

分类号: Q814

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530122

脂肪酶的固定化及其合成风味酯的研究

Study on Immobilization of Lipases and their Applications for Flavor Ester Synthesis

学生姓名: 程瑶纳

指导教师: 魏胜华

专 业: 生物与医药

研究方向: 酶工程与生物催化

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名： 杨振纳
日期：2024年6月3日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☒，在 1 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☐。

学位论文作者签名：程振纳

指导教师签名：程振纳

日期：2024 年 6 月 3 日

日期：2024 年 6 月 3 日

脂肪酶的固定化及其合成风味酯的研究

摘 要

风味酯是具有独特香味的化合物，主要包括乙酸丁酯、乙酸异戊酯、丁酸乙酯和异戊酸异戊酯等，传统获得风味酯主要从天然植物中提取和通过化学法合成，但由于原材料的限制，提取的产量往往较低，因此难以满足市场的需求；化学合成的过程通常对环境具有不利的影响，产生难以分离的副产物，严重影响产品的特征风味，商业价值较低。脂肪酶催化合成风味酯具有反应条件温和、选择性高以及污染少等优点。但是目前所使用的商品化的固定化脂肪酶价格偏高，本文从脂肪酶固定化新方法的建立和新酶源的挖掘及其在风味酯合成中的应用进行了以下的研究：

(1) 以来源于疏绵状嗜热丝孢菌的脂肪酶为研究对象，采用凝胶涂层包覆大孔树脂固定脂肪酶，并以该固定化酶为催化剂，分别在有机溶剂中酯化反应合成乙酸丁酯和无溶剂体系中合成乙酸异戊酯，其最佳反应条件：10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 乙酸和丁醇、0.9 g 分子筛、反应温度为 45 °C、加酶量为 1 g、控制水活度为 0.54，反应 12 h 后酯化率为 93.05%；3 mL 乙酸乙烯酯溶液中添加 2.4 mmol 的异戊醇、反应温度为 45 °C、加酶量 0.5 g，反应 14 h 后酯化率为 92.35%。

(2) 采用蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定技术对脂肪酶进行固定化并在有机溶剂中催化合成乙酸香叶酯，其最佳反应条件：10 mL 正庚烷溶液中加入乙酸 0.5 mmol、香叶醇 0.6 mmol、0.9 g 分子筛、反应温度为 50 °C、

加酶量为 0.4 g，控制水活度为 0.54、反应 12 h 后酯化率达到了 88.4%。

(3) 以文冠果种籽为原料，利用戊二醛对其籽粉进行原位交联固定化。所制备的催化剂在有机溶剂中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其最佳反应条件为：10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 的酸和醇为底物、0.9 g 分子筛、温度为 45 °C、控制水活度为 0.33，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯，反应 12 h 后酯化率达到了 72.83%；加入 0.4 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯，反应 12 h 后酯化率达到了 67.24%。

(4) 在三相系统对文冠果种籽中的脂肪酶进行分离和固定化，并将其应用在乙酸丁酯和乙酸香叶酯的合成中。通过三相分离，脂肪酶的纯化倍数达到 2.85，酶活回收率为 53.08%；利用 1%的戊二醛溶液对三相中的酶饼进行交联固定化，所制备的交联酶聚集体在有机溶剂中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其最佳反应条件为：10 mL 正己烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 丁醇为底物、0.9 g 分子筛，并在温度为 40 °C、水活度为 0.54 的条件下，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯，反应 12 h 后酯化率达到了 87.97%；10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 香叶醇为底物、添加 0.9 g 分子筛，并在温度为 45 °C、水活度为 0.33 的条件下，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯，反应 12 h 后酯化率达到了 72%。

关键词：脂肪酶，固定化，风味酯，文冠果，乙酸丁酯，乙酸异戊酯，乙酸香叶酯

Study on Immobilization of Lipases and their Applications for Flavor Ester Synthesis

ABSTRACT

Flavor esters are compounds with unique fragrance, mainly including butyl acetate, isoamyl acetate, ethyl butyrate and isoamyl isovalerate. Traditionally, flavor esters are mainly extracted from natural plants and synthesized by chemical methods. However, due to the limitation of raw materials, the yield of extraction is often low, so it is difficult to meet the market demand. The process of chemical synthesis usually has negative impact on the environment, resulting in by-products that are difficult to separate, which seriously affects the characteristic flavor of products and has low commercial value. Lipase-catalyzed synthesis of flavor esters has the advantages of mild reaction conditions, high selectivity and less pollution. However, the price of commercial immobilized lipase used at present is high. In this paper, the establishment of a new method of lipase immobilization, the excavation of new enzyme sources and its application in the synthesis of flavor esters were studied as follows:

(1) Taking lipase from *thermophila sparsiformis* as the research object, the immobilized lipase was immobilized on macroporous resins by gel coating, and the immobilized lipase was then used as catalyst to synthesize butyl acetate in organic solvent and isoamyl acetate in solvent-free system, respectively. The

optimum reaction conditions were as follows: adding 1 mmol of acetic acid and butanol to 10 mL of n-heptane solution, adding 0.9 g molecular sieve, reacting at 45 °C, adding 1 g of lipase and controlling water activity to be 0.54. The esterification rate was 92.35% after adding 2.4 mmol of isoamyl alcohol to 3 mL of vinyl acetate solution, reacting at 45 °C and adding 0.5 g of enzyme for 14 h.

(2) Lipase was immobilized by protein-coated microcrystal-PEI co-immobilization technology, and then geranyl acetate was synthesized in organic solvent. The optimum reaction conditions were as follows: acetic acid 0.5 mmol, geraniol 0.6 mmol and molecular sieve 0.9 g were added to 10 mL n-heptane solution, the reaction temperature was 50 °C, the enzyme dosage was 0.4 g, the water activity was controlled at 0.54, and the esterification rate reached 88.4% after 12 h.

(3) *Xanthoceras sorbifolium bunge* seeds powder was crosslinked and immobilized *in situ* by glutaraldehyde. The catalyst prepared catalyzed the synthesis of butyl acetate and geranyl acetate in organic solvent. The optimum reaction conditions were as follows: in 10 mL of n-heptane solution, 1 mmol of acid and alcohol were added as substrates, 0.9 g of molecular sieve was added, the temperature was 45 °C, the water activity was controlled to be 0.33, and 0.3 g of immobilized enzyme was added to catalyze the synthesis of butyl acetate. After 12 h, the esterification rate reached 72.83%. Geranyl acetate was synthesized by adding 0.4 g immobilized enzyme, and the esterification rate reached 67.24% after 12 h.

(4) Lipase from *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds was isolated and

immobilized in a three-phase system, and it was applied to the synthesis of butyl acetate and geranyl acetate. Through three-phase partitioning, the purification multiple of lipase reached 2.85, and the activity recovery rate of lipase was 53.08%. The enzyme cake in three phase was crosslinked and immobilized by 1% glutaraldehyde solution, and the prepared cross-linked enzyme aggregates was used to catalyze the synthesis of butyl acetate and geranyl acetate in organic solvent. The optimum reaction conditions were as follows: adding 1 mmol of acetic acid and 1.2 mmol of butanol as substrates in 10 mL of n-hexane solution, adding 0.9 g of molecular sieve, adding 0.3 g of immobilized enzyme to catalyze the synthesis of butyl acetate at 40 °C and water activity of 0.54, and esterifying after 12 h. Geranyl acetate was synthesized by adding 1 mmol of acetic acid and 1.2 mmol of geraniol to 10 mL of n-heptane solution, adding 0.9 g of molecular sieve, and adding 0.3 g of immobilized enzyme at 45 °C and water activity of 0.33. After 12 h, the esterification rate reached 72%.

KEY WORDS: Lipase, Immobilization, Flavor ester, *Xanthoceras sorbifolium bunge*, Butyl acetate, Isoamyl acetate, Geranyl acetate

目录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论	1
1.1 脂肪酶的概述	1
1.1.1 脂肪酶的定义及来源	1
1.1.2 脂肪酶的结构及催化类型	2
1.1.3 脂肪酶的应用	4
1.2 脂肪酶固定化的研究进展	5
1.2.1 吸附法	6
1.2.2 包埋法	6
1.2.3 交联法	6
1.2.4 共价结合法	7
1.3 风味酯合成的研究进展	8
1.3.1 风味酯的简介	8
1.3.2 风味酯的合成	8
1.3.3 脂肪酶合成风味酯的模式	9
1.3.4 风味酯合成的反应体系	10
1.4 本论文的研究目的和研究内容	12
第 2 章 凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯的研究	15
2.1 引言	15
2.2 材料与设备	16
2.2.1 材料与试剂	16
2.2.2 仪器与设备	17
2.3 实验方法	18
2.3.1 Gel-coated Lipase@Resins 的制备	18
2.3.2 Gel-coated Lipase@Resins 的表征	20
2.3.3 Gel-coated Lipase@Resins 酶学性质的研究	20
2.3.4 Gel-coated Lipase@Resins 催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯	21
2.3.5 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性	22
2.4 分析方法	22
2.4.1 脂肪酶酶活的测定	22
2.4.2 蛋白含量的测定	23
2.4.3 蛋白固定率的计算	23
2.4.4 酶蛋白表面氨基修饰度的测定	23
2.5 结果与讨论	23
2.5.1 标准曲线	23
2.5.2 Gel-coated Lipase@Resins 的制备	26
2.5.3 Gel-coated Lipase@Resins 的表征	31
2.5.4 Gel-coated Lipase@Resins 酶学性质的研究	35
2.5.5 Gel-coated Lipase@Resins 有机溶剂中酯化反应合成乙酸丁酯	38

2.5.6 Gel-coated Lipase@Resins 无溶剂体系中转酯反应合成乙酸异戊酯	43
2.5.7 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性	45
2.6 本章小结	45
第 3 章 蛋白包覆微晶脂肪酶-聚乙烯亚胺共固定化及催化合成乙酸香叶酯的研究	47
3.1 引言	47
3.2 材料与设备	48
3.2.1 材料与试剂	48
3.2.2 仪器与设备	48
3.3 实验方法	48
3.3.1 PEI-PCMCLs 的制备	48
3.3.2 PEI-PCMCLs 的电镜观察	50
3.3.3 PEI-PCMCLs 酶学性质的研究	50
3.3.4 PEI-PCMCLs 催化合成乙酸香叶酯	50
3.3.5 PEI-PCMCLs 的重复使用性	50
3.4 分析方法	50
3.4.1 有机溶剂中脂肪酶酶活的测定	50
3.5 结果与讨论	51
3.5.1 标准曲线	51
3.5.2 PEI-PCMCLs 的制备	52
3.5.3 PEI-PCMCLs 的电镜观察	56
3.5.4 PEI-PCMCLs 酶学性质的研究	56
3.5.5 PEI-PCMCLs 催化合成乙酸香叶酯	58
3.5.6 PEI-PCMCLs 的重复使用性	63
3.6 本章小结	63
第 4 章 文冠果种籽中脂肪酶的原位固定化及其合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的研究	65
4.1 引言	65
4.2 材料与设备	66
4.2.1 材料与试剂	66
4.2.2 仪器与设备	66
4.3 实验方法	66
4.3.1 种籽粉的制备	66
4.3.2 种籽的筛选	67
4.3.3 浸泡时间对文冠果种籽脂肪酶酶活的影响	67
4.3.4 交联文冠果籽粉的制备	67
4.3.5 交联文冠果籽粉的电镜观察	67
4.3.6 交联文冠果籽粉催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯	67
4.3.7 交联文冠果籽粉的重复使用性	67
4.4 分析方法	67
4.4.1 脂肪酶酶活的测定	67
4.5 结果与讨论	68
4.5.1 含脂肪酶种籽的筛选	68
4.5.2 浸泡时间对文冠果种籽脂肪酶酶活的影响	68
4.5.3 交联文冠果种籽粉的制备	69
4.5.4 交联文冠果籽粉的电镜观察	70
4.5.5 交联文冠果籽粉催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯	71

4.5.6 交联文冠果籽粉的重复使用性	76
4.6 本章小结	76
第 5 章 三相系统中文冠果种籽脂肪酶的提取、固定化及合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的研究	78
5.1 引言	78
5.2 材料与设备	79
5.2.1 材料与试剂	79
5.2.2 仪器与设备	79
5.3 实验方法	79
5.3.1 文冠果种籽粗酶提取液的制备	79
5.3.2 三相法分离提取文冠果种籽脂肪酶	79
5.3.3 LCLEAs 的制备	80
5.3.4 LCLEAs 的电镜观察	80
5.3.5 LCLEAs 酶学性质的研究	81
5.3.6 LCLEAs 催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯	81
5.3.7 LCLEAs 的重复使用性	81
5.4 分析方法	81
5.4.1 脂肪酶酶活的测定	81
5.4.2 蛋白含量的测定	81
5.4.3 蛋白固定率的计算	81
5.4.4 酶活回收率的计算	81
5.4.5 纯化倍数的计算	81
5.5 结果与讨论	81
5.5.1 三相分离提取文冠果种籽脂肪酶	81
5.5.2 纯化结果及 SDS-PAGE 结果	84
5.5.3 LCLEAs 的制备	84
5.5.4 LCLEAs 的电镜观察	86
5.5.5 LCLEAs 酶学性质的研究	86
5.5.6 LCLEAs 催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯	87
5.5.7 LCLEAs 的重复使用性	92
5.6 本章小结	92
第 6 章 结论与展望	94
6.1 结论	94
6.2 本文的创新点	95
6.3 展望	96
参考文献	97
攻读学位期间发表的学术论文目录	106
致谢	107

第 1 章 绪论

1.1 脂肪酶的概述

1.1.1 脂肪酶的定义及来源

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一种能够作用于羧酸酯键的水解酶类,又被称作甘油酯水解酶,它能够降解不溶性的甘油三酯,并将其分解成游离的脂肪酸和甘油。脂肪酶在自然界中普遍存在,也是生物催化领域应用最广泛的酶之一,它具有催化活性高、反应条件温和、对环境友好、底物识别能力高等优点,因此具备广阔的应用前景^[1-4]。脂肪酶的来源广泛,在动植物组织及微生物中广泛存在^[5]。

1.1.1.1 动物来源

脂肪酶最早是从兔胰脏中被发现,目前动物脂肪酶的主要来源是猪、牛、羊等动物的胰腺。与来自植物和微生物的脂肪酶相比,关于这类脂肪酶的研究尚显匮乏。动物体内的脂肪酶由两种不同的机制合成:一种是通过动物体内的特殊细胞合成的,另一种是通过动物胃肠道系统中的微生物合成的^[6]。动物细胞合成的脂肪酶,能够消化脂肪和脂类^[7-9]。但受限于提取、培养及产物分离等技术,相较于商业生产,动物脂肪酶更多用于临床诊断^[2]。例如急性胰腺炎和胰腺损伤时检测血清中脂肪酶的水平可作为诊断依据^[10]。

1.1.1.2 植物来源

植物脂肪酶存在于植物的各个部分,包括叶、茎、种籽等。多数植物脂肪酶从种籽中获得,包括葵花籽、油菜籽、亚麻籽等^[11]。与其他来源相比,种籽中的脂肪酶水解活性明显更高,因为它们含有丰富的三酰甘油,可为植物的生长提供能量^[12]。在发芽期间,植物种籽中脂肪酶活性明显增加,三酰甘油在脂肪酶的作用下转化为可溶性糖,从而促进植物的生长。植物脂肪酶比微生物衍生的脂肪酶更便宜、更容易获得、容易被接受,并且它们具有广泛的底物特异性,可作为生物催化剂直接应用在食品、化妆品、医疗和其他行业。但是,由于植物脂肪酶的丰度低、不稳定,且在采用传统纯化策略时会丧失活性,因此很少对这方面进行研究^[13, 14]。

1.1.1.3 微生物来源

微生物脂肪酶包括真菌、酵母和细菌脂肪酶。微生物具有生产和产酶快、易变异、可定向筛选等特点,这使得微生物来源的脂肪酶在工业应用和研究中都是最多的,近年来绝大部分商品化脂肪酶如 Novozym 435、Lipozyme RM-IM 等都来源于微生物。大多

数微生物脂肪酶容易受到温度、pH 值、溶解氧、培养基成分等因素的影响，而真菌脂肪酶因其稳定性、特异性和易生产性，被认为更适用于生物技术领域。目前商业脂肪酶的主要来源是丝状真菌，包括黑曲霉、米曲霉、产黄青霉等，丝状真菌产酶能力强，且与其他来源相比，其提取、纯化和加工过程相对简单明了^[15, 16]。Rocha^[17]等人在研究中发现 *Stemphylium lycopersici* 和 *Sordida sp* 两种真菌具有产脂肪酶的能力，其产量分别达到 397 U/ml/min 和 286 U/ml/min。细菌脂肪酶主要产自芽孢杆菌、伯克霍尔德菌、链霉菌、节杆菌等，一般细菌脂肪酶不用于食品加工，而是用于洗涤剂 and 生物柴油的生产。与丝状真菌和细菌相比，酵母更易于处理和生长，酵母脂肪酶也更多被用于食品加工和其他行业。

1.1.2 脂肪酶的结构及催化类型

酶的催化功能与空间结构密切相关，脂肪酶属于 α/β 水解酶家族，和其他 α/β 水解酶一样，具有 α 螺旋和 β 折叠(见图 1-1)^[18]。脂肪酶的折叠结构内部由 8 个 β 折叠排列，外部由 6 个 α 螺旋将其相连，这种结构为活性位点提供了稳定的支架(见图 1-2)^[19-21]。尽管脂肪酶的来源广泛，不同脂肪酶的氨基酸序列和分子量差异大，但它们都具有相同或相似的活性位点，即由一个丝氨酸亲核残基、一个天冬氨酸或谷氨酸酸性催化残基、一个组氨酸残基形成的催化三联体^[22, 23]。大多数的脂肪酶催化活性中心上由一个双亲性肽链段的“盖子”结构所覆盖，当在油水界面以外的地方时，盖子结构覆盖活性位点；当位于油水界面时，盖子将被打开以允许催化位点和底物之间的相互作用，从而促进酶进行催化反应，这被称为界面激活现象^[24, 25]。脂肪酶能够催化多种反应，包括水解、酸解、醇解、氨解、转酯以及酯化反应^[26, 27]等，其反应如图 1-3 所示。

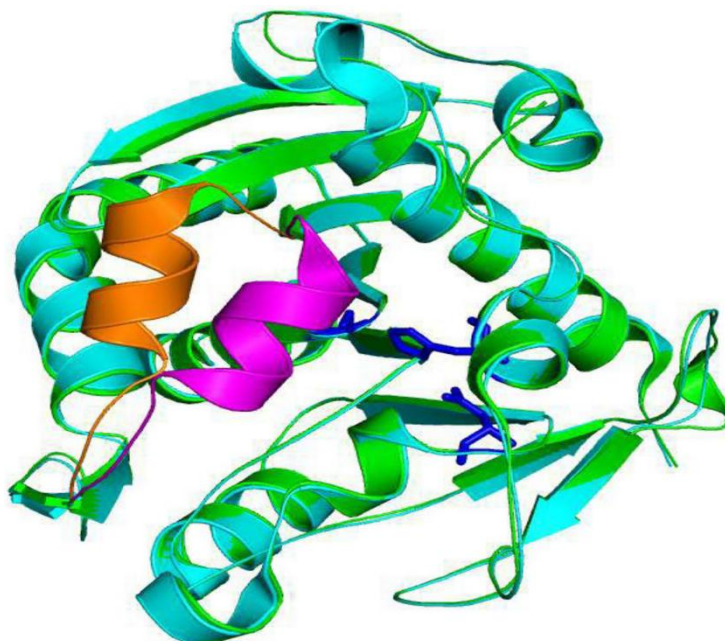


图 1-1 疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶的结构^[18]

Fig.1-1 The structure of lipase from *thermomyces lanuginosus*^[18]

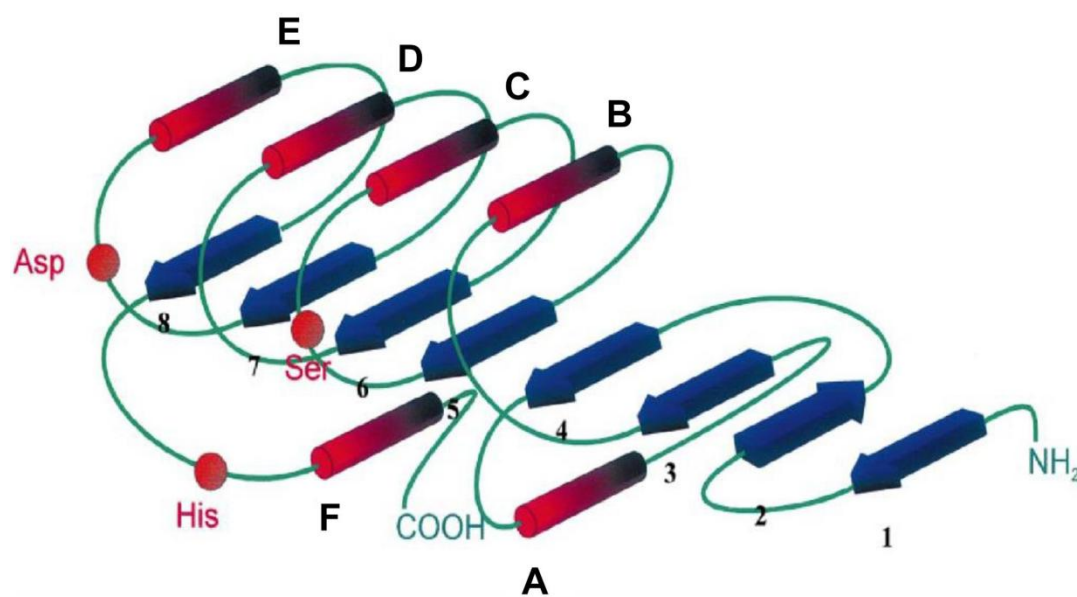


图 1-2 α/β 水解酶折叠示意图^[19]

Fig.1-2 Schematic of the α/β hydrolase fold^[19]

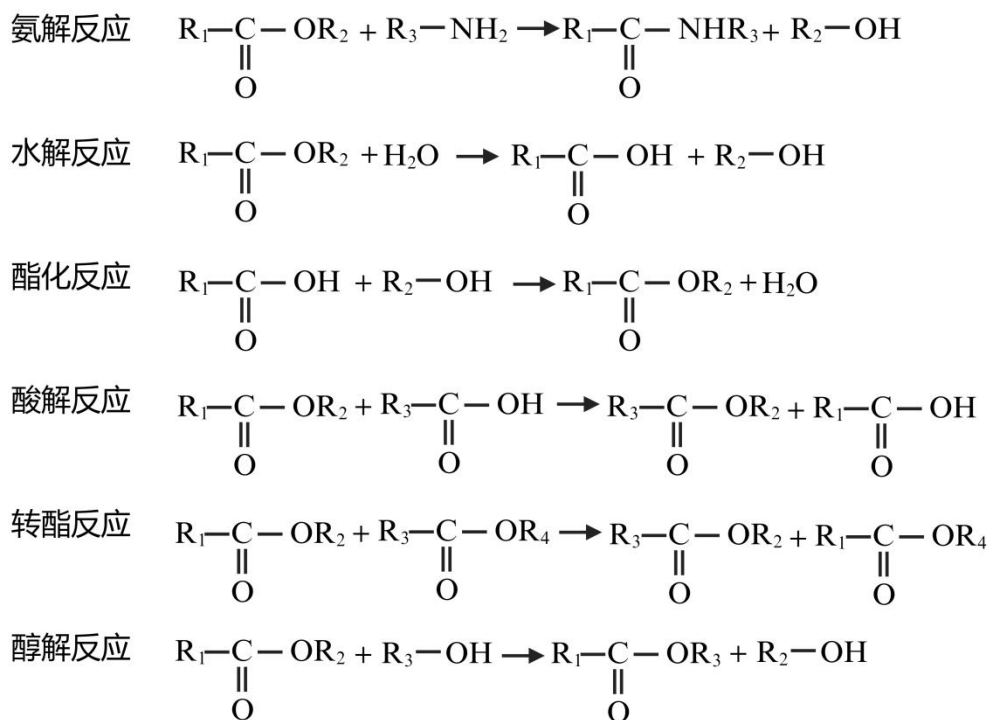


图 1-3 脂肪酶催化的反应类型

Fig.1-3 Types of lipase catalyzed reactions

1.1.3 脂肪酶的应用

脂肪酶因其多样性和易于大规模生产而成为具有生物技术意义的重要酶类^[28]。脂肪酶的酶促能力和底物特异性使其在工业应用中具备独特的吸引力，其常见的工业应用如下所述。

1.1.3.1 在食品工业的应用

在食品加工领域，脂肪酶起着至关重要的作用，它可以通过催化合成食品中的所需的调味料，从而改善食品风味。特别是微生物脂肪酶在定制植物油、增强奶酪味道、制造瘦肉、开发乳制品风味和加工高脂肪食品等方面具有重要意义^[29]。Shojaei^[30]等人提出在牛奶中添加脂肪酶发酵从而增强其风味；Li^[31]等人在研究中描述了脂肪酶可作为抑制剂解决米糠酸败的问题；Qi^[32]等人在研究中介绍了脂肪酶用于催化合成糖酯，可以用作甜点加工及水果和蔬菜保存的抗菌剂。

1.1.3.2 在生物柴油生产的应用

目前生物柴油的生产是利用化学催化剂(强酸或强碱)在相对较高的温度下通过酯交换过程来生产的，这个过程对反应条件要求较高，成本昂贵，且存在一定毒性，这些问题的存在促使研究人员积极探索替代途径^[33]。酶法生产生物柴油是一种可行且环保的途径，该过程涉及利用易于降解且具有高浓度游离脂肪酸的油和脂肪来制造生物柴油，脂

肪酶可以促进酯化和酯交换反应，从而转化这些化合物并产生生物柴油^[16, 34]。Iuliano^[35]等人利用念珠菌脂肪酶在甲醇的作用下将啤酒谷物转化为生物柴油，该实验生产率高达98%，此外，该方法可以有效降低成本，因为催化剂可以重复使用多达四个循环；Shalini^[36]等人利用磁性纳米颗粒对从黑曲霉中获得的脂肪酶进行固定，然后通过酯交换法生产生物柴油，收率达到90%，在经过五次循环使用后仍保持其活性。

1.1.3.3 在生物医药方面的应用

传统的药物研发面临高成本与低成效的困难，这主要是由于它存在一些不可避免的缺点，例如反应条件苛刻、催化剂具有毒性、产物中含有挥发性有害物质，这些问题阻碍了制药行业的持续发展^[37]。脂肪酶具有高度的对映体选择性，可以拆分外消旋体，因此在药物合成方面具有重要作用，特别是用于手性药物的合成和旋光异构体的拆分^[38, 39]。2-辛醇是许多光学活性药物和农药的手性中间体，Bouguerra^[40]等人利用气凝胶对脂肪酶进行固定化，然后通过对映体选择性实现了(R,S)-2-辛醇的分离。随着全球出现病毒感染，开发抗病毒类药物迫在眉睫。莫努匹拉韦是一种正在研究用于治疗轻度至中度COVID-19的实验药物，Rosangzuala^[41]等人利用异丁酸酐为酰基供体，通过固定化脂肪酶催化尿苷合成莫努匹拉韦，该方法与其他合成法相比成本更低廉，且步骤更少，符合绿色化学的要求。

1.1.3.4 其他应用

脂肪酶的应用广泛，例如血清脂肪酶可以用于急性胰腺炎的诊断^[42]；在洗涤剂中使用水解真菌脂肪酶作为添加剂，可以通过降低洗涤剂洗涤时的温度来节省能源，从而减少环境中的洗涤剂产品负荷^[43]；脂肪酶还可以参与污水处理以及储罐、化粪池和隔油池的清洁^[44]；土曲霉和黑曲霉产生的脂肪酶可用于污染土壤的生物修复和聚乙烯醇薄膜的降解^[45]。

1.2 脂肪酶固定化的研究进展

尽管脂肪酶在各种生物技术和工业应用中具有重要价值，但其工业应用仍存在严重局限性。这基于它们的稳定性差、易失活以及难以从反应系统中分离以进行再利用，使得生产成本大大增加。因此，必须通过固定化技术来增强脂肪酶的活性和操作稳定性，以便获得更经济和更有效的使用。固定化方法主要有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法四大类。

1.2.1 吸附法

在这种方法中,酶的固定化是通过非共价键(如范德华力、疏水作用力和氢键等)进行的,常用的载体有活性炭、硅胶、氧化铝、陶瓷、大孔树脂等^[46, 47]。它的优势在于吸附过程操作简单、价格低廉、载体可再生。Adnan^[48]等人通过吸附法将 BCL 脂肪酶固定在沸石咪唑骨架-8(ZIF-8)上生产生物柴油,其催化活性较游离酶相比显著提高;Pedro^[49]等人利用二氧化硅氧化铝对脂肪酶 CALB 和 RML 进行吸附,并利用吸附后的 CALB 在 60 °C 下催化合成油酸乙酯获得了 61.7%的转化率,与游离形式相比,两种生物催化剂均表现出较好的热稳定性和重复使用性,在经过 3 批油酸乙酯合成后仍保持约 30%的初始转化率。在整个吸附过程中,固定化主要受到扩散作用的调节,且它的发生速度比较缓慢,因此需要一定的时间^[50]。

1.2.2 包埋法

在包埋过程中,酶被保留在聚合物的结构中,使得酶保留原有的构象,具有良好的机械和储存稳定性,常用的聚合物如海藻酸钠、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺等。Cao^[51]等人设计了一种将酶包埋到纳米分子笼中的新型固定化脂肪酶,包埋的脂肪酶较游离酶表现出更高的催化活性,表明脂肪酶的天然构象在固定过程中没有被破坏,此外,将包埋的脂肪酶用于肉桂酸苄酯的生物合成,其显示出优异的活性和可重复使用性,经过 7 个循环后,包埋的脂肪酶催化肉桂酸苄酯的产率保持在 70.2%,而吸附的脂肪酶催化的产率仅为 10%左右,这些结果表明纳米分子笼可以抑制脂肪酶的变性并保持其活性。

1.2.3 交联法

交联法是一种不需要载体的方法,固定化过程由交联剂进行,常用的交联剂如戊二醛、聚乙烯醇、己二酰亚胺酸二甲酯等,由于不需要载体,因而生产成本低廉。Chen^[52]等采用两步交联法成功固定疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(TLL),首先将 TLL 与氧化羧甲基纤维素(OCMC)进行交联,然后通过羧甲基壳聚糖(CMCSH)交联,形成 CMCHS/OCMC@TLLs 微球,其热稳定性大大提高。交联酶聚集体(CLEAs)是一种具有吸引力的固定化方式,Muley^[53]等人使用硫酸铵制备黑曲霉脂肪酶的 CLEAs 酶活性和回收率分别为 42.80 ± 0.31 U/mg 和 $88.55 \pm 1.56\%$,在经过 4 个催化循环后 CLEAs 脂肪酶仍保留了 65%以上的初始活性;Oliart^[54]等人的研究结果类似,其使用 40%的硫酸铵在 40 mM 戊二醛、pH 8.0 和 40 °C 的交联条件下制备来自 *Geobacillus thermoleovorans* CCR1

