

Research Status of Biodiesel Production by Enzymatic Method and Its Prospect

Changmei Wang, Wudi Zhang, Yubao Chen, Fang Yin, Jianchang Li, Rui Xu, Shiqing Liu

Institute of Solar Energy; Engineering Re-search Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education; Provincial Key Laboratory of bioenergy and Environmental Biotechnology; Provincial Key Laboratory of Rural Energy Engineering; Yunnan Normal University, Kunming 650092, P. R. China
Email: wangcmzf@163.com, wooti@ynnu.edu.cn

Abstract: Non-renewable energy sources are declining. As a renewable energy and friendly to the environment, the technology of lipase catalyzed synthesis biodiesel has received extensive attentions. This paper reviews the sorts of lipase, resources of materials, and the methods of lipase use. Meanwhile, it points out the tendency of the research and development of lipase catalyzed synthesis biodiesel. It also provides ideas of biodiesel in the future.

Keywords: lipase; biodiesel; material source, research

酶法制备生物柴油的研究现状及展望

王昌¹, 张无敌, 陈玉保, 尹芳, 李建昌, 徐锐, 刘士清

云南师范大学 太阳能研究所, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心,
云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南省农村能源工程重点实验室, 云南 昆明 650092
Email: wangcmzf@163.com, wooti@ynnu.edu.cn

摘 要: 不可再生能源日益减少, 生物柴油具有可再生、环保等优点, 脂肪酶催化合成生物柴油已受到普遍关注。本文对用于制备生物柴油的脂肪酶、用于脂肪酶制备生物柴油的原料油脂, 脂肪酶制备生物柴油的使用方式等方面进行了综述。提出了脂肪酶制备生物柴油的研究与发展方向, 为今后脂肪酶催化制备生物柴油提供思路。

关键词: 脂肪酶; 生物柴油; 原料油脂; 研究进展

1 引言

生物柴油和传统的石化柴油相比具有很多的优点, 发展生物柴油在我国具有巨大的潜力, 将有利于保障我国的石油安全、生态环境的保护、促进农村的经济和产业发展、提高农民收入方面产生相当重要的作用^[1]。生物柴油主要是以动、植物油为原料, 通过转酯反应而制备成的长链脂肪酸酯类物质(脂肪酸甲酯或乙酯)。目前生物柴油的制备方法主要有化学法和生物酶法。化学法生产工艺较成熟, 是目前制备生物柴油常用的方法。但化学法存在能耗高、工艺复杂、醇消耗量大、环境污染等缺点。生物酶法制备生物柴油具有反应条件温和、醇用量小、产物易分离、环保

等优点。此外, 酶法对原料要求低, 游离脂肪酸完全可以被脂肪酶直接酯化, 副产物甘油分离简单, 降低了生产工艺要求和生产成本, 因而酶法制备生物柴油被认为是取代化学法生产生物柴油的绿色工艺^[2]。酶法合成生物柴油也存在一些缺点, 目前的脂肪酶对长链脂肪醇有效, 而对短链脂肪醇的转化率低; 短链醇对酶有一定的毒性, 酶的使用寿命短; 副产物甘油和水难以回收, 不但对产物形成抑制, 而且产物甘油也对酶有毒性, 使酶使用寿命缩短^[3]。本文对脂肪酶制备生物柴油的研究现状进行了综述。

2 生物酶法制备生物柴油现状

2.1 用于制备生物柴油的脂肪酶

脂肪酶全称为甘油三酰水解酶, 其基本功能是催

资助信息: 国家自然科学基金(90610034)、国家 863 计划(2007AA02Z231911)和教育部春晖计划(Z2006-1-65007)

