

7. 脂解酶催化轉酯

利用酸性或鹼性催化劑進行轉酯化反應，雖有高轉酯率之優點，但也有高耗能、反應後甘油回收與催化劑移除、廢水處理、以及油脂所含水分與游離脂肪酸對於轉酯化反應產生干擾等缺點。然而，在有水（Aqueous）或無水（Nonaqueous）狀態下，採用酵素催化進行轉酯化反應，則有反應條件較溫和、甘油回收容易、產物純度高、分離與純化步驟簡單、不受油脂所含水分與游離脂肪酸之影響等優點，使得利用脂解酶（Lipase）轉酯產製生質柴油逐漸受到重視，但脂解酶催化劑之產製成本遠高於鹼性或酸性催化劑，也是將來能否將脂解酶催化劑廣泛應用於生質柴油製程之關鍵。表 7-1 為鹼性催化劑與脂解酶催化劑之比較。

表 7-1 鹼性催化劑與脂解酶催化劑之比較（Fukuda et al.,2001）

Table 7-1 Comparison between alkali-catalysis and lipase-catalysis methods for biodiesel fuel production（Fukuda et al.,2001）

	Alkali-catalysis process	Lipase-catalysis process
Reaction temperature	60~70°C	30~40°C
Free fatty acids in raw materials	Saponified products	Methyl esters
Water in raw materials	Interference with the reaction	No influence
Yield of methyl esters	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Difficult	Easy
Purification of methyl esters	Repeated washing	None
Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive

Mittelbach 等人（1990）以石油醚（Petroleum ether）作為溶劑，利用脂解酶 *Pseudomonas fluorescens* 與固定化酵素（Immobilized enzymes）*Mucor miehei* 與 *Candida sp.* 對向日葵油進行醇解反應；該研究除了探討這三種不同脂解酶與酵素在無水、不同反應溫度與不同醇（甲醇、乙醇與 1-丙醇）下之醇解能力外，並以脂解酶 *Pseudomonas fluorescens*，在使用石油醚（Petroleum ether）作為溶劑下，探討使用不同醇之醇解轉換率、有無添加水分之影響與酯化能力。研究結果顯示：沒有添加溶劑下，使用 96% 之乙醇者，轉換率最高，其次依序為 1-丙醇、乙醇與甲醇，而不管有無添加水，醇解之轉換率隨著使用醇之鏈長度增加而增加，除了甲醇之外，有添加水分者，醇解之反應率都比沒有添加水者較高；加入油酸之向日葵油，其中 80% 之游離脂肪酸可以在 5 小時內酯化成脂肪酸油酯，顯示脂解酶具有催化游離脂肪酸酯化反應之能力。

Linko 等人（1995）利用 *Achromobacter sp.*、*Candida rugosa*、*Chromobacterium viscosum*、*Rhizomucor miehei*、*Pseudomonas fluorescens* 等脂解酶催化油酸丁酯（Butyl Oleate）與油菜籽油脂肪酸 2-乙基己酯（2-ethyl-1-hexyl ester of rapeseed oil fatty acid）之酯化與轉酯化製程。該研究首先以 3.27 mM 之丁醇、0.7 mM 之油酸、1.13 % 之脂解酶，於反應溫度 40°C、攪拌速度 200rpm 等條件下，以油酸甲酯之產率高低篩選出四種活性較強之脂解酶 *Chromobacterium viscosum*、*Pseudomonas fluorescens*、*Candida rugosa*、*Rhizomucor miehei*，

再以 2-Ethyl-1-hexanol (2-乙基己醇)，於醇油莫耳比 3:1、3%之添加水分與 3.3%之脂解酶等條件下，利用篩選出之脂解酶將油菜籽油轉酯化成 2-乙基己酯，除 *Rhizomucor miehei* 外，其餘脂解酶均能在反應時間 24 小時獲得 96% 以上之產酯率；該研究進一步探討脂解酶劑量、添加水分量、醇油莫耳比、反應溫度等因素對酯化反應與轉酯化反應之影響。研究結果顯示：(1) 脂解酶劑量越高，初始階段之酯化與轉酯化反應速度越快，隨後之差異即逐漸消失；(2) 酯化反應中 (醇油莫耳比 0.5:1、2:1)，使用脂解酶 *Chromobacterium viscosum* 者，可以在不添加水分下，於反應時間 12 小時獲得 98% 之產酯率，其餘脂解酶在不添加水分下，均無法產酯；(3) 酯化反應中 (醇油莫耳比 0.5:1、2:1)，於 3.2% 之添加水分下，可獲得 90% 之產酯率者，包括使用 *Candida rugosa* 與 *Pseudomonas fluorescens* 作為脂解酶者；(4) 酯化反應中 (醇油莫耳比 0.5:1、2:1)，使用 *Rhizomucor miehei* 作為脂解酶者，只有在 14% 之添加水分下，才可獲得 90% 之產酯率；(5) 轉酯化反應中 (醇油莫耳比 2.8:1)，使用 *Candida rugosa* 作為脂解酶者，最佳之水分添加量為 3%；(6) 酯化反應中 (3.2% 之添加水分、0.3% 之脂解酶)，使用 *Candida rugosa* 作為脂解酶者，醇油莫耳比 0.5:1~2:1，產酯率均在 80% 以上；(6) 酯化反應中 (3.2% 之添加水分、0.3% 之脂解酶)，使用 *Chromobacterium viscosum* 作為脂解酶者，產酯率高低受醇油莫耳比之影響較小；(7) 以 *Candida rugosa* 作為脂解酶之轉酯化反應中 (3.3% 之脂解酶、3% 之添加水分)，最佳之醇油莫耳比為 2.8:1；(8) 以 *Candida rugosa* 作為脂解酶之轉酯化反應中 (3.3% 之脂解酶、3% 之添加水分)，最佳之反應溫度為 55°C。

Nelson 等人 (1996) 使用五種不同之脂解酶 *Mucor miehei* (*Lipozyme IM60*)、*Candida antarctica*、*Geotrichum candidum*、*Pseudomonas cepacia* 與 *Rhizopus delemar*，以 Primary alcohols (甲醇 Methanol、乙醇 Ethanol、丙醇 Propanol、丁醇 Butanol、異丁醇 iso-Butyl) 或 Secondary alcohols (異丙醇 iso-Propanol、2 丁醇 2-Butanol)，於反應溫度 45°C 下，將油菜籽油 (Rapeseed oil)、牛油 (Tallow)、高 FFA 含量之油脂 (Grease)、黃豆油 (Soybean oils) 與橄欖油 (Olive oil) 轉酯化，檢驗脂解酶之轉酯能力，研究結果顯示：(1) 於使用 Primary alcohols、10% 之催化劑劑量、溶劑 Hexane 與醇油莫耳比 3:1 等條件下，*Mucor miehei* 之轉酯效率最高；(2) 針對牛油 (Tallow)，於使用 Second alcohols、25% 之催化劑劑量、溶劑 Hexane 與醇油莫耳比 3:1 等條件下，*Candida antarctica* 與 *Pseudomonas cepacia* 之轉酯效率較高。該研究也探討不同醇類下，水分、游離脂肪酸含量與有無溶劑對於轉酯之影響，研究結果顯示：(1) 使用甲醇時，若反應物中加入水分，則酯之產率將降低；(2) 使用甲醇時，FFA 含量若超過 9%，轉酯反應即受阻，使用乙醇時，FFA 含量必須低於 22.4%，而 FFA 含量較高者，則以採用 Secondary alcohols 較佳；(3) 使用甲醇與乙醇時，有添加溶劑者，轉酯率高於無添加溶劑者。

Basri 等人 (1997) 利用 *Rhizopus rhizopodiformis* 製作菌絲脂解酶 (Mycelial lipase)，於反應溫度 37°C 下，對 Palm oil mid-fraction (PMF) 進行水解、酯化與醇解反應，並探討醇類 (甲醇與丙醇)、醇油莫耳比與轉換率之關係、溶劑與脂解酶活性之關係，以及分析脂解酶以不同溫度 (20°C~70°C)，於己烷 (Hexane) 中培養 1 小時後之殘餘活性 (Residual activity)，以探討熱穩定性。研究結果顯示：(1) 於反應溫度 37°C、醇油莫耳比 2:1 等條件

下，使用甲醇者，歷經 10 小時後，轉換率為 60%，使用丙醇者，轉換率為 85%；(2) 醇（甲醇或丙醇）油莫耳比以 2:1 最佳，過量醇反而造成轉換率降低；(3) 用於醇解反應之有機溶劑以己烷最佳；(4) 脂解酶以低於 60°C 之溫度，於己烷（Hexane）培養 1 小時後之殘餘活性仍高於 80%，若溫度為 70°C，則殘餘活性下降為 70%，呈現相當高之熱穩定性；(5) 當培養時間延長至 24 小時，若培養溫度為 40°C，則殘餘活性仍可維持在 70% 以上，若培養溫度為 70°C，則殘餘活性降低至 0。

Selmi 與 Daniel (1998) 利用固定化脂解酶 *1,3-specific Mucor miehei*，以乙醇對向日葵油進行醇解反應，探討醇油莫耳比 (2:1~6:1)、反應溫度 (35~60°C)、水含量 (0.0~0.5%) 與脂解酶劑量 (0.1~0.5mg) 對轉換率與產物成分之影響，找出最佳之操作條件，並以連續四次之醇解反應，探討有無加入 Silicate-gel 對於脂解酶再利用之影響。研究結果顯示：(1) 於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 3:1、脂解酶劑量為 0.3g 等條件下，1 小時後之乙酯產率為 66%、單酸甘油酯與雙酸甘油酯分別為 19.3% 與 8.3%，至 5 小時後，乙酯產率達 83%；(2) 醇油莫耳比 3:1、脂解酶劑量 0.5g、反應溫度 50°C、水含量 0% 為最佳之反應條件，水含量越高者，轉換率越低，其結果與 Mittelbach 等人 (1990) 之結果不同，本研究無添加溶劑，後者則使用石油醚作為溶劑；(3) 在第一次醇解反應中，有無添加 Silicate-gel 對於轉換率之影響不大，但後續三次醇解反應，有添加 Silicate-gel 者，轉換率則比沒有添加者高，其原因在於 Silicate-gel 扮演著甘油收集者之角色，保護脂解酶以避免甘油吸附在固定脂解酶之支撐物 (Macroporous anion exchange resin)。

