

研究报告

固定化脂肪酶催化毛棉籽油制备生物柴油

刘伟涛, 周丽亚, 姜艳军, 高静

河北工业大学化工学院, 天津 300130

摘要: 研究了固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 催化毛棉籽油和乙酸甲酯制备生物柴油的过程。通过向反应体系中添加甲醇, 可减少乙酸的抑制, 明显提高生物柴油得率, 确定最佳反应条件为: 正己烷作溶剂, 乙酸甲酯与油摩尔比 9:1, 添加油重 3% 的甲醇、油重 10% 的 Lipozyme TL IM 和 5% 的 Novozym 435 复合使用, 温度 55°C, 反应 8 h, 生物柴油得率达到 91.83%。最后探索了酶催化毛棉籽油合成生物柴油的动力学, 得到动力学方程。

关键词: 生物柴油, 毛棉籽油, 固定化脂肪酶, 动力学

Immobilized lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from crude cottonseed oil

Weitao Liu, Liya Zhou, Yanjun Jiang, and Jing Gao

School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

Abstract: We investigated the transesterification of crude cottonseed oil with methyl acetate to biodiesel, by using Lipozyme TL IM and Novozym 435 as catalysts. Results showed that the biodiesel yield significantly increased with the addition of methanol into the reaction system, and the highest biodiesel yield of 91.83% was achieved with the optimum conditions as follows: *n*-hexane as solvent, molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 3% methanol based on the oil mass to inhibit the creation of acetic acid, 10% Lipozyme TL IM and 5% Novozym 435 as catalyst based on the oil mass, reaction temperature 55°C and reaction time 8 h. Additionally, we explored the kinetics of lipase-catalyzed crude cottonseed oil to biodiesel, and proposed a kinetic model.

Keywords: biodiesel, crude cottonseed oil, immobilized lipases, kinetics

生物柴油是动植物油脂与短链醇等通过转酯反应得到的长链脂肪酸单酯的混合物^[1], 与普通柴油相比, 生物柴油具有可再生、环境友好等优点^[2-4]。目前工业生产生物柴油大多使用碱催化的化学方法^[5], 但是化学方法对原料油要求高、污染大、能耗高。酶催化法很好地解决了化学方法的这些问题, 是更具竞争力的新工艺^[6-8]。

目前制约生物柴油发展的主要因素是原料油供

应不足。棉籽油中含有对人体有害成分(如棉酚)而不被食用, 且我国是世界产棉大国, 选用棉籽油作为原料, 充分利用了现有资源, 与可食用油相比, 又降低了成本^[9]。碱催化精制棉籽油合成生物柴油的文献已有报道^[10], 但是碱催化方法的不足限制了其应用。Royon 等^[11]用精制的棉籽油为原料, 在固定化脂肪酶 Novozym 435 催化下制备生物柴油。虽然生物柴油的得率较高, 但棉籽油在精制(脱酸、脱臭)

Received: July 11, 2009; Accepted: November 10, 2009

Supported by: Natural Science Foundation of Tianjin (No. 08JCYBJC02400), Natural Science Foundation of Hebei Province (No. B2008000028).

Corresponding author: Jing Gao. Tel: +86-22-60204293; E-mail: jgao@hebut.edu.cn

天津市自然科学基金(No. 08JCYBJC02400), 河北省自然科学基金(No. B2008000028)资助。

过程中有效成分(游离脂肪酸和甘油酯)大量流失,不但造成了原料的浪费,而且增加了生产工序。以未经脱酸、脱臭的棉籽油毛油为原料制备生物柴油的方法还未见报道。乙酸甲酯作为酰基受体已有报道^[12],相对甲醇而言,乙酸甲酯对酶的活性影响较小,故选择乙酸甲酯作为酰基受体。由于毛油中游离脂肪酸较多,易与乙酸甲酯反应生成乙酸,乙酸会降低酶周围环境的 pH,且能与酶活性中心的氨基酸反应使酶失活^[13],通过添加适量的甲醇可抑制乙酸的生成。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 购于诺维信公司;棉籽油产于山东临清;脂肪酸甲酯标准品:棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯购于 Sigma 公司;甲醇、乙酸甲酯、正己烷、叔丁醇、水杨酸甲酯均为分析纯,购于天津江天化工技术有限公司。

