



(51) МПК
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C07C 67/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010126177/10, 13.11.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 13.11.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 28.11.2007 US 11/946,121

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2012 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 20.06.2014 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: LI L. et al. "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, v.43, pp.58-62. SOUMANOU M. M. et al: "Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil" *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, v. 33, pp. 97-103. RU 2151788 C1, 27.06.2000

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 28.06.2010

(86) Заявка РСТ:
 IL 2008/001497 (13.11.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2009/069116 (04.06.2009)

Адрес для переписки:

109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
 "Союзпатент", Е.В.Воробьевой

(72) Автор(ы):

БАШЕЕР Собхи (IL),
ХАЙ Маиса (IL),
КАЙЯЛ Мухаммад (IL)

(73) Патентообладатель(и):

ТРАНС БИОДИЗЕЛЬ ЛТД. (IL)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЛОЖНЫХ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИ ЛИПАЗ (ВАРИАНТЫ)

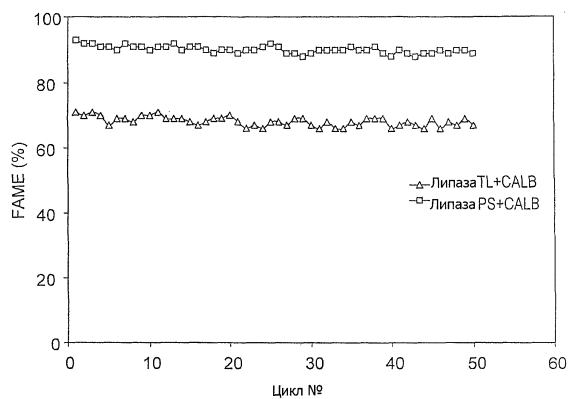
(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложены варианты способа получения сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) в микроводной системе, не содержащей растворителей. Осуществляют поэтапное добавление метанола к триглицеридам в присутствии препарата липаз и обеспечивают

протекание реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды не превратятся в сложные метиловые эфиры жирных кислот. Препарат липаз содержит по меньшей мере две липазы, по отдельности или вместе иммобилизованные на пористом гидрофобном носителе, где одна из липаз обладает повышенной

аффинностью к неполным глицеридам, другая является позиционно специфичной к положению sn-1,3, а необязательная третья липаза обладает высокой селективностью в отношении положения sn-2 глицерина. Носитель выбирают из группы, включающей пористые гидрофобные носители на основе алифатических или ароматических полимеров. Также предложен способ получения смеси липаз, иммобилизованных на указанном носителе. Смесь содержит липазу из *Candida*

antarctica В и по меньшей мере одну липазу, полученную из *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp. и *Thermomyces lanuginosa*. Препараты липаз обладают высокой устойчивостью в отношении гидрофильных субстратов, демонстрируют синергизм между иммобилизованными липазами и позволяют достичь высокой степени превращения за короткий промежуток времени. 7 н. и 11 з.п. ф-лы, 4 ил., 5 табл., 12 пр.



Фиг. 3

RU 2520093 C2

RU 2520093 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C07C 67/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010126177/10, 13.11.2008**(24) Effective date for property rights:
13.11.2008

Priority:

(30) Convention priority:
28.11.2007 US 11/946,121(43) Application published: **10.01.2012 Bull. № 1**(45) Date of publication: **20.06.2014 Bull. № 17**(85) Commencement of national phase: **28.06.2010**(86) PCT application:
IL 2008/001497 (13.11.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/069116 (04.06.2009)

Mail address:

**109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent",
E.V.Vorobevoj**

(72) Inventor(s):

**BAShEER Sobkhi (IL),
KhAJ Maisa (IL),
KAJJaL Mukhammad (IL)**

(73) Proprietor(s):

TRANS BIODIZEL' LTD. (IL)(54) **METHOD OF PRODUCING FATTY ACID METHYL ESTERS USING LIPASE MIXTURE (VERSIONS)**

(57) Abstract:

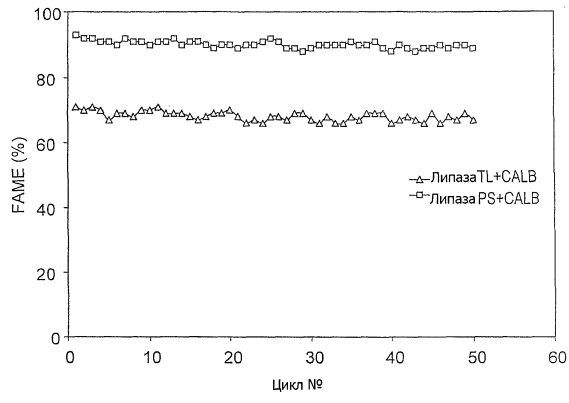
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Disclosed are versions of a method of producing fatty acid methyl esters (biodiesel) in a solvent-free microwave system. The method involves step-by-step addition of methanol to triglycerides in the presence of a lipase preparation and carrying out a reaction in suitable conditions until the triglycerides are converted to fatty acid methyl esters. The lipase preparation contains at least two lipases, separately or together immobilised on a porous hydrophobic support, where one of the lipases has high affinity for partial glycerides and the other is position-specific to the sn-1,3 position, and a third optional lipase has high selectivity for the glycerine sn-2 position. The support is selected from a group comprising porous hydrophobic supports based on aliphatic or aromatic polymers. Also disclosed is a method of preparing a mixture of lipases immobilised on said support. The mixture contains *Candida antarctica* B lipase and at least one lipase obtained from *Pseudomonas*

sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp. and *Thermomyces lanuginosa*.

EFFECT: lipase preparations have high resistance to hydrophilic substrates, demonstrate synergism between immobilised lipases and facilitate a high degree of conversion over a short period of time.

18 cl, 4 dwg, 5 tbl, 12 ex



Фиг. 3

R U 2 5 2 0 0 9 3 C 2

R U 2 5 2 0 0 9 3 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к получению иммобилизованных мультиферментных систем, предназначенных для трансэстерификации или эстерификации триглицеридов масел и жиров или жирных кислот с помощью короткоцепочечных спиртов для получения
5 сложных короткоцепочечных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно для применения в качестве биодизеля. Изобретение также относится к способу получения таких иммобилизованных мультиферментных систем и различным применениям их в промышленности в одностадийных или многостадийных процессах, в частности для получения сложных метиловых эфиров, обычно используемых в качестве биодизеля,
10 при приблизительно полном превращении.

Уровень техники

Липазы (триацилглицеролгидролаза Е.С. 3.1.1.3) определяют как гидролитические ферменты, которые действуют на сложноэфирную связь в триацилглицероле в водных системах с получением свободных жирных кислот, неполных глицеридов и глицерина.
15 Эта группа ферментов при низкой активности воды способна катализировать реакцию, обратную гидролизу. Обратную каталитическую активность липаз широко применяли для синтеза ценных соединений, которые содержат сложноэфирные и амидные связи, или других родственных химических веществ, содержащих такие функциональные группы, как гидроксильные, карбоксильные группы и аминокруппы. В частности,
20 липазы применяли для риформинга жирных кислот, масел, восков, фосфолипидов и сфинголипидов для получения новых требуемых функциональных свойств и для разделения оптически активных соединений из их рацемических смесей. Особенно интересно отметить, что будет раскрыто применение мультиферментной системы, включавшей различные липазы, иммобилизованные на полимерном носителе, для
25 синтеза сложных эфиров короткоцепочечных алкилов и жирных кислот (биодизеля).

В настоящее время существует более чем 40 различных коммерчески доступных липаз и фосфолипаз, однако, только некоторые из них получают в промышленном количестве. Некоторые из наиболее многообещающих с точки зрения промышленного производства ферменты, функционирующие на разделе фаз, получают из *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, семян папайи и панкреатина.
30

Наиболее известные способы иммобилизации в основном делятся на следующие.

1. Физическая адсорбция ферментов на твердом носителе, таком как кремнезем и
35 нерастворимые полимеры.
2. Адсорбция на ионообменных смолах.
3. Ковалентное связывание ферментов с веществом твердого носителя, такого как эпоксидные неорганические или полимерные носители.
4. Включение ферментов в растущий полимер.
- 40 5. Помещение ферментов в мембранный реактор или полупроницаемые гели.
6. Перекрестно-сшитые кристаллы ферментов (CLECs) или агрегаты (CLEA's).

Физическая адсорбция липаз, основанная на применении полимерных носителей с высокой пористостью или на применении ионообменных смол, представляет собой наиболее используемые на практике методы иммобилизации липаз. Этот способ
45 характеризуется простотой и приводит к получению надежной синтетической активности.

Применение свободных или иммобилизованных липаз для трансэстерификации триглицеридов и короткоцепочечных спиртов для образования сложных алкиловых

эфиров жирных кислот приводило к неудовлетворительным результатам в отношении активности и стабильности фермента. Также, экономическая эффективность иммобилизованных ферментов все еще препятствует энзиматическому получению сложных алкиловых эфиров жирных кислот в промышленных количествах. Кроме того, было показано, что все имеющиеся в продаже в настоящее время липазы, существующие или в своей свободной, или в иммобилизованной формах, не способны приводить к практически полному превращению триглицеридов масел в сложные алкиловые эфиры жирных кислот, предпочтительно достигающему более 99% в разумное время реакции, составляющее, в частности, менее 8 часов.

Другой основной недостаток липаз происходит из-за их низкой устойчивости в отношении гидрофильных субстратов, в частности, в отношении короткоцепочечных спиртов, короткоцепочечных жирных кислот (и те, и другие состоят из менее чем 4 атомов С), воды и глицерина, обычно присутствующих в реакционной среде для трансэстерификации. Во многих исследованиях было показано, что короткоцепочечные спирты и короткоцепочечные жирные кислоты, такие как метанол и уксусная кислота, соответственно, являются причиной отщепления молекул воды от четвертичной структуры таких ферментов, что приводит к их денатурации и последующей потере их каталитической активности. Также, присутствие таких гидрофильных молекул в реакционной среде приводит к отщеплению молекул воды от носителя и последующему снижению срока эксплуатации ферментов. Таким образом, не удивительно, что применение липаз для получения приемлемых для продажи количеств сложных метиловых эфиров жирных кислот «биодизеля» с применением триглицеридов масел и метанола в качестве субстратов является невозможным.

В работе [Lee, D.H. et al., *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006, 11:522-525] было предложено применение смесей липаз. В этой публикации описано получение биодизеля с помощью смеси химически связанных, иммобилизованных липаз *Rhizopus oryzae* и *Candida rugosa*. Как можно было увидеть, для того чтобы достигнуть более 96%-ного превращения сырья в биодизель, требовалось относительно долгое время реакции, обычно превышавшее 24 часа. Также, результаты, приведенные в этой публикации, показывают, что используемая смесь ферментов теряла более 20% своей исходной активности уже спустя всего 10 циклов применения. Это может быть вызвано накоплением неполных глицеридных промежуточных продуктов в реакционной системе, которое уменьшает реакцию трансэстерификации и поэтому увеличивает время реакции. Деактивация биокатализатора в системе, описанная в этой публикации, является главным недостатком, который препятствует его промышленному применению.

Поэтому целью этого изобретения является обеспечение нового способа получения высокоактивных и стабильных иммобилизованных липаз, предназначенных, в особенности, для синтеза сложных алкиловых эфиров жирных кислот, в частности сложных метиловых эфиров жирных кислот, для использования в качестве «биодизеля».