Kaieda 等人 (1999) 使用脂解酶 *Rhizopus oryzae*，以甲醇對黃豆油進行轉酯化反應。該研究先於醇油莫耳比 1:1 下，使用 1.05、4.16、15.8、25.9、71.3、179.3 IU (Unit of enzyme activity) / (mL 酵素溶液) 等不同劑量之脂解酶對醇解初始速率之影響，再於醇油莫耳比 1:1 下，在酵素溶液中加入 0.6~9.0mL (或 2~30wt %) 不等之水分，且於甲酯產率達到 30% 與 60% 時，再加入 1mol 之甲醇，以探討不同水分對於甲酯產率之影響，然後以 60 IU/mL 劑量之脂解酶 *Rhizopus oryzae*，於不同醇油莫耳比下，探討黃豆油之水解與轉酯化反應，其中包括階段式加入甲醇之影響。研究結果顯示：(1) 催化劑劑量為 25 IU/mL 時，甲酯之產率已達最大；(2) 加入 1.2~9.0mL 之水 (4~30 wt %)，歷經 70 小時後，甲酯產率可達 80~90%，若加入水分僅有 0.9mL，則甲酯產率在 180 小時後僅有 73.3%，若加入水分更少，則甲酯產率更低；(3) 由反應過程中游離脂肪酸與甲酯之產率變化，可知採用脂解酶催化之反應方式與連續式反應機制相同，即三酸甘油酯先水解成游離脂肪酸與部份甘油酯 (Partial glycerides)，而後游離脂肪酸再與甲醇發生酯化反應；(4) 採取三階段加入甲醇方式，轉酯率可達 80%；(5) 脂解酶 *Rhizopus oryzae* 具有 1(3)-regiospecificity，因此反應過程中，1,2-diglyceride 與 2,3-diglyceride 逐漸減少，1,3-diglyceride 則逐漸增加。

Shimada 等人 (1999) 利用 *Rhizomucor miehei*、*Candida antarctica*、*Rhizopusdelemar*、*Fusarium heterosporum*、*Aspergillus niger* 等五種固定化脂解酶與甲醇，於醇油莫耳比 1:1、脂解酶劑量 0.4g、反應溫度 30°C 等條件下，對蔬菜油 (黃豆油與油菜籽油混合) 進行四次甲醇解反應，並於每次反應後將脂解酶轉至新鮮之醇油混合反應物，找出其中最佳之固定化

脂解酶 *Candida antarctica* 作為後續研究之脂解酶，並探討反應物中加入之水分量、醇量、脂解酶劑量（1~10%）與反應溫度（20~60°C）對於轉換率（甲酯產率）之影響，而後採取三階段加入甲醇方式進行蔬菜油之醇解反應，並探討脂解酶 *Candida antarctica* 之穩定性。研究結果顯示：(1) 於醇油莫耳比 1:1、脂解酶劑量 0.4g、反應溫度 30°C、沒有加入水分等條件下，歷經 6 小時反應後，測得之甲酯產率為 30.7%，且產率隨加入水分量之增加而降低，當加入水分量為 0.7% 時，甲酯產率低於 10%，但若於反應 24 小時測量甲酯產率，則加入水分量即便達 0.7%，甲酯產率也可達 27.5%；(2) 於醇油莫耳比 1:1、脂解酶劑量 0.4g、反應溫度 30°C 等條件下，加入 0~2.0% 之水分，則第一次反應之甲酯產率隨加入水分量之增加而降低，水解率則增加，但經過五次甲醇解反應後（每次反應後，將脂解酶轉置新鮮之醇油混合反應物，但不再加入水分），過量之水分已被移除，導致水解率降低、甲酯產率回升到沒有加入水之位準；(3) 最佳之反應條件為醇油莫耳比 1:1、反應溫度 30°C、脂解酶劑量 4%（0.4g）、攪拌速度 130 oscillations/min；(4) 加入甲醇量超過 1 莫耳當量時，將導致脂解酶失效；(5) 於反應溫度 30°C 下，先加入 1 莫耳當量之甲醇，再分別於第 24、48 小時加入 1 莫耳當量之甲醇，最後之轉換率為 98.4%；(6) 固定化脂解酶 *Candida antarctica* 歷經 50 次反應循環（每次循環反應時間 48 小時，於第 14、24 小時分別加入 1 莫耳當量之甲醇），轉換率仍可維持 95% 以上。

Wu 等人（1999）利用脂解酶 PS-30 與 95% 之乙醇，於不同溫度（25~55°C）、不同脂解酶劑量（4.375~10 wt.%）、不同反應時間（0.5~3 小時）與不同醇油莫耳比（3:1~6:1）等條件下，對回收之餐廳油脂進行轉酯化反應，並利用 Response Surface Methodology (RSM) 找出最佳之操作條件並預測最佳操作條件下之產酯率，所得之最佳條件為溫度 38.4°C、脂解酶劑量 13.7wt %、反應時間 2.47 小時、醇油莫耳比 6.6:1，而產酯率為 85.4%；以最佳條件為基礎，實地試驗結果卻發現產酯率比預測值低 10~15%，因此該研究調整推估之操作條件為溫度 38°C、脂解酶劑量 5%、醇油莫耳比 4:1，惟所獲得轉酯率仍不及 85%，而後於原條件下，反應時間 1 小時後，加入 5wt % 之脂解酶 SP435，即可獲得超過 96% 之產酯率。

Abigor 等人（2000）利用脂解酶 PS30 作為催化劑，以不同之醇類（Methanol、Ethanol、1-Propanol、iso-Propanol、n-Propanol、t-Butanol、1-Butanol），並使用 Hexanem/ether（1:1，v/v）與飽和之 NaCl 作為溶劑，於醇油莫耳比 4:1、催化劑劑量 10%（油重）、反應溫度 40 °C、反應時間 8 小時與攪拌速度 250rev/min 等條件下，將棕櫚核油（Palm kernel oil）與椰子油（Coconut oi）轉酯化生成生質柴油，並探討產物之黏度、Cloud point 與 Cloud point 等物理特性。研究結果顯示：棕櫚核油之轉酯部分，使用乙醇所得轉酯率最高為 72%，依序為 t-Butanol 之 62%、1-Butanol 之 42%、n-Propanol 之 42%、iso-Propanol 之 24%，使用甲醇者最低，只有 15%；椰子油之轉酯部分，使用 1-Butanol 與 iso-Butanol 者最高為 40%，使用乙醇者為 35%，使用 1-Propanol 者為 16%。

Hsu 等人（2000）提出將 *Pseudomonas cepacia* (PS-30) 固定在 Phyllosilicate sol-gel matrix 之創新技術。由於固定化脂解酶之活性受到烷基胺鹽（Alkylammonium salt）、無機催化劑（Inorganic catalyst）、Phyllosilicate clay 相對於 TMOS 之體積比等因素所影響，該研究

分別就 Trimethylammonium chloride (TMA) 與 Cetyltrimethyl ammonium chloride (CTMA)、Tetramethyl orthosilicate (TMOS) 與 NaF 濃度、水活性 (Water activity, a_w) 對固定化脂解酶之活性影響加以探討，並於反應溫度 30°C 下，利用不同固定化方式之脂解酶，以正辛醇 (n-Octanol) 將月桂酸 (Lauric acid) 酯化，比較 PS-30 在不同固定化方式下之活性，再於反應溫度 20°C 下，歷經五次循環反應，每次反應時間 4 小時，比較 PS-30 有無固定化之活性。研究結果顯示：(1) 使用 CTMA 可以使脂解酶之活性明顯增加，且於 CTMA 濃度為 100 mM 時，可獲得最佳之脂解酶活性；(2) 固定化脂解酶活性之最佳條件為 TMOS 之添加體積比為 10% (v/v)、NaF 濃度為 150mM；(3) 將脂解酶固定於 TMOS 者，活性最低，固定於 TMOS/PTMS (Propyltrimethoxysilicate) 者，初始階段反應速度很快，固定於 Phyllosilicate sol-gel/NaF 者，活性最佳；(4) 固定化脂解酶活性在五次循環使用後，活性仍可維持，未固定化者，活性降低 30~50%。

Samukawa 等人 (2000) 探討固定化之脂解酶 *Candida antarctica* (Novozym 435) 之預處理、含水量與甲醇劑量對轉酯化反應之影響，該研究利用 4wt % 之 Novozym 435 與甲醇，於反應溫度 30°C、初始醇油莫耳比 1:1 等條件下，對黃豆油進行醇解反應，反應前將 Novozym 435 於油酸甲酯中培養 (Incubate) 0~6 小時，然後再培養於黃豆油中 0~24 小時；該研究並利用 Michaelis-Menten-type 方程式來分析脂解酶在有無預處理下之反應速度與醇量間關係，探討有無預處理對於脂解酶醇解效應之影響。研究結果顯示：(1) 將 Novozym 435 先於油酸甲酯 (Methyl Oleate) 培養 0.5 小時，然後再置入黃豆油中培養 12 小時，可以獲得最高之醇解反應速度；(2) 當水含量增加時，所使用之脂解酶不管有無預處理，醇解反應速度都隨之降低，但經過預處理者，因加入之水分在穿過脂解酶之固定基材時，會被滲入之油酸甲酯與黃豆油壓抑，因此醇解反應速率降低之程度 (幅度) 較無預先處理者小；(3) 在初步反應中，當醇用量低於 0.67 莫耳時，反應速度隨醇用量之增加而增加，當醇用量超過 0.67 莫耳時，反應速率則隨著醇量之增加而減少；(4) 經過預處理後，反應物質得以穿過脂解酶之固定基材，故經預處理後之脂解酶活性較佳，但過量之醇反而會導致脂解酶失活，因此為了達到最佳之醇解效果，醇用量必須妥善控制；(5) 採取階梯式添加甲醇之方式決定添加之甲醇量，每隔 0.25~0.4 小時添加 0.33 莫耳之甲醇，於歷經 3.5 小時後，甲酯產率可達到 97%；(6) Novozym 435 在採取階段式添加甲醇之方式下，歷經 20 次循環使用，甲酯產率仍在 96% 以上。