的重组脂肪酶的 CLEA, 其表现出 7750 U/g 的最大比酶活, 在 100 °C 时保留了超过 20% 的活性。

1.2.4 共价结合法

共价结合法是通过共价键进行连接的, 这些键是通过某些氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸)的侧链以及氨基酸官能团(如羧酸、咪唑、羟胺和酚基)的化学反应产生的。共价键能够维持酶的分子结构, 使得酶能够不受温度、极端 pH、有机溶剂等因素的影响, 从而提高了酶的稳定性^[55]。Xu^[56]等采用离子液体(IL)修饰的磁性羧甲基纤维素(MCMC)纳米复合材料来共价固定脂肪酶, 所获得的固定化酶与游离酶相比表现出更好的催化活性, 且经过 10 次循环使用后, 仍然保留 86.9% 的酶活。为了促进酶与载体的结合, 通常选择反应基团较多或者具有较强可修饰性的载体。

在实际应用中使用单一固定化方法有时难以满足需求, 联合两种或两种以上的固定化方法更能满足固定化需求, 起到互补促进的作用。随着酶工程的发展, 对新型材料和新型固定化技术的研究成为了热点之一。

表 1-1 典型的脂肪酶的固定化及其应用

Table 1-1 Immobilization of typical lipases and their applications

酶源	固定化	应用	引用
疏绵状嗜热丝胞菌	戊二醛活化硅胶(GASG)	制备葛根素棕榈酸酯	[57]
米黑霉	金属-有机框架 (MOF)	酸解合成 OPL	[58]
假丝酵母	果胶基水凝胶	污水处理	[59]
假单胞菌	木质素基氧化石墨烯增强复合气凝胶	手性拆分	[40]
嗜热芽孢杆菌	碳酸钙	生物柴油	[34]
猪胰脏	共价有机骨架(COF)	筛选脂肪酶抑制剂	[60]
南极假丝酵母	磁性纳米颗粒	生物柴油	[61]
疏绵状嗜热丝胞菌	聚丙烯无纺布	监测牛肉质量	[62]
念珠菌	海藻酸铁纳米凝胶	制备风味酯	[31]

1.3 风味酯合成的研究进展

1.3.1 风味酯的简介

风味酯是重要的香料化合物，这种物质天然存在于植物中，包括乙酸丁酯、乙酸异戊酯、乙酸香叶酯等^[63]，如图 1-4 所示。风味酯的种类繁多，每种都具有独特而迷人的香味，因此广泛应用于食品、化妆品以及制药行业，深受消费者认可^[64]。2023 年全球香精市场估值约为 106 亿美元，预计到 2033 年将以近 5% 的复合年增长率增长至 172 亿美元，因此对风味酯有着极大的需求。

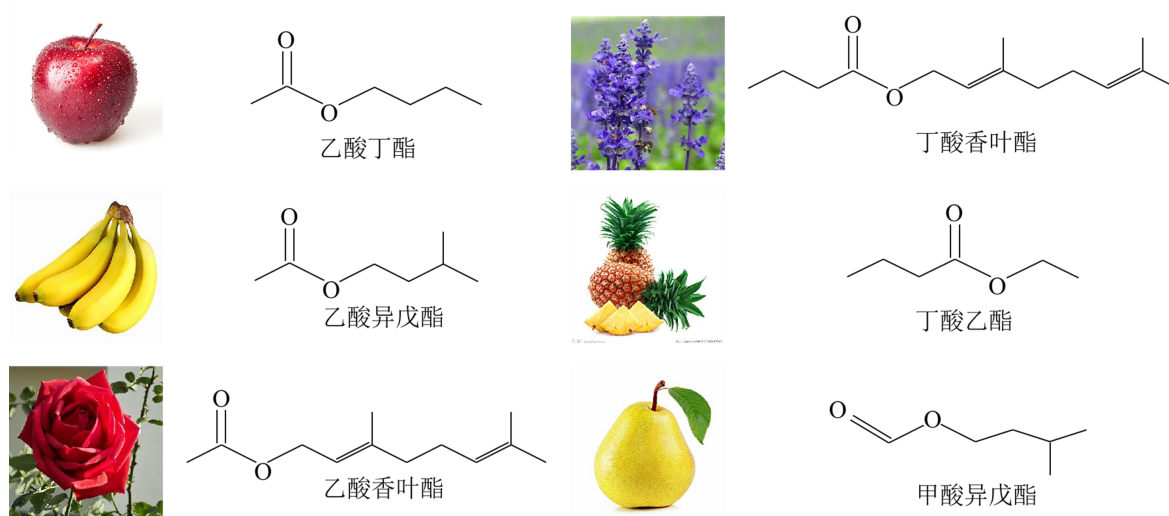


图 1-4 典型的风味酯

Fig.1-4 Typical flavor esters

1.3.2 风味酯的合成

目前大多数风味酯要么从自然资源中直接提取，要么以化学过程人工合成^[65]。从自然资源中提取的风味酯浓度低、有杂质，且成本高，另外它还受到各种问题的影响，包括原材料成本以及对气候和农业条件的依赖。采用传统化学合成法通常依赖化学试剂，并且反应条件相对苛刻，例如在 120 至 220 °C 的较高温度下使用无机酸和强碱。除此之外，传统的化学过程还存在一些局限性，如产量较低、催化剂分离困难、反应速率低、需要无腐蚀设备、废物较难处理，容易污染环境等，且化学合成过程中会产生具有不良副反应的外消旋混合物，从而降低合成效率，增加生产成本^[66]。此外，随着消费者对健康问题的逐渐关注，对天然产品的需求增加，以传统化学方式合成的风味酯逐渐难以被接受，这些问题使得化学合成的风味酯难以在商业上被广泛应用^[67, 68]。

酶法合成是制备风味酯的一种方法，根据美国 and 欧洲的相关法律规定，利用微生物或酶法工艺生产的风味酯可被认定为等同于天然来源的成分^[69]。与传统的化学法相比，

酶法反应条件温和，选择性高，副产物少，具有更好的产物纯度，对环境更友好，同时生物催化剂可重复使用性，降低了生产成本。

1.3.3 脂肪酶合成风味酯的模式

脂肪酶主要功能是催化酯的水解。在有机溶剂中，该酶能够通过酯化或者转酯反应合成酯类化合物，其合成模式如图 1-5 所示，表 1-2 显示了近年合成风味酯的研究。

1.3.3.1 酯化反应

酯化反应目前被广泛用于风味酯的合成，酯化反应过程中，在催化剂确定的情况下，通常的影响因素包括底物的浓度及配比、水含量、反应温度等。丁酸异戊酯因其特有的香蕉味，在许多行业中被用作调味剂；Bansode^[70]等人利用微波辅助技术，在反应温度为 60 °C、丁酸：异戊醇的摩尔比为 1：2、脂肪酶负载量为 2%(w/v)、微波功率为 700 W 的条件下，反应 120 分钟获得了 95% 的转化率。但在酯化反应中存在两个不利的影响因素：一是底物醇和短链脂肪酸很容易影响酶活性，可以采取补料分批策略；二是酯化反应本质上是一个可逆过程，并且伴随水的生成，这一特点可能促使反应向水解方向偏移，进而导致酯化率不尽人意，通过使用分子筛可以去除体系中的水分。

1.3.3.2 转酯反应

利用脂肪酶催化酯交换反应从而合成风味酯，它的优势是可以缓解极性脂肪酸对脂肪酶活性的抑制作用，因为它用简单酯作为底物，而不是短链脂肪酸。此外，在酯交换反应期间不产生水，使得水解反应大大降低。乙酸苄酯是一种具有茉莉花香的风味酯，研究报道，利用固定化荧光假单胞菌脂肪酶在正庚烷体系中催化苯甲醇和乙酸乙烯酯合成乙酸苄酯，在苯甲醇：乙酸乙烯酯为 2:3.5、固定化脂肪酶添加量为 36 mg、反应温度为 50 °C 的条件下，反应 4 h 达到了 99% 的转化率。

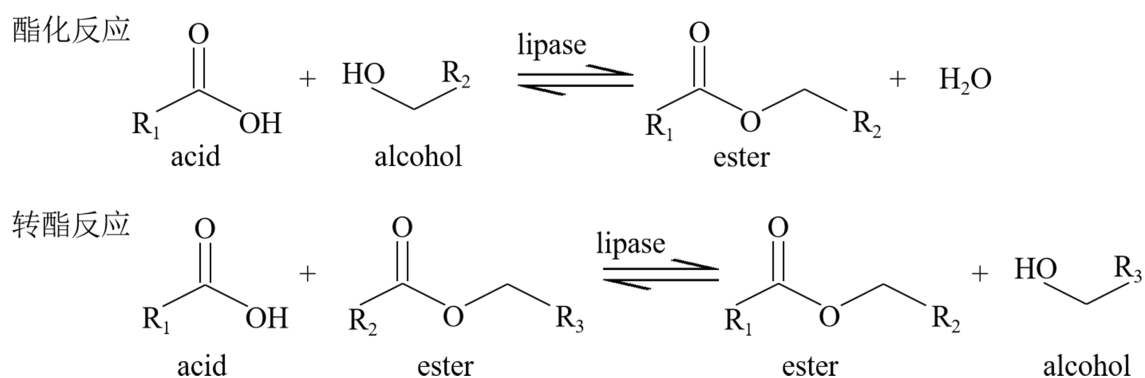


图 1-5 脂肪酶合成风味酯的模式

Fig.1-5 Patterns of flavor ester synthesis by lipases

表 1-2 典型合成风味酯的研究

Table 1-2 Study of typical synthetic flavor esters

风味酯	合成模式	酶	条件	引用
丁酸乙酯	酯化	毕赤酵母中表达的 固定化重组米根霉 脂肪酶	正己烷体系、温度为 30 °C、转速为 250 rpm/min、丁酸: 乙醇为 1:1.25、反应 24 h 产率为 100%	[71]
戊酸乙酯	酯化	固定在聚羟基丁酸 酯(PHB)的嗜热单胞 菌的脂肪酶	正庚烷体系、反应温度为 30.5 °C、转速为 235 rpm、戊酸和乙醇均为 1000 mM、添加 18%催化剂、反应 105 min 产率为 92%	[72]
乙酸香叶酯	转酯	Novozyme 435	无溶剂体系、香叶醇: 乙酸乙酯为 1:7、 添加 12.7 g/L、60 °C反应 2 h 获得 85%香 叶醇转化率	[73]
乙酸异戊酯	转酯	蛋白质包被的微晶 疏棉状嗜热霉菌脂 肪酶	正己烷体系、温度为 50 °C、添加 30 mg 固定化酶、乙酸乙酯: 异戊醇摩尔比为 1:3、反应 6 h 后乙酸异戊酯收率为 95%	[74]
乙酸己酯	转酯	Lipozyme RMIM	正己烷体系、温度为 50 °C、转速 100 rpm、 己醇: 甘油三乙酸酯为 1:1、添加 4%酶量、 反应 9 h 后实现 68%转化率	[75]
乙酸丁酯	酯化	Novozym 435	无溶剂体系、添加 4%的酶量、连续添加 乙酸使正丁醇: 乙酸终摩尔比为 1:1, 温 度为 60 °C达到 84%转化率	[76]

1.3.4 风味酯合成的反应体系

1.3.4.1 无溶剂体系

在无溶剂体系中, 因为醇同时起着底物(酰基供体)和溶剂的作用, 所以不需要向反应混合物中加入额外的有机溶剂。这样, 与在有机溶剂介质中相比, 下游过程被简化, 因为它不需要化合物分离和溶剂蒸发^[77]。无溶剂体系中脂肪酶催化酯合成反应更加方便, 因为酶活性位点周围有更多的底物。例如, Azudin^[78]等使用固定化的 *R.miehei* 脂肪酶和 Novozym 435, 在无溶剂系统中合成乙酸异戊酯, 实现了 80%的转化率和较高的初始反应速率; Güvenç^[79]等将固定化脂肪酶 Novozym 435 用于催化杂醇油与异戊醇合成乙酸异戊酯, 并获得了 75%的高转化率; 响应面优化法(RSM)在酯合成的过程中起到了重要的作用, Güvenç^[80]等采用响应面法优化了 Novozym 435 催化合成乙酸异戊酯的反应条件, 获得了 82%的转化率。然而, 在某些情况下, 脂肪酶活性受到底物或产物的抑制,

从而导致酯产率降低。例如, Ben Salah^[81]等人使用由米根霉制备的脂肪酶在无溶剂系统中合成乙酸丁酯, 仅获得了 60% 的产率, 推测低收率是因为乙酸使脂肪酶变性失活。为了克服极性底物(例如乙酸和丁酸)的抑制作用, De Meneses^[82]等采用补料分批方法来克服丙酸导致的脂肪酶的失活, 丙酸苄酯转化率从分批模式的 44% 增加到补料模式的 99%。

1.3.4.2 有机溶剂合成体系

在有机溶剂中进行酯合成反应有利于底物的溶解, 增强酶的热稳定性, 促使反应向合成方向移动, 有助于提高酯合成的转化率。Raghavendra^[83]等人研究了不同有机溶剂类型对 *C.rugosa* 脂肪酶合成戊酸乙酯的影响, 发现环己烷是最合适的有机溶剂。除此之外, 正己烷、庚烷和异辛烷也是最常用的有机溶剂, 因为它们的极性较低, 在制备乙酸乙酯、乙酸丁酯、戊酸乙酯和丁酸甲酯中广泛使用^[84-87]。

然而, 有机溶剂本身也可能对脂肪酶活性产生不利影响, 特别是极性有机溶剂, 因为它们容易通过与蛋白质相互作用而夺取酶活性位点周围的必需水, 从而导致酶活性位点构象的扭曲。虽然通过使用有机溶剂可以获得高收率的酯, 但添加易燃有机溶剂会产生环境污染并危害人类安全与身体健康。为了解决有机溶剂带来的这些问题, 已经开发了新的替代反应介质, 例如离子液体和超临界流体。

1.3.4.3 离子液体体系

离子液体是由有机阳离子与阴离子组成, 常温下呈液态, 具有饱和蒸气压小、不可燃性、疏水性、可重塑性以及良好的热力学稳定性等性质, 这使其成为易燃有机溶剂的最佳的替代品^[88]。Alvarez^[89]等人研究发现, 在含有长烷基侧链的铵或咪唑阳离子的疏水性离子液体的反应介质中, 脂肪酶催化脂肪酸(乙酸、丙酸等)与醇(肉桂醇、苯甲醇、茴香醇)直接酯化, 所有合成的风味酯的产率均接近 100%, 并且形成的海绵状离子液体可以重复使用; Kirdi^[90]等人通过构建离子液体-醇的双相反应系统, 在高压的情况下达到了较高的转化率, 这在乙酸异戊酯的合成中表现尤为明显; Marina^[91]等人将疏水性离子液体[C₇mim][Tf₂N]用在小型酶反应器中, 通过固定化南极 *C.antarctica* 脂肪酶催化合成乙酸异戊酯, 其产率达到了 92%; Fehér^[92]等使用 PF₆ 离子液体作为合成乙酸异戊酯的反应介质, 并通过沸石吸附除去水, 获得了 100% 高酯产率。

1.3.4.4 超临界流体体系

超临界流体是一种绿色溶剂, 经常被用作酶促反应介质和从天然材料中提取化学品的溶剂^[93]。超临界二氧化碳(SC-CO₂)是脂肪酶催化合成酯中最常用的流体, 这种反应介

质具有低粘度、高扩散性、低临界温度和压力条件、不易燃性和无毒性等优点，这使 SC-CO₂ 成为脂肪酶催化反应的良好反应介质^[94]。Dias^[95]等采用 Novozym 435 在超临界二氧化碳(SC-CO₂)中，以生物乙醇工厂产生的副产物杂醇油通过酶法合成乙酸异戊酯，在最优的条件下，转化率达到 88.4%，相比较正己烷和无溶剂体系，分别高出 1.3 倍和 1.2 倍；并在连续填充床反应器(PBR)中，以固定化脂肪酶 Novozym 435 为催化剂，考察了压力、温度、底物、流速和 CO₂ 流速对乙酸异戊酯转化率的影响，显著性分析发现底物流速起着最大影响作用，其在最低底物流速(0.2 mL/min)下达到了最高的转化率；反应动力学显示酯转化率并没有随时间而变化，这表明 Novozym 435 在该过程中保持较好的稳定性和活性^[96]。Romero^[97]等人研究发现，在 SC-CO₂ 中，Novozym 435 和 Lipozyme RM-IM 均能成功合成乙酸异戊酯，与正己烷相比，尽管在酯的最终产率方面没有观察到显著差异，但是其合成的速率有了一定的提高。

1.4 本论文的研究目的和研究内容

风味酯是具有独特香味的物质，目前主要通过天然提取或者化学合成，但往往产量较低，提取成本高，而化学合成又可能会产生难以分离的副产物，污染环境，违背了绿色发展和可持续化学的原则。酶法合成是一种环境友好且比较温和的方式，通常其合成的产物可以被认为是等同于天然来源的产品，市场认可度较高。但是目前商品化的固定化脂肪酶的价格较高，种类有限，酶源单一。

本论文的研究目的：

- (1) 研究开发新的固定化脂肪酶的制备技术，适应风味酯合成的需要。
- (2) 发掘新的脂肪酶酶源，降低酶的制备成本。

本论文的主要框架如图 1-6 所示。

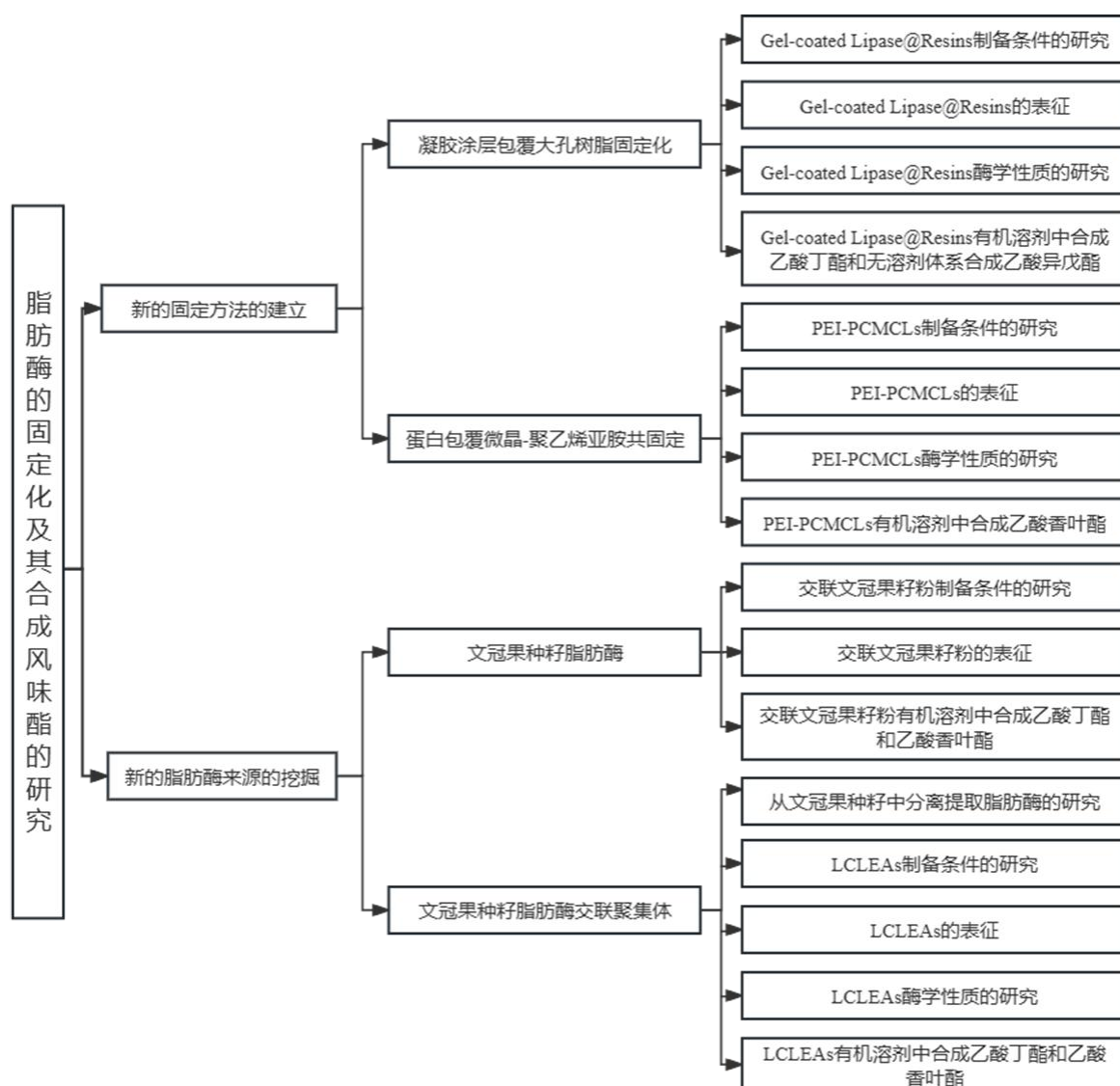


图 1-6 本论文的框架

Fig.1-6 The framework of the thesis

本论文的主要研究内容:

(1) 以来源于疏绵状嗜热丝孢菌的脂肪酶为研究对象, 采用凝胶涂层包覆大孔树脂固定脂肪酶, 优化了凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶(Gel-coated Lipase@Resins)的制备工艺条件, 然后对 Gel-coated Lipase@Resins 的形态结构进行表征, 考察了酶学性质, 最后以 Gel-coated Lipase@Resins 为催化剂, 在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯, 并研究不同条件对合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯的影响。

(2) 采用蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定技术对脂肪酶进行固定, 优化了蛋白包覆微晶脂肪酶-聚乙烯亚胺共固定化(PEI-PCMCLs)的制备工艺, 并对 PEI-PCMCLs 的形态

结构进行表征，考察了其酶学性质，最后以 PEI-PCMCLs 为催化剂，在非水相中催化合成乙酸香叶酯，并研究不同条件对合成乙酸香叶酯的影响。

(3) 从植物种籽中筛选出脂肪酶活性高的文冠果种籽，研究了浸泡时间与酶活的关系，并利用戊二醛溶液进行交联固定，同时对交联文冠果籽粉进行形态表征，最后以交联文冠果籽粉为催化剂，在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，并研究不同条件对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响。

(4) 采用三相分离技术从文冠果种籽粗酶提取液中初步分离纯化脂肪酶，分别对影响三相分离效果的条件进行了优化，然后利用戊二醛溶液进行交联固定，制备得到 LCLEAs，同时对比固定化前后的形态结构，最后以 LCLEAs 为催化剂，在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，并研究不同条件对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响。

第2章 凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯的研究

2.1 引言

脂肪酶，又称甘油酯水解酶(Lipase, EC.3.1.1.3)，其主要功能是催化酯的水解。在有机溶剂中，该酶能够通过酯化或者转酯反应合成酯类化合物，因此可以利用该酶合成风味酯^[98]。酶法合成风味酯具有反应条件温和、选择性高以及污染少等优点。根据国际行业规定，通过酶或微生物发酵法制备的风味酯等同于自然提取所得到的^[69]，消费者对它的接受度远高于化学合成香料。但是在有机环境中，游离酶的活性会有较大的损失，为了增强酶在有机溶剂中的稳定性，并使其作为催化剂能够被重复使用，需要对脂肪酶进行固定化处理以提高其稳定性^[99]。在风味酯合成的研究中，常用 Novozym435、Lipozyme TL-IM 和 Lipozyme RM-IM 这 3 种商品固定化脂肪酶^[100, 101]。除此之外，许多研究者以磁性纳米颗粒^[102]、MOF^[103, 104]以及碳纳米管^[105]等新材料为载体固定化脂肪酶用于合成丁酸乙酯、丁酸异戊酯和己酸乙酯等多种风味酯。

大孔树脂是经过人工合成的聚合物颗粒，具有多孔且立体的结构，这种材料不仅具备出色的稳定性，还因内部空间较大而表现出高吸附能力。基于这些特点，大孔树脂经常被用作固定化酶的载体，其所制备的固定化酶可以适应多种形式的反应器^[106]。然而简单的吸附作用使固定化酶的稳定性不高，酶蛋白容易从树脂上脱落。为了提高其稳定性，常采用戊二醛进行交联，但是这样的操作的结果会使酶活有较大损失^[46, 107, 108]。

本研究以大孔吸附树脂为载体固定化脂肪酶，然后对吸附在大孔树脂上的酶蛋白表面进行丙烯酰化反应，引入不饱和的可发生聚合反应的双键官能团，最后通过聚合反应在其表面形成凝胶层，完成对大孔树脂固定化脂肪酶颗粒的包覆，制备过程如图 2-1 所示。此方法所制备的固定化酶不仅不易从树脂上所脱落，而且由于接枝聚合物壳层的厚度被控制在纳米尺寸之内，因此并不会引发较大的传质阻力，使得酶活性得以有效保持；同时聚合物壳层与酶分子之间的共价连接以及壳层内部适宜的微环境可以大幅度增强酶的热稳定性和有机溶剂耐受性。同时也研究了影响凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶制备的主要因素，探究了固定化酶的稳定性，考察了固定化酶合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯的能力，对拓宽脂肪酶的用途具有一定的指导意义。

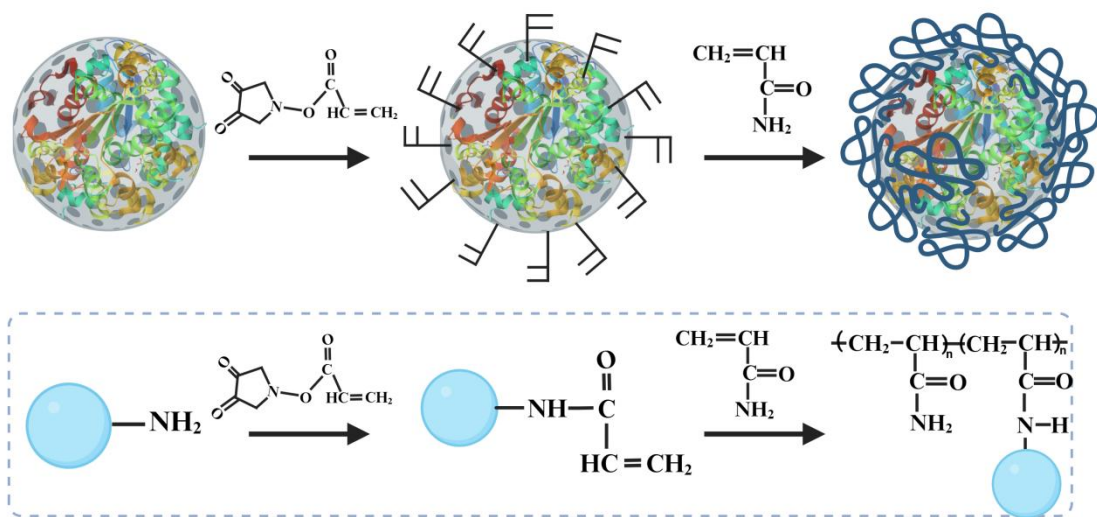


图 2-1 Gel-coated Lipase@Resins 的制备
Fig.2-1 Preparation of Gel-coated Lipase@Resins

2.2 材料与设备

2.2.1 材料与试剂

表 2-1 主要材料与试剂
Table 2-1 The main materials and reagents

试剂名称	规格	生产厂家
脂肪酶(源自 <i>Thermophila sparsiformis</i>)	酶活 ≥ 100000 U/mL	阿拉丁试剂有限公司
牛血清白蛋白	生物试剂	上海麦克林生物科技股份有限公司
考马斯亮蓝 G ₂₅₀	生物试剂	国药集团化学试剂有限公司
对硝基苯酚	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
三氯乙酸	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
曲拉通 100	生物试剂	阿拉丁试剂有限公司
阿拉伯树胶	生物试剂	阿拉丁试剂有限公司
棕榈酸对硝基苯酯	纯度 $\geq 98\%$	阿拉丁试剂有限公司
三羟基氨基甲烷	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
无水碳酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
大孔吸附树脂 D101	生物试剂	上海麦克林生物科技股份有限公司
DM130	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
YPR-II	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
AB-8	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
X-5	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
二甲亚砜	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺	纯度 $\geq 99\%$	北京百灵威科技有限公司
丙烯酰胺	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
过硫酸铵	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
N,N,N',N'-四甲基乙二胺	分析纯	生工生物工程股份有限公司
正庚烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

正己烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
环己烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
异辛烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
乙酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
正丁醇	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
乙酸乙烯酯	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
异戊醇	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
碳酸氢钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
酚酞	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
2,4,6-三硝基苯磺酸	分析纯	北京百灵威科技有限公司
磷酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
二甲基甲酰胺	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硫酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
25%戊二醛水溶液	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 仪器与设备

表 2-2 实验的主要设备

Table 2-2 The main apparatus of the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
高速离心机	64R	美国贝克曼公司
L3 可见分光光度计	723	上海仪电科学仪器股份有限公司
容声冰箱	BCD-202K	海信容声(广东)冰箱有限公司
快速混匀器	SK-1	金坛市杰瑞尔电器有限公司
数显恒温磁力搅拌器	JB-2010	金坛市杰瑞尔电器有限公司
数显恒温水浴锅	HH-6	金坛市杰瑞尔电器有限公司
电热恒温股份干燥箱	DHG-9143B5-III	上海新苗医疗器械制造有限公司
数控超声波清洗器	KQ-500DE	昆山市超声仪器有限公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
正置荧光显微镜	DM2500 LED	德国徕卡公司
比表面积和孔径测试仪	JW-BK200B	北京精微高博科学技术有限公司
恒温摇床	ZQZY-88BES	上海知楚仪器有限公司
红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
气相色谱仪	Agilent 8860	美国安捷伦公司

2.3 实验方法

2.3.1 Gel-coated Lipase@Resins 的制备

取 0.1 mL 来源于疏绵状嗜热丝孢菌的脂肪酶酶液用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 稀释到 5 mL, 称 1 g 大孔吸附树脂加入到稀释的酶液中, 并放入 30 °C、150 rpm 的恒温振荡摇床中吸附 2 h, 收集未被吸附的酶液, 并使用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 对吸附有脂肪酶的大孔树脂清洗 3 次, 滤纸吸干水分, 获得大孔吸附树脂固定化的脂肪酶(Lipase@Resins)。