1.2 实验仪器

恒温水浴振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司);电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SP-2100 气相色谱仪(北京北分瑞利分析仪器公司);SE-30 毛细管色谱柱(0.25 mm×0.25 μm×30 m),购自兰州中科安泰分析科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料油的预处理和平均分子量的确定

通过过滤、水化脱胶、干法脱胶、吸附脱色除去毛油中的磷脂等对酶有害的物质^[14],根据 GBT5530-2005 和 GBT5334-1995 测出脱胶后的棉籽油的酸价为 7.39、皂化价为 202.76,算出棉籽油的平均分子量为 861.4。

1.3.2 生物柴油的合成

在 50 mL 具塞锥形瓶中加入一定量的脱胶后的棉籽油、乙酸甲酯和固定化脂肪酶等,在恒温水浴振荡器中反应,振荡频率为 150 r/min。

1.3.3 产物的测定

反应物中长链脂肪酸甲酯的含量由气相色谱测定,测定方法为内标法,以水杨酸甲酯作为内标物,气相色谱柱为 SE-30 毛细管柱(0.25 mm×0.25 μm×

30 m),FID 检测器,采用程序升温,柱温 120°C,保持 2 min,以 12°C/min 的速度升温至 210°C,保持 3 min,再以 3°C/min 的速度升温至 240°C,保持 5 min。生物柴油得率的计算公式:

$$\text{生物柴油得率} = \frac{\text{测得的长链脂肪酸甲酯的量}}{\text{油完全甲酯化后脂肪酸甲酯的量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 乙酸甲酯与油的摩尔比对生物柴油得率的影响

乙酸甲酯作酰基受体既避免了甲醇以及副产物甘油对酶活的影响,又避免了分批添加甲醇的繁琐步骤。经过预实验证明乙酸甲酯做酰基受体时,酶的重复利用率明显高于甲醇,虽然乙酸甲酯的价格高于甲醇,但从乙酸甲酯能很好的保护酶活,提高脂肪酶的重复使用次数方面考虑,生物柴油的总生产成本仍是降低的。乙酸甲酯与油的摩尔比对生物柴油得率的影响如图 1 所示,随着乙酸甲酯量的增加,生物柴油得率不断提高,当乙酸甲酯与油的摩尔比为 9:1 时生物柴油得率最高。继续添加乙酸甲酯,生物柴油得率没有明显增加甚至略有降低。可归因于:1)在乙酸甲酯浓度较低时增加其浓度有利于反应向正方向进行,生物柴油得率提高;2)反应体系中乙酸甲酯浓度过高,会稀释底物油的浓度,这可能影响了油与酶的结合,使生物柴油得率降低。

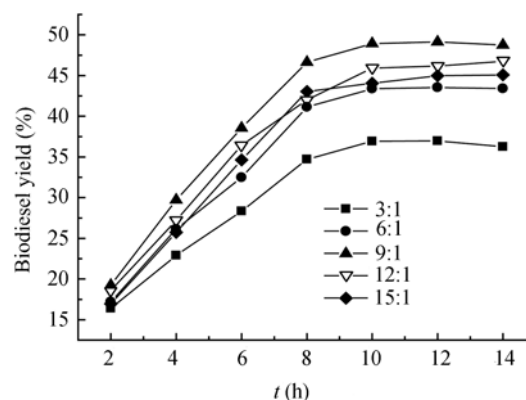


图 1 乙酸甲酯与油摩尔比对生物柴油得率的影响

Fig. 1 Effect of molar ratio of methyl acetate to oil on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, 1.5% Novozym 435 and 3.5% Lipozyme TL IM based on the oil mass, 50°C, 150 r/min.

2.2 有机溶剂对生物柴油得率的影响

在反应过程中加入有机溶剂作用如下:1)降低

底物的黏度, 提高底物与产物的传质; 2) 由于其惰性, 有机溶剂使得脂肪酶保持其天然构象, 从而保持活性; 3) 有机溶剂在反应体系中可构建一个较低的水活度的反应环境, 降低酯化和水解反应的热力学和动力学障碍^[15]。鉴于此, 本研究比较了当前研究较多的叔丁醇和正己烷作有机溶剂对生物柴油得率的影响, 如图 2 所示, 适量添加有机溶剂使得生物柴油得率明显提高, 但溶剂过多会稀释底物浓度, 导致生物柴油得率降低。与叔丁醇相比, 正己烷表现出更好的疏水性, 能更好地保持酶分子的稳定性, 与刘伟东等报道的一致^[16]。故选用油重 25% 的正己烷作溶剂。