化甘油酯水解为甘油和脂肪酸。脂肪酶最早应用于油脂工业是由油脂水解生产脂肪酸^[4]。随着非水相酶学研究的深入开展,以及对脂肪酶的热力学和动力学的研究发现^[5]:在一定的反应体系中,利用脂肪酶的催化作用,还可实现油脂与短链醇的酯交换反应,用于制备生物柴油。脂肪酶广泛存在于动物肝脏、植物种子和微生物中^[5]。不同来源的脂肪酶具有不同的催化特点和催化活力。目前,用于催化制备生物柴油的脂肪酶主要有 Novozym435 脂肪酶^[6-7]、南极假丝酵母 *Candida antarctica* 脂肪酶^[8-9]、*Candida rugosa*^[10]、固定化假丝酵母 *Candida* sp.99-125 脂肪酶^[11]、米根霉 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶^[12-13]、米根霉 IFO4697^[14-15]、华根霉 CCTCC M201021^[16]、葡枝根霉 YF6^[17]、洋葱假单胞菌 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶^[18-21]、荧光假单胞菌新型^[22]。此外,还有猪胰脂肪酶^[23-24]、*Penicillium Expansum* TS414^[25]、*Enterobacter agglomerans* 脂肪酶^[26],它们催化而得脂肪酸甲酯得率一般在 70%~100%之间^[27]。

2.2 用于脂肪酶制备生物柴油的原料油脂

2.2.1 植物油脂

来源于植物的油脂是较好的制备生物柴油原料。生产生物柴油原料的油料要具备生长快、单产高、含油量高的条件。不饱和脂肪酸含量高的油脂可避免冬季气温下降而凝固,油酸含量高的油脂所制备的生物柴油具有良好的贮存稳定性及燃烧特性^[28]。大豆油、棕榈油、棉籽油、葵花籽油、红花籽油、菜籽油、花生油、蓖麻籽油皆可作为酶法制备生物柴油的原料。此外,一些木本植物油脂,如桐油、麻疯树籽油,其中含有佛波酯 (phorbol ester)而不可食用,但油酸含量较高,也是制备生物柴油较好的原料^[12]。刘伟涛等^[29]研究了固定化脂肪酶 Lipozyme TLIM 和 Novozym 435 催化毛棉籽油和乙酸甲酯制备生物柴油,生物柴油得率达到 91.83%。李俊奎等^[30]研究了以石油醚提取的小桐子毛油和甲醇为原料,利用固定化 *Candida* sp.99-125 脂肪酶催化反应合成生物柴油,最高产率可达 93%,酶连续使用 14 批,产率仍然可保持在 70%以上。

2.2.2 动物油脂

动物油脂含较高的饱和脂肪酸,是制备生物柴油的原料之一,但目前以动物油脂为原料,采用酶法催化制备生物柴油的报道并不多见。Lu 等^[31]以猪油为

原料,在 *Candida* sp.99-125 催化下制备生物柴油,产率达 87.4%。Yuji 等^[32]以金枪鱼油为原料,采用固定化 *Candida antarctica* 脂肪酶逐步醇解工艺,生物柴油产率达 90%。凌云等^[24]等以混合猪油菜油为原料,采用猪胰脂肪酶为催化剂制备生物柴油,转化率偏低,只有 36%。

2.2.3 微藻油脂

微藻油脂是制备生物柴油的另一原料来源。Li 等^[33]曾报道利用 *Chlorella protothecoids* 微藻油脂,在固定化的 *Candida* sp. 脂肪酶催化下制备生物柴油,转化率达 98%,且该微藻的油脂含量达 44%~48% (细胞干重)。借助基因工程和遗传工程技术手段及光照培养技术,培养繁衍能力强、油脂含量高、生长周期短的工程微藻,降低微藻生物柴油生产成本,比植物油脂生产生物柴油更具有商业竞争力。

2.2.4 废弃油脂

餐饮业废弃的食用油、地沟油、植物油脂加工后的油脚可作为制备生物柴油的原料。虽然原料成本低,但在这些原料中聚合物和游离脂肪酸含量高,黏度高,进行转酯化反应前必须进行预处理,如用硅酸镁吸附除去游离脂肪酸等杂质,否则易导致催化剂失活^[34]。韩春阳等^[35]以餐饮废油为原料,固定化脂肪酶催化制备生物柴油,甲酯转化率达到 85.7%,脂肪酶在连续反应 266h 后,催化活性基本没有下降。苏敏光等^[36]利用中性脂肪酶催化泔水油与甲醇反应制备生物柴油,生物柴油产率可达 89.7%以上。