Steinke 等人 (2000) 利用 Novozym 435、Lipozyme IM 與 *Carica papaya latex* 等三種脂解酶，Crambe alcohol、Camelina alcohol、油醇 (Oleyl alcohol)、辛醇 (n-Octanol) 與異丙醇 (iso-Propanol) 等五種醇類，對 Crambe oil 與 Camelina oil 等二種油脂料源進行醇解反應，產製長鏈酯 (Long-chain ester)，比較三種脂解酶之醇解能力，觀察醇油莫耳比對轉換率之影響，探討不同醇 (Crambe alcohol、Camelina alcohol) 與三種不同脂解酶之最佳搭配，並比較不同醇類對轉換率之影響。研究結果顯示：(1) 於醇油莫耳比 3:1、反應溫度 60°C 等條件下，使用油醇與 Novozym 435 者，轉換率為 90~100%，使用油醇與 Lipozyme IM 者，轉換率為 50~60%，使用油醇與 *Carica papaya latex* 者，轉換率為 30~50%；(2) 當料源為 Crambe oil 時，產製之酯成分以 C40 為主，當料源為 Camelina oil 時，產製之酯成分以 C36

為主；(3) 於反應溫度 60°C 下，使用油醇與 Novozym 435 者，醇油莫耳比 3:1 或 10:1 之轉換率差異不大，使用油醇與 Lipozyme IM 者，醇油莫耳比 10:1 之轉換率比醇油莫耳比 3:1 者，高出許多；(4) 於醇油莫耳比 3:1、反應溫度 60°C 等條件下，當料源為 Camelina oil 時，Novozym 435 搭配 Camelina alcohol 之轉換率最高，當料源為 Crambe oil 時，Novozym 435 搭配 Crambe alcohol 之轉換率最高；(5) 使用長鏈醇 (Crambe alcohol、Camelina alcohol、油醇) 之轉換率最高，依序為中鏈醇 (辛醇) 與短鏈醇 (異丙醇)。

Watanabe 等人 (2000) 利用固定化脂解酶 *Candida antarctica* 與甲醇，於反應溫度為 30°C、脂解酶劑量為 4% 與攪伴速度為 130 oscillations/min 等條件下，對蔬菜油 (黃豆油與油菜籽油混合) 進行醇解反應，產製生質柴油，該醇解反應包括三階段與兩階段批次式、三階段與兩階段流動式等；其中，批次式係先加入 1/3 莫耳當量之甲醇，而後再一次加入其餘 2/3 或分二次各加入 1/2 莫耳當量之甲醇，三階段流動式係利用三個 Column 作為反應器，每個 Column 內裝有 3g 之固定化 *Candida antarctica*，將蔬菜油與 1/3 莫耳當量之甲醇混合後，用一個蠕動式馬達注入 Column 中，於反應溫度 30°C 下，進行第一階段醇解反應，再將第一階段反應後之洗出物 (Eluate) 與 1/3 莫耳當量之甲醇混合加入另一個 Column，進行第二階段醇解反應，再將第二階段反應後之洗出物與 1/3 莫耳當量之甲醇混合加入另一 Column，進行第三階段醇解反應；兩階段流動式則僅利用二個 Column 作為反應器，在第二階段反應中加入 2/3 莫耳當量之甲醇。為了探討脂解酶之穩定性，進一步採取循環反應方式，於階段醇解反應後，換上新鮮之油脂與甲醇混合物，進行另一循環之醇解反應；該研究 (1) 將長鏈三甘油酯基 (Acylglycerol, AG) 與 33% 甲酯 (ME) 混合，稱為 AG/ME33，並探討甲醇用量對 AG/ME33 醇解反應之影響；(2) 比較三階段 (於第 7、17 小時各加入 1/3 莫耳當量之甲醇) 與兩階段 (於第 7 小時加入 2/3 莫耳當量之甲醇) 批次式反應之速率與轉換率；(3) 以三階段 (於第 10、24 小時各加入 1/3 莫耳當量之甲醇，共 48 小時) 與兩階段 (於第 12 小時加入 2/3 莫耳當量之甲醇，共 36 小時) 批次式反應，探討脂解酶之耐久性；(4) 探討流率與階段流動式反應之關係；(5) 以三階段流動式反應探討脂解酶之耐久性。研究結果顯示：(1) 由於甲醇在 AG/ME33 之溶解度高於在 AG 者，因此在 AG/ME33 中使用 1/2 莫耳當量之甲醇，並不會使脂解酶失活；(2) 甲醇在 AG/ME33 中之溶解度為 2/3 莫耳當量；(3) 在 AG/ME33 中，使用 1/1、5/3、7/3 莫耳當量之甲醇，醇解反應速度降至使用 2/3 莫耳當量甲醇者之 88%、66%、3%；(4) 採用三階段批次式反應者，第三階段之反應速度低於前二階段，採用兩階段批次式反應者，僅需 20 小時即可達 96.5% 之轉換率，比三階段批次式反應者省 27% 之反應時間；(5) 採用兩階段批次式反應者，歷經 70 次循環 (105 天) 後，仍可維持 95% 以上之轉換率，採用三階段批次式反應者，歷經 50 次循環 (100 天) 後，仍可維持 95% 以上之轉換率；(6) 流率越低者，轉換率越高；(7) 採用三階段流動式反應者，歷經 50 次循環 (100 天) 後，仍可維持 92% 以上之轉換率，脂解酶之活性並未被破壞。

Ban 等人 (2001) 將具有 1,3-positional specificity 之脂解酶 *Rhizopus oryzae* cell 固定在 BSPs (Biomass Support Particles) 當作 Whole-Cell Biocatalyst，對黃豆油進行醇解反應，並在基質培養與固定化脂解酶過程中添加與基質相關之化合物，包括橄欖油 (Olive oil)、油酸 (Oleic acid)、油醇 (Oleyl alcohol)、己酸甲酯 (Methyl caprate)、Tween-80 與葡萄糖 (

Glucose)，然後於反應溫度為 35°C、反應時間為 2.5 小時、水含量為 15%、醇油莫耳比為 1:1、葡萄糖濃度為 3g/l 等條件下，比較添加物種類與添加物濃度對於甲醇解反應之影響，找出最佳之添加物種類與濃度，而後再探討基質培養階段添加之葡萄糖濃度對於甲酯產率之影響；並於固定化脂解酶參與甲醇解反應前，先將固定化脂解酶於丙酮 (Acetone)、甲醇、乙醇或異丙醇中培養，以分析培養時間對於甲酯產率之影響，最後再採三階段加入甲醇（分別於反應時間第 24、48 小時各加入 1 莫耳當量之甲醇）之方式，探討反應物中水分含量（0~30%）對於甲醇解活性之影響。研究結果顯示：(1) 於添加物劑量為 30g/l 下，除了添加己酸甲酯外，其餘添加物對於甲酯之產率均比未加入添加物者高，至於胞外水解活性 (Extracellular hydrolysis activity) 則以未加入添加物者為最高，顯然加入之添加物會把脂解酶維持在細胞 (Cell) 內；(2) 添加物中以橄欖油最佳，濃度則以 30g/l 最佳，當添加之濃度超過 30g/l 以上時，並不會增加甲酯之產率；(3) 添加葡萄糖濃度 0~5g/l 者，甲酯產率較高，當添加之濃度超過 5g/l 時，甲酯產率逐漸下降，因此以不添加葡萄糖者為最佳，有助於提高甲醇解之活性；(4) 將固定化脂解酶於丙酮或異丙醇中培養，對於甲酯產率之影響較小，若於甲醇或乙醇中培養，則甲酯產率急速下降，因此固定化脂解酶參與醇解反應前以不先處理為佳；(5) 含水量為 4~30% 時，歷經 72 小時之醇解反應，可獲得 80~91.1% 之甲酯產率，其中以含水量為 15% 時，可獲得最高之甲酯產率 91.1%。

Hsu 等人 (2001) 將脂解酶 *Pseudomonas cepacia* (PS-30) 固定在 Phyllosilicate sol-gel matrix 上，使用甲醇、乙醇、95% 乙醇、n-丙醇 (n-Propanol)、n-丁醇 (n-Butanol)、異丙醇 (iso-Propanol)、異丁醇 (iso-Butanol) 等醇類，對餐廳回收油脂 (Recycled restaurant grease) 與牛油 (Beef tallow) 進行醇解反應，產製烷酯 (Alkyl ester)，並探討脂解酶 PS-30 固定於 Phyllosilicate sol-gel matrix 前之濃度對於轉換率之影響，比較 PS-30 沒有固定化處理者與有固定化處理者之轉酯能力差異、不同醇類搭配未固定與有固定之 PS-30 之轉酯能力、PS-30 沒有固定化處理與有固定化處理下有無添加分子篩 (Molecular sieves) 對於轉換率之影響，最後再檢驗 PS-30 循環再利用之能力。研究結果顯示：(1) 使用 95% 之乙醇，於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 4:1、反應時間為 24 小時等條件下，PS-30 濃度越高，轉換率越高，當濃度超過 150mg/mL 時，轉換率再增加之情形即不再顯著；(2) 使用 95% 之乙醇，於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 4:1、反應時間為 24 小時等條件下，使用未固定化處理之 PS-30，醇解反應初始階段之轉酯能力高於有固定化處理者，當反應時間超過 22 小時，未固定化處理之 PS-30 轉酯能力反而低於有固定化處理者；(3) 甲醇搭配未固定化之 PS-30 者，產出之烷酯最少，若改搭配固定化之 PS-30，則甲醇會使脂解酶失效之現象就不再發生；(4) 使用 95% 之乙醇，於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 4:1、反應時間為 18 小時等條件下，當料源為餐廳回收油脂時，使用固定化之 PS-30 者，烷酯產率為 84%~94%，高於使用固定化之 PS-30 者 (47%~89%)，當料源為牛油且使用固定化之 PS-30 時，一級醇之烷酯產率為 82%~94%，高於二級醇之 32%~68%；(5) 使用 95% 之乙醇，於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 4:1、反應時間為 18 小時等條件下，有添加分子篩者，轉換率較高，其中又以搭配固定化之 PS-30 者較高；(6) 使用 95% 之乙醇，於反應溫度為 50°C、醇油莫耳比為 4:1、每循環反應時間為 18 小時下，固定化之 PS-30 於歷經五次循環後，其轉酯能力影響不大，但使用未固定化之 PS-30 者，轉酯能力下降 50%。

