反應前酵素活性(表 4-7)相比可以看到 *Candida rugosa* 在水解反應後其活性會降低，往後在使用時需要添加些新的 *Candida rugosa* 酵素，以維持酵素水解反應的效率。

表 4-8 水解反應前後水相中 *Candida rugosa* 酵素濃度的變化

	濃度(mg/ml)	濃度(mg/ml)	體積(ml)	回收率 1	回收率 2	平均值(%)
反應前	0.536	0.540	15	—	—	—
反應後	0.481	0.483	13.5	80.7	80.5	80.6

表 4-9 水解反應後 *Candida rugosa* 酵素的活性

樣本	酵素活性 (U)
1	1.623×10^2
2	3.544×10^2
平均	2.584×10^2

4.5.4 重複使用 *Candida rugosa* 酵素進行水解反應的結果

在 4.4.2 節中知道水解反應後有 80.6% 的 *Candida rugosa Lipase* (簡寫 CRL) 酵素存留在水層中，把這些含有 *Candida rugosa* 酵素的水回收後可以再繼續使用，圖 4-15 是重覆使用 *Candida rugosa* 酵素溶液的次數對脂肪酸產率和 *Candida rugosa* 酵素濃度的影響關係圖，從圖 4-15 可看到脂肪酸產率和 *Candida rugosa* 酵素濃度隨著 *Candida rugosa* 酵素溶液使用次數的增加而遞減，脂肪酸產率從 *Candida rugosa* 酵素第一次使用獲的 96.7 % 下降到第 5 次使用的 29.2 %，*Candida rugosa* 酵素濃度也從第一次使用的 0.538 mg/ml 降到第五次使用的 0.449 mg/ml，重複使用酵素次用對脂肪酸產率的影響和重複使用次數對 *Candida rugosa* 酵素濃度影響的詳細數值見表 4-10。

在表 4-10 中看到 *Candida rugosa* 酵素在 "FA yiled/CRL 量" 這欄中於第二次使用時的比值 12.43 與第一次使用時 11.98 相近，表示酵素水解效能沒有因為第二次使用而明顯降低；不過第二次重複使用酵素得到脂肪酸產率 80.91 % 比第一次使用得到 96.7 % 還低，第二次使用時溶液中酵素含量是 6.507 mg，比第一次使用時酵素含量 8.070 mg 少，此時酵素只剩下第一次使用的 80.6 %。顯示造成第二次使用酵素時脂肪酸產率降低的原因，是參與水解反應的 *Candida rugosa* 酵素量減少所致。所以酵素回收後在第二次使用時，只要補足未回收到的酵

素量即可達到跟第一次使用酵素的一樣的效果。

在表 4-10 中比較 *Candida rugosa* 酵素濃度變化，從酵素第三次使用開始可看到酵素濃度減少程度比第二次使用時都還要小，甚至第四次與第五次使用時酵素濃度的變化不大。不過在”FA yield/CRL 重”這欄中可看到，酵素水解效能跟第一次使用時相比有差距，以第五次來看只有 5.20，跟第一次使用時 11.98 相比相差了 6.78；此時脂肪酸產率只有 29.18 %，遠低於第一次使用的 96.68 %。因此推斷造成脂肪酸產率降低的主因是酵素水解效能的降低。

因此往後重複使用 *Candida rugosa* 酵素，於第三次使用前在計算補充酵素量的時候，除考量回收過程中酵素量的減少，更要考慮回收酵素水解效能的降低，這樣才能維持每次水解反應產物的品質。

表 4-10 *CRL* 酵素使用次數對 FA yield 及 *CRL* 酵素濃度的影響

CRL 酵素 使用次數	FA yield (%)	CRL 濃度 (mg/ml)	CRL 重量 (mg)	FA yield / CRL 量 (% /mg)
1	96.68	0.538	8.070	11.98
2	80.91	0.482	6.507	12.43
3	60.39	-	-	-
4	47.01	0.457	5.713	8.23
5	29.18	0.449	5.613	5.20

