(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 101932717 B
(45)授权公告日 2013.08.14

(21)申请号 200880124934.9
(22)申请日 2008.11.13
(30)优先权数据
11/946,121 2007.11.28 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.07.16
(86)PCT申请的申请数据
PCT/IL2008/001497 2008.11.13
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/069116 EN 2009.06.04
(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 苏卜希·巴舍尔 迈萨·哈吉 穆哈姆德·凯亚尔
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 庞东成
(51)Int.Cl.
C12P 7/64(2006.01)
(56)对比文件
CN 101020836 A,2007.08.22, 全文.
CN 1752213 A,2006.03.29, 全文.
WO 2008084470 A2,2008.07.17, 全文.
蔡志强等. 固定化脂酶催化合成生物柴油的研究.《中国油脂》.2004, 第29卷(第8期),29-32.
Srivathsan Vembanur Ranganathan 等.An overview of enzymatic production of biodiesel.《Bioresource Technology》.2007, 第99卷3975-3981.
陈新等. 生物酶法制备生物柴油研究现状及展望.《现代化工》.2007, 第27卷(第8期),23-29.
Lee Jong Ho 等.Optimization of the Process for Biodiesel Production Using a Mixture of Immobilized Rhizopus oryzae and Candida rugosa Lipases.《J. Microbiol. Biotechnol.》.2008, 第18卷(第12期),1927-1931.
审查员 马振莲

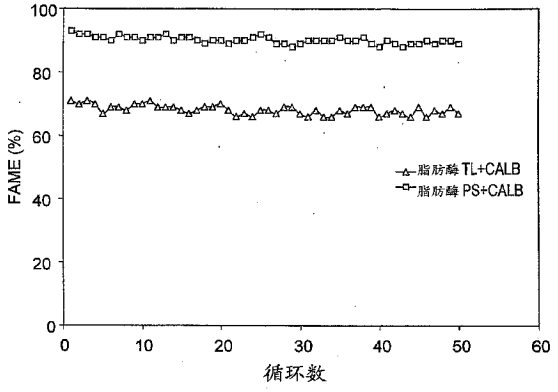
权利要求书5页 说明书18页 附图3页

(54)发明名称

用于脂肪酸烷基酯合成的强力多酶制剂

(57)摘要

本发明公开了一种使用强力脂肪酶制剂在无溶剂微水体系中由脂肪酸原料与醇或醇供体制备脂肪酸烷基酯、特别是脂肪酸甲酯(生物柴油)的酶促方法,所述脂肪酶制剂包含单独或一起固定在适当载体上的至少两种脂肪酶,其中,所述脂肪酶中的一种对于偏甘油酯具有较高的亲和性,另一种具有sn-1,3位特异性,可选的第三脂肪酶对于脂肪酸原料的甘油骨架的sn-2位具有高选择性。



CN 101932717 B

1. 一种在无溶剂微水体系中制备脂肪酸烷基酯的方法，所述方法包括：

提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离醇或醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸烷基酯，其中，所述脂肪酶制剂包含至少两种脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在载体上，所述载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种，并且，所述脂肪酶中的至少一种对于偏甘油酯具有较高亲和性，且所述脂肪酶中的至少一种具有 sn-1,3 位特异性，其中，具有 sn-1,3 位特异性的所述脂肪酶选自由疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、根霉 (Rhizopus sp.)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、娄地青霉菌 (Penicillium roqueforti)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、无色杆菌 (Acromobacter sp.) 和伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.) 组成的组，并且对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶选自由南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)、南极假丝酵母 A(Candida antarctica A)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 和卡门柏青霉 (Penicillium camembertii) 组成的组。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述脂肪酶制剂包含对于甘油骨架的 sn-2 位具有高选择性的第三脂肪酶。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述脂肪酸烷基酯是脂肪酸短链烷基酯。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中，所述脂肪酸短链烷基酯是脂肪酸甲酯。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其中，对于 sn-2 位具有高选择性的所述第三脂肪酶源于南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 或 Pseudozyma sp.。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述脂肪酸原料包含豆油、芥花籽油、油菜籽油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、葵花籽油、花生油、棉花籽油、麻疯果油、动物性脂肪、废烹调油或源于不可食用植物原料的油类甘油三酯中的至少一种或者其中至少两种的任意混合物。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述脂肪酶一起固定在所述载体上。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述脂肪酶中的每一种都固定在一种所述载体上，并且，所述脂肪酶所固定于其上的载体是相同的或不同的。

9. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述载体为多孔载体。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述载体含有选自环氧基和醛基的活性官能团，或者离子基。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，于反应过程中的各个时间点，监控所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸烷基酯的转化率，于反应过程中的任何所希望的时间点通过适当手段除去反应介质，由此使反应停止，并将所形成的脂肪酸烷基酯和所形成的甘油从反应介质中分离出来。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中，当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸烷基酯的转化率达到至少 70％时，停止反应。

13. 一种在无溶剂微水体系中制备脂肪酸甲酯的方法，所述方法包括：

提供脂肪酸原料甘油三酯，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入甲醇，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％，其中，所述脂肪酶制剂包含固定在载体上的单独一种脂肪酶，或者一

起或单独地固定在载体上的至少两种脂肪酶的混合物，其中，所述载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述脂肪酶制剂包含至少两种脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在所述载体上。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述脂肪酶制剂包含单独或一起固定在所述载体上的第三脂肪酶。

16. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述脂肪酶中的至少一种对于偏甘油酯具有较高亲和性，并且所述脂肪酶中的至少一种具有 sn-1,3 位特异性。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其中，所述第三脂肪酶与任选脂肪酶相比对于 sn-2 位具有较高的选择性。

18. 如权利要求 13 所述的方法，其中，具有 sn-1,3 位特异性的所述脂肪酶选自由疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、根霉 (Rhizopus sp.)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、娄地青霉菌 (Penicillium roqueforti)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、无色杆菌 (Acromobacter sp.) 和伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.) 组成的组，并且对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶选自由南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 和卡门柏青霉 (Penicillium camembertii) 组成的组。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其中，与任选脂肪酶相比对于 sn-2 位具有较高的选择性的所述第三脂肪酶源于南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 或 Pseudozyma sp.。

20. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述脂肪酸原料包含豆油、芥花籽油、油菜籽油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、葵花籽油、花生油、棉花籽油、麻疯果油、动物性脂肪、废烹调油或源于不可食用植物原料的油类甘油三酯中的至少一种或者其中至少两种的任意混合物。

21. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述脂肪酶一起固定在所述载体上。

22. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述脂肪酶中的每一种都固定在各个所述载体上，并且，所述脂肪酶所固定于其上的载体是相同的或不同的。

23. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述载体为多孔载体。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中，所述多孔载体含有选自环氧基和醛基的活性官能团，或者离子基。

25. 如权利要求 13 所述的方法，其中，于反应过程中的各个时间点，监控所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基向脂肪酸甲酯的转化率，于反应过程中的任何所希望的时间点通过适当手段除去反应介质，由此使反应停止，并将所形成的脂肪酸甲酯和所形成的甘油从反应介质中分离出来。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中，当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 85％时，停止反应。

27. 一种制备脂肪酸甲酯的无溶剂微水方法，所述方法包括：

(a) 提供脂肪酸原料甘油三酯，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入甲醇或任何其他甲醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％，同时从反应混合物中连续除去所形成的甘油，以获得主要含有残留的未反应甘油酯和所形成的脂肪酸甲酯的有机相，其中，所述脂肪

酶制剂包含固定在载体上的至少一种脂肪酶，或者一起或单独地固定在载体上的至少两种脂肪酶的混合物，其中各个所述载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种；和

(b) 在如步骤 (a) 中所定义的脂肪酶制剂存在下，使所述有机相与甲醇或任何其他甲醇供体在适当条件下反应，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 95％。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述脂肪酶制剂包含一起或单独地固定在所述载体上的三种脂肪酶。

29. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述脂肪酶中的至少一种对于偏甘油酯具有较高亲和性，并且所述脂肪酶中的至少一种具有 sn-1,3 位特异性，并且第三脂肪酶对于 sn-2 位具有高选择性。

30. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述脂肪酶一起固定在所述载体上。

31. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述至少一种脂肪酶中的每一种都单独地固定在一种所述载体上，并且，所述脂肪酶所固定于其上的载体是相同的或不同的。

32. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述载体为多孔载体，其中所述载体含有选自环氧基和醛基的活性官能团，或者离子基。

33. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述脂肪酶选自由南极假丝酵母 (Candida antarctica)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、雪白根霉 (Rhizopus niveus)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、米根霉 (Rhizopus oryzae)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、卡门柏青霉 (Penicillium camembertii)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.)、伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.)、Pseudozyma sp. 和疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa) 组成的组。

34. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其中，所述脂肪酸原料包含豆油、芥花籽油、油菜籽油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、葵花籽油、花生油、棉花籽油、麻疯果油、动物性脂肪、废烹调油或源于不可食用植物原料的油类甘油三酯中的至少一种或者其中至少两种的任意混合物。

35. 如权利要求 29 所述的方法，其中，具有 sn-1,3 位特异性的所述脂肪酶选自由疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、根霉 (Rhizopus sp.)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、娄地青霉菌 (Penicillium roqueforti)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、无色杆菌 (Acromobacter sp.) 和伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.) 组成的组，并且对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶对于甘油三酯具有低酯交换活性或无酯交换活性，且选自由南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 和卡门柏青霉 (Penicillium camembertii) 组成的组，并且对于 sn-2 位具有高选择性的所述第三脂肪酶选自由南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 和 Pseudozyma sp. 组成的组。

36. 一种当用于权利要求 1 ～ 12 中任一项所述的方法时固定在不溶性载体上的脂肪酶混合物的制备方法，所述混合物包含源于南极假丝酵母 B(Candida antarctica B) 的脂肪酶和源于假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.)、伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.) 和疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa) 的至少一种脂肪酶，

所述制备方法包括以下步骤：

(a) 将含有源于南极假丝酵母 B(Candida antarctica B) 的脂肪酶和源于假单胞菌(Pseudomonas sp.)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.)、伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.) 和疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa) 的至少一种脂肪酶的缓冲液与聚合物载体接触，所述聚合物载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种，在疏水性有机溶剂存在下进行所述接触，所述有机溶剂以缓冲液：有机溶剂分别为 1 ： 10 ～ 10 ： 1 的比例加入到固定化介质中；

(b) 在室温将步骤 (a) 中获得的体系混合至少 4 小时；

(c) 滤出固定化脂肪酶混合物，并将其干燥至水含量少于 5%。

37. 如权利要求 36 所述的方法，其中，所述不溶性载体为多孔的网状疏水性脂肪族或芳香族聚合物类载体。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中，所述载体是 XAD 16、XAD 1600、XAD 7HP、XAD 16HP、XAD 1180、Amberlite FPA53、Amberlite FPC22H、Amberlite FPA40Cl、Amberlite IRC50， 选 自 A7、A561、A568 和 Duolite C467 的 Duolite，Amberlyst A-21，Dowex Monosphere77，Dowex Optipore L493，Dow Styrene DVB，MTO Dowex Optipore SD-2，Dowex MAC-3，Purolire A109，和选自 EC-EA、EC-EP、EC-BU 和 EC-OD 的 Sepabeads。

