

## 固定化全细胞催化可再生油脂合成生物柴油的稳定性

孙婷, 杜伟, 刘德华, 里伟, 曾静, 戴玲妹

清华大学化工系, 北京 100084

**摘要:** 酶法合成生物柴油具有反应条件温和、酶用量小、无污染物排放、产物易分离回收等优点, 越来越得到关注。全细胞催化剂, 无需酶的提取和纯化, 减少了酶活损失, 有望大幅降低生产成本; *Rhizopus oryzae* IFO4697 全细胞可以有效催化植物油脂合成生物柴油, 进一步提高全细胞在催化植物油脂甲醇解制备生物柴油过程中的稳定性, 对于工业放大具有重要意义。本实验对固定化全细胞 *Rhizopus oryzae* IFO4697 催化植物油脂合成生物柴油的稳定性进行了系统地研究, 结果表明: 反应体系含水量对于全细胞催化剂的反应活性和催化稳定性有重要影响, 5%~15%含水量适宜; 研究范围内, 载体粒度及干燥方式对稳定性影响不显著; 经过戊二醛交联后, 全细胞催化油脂甲醇解反应的稳定性显著提高, 1200 h 反应后, 仍然可以保持 75%的生物柴油得率; 真空抽滤直接回用的方式有利于稳定性的保持。在优化条件下, 回用 20 个批次, 生物柴油得率可维持在 80%。

**关键词:** 生物柴油, 全细胞催化剂, 转酯化反应, 稳定性

## Stability of whole cell biocatalyst for biodiesel production from renewable oils

Ting Sun, Wei Du, Dehua Liu, Wei Li, Jing Zeng, and Lingmei Dai

Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Lipase-mediated biodiesel production becomes increasingly important because of mild reaction conditions, pollution free during the process and easy product separation. Compared with traditional immobilized lipase, whole cell biocatalyst is promising for biodiesel production because it is easy to prepare and has higher enzyme activity recovery. *Rhizopus oryzae* IFO4697 can be used as the catalyst for biodiesel production. To further study the stability of the whole cell biocatalyst is extremely important for its further application on large scale. This paper focuses on the stability study of *Rhizopus oryzae* IFO4697 when used for the methanolysis of renewable oils for biodiesel production. The results showed that water content was important for achieving high catalytic activity and good stability of the biocatalyst. The optimum water content was found to be 5%–15%. Both particle size and desiccation methods showed no obvious effect on the stability of the biocatalyst. With GA cross-linking pretreatment, the stability of the biocatalyst could be improved significantly. When *Rhizopus oryzae* IFO4697 repeatedly used for next batch reaction, direct vacuum filtration was found to be a good way for the maintenance of good stability of the biocatalyst. Under the optimum reaction conditions, the methyl

**Received:** March 4, 2009; **Accepted:** July 10, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20706034), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020203), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB714302), Tsinghua Fundamental Research Funding.

**Corresponding author:** Wei Du. Tel: +86-10-62782654; E-mail: duwei@mail.tsinghua.edu.cn

Dehua Liu. Tel: +86-10-62792128; E-mail: dhliu@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 20706034), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA020203), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2007CB714302), 清华大学研究基金项目资助。

ester yield could keep over 80% during 20 repeated reaction batches.

**Keywords:** biodiesel, whole cell biocatalyst, methanolysis, stability

生物柴油, 指由大豆油、蓖麻油等植物油或者动物脂肪等油脂类物质与短链醇(如甲醇、乙醇等)经过酯交换反应而得到的有机脂肪酸酯类物质。生物柴油作为一种可再生替代能源, 具有来源广泛、可再生、燃烧充分等优势, 其环境友好性和可再生性使其具有很强的竞争力<sup>[1]</sup>。