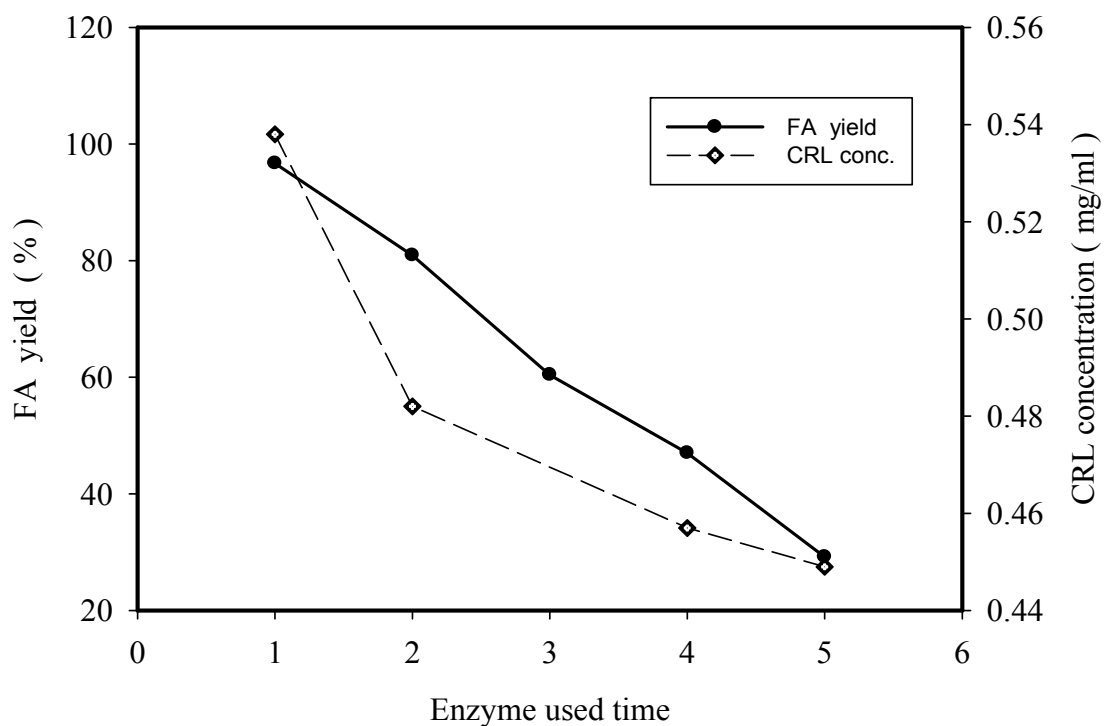


圖 4-15 *CRL* 使用次數對 FA yield 及 *CRL* 濃度的影響

反應條件大豆油：*CRL* 溶液 (v/v) = 1：1，緩衝液為 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)，過程中攪拌速度 260 rpm，反應溫度 30°C，反應時間 12 小時

4.6 Novozym 435 的活性分析

利用分光光度計測量酵素 Novozym 435 的活性，可以知道有機溶劑的影響和反應前後酵素活性的差異。表 4-11 是 Novozym 435 酵素在酯化反應前的活性，可以看到固定化酵素的活性會介在一範圍內，猜測是因為固定在載體上的酵素量不一樣所致。表 4-12 是酵素酯化反應後的活性，對照表 4-11 可發現反應後 Novozym 435 酵素活性落在 Novozym 435 酵素反應前的活性範圍內，表示 Novozym 435 酵素活性並沒有喪失具有回收再使用的價值。

表 4-11 Novozym 435 酵素酯化反應前的水解活性

樣本	酵素活性 (U)
1	7.024×10^{-1}
2	9.595×10^{-1}
3	4.659×10^{-1}
4	6.852×10^{-1}
5	5.115×10^{-1}
6	4.515×10^{-1}
平均	6.293×10^{-1}

表 4-12 Novozym 435 酵素酯化反應後的水解活性

樣本	酵素活性 (U)
1	5.347×10^{-1}
2	5.752×10^{-1}
3	4.665×10^{-1}
平均值	5.255×10^{-1}

4.7 不同反應方法的比較

這裡比較鹼催化反應、酵素一步驟反應、酵素-酸二步驟反應和酵素二步驟反應四種不同製程的優劣，以及產物的酸價、黏度、比重等特性。反應油脂皆為大豆油，反應的醇類皆為 95% 甲醇，四種製程的反應條件如表 4-13 所示。

鹼催化反應完成後的情況如圖 4-16 示，可看到在反應後系統會出現產物分層的現象，上層相是生質柴油下層相是副產物甘油。Novozym 435 酵素一步驟催化轉酯化反應後的情況如圖 4-17 所示，反應後固定化的 Novozym 435 酵素會沉澱在反應瓶底部。比照這兩個反應的反應條件和產物特性可以發現，同樣是一步驟轉酯化反應，鹼催化反應只需要 1 小時，而酵素反應卻需要 43 小時。從表 4-18 可以看到兩者在產物處理過程中的差異：鹼催化反應需要經過減壓蒸餾和 6 次水洗的步驟，酵素 Novozym 435 反應後只需要水洗一次就可達到和鹼催化反應產物水洗 6 次的效果，即下層相的水呈現清澈透明狀態。鹼催化反應過程中會有副反應產生，例如皂化反應，因此在水洗過程中會讓水洗廢液呈現不透明甚至乳白色的情況。不過經過水洗 6 次後水洗廢液就會出現澄清透明的情況。Novozym 435 酵素一步驟催化轉酯化反應不會有皂化反應的副反應發生，因此水洗一次廢液會出現透明的現象。從表 4-17 可看到兩者的產物在黏度和比重的差