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение высокоактивного и стабильного иммобилизованного мультиферментного препарата, который обладает высокой устойчивостью в отношении короткоцепочечных спиртов и короткоцепочечных жирных кислот, в особенности в отношении метанола, этанола и уксусной кислоты, соответственно, и других полиолов, таких как глицерин, а также других ингибирующих факторов, обычно присутствующих в маслах и жирах, в особенности в их технических сортах.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение компоновки одностадийного или многостадийного ферментативного реактора для получения

требуемого продукта, а именно сложных алкиловых эфиров жирных кислот, при практически полном превращении в разумное время реакции, составляющее обычно менее 5 часов.

Эти и другие цели изобретения станут понятными в представленном ниже описании изобретения.

Раскрытие изобретения

В первом аспекте изобретение относится к способу получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно короткоцепочечных сложных алкиловых эфиров жирных кислот, таких как сложные метиловые эфиры жирных кислот (биодизель) в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающему предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление свободного спирта, предпочтительно короткоцепочечного свободного спирта, в частности метанола, или донора любого другого спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз, и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные алкиловые эфиры жирных кислот, предпочтительно в сложные метиловые эфиры жирных кислот (FAME), где указанный препарат липаз включает, по меньшей мере, две липазы, предпочтительно три липазы, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, и где, по меньшей мере, одна из указанных липаз обладает повышенной активностью в отношении неполных глицеридов и, по меньшей мере, одна из указанных липаз позиционно специфична к положению sn-1,3, и необязательно третью липазу, обладающую высокой селективностью в отношении положения sn-2 углеродного скелета глицерина.

Липазу, позиционно специфичную к положению sn-1,3, можно выбирать из группы, состоящей из липаз *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter sp.* и *Burkholderia sp.*, но не ограниченной только ими. Указанную липазу, обладающую повышенной аффинностью в отношении неполных глицеридов, можно выбирать из группы, состоящей из липаз *Candida antarctica B*, *Candida antarctica A*, *Candida rugosa*, *Alcaligenes sp.* и *Penicillium camembertii*, но не ограниченной только ими. Третья липаза может, в частности, быть липазой, обладающей высокой селективностью в отношении положения sn-2, полученной из *Candida antarctica A* или *Pseudozyma sp.*

Источник жирных кислот, применяемый в способе изобретения, может включать, по меньшей мере, один из перечисленных компонентов, таких как соевое масло, масло канолы, рапсовое масло, оливковое масло, касторовое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло, арахисовое масло, хлопковое масло, ятрофное масло, жир животного происхождения, отходы кулинарного жира, триглицериды масел из несъедобных растительных источников или любые их смеси, по меньшей мере, смеси из двух компонентов.

Липазы могут быть вместе иммобилизованы на подходящем носителе, предпочтительно на носителе на основе гидрофобного алифатического полимера или на гидрофобном ароматическом полимерном носителе. Любая из указанных липаз может быть иммобилизована на подходящем носителе, где носители, на которых иммобилизованы указанные липазы, или идентичны, или различаются.

Носитель предпочтительно является пористым носителем, который может быть органическим или неорганическим. Примерами носителей являются пористые неорганические носители, такие как носители на основе оксида кремния или оксида алюминия, но не ограниченные только ими, и органические носители, такие как

полимерные носители или носители на основе полимера, но не ограниченные только ими, и носители необязательно могут содержать активные функциональные группы, выбираемые из эпокси групп и альдегидных групп, или ионных групп.

В способе этого аспекта изобретения за превращением ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот можно следить в различные моменты времени в ходе реакции, реакционную среду можно удалять с помощью подходящих способов в любой требуемый момент в ходе реакции, останавливая таким образом реакцию, и образованные сложные метиловые эфиры жирных кислот и необязательно образованный глицерин выделяют из реакционной среды. Реакцию можно специфически останавливать, если превращение ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот достигло, по меньшей мере, 70%, предпочтительно, по меньшей мере, 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, 95%.

В следующем аспекте изобретение относится к способу получения короткоцепочечных сложных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающему предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление короткоцепочечного свободного спирта, предпочтительно метанола или донора любого другого спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока превращение ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот не достигнет, по меньшей мере, 70%, где указанный препарат липаз включает одну единственную липазу, иммобилизованную на подходящем носителе, или смесь, по меньшей мере, двух липаз, вместе или по отдельности иммобилизованных на подходящем носителе, при постоянном удалении образующегося глицерина и любого избыточного количества воды из реакционной среды.

Также в способе этого аспекта указанный препарат липаз может включать, по меньшей мере, две липазы, предпочтительно три липазы, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе. По меньшей мере, одна из указанных липаз обладает повышенной аффинностью к неполным глицеридам и, по меньшей мере, одна из указанных липаз позиционно специфична к положению sn-1,3. Необязательная третья липаза предпочтительно обладает более высокой селективностью к положению sn-2, чем позиционно неспецифичные липазы.

Липазы, позиционно специфичные к положению sn-1,3, без ограничений могут быть ферментом из любого источника: *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter* sp. и *Burkholderia* sp. Указанная липаза, обладающая повышенной аффинностью к неполным глицеридам, без ограничений может быть ферментом из любого источника: *Candida antarctica* B, *Candida rugosa*, *Alcaligenes* sp. и *Penicillium camembertii*, и указанная необязательная третья липаза, обладающая более высокой селективностью в отношении положения sn-2, чем позиционно неспецифичные липазы, без ограничений, может быть получена из *Candida antarctica* A и *Pseudozyma* sp.

Также в этом способе источник жирных кислот может включать, по меньшей мере, один из компонентов, таких как соевое масло, масло канолы, рапсовое масло, оливковое масло, касторовое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло, арахисовое масло,

хлопковое масло, ятрофное масло, жир животного происхождения, отходы кулинарного жира, триглицериды масел из несъедобных растительных источников или любую смесь, по меньшей мере, двух из них.

Липазы могут быть вместе иммобилизованы на подходящем носителе, предпочтительно на носителе на основе гидрофобного алифатического полимера или на гидрофобном ароматическом полимерном носителе. Любая из указанных липаз может быть иммобилизована на подходящем носителе, где носители, на которые иммобилизованы указанные липазы, идентичны или различаются.

Носитель предпочтительно является пористым носителем, который может быть органическим или неорганическим. Примерами носителей являются пористые неорганические носители, такие как носители на основе кремнезема или глинозема, но не ограниченные только ими, и органические носители, такие как полимерные носители или носители на основе полимера, но не ограниченные только ими, и носители необязательно могут содержать активные функциональные группы, выбираемые из эпокси групп и альдегидных групп, или ионных групп.

Также в способе этого аспекта изобретения за превращении ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот можно следить в различные моменты времени в ходе реакции, реакционную среду можно удалять с помощью подходящих способов в любой требуемый момент в ходе реакции, останавливая таким образом реакцию, и образованные сложные метиловые эфиры жирных кислот и необязательно образованный глицерин выделяют из реакционной среды. Реакцию можно специфически останавливать, если превращение ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот достигло, по меньшей мере, 70%, предпочтительно, по меньшей мере, 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, 95%.

В еще одном аспекте изобретение относится к микроводному способу в отсутствие растворителей для получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно сложных короткоцепочечных алкиловых эфиров жирных кислот, таких как сложные метиловые эфиры (биодизель), включающему:

(а) предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление короткоцепочечного спирта, предпочтительно метанола или донора любого другого спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока превращение ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот не достигнет, по меньшей мере, 70%, где указанный препарат липаз включает, по меньшей мере, одну липазу, иммобилизованную на подходящем носителе, или смесь, по меньшей мере, двух липаз и предпочтительно трех липаз, которые вместе или по отдельности иммобилизованы на подходящем носителе, при постоянном удалении образующегося глицерина из реакционной среды, для получения органической фазы, содержащей в основном отстатки непрореагировавших триглицеридов и образованных сложных алкиловых эфиров жирных кислот; и (б) реакцию указанной органической фазы с короткоцепочечным свободным спиртом, предпочтительно метанолом или донором любого другого спирта, в присутствии препарата липаз, как указано на стадии (а) в подходящих условиях, пока превращение ацильных групп жирных кислот или свободных жирных кислот, включенных в указанный источник жирных кислот, в сложные

метиловые эфиры жирных кислот не достигнет, по меньшей мере, 95%.

Липазы, препараты липаз, носитель ферментов, источник жирных кислот в способе этого аспекта сходны с теми, которые применяют в других аспектах.

5 Еще изобретение относится к способу получения смеси липаз, иммобилизованных на нерастворимом носителе, указанная смесь включает липазу, полученную из *Candida antarctica* В и, по меньшей мере, одну липазу, полученную из *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp. и *Thermomyces lanuginosa*, способ включает стадии (а) контакта буферного раствора, содержащего одну из указанных выше липаз и другого буферного раствора, содержащего вторую липазу, или одного единственного буферного раствора, содержащего смесь указанных выше липаз, с полимерным носителем, предпочтительно с ионообменной смолой или адсорбентом; в частности, с гидрофобным алифатическим носителем или носителем на основе ароматического полимера, предпочтительно в присутствии гидрофобного органического растворителя, такого как н-гексан, добавленного в среду для иммобилизации в соотношениях буфер : органический растворитель от 1:10 до 10:1, соответственно; (b) смешивания системы, полученной на стадии (а), в течение, по меньшей мере, 4 часов при комнатной температуре; (с) 10 фильтрования смеси иммобилизованных липаз и высушивания ее до тех пор, пока содержание воды не станет меньше 5%.

Нерастворимый носитель, применяемый в этом аспекте изобретения, предпочтительно 20 является пористым и сетчатым гидрофобным алифатическим носителем или носителем на основе ароматического полимера, в частности, Amberlite XAD 7HP или Amberlite XAD 1600, соответственно.

Изобретение также относится к биодизелю, полученному с помощью способа, в котором применяют смесь иммобилизованных липаз, полученную с помощью способа 25 изобретения.

Указанные сложные эфиры короткоцепочечных алкилов и жирных кислот во всех аспектах изобретения предпочтительно являются сложными метиловыми, этиловыми, изо-пропиловыми или бутиловыми эфирами жирных кислот (биодизелем).

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения сложных алкиловых 30 эфиров жирных кислот, предпочтительно сложных эфиров короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности сложных метиловых эфиров жирных кислот, в системе, не содержащей растворителя, включающему предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление свободного спирта, предпочтительно короткоцепочечного свободного спирта, в частности метанола или более высокомолекулярного спирта, или 35 донора любого другого спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные алкиловые эфиры жирных кислот, предпочтительно в сложные эфиры короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности сложные метиловые эфиры 40 жирных кислот (FAME), где указанный препарат липаз включает первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе и где указанная первая липаза демонстрирует более высокую трансэстерификационную активность в отношении триглицеридов по сравнению с ее активностью в отношении неполных глицеридов, а указанная вторая липаза 45 демонстрирует более высокую трансэстерификационную активность в отношении неполных глицеридов по сравнению с ее активностью в отношении триглицеридов, и где две указанные липазы демонстрируют синергический эффект в своей трансэстерификационной активности при получении конечного продукта.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно сложных эфиров короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности сложных метиловых эфиров жирных кислот, в системе, не содержащей растворителей, включающему предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление свободного спирта, в частности, короткоцепочечного свободного спирта, предпочтительно метанола или более высокомолекулярного спирта, или донора любого другого спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные алкиловые эфиры жирных кислот, предпочтительно сложные эфиры короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности, в сложные метиловые эфиры (FAME), где указанный препарат липаз включает первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, и где указанная первая липаза высвобождает промежуточные продукты в первой реакции трансэстерификации, которые являются предпочтительными для указанной второй липазы в трансэстерификации со спиртом с образованием сложных алкиловых эфиров жирных кислот.