2.3 脂肪酶制备生物柴油的使用方式

2.3.1 游离酶法制备生物柴油

游离脂肪酶通过催化双相(O/W) 体系界面的转酯 / 酯化反应而制备生物柴油。基于油水界面活化效应的特点,脂肪酶催化制备生物柴油的反应速度较快,不受底物、产物的扩散限制,产物、副产物分离简单。Kaieda 等^[37]利用 *Rhizopus oryzae* 游离脂肪酶催化大豆油和甲醇的酯交换反应,发现 4%~30%水的存在有利于反应的进行。Kaieda 还比较了 *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* 3 种游离脂肪酶在无溶剂反应体系中转酯化大豆油生产生物柴油,发现 *Pseudomonas cepacia* 和 *Pseudomonas fluorescens* 菌脂肪酶对甲醇有着非常好的稳定性,其中又以 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶稳定性最好,转化率最高。苏敏光等^[36]利用游离中性脂肪酶催化泔水油与甲醇

反应制备生物柴油。通过 50g 泔水油正交实验获得最佳转酯化反应条件：油醇摩尔比 1 : 3，油酶质量比 1 : 1，温度 45℃，油溶剂质量比 1 : 0.6，反应时间 10h 后，生物柴油产率可达 89.7% 以上。吕丹等[38]采用游离脂肪酶 NS81006 催化含酸油脂制备生物柴油，生物柴油得率达 90%，离心分离可有效实现 NS81006 的回复使用，连续回用 5 个批次，游离脂肪酶活性未出现明显下降。

游离脂肪酶在反应体系中分散不均且容易聚集结块，不利于回收和重复利用，以及甲醇对酶的失活效应等因素，限制了其在工业规模生产生物柴油中的应用：通过固定化技术和全细胞催化剂的采用、甲醇流加方式的改进等技术手段的应用，改善酶的催化活力和稳定性，从而降低整个生产工艺成本，加快生物柴油工业化进程[2]。

2.3.2 固定化酶制备生物柴油

酶是高效专一性强的生物催化剂，但是自由酶在水溶液中很不稳定，可溶性酶一般只能一次起催化作用。同时酶是蛋白质，在高温、高离子浓度、强酸、强碱及部分有机溶剂等条件下均不够稳定，容易失活而降低其催化能力，这些不足大大限制了酶促反应的广泛应用[39]。20 世纪 70 年代出现的固定化酶技术克服了游离酶的不足。固定化细胞技术，是指用物理或化学的手段将游离细胞固定于限定的空间区域，并使固定后的细胞拥有良好的催化活性和重复使用性的一种方法[40]。近年来在生物柴油的制备研究中固定化酶有所应用，有望成为一种新型、高效、无污染、低成本生物柴油工业化生产方法[41-43]。

溶胶-凝胶法固定化脂肪酶制备工艺简单、力学性能稳定、生物相容性好，已成为当今酶固定化的热点研究领域之一。Nouredini 等[19]人利用以四甲氧基硅烷和异丁基三甲氧基硅烷为前驱体的溶胶——凝胶法固定 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶催化大豆油转酯化反应，酶的稳定性和催化活性显著提高，重复使用 11 次后，酶的活性仅丧失 5%。Yagiz 等[44]人以人工合成水滑石为载体制备固定化 Lipozyme TLIM 脂肪酶，并考察了温度、pH、粒径、时间对固定化效率的影响，用该固定化酶进行废油脂的转酯化反应，室温 (24℃) 反应 105h 后转化率达 92.8%，重复使用 7 次后，酶的残余活力为 36%。高阳等[45]人以非极性大孔树脂 NK A 为载体，用物理吸附法进行 *Candida* sp.99-125 脂肪酶的固定化，该法简便易行，在低水的