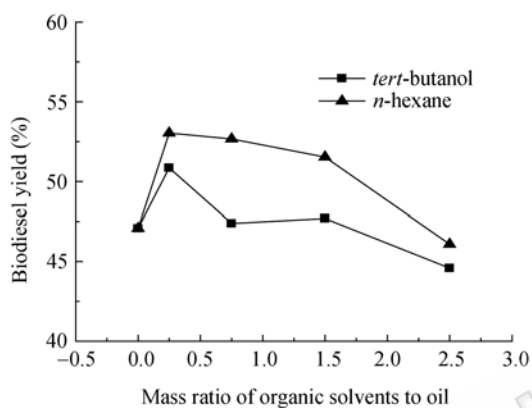


图 2 有机溶剂对生物柴油得率的影响

Fig. 2 Effect of organic solvents on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, 1.5% Novozym 435 and 3.5% Lipozyme TL IM based on the oil mass, the molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 50°C, 150 r/min, 8 h.

2.3 复合酶的配比及加酶总量对生物柴油得率的影响

在预实验中分别研究了 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 两种酶的用量对反应的影响(数据未显示)。由 Lipozyme TL IM 催化的转酯反应, 生物柴油得率较低, 可能由于 Lipozyme TL IM 在本反应体系中表现出 1, 3 位专一的催化特性, 即使油脂在反应过程中存在酰基转移作用, 但酰基转移速度慢, 要想达到最终优化后得到的 90% 以上的生物柴油得率, 需要的酶量非常大(>40%), 反应时间也较长(>24 h), 李俐林等也有类似报道^[17]。而本反应体系中 Novozym 435 表现出较高的催化活性, 生物柴油得率较高, 与 Türkan 等的报道一致^[18]。Novozym 435 的价格过高, 限制了其应用, 综合 Novozym 435 高

效和 Lipozyme TL IM 低成本的优点, 选用 Novozym 435 和 Lipozyme TL IM 的复合酶作为催化剂。在酶总量一定的条件下, 不同配比的复合酶对生物柴油得率的影响如图 3 所示, 随着 Novozym 435 的比例增加, 生物柴油得率显著提高, 当 Novozym 435 与 Lipozyme TL IM 质量比为 1:2 时生物柴油得率达到 53.81%, 随后再增加 Novozym 435 的比例, 生物柴油得率没有明显增加, 故选择 Novozym 435 与 Lipozyme TL IM 质量比为 1:2。

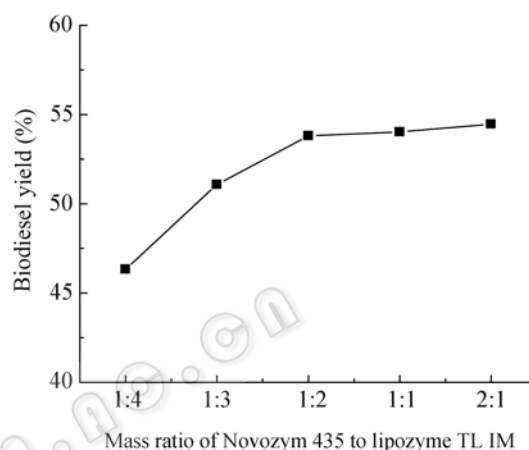


图 3 Novozym 435 和 Lipozyme TL IM 的质量比对生物柴油得率的影响

Fig. 3 Effect of mass ratio of Novozym 435 to Lipozyme TL IM on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, total amount of lipase 5% based on the oil mass, the molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 25% *n*-hexane as solvent based on oil mass, 50°C, 150 r/min, 8 h.

在固定 Novozym 435 与 Lipozyme TL IM 质量比 1:2 的条件下, 复合酶总量对生物柴油得率的影响如图 4 所示, 随着总酶量的增加, 生物柴油得率显著提高, 在总酶量为油重的 15% 时生物柴油得率达到 72.76%, 再增加酶的量, 得率没有明显增加。综合考虑生产成本和生物柴油得率, 确定油重 5% 的 Novozym 435 和 10% 的 Lipozyme TL IM 的复合酶作为催化剂。

2.4 温度对生物柴油得率的影响

温度对生物柴油得率的影响如图 5 所示, 随着温度的升高, 生物柴油得率明显增加, 在 55°C 反应 10 h 时生物柴油得率达到 77.97%。温度升高到 60°C 时, 反应初期生物柴油得率显著提高, 反应 6 h, 可达到 69.08%, 随着反应继续进行, 生物柴油得率没