生物柴油的制备主要包括化学法和生物酶法。化学法合成生物柴油的技术相对成熟, 但目前在工业上也有明显的缺点: 使用碱催化剂时对原料要求高, 需要严格控制油脂中游离脂肪酸和水分的含量, 残留碱时柴油中有皂生成, 容易堵塞管道; 生成的甲酯、甘油以及多余的甲醇难以回收, 处理成本高; 反应过程中有废酸或废碱液排放, 造成环境污染<sup>[2]</sup>。

酶法合成生物柴油具有条件温和、醇用量小、无污染物排放等优点, 引起越来越多的关注<sup>[3-5]</sup>。固定化酶催化油脂甲醇解合成生物柴油的研究较多, 内容主要包括固定化载体、反应工艺条件、酰基受体等, 然而廉价、制备方法简单、易活化的载体不易制备, 使固定化酶的成本较高。近年来, 一些学者致力于固定化全细胞催化剂催化油脂甲醇解制备生物柴油的研究, 与固定化酶相比, 无需酶的提取和纯化, 减少了酶活失, 降低了脂肪酶的生产成本(图 1)<sup>[6]</sup>。

日本大阪大学学者率先报道了 *Rhizopus oryzae* IFO4697 米根霉全细胞催化植物油脂甲醇解的反应情况, 3 步添加甲醇, 反应时间 72 h, 可以得到 90% 以上的生物柴油得率<sup>[7-8]</sup>, 里伟等<sup>[9-10]</sup>优化了叔丁醇体系下的反应条件, 回用 6 个批次得率在 70% 以上,

油脂原料中的脂肪酸、磷脂等对全细胞的催化活性没有负面影响; Ban 等<sup>[11]</sup>研究发现, 将全细胞经过戊二醛交联处理后, 经过 6 批次反应, 胞内酶的活力仍无明显降低。进一步研究全细胞催化剂制备过程的各种影响因素对于稳定性的影响, 提高全细胞催化剂的回用稳定性, 对于降低脂肪酶的使用成本有重要意义。本研究对全细胞催化剂 *Rhizopus oryzae* IFO4697 的稳定性影响因素固定化载体粒度、油脂诱导物、干燥方式、预处理及回用方式等进行了考察, 系统研究了全细胞催化剂制备过程中的各种因素对于稳定性的影响, 为今后的研究提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

米根霉 *Rhizopus oryzae* IFO 4697。实验所用精制大豆油由北京艾森绿宝油脂有限公司生产, 橄榄油为北京品利食品有限公司生产, 菜籽油和棕榈油为湖南海纳百川生物工程有限公司提供。油酸甲酯、亚油酸甲酯、硬脂酸甲酯、棕榈酸甲酯和十七碳酸甲酯均购于 Sigma 公司, 色谱纯试剂。其他试剂均为市售分析纯。载体为聚氨酯, 粒度根据实验需要分别为 5 mm×5 mm×5 mm、8 mm×8 mm×5 mm、10 mm×10 mm×5 mm, 空隙率 97%。

气相色谱仪 GC14B(日本岛津公司); 真空冷冻干燥机 FDU-810(日本东方日化公司); 超声波细胞粉碎机 JY92-II(宁波新芝科器研究所); 电子天平 Exploren(美国 OHAUS 公司)。

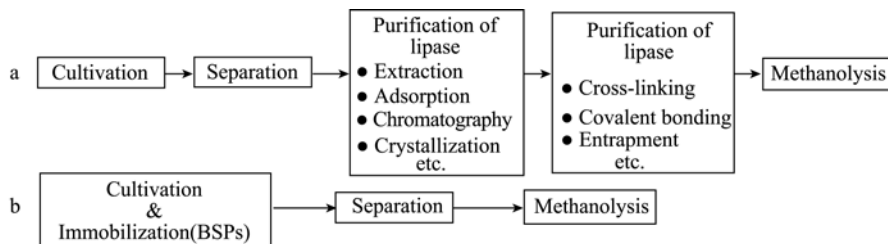


图 1 全细胞与固定化酶催化油脂甲醇解<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Processes of biodiesel production with immobilized lipase (a) and whole-cell as the catalyst (b)<sup>[4]</sup>.

