(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102812128 B
(45)授权公告日 2017.09.12

(21)申请号 201180011544.2

(22)申请日 2011.02.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102812128 A

(43)申请公布日 2012.12.05

(30)优先权数据
61/309,122 2010.03.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.08.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2011/000121 2011.02.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/107977 EN 2011.09.09

(73)专利权人 转换生物柴油有限公司
地址 以色列沙法拉姆

(72)发明人 S·巴舍尔 M·哈伊 U·莫森
D·舍哈德 A·辛达维
E·玛索德

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李英

(51)Int.Cl.
C12P 7/64(2006.01)

(56)对比文件
US 2005/0233426 A1,2005.10.20,全文.
EP 1582594 A2,2005.10.05,权利要求1-10,说明书实施例2-3.
WO 2009/069116 A2,2009.06.04,全文.

审查员 刘俊

权利要求书5页 说明书16页 附图7页

(54)发明名称

用于脂肪酸烷基酯的酶合成的方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于制备脂肪酸烷基酯的酶批量或连续方法及用于其的体系,所述脂肪酸烷基酯用于生物燃料、食品和清洁剂工业中。所述方法利用在碱性或弱碱性含水缓冲液的存在下或在水溶液的存在下,与脂肪酸源和醇或醇给体混合的固定于疏水性树脂上的酶。用于脂肪酸烷基酯的制备方法通过酯交换或酯化同时或连续进行。生物催化剂活性得以保持,而在多个用途中无显著的活性损失,还避免了甘油和水副产物或其他亲水性化合物在所述生物催化剂上的积聚。

CN 102812128 B

1.一种用于脂肪酸源与醇的酯交换和/或酯化以形成脂肪酸烷基酯的方法，其包括在固定化脂肪酶制剂的存在下使所述脂肪酸源与醇或醇给体反应，其中所述固定化脂肪酶制剂包含一种固定在疏水性多孔载体上的脂肪酶，且反应介质含有含水碱性缓冲溶液，所述含水碱性缓冲溶液在所述脂肪酸源的至多5重量%的量下具有7-11的pH，

其中，所述脂肪酸源包括在不存在或存在游离脂肪酸或其选自酰胺、酯、磷脂和固醇酯的衍生物下的甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯、它们任意比例的混合物，

其中，所述酯交换和/或酯化同时或连续进行，

其中，甘油和/或水分别作为副产物形成。

2.根据权利要求1所述的方法，其中所述含水碱性缓冲溶液为含水弱碱性缓冲溶液。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述含水碱性缓冲溶液以所述脂肪酸源的0.5重量%、0.75重量%、1重量%、1.5重量%、2重量%、2.5重量%、3重量%、3.5重量%、4重量%、4.5重量%或5重量%的量被包含。

4.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述pH为7-8.5、7-9、7-9.5和7-10中任一种。

5.一种用于选自甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯及其任意的混合物的脂肪酸源与醇或醇给体的酯交换和/或酯化以形成脂肪酸烷基酯的方法，所述酯交换/酯化在不存在或存在游离脂肪酸或其选自酰胺、酯、磷脂和固醇酯的衍生物下进行，所述方法包括在固定化脂肪酶制剂的存在下使所述脂肪酸源与醇反应，其中所述固定化脂肪酶制剂包含固定在疏水性多孔载体上的脂肪酶，且所述脂肪酸源或者反应介质中以所述脂肪酸源的至多5重量%的量添加了水或水溶液，其中水溶液或反应体系的pH为3-11，并且

其中，所述酯交换和/或酯化同时或连续进行，

其中，甘油和/或水分别作为副产物形成。

6.根据权利要求5所述的方法，其中所述反应介质含有所述脂肪酸源的0.5重量%、0.75重量%、1重量%、1.5重量%、2重量%、2.5重量%、3重量%、3.5重量%、4重量%、4.5重量%或5重量%的水或水溶液。

7.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述醇为短链醇。

8.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述醇给体为单烷基酯，或者碳酸二烷基酯，其也充当在反应介质中的弱碱性试剂源。

9.根据权利要求8所述的方法，其中所述单烷基酯是乙酸甲酯并且所述碳酸二烷基酯是碳酸二甲酯。

10.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述至少一种脂肪酶为源自如下任一的脂肪酶：米赫根毛霉、假单胞菌属、雪白根霉、爪哇毛霉、米根霉、黑曲霉、卡门柏青霉、产碱杆菌属、无色杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、绵毛嗜热丝孢菌、粘稠色杆菌、南极假丝酵母B、皱褶假丝酵母、南极假丝酵母A和番木瓜种子。

11.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述固定化脂肪酶能够催化游离脂肪酸的酯化以产生脂肪酸烷基酯以及作为副产物的水，并能够催化甘油三酯和偏甘油酯的酯交换以产生脂肪酸烷基酯以及作为副产物的甘油。

12.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中在反应介质中的所述碱性溶液的量为脂肪酸源的0.5至5重量%。

13.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述脂肪酶制剂包含至少两种脂肪酶，所述至少两种脂肪酶可各自分别固定至疏水性载体上，或者共固定至同一疏水性载体上。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述脂肪酶具有相同或不同的区域专一性。

15.根据权利要求13所述的方法，其中所述脂肪酶能够同时或连续催化游离脂肪酸的酯化以产生脂肪酸烷基酯以及作为副产物的水，以及甘油三酯和偏甘油酯的酯交换以产生脂肪酸烷基酯以及作为副产物的甘油。

16.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述载体为疏水性脂族聚合物基载体和疏水性芳族聚合物基载体中的任一种。

17.根据权利要求16所述的方法，其中所述疏水性聚合物载体由直链或支链的有机链组成。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述载体包含大网络有机聚合物或共聚物链。

19.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述载体为多孔无机载体，所述多孔或非多孔无机载体可为疏水性的或用疏水性有机材料涂布。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述有机材料为直链、支链或官能化的疏水性有机链。

21.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述含水碱性缓冲溶液为无机碱性盐或有机碱的溶液。

22.根据权利要求21所述的方法，其中所述碱性缓冲溶液为如下任一种的溶液及它们的任意混合物：碱金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硫酸盐、乙酸盐和柠檬酸盐、伯胺、仲胺和叔胺。

23.根据权利要求22所述的方法，其中所述碱性缓冲溶液为选自钠或钾的碳酸氢盐和碳酸盐的弱碱的溶液。

24.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中在预混阶段将所述碱性缓冲溶液加入至所述脂肪酸源，或者将所述碱性缓冲溶液直接加入至所述反应介质。

25.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中在酯交换/酯化反应介质中的所述碱性缓冲溶液的含量在油原料的0.5-5重量％范围内。

26.根据权利要求25所述的方法，其中所述碱性缓冲溶液的含量为油原料的1-2重量％。

27.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述脂肪酸源首先与所述碱性缓冲溶液混合，然后用所述固定化脂肪酶制剂处理所述混合物，随后加入所述醇，并允许反应在合适的条件下进行直至将所述脂肪酸源转化为脂肪酸酯。

28.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述脂肪酸源为如下的任一种和它们的任意混合物：植物油、动物脂肪、海藻油、鱼油、废油、褐色润滑脂。

29.根据权利要求1或权利要求2所述的方法，其中所述脂肪酸源包括在不存在或存在选自磷脂和固醇酯的其他少量脂肪酸衍生物下的游离脂肪酸、甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯、它们任意比例的混合物、脂肪酸酯和酰胺，所述其他少量脂肪酸衍生物，其中所述脂肪酸源为未精制的、精制的、漂白的、除臭的或它们的任意组合。

30.根据权利要求5所述的方法，其中所述脂肪酸源进一步包括脂肪酸酯和酰胺，以及

选自磷脂和固醇酯的其他少量脂肪酸衍生物，其中所述脂肪酸源为未精制的、精制的、漂白的、除臭的或它们的任意组合。

31.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述醇为短链烷基醇。

32.根据权利要求31的所述方法，其中所述短链烷基醇为C_1-C_6烷基醇。

33.根据权利要求31的所述方法，其中所述短链烷基醇为C_1-C_4烷基醇。

34.根据权利要求31的所述方法，其中所述短链烷基醇为甲醇或乙醇。

35.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述醇为甲醇，且所述所得脂肪酸酯为脂肪酸甲酯。

36.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述醇为6-10个碳原子的中链脂肪醇或12-22个碳原子的长链脂肪醇。

37.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述反应在10℃至100℃之间的温度下进行。

38.根据权利要求37所述的方法，其中所述反应在25-30℃之间的温度下进行。

39.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述脂肪酸源与所述醇或醇给体以及所述水或缓冲溶液在预反应准备容器中预混以形成乳状液，随后将所述乳状液与所述固定化脂肪酶制剂一起进料至酯交换/酯化反应容器中。

40.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其中所述固定化脂肪酶在连续搅拌槽反应器中或在以批量模式或连续模式操作的填充床柱反应器中使用。

41.根据权利要求29所述的方法，其中所述其他少量脂肪酸衍生物为磷脂或固醇酯。

42.根据权利要求30所述的方法，其中所述其他少量脂肪酸衍生物为磷脂或固醇酯。

43.一种用于制备通过脂肪酸源与醇的酯交换/酯化形成的脂肪酸烷基酯的制备体系，所述制备体系包括：

配置用于使反应介质在固定化脂肪酶制剂的存在下反应的反应容器，所述反应介质包含所述脂肪酸源以及醇和醇给体中的至少一种，其中所述固定化脂肪酶制剂包含固定于疏水性多孔载体上的至少一种脂肪酶，且所述反应介质含有含水碱性缓冲溶液。

44.一种用于制备通过选自甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯及其任意的混合物的脂肪酸源与醇的酯交换/酯化形成的脂肪酸烷基酯的制备体系，所述制备体系包括：

配置用于使反应介质在固定化脂肪酶制剂的存在下反应的反应容器，所述反应介质包含所述脂肪酸源以及醇和醇给体中的至少一种，其中所述固定化脂肪酶制剂包含固定于疏水性多孔载体上的脂肪酶，且所述脂肪酸源或者反应介质中添加了水。

45.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，其中至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述制备体系的操作过程中，所述反应容器包含所述固定化脂肪酶制剂。

46.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，其中至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述制备体系的操作过程中，所述反应容器包含脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种。

47.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，其中所述反应介质包含混合物，所述制备体系还包括与所述反应容器选择性流体连接的预反应容器，所述预反应容器配置用于至少预混所述脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种以形成所述混合物，并用于至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述制备体系的操作过程中将所述混合物选择性地递送至所

述反应容器。

48.根据权利要求47所述的制备体系，其还包括脂肪酸源和醇源，所述脂肪酸源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中将脂肪酸选择性地递送至所述预反应容器，所述醇源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中将醇和醇给体中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。

49.根据权利要求48所述的制备体系，其还包括缓冲液源，所述缓冲液源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中将含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器以被包含于所述混合物中。

50.根据权利要求48或权利要求49所述的制备体系，其配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中以连续方式将一种或多种脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。

51.根据权利要求49所述的制备体系，其配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中以连续方式将含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。

52.根据权利要求48或权利要求49所述的制备体系，其配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中不连续批量地将一种或多种脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。

53.根据权利要求49所述的制备体系，其配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中不连续批量地将含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。

54.根据权利要求47所述的制备体系，其中所述预反应容器配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中以连续方式将所述混合物选择性地递送至所述反应容器。

55.根据权利要求47所述的制备体系，其中所述预反应容器配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中不连续批量地将所述混合物选择性地递送至所述反应容器。

56.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，所述制备体系配置用于将如下的至少一种选择性地直接递送至所述反应容器：脂肪酸、醇和醇给体中的至少一种，以及含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种。

57.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，其中所述反应容器包括热调节系统，所述热调节系统配置用于将所述反应容器中的反应介质保持在所选温度范围内。

58.根据权利要求43或权利要求44所述的制备体系，其还包括保留装置，所述保留装置配置用于至少在所述制备体系的操作过程中将所述固定化脂肪酶制剂保留在所述反应容器内。

59.根据权利要求43或权利要求44的制备体系，其还包括与所述反应容器选择性流体连接的产物分离容器，所述制备体系配置用于将包含反应产物的反应混合物从所述反应容器选择性地递送至所述产物分离容器，且其中所述产物分离容器配置用于将脂肪酸烷基酯的产出物选择性地从递送至所述产物分离容器的反应混合物中分离。