39. 一种固定化脂肪酶混合物，所述脂肪酶混合物在用于权利要求 1 ～ 12 中任一项所述的制备脂肪酸烷基酯的方法时通过权利要求 36 所述的方法制得。

40. 一种制备生物柴油的方法，所述方法使用通过权利要求 37 所述的方法制备的固定化脂肪酶混合物。

41. 如权利要求 3 所述的方法，其中，所述脂肪酸短链烷基酯为脂肪酸甲酯、乙酯、异丙酯或丁酯。

42. 如权利要求 1 所述的方法，所述脂肪酸烷基酯为脂肪酸己酯、正辛酯、正癸酯、正十二烷基酯、正十四烷基酯、正十六烷基酯或正十八烷基酯。

43. 如权利要求 12 所述的方法，其中，当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸烷基酯的转化率达到至少 75%时，停止反应。

44. 如权利要求 36 所述的方法，其中，所述溶剂为正己烷。

45. 如权利要求 12 所述的方法，其中，当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸烷基酯的转化率达到至少 95%时，停止反应。

46. 一种在无溶剂体系中制备脂肪酸短链烷基酯的方法，所述方法包括：

提供脂肪酸原料甘油三酯，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离短链醇或短链醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸短链烷基酯，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在疏水性载体上，所述疏水性载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种，并且，所述第一脂肪酶表现出比其对于偏甘油酯的活性更高的对于甘油三酯的酯交换活性，并且所述第二脂肪酶表现出比其对于甘油三酯的活性更高的对于偏甘油酯的酯交换活性，并且，所述两种脂肪酶在其酯交换活性方面显示出协同效应，从而获得最终产物。

47. 一种在无溶剂体系中制备脂肪酸短链烷基酯的方法，所述方法包括：

提供脂肪酸原料甘油三酯，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离短链醇或任何其他短链醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸短链烷基酯，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在疏水性载体上，所述疏水性载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种，并且，所述第一脂肪酶在第一酯交换反应聚合物类载体中释放中间体，所述中间体是甘油单酯和甘油二酯中的至少一种，所述中间体为所述第二脂肪酶所偏爱从而与醇酯交换以形成脂肪酸烷基酯。

48. 一种在无溶剂体系中制备脂肪酸短链烷基酯的方法，所述方法包括：

提供脂肪酸原料甘油三酯，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离短链醇或任何其他短链醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸短链烷基酯，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在疏水性载体上，所述疏水性载体是疏水性脂肪族聚合物类载体和疏水性芳香族聚合物类载体中的任意一种，并且，所述脂肪酶表现出不同的底物特异性，即，当一起使用时会保持它们对于甘油三酯的酯交换活性，而在以甘油三酯为底物单独使用时，所述两种脂肪酶中的至少一种在酯交换反应介质中衰减，但分别以偏甘油酯和脂肪酸作为底物时，表现出高酯交换 / 酯化活性。

49. 如权利要求 46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述脂肪酸短链烷基酯为甲酯、乙酯、异丙酯和丁酯。

50. 如权利要求 46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述载体为 Amberlite XAD 1600。

51. 如权利要求 46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述脂肪酸原料为甘油三酯、偏甘油酯、磷脂、脂肪酸的酯和酰胺中的至少一种，或者为由至少两种所述原料构成的混合物。

52. 如权利要求 46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述醇为甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和短链醇供体中的至少一种，或者其中至少两种的任意混合物。

53. 如权利要求 46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述载体为下述聚合物制载体：由二乙烯基苯或二乙烯基苯和苯乙烯的混合物构成的网状疏水性聚合物，以及由脂肪族丙烯酸类聚合物构成的网状疏水性脂肪族聚合物。

54. 如权利要求 1、37、46、47 和 48 中的任一项所述的方法，其中，所述载体是孔径为 25 Å～1000 Å的多孔基体。

55. 如权利要求 1、13、27 和 46 ～ 48 中的任一项所述的方法，其中，具有 sn-1,3 位特异性的所述脂肪酶源于假单胞菌 (Pseudomonas sp.) 和疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose) 中的任意一种，对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶源于南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)。

56. 如权利要求 55 所述的方法，其中，对于甘油骨架的 sn-2 位具有高选择性的所述脂肪酶是南极假丝酵母 A(Candida antarctica A)。

57. 如权利要求 55 所述的方法，其中，所述载体为 Amberlite XAD 1600。

用于脂肪酸烷基酯合成的强力多酶制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及固定化多酶体系的制备，所述固定化多酶体系用于油脂类甘油三酯或脂肪酸与短链醇的酯交换或酯化，以获得优选用作生物柴油的脂肪酸短链烷基酯。本发明还涉及所述固定化多酶体系的制备方法，及其在一步或多步法中的各种工业应用，特别是以接近完全转化用于通常用作生物柴油的甲基酯的生产中。

背景技术

[0002] 脂肪酶（甘油三酯水解酶 E.C.3.1.1.3）被定义为在水性体系中作用于甘油三酯的酯键以产生游离脂肪酸、偏甘油酯和甘油的水解酶。此类酶在低水活性下能够催化其逆水解反应。脂肪酶的逆向催化活性已经被广泛用于含酯键和酰胺键的有价值的化合物或含有如羟基、羧基和氨基等官能团的其他相关化学物质的合成。具体而言，脂肪酶已经被用于重整脂肪、油、蜡、磷脂和鞘脂以获得新的期望的功能性质，还用于将光学活性的化合物从它们的外消旋混合物中分离出来。特别有意义的是，将公开由固定在聚合物载体上的不同脂肪酶构成的多酶体系用于脂肪酸短链烷基酯（生物柴油）合成的应用。

[0003] 目前，市售的不同脂肪酶和磷脂酶有超过 40 种之多，然而其中仅有少数是以商业化量制备的。一些最有工业前景的界面酶源于南极假丝酵母 (Candida antarctica)、皱褶假丝酵母 (Candida rugosa)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、雪白根霉 (Rhizopus niveus)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、米根霉 (Rhizopus oryzae)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、卡门柏青霉 (Penicillium camembertii)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.)、伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.)、疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa)、粘稠色杆菌 (Chromobacterium viscosum)、木瓜籽和胰酶。

[0004] 最常见的酶固定化技术通常根据如下条件划分：

[0005] 1. 酶在如二氧化硅和不溶性聚合物等固体载体上的物理吸附。

[0006] 2. 酶在离子交换树脂上的吸附。

[0007] 3. 酶与如环氧化无机载体或环氧化聚合物载体等固体载体材料的共价结合。

[0008] 4. 酶在生长聚合物内的包埋。

[0009] 5. 酶在膜反应器或半渗透性凝胶中的约束。

[0010] 6. 交联酶晶体 (CLEC) 或聚集体 (CLEA)。

[0011] 基于使用高孔隙率聚合物载体或使用离子交换树脂的脂肪酶的物理吸附是对于脂肪酶而言最常用的固定化方法。该方法的特征在于其简易性并且可获得可靠的合成活性。

[0012] 将游离或固定化脂肪酶用于甘油三酯与短链醇的酯交换从而形成脂肪酸烷基酯在酶的活性和稳定性方面已取得满意的结果。此外，对于用于以工业量进行脂肪酸烷基酯的酶促生产，固定化酶的成本效益仍然受阻。此外，还曾报道过，所有目前可用的脂肪酶，无论其为游离形式还是固定化形式，以合理的反应时间、优选 8 小时以下，对于甘油三酯向脂肪酸烷基酯的转化，都不能达到接近完全的、优选高于 99％的转化率。

[0013] 脂肪酶的另一主要缺点源于其对亲水性底物的低耐受性，特别是对于存在于酯交换反应介质中的短链醇、短链脂肪酸（都为C4以下）、水和甘油的低耐受性。在许多研究中已经观察到，如甲醇和乙酸等短链醇和短链脂肪酸分别可造成使必需的水分子从这些酶的四级结构中脱离出来，导致这些酶变性并因而丧失催化活性。此外，这些亲水性分子在反应介质中的存在导致酶分子从载体中脱离出来，并因而缩短了酶的工作寿命。因此，将脂肪酶用于使用油类甘油三酯和甲醇作为底物以商业量生产脂肪酸甲酯“生物柴油”是不可行的，这并不令人惊讶。

[0014] 已经有人提出过使用脂肪酶的混合物[Lee, D.H. 等, Biotechnology and Bioprocess Engineering 2006,11:522-525]。该文献描述了使用化学结合的固定化米根霉和皱褶假丝酵母脂肪酶的混合物来生产生物柴油。由该文献可以看出，为使生成生物柴油的转化率超过96%，需要的反应时间比较长，通常多于24小时。此外，该文献中所提供的结果显示，在短短10个使用循环之后，所使用的酶混合物丧失了其初始活性的20%以上。这可归因于，偏甘油酯中间体在反应体系中的聚集，其使酯交换反应减慢，因而延长了反应时间。该文献中所描述的该体系中生物催化剂的失活是一个重大缺陷，该缺陷阻止了其工业应用。

[0015] 因此，本发明的一个目的是提供获得高活性的稳定的固定化脂肪酶的新方法，所述脂肪酶特别适用于脂肪酸烷基酯、特别是用作“生物柴油”的脂肪酸甲酯的合成。

[0016] 本发明的另一个目的在于，提供高活性的稳定的固定化多酶制剂，所述多酶制剂对于短链醇和短链脂肪酸（特别是甲醇、乙醇和乙酸）和如甘油等其他多元醇，以及通常存在于油脂中（特别是不可食用级的）的其他抑制因素具有高耐受性。

[0017] 本发明的另一个目的在于，提供一步或多步酶反应器结构，从而在合理反应时间内（通常5小时以下）以接近完全转化来获得所希望的产物，即脂肪酸烷基酯。

[0018] 随着说明的展开，本发明的这些和其他目的将变得显而易见。

发明内容

[0019] 在第一个方面中，本发明涉及在无溶剂微水体系中制备脂肪酸烷基酯、优选如脂肪酸甲酯（生物柴油）等脂肪酸短链烷基酯的方法，所述方法包括：提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下向所述脂肪酸原料中逐步加入游离醇、优选短链游离醇，特别是甲醇，或任何其他醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸甲酯(FAME)，其中，所述脂肪酶制剂包含至少两种脂肪酶、优选三种脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，并且，所述脂肪酶中的至少一种对于偏甘油酯具有较高的亲和性，所述脂肪酶中的至少一种具有sn-1,3位特异性，且可选的第三脂肪酶对于甘油骨架的sn-2位具有高选择性。