取 1 g Lipase@Resins 放于 5 mL 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 中, 加入溶解于 DMSO 的 N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS)溶液 (5%, w/v) 至终浓度为 4 mmol/L, 在 4 °C 条件下搅拌反应 3 h, 反应结束后除去未反应的溶液, 并用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 清洗 3 次, 然后加入 100 mg 丙烯酰胺, 在室温条件下搅拌, 待溶解后通氮气吹扫 20 min 除去空气, 接着加入 10 mg 过硫酸铵和 15 μ L 的 TEMED 作为复合引发剂, 在 4 °C 条件下搅拌反应 5 h, 反应结束后除去未反应的溶液, 并用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 清洗 3 次, 获得凝胶涂层包覆的大孔树脂固定化脂肪酶(Gel-coated Lipase@Resins)。

2.3.1.1 大孔吸附树脂的筛选

为了研究不同大孔吸附树脂对吸附效果的影响, 选择以 DM130、YPR-II、AB-8、X-5、D101 为吸附载体, 其他条件保持不变, 待吸附过程结束后测定酶活和蛋白含量, 计算蛋白固定率和酶活回收率。

2.3.1.2 吸附 pH 的选择

为了研究不同 pH 对吸附效果的影响, 选择大孔吸附树脂 D101, 在 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的不同 pH 条件对脂肪酶进行吸附, 其他条件保持不变, 待吸附过程结束后测定酶活和蛋白含量, 计算蛋白固定率和酶活回收率。

2.3.1.3 酶添加量的选择

为了研究酶添加量对吸附的影响, 以大孔吸附树脂 D101 为载体, 在 pH 为 6 的条件下, 选择添加 0.05-0.25 mL/g 酶液量进行吸附, 其他条件保持不变, 待吸附过程结束后测定酶活和蛋白含量, 计算蛋白固定率和酶活回收率。

2.3.1.4 吸附时间的选择

为了选择合适的吸附时间，以大孔吸附树脂 D101 为载体，在 pH 为 6 的条件下，选择添加 0.20 mL/g 酶液量，吸附时间设定为 1-3 h，其他条件保持不变，待吸附过程结束后测定酶活和蛋白含量，计算蛋白固定率和酶活回收率。

2.3.1.5 修饰剂 NAS 浓度的选择

为了考察修饰剂 NAS 浓度对酶表面修饰的影响，在其他条件不变的基础上，分别向吸附固定化的酶溶液中加入 NAS 溶液至终浓度为 2、4、6、8、10 mmol/L，反应结束后测定酶表面氨基修饰度和剩余酶活。

2.3.1.6 表面修饰时间的选择

为了考察表面修饰时间对酶表面修饰的影响，在其他条件不变的基础上，加入 NAS 溶液至终浓度为 8 mmol/L，在 4 °C 条件下分别搅拌反应 0.5、1、2、3、4、5 h，反应结束后测定酶表面氨基修饰度和剩余酶活。

2.3.1.7 表面修饰 pH 的选择

为了考察 pH 对酶表面修饰的影响，根据磷酸缓盐冲液和柠檬酸盐缓冲液的配制方法，配置 50 mmol/L pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的盐缓冲液，在其他条件不变的基础上，取 1 g 大孔树脂 D101 吸附过的固定化酶放于 5 mL 不同 pH 的盐缓冲液中，加入 NAS 溶液至终浓度为 8 mmol/L，在 4 °C 条件下搅拌反应 3 h，反应结束后测定酶表面氨基修饰度和剩余酶活。

2.3.1.8 丙烯酰胺浓度的选择

为了考察不同丙烯酰胺浓度对酶表面聚合的影响，在其他条件不变的基础上，向固定化酶溶液中分别加入 5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL 的丙烯酰胺，制备得到一些不同丙烯酰胺浓度的纳米凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶颗粒，测定其剩余酶活。并将制备得到的不同丙烯酰胺浓度的纳米凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶颗粒放在 50 °C 的水浴锅中 2 h，测定剩余酶活，考察其稳定性。

2.3.1.9 表面聚合时间的选择

为了考察表面聚合时间对酶表面聚合的影响，在其他条件不变的基础上，向固定化酶溶液中加入 10 mg/mL 的丙烯酰胺，表面聚合反应 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h，制备得到不同聚合时间的纳米凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶颗粒，测定其剩余酶活。

并将制备得到的不同聚合时间的纳米凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶颗粒放在 50 °C 的水浴锅中 2 h, 测定剩余酶活, 考察其稳定性。

2.3.2 Gel-coated Lipase@Resins 的表征

2.3.2.1 红外光谱的测定

将经过真空干燥的 D101 Resins、Lipase@Resins、Gel-coated Lipase@Resins 分别与溴化钾混合, 并用压片机进行压片, 然后采用傅里叶变换红外光谱进行测定。

2.3.2.2 比表面和孔径的测定

将 D101 Resins、Lipase@Resins、Gel-coated Lipase@Resins 等样品真空干燥后, 进行比表面积和孔径测定。

2.3.2.3 扫描电子显微镜微观形态观测

采用扫描电子显微镜 (SEM) 对 D101 Resins、Lipase@Resins 及 Gel-coated Lipase@Resins 的微观形态进行观测。具体步骤如下: 取适量 D101 Resins、Lipase@Resins 及 Gel-coated Lipase@Resins 放入真空干燥箱中干燥, 然后取样品喷金后进行观测。

2.3.2.4 酶蛋白的荧光标记及荧光显微镜观测

酶蛋白的荧光标记可以利用异硫氰酸荧光素 (FITC), 具体操作如下: 称取 10 mg FITC 溶于 10 mL DMSO 溶液中, 再取 10 mL 稀释到 2 mg/mL 脂肪酶溶液, 按脂肪酶: 异硫氰酸荧光素 (FITC)=1 mg: 150 μ g 的比例缓缓加入 FITC 溶液, 并摇晃使其与脂肪酶溶液混匀, 然后放在 4 °C 冰箱中避光反应, 8 h 后加入 NH_4Cl 溶液 (5 mol/L) 至终浓度为 50 mmol/L, 并混合均匀, 放入 4 °C 冰箱中终止反应 2 h; 将混合溶液放在磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 中进行透析, 待透析液中观察不到明显荧光后, 取出荧光标记的脂肪酶蛋白溶液, 放入 4 °C 冰箱备用。用大孔吸附树脂 D101 吸附标记过的脂肪酶蛋白, 得到 FITC-Lipase@Resins, 之后进行表面修饰和表面聚合反应, 得到 FITC-Gel-coated Lipase@Resins。

采用荧光显微镜对 FITC-Lipase@Resins、FITC-Gel-coated Lipase@Resins 进行观测。具体步骤如下: 分别取适量的固定化酶, 干燥后将其均匀分散在载玻片上, 利用荧光显微镜测定固定化酶的荧光效果。

2.3.3 Gel-coated Lipase@Resins 酶学性质的研究

2.3.3.1 最适反应 pH 及酸碱稳定性的研究

将游离脂肪酶和固定化脂肪酶放在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液中

测定其催化活力，考察其最适反应 pH 的变化。

将游离脂肪酶和固定化脂肪酶放在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液中保持 3 h，结束后测定并计算其剩余酶活，考察其酸碱稳定性。

2.3.3.2 最适反应温度及热稳定性的研究

将游离脂肪酶和固定化脂肪酶放置在温度为 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C 的水浴锅中反应测定其催化活力，考察最适反应温度的变化。

将游离脂肪酶和固定化脂肪酶放置在温度为 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 的水浴锅中保持 3 h，结束后测定并计算其剩余酶活，考察其热稳定性。

2.3.3.3 有机溶剂的耐受性

将游离酶和固定化酶分别放在甲醇、乙醇、二甲亚砜、二甲基甲酰胺中 50 °C 保持 3 h，结束后测定并计算其剩余酶活，考察其有机溶剂耐受性。

2.3.3.4 酶促反应动力学研究

配制不同浓度的棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP)溶液(1、2、4、6、8、10 mg/mL)，其他条件不变，进行酶活测定，通过双倒数公式，计算出脂肪酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

2.3.4 Gel-coated Lipase@Resins 催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯

乙酸丁酯: 在 50 mL 的具塞三角瓶中加入 10 mL 正庚烷, 再加入 1 mmol 乙酸、1 mmol 丁醇、0.9 g 分子筛, 混合均匀后加入 0.25 g 固定化酶, 然后密封放入 40 °C、200 rpm 的恒温振荡摇床中反应 12 h。以乙酸异戊酯为内标, 绘制标准曲线, 采用气相色谱取样测定并计算乙酸丁酯合成的酯化率。

乙酸异戊酯: 在 3 mL 乙酸乙烯酯溶液中加入 0.6 mmol 异戊醇, 混合均匀后加入 0.25 g 固定化酶, 然后放入 5 mL 离心管中, 40 °C、200 rpm 的恒温摇床中反应 12 h。以乙酸丁酯为内标, 绘制标准曲线, 采用气相色谱取样测定并计算乙酸异戊酯合成的酯化率。

气相检测条件为:

色谱柱: AE.SE-30, 30 m 长×0.53 mm 内径;

进样口温度: 230 °C;

检测器温度: 230 °C;

柱温采用程序升温, 过程为: 80 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 的速度升到 120 °C, 保持 2 min, 以 20 °C/min 的速度升到 200 °C, 保持 2 min。

$$\text{酯化率} = \frac{\text{产物中酯的含量}}{\text{理论上完全反应生成酯的含量}} \times 100\%$$

2.3.5 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性

在实验的最佳条件下, 利用固定化脂肪酶进行催化反应, 反应结束后取出固定化脂肪酶自然吹干, 然后重复进行 4 次, 评估固定化脂肪酶的重复使用性。

2.4 分析方法

2.4.1 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶的水解酶活测定方法采用对硝基苯酚显色法^[109], 具体步骤如下:

(1) 对硝基苯酚(*p*-NP)标准曲线: 取 0.1391 g 对硝基苯酚溶解于 1 L 纯水中, 再从中取 10 mL 用纯水定容到 100 mL, 得到 100 μmol/L 的对硝基苯酚溶液, 再分别稀释一定的浓度梯度, 加 1 mL 0.5 mol/L 三氯乙酸和 1.5 mL 10% 无水碳酸钠, 用分光光度计在 410 nm 处测量吸光度, 从而获得线性回归方程和相关系数。

(2) 底物的配制: 底物 A: 90 mg 棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP)加入到 30 mL 异丙醇中超声溶解。底物 B: Tris-HCL 缓冲液(50 mmol/L, pH=8)中加入 1% 曲拉通 100 和 0.1% 阿拉伯树胶。

(3) 酶活力的测定: 取 0.2 mL 底物 A 和 1.8 mL 底物 B 混匀, 加上 0.5 mL 适当稀释的酶液混匀放入 40°C 水浴锅中反应 10 min, 再加 1 mL 0.5 mol/L 三氯乙酸, 并迅速放入冰水浴中 3 min 终止反应, 加 1.5 mL 10% 无水碳酸钠显色, 用分光光度计在 410 nm 处测量吸光度。以 0.5 mL 磷酸盐缓冲溶液代替酶液作为对照组, 其他条件均保持一致。每组样品平行测定 3 次。

(4) 脂肪酶酶活按下式计算:

$$\text{脂肪酶水解酶活(U/mL)} = \frac{CV}{tV'}$$

其中 C 为对硝基苯酚浓度, μmol/mL; V 为酸碱调节后的终体积, mL; V' 为酶液的用量, mL; t 为反应时间, min。

酶活定义: 在一定条件下, 每分钟水解 *p*-NPP 产生 1 μmol *p*-NP 所需要的酶量为一个酶活单位。

剩余酶活: 在同组实验中, 以初始组酶活为 100%, 其他组的酶活用所测得的酶活与初始酶活的百分比表示。

相对酶活：在同组实验中，以酶活最高的实验组的酶活为 100%，其他组的酶活用所测得的酶活与最高酶活的百分比表示。

2.4.2 蛋白含量的测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[110]，具体步骤如下：

(1) 考马斯亮蓝溶液的配制：称取 100 mg 考马斯亮蓝 G₂₅₀ 溶于 50 mL 95% 乙醇中，加入 100 mL 85% 磷酸混匀，加水定容到 1 L，用滤纸过滤后避光备用。

(2) 蛋白浓度标准曲线：以牛血清蛋白为标准蛋白，并配制成不同的浓度的溶液，取 1 mL 标准蛋白溶液，加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液并混匀，用分光光度计在 595 nm 处测得吸光度，从而获得线性回归方程和相关系数。

(3) 蛋白含量的测定：取 1 mL 适当稀释的酶蛋白溶液，加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液，混匀后放置 5 min，用分光光度计在 595 nm 处测量吸光度，将测得的吸光值代入标准曲线方程，计算得到蛋白溶液浓度。以 1 mL 磷酸盐缓冲溶液代替酶蛋白溶液作为对照，其他条件保持一致。每组样品平行测 3 次。

2.4.3 蛋白固定率的计算

固定化脂肪酶的蛋白固定率计算公式为：

$$\text{蛋白固定率(\%)} = \frac{\text{加入的总蛋白含量} - \text{未吸附的蛋白含量}}{\text{加入的总蛋白含量}} \times 100\%$$

2.4.4 酶蛋白表面氨基修饰度的测定

酶蛋白表面氨基的修饰度利用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)进行测定，具体操作如下：用一定量磷酸盐缓冲液稀释固定化酶，并加入 1 mL 4% 的 NaHCO₃ 溶液混匀，然后再加入 1 mL 0.1% 的 TNBS 溶液，振荡混匀后放于 40 °C 的水浴锅中保温，避光反应 2 h，反应结束后待冷却至室温，然后用分光光度计在 420 nm 处测定其吸光值。其中，以不加固定化酶的磷酸盐缓冲溶液作为空白对照，其他条件均保持一致。氨基修饰度的计算公式为：

$$\text{氨基修饰度(\%)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\%$$

其中，A₀ 为未修饰酶蛋白溶液的 OD 值，A₁ 为修饰后酶蛋白溶液的 OD 值。

2.5 结果与讨论

2.5.1 标准曲线

2.5.1.1 蛋白标准曲线

测定不同浓度的牛血清蛋白(BSA)吸光度,并绘制其标准曲线,结果如图 2-2。蛋白浓度标准曲线的线性回归方程为: $y=0.0072x+0.0706(R^2=0.9961)$ 。

其中 y 为吸光值 A_{595} , x 为蛋白浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

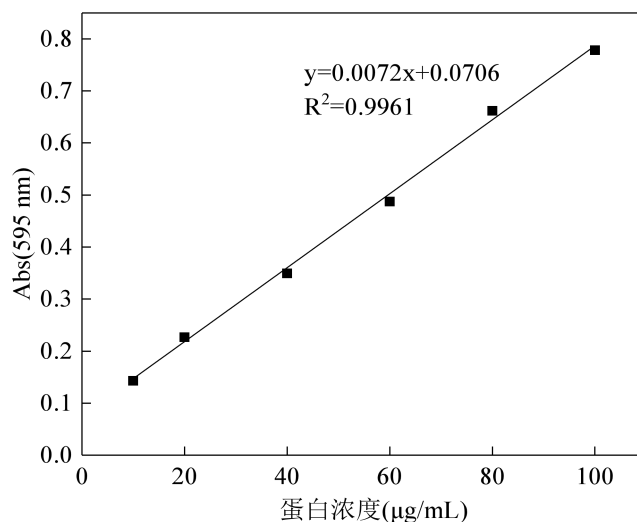


图 2-2 蛋白标准曲线

Fig.2-2 Standard curve of protein

2.5.1.2 对硝基苯酚标准曲线

测定不同浓度对硝基苯酚的吸光值,并绘制其标准曲线,如图 2-3 所示。对硝基苯酚(p -NP)标准曲线线性回归方程为: $y=0.0165x+0.0120(R^2=0.9997)$ 。

其中 y 为吸光值 A_{410} , x 为 p -NP 浓度, $\mu\text{mol/L}$ 。

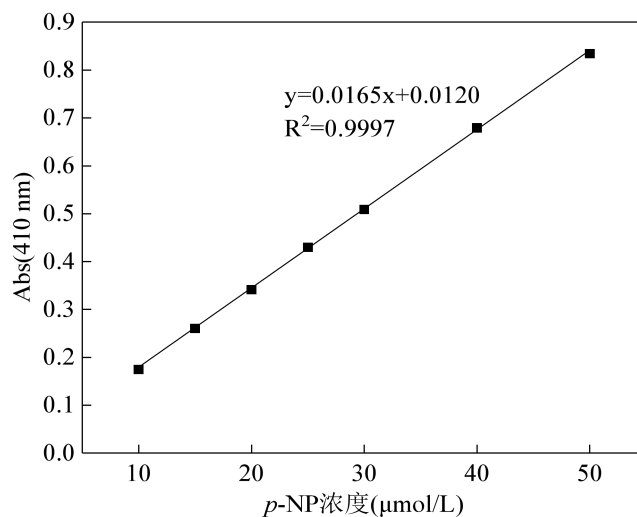


图 2-3 p -NP 标准曲线

Fig.2-3 Standard curve of p -NP

2.5.1.3 乙酸丁酯和乙酸异戊酯的标准曲线及气相色谱图

如图 2-4 所示,测定并计算不同浓度的乙酸丁酯与内标的峰面积之比,绘制成标准曲线,由图 A 可知乙酸丁酯的线性回归方程为 $y=0.1617x+0.0031$ ($R^2=0.9938$); 由图 B 可知,乙酸、丁醇、乙酸丁酯和内标乙酸异戊酯的保留时间分别为 8.457 min、9.027 min、10.548 min 和 11.365 min。

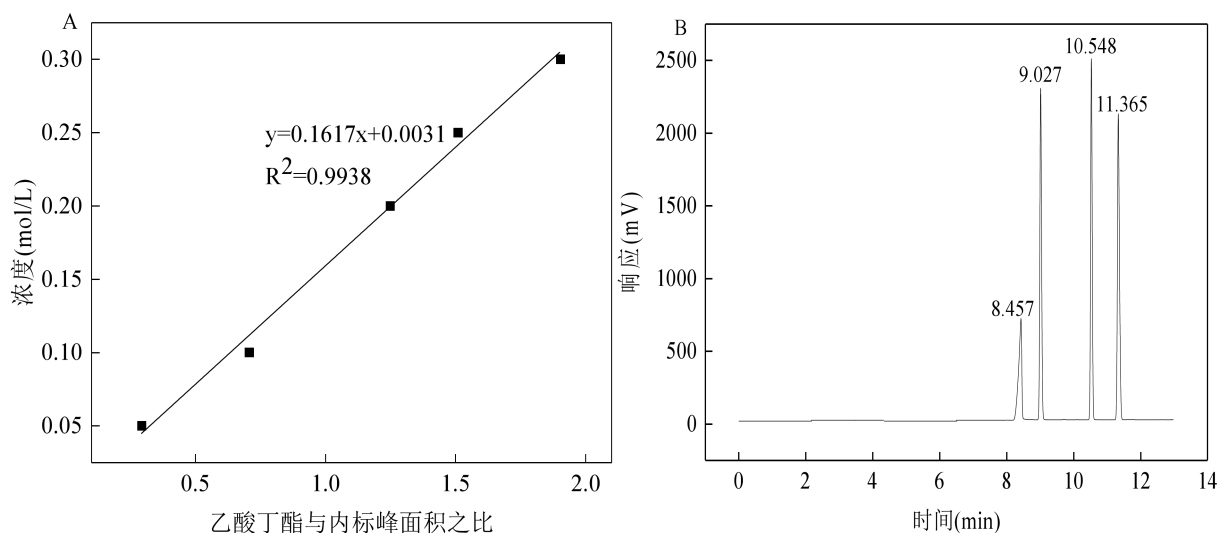


图 2-4 乙酸丁酯的标准曲线(A)及标准品气相色谱图(B)

Fig.2-4 Standard curve(A) and GC chromatogram(B) of butyl acetate standards

如图 2-5 所示,测定了不同浓度的乙酸异戊酯与内标的峰面积,并绘制成标准曲线,由图 A 可知,乙酸异戊酯的线性回归方程为 $y=0.1363x+0.0029$ ($R^2=0.9964$); 由图 B 可知,乙酸乙烯酯、异戊醇、乙酸异戊酯和内标乙酸丁酯的保留时间分别为 8.462 min、9.733 min、10.562 min 和 11.378 min。

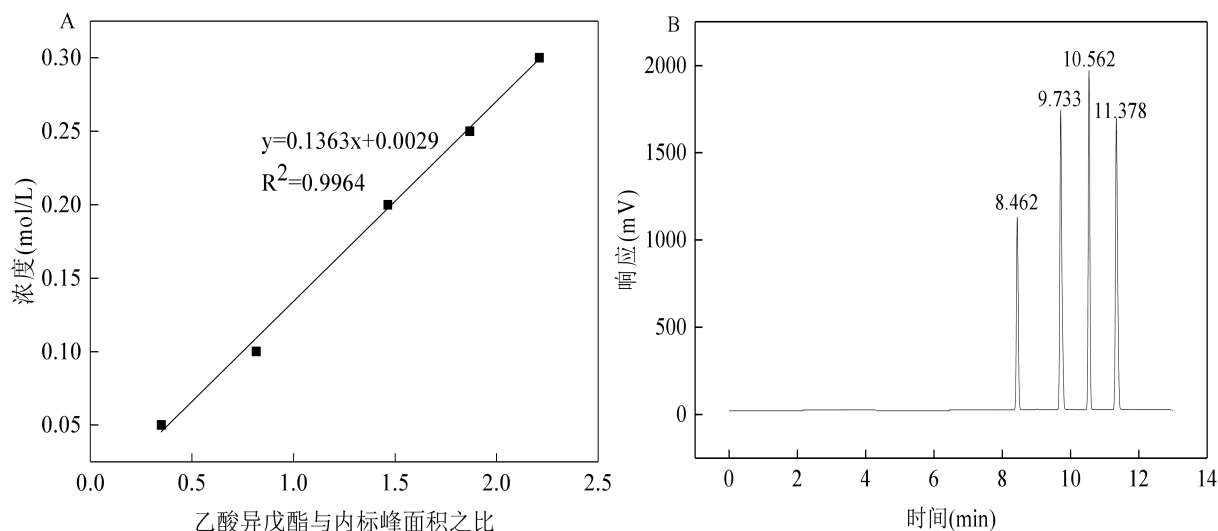


图 2-5 乙酸异戊酯的标准曲线(A)及标准品气相色谱图(B)

Fig.2-5 Standard curve(A) and GC chromatogram(B) of isoamyl acetate standards

2.5.2 Gel-coated Lipase@Resins 的制备

2.5.2.1 不同型号树脂对脂肪酶吸附的影响

不同型号的大孔树脂具有各自的吸附特性，以市场常见的 DM130、YPR-II、AB-8、X-5 和 D101 等 5 种树脂为吸附载体，通过测定蛋白含量和酶活，从而选择最优的大孔吸附树脂，结果如图 2-6 所示。可以看出，以大孔吸附树脂 D101 进行吸附，其蛋白固定率和酶活回收率最高。载体的物理化学性质是影响固定化效果的重要因素^[66, 111]，大孔吸附树脂 D101 作为一种非极性吸附树脂，具有较大的孔径和比表面积，能够提供更多的吸附位点，在多种性质的脂肪酶的固定化中有成功的应用^[106, 112]，后续实验采用大孔树脂 D101 作为吸附载体。

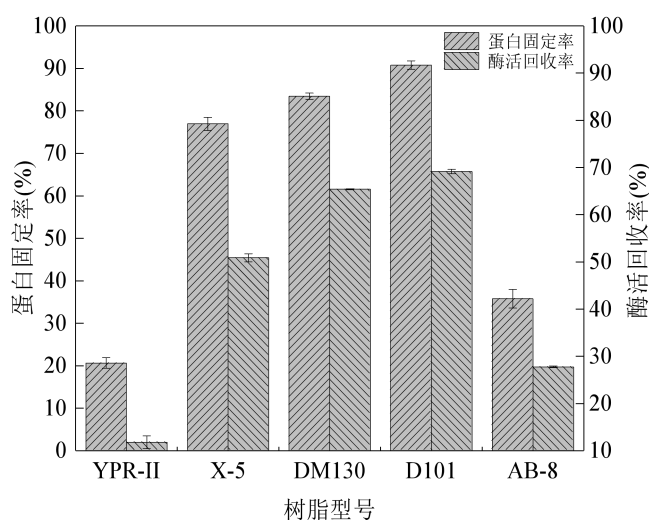


图 2-6 不同型号树脂对脂肪酶吸附的影响

Fig.2-6 Effect of different types of resins on lipase adsorption

2.5.2.2 pH 对脂肪酶吸附的影响

pH 是影响固定化效果的重要因素之一，它可能会影响酶蛋白表面的带电状态，影响与树脂的吸附。为了制备得到效果最佳的固定化酶，考察了不同 pH 条件下 D101 树脂吸附脂肪酶的情况，实验结果如图 2-7 所示，当 pH 在 5.0-7.5 时，其蛋白固定率在 80% 以上，酶活回收率在 60% 以上，其中，当 pH 为 6.0 时，固定化效果最好，其蛋白固定率达到 96.67%，酶活回收率也达到 89.98%，因此选择 pH 为 6.0 作为吸附条件。

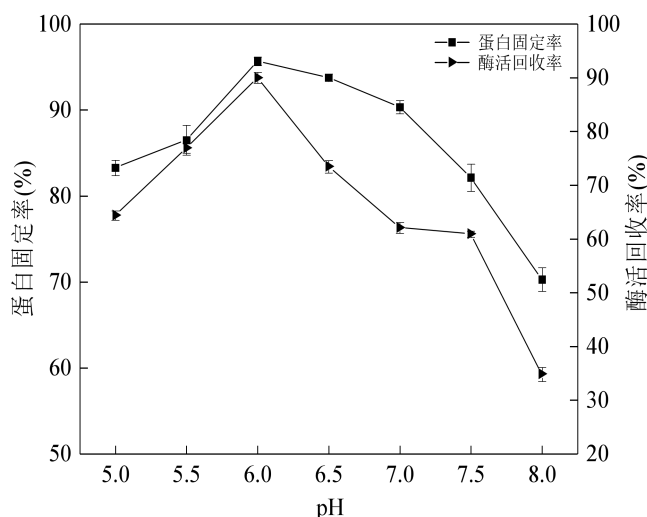


图 2-7 pH 对脂肪酶吸附的影响

Fig.2-7 Effect of pH on lipase adsorption

2.5.2.3 酶添加量对脂肪酶吸附的影响

为了选择合适的酶液量，选择添加 0.05-0.25 mL/g 进行吸附实验，结果如图 2-8 所示，当酶液添加量在 0.05-0.2 mL/g 时，蛋白吸附率在 95% 左右，酶活回收率在 90% 左右，当增加酶液添加量到 0.25 mL/g 时，蛋白吸附率和酶活回收率都有所减少，这是因为当吸附达到一定程度之后，达到了大孔树脂最大吸附量，继续增加酶量蛋白固定率下降和酶活回收率反而下降^[113]。出于经济考虑，选择 0.2 mL/g 作为吸附的条件。

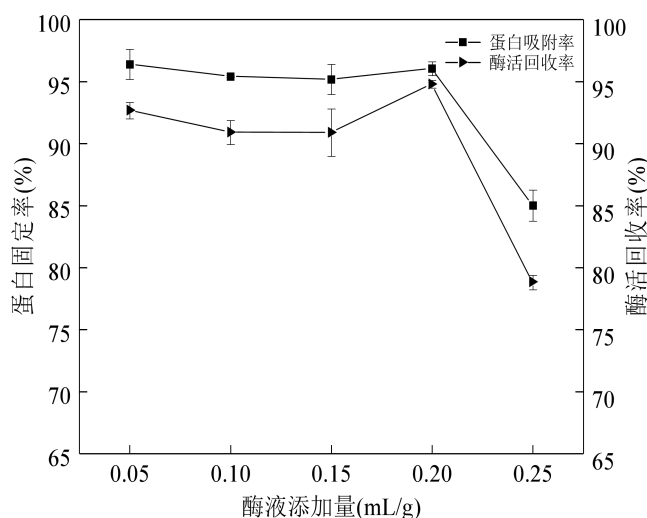


图 2-8 酶添加量对脂肪酶吸附的影响

Fig.2-8 Effect of enzyme addition on lipase adsorption

2.5.2.4 吸附时间对脂肪酶吸附的影响

大孔树脂吸附酶蛋白是一个物理过程，包括酶蛋白聚集在树脂的表面以及向树脂内部的扩散，为了研究吸附时间对脂肪酶固定化的影响，选择了 1-3 h 的吸附时间，结果如图 2-9 所示，当吸附时间小于 2 h 时，蛋白吸附率和酶活回收率随着吸附时间的延长

而增加,这可能是由于吸附时间过短,酶与树脂结合不充分,且清洗时会有部分酶脱落,当吸附时间超过 2 h 时,蛋白吸附率基本保持不变,但酶活回收率有所下降,这可能是酶与树脂结合已经达到饱和状态,吸附时间延长,蛋白吸附率也基本不变,但酶活回收率略微下降,这可能是酶自身稳定性导致。因此选择 2 h 作为吸附条件。

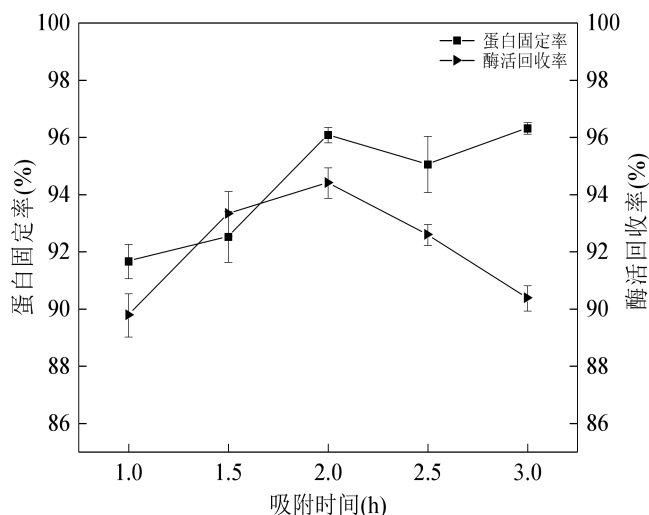


图 2-9 吸附时间对脂肪酶吸附的影响

Fig.2-9 Effect of time on lipase adsorption

2.5.2.5 修饰剂 NAS 浓度的选择

NAS 作为修饰剂,可以与酶表面的氨基反应,从而引入可聚合的双键基团,这个过程被称为酶的丙烯酰化,从而为后续的聚合反应提供位点^[114]。在修饰时如果 NAS 浓度过低,则可能造成修饰度不足。研究了不同 NAS 浓度对脂肪酶表面修饰的影响,结果如图 2-10 所示。随着 NAS 浓度的增加,脂肪酶表面氨基修饰度也在慢慢提高,达到 80% 以上。但随着 NAS 浓度的增加,脂肪酶的酶活也在慢慢下降,这可能是 NAS 浓度低时对酶活性的影响较小,而随着 NAS 浓度的提高,这种影响逐渐放大,使得酶的催化活性中心被破坏,造成酶活的损失。因此,综合考虑之后选择 8 mmol/L 的 NAS 浓度作为后续的实验条件。