60.根据权利要求59所述的制备体系，其中所述产物分离容器包括离心机和重力分离系统中的一种。

61.根据权利要求59所述的制备体系，其中所述反应容器配置用于至少在所述制备体

系的所述操作过程中以连续方式将所述反应混合物选择性地递送至所述产物分离容器。

62.根据权利要求59所述的制备体系，其中所述反应容器配置用于至少在所述制备体系的所述操作过程中不连续批量地将所述反应混合物选择性地递送至所述产物分离容器。

63.根据权利要求59所述的制备体系，其配置用于从所述产物分离容器选择性地递送所述脂肪酸烷基酯的产出物。

64.根据权利要求63所述的制备体系，其配置用于以连续方式从所述产物分离容器选择性地递送所述脂肪酸烷基酯的产出物。

65.根据权利要求63所述的制备体系，其配置用于不连续批量地从所述产物分离容器选择性地递送所述脂肪酸烷基酯的产出物。

66.根据权利要求59所述的制备体系，其中所述制备体系配置用于增加从递送至所述产物分离容器的所述反应混合物中的所述脂肪酸烷基酯的产出物。

67.根据权利要求66所述的制备体系，其中所述制备体系配置用于将所述脂肪酸烷基酯的产出物选择性地再发送至所述反应容器以进一步增加从反应混合物中的的所述脂肪酸烷基酯的产出物，所述反应混合物随后被递送至所述产物分离容器。

68.根据权利要求66所述的制备体系，其中所述制备体系配置用于将所述脂肪酸烷基酯的产出物选择性地再发送至辅助反应器组件，其中所述辅助反应器组件包括辅助反应器容器和辅助产物分离容器，其中所述进一步增加的脂肪酸烷基酯的产出物随后经由所述辅助产物分离容器被选择性地递送。

69.根据权利要求1或权利要求5所述的方法，其在权利要求43至68中任一项所述的制备体系中进行。

用于脂肪酸烷基酯的酶合成的方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种用于制备脂肪酸烷基酯的酶方法，所述脂肪酸烷基酯用于生物燃料、食品和清洁剂工业中。在所述方法中，脂肪酸源和醇或醇给体在固定于疏水性树脂上的酶的存在下，在碱性含水缓冲液或水的存在下反应。所公开的方法可使用连续搅拌槽反应器或填充床柱反应器批量地或连续地进行操作。

背景技术

[0002] 酶的固定化已由大量技术进行描述，所述大量技术基本上旨在降低在整个酶方法中酶的成本贡献、促进酶从产物中回收，以及使方法能够连续操作。

[0003] 固定化技术通常根据如下划分：

[0004] 1.酶对固体载体(如二氧化硅和不可溶聚合物)的物理吸附。

[0005] 2.在离子交换树脂上的吸附。

[0006] 3.酶对固体载体材料(如环氧化的无机或聚合物载体)的共价结合。

[0007] 4.酶在增长中的聚合物中的捕获。

[0008] 5.酶在膜反应器中或在半渗透凝胶中的限制。

[0009] 6.交联酶晶体(CLECS)或聚集体(CLEAS)。

[0010] 所有前述酶固定化程序均由如下步骤组成：

[0011] 1.关于pH、温度、缓冲盐的类型和离子强度，将酶溶解于适当的缓冲液体系中。

[0012] 2.将固体载体加入至酶溶液中，并混合一定时间直至酶分子固定至固体载体上。

[0013] 3.过滤含有固定化酶的固体载体。

[0014] 4.用适当的缓冲液洗涤所述载体以去除松散结合的酶分子，然后干燥所述固体载体。

[0015] 界面酶，主要是脂肪酶已遵循前述技术而被固定。这些提供了具有低合成活性和/或短的操作半衰期的固定化酶制剂。为了增加固定化脂肪酶和其他界面酶的合成活性和稳定性，已应用了不同的活化方法。这些方法包括：

[0016] 1.将酶的表面官能团与疏水性残基(如脂肪酸或聚乙二醇)结合。

[0017] 2.用表面活性剂(如多元醇脂肪酸酯)涂布酶的表面。

[0018] 3.使酶接触疏水性载体(通常为聚丙烯)，所述疏水性载体已用亲水性试剂(如乙醇或异丙醇)进行预处理。

[0019] 上述方法都不产生用以进行工业量的酶反向转化的关于固定化界面酶的稳定和成本效益的令人满意的结果。而且，已报道当根据前述程序进行固定化时，由于由固定化程序所施加的某些限制，或者由于某些酶抑制剂在反应介质中的存在，大多数酶或者损失显著部分的它们的合成活性，或者它们不显示它们的完全活性性能。

[0020] 脂肪酶和磷脂酶的另一主要缺点在于它们对亲水性底物，特别是短链醇和短链脂肪酸(C4以下)的低耐受性。已在许多研究中观察到短链醇和短链脂肪酸(分别例如甲醇和乙酸)是使必要的水分子从那些酶的四级结构分离，从而导致酶的变性和因此它们的催化

活性的损失的原因。该缺点已阻止了脂肪酶用于使用油甘油三酯和甲醇作为底物来制备商业量的脂肪酸甲酯“生物柴油”的应用。

[0021] 使用固定化脂肪酶用于脂肪酸源与游离醇的酯交换/酯化的另一缺点在于，所形成的甘油和水副产物在生物催化剂上积聚，因此阻止了底物自由到达固定化酶的活性位点。当使用同一批次的生物催化剂时，这些生物催化剂通常在数个循环之后损失它们的催化性能。

[0022] 本发明人已开发了在许多制备循环内显示出良好的稳定性、持久的活性的特定固定化酶制剂。这种酶制剂的例子尤其公开于WO/2008/084470、WO/2008/139455和WO2009/069116中。

[0023] 催化反应进行的条件可不利地影响固定化酶制剂的稳定性和效率。重要的是具有在反应条件下保留稳定性和活性的酶制剂。

[0024] 随着描述的进行，本发明的这些目的和其他目的将变得显而易见。

发明内容

[0025] 在一个实施例中，本发明涉及一种用于脂肪酸源与醇的酯交换/酯化以形成脂肪酸烷基酯的方法，其包括在固定化脂肪酶制剂的存在下使脂肪酸源与醇或醇给体反应，其中所述固定化脂肪酶制剂包含至少一种固定至疏水性多孔载体上的脂肪酶，且反应介质含有含水碱性缓冲溶液。

[0026] 所述含水碱性缓冲溶液可为含水弱碱性缓冲溶液。所述含水碱性缓冲溶液可以所述脂肪酸源的至多5重量%的量包含于所述反应混合物中。所述含水缓冲溶液可具有7至约11，例如7-8.5、7-9、7-9.5、7-10和7-11中的任一种的pH。包含所述缓冲溶液的补充弱碱性试剂的pKa高于或等于包含所述脂肪酸源的酸的pKa。

[0027] 在另一实施例中，本发明涉及一种用于脂肪酸源与醇的酯交换/酯化以形成脂肪酸烷基酯的方法，其包括在固定化脂肪酶制剂的存在下使脂肪酸源与醇反应，其中所述固定化脂肪酶制剂包含至少一种固定至疏水性多孔载体上的脂肪酶，且反应介质含有水。所述水为具有3至11的pH的水溶液的形式。所述反应介质可含有脂肪酸源的至多5重量%的水或水溶液。

[0028] 在本发明的所有实施例和方面中，所述醇可为短链醇，例如C_1-C_6烷基醇，更特别地C_1-C_4烷基醇，特别是甲醇或乙醇。当所述醇为甲醇时，所述所得脂肪酸酯为脂肪酸甲酯(FAME-生物柴油)。所述醇也可为中链脂肪醇(C_6-C_{10})或长链脂肪醇(C_{12}-C_{22})。所述醇给体可为单烷基酯或碳酸二烷基酯，如碳酸二甲酯或碳酸二乙酯。

[0029] 在本发明的所有实施例和方面中，所述固定化脂肪酶能够催化游离脂肪酸的酯化以产生脂肪酸烷基酯以及水作为副产物，并能够催化甘油三酯和部分甘油酯的酯交换以产生脂肪酸烷基酯以及甘油作为副产物。

[0030] 在涉及使用碱性缓冲液或碱性溶液的本发明的所有实施例和方面中，在反应介质中所述碱性缓冲液或溶液的量为脂肪酸源的0.001至5重量%。

[0031] 在本发明的所有实施例和方面中，所述至少一种脂肪酶可为衍生自任一如下的脂肪酶：米赫根毛霉、假单胞菌属、雪白根霉、爪哇毛霉、米根霉、黑曲霉、卡门柏青霉、产碱杆菌属、无色杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、绵毛嗜热丝孢菌、粘稠色杆菌、南极假丝酵母B、皱褶

假丝酵母、南极假丝酵母A、番木瓜种子和胰液素。所述脂肪酶制剂可包含至少两种脂肪酶，所述至少两种脂肪酶可各自分别固定至疏水性载体上，或者共固定至同一疏水性载体上。所述脂肪酶可具有相同或不同的区域专一性。所述脂肪酶能够同时或连续催化游离脂肪酸的酯化以产生脂肪酸烷基酯以及水作为副产物，以及甘油三酯和部分甘油酯的酯交换以产生脂肪酸烷基酯以及甘油作为副产物。

[0032] 在本发明的所有实施例和方面中，所述载体可为疏水性脂族聚合物基载体和疏水性芳族聚合物基载体中的任一种。所述疏水性聚合物载体可由直链或支链有机链组成。所述载体可包含大网络有机聚合物或共聚物链。所述载体可为多孔或非多孔无机载体，所述多孔或非多孔无机载体可为疏水性的，或用疏水性有机材料涂布。所述有机材料可为直链、支链或官能化的疏水性有机链。

[0033] 在本发明的所有实施例和方面中，当使用碱性缓冲溶液时，所述含水碱性缓冲溶液可为无机碱盐或有机碱的溶液。所述碱性缓冲溶液可为如下任一种的溶液和它们的任意混合物：碱金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硫酸盐、乙酸盐和柠檬酸盐、伯胺、仲胺和叔胺。在特定实施例中，所述碱性缓冲溶液可为选自钠或钾的碳酸氢盐和碳酸盐的弱碱的溶液。在本发明的方法的一些特定实施例中，可在预混阶段将所述碱性缓冲溶液加入至所述脂肪酸源，或者将所述碱性缓冲溶液直接加入至所述反应介质。

[0034] 在本发明的所有实施例和方面中，当使用碱性缓冲溶液时，在酯交换/酯化反应介质中的所述碱性缓冲溶液的含量可在油原料的0.001-5重量%范围内，例如油原料的1-2重量%。

[0035] 在本发明的一些实施例中，所述脂肪酸源可首先与所述碱性缓冲溶液或者与水或水溶液混合，然后用所述固定化脂肪酶制剂处理所述混合物，随后加入所述醇，并允许反应在合适的条件下进行直至所述脂肪酸源转化为脂肪酸酯。

[0036] 在本发明的所有实施例和方面中，所述脂肪酸源可为如下的任一种和它们的任意混合物：植物油、动物脂肪、海藻油、鱼油、废油。所述脂肪酸源可包括在不存在或存在其他少量脂肪酸衍生物下的游离脂肪酸、甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯、它们任意比例的混合物，所述其他少量脂肪酸衍生物例如磷脂和固醇酯。所述脂肪酸源可为未精制的、精制的、漂白的、除臭的或它们的任意组合。

[0037] 在本发明的所有实施例和方面中，所述反应可在10°C至100°C之间，特别地25-30°C之间的温度下进行。

[0038] 在本发明的所有实施例和方面中，所述脂肪酸源可与所述醇或醇给体以及所述水或缓冲溶液在预反应准备容器中预混以形成乳状液，随后将所述乳状液与所述固定化脂肪酶制剂一起进料至酯交换/酯化反应容器中。

[0039] 在本发明的所有实施例和方面中，所述固定化脂肪酶可在以批量模式或连续模式操作的填充床柱反应器中使用。

[0040] 根据本发明的另一方面，提供了一种用于脂肪酸与醇的酯交换/酯化以形成脂肪酸烷基酯的体系，其包括：

[0041] 配置用于使反应介质在固定化脂肪酶制剂的存在下反应的反应容器，所述反应介质包含脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种，其中所述固定化脂肪酶制剂包含固定于疏水性多孔载体上的至少一种脂肪酶，且所述反应介质含有含水碱性缓冲溶液和水中的至少一