庚烷反应体系中，进行大豆油的转酯化反应，单批转化率为 97.3%，连续反应 19 批次，转化率为 70.2%，酶残余活力为 85.1%。上海大学的张宝华等[46]以丝瓜络为载体，对 *Pseudomonas fluorescens* 脂肪酶进行固定化，催化餐饮废油制备生物柴油，在 40℃、醇油摩尔比为 3 : 1，水质量分数 0.4%、无溶剂条件下，甲酯收率最高达 88.7%，重复使用 10 次后甲酯收率任达 85.5%，适合于工业化应用。李治林等[47]以硅藻土、聚氨酯树脂、氧化铝和海藻酸钠 4 种载体固定化米根霉细胞，结果表明聚氨酯树脂为适宜的固定载体，在 80mL 液体发酵培养基中，加入聚氨酯树脂 0.6g 时所制备得到的固定化细胞性能最佳，此时固定上细胞干质量为 0.556g，培养液酶活为 17.4U/mL。将此固定化细胞用于催化大豆油甲酯化反应，在 m(甲醇) : m(大豆油) 为 5 : 1 甲醇分批加入(每 12 h 加 1 批)的情况下，甲酯得率可达 94%。

2.3.3 复合脂肪酶协同催化制备生物柴油

复合脂肪酶的协同转酯作用可解决单一脂肪酶受酰基转移速度的影响，而导致转化效率低的问题。对复合酶与单一脂肪酶催化进行比较研究，可探索出能有效提高脂肪酶转化效率的生物酶法新工艺。周位等[2]研究了在无溶剂体系中，Novozym 435 分别与 Lipozyme TLIM 和 Lipozyme RMIM 均以 70/30 质量比混合时，甲酯得率分别达到 94.52 % 和 96.25 %，比 Novozym435 单独催化时的甲酯得率分别提高了 9.52 % 和 9.99 %。在叔丁醇体系中，当 Novozym435 与 Lipozyme TLIM 和 Lipozyme TLIM 分别以 60/40 和 80/20 的质量比混合时，其甲酯得率分别为 85.06 % 81.5 %，比 Novozym 435 单独催化的效率分别提高了 9.89 % 和 7.48 %。优化叔丁醇体系中复合酶催化条件后，甲酯得率达 92%。蒋建新等[48]研究了 Novozym435 和 Lipozyme TLIM 混合脂肪酶催化香叶树籽油制备生物柴油，采用叔丁醇作为反应体系的溶剂，最优反应条件为反应温度 38.5℃、甲醇与油摩尔比 4 : 1、叔丁醇与油体积比 1 : 1.5、酶用量为油质量的 4%，此时反应转化率达 90.09%。当两种酶按 1 : 3 质量比混合使用时，具有协同催化作用，既可提高反应转化率，又可降低酶的使用成本。

3 展望

脂肪酶法制备生物柴油已成为国内外研究者关注的热点。国内外研究者已取得的研究成果，特别是获

得了许多转化率极高的不同来源脂肪酶,为脂肪酶催化制备生物柴油的产业化进程奠定了坚实的基础。笔者认为今后的研究方向为:①对酶制剂的研究,利用DNA重组技术可生产重组脂肪酶,降低酶的生产成本,改变其热稳定性、脂肪酸链长度专一性、底物专一性、醇链长度专一性、醇耐受性及pH稳定性。对于已发现的转化率高、连续生产酶活损失少的脂肪酶,应着重考虑如何降低其制造成本和使用成本。②原料的解决,鉴于国家产业政策不允许利用食用油生产生物柴油,应加大对非食用油脂,如餐饮废油脂等的脂肪酶催化转化研究,还可加大以动物油脂为原料,使用酶法制备生物柴油的研究。③对酶的使用方式进行改进,脂肪酶固定化技术的成功与否是酶法合成生物柴油能否得以工业化应用的关键,获得廉价、易于活化和制备的固定化酶是研究的重点。

随着石油资源的日益枯竭以及人们对环境的日益关注,可再生、对环境友好的生物柴油已被认为是一种新的可替代石化柴油的清洁燃料,国内外已经建成了各种规模的生物柴油生产厂。随着生物酶法合成生物柴油的研究与产业化进程的加速,酶法催化制备生物柴油技术将会以其高效、安全、节能、环保、成本低等优点得到广泛应用。

References (参考文献)