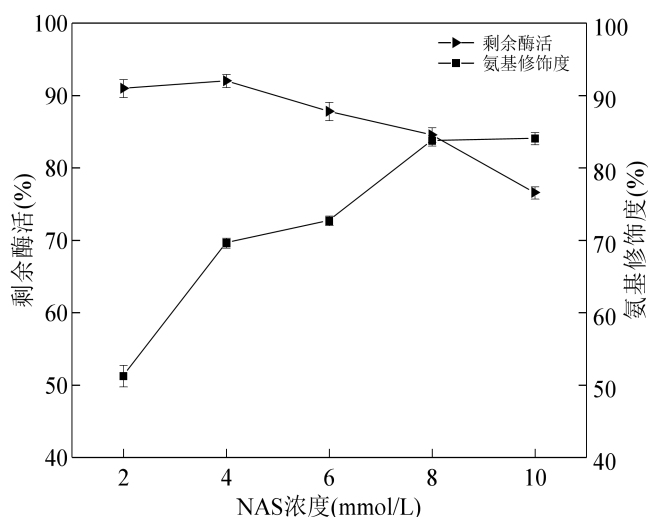


图 2-10 不同 NAS 浓度对脂肪酶的影响

Fig.2-10 Effect of NAS concentrations on lipase

2.5.2.6 表面修饰时间的选择

酶的表面修饰需要一定的反应时间，时间越长，修饰越充分，但随着修饰时间的延长，暴露在 NAS 体系的时间也越长，可能造成酶活的损失。为了选择合适的表面修饰时间，选择了 0.5-5 h 进行表面修饰。结果如图 2-11 所示，在 0.5-3 h 之间，随着反应时间的延长，氨基修饰度从 36.49% 提高到了 82.36%，继续延长反应时间，氨基修饰度基本稳定，但酶活损失较多。综合考虑选择 3 h 作为表面修饰的时间。

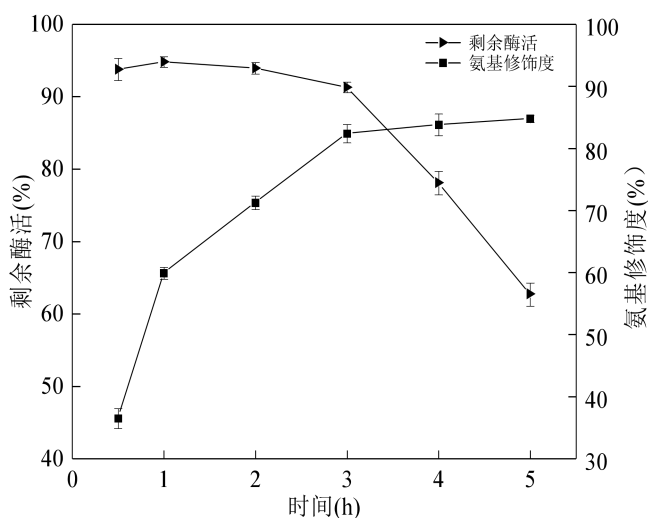


图 2-11 表面修饰时间对脂肪酶的影响

Fig.2-11 Effect of acryloylation modified reaction time on lipase

2.5.2.7 表面修饰 pH 的选择

酶在进行表面修饰时，不同的 pH 可能会对修饰结果产生影响。研究了不同 pH 对酶表面修饰的影响，结果如图 2-12 所示，当 pH=6 和 7 时，氨基修饰度在 80% 左右。当 pH=4、5、8、9 时，相较于 pH=6 和 7，这 4 种 pH 条件下酶表面的氨基修饰度不高，可

能 pH 过高或过低不利于酶的表面修饰。当 pH 在 4-8 之间，酶活基本保持在 80% 以上，证明酶的表面修饰有一定的作用。当 pH=9 时，酶活损失增加，可能是由于酶的表面氨基修饰度低。因此，综合考虑选择 pH=6 作为表面修饰时的 pH 条件。

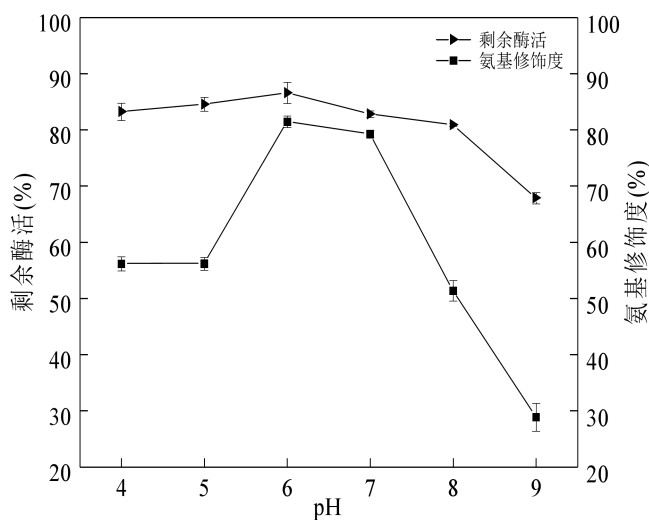


图 2-12 表面修饰 pH 对脂肪酶的影响

Fig.2-12 Effect of acryloylation modified pH on lipase

2.5.2.8 丙烯酰胺浓度的选择

酶纳米凝胶的物理和化学性质受到丙烯酰胺浓度的影响，如图 2-13 所示，当丙烯酰胺浓度从 5 mg/mL 增加到 15 mg/mL，剩余酶活基本稳定，但酶活稳定性从 87.7% 提高到 94.83%，这可能是因为增加了表面聚合物壳层厚度，继续提高浓度，剩余酶活下降，但酶活稳定性并没有提高，因此选择 10 mg/mL 作为丙烯酰胺的浓度。

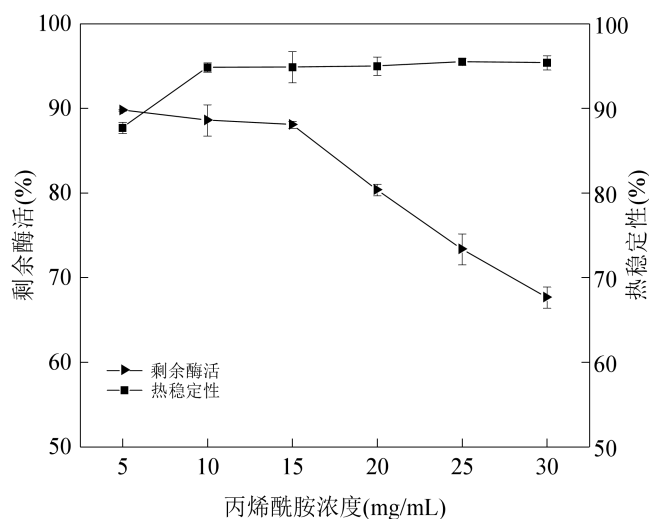


图 2-13 丙烯酰胺浓度对脂肪酶的影响

Fig.2-13 Effect of acrylamide concentration on lipase

2.5.2.9 表面聚合时间的选择

表面聚合时间的长短影响酶表面聚合效果,如图 2-14 所示,当表面聚合时间增加,酶的稳定性由 1 h 的 80.83% 提高到 5 h 的 94.02%。当表面聚合时间在 1-3 h 时,剩余酶活基本一致,酶活稳定性有所提高,这是由于表面聚合物壳层厚度在增加,从而提高酶的稳定性。随着时间的延长,酶活稳定性基本不再提高,但剩余酶活降低,这可能是由于聚合时间过长导致表面聚合物壳层较厚,使得酶与底物接触困难,因此选择 3 h 作为表面聚合的时间。

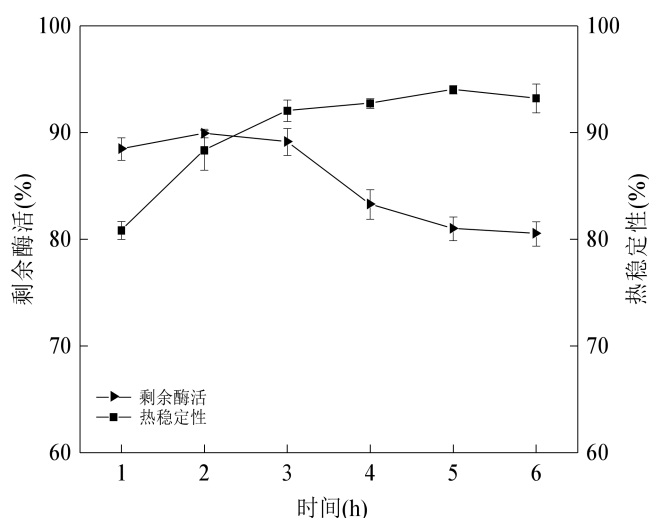


图 2-14 表面聚合对脂肪酶的影响

Fig.2-14 Effect of surface polymerization on lipase

2.5.3 Gel-coated Lipase@Resins 的表征

2.5.3.1 红外光谱的测定

采用傅里叶变换红外光谱对 D101 Resins、Lipase@Resins、Gel-coated Lipase@Resins 进行了分析,结果如图 2-15 所示,通过红外光谱分析可知,酰胺 I 带($1600-1700\text{cm}^{-1}$)和酰胺 II 带($1500-1600\text{cm}^{-1}$)是蛋白质的特征吸收峰,对 Lipase@Resins 的红外光谱进行分析可以得知,在 1653cm^{-1} 处的峰与酰胺 I 带中 C=O 伸缩振动有关, 1511cm^{-1} 处的峰与酰胺 II 带中 C-N 的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动有关,与 D101 Resins 的红外光谱对比表明脂肪酶被吸附在大孔树脂 D101 表面。在固定化酶 Gel-coated Lipase@Resins 的红外光谱中, 3313cm^{-1} 处的峰对应为 N-H 的伸缩振动, 2925cm^{-1} 和 2857cm^{-1} 处的峰对应为亚甲基的反对称与对称伸缩振动, 1667cm^{-1} 处的峰对应为 C=O 的伸缩振动, 1453cm^{-1} 处的峰对应为亚甲基的弯曲振动, 1120cm^{-1} 处的峰对应于 C-N 的伸缩振动,以上结果证明了聚丙烯酰胺纳米凝胶涂层成功包覆。

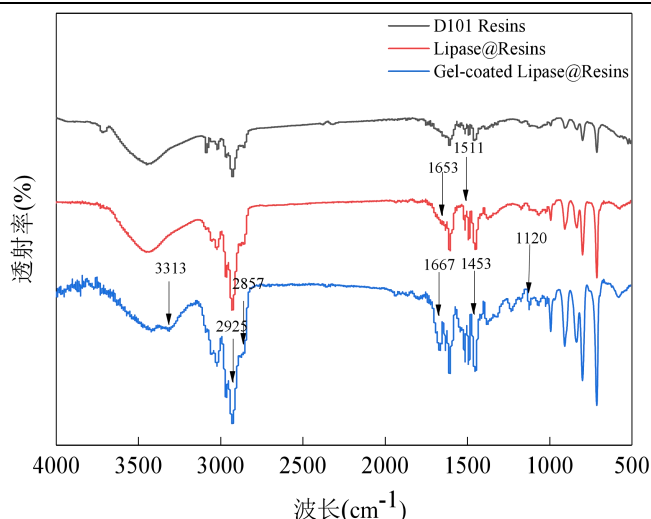


图 2-15 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的红外光谱图

Fig.2-15 Infrared spectra of D101 Resins, Lipase@Resins and Gel-coated Lipase@Resins

2.5.3.2 孔径分布测定

图 2-16 和图 2-17 分别显示了 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的氮气吸附脱附曲线及孔径分布曲线。从图中看出所有的样品曲线均出现 II 型吸附等温线和 H3 型回滞环,这说明树脂内部存在介孔。表 2-3 总结了 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的比表面积和孔体积。其中, D101 的比表面积和孔体积分别是 $678.183\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $1.467\text{cm}^3\text{g}^{-1}$; 脂肪酶吸附以后, 比表面积和孔体积分别下降到 $626.935\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $1.341\text{cm}^3\text{g}^{-1}$, 这说明 D101 树脂中的部分介孔被堵塞; 纳米凝胶包覆以后, 比表面积和孔体积下降到 $580.845\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $1.133\text{cm}^3\text{g}^{-1}$, 说明纳米凝胶成功包覆。

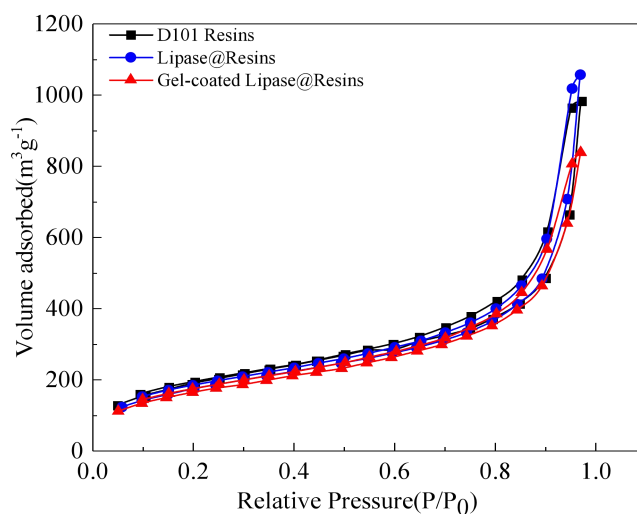


图 2-16 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的氮气吸附脱附等温线

Fig.2-16 Nitrogen adsorption-desorption isotherm of D101 Resins, Lipase@Resins and Gel-coated Lipase@Resins

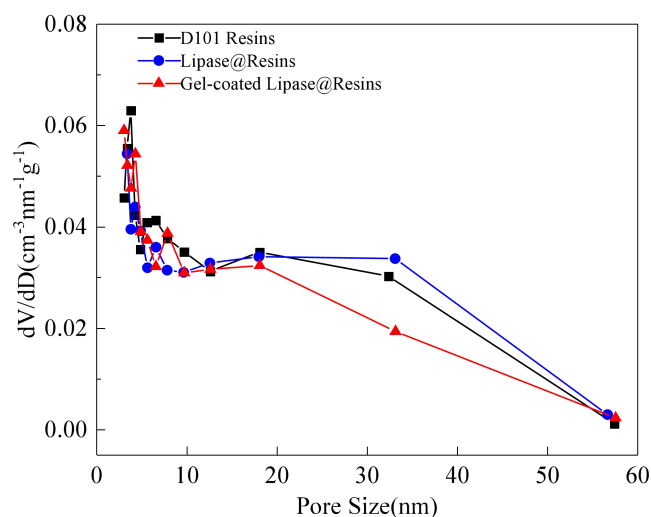


图 2-17 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的孔径分布曲线

Fig.2-17 Pore size distribution curve of D101 Resins,Lipase@Resins and Gel-coated Lipase@Resins

表 2-3 D101 Resins,Lipase@Resins and Gel-coated Lipase@Resins 的 BET 和 BJH 参数

Table 2-3 BET and BJH parameters of D101 resins, Lipase@resins and Gel-coated Lipase@Resins

	D101 Resins	Lipase@Resins	Gel-coated Lipase@Resins
比表面积(m^2g^{-1})	678.183	626.935	580.845
孔体积(cm^3g^{-1})	1.467	1.341	1.133

2.5.3.3 扫描电子显微镜微观形态观测

如图所示,图 2-18 展示了 D101 Resins、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的 SEM 图。由图 A 可知,大孔树脂 D101 表面有很多的孔状结构,这种结构为酶蛋白的吸附提供了大量的附着位点。由图 B 可知大量脂肪酶蛋白被大孔树脂吸附,使得孔状结构被填满。由图 C 可知脂肪酶蛋白表面裹上了一层紧密的聚合物壳层,这种结构更有利于提高酶的稳定性。

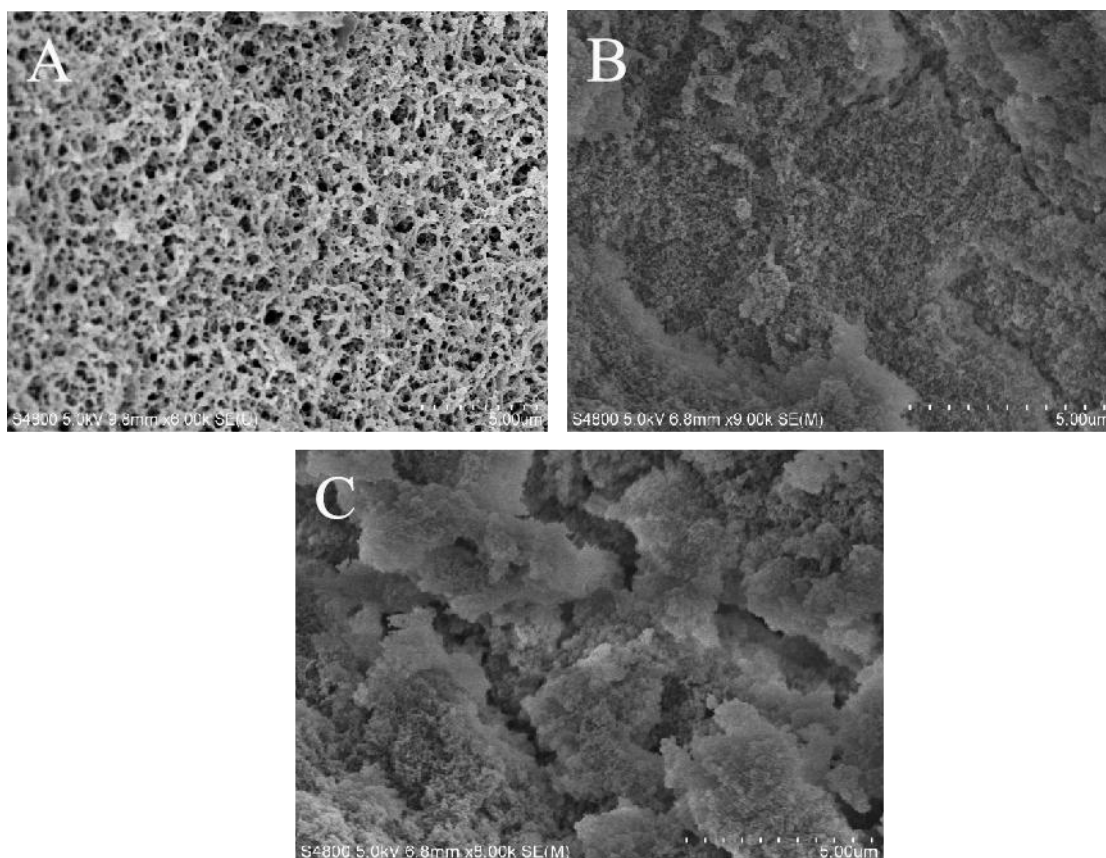


图 2-18 D101 Resins(A)、Lipase@Resins(B)和 Gel-coated Lipase@Resins(C)的 SEM 图

Fig.2-18 SEM images of D101 Resins(A)、Lipase@Resins(B)和 Gel-coated Lipase@Resins(C)

2.5.3.4 荧光显微镜观测

将脂肪酶经过荧光标记后, 再进行固定化, 图 2-19 显示了在荧光显微镜观测到的 FITC-Lipase@Resins 和 FITC-Gel-coated Lipase@Resins 的情况, 观测分析可以证明固定化酶颗粒被凝胶包覆后的情况。对比可知, FITC-Gel-coated Lipase@Resins 的荧光强度较 FITC-Lipase@Resins 有所减弱, 这从一个侧面也证明了 Lipase@Resins 表面被裹上一层聚合物。

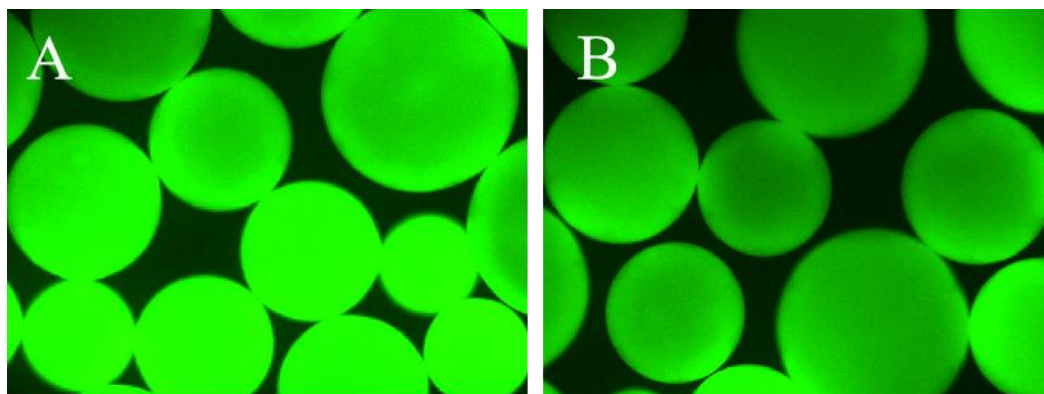


图 2-19 FITC-Lipase@Resins(A)和 FITC-Gel-coated Lipase@Resins(B)的荧光照片

Fig.2-19 Fluorescence imaging of FITC-Lipase@Resins(A)和 FITC-Gel-coated Lipase@Resins(B)

2.5.4 Gel-coated Lipase@Resins 酶学性质的研究

2.5.4.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性的研究

在不同 pH 条件下分别研究了游离脂肪酶和固定化酶的催化活性, 结果如图 2-20 和图 2-21 所示。由图 2-20 可知, 游离脂肪酶和固定化酶的最适反应 pH 均为 8, 说明固定化手段并没有改变脂肪酶的催化活性中心结构。由图 2-21 可知, 经过固定化处理后, 在一定程度上提高了酶对酸碱的耐受性。当 pH 偏碱性时, 游离酶和固定化酶的酶活损失相对较少, 证明脂肪酶具有一定的耐碱性, 这与文献所报道的一致^[52]。

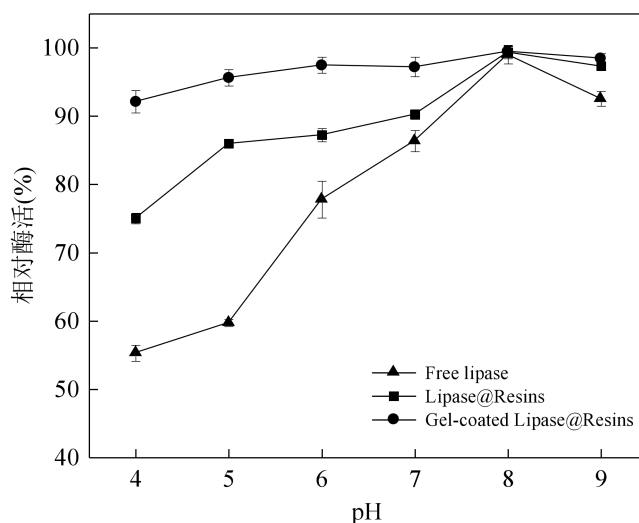


图 2-20 Gel-coated Lipase@Resins 最适反应 pH

Fig.2-20 Optimum reaction pH of Gel-coated Lipase@Resins

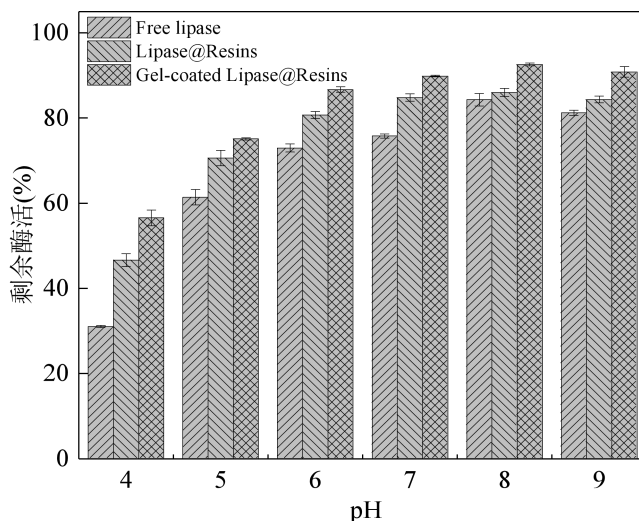


图 2-21 Gel-coated Lipase@Resins 的 pH 稳定性

Fig.2-21 The pH stability of Gel-coated Lipase@Resins

2.5.4.2 最适反应温度和热稳定性

在不同温度条件下分别研究了游离脂肪酶和固定化脂肪酶的催化活性, 结果如图 2-22 和图 2-23 所示。由图 2-22 可知, 游离脂肪酶和固定化酶的最适反应温度都为 50 °C。在小于 50 °C 条件下酶的催化活性随着温度的升高而增加, 可能是温度过低不利于酶的

催化。在大于 50 °C 时，游离酶的催化活性降低，而经过固定化处理后催化活性降低较少，证明酶表面的纳米凝胶壳层使得酶催化活性提高。由图 2-23 可知，游离脂肪酶在 40 °C 和 50 °C 条件下处理 3 h 仍然保留 80% 的酶活，但在 60 °C 和 70 °C 条件下酶活损失较多。相比游离酶来说，两种固定化酶在 60 °C 和 70 °C 酶活损失大大减少，证明经过固定化后酶的热稳定性显著提高。

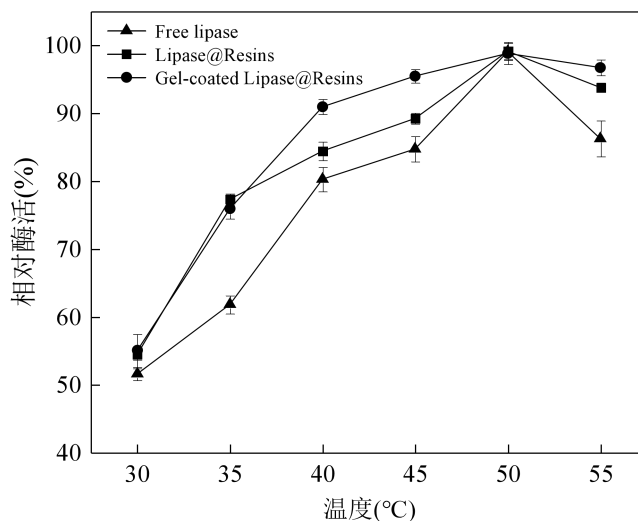


图 2-22 Gel-coated Lipase@Resins 的最适反应温度

Fig.2-22 Optimum reaction temperature of Gel-coated Lipase@Resins

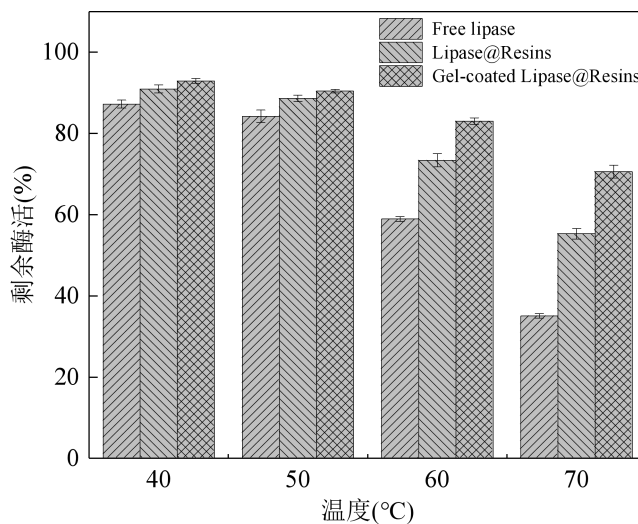


图 2-23 Gel-coated Lipase@Resins 的热稳定性

Fig.2-23 Thermal stability of Gel-coated Lipase@Resins

2.5.4.3 有机溶剂耐受性

酶在有机溶剂等非水介质中催化活性会有较大损失，通过固定化手段能够在一定程度上减少酶活损失。图 2-24 展示了游离脂肪酶和固定化酶在甲醇、乙醇、二甲亚砜和二甲基甲酰胺中的剩余酶活，从图中可以看出，游离酶在四种有机溶剂中仅保留不到 20% 的酶活，通过大孔树脂 D101 吸附以及纳米凝胶涂层包覆后，对这四种有机溶剂的

耐受性大大提高。在二甲亚砆和二甲基甲酰胺中也保留 40%左右的酶活，证明了固定化处理后可以有效提高对有机溶剂的耐受性，扩大酶的应用。

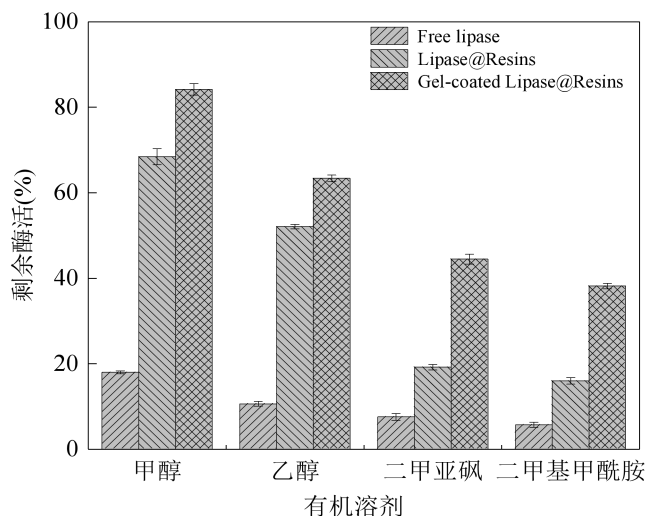


图 2-24 Gel-coated Lipase@Resins 的有机溶剂耐受性

Fig.2-24 Stability of Gel-coated Lipase@Resins in organic solvents

2.5.4.4 酶促反应动力学参数的测定

酶促反应动力学参数能够直观地反映酶的催化效率。以 *p*-NPP 为底物，分别测定了 Free lipase、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 这 3 种形式的脂肪酶在不同底物浓度下的催化活性。并根据双倒数法绘制酶促反应动力学曲线，得到图 2-25，计算出 Free lipase、Lipase@Resins 和 Gel-coated Lipase@Resins 的米氏常数 K_m 值及最大反应速率 V_{max} ，即表 2-4。由表 2-4 可知固定化酶的 K_m 值比游离脂肪酶的 K_m 值大，通常情况下，酶经过固定化以后其 K_m 值都会增大，这是因为经过固定化以后酶与底物的接触面积和底物进入酶催化活性中心都会受到影响。在本实验中聚合物壳层增加了底物进入酶催化活性中心的传质阻力，此外 Gel-coated Lipase@Resins 内部水解的产物不能及时扩散，也会对酶的催化活性产生一定的抑制作用，从而带来 K_m 值的增大和 V_{max} 的减小。但由于聚合物层比较薄且通透性较好，并没有过多增大其传质及扩散阻力，因此 Gel-coated Lipase@Resins 较 Lipase@Resins 对底物的亲和力仅略有下降。