[0020] 具有sn-1,3位特异性的脂肪酶可选自由疏绵状嗜热丝孢菌(Thermomyces lanuginose)、米黑根毛霉(Rhizomucor miehei)、米黑毛霉(Mucor miehei)、假单胞菌(Pseudomonas sp.)、根霉(Rhizopus sp.)、爪哇毛霉(Mucor javanicus)、娄地青霉菌(Penicillium roqueforti)、黑曲霉(Aspergillus niger)、无色杆菌(Acromobacter sp.)和伯克霍尔德氏菌(Burkholderia sp.)组成的组，但不限于此。对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶可以选自由南极假丝酵母B(Candida antarctica B)、南极假丝酵

母 A(Candida antarctica A)、皱褶假丝酵母 (Candida rugosa)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 和卡门柏青霉 (Penicillium camembertii) 组成的组，但不限于此。第三脂肪酶可以具体是源于南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 或 Pseudozyma sp. 的对于 sn-2 位具有高选择性的脂肪酶。

[0021] 用在本发明的方法中的脂肪酸原料可以包含豆油、芥花籽油、油菜籽油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、葵花籽油、花生油、棉花籽油、麻疯果油、动物性脂肪、废烹调油或源于不可食用植物原料的油类甘油三酯中的至少一种或者其中至少两种的任意混合物。

[0022] 脂肪酶可以一起固定在适当载体、优选疏水性脂肪族聚合物类载体或疏水性芳香族聚合物载体上。所述脂肪酶中的每一种均可固定在适当载体上，其中，所述脂肪酶固定于其上的所述载体可以相同，也可以不同。

[0023] 载体优选为有机或无机的多孔载体。载体的实例为：多孔无机载体，例如但不限于二氧化硅类和氧化铝类载体；有机载体，例如但不限于聚合物载体或聚合物类载体，并且载体可以可选地含有选自环氧基和醛基的活性官能团或离子基。

[0024] 在本发明的此方面的方法中，在反应过程中，可于各个时间点监控所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率，在反应过程中的任何所希望的时间点都可以通过适当手段除去反应介质，由此使反应停止，并将所形成的脂肪酸甲酯和可选的所形成的甘油从反应介质中分离出来。当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％、优选至少 85％、更优选至少 95％时，可以明确地停止该反应。

[0025] 在另一个方面中，本发明涉及在无溶剂微水体系中制备脂肪酸短链烷基酯、优选脂肪酸甲酯（生物柴油）的方法，所述方法包括：提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下向所述脂肪酸原料中逐步加入短链游离醇、优选甲醇，或任何其他醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％，同时连续地从反应混合物中除去所形成的甘油和任何多余的水，其中，所述脂肪酶制剂包含固定在适当载体上的单独一种脂肪酶，或一起或单独地固定在适当载体上的至少两种脂肪酶的混合物。

[0026] 此外，在此方面的该方法中，所述脂肪酶制剂可包含至少两种脂肪酶、优选三种脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上。所述脂肪酶中的至少一种对于偏甘油酯具有较高的亲和性，并且所述脂肪酶中的至少一种具有 sn-1,3 位特异性。可选的第三脂肪酶与任选的脂肪酶相比优选对于 sn-2 位具有较高的选择性。

[0027] 具有 sn-1,3 位特异性的脂肪酶可以是但不限于下述脂肪酶中的任一种：疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、根霉 (Rhizopus sp.)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、娄地青霉菌 (Penicillium roqueforti)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、无色杆菌 (Acromobacter sp.) 和伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.)。对于偏甘油酯具有较高亲和性的所述脂肪酶可以是但不限于下述脂肪酶中的任一种：南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)、皱褶假丝酵母 (Candida rugosa)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 和卡门柏青霉 (Penicillium camembertii)，并且与任选脂肪酶相比对于 sn-2 位具有较高选择性的所述可选的第三脂肪酶可以是但不限于源于南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 和

Pseudozyma sp. 的脂肪酶。

[0028] 此外，在该方法中，脂肪酸原料可以包含豆油、芥花籽油、油菜籽油、橄榄油、蓖麻油、棕榈油、葵花籽油、花生油、棉花籽油、麻疯果油、动物性脂肪、废烹调油或源于不可食用植物原料的油类甘油三酯中的至少一种或者其中至少两种的任意混合物。

[0029] 脂肪酶可以一起固定在适当载体、优选疏水性脂肪族聚合物类载体或疏水性芳香族聚合物载体上。所述脂肪酶中的每一种均可固定在适当载体上，其中，所述脂肪酶固定于其上的所述载体可以相同，也可以不同。

[0030] 载体优选为有机或无机的多孔载体。载体的实例为：多孔无机载体，例如但不限于二氧化硅类和氧化铝类载体；有机载体，例如但不限于聚合物载体或聚合物类载体，并且载体可以可选地含有选自环氧基和醛基的活性官能团或离子基。

[0031] 此外，在本发明的此方面的方法中，在反应过程中，可于各个时间点监控所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率，在反应过程中的任何所希望的时间点都可以通过适当手段除去反应介质，由此使反应停止，并将所形成的脂肪酸甲酯和可选的所形成的甘油从反应介质中分离出来。当所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％、优选至少 85％、更优选至少 95％时，可以明确地停止该反应。

[0032] 在另一个方面中，本发明涉及制备脂肪酸烷基酯、优选如甲酯（生物柴油）等脂肪酸短链烷基酯的无溶剂微水方法，所述方法包括：(a) 提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下向所述脂肪酸原料中逐步加入短链醇、优选甲醇，或任何其他醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 70％，同时连续地从反应混合物中除去所形成的甘油，从而获得主要含有残留的未反应的甘油酯和所形成的脂肪酸烷基酯的有机相，其中，所述脂肪酶制剂包含固定在适当载体上的至少一种脂肪酶，或一起或单独地固定在适当载体上的至少两种脂肪酶的混合物、优选三种脂肪酶；和 (b) 在如步骤 (a) 中所定义的脂肪酶制剂存在下，将所述有机相与短链游离醇、优选甲醇，或任何其他醇供体在适当条件下反应，直至所述脂肪酸原料中所包含的脂肪酸酰基或游离脂肪酸向脂肪酸甲酯的转化率达到至少 95％。

[0033] 在此方面的方法中，脂肪酶、脂肪酶制剂、酶载体、脂肪酸原料都类似于其他方面中所使用的那些物质。

[0034] 此外，本发明涉及制备固定在不溶性载体上的脂肪酶混合物的方法，所述混合物包含源于南极假丝酵母B(Candida antarctica B)的脂肪酶和源于假单胞菌(Pseudomonas sp.)、产碱杆菌(Alcaligenes sp.)、伯克霍尔德氏菌(Burkholderia sp.)和疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa) 的至少一种脂肪酶，所述方法包括以下步骤：(a) 将含有上述脂肪酶之一的缓冲液和含有第二脂肪酶的另一种缓冲液，或含有上述脂肪酶的混合物的一种缓冲液与聚合物载体、优选离子交换树脂或吸附剂、更特别的是疏水性脂肪族或芳香族聚合物类载体接触；优选在如正己烷等疏水性有机溶剂存在下进行，所述有机溶剂以缓冲液：有机溶剂分别为 1 ： 10 ～ 10 ： 1 的比例加入到固定化介质中；(b) 在室温将步骤 (a) 中获得的体系混合至少 4 小时；(c) 滤出固定化脂肪酶混合物，并将其干燥至水含量小于 5％。

[0035] 本发明的此方面中所使用的不溶性载体优选为多孔的网状疏水性脂肪族或芳香

族聚合物类载体，特别是分别为 Amberlite XAD 7HP 或 Amberlite XAD 1600。

[0036] 本发明还涉及通过利用本发明的方法制备的固定化脂肪酶混合物的方法而制备的生物柴油。

[0037] 在本发明的所有方面中，所述脂肪酸短链烷基酯优选为脂肪酸甲酯、乙酯、异丙酯或丁酯（生物柴油）。

[0038] 在另一个方面中，本发明涉及在无溶剂体系中制备脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸短链烷基酯、特别是脂肪酸甲酯的方法，所述方法包括：提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离醇、优选短链游离醇、特别是甲醇或高级醇，或任何其他醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸烷基酯、优选短链烷基酯、特别是脂肪酸甲酯 (FAME)，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，并且，所述第一脂肪酶表现出比其对于偏甘油酯的活性更高的对于甘油三酯的酯交换活性，并且所述第二脂肪酶表现出比其对于甘油三酯的活性更高的对于偏甘油酯的酯交换活性，并且，所述两种脂肪酶在其酯交换活性方面显示出协同效应，从而获得最终产物。

[0039] 在另一个方面中，本发明涉及在无溶剂体系中制备脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸短链烷基酯、特别是脂肪酸甲酯的方法，所述方法包括：提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离醇、特别是短链游离醇、优选甲醇或高级醇，或任何其他醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸短链烷基酯、特别是甲酯 (FAME)，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，并且，所述第一脂肪酶在第一酯交换反应中释放中间体，所述中间体为所述第二脂肪酶所偏爱从而与醇酯交换以形成脂肪酸烷基酯。

[0040] 本发明还涉及在微水无溶剂体系中制备脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸短链烷基酯、特别是脂肪酸甲酯的方法，所述方法包括：提供脂肪酸原料，在脂肪酶制剂存在下，向所述脂肪酸原料中逐步加入游离醇、优选短链游离醇、特别是甲醇或高级醇，或任何其他游离醇或醇供体，并使反应在适当条件下进行，直至所述脂肪酸原料甘油三酯转化为脂肪酸烷基酯、优选脂肪酸短链烷基酯、特别是甲酯 (FAME)，其中，所述脂肪酶制剂包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，并且，所述脂肪酶表现出不同的底物特异性，即，当一起使用时会保持它们对于甘油三酯的酯交换活性，而在以甘油三酯为底物单独使用时，所述两种脂肪酶中的至少一种在酯交换反应介质中衰减，但分别以偏甘油酯和脂肪酸作为底物时，表现出高酯交换 / 酯化活性。

[0041] 脂肪酸原料为甘油三酯、偏甘油酯、游离脂肪酸、磷脂、脂肪酸的酯和酰胺中的至少一种，或者为由至少两种所述原料构成的混合物。

[0042] 载体可以是由二乙烯基苯或二乙烯基苯和苯乙烯的混合物构成的网状疏水性聚合物，以及由脂肪族丙烯酸类聚合物构成的网状疏水性脂肪族聚合物。载体优选为多孔基体，孔隙为25 Å～1000 Å，优选为40 Å～100 Å。

[0043] 下面将参照附图更加详细地描述本发明。

附图说明

[0044] 图 1 :各自单独地固定在 Amberlite XAD 7HP 上的 CALB、脂肪酶 PS、脂肪酶 TL 的酯化活性。反应条件 :将油酸 (2.5g) 和甲醇 (3 批,各为 95mg) 与 250mg 固定化脂肪酶在 30℃混合 6 小时。在相同条件下,将同批生物催化剂用于 50 次反应循环。