Изобретение, кроме того, относится к способу получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот, предпочтительно сложных эфиров короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности сложных метиловых эфиров жирных кислот, в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающему предоставление источника жирных кислот, поэтапное добавление свободного спирта, предпочтительно короткоцепочечного свободного спирта, в частности метанола или более высокомолекулярного спирта, или любого другого свободного спирта или донора спирта, к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные алкиловые эфиры жирных кислот, предпочтительно в сложные эфиры короткоцепочечных алкилов и жирных кислот, в частности в сложные метиловые эфиры (FAME), где указанный препарат липаз включает первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, и где указанные липазы демонстрируют различные субстратные специфичности, которые обеспечивают их трансэстерификационную активность в отношении триглицеридов, при условии, что их используют вместе, тогда как, по меньшей мере, одна из двух указанных липаз теряет активность в среде для реакции трансэстерификации, если ее используют отдельно саму по себе с триглицеридами в качестве субстрата, но демонстрирует высокую трансэстерификационную/эстерификационную активность с неполными глицеридами и жирными кислотами в качестве субстратов, соответственно.

Источник жирных кислот, по меньшей мере, является одним из триглицеридов, неполных глицеридов, одной из свободных жирных кислот, одним из фосфолипидов, сложных эфиров и амидов жирных кислот или смесью, включающей, по меньшей мере, два указанных источника.

Носитель может быть сетчатым гидрофобным полимером, состоящим из дивинилбензола или смеси дивинилбензола и стирола, и сетчатым гидрофобным алифатическим полимером, состоящим из алифатических акриловых полимеров. Носитель предпочтительно является пористым матриксом с размером пор в диапазоне 25-1000 Å и предпочтительно в диапазоне 40-100 Å.

Изобретение будет описано более подробно с помощью прилагаемых чертежей.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Эстерификационная активность CALB, липазы PS, липазы TL, каждая из которых по отдельности иммобилизована на Amberlite XAD 7HP. Условия реакции: олеиновую кислоту (2,5 г) и метанол (3 порции, каждая по 95 мг) смешивали с 250 мг иммобилизованной липазы при 30°C в течение 6 часов. Одну и ту же порцию биокатализатора использовали в 50 реакционных циклах в одних и тех же условиях.

Фигура 2: Трансэстерификационная активность CALB, липазы PS, липазы TL, все ферменты были иммобилизованы по отдельности на Amberlite XAD 7HP. Условия реакции: соевое масло (2,5 г) и метанол (3 порции, каждая по 91 мг) смешивали с 250 мг иммобилизованной липазы при 30°C в течение 6 часов. Одну и ту же порцию биокатализатора использовали в 50 реакционных циклах в одних и тех же условиях.

Фигура 3: Трансэстерификационная активность мультилипазы, иммобилизованной на Amberlite XAD 7HP, или для CALB и липазы TL, или для CALB и липазы PS. Условия реакции: соевое масло (2,5 г) и метанол (3 порции, каждая по 91 мг) смешивали с 250 мг иммобилизованной липазы при 30°C в течение 6 часов. Одну и ту же порцию биокатализатора использовали в 50 реакционных циклах в одних и тех же условиях.

Фигура 4: FAME в % в двухстадийном способе трансэстерификации с помощью липазы PS и CALB, оба фермента иммобилизованы на Amberlite XAD 7HP. Условия реакции: реакцию начинали добавлением биокатализатора (30 г) к соевому маслу (220 г) и метиловому спирту (23,9 г) в стеклянном реакторе с двойной рубашкой, имеющем дно с фильтром из спеченного стекла с пористостью 70-100 мкм. Метанол добавляли порциями, каждая порция составляла 1/3 от стехиометрического количества, или титровали по каплям. Реакционную систему механически перемешивали при 30°C в течение 2 часов. Реакционную среду после первой стадии удаляли, центрифугировали, чтобы убрать глицерин и затем вводили в реактор для второй стадии и перемешивали в течение двух часов.

Осуществление изобретения

Чтобы усовершенствовать и облегчить энзиматическое получение биодизеля, настоящее изобретение в первую очередь нацелено на предупреждение деактивации ферментов или потери ферментативной активности вследствие отсоединения иммобилизованного фермента от носителя, на котором он иммобилизован, которое обычно происходит из-за воздействия метанола, который является одним из исходных веществ, или из-за воздействия глицерина и воды, образуемых в этом процессе. Липаза Novozyme 435 {липаза *Candida antarctica* Б), иммобилизованная на адсорбенте, которую использовали в прошлом, характеризуется потерей активности менее чем через 10 реакционных циклов из-за указанного выше снижения ферментативной активности. Целью настоящего изобретения является решение этой проблемы.

Кроме того, чтобы достичь превращений до уровня более чем 96%, время реакции трансэстерификации масел и метанола становится относительно долгим и обычно составляет диапазон 24-48 часов с указанным ферментом Novozyme 435, а также с другими липазами. Также целью изобретения является обеспечение способа и препаратов ферментов, которые должны значительно уменьшить время реакции.

Кроме того, побочный продукт глицерин, образующийся при этом способе, приводит к снижению ферментативной активности, так как он остается на частицах биокатализатора. Прилипание глицерина к биокатализаторам приводит к снижению или иногда к полной потере ферментативной активности. Способ и препараты изобретения также нацелены на решение этой проблемы.

Кроме того, в работах предшествующего уровня техники использовали липазы,

которые приводили к образованию и аккумуляции в реакционной системе неполных глицеридов, включающих моно- и диглицериды. Низкие скорости реакции трансэстерификации у таких липаз для этих субстратов вызывали увеличение времени реакции, необходимого для того, чтобы достигнуть превращения более чем на 96%.

5 Настоящее изобретение обеспечивает препараты ферментов, систему и способ, которые облегчают высокую скорость выведения образующихся интермедиатов в ходе ферментативной трансэстерификации и таким образом достигают высокой степени превращения в короткие времена реакции.

В частности, изобретение обеспечивает применение мультиферментной системы в 10 одно- или двухстадийных способах, которое преодолевает указанные выше затруднения, приводит к неожиданным результатам, и демонстрирует синергизм между иммобилизованными ферментами и устраняет деактивацию ферментов или потерю ферментативной активности, в том числе и из-за эффективных комбинаций липаза-липаза, а также комбинаций липаза-матрикс.

15 Авторы настоящего изобретения, таким образом, усовершенствовали высокоактивные и стабильные препараты иммобилизованных ферментов, обладающих высокой устойчивостью в отношении гидрофильных субстратов, таких как короткоцепочечные спирты, полиолы и короткоцепочечные жирные кислоты, для 20 улучшения ферментативных способов получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот, в особенности сложных метиловых эфиров жирных кислот «биодизеля». Кроме того, как было указано выше в разделе «Раскрытие изобретения», смесь липаз также может состоять из более чем двух липаз, предпочтительно быть смесью из трех липаз, где первая липаза обладает позиционной специфичностью к положению sn-1,3, вторая липаза обладает большей селективностью в отношении положения sn-2, чем позиционно 25 неспецифичные липазы, в частности чем позиционно неспецифичные липазы, полученные из *Candida rugosa*, и третья липаза обладает повышенной аффинностью в отношении моно- и диглицеридов.

Следует отметить, что по всему тексту заявки, если ссылаются на положения sn-1, sn-2- или sn-3, то речь идет о положениях в углеродном скелете глицерина в различных 30 глицеридах.

То, что липаза обладает более высокой селективностью в отношении положения sn-2, чем позиционно неспецифичная липаза, означает, что такой фермент предпочтительно катализирует реакцию между спиртом или донором спирта с жирнокислотной группой в положении sn-2, тогда как позиционно неспецифичные липазы демонстрируют одну 35 и ту же трансэстерификационную активность в отношении жирнокислотных групп во всех трех положениях углеродного скелета глицерина.

Как будет показано ниже в разделе «Примеры» (например, при отсылке к *Candida Antarctica A (CALA)*), некоторые ферменты уникальным образом демонстрируют позиционную активность в отношении положения sn-2, в особенности в специфических 40 условиях, определяемых субстратами, продуктами и т.д. Ферменты, применяемые в этом документе в этом качестве, демонстрируют дифференцированную позиционную селективность относительно положения sn-2 и способность к трансэстерификации sn-2 неполных глицеридов.

Усовершенствованный биокатализатор состоит из смеси липаз различных типов, 45 иммобилизованных на полимерном матриксе, предпочтительно пористом, сетчатом матриксе на основе гидрофобных алифатических или ароматических полимеров. В соответствии с изобретением различные липазы могут быть иммобилизованы в одном и том же реакционном сосуде или по отдельности, на одном и том же или различных

носителях. Необязательно различные липазы могут быть иммобилизованы по отдельности на различных носителях, в зависимости от наилучшей комбинации фермент-носитель, в соответствии с их устойчивостью к короткоцепочечным спиртам, эстерификационной/трансэстерификационной активностью и временем эксплуатации для биокатализатора. Смесь липаз в соответствии с изобретением включает липазу, которая является позиционно специфичной к положению sn-1, 3, вместе с позиционно неспецифичной липазой, в частности, липазу, которая обладает аффинностью в отношении неполных глицеридов, и необязательно третью липазу с высокой аффинностью в отношении положения sn-2.

Липаза, позиционно специфичная к положению sn-1,3, может быть липазой из *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter* sp. или *Burkholderia* sp., но не ограничивается только ими. Липаза с более высокой специфичностью в отношении положения sn-2 по сравнению с позиционно неспецифичными липазами может быть липазой из *Candida antarctica* A и липазой из *Pseudozyma* sp., но не ограничивается только ими. Липаза, обладающая повышенной аффинностью к неполным глицеридам, может быть липазой из *Candida antarctica* B, *Candida rugosa*, *Alcaligenes* sp. или *Penicillium camembertii*, но не ограничивается только ими. Другие липазы, рассматриваемые в объеме настоящей заявки, могут быть липазами из *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium viscosum*, липазой семян папайи или панкреатина.

Иммобилизацию различных липаз можно проводить или в одном сосуде, или по отдельности.

Нерастворимый носитель способен к связыванию липаз путем физической адсорбции или путем ковалентного связывания с его функциональными группами. Термины «физически адсорбированный» или «физическая адсорбция», используемые в этом документе, могут быть синонимами терминов «иммобилизованный» и «иммобилизация», соответственно. Термины «носитель» и «матрикс» могут быть использованы в этом документе как синонимы. Носитель предпочтительно является гидрофобным пористым носителем, который может быть органическим или неорганическим, и который предпочтительно выбирают из группы, состоящей из пористого неорганического носителя, такого как носители на основе оксида кремния или оксида алюминия, органических носителей, например, включающих без ограничения гидрофобные алифатические и акриловые сетчатые полимеры, или носителя на основе гидрофобных ароматических сетчатых полимеров, такого как Amberlite^R XAD 7HP и Amberlite^R XAD 1600, соответственно, где указанный носитель необязательно может содержать активные функциональные группы, такие как эпоксигруппы или альдегидные группы, или ионные группы. Специфическими примерами подходящих носителей, не ограничивающих настоящее изобретение, являются Amberlite XAD, такой как XAD 4, XAD 16, XAD-1600, XAD 7HP, XAD 16HP, XAD 1180, Amberlite FPA53, Amberlite FPC22H, Amberlite FPA40C1, Amberlite IRC50, Duolite, такой как A7, A561, A568 и Duolite C467, Amberlyst A-21, Dowex Monosphere 77, Dowex Optipore L493, Dow Styrene DVB, MTO Dowex Optipore SD-2, Dowex MAC-3, Purolite A109, и Sepabeads, такой как EC-EA, EC-EP, EC-BU и EC-OD.