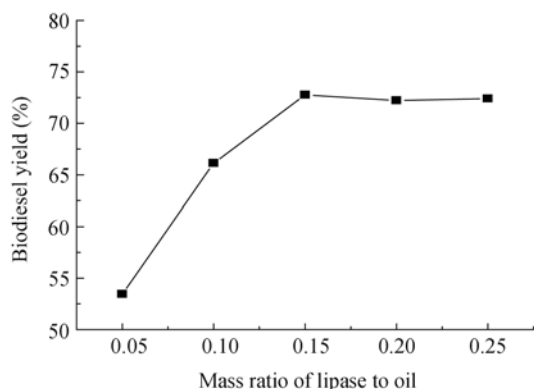


图4 复合酶量对生物柴油得率的影响

Fig. 4 Effect of compound lipases dosage on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, the mass ratio of Novozym 435 to Lipozyme TL IM 1:2, the molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 25% n-hexane as solvent based on oil mass, 50°C, 150 r/min, 8 h.

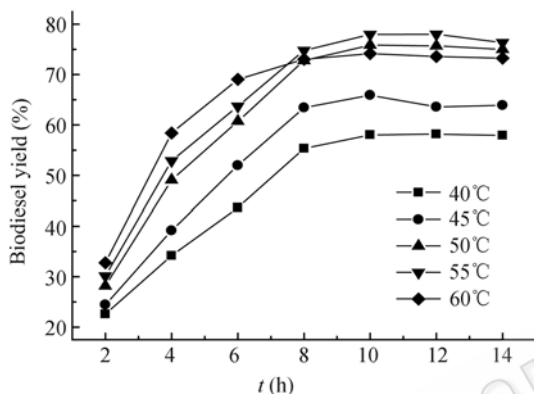


图5 反应温度对生物柴油得率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, 5% Novozym 435 and 10% Lipozyme TL IM based on the oil mass, the molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 25% n-hexane as solvent based on the oil mass, 150 r/min.

有明显增加。可归因于: 1) 随着温度的升高, 分子运动加剧, 扩散阻力减小, 增加了酶和底物结合的几率, 提高了反应速率; 2) 酶本身是蛋白质, 较高的温度会导致部分酶失活。综合考虑酶稳定性和生物柴油得率, 选用 55°C 作为反应的最适温度。

2.5 甲醇对生物柴油得率的影响

甲醇的量对生物柴油得率的影响如图 6 所示, 不加甲醇时反应 10 h 时生物柴油得率为 77.97%, 加油重 3% 的甲醇反应时间 8 h, 生物柴油得率达到 91.83%, 提高了 13.86%。可能因为毛油中含有大量的游离脂肪酸, 当反应体系中不加甲醇时, 乙酸甲酯与油中游离脂肪酸反应生成乙酸, 陈志峰等也报道了类似反应体系中乙酸的生成^[19]。乙酸不但在酶

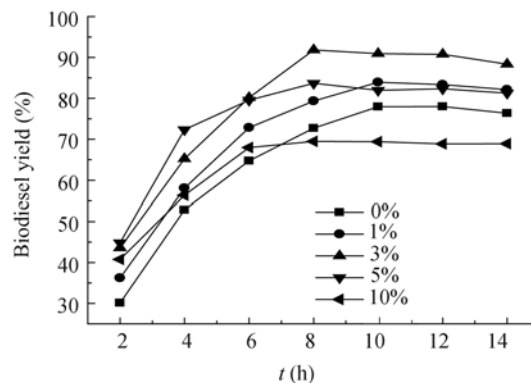


图6 甲醇的量对生物柴油得率的影响

Fig. 6 Effect of methanol quantity on biodiesel yield. Reaction conditions: cottonseed oil 2.0 g, 5% Novozym 435 and 10% Lipozyme TL IM based on the oil mass, the molar ratio of methyl acetate to oil 9:1, 25% n-hexane as solvent based on the oil mass, 55°C, 150 r/min.