[0045] 图 2 :全部单独地固定在 Amberlite XAD 7HP 上的 CALB、脂肪酶 PS、脂肪酶 TL 的酯交换活性。反应条件 :将豆油 (2.5g) 和甲醇 (3 批,各为 91mg) 与 250mg 固定化脂肪酶在 30℃混合 6 小时。在相同条件下,将同批生物催化剂用于 50 次反应循环。

[0046] 图 3 :固定在 Amberlite XAD 7HP 上的 CALB 与脂肪酶 TL 或者 CALB 与脂肪酶 PS 的多脂肪酶的酯交换活性。反应条件 :将豆油 (2.5g) 和甲醇 (3 批,各为 91mg) 与 250mg 固定化脂肪酶在 30℃混合 6 小时。在相同条件下,将同批生物催化剂用于 50 次反应循环。

[0047] 图 4 :两阶段酯交换方法中的 FAME%,所述方法使用一起固定在 Amberlite XAD 7HP 上的脂肪酶 PS 和 CALB。反应条件 :通过向位于双夹套玻璃反应器中的豆油 (220g) 和甲醇 (23.9g) 中加入生物催化剂 (30g) 而引发反应,所述反应器底部具有孔隙为 70μm ～ 100μm 的烧结的玻璃过滤器。甲醇被分批加入 (各批为化学计量比量的 1/3) 或者逐滴滴入。在 30℃机械搅拌反应体系 2 小时。从第一阶段取出反应介质,离心分离以除去甘油,然后导入第二阶段反应器中并搅拌 2 小时。

具体实施方式

[0048] 为改善和促进生物柴油的酶促生产,本发明主要针对以下目标 :防止酶失活,或因固定化酶从其所固定的载体上脱离而丧失酶活性,这通常由以下原因所引起 :暴露于作为原材料之一的甲醇,或者暴露于在该过程中所形成的甘油和水。过去曾经用过的固定在吸附剂上的 Novozyme435 脂肪酶 (南极假丝酵母脂肪酶 B) 具有以下特征,即,由于存在上述酶活性的衰减,在短短平均 10 次反应循环后即丧失活性。本发明的一个目的是解决这一问题。

[0049] 此外,为了达到高于 96%的转化率,在利用 Novozyme 435 和其他脂肪酶时,油类与甲醇的酯交换反应时间较长,通常为 24 小时～ 48 小时。提供可显著缩短反应时间的方法和酶制剂也是本发明的目的之一。

[0050] 另外,在该方法中所形成的甘油副产物也会导致酶活性的衰减,因为它保持在生物催化剂颗粒上。甘油在生物催化剂上的附着会引起酶活性的降低,有时甚至可使酶活性完全丧失。本发明的方法和制剂也以解决这一问题为目的。

[0051] 此外,现有技术工作在反应体系中使用了导致偏甘油酯 (包括甘油单酯和甘油二酯) 形成和聚集的脂肪酶。所述酶对于那些底物的低酯交换反应速率造成达到高于 96%的转化率所需的反应时间延长。本发明提供下述酶制剂、体系和方法,所述酶制剂、体系和方法可以促进酶促酯交换过程中所形成的中间体的高速清除,因此可在短反应时间内实现高转化率。

[0052] 更具体而言,本发明提供多酶体系在一步或两步法中的应用,所述应用克服了上述障碍,获得了出人意料的结果,并表现出固定化酶之间的协同效应及避免了酶失活或酶活性丧失,其原因在于脂肪酶 - 脂肪酶和脂肪酶 - 基体的有效结合。

[0053] 本发明人因此开发了高活性的稳定的固定化酶制剂,所述酶制剂对于如短链醇、多元醇和短链脂肪酸等亲水性底物具有高耐受性,可用于改善生产脂肪酸烷基酯、特别是

脂肪酸甲酯“生物柴油”的酶促方法。除在以上发明内容中的上述描述之外，脂肪酶混合物也可以由多于两种的脂肪酶、优选三种脂肪酶的混合物构成，其中第一脂肪酶具有 sn-1,3 位特异性，第二脂肪酶与任选脂肪酶、特别是源于皱褶假丝酵母 (Candida rugosa) 的任选脂肪酶相比对于 sn-2 位具有较高选择性，并且第三脂肪酶对于甘油单酯和甘油二酯具有较高亲和性。

[0054] 需要注意的是，在整个本申请中，当提及位置 sn-1、sn-2 或 sn-3 时，它们是指在各种甘油酯的甘油骨架上的位置。

[0055] 脂肪酶与任选脂肪酶相比对于 sn-2 位具有较高选择性的含义在于，所述酶偏爱催化醇或醇供体与 sn-2 位的脂肪酰基之间的反应，而任选脂肪酶对于甘油骨架上的所有三个位置处的脂肪酰基表现出相同的酯交换活性。

[0056] 如以下实施例中 (例如参见南极假丝酵母 A(Candida Antarctica A(CALA)) 所示，一些酶独一无二地显示出对于 sn-2 位的位置活性，特别是在由底物、产物等所决定的特定条件下。此处所使用的酶在此能力方面显示了突出的 sn-2 位选择性和使 sn-2 偏甘油酯进行酯交换的能力。

[0057] 所开发的生物催化剂由固定在聚合物基体上的不同类型的脂肪酶的混合物构成，所述聚合物基体优选多孔的网状疏水性脂肪族或芳香族聚合物类基体。根据本发明，不同的脂肪酶可以在同一反应釜中或单独固定在相同或不同载体上。可选的是，不同脂肪酶可以单独固定在不同载体上，这取决于酶 - 载体针对生物催化剂的短链醇耐受性、酯化 / 酯交换活性和工作寿命方面的最佳组合。本发明的脂肪酶混合物包含具有 sn-1,3 位特异性的脂肪酶，和任选脂肪酶、特别是对于偏甘油酯具有亲和性的脂肪酶，以及对于 sn-2 位具有高亲和性的可选的第三脂肪酶。

[0058] 具有 sn-1,3 位特异性的脂肪酶可以是但不限于疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose)、米黑根毛霉 (Rhizomucor miehei)、米黑毛霉 (Mucor miehei)、假单胞菌 (Pseudomonas sp.)、根霉 (Rhizopus sp.)、爪哇毛霉 (Mucor javanicus)、娄地青霉菌 (Penicillium roqueforti)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、无色杆菌 (Acromobacter sp.) 或伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.)。具有比任选脂肪酶更高的对于 sn-2 位的特异性的脂肪酶可以是但不限于南极假丝酵母 A(Candida antarctica A) 和源于 Pseudozyma sp. 的脂肪酶。对于偏甘油酯具有较高亲和性的脂肪酶可以是但不限于南极假丝酵母 B(Candida antarctica B)、皱褶假丝酵母 (Candida rugosa)、产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 或卡门柏青霉 (Penicillium camembertii)。预期在本申请范围内的其他脂肪酶可以是雪白根霉 (Rhizopus niveus)、米根霉 (Rhizopus oryzae)、伯克霍尔德氏菌 (Burkholderia sp.)、粘稠色杆菌 (Chromobacterium viscosum)、木瓜籽和胰酶。

[0059] 不同脂肪酶的固定化可以在一锅中进行或单独进行。

[0060] 不溶性载体能够通过物理吸附或通过共价结合到其官能团而结合脂肪酶。此处所用的术语“物理吸附的”或“物理吸附”可分别与“固定化的”和“固定化”同义。术语载体和基体此处可以同义使用。载体优选有机或无机的疏水性多孔载体，优选选自由以下载体组成的组 :多孔无机载体，如二氧化硅类或氧化铝类载体，有机载体，例如但不限于疏水性脂肪族和丙烯酸类网状聚合物，或疏水性芳香族网状聚合物类载体，分别如 Amberlite^{R} XAD 7HP 和 Amberlite^{R} XAD 1600，其中，所述载体可以可选地含有诸如环氧基或醛基等活性官

能团或离子基。适当的载体的具体的非限制性实例为 Amberlite XAD，如 XAD 4、XAD 16、XAD-1600、XAD 7HP、XAD 16HP、XAD 1180、Amberlite FPA53、Amberlite FPC22H、Amberlite FPA40Cl、Amberlite IRC50，Duolite，如 A7、A561、A568 和 Duolite C467，Amberlyst A-21，Dowex Monosphere 77，Dowex OptiporeL493，Dow Styrene DVB，MTO Dowex Optipore SD-2，Dowex MAC-3，Purolire A109 和 Sepabeads，如 EC-EA、EC-EP、EC-BU 和 EC-OD。优选的载体为由以下物质构成的那些载体：由二乙烯基苯或者二乙烯基苯与苯乙烯构成的疏水性网状芳香族聚合物，和由网状脂肪族丙烯酸类聚合物构成的疏水性脂肪族聚合物。

[0061] 在另一个方面中，本发明提供了制备如发明内容中所详细描述的生物柴油的方法。

[0062] 此外，在本发明的制备生物柴油的方法中，可以连续除去从酶载体上自脱附的所有或一些反应产物和 / 或副产物。产物 / 副产物从载有一种或多种酶的载体上的自脱附或自发脱附是本发明的固定化酶体系的独特性质。不受任何具体理论的限制，该特征可能是由于基体的疏水性所致，这是将所形成的亲水性甘油或其他亲水性物质从固定化生物催化剂附近排除出去的原因。为使原材料向其对应的脂肪酸烷基酯的转化率达到高于 98％，所公开的酶促方法可以以一个阶段或两个阶段进行。本发明的新方法可以使用本发明的脂肪酶制剂或者固定在固体载体上的单一脂肪酶。在此情况下，脂肪酶可以是任选的或具有 sn-1，3 特异性的，并且脂肪酶 / 载体的组合被慎重设计以提供强力而有效的酶制剂。脱附的甘油被释放至反应介质中，然后可以通过如本说明书中所述的机械手段从体系中除去。所述体系的使用防止了因颗粒被所形成的甘油附着而产生生物催化剂聚集体。酶聚集体的形成是造成酶活性衰减或遮掩的主要因素之一，本发明的体系和方法可以克服这一问题。

[0063] 为使原材料的转化率达到 98％以上，可以采用两种类型的方法配置：

[0064] 1. 使用带有底部烧结的玻璃过滤器的搅拌釜式反应器，所述过滤器将生物催化剂保持在反应器中，但允许反应介质从反应器中渗透出去。所述反应器构造使得从固定化酶中自脱附的副产物、特别是甘油沉入反应器的底部，并经烧结的玻璃过滤器渗透出来。结果是从反应介质中连续除去了脱附的所形成的甘油和多余的水，使得反应向合成方向移动，由此达到超过 98％的转化率。该反应器中所使用的生物催化剂可以根据脂肪酶的位置特异性和来源由一种或多种类型的脂肪酶构成。

[0065] 2. 两个带有底部烧结的玻璃过滤器的连续搅拌釜式反应器。在两个反应器之间使用沉降槽或离心分离机。第一反应器可以含有由一种或多种类型的脂肪酶构成的固定化生物催化剂。两个反应器之间的沉降槽或离心分离机的作用是从反应介质中除去所形成的甘油和多余的水，使得在合理的反应时间内，在第二反应器中原材料向其所对应的脂肪酸烷基酯的转化率提高至 98％以上。