种。

[0042] 所述体系可以任何所需的组合或排列包括如下特征的一种或多种：

[0043] A.至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述体系的操作过程中，所述反应容器可包含所述固定化脂肪酶制剂。

[0044] B.另外地或替代特征A地，至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述体系的操作过程中，所述反应容器可包含脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种。

[0045] C.另外地或替代特征A或B地，所述反应介质包含混合物，所述体系还包括与所述反应容器选择性流体连接的预反应容器，所述预反应容器配置用于至少预混所述脂肪酸以及醇和醇给体中的至少一种以形成所述混合物，并用于至少在用于制备所述脂肪酸烷基酯的所述体系的操作过程中将所述混合物选择性地递送至所述反应容器。所述体系可任选地进一步包括脂肪酸源和醇源，所述脂肪酸源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述体系的所述操作过程中将脂肪酸选择性地递送至所述预反应容器，所述醇源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述体系的所述操作过程中将醇和醇给体中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器。所述体系可任选地进一步包括缓冲液源，所述缓冲液源与所述预反应容器选择性流体连接，并配置用于至少在所述体系的所述操作过程中将含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种选择性地递送至所述预反应容器以被包含于所述混合物中。

[0046] D.另外地或替代特征A至C地，所述体系可配置用于至少在所述体系的所述操作过程中以连续方式或不连续批量地将一种或多种脂肪酸和/或醇和醇给体中的至少一种和/或含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种各自选择性地递送至所述预反应容器。

[0047] E.另外地或替代特征A至D地，所述预反应容器可配置用于至少在所述体系的所述操作过程中以连续方式和/或不连续批量地将所述混合物选择性地递送至所述反应容器。

[0048] F.另外地或替代特征A至E地，所述体系可配置用于将如下的至少一种选择性地直接递送至所述反应容器：脂肪酸、醇和醇给体中的至少一种、以及含水碱性缓冲溶液和水中的至少一种。

[0049] G.另外地或替代特征A至F地，所述反应容器可包括热调节系统，所述热调节系统配置用于将所述反应容器中的反应介质保持在所选温度范围内。

[0050] H.另外地或替代特征A至G地，所述体系可任选地进一步包括保留装置，所述保留装置配置用于至少在所述体系的操作过程中将所述固定化脂肪酶制剂保留在所述反应容器内。

[0051] I.另外地或替代特征A至H地，所述体系还包括与所述反应容器选择性流体连接的产物分离容器，所述体系配置用于将来自所述反应容器的包含反应产物的反应混合物选择性地递送至所述产物分离容器，且其中所述产物分离容器配置用于将脂肪酸烷基酯的产量选择性地从递送至所述产物分离容器的反应混合物中分离。例如，所述产物分离容器可为离心机和重力分离系统中的一种。

[0052] J.另外地或替代特征A至I地，所述反应容器配置用于至少在所述体系的所述操作过程中以连续方式和/或不连续批量地将所述反应混合物选择性地递送至所述产物分离容器。

[0053] K.另外地或替代特征I至J地，所述体系配置用于从所述产物分离容器选择性地递

送所述脂肪酸烷基酯的产量。例如，所述体系配置用于以连续方式和/或不连续批量地从所述产物分离容器选择性地递送所述脂肪酸烷基酯的产量。

[0054] 另外地或替代特征A至K地，所述体系配置用于从递送至所述产物分离容器的反应混合物增加所述脂肪酸烷基酯的产量。在具有该特征的体系的一种配置中，所述体系配置用于将所述脂肪酸烷基酯的产量选择性地再发送至所述反应容器以进一步增加来自所述反应混合物的所述脂肪酸烷基酯的产量，所述反应混合物随后被递送至所述产物分离容器。在具有该特征的体系的另一配置中，所述体系配置用于将所述脂肪酸烷基酯的产量选择性地再发送至辅助反应器组件，其中所述辅助反应器组件包括辅助反应器容器和辅助产物分离容器，其中所述进一步增加的脂肪酸烷基酯的产量随后经由所述辅助产物分离容器被选择性地递送。

附图说明

[0055] 为了理解本发明并领会本发明如何在实践中进行，现在将仅以非限制性的例子的方式并参照附图描述实施例，其中：

[0056] 图1：固定在作为疏水性树脂的Amberlite XAD 1600(Amb.XAD1600)上和作为亲水性树脂的Duolite D568(Duo D568)上的脂肪酶绵毛嗜热丝孢菌(TL)，以及固定在作为疏水性树脂的Sepabeads SP70(SB SP70)上和作为亲水性树脂的多孔二氧化硅(Sil.)上的脂肪酶假单胞菌属(PS)的酯交换活性。

[0057] 缩写：Conv.-转化率；Cyc.-循环

[0058] 图2：在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在0.1M的碳酸氢钠溶液的不同水平下反应6小时之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶。

[0059] 缩写：Conv.-转化率；Cyc.-循环

[0060] 图3：在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在0.1M的碳酸氢钠溶液的不同水平下反应6小时之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶。

[0061] 缩写：Conv.-转化率；Cyc.-循环

[0062] 图4：在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在无水下以及在水的不同水平下反应6小时之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶。

[0063] 缩写：Conv.-转化率；Cyc.-循环；DW-蒸馏水

[0064] 图5：在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在水的不同水平下反应6小时之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶。

[0065] 缩写：Conv.-转化率；Cyc.-循环；DW-蒸馏水

[0066] 图6：在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在0.1M的碳酸氢钠溶液的不同水平下酯化/酯交换4小时之后，FFA和豆油的混合物向生物柴油，以及甘油和水副产物的转化率。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶。

[0067] 缩写:Conv.-转化率;Cyc.-循环;DW-蒸馏水

[0068] 图7:在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在2%的0.1M的碳酸氢钠溶液的存在下反应4小时之后,豆油水解产物向生物柴油和水的酯化。生物催化剂为固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶。

[0069] 缩写:Ac.Val.-酸值;Cyc.-循环

[0070] 图8:在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在1重量%的0.1M的碳酸氢钠溶液的存在下反应6小时之后,鱼油与乙醇的酯交换。生物催化剂为固定于Amberlite XAD 1600上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌(TL Lip.)和假单胞菌属(PS Lip.)的脂肪酶。

[0071] 缩写:Conv.-转化率;Cyc.-循环

[0072] 图9:在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在2重量%的0.1M的碳酸氢钠溶液的存在下反应6小时之后,牛脂肪与乙醇的酯交换。生物催化剂为固定于Amberlite XAD 1600上的绵毛嗜热丝孢菌、假单胞菌属脂肪酶(PS Lip.;TL Lip.)。

[0073] 缩写:Conv.-转化率;Cyc.-循环

[0074] 图10:使用固定于疏水性多孔树脂上的假单胞菌属或绵毛嗜热丝孢菌以及固定于疏水性多孔树脂上的南极假丝酵母,处理在4小时之后获得的含有7mg KOH/1g的FFA值的酯交换/酯化反应介质。

[0075] 缩写:Ac.Val.-酸值;Cyc.-循环

[0076] 图11:示意性示出了根据本发明的一个方面的用于制备脂肪酸烷基酯的体系的第一实施例。

[0077] 图12:示意性示出了根据本发明的一个方面的用于制备脂肪酸烷基酯的体系的第二实施例。

具体实施方式

[0078] 在寻求酶催化工业方法,特别是在固定化脂肪酶的存在下脂肪酸源与醇的酯交换/酯化的方法的改进中,本发明人已开发了特定的条件,在该条件下固定化脂肪酶的稳定性在许多制备循环中得以保持。

[0079] 在本发明的一个实施例中,本发明涉及一种用于在无溶剂碱性微水体系中制备脂肪酸的烷基酯,特别是脂肪酸的短链烷基酯,如脂肪酸甲酯和脂肪酸乙酯(生物柴油)的方法。在特定实施例中,所述碱性微水体系为弱碱性微水体系。所述方法包括提供脂肪酸源,并在所述碱性或弱碱性条件下在固定化脂肪酶制剂的存在下使所述脂肪酸源与游离醇或醇给体反应。不受限于理论,用碱性缓冲溶液预处理脂肪酸源将产生可能对酶具有抑制作用的中和酸。完成高达100%转化率的反应所需的醇的量可逐步加入或一次性加入。此外,所述醇可为短链醇,例如甲醇或乙醇。其他醇给体可在水解酶的存在下在与脂肪酸源的反应中使用,并允许反应在合适条件下进行,直至所述脂肪酸源转化为脂肪酸烷基酯,特别是脂肪酸甲酯(FAME)或脂肪酸乙酯,其中所述水解酶制剂包含分别或共同固定至合适的大网络多孔疏水性聚合物基载体上的一种或多种脂肪酶。

[0080] 在另外的实施例中,脂肪酸源和醇或醇给体之间的酯交换/酯化反应在含水微环境中进行,其中将水加入所述反应混合物中。在特定实施例中,水可以以脂肪酸源的0.0001至5重量%加入。本文所用的水意指纯水或蒸馏水,以及“水溶液”,其可为但不限于自来水、

海水或来自任何其他天然水源或水库的水、脱盐水、经化学或酶净化或处理的水，以及任何其他含水溶液。反应体系或水溶液的pH可变化，并可为例如约3-11，例如4-10、5-10、5-9、6-10、6-9或7-9。

[0081] 本发明的方法可在同时从反应混合物中连续去除所形成的甘油和任何过量的水下进行。包含于所述脂肪酸源中的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸烷基酯，特别是脂肪酸甲酯的转化率可在反应过程中在各种时间点进行监测。可在反应过程中在任何所需的时间点通过合适的方式去除反应介质，由此停止反应，并将形成的脂肪酸甲酯和任选的形成的甘油从所述反应介质中分离。当包含于所述脂肪酸源中的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率已达到至少70%，例如至少85%，或至少90%时，可特别地停止反应。

[0082] 所述反应体系可类似于描述于共同待审的WO2009/069116中的反应体系。例如，制备体系可使用具有底部烧结玻璃或不锈钢过滤器的搅拌槽反应器，所述底部烧结玻璃或不锈钢过滤器将生物催化剂保留在反应器中，但允许反应介质渗透出所述反应器。这种反应器配置允许从固定化酶自解吸的副产物(特别是甘油和水)下沉至反应器的底部，并通过所述过滤器渗透出去。结果是解吸的形成的甘油以及过量的水从反应介质连续移出，从而导致反应向合成移动，由此达到98%以上的转化率。在该反应器中使用的生物催化剂由单一类型或多个类型的脂肪酶组成，考虑到它们的位置特异性以及它们的来源，如本文所述。或者，可使用具有底部过滤器的两个连续的搅拌槽反应器。可在所述两个反应器之间使用沉降槽或离心机。第一反应器可含有由单一类型或多个类型的脂肪酶组成的固定化生物催化剂。在两个反应器之间的沉降槽或离心机的作用是从反应介质中去除所形成的甘油和过量的水，从而使得在第二反应器中在合理的反应时间原料向它们相应的脂肪酸烷基酯的转化率增加至98%以上。以下描述一些特定的反应体系和方法。

[0083] 术语“反应混合物”、“反应体系”和“反应介质”在本文可同义地使用。

[0084] 如在本发明的方法的实施例中，在碱性缓冲溶液或水的存在下固定于疏水性树脂上的脂肪酶的使用确保了酶的高稳定性，并避免了亲水性物质(如水和形成的甘油副产物)在生物催化剂上的积聚。在本发明的方法的特定实施例中，使用0.001-5%碱性或弱碱性缓冲溶液，例如0.01-5%、0.05-5%、0.1-5%、0.5-5%，如0.001%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%。在使用水的本发明的方法的特定实施例中，水以0.0001-5%的水平使用，例如0.001-5%、0.01-5%、0.05-5%、0.1-5%、0.5-5%，如0.0001%、0.001%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%。如所述，当使用碱性溶液时，其可中和酸，所述酸通常存在于所述脂肪酸源中，或由于副反应而产生。这些副产物的连续主动去除甚至可增加方法的效率。经分离的甘油可工业使用。

[0085] 在本发明的方法中使用的脂肪酸源可包含如下的至少一种，或任何所需比例的它们中的至少两种的任意混合物：豆油、芥花籽油、海藻油、菜子油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、向日葵油、花生油、棉籽油、麻疯树油、玉米粗油、鱼油、动物衍生脂肪、餐饮废油、褐色润滑脂、衍生自不可食用的植物源的油甘油三酯、衍生自那些油的部分甘油酯和游离脂肪酸。

