

生物柴油制备方法的应用研究进展

刘幽燕, 庾乐, 黄林峰, 周涛
(广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

摘要:生物柴油以其优良的环境友好性和可再生性引起广泛关注,但较高的生产成本是其商业化生产和应用的障碍之一。综述了生物柴油的化学转酯化法和以游离脂肪酶、固定化脂肪酶、全细胞为催化剂的生物转酯化法的工业研究进展,同时还指出了采用生物转酯化法制备生物柴油时面临的一些问题。

关键词:生物柴油;转酯化;生物催化剂

中图分类号:TQ033

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)04-0015-04

Advances in applied research for biodiesel production

LIU You-yan, YU Le, HUANG Lin-feng, ZHOU Tao

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Biodiesel has attracted much attention due to its environmental friendly and renewable characteristics, however, high cost has been a major obstacle to its commercialization. In this paper, research achievements in industrial biodiesel production through chemical transesterification and bio-transesterification with free lipase, immobilized lipase, full cells as catalysts are reviewed. Furthermore, some problems that have not been yet solved when using bio-transesterification method to prepare biodiesel are pointed out.

Key words: biodiesel; transesterification; biocatalyst

石油是不可再生资源,而世界经济的飞速发展使得人们对其依赖性却越来越大,愈演愈烈的“能源危机”、大量化石燃料的燃烧可能导致的“温室效应”都迫使人们寻找更洁净、可再生的能源来替代石油。在长期研究中人们发现将动、植物油脂酯化后,所得的长链脂肪酸单酯碳链中碳原子数为15~18,与以石油裂化为基础的普通柴油非常相似,其十六烷值、黏度、燃烧热指标可达到普通柴油的标准;更为重要的是其闪点和浊点(cloud point)比柴油的更高,作为燃料更具安全性和抗冻性,人们将这种脂肪酸单酯称为生物柴油。由于生物柴油由可再生的动、植物油脂制得,属于可降解的再生能源,含硫量极低,燃烧时产生的废物、废气少,对环境污染小,因此生物柴油的大规模生产受到关注^[1-5]。

运用动、植物油脂代替石油在第二次世界大战期间就已被提出,最初采用直接与汽油、柴油混合、高温裂解、微乳化等方法来降低动、植物油脂的黏度,但成效不大。现阶段较为成功的方法是转酯化法,即动、植物油脂与短链脂肪醇在催化剂的作用下发生转酯化反应,生成相应的脂肪酸单酯和甘油。目前生物柴油在欧洲、美国均已有大规模生产,现阶段

的研究重点在于不断改进生产工艺,降低成本,减少环境污染。生物柴油的生产成本高一方面是由于原料的价格偏高和来源有限(占整个生产成本的70%~95%),另一方面则是生产过程中的额外耗能。本文综述了生物柴油的生产方法,侧重于为降低成本所进行的工艺优化工业设计试验和利用生物法制备生物柴油的现状与尚未解决的问题。

1 化学转酯化法及工业研究进展

以无机酸、碱作催化剂进行转酯化反应即为化学转酯化法,反应为3个连续可逆过程^[6],从三酯最终转化为单酯。用于转酯化反应的醇包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和戊醇,其中最为常用的是甲醇,这是由于甲醇的价格较低,同时其碳链短、极性大,能够很快地与脂肪酸甘油酯发生反应,且碱性催化剂易溶于甲醇。催化剂可以是均相的(液态的酸、碱),也可以是异相的(固态金属氧化物)。其中碱性催化剂包括氢氧化钠、氢氧化钾、各种碳酸盐以及钠和钾的醇盐;酸性催化剂常用的是硫酸、磷酸或盐酸。碱性催化剂的效率比酸性高,因此商业化生产中以碱性催化剂为主。醇、油的化学计量比是1:3,但是在实

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-02-22

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科青0447003)