## 1.2 细胞培养

斜面培养基: 马铃薯蔗糖培养基(PSA)。将 200 g 马铃薯切成小块并熬成汁, 把马铃薯汁与 20 g 蔗糖溶于 1 L 水中, 并加入 20 g 琼脂, 121°C 高温灭菌 15 min。接种斜面置于 28°C 恒温培养箱中 3 d。

摇瓶培养基: 碳源 30 g/L, 蛋白胨 70 g/L, NaNO<sub>3</sub> 1.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.244g/L。当对某因素进行研究时, 其他因素用量保持不变。将斜面孢子接入培养基中, 接种量为 10<sup>6</sup> 孢子数/100 mL 培养基, 加入载体量为 1.0 g/100 mL。然后将装有培养基的摇瓶置于恒温 35°C、150 r/min 摇床培养 72 h。细胞培养完后, 水洗、过滤、干燥至恒重后备用。真空冷冻干燥需先在 -72°C 下冰冻 1 h, 再用真空冷冻干燥机干燥 24 h; 或者室温自然条件下干燥 24 h。

## 1.3 固定化细胞的交联处理

将 1.2 节中制备完成的固定化细胞在一定浓度的戊二醛溶液中浸泡一定时间后过滤, 再用缓冲液浸泡洗去残留戊二醛, 自然条件下干燥 24 h。戊二醛交联条件: 25°C, pH 6.8, 戊二醛浓度 0.1%, 时间 1 h。

## 1.4 胞内酶活的测定

酶活力单位定义: 35°C、pH 6.8 的条件下, 每分钟催化三丁酸甘油酯水解生成 1 μmol 脂肪酸的酶量定义为 1 个酶活力单位。

50 mL 三角瓶中加入 20 mL 振荡乳化过的含 10% 三丁酸甘油酯的磷酸缓冲液, 放入 35°C 恒温摇床中预热 15 min, 加入 0.2 g 固定化细胞(净生物量), 放入 35°C 恒温摇床中反应 15 min, 加入 95% 乙醇 15 mL 终止反应, 酚酞做指示剂, 用浓度为 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定, 消耗体积为 V<sub>1</sub>, 空白在加细胞前先加入乙醇, 消耗 NaOH 体积为 V<sub>0</sub>。计算出胞内酶活。

$$\text{细胞胞内酶活}(\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})) = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1000}{m \times t}$$

V<sub>1</sub>——试样所消耗的 NaOH 溶液的体积, mL;

V<sub>0</sub>——空白实验所消耗的 NaOH 溶液的体积, mL;

c——NaOH 溶液的浓度, mol/L;

m——固定化细胞的质量, g;

t——反应时间, min。

## 1.5 固定化全细胞催化剂催化油脂甲醇解反应制备生物柴油

采用醇油摩尔比为 1:1, 分 3 步等量加入甲醇的方式进行转酯化反应<sup>[5,10]</sup>。将 9.65 g 植物油(如无特殊说明均指大豆精制油)和 0.35 g 甲醇混合物装于 50 mL 具塞三角瓶中, 加入 15%(基于油重)pH 6.8 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(0.1 mol/L), 混合均匀, 再加入净生物量基于油重 5% 的全细胞催化剂, 置于 35°C、150 r/min 摇床中进行反应, 定时取样。3 步反应时, 分别于 24 h 和 48 h 加入第 2、第 3 次甲醇。将所取的样品进行离心, 取上清液与十七碳酸甲酯(内标物)混合溶于正己烷中, 振荡均匀, 用气相色谱测定反应物中的脂肪酸甲酯含量。全细胞催化剂在批次反应结束后, 真空抽滤后回用。

## 1.6 气相色谱分析

气相色谱仪 GC 14B, 毛细管气相色谱柱 CB-FFAP, FID 检测器。

程序升温: 初始柱温 180°C, 保持 0.5 min, 以 15°C/min 的速率升温到 250°C, 保持 6 min。检测器温度为 260°C, 进样口温度为 250°C。