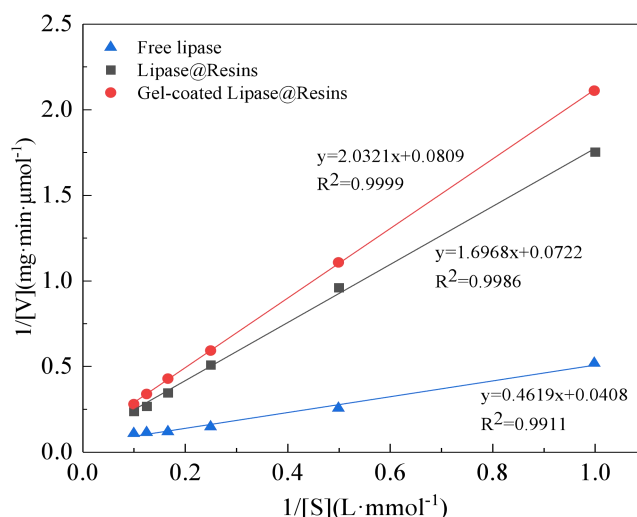


图 2-25 酶促反应动力学曲线

Fig.2-25 Kinetic curve of enzymatic reaction

表 2-4 酶促反应动力学参数

Table 2-4 Kinetic parameters of enzymatic reaction

	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\max}/\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
Free lipase	11.32	24.51
Lipase@Resins	23.50	13.85
Gel-coated Lipase@Resins	25.12	12.36

2.5.5 Gel-coated Lipase@Resins 有机溶剂中酯化反应合成乙酸丁酯

2.5.5.1 有机溶剂对合成乙酸丁酯的影响

有机溶剂作为反应介质，一方面影响底物的溶解性，另一方面会影响酶的催化活性。通常溶剂的亲水性或疏水性用 $\text{Log } P$ 来表示，其值越大，疏水性就越强。亲水性的溶剂 ($\text{Log } P$ 低于 2) 更容易夺取酶分子表面的必需水，从而导致酶的失活变性；疏水性的溶剂 ($\text{Log } P$ 高于 2) 不会影响酶周围的水层，有利于维持酶的活性。图 2-26 显示了有机溶剂对合成乙酸丁酯的影响，由图 2-26 可以看出，以正庚烷为有机溶剂的效果最好，酯化率达到了 56.95%。而以二甲亚砜为强亲水性溶剂，酯化率只有 23.75%，酯化率较低。因此选择正庚烷作为后续反应的有机溶剂。

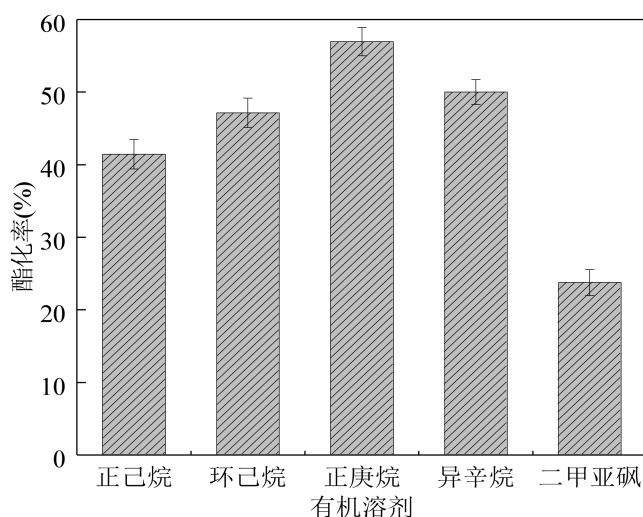


图 2-26 有机溶剂对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-26 Effect of organic solvents on synthesis of butyl acetate

2.5.5.2 底物浓度对合成乙酸丁酯的影响

在酸醇摩尔比相同的情况下，以不同底物浓度条件进行反应，如图 2-27 所示，当底物浓度为 0.1 mol/L 时酯化率最高，达到了 70.83%，而随着底物浓度的增加，酯化率降低。在酯合成的反应体系中，酸醇浓度过高可能会影响酶的活性，从而使得酯化效果降低。

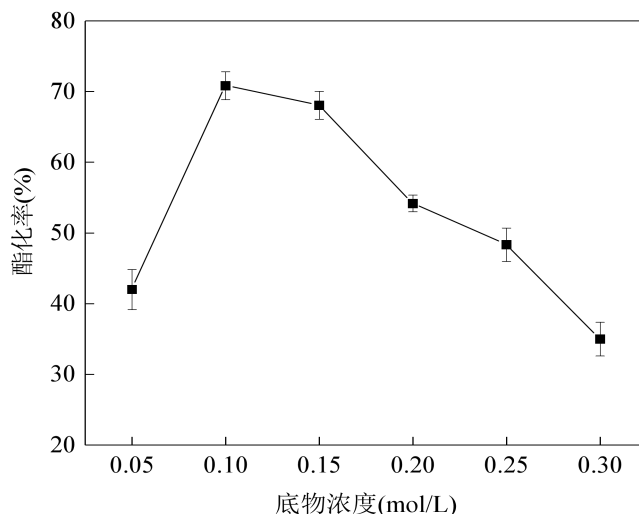


图 2-27 底物浓度对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-27 Effect of substrate concentration on synthesis of butyl acetate

2.5.5.3 底物摩尔比对合成乙酸丁酯的影响

图 2-28 显示了不同酸醇比对合成乙酸丁酯的影响，由图中可以看出当乙酸：丁醇为 1:1 时，酯化率最高，这与一些研究结果相同^[115-117]。当增加乙酸或者增加丁醇的量时，酯化率反而降低，证明过量的酸或醇并不能提高酯化率，因此选择酸醇比为 1:1 进行反应。

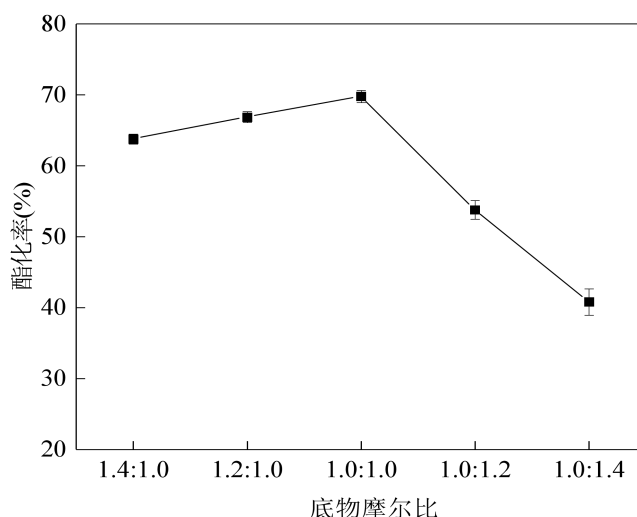


图 2-28 底物摩尔比对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-28 Effect of substrate molar ratio on synthesis of butyl acetate

2.5.5.4 温度对合成乙酸丁酯的影响

图 2-29 显示了不同温度条件下的乙酸丁酯合成的酯化率，由图中可以看出，在 30-45 °C 范围内，随着温度的提高，酯化率也在提高，当反应温度为 45 °C 时，酯化率最高，达到 71.1%，继续提高温度，酯化率降低，可能是温度过高影响了酶的催化活性，因此选择 45 °C 作为反应温度条件。

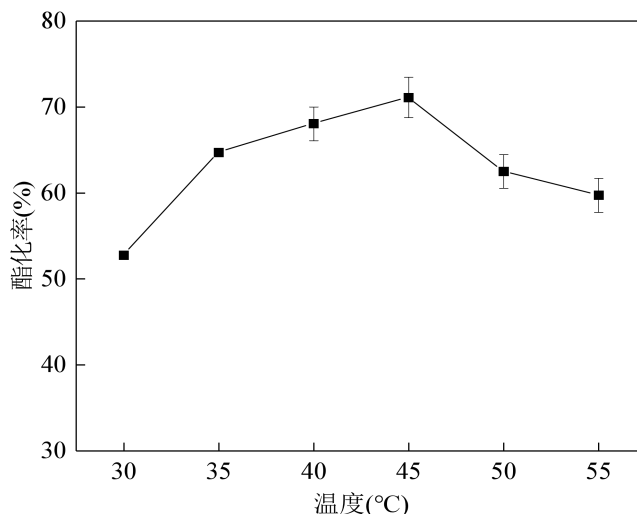


图 2-29 温度对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-29 Effect of temperature on synthesis of butyl acetate

2.5.5.5 加酶量对合成乙酸丁酯的影响

如图 2-30 所示，由图可以看出，当加酶量在 0.25-1 g 范围内时，随着加酶量的增加，酯化率提高，当加酶量在 1 g 时，酯化率为 93.05%，继续提高加酶量，酯化率并没有提高。为了节约酶蛋白的用量，同时又能高效合成乙酸丁酯，综合考虑选择 1 g 作为反应条件。

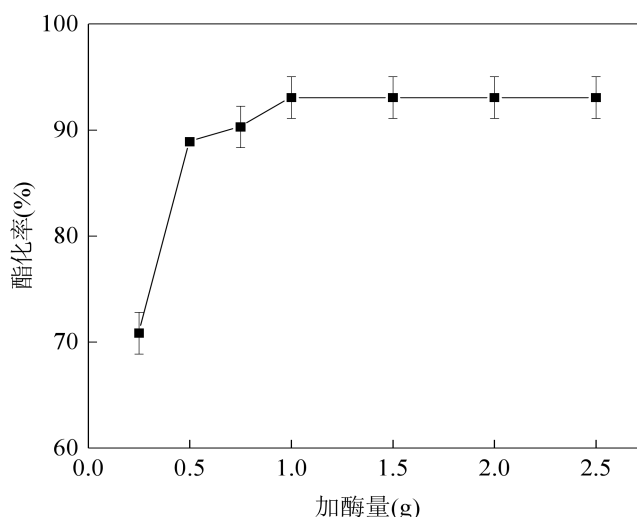


图 2-30 加酶量对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-30 Effect of enzyme addition on synthesis of butyl acetate

2.5.5.6 水活度对合成乙酸丁酯的影响

由于水对维持分子构象和发挥酶的催化活性是必需的,但酯化过程中产生水,会将酯化过程推向水解,因此在反应过程中控制水活度就显得比较重要^[118]。直接控制反应系统的水活度比测量水活度来的容易,通常用盐/盐水合物来控制。将底物溶液和酶与某种盐的饱和水溶液预平衡,则可以获得该种盐溶液等水活度的反应体系,称为预平衡法;另一种直接向反应体系中加入盐或盐的水合物,从而建立平衡,获得一恒定的水活度,称为直接加盐法^[119]。在本实验中,为了防止盐对酶的活性可能产生影响,选择预平衡法。将固定化酶及反应溶剂与不同饱和盐水溶液如氯化锂($a_w=0.11$)、氯化镁($a_w=0.33$)、硝酸镁($a_w=0.54$)、硝酸钠($a_w=0.74$)、氯化钾($a_w=0.86$)、硫酸钾($a_w=0.97$)一起放于密闭干燥容器中预平衡 3 d,从而控制水活度。在其他条件不改变的情况下,利用固定化酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯,结果如图 2-31 所示。当水活度为 0.54 时,酯化率最高,为 89.35%,增加水活度,酯化率逐渐下降,可能是水活度高使得反应向酯化反应的逆反向进行,因此选择水活度 0.54 作为反应条件。

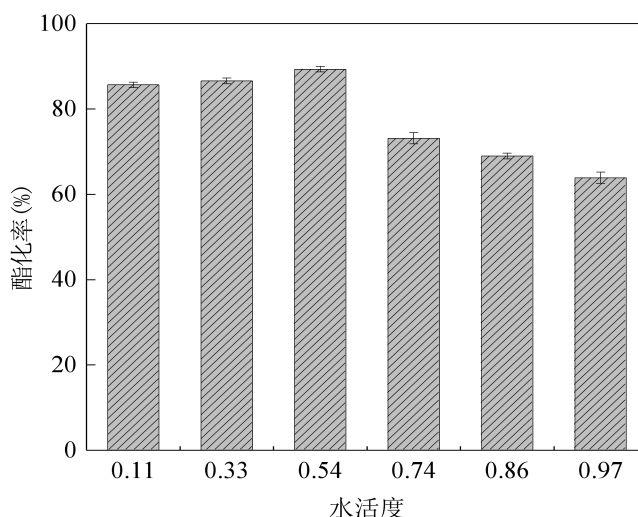


图 2-31 水活度对合成乙酸丁酯的影响

Fig.2-31 Effect of a_w on synthesis of butyl acetate

2.5.5.7 酯化反应进程

在实验最优条件下进行反应,如图 2-32 所示,当反应时间为 3 h,酯化率为 70.83%,随着反应时间的延长,在 12 h 酯化率达到 93.05%,继续反应酯化率基本不再提高。因此反应时间选择 12 h。根据 Ben Salah Riadh^[81]等人的报道,采用固定化米曲霉脂肪酶为催化剂,分别以正庚烷和正己烷作为有机溶剂,乙酸和丁醇均为 0.2 mol/L,反应温度为 37 °C,经过 24 h 的反应,酯化率达到 80%和 76%。相比之下,本实验的酯化率效果更佳,反应时间也大大缩短。

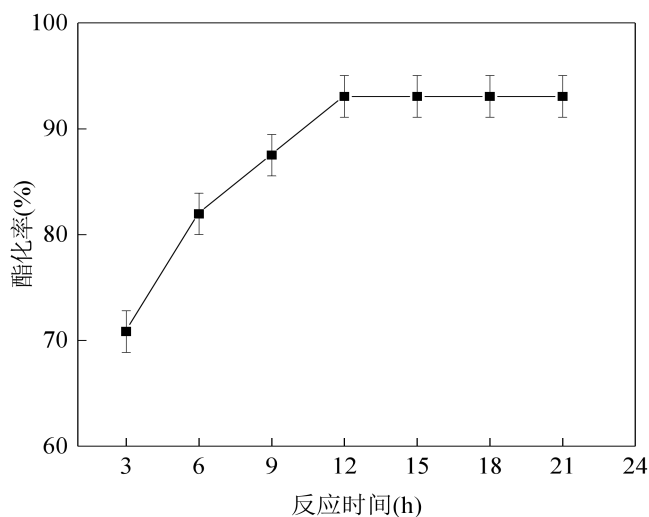


图 2-32 酯化反应时间曲线

Fig.2-32 Esterification reaction time curve

2.5.6 Gel-coated Lipase@Resins 无溶剂体系中转酯反应合成乙酸异戊酯

2.5.6.1 异戊醇浓度对合成乙酸异戊酯的影响

由图 2-33 可知, 当异戊醇在 0.2-0.8 mol/L 之间, 随着异戊醇浓度的增加, 酯化率也随之增加, 当异戊醇浓度为 0.8 mol/L 时, 酯化率最高, 继续增加浓度, 酯化率下降, 所以选择异戊醇浓度为 0.8 mol/L 作为后续实验条件。

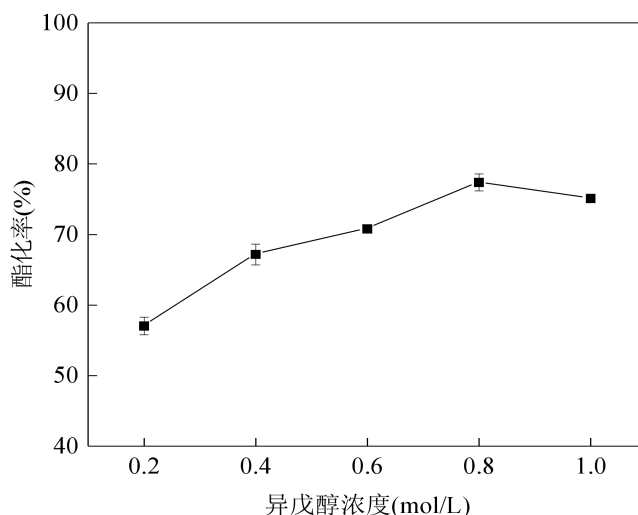


图 2-33 异戊醇浓度对合成乙酸异戊酯的影响

Fig.2-33 Effect of isoamyl alcohol concentration on synthesis of isoamyl acetate

2.5.6.2 加酶量对合成乙酸异戊酯的影响

由图 2-34 可知, 当加酶量在 0.1-0.5 g 之间, 随着加酶量的增加, 酯化率也随之增加, 当加酶量为 0.5 g 时, 酯化率达到 80%, 继续增加酶量, 酯化率没有增加, 为了反应的高效进行, 同时为了节约酶蛋白的用量, 所以综合考虑选择加酶量为 0.5 g 作为后续实验条件。

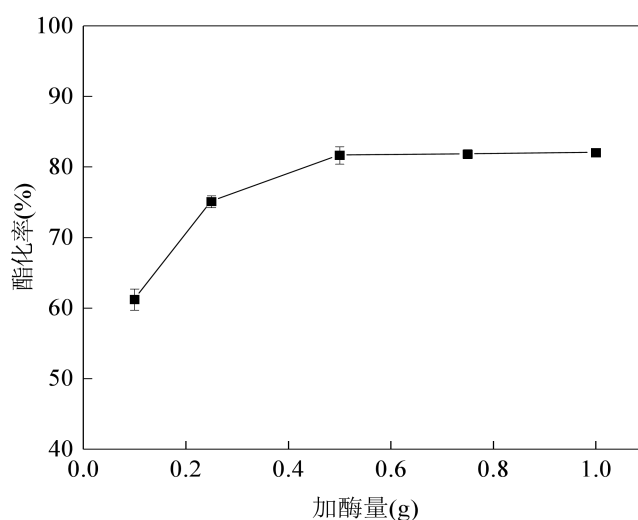


图 2-34 加酶量对合成乙酸异戊酯的影响

Fig.2-34 Effect of enzyme addition on synthesis of isoamyl acetate

2.5.6.3 温度对合成乙酸异戊酯的影响

由图 2-35 可以看出, 当温度在 35-45 °C 之间, 随着温度的增加, 酯化率也随之增加, 当异戊醇浓度为 45 °C 时, 酯化率最高, 继续增加温度, 酯化率下降, 可能是温度过高导致酶活性降低, 综合考虑选择温度为 45 °C 作为后续实验条件。

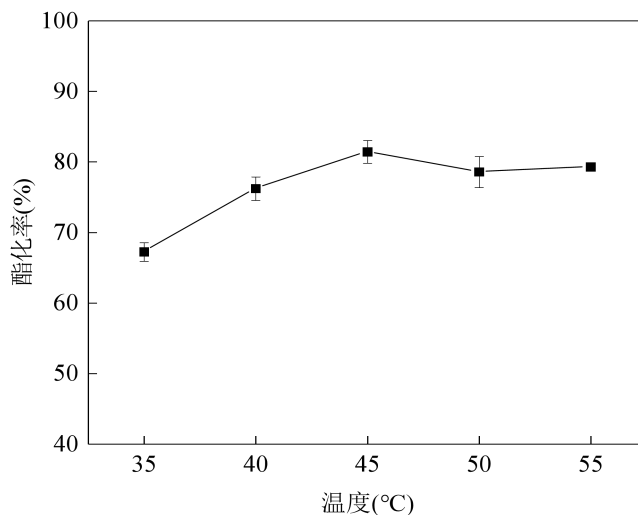


图 2-35 温度对合成乙酸异戊酯的影响

Fig.2-35 Effect of temperature on synthesis of isoamyl acetate

2.5.6.4 反应历程

在实验最优条件下进行反应, 并绘制反应历程曲线, 如图 2-36 所示。当反应时间为 12 h 时, 酯化率为 84.87%, 延长反应时间, 在 14 h 时, 酯化率达到 92.35%, 继续反应酯化率基本平稳。这与 Türk^[74]等人的结果相类似, 其利用 TLL-PCMCLs 催化乙酸乙烯酯和异戊醇在正己烷中通过转酯反应合成乙酸异戊酯, 实现了 95%转化率。

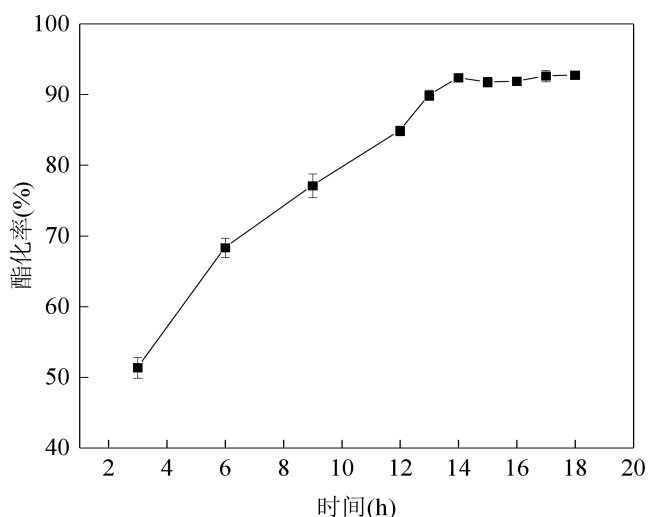


图 2-36 反应时间曲线

Fig.2-36 Reaction time curve

2.5.7 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性

为了研究 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性，每次反应结束后将酶从体系中分离并回收使用，结果如图 2-37 所示，合成乙酸丁酯的初始反应酯化率为 93.05%，Gel-coated Lipase@Resins 在连续重复利用 4 次后酯化率仍然有 70.83%，为初始酯化率的 76.12%；合成乙酸异戊酯的初始酯化率为 92.35%，Gel-coated Lipase@Resins 在连续重复利用 4 次后酯化率仍然有 84.80%，为初始酯化率的 91.82%，证明 Gel-coated Lipase@Resins 具有很好的重复使用性，能够被回收再利用。

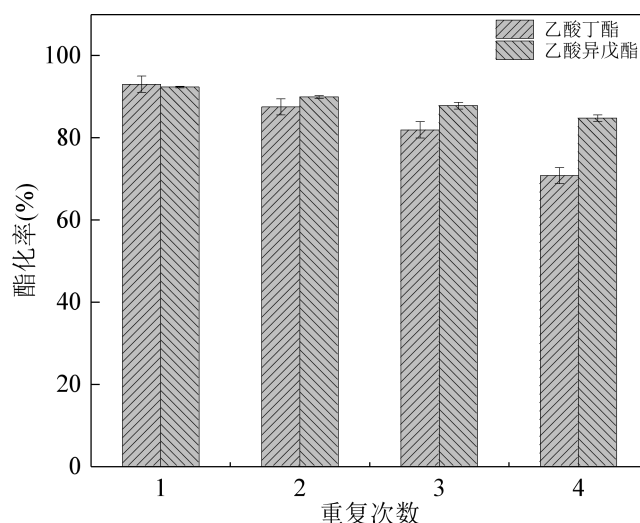


图 2-37 Gel-coated Lipase@Resins 的重复使用性

Fig.2-37 Reuse stability of Gel-coated Lipase@Resins

2.6 本章小结

本章对凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶(Gel-coated Lipase@Resins)制备条件进行了优化，并对固定化酶的形态结构进行了表征，研究了它的酶学性质，接着以凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶为催化剂催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯，优化了合成条件，具体结论如下：

(1) 以大孔树脂 D101 为吸附载体，在 pH=6、酶液添加量为 0.2 mL/g 的条件下吸附脂肪酶 2 h，然后在 NAS 浓度为 8 mmol/L、pH=6 的条件下修饰反应 3 h，接着以丙烯酸胺浓度为 10 mg/mL 的条件聚合反应 3 h，按照上述条件制备的凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶，其剩余酶活达到 89.14%。

(2) 通过傅里叶红外光谱、比表面积与孔径、SEM 以及荧光显微镜对凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶的形态结构进行表征, 结果证明了纳米凝胶成功涂覆在脂肪酶表面, 且涂覆后的大孔树脂比表面积和孔体积分别为 $580.845 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $1.133 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ 。

(3) 通过脂肪酶的酶学性质研究表明, 固定化前后脂肪酶的最适温度和 pH 并没有改变, 分别为 50°C 和 $\text{pH}=8$, 但凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶的稳定性较游离脂肪酶的稳定性有了显著提高, 其在二甲亚砜和二甲基甲酰胺中 50°C 保持 3 h 仍能保留 40% 左右的酶活。

(4) 利用凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯, 其合成最佳条件为: 以 10 mL 正庚烷为反应溶剂, 加入 1 mmol 乙酸和丁醇和 0.9 g 分子筛、反应温度为 45°C 、加酶量为 1 g、水活度为 0.54, 反应 12 h, 其酯化率为 93.05%。在 3 mL 乙酸乙烯酯中添加 2.4 mmol 的异戊醇、0.5 g 固定化酶, 在 45°C 反应 14 h, 其酯化率为 92.35%。且利用凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶重复 4 次催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯, 在连续重复利用 4 次后酯化率仍然有 70.83% 和 84.80%, 证明 Gel-coated Lipase@Resins 具有很好的重复利用性, 能够被回收再利用。

第3章 蛋白包覆微晶脂肪酶-聚乙烯亚胺共固定化及催化合成乙酸香叶酯的研究

3.1 引言

传统的酶固定化方法包括法、包埋法、结合法和交联法这四大类,随着技术的发展,后期开发了交联酶晶体以及交联酶聚集体的固定化技术,突破了固定化酶必须有载体的定义。脂肪酶催化的酯合成反应一般是在低水活度的有机相中进行,开发适合此类反应的固定化酶技术对于提升该酶的催化性能具有重要的意义。2001年,Kreiner及其同事开发了一种新的固定化策略-蛋白质包覆微晶体(Protein coated microcrystals, PCMCs)固定化酶的方法,这是一种简单、快速和高效的固定化酶方法,所制备的固定化酶具有在有机溶剂中反应的唯一性^[120]。首先选择一种水溶性好的化合物,一般是盐、糖或氨基酸等为赋形剂,制备成高浓度溶液,然后将酶在快速混合下,将这种酶溶液逐滴加入脱水剂中,通常是水溶性溶剂(例如丙醇、乙醇、乙腈、丙酮、四氢呋喃)中,在这一过程中酶溶液快速脱水,导致晶体生长剂结晶,酶沉积在晶体的表面上,形成蛋白包覆微晶形态的固定化酶。

从 PCMCs 的制备过程可以看出,该种形态的固定化酶特别适用于含水量较低的催化系统,在某些情况下脱水剂就是后续酶催化反应的介质,若在其他有机溶剂的反应体系中使用 PCMC 固定化酶,只需将其晾干或者用相应的有机溶剂清洗置换即可,后续操作及其方便。同时,在制备的过程中有机溶剂使酶脱水的过程可以最大程度保持酶分子的三维结构不发生改变,减少酶失活。目前该技术在脂肪酶和蛋白酶中应用最为广泛,所制备的固定化酶在生物柴油的合成以及手型化合物的拆分中表现出了优异的催化性能^[121, 122]。

聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)是乙烯亚胺聚合产生的具有活性功能和水溶性的高分子聚合物,有丰富的正电基团而具有高吸附性,兼具良好的生物相容性,有研究报道称,PEI 可显著提高酶的活性和稳定性^[123-125]。

本章在此基础上,先用 PEI 与脂肪酶结合,然后利用蛋白微晶包覆技术对酶进行固定,形成蛋白包覆微晶脂肪酶-聚乙烯亚胺共固定化(PEI-PCMCLs),其制备过程如图 3-1 所示,并对 PEI-PCMCLs 制备条件进行优化,考察其形态结构和酶学性质,然后利用 PEI-PCMCLs 合成乙酸香叶酯。

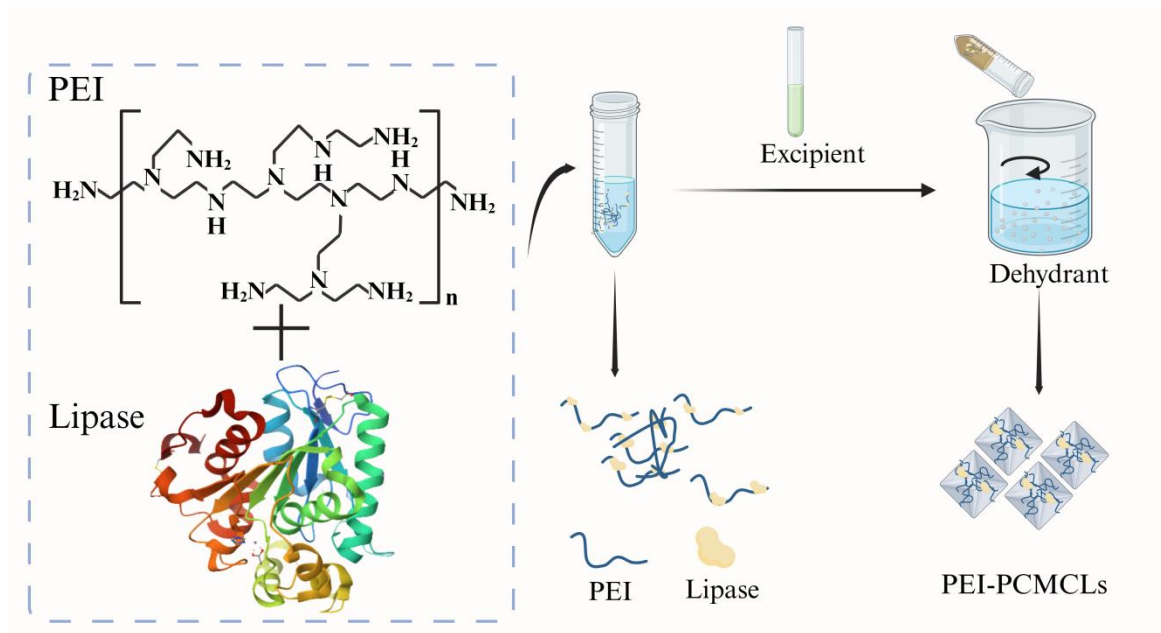


图 3-1 PEI-PCMCLs 的制备示意图

Fig.3-1 Schematic diagram of PEI-PCMCLs preparation

3.2 材料与设备

3.2.1 材料与试剂

表 3-1 主要的材料与试剂
Table 3-1 The main materials and reagents

试剂名称	规格	生产厂家
50%聚乙烯亚胺水溶液	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
香叶醇	分析纯	上海麦克林生物科技股份有限公司
硫酸钾	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
丙酮	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
丙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
乙腈	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
叔丁醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硫酸铵	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸钾	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钾	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