Iso 等人 (2001) 在無水條件下，利用多孔性之高嶺土微粒 (Porous kaolinite particle) 作為載體 (Carrier)，固定脂解酶 *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK)、*P. cepacia* (Lipase PS)、*Mucor javanicus* (Lipase M)、*Candida rugosa* (Lipase AY)、*Rhizopus niveus* (Newlase F)，並以甲醇 (Methanol)、乙醇 (Ethanol)、正丙醇 (1-Propanol)、正丁醇 (1-Butanol) 等醇類，搭配 1,4-Dioxane、Benzene、Chloroform 與 Tetrahydrofuran (THF) 等不同之溶劑，於醇油莫比 3:1 下，對紅花油 (Safflower oil) 與三油酸甘油酯 (Triolein) 進行轉酯化反應，並探討不同溶劑與溶劑劑量對於轉換率之影響、評估比較固定脂解酶之活性、比較有無將脂解酶固定化對於轉換率之影響、探討最佳之反應溫度、探討含水量之影響與固定脂解酶重複使用之能力。研究結果顯示：(1) 於反應溫度 50°C 與使用甲醇、脂解酶 *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) 等條件下，四種溶劑中以 1,4-Dioxane 最有助於提高脂解酶催化劑之活性，且劑量越高，脂解酶催化劑之活性越高；若使用正丙醇 (1-Propanol)、正丁醇 (1-Butanol)，則不需要使用溶劑；(2) 於反應溫度 50°C 與使用正丙醇 (1-Propanol) 或正丁醇 (1-Butanol) 等條件下，五種固定化脂解酶中以 *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) 之活性最高；(3) 於反應溫度 50°C 下，使用固定化 *Pseudomonas fluorescens* 者比使用未固定 *Pseudomonas fluorescens* 者轉換率高，其中又以搭配 1-Propanol 者，較搭配 1-Butanol 者高；(4) 使用 1-Propanol 時，不管有無將 *Pseudomonas fluorescens* 固定化，反應溫度 (40~70°C) 中以 60°C 最佳，使用未固定化脂解酶者，於反應溫度 70°C 時，反應速度下降幅度，比使用固定化之脂解酶者大，其中固定化有助提高脂解酶之熱穩定度是關鍵因素；(5) 於反應溫度 50°C、反應時間 0.5 小時、使用固定化 *Pseudomonas fluorescens* 等條件下，水含量低於 0.3 wt % 者，水含量越高轉換率越高，當水含量超過 0.3 wt % 以上時，轉換率則隨含水量之增加而下降；(6) 脂解酶催化劑可以重複使用且其活性不會降低。

Kaieda 等人 (2001) 利用 *Candida rugosa*、*Penicillium camembertii*、*Penicillium roqueforti*、*Pseudomonas cepacia*、*Pseudomonas fluorescens*、*Candida lipolytica* 與 *Klebsiella oxytoca* SNSM-87 等七種脂解酶，以甲醇將黃豆油轉酯化成生質柴油；該研究於醇油莫耳比 1:1 下，使用 1 mL 之酵素溶液 (60 IU) 或 0.5g 之脂解酶粉末，比較七種脂解酶之醇解能力，然後選擇其中能力較強之三種脂解酶，於反應溫度 35°C 下，探討比較黃豆油之醇解、水解反應，以及油酸 (Oleic acid) 與甲醇之酯化反應；為了探討水含量對於醇解反應之影響，該研究以 *Pseudomonas cepacia*、*Candida rugosa*、*Pseudomonas fluorescens* 等三種脂解酶，於醇油莫耳比 1:1 下，在酵素溶液中加入 0~6.0 mL (或 0~20 wt %) 不等之水分，期間當甲酯產率達到 30% 與 60% 時，再加入 1 mol 之甲醇；最後，該研究利用 0.5g 之脂解酶 *Pseudomonas cepacia* 粉末或 1mL 之溶液，於反應溫度 35°C 下，探討不同之甲醇劑量對醇解反應之影響。研究結果顯示：(1) 使用酵素溶液且沒有添加溶劑下，七種脂解酶中以 *Pseudomonas cepacia* 之醇解能力最佳，依序為 *Candida rugosa*、*Pseudomonas fluorescens*，若使用脂解酶粉末，則只有 *Pseudomonas cepacia* 產生反應，其餘脂解酶幾乎沒有發揮效用；(2) 使用脂解酶 *Pseudomonas cepacia* 與 *Candida rugosa* 者，其初始反應速度很快，且以水解反應最為領先，此性質與脂解酶 *Rhizopus oryzae* 相似，意即三酸甘油酯先水解成游離脂肪酸與部份甘油酯 (Partial glycerides)，然後甲醇再與游離脂肪酸酯化成甲酯，至於使用脂解酶 *Pseudomonas fluorescens* 者，反應機制則與其他兩者不同，酯化反應遠比水解與醇解反

應低；(3) 使用脂解酶 *Candida rugosa*、*Pseudomonas fluorescens* 者，若水含量降低，則反應速率相對於使用脂解酶 *Pseudomonas cepacia* 者，呈現明顯降低之情形，顯示水含量有助於防止脂解酶失效；(4) 使用脂解酶 *Pseudomonas cepacia* 者，即使在低含水量下仍有較強之醇解反應，意即脂解酶 *Pseudomonas cepacia* 對過量甲醇之抵抗性最強；(5) 使用脂解酶粉末者，甲醇用量用高，醇解反應越低，若使用酵素溶液，則甲醇量越大者，初始反應速度越快；(6) 過量之甲醇容易導致脂解酶失效，與水分可以防止脂解酶失效之作用恰巧相反。

Watanabe 等人 (2001) 利用固定化脂解酶 *Candida antarctica* 與甲醇，對廢棄之食用油、蔬菜油 (黃豆油與油菜籽油混合) 分別進行三階段式批次式、三階段流動式與一階段流動式醇解反應。三階段批次式係以 Screw-capped vessel 作為反應器，內裝 4% 之 *Candida antarctica*，於反應溫度 30°C、攪拌速度 130 oscillation/min 下，先將 30 g 之油與 1/3 莫耳當量之甲醇混合後加入反應器，而後再分二次各加入 1/3 莫耳當量之甲醇；三階段流動式係利用三個 Column 作為反應器，每個 Column 內裝有 3g 之 *Candida antarctica*，將 30g 之油脂 (廢棄之食用油或蔬菜油) 與 1/3 莫耳當量之甲醇混合後，用一個蠕動式馬達注入 Column 中，於反應溫度 30°C 下，進行第一階段醇解反應，再將第一階段反應後之洗出物 (Eluate) 與 1/3 莫耳當量之甲醇混合加入另一個 Column，進行第二階段醇解反應，再將第二階段反應後之洗出物與 1/3 莫耳當量之甲醇混合加入另一 Column，進行第三階段醇解反應；一階段流動式則僅利用一個 Column 作為反應器，於 Column 內裝有 3g 之 *Candida antarctica*，將廢棄之食用油以甲基化 (Methylation) 產物 (內含 90.7% 之甲酯) 稀釋後，與甲醇混合後加入反應器，並於反應溫度 30°C 下進行醇解反應；三階段批次式、流動式或一階段流動式之醇解反應後，可換上新鮮之油脂與甲醇混合物，進行另一循環之醇解反應；該研究 (1) 於一階段流動式醇解反應中加入不等量之水分，並歷經五次反應循環，以探討含水量 (250 ppm、1980 ppm、2010 ppm) 對於醇解反應之影響；(2) 於三階段批次式反應之第 10、14 小時各加入 1/3 莫耳當量之甲醇，比較不同油脂之甲酯產率；(3) 於三階段流動式醇解反應下，探討不同流率對於甲酯產率之影響；(4) 於三階段流動式醇解反應、固定之流率下，探討 *Candida antarctica* 之耐久性；(5) 將廢棄食用油與三階段流動式醇解反應之第三階段反應洗出物混合 (甲酯含量 67.6%)，於一階段流動式醇解反應下，探討流率與甲酯產率之關係；(6) 於一階段流動式醇解反應下，比較以三階段流動式醇解反應之第二階段反應洗出物或第三階段反應洗出物與廢棄食用油混合之醇解反應。研究結果顯示：(1) 第一次反應於反應時間 6 小時測得之初始甲酯產率，隨著含水量之增加 (250~2010 ppm) 而降低 (9.3~6.4%)，但隨著後續循環反應之累進而縮小降低幅度，即反應物中之含水量對醇解反應之阻礙力，隨著後續循環反應之累進而下降，以含水量 2010 ppm 者為例，第一次反應之初始甲酯產率為 6.4%，第三、五次反應則增加至 10.1% 與 11.5%，其原因在於油脂中之水分因醇解反應轉換到甘油層，使得油脂之醇解反應加速；(2) 以蔬菜油、廢棄食用油分別進行三階段批次式醇解反應，於反應後第 10、24、48 小時，甲酯產率分別為 34%、66%、95.9% 與 24%、66%、90.4%；(3) 同一階段之醇解反應中，流率越高者，甲酯產率越低；(4) 將三階段醇解反應之流率固定為 6、6、4 mL/h 者，第一、二、三階段洗出物所含之甲酯分別為 32.6%、65.3% 與 89.9%，連續 100 日後，三個反應器洗出物之甲酯含量仍維持 33.5%、65.8% 與 90.3%，顯示 *Candida antarctica* 之活性不減；(5) 一階段流動式醇解反應之甲酯產率隨流率