Предпочтительными являются носители, которые состоят из гидрофобных сетчатых ароматических полимеров, состоящих из дивинилбензола или дивинилбензола и стирола, и гидрофобных алифатических полимеров, состоящих из сетчатых алифатических акриловых полимеров.

В следующем аспекте изобретение обеспечивает способ получения биодизеля, как было детально описано в разделе «Раскрытие изобретения».

Кроме того, в способе получения биодизеля в соответствии с изобретением может происходить постоянное удаление всех или некоторых продуктов реакции и/или побочных продуктов, которые самопроизвольно десорбируются с носителя фермента. Самопроизвольная или спонтанная десорбция продукта/побочных продуктов с носителя, несущего фермент, является уникальным свойством иммобилизованных ферментных систем изобретения. Не ограничиваясь рамками определенного механизма, следует отметить, что это свойство может быть обусловлено гидрофобной природой матрикса, который отвечает за отталкивание образованного гидрофильного глицерина или других гидрофильных веществ, находящихся рядом с иммобилизованным биокатализатором.

Раскрытый энзиматический способ можно осуществлять или в одну стадию, или в две стадии, чтобы достичь превращения исходных материалов в соответствующие сложные алкиловые эфиры жирных кислот более чем на 98%. В новом способе, относящемся к настоящему изобретению, можно использовать препараты липаз в соответствии с изобретением или одну единственную липазу, иммобилизованную на твердом носителе.

В таком случае липаза может быть позиционно неспецифичной или специфичной к положению sn-1, 3, а комбинацию липаза/носитель тщательно конструируют, чтобы получить надежный и эффективный препарат ферментов. Десорбированный глицерин высвобождается в реакционную среду и затем его можно удалить из системы механическими способами, как описано в этом документе. Применение такой системы предупреждает образование агрегатов биокатализатора, происходящее вследствие слипания шариков при участии образованного глицерина. Образование агрегатов фермента является одним из ключевых факторов, которое вызывает снижение или маскирование ферментативной активности и которое преодолевается системой и способами изобретения.

Чтобы достичь превращений исходных материалов более чем на 98%, можно использовать две схемы способов:

1. Реактор с мешалкой и с фильтром из пористого стекла на дне, который удерживает в реакторе биокатализатор, однако обеспечивает способность реакционной среде проникать в реактор. Такое устройство реактора позволяет побочному продукту, в частности глицерину, который самостоятельно десорбируется с иммобилизованного фермента, перемещаться на дно реактора и проходить через фильтр из пористого стекла. В результате происходит постоянное удаление из реакционной среды образованного десорбированного глицерина, а также избытка воды, приводящее к сдвигу реакции в направлении синтеза, таким образом достигается превращение более чем на 98%.

Биокатализатор, используемый в этом реакторе, может включать липазы одного типа или множественных типов, в соответствии с их позиционной специфичностью, а также их источником.

2. Два последовательных реактора с мешалкой и с фильтром из пористого стекла на дне. Между двумя реакторами используют отстойник или центрифугу. Первый реактор может содержать иммобилизованный биокатализатор, включающий липазы одного или множественных типов. Роль отстойника или центрифуги, находящихся между обоими реакторами, состоит в удалении образующегося глицерина и избытка воды из реакционной среды, приводящем к повышению уровня превращения исходных веществ в соответствующие им сложные алкиловые эфиры жирных кислот, достигающего во втором реакторе более 98% в приемлемое время реакции.

В способе изобретения не происходит накопления в системе неполных глицеридов (моно- и диглицеридов). Такие неполные глицериды наряду с накапливающимся глицерином обычно являются причиной потери ферментативной активности. Как будет

показано в примерах, приведенных ниже, в способе изобретения активность биокатализатора неожиданно сохраняется при повторном применении одного и того же препарата ферментов в течение более чем 100 циклов. Время реакции сокращается до 4 часов и менее по сравнению с более чем 24 часами, когда для достижения превращения, составляющего более 96%, используют другие биокатализаторы, как было указано в разделе «Уровень техники». Такие характеристики наделяют препараты ферментов и способ изобретения высокой экономической ценностью.

Реакционная смесь, содержащаяся в термостатируемом реакторе, снабженном на дне фильтром, подвергается превращению в подходящих условиях до тех пор, пока жирнокислотные группы или жирные кислоты не превратятся в сложный алкиловый эфир жирных кислот, обычно в сложные метиловые эфиры жирных кислот. Реакционную среду фильтруют через нижний фильтр, используя силу тяжести или путем применения давления азотом в верхней части реактора.

Чтобы достичь превращения более чем на 98% в приемлемое время реакции, предпочтительно составляющее менее чем 4 часа, реакцию проводят в две стадии. Вначале источник жирных кислот реагирует с короткоцепочечным спиртом или донором спиртов, таким как метанол, в течение примерно 2 часов, когда происходит превращение в сложные алкиловые эфиры жирных кислот более чем на 70%. Реакционную среду удаляют из нижней части реактора, оставляя при этом в реакторе биокатализатор.

Реакционную среду оставляют для разделения на фазы или центрифугируют, чтобы удалить образованный глицерин. Затем верхнюю органическую фазу, содержащую в основном остатки непрореагировавших глицеридов и образованные сложные алкиловые эфиры жирных кислот, вводят в следующий второй реактор и оставляют реагировать с метанолом в присутствии липазы или нескольких липаз, иммобилизованных на полимерном матриксе.

Этот способ приводит к образованию сложных алкиловых эфиров жирных кислот в количестве, составляющем более 98%, и побочного продукта глицерина высокого качества. Полученный мультиферментный иммобилизованный препарат пригоден для повторного применения с незначительной потерей активности после повторного использования более чем в 100 циклах.

Реакцию источника жирных кислот со спиртом, таким как метанол, или донором другого спирта, с образованием биодизеля также можно проводить непрерывно путем упаковки смеси иммобилизованных ферментов в колонку и пропусканием реакционной смеси через колонку для получения требуемых продуктов.

Следует отметить, что, режим работы реактора для получения биодизеля, который может вырабатываться порциями в реакторе с мешалкой, также можно использовать непрерывно, применяя биокатализатор, упакованный в колонку.

Твердые носители, подходящие для удержания липазы/липаз, описаны выше. Некоторые специфические носители представлены ниже в разделе «Примеры», в частности в таблице 1.

Предпочтительно, гидрофобный органический растворитель, такой как н-гексан, можно добавлять в среду для иммобилизации в соотношениях буфер:органический растворитель от 1:10 до 10:1 соответственно. Иммобилизованные ферменты изобретения, полученные с помощью способа изобретения, очень активны и, в частности, стабильны и обладают высокой устойчивостью к гидрофильным субстратам, таким как короткоцепочечные спирты, короткоцепочечные жирные кислоты и другие факторы, деактивирующие ферменты, обычно присутствующие в отработанном масле. Превращение источника жирных кислот примерно на 90% на первой стадии и более

чем на 98% на второй стадии, сохраняется даже после 100 циклов реакции. Такая стабильность составляет главную экономическую ценность.

Иммобилизацию можно проводить в соответствии с методиками, описанными в этой области техники. Особенно эффективный способ иммобилизации описан в заявке на патент WO 2008/084470, одновременно поданной авторами изобретения и находящейся на рассмотрении, содержание которой включено в этот документ во всей своей полноте путем отсылки. Вкратце, получение липазы, иммобилизованной на нерастворимый носитель, проводят, обеспечивая бифазную систему, включающую водный буферный раствор и, по меньшей мере, один первый органический растворитель; путем смешивания указанного фермента, находящегося на разделе фаз, с бифазной системой; путем добавления носителя к полученной смеси и смешивания; и путем выделения из полученной смеси фермента, расположенного на поверхности раздела, иммобилизованного на указанном носителе.

Выбор фермента очень важен для продуктивности ферментного препарата изобретения, в частности для мультилипазных систем. Комбинацию следует выбирать так, чтобы исключить потерю активности в жестких условиях реакции. Этого можно достигнуть, так как би- или мультиферментные препараты в системе работают синергично. Следует понимать, что термин «синергизм», используемый в этом документе, также означает предотвращение деактивации или снижения, или потери ферментативной активности. Например, не ограничиваясь рамками определенного механизма, следует отметить, что некоторые из промежуточных продуктов трансэстерификации, в основном моноглицериды и диглицериды, как оказалось, вызывают деактивацию или снижение трансэстерификационной активности липазы, полученной из *Pseudomonas sp.* (в этом документе называемой SP) и липазы, полученной из *Thermomyces lanuginosa* (в этом документе называемой TL). С другой стороны, липаза, полученная из *Candida Antarctica B* (в этом документе называемая CALB), обладает высокой специфичностью в отношении моноглицеридов и диглицеридов. Присутствие CALB и либо PS, либо TL гарантирует синергические эффекты, как было отмечено в этом документе, и таким образом сохранение комплексного биокатализатора без значительной потери активности при повторном применении. Кроме того, присутствие дополнительной третьей липазы с высокой аффинностью в отношении положения sn-2, приводит к снижению уровня концентраций образующихся промежуточных продуктов реакции трансэстерификации, относящихся к типу sn-2 ацилированного глицерина, которые характеризуются низкой скоростью выведения из реакционной среды. Специфические комбинации ферментов и оптимальная основа для их разработки будут описаны более детально в примерах, приведенных ниже. Главное в иммобилизации липаз в контексте этой заявки состоит в том, чтобы найти наиболее подходящий матрикс, соответствующий ферментным белкам. Причина в том, что высокая трансэстерификационная активность у специфической комбинации липаза-матрикс не гарантирует сохранение активности при повторном применении. Авторы настоящей заявки, в частности, создали эффективные комбинации, такие как описаны в этом документе, но не ограниченные только ими.

Особенно предпочтительными комбинациями ферментов являются липаза TL и CALB, липаза PS и CALB, липаза TL, CALB и CALA, и липаза PS, CALB и CALA, иммобилизованные на гидрофобных матриксах, как описано в этом документе.

Применение двухлипазной или трехлипазной системы в соответствии с изобретением, которые обладают высокой активностью трансэстерификации метанола и масел, а также высокой стабильностью в экстремальных условиях реакции, обеспечивает экономическую ценность усовершенствованных биокатализаторов для получения

биодизеля при незначительной стоимости биокатализатора, который можно наиболее эффективно повторно применять.

Как будет показано в последующих примерах, в энзиматическом способе получения сложных эфиров короткоцепочечных алкилов и жирных кислот в соответствии с изобретением можно использовать первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, где указанная первая липаза демонстрирует более высокую трансэстерификационную активность в отношении триглицеридов по сравнению с ее активностью в отношении неполных глицеридов, а указанная вторая липаза демонстрирует более высокую трансэстерификационную активность в отношении неполных глицеридов в сравнении с ее активностью в отношении триглицеридов, указанные две липазы демонстрируют синергический эффект в их трансэстерификационной активности при получении конечного продукта, сложных алкиловых эфиров жирных кислот.

В еще одном воплощении препарат липаз, предназначенный для применения в способе изобретения, может включать первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, указанная первая липаза высвобождает промежуточные продукты в первой реакции трансэстерификации, которые являются предпочтительными для указанной второй липазы в трансэстерификации со спиртом или донором спиртов при образовании сложных алкиловых эфиров жирных кислот.