其他相同试剂同 2.2.1。

3.2.2 仪器与设备

实验主要仪器同 2.2.2。

3.3 实验方法

3.3.1 PEI-PCMCLs 的制备

取 1 mL 脂肪酶溶液(1 mg/mL)，加入 1 mL 1%聚乙烯亚胺溶液，混合均匀后加入 0.5

mL 饱和硫酸钾溶液, 振荡摇匀。将混合液逐滴加入到 5 mL 丙酮溶液中, 在磁力搅拌的作用下, 混合酶溶液迅速脱水, 将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min, 得到白色沉淀, 用丙酮清洗三次并离心, 再将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干, 得到蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定化脂肪酶(PEI-PCMCLs)。

3.3.1.1 脱水剂及用量的选择

其它条件不变, 将混合酶溶液分别滴入到不同的有机溶剂(甲醇、乙腈、丙醇、丙酮、叔丁醇)中磁力搅拌, 再将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min, 得到白色沉淀后用有机溶剂洗涤三次并离心, 离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干, 得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活, 确定最佳的脱水剂。

确定脱水剂种类后, 将混合酶溶液分别滴入到不同体积(5 mL、10 mL、15 mL、20 mL、25 mL)的叔丁醇中磁力搅拌, 再将混合液置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min, 得到白色沉淀。将白色沉淀用叔丁醇洗涤三次并离心, 离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干, 得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活, 确定最佳的叔丁醇用量。

3.3.1.2 赋形剂及用量的选择

在其他条件不变的情况下, 向混合脂肪酶溶液中分别加入饱和硫酸钠溶液、饱和硫酸铵溶液、饱和磷酸钾溶液、饱和硫酸钾溶液、饱和氯化钾溶液, 振荡摇匀后将混合酶液逐滴加入到 10 mL 叔丁醇溶液中磁力搅拌, 再将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min, 得到白色沉淀。将白色沉淀用叔丁醇洗涤三次并离心, 离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干, 得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活, 确定最佳的赋形剂。

在确定饱和盐溶液种类后, 将其用量设为 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL, 再将混合酶液逐滴加入到 10 mL 叔丁醇溶液中磁力搅拌, 将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min, 得到白色沉淀。将白色沉淀用叔丁醇洗涤三次并离心, 离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干, 得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活, 确定最佳的饱和硫酸钾溶液用量。

3.3.1.3 脂肪酶浓度的选择

为了确定合适的脂肪酶浓度, 选择了 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL, 并加入 1 mL 1% 的聚乙烯亚胺溶液, 混合均匀后加入 1 mL 饱和硫酸钾溶液,

振荡摇匀。将混合液逐滴加入到 10 mL 叔丁醇溶液中磁力搅拌，再将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min，得到白色沉淀。将白色沉淀用叔丁醇洗涤三次并离心，离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干，得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活，确定最佳的脂肪酶浓度。

3.3.1.4 聚乙烯亚胺添加量的选择

其他条件一致的情况下，向酶溶液中加入不同体积的聚乙烯亚胺溶液(0-2 mL)，混合均匀后加入 1 mL 饱和硫酸钾溶液，振荡摇匀。将混合液逐滴加入到 10 mL 叔丁醇溶液中磁力搅拌，再将混合物置于离心管中 4000 r/min 离心 10 min，得到白色沉淀，用叔丁醇洗涤三次并离心，离心结束将白色沉淀置于阴凉处用风扇吹干，得到蛋白包覆微晶固定化脂肪酶。测定酶活并计算相对酶活，确定最佳的聚乙烯亚胺添加量。

3.3.2 PEI-PCMCLs 的电镜观察

同 2.3.2.3。

3.3.3 PEI-PCMCLs 酶学性质的研究

3.3.3.1 最适温度和热稳定性

同 2.3.3.2。

3.3.3.2 有机溶剂稳定性

同 2.3.3.3。

3.3.3.3 酶促反应动力学

同 2.3.3.4。

3.3.5 PEI-PCMCLs 的重复使用性

同 2.3.5。

3.4 分析方法

3.3.4 PEI-PCMCLs 催化合成乙酸香叶酯

在 50 mL 的具塞三角瓶中加入 10 mL 有机溶剂，再加入 1 mmol 乙酸和香叶醇、0.9 g 分子筛，混合均匀后加入 0.25 g 固定化酶，然后密封放入 40 °C、200 rpm 的恒温振荡摇床中反应 12 h。以丁酸香叶酯为内标，绘制标准曲线，采用气相色谱取样测定并计算乙酸香叶酯合成的酯化率。

气相检测条件为：

色谱柱：AE.SE-30，30 m 长×0.53 mm 内径；

进样口温度：250 ℃；

检测器温度：250 ℃；

柱温采用程序升温，过程为：80 ℃保持 1 min，以 10 ℃/min 的速度升到 120 ℃，保持 3 min，以 20 ℃/min 的速度升到 240 ℃，保持 3 min。

酯化率计算同 2.3.4。

3.4.1 有机溶剂中脂肪酶酶活的测定

有机溶剂中脂肪酶酶活的测定参考 PENCREAC'H G^[126]等人的方法。在 5 mL 的离心管中加入 1.5 mL 正庚烷和 50 mM 的 *p*-NPP 并在 40 ℃ 预热 3 min，然后加入 10 mg 固定化酶，在 40 ℃、150 rpm 的摇床中反应 20 min。从反应溶液中取 250 μL 与 5 mL 0.1 M 的 NaOH 溶液混合，从而萃取出 *p*-NP，并在 410 nm 处测量 *p*-NP 的吸光度。以不含酶的溶液为对照组，其他条件均保持一致。每组样品平行测定 3 次。

酶活定义：在一定条件下每分钟产生 1 μmol *p*-NP 所需要的酶量为一个酶活单位。

3.5 结果与讨论

3.5.1 标准曲线

3.5.1.1 乙酸香叶酯的标准曲线及气相色谱图

如图 3-2 所示,测定并计算了不同浓度的乙酸香叶酯与内标的峰面积之比,绘制成标准曲线,由图 A 可知乙酸香叶酯的线性回归方程为 $y=0.1808x+0.0136$ ($R^2=0.9970$)；由图 B 可知乙酸、香叶醇、乙酸香叶酯和内标丁酸香叶酯的保留时间分别为 8.279 min、11.328 min、14.998 min、16.416 min。

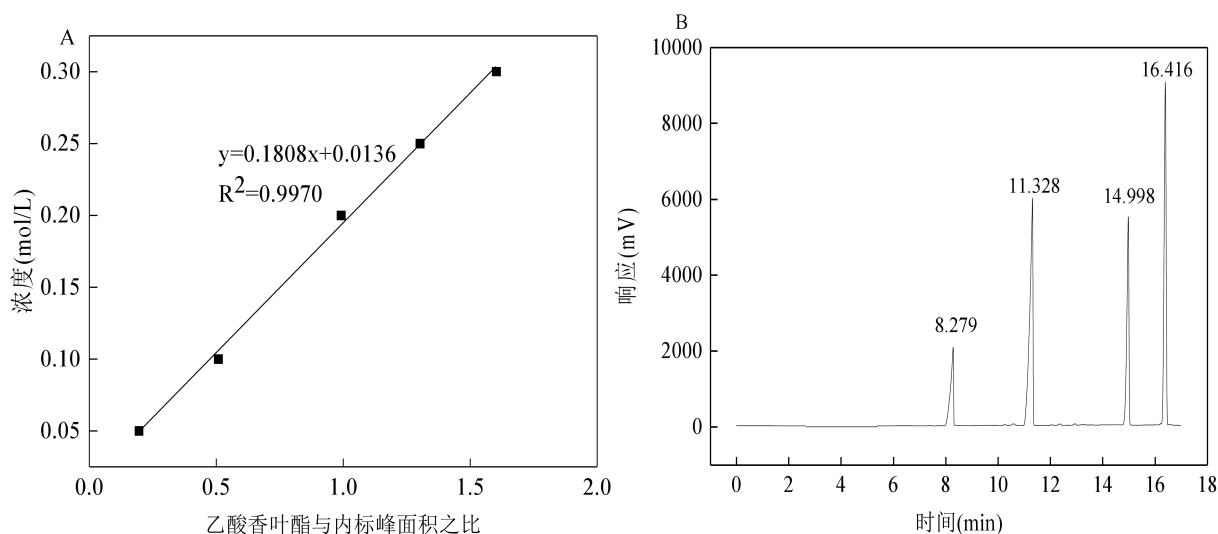


图 3-2 乙酸香叶酯的标准曲线(A)及标准品气相色谱图(B)

Fig.3-2 Standard curve(A) and GC chromatogram(B) of geranyl acetate standards

3.5.2 PEI-PCMCLs 的制备

3.5.2.1 脱水剂及用量的选择

在蛋白微晶包覆脂肪酶制备的过程中，有机溶剂扮演脱水剂的角色，酶溶液在其中快速脱水且大部分酶都保持其分子构象，因此有机溶剂的选择影响固定化酶制备效果^[120]。图 3-3 显示了有机溶剂对固定化脂肪酶酶活的影响，由图可知，在叔丁醇中酶活最高，固定化效果最好，其次是丙酮；甲醇的固定化效果较差，这可能是不同有机溶剂的疏水性造成固定化效果的差异，甲醇作为亲水性有机溶剂，易于夺取脂肪酶表面的必需水层，导致酶的构象发生变化，酶蛋白变性失活，因此不适合作为固定化的条件。根据马丽^[127]等人在研究中的报道，其以丙酮作为脱水剂，制备的脂肪酶效果最佳，而在本研究中叔丁醇的效果优于丙酮，因此选择叔丁醇作为脱水剂。

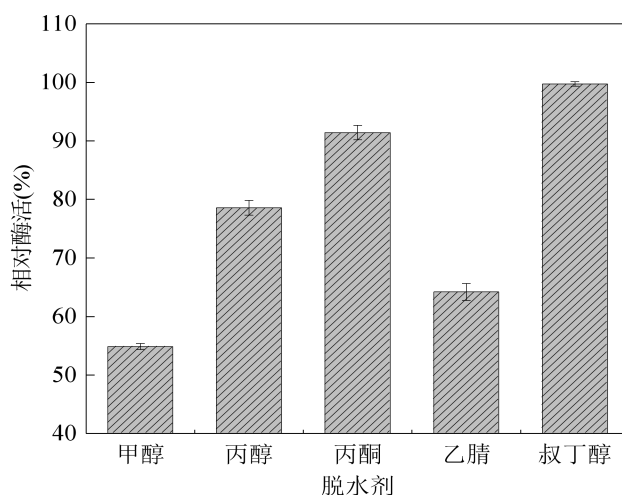


图 3-3 脱水剂对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-3 Effect of dehydrant on immobilized lipase activity

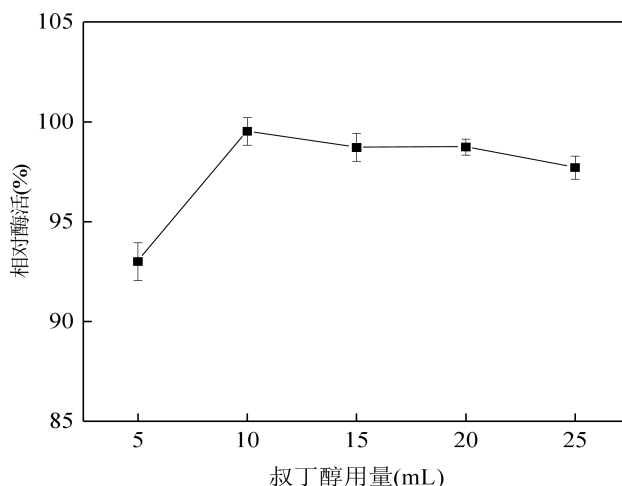


图 3-4 叔丁醇用量对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-4 Effect of tert-butyl alcohol dosage on immobilized lipase activity

图 3-4 显示了叔丁醇用量对固定化脂肪酶酶活的影响，由图可知，随着叔丁醇用量

的增加, 脂肪酶酶活提高, 在 10 mL 时酶活最高, 固定化效果最好, 继续增加用量超过 10 mL, 酶活基本保持稳定。为了最佳的脂肪酶固定化效果, 同时减少试剂的使用, 综合考虑选择 10 mL 的叔丁醇用量进行后续固定化的实验。

3.5.2.2 赋形剂及用量的选择

饱和盐溶液被用作赋形剂, 在脱水剂中, 赋形剂与蛋白共沉淀, 使得酶包裹在表面, 因此这就要求赋形剂具有一定的晶体体积。图 3-5 显示了不同饱和盐溶液对固定化脂肪酶酶活的影响, 由图可知, 硫酸钾作为固定化条件的效果更好, 这可能是由于硫酸钾具有合适的溶解度和晶体体积, 而磷酸钾作为固定化条件, 脂肪酶的酶活明显低于其他饱和盐溶液固定的, 这可能是由于磷酸钾属于弱酸性盐从而影响酶活, 综合考虑选择硫酸钾作为固定化的条件。

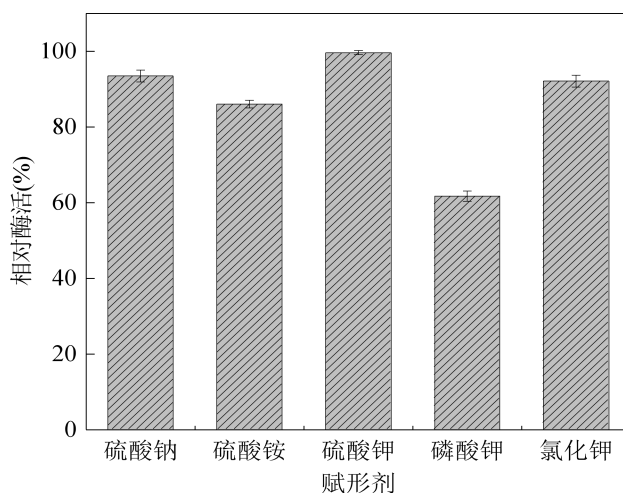


图 3-5 赋形剂对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-5 Effect of excipient on immobilized lipase activity

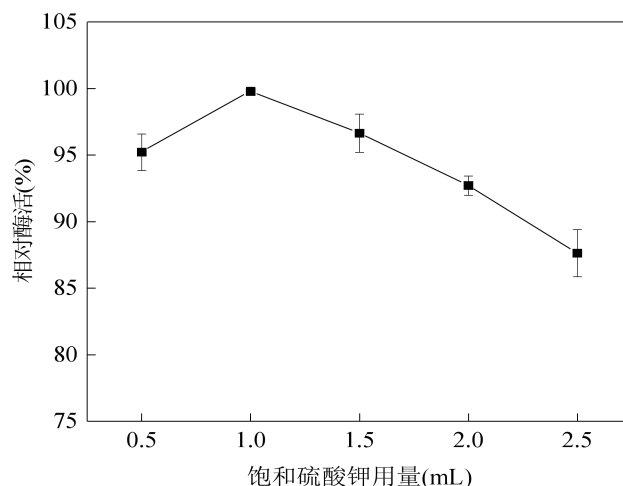


图 3-6 饱和硫酸钾用量对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-6 Effect of potassium sulfate dosage on immobilized lipase activity

图 3-6 显示了饱和硫酸钾的用量对酶活的影响, 由图可知, 随着硫酸钾用量的增加,

脂肪酶的酶活先增加后减少，当饱和硫酸钾溶液用量为 1 mL 时，酶活最高，增加硫酸钾用量，包裹在硫酸钾单位体积的脂肪酶减少，使得酶活降低，因此选择 1 mL 的硫酸钾用量作为固定化的条件。

3.5.2.3 脂肪酶浓度的选择

图 3-7 显示了脂肪酶浓度对酶活的影响，由图可知，随着脂肪酶浓度的增加，脂肪酶的酶活先增加后趋于稳定，当脂肪酶浓度为 2 mg/mL 时，脂肪酶酶活最高，增加脂肪酶的浓度，酶活没有明显提高，可能是该浓度脂肪酶的量达到了硫酸钾的最大负载量，因此选择 2 mg/mL 作为脂肪酶浓度的条件。

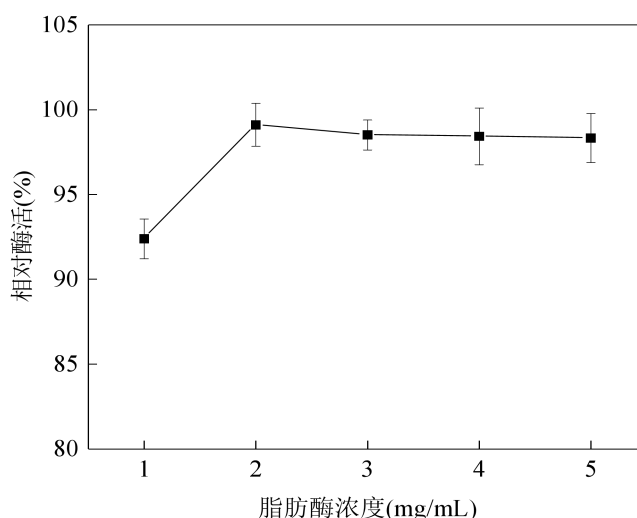


图 3-7 脂肪酶浓度对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-7 Effect of lipase concentration on immobilized lipase activity

3.5.2.4 聚乙烯亚胺添加量的选择

聚乙烯亚胺表面含有大量氨基作为反应位点，可以通过化学修饰实现其功能的多样化。研究表明，聚乙烯亚胺特有的多级胺结构能够有效压缩、封装蛋白，同时聚乙烯亚胺也可以将蛋白吸附在表面，实现其超高负载率^[128, 129]。结果如图 3-8 所示，当不加聚乙烯亚胺时，其相对酶活仅为 74.18%，随着聚乙烯亚胺的添加，酶活有所提高。当聚乙烯亚胺添加量为 1 mL 时，酶活最高，继续增加用量，但酶活却大幅降低。这可能是由于聚乙烯亚胺用量过多，使得底物与酶的活性位点难以接触，从而表现出低活性。从图 3-9 中可以看出，随着聚乙烯亚胺用量的增加，酶溶液的粒径在不断缩小，接近原始 PEI 溶液的粒径；再结合图 3-10 所示，初始酶蛋白溶液的电位为 -4.68 mV，初始 PEI 的电位为 9.11 mV，随着 PEI 用量的增加，电位逐渐增加，当添加量为 2 mL 时，电位为 10.03 mV，说明体系中 PEI 是过量的，综合考虑选择添加 1 mL 的 PEI。

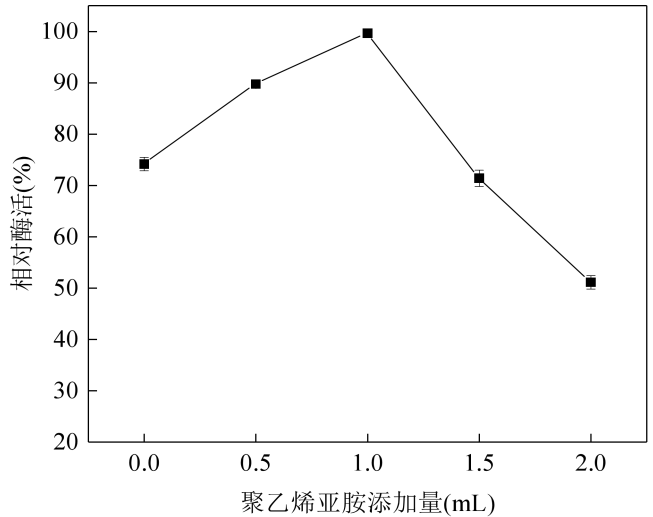


图 3-8 聚乙烯亚胺添加量对固定化脂肪酶酶活的影响

Fig.3-8 Effect of polyethylenimine addition on immobilized lipase activity

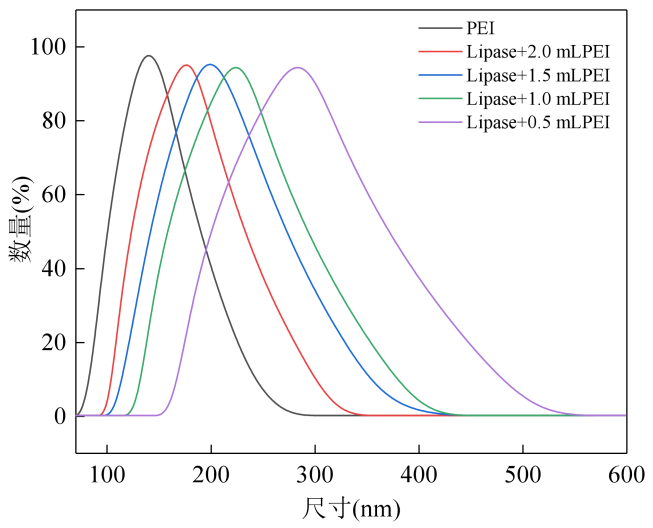


图 3-9 不同聚乙烯亚胺添加量对脂肪酶粒径的影响

Fig.3-9 Effect of different polyethylenimine addition on lipase particle size

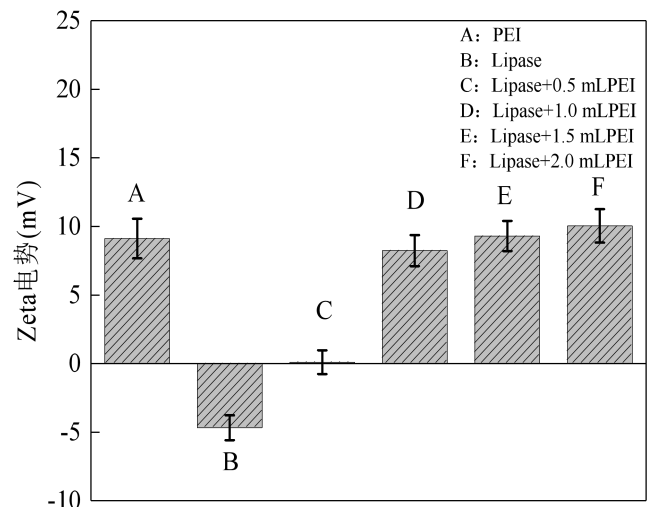


图 3-10 不同聚乙烯亚胺添加量对脂肪酶电位的影响

Fig.3-10 Effect of different polyethylenimine addition on lipase potential

3.5.3 PEI-PCMCLs 的电镜观察

如图 3-11 所示,展示了 PCMCLs 和 PEI-PCMCLs 的 SEM 图,从图中可以看出,脂肪酶固定化后包覆在硫酸钾表面,并且对比加入聚乙烯亚胺前后,其形态并没有发生明显变化,说明聚乙烯亚胺并不会破坏酶的结构。这与 Wu^[124]等人的研究结果类似,其利用 PEI 对 MOF-5 进行修饰,通过电镜和 XRD 进行表征,结果表明 PEI 并没有影响晶体结构。

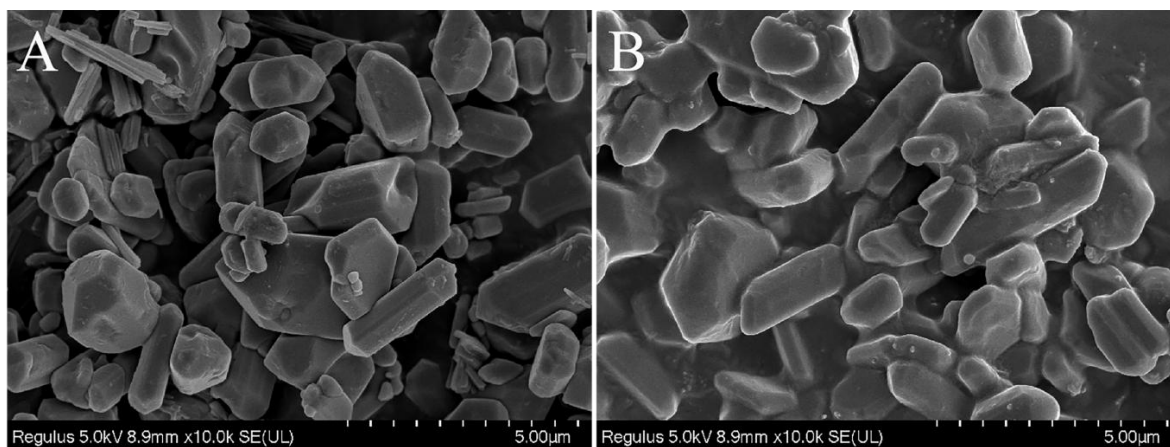


图 3-11 PCMCLs(A)和 PEI-PCMCLs(B)的 SEM 图

Fig.3-11 SEM images of PCMCLs(A) and PEI-PCMCLs(B)

3.5.4 PEI-PCMCLs 酶学性质的研究

3.5.4.1 最适温度和热稳定性

图 3-12 显示了固定化脂肪酶的最适反应温度,由图可知,游离酶和固定化脂肪酶的最适反应温度一致,均为 50 °C,说明这种固定化方式并不会改变酶蛋白的构象,这与 Monteiro^[130]等人在文献中报道的一致。随着温度的升高,固定化脂肪酶酶活损失和游离酶相比较少,说明固定化酶有效提高了对温度的耐受力。

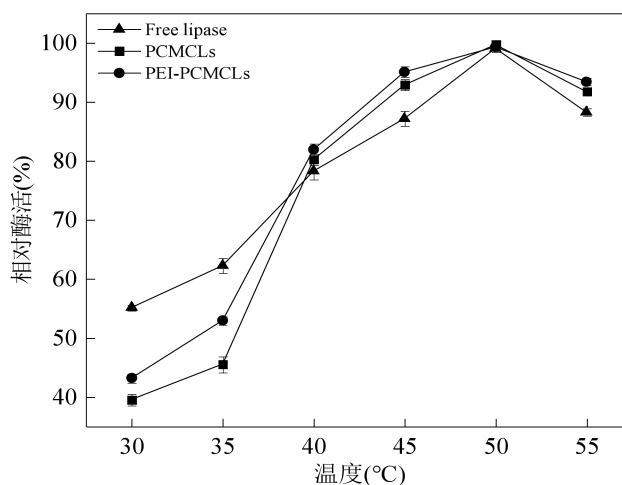


图 3-12 PEI-PCMCLs 的最适温度

Fig.3-12 Optimum temperature of PEI-PCMCLs

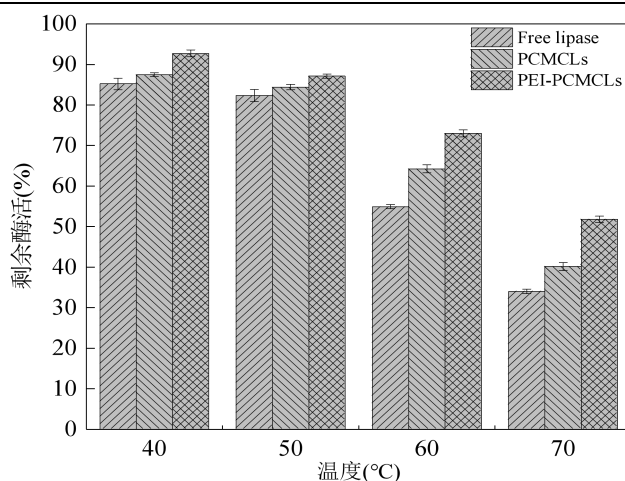


图 3-13 PEI-PCMCLs 的热稳定性

Fig.3-13 Temperature stability of PEI-PCMCLs

图 3-13 显示了固定化脂肪酶在不同温度条件下保温 3 h 后的剩余酶活，由图可知，在较高温度条件下，PCMCLs 和 PEI-PCMCLs 比游离酶的剩余酶活高。在 70℃时，PEI-PCMCLs 的剩余酶活为 51.80%，PCMCLs 剩余酶活 40.17%，而游离酶仅为 34.04%，这说明高温使得酶蛋白变性失活，但固定化后，特别是加入 PEI 固定化之后比游离的酶具有更好的耐受性，起到了保护作用。

3.5.4.2 有机溶剂稳定性

图 3-14 显示了固定化脂肪酶在甲醇、乙醇、二甲亚砆、二甲基甲酰胺中 50 °C保温 3 h 的剩余酶活，由图可知，在四种有机溶剂中，游离酶的剩余酶活较低，在甲醇中，仅为 17.33%，而通过固定化之后，在这四种有机溶剂中酶活都显著提高，在甲醇中保留 52.70%的剩余酶活，说明这种固定化手段是有效且必要的。

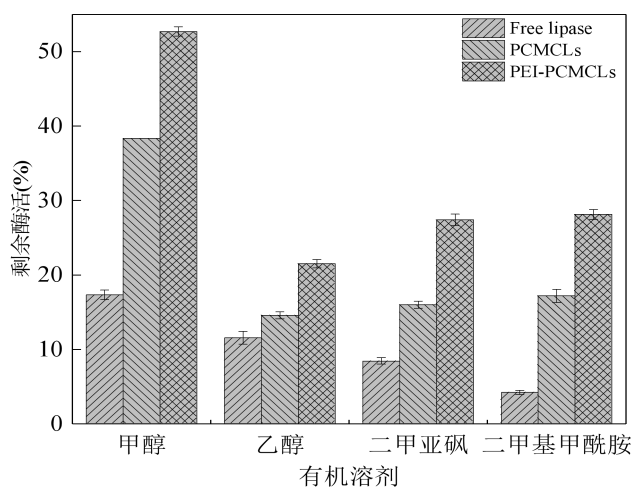


图 3-14 PEI-PCMCLs 的有机溶剂稳定性

Fig.3-14 Stability of organic solvents for PEI-PCMCLs

3.5.4.3 酶促反应动力学参数的测定

如图 3-15 为脂肪酶的酶促反应动力学曲线，并根据双倒数公式计算出米氏常数，

如表 3-2 所示。其中 K_m 反应的是酶与底物的亲和力，从表中可以看出 PCMCLs 与 PEI-PCMCLs 的米氏常数相差不大，证明 PEI 并不会很大程度阻碍酶与底物的亲和力。

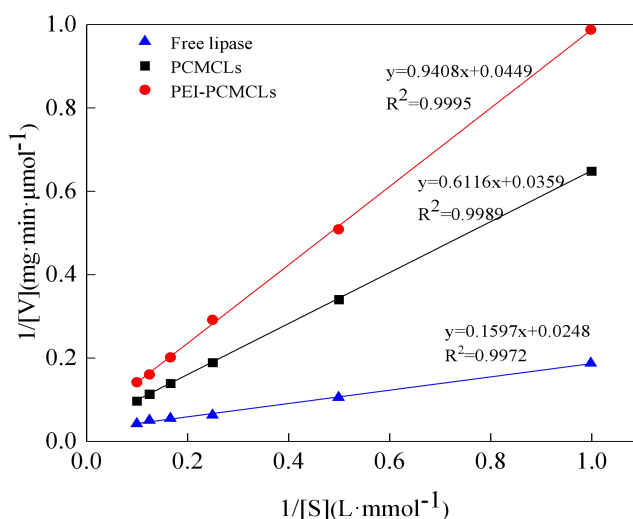


图 3-15 酶促反应动力学曲线

Fig.3-15 Kinetic curve of enzymatic reaction

表 3-2 酶促反应动力学参数

Table 3-2 Kinetic parameters of enzymatic reaction

	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\max}/\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
Free lipase	6.44	40.32
PCMCLs	17.04	27.86
PEI-PCMCLs	20.95	22.27