周围形成低 pH 环境, 影响酶的活性, 还能与酶活性中心的氨基酸残基反应使酶失活而影响生物柴油得率, 与 Huang 等的报道一致^[20]。为了证明甲醇抑制了乙酸的生成, 本实验分别测定了不加甲醇反应 2 h 后底物的酸价和加甲醇反应 2 h 后底物的酸价, 分别为 7.13 和 2.07。结果表明加入甲醇可以在短时间内明显降低反应底物的酸价, 抑制乙酸生成, 可能由于甲醇与游离脂肪酸分子较小, 更易与酶结合, 甲醇的加入能够与油中的游离脂肪酸发生酯化反应生成目的产物脂肪酸甲酯, 从而避免了乙酸的生成, 保证了酶的稳定性, 故生物柴油得率随着反应体系中甲醇量的增加而提高。但添加甲醇的量超过 3% 后, 部分不能被油溶解的甲醇集结在酶表面使酶失活^[21-22], 导致生物柴油得率下降。

2.6 动力学模型的建立

通过反应动力学的研究, 可对生物柴油生产设计提供理论基础。将 Novozym 435 与 Lipozyme TL IM 比例为 1:2 时的复合酶视为一种催化剂, 研究了此催化剂的反应机理。

2.6.1 恒温水浴振荡器的转速对反应初速度的影响

反应条件中, 恒温水浴振荡器的转速是影响传质效果的主要因素。在其他反应条件相同的情况下, 50~250 r/min 范围内测定反应在不同转速条件下对反应初速度的影响, 结果见图 7。在转速较低时, 由于传质阻力的存在, 反应初速度较小; 随着转速增大, 反应初速度也随之逐渐增大; 当摇床转速增大

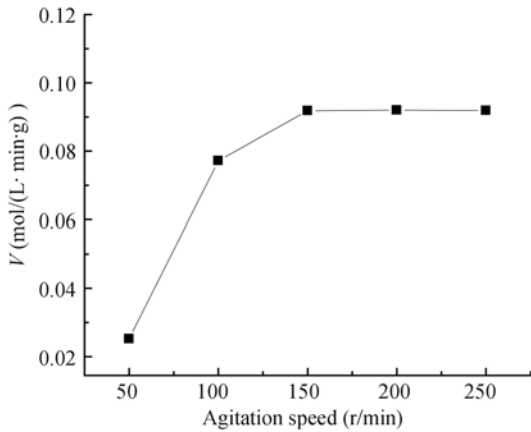


图7 转速对反应初速率的影响

Fig. 7 Effect of agitation speed on initial reaction rate. Reaction conditions: compound lipases 0.06 g/mL, cottonseed oil 0.4 mol/L, methyl acetate 4.0 mol/L, adding n-hexane until the total volume reaches 5.0 mL, 55°C, 150 r/min.

至 150 r/min 时, 再增加转速, 反应初速度基本保持恒定。这也说明在转速增大过程中, 固定化酶反应体系中的扩散限制对反应的影响逐渐减小。为消除扩散限制, 保证反应受动力学控制, 将转速定为 150 r/min。

2.6.2 底物对反应的抑制作用

底物浓度对反应初速度的影响如图 8、9 所示, 固定乙酸甲酯的浓度为 4.0 mol/L 时, 反应初速度随着棉籽油浓度的增加不断增大, 当棉籽油的浓度超过一定临界值后, 反应初速度反而有所降低(图 8)。固定棉籽油的浓度为 0.4 mol/L 时, 反应初速度随着乙酸甲酯浓度增加而增大, 乙酸甲酯浓度为 4.0 mol/L 时, 反应初速度达到最大, 继续增加乙酸甲酯浓度, 反应初速度呈现下降趋势(图 9)。可能的原因为: 过量的油、乙酸甲酯和酶形成反应终止复合物, 与 Xu 等^[23]报道的一致。因此, 该反应属双底物抑制反应。

2.6.3 方程的建立

目前, 一般认为有机相中酶催化转酯反应符合乒乓机制^[24]。综合图 8 和图 9 的结果, 该反应属双底物抑制的乒乓机制, 示意图见图 10。

双底物抑制的乒乓机制的动力学模型被描述为以下方程:

$$v = \frac{V_{\max} C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}} \right] + K_B C_A \left[1 + \frac{C_A}{K_{iA}} \right]} \quad (1-1)$$