[0086] 在本发明的所有方法中，通过反应所形成的脂肪酸短链烷基酯特别地为脂肪酸甲酯、脂肪酸乙酯、脂肪酸异丙酯或脂肪叔丁酯(生物柴油)。其他中链脂肪醇(C_6-C_{10})和长链脂肪醇(C_{12}-C_{22})也可用于本法的制备方法中。这些更长的醇可特别地适于制备蜡，例如化

妆产品。

[0087] 所述脂肪酶可为衍生自如下的脂肪酶，但不限于此：绵毛嗜热丝孢菌、米赫根毛霉、米赫毛霉、假单胞菌属、根霉属、爪哇毛霉、罗克福尔青霉菌、黑曲霉、粘稠色杆菌、无色杆菌属、伯克霉尔德氏菌属、南极假丝酵母A、南极假丝酵母B、皱褶假丝酵母、产碱杆菌属、卡门柏青霉、番木瓜种子和胰液素。

[0088] 所述脂肪酶可共同固定于合适的载体上，特别是疏水性脂族聚合物基载体或疏水性芳族聚合载体上。所述脂肪酶的每一种可被固定至合适的载体上，其中其上固定所述脂肪酶的载体可相同或不同。所用的脂肪酶可对它们的基材为区域专一性的，或随机的。当使用超过一种脂肪酶时，可将所述脂肪酶固定至相同或不同的疏水性载体上。共固定至同一载体上的脂肪酶可显示出对它们的基材相同或不同的基材选择性或区域专一性。

[0089] 脂肪酶可为区域专一性的(或位点特异性)，各自单独使用或与具有相同或不同位点特异性的脂肪酶组合使用。当提及位置sn-1、sn-2-或sn-3时，这些为在各种甘油酯的甘油骨架上的位置。因此，相比于随机脂肪酶，在本发明的方法中使用的脂肪酶可具有更高的对sn-2位置选择性，即它们有利于催化醇或醇给体与sn-2位置的脂肪酰基之间的反应，而随机脂肪酶显示出对甘油骨架上的所有三个位置的脂肪酰基相同的酯交换活性。一些脂肪酶独特地显示出在sn-2位置上的位置活性，特别是在由基材、产物等所决定的特定条件下。在本发明的方法中使用的其他脂肪酶为sn-1,3位置特异性。它们可单独使用或与随机脂肪酶(特别是对部分甘油酯具有亲和性的脂肪酶，以及任选的具有对sn-2位置的高亲和性的第三脂肪酶)一起使用。

[0090] 所述载体特别地为多孔大网络疏水性载体，其可为有机的或无机的。载体的例子为多孔无机载体(例如但不限于疏水化的二氧化硅或和氧化铝基载体)，和疏水性有机载体(例如但不限于聚合或聚合物基载体)。所述载体可任选地含有选自环氧基或和醛基，或离子基团的活性官能团。

[0091] 在本发明的方法中使用的不可溶载体特别地为多孔网状疏水性脂族或芳族聚合物基载体，如Amberlite^{R} XAD 1600和Sepabeads^{R} SP70(两者均由多孔微网状树脂组成，并由二乙烯基苯或由二乙烯基苯和聚苯乙烯的混合物制得)、Amberlite^{R} XAD 7HP(其由微网状脂族丙烯酸类聚合物组成)和多孔脂族聚合物(如多孔聚丙烯(Accurel^{R}))。

[0092] 所述载体可为由二乙烯基苯或二乙烯基苯和苯乙烯的混合物组成的网状疏水性聚合物，和由脂族丙烯酸类聚合物或聚烯烃(如聚丙烯)组成的网状疏水性脂族聚合物。特定的载体为孔径在25-1000Å范围内，更特别地在80-200Å范围内的多孔基质。所述载体也可为粉末状或颗粒状多孔疏水性二氧化硅或其他无机氧化物。所述载体也可为粉末状或颗粒状多孔疏水化的二氧化硅或其他无机氧化物。在特定实施例中，载体树脂的表面积高于100m^2/g。

[0093] 待补充至脂肪酸源和醇之间的脂肪酶催化的酯交换/酯化反应中的碱性或弱碱性水溶液的量通常低于反应介质的5重量%。该碱性溶液例如由无机碱或盐制得，或者由有机碱制得。无机碱和盐为例如碱金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硫酸盐、乙酸盐和柠檬酸盐。有机碱可为例如伯胺、仲胺或叔胺。也可预期这些碱性试剂的混合物。在根据本发明的方法中，固定化酶的微环境的pH保持为碱性或弱碱性值。尽管蒸馏水向反应体系的添加改进了固定于疏水性载体(树脂)上的脂肪酶的性能，如图4和5所示，各种碱性缓冲液

(其取决于所用的碱的类型而具有不同的pH值)的添加获得了固定于疏水性载体(树脂)上的脂肪酶的进一步稳定,例如如图2和3所示。碳酸盐和碳酸氢盐缓冲液为有效增加固定于疏水性载体上的脂肪酶的稳定性的弱碱的例子。本文描述其他合适的碱。通常包含所述缓冲溶液的补充碱性或弱碱性试剂的pKa等于或高于包含所述脂肪酸源的酸的pKa。本文所用的弱碱性溶液通常为具有7至约11,例如7-8.5、7-9、7-9.5、7-10或7-11的pH的溶液。通常,所用的碱性或弱碱性水溶液的量由以反应中所用的油的量计的重量百分比(重量%)表示。

[0094] 在碱性或弱碱性溶液的存在下,例如0.01-5重量%,0.05-5重量%,0.05-4重量%,1-5重量%或1-4重量%的量的固定于多孔疏水性聚合物基载体(树脂)上的脂肪酶的使用获得了在脂肪酸源和醇之间的酯交换/酯化反应中的生物催化剂的活性的稳定。这在如下实例中显示。

[0095] 所述脂肪酸源为如下的至少一种或由至少两个所述来源组成的混合物:甘油三酯、部分甘油酯、游离脂肪酸、磷脂、脂肪酸的酯和酰胺。

[0096] 脂肪酸烷基酯的制备通过酯交换或酯化同时或连续进行。在这种反应体系中,生物催化剂活性得以保持,而在多个用途中无显著的活性损失,还避免了甘油和水副产物或其他亲水性化合物在所述生物催化剂上的积聚。

[0097] 本发明提供了利用在许多制备循环中保留高活性和稳定性的特定固定化界面酶的方法。特别地,在酯交换/酯化反应中使用脂肪酶和磷脂酶制剂。这些反应可用于制备食品、化妆品和生物燃料("生物柴油")。特别关注地,这些酶可用于合成用作"生物柴油"的脂肪酸短链烷基酯。

[0098] 本发明利用对短链醇(如甲醇、乙醇和甘油)以及短链脂肪酸(如乙酸)具有高耐受性的稳定的固定化界面酶。这些酶制剂的使用也防止了亲水性物质,特别是甘油和水在固定化生物催化剂上的积聚。

[0099] 在本发明的一个实施例中,提供了一种方法,所述方法用于在碱性或弱碱性水溶液的存在下,使用固定于疏水性载体(树脂)上的一种或多种类型的脂肪酶,脂肪酸源与醇的同时或连续酯交换/酯化反应,从而在合理的反应时间过程中(通常低于5小时)在接近完全转化下获得所需产物(即脂肪酸烷基酯)。弱碱溶液,例如0.001M、0.1M、0.5M或1M的碳酸氢钠溶液可以低于反应中所用的油的量的约5重量%或约4重量%的量存在于所述反应体系中。

[0100] 如以下实例所示,脂肪酶的操作寿命也可通过如下方式而得以延长:使用用于脂肪酶固定化的疏水性树脂载体,结合在酯交换/酯化反应介质中使用例如0.001-5重量%范围内的碱性或弱碱性缓冲溶液。如以下实例进一步所示,反应混合物的水含量可增加,无论pH值为多少。因此,在另一实施例中,通过添加例如所述脂肪酸源的0.0001-5重量%或任意如上定义的特定子区间的水,生物催化剂的稳定性随着反应体系的水含量的增加而增加。结果显示,所述脂肪酸源的0.0001-5重量%范围内的碱性溶液(图2和3)的添加,或所述脂肪酸源的0.001-4%的水(图4和5)的添加导致在许多反应循环中保持了酶活性和稳定性。

[0101] 在本发明的方法中所用的醇或醇给体可为短链烷基醇,特别为C_1-C_6烷基醇,更特别为C_1-C_4烷基醇,且特别地为甲醇或乙醇,或者所述醇给体可为单烷基酯或碳酸二烷基酯,如碳酸二甲酯。例如碳酸二烷基酯的醇给体也可充当用于反应体系的碱性或弱碱性的来源。

[0102] 根据本发明的另一方面，提供了一种用于制备脂肪酸烷基酯的体系。参见图11，通常用附图标记100表示的这种体系的第一实施例包括反应器容器120、预反应准备容器140和产物分离容器160。

[0103] 预反应准备容器140配置用于接收原料和缓冲液(和/或水)以从其形成合适的乳状液，并用于将所述准备乳状液PE(在本文也称为乳化原料)进料至反应器容器120。特别地，这种原料可包括分别经由合适的供给线152，154，156提供的来自脂肪酸源182的脂肪酸FA(例如餐饮废油)、来自醇源184的醇AL(例如甲醇)，和来自缓冲液/水源186的缓冲液(和/或水)BU，所述供给线152，154，156分别经由容器入口172，174，176和合适的阀门(未显示)与所述预反应准备容器140流体连接。

[0104] 预反应准备容器140限定了内体积V1，在所述内体积V1中，包含经由容器入口172，174，176提供其中的原料和缓冲液/水的反应混合物通过合适的搅拌系统142被混合在一起以形成乳状液PE，所述搅拌系统142由电源(未显示)驱动。所述预反应准备容器140包括外夹套149，合适的工作流体可通过所述外夹套149循环以将体积V1保持在所需的稳态温度下。例如，工作流体可为在不同的容器(未显示)中加热或冷却并经由合适的入口和出口(未显示)泵送通过夹套149的油或水。在该实施例的可选择的变型中，代替夹套149或除了夹套149之外，预反应准备容器140可包括加热和/或冷却部件(例如电动加热和/或冷却部件)系统。

[0105] 反应器容器120配置用于从预反应准备容器140接收准备乳状液PE，从而在合适的生物催化剂BC的存在下，在其中使原料反应以制得反应产物RP，并用于将反应产物RP从反应混合物进料至产物分离容器160。出口线148提供了预反应准备容器140和反应器容器120之间经由合适的阀门(未显示)的选择性流体连接，并允许由预反应准备容器140制得的准备乳状液PE如所需被进料至反应器容器120。

[0106] 反应容器120限定了内体积V2，在所述内体积V2中，经由容器入口122提供其中的反应混合物中的准备乳状液PE反应，且反应混合物可通过合适的搅拌系统124进行搅拌以形成反应产物RP，所述搅拌系统124由电源(未显示)驱动。生物催化剂BC可包含合适的酶，并以固定化酶珠粒的形式提供，所述固定化酶珠粒保持在反应器容器120中直至它们变得无效或不足够有效，此时它们可被移出并用新的生物催化剂BC代替。例如，生物催化剂BC可包括固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶。

[0107] 反应器容器120包括外夹套129形式的热调节系统，合适的工作流体可通过所述外夹套129循环以将体积V2保持在所需的稳态温度下。例如，工作流体可为在不同的容器(未显示)中加热或冷却并经由合适的入口和出口123泵送通过夹套129的油或水。在该实施例的可选择的变型中，代替夹套129或除了夹套129之外，所述热调节系统包括加热和/或冷却部件(例如电动加热和/或冷却部件)系统。

[0108] 反应器容器120的下部包括出口127，且以过滤器125形式的合适的保留装置在出口127的上游提供，并配置用于在将反应混合物从反应器容器120移出之前过滤所述反应混合物，特别是反应产物RP，并用于防止生物催化剂BC与反应产物RP一起被移出。

[0109] 产物分离容器160配置用于从反应产物RP，从副产物(包括过量的水和甘油G)中分离出所需的产物P(脂肪酸烷基酯)。出口线147提供了产物分离容器160和反应器容器120之

间经由合适的阀门(未显示)的选择性流体连接,并允许反应产物RP如所需从反应器容器120被进料至产物分离容器160。在该实施例中,产物分离容器160包括用于进行前述分离的离心机或重力分离系统,并包括用于输出产物P的第一出口162,和用于收集过量水和甘油G的第二出口164。产物P可经由龙头163收集。