Спирт может включать, по меньшей мере, любой из перечисленных спиртов: метанол, этанол, изо-пропанол, н-бутанол или другой более высокомолекулярный спирт, такой как н-гексанол, н-октанол, н-деканол, н-додеканол, н-тетрадеканол, н-гексадеканол и н-октадеканол или любой донор спирта, или любую смесь, по меньшей мере, двух из них. Донор спирта предпочтительно является эфиром короткоцепочечных алкилов и карбоновой кислоты, таким как метилацетат.

Кроме того, препарат липаз может включать первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на подходящем носителе, указанные липазы демонстрируют различные субстратные специфичности, которые сохраняют их трансэстерификационную активность в отношении триглицеридов при условии, что их используют вместе, тогда как, по меньшей мере, одна из указанных двух липаз теряет активность в среде для реакции трансэстерификации, если ее используют отдельно саму по себе с триглицеридами в качестве субстрата, но демонстрирует высокую трансэстерификационную/эстерификационную активность с неполными глицеридами или жирными кислотами в качестве субстратов.

Все, что раскрыто и описано в этом документе, следует понимать таким образом, что это изобретение не ограничивается частными примерами, стадиями способа и веществами, раскрытыми в этом документе, так как стадии способа и вещества могут в некоторой степени быть изменены. Также следует понимать, что терминология, используемая в этом документе, применяется только для описания специфических воплощений и не предназначена для ограничения, так как объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Необходимо отметить, что в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают множественное число, за исключением тех случаев, когда содержание предписывает иной смысл.

По всему описанию и в последующей формуле изобретения, в тех случаях, когда контекст предусматривает иное, слово «включают» («содержат») и варианты, такие как «включает» («содержит») и «включающий» («содержащий»), следует понимать как

включение точно определенного единого целого или стадии или группы единых целых, но не исключение любого другого единого целого или другой стадии или группы единых целых или стадий.

Приведенные ниже примеры являются образцами методов, применяемых авторами изобретения, для осуществления аспектов настоящего изобретения. Следует понимать, что хотя эти методики представляют собой примеры предпочтительных воплощений для практического осуществления изобретения, специалисты в этой области техники с учетом настоящего описания признают, что можно осуществить множество модификаций, не выходя за пределы объема настоящего изобретения.

10 Примеры

Пример 1. Получение одиночной липазы, иммобилизованной на полимерном носителе Липазу, полученную из *Thermomyces lanuginosa* ((TL), 1 мл Lipozyme TL 100L) или концентрат липазы, полученной из *Thermomyces lanuginosa* (Novozymes, Denmark), растворяли в 0,05 М растворе TRIS-буфера (12 мл), pH 8. Раствор липазы приводили в 15 контакт с носителем фермента (1 г, различные применяемые носители представлены ниже в таблице 1) путем встряхивания или перемешивания в течение 8 часов при комнатной температуре. Предпочтительно в среду для иммобилизации добавляли гидрофобный органический растворитель, такой как н-гексан, в соотношениях буфер : органический растворитель от 1:10 до 10:1, соответственно. Носитель, содержащий 20 иммобилизованный фермент, фильтровали и высушивали в эксикаторе в течение ночи для получения иммобилизованной липазы. Эту же процедуру повторяли, используя или липазу, полученную из *Pseudomonas* sp. (100 мг липазы PS, Amano Enzyme, Japan), липазу, полученную из *Alcaligenes* sp. (50 мг липазы QLM, Meito Sangyo, Japan), липазу из *Candida antarctica* A (1 мл CALA, Novozymes, Denmark) или концентрат липазы из 25 *Candida antarctica* B (1 мл, CALB-L, Novozymes, Denmark). Эти иммобилизованные липазы можно использовать или по отдельности в новом способе изобретения, или в комбинации в различных весовых соотношениях в одностадийной реакционной системе или в последовательном двухстадийном способе, или способе с большим количеством стадий для получения сложных алкиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) с помощью 30 реакций эстерификации/трансэстерификации источника жирных кислот и спирта, обычно метанола для получения биодизеля. Химический реактор для производства биодизеля может функционировать в режиме получения партий в химическом реакторе с мешалкой или в непрерывном режиме, если биокатализатор упакован в колонку.

Пример 2. Получение мультилипазных иммобилизованных биокатализаторов 35 Липазу, полученную из *Thermomyces lanuginosa* (1 мл Lipozyme TL 100L, Novozymes, Denmark), и концентрат липазы, полученной из *Candida antarctica* B (1 мл, CALB-L, Novozymes, Denmark), растворяли в 0,05 М буферном растворе (12 мл), pH 8. Раствор, содержащий оба фермента, приводили в контакт с носителем, таким как Amberlite XAD 7HP или Amberlite XAD 1600 (1 г), оба носителя получали от Rohm and Haas, USA путем 40 встряхивания или перемешивания в течение 8 часов при комнатной температуре. Предпочтительно в среду для иммобилизации добавляли гидрофобный органический растворитель, такой как н-гексан, в соотношениях буфер : органический растворитель от 1:10 до 10:1, соответственно. Носитель, содержащий иммобилизованные ферменты, фильтровали и высушивали в эксикаторе в течение ночи для получения 45 иммобилизованного мультилипазного препарата. Эту же процедуру повторяли, используя раствор, содержащий любую пару, состоящую из двух липаз: липазу PS (100 мг, Amano Enzyme, Japan) и концентрат липазы *Candida antarctica* B (1 мл, CALB-L, Novozymes, Denmark) или липазу PS (100 мг, Amano Enzyme, Japan) и концентрат липазы

Thermomyces lanuginosa (1 мл, CALB-L, Novozymes, Denmark). Другие мультиферментные системы можно получить, например, используя липазу, полученную из *Alcaligenes* sp. (50 мг, липаза QLM, Meito-Sangyo, Japan) в комбинации либо с липазой PS, либо с липазой TL. Другие препараты липаз могут содержать три различных фермента, в частности

липазу TL, CAL-A и CAL-B или липазу PS, CAL-A и CAL-B, все иммобилизованные на одном и том же или на различных носителях.

Пример 3. Получение сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME, биодизель) с помощью иммобилизованных липаз

Таблица 1 показывает процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME%) в реакции трансэстерификации с использованием липаз, полученных из *Thermomyces lanuginosa* (TL), *Pseudomonas* sp. (PS) и *Candida antarctica* B (CALB), каждая из которых была иммобилизована по отдельности на различных носителях. Реакции проводили путем добавления иммобилизованной липазы (30 г) к соевому маслу (220 г) и метиловому спирту (23,9 г) (стехиометрическое соотношение 1:3 между триглицеридами масла и метанолом, соответственно) в стеклянном реакторе с двойной рубашкой, имеющем дно с фильтром из спеченного стекла с пористостью 70-100 мкм. Метанол добавляли порциями, каждая порция составляла 1/3 от стехиометрического количества, или титровали по каплям. Концентрация воды во всех реакционных системах была в диапазоне 0,1-2%. Реакционную систему механически перемешивали при 30°C. Степень превращения исходных веществ определяли путем измерения процента сложных метиловых эфиров жирных кислот, неполных глицеридов и триглицеридов, используя GC через 8 часов реакции в указанных выше условиях.

Результаты приведены в таблице 1, которая показывает процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот в системе трансэстерификации, включившей триглицериды соевого масла (220 г) и метанол (23,9 г) с помощью различных индивидуально иммобилизованных липаз, полученных в соответствии с примером 1 (30 г). Реакционную смесь механически перемешивали при 30°C в течение 8 часов.

Иммобилизованная липаза/Тип носителя	Липаза <i>Thermomyces lanuginosa</i> FAME (%)	Липаза <i>Pseudomonas</i> sp. FAME (%)	Липаза <i>Candida antarctica</i> FAME (%)
Amberlite XAD 4	45	55	20
Amberlite XAD 16	47	85	55
Amberlite XAP 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 DVБ	5	35	5
MTO Dowex optipore SD-2	5	75	5

Иммобилизованная липаза/ Тип носителя	Липаза <i>Thermomyces lanuginosa</i> FAME (%)	Липаза <i>Pseudomonas</i> sp. FAME (%)	Липаза <i>Candida antarctica</i> FAME (%)
Dowex MAC-3	0		0
Amberlite FPA53	45	70	35
Amberlite FPC22H	0	0	0

Amberlite FPA40C1	45	47	45
Amberlite IRC50	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

Пример 4. Синтез сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) с помощью препарата иммобилизованных мультилипаз

Таблица 2 демонстрирует процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME%) в реакции трансэстерификации с помощью препарата мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD 7HP, включавших либо липазу *Thermomyces lanuginosa* (TL) и липазу *Candida antarctica* B (CALB), либо липазу *Pseudomonas* sp.(PS) и липазу *Candida antarctica* B, которые были иммобилизованы по отдельности или вместе на один и тот же носитель в одностадийной системе. Также, вместо CALB использовали липазу из *Alcaligenes*. sp.(липаза QLM, Meito-Sangyo, Japan) в комбинации с липазами PS или TL. Реакции проводили путем добавления препарата иммобилизованных липаз (30 г) к соевому маслу (220 г) и метиловому спирту (23,9 г) в стеклянном реакторе с двойной рубашкой, имеющем дно с фильтром из спеченного стекла с пористостью 70-100 мкм. Метанол добавляли порциями, каждая порция составляла 1/3 от стехиометрического количества, или титровали по каплям. Реакционную систему механически перемешивали при 30°C. Степень превращения исходных веществ определяли путем измерения процента сложных метиловых эфиров жирных кислот, неполных глицеридов и триглицеридов, используя газовую хроматографию (GC) через 2, 3 и 6 часов реакции в указанных выше условиях.

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что липазы TL и PS не способны образовывать FAME в концентрациях, превышающих 95%, через 6 часов реакционного времени, наряду с тем, что трансэстерификационная активность CALB была относительно низкой. Препарат иммобилизованных мультилипаз, включающий липазы TL и CALB, неожиданно продемонстрировал более высокую трансэстерификационную активность, чем в контрольных экспериментах с отдельным использованием липаз TL или CALB.

Как показано в таблице 2, препарат иммобилизованных мультилипаз, содержащий липазу PS и CALB, также демонстрировал улучшенную и синергическую трансэстерификационную активность, обычно составляющую более 99%, по сравнению с менее 86% в контрольных экспериментах. Такую же тенденцию с синергическим эффектом наблюдали при использовании липазы QLM в комбинации с липазами TL и PS.

Таблица 2 показывает процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот через 2, 3 и 6 часов реакционного времени в трансэстерификационной системе, включавшей триглицериды соевого масла (220 г) и метанол (23,9 г), с помощью различных смесей мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD 7HP, полученных в соответствии с примером 2, а также с помощью иммобилизованных липаз, полученных в соответствии с примером 1, в качестве контрольных экспериментов. Реакционную смесь механически перемешивали при 30°C в течение 6 часов.