異不大。酵素一步驟反應因為處理的程序簡單，整體過程中損失的產物最少所以產率最高。兩方法除了反應時間外，最大的差異是酵素催化反應後固定化酵素可以回收再使用，然而鹼觸媒會溶在水洗後的廢水中被丟棄。

表 4-13 四種方法的反應條件

製程種類	醇油(or FFA)比 mol/mol	觸媒	反應溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	反應時間 (hr)
鹼製程 ^{註1}	6:1	NaOH	60	1.5
酵素一步反應 ^{註2}	3:1	Novozym 435	40	43
酵素-鹽酸混合 製程 ^{註3}	20:1	Candida rugosa- HCl	35/70	16
酵素-酵素反應	15:1	Candida rugosa- Novozym 435	35/30	28

註1：此反應條件參照 Freedman 學者論文中的反應條件 (Freedman et al., 1984)

註2：反應條件設定依照 Shimada 學者提出的反應條件(Shimada et al., 1999)

註3：反應條件設定參考 2008 年成大碩士論文的反應條件(李智傑, 2008)



圖 4-16 鹼催化轉酯化反應後的情況

上層相是生質柴油，下層相是甘油。

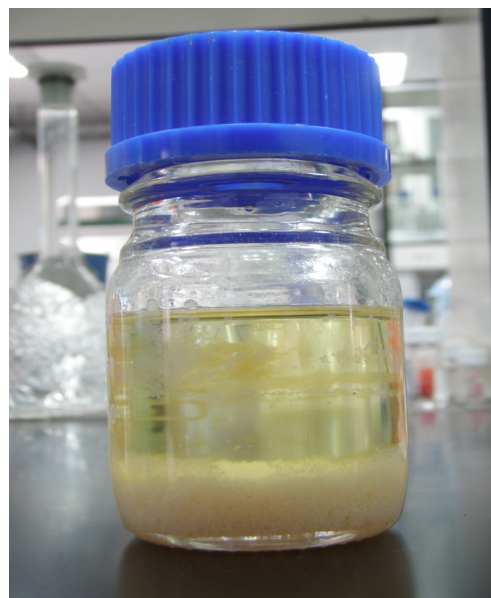


圖 4-17 Novozym 435 酵素進行轉酯化反應後的情況

上層相是生質柴油，下層相是固定化的 Novozym 435 酵素。

鹼製程製造的生質柴油經氣相層析儀 (Gas chromatography, GC) 分析得到的圖譜如圖 4-18 所示，各物質出現的時間和對應吸收峰面所示，標準品名稱和縮寫如表 4-14 所示。比對表 4-15 和圖 4-18 可以知道在圖 4-18 中，最大的波峰是溶劑 n-hexane，第二大的吸收峰是大豆油成分中最多量 linoleic acid 的甲基化產物 linoleic acid methyl ester (簡寫 C18:2)。將表 4-16 比對實驗前以同樣條件用 GC 檢測 7 個標準品得到的各標準品出現的時間 (見表 4-15)，即可知道在這次樣品中有哪些跟標準品一樣的成分。經由此方法可以知道生質柴油是由很多物質組成的混合物。

表 4-14 七個標準品名稱及對應的縮寫

標準品名稱	簡寫
methyl myristate	C14:0
methyl palmitate	C16:0
methyl palmitoleate	C16:1
methyl stearate	C18:0
methyl oleate	C18:1
methyl linoleate	C18:2
methyl linolenate	C18:3

表 4-15 七個標準品在 GC 檢測過程中的詳細資訊

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.933	29537	0.00	2232	0.00
6.645	760554211	99.24	140897305	99.55
7.057	65778	0.01	8656	0.01
7.277	65163	0.01	8845	0.01
7.485	37151	0.00	3917	0.00
7.680	38148	0.00	6840	0.00
7.867	20423	0.00	2477	0.00
C14:0 12.638	772686	0.10	146124	0.10
13.428	37816	0.00	3196	0.00
13.917	37955	0.00	3079	0.00
14.597	30582	0.00	2859	0.00
C16:0 17.163	821405	0.11	109066	0.08
C16:1 18.125	792025	0.10	96717	0.07
19.293	20169	0.00	2058	0.00
21.478	20746	0.00	2297	0.00
C18:0 24.707	845378	0.11	77208	0.05
C18:1 25.942	564686	0.07	45734	0.03
26.250	30078	0.00	3741	0.00
C18:2 28.625	805348	0.11	61235	0.04
C18:3 32.892	782071	0.10	51757	0.04
Totals	766371356	100.00	141535343	100.00