[0066] 在本发明的方法中，体系内不存在偏甘油酯（甘油单酯和甘油二酯）的积聚。所述偏甘油酯与聚集的甘油通常会造成酶活性丧失。如以下实施例中将显示的，在本发明的方法中，在反复使用同一酶制剂超过 100 次循环后，生物催化剂活性出乎意料地得到了保持。为达到高于 96％的转化率，反应时间缩短至不到 4 小时，相对照的是，当使用现有技术所述的其他生物催化剂时反应时间超过 24 小时。这些特征为本发明的酶制剂和方法赋予了高经济价值。

[0067] 底部带有过滤器的恒温反应器中所容纳的反应混合物在适当条件下反应，直至脂

肪酰基或脂肪酸转化为脂肪酸烷基酯，通常是脂肪酸甲酯。反应介质通过重力或通过在反应器顶部施加氮气压力而经底部过滤器过滤。

[0068] 为使转化率在合理反应时间内（优选小于 4 小时）达到高于 98％，可以分两个阶段来进行反应。首先，使脂肪酸原料与如甲醇等短链醇或醇供体反应约 2 小时，其中获得了超过 70％的向脂肪酸烷基酯的转化率。从反应器底部取出反应介质，将生物催化剂保留在反应器中。使反应介质进行相分离或者离心分离，以除去所形成的甘油。然后，将主要含有残留的未反应甘油酯和所形成的脂肪酸烷基酯的上层有机相导入第二连续反应器中，并使其在固定在聚合物基体上的一种脂肪酶或多脂肪酶存在下与甲醇反应。

[0069] 该方法获得了含量高于98％的脂肪酸烷基酯，以及高品质的副产品，即甘油。重复使用 100 次循环之后，所制备的多酶固定化制剂仍是可再循环的，其活性损失不显著。

[0070] 也可以通过以下方式，来使脂肪酸原料与如甲醇等醇或其他醇供体反应生成生物柴油得以连续进行：将固定化酶的混合物填充在柱中，并使反应混合物通过该柱，从而得到所希望的产物。

[0071] 要提到的是，在搅拌釜式反应器中可分批运行的生产生物柴油的反应器模式也可以通过将生物催化剂填充在柱中而连续进行。

[0072] 适于负载一种或多种脂肪酶的固体载体如上所述。下面的实施例、特别是表 1 中给出了一些具体载体。

[0073] 优选的是，可以以缓冲液：有机溶剂分别为 1 ： 10 ～ 10 ： 1 的比例，将如正己烷等疏水性有机溶剂加入固定化介质中。通过本发明的方法制备的本发明的固定化酶非常具有活性、特别稳定并对通常存在于废油中的如短链醇、短链脂肪酸和其他酶失活因素等亲水性底物具有高耐受性。在甚至 100 次循环的反应后，脂肪酸原料的转化率在第一阶段保持为约 90％，在第二阶段保持为高于 98％。该稳定性具有重大的经济意义。

[0074] 固定化可以根据本领域中记载的程序进行。特别有利的固定化方法在申请人的共同申请的 WO2008/084470 中有描述，通过援引将其全部内容并入本说明书中。简而言之，固定在不溶性载体上的脂肪酶的制备通过以下方式进行：提供由水性缓冲液和至少一种第一有机溶剂构成的两相体系；将所述界面酶与该两相体系混合；向获得的混合物中加入载体中并混合；并且从所获得的混合物中分离出固定在所述载体上的界面酶。

[0075] 酶的选择对于本发明的酶制剂、特别是对于多脂肪酶体系的功效而言非常重要。应该对组合进行选择，以使在苛刻反应条件下也能避免活性的衰减或丧失。这是可以实现的，因为该体系中的双酶或多酶制剂可以协同发挥作用。应该理解，此处所用的术语协同也指对酶失活或酶活性衰减或丧失的避免。例如，不受限于理论，一些酯交换中间体，主要是甘油单酯和甘油二酯似乎会引起源于假单胞菌（此处记为 SP）的脂肪酶和源于疏绵状嗜热丝孢菌（此处记为 TL）的脂肪酶的失活或酯交换活性衰减。另一方面，源于南极假丝酵母 B（此处记为 CALB）的脂肪酶对于甘油单酯和甘油二酯具有高特异性。CALB 和 PS 或 TL 的存在保证了如上所定义的协同效应，并因此可使复合生物催化剂在反复使用中不会发生显著的活性丧失。此外，附加的具有高 sn-2 亲和性的第三脂肪酶的存在，会导致所形成的 sn-2 酰化甘油型酯交换反应中间体的浓度水平降低，所述中间体的特征在于从反应介质中的清除率很低。酶的具体组合及其设计原理将在以下实例中更详细地描述。在本申请上下文中的脂肪酶固定化的要点在于，发现与酶类蛋白质相配的最适宜的基体。这是因为，对于脂肪

酶－基体的具体组合而言，具有高酯交换活性不能保证反复应用后仍能保持所述活性。本发明人已经确定了特别有效的组合，例如但不限于此处所述的那些组合。

[0076] 特别优选的酶组合为如此处所述的固定在疏水性基体上的脂肪酶 TL 和 CALB，脂肪酶 PS 和 CALB，脂肪酶 PS、CALB 和 CALA，脂肪酶 TL、CALB 和 CALA。

[0077] 根据本发明的两种脂肪酶或三种脂肪酶体系的使用（其在极端反应条件下具有高甲醇和油类酯交换活性和高稳定性），为所开发的生物催化剂赋予了在生物柴油生产中的经济价值，具有最低的生物催化剂成本，并且所述生物催化剂可以得到最有效的重复使用。

[0078] 如以下实施例中显示的，本发明的制备脂肪酸短链烷基酯的酶促方法可以使用第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，所述第一脂肪酶表现出比其对于偏甘油酯的活性更高的对于甘油三酯的酯交换活性，并且所述第二脂肪酶表现出比其对于甘油三酯的活性更高的对于偏甘油酯的酯交换活性，所述两种脂肪酶在其酯交换活性方面显示出协同效应从而获得最终的脂肪酸烷基酯产物。

[0079] 在另一实施方式中，用在本发明的方法中的脂肪酶制剂可以包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，所述第一脂肪酶在第一酯交换反应中释放出中间体，所述中间体为所述第二脂肪酶所偏爱从而与醇或醇供体酯交换以形成脂肪酸烷基酯。

[0080] 醇可以包含甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇或如正己醇、正辛醇、正癸醇、正十二烷醇、正十四烷醇、正十六烷醇和正十八烷醇等任何其他高级醇或任何醇供体中的至少一种，或者其中至少两种的任意混合物。醇供体优选羧酸短链烷基酯，如乙酸甲酯。

[0081] 另外，脂肪酶制剂可以包含第一脂肪酶和第二脂肪酶，所述脂肪酶单独或一起固定在适当载体上，所述脂肪酶表现出不同的底物特异性，即，当一起使用时会保持它们对于甘油三酯的酯交换活性，而在以甘油三酯为底物单独使用时，所述两种脂肪酶中的至少一种在酯交换反应介质中衰减，但以偏甘油酯或脂肪酸作为底物时，表现出高酯交换／酯化活性。

[0082] 如所公开和描述的，应该理解本发明不限于此处所公开的具体实例、方法步骤和材料，因为这些方法步骤和材料可以在某种程度上变化。还应该理解本文所用的术语仅仅是用于描述特定实施方式的目的而不是意在作出限制，因为本发明的范围仅受所附权利要求及其等同物的限制。

[0083] 必须注意的是，如本说明书和所附权利要求中所用的“a”、“an”和“the”等单数形式包括复数的指代物，除非内容中另有明确规定。

[0084] 在整个本说明书和后面所附的权利要求书中，除非上下文另有要求，否则词语“包括”和“包含”（“comprise”）及其变体（例如“comprises”和“comprising”）应被理解为意指包含所说明的整体或步骤或者多个整体或多个步骤的组，但并非不含任何其他的整体或步骤或者多个整体或多个步骤的组。

[0085] 以下实施例是本发明人在实施本发明的各方面时采用的技术的代表。应该理解的是，尽管这些技术是实施本发明的优选实施方式的示例，然而本领域技术人员根据本公开将会认识到，可以进行大量修改而不偏离本发明的预期范围。

实施例

[0086] 实施例 1- 固定在聚合物基体上的单一脂肪酶的制备

[0087] 将源于疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginosa) 的脂肪酶 ((TL),1ml Lipozyme TL 100L) 或源于疏绵状嗜热丝孢菌 (Thermomyces lanuginose) 的脂肪酶浓缩物 (Novozymes,丹麦) 溶解在 0.05M、pH8 的 TRIS 缓冲液 (12ml) 中。通过在室温摇动或搅拌 8 小时,使脂肪酶溶液与酶载体 (1g,所使用的各种载体如下表 1 中所示) 接触。优选的是,以缓冲液 : 有机溶剂分别为 1 ： 10 ～ 10 ： 1 的比例,将如正己烷等疏水性有机溶剂加入固定化介质中。滤出含有固定化酶的载体并在干燥器中干燥过夜,从而得到固定化脂肪酶。使用源于假单胞菌 Pseudomonas sp.) 的脂肪酶 (100mg 脂肪酶 PS, Amano Enzyme,日本)、源于产碱杆菌 (Alcaligenes sp.) 的脂肪酶 (50mg 脂肪酶 QLM,Meito Sangyo,日本)、南极假丝酵母脂肪酶 A(Candida antarctica A)(1ml GALA,Novozymes,丹麦) 或南极假丝酵母脂肪酶 B(Candida antarctica B) 浓缩物 (1ml,CALB-L,Novozymes,丹麦),重复同样的程序。这些固定化脂肪酶可以在本发明的新方法中单独使用,也可以在一锅反应系统或在连续的两步或多步法中以不同重量比组合使用,以通过生物柴油的脂肪酸原料与醇、通常是甲醇的酯化 / 酯交换反应来制备脂肪酸烷基酯 (生物柴油)。生产生物柴油的反应器模式可以是在搅拌釜式反应器中分批运行,也可以是将生物催化剂填充在柱中而连续运行。