- [1] Zhang Wudi, Yin Fang, Li Jianchang, et al, Status Quo and Development of Biodiesel[J], *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2003, (3), P27-30(Ch).
张无敌, 尹芳, 李建昌, 等. 生物柴油的开发利用现状分析[J], 生物质能利用, 2003, (3), P27-30.
- [2] Li Yuyang, Sun Peihui, Hu Jigeng, et al, Research Progress on Biodiesel Production by Lipase Catalysis [J], *China Biotechnology*, 2008, 28(10), P136-140(Ch).
李宇扬, 孙佩慧, 胡基埂, 等. 脂肪酶催化制备生物柴油的研究进展[J], 中国生物工程杂志, 2008, 28(10), P136~140.
- [3] LI Changzhu, JIANG Lijuan, CHENG Shuqi. Biodiesel—Green Energy [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
李昌珠, 蒋丽娟, 程树棋. 《生物柴油—绿色能源》[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [4] Gu Wenling, Research Progress of Lipase Hydrolytic Technology [J], *Western Grain and Oil Technology*, 1998, 23 (6), P31 - 35(Ch).
顾文玲, 脂肪酶油脂水解技术的研究及进展[J], 西部粮油科技, 1998, 23 (6), P31 - 35.
- [5] YUAN Qinsheng. Modern enzymology[M]. Shanghai: East China University Press, 1998.
袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1998.
- [6] Wu Hong, Zong Minhua, Lou Wenying, Immobilized Lipase Catalyzed Waste Oil into Biodiesel in Solvent-free System[J], *Journal of Catalysis*, 2004, 25(11), P903-908(Ch).
吴虹, 宗敏华, 娄文勇, 无溶剂系统中固定化脂肪酶催化废油脂转酯生产生物柴油[J], 催化学报, 2004, 25(11), P903-908.
- [7] Modi M K, Reddy J R C, Rao B V, et al, Lipase - catalyzed mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2), P1260 -1264 .
- [8] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, et al, Enzymatic Production of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using t-butanol as a Solvent[J], *Bioresource Technol*, 2007, 98(3), P648-653.
- [9] Xu Y, Du W, Liu D, et al . A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent - free medium [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(15), P1239 -1241.
- [10] Linko YY, M Lämsä, A Huhtala, et al. Lipase biocatalysis in the production of esters [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995, 72(11), P1293-1299.
- [11] GAO Jing, WANG Fang, TAN Tianwei, et al, Synthesis of biodiesel from waste oil by immobilized lipase [J], *Journal of Chemical Industry and Engineer* , 2009, 56(9), P1727-1730(Ch).
高静, 王芳, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化废弃油脂合成生物柴油的研究, 化工学报, 2005, 56 (9), P1727~1730
- [12] Shan S, Gupta M N, Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a stem[J]. *Pro Biochem*, 2007, 42, P409-414.
- [13] MATS UMOT O T, T AKAHASH I S, KA IEDA M, et al .Yeast whole - cell biocatalyst constructed by intracellular over production of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57 (4), P515 - 520 .
- [14] Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, et al. Whole cell biocatalyst for Biodiesel fuel production utilizing *rhizopus oryzae* cells immobilized with in biomass support particles[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8(1), P9-43.
- [15] LI Lilin, DU Wei, LIU Dehua, et al, Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from Several Oils in a Novel Reaction Medium[J], *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2006(6), 799-803 (Ch).
李俐林, 杜伟, 刘德华, 等. 新型反应介质中脂肪酶催化多种油脂制备生物柴油. 过程工程学报, 2006(6), P799-803.
- [16] He Qin, Xu Yan, Ten Yun. et al, Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis* [J]. *Journal of Catalysis*, 2008(1), P41-46(Ch).
贺芹, 徐岩, 滕云, 等. 华根霉全细胞脂肪酶催化合成生物柴油[J], 催化学报, 2008(1), P41-46.
- [17] Hu Xiaojia, Jiang Mulan, Preparation of biodiesel catalyzed by immobilized whole cell *Rhizopus Stolonifer*, YF6 [J], *China Oils and Fats*, 2008, 33(4), P47-49(Ch).
胡小加, 江木兰, 固定化全细胞葡枝根霉 YF6 合成生物柴油的研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(4), P47-49(Ch).
- [18] Lara Pizarro A V, Park E Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth[J]. *Pro Biochem*, 2003, 38(7), P1077-1082.
- [19] Nouredini H. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(7), P769-777.
- [20] Veena K, Shweta S. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from *Madhuca indica*[J]. *Energy & Fuels*, 2007, (21), 368-372.
- [21] Guo Daoyi, Zhang Yun, Preparation of biodiesel from soybean oil catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* G63 [J], *China Oils and Fats*, 2008, (4), P54-57(Ch).
郭道义, 张云, 固定化洋葱假胞菌 G63 脂肪酶转酯化大豆油合成生物柴油[J], 中国油脂, 2008, (4), P54-57.
- [22] Wang Gang, Luo Yu, Production of Biodiesel Catalyzed by a Novel Lipase LipB52 from *Pseudomonas fluorescens* [J], *Journal of East China University of Science and Technology (Nature Science Edition)* , 2008, (4), P197-201(Ch).
王刚, 罗宇, 新型脂肪酶 LipB52 催化生物柴油[J], 华东理工大学学报, 2008, (4), P197-201.
- [23] Ariela V Paula. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and bio-