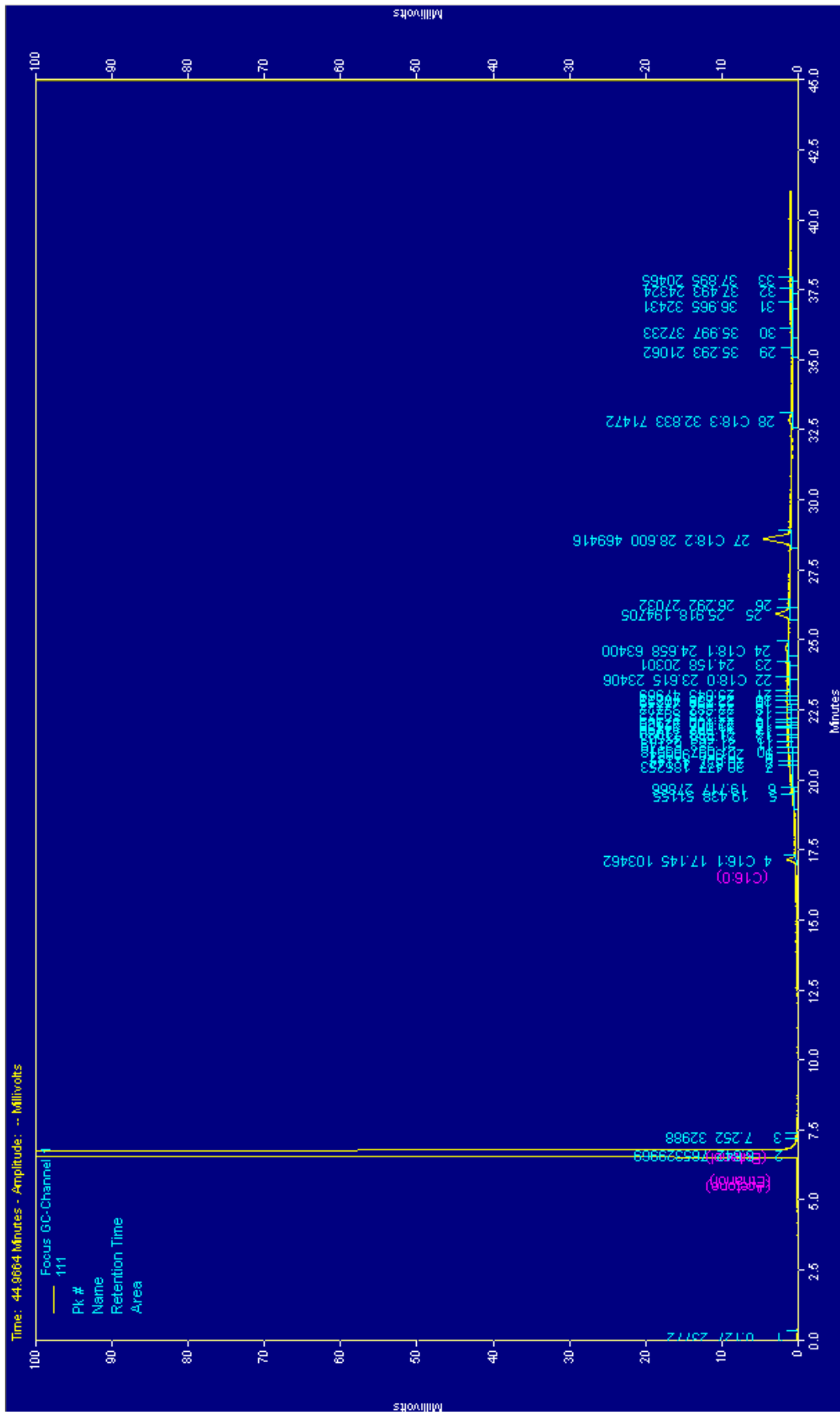


圖 4-18 驗製程製造的生質柴油 GC 圖譜

表 4-16 鹼製程生產的生質柴油 GC 標定結果

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
0.127	23772	0.00	2513	0.00	
6.642	765329969	99.72	140752761	99.86	
7.252	32988	0.00	3630	0.00	
C16:0 17.145	103462	0.01	12467	0.01	
19.438	51155	0.01	2733	0.00	
19.717	27866	0.00	3417	0.00	
20.477	185253	0.02	6768	0.00	
20.637	42144	0.01	5588	0.00	
20.960	90864	0.01	5673	0.00	
21.057	63518	0.01	5966	0.00	
21.283	62149	0.01	6098	0.00	
21.558	43503	0.01	5977	0.00	
21.668	71089	0.01	6142	0.00	
21.877	24439	0.00	7428	0.01	
22.005	22126	0.00	5930	0.00	
22.100	37965	0.00	5855	0.00	
22.378	59272	0.01	6149	0.00	
22.587	32722	0.00	5755	0.00	
22.798	47759	0.01	5767	0.00	
22.888	40822	0.01	4749	0.00	
23.043	47969	0.01	4675	0.00	
23.615	23406	0.00	3873	0.00	
24.158	20301	0.00	4139	0.00	
C18:0 24.658	63400	0.01	4632	0.00	
C18:1 25.918	194705	0.03	16879	0.01	
26.292	27032	0.00	3788	0.00	
C18:2 28.600	469416	0.06	35350	0.03	
C18:3 32.833	71472	0.01	4493	0.00	
35.293	21062	0.00	2440	0.00	
35.997	37233	0.00	2738	0.00	
36.965	32431	0.00	4055	0.00	
37.493	24324	0.00	2661	0.00	
37.895	20465	0.00	2796	0.00	
Totals		767446053	100.00	140953885	100.00