[0110] 因此所述体系可以以连续制备模式操作,其中将准备乳状液PE进料至反应器容器120,所需的产物P经由龙头163以连续方式收集。乳状液PE可以以连续方式制备并递送至反应器容器120,从而以与从出口127移出反应产物RP相同的速率装满在反应器容器120中的反应物的体积。或者,乳状液PE可批量制备并递送至反应器容器120,从而在经由出口127连续移出反应产物RP之后,在反应器容器120中的反应物水平下降至特定的最小水平的任何时候,以不连续间隔装满在反应混合物中的反应物的体积。当然,也有可能操作体系100,从而批量地而不是连续地提供所需的产物P。

[0111] 或者,体系100可以以提高产量的模式操作,其中产物P不是经由龙头163被立即收集,而是经由任选的再发送系统被再发送至反应器容器120,所述再发送系统包括管线165、容器入口121和阀门166,其中可选择性地操作阀门166以从龙头163转移产物P。当产物P被再发送至反应器容器120时,产物P可在其中与醇AL进一步反应以制得更高产量的产物P,所述更高产量的产物P可使用产物分离容器160从副产物中再次被分离出,所述醇AL从来源184经由分开的管线(未显示)提供、从不同的醇源(未显示)提供,或经由预反应准备容器140从来源184提供。当醇经由准备容器140提供时,准备容器140首先倒空准备乳状液PE,且合适的阀门防止脂肪酸FA和任选的缓冲液/水由各自的来源182和186提供。

[0112] 可提供合适的泵或重力进料和可控阀门以将各自的材料通过各自的管线152,154,156,148,147,165选择性输送,且合适的控制器(未显示)监测并控制体系的操作。

[0113] 在第一实施例的至少一些可选择的变体中,预反应准备容器140可与反应容器120一体化。例如,各自的内体积V1和V2可由具有对应于管线148的开放装置的壁分隔。或者,各自的内体积V1和V2可为相接的,但内体积V1与生物催化剂BC充分间隔,以提供在到达生物催化剂BC之前乳状液PE形成的充足时间。

[0114] 在第一实施例的可选择的变体中,可将脂肪酸FA、醇AL,和缓冲液/水BU中的一种、两种或全部绕过预反应准备容器140而直接提供至反应器容器120。例如,脂肪酸源182、醇源184,和缓冲液/水源186中的一种或多种可绕过预反应准备容器140,经由合适的供应管线(未显示)而直接与反应器容器120选择性流体连接。

[0115] 应了解,根据第一实施例或其可选择的变体的体系100的所有组件具有合适的形式,并由本领域已知的合适的材料制成,例如以使得每个组件能够在各自的条件(包括温度、压力、pH等)下进行各自的功能。

[0116] 参照图12,所用附图标记200表示的所述体系的第二实施例包括第一实施例的所有部件和特征,包括其可选择的变体,包括已作必要变更的具有一些区别的如图11的所有类似编号的组件。例如,体系200也包括:反应器容器120、预反应准备容器140、产物分离容器160、脂肪酸源182、醇源184、缓冲液/水源186、供应管线152,154,156、容器入口172,174,176、搅拌系统142、外夹套149、出口管线148、容器入口122、搅拌系统124、生物催化剂BC外夹套129、入口和出口123、出口127、过滤器125、出口管线147,第一出口162、第二出口164,如第一实施例所公开并已作必要变更。

[0117] 然而，在第二实施例中，省略第一实施例的管线165、龙头163和阀门166，相反辅助反应器组件300任选连接至产物分离容器160的第一出口162。

[0118] 辅助反应器组件300包括辅助反应器容器220和辅助产物分离容器260，在该实施例中所述辅助反应器容器220和辅助产物分离容器260分别基本上类似于反应器容器120和产物分离容器160并已作必要变更。在操作中，来自产物分离容器160的所需产物P经由管线266、阀门267和容器入口221而通入辅助反应器容器220。当通入辅助反应器容器220时，产物P可在其中与醇AL进一步反应以制得进一步反应的产物FRP，所述醇AL从来源184或从不同的醇源(未显示)经由分开的管线(未显示)而提供。管线249使得所述进一步反应的产物FRP能够被输送至辅助产物分离容器260，所述辅助产物分离容器260随后操作以从副产物中分离更高产量的产物P’。

[0119] 体系200可以以类似于体系100的方式(已作必要变更)操作。

[0120] 尽管已公开和描述，但应了解本发明不限于本文公开的特定实例、方法步骤和材料本身，方法步骤和材料可有所变化。还应了解本文所用的术语仅为了描述特定实例的目的而使用，并不旨在限定，因为本发明的范围仅由所附权利要求书及其等同方式进行限定。

[0121] 应注意在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一种”和“所述”包括复数，除非内容清楚地另外指出。

[0122] 在整个本说明书和之后的权利要求书中，除非上下文另外要求，词语“包含”应理解为暗示包括所述整数或步骤或整数组或步骤组，但不排除任何其他整数或步骤或整数组或步骤组。

[0123] 如下实例代表了本发明人在进行本发明的方面时所用的技术。应了解尽管这些技术示例了用于实施本发明的优选实施例，但根据本公开，本领域技术人员将认识到在不偏离本发明的预期范围下可进行许多改变。

[0124] 实例

[0125] 综述

[0126] 全部实验或者在底部具有居中的玻璃过滤器的体积为30ml的玻璃管中，或者在底部具有孔隙率为150-250μm的烧结玻璃过滤器的体积为500ml的机械搅拌反应器中进行。典型的反应介质含有相对于脂肪酸(无论其为游离的或结合于甘油骨架上)1:1摩尔基础的脂肪酸源、醇(通常为甲醇或乙醇)(对于游离脂肪酸和甘油单酯为1:1，对于甘油二酯为1:2，且对于甘油三酯为1:3，有利于醇)。脂肪酸源与不同量的碱性缓冲液(在特定实施例中为碳酸氢钠)预混。反应通过加入固定于疏水性树脂上的脂肪酶(10-15重量%)而引发，反应介质或者机械摇动，或者在30°C下搅拌。除非不同指出，醇量在三个步骤中相等地加入，所述三个步骤各自间隔1小时。反应转化率通过在不同的时间间隔从反应介质中取出样品并分析脂肪酸组分而跟踪。向生物柴油的转化率计算为：100*脂肪酸烷基酯的峰面积/所有峰面积的总和。

[0127] 脂肪酶固定化：根据标准程序固定脂肪酶，其中将衍生自某种微生物的脂肪酶溶解于在某个pH值(例如7.5)下的0.1M的缓冲溶液中。将有机或无机聚合物树脂引入所述脂肪酶溶液中。所述混合物在室温下摇动8小时。将冷丙酮任选地加入至所述混合物中以增加在树脂上的蛋白质酶沉淀。过滤所述混合物，干燥酶珠粒以将水含量减少至小于5%。

[0128] 使用不同的树脂以获得具有疏水特性的树脂，所述不同的树脂包括基于聚苯乙

烯/二乙烯基苯、石蜡或它们的任意组合的疏水性聚合物树脂。所用的典型的疏水性树脂包括Amberlite® XAD 1600(Rohm &Haas,USA)和Sepabeads® SP70(Resindion,Italy)。所用的典型的亲水性树脂包括Duolite® D568(Rohm & Haas)和多孔二氧化硅凝胶。脂肪酶可分开固定于树脂上,或者不同的脂肪酶可共固定于同一树脂上。

[0129] 实例1

[0130] 固定于作为疏水性树脂的Amberlite® XAD 1600上和作为亲水性树脂的Duolite® D568上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶,以及固定于作为疏水性树脂的Sepabeads® SP70上和作为亲水性树脂的多孔二氧化硅上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶的酯交换活性。

[0131] 反应条件:精制且漂白的豆油(20g)含有1重量%的0.1M碳酸氢钠溶液。在三个等同批次中逐步加入甲醇(2.5ml),所述三个等同批次各自间隔1小时。在300rpm和30°C下摇动含有10重量%的脂肪酶制剂的反应介质。结果示于图1中。

[0132] 图1示出的结果显示,使用相同批次的酶在最初5个循环过程中,在1重量%的碳酸氢钠溶液的存在下,固定于不同树脂上的绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属脂肪酶均显示出高的酯交换活性。观察到在第5批次之后,当使用相同批次的酶时,由于在固定于亲水性树脂(即Duolite® D568和多孔二氧化硅)上的两种脂肪酶的珠粒周围凝胶状沉淀的形成,从体系过滤反应介质变得困难。在进一步的连续批次中,固定于亲水性树脂上的两种脂肪酶的酯交换活性急剧下降,且在第10个循环之后它们变得失活。相反,固定于疏水性树脂Sepabeads® SP70上的假单胞菌属脂肪酶在70个循环之后保留其初始活性的超过80%,而固定于疏水性树脂Amberlite® XAD1600上的绵毛嗜热丝孢菌脂肪酶在超过70个循环之后保留其初始活性的超过20%。

[0133] 实例2

[0134] A.在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后,豆油向生物柴油和甘油的转化率。

[0135] 反应条件:精制且漂白的豆油(20g)含有不同浓度的0.1M碳酸氢钠溶液。在三个等同批次中逐步加入甲醇(2.5ml),所述三个等同批次各自间隔1小时。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图2中。

[0136] B.在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后,豆油向生物柴油和甘油的转化率。

[0137] 反应条件:精制且漂白的豆油(20g)含有不同浓度的0.1M碳酸氢钠溶液。在三个等同批次中逐步加入甲醇(2.5ml),所述三个等同批次各自间隔1小时。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图3中。

[0138] 图2和3显示了在反应介质中碳酸钠的量对固定于疏水性树脂上的绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属脂肪酶的使用寿命具有主要作用。在图2和3中可以看出,在不存在碱性溶液下,两种固定化脂肪酶均在数个循环之后显著损失它们的活性,而在作为反应体系中的碱的碳酸氢钠溶液的存在下,同样的固定化脂肪酶在多次使用中保持它们的酯交换活性。两种固定化酶的结果显示,在0-4重量%范围内在反应介质中增加碳酸氢钠溶液的量可在相同批次的固定化酶的多次使用中减少酶活性的损失。

[0139] 实例3

[0140] A.在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。反应条件：精制且漂白的豆油(20g)含有不同浓度的蒸馏水。在三个等同批次中逐步加入甲醇(2.5ml)，所述三个等同批次各自间隔1小时。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图4中。

[0141] B.在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后，豆油向生物柴油和甘油的转化率。反应条件：精制且漂白的豆油(20g)含有不同浓度的蒸馏水。在三个等同批次中逐步加入甲醇(2.5ml)，所述三个等同批次各自间隔1小时。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图5中。

[0142] 图4和5显示，在多次实验中使用相同批次的固定于疏水性树脂上的脂肪酶绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属的酯交换活性也受到反应体系中水量的影响。可以看出，当在连续循环中使用生物催化剂时，将水量从无(零)增加至4重量%可保持生物催化剂的更高剩余酯交换活性。示于图2至5中的结果明显显示，当在连续循环中使用时，在酯交换反应中使用弱碱(如碳酸氢钠溶液)有利于保持固定于疏水性树脂上的脂肪酶的活性。

[0143] 实例4

[0144] 在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在4小时的酯化/酯交换之后，游离脂肪酸(FFA)和豆油的混合物向生物柴油以及甘油和水副产物的转化率。

[0145] 反应条件：初始FFA值为72mg KOH/1g的游离脂肪酸豆油水解产物(50重量%)和豆油(50重量%)的混合物含有不同量的0.1M碳酸氢钠溶液。在三个等同批次中逐步加入甲醇(4.5ml)，所述三个等同批次各自间隔1小时。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶(20重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图6中。

[0146] 图6显示了不同量的碱溶液对存在于反应混合物中的FFA的同时酯化反应具有主要影响，所述反应混合物由等比例的豆油水解产物和豆油甘油三酯组成。可以看出，当无碱性溶液加入酯化/酯交换反应体系中时，固定于疏水性树脂上的假单胞菌属脂肪酶失去其酯化活性，而当将1和2重量%的0.1M碳酸氢钠溶液分别加入反应体系中时，同样的生物催化剂在连续循环中保持其活性。图6示出的结果显示，在1重量%和2重量%的0.1M碳酸氢钠溶液的存在下，固定于疏水性树脂上的假单胞菌属脂肪酶的使用将FFA含量从初始值72mgKOH/1g分别降低至平均8和6mg KOH/1g，并在22个连续循环中保持该活性。