之增加而降低；(6) 以三階段流動式醇解反應之第二階段反應洗出物作為料源，醇解反應較為有效，原因在於反應物內所含單三甘油酯基 (Monoacylglycerol; MAG) 與雙三甘油酯基 (Diacylglycerol, DAG) 比第三階段反應洗出物與廢棄食用油之混合物高，且 *Candida antarctica* 之活性有三甘油酯基專一性 (Acylglycerol specificity)。

Ban 等人 (2002) 將 *Rhizopus oryzae* cell 固定在 BSPs (Biomass Support Particles) 當作 Whole-Cell Biocatalyst (Intracellular lipase)，以分成六、三、二階段加入不同劑量之甲醇 (每階段 0.175g、0.35g、0.525g) 之方式，於反應溫度 35°C 下，對黃豆油進行醇酯化反應，並比較甲醇劑量對轉換率之影響；該研究在醇解反應前，將未固定化之 Extracellular lipase、Intracellular lipase 分別於 35°C 下，分別在油酸甲酯 (Methyl Oleate)、黃豆油中 Pre-incubated 3~96 小時，或分別在油酸甲酯、亞麻油酸甲酯 (Methyl Linoleate)、黃豆油中 Pre-incubated 6~168 小時，比較有無經過 Pre-incubate，以及在不同油脂中 Pre-incubated 對轉換率之影響；該研究為了探討固定化脂解酶 *Rhizopus oryzae* 在重複反應下之穩定性，於反應溫度 25°C 下，利用 0.01%~1.0 vol. % 之戊醛 (Glutaraldehyde, GA) 予以處理，並探討不同戊醛濃度對於轉換率之影響，以及比較沒有經過戊醛者，於多次循環後之轉換率。研究結果顯示：(1) 使用每階段加入 0.175g、0.35g 之甲醇，且分成六或三階段加入者，醇解反應之轉換率由首次之 80%，下降至第四次之 60%，若使用每階段加入 0.525g，且分成二階段加入者，醇解反應之轉換率由首次之 70%，下降至第四次之幾乎呈現停止，因此本研究採用每階段加入 0.35g 之方式作為後續研究之基礎；(2) 經過戊醛處理後之醇解活性比未經戊醛處理者高，且戊醛濃度越高，活性越高，惟濃度超過 1.0 vol. % 以上者，活性提高程度有限，因此本研究採用濃度 1.0 vol. % 之戊醛穩定脂解酶之活性；(3) 使用 Extracellular lipase 者，若於黃豆油中 Pre-incubated，則經過 96 小時後，催化劑之活性降幅也不大，若是於油酸甲酯中 Pre-incubated，則活性降低到幾乎為零；(4) 使用 Intracellular lipase 者，若於黃豆油中 Pre-incubated，則經過 168 小時後，催化劑之活性降幅也不大，若是於油酸甲酯或亞麻油酸甲酯中 Pre-incubated，則活性降低幅度較大，且油酸甲酯或亞麻油酸甲酯濃度越高者，降低幅度越大；(5) 採用三階段加入甲醇方式，且經過戊醛處理者，即便歷經六次循環反應，轉換率仍維持在 70~83% 間，但未經戊醛處理者，轉換率即降低到 50% 左右。

Belafi-Bako 等人 (2002) 將脂解酶 *Candida antarctica* (Novozym 435) 固定於 Macroporous resin support，於不添加溶劑、反應溫度 50°C、攪拌速度 130rpm、最終醇油耳比 4:1 等條件下，對向日葵油進行甲醇解反應，除探討階段式或連續式添加 (Stepwise and continuous feeding) 甲醇對轉換率之影響外，並進一步探討阻礙產物生成之因素到底是脂肪酸甲酯或甘油，然後採用 Membrane separation method，即透析法 (Dialysis) 去除障礙物，且分析流率 (45~85ml/min) 與溫度 (20~50°C) 對透析效果之影響。研究結果顯示：(1) 採用連續添加 (Continuous feeding) (每次加入 0.05ml，每次間隔 5 分鐘) 甲醇之方式，轉換率最高，至於採用階段式者，界分次數越高者，效果越好；(2) 甘油對於產物生成之阻礙較脂肪酸甲酯強；(3) 使用透析法去除甘油，最佳流率為 85ml/min，最佳溫度為 50°C。

Hsu 等人 (2002) 利用固定於 Granulated silica 之脂解酶 *Thermomyces lanuginosa*、

Candida antarctica (分別稱為 Gran-T.l. 與 Gran-C.a.)、固定於 Macroporous acrylic resin 之脂解酶 *C. antarctica* (稱為 SP435)、固定於 Phyllosilicate sol-gel matrix 之脂解酶 *Pseudomonas cepacia* (稱為 IM PS-30)，對回收之餐廳用油進行轉酯化反應，於反應溫度為 40°C、醇油莫耳比為 4:1 等條件下，探討四種固定脂解酶對於油脂乙醇解與甲醇解之影響、不同固定脂解酶之水活性 (Water activity, a_w) 與甲醇解反應之轉換率關係、水含量 (0~20wt %) 與分子篩 (Molecular sieve) 對於甲醇解反應之影響、不同醇 (一級醇與二級醇：Methanol、95% Ethanol、Ethanol、n-Propanol、iso-Propanol、n-Butanol、iso-Butanol) 與不同固定脂解酶搭配下之轉換率關係。研究結果顯示：(1) 使用 95% 之乙醇之乙醇解反應中，以使用 Gran-T.l. 者，初始階段之反應速度最快，使用 IM PS-30 者，所得之轉換率最高 95%，其他兩者 (SP435 與 Gran-C.a.) 則表現不佳；(2) 使用甲醇之甲醇解反應中，以使用 IM PS-30 者，所得之轉換率最高 98%，其次依序為使用 SP435、Gran-C.a.、Gran-T.l. 者；(3) 利用 Gran-T.l. 與 Gran-C.a. 者， a_w 約為 0.75，轉換率約 20%，利用 IM PS-30 者， a_w 約為 0.45，轉換率約 95%，利用 SP435 者， a_w 約為 0.45，轉換率約 40%；(4) 在反應物中加入分子篩可除去酯化反應中所產生之水分，有助於轉換率之提高 (使用 IM PS-30 者或 SP435 者，於添加 240mg 分子篩後，轉換率可提高 20%)，但使用之固定化脂解酶如 Gran-T.l. 與 Gran-C.a. 者，因在反應過程產生太多之水分，故添加分子篩之效應不大；(5) 有添加分子篩者，水分對於轉換率之負面影響比沒有添加分子篩者輕微；(6) 除了甲醇醇解反應外，IM PS-30 與 Gran-T.l. 是較佳之固定化脂解酶；(7) 以使用 IM PS-30 為例，使用一級醇所得之轉換率高於使用二級醇者，其原因在於二級醇擴散進入 Phyllosilicate sol-gel matrix 之速度較慢，此一現象可藉由增加 Matrix 之孔洞尺寸來改善。

Kose 等人 (2002) 利用固定化脂解酶 *Candida antarctica* (Novozym 435) 將來自土耳其、已精煉過之棉花籽油 (Cotton seed oil)，在沒有使用溶劑下醇解化成生質柴油，並探討脂解酶劑量、醇油莫耳比、反應溫度與反應時間對於醇解轉換率之影響，從中找出最佳之反應條件，再以最佳之條件，將棉花籽油分別與一級醇 (Isoamylalcohol) 及二級醇 (Isopropyl) 進行醇解反應。研究結果顯示：甲醇解反應之最佳條件為 30% 油重之脂解酶、醇油莫耳比 4:1、反應溫度 50°C、反應時間 7 小時，最大之醇解轉換率為 91.5%，至於使用一級醇及二級醇者，醇解轉換率介於 72%~94%。

Lee 等人 (2002) 利用脂解酶 *Candida antarctica*，以甲醇或乙醇對廚餘油脂與豬油進行醇解反應，產製烷酯，該醇解之料源先經過丙酮分餾 (Acetone fractionatio) 或以吸附劑包裹之層析柱 (Chromatography column) 處理後，於反應溫度為 30°C、脂解酶劑量為 10% 等條件下，先以 1 莫耳之甲醇對豬油進行醇解反應，而後再加入 1 或 2 或 3 莫耳之甲醇，以探討不同劑量之甲醇對於甲酯產率 (轉酯率) 之影響，並採三階段批次反應方式，每間隔 24 小時加入 1 莫耳劑量之甲醇或乙醇，累計 72 小時之反應時間，探討甲醇與乙醇之醇解能力，再探討醇解反應中添加矽膠 (Silica gel) 之作用。研究結果顯示：(1) 1 莫耳之甲醇對豬油進行醇解反應 24 小時，可得 24% 之轉酯率，再加入 1 或 2 或 3 莫耳之甲醇，歷經 24 小時反應後，分別獲得 56%、35%、25% 之轉酯率，因此過量之甲醇將導致脂解酶失活；(2) 於三階段批次反應中使用甲醇可獲得 74% 之轉酯率，使用乙醇者，僅有 43% 之轉酯率；(3)