[0088] 实施例 2- 多脂肪酶固定化生物催化剂的制备

[0089] 将源于疏绵状嗜热丝孢菌的脂肪酶 (Thermomyces lanuginosa)(1mlLipozyme TL 100L, Novozymes,丹麦) 和南极假丝酵母 B(Candida antarctica B) 脂肪酶浓缩物 (1ml, CALB-L,Novozymes,丹麦) 溶解在 0.05M、pH8 的缓冲液 (12ml) 中。通过在室温摇动或搅拌 8 小时,将含有上述两种酶的溶液与载体接触,所述载体例如为皆来自 Rohm and Haas(美国) 的 Amberlite XAD 7HP 或 Amber lite XAD 1600(1g)。优选的是,以缓冲液 : 有机溶剂分别为 1 ： 10 ～ 10 ： 1 的比例,将如正己烷等疏水性有机溶剂加入固定化介质中。滤出含有固定化酶的载体并在干燥器中干燥过夜,从而得到固定化多脂肪酶制剂。使用同时含有脂肪酶 PS(100mg,Amano Enzyme,日本) 和南极假丝酵母 B 脂肪酶浓缩物 (1ml,CALB-L, Novozymes,丹麦) 的溶液或者同时含有脂肪酶 PS(100mg, Amano Enzyme,日本) 和疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶浓缩物 (1ml,CALB-L,Novozymes,丹麦) 的溶液,重复同样的程序。例如使用源于产碱杆菌的脂肪酶 (50mg,脂肪酶 QLM, Meito-Sangyo,日本) 与脂肪酶 PS 或脂肪酶 TL 的组合,可以制备其他多酶体系。其他脂肪酶制剂可以含有三种不同酶,特别是全都固定在相似或不同载体上的脂肪酶 TL、CALA 和 CALB,或者脂肪酶 PS、CALA 和 CALB。

[0090] 实施例 3- 使用固定化脂肪酶制备脂肪酸甲酯 (FAME,生物柴油)

[0091] 表 1 显示了在使用源于疏绵状嗜热丝孢菌 (TL)、假单胞菌 (PS) 和南极假丝酵母 B(CALB) 的脂肪酶的酯交换反应中,所形成的脂肪酸甲酯的百分比 (FAME％),所述脂肪酶各自单独地固定在不同载体上。反应通过向位于双夹套玻璃反应器中的豆油 (220g) 和甲醇 (23.9g)(油类甘油三酯与甲醇之间的化学计量比分别为 1 ： 3) 中加入固定化脂肪酶 (30g) 来进行,所述反应器底部具有孔隙为 70μm～ 100μm 的烧结的玻璃过滤器。甲醇被分批加入 (各批为化学计量比量的 1/3) 或者逐滴滴入。在整个反应体系中水浓度为 0.1％～ 2％。在 30℃机械搅拌反应体系。通过在上述条件下于 8 小时反应时间后,使用 GC 来测量脂肪酸甲酯、偏甘油酯和甘油三酯的百分比,从而确定原材料的转化进程。

[0092] 结果提供在表 1 中，表 1 显示了使用根据实施例 1 制备的不同的单独固定化脂肪酶 (30g) 在由豆油甘油三酯 (220g) 和甲醇 (23.9g) 构成的酯交换体系中，所形成的脂肪酸甲酯的百分比。在 30℃机械搅拌反应混合物 8 小时。

[0093] 表 1

[0094]

固定化脂肪酶 / 载体类型	疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶 FAME(%)	假单胞菌脂肪酶 FAME(%)	南极假丝酵母脂肪酶 FAME(%)
Amberlite XAD 4	45	55	20
Amberlite XAD 16	47	85	55
Amberlite XAD 7HP	55	86	40
Amberlite XAD 16HP	46	80	40
Duolite XAD 761	50	85	40
Amberlite XAD 1180	55	87	70
Amberlite XAD 1600	60	80	70
Duolite A7	65	85	40
Duolite A561	65	85	75
Duolite A568	54	80	40
Duolite C467	75	10	0
Amberlyst A-21	55	80	40
Dowex monosphere 77	40	80	40
Dowex optipore L493	10	55	0
Dow styrene DVB	5	35	5
MTO Dowex optipore SD-2	5	75	5
Dowex MAC-3	0	0	0
Amberlite FPA53	45	70	35
Amberlite FPC22H	0	0	0

Amberlite FPA40Cl	45	47	45
AmberliteIRC50	5	15	45
Purolire A109	45	75	45
Sepabeads EC-EA	75	85	70
Sepabeads EC-EP	80	85	75
Sepabeads EC-BU	85	86	85
Sepabeads EC-OD	80	85	85

[0095] 实施例 4- 使用固定化多脂肪酶制剂合成脂肪酸甲酯（生物柴油）

[0096] 表 2 显示了在使用由一锅方式中单独或一起固定在相同载体上的疏绵状嗜热丝孢菌 (TL) 脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB) 或者假单胞菌 (PS) 脂肪酶与南极假丝酵母脂肪酶 B 构成的固定在 Amberlite XAD 7HP 上的多脂肪酶制剂的酯交换反应中，所形成的脂肪酸甲酯的百分比 (FAME％)。此外，可以使用源于产碱杆菌的脂肪酶（脂肪酶 QLM，Meito-Sangyo，日本）代替 CALB 与脂肪酶 PS 或 TL 组合使用。反应通过以下方式进行：向位于双夹套玻璃反应器中的豆油 (220g) 和甲醇 (23.9g) 中加入固定化脂肪酶制剂 (30g)，所述反应器底部具有孔隙为 70μm～100μm 的烧结的玻璃过滤器。甲醇被分批加入（各批为化学计量比量的 1/3) 或者逐滴滴入。在 30℃机械搅拌反应体系。通过在上述条件下于 2 小时、3 小时和 6 小时反应时间后，使用气相色谱法 (GC) 来测量脂肪酸甲酯、偏甘油酯和甘油三酯的百分比，从而确定原材料的转化进程。

[0097] 表 2 中所提供的结果显示，脂肪酶 TL 和 PS 在 6 小时反应时间后不能实现浓度在 95％以上的 FAME，同时 CALB 的酯交换活性较低。由脂肪酶 TL 和 CALB 构成的多脂肪酶固定化制剂令人惊讶地表现出比单独使用脂肪酶 TL 或 CALB 的对照实验更高的酯交换活性。

[0098] 如表 2 中所示，由脂肪酶 PS 和 CALB 构成的多脂肪酶固定化制剂还表现出提高的且具协同效应的酯交换活性，其通常高于 99％，而对照实验中酯交换活性小于 86％。当将 QLM 与脂肪酶 TL 和 PS 组合使用时，观察到相同的协同效应趋势。

[0099] 表 2 显示了在使用根据实施例 2 制备的固定在 Amberlite XAD 7HP 上的不同多脂肪酶混合物时和使用根据实施例 1 制备的固定化脂肪酶作为对照实验时，在由豆油甘油三酯 (220g) 和甲醇 (23.9g) 构成的酯交换体系中，在 2 小时、3 小时和 6 小时反应时间后所形成的脂肪酸甲酯的百分比。在 30℃搅拌反应混合物 6 小时。

[0100] 表 2

[0101]

在 Amberlite XAD 7HP 上的固定化脂肪酶	2 小时后的 FAME(％)	3 小时后的 FAME(％)	6 小时后的 FAME(％)
疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶（对照）	75	82	85

假单胞菌脂肪酶（对照）	74	81	86
南极假丝酵母 B 脂肪酶（对照）	10	18	42
产碱杆菌脂肪酶（脂肪酶 QLM）	52	67	88
疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶和南极假丝酵母 B 脂肪酶	82	87	96
假单胞菌脂肪酶和南极假丝酵母 B 脂肪酶	82	96	99.7
产碱杆菌脂肪酶和疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶	71	78	96
产碱杆菌脂肪酶和假单胞菌脂肪酶	86	98	99.5

[0102] 实施例 5- 在使用同一批生物催化剂的分批反应中固定化脂肪酶的重复酯化活性

[0103] 通过将固定在 Amberlite XAD 7HP 上的三种脂肪酶 (TL、PS、CALB) 中的一种 (250mg) 加入容有油酸 (2.5g) 和 1/3 化学计量比量的甲醇 (285mg) 的螺旋盖小瓶中，来测量生物催化剂的酯化活性。在 2 小时和 4 小时反应时间后，分相同的两批加入余下的 2/3 量的甲醇。6 小时后分析反应混合物的组成。从小瓶中除去反应介质，并导入新一批的新底物，同时使用同一批酶。图 1 显示了在 50 次反应循环中，使用同一批各自单独地固定在 Amberlite XAD 7HP 上的脂肪酶 PS、脂肪酶 TL 或 CALB 的反应介质中的 FAME％。

[0104] 图 1 所示的结果表明，固定化 CALB、脂肪酶 PS 和 TL 制剂全部可以有效地催化游离脂肪酸与甲醇的酯化。在 50 次反应循环后，CALB 的重复酯化活性非常稳定，而脂肪酶 TL 和 PS 在 50 次反应循环后，分别线性地失去了初始酯化活性的 26％和 16％。

[0105] 实施例 6- 在使用同一批生物催化剂的分批反应中固定化脂肪酶的重复酯交换活性

[0106] 通过将固定在 Amberlite XAD 7HP 上的三种脂肪酶中的一种 (250mg) 加入含有豆油 (2.5g) 和 1/3 化学计量比量的甲醇 (91mg) 的螺旋盖小瓶中，来测量反复使用的生物催化剂的酯交换活性。在 2 小时和 4 小时反应时间后，分相同的两批加入余下的 2/3 量的甲醇。6 小时后分析反应混合物的组成。从小瓶中除去反应介质，并导入新一批的新底物，同时使用同一批酶。

[0107] 图 2 显示了使用同一批生物催化剂，CALB、脂肪酶 PS 和脂肪酶 TL 单独在 50 次反应循环中的酯交换活性。结果显示，脂肪酶 PS 和 TL 的酯交换活性都获得了 85％以下的 FAME％，并在 50 次反应循环后发生线性衰减，平均达到其初始酯交换活性的 70％。CALB 的初始酯交换活性较低，并出乎意料的是，在 11 次反应循环之后线性地丧失了其活性。

[0108] 实施例 7- 酯交换活性不足的 CALB 在脂肪酸与醇的酯化反应中的应用

[0109] 将如实施例 6 所述的在 11 次反应循环之后已经丧失其酯交换活性的固定在 Amberlite XAD 7HP 上的 CALB(250mg) 用于油酸 (2.5g) 与甲醇 (285mg) 的酯化。在 10 次反应循环中使用同一批生物催化剂。出乎意料的是，分析结果显示，所述生物催化剂具有高酯化活性，尽管其在前述实验中丧失了其酯交换活性。在使用同一批生物催化剂连续进行

10 次的实验中，平均 FAME％为 85％。

[0110] 实施例 8- 酯交换活性不足的 CALB 在偏甘油酯与醇的酯交换反应中的应用

[0111] 将如实施例 6 所述的在 11 次反应循环之后已经丧失其酯交换活性的固定在 Amberlite XAD 7HP 上的 CALB(250mg) 用于甘油一油酸酯 (3g) 与甲醇 (270mg) 的酯交换。在 10 次反应循环中使用同一批生物催化剂。出乎意料的是，分析结果显示，所述生物催化剂对于偏甘油酯与甲醇具有高酯交换活性，尽管其在前述实验中丧失了其对甘油三酯与甲醇的酯交换活性。在使用同一批生物催化剂连续进行 10 次的实验中，平均 FAME％高于 80％。