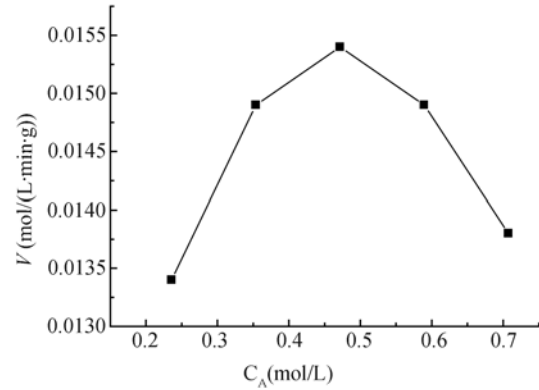


图8 棉籽油的浓度对反应初速度的影响

Fig. 8 Effect of concentration of cottonseed oil on initial reaction rate. Reaction conditions: compound lipases 0.06 g/mL, methyl acetate 4.0 mol/L, adding n-hexane until the total volume reaches 5.0 mL, 55°C, 150 r/min.

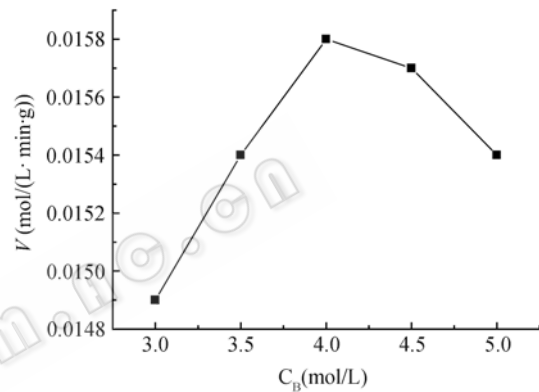


图9 乙酸甲酯的浓度对反应初速度的影响

Fig. 9 Effect of concentration of methyl acetate on initial reaction rate. Reaction conditions: compound lipases 0.06 g/mL, cottonseed oil 0.4 mol/L, adding n-hexane until the total volume reaches 5.0 mL, 55°C, 150 r/min.

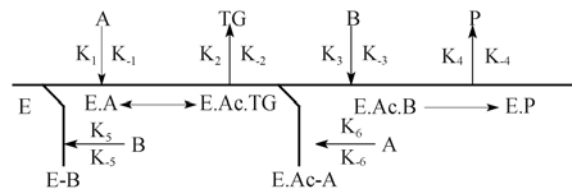


图10 双底物抑制的双乒乓机制示意图

Fig. 10 Representation of the Ping-Pong Bi-Bi mechanism with inhibition by both substrates. E: lipase; A: cottonseed oil; B: methyl acetate; TG: triacetyl glycerol; P: biodiesel.

利用 Lineweaver-Burk 双倒数法, 将方程(1-1)两边取倒数整理得:

$$\frac{V_{\max}}{v} = \left(1 + \frac{K_B}{C_B} \right) + K_A \left(1 + \frac{C_B}{K_{iB}} \right) \frac{1}{C_A} + \left(\frac{K_B}{K_{iA} C_B} \right) C_A \quad (1-2)$$

令 $1/v=Y$; $1/C_A=X$, 整理得:

$$Y=P_1+P_2 \times X+P_3/X \quad (1-3)$$

由于双底物抑制的酶促动力学方程中有 2 个自变量, 因此实验中固定了乙酸甲酯的浓度为常数, 建立棉籽油浓度和反应初始速率的关系。分别固定乙酸甲酯浓度为 4.0 mol/L 和 5.0 mol/L, 改变油的浓度, 其他反应条件不变。利用 origin 软件建立油的浓度对反应初速度的 Lineweaver-Burk 图, 并进行非线性拟合, 结果如图 11 所示, 分别得到两组 P1、P2 和 P3 的值。联立求解方程组得出 5 个待求参数, 并在相同条件下, 用相同的方法求出单一脂肪酶 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 分别催化转酯反应的 动力学参数, 见表 1。根据不同脂肪酶催化棉籽油酯交换反应得到的 3 组动力学参数, 通过最大初速度的比较可以看出, 复合脂肪酶 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 的催化能力要比单独使用其中一种脂肪酶的能力强, 反应效果好。使用复合酶在提高了反应速率的同时还降低了反应的成本。

2.6.4 验证试验

固定乙酸甲酯浓度为 4.5 mol/L, 通过改变棉籽油的浓度进行验证试验, 得到复合酶反应动力学方程式:

$$v = \frac{0.3473C_A C_B}{C_A C_B + 0.0939C_B \left[1 + \frac{C_B}{0.0937} \right] + 0.066C_A \left[1 + \frac{C_A}{0.0006} \right]} \quad (1-4)$$