- diesel [J]. *Chem Techno Biotechnol*, 2007, 82(3), P281-288.
- [24] Ling Yun, Chang Liang, Zhao Congcong, et al, Research on optimal conditions of waste pigskin oil lipase-catalyzed synthesis of biodiesel [J]. *Leather Science and Engineering*, 2008, 18(5), P44-47(Ch).
凌云, 常亮, 赵丛丛, 等. 脂肪酶催化猪皮废油制备生物柴油最优工艺条件的探讨[J], *皮革科学与工程*, 2008, 18(5), P44-47.
- [25] Xue Jianping, Su Min, Application of *Penicillium expansum* TS 414 lipase in synthesis of biodiesel [J]. *Journal of Cereals and Oils*, 2008(4), P16-18(Ch).
薛建平, 苏敏, *Penicillium expansum* TS414 青霉菌脂肪酶催化合成生物柴油研究[J], *粮食与油脂*, 2008(4), P16-18.
- [26] Zhang Zhenqian, Guan Chunyun, Preparation of rapeseed oil biodiesel by catalysis of immobilized lipase of *Enterobacter agglomerans* [J]. *China Oils and Fats*, 2010, 35(2), P46-50(Ch).
张振乾, 官春云, 固定化 *Enterobacter agglomerans* 脂肪酶生产菜籽油生物柴油的研究[J], *中国油脂*, 2010, 35(2), P46-50.
- [27] Shu Zhengyu, Yang Jiangke, Huang Ying et al, Resources and Current State of Lipases Used in Biodiesel Production [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007(11), P1027-1030(Ch).
舒正玉, 杨江科, 黄瑛, 等. 生物柴油生产用脂肪酶资源及研究发现[J], *湖北农业科学*, 2007(11), P1027-1030.
- [28] PINTO A C, GUARIEIRO L L N, REZENDE M J C, et al. Biodiesel: an overview [J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, 16: 1313-1330.
- [29] Weitao Liu, Liya Zhou, Yanjun Jiang, Immobilized lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from crude cottonseed oil [J]. *Institute of Microbiology*, 2009, 25(12), P1996-2002(Ch).
刘伟涛, 周丽亚, 姜艳军, 固定化脂肪酶催化毛棉籽油制备生物柴油, *生物工程学报*, 2009, 25(12), P1996-2002.
- [30] Li Junkui, Wang Fang, Tan Tianwei, Immobilized lipase catalyzed crude oil from *Jatropha curcas* into biodiesel [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science)*, 2010, 37(2), P100-103(Ch).
李俊奎, 王芳, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化小桐子毛油合成生物柴油[J], *北京化工大学学报 (自然科学版)*, 2010, 37(2), P100-103.
- [31] Lu Jike, Nie Kaili. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized lipase *Candida sp.* 99-125 in organic solvent system [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(9), P1367-1370.
- [32] Yuji S, Yomi W, Akio S, et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002(7), P133-142.
- [33] LIX, XU H, WU Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(4), P764-771.
- [34] CASIMIR C A, SHU W C, GUAN C L, et al. Enzymatic approach to biodiesel production [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22), P8995-9005.
- [35] Han Chunyang, Yue Xiqing, Immobilized lipase catalyzed waste oil into biodiesel [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2009, 40(4), P494-496(Ch).
韩春阳, 岳喜庆, 固定化脂肪酶催化餐饮废油合成生物柴油研究[J], *沈阳农业大学学报*, 2009, 40(4), P494-496.
- [36] Su Minguang, Yu Shaoming, Wu Ke et al, Study on the Conditions of Swill Oil Produced Biodiesel by Enzymatic [J]. *Anhui Chemical Industry*, 2009, 35(6), P16-19(Ch).