内标法: 待测样品离心后, 取 5 μL 上清液溶于 300 μL 无水乙醇中, 再加入 300 μL 0.412 mg/mL 的十七碳酸甲酯-正己烷溶液(内标), 振荡混合均匀, 取该混合液 1 μL 注入气相色谱仪进行测定。

根据测得的样品浓度可以计算生物柴油得率:

$$\text{生物柴油得率}(\%) = \frac{\text{反应液中实际生物柴油浓度}}{\text{理论上完全反应时反应液中生物柴油浓度}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化载体粒度对于全细胞催化油脂甲醇解稳定性的影响

全细胞催化剂 *Rhizopus oryzae* IFO4697 依靠菌种本身絮凝性<sup>[12]</sup>, 在培养的同时实现了在聚氨酯多孔载体上的固定。目前针对 *Rhizopus oryzae* IFO4697 催化植物油甲醇解反应合成生物柴油的反应体系、反应条件<sup>[7-10,13-15]</sup>做了很多研究, 但对于固定化载体的影响并没有涉及。本研究将 *Rhizopus oryzae* IFO4697 固定在不同粒度(5 mm×5 mm×5 mm、8 mm×8 mm×5 mm、10 mm×10 mm×5 mm)的载体上, 考察催化剂的粒度对催化速率和反应稳定性的影响情况分别如

图 2、3 所示。初始反应速率指酶促反应最初阶段 (30 min) 每分钟产生脂肪酸甲酯的毫摩尔数。

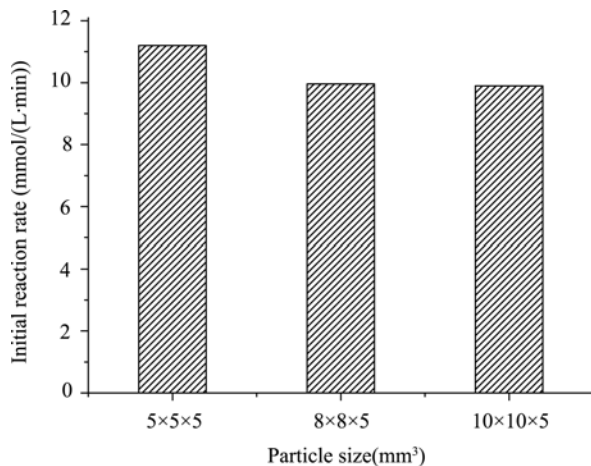


图 2 不同粒度载体的初始反应速率

Fig. 2 Initial reaction rate with different size of whole cell catalyst. Reaction conditions: 35°C, 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L, 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight).

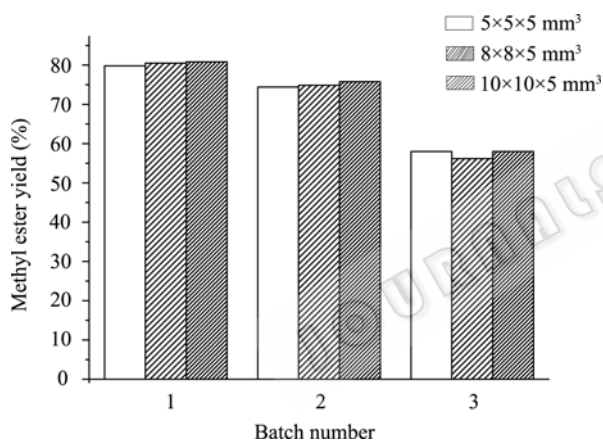


图 3 不同载体粒度的固定化全细胞回用情况比较

Fig. 3 Repeated methanolysis reaction using whole cell biocatalyst with different size. Reaction conditions: 35°C, 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight), three stepwise addition of methanol with one molar equivalent 24 h.