3.5.5 PEI-PCMCLs 催化合成乙酸香叶酯

乙酸香叶酯是一种具有玫瑰香气的风味酯，也是 60 多种精油的天然成分，广泛用于食品、化妆品、香精香料行业^[131]。另外，它还具有抗氧化、抗菌、驱虫、杀螨的作用，Remonatto^[132]等人利用固定化脂肪酶 Novozym 435 在补料间歇式反应器中生产乙酸香叶酯，并研究了其对牛脾的杀虫活性。Patel^[133]等人通过用聚乙烯亚胺接枝氧化锌纳米粒子，然后用戊二醛修饰固定化脂肪酶，再通过转酯反应催化香叶醇和乙酸乙烯酯合成乙酸香叶酯，在 6 h 内获得了 94% 的转化率；Zhai^[134]等人将 PFL(荧光假单胞菌脂肪酶)固定在两种叶片粉末中制备成 MALP-PFL 和 GBLP-PFL，再利用固定化脂肪酶催化香叶醇和乙酸乙烯酯转酯合成乙酸香叶酯，实现了 99.3% 的转化率。本节通过乙酸和香叶醇直接酯化反应合成乙酸香叶酯，其合成如图 3-16 所示，并考察了不同因素对合成的影响。

Fig.3-16 Synthesis of geranyl acetate

从图 3-17 可以看出，在正己烷、环己烷、正庚烷、异辛烷中，酯化率比较接近，通过研究发现，这些溶剂的 Log P 值比较接近。而二甲亚砜和叔丁醇属于强亲水性溶剂，因此酶在反应过程中易失活，使得酯化率较低。但 Log P 值不是唯一影响因素，一个特定的酯化反应，其反应溶剂的选择通常是由底物、催化剂以及溶剂共同决定的。图中显示，酶在正庚烷中催化的酯化率最高，因此后续实验采用正庚烷作为反应溶剂。

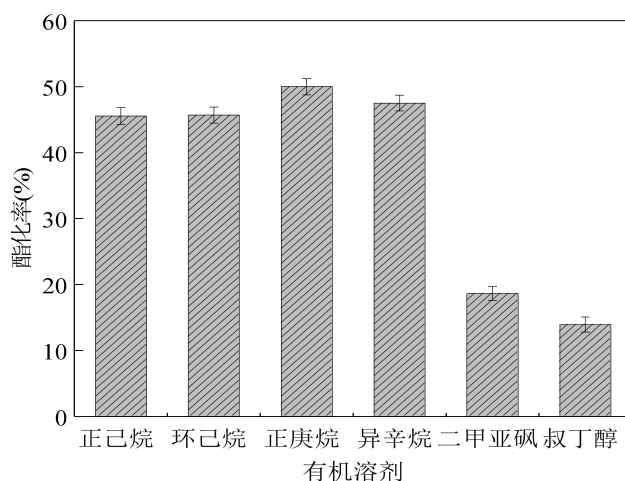


Fig.3-17 Effect of organic solvents on synthesis of geranyl acetate

在酸和醇的摩尔比相同的情况下，研究不同底物浓度对于酯合成的影响，结果如图 3-18 所示，当底物浓度在 0.025-0.05 mol/L 时，随着底物浓度的增加，酯合成率增加，在 0.05 mol/L 时达到 56.07%。随着底物浓度的增加，酯合成率却不断下降，这可能是由于过多的底物对酶产生了抑制作用，特别是乙酸，作为短链极性酸，容易形成亲水界面，夺取酶表面的必需水，破坏蛋白质的三维结构，造成酶失活。为了后续更好地合成，选择 0.05 mol/L 的底物浓度作为反应条件。

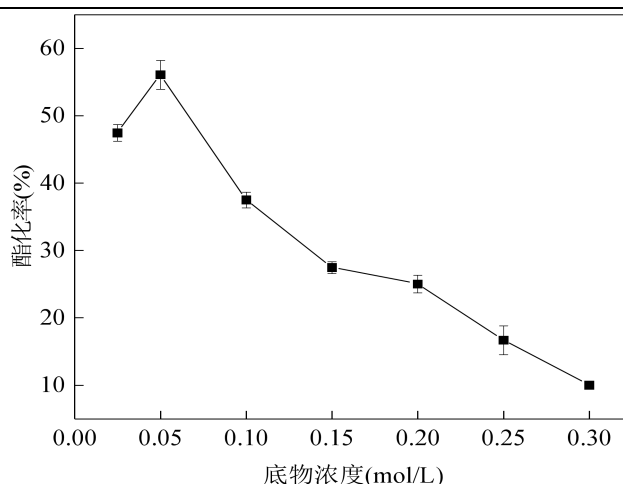


图 3-18 底物浓度对合成乙酸香叶酯的影响

Fig.3-18 Effect of substrate concentration on synthesis of geranyl acetate

3.5.5.3 底物摩尔比对合成乙酸香叶酯的影响

酯化反应作为可逆反应，其底物的比例可能会影响产物的合成，为了促使反应正向进行，选择了 1.4:1.0、1.2:1.0、1.0:1.0、1.0:1.2 和 1.0:1.4 五种不同的酸醇摩尔比，研究底物摩尔比对固定化脂肪酶催化合成乙酸香叶酯的影响，结果如图 3-19 所示。随着酸醇比从 1.4:1.0 到 1.0:1.2，酯化率也在增加，当乙酸和香叶醇摩尔比为 1.0:1.2 时，酯化率最高为 60.23%，继续提高香叶醇的比例，酯化率有所降低，这可能是因为高浓度的香叶醇会对脂肪酶有抑制作用^[135]，因此选择 1.0:1.2 作为实验最佳的底物摩尔比。

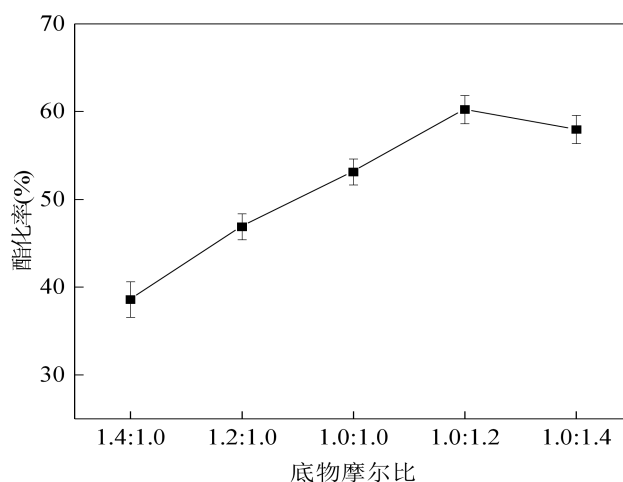


图 3-19 底物摩尔比对合成乙酸香叶酯的影响

Fig.3-19 Effect of substrate molar ratio on synthesis of geranyl acetate

3.5.5.4 温度对合成乙酸香叶酯的影响

温度对酶具有两重性，一方面，随着温度的升高，体系中分子动能增加，使得底物分子能够更好地接触，提高反应的速率，另一方面，高温环境会影响脂肪酶的分子构象，破坏酶的三级结构，导致酶变性失活。因此，寻找这个最适的反应温度是很有必要的。

从图 3-20 可以看出, 当温度在 40-50 °C 之间, 随着温度的增加, 酯化率随之增加, 这是由于较高的温度有利于分子运动, 提高酶促反应速率; 当温度超过 50 °C, 继续增加温度, 酯化率却减少, 这是因为较高的温度引起蛋白的变性, 因此在这个反应体系中, 选择 50 °C 作为反应条件。

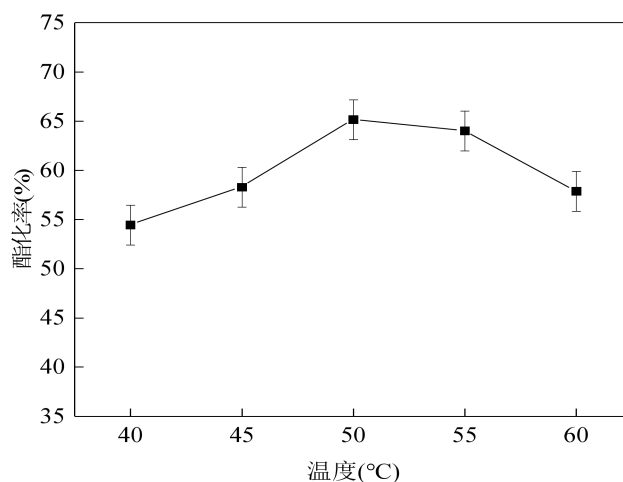


图 3-20 温度对合成乙酸香叶酯的影响

Fig.3-20 Effect of temperature on synthesis of geranyl acetate

3.5.5.5 加酶量对合成乙酸香叶酯的影响

对于酶促反应来说, 催化剂的用量是重要的影响因素, 在一定程度上可以提高反应速率。但并不是用量越多越好, 大量的酶可能会吸附底物, 影响反应体系的传质效果和粘度, 甚至可能造成自身酶的大量聚集, 不利于反应的进行。因此探究了不同加酶量对酯化率的影响, 结果如图所示。当加酶量从 0.05 g 增加到 0.4 g 时, 酯化率不断增加。当加酶量为 0.4 g 时, 酯化率为 83.1%, 继续加酶, 酯化率并无明显提高, 为了节省蛋白用量, 选择加酶量为 0.4 g。

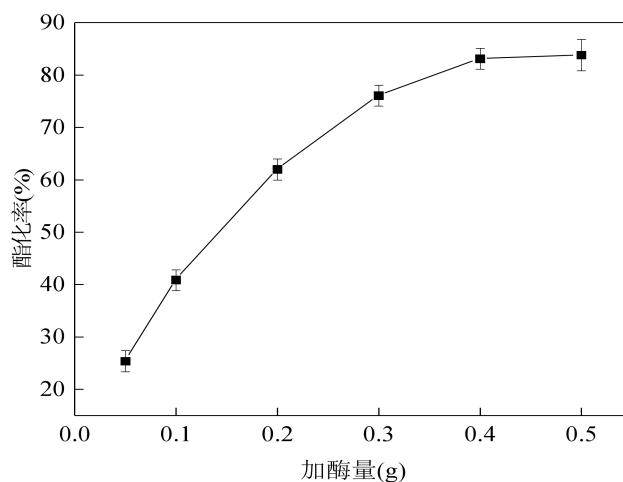


图 3-21 加酶量对合成乙酸香叶酯的影响

Fig.3-21 Effect of enzyme addition on synthesis of geranyl acetate

3.5.5.6 水活度对合成乙酸香叶酯的影响

在其他条件不改变的情况下,通过控制初始水活度,在不同水活度下利用固定化酶催化合成乙酸香叶酯,结果如图 3-22 所示。随着水活度的增加,酯化率略有增加,然后下降,当水活度为 0.54 时,酯化率最高为 85.78%,可能是在这种水活度下,脂肪酶具有催化的最佳构象,因此后续实验将水活度控制在 0.54。

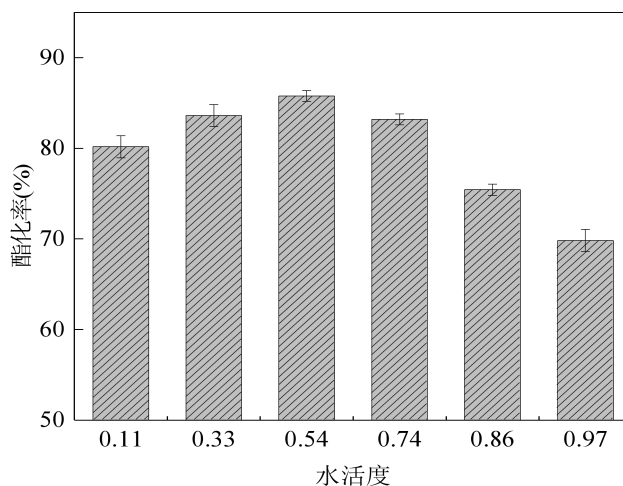


图 3-22 水活度对合成乙酸香叶酯的影响

Fig.3-22 Effect of a_w on synthesis of geranyl acetate

3.5.5.7 酯化反应进程

在实验条件最佳的情况下进行酶促合成乙酸香叶酯的反应,结果如图 3-23 所示。在开始阶段,酯化反应速率较快,反应 4 h 到 8 h,酯化率从 71.43%提高到 86.61%,反应 12 h 时酯化率为 88.4%,反应基本达到平衡,这说明固定化脂肪酶具有良好的催化效果。这比 Rosa^[136]等人通过转酯反应合成的结果要好一些,其利用发酵培养基生产念珠菌脂肪酶,然后在正己烷体系中,添加 12.5%的脂肪酶、香叶醇:乙酸乙烯酯为 1:1.5、反应温度为 45 °C 的条件下实现了 79%的产酯率。

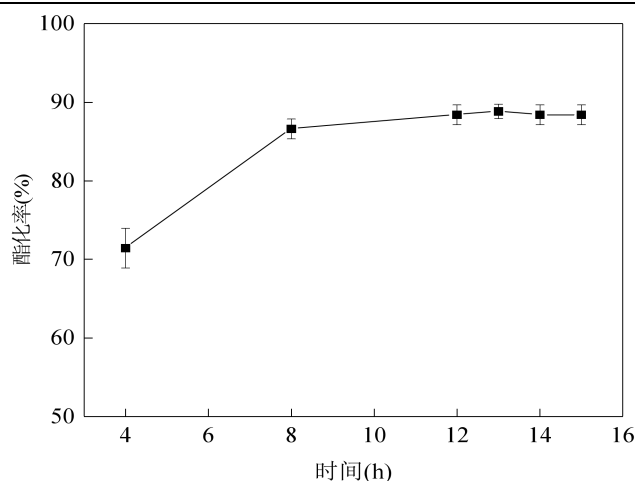


图 3-23 酯化反应时间曲线

Fig.3-23 Esterification reaction time curve

3.5.6 PEI-PCMCLs 的重复使用性

固定化酶的重复使用性是评价固定化酶催化性能的一个重要指标,在实际生产中重复使用性好的固定化酶能够降低生产成本。图 3-24 显示了 PEI-PCMCLs 使用了 4 次的结果,从图中可以看出,在使用了 4 次之后酯化率为 69.71%,这说明 PEI-PCMCLs 具有良好的重复使用性。

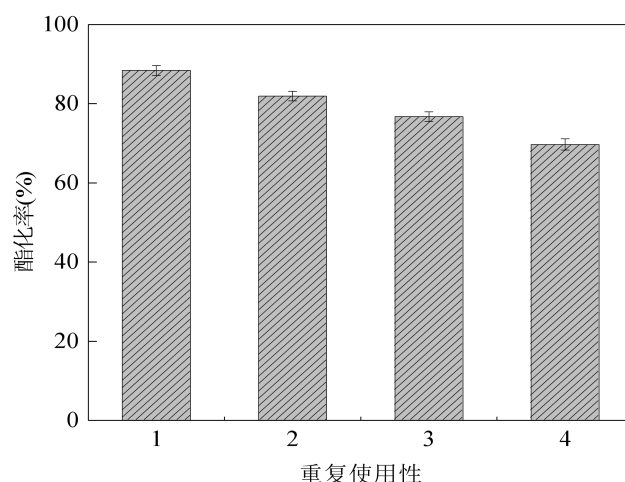


图 3-24 PEI-PCMCLs 的重复使用性

Fig.3-24 Reusability of PEI-PCMCLs

3.6 本章小结

本章以蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定技术对脂肪酶进行固定化,通过实验优化了制备条件,利用 Zeta 电位和粒径对其进行表征;初步研究了固定化酶的酶学性质,并利用 PEI-PCMCLs 在非水相中催化乙酸和香叶醇合成乙酸香叶酯,同时对反应条件进行了优化,主要结论如下:

(1) 通过实验确定了最佳制备条件为：将 1 mL 脂肪酶(2 mg/mL)与 1mL 1%聚乙烯亚胺溶液混合，加入 1 mL 饱和硫酸钾溶液混匀，迅速滴入 10 mL 叔丁醇中，得到白色的固定化酶(PEI-PCMCLs)沉淀。

(2) 酶学性质的研究表明，PEI-PCMCLs 的最适温度保持 50 °C 不变，但温度稳定性和有机溶剂耐受性较游离酶显著提高。在 70°C 的条件下保持 3 h，PEI-PCMCLs 的剩余酶活为 51.80%，较游离酶提高了 17%。

(3) 利用 PEI-PCMCLs 非水相体系中催化乙酸和香叶醇酯化合成乙酸香叶酯，结果表明其最佳合成条件为：向 10 mL 正庚烷为反应溶剂加入乙酸 0.5 mmol、香叶醇 0.6 mmol、0.9 g 分子筛、反应温度为 50 °C、水活度 0.54、加酶量为 0.4 g，反应 12 h 后酯化率达到了 88.4%，在重复使用 4 次后的酯化率为 69.71%。

第4章 文冠果种籽中脂肪酶的原位固定化及其合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的研究

4.1 引言

脂肪酶是生物催化领域中最重要酶之一，但是生物催化领域所应用的脂肪酶大多来源于微生物，而植物来源的脂肪酶很少。植物中，特别是一些油料植物的种籽，其含有的脂肪酶负责油籽和谷物种籽中酯类物质的水解，为种籽的萌发提供能量和前体物质，一般种籽在萌发的阶段，其脂肪酶的活性通常很高。有时存在于植物来源粗提物中的脂肪酶可以直接催化脂质的水解或合成反应，这是植物源脂肪酶的优势之一。植物中脂肪酶的来源大致可以分为三大类：①油料植物的种籽：一些油料植物的种籽，例如麻疯树、蓖麻和油菜等，其本身具有较高的含油量，相对应的含有大量的脂肪酶，可以广泛应用于油脂的水解方面；②谷物的种籽：例如稻米、小麦和燕麦等也含有一定量的脂肪酶，米糠是稻米加工过程中的副产物，其中的米糠脂肪酶，具有较高的热稳定性，在 90 °C 下孵育 15 min 后保留了 36% 的催化活性；小麦胚芽中的脂肪酶的酯化活性也较高，酶活达到 6.58 U/mg；③植物的乳胶：乳胶是由所谓的含乳植物产生的乳白色液体，其水不溶性部分具有脂肪酶活性，其中的典型代表是木瓜，木瓜的乳胶中含有包括脂肪酶在内的多种水解酶类^[7]。

植物脂肪酶具有独特的性质，尤其是在有机溶剂中稳定性较高^[137]；相对于微生物脂肪酶，植物脂肪酶分布广泛，从植物生物质中提取成本低廉，并且不需要基因生物技术来生产它们。经过基因工程改造的微生物脂肪酶非常昂贵，价格超过 300 欧元/公斤。而来自植物的脂肪酶至少比微生物脂肪酶便宜 20 倍(对于相似的活性)，例如木瓜绿色果实中渗出的乳胶含有用于几种工业应用的活性脂肪酶，其价格仅为 27 欧元/公斤^[13]。

生物催化产业化的关键是酶活性高、稳定性好以及较为廉价的催化剂的获得，这样才能在成本方面比化学法更加具有竞争力和优势，因此挖掘和开发新的酶资源一直是生物催化产业研究的重点。在风味酯合成研究中，基本上使用的是来自微生物的脂肪酶。比如常用的 Novozym 435 是来源于假丝酵母(*Candida antarctica*)的脂肪酶，用一种经过基因改性的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)微生物进行深层发酵并吸附在大孔丙烯酸树脂上而制成；Lipozyme TL-IM 是来源于疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)，并固定在硅胶上的固定化酶；Lipozyme RM-IM 来源于米黑根毛霉菌(*Rhizomucor miehei*)，并

固定在大孔阴离子交换树脂上。植物的种籽粉是包含蛋白（酶）、纤维、细胞壁、植物组织等的一种混合物，在某种程度上是一种天然的固定化催化剂，因此比起游离的酶蛋白稳定性更好。通过戊二醛交联可以将一些游离的蛋白质更好地固定在纤维组织上，从而进一步提高催化剂的稳定性^[138]。本研究在广泛筛选不同植物种籽的基础上，以文冠果种籽为研究对象，采用交联剂直接将其所富含的脂肪酶固定在其种籽的粉末中。这种原位固定化制备的催化剂具有酶活保留高、稳定性好以及成本低的优点，制备过程如图 4-1 所示。在此基础上考察了其合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的性能。

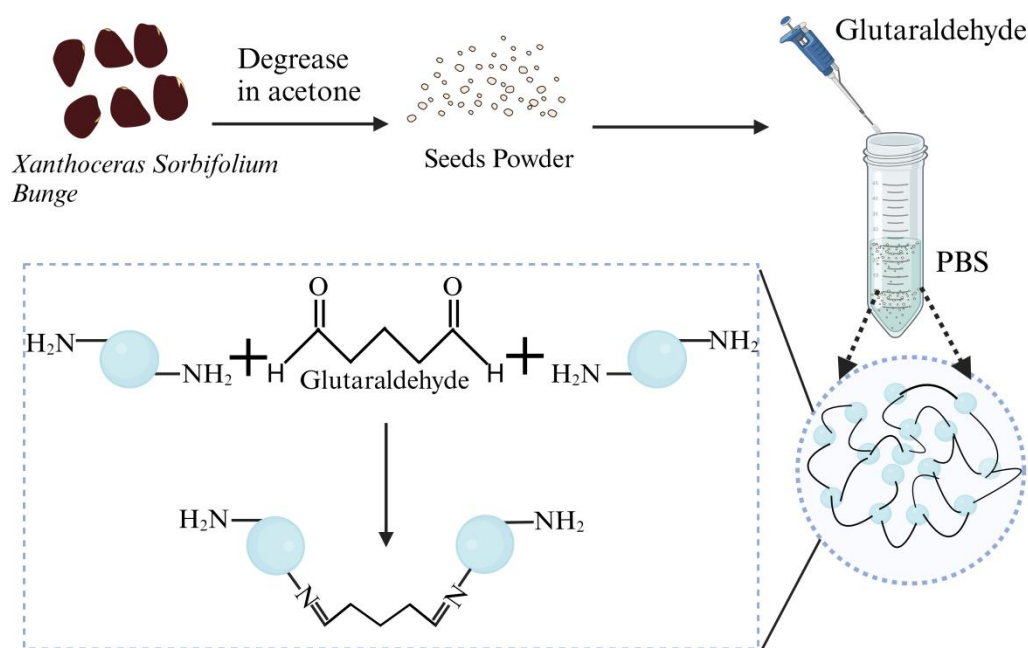


图 4-1 交联文冠果籽粉的制备

Fig.4-1 Preparation of *xanthoceras sorbifolium bunge* cross-linked seeds powder

4.2 材料与设备

4.2.1 材料与试剂

不同的植物种籽(苦杏仁、蓖麻籽、文冠果、油桐、麻疯树)购自当地农资公司，其他主要实验试剂见 2.2.1 及 3.2.1。

4.2.2 仪器与设备

主要仪器设备同 2.2.2。

4.3 实验方法

4.3.1 种籽粉的制备

首先去除不同种籽的外壳，再用研钵将种籽碾碎，加入预冷的丙酮(-4 °C)搅拌 2-3

min 进行脱脂，然后用布氏漏斗抽滤，收集滤渣再次丙酮洗涤 1 次并抽滤，取出过滤物放入阴凉处自然风干，再过 40 目筛，得到了种籽粉。

4.3.2 种籽的筛选

选择了苦杏仁、蓖麻籽、文冠果、油桐和麻疯树等五种不同的植物种籽，去壳后制备成种籽粉，然后在相同的条件下测定脂肪酶的酶活，从中筛选出酶活最高的种籽作为后续实验的脂肪酶来源。

4.3.3 浸泡时间对文冠果种籽脂肪酶酶活的影响

用自来水清洗种籽表面的灰尘，然后在烧杯底部放入一块纱布，取适量的文冠果种籽放入烧杯中，加入少量水使种籽被微微浸湿，并置于 30 °C 恒温培养箱，促进种籽的萌发，定时取出种籽剥壳后用丙酮脱脂后检测脂肪酶酶活，研究浸泡时间对文冠果种籽酶活的影响。

4.3.4 交联文冠果籽粉的制备

称取 1.0 g 文冠果种籽粉，加入 20 mL 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(50 mmol/L, pH=7)混合均匀，加入戊二醛溶液至浓度为 1%，放入恒温摇床中 30 °C、150 rpm 固定 1 h，取出 4000 rpm/min 离心 5 min，倒掉上清液并用磷酸盐缓冲溶液重复洗涤 3 次，离心后取沉淀干燥备用。

4.3.5 交联文冠果籽粉的电镜观察

同 2.3.2.3。

4.3.6 交联文冠果籽粉催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯

交联文冠果籽粉脂肪酶催化合成乙酸丁酯同 2.3.4，交联文冠果籽粉脂肪酶催化合成乙酸香叶酯同 3.3.4。

4.3.7 交联文冠果籽粉的重复使用性

同 2.3.5。

4.4 分析方法

4.4.1 脂肪酶酶活的测定

同 2.4.1。

4.5 结果与讨论

4.5.1 含脂肪酶种籽的筛选

植物种籽脂肪酶的来源广泛，在谷物种籽和油料种籽中都有发现，Su^[139]等研究了中国主要的三个蓖麻籽品种，从中发现了两种不同性质的脂肪酶，并进行分离纯化；为了筛选出含脂肪酶的种籽，选择了苦杏仁、蓖麻籽、文冠果、油桐和麻疯树等 5 种不同的植物种籽，脱脂后测定酶活，从图 4-2 可以看出，文冠果的种籽脂肪酶酶活是最高的，后续实验采用文冠果种籽进行。

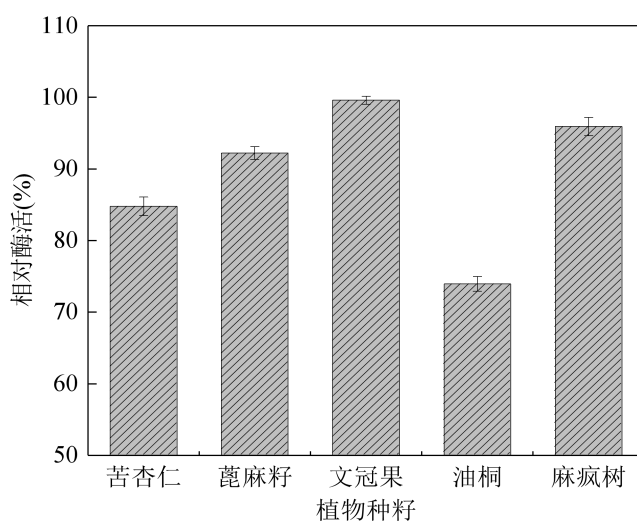


图 4-2 种籽的筛选

Fig.4-2 Screening of seeds

4.5.2 浸泡时间对文冠果种籽脂肪酶酶活的影响

植物脂肪酶酶活可能与种籽发芽有关，在多数报道中，脂肪酶活性在未发芽或休眠期的种籽中并不存在，只有少数情况下，休眠期的种籽也能够表现出活性^[137, 140]，如蓖麻籽、麻疯树等。为了研究发芽对植物脂肪酶催化活性的影响，Nanssou^[141]等利用 6 种不同植物种籽的脂肪酶，在发芽和未发芽两种状态下进行催化反应，仅有 2 种植物在未发芽时表现出活性；Abigor^[142]等对麻疯树种籽进行了研究，在休眠期和发芽期都检测到了脂肪酶活性。因此，发芽似乎是植物脂肪酶表现活性的一个关键节点，在发芽时植物需要一定的能量来促进自身生长，这恰好激活了脂肪酶水解种籽中的三酰甘油，生成脂肪酸和甘油，脂肪酸通过乙醛酸循环释放葡萄糖，葡萄糖用于提供植物所需的能量^[143]。为了更好地促进发芽，选择将种籽浸泡一定的时间，研究浸泡时间对文冠果种籽脂肪酶酶活的影响。结果如图 4-3 所示，当浸泡时间为 4 h 时，脂肪酶酶活最高，继续延长浸泡时间，酶活反而下降，这说明浸泡时间不宜过长，因此选择浸泡 4 h 促进萌发。

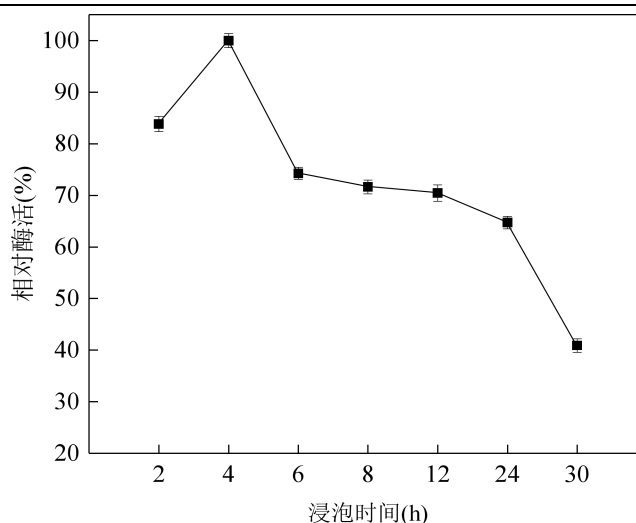


图 4-3 浸泡时间对酶活的影响

Fig.4-3 Effect of soaking time on enzyme activity

4.5.3 交联文冠果种籽粉的制备

4.5.3.1 戊二醛浓度对交联文冠果籽粉的影响

戊二醛是常用的交联剂，它可与酶蛋白的氨基发生反应，增强酶的稳定性。采用戊二醛对文冠果籽粉进行原位固定，结果如图所示。当戊二醛浓度较低时，戊二醛与蛋白无法形成有效的连接，一些蛋白分子在洗涤过程中甚至会脱连接，造成酶活不高。当戊二醛浓度为 2% 时，文冠果种籽的酶活最高；随着戊二醛浓度的增加，酶活略有下降。这可能是由于戊二醛浓度过高，酶分子之间过度交联，形成紧密的结构，在反应时，底物难以与酶的活性位点接触，从而表现出较低的酶活。另一方面，过高浓度的戊二醛会使得酶分子本身的氨基酸发生多位点结合，因此采用戊二醛浓度为 2% 作为实验的条件。