实验测得的复合酶催化反应初速度, 与计算得到的初速度进行对比, 结果如图 12 所示, 理论与

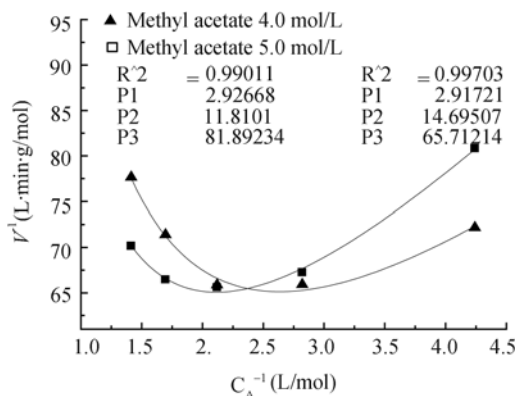


图 11 棉籽油的浓度对反应初速度的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 11 Lineweaver-Burk plot of reciprocal cottonseed oil concentrations versus reciprocal initial reaction rates. Reaction conditions: compound lipases 0.06 g/mL, adding n-hexane until the total volume reaches 5.0 mL, 55°C, 150 r/min.

实验值吻合较好, 因此用双底物抑制的乒乓机制模型可以较好地描述该反应。

表 1 双乒乓机制的非线性拟合动力学常数

Table 1 Kinetic constants from non-linear regression of initial reaction rate data with Ping-Pong Bi-Bi mechanism

Parameters	Compound lipases	Lipozyme TL IM	Novozym 435
V_{max} (mol/(min·L·g))	0.3473	0.2471	0.3204
K_A (mol/L)	0.0939	0.6489	0.1137
K_B (mol/L)	0.066	0.0788	0.2986
K_{iA} (mol/L)	0.0006	0.0007	0.0025
K_{iB} (mol/L)	0.0937	0.8071	0.1131

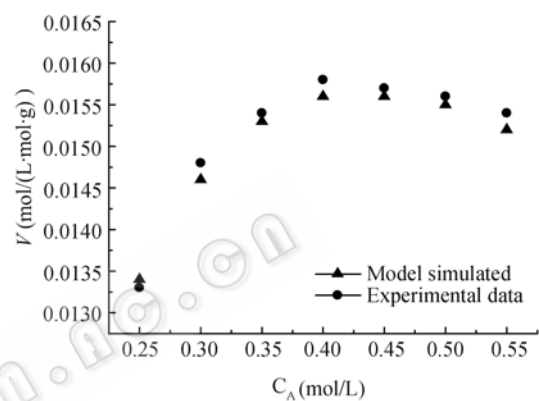


图 12 模型预测值与实验值的比较

Fig. 12 Comparison of model simulated and experimental data of initial reaction rate. Reaction conditions: compound lipases 0.06 g/mL, methyl acetate 4.5 mol/L, adding n-hexane until the total volume reaches 5.0 mL, 55°C, 150 r/min.

3 结论

利用来源丰富并且廉价的棉籽油毛油作为原料, 以正己烷为反应介质, 复合酶为催化剂, 在乙酸甲酯与油摩尔比为 9:1、甲醇的添加量为油重的 3%, 温度为 55°C 的条件下反应 8 h, 生物柴油得率达到 91.83%。在高酸价油与乙酸甲酯的反应体系中添加适量的甲醇, 成功地抑制了乙酸的产生, 保证了酶的稳定性, 既缩短了反应时间又提高了产物得率, 对于高酸价毛油的充分利用具有重要意义。最后研究了酶催化毛棉籽油与乙酸甲酯合成生物柴油的动力学, 结果表明符合双底物抑制的乒乓机制, 得到了动力学参数: $V_{max}=0.3473$ mol/(min·L·g); $K_A=0.0939$ mol/L; $K_B=0.066$ mol/L; $K_{iA}=0.0006$ mol/L; $K_{iB}=0.0937$ mol/L。以上数据为工业化生产提供一定的理论依据和基础数据支持。

符 号 说 明

- C_A ——棉籽油的浓度, mol/L;
 C_B ——乙酸甲酯的浓度, mol/L;
 V ——反应初速度, mol/(min·L·g);
 V_{max} ——最大反应速度, mol/(min·L·g);
 K_A ——棉籽油的表观米氏常数, mol/L;
 K_B ——甲醇的表观米氏常数, mol/L;
 K_{iA} ——棉籽油的表观抑制常数, mol/L;
 K_{iB} ——乙酸甲酯的表观抑制常数, mol/L。