研究结果表明小粒度全细胞催化剂具有较高的催化速率。而在 3 步甲醇解 72 h 之后, 不同粒度的全细胞催化剂所得的甲酯得率基本相同。实验中在净细胞量相同的情况下, 固定在不同大小的载体上的全细胞催化剂显示出相同的回用稳定性, 表明载体大小对于催化剂稳定性没有明显影响。

Journals.im.ac.cn

## 2.2 戊二醛交联对于全细胞催化油脂甲醇解稳定性的影响

全细胞催化剂 *Rhizopus oryzae* IFO4697 可以有效地催化植物油脂甲醇解制备生物柴油, 但在回用过程中发现细胞脱落, 脂肪酶泄露, 造成酶活损失, 生物柴油得率随反应批次增加而降低, 如图 3 所示。可以通过交联剂的支撑、固着作用, 提高稳定性。戊二醛分子结构中的 2 个醛基可以与蛋白质分子发生 2 种反应, 第一种反应是与丝氨酸和酪氨酸上的羟基发生反应形成半缩醛结构, 第二种反应是与精氨酸、赖氨酸、组氨酸、色氨酸等的氨基发生水解反应形成氨醇结构, 对糖原和核蛋白, 尤其是对微管和内质网等膜系统以及细胞基质有较好的固定作用<sup>[16]</sup>。戊二醛交联处理, 在最适宜的条件下, 可以达到既尽量减少酶的失活, 又提高细胞回用稳定性的效果。图 4 对比了经过戊二醛交联前后, 固定化全细胞在催化植物油脂和甲醇转酯化反应合成生物柴油过程中的稳定性情况。

戊二醛交联显著提高了全细胞催化油脂甲醇解的回用稳定性, 经过 1200 h 反应后, 仍然可以保持 75% 的生物柴油得率。

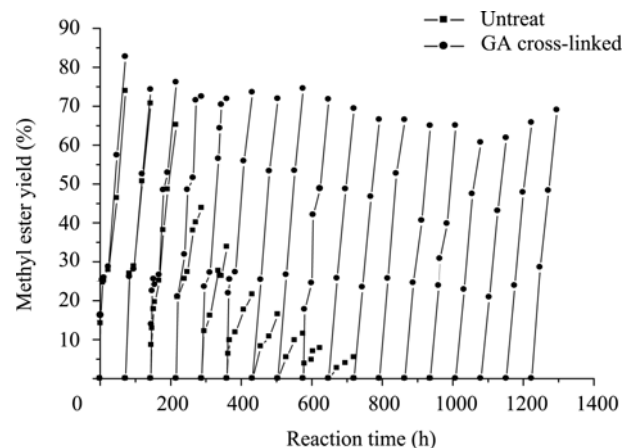


图 4 戊二醛交联对于全细胞催化油脂与甲醇转酯化反应合成生物柴油的稳定性影响

Fig. 4 Repeated methanolysis reaction using glutaraldehyde treated whole cell biocatalyst. GA cross-linking treatment conditions: 25°C, pH 6.8, GA concentration 0.1% (W/W), treatment time 1h. Reaction conditions: 35°C, 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight), three stepwise addition of methanol with one molar equivalent 24 h.

### 2.3 干燥方式对全细胞催化油脂甲醇解回用稳定性的影响

采用真空冷冻的方式干燥 *Rhizopus oryzae* IFO4697 固定化全细胞催化剂, 能耗较大, 本研究考查了室温自然干燥方式对于催化活性的影响。全细胞催化剂经过 72 h 左右的培养后从发酵液中分离出来, 冲洗之后放入  $-72^{\circ}\text{C}$  冰箱中冰冻 1 h, 之后采用 2 种方式干燥: 真空冷冻干燥 24 h 或者室温自然干燥 24 h。研究结果表明不同干燥方式下催化剂的催化活性情况基本没有差异(图 5)。