作者简介:刘幽燕(1971-),女,博士,副教授,主要从事生物催化、生物反应器等方面的研究,liuyouyang@163.com。

际生产中为使反应平衡向产物方向移动,醇通常是过量的;同时为防止反应过程中发生皂化反应,所用的甘油酯和醇必须无水。如果体系中水和自由脂肪酸的含量较高,则先用酸性催化剂。由 G. Vicente 等^[7]设计的二维工业化生产模型可见,温度和催化剂浓度是影响反应的最主要因素,其中催化剂浓度比温度的影响更明显。最佳反应条件是:温度 20 ~ 50℃,催化剂的最大质量分数为 1.3%。经转酯化反应后,产物是脂肪酸单酯、醇、催化剂、甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯的混合物,要获得纯净的脂肪酸单酯,必须经过复杂的分离工段。

生产规模较小时可采用间歇式反应器,而生产规模大于 400 万 t/a 时则需使用连续搅拌槽式反应器(CSTR)或活塞流反应器(PFR)。反应分为 2 步^[8]:在第一阶段先加入 80% 的醇和催化剂,然后通过一个甘油移除装置将余下的醇和催化剂加入第 2 个 CSTR 中,这样得到的转化率比仅使用一步反应的要明显提高。反应结束后反应液分为 2 层:上层为甲酯层,下层为甘油层。由于甘油在甲酯中的溶解度很小,因此能迅速分离而不需要额外的离心分离。为防止逆反应发生,待甘油和甲酯分离后,需将反应体系中过量的甲醇去除。最后用水洗涤产物,除去残留的催化剂、皂液、盐及部分溶解在酯中的甘油。中和工段的作用是去除残余的催化剂和在反应过程中可能生成的皂化物。图 1 为生物柴油制备流程图示意图。

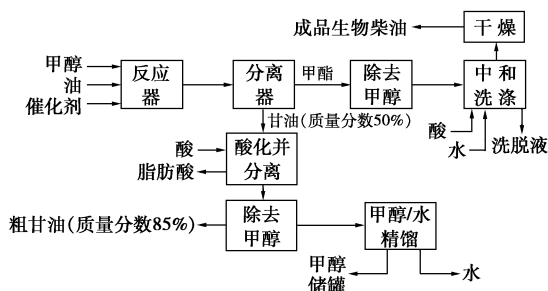


图 1 生物柴油制备流程图示意图

为降低成本,人们也在寻找更便宜的原料。M. J. Haas^[9]提出使用皂脚料为原料,这是一种植物油精炼过程中的副产物,是含有大量油脂的碱溶液,其中含水质量分数为 50%,并包括自由脂肪酸、磷酸

(上接第 14 页)

[27] Gray M R, Corcoran W H, Gavalas G R. Pyrolysis of a wood-derived material effects of moisture and ash content[J]. Ind Eng Chem Process Des Dev, 1985, 24(4): 646 - 651.

[28] Brown R C, Radlein D, Piskorz J. Pretreatment processes to increase py-

酰基甘油、色素、三酰基甘油和其他非极性大豆油成分。目前其市场价格约 0.11 美元/kg,比常用的大豆油(0.48 ~ 0.57 美元/kg)便宜许多。更多的科学家提出以用过的废油为原料,既降低成本,又解决了废物再生问题,还保护了环境。加拿大的学者们^[10]设计了非常完整的工业生产方案:在连续化碱式催化过程中,以废油为原料需在原工艺基础之前加一个预处理工段,包括自由脂肪酸的酯化、甘油的洗涤和甲醇的再生。他们还进行了经济核算和统计分析,得出制备生物柴油经济可行性的最关键因素是工厂的生产能力(年产量)、原料油(废油)的价格以及成品生物柴油的价格。

酯化过程中的副产物甘油以及甘油衍生物(单甘油酯和三甘油酯)是优良的合成中间体,回收高附加值甘油是一条行之有效的降低成本的方法。通常是直接蒸馏回收甘油,也可将甘油转化为单甘油酯和三甘油酯的形式,这个过程是在反应中使甘油与未反应的三酰基甘油自然形成的^[11]。单甘油酯和三甘油酯是制备醇酸树脂、清洁剂和其他表面活性剂的重要修饰基团,单甘油酯还广泛应用于化妆品、颜料、地蜡、合成橡胶、衣料、纺织品等的制造过程中。