酵素-鹽酸混合製程是先用 *Candida rugosa* 酵素把大豆油水解成脂肪酸，再用鹽酸進行酯化反應轉變成生質柴油，鹽酸催化酯化反應前後的情況如圖 4-19 和圖 4-20 所示。比較酵素一步驟轉酯化反應和酵素-鹽酸混合製程這兩方法，酵素一步驟反應需要 43 小時，酵素-鹽酸混合製程僅需 16 小時。反應過程中酵素一步驟反應只需要 3 倍大豆油莫耳數的甲醇即可完成反應，酵素-鹽酸混合製程在第二階段的酯化反應中需要脂肪酸 20 倍的甲醇才可以完成反應。因為酵素-鹽酸混合製程需要兩步驟的反應和較多純化過程，所以產物的產率比較低；兩方法的產物性質在黏度和比重相同，酵素-鹽酸混合製程產物的酸價因為無法將脂肪酸完全轉化成生質柴油，所以會比酵素一步驟轉酯化反應高。

酵素兩步驟反應在水解反應後和酯化反應的情況如圖 4-21 和圖 4-22 所示。比較酵素兩步驟反應和酵素-鹽酸混合製程，反應時間的差異在酯化反應過程，Novozym 435 酵素酯化反應需要較長的時間；不過酵素兩步驟反應過程中都在室溫附近反應。兩者產物的黏度和比重相近，只有在酸價這項目上，酵素兩步驟反應會造成比較高的酸價，原因是酵素催化酯化反應的效能比鹽酸差。酵素兩步階段反應中第二步所使用的酵素可輕易地回收再利用，酵素-鹽酸混合製程中第二階段所用的鹽酸觸媒皆會存在甲醇和產物中，需要進一步的分離

純化過程後才能再次使用。

綜合比較起來，不管是酵素兩步驟反應或是酵素-鹽酸混合製程，過程中都會把大豆油先水解成脂肪酸再經酯化反應生成生質柴油，因為在第二階段的反應過程中無法將脂肪酸完全轉化成生質柴油，所以產物中的酸價值都會比鹼觸媒催化反應和酵素一步驟反應高，特別是酵素兩步驟反應。也因為產物中脂肪酸含量最高，產物在水洗過程中會有最嚴重的乳化現象，大大降低產率。四種反應方法的優缺點如表 4-19 所示。

酵素具有可在室溫下反應、副反應 (side reaction) 少、產物純度高、反應過程對環境友善、可用基因工程的方式增強酵素特性、可以使用高油酸的油脂、具備前瞻性等優點，在現今訴求生產過程具備轉化率高、分離純化容易、低能源消耗、減少產生廢棄物的要求，利用酵素來生產是個值得深入研究的方法。酵素兩步驟反應雖然具有以上酵素生產的優點，改善了酵素一步驟轉酯化反應中反應時間較長的缺點，不過仍然有產物的酸價偏高、需要去除產物中的脂肪酸、整體的產率偏低等缺點，故需要更進一步的改良才能具有工業化生產的潛力。