[0147] 实例5

[0148] 在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在4小时的反应之后，豆油水解产物向生物柴油和水的酯化。

[0149] 反应条件：FFA值为150mg KOH/1g的游离脂肪酸豆油水解产物(20g)含有1重量%的0.1M碳酸氢钠溶液。在一个批次中将甲醇(2ml)加入反应介质中。使用固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自假单胞菌属的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图7中。

[0150] 图7显示，固定于疏水性树脂上的假单胞菌属脂肪酶也能够催化游离脂肪酸的酯

化以形成脂肪酸甲酯和水副产物。结果显示，使用同一批次的生物催化剂，脂肪酶制剂在含有1%的0.1M碳酸氢钠溶液的介质中在超过25个循环中保持其酯化/酯交换活性，而未观察到任何活性的显著损失。

[0151] 实例6

[0152] 在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后，鱼油与乙醇的酯交换。

[0153] 反应条件：精制鱼油(20g)含有1%的0.1M碳酸氢钠溶液。在三个等同批次中逐步加入乙醇(2.5ml)，所述三个等同批次各自间隔1小时。分别使用固定于Amberlite^{R} XAD 1600上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属的脂肪酶(10重量%)。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图8中。

[0154] 图8显示固定于疏水性树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属的两种脂肪酶也能够催化鱼油甘油三酯与乙醇的酯交换以形成脂肪酸乙酯和甘油副产物。结果也显示使用同一批次的生物催化剂，两种生物催化剂制剂在1%的碳酸氢钠溶液的存在下在超过20个循环中保持其酯交换活性而无显著的活性损失。

[0155] 实例7

[0156] 在多个批量实验中使用同一批生物催化剂在6小时的反应之后，牛脂肪与乙醇的酯交换。

[0157] 反应条件：含有牛脂肪的脂肪酸乙酯(4g)的牛脂肪(16g)和1%的1M碳酸钾溶液。在三个等同批次中逐步加入乙醇(2.5ml)，所述三个等同批次各自间隔1小时。固定于Amberlite^{R} XAD 1600上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌、假单胞菌属的脂肪酶(10重量%)分别使用或者以相等比例结合使用。在300rpm和37℃下摇动反应介质。结果示于图9中。

[0158] 图9显示分别或结合固定于疏水性树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌和假单胞菌属的两种脂肪酶也能够催化牛脂肪甘油三酯与乙醇的酯交换以形成脂肪酸乙酯和甘油副产物。反应介质的原料由牛脂肪(80%)和衍生自牛脂肪的脂肪酸乙酯组成，以降低反应介质的熔点。图9所示的结果显示，当在100个连续循环中使用同一批次的生物催化剂时，在弱碱性溶液(如1M的碳酸钾)的存在下所有生物催化剂均保留其初始活性的超过80%。

[0159] 实例8

[0160] 在多个批量实验中，使用同一批生物催化剂(10重量%)，使用固定于疏水性多孔树脂上的假单胞菌属脂肪酶或绵毛嗜热丝孢菌脂肪酶以及固定于疏水性多孔树脂上的南极假丝酵母B脂肪酶和甲醇(分别地，FFA和甲醇之间以摩尔计1:10的比例)处理在4小时之后获得的酯交换/酯化反应介质，所述反应介质具有7mg KOH/1g的FFA值。在300rpm和30°C下摇动反应介质。结果示于图10中。

[0161] 图10显示，在使用如上所述的绵毛嗜热丝孢菌脂肪酶或假单胞菌属脂肪酶处理之后获得的酯交换反应介质(其通常具有3-7mgKOH/1g的FFA值)可用固定于亲水性或疏水性载体上的南极假丝酵母B脂肪酶进行处理，从而将FFA值降低至小于2mg KOH/1g。固定化脂肪酶可在超过100个循环中保持其活性。

[0162] 实例9

[0163] 实例8

[0164] 使用图11所示的体系的第一实施例，含有10%FFA的餐饮废油与甲醇的酯交换/酯

化以形成生物柴油、水和甘油。

[0165] 反应条件：含有2%的0.1M的碳酸氢钠溶液的餐饮废油(1100g)和甲醇(140g)首先在预反应准备容器140中预混以形成乳状液，随后将所述乳状液引入具有约2升的内体积V2的反应器容器120。所述反应混合物在反应器容器120中与固定于疏水性多孔聚苯乙烯-二乙烯基苯基树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌的脂肪酶(油的30重量%)在30°C下混合6小时。将所述反应混合物过滤通过过滤器125，并进料至产物分离容器160。将甘油和过量的水从产物分离容器160中的反应混合物中移出。将含有脂肪酸甲酯和未反应的甘油酯的上层相经由再发送管线165再引入至反应器容器120，并在将甲醇(110g)加入至反应器容器120中的反应介质之后重新开始反应器容器120中的搅拌。在2小时之后向甲酯的转化率为98%。将含有餐饮废油(83重量%)、甲醇(15%)和0.1M的碳酸氢钠溶液(2%)的乳化反应介质(准备乳状液)以约30ml/min的流量连续进料至反应器容器120中。当使用同一批次的固定于大孔疏水性树脂上的衍生自绵毛嗜热丝孢菌脂肪酶的生物催化剂时，向脂肪酸甲酯的转化率保持超过3个月而无显著的活性损失。

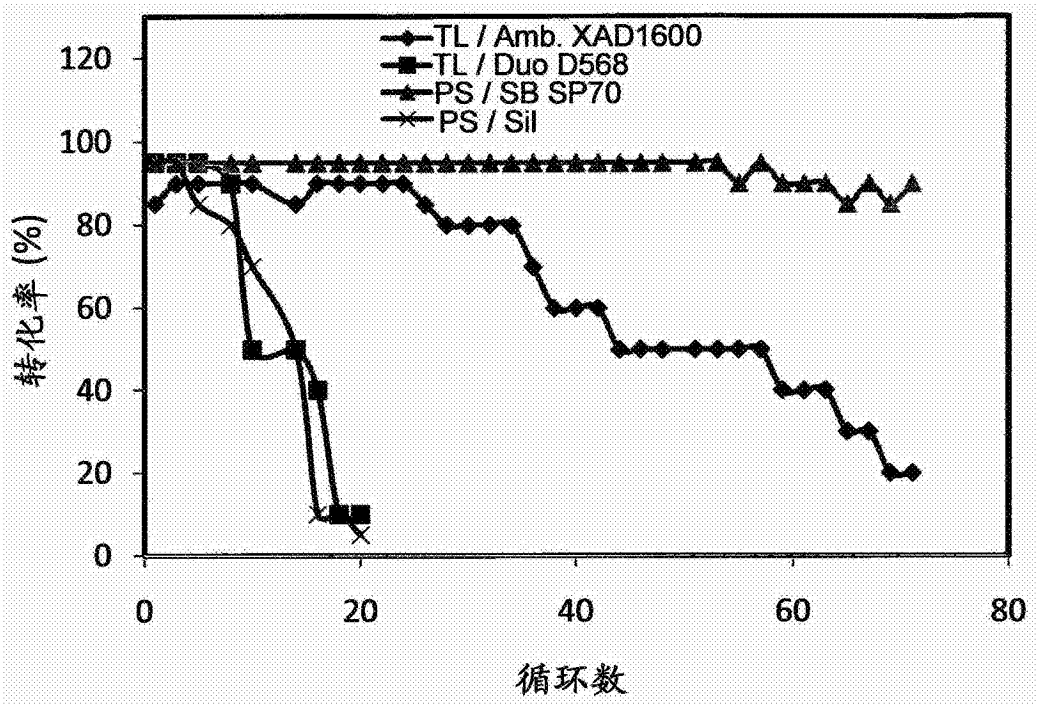
TL / Amb. XAD1600
TL / Duo D568
PS / SB SP70
PS / Sil
转化率 (%)
循环数
0
20
40
60
80
100
120

图1

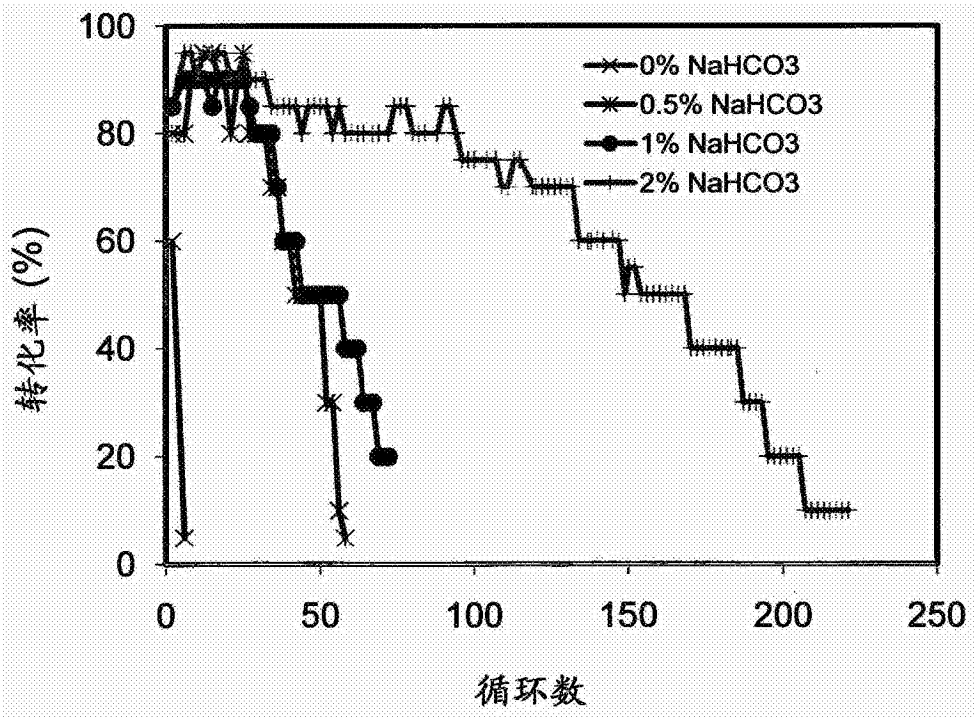
0% NaHCO3
0.5% NaHCO3
1% NaHCO3
2% NaHCO3
转化率 (%)
循环数
0
20
40
60
80
100
0
50
100
150
200
250

图2

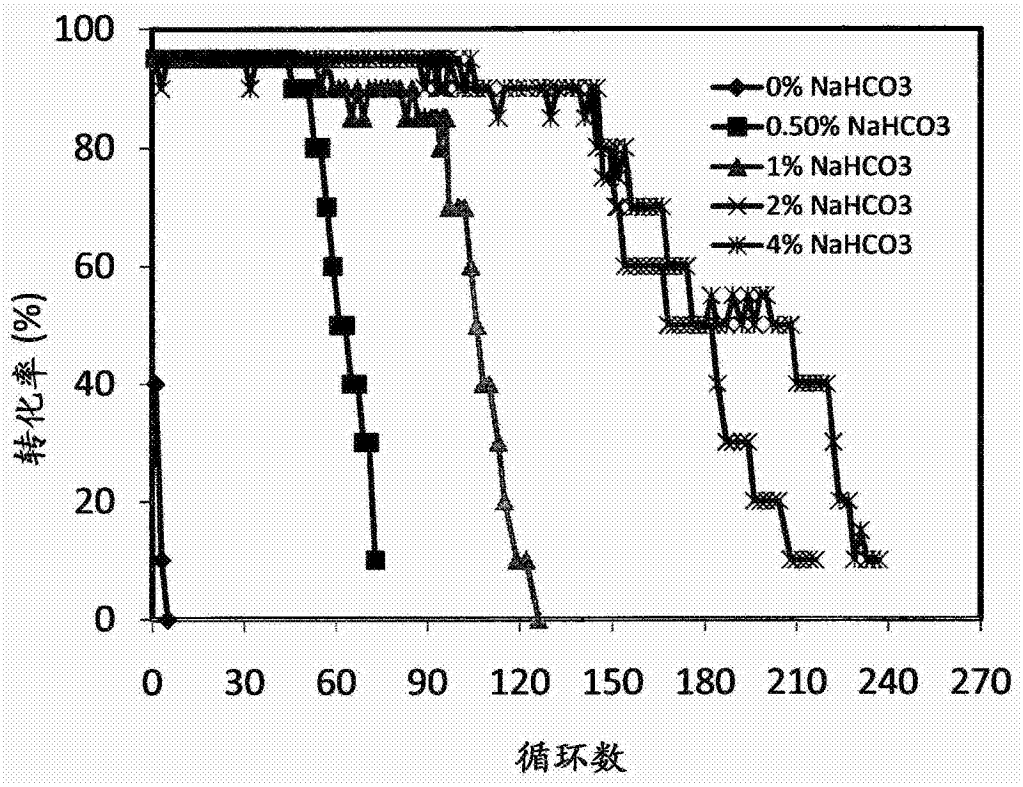
100
80
60
40
20
0
转化率 (%)
0 30 60 90 120 150 180 210 240 270
循环数
0% NaHCO3
0.50% NaHCO3
1% NaHCO3
2% NaHCO3
4% NaHCO3