2 生物转酯化法及工业研究进展

化学转酯化法最大的问题在于工艺复杂、能耗高、易造成环境污染,若以酶或细胞为催化剂的生物转酯化法代替传统的化学转酯化法则可克服以上缺点。从目前报道情况来看,生物转酯化法工艺较为简单、反应条件温和、选择性高、醇用量小、副产物少、生成的甘油易回收且无需进行废液处理等^[12]。

生物转酯化法首要解决的问题是找到适合的生物催化剂,既可以选用现有的商品酶,也可利用产酶细胞。对于制备生物柴油,通常选择脂肪酶作催化剂,因为在无水条件下脂肪酶可以催化酯化和转酯化反应。

2.1 游离脂肪酶作催化剂

已经报道有多种脂肪酶可用于催化合成生物柴油,其中活力较高的有假单胞脂肪酶(*Pseudomonas fluorescens*)、假丝酵母脂肪酶(*Candida cylindracea*)、

rolytic yield of levoglucosan from herbaceous feedstocks[C]//Bozell J J. ACS Symposium Series: 784, Washington D C: American Chemical Society, 2001: 123 - 132.

[29] So K S, Brown R C. Economic analysis of selected lignocellulose-to-ethanol conversion technologies[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999, 77/78/79: 633 - 640. ■

根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae*)等,但各类脂肪酶之间的催化特性和在不同介质中表现出的催化效果各有不同。M. Kaieda 等^[13]研究发现,根霉脂肪酶能在初始含水质量分数为4%~30%的反应系统中催化植物油生成生物柴油。N. R. Kamini 等^[14]研究了影响隐球菌(*Cryptococcus* sp S-2)在水相中催化植物油转酯化的各种因素,得出最佳反应条件是:油/甲醇摩尔比是1:4,含水质量分数为80%,在转速160 r/min、30℃下反应120 h,最终脂肪酸甲酯的质量分数可达80.2%。P. V. Lara 等^[15]研究了在有机溶剂(正己烷)中假丝酵母脂肪酶催化转酯化棕榈油与短链醇的底物,反应4 h转化率就能达到78.6%左右,其中以正丙醇为底物时反应8 h转化率即可达96%。

脂肪酶选择性好,催化活力高,但若直接将其作为大规模工业生产的催化剂还面临不少问题。首先,脂肪酶价格昂贵,使用量大,成本太高;其次,作为底物的短链脂肪醇对脂肪酶有毒性,尤其是甲醇会导致脂肪酶发生不可逆失活;再次,一些脂肪酶在有机相中的分散性不佳,需要对其进行修饰;另外,其对长链脂肪醇不起催化作用。

2.2 固定化脂肪酶作催化剂

将固定化技术引入生物柴油的工业化生产中,可大大提高酶的稳定性和重复使用率,降低成本。早在20世纪90年代末,日本大阪政科技研究所(Osaka Municipal Technical Research Institute)对固定化脂肪酶催化转酯化植物油脂做了大量研究,并进行了初步工业化设计。利用丹麦诺维信(Novozymes)公司生产的固定化假丝酵母脂肪酶Novozym 435, Y. Shimada 等^[16]成功利用三步法(即每次分别加入1/3计量的甲醇)在30℃下反应48 h,转化率达97.3%。他们还发现,甲醇在三酰基甘油与脂肪酸甲酯的混合体系中,其溶解性要优于其在纯三酰基甘油体系中的,这样可在第一步反应后将剩余的甲醇一次加入,使得三步法简化成两步法,反应36 h后转化率达到96.8%。但把两步法用于固定床连续反应时,酶却发生失活现象。研究发现,当反应副产物甘油不断在反应器底部积累时,其高黏性阻碍了酶分子在底物分子中的扩散,降低了催化效率,最终导致酶失活。