圖 4-19 酵素-鹽酸混合製程之酯化反應前情況

FFA 在甲醇加入後彼此可以互溶變成均一相。



圖 4-20 酵素-鹽酸混合製程進行酯化反應後情況

上層相為甲醇下層相是生質柴油。

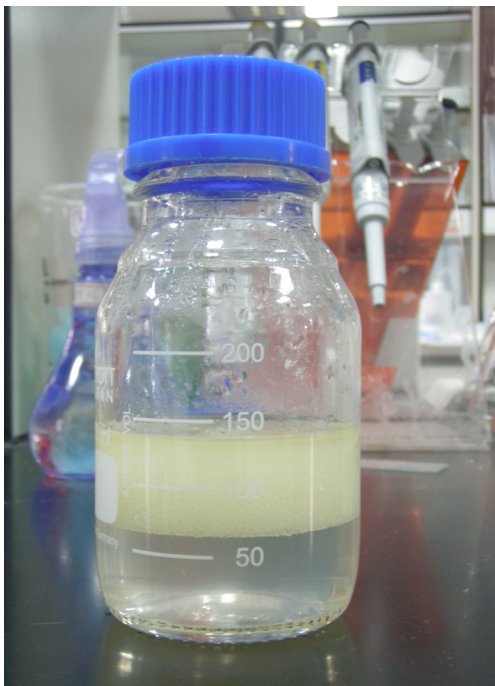


圖 4-21 酵素二步驟反應之水解反應後的情況

上層相為游離脂肪酸，下層相是酵素溶液。



圖 4-22 酵素二步驟反應之酯化反應後的情況

最上層為甲醇，中間黃色層是生質柴油，底層是 Novozym 435 酵素。

表 4-17 四種方法製造的產物性質比較

製程種類	酸價 (mgKOH/g)	黏度(mm ² /s)	密度 (g/ml)	產率 (%)
鹼製程	0.287	1.62	0.876	69.03
酵素反應	1.915	2.393	0.882	82.45
酵素-酸反應	2.119	1.62	0.878	75.17
酵素-酵素反應	3.120	1.68	0.890	66.01

表 4-18 四種製程產物的處理方法

製程種類	產物處理過程
鹼製程	減壓蒸餾 → 去離子水清洗 6 次
酵素反應	去離子水清洗 1 次
酵素-酸反應	減壓蒸餾 → 去離子水清洗 3 次
酵素-酵素反應	加丙酮離心→減壓蒸餾

表 4-19 四種製程的優缺點

製程種類	優點	缺點
鹼製程	反應時間短 產率高 產物品質佳	對原料油脂品質嚴苛要求 產物需要繁雜的純化處理過程
酵素反應	反應物純度高 整體產率高 全程在室溫下反應	反應時間長 酵素價格高昂
酵素-酸反應	可忍受低純度的油脂	第二步的觸媒難以重複利用 產物需要多次水洗去除酸觸媒
酵素-酵素反應	全程在室溫附近反應 可忍受低純度的油脂 固定化酵素反應後活性不變	反應後需要多步驟的純化 水洗後產物乳化情況嚴重 產率較低

第五章 結論與未來建議

5.1 實驗結論

本研究探討酵素二步驟生產生質柴油較佳反應條件，這方法可以改善酵素進行一步驟轉酯化反應需要長時間反應的缺陷；此外將 *Candida rugosa* 酵素回收與重複使用，並比較重複使用 *Candida rugosa* 酵素的水解效能。最後再跟三種製造生質柴油的方法相比較，找出各方法在製造和產物處理過程的優缺點。在二步驟生產生質柴油的實驗過程分成兩部份：

5.1.1 酵素水解部份

1. *Candida rugosa* 酵素的水解活性比 Novozym 435 酵素佳，*Candida rugosa* 酵素在 35 °C、pH 7.0 和大豆油/緩衝液=1/1 (v/v)，*Candida rugosa* 酵素使用量是反應大豆油重量的 0.25 wt%，反應 12 小時可得到 93.4 % 的脂肪酸產率；Novozym 435 酵素在 70 °C、pH 5.0 和大豆油/緩衝溶液/酵素組成比例為 10 g/ 5 g/ 1 g 的條件下反應 16 小時只可得到 51.4 % 的脂肪酸產率。因此 *Candida rugosa* 酵素比較適合用來大量生產純度高的脂肪酸。
2. Novozym 435 酵素比 *Candida rugosa* 酵素能承受更高的反應溫度，在超過 70 °C 時 Novozym 435 酵素依舊有不錯的水解反應活

性；*Candida rugosa* 酵素在 40°C 出現水解效能降低的情況，在 50°C 時脂肪酸產率只剩下 35°C 的一半，水解效能下降的程度非常明顯。

3. Novozym 435 酵素在 pH 5.0 弱酸性環境下有比較好的水解能力，*Candida rugosa* 酵素在 pH 7.0 中性環境下有最佳的水解反應；兩個酵素在鹼性環境下都沒有好的水解效果。
4. Novozym 435 酵素在使用量為大豆油重量的 1.0% 時有最好的水解效果，*Candida rugosa* 酵素在使用量為大豆油重量的 0.25% 時得到較佳的效果。當酵素用量再增高，兩者皆沒出現更好的成果。

5.1.2 酯化反應

1. Novozym 435 酵素在 30°C 時有最好的脂肪酸轉化率，隨著溫度的上升，轉化率漸漸降低；到 50°C 時降低非常明顯。這顯示較高的溫度不利於 Novozym 435 酵素進行脂肪酸的酯化反應。
2. 在甲醇/脂肪酸莫耳比到達 5，可得到脂肪酸轉化率達到 90% 以上；再提升甲醇/脂肪酸莫耳比到 10 或 15 後，脂肪酸轉化率小幅度上升至 96.9%。顯示較高的甲醇/脂肪酸莫耳比可提升脂肪酸轉化率。
3. Novozym 435 酵素使用量在脂肪酸和甲醇總重量的 2% 時有較佳的轉化率；再提高酵素使用量，脂肪酸轉化率的增加不甚明顯。
4. Novozym 435 酵素在反應 12 小時後可以得到超過 90% 的轉化率，