於醇油莫耳比 3:1 下，未添加矽膠者，歷經 24 小時與 48 小時之反應，轉酯率僅有 2.7% 與 2.8%，但加入 10% 矽膠者，轉酯率分別提高到 25% 與 58%，因此矽膠在甲醇解反應中扮演甲醇之吸附者，防止脂解酶曝露到大量之甲醇中。

Watanabe 等人 (2002) 指出天然黃豆油無法利用固定化脂解酶 *Candida antarctica* 予以醇解，但脫膠後 (Degummed) 之黃豆油則可，且脫膠過程中所除去之黃豆膠體 (Gum)，包括磷脂質 (Phospholipids; PLs) 與黃豆磷脂質 (Soybean PLs) 確實對醇解反應產生抑制作用。該研究利用 4 wt.% 之固定化脂解酶 *Candida antarctica*，於反應溫度 30°C、1/3 莫耳當量 (理論量之 1/3) 之甲醇等條件下，採用每次反應時間 24 小時 (共計 10 次循環)，並於每次循環後將固定化脂解酶換到新鮮之反應物中，並於每次循環之第 6 小時取樣分析脂肪酸甲酯 (FAME) 產量，以探討天然黃豆油、脫膠黃豆油與精煉過黃豆油醇解反應之結果：而為了探討 PLs 對醇解反應之影響，於精煉過之黃豆油中加入不等量之黃豆磷脂質或 Egg yolk PC (Phosphatidyl Choline, 膽鹼磷脂)，採用前述反應條件，並於每次循環之第 3 小時取樣分析脂肪酸甲酯 (FAME) 產量，最後研究採用三階段方式，在總計 48 小時之反應時間內，分別於 10 與 24 小時各加入 1/3 莫耳當量之甲醇，將天然、脫膠與精煉過之黃豆油進行甲醇解反應。研究結果顯示：(1) 由天然黃豆油、脫膠黃豆油與精煉過黃豆油於第一次循環之 FAME 產量分別為 10.3%、28.1%、30.2%，第五次循環之產量分別為 7.1%、30.3%、32.2%，第十次循環之產量分別為 0.5%、30.9%、32.4% 等變化來看，存在天然黃豆油中阻礙醇解反應之物質，已在脫膠過程中被移除；(2) FAME 轉換率隨 PLs 含量之增加而降低，且在 PLs 含量超過 0.5% 以上時，反應速度隨著循環次數之累進而微幅下降；(3) Egg yolk PC 也是阻礙醇解反應之物質，對脂解酶活性之影響與 PLs 不同，在歷經多次循環後，脂解酶活性出現恢復現象；(4) PL 為 TAGs 醇解反應之抑制物，其抑制行為乃因受質與固定化脂解酶產生磷脂鍵結之內反應；(5) 以脫膠後之油脂作為脂解酶醇解反應之受質 (Substrate)，於歷經三階段 48 小時醇解反應後，轉換率可達 93.8%，若使用精煉過之黃豆油，則轉換率更可達 95%。

Deng 等人 (2003) 利用脂解酶催化脂肪酸與醇之酯化反應、甲醇與油菜籽油之轉酯反應；其中，酯化反應分成階段添加醇與一階段添加醇等兩者方式，分階段添加醇者，先加入 2.97 mmol 之醇、5.95 mmol 之脂肪酸與 5% 之脂解酶 (*Candida sp.* 99-125)，於攪拌速度為 180 oscillations/min、反應溫度為 40°C、Silica gel 為 1.6g 等條件下，先行酯化反應 10 小時，再加入 2.97mmol 之醇，持續反應 14 小時；一階段添加醇者，直接添加 5.97mmol 之醇、5.95mmol 之脂肪酸與 5% 之脂解酶 (*Candida sp.* 99-125)，先行酯化反應 10 小時，再添加 1.6g 之 Silica gel，持續反應 14 小時；轉酯化反應者，先添加 2.99g (3.43 mmol) 之油菜籽油、0.33g (10.3mmol) 之甲醇 (醇油莫耳比 3:1) 與 5% 之脂解酶，於攪拌速度為 180 oscillations/min、反應溫度為 40°C 等條件下，轉酯化反應 24 小時；該研究先使用油酸與甲醇，採分階段酯化反應方式，篩選出產酯率最高之脂解酶，然後探討短鏈醇 (甲醇、乙醇、丙醇與丁醇) 添加方式對於酯化反應之影響、不同有機溶劑 (Petroleum ether、Issoctane、n-Heptane、n-Hexane、Cyclohexane) 對酯化反應之影響、吸水物質 (Water absorbent) 對於酯化反應之影響，並比較在反應時間第 2 或第 10 小時添加另一半甲醇與吸水物質 Silica gel 或

於第 10 小時僅添加另一半甲醇等三種不同操作方式對於酯化反應之影響、不同脂肪酸 (Palmitic acid、Oleic acid、Stearic acid、mixed fatty acid) 與不同醇 (Methanol、Ethanol、Propanol、tButanol) 之酯化反應, 以及探討醇酸莫耳比 (0.8:1~2.5:1) 與階段添加模式、脂解酶劑量 (3~10 wt %) 對酯化反應之影響、固定化脂解酶之可重複使用性, 最後採三階段添加甲醇方式對油菜籽油進行轉酯化反應。研究結果顯示: (1) 短鏈醇為脂解酶之變性劑, 過量之短鏈醇會阻礙酯化反應, 若採一次添加醇之方式, 且油酸莫耳比為 1:1 之短鏈醇, 產酯率低於 28%, 若採階段式添加方式, 產酯率將增加至 80% 以上; (2) 酯化反應中添加有機溶劑將影響脂解酶之活性, 其主要因素為有機溶劑之恐水性 (Hydrophobicity), 若以 log P 值描述有機溶劑之恐水性與極性 (Polarity) 之關係, 則 log P 值越大者, 脂解酶之活性越高, 酯化反應之酯化程度 (Esterification degree) 也越高, 五種有機溶劑中以石油醚 (Petroleum ether) 最佳; (3) 酯化反應中添加吸水物質 (Silica gel) 比沒添加者, 可增加產酯率達 16%, 而添加之時機不同, 增加之效果也不同, 其中以一開始反應即添加者, 因水含量太早被減少與 Silica gel 對甲醇強烈之吸附作用等因素導致效果最差; (4) 酯化反應在一開始之 2 小時內反應最快, 酯化程度達到 48%, 若於第 10 小時才添加另一半甲醇與吸水物質, 則於反應時間 24 小時酯化程度達到最高之 81%, 至於沒有添加吸水物質者, 酯化程度最低; (5) 較長鏈之醇與較高飽和之脂肪酸搭配下, 脂解酶之活性與酯化程度越高, 因此使用丁醇可以獲得較高之酯化程度; (6) 每階段加入甲醇低於 0.5 莫耳當量下, 最佳之醇酸莫耳比為 1.4:1, 採三階段加入, 酯化程度可達 92%; (7) 不管有無使用溶劑, 最佳之脂解酶劑量為 5 wt %, 超過此劑量時, 對於酯化程度之增加助益不大; (8) 分別利用三階與一階多項式方程式嵌合重複批次反應次數 (每次經歷 24 小時) 與該次反應之酯化程度, 計算脂解酶之半壽命期 (Half-life, 即酯化程度衰減到初次酯化程度之 50%) 分別為 14.41 日與 14 日; (9) 使用石油醚作為溶劑下, 分別於反應後第 12、24 小時各加入 1 莫耳當量之甲醇, 可於第 12、24、36 小時獲得 32.1%、58%、83% 之酯化程度。

Du 等人 (2003) 利用固定於 Acrylin resin 之脂解酶 *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) 與甲醇對黃豆油進行轉酯化反應, 該研究採用三階段添加甲醇之方式, 每一階段稱為一個循環, 每次循環反應時間 3 小時, 三個循環稱為一個批次, 每個階段於醇油莫耳比為 1:1、反應溫度為 30°C、攪拌速度為 150rpm、脂解酶劑量為 30% (w/w) 等條件下進行, 每階段反應後, Lipozyme TL 先被濾出, 再以不同溶劑 (Propanol、iso-Propanol、Butanol、t-Butanol) 清洗, 以接續次一循環反應, 該研究發現溶劑中以 iso-Propanol 最佳, 經過連續 10 批次轉酯反應後, Lipozyme TL 仍可維持相當高之穩定性, 活性損失不大; 該研究進一步於反應溫度為 30°C、攪拌速度為 150rpm、脂解酶劑量為 30% (w/w) 等條件下, 探討醇油莫耳比 (1:1、2:1、3:1、4:1) 與反應溫度對 (30~50°C) 轉酯率與脂解酶活性之影響。研究結果顯示: 醇油莫耳比 1:1 為最佳條件, 反應溫度越高轉酯率越高, 但從脂解酶活性之角度來看, 溫度 30°C 為最佳條件。

Soumanou 與 Bornscheuer (2003a) 利用固定於 Carrier material polypropylene EP-100 之 *Pseudomonas fluorescens* (AK)、固定於 Anion exchange resin 之 *Rhizomucor miehe* (Lipozyme RM, IM) 與固定於 Silica gel 之 *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM) 等