为降低产品成本,他们也探索了以废食用油为原料工业化制备生物柴油的可能性。废食用油中含水、自由脂肪酸及部分酰基甘油的质量分数分别为0.198%、2.5%和4.6%,当含水质量分数大于

0.05%时,反应速率降低,但实验表明,通过增加反应循环次数可以消除水对反应的不利影响,因此构建批式反应器时分三阶段进料,分别在反应10、14 h和24 h加入1/3计量的甲醇。每批进料反应48 h后转化率可达90.4%,比以植物油为原料所得到的转化率(95.9%)略低一些。从反应进程曲线上看,转化率降低的现象主要发生在第3次加入甲醇后,其原因可能在于油品在煎炸后,一些脂肪酸被氧化和热解为环氧化物、醛、聚合物等,无法进行酶反应。进一步考察酶的稳定性发现,反应循环50次(共100天)酶活力没有明显的降低;同时将酶从3个反应器中取出测定其残余活力,结果显示其仍与初始酶活力相同,说明在此反应条件下酶能保持较高稳定性。

同样,法国学者^[17]研究发现,在填充床连续反应器中,甘油不溶于正己烷,吸附到酶表面形成亲水性阻碍,限制了疏水性底物从有机相向酶扩散,造成酶失活。改用三步法,并将产物洗提,放置过夜除去甘油,反应100天仍未发现酶有任何失活,转化率可达93%。

为了避免由甲醇引发的酶失活,清华大学的Du等^[18]用乙酸甲酯代替甲醇作为酰基受体与大豆油(摩尔比=12:1)进行酯交换反应,同样以Novozym 435为催化剂,其相应的甲酯收率为92%。但是其最大缺陷在于酶的用量过大,要加入质量分数为30%(与油质量相比)的酶。

德国学者^[19]和日本东京农业科技大学(Tokyo University of Agriculture and Technology)的学者^[20]则是以固定化的假单胞脂肪酶作催化剂,分别催化向日葵籽油与短链脂肪醇、红花油与短链脂肪醇的转酯化反应,生物柴油的转化率都超过90%。北京化工大学研究者将自有菌株发酵提取的脂肪酶(*Candida* sp. 99-125)^[21]用硅藻土吸附固定化后作为催化剂,采用酯化和酯交换2种途径制备生物柴油。其中酯化反应是直接将脂肪酸与甲醇反应,油酸和甲醇摩尔比为1:1.4,反应过程中加入硅胶作吸水剂,反应24 h,酯化率可达92%;酯交换是用菜籽油(毛油)与甲醇反应,通过三步法加入甲醇,最终转化率可达83%。

固定化技术的运用为实现生物柴油工业化生产迈出了坚实的一步,其在许多方面都优于游离酶技术,但时至今日用于工业化的实例仍然很少,最主要的原因是廉价、制备方法简单、活化效果好的固定化载体尚未找到。加之存在低碳醇和甘油对酶的失活问题,这都迫使科学家们在开发新型固定化载体、方

法和改进生产工艺上不懈努力。

2.3 全细胞作催化剂

上述反应都是以脂肪酶作催化剂,如果使用全细胞作生物催化剂,并将其吸附在一些多孔可渗透生物质支撑物中,就可省去复杂的酶纯化和固定化过程,大大降低工业生产的成本。Hideki Fukuda 所领导的小组在这方面做了比较全面和深入的研究。由于酵母细胞的细胞壁刚性较强,在有机化合物和有机溶剂存在的条件下仍能保持其结构, T. Matsumoto 等^[22]首先构建出产米根霉脂肪酶的酿酒酵母 MT 8-1,其脂肪酶活力可达 474.5 IU/L,采用预先冻融或风干方法增强酵母细胞的渗透性后将其用于催化由大豆油合成脂肪酸甲酯的反应,反应液中甲酯质量分数为 71%。在进一步的研究^[23]中,将细胞与多孔载体共同培养 80~90 h 后,直接将甲醇分 3 次加入发酵液,所获得的甲酯质量分数达到 90%,与用胞外酶作催化剂的效果相当。K. Ban 等^[24]还研究了 MT 8-1 全细胞的稳定性,细胞经戊二醛交联处理后,经过 6 批次反应,胞内酶的活力仍无明显降低。S. Hama 等^[25]研究了细胞膜脂肪酸的组成对制备生物柴油的影响,研究发现,富含油酸或亚油酸的细胞比富含饱和和脂肪酸的细胞表现出更高的反应初速度;而富含棕榈酸的细胞比富含不饱和脂肪酸的细胞表现出更好的稳定性。他们认为这是由于细胞膜的脂肪酸组成不同使得细胞膜的渗透性有明显区别,从而影响反应的初速度和酶的稳定性。全细胞生物催化剂在工业生产中的应用潜力巨大,通过基因工程技术提高脂肪酶的表达水平和对甲醇的耐受性等,可以进一步提高全细胞的使用效率。