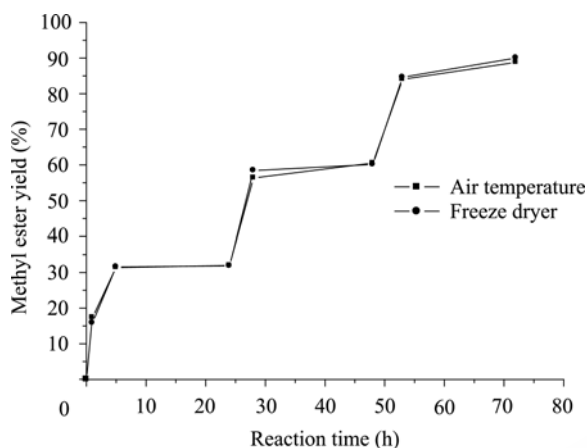


图 5 不同干燥方式对全细胞催化大豆油合成生物柴油的影响

Fig. 5 Methanolysis reaction with whole cell biocatalyst with different desiccation methods. Reaction conditions:  $35^{\circ}\text{C}$ , 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L, 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight), three stepwise addition of methanol with one molar equivalent 24 h.

### 2.4 反应体系含水量对于全细胞催化油脂甲醇解稳定性的影响

酶法制备生物柴油中, 反应体系的水含量是一个重要因素。Shah 等<sup>[17]</sup>研究了含水量对 *P. cepacia* 脂肪酶催化麻风树油乙醇解制备生物柴油的影响。反应体系含水量为酶量 1%~10%(W/W)时, 生物柴油得率会随着含水量增加而增加。5%水含量时, 反应 5 h, 得率可以达到 98%, 而不加水时得率仅有 70%。最优的水含量由酶和反应体系所决定, 酶的种类、催化的反应类型和反应体系不同, 适宜的水含量也不同。对于全细胞催化剂 *Rhizopus oryzae*, 前期的研究发现, 在叔丁醇体系, 含水量 0%~3%, 反应速率随含水量增加而增加, 而无溶剂体系的水含量影响

情况没有详细报道。

本实验研究了 *Rhizopus oryzae* 在含水量分别为 0%、5%、15%、20% (W/W, based on oil) weight 的反应活性。结果表明, 在水含量 5%~15% 范围内, 生物柴油得率较高, 重复反应的稳定性较好; 反应体系不含水, 酶促反应缺少必需水, 活性下降, 生物柴油得率很低; 反应体系含水量过高(20%), 脂肪酸甲酯的水解速率加快, 得率下降(图 6)。

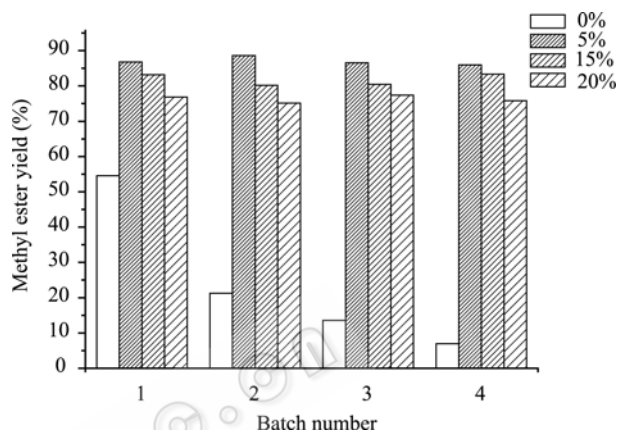


图 6 反应体系不同含水量对全细胞催化大豆油合成生物柴油的影响

Fig. 6 Methanolysis reaction with whole cell biocatalyst with different water contents. GA cross-linking treatment conditions:  $25^{\circ}\text{C}$ , pH 6.8, GA concentration 0.1% (W/W), treatment time 1 h. Reaction conditions:  $35^{\circ}\text{C}$ , 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L, 0%~20% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight), three stepwise addition of methanol with one molar equivalent 24 h.