三種固定化脂解酶，分別於有添加溶劑 (n-hexane) 與無添加溶劑、醇油莫耳比為 3:1、反應溫度為 40°C、脂解酶劑量為 10% (w/w) 等條件下，以 Methanol、Ethanol、1-Propanol、1-Butanol、iso-Propanol、iso-Butanol 對蔬菜油進行醇解反應，並探討三種不同之脂解酶對於蔬菜油之轉酯能力，討論不同脂解酶與醇搭配下之轉酯能力與穩定性，最後再利用 Lipozyme RM 與 AK，搭配 Methanol 與 iso-Propanol 對不同蔬菜油 (Cottonseed oil、Peanut oil、Sunflower oil、Palm olein、Coconut oil、Palmkernel oil)，採三階段添加醇之方式進行醇酯反應。研究結果顯示：(1) 在添加溶劑與使用甲醇下，就棕櫚油酸 (Palm olein) 而言，以使用固定化脂解酶 Lipozyme TL 之醇解效果最佳，於 24 小時後即可達 97% 之轉酯率，就棉花籽油 (Cottonseed oil) 而言，則以使用固定化脂解酶 AK 之醇解效果最佳；(2) 在無添加溶劑下，固定化脂解酶 AK 與 Lipozyme RM 之活性高於 Lipozyme TL 者 (與有溶劑條件下之結果不同)，就使用異丙醇或異丁醇 (二級醇) 而言，異丙醇之轉酯率低於異丁醇；(3) 在無添加溶劑下，採用 1-丙醇與異丁醇者，可以獲得較高之轉酯率；(4) 在無添加溶劑下，就棉花籽油而言，採用三階段方式添加甲醇所獲得之轉酯率，以搭配 Lipozyme RM 者最高，其次為 AK，最差者為 Lipozyme TL；(5) 在無添加溶劑下，就棉花籽油而言，使用 Lipozyme RM 者，於 8 次循環反應後之轉酯率為 65%，但使用 Lipozyme TL 者，則下降至 35%；(6) 不論使用 Lipozyme RM 或 AK，搭配 iso-Propanol 者，所獲得之轉酯率均低於搭配 Methanol 者。

Soumanou 與 Bornscheuer (2003b) 利用固定於 Carrier material polypropylene EP-100 之 *C. antarctica A*、*C. antarctica B*、*Pseudomonas fluorescens* (AK)、固定於 Ion exchange resin 之 *Rhizomucor miehei* (LipozymeRM, IM)、固定於 Silica gel 之 *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM) 等固定化脂解酶，分別於添加溶劑 (n-hexane)、醇油莫耳比為 3:1、反應溫度為 40°C、脂解酶劑量為 10% (w/w) 等條件下，以甲醇對三油酸甘油酯進行醇解反應，篩選出轉酯率較高之三種脂解酶 RM、TL 與 AK，再對向日葵油進行醇酯反應，得出轉酯率最高者為 AK，依序為 TL 與 RM；其中，初始速度最高者為 TL，而後再以 RM、TL、AK 等三種脂解酶，搭配不同之溶劑 (n-Hexane、Cyclohexane、n-Heptane、Isooctane、Acetone、Petroleum ether)，比較轉酯率，然後再於不使用溶劑下，探討醇油莫耳比 (0.5:1~5:1)、反應溫度 (35~70°C) 對於醇解反應之影響，最後，採三階段添加甲醇之模式，探討醇解反應與脂解酶之穩定性。研究結果顯示：(1) 使用固定化脂解酶 AK 者，以搭配正己烷 (n-Hexane) 最佳，使用 TL 與 RM 者，以搭配異辛烷 (Isooctane) 與石油醚 (Petroleum ether) 最佳；(2) 使用固定化脂解酶 AK 者，最高之醇油莫耳比可達 4.5:1，使用 TL 與 RM 者，最高之醇油莫耳比為 3:1；(3) 使用固定化脂解酶 RM 者，最佳溫度為 40°C，使用 TL 者，最佳溫度為 50°C；(4) 採用三階段添加甲醇之模式，分別於第 5、10 小時，各加入 1 莫耳當量之甲醇，且使用固定化脂解酶 RM 者，可於反應時間達 24 小時，獲得 84% 轉酯率，使用 TL 者，轉酯率為 40%；(5) 每批次採用三階段添加甲醇之模式且反應時間為 24 小時者，於歷經八次循環後，使用固定化脂解酶 RM 者，轉酯率之受影響程度有限，但使用 TL 者，轉酯率則下降超過 50%。

Xu 等人 (2003) 利用固定化脂解酶 Novozym 435 (*Candida antarctica*)、Lipozyme TL

IM (*Thermomyces lanuginosus*)、Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*)，以乙酸甲酯 (Methyl acetate) 替代甲醇作為醯基接受者 (Acyle acceptor)，於不使用溶劑下，將黃豆油轉換成生質柴油；該研究先於反應溫度為 40°C、乙酸甲酯與油莫耳比達 12:1、30% 之脂解酶、攪拌速度為 150rpm 等條件下，篩選出 Novozym 435 為最佳之脂解酶，然後探討乙酸甲酯與油莫耳比、脂解酶劑量、反應溫度等對於甲酯產率之影響，找出最佳之反應條件，最後再就脂解酶之可重複使用性加以分析。研究結果顯示：(1) 最佳之反應條件為乙酸甲酯與油莫耳比 12:1、脂解酶劑量 30%、反應溫度 40°C；(2) 歷經 10 個批次循環反應後，脂解酶活性並不受影響；(3) 以乙酸甲酯作為醯基接受者，並不會產生甘油，省去甘油所導致之副作用，讓脂解酶可以不經額外處理即可再循環利用，而所產製之副產品 (三醋酸甘油，Triacetyl glycerol) 並不會影響生質柴油作為燃料之整體特性

Du 等人 (2004a) 利用固定化脂解酶 Novozym 435，於反應溫度為 40°C、醇油莫耳比為 1:1、脂解酶劑量為 4% (w/w)、攪拌速度為 150 oscillations/min 等條件下，以甲醇對天然黃豆油與精煉黃豆油進行轉酯化反應，發現天然黃豆油之甲酯產率低於精煉黃豆油者，該研究綜合其間差異之可能因素，並探討磷脂質 (Phospholipid) 含量、水活性 (Water activity)、游離脂肪酸對轉酯化反應之影響，找出主要影響天然黃豆油與精煉黃豆油轉酯率之因素在於磷脂質含量；而後該研究採用三階段添加甲醇方式，於反應時間第 24、48 小時各加入 1/3 莫耳當量之甲醇，探討天然黃豆油於各階段反應期間之甲酯產率，發現第二階段之反應速度高於第一階段者，顯示脂解酶與油脂料源長時間接觸後，有效降低了其間之擴散限制，依據此一假設，該研究進一步探討脂解酶於參與油脂轉酯化反應前，預先於油脂中培養，培養時間長短、有無預先培養與轉酯率之關係，確認脂解酶於參與轉酯化反應前之預處理有助於提供脂解酶之轉酯能力。

Du 等人 (2004b) 利用固定於 Acrylic resin 之脂解酶 *Candida antarctica*B (Novozym 435)，將天然黃豆油與精煉黃豆油轉酯化成生質柴油，探討以乙酸甲酯 (Methyl acetate) 或甲醇作為醯基接受者 (Acyle acceptor) 對於甲酯產率與脂解酶活性之影響。研究結果顯示：(1) 使用甲醇者，於反應溫度為 40°C、Novozym 435 為 4%、攪拌速度為 150rpm、醇油莫耳比為 1:1 等條件下，脂解酶之活性即受到影響，甲酯產率僅約 30%，使用乙酸甲酯者，於反應溫度為 40°C、Novozym 435 為 30%、攪拌速度為 150rpm、醇油莫耳比達 12:1 等條件下，甲酯產率可達 92%；(2) 採用三階段添加甲醇、每階段之醇油莫耳比為 1:1 者，於反應溫度為 40°C、Novozym 435 為 4%、攪拌速度為 150rpm、條件下，或採三階段添加乙酸甲酯、每階段之醇油莫耳比為 12:1 者，於反應溫度為 40°C、Novozym 435 為 30%、攪拌速度為 150rpm 等條件下，對天然黃豆油與精煉黃豆油進行轉換，使用甲醇者，天然黃豆油與精煉黃豆油之甲酯產率有落差，使用乙酸甲酯者，天然黃豆油與精煉黃豆油之甲酯產率無落差；(3) 以三階段添加甲醇或乙酸甲酯者，歷經 100 個批次循環後，使用乙酸甲酯者明顯不影響 Novozym 435 之活性；(4) 使用乙酸甲酯所產製之副產品 (三醋酸甘油，Triacetyl glycerol) 之經濟價值，比使用甲醇所產製之甘油高。

Xu 等人 (2004) 利用固定化脂解酶 *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM)，採三

階段添加甲醇之方式，於攪拌速度 150rpm 下，將黃豆油醇解反應成生質柴油，並探討醇油莫耳比與初始反應速度之關係，以及反應溫度 (30~50°C)、脂解酶劑量 (4~10%)、含水量 (0.25~1%)、不同醇 (甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇) 與甲酯產率之關係；再比較脂解酶於每批次 (三階段) 醇解反應有無使用異丙醇清洗對於甲酯產率之影響。研究結果顯示：

- (1) 醇油莫耳比為 1:1 時，初始反應速度可達 9g/l-min，若醇油莫耳比超過 1.5:1，則初始反應速率急速下降；
- (2) 最佳反應溫度為 40°C，若溫度再增加，並無助於甲酯產率之提高；
- (3) 採用三階段、並於第 12、24 小時各加入 1 莫耳當量甲醇時，脂解酶劑量越多，最終 (反應時間 48 小時) 甲酯產率越高，但因脂解酶劑量差異導致之甲酯產率變化在第三階段較為明顯，因此於前二階段僅添加 4% 之脂解酶，再於第三階段添加 10% 之脂解酶，即可獲得 98% 之甲酯產率；
- (4) 水分含量並無助於提高甲酯產率，即水分含量與醯基之移動 (acyle migration) 關聯不大，惟水分含量超過 1% 時，反應速率反而出現些微下降；
- (5) 五種醇類中，以甲醇最佳，異丙醇最差；
- (6) 於反應溫度為 40°C，脂解酶劑量為 10%，採三階段且分別於第 1、3 小時各添加 1 莫耳當量之甲醇、每批次反應時間為 12 小時等條件下，每批次反應後以異丙醇清洗脂解酶，將有助於甘油之移除，使脂解酶在歷經 15 次批次循環後，仍可維持 94% 之甲酯產率。