3 结语

发展清洁、可再生能源为解决能源危机,实现人类的可持续发展具有非常重要的意义。美国、欧盟、加拿大、巴西、日本、澳大利亚、印度等国家都在积极发展生物柴油产业,2001 年美国生物柴油的产量已达 5.7 亿~7.6 亿 t,到 2011 年美国生物柴油的产量将达到 130 亿 t。现在国际上相对成熟的工业化生产工艺主要以化学合成法为主,要将生物法运用到大规模工业化生产中还面临不少难题,这就要求科研工作者付出更大、更艰辛的努力。

我国正逐步加大相关方面的研究工作,清华大学、北京化工大学、江苏工业学院、江苏大学、湘潭大学等已在生物柴油研究工作上取得了一定进展,同时在四川省和海南省已建成拥有自主知识产权的企

业,年产百万吨,但总体还相对落后。我国应该走以国家政策大力扶持,地方政府全力支持,各种社会资金积极投入的科学生产模式,加快从实验室到建厂投产的速度,形成从原料供给—工厂生产—全国销售的完善产业链。

参考文献

- [1] 王一平,翟怡,张金利,等.生物柴油制备方法研究进展[J].化工进展,2003,22(1):8-12.
- [2] 谭天伟,王芳,邓立,等.生物柴油的生产 and 应用[J].现代化工,2002,22(2):4-6.
- [3] Freedman B, Pryde E H, Mounts T L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1984, 61: 1638-1643.
- [4] Gemma V, Mercedes M, José A. Optimization of brassica carinata oil methanolysis for biodiesel production[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 2005, 82(12): 899-904.
- [5] Nelson L A, Foglia T A, Marmer W N. Lipase-catalyzed production of biodiesel[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1996, 73(8): 1191-1195.
- [6] 盛梅,李为民,邬国英.生物柴油研究进展[J].中国油脂,2003,28(4):66-70.
- [7] Vicente G, Coteron A, Martinez M, et al. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production[J]. Industrial Crops and Products, 1998, 8(1): 29-35.
- [8] Gerpe J V. Biodiesel processing and production[J]. Fuel Processing Technology, 2005, 86(10): 1097-1107.
- [9] Haas M J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock[J]. Fuel Processing Technology, 2005, 86(10): 1087-1096.
- [10] Zhang Y, Du M A, McLeana D D, et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment[J]. Biore-source Technology, 2003, 89(1): 1-16.
- [11] Muniyappa P R, Brammer S C, Noureddini H. Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product[J]. Biore-source Technology, 1996, 56(1): 19-24.
- [12] 杨继国,林炜铁,吴军林.酶法合成生物柴油的研究进展[J].化工环保,2004,24(2):116-120.
- [13] 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 an organic solvent[J]. Journal of Bioscience Bioengineering, 1999, 88(6): 627-631.
- [14] Kamini N R, Iefuji H. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by cryptococcus spp. S-2[J]. Process Biochemistry, 2001, 37(4): 405-410.
- [15] Lara P V, Park E Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using Candida cylindracea lipase in organic solvent system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(3/4): 270-277.