當反應時間繼續增加到 16 小時後，脂肪酸轉化率有微幅增加。

回收酵素的實驗分成兩部分：

5.1.3 *Candida rugosa* 酵素

重複使用 *Candida rugosa* 酵素發現脂肪酸產率會隨著使用次數增加而降低，回收酵素量的減少會造成脂肪酸產率下降，但酵素水解效能降低的影響比酵素量損失造成的影響還大。

5.1.4 Novozym 435 酵素

酯化反應後酵素活性平均值和反應前的平均值相差不多，且平均活性值在酵素未使用前的活性範圍內。比起重複使用 *Candida rugosa* 酵素，在重覆使用 Novozym 435 酵素時不需要考慮到 Novozym 435 酵素活性喪失的問題。

5.1.5 四種製程的比較

鹼觸媒反應具有最快的反應速度，其產物的酸價、黏度、比重皆符合規定；不過需要使用精製過的油脂，無法使用純度不高富含脂肪酸的油脂；Novozym 435 酵素是商品化固定酵素，產物純度和轉化率皆不低。文獻指出 Novozym 435 酵素可以同時進行酯化反應和轉酯化反應，具有利用低純度油脂的能力，不過冗長的反應時間造成商業

化運轉的機會非常小。酵素-鹽酸混合製程需要先把油脂水解成脂肪酸，再用酸觸媒進行酯化反應，特色是可以使用低純度的油脂，且反應時間比酵素轉酯化反應短；不過缺點是在第二步反應時使用到鹽酸會殘留在產物中，需要使用大量的水將其從產物中去除。洗滌後留在廢水中的鹽酸也須經過純化處理，到達高濃度後才可以再次利用。酵素二階段反應全程都在室溫附近反應，能源消耗最少；第二步反應用的酵素固定在載體上，可以輕易地回收再利用。不過產物的酸價值略高，需要再改進製程才能夠讓生質柴油的品質達到規定。

5.2 未來建議

1. 可以在水解反應後添加有機溶劑，協助游離的 *Candida rugosa* 酵素聚集在水相層，增加 *Candida rugosa* 酵素的回收率。
2. 文獻指出使用 Novozym 435 酵素進行酯化反應過程中添加異辛烷 (isooctane)，可以得到更高的酯化反應轉化率(Talukder et al., 2010)。
3. 文獻指出在酯化反應過程中加入甘油吸水，有助於提高酯化反應的轉化率，降低酯化反應的副產物水對 Novozym 435 酵素進行反應的干擾(Watanabe et al., 2007)。
4. *Candida rugosa* 酵素若固定在載體上，在反應後即可方便回收，

可預料酵素的穩定性會比較高。

5. 反應完成後可再增加一些去除脂肪酸的程序，讓產物酸價值可以降低，已達到生質柴油的規格。
6. 嘗試採用其他水解效能更高的酵素來進行水解反應，和其他反應效能更高的酵素來進行酯化反應，期望能縮短酵素二階反應的時間並提高產物品質。

參考文獻

- Abu Bakar Salleh, R.N.Z.R.A.R.a.M.B., 2006. New lipases and proteases. Nova Science Publishers, 159 pages pp.
- Agarwal, A.K., 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3): 233-271.
- Andrea Salis, M.P., Maura Monduzzi, Vincenzo Solinas, 2008. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodeisel synthesis. *journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 54(1-2): 6.
- Arora, D.K., 2003. *Handbook of Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker, 600 pp.
- ASTM, Standard test method for acid and base number by color-indicator titration. ASTM D974-97.
- Benjamin, S. and Pandey, A., 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12): 1069-1087.
- Canakci, M. and Van Gerpen, J., 1999. Biodiesel production via acid catalysis. *Transactions of the Asae*, 42(5): 1203-1210.
- Canakci, M. and Van Gerpen, J., 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the Asae*, 44(6): 1429-1436.
- Demirbas, A., 2008. *Biodiesel_A realistic fuel alternative for diesel engines*. Springer, 208 pp.
- Dennis Y.C. Leung, X.W., M.K.H. Leung, 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4): 1083-1095.
- Dong-Woo Lee, Y.-S.K., Ki-Jun Kim, Byung-Chan Kim, and Hak-Jong Choi, D.-S.K., Maggy T. Suhartono, Yu-Ryang Pyun, 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*,(179): 393-400.
- Drapcho, C.M., Nhuan, N.P. and Walker, T.H., 2008. *Biofuels engineering process technology*. McGraw-Hill Professional, 371 pp.
- Du, W., Xu, Y. and Liu., D., 2003. Lipase-catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnology and applied biochemistry*, 38: 103-106.
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V. and Norddahl, B., 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5): 1298-1315.
- Francisco J. Plou, M.B., Maria V. Calvo, Antonio Ballesteros and Eitel Pastor, 1996. High-yield production of mono- and di-oleglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 66-71.