图3

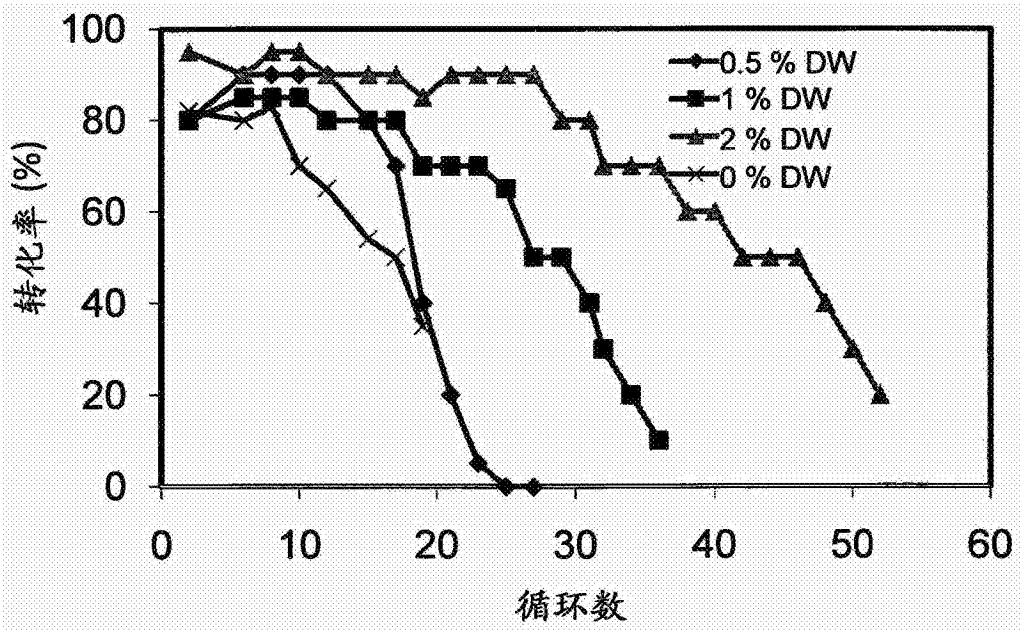
100
80
60
40
20
0
转化率 (%)
0 10 20 30 40 50 60
循环数
0.5 % DW
1 % DW
2 % DW
0 % DW

图4

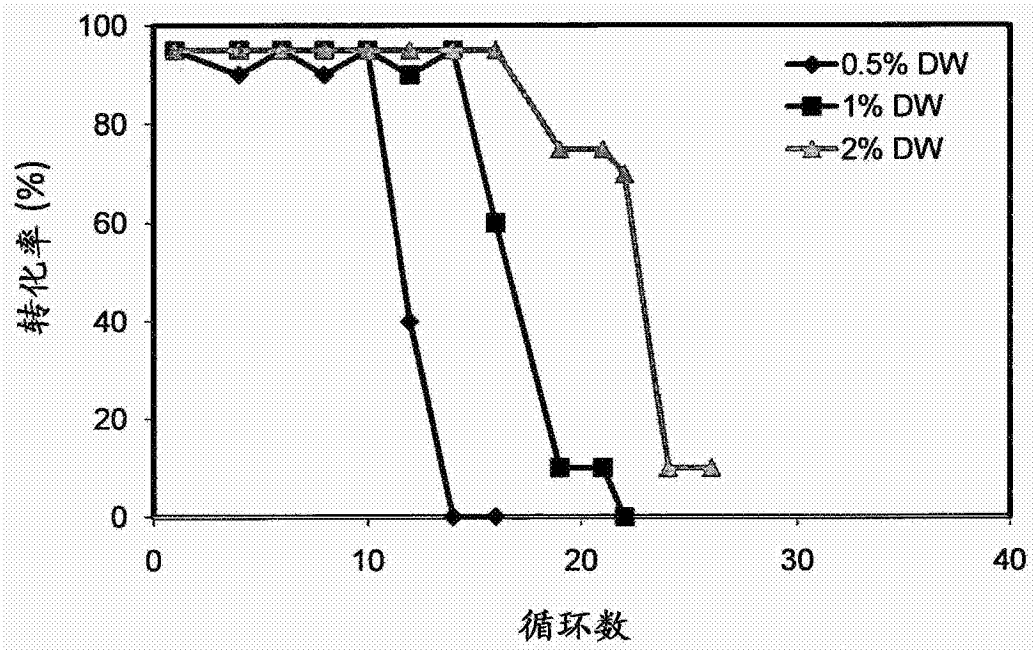
100
80
60
40
20
0
转化率 (%)
0
10
20
30
40
循环数
0.5% DW
1% DW
2% DW

图5

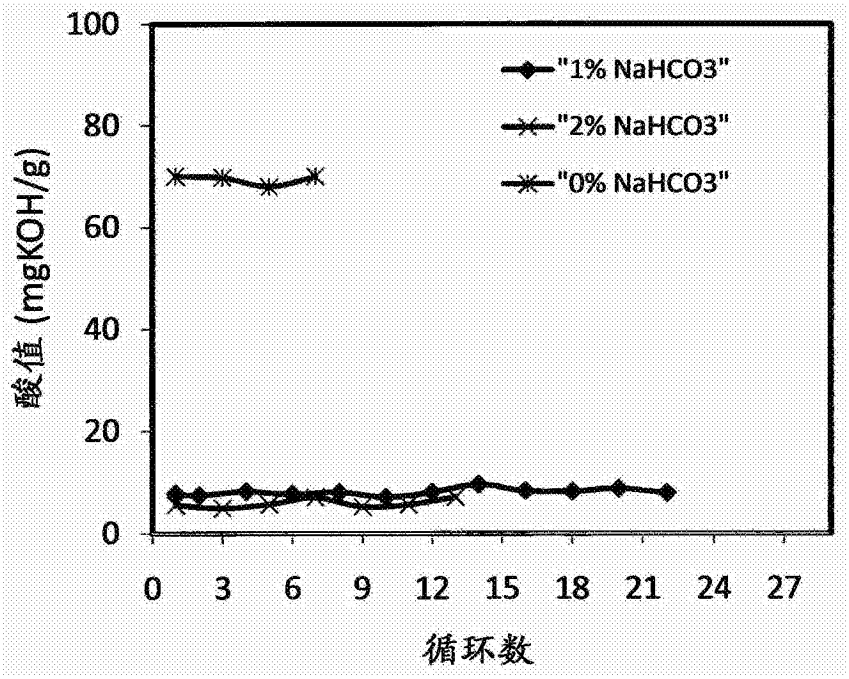
100
80
60
40
20
0
酸值 (mgKOH/g)
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
循环数
"1% NaHCO3"
"2% NaHCO3"
"0% NaHCO3"

图6

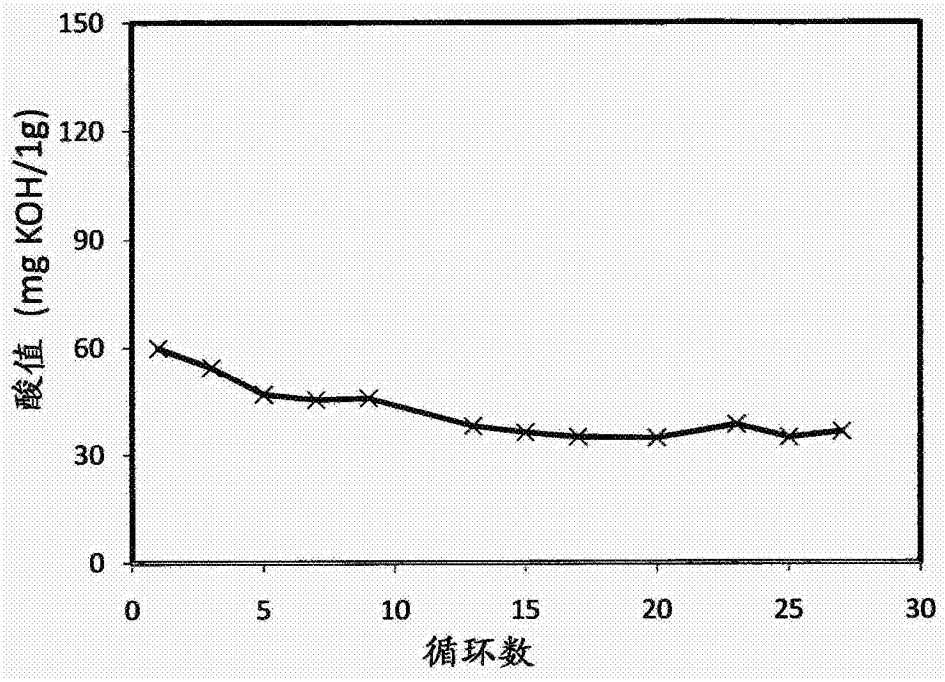
150
120
90
60
30
0
酸值 (mg KOH/1g)
0
5
10
15
20
25
30
循环数

图7

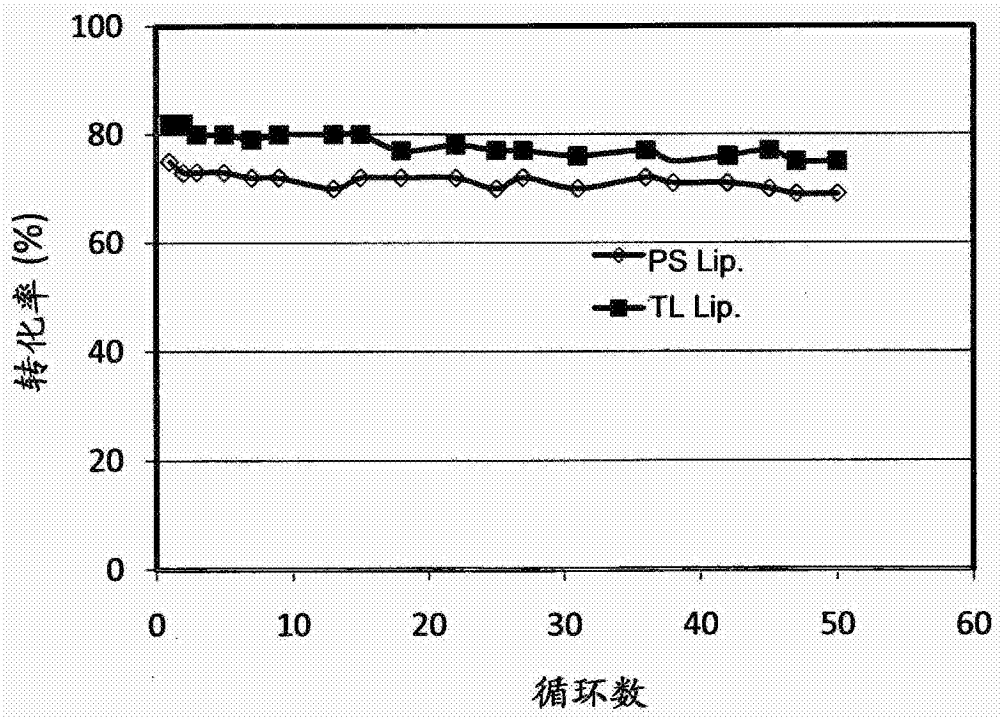
100
80
60
40
20
0
转化率 (%)
PS Lip.
TL Lip.
0
10
20
30
40
50
60
循环数