(下转第 20 页)

达地面的紫外线强度。此外,农业面源污染对人类健康的影响也不容忽视。据调查,累积于饮用水源特别是井水中的化肥氮磷和农药对至少 13 个省份、数以百万计居民的健康构成威胁。如何在经济高速发展的同时控制环境污染,改善环境质量,是实现农业经济可持续发展亟待解决的重要问题,因此迫切需要生态型的快速环境修复技术和方法。

2 生物修复的特点和前景

环境修复技术包括物理方法、化学方法和生物方法三大类。生物修复是利用生物的生命代谢活动减少存在于环境中的有毒、有害物质的浓度或使其完全无害化,使受污染的环境能部分或完全恢复到原始状态的过程^[1]。由于生物修复技术具有纯生态过程的显著优越性,从根本上体现了可持续发展的战略思想,因此生物修复技术已成为环境保护技术的重要组成部分。生物修复的两大主体是微生物和植物,而目前微生物是环境生物修复技术的主力军,另外少部分利用植物作为环境污染控制的生物。

2.1 微生物修复技术

微生物修复是利用一种或多种微生物来降解环境中的有机毒物,如石油烃类和有机磷、有机氯农药等,使这类物质变成无毒、无害物质,最终形成二氧化碳、水和氮气。利用生物技术处理污染物通常能一步到位,避免了污染物的多次转移^[2],可修复用其他方法难以处理的环境介质,使受污染的水、土壤资源等得以重新利用;微生物修复的另一大特点就是可通过优势菌群和微生态的调整来强化环境的自净

能力。因此,国外已将该类技术成功应用于土壤、地下水、河道和近海洋面的污染治理。

对土壤的微生物修复技术分为地面生物处理和原位生物修复 2 类。地面生物处理是将受污染的土壤挖掘出来,在地面建造的处理设施内进行生物处理,主要有地面堆肥和泥浆生物反应器处理等。原位生物修复是在基本不破坏土壤和地下水自然环境的条件下,将受污染的土壤和地下水原位进行修复。在原位生物修复技术中,一种途径是提供微生物生长所需要的营养,改善微生物生长的环境条件,从而大幅度提高野生微生物的数量和活性,提高其降解污染物的能力,这种途径称为生物强化修复;另一种途径是投加实验室培养的对污染物具有特殊亲和性的目标微生物,使其能够降解土壤和地下水中的污染物,称为生物接种修复。

底物强化微生物筛选法是实验室筛选目标微生物的常用手段。微生物经过一段时间的适应性对底物产生了较强的氧化能力,适应性的可能机制包括特定酶的诱导和抑制、基因突变产生新的代谢群体、有机体的选择性富集等^[3]。底物强化微生物筛选法由于周期较长,难以同时降解多种底物,所以现在许多实验室采用分子生物技术构建具有所需目标特征的集合菌株^[4]。但生物接种修复从实验室结果放大到环境应用中还需要考虑一些生态环境问题:如外源微生物在环境中是否能快速生长并具有较高的酶活性,外源微生物是否具有较强的与土著微生物生存生长的竞争能力,接种微生物是否无致病性且不产生有毒代谢物等^[5]。

(上接第 18 页)

- [16] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/4/5): 133 - 142.
- [17] Dossata V, Combes D, Martyb A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(3/4/5): 194 - 200.
- [18] Du W, Xu Y, Liu D H, *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 30(3/4): 125 - 129.
- [19] Soumanou M M, Bornscheuer U T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(1): 97 - 103.
- [20] Iso M, Chen B, Eguchi M, *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 16(1): 53 - 58.
- [21] 邓利, 谭天伟, 王芳. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(1): 97 - 101.
- [22] Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, *et al.* Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001, 57(4): 515 - 520.
- [23] Ban K, Kaied M, Matsumoto T, *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.
- [24] Ban K, Hama S, Nishizuka K, *et al.* Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/4/5): 157 - 165.
- [25] Hama S, Yamaji H, Kaieda M, *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. ■