Deng 等人 (2005) 利用 Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginose* lipase; TLL-1)、Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*)、Novozyme 435 (*Candida Antarctica* lipase B; CAL)、Lipase LA201 (*Thermomyces lanuginose* lipase, TLL-2)、Lipase PS-C (*Pseudomonas cepacia* lipase; PCL)、Lipase AK-C (*Pseudomonas fluorescens* lipase, PFL) 等六種固定化脂解酶，搭配甲醇、99% 之乙醇、96% 之乙醇、1-丙醇、2-丙醇、丁醇與異丁醇等七種醇，於反應溫度為 40°C、反應時間為 24 小時等條件下，採四階段、並分別於第 2、4、8 小時各加入四分之三莫耳當量之甲醇，對向日葵油進行醇解反應，分析不同固定化脂解酶與醇搭配下之甲酯產率。研究結果顯示：

- (1) Novozyme 435 為較佳之固定化脂解酶，與甲醇、99% 之乙醇、1-丙醇搭配下，甲酯產率超過 90%；
- (2) 除了與 Novozyme 435 搭配外，96% 之乙醇為較佳之醇；
- (3) 除了 Novozyme 435 外，水含量越高，甲酯產率越高。

Du 等人 (2005) 利用固定於 Silica gel 之脂解酶 *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL)，採三階段添加甲醇、每階段醇油莫耳比為 1:1 之方式，於反應溫度 40°C 下，對黃豆油進行轉酯化反應，該研究指出過量之醇劑量，將導致脂解酶失活，且因 Lipozyme TL 具有強烈之 1,3-positional specificity，理論上之生質柴油產率僅有 66%，然而要能讓產率超過 90%，應與醯基移動 (acyle migration) 能否在反應過程中發生有關，因此該研究以不同劑量之 Lipozyme TL (2~10%) 探討脂肪酸甲酯 (FAME) 之產率，發現劑量越高者，產率越高，使用 10% 之 Lipozyme TL，可獲得 92% 之產率，使用 4% 之 Lipozyme TL，則僅可獲得 65% 之產率，顯示醯基移動與脂解酶之劑量有關，而後該研究進一步探討脂解酶固定與否、水含量與添加 Silica gel 對轉酯化反應之影響。研究結果顯示：

- (1) 使用未固定之脂解酶，即便其活性與 10% 之 Lipozyme TL 相同，但歷經 72 小時也僅能獲得 63% 之產率，再以 Thin layer chromatograph 進行產物分析，發現使用固定化脂解酶者，產物內除了 1,2-(2,3-) Diglycerides 外，也出現 1,3-Diglycerides，但使用未固定之脂解酶者，則無法偵測出 1,3-Diglycerides，表

示固定化脂解酶中確有某些物質對醯基移動發生作用；(2) 水含量於固定化脂解酶轉酯化反應過程中，並無法加速醯基移動，且對轉酯反應有副作用；(3) 於 4% 之 Lipozyme TL 中加入 6% 之 Silica gel 可獲得之產率與使用 4% 之 Lipozyme TL 者相近。

Noureddini 等人 (2005) 以黃豆油作料源，於反應溫度為 35°C、攪拌速度為 700 rpm、250 mg 之脂解酶、3g 之甲醇、10g 之油、反應時間為 1 小時等條件下，比較 *Penicillium roqueforti*、*Pseudomonas sp.* (AK)、*Pseudomonas sp.* (PS)、*Mucor sp.*、*Aspergillus niger*、*Rhizopus oryzae*、*Penicillium camemberittii*、*Rhizopus niveus*、*Candida rugosa* 等九種脂解酶之轉酯能力，篩選出其中活性最強之 *Pseudomonas sp.* (PS)，並將其固定在 Sol-gel polymer matrix (由水解後之 tetramethoxysilane 與 iso-butyltrimethoxysilane 經聚合化反應所生成) 作為該研究採用之固定化脂解酶，而後就脂解酶劑量 (0~700mg)、水含量 (0.05~2.0g)、醇油莫耳比 (甲醇 2.7~13.7、乙醇 5.7~26.7)、脂解酶熱穩定性、溫度 (25~60°C) 等因素對於轉酯化反應之影響加以探討，找出以 *Pseudomonas sp.* (PS) 搭配甲醇或乙醇之最佳反應條件，再以最佳之反應條件對黃豆油進行轉酯，並檢驗脂解酶之穩定性與重複使用能力。研究結果顯示：(1) 使用甲醇時之最佳反應條件為脂解酶劑量 475mg、含水量 0.5g、醇油莫耳比 7.5:1、反應溫度 35°C，使用乙醇時之最佳反應條件為脂解酶劑量 475mg、含水量 0.3g、醇油莫耳比 15.2:1、反應溫度 35°C；(2) 反應前，於 35°C 下，將脂解酶在黃豆油中培養 72 小時，並沒有影響其轉酯能力，顯示固定化脂解酶 *Pseudomonas sp.* (PS) 確有相當之熱穩定性；(3) 於最佳之反應條件下，使用甲醇可獲得 65mol% 之產酯率，使用乙醇可獲得 63mol% 之產酯率；(4) 歷經 11 次循環反應，使用乙醇者，轉酯率下降 5mol%，但使用甲醇者，下降幅度則較大。

Oda 等人 (2005) 分別採用起舉式生物反應器 (Air-lift bioreactor) 與震盪培養瓶 (Shake-flake) 將脂解酶 *Rhizopus oryzae* cell 固定於 Biomass support particles (BSPs)，然後再以 Glutaraldehyde (GA) 處理，成為 Whole-cell biocatalyst，對植物油進行甲醇解反應；該研究先於反應溫度為 30°C、攪拌速度為 150 oscillations/min、醇油莫耳比為 1:1、含水量為 wt.15% 等條件下，探討甲醇解活性 (以甲酯產率定義之) 與 *Rhizopus oryzae* cell 固定於 BSPs 之重量，發現以起舉式生物反應器固定化脂解酶 *Rhizopus oryzae* cell 之甲醇解活性高於以震盪培養瓶者，而於 BSPs 上固定 *Rhizopus oryzae* cell 所需之時間，使用起舉式生物反應器者需 44 小時，使用震盪培養瓶者則需 96 小時，若再進一步從其可重複性使用之耐性加以比較，發現使用起舉式生物反應器者，在歷經五次循環反應後，甲酯產率仍可維持在 80%，但使用震盪培養瓶者，則降低到 60%；因此該研究以起舉式生物反應器固定化脂解酶為基礎，探討水含量 (0~15wt.%) 對重複甲醇解反應之影響、於不同含水量與多次循環反應下，分析甲醇解反應過程之中間產物、探討水含量與脂解酶劑量對於醯基移動 (acyle migration) 之影響。研究結果顯示：(1) 不含水者，第一次循環反應之甲酯產率為 75 wt. %，第二次循環反應則降至 30 wt. %，而含水量 5~15wt.% 者，下降之幅度則較小，其中以含水量 5wt.% 者，下降幅度最小；(2) 含水量越高者，產物中之游離脂肪酸 (FFA) 越高，單酸甘油酯 (MG) 越低；(3) 不論含水量高低，首次循環反應產物中之單酸甘油酯、雙酸甘油酯 (DG) 與三酸甘油酯 (TG) 都很低，但隨著循環反應次數之增加而增加，其中以 2-MGs、1,2(2,3)-

DGs 之增加較明顯，1,3-DGs 與 1(3)-MGs 則較不明顯；(4) 2-MGs、1,2(2,3)-DGs 之含量，隨水含量與反應時間之增加而降低，顯示脂解酶 *Rhizopus oryzae* 導致甘油酯之醯基移動由 sn-2 移到 sn-1(3)。

Salis 等人 (2005) 先以三油酸甘油酯 (Triolein) 作為料源，於不使用溶劑、反應溫度為 40°C、醇油莫耳比為 3:1、反應時間為 50 小時等條件下，以 1-丁醇分別與 Novozym 435 (*Candida antarctica*)、Lipozyme RMIM (*Rhizomucor miehei*)、PS-C (*Pseudomonas cepacia*)、PS-D (*Pseudomonas cepacia*) 等四種固定化脂解酶進行醇解反應，找出其中活性最強之 PS-D 作為該研究採用之固定化脂解酶，並探討溫度 (20~70°C)、水活性 (Water activity)、醇油莫耳比 (3:1~12:1)、醇種類 (Methanol、Ethanol、1-Propanol、1-Butanol、2-Butanol、iso-Butanol、iso-Amyl alcohol) 等對醇解反應之影響，再以探討中所得之最佳條件為基礎，以合成之 Fusel oil-like alcohol (由 5.6% 之 1-Propanol、5.6% 之 2-Methyl-1-Propanol、1.3% 之 1-Butanol、27.6% 之 2-Butanol、64.4% 之 iso-Amyl alcohol 合成) 與 PS-D，對三油酸甘油酯進行轉酯反應。研究結果顯示：(1) 使用 1-丁醇，於醇油耳比 3:1 下，反應時間越長 (1~6 小時) 轉酯率越高，最佳之反應溫度為 40°C；(2) 水活性 $a_w=0.4\sim0.6$ 間，PS-D 之活性最強；(3) 於使用 1-丁醇、PS-D、水活性 $a_w=0.432$ 、反應溫度為 40°C 等條件下，最佳之醇油莫耳比為 3:1 或 6:1，在反應時間 4 小時後，即達到 100% 之轉酯率；(4) 於使用 PS-D、水活性 $a_w=0.432$ 、反應溫度為 40°C 等條件下，除了甲醇與 2-丁醇外，其他之醇都可獲得相當高之轉酯率 (以 1-丁醇最佳)，其中，甲醇因與油脂不能相混合，2-丁醇則因脂解酶之 Regio-specificity 與 Stereo-specificity 等因素，造成轉酯率偏低；(5) 於水活性 $a_w=0.432$ 、反應溫度為 40°C 等條件下，以合成之 Fusel oil-like alcohol 與 PS-D 對三油酸甘油酯轉酯，可於反應時間 12 小時後，即達到 100% 之轉酯率。