Липаза, иммобилизованная на Amberlite XAD 7HP	FAME (%) через 2 часа	FAME (%) через 3 часа	FAME (%) через 6 часов
Липаза <i>Thermomyces lanuginosa</i> (контроль)	75	82	85

Липаза <i>Pseudomonas</i> sp.(контроль)	74	81	86
Липаза <i>Candida antarctica</i> B (контроль)	10	18	42
Липаза <i>Alcaligenes</i> sp.(липаза QLM)	52	67	88
Липазы <i>Thermomyces lanuginosa</i> и <i>Candida antarctica</i> B	82	87.	96
5 Липазы <i>Pseudomonas</i> sp.и <i>Candida antarctica</i> B	82	96	99,7
Липазы <i>Alcaligenes</i> sp.и <i>Thermomyces lanuginosa</i>	71	78	96
Липазы <i>Alcaligenes</i> sp.и <i>Pseudomonas</i> sp.	86	98	99,5

10 Пример 5. Эстерификационная активность иммобилизованных липаз после повторного применения в многократно повторяющихся реакциях с использованием одной и той же порции биокатализатора

15 Эстерификационную активность биокатализаторов анализировали путем добавления одной из трех липаз (TL, PS, CALB), иммобилизованной на Amberlite XAD 7HP (250 мг), во флакон с завинчивающейся крышкой, содержащий олеиновую кислоту (2,5 г) и 1/3 стехиометрического количества метанола (285 мг). Оставшиеся 2/3 количества метанола добавляли двумя равными порциями через 2 часа и через 4 часа реакционного времени. Состав реакционной смеси анализировали через 6 часов. Реакционную среду отбирали из флакона и вносили новую порцию свежих субстратов, используя ту же самую порцию фермента. Фигура 1 показывает % FAME в реакционной среде при использовании одной и той же порции липазы PS, липазы TL или CALB, каждая из которых по отдельности была иммобилизована на Amberlite XAD 7HP, в 50 реакционных циклах.

20 Результаты, представленные на фигуре 1, показывают, что все препараты иммобилизованных CALB, липазы PS и TL эффективно катализировали эстерификацию свободных жирных кислот и метанола. Эстерификация активность CALB после 25 повторного применения была стабильной после 50 реакционных циклов, тогда как липазы TL и PS линейно теряли 26% и 16% исходной эстерификационной активности после 50 реакционных циклов, соответственно.

30 Пример 6. Трансэстерификационная активность иммобилизованных липаз после повторного применения в многократно повторяющихся реакциях с использованием одной и той же порции биокатализатора

35 Трансэстерификационную активность биокатализаторов при повторном применении анализировали путем добавления одной из трех липаз, иммобилизованной на Amberlite XAD 7HP (250 мг), во флакон с завинчивающейся крышкой, содержащий соевое масло (2,5 г) и 1/3 стехиометрического количества метанола (91 мг). Оставшиеся 2/3 количества метанола добавляли двумя равными порциями через 2 часа и через 4 часа реакционного времени. Состав реакционной смеси анализировали через 6 часов. Реакционную среду отбирали из флакона и вносили новую порцию свежих субстратов, используя ту же самую порцию фермента.

40 Фигура 2 показывает Трансэстерификационную активность CALB, липазы PS и липазы TL по отдельности в 50 реакционных циклах с использованием той же самой порции биокатализатора. Результаты показывают, что Трансэстерификационная 45 активность обеих липаз PS и TL обеспечивает % FAME, который ниже 85%, и линейно теряют свою исходную Трансэстерификационную активность, достигая в среднем 70% от нее, после 50 реакционных циклов. Исходная Трансэстерификационная активность CALB было относительно низкой и неожиданно линейно во времени исчезала после 11 реакционных циклов.

Пример 7. Применение CALB со сниженной трансэстерификационной активностью в реакциях эстерификации жирных кислот и спирта

CALB, иммобилизованную на Amberlite XAD 7HP, которая теряла свою Трансэстерификационную активность после 11 реакционных циклов, как было описано в примере 6 (250 мг), использовали для эстерификации олеиновой кислоты (2,5 г) и метанола (285 мг). В 10 реакционных циклах использовали одну и ту же порцию биокатализатора. Анализ результатов неожиданно показал, что биокатализатор обладает высокой эстерификационной активностью, хотя он терял свою Трансэстерификационную активность в предшествующих экспериментах. Средний % FAME в 10 последовательных прогонах с использованием одной и той же порции биокатализатора составил 85%.

Пример 8. Применение CALB со сниженной трансэстерификационной активностью в реакциях трансэстерификации неполных глицеридов и спирта

CALB, иммобилизованную на Amberlite XAD 7HP, которая теряла свою трансэстерификационную активность после 11 реакционных циклов, как было описано в примере 6 (250 мг), использовали для трансэстерификации моноолеина (3 г) и метанола (270 мг). В 10 реакционных циклах использовали одну и ту же порцию биокатализатора. Анализ результатов неожиданно показал, что биокатализатор обладает высокой эстерификационной активностью в отношении неполных глицеридов и метанола, хотя в предшествующих экспериментах он терял свою трансэстерификационную активность в отношении триглицеридов и метанола. Средний % FAME в 10 последовательных прогонах с использованием одной и той же порции биокатализатора был выше 80%.

Пример 9. Трансэстерификационная активность препарата иммобилизованных мультилипаз после повторного применения в многократно повторяющихся реакциях с использованием одной и той же порции биокатализатора

Трансэстерификационную активность препаратов иммобилизованных мультилипаз анализировали путем добавления либо липаз PS и CALB, либо липаз TL и CALB, все из них были иммобилизованы на Amberlite XAD 7HP (250 мг) в соответствии с примерами 1 или 2, во флакон с завинчивающейся крышкой, содержащий соевое масло (2,5 г) и 1/3 стехиометрического количества метанола (91 мг). Оставшиеся 2/3 количества метанола добавляли двумя равными порциями через 2 часа и через 4 часа реакционного времени. Состав реакционной смеси анализировали через 6 часов. Реакционную среду отбирали из флакона и вносили новую порцию свежих субстратов, используя ту же самую порцию фермента.

Фигура 3 показывает % FAME в реакционной среде при использовании одной и той же порции биокатализатора в 50 циклах. Результаты, представленные на фигуре 3, показывают, что Трансэстерификационная активность обоих препаратов мультилипаз неожиданно была стабильной в 50 реакционных циклах при использовании одной и той же порции биокатализатора.

Пример 10. Синтез сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) с использованием препарата иммобилизованных мультилипаз в двухстадийном способе

Таблица 3 показывает, что % FAME в реакционной среде трансэстерификации при использовании препарата мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD 7HP, включавших либо липазы TL и CALB, либо липазы PS и CALB, которые были иммобилизованы по отдельности или в одностадийной системе. Реакции проводили путем добавления препарата иммобилизованных липаз (30 г) к соевому маслу (220 г) и метиловому спирту (23,9 г) в стеклянный реактор с двойной рубашкой, имеющий дно с фильтром из спеченного стекла с пористостью 70-100 мкм. Метанол добавляли порциями, каждая порция составляла 1/3 от стехиометрического количества, или титровали по каплям. Реакционную систему механически перемешивали при 30°C в

течение 2 часов. Когда превращение субстратов предпочтительно достигало более 70%, реакционную среду фильтровали через нижний фильтр реактора, применяя давление сжатого азота или используя силу тяжести, действующую на фильтр из спеченного стекла. Реакционную среду или центрифугировали, или оставляли на некоторое время для разделения фаз. Нижнюю фазу, содержащую глицерин, удаляли, а органическую фазу, содержащую непрореагировавшие глицериды и FAME, вносили в следующий второй реактор с двойной рубашкой, имеющий дно с фильтром из спеченного стекла, содержащий иммобилизованную липазу. Среду во втором реакторе механически перемешивали с одной третью стехиометрического количества исходно требуемого метанола в течение 2 часов при 30°C. За протеканием реакции следили, измеряя процент сложных метиловых эфиров жирных кислот, неполных глицеридов и триглицеридов с помощью GC через 2 часа.

Результаты, приведенные в таблице 3, показывают, что обе липазы TL и PS, применяемые в контрольных экспериментах, способны обеспечивать % FAME, который ниже 85% на первой стадии и который составляет 98% на второй стадии, тогда как CALB, иммобилизованная на Amberlite 7HP, демонстрирует относительно низкую трансэстерификационную активность, которая не превышает 15% после двустадийной реакции. Препарат мультилипаз, включающий липазу PS и CALB, обеспечивает 92% FAME на первой стадии и 100% на второй стадии. Аналогичным образом, препарат мультилипаз, включающий липазу TL и CALB, обеспечивает относительно высокий % FAME, составляющий 90%, и практически полное превращение на второй стадии. Комбинация липаз TL и PS обеспечивает высокий процент FAME на первой стадии и практически полное превращение на второй стадии. Эти результаты подтверждают синергизм в трансэстерификационной активности применяемых комбинаций липаз, описанных выше.

Таблица 3 показывает процент образовавшихся сложных метиловых эфиров жирных кислот через 2 часа реакционного времени на каждой стадии для трансэстерификационной реакционной системы, включающей триглицериды соевого масла (220 г) и метанол (23,9 г), при использовании препарата различных мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD 7HP, полученного в соответствии с примером 2. Реакционную смесь механически перемешивали при 30°C в течение 2 часов. После разделения фаз верхнюю органическую фазу вносили во второй реактор, содержащий иммобилизованную липазу, которая функционирует в тех же самых условиях реакции.

№ стадии	Липаза PS FAME (%)	Липаза TL FAME (%)	CALB FAME (%)	PS/CALB FAME (%)	TL/CALB FAME (%)	PS/TL FAME (%)
Стадия 1	80	85	5	92	90	85
Стадия 2	98	98	15	100	99	99

Таблица 3 показывает различные возможности для различных комбинаций синергических ферментов (как можно видеть на фигурах 3 и 4, где были использованы мультиферментные системы, в сравнении с фигурой 2, где использовали один фермент).

Реакционное время сокращается до 2-3 часов из-за присутствия CALB, которая обеспечивает очистку от промежуточных неполных глицеридов, а именно моно- и диглицеридов, в дополнение к очистке от образованного глицерина, обычно обеспечивающего увеличение реакционного времени и деактивацию фермента в том случае, если применяют только липазу PS или только липазу TL по отдельности.

Пример 11. Синтез сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) при

использовании препарата иммобилизованных мультилипаз в двухстадийном способе с помощью одного и того же биокатализатора в последовательных порциях

5 Фигура 4 показывает % FAME на стадиях 1 и 2 для среды трансэстерификационной реакции при использовании препарата мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD, включающего липазу PS и CALB, которые были иммобилизованы по отдельности
10 или в одностадийной системе. Реакции проводили путем добавления биокатализатора (30 г) к соевому маслу (220 г) и метиловому спирту (23,9 г) в стеклянном реакторе с двойной рубашкой, имеющем дно с фильтром из спеченного стекла с пористостью 70-100 мкм. Метанол добавляли порциями, каждая порция составляла 1/3 от
15 стехиометрического количества, или титровали по каплям. Реакционную систему механически перемешивали при 30°C в течение 2 часов. Когда превращение субстратов предпочтительно достигало более 80%, реакционную среду фильтровали, применяя давление сжатого азота или используя силу тяжести, действующую на фильтр из спеченного стекла. Реакционную среду или центрифугировали, или оставляли на
20 некоторое время для разделения фаз. Нижнюю фазу, содержащую глицерин, удаляли, а органическую фазу, содержащую непрореагировавшие глицериды и FAME, вносили в следующий второй реактор с двойной рубашкой, имеющий дно с фильтром из спеченного стекла, содержащий тот же самый биокатализатор. Среду во втором реакторе механически перемешивали с одной третью стехиометрического количества
25 исходно требуемого метанола в течение 2 часов при 30°C. Реакционную среду удаляли из реактора, сохраняя тот же самый биокатализатор. Эту процедуру повторяли, по меньшей мере, в течение 100 циклов. Фигура 4 показывает % FAME через 2 часа реакционного времени в каждом цикле двухстадийного способа. Результаты, приведенные на фигуре 4, показывают, что процент FAME после первой стадии составлял
30 в среднем примерно 88% и достигал в среднем более 99% после второй стадии. Эти результаты неожиданно показали, что препарат иммобилизованных мультилипаз высоко активен и что не происходит значительной потери активности в 100 реакционных циклах при использовании одной и той же порции биокатализатора.