[0112] 实施例 9- 在使用同一批生物催化剂的分批反应中固定化多脂肪酶制剂的重复酯交换活性

[0113] 通过将实施例 1 或 2 的全部固定在 Amberlite XAD 7HP(250mg) 上的脂肪酶 PS 和 CALB 或者脂肪酶 TL 和 CALB 加入容有豆油 (2.5g) 和 1/3 化学计量比量的甲醇 (91mg) 的螺旋盖小瓶中，来测量固定化多脂肪酶制剂的酯交换活性。在 2 小时和 4 小时反应时间后，分相同的两批加入余下的 2/3 量的甲醇。反应 6 小时后从小瓶中除去反应介质，并导入新一批的新底物，同时使用同一批酶。图 3 显示了在 50 次循环中使用同一批生物催化剂的反应介质中的 FAME％。图 3 所示的结果表明，使用同一批生物催化剂，在 50 次反应循环中，多脂肪酶制剂的酯交换活性出乎意料地稳定。

[0114] 实施例 10- 在两步法中使用固定化多脂肪酶制剂合成脂肪酸甲酯（生物柴油）

[0115] 表 3 显示了在使用固定在 Amberlite XAD 7HP 上的多脂肪酶制剂的酯交换反应介质中的 FAME％，所述制剂由单独或以一锅方式固定的脂肪酶 TL 和 CALB 或者脂肪酶 PS 和 CALB 构成。反应通过以下方式进行：向位于双夹套玻璃反应器中的豆油 (220g) 和甲醇 (23.9g) 中加入固定化脂肪酶制剂 (30g)，所述反应器底部具有孔隙为 70μm ～ 100μm 的烧结的玻璃过滤器。甲醇被分批加入（各批为化学计量比量的 1/3) 或者逐滴滴入。在 30℃机械搅拌反应体系 2 小时。当底物转化率达到优选的 70％以上时，通过施加氮气压力或者通过重力，经过烧结的玻璃过滤器，从反应器底部滤出反应介质。通过离心分离或静置一段时间来使反应介质发生相分离。除去含有甘油的下相，并将含有未反应甘油酯和 FAME 的有机相导入容有固定化脂肪酶的第二连续的底部烧结的玻璃过滤器中。在 30℃机械搅拌第二反应器中的介质 2 小时，其中具有最初所需的甲醇的化学计量比量的三分之一。通过在 2 小时后使用 GC 测量脂肪酸甲酯、偏甘油酯和甘油三酯的百分比来跟踪反应进程。

[0116] 表 3 中所示的结果表明，用作对照实验的两种脂肪酶 TL 和 PS 皆能在第一步中获得 85％以下的 FAME％及在第二步中获得 98％的 FAME％，而固定在 Amberlite 7HP 上的 CALB 表现出在两步反应后不超过 15％的较低的酯交换活性。由脂肪酶 PS 和 CALB 构成的多脂肪酶制剂在第一步可获得 92％ FAME 且在第二步中可获得 100％的 FAME。类似的是，由脂肪酶 TL 和 CALB 构成的多脂肪酶制剂可获得 90％的较高的 FAME％，并且在第二步中获得接近完全的转化。脂肪酶 TL 和 PS 的组合可在第一步中获得高 FAME 百分比，并可在第二步中获得接近完全的转化。这些结果支持了上述的所使用的脂肪酶组合在酯交换活性方面的协同效应。

[0117] 表 3 显示了使用根据实施例 2 制备的不同的固定在 Amberlite XAD7HP 上的多脂肪酶制剂的由豆油甘油三酯 (220g) 和甲醇 (23.9g) 构成的酯交换反应体系的各步中 2 小

时反应时间后所形成的脂肪酸甲酯的百分比。在30℃机械搅拌反应混合物2小时。相分离之后，将上层有机相导入在相同条件下运行的容有固定化脂肪酶的第二反应器中。

[0118] 表3

[0119]

步骤编号	脂肪酶PS FAME（%）	脂肪酶TL FAME（%）	CALB FAME（%）	PS/CALB FAME（%）	TL/CALB FAME（%）	PS/TL FAME（%）
步骤1	80	85	5	92	90	85
步骤2	98	98	15	100	99	99

[0120] 表3显示了不同的具有协同效应的酶组合的各种可能性（也可通过与使用一种酶的图2相对照的使用多酶体系的图3和图4中看出）。

[0121] 由于CALB的存在，反应时间缩短至2小时～3小时，所述CALB除了清除所形成的甘油之外，还负责清除中间体偏甘油酯，即甘油单酯和甘油二酯，当仅单独使用脂肪酶PS或脂肪酶TL时，所述偏甘油酯和甘油通常会造成反应时间延长和酶失活。

[0122] 实施例11-在以连续批次使用相同生物催化剂的两步法中使用固定化多脂肪酶制剂合成脂肪酸甲酯（生物柴油）

[0123] 图4显示了使用由脂肪酶PS和CALB构成的固定在Amberlite XAD7HP上的多脂肪酶制剂的酯交换反应介质在阶段1和阶段2中的FAME％，所述脂肪酶PS和CALB被单独固定化或以一锅方式固定化。反应通过以下方式进行：向位于双夹套玻璃反应器中的豆油(220g)和甲醇(23.9g)中加入生物催化剂(30g)，所述反应器底部具有孔隙为70μm～100μm的烧结的玻璃过滤器。甲醇被分批加入（各批为化学计量比量的1/3）或者逐滴滴入。在30℃机械搅拌反应体系2小时。当底物转化率达到优选的80％以上时，在烧结的玻璃过滤器上通过施加氮气压力或者通过其重力来过滤反应介质。通过离心分离或静置一段时间来使反应介质发生相分离。除去含有甘油的下相，并将含有未反应甘油酯和FAME的有机相导入容有相同生物催化剂的第二连续的底部烧结的玻璃过滤器中。在30℃机械搅拌第二反应器中的介质2小时，其中具有最初所需的甲醇的化学计量比量的三分之一。从保持有相同生物催化剂的该反应器中取出反应介质。将该程序重复至少100个循环。图4显示了在该两步法中各次循环中2小时反应时间后的FAME％。图4中的结果表明，在第一阶段后FAME的百分比平均约为88％，在第二步后则达到了平均为99％以上。出乎意料的是，这些结果表明，多脂肪酶固定化制剂具有高活性，并且在使用同一批生物催化剂的100次反应循环中未观察到显著的活性丧失。

[0124] 实施例12-使用具有不同底物特异性的脂肪酶生产生物柴油

[0125] 表4显示了在豆油甘油三酯与甲醇的酯交换反应中于不同时间间隔后所形成的脂肪酸甲酯的百分比，所述反应使用了具有各种底物选择性的不同的多脂肪酶制剂。脂肪酶根据实施例2中所述的方法使用如Amberlite XAD 1600等多孔疏水性载体来固定。

[0126] 表4：由豆油甘油三酯(2.5g)和甲醇(285mg)构成的酯交换反应体系于不同时间间隔后所形成的脂肪酸甲酯的百分比，所述反应体系使用了根据实施例2制备的固定在

Amberlite XAD 1600 上的不同的多脂肪酶制剂(15 重量%)。在 2 小时的反应时间期间,分相同的三批加入甲醇。在 30℃摇动和培养该反应混合物。不同酶制剂之间的重量比为 60% PS ： 40% CALB 和 60% PS ： 20% CALB ： 20% CALA。TL ： CALB 和 TL ： CALB ： CALA 之间采用相似的重量比。

[0127]

时间 \ 脂肪酶	脂肪酶 PS+CALB	脂肪酶 PS+CALB+CALA	脂肪酶 TL+CALB	脂肪酶 TL+CALB+CALA
1	48	57	43	59
2	80	86	82	91
3	94	97	92	98
4	99	99.7	95	99

[0128] 表 4 所示的结果表明,使用由具有 1,3- 位特异性的脂肪酶(如脂肪酶 TL 或脂肪酶 PS)和对于偏甘油酯具有选择性的脂肪酶(如 CALB)以及对于 sn-2 位具有高选择性的脂肪酶(如 CALA)构成的多酶体系可导致以下结果 :与使用相似的但不加入对于 sn-2 位具有高选择性的脂肪酶(即 CALA)的酶制剂相比,生物柴油生产的酯交换反应速率有显著提高。

[0129] 表 5 显示了由固定在多孔疏水性载体(即 Amberilte XAD 1600)或多孔亲水性载体(如 Duolite A7)上的脂肪酶 TL、CALB 和 CALA 构成的两种多脂肪酶制剂的酯交换活性,所述两种载体皆由美国 Rohm and Haas 制造。结果显示,当固定化在疏水性载体上时,上述脂肪酶的组合获得了较高的酯交换活性和大幅提高的工作稳定性。从表 5 中可以看出,由固定在疏水性载体上的脂肪酶构成的生物催化剂,在将同一批酶用于 20 次连续运行时,保持了其初始酯交换活性,活性丧失极少,而使用相同的但固定在亲水性载体上的脂肪酶时的酯交换活性,在使用同一批生物催化剂 20 次之后,却发生了实质上的衰减,达到其初始活性的 40%。这些结果清楚地表明,与将亲水性载体用于脂肪酶的固定化相比,疏水性载体对于将脂肪酶固定化从而生产生物柴油更有利。

[0130] 表 5 显示了由脂肪酶 TL、CALB 和 CALA 构成的多脂肪酶制剂的酯交换活性,所述脂肪酶全都固定在多孔疏水性载体 Amberilte XAD 1600 上或多孔亲水性载体 Duolite A7 上。反应条件 :将豆油 (2.5g) 和甲醇 (3 批,各为 91mg) 与 250mg 固定化脂肪酶制剂在 30℃混合 4 小时。在相同条件下,将同批生物催化剂用在 20 次反应循环中。

[0131] 表 5

[0132]

批次 \ 生物催化剂	固定在疏水性载体上的脂肪酶 TL、CALB 和 CALA	固定在亲水性载体上的脂肪酶 TL、CALB 和 CALA
1	92	82
2	91	82
3	91	75
4	90	72
5	90	66
6	89	65
7	89	62
8	90	57
9	88	55
10	89	53
11	88	52
12	88	50
13	89	50
14	89	47
15	87	44
16	87	43
17	88	40
18	87	39
19	87	38
20	87	33