图8

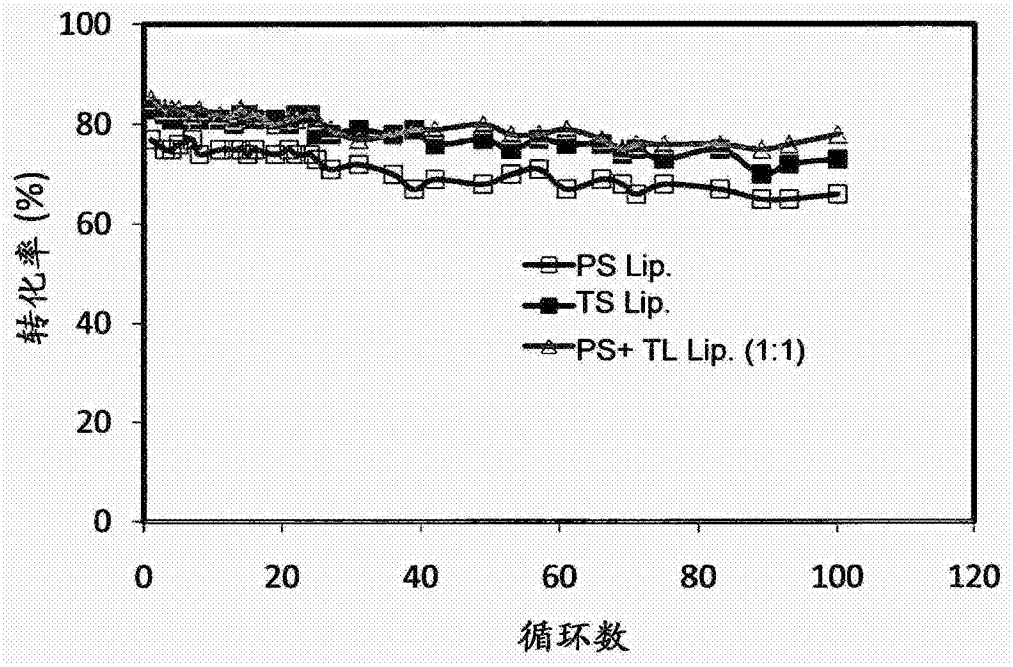
100
80
60
40
20
0
转化率 (%)
PS Lip.
TS Lip.
PS+ TL Lip. (1:1)
0
20
40
60
80
100
120
循环数

图9

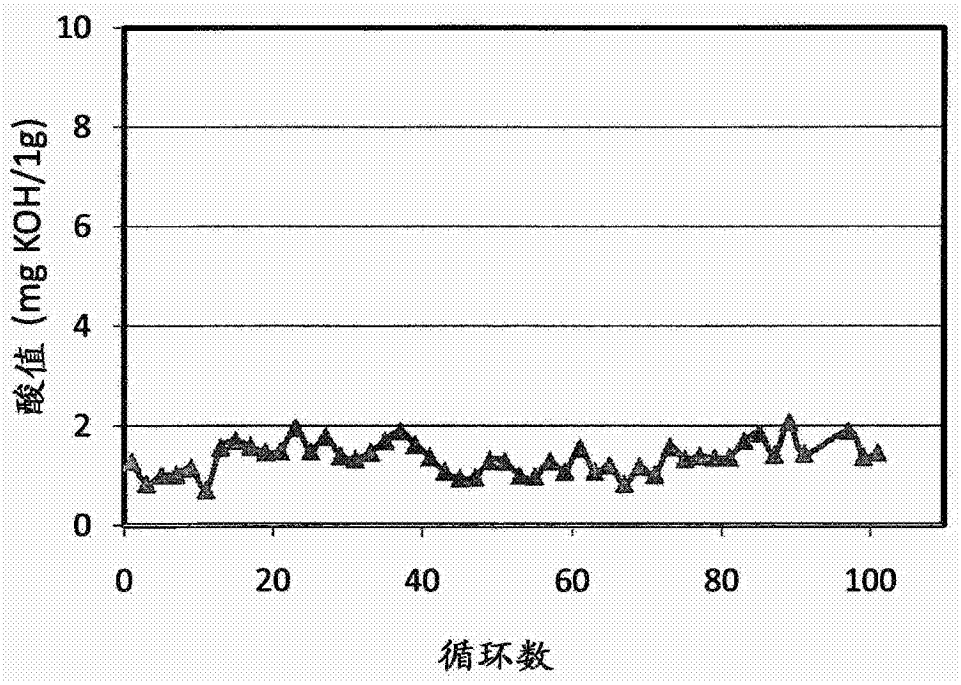
10
8
6
4
2
0
酸值 (mg KOH/1g)
0
20
40
60
80
100
循环数

图10

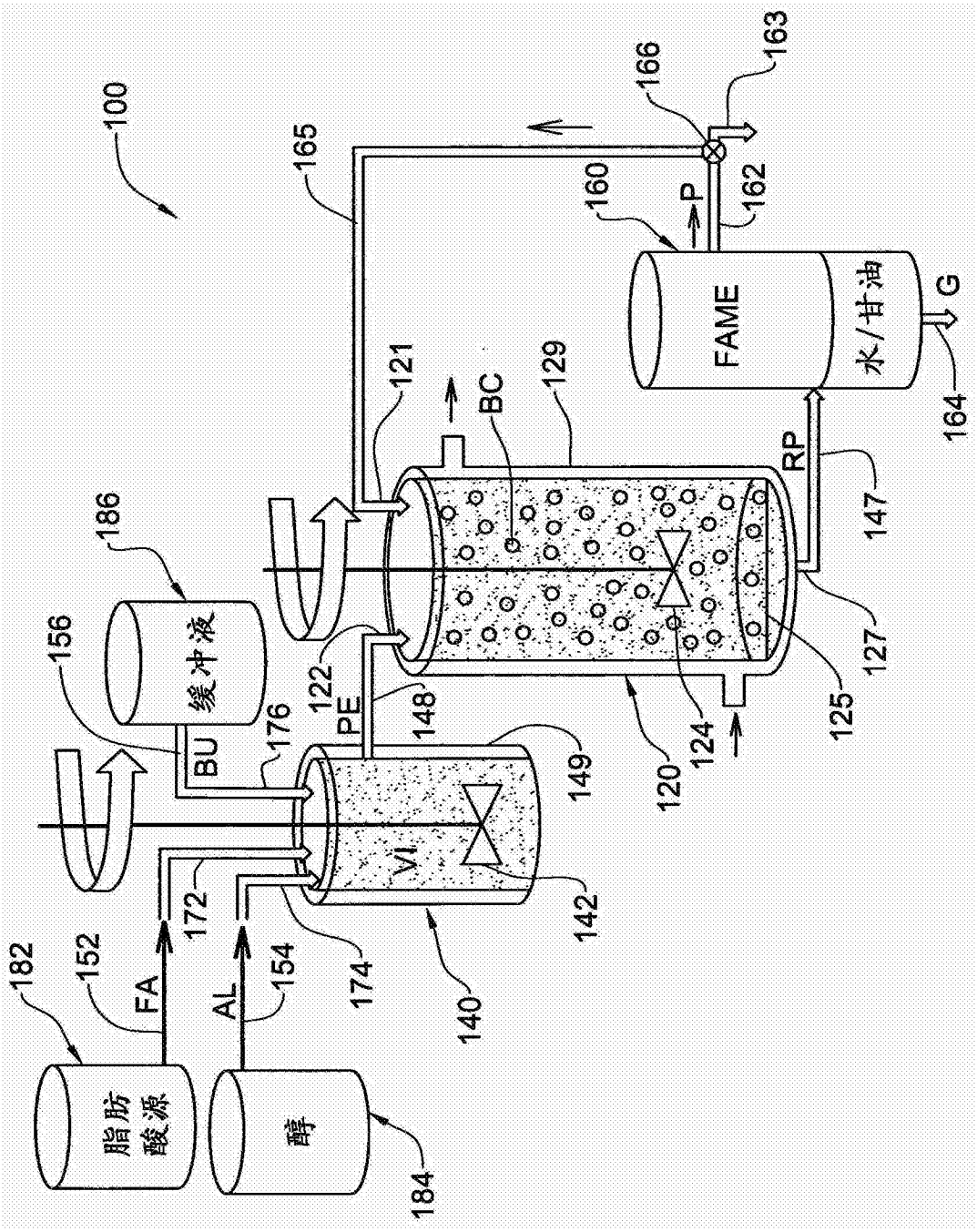
100
165
166
163
160
P
162
FAME
水/甘油
G
164
121
BC
129
RP
147
127
125
124
120
122
PE
148
149
186
缓冲液
156
BU
176
VI
142
140
174
172
154
AL
152
FA
182
脂肪酸源
醇
184

图11

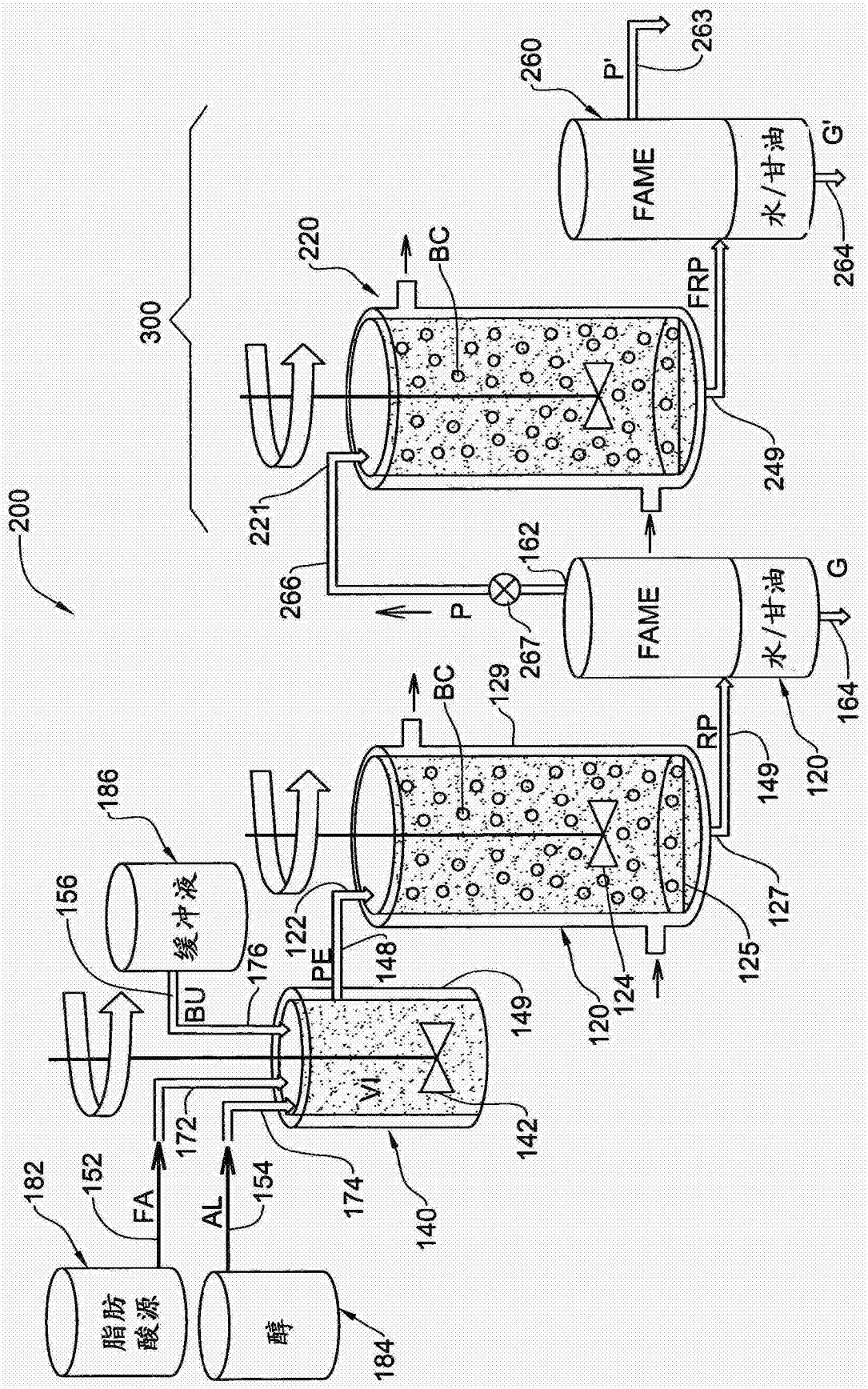
200
300
脂肪酸源
醇
FA
AL
VI
缓冲液
BU
PE
BC
RP
FRP
FAME
水/甘油
P
P'
G
G'
182
152
154
172
174
140
142
149
156
176
186
122
148
124
125
127
129
120
164
162
267
266
221
220
249
260
263
264
184

图12