30 Пример 12. Получение биодизеля при использовании липаз с различной субстратной специфичностью

Таблица 4 показывает процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот через различные интервалы времени в ходе реакции трансэстерификации триглицеридов соевого масла и метанола при использовании препаратов различных мультилипаз с различной субстратной селективностью. Липазы были иммобилизованы
35 в соответствии со способом, описанным в примере 2, с использованием пористого гидрофобного носителя, такого как Amberlite XAD 1600.

Таблица 4. Процент образованных сложных метиловых эфиров жирных кислот через различные интервалы времени для трансэстерификационной реакционной системы, включавшей триглицериды соевого масла (2,5 г) и метанол (285 мг), при использовании
40 препаратов различных мультилипаз, иммобилизованных на Amberlite XAD 1600 (15% мас./мас.), полученных в соответствии с примером 2. Метанол добавляли в трех равных порциях в ходе реакции, время которой составляло 2 часа. Реакционную смесь встряхивали и инкубировали при 30°C. Массовые соотношения между препаратами различных ферментов составляли 60% PS: 40% CALB и 60% PS: 20% CALB: 20% CALA.
45 Сходные массовые соотношения использовали для TL:CALB и TL:CALB:CALA.

Время/липаза	Липаза PS+CALB	Липаза PS+CALB+CALA	Липаза TL+CALB	Липаза TL+CALB+CALM
1	48	57	43	59
2	80	86	82	91

3	94	97	92	98
4	99	99,7	95	99

Результаты, представленные в таблице 4, показывают, что применение мультиферментной системы, включающей липазу с 1,3-позиционной специфичностью, такую как липаза TL или липаза PS, и липазу с селективностью в отношении неполных глицеридов, такую как CALB, совместно с липазой, обладающей высокой селективностью в отношении положения sn-2, такой как CALA, приводит к значительному улучшению скорости реакции трансэстерификации при получении биодизеля, по сравнению с применением сходных препаратов ферментов, но без добавления липазы с высокой селективностью в отношении положения sn-2, а именно CALA.

Таблица 5 показывает трансэстерификационную активность двух препаратов мультилипаз, включавших липазу TL, CALB и CALA, иммобилизованных либо на пористом гидрофобном носителе Amberilte XAD 1600, либо на пористом гидрофильном носителе, таком как Duolite A7, оба производятся Rohm and Haas, USA. Результаты показывают, что комбинация указанных выше липаз, если они иммобилизованы на гидрофобном носителе, обеспечивает более высокую трансэстерификационную активность, а также более совершенную технологическую стабильность. В таблице 5 видно, что биокатализатор, включающий липазы, иммобилизованные на гидрофобном носителе, сохранил свою исходную трансэстерификационную активность с минимальными потерями активности в том случае, если ту же самую порцию фермента использовали в течение 20 последовательных прогонов, тогда как трансэстерификационная активность при использовании тех же липаз, но иммобилизованных на гидрофильном носителе, значительно снизилась и достигла 40% от своей исходной активности после 20 применений одной и той же порции биокатализатора. Результаты отчетливо показывают, что гидрофобные носители являются предпочтительными для иммобилизации липаз для получения биодизеля в сравнении с использованием гидрофильных носителей для иммобилизации тех же самых ферментов.

Таблица 5 показывает трансэстерификационную активность препаратов мультилипаз, включающих липазу TL, CALB и CALA, все они были иммобилизованы либо на пористом гидрофобном носителе Amberilte XAD 1600, либо на пористом гидрофильном носителе Duolite A7. Условия реакции: соевое масло (2,5 г) и метанол (3 порции, каждая по 91 мг) смешивали с 250 мг препарата иммобилизованных липаз при 30°C в течение 4 часов. Одну и ту же порцию биокатализатора использовали в 20 реакционных циклах в одинаковых условиях.

№порции/Биокатализатор	Липаза TL, CALB и CALA, иммобилизованные на гидрофобном носителе	Липаза TL, CALB и CALA, иммобилизованные на гидрофильном носителе
1	92	82
2	91	82
3	91	75
4	90	72

№порции/Биокатализатор	Липаза TL, CALB и CALA, иммобилизованные на гидрофобном носителе	Липаза TL, CALB и CALA, иммобилизованные на гидрофильном носителе
5	90	66
6	89	65
7	89	62
8	90	57

	9	88	55
	10	89	53
	11	88	52
	12	88	50
5	13	89	50
	14	89	47
	15	87	44
	16	87	43
	17	88	40
	18	87	39
10	19	87	38
	20	87	33

Формула изобретения

1. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающий обеспечение триглицеридов в качестве источника жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды не превратятся в сложные метиловые эфиры жирных кислот, где указанный препарат липаз содержит по меньшей мере две липазы, предпочтительно три липазы, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на носителе, который является пористым носителем на основе гидрофобного алифатического полимера или ароматического полимера, и где по меньшей мере одна из указанных липаз обладает повышенной аффинностью к неполным глицеридам и по меньшей мере одна из указанных липаз является позиционно специфичной к положению sn-1,3, и необязательно третья липаза обладает высокой селективностью в отношении положения sn-2 углеродного скелета глицерина, где указанную позиционно специфичную к положению sn-1,3 липазу выбирают из группы, состоящей из липаз *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter* sp. и *Burkholderia* sp., и указанную липазу, обладающую повышенной аффинностью к неполным глицеридам, выбирают из группы, состоящей из липаз *Candida antarctica B*, *Candida antarctica A*, *Alcaligenes* sp. и *Penicillium camembertii*.

2. Способ по п.1, в котором указанную третью липазу, обладающую высокой селективностью в отношении положения sn-2, получают из *Candida antarctica A* или *Pseudozyma* sp.

3. Способ по п.1, в котором указанный источник жирных кислот включает по меньшей мере один из компонентов, таких как соевое масло, масло канолы, рапсовое масло, оливковое масло, касторовое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло, арахисовое масло, хлопковое масло, ятрофное масло, жир животного происхождения, отходы кулинарного жира, триглицериды масел из несъедобных растительных источников или любую смесь, по меньшей мере, двух из них.

4. Способ по п.1, в котором указанные липазы вместе иммобилизованы на указанном носителе.

5. Способ по п.1, в котором каждая из указанных липаз иммобилизована на одном из указанных носителей и где носители, на которые иммобилизованы указанные липазы, идентичны или различаются.

6. Способ по п.1, где указанный носитель необязательно может содержать активные функциональные группы, выбранные из эпоксигрупп или альдегидных групп, или ионных групп.

7. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающий обеспечение триглицеридов, являющихся источником жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока превращение ацильных групп жирных кислот, содержащихся в указанном источнике жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот не достигнет по меньшей мере 70%, где указанный препарат липаз включает единственную липазу, иммобилизованную на пористом носителе, при этом липаза является позиционно неспецифичной или специфичной к положению sn-1,3 липазой, или смесь по меньшей мере двух липаз, по меньшей мере одна из которых обладает повышенной аффинностью к неполным глицеридам и, по меньшей мере одна из которых позиционно специфична к положению sn-1,3, вместе или по отдельности иммобилизованных на пористом носителе, где указанный носитель является любым из следующих носителей: пористые гидрофобные носители на основе алифатических полимеров и пористые гидрофобные носители на основе ароматических полимеров.

8. Способ по п.7, в котором указанный препарат липаз содержит по меньшей мере две липазы, предпочтительно три липазы, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на указанном носителе.

9. Способ по п.8, в котором указанная необязательная третья липаза обладает более высокой селективностью в отношении положения sn-2, чем позиционно неспецифичные липазы.

10. Способ по п.8, в котором указанную позиционно специфичную к положению sn-1,3 липазу выбирают из группы, состоящей из липаз, полученных из любой из: *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromohacter* sp. и *Burkholderia* sp., и указанную липазу, обладающую повышенной аффинностью к неполным глицеридам, выбирают из группы, состоящей из липаз, полученных из любой из: *Candida antarctica B*, *Alcaligenes* sp. и *Penicillium camembertii*, и указанную необязательную третью липазу, обладающую более высокой селективностью в отношении положения sn-2, чем позиционно неспецифичные липазы, получают из *Candida antarctica A* и *Pseudozyma* sp.

11. Способ по п.7, где указанный источник жирных кислот включает по меньшей мере один из компонентов, таких как соевое масло, масло канолы, рапсовое масло, оливковое масло, касторовое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло, арахисовое масло, хлопковое масло, яatroфное масло, жир животного происхождения, отходы кулинарного жира, триглицериды масел из несъедобных растительных источников или любую смесь, по меньшей мере, двух из них.

12. Способ по п.7, в котором каждая из указанных липаз иммобилизована на любом указанном носителе, и в котором носители, на которые иммобилизованы указанные липазы, идентичны или различаются.

13. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) включающий:

(а) обеспечение триглицеридов, являющихся источником жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях, до тех пор пока превращение ацильных групп жирных кислот, содержащихся в указанном источнике жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот не достигнет по меньшей мере 70%, где указанный препарат липаз содержит по меньшей мере одну позиционно

неспецифичную или специфичную к положению sn-1,3 липазу, иммобилизованную на пористом носителе, или смесь по меньшей мере двух липаз, и предпочтительно трех липаз, совместно или по отдельности иммобилизованных на пористом носителе, где каждый указанный носитель является одним из гидрофобных носителей на основе алифатических полимеров и гидрофобных носителей на основе ароматических полимеров, при постоянном удалении образованного глицерина из реакционной среды, чтобы получить органическую фазу, содержащую главным образом остаточное количество непрореагировавших глицеридов и образованные сложные метиловые эфиры жирных кислот, и где по меньшей мере одна из указанных по меньшей мере двух липаз обладает повышенной аффинностью к неполным глицеридам, и по меньшей мере одна из указанных по меньшей мере двух липаз является позиционно специфичной к положению sn-1,3, и указанная необязательная третья липаза обладает высокой селективностью в отношении положения sn-2 углеродного скелета глицерина, где указанную позиционно специфичную к положению sn-1,3 липазу выбирают из группы, состоящей из липаз, полученных из любой из: *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter* sp. и *Burkholderia* sp., и указанную липазу, обладающую повышенной аффинностью к неполным глицеридам, выбирают из группы, состоящей из липаз, полученных из любой из: *Candida antarctica B*, *Candida antarctica A*, *Alcaligenes* sp. и *Penicillium camembertii*,

(b) реакцию указанной органической фазы с метанолом в присутствии препарата липаз, как было определено для стадии (a), в подходящих условиях, до тех пор, пока превращение ацильных групп жирных кислот, содержащихся в указанном источнике жирных кислот, в сложные метиловые эфиры жирных кислот не достигнет по меньшей мере 95%.

14. Способ по п.13, где указанный носитель необязательно может содержать активные функциональные группы, выбираемые из эпокси групп или альдегидных групп, или ионных групп.