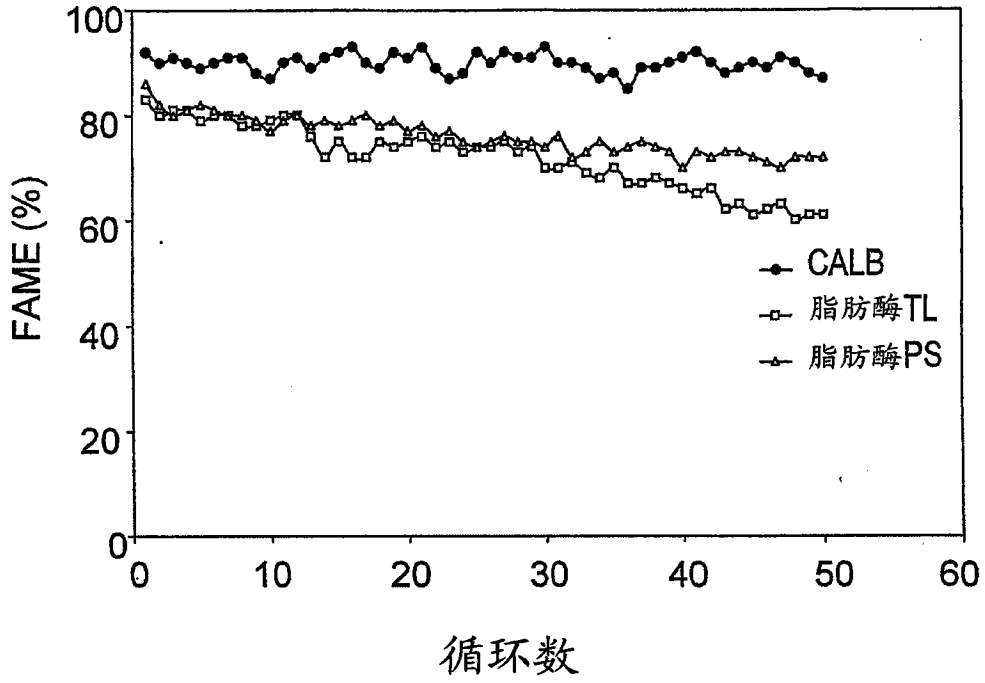

100
80
60
40
20
0
FAME (%)
0
10
20
30
40
50
60
CALB
脂肪酶TL
脂肪酶PS
循环数

图 1

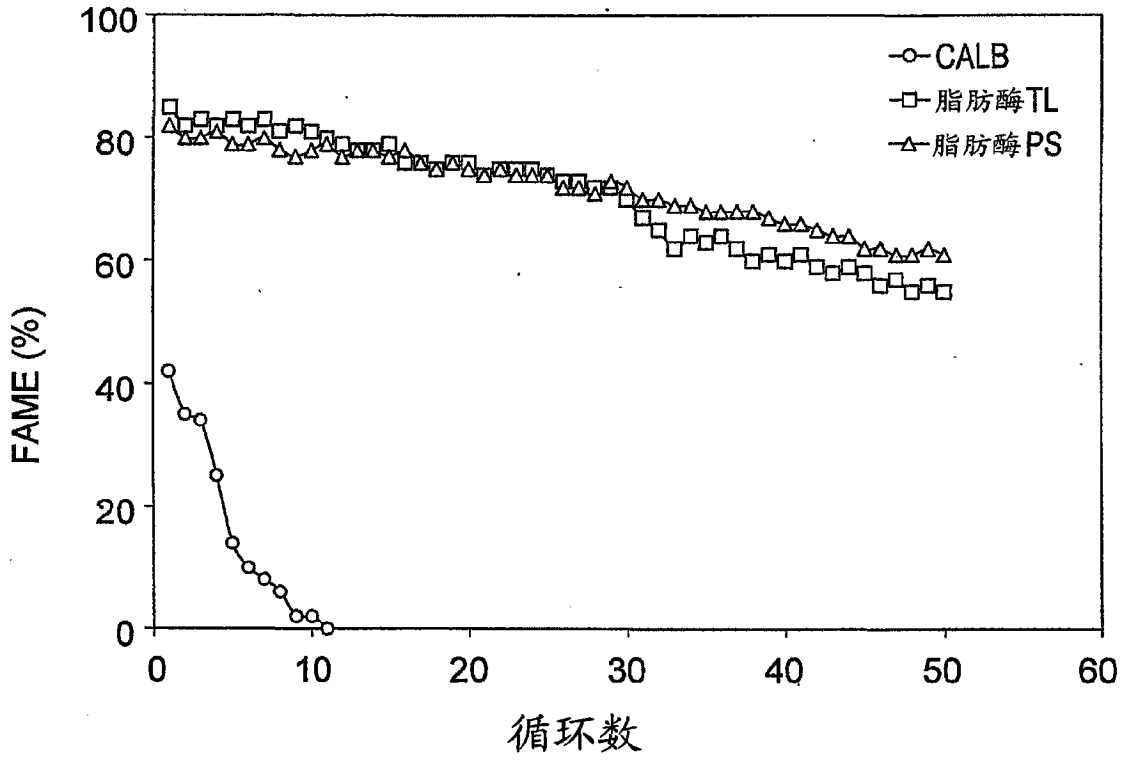

100
80
60
40
20
0
FAME (%)
0
10
20
30
40
50
60
CALB
脂肪酶TL
脂肪酶PS
循环数

图 2

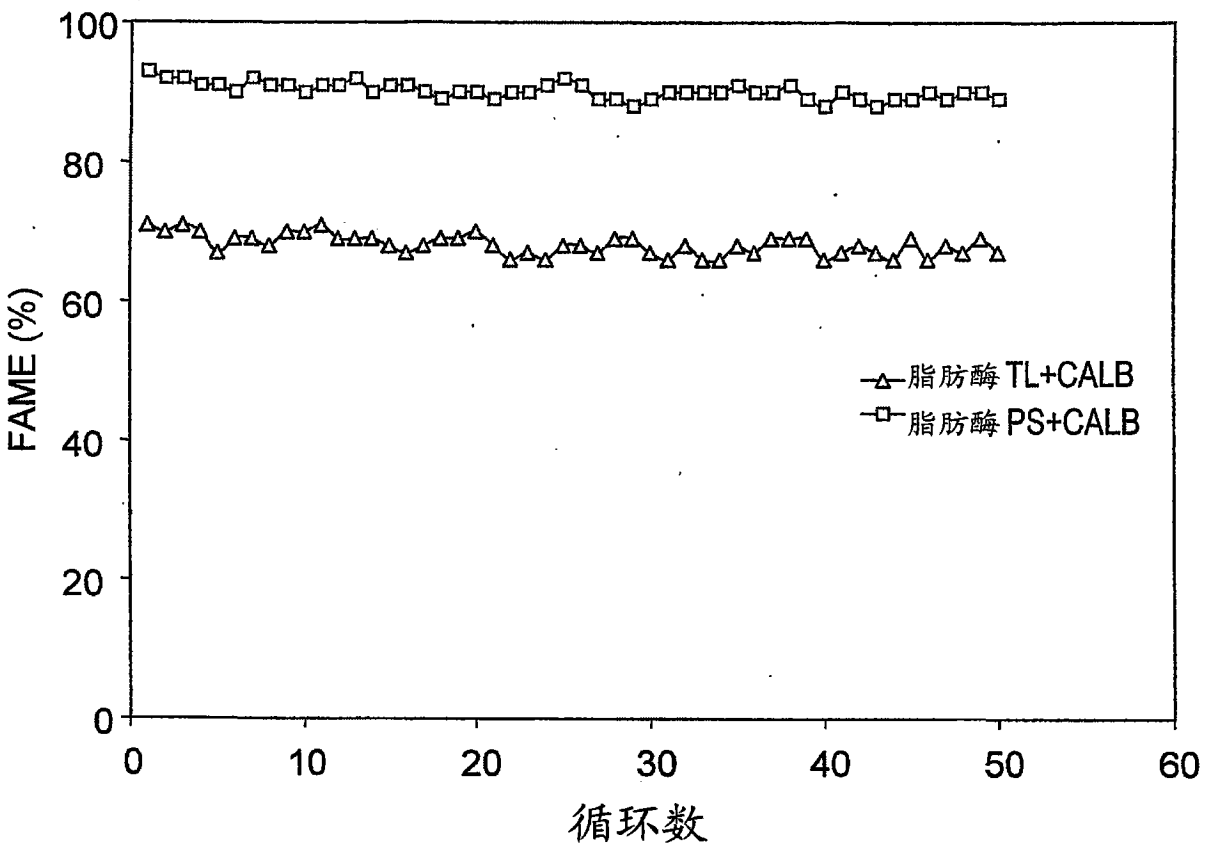

100
80
60
40
20
0
FAME (%)
0
10
20
30
40
50
60
循环数
脂肪酶 TL+CALB
脂肪酶 PS+CALB

图 3

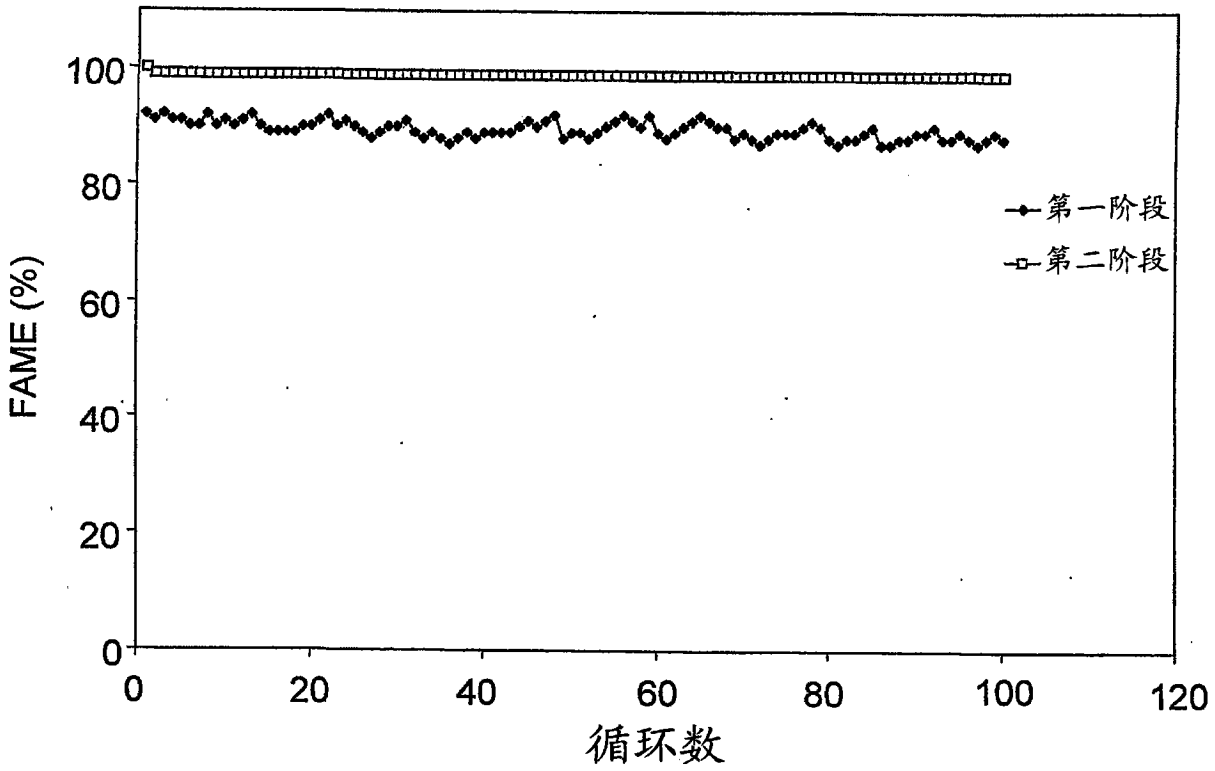


图 4