### 2.5 回用方式对于全细胞催化油脂甲醇解稳定性的影响

全细胞催化剂的一大优势在于制备成本低, 并且可以回用。但回用方式并没有系统的研究, 本研究研究了水洗以及有机溶剂洗涤对于全细胞在重复回用过程活性的影响。

图 7 对比了采用水洗、有机溶剂正己烷洗涤和真空抽滤直接回用的方式, 全细胞催化剂的回用稳定性情况。研究发现, 水洗之后, 全细胞催化剂的反应活性略有降低, 水洗会在一定程度上造成脂肪酶的泄露和细胞脱落, 使得催化活性下降。有机溶剂正己烷洗涤会对全细胞催化剂的催化稳定性造成负面影响。采用直接真空抽滤直接回用的方式有利于全细胞催化剂稳定性的保持。

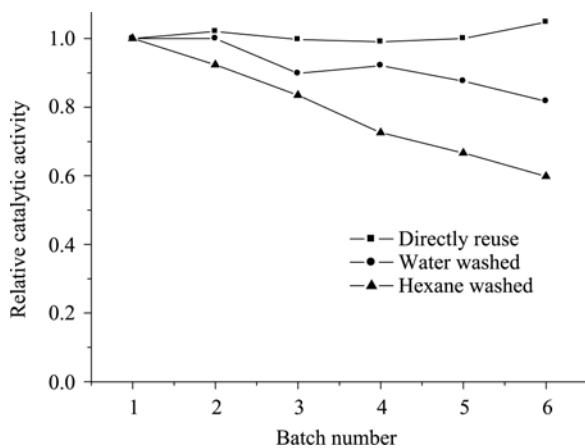


图 7 不同回用方式对全细胞催化大豆油合成生物柴油的影响

Fig. 7 Methanolysis reaction with whole cell biocatalyst with different reuse methods. GA cross-linking treatment conditions: 25°C, pH 6.8, GA concentration 0.1% (W/W), treatment time 1 h. Reaction conditions: 35°C, 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L, 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight), three stepwise addition of methanol with one molar equivalent 24 h.

## 2.6 优化条件下全细胞催化油脂甲醇解回用稳定性

根据对上述因素系统考察的结果, 采用优化的制备条件, 提出了提高全细胞催化剂稳定性的策略, 采用 5 mm×5 mm×5 mm 载体, 以橄榄油作为诱导物, 经过戊二醛交联, 抽滤后直接回用全细胞催化剂, 回用 20 个批次, 生物柴油得率维持在 80% 左右, 没有明显下降, 显著提高了 *Rhizopus oryzae* IFO4697 全细胞在无溶剂下催化油脂和甲醇转酯化合成生物柴油的回用稳定性 (图 8)。

## 3 结论

本实验对固定化全细胞催化剂 *Rhizopus oryzae* IFO4697 催化植物油脂合成生物柴油的稳定性进行了系统的考察, 研究结果表明: 反应体系含水量对于全细胞催化剂的反应活性和催化稳定性有重要影响, 5%~15% 的含水量最为适宜; 研究范围内, 载体粒度及干燥方式对稳定性影响不显著; 戊二醛交联, 显著提高了反应的稳定性; 小载体全细胞催化剂反应速率快, 载体粒度对稳定性影响不显著; 直接回用全细胞催化剂简单易行, 反应稳定性好。在优化条件下, 采用 *Rhizopus oryzae* IFO4697 全细胞催化