15. Способ получения смеси липаз, иммобилизованных на нерастворимом носителе, для использования в способе по любому из пп.1-14, в котором указанный нерастворимый носитель является пористым и сетчатым гидрофобным носителем на основе алифатических или ароматических полимеров, указанная смесь содержит липазу, полученную из *Candida antarctica B*, и по меньшей мере одну липазу, полученную из *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp. и *Thermomyces lanuginosa*, способ включает следующие стадии:

(a) контакт буферного раствора, содержащего липазу, полученную из *Candida antarctica B*, и по меньшей мере одну липазу, полученную из любой из: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp. и *Thermomyces lanuginosa*, с полимерным носителем, который является любым из гидрофобных носителей на основе алифатических и ароматических полимеров, предпочтительно в присутствии гидрофобного органического растворителя, такого как n-гексан, добавленного в среду для иммобилизации в соотношении буфер: органический растворитель от 1:10 до 10:1, соответственно;

(b) смешивание системы, полученной на стадии (a), в течение по меньшей мере 4 часов при комнатной температуре;

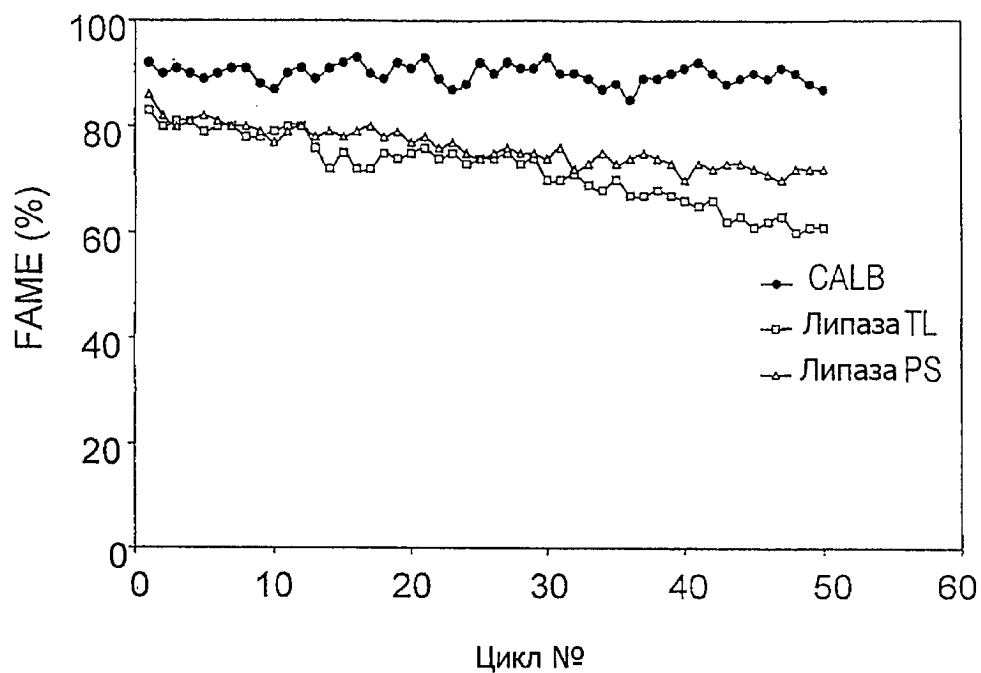
(c) фильтрование смеси иммобилизованных липаз и высушивание ее до тех пор, пока содержание воды не станет меньше 5%.

16. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающий обеспечение триглицеридов,

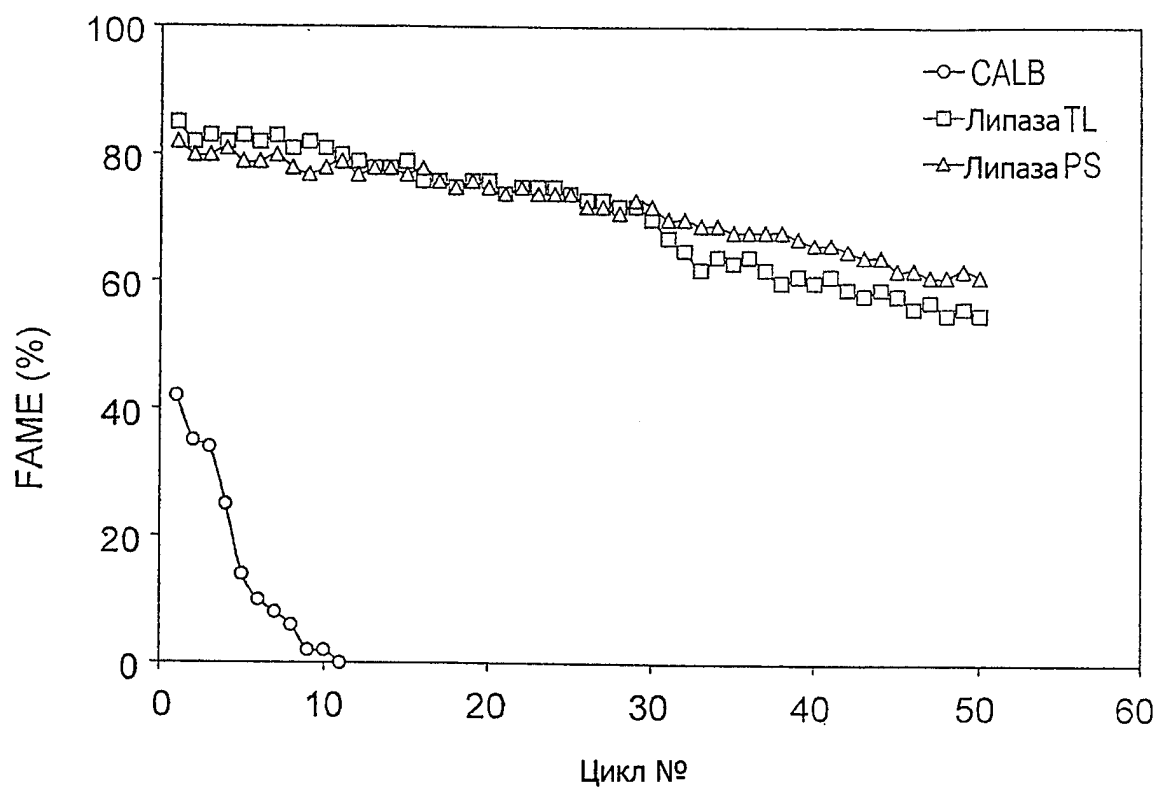
являющихся источником жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные метиловые эфиры жирных кислот, где указанный препарат липаз содержит первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на пористом гидрофобном носителе, который является любым из гидрофобных носителей на основе алифатических полимеров и гидрофобных носителей на основе ароматических полимеров, и где указанная первая липаза демонстрирует более высокую трансэтерификационную активность в отношении триглицеридов в сравнении с ее активностью в отношении неполных глицеридов, и указанная вторая липаза демонстрирует более высокую трансэтерификационную активность в отношении неполных глицеридов в сравнении с ее активностью в отношении триглицеридов, и где указанные две липазы демонстрируют синергетический эффект в своей трансэтерификационной активности при получении конечного продукта.

17. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающий обеспечение триглицеридов, являющихся источником жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные метиловые эфиры жирных кислот, где препарат указанных липаз содержит первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или совместно иммобилизованы на пористом гидрофобном носителе, который является любым из гидрофобных носителей на основе алифатических полимеров и гидрофобных носителей на основе ароматических полимеров, и где указанная первая липаза высвобождает промежуточные продукты, которые являются одним из моноглицеридов и диглицеридов, в первой реакции трансэтерификации, которые являются предпочтительными для указанной второй липазы в трансэтерификации с метанолом с образованием сложных метиловых эфиров жирных кислот.

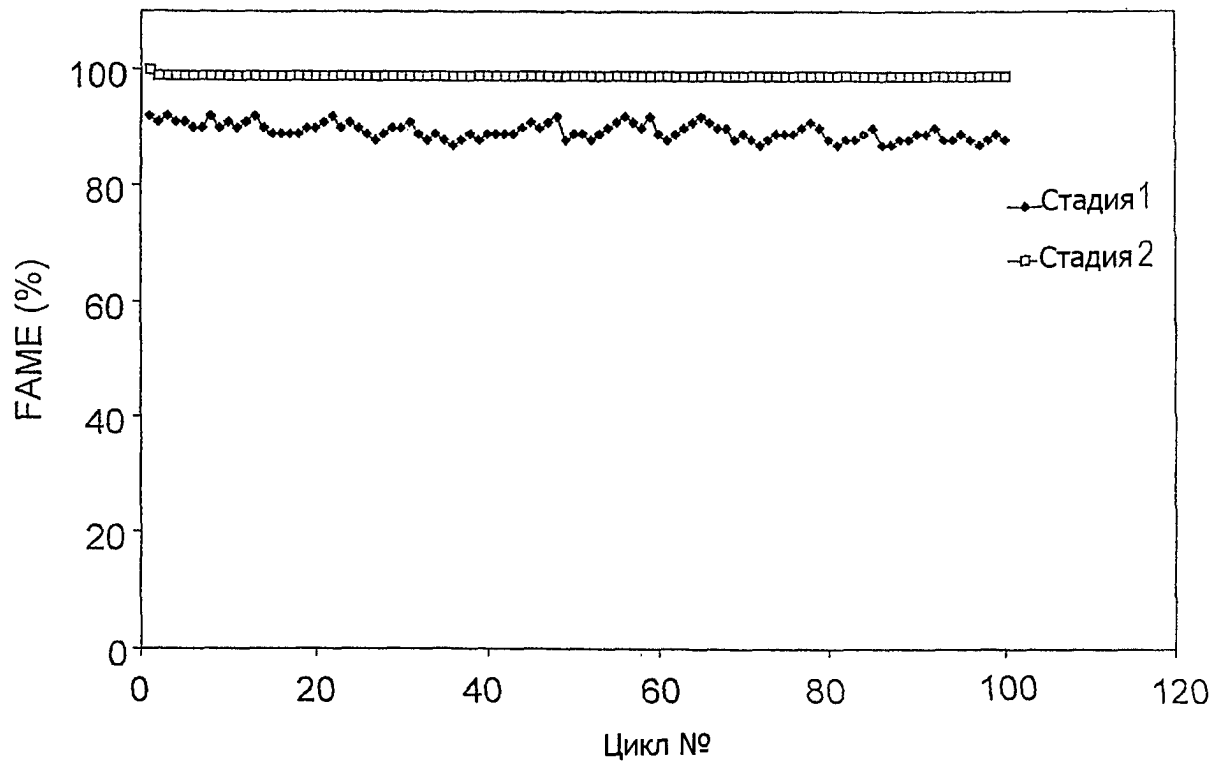
18. Способ получения сложных метиловых эфиров жирных кислот в микроводной системе, не содержащей растворителей, включающий обеспечение триглицеридов, являющихся источником жирных кислот, поэтапное добавление метанола к указанному источнику жирных кислот в присутствии препарата липаз и обеспечение протекания реакции в подходящих условиях до тех пор, пока триглицериды, являющиеся указанным источником жирных кислот, не превратятся в сложные метиловые эфиры жирных кислот, где указанный препарат липаз содержит первую липазу и вторую липазу, указанные липазы по отдельности или вместе иммобилизованы на пористом гидрофобном носителе, который является любым из гидрофобных носителей на основе алифатических полимеров и гидрофобных носителей на основе ароматических полимеров, и где указанные липазы демонстрируют различные субстратные специфичности, которые обеспечивают их трансэтерификационную активность в отношении триглицеридов, при условии, что их используют вместе, тогда как по меньшей мере одна из двух указанных липаз теряет активность в среде для реакции трансэтерификации, если ее используют отдельно с триглицеридами в качестве субстрата, но демонстрирует высокую трансэтерификационную/этерификационную активность с неполными глицеридами и жирными кислотами в качестве субстратов, соответственно.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 4