- Freedman, B., Pryde, E.H. and Mounts, T.L., 1984. Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable-Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(10): 1638-1643.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5): 405-416.
- Gazzillo, P.E.S.a.J.A., 1991. Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68: 11-15.
- Ghadge, S.V. and Raheman, H., 2005. Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids. *Biomass & Bioenergy*, 28(6): 601-605.
- Goff, M.J., Bauer, N.S., Lopes, S., Sutterlin, W.R. and Suppes, G.J., 2004. Acid-catalyzed alcoholysis of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(4): 415-420.
- Haas, M.J., Michalski, P.J., Runyon, S., Nunez, A. and Scott, K.M., 2003. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80(1): 97-102.
- Heri Hermansyah, A.W., Misri Gozan, Rita Arbianti Tania Surya Utami, Masaki Kubo, Naomi Shibasaki-Kitakawa, Toshikuni Yonemoto, 2007. Consecutive reaction model for triglyceride hydrolysis using lipase. *JURNAL TEKNOLOGI*, 2: 151-157.
- <http://www.eia.doe.gov>, International Energy Outlook 2010 - Highlights. U.S. Energy Information Administration.
- Kaieda, M. et al., 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6): 627-631.
- Kaushal Rege, I.L.M., 2009. *Methods in Bioengineering: Nanoscale Bioengineering and Nanomedicine*. Artech House, 350 pages pp.
- Kirk, O. and Christensen, M.W., 2002. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development*, 6(4): 446-451.
- kuo, T.M., Harold W. Gardner, 2002. *Lipid Biotechnology*. CRC Press, New York, 728 pages pp.
- Kusdiana, D. and Saka, S., 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, 80(2): 225-231.
- Kusdiana, D. and Saka, S., 2004. Two-step preparation for catalyst-free biodiesel fuel production - Hydrolysis and methyl esterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113: 781-791.
- Lotero, E. et al., 2005. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. *Industrial &*

- Engineering Chemistry Research, 44(14): 5353-5363.
- Lotrakul, P. and Dharmstithi, S., 1997. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13(2): 163-166.
- Ma, F.R. and Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70(1): 1-15.
- Mahajan, S., Konar, S.K. and Boocock, D.G.B., 2006. Determining the acid number of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 83(6): 567-570.
- Natuurlijkerwijs.com, Fatty acid metabolism.
http://www.natuurlijkerwijs.com/english/Fatty_acid_metabolism.htm.
- Pandey, A., 2008. Handbook of plant-based biofuels. CRC Press, pp. 312
- Pienkos, P.T., 2007. The potential for biofuels from algae. In: n.r.e. laboratory (Editor), algae biomass summit, San Francisco, California, USA.
- Rosa Margesin, F.S., 1999. Biotechnological applications of cold-adapted organisms. Springer, 338 pp.
- Schwab, A.W., Dykstra, G.J., Selke, E., Sorenson, S.C. and Pryde, E.H., 1988. Diesel Fuel from Thermal-Decomposition of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65(11): 1781-1786.
- Shimada, Y. et al., 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(7): 789-793.
- Talukder, M.M.R., Wu, J.C., Fen, N.M. and Melissa, Y.L.S., 2010. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2): 6.
- Tsung Min Kuo, H.W.G., 2002. Lipid Biotechnology. CRC Press, New York, 728 pages pp.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Nishida, Y., Takagi, Y. and Shimada, Y., 2007. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84(11): 1015-1021.
- Ziejewski, M., Goettler, H., Pratt, G.L., 1986. International Congress and Exposition. Paper No. 860301, Detroit, MI.
- 王惠民, 2003. 以正十六烷回收 *Acinetobacter radioresistens* 脂肪酵素之研究. 國立成功大學化學工程學系博士論文, 160 pp.
- 李智傑, 2008. 酸性觸媒在生質柴油製程之研究. 國立成功大學化學工程學系碩士論文.
- 車用柴油全面添加 2% 生質柴油. In: ITRI 工業技術研究院 (Editor).
<http://www.biodiesel-tw.org/index.htm>.

經濟部能源局, 2010a. 2010 年能源產業技術白皮書. 經濟部.

經濟部能源局, 2010b. 愛護地球再加倍 車用柴油全面 添加 2%生質柴油

<http://www.moeaboe.gov.tw/Default.aspx?group=2>.

謝志強, 殷., 2008. 全球生質能源產業與技術發展現況與趨勢. 科技發展政策報導, 5: 15-39.