REFERENCES

- [1] Van Kasteren JMN, Nisworo AP. A process model to estimate the cost of industrial scale biodiesel production from waste cooking oil by supercritical transesterification. *Res Con Rec*, 2007, **50**(4): 442–458.
- [2] Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, *et al.* Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**(4): 398–408.
- [3] Vasudevan PT, Briggs M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biot*, 2008, **35**(5): 421–430.
- [4] Al-Widyan MI, Tashtoush G, Abu-Qudais M. Utilization of ethyl ester of waste vegetable oils as fuel in diesel engines. *Fuel Proc Technol*, 2002, **76**(2): 91–103.
- [5] Haas MJ, Bloomer S, Scott K. Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock. *J Am Oil Chem Soc*, 2000, **77**(4): 373–379.
- [6] Dizg N, Aydiner C, Imer DY, *et al.* Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Biores Technol*, 2009, **100**(6): 1983–1991.
- [7] Köse Ö, Töter M, Ayse Aksoy H. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cottonseed oil in a solvent-free medium. *Biores Technol*, 2002, **83**(2): 125–129.
- [8] Harding KG, Dennis JS, Von Blottnitz H, *et al.* A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *J Cleaner Prod*, 2008, **16**(13): 1368–1378.
- [9] Shao P, Meng XH, He JZ, *et al.* Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. *Food Bioprod Proc*, 2008, **86**(4): 283–289.
- [10] Azcan N, Danisman A. Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation. *Fuel*, 2007, **86**(17/18): 2639–2644.
- [11] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, *et al.* Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Biores Technol*, 2007, **98**(3): 648–653.
- [12] Du W, Xu YY, Liu DH, *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J Mol Catal B-Enzym*, 2004, **30**(3/4): 125–129.
- [13] Hari Krishna S, Divakar S, Prapulla SG, *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Biotechnol*, 2001, **87**(3): 193–201.
- [14] Li ZB, Du W, Liu DH. Effect of phospholipids and water contents on production of biodiesel fuel catalyzed by lipases in a solvent system. *J Chem Ind Eng*, 2007, **58**(1): 233–237.
李泽波, 杜伟, 刘德华. 生物柴油制备过程中磷脂及水分含量对脂肪酶的影响. *化工学报*, 2007, **58**(1): 233–237.
- [15] Gao J, Wang F, Tan TW, *et al.* Synthesis of biodiesel from waste oil by immobilized lipase. *J Chem Ind Eng*, 2005, **56**(9): 1727–1730.
高静, 王芳, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化废油合成生物柴油. *化工学报*, 2005, **56**(9): 1727–1730.
- [16] Liu WD, Nie KL, Lu JK, *et al.* Biodiesel production by lipase in reversed micellar systems. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(1): 142–146.
刘伟东, 聂开立, 鲁吉珂, 等. 反胶束体系中脂肪酶催化合成生物柴油. *生物工程学报*, 2008, **24**(1): 142–146.
- [17] Li LL, Du W, Liu DH, *et al.* Lipase-catalyzed production of biodiesel from several oils in a novel reaction medium. *Chin J Proc Engin*, 2006, **6**(5): 799–803.
李俐林, 杜伟, 刘德华, 等. 王利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**(5): 799–803.
- [18] Türkan A, Kalay S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanisms of lipase. *J Chromatogr A*, 2006, **1127**(1/2): 34–44.
- [19] Chen ZF, WU H, Zong MH. Transesterification of waste oil with high acid value to biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Chin J Catal*, 2006, **27**(2): 146–150.
陈志锋, 吴虹, 宗敏华. 固定化脂肪酶催化高酸废油脂酯交换生产生物柴油. *催化学报*, 2006, **27**(2): 146–150.
- [20] Huang SY, Chang HL, Goto M. Preparation of surfactant-coated lipase for the esterification of geraniol and acetic acid in organic solvents. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **22**(7): 522–557.
- [21] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, *et al.* Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, **76**(7): 789–793.
- [22] Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Biores Technol*, 2008, **99**(10): 3975–3981.
- [23] Xu YY, Du W, Liu DH. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J Mol Catal B: Enzym*, 2005, **32**(5/6): 241–245.
- [24] Zaks A, Klivanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(10): 3192–3196.