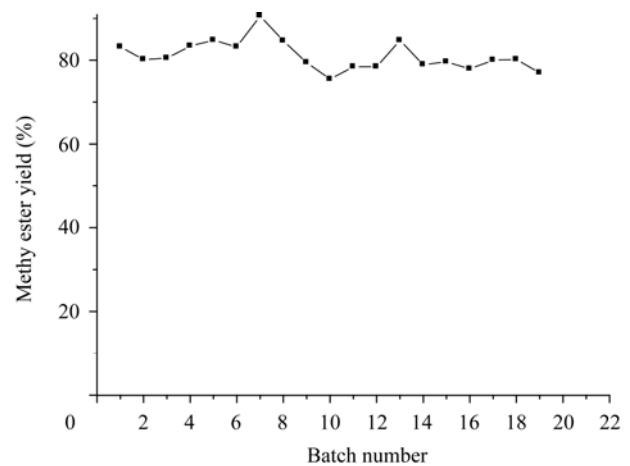


图 8 全细胞催化大豆油与甲醇转酯化反应稳定性

Fig. 8 Repeated methanolysis reaction using GA treated whole cell biocatalyst under optimum conditions. GA cross-linking treatment conditions: 25°C, pH 6.8, GA concentration 0.1% (W/W), treatment time 1 h. Reaction conditions: 35°C, 150 r/min, pH 6.8, 0.1 mol/L, 15% phosphate buffer (W/W, based on oil weight), 5% net cells (W/W, based on oil weight).

植物油脂合成生物柴油, 回用 20 个批次, 生物柴油得率维持在 80%, 为 *Rhizopus oryzae* IFO4697 全细胞催化油脂甲醇解制备生物柴油的工业化生产提供了参考。

## REFERENCES

- [1] Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels. *Prog Energ Combust Sci*, 2007, **33**: 1–18.
- [2] Meher LC, Vidya SD, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew Sust Energ Rev*, 2006, **10**: 248–268.
- [3] Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technol*, 2007, **99**: 3975–3981.
- [4] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 763–781.
- [5] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**: 627–662.
- [6] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, 2001, **92**: 405–416.
- [7] Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, *et al.* Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J*, 2001, **8**: 39–43.

- [8] Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, *et al.* Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J*, 2007, **34**: 273–278.
- [9] Li W, Du W, Liu DH. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in *tert*-butanol system. *Process Biochem*, 2007, **42**: 1481–1485.
- [10] Li W, Du W, Liu DH. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J Mol Catal B- Enzym*, 2007, **45**: 122–127.
- [11] Ban K, Hama S, Nishizuka K, *et al.* Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *J Mol Catal B-Enzym*, 2002, **17**:157–165.
- [12] Nakashima T, Fukuda H, Kyotani S, *et al.* Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *J Ferment Technol*, 1988, **66**: 441–447.
- [13] Zeng J, Du W, Xu YY, *et al.* Study on producing biodiesel from soybean oil sources catalyzed by *R. oryzae* IFO. *Chem Ind*, 2005, **25**: 228–230.
- [14] Zeng J, Du W, Liu XY, *et al.* Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *J Mol Catal B-Enzym*, 2006, **43**: 15–18.
- [15] Hama S, Yamaji H, Kaieda M, *et al.* Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. *Biochem Eng J*, 2004, **21**: 155–160.
- [16] Monsan P. Optimisation of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilisation. *J Mol Catal B- Enzym*, 1977, **3**: 371–384.
- [17] Shah S, Gupta MN. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochem*, 2007, **42**: 409–414.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 植物基因工程 (第二版)

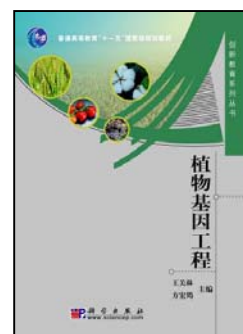
王关林 方宏筠主编

978-7-03-024981-4 ¥ 75.00 2009年8月出版

#### 内容简介

本书是由科学出版社申报,教育部组织专家评议审批的普通高等教育“十一五”国家级规划教材,也是我国第一本《植物基因工程》专业教科书。全书兼顾了植物基因工程的基础理论及技术原理和实验操作技术。理论部分系统详尽地讲解了植物基因工程相关知识,实验部分不仅列举了多种方案供读者根据需要自由选择或自我设计,还增加了实验结果分析,以利于学生开拓思路,培养举一反三的分析能力,真正掌握实验技能,学以致用。全书以植物基因工程的程序为主线循序展开,逐渐深入。既具有较高的理论性,又具有较强的实用性和可操作性,构成了独特的植物基因工程理论体系。

本书适合用作各大学生物专业,特别是农林院校植物育种专业的专业课教材,也可作为该专业研究生和科研工作者的参考书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目