苏敏光, 于少明, 吴克, 等. 酶促泔水油生产生物柴油条件的研究[J], *安徽化工*, 2009, 35(6), P16-19.
- [37] Kaieda M, Samukawa T, Matsumoto T et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without organic solvent [J]. *Biosei Bioeng*, 1999, 88(6), P627-631.
- [38] Lv Dan, Du Wei, Liu Dehua et al, Study on Soluble Lipase NS81006-Mediated Alcoholysis of Oils Containing FFA for Biodiesel Production [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2010, 24(1), P82-86(Ch).
吕丹, 杜伟, 刘德华, 等. 游离脂肪酶 NS81006 催化含酸油脂制备生物柴油的应用研究 [J], *高校化学工程学报*, 2010, 24(1), P82-86.
- [39] Yao Xianming, Li Changzhu, Liu Rukuan et al, Development of Immobilized Lipase for Biodiesel Production [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2007, (4), 81-83 (Ch).
姚先铭, 李昌珠, 刘汝宽, 等. 固定化酶催化酯交换反应制备生物柴油研究进展, *湖南农业科学*, 2007, (4), P81-83.
- [40] SUN Zhihai. Biocatalysis technology [M]. *Bei Jing: Chemical Industry Press*, 2005.
孙志浩. 生物催化工艺学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [41] KAZUHIRO B, MASARU K, TAKESHIM, et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8(1): 39-43.
- [42] SHINJI H, HIDEKI Y, MASARU K, et al, Effect of fatty acid-membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21(2): 155-160.
- [43] Zeng Jing, Du Wei, Xu Yuanyuan et al, Effect of Cultivation parameters on *Rhizopus oryzae* IFO Cell-catalyzed Transesterification of Vegetable Oils for Biodiesel Production [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(10), P17-20(Ch).
曾静, 杜伟, 徐圆圆, 等. 培养过程参数对霉菌 *Rhizopus oryzae* IFO 细胞催化植物油酯合成生物柴油的影响研究 [J], *食品与发酵工业*, 2005, 31(10), P17-20.
- [44] Yagiz F, Kazan D, Akin AN. Biodiesel Production from Waste Oils Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2007, 143(3), P262-267.
- [45] Gao Yang, Tan Tianwei, Nie Kaili, et al. Immobilization of Lipase on Macroporous resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous media [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22 (1), P114-118.
高阳, 谭天伟, 聂开立, 等. 大孔树脂固定化脂肪酶及在微水相中催化合成生物柴油的研究, *生物工程学报*, 2006, 22(1), P114-118.
- [46] Zhang Baohua, Qian Fei, Ye Jundan et al, Immobilization of a Specific Lipase and Its catalysis in Preparing Biodiesel [J]. *Petrochemical Technology*, 2009, 38(12), P1336-1341(Ch).
张宝华, 潜飞, 叶俊丹, 等. 脂肪酶的固定化及其催化合成生物柴油 [J], *石油化工*, 2009, 38(12), P1336-1341.
- [47] Li Zhilin, Li XUN, Wang Fei, et al, Study on Preparation of Biodiesel by Whole-cell Biocatalysis—Preparation and Catalytic Capability of Immobilized Cells [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2009, 29(1), P18-22(Ch).
李治林, 李迅, 王飞, 等. 全细胞生物催化制备生物柴油研究——固定化细胞的制备及其催化性能 [J], *林产化学与工业*, 2009, 29(1), P18-22.
- [48] Jiang Jianxin, Wang Weigang, Wu Yu, et al. Study on transesterification of *Lindera communis* oil to produce biodiesel by immobilized lipase [J]. *Modern Chemical Industry*, 2009, 29(1), P289-292(Ch).
蒋建新, 王卫刚, 吴昱, 等. 固定化脂肪酶催化制备香叶树籽生物柴油研究, *现代化工*, 2009, 29(1), P289-292.