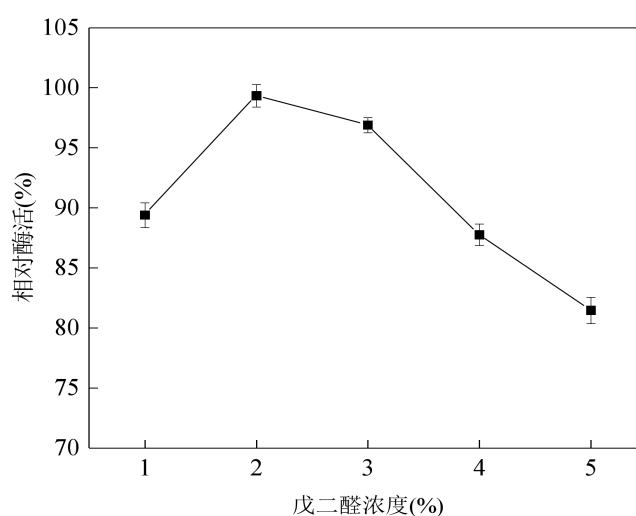


图 4-4 戊二醛浓度对交联文冠果籽粉的影响

Fig.4-4 Effect of glutaraldehyde concentration on cross-linked *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds powder

4.5.3.2 戊二醛交联时间对文冠果种籽脂肪酶的影响

戊二醛与蛋白的交联需要一定的时间,较短的时间,酶蛋白分子无法形成有效的交联,在洗涤时容易再次溶解,而过长的时间,容易引起过度交联,底物与活性位点难以接触,使得酶蛋白活力下降。因此探究了不同时间对固定化的影响,结果如图所示。当固定时间在 1-3 h 时,随着时间的延长,酶活逐渐提高,当 3 h 时,酶活最高,继续延长时间,酶活下降,这可能是因为 3 h 的交联使得大部分蛋白被固定住,继续延长时间反而使得酶蛋白过度交联,容易引起酶与底物分子接触困难,同时也增加了酶暴露在戊二醛体系的时间,造成酶活下降,因此选择 3 h 作为戊二醛固定的时间。

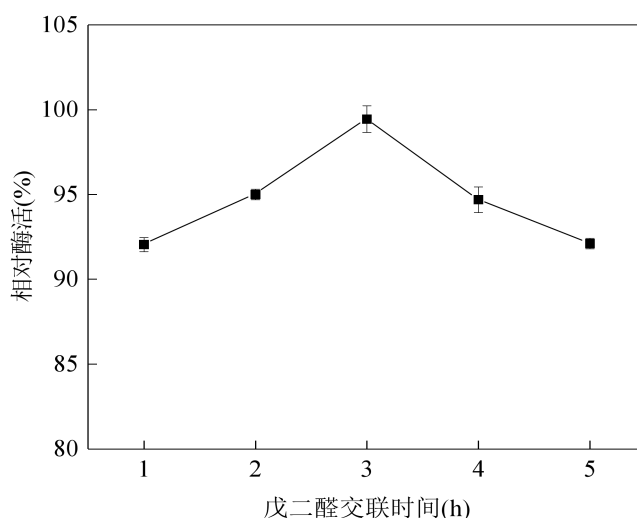


图 4-5 戊二醛交联时间对交联文冠果籽粉的影响

Fig.4-5 Effect of glutaraldehyde crosslinking time on cross-linked *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds powder

4.5.4 交联文冠果籽粉的电镜观察

对文冠果籽粉和戊二醛交联文冠果籽粉进行了扫描电子显微镜微观形态的观测,结果如图 4-6 所示,从图 A 可以看出,文冠果种籽粉形状似圆球,颗粒饱满,彼此之间间隔明显,利用戊二醛进行交联后如图 B 所示,酶蛋白交联靠近,这种结构更有利于酶的稳定性。

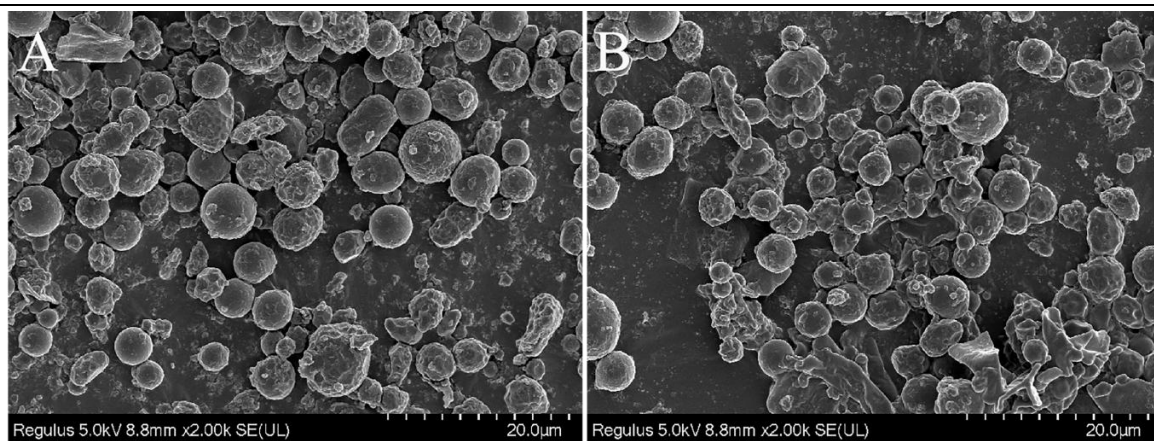


图 4-6 文冠果籽粉(A)和戊二醛交联文冠果种籽粉(B)的 SEM 图

Fig.4-6 SEM image of *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds powder(A) and its cross-linked by glutaraldehyde(B)

4.5.5 交联文冠果籽粉催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯

4.5.5.1 有机溶剂对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

在非水相催化反应中，有机溶剂是重要因素之一，亲水性溶剂更容易夺取酶表面的必需水并争夺蛋白质结构内部的氢键，导致蛋白质变性，天然结构被展开，酶蛋白失活，因此这类溶剂不适合作为反应介质。为了确定适合酯合成的有机溶剂，选择了正己烷、环己烷、正庚烷、异辛烷、二甲亚砜作为反应体系，结果如图 4-7 所示。从图中可以看出，在正己烷、环己烷、正庚烷、异辛烷这四种有机溶剂中，脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其酯化率均在 40%以上，而二甲亚砜作为亲水性溶剂，易导致酶活降低，影响酶催化效果，合成酯的酯化率在 20%以下，因此不宜作为反应溶剂。从图中也可以看出，正庚烷作为反应溶剂合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其效果都是最好的，酯化率分别达到了 54.31%和 52.59%，而目前报道的大多数脂肪酶催化合成酯的研究中，是以正庚烷或正己烷作为反应溶剂，但正庚烷较正己烷毒性更小，因此选用正庚烷作为合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的条件^[144]。

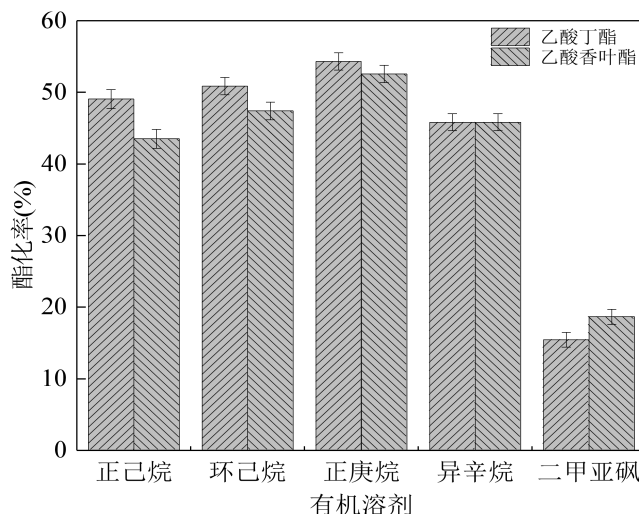


图 4-7 有机溶剂对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-7 Effect of organic solvents on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.2 底物浓度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

一般认为高浓度的底物可以加快反应速率并促使反应向产物生成方向进行，然而在非水相酶催化酸和醇直接酯化的反应中，底物浓度过高可能会产生抑制作用，一方面，乙酸作为极性酸，会夺取酶表面的必需水，使得酶的构象发生变化而失活，另一方面，高浓度的醇会使反应体系极性增强，效果等同于使用强极性溶剂。为了研究底物浓度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，在酸和醇摩尔比相同的情况下进行反应，结果如图 4-8 所示。在合成乙酸丁酯的过程中，随着底物浓度的增加，酯化率先提高后降低，当底物浓度为 0.10 mol/L 时，酯化率最高为 57.76%；在合成乙酸香叶酯的过程中，随着底物浓度的增加，酯化率刚开始稳定在 50%左右，而当底物浓度超过 0.10 mol/L 时，酯化率开始下降，这是浓度过高使得酶催化效果下降。与 PEI-PCMCLs 催化合成乙酸香叶酯不同，该体系中选择 0.1 mol/L 更合适，说明交联文冠果籽粉对乙酸和香叶醇更耐受。后续选择 0.1 mol/L 作为底物浓度的条件。

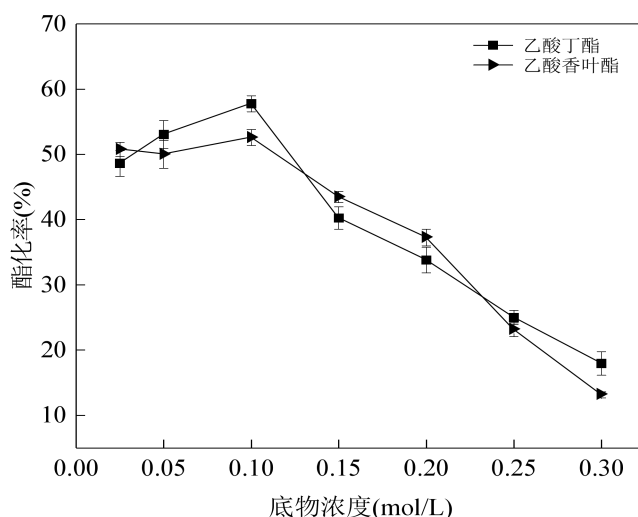


图 4-8 底物浓度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-8 Effect of substrate concentration on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.3 底物摩尔比对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

过多的酸或者醇对脂肪酶的活性有不利影响, 改变反应体系中的酸醇摩尔比, 不仅可以提高反应速率, 还能够促使反应向着产物生成方向进行, 因此有必要研究酸与醇的摩尔比对合成酯的影响, 在底物浓度确定的条件下, 选取酸醇比为 1.4:1.0、1.2:1.0、1.0:1.0、1.0:1.2、1.0:1.4 的不同条件, 在反应 12 h 后取样检测, 结果如图 4-9 所示。当酸和醇比例为 1:1 时, 两种酯的酯化率是最好的, 均达到 50% 以上。随着醇的比例增加, 酯化率下降, 说明醇抑制了酶的催化活性。因此后续实验两种酯的合成均采用 1:1 的底物摩尔比。

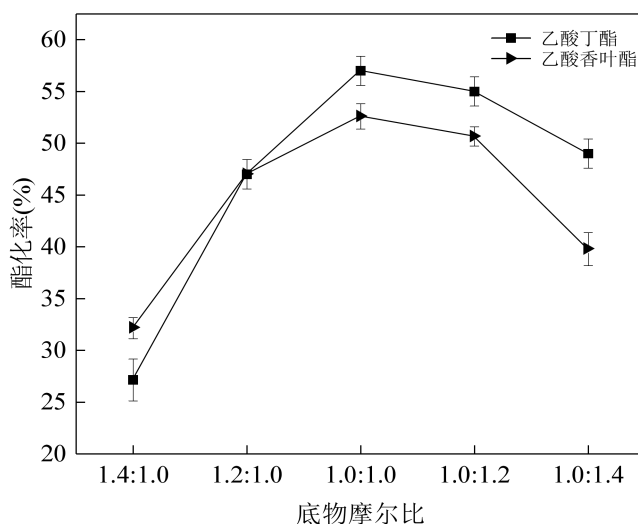


图 4-9 底物摩尔比对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-9 Effect of substrate molar ratio on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.4 温度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

反应温度是一个重要影响因素, 它既可以影响反应的速率, 也可以影响酶的催化活

性和稳定性。当温度升高时，分子间碰撞的几率和频率增加，反应速率更快，有利于产物的合成。然而当反应温度过高时，酶作为蛋白质容易在高温下变性失活。为了寻找合适的反应温度，选择了 30-50 °C 作为反应条件，考察不同温度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，结果如图 4-10 所示。随着温度的增加，酯化率先提高后下降，当温度达到 45 °C 时，酯化率最高，乙酸丁酯的酯化率达到 66.38%，乙酸香叶酯的酯化率达到 56.04%，提高温度酯化率均略有下降，说明高温对酶蛋白有影响，使得催化效果下降，因此后续实验采取 45 °C 作为反应的温度条件。

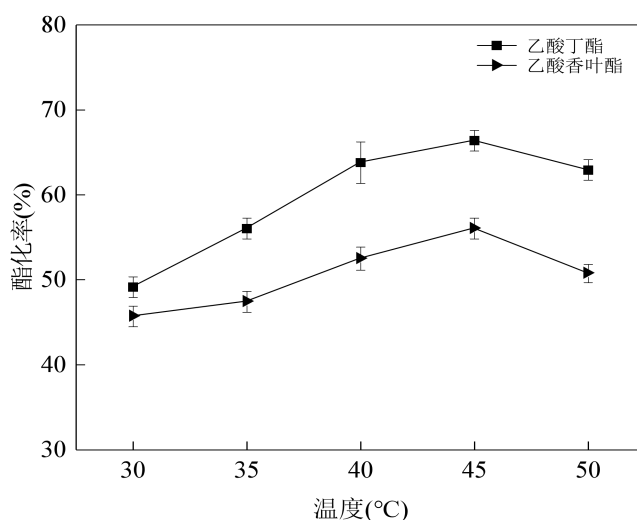


图 4-10 温度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-10 Effect of temperature on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.5 加酶量对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

酶作为反应的催化剂，其在反应体系中的用量也是重要影响因素，随着加酶量的增加，反应速率会增加，酯化率也会随之提高，然而超过一定的范围后，酯化率不会再有明显提升甚至有可能下降。然而过多的加酶量会增加使用成本，因此需要合适的添加量。因此选择了 0.05-0.5 g 的加酶量，考察不同加酶量对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，结果如图 4-11 所示。随着加酶量的增加，酯化率都有了明显的提高。当加酶量为 0.3 g 时，乙酸丁酯酯化率最高为 68.1%，之后反应达到平衡状态，乙酸香叶酯的酯化率在 0.4 g 时达到 57.76%，继续增加酶量反而酯化率降低，这是因为酯化反应是可逆反应，催化剂过多可能使反应向逆向进行。因此后续在合成乙酸丁酯时，加酶量采用 0.3 g，合成乙酸香叶酯时采用 0.4 g。这与 Gel-coated Lipase@Resins 合成乙酸丁酯以及 PEI-PCMCLs 合成乙酸香叶酯相比，该体系中使用催化剂更少，说明制备的交联文冠果籽粉的催化活性较好。

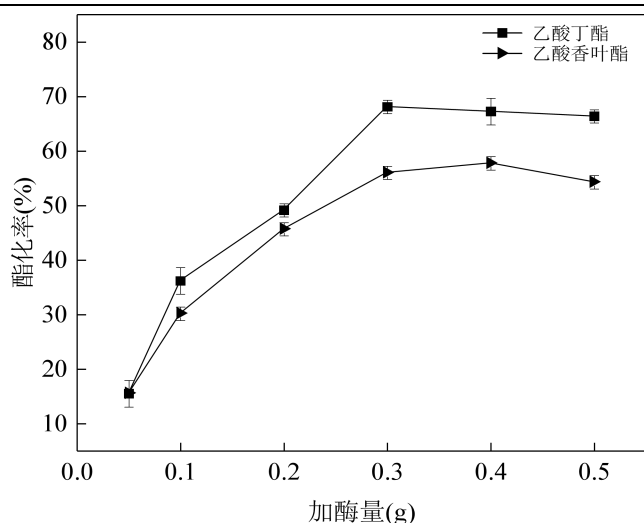


图 4-11 加酶量对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-11 Effect of enzyme addition on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.6 水活度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

如图 4-12 所示,可以看出,随着 a_w 的增加,酯化率先增加后减少,酯化效果最好的是 $a_w=0.33$,此时乙酸丁酯的酯化率为 72.85%,乙酸香叶酯的酯化率为 65.95%。这可能时因为在 $a_w=0.33$ 时,固定化酶处于催化作用所必需的最佳构象中,酶周围紧密结合了一层必需水,使得酶具有一定的柔性,能维持酶的结构和构象,过多的水活度可能将反应推向逆向,不利于酯合成。根据 Moussavou^[145]等人在文献中的报道,植物脂肪酶的最佳 a_w 为 0.22-0.44, a_w 大于 0.5 时脂肪酶活性下降。本文的结果与报道的一致,因此采用 $a_w=0.33$ 作为反应的条件。

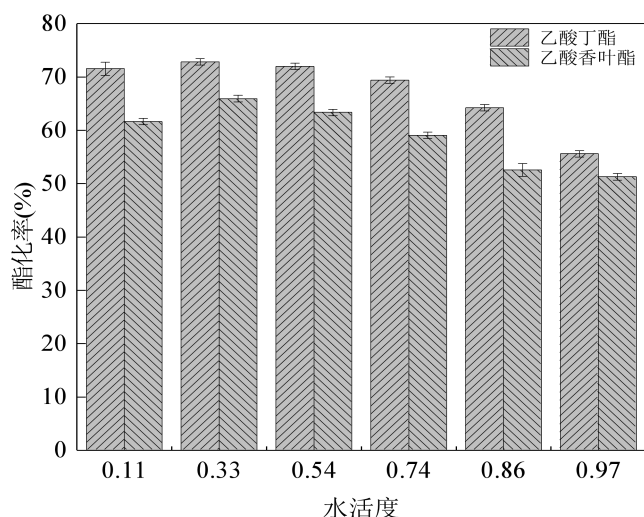


图 4-12 水活度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.4-12 Effect of a_w on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

4.5.5.7 酯化反应进程

在反应的最佳条件下,考察时间对脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响,

并绘制酯化反应时间曲线,结果如图 4-13 所示。合成乙酸丁酯的时间曲线中,在反应 6 h 到 10 h 这段时间里酯化率上升较快,从 57.76%提高到 70.11%,12h 时酯化率达到 72.83%,反应基本达到平衡;而在合成乙酸香叶酯的过程中,反应 12 h 酯化率达到 67.24%。

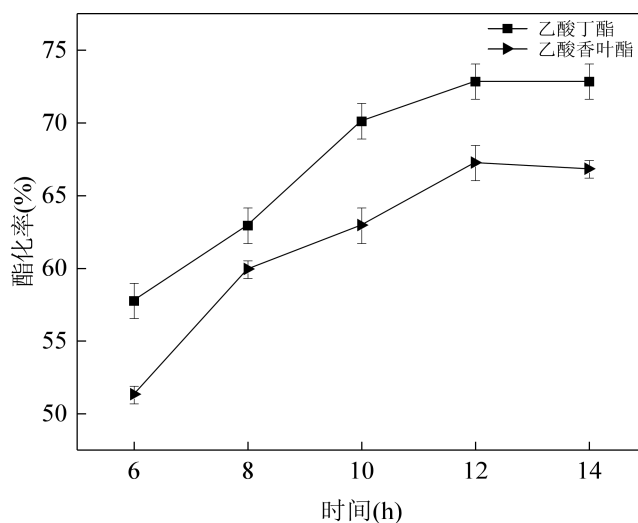


图 4-13 酯化反应时间曲线

Fig.4-13 Esterification reaction time curve

4.5.6 交联文冠果籽粉的重复使用性

图 4-14 显示了交联文冠果籽粉的重复使用性,在重复使用 4 次后,催化合成乙酸丁酯的酯化率为 63.95%,为初始值的 87.81%;合成乙酸香叶酯的酯化率为 58.79%,为初始值的 87.43%,证明交联文冠果籽粉具有一定的重复使用性。

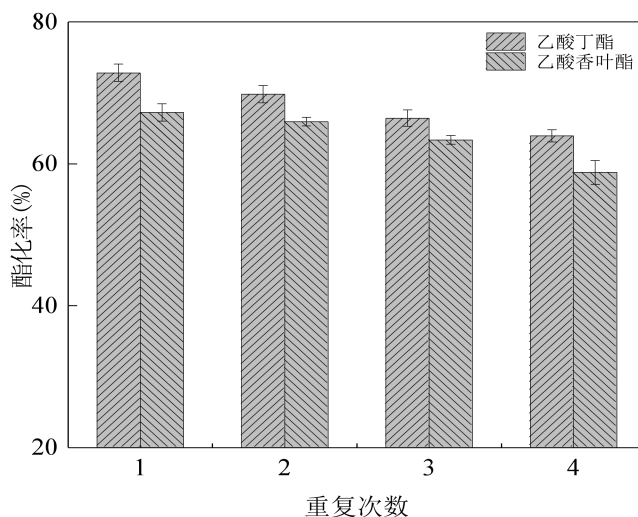


图 4-14 交联文冠果籽粉的重复使用性

Fig.4-14 Reusability of cross-linked *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds powder

4.6 本章小结

本章选取了苦杏仁、蓖麻籽、文冠果、油桐和麻疯树等 5 种不同的植物种籽,从中筛选出酶活最高的文冠果种籽,研究浸泡时间对酶活的影响;利用戊二醛进行原位固定

化,并对戊二醛浓度和交联时间进行优化;利用制备的交联文冠果籽粉在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯,并研究不同因素对酯化率的影响,主要结论如下:

(1) 将文冠果种籽浸泡 4 h 促进萌发后进一步激发脂肪酶酶活,利用丙酮对其脱脂风干后,加入 2%的戊二醛水溶液原位固定 3 h 制备得到交联文冠果籽粉。

(2) 以交联文冠果籽粉为催化剂,在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯,结果表明:10 mL 正庚烷溶液中,各加入 1 mmol 的酸和醇为底物,并添加 0.9 g 分子筛,在温度为 45 °C、水活度为 0.33 的条件下,加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯,反应 12 h 后酯化率达到了 72.83%,加入 0.4 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯,反应 12 h 后酯化率达到了 67.24%;在重复使用 4 次后,催化合成乙酸丁酯的酯化率为 63.95%,为初始值的 87.81%;合成乙酸香叶酯的酯化率为 58.79%,为初始值的 87.43%,证明其具有一定的重复使用性。

第5章 三相系统中文冠果种籽脂肪酶的提取、固定化及合成 乙酸丁酯和乙酸香叶酯的研究

5.1 引言

在前述的章节中研究了以文冠果的种籽粉为催化剂合成乙酸香叶酯，但是由于种籽中含有的酶丰度较低，为了实现催化反应的顺利进行就要添加大量的催化剂。同时。天然的种籽组织结构较为紧密，对于反应过程中的传质起到了一定的阻遏作用，因此，将脂肪酶从种籽中提取出来是很有必要的。从应用的角度来说，大多数植物脂肪酶使用其粗提物就可以，硫酸铵沉淀所获得的粗酶液经过透析以后就可以作为催化剂。

在酶的生产与制备过程中，分离纯化占有重要的地位，一般酶的分离纯化的过程包括盐析、膜过滤以及色谱层析等，依照所分离目标蛋白的性质和用途的不同，可以选用一种或者几种方法的组合，但是总体而言，普遍遵循简便、高效、酶活回收和纯化倍数高的原则。

三相分离是一种用于分离和纯化生物分子的新型分离技术，目前在蛋白质、多糖以及生物活性成分的分离提纯中有较多应用^[146]。其有机相和含盐的水相与蛋白粗提物结合时，能有效地使目标蛋白悬浮在有机相与水相的中间层成为固相。三相分离的确切机理至今尚未完全明了，多数学者认为是盐离子浓度、Kosmotropy、渗透压应力和以及表面张力等多种因素的综合效果。而在三相法提取酶的过程中，由于相转变涉及蛋白空间结构的微调，有时会出现酶活提高的现象^[147]。

脂肪酶在有机相中进行催化反应时，为了提高其对有机溶剂的耐受性需要将酶进行固定化处理。在酶的固定化方法中，除了常规的吸附、交联、共价和包埋等方法外，一种无载体固定化方法也广泛使用，首先通过添加沉淀剂(如硫酸铵、水混溶溶剂或聚乙二醇)将酶从水溶液中沉淀出来。在下一步，物理沉淀的酶被交联，形成不溶于水的颗粒^[148]。目前已制备出多种酶的CLEAs，如醇脱氢酶、酪氨酸酶、青霉素酰化酶、脂肪酶、蛋白酶和漆酶^[149]。本节研究建立了文冠果中脂肪酶的分离提取以及其交联酶聚集体(LCLEAs)的制备都在三相分离系统中的方法，降低了酶制备及固定化的成本，其过程如图5-1所示。在此基础上考察了其合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的性能。

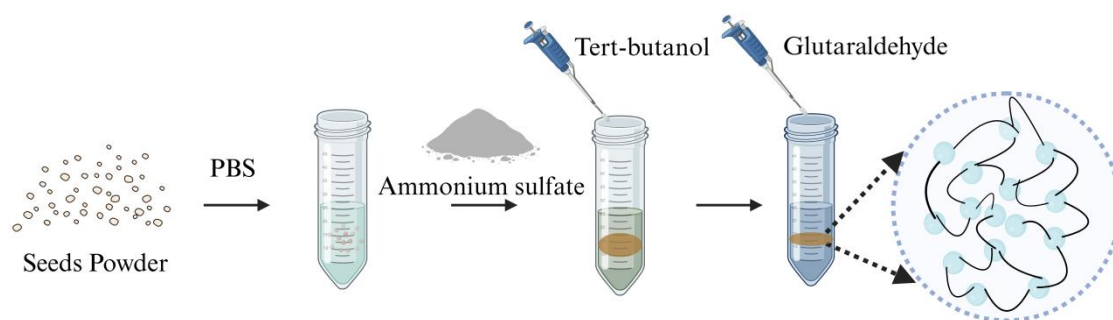


图 5-1 三相系统中文冠果种籽脂肪酶的提取和交联酶聚集体的制备

Fig.5-1 Extraction of lipase from *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds and preparation of LCLEAs in three-phase system

5.2 材料与设备

5.2.1 材料与试剂

文冠果种籽购自当地农资公司，其他实验试剂同 2.2.1 及 3.2.1。

5.2.2 仪器与设备

主要仪器设备同 2.2.2。

5.3 实验方法

5.3.1 文冠果种籽粗酶提取液的制备

称 1.0 g 文冠果种籽粉加入少量石英砂，并加入 20 mL 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(50 mmol/L, pH=7.0)进行研磨，然后倒入离心管中，在 4 °C 的条件下 4000 r/min 离心 10 min，再用滤纸进行过滤，滤液即为种籽粗酶提取液，将其收集并保存在 4 °C 冰箱中备用。

5.3.2 三相法分离提取文冠果种籽脂肪酶

取 10 mL 粗酶提取液，在室温条件下加入硫酸铵至饱和度为 30%，待溶解后 1:1 加入叔丁醇，混匀后在室温条件下静置 30 min，然后以 4000 r/min 的条件离心 5 min，收集中间沉淀，即为纯化后的脂肪酶。用 10 mL 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(50 mmol/L, pH=7.0)溶解中间沉淀，然后进行酶活和蛋白含量的测定。

5.3.2.1 硫酸铵饱和度的选择

为了确定最佳的硫酸铵饱和度，选择硫酸铵饱和度为 20%、30%、40%、50%、60%、70%的进行分离，其他条件均保持一致，待三相分离结束后测定其酶活和蛋白浓度，计算酶活回收率和纯化倍数。

5.3.2.2 叔丁醇比例的选择

为了确定叔丁醇的比例，选择了粗酶提取液与叔丁醇体积比为 1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:1.5、1.0:2.0、1.0:2.5 进行分离，其他条件均保持一致，待三相分离结束后测定其酶活和蛋白浓度，计算酶活回收率和纯化倍数。

5.3.2.3 最适温度的选择

为了确定最适分离温度，将温度设为 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C，其他条件均保持一致，然后进行三相分离，待三相分离结束后测定其酶活和蛋白浓度，计算酶活回收率和纯化倍数。

5.3.2.4 最适 pH 的选择

为了确定最适分离 pH，将分离体系的 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，其他条件均保持一致，然后进行三相分离，待三相分离结束后测定其酶活和蛋白浓度，计算酶活回收率和纯化倍数。

5.3.3 LCLEAs 的制备

取三相分离纯化的酶溶液，加入戊二醛溶液至浓度为 0.5%，振荡摇匀，待交联 30 min 后，4000 r/min 离心 5 min，取沉淀并用一定体积的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50mmol/L, pH=7.0) 洗涤。测定酶活和蛋白含量，计算相对酶活和蛋白固定率。

5.3.3.1 戊二醛浓度的选择

其他条件不变，取三相分离纯化的酶溶液，加入戊二醛溶液至浓度为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%，振荡摇匀，待交联 30 min 后，4000 r/min 离心 5 min，取沉淀并用一定体积的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 洗涤。测定酶活和蛋白含量，计算相对酶活和蛋白固定率。

5.3.3.2 戊二醛交联时间的选择

其他条件不变，取三相分离纯化的酶溶液，加入戊二醛溶液至浓度为 1%，振荡摇匀，待交联一段时间后 (0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h)，4000 r/min 离心 5 min，取沉淀并用一定体积的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0) 洗涤。测定酶活和蛋白含量，计算相对酶活和蛋白固定率。

5.3.4 LCLEAs 的电镜观察

同 2.3.2.3。

5.3.5 LCLEAs 酶学性质的研究

5.3.5.1 最适温度和热稳定性

最适温度：其他反应条件不变，将一定量的固定化脂肪酶放在不同温度下(20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C)进行反应，测定其催化活力，以最高酶活力为 100%，计算相对酶活，确定最适的反应温度。

热稳定性：同 2.3.3.2。

5.3.6 LCLEAs 催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯

同 4.3.6。

5.3.7 LCLEAs 的重复使用性

同 2.3.5。

5.4 分析方法

5.4.1 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定同 2.4.1。

5.4.2 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定同 2.4.2。

5.4.3 蛋白固定率的计算

蛋白固定率的计算同 2.4.3。

5.4.4 酶活回收率的计算

酶活回收率的计算公式为：

$$\text{酶活回收率} = \frac{\text{纯化后酶活力}}{\text{初始粗酶活力}} \times 100\%$$

5.4.5 纯化倍数的计算

纯化倍数的计算公式为：

$$\text{纯化倍数} = \frac{\text{纯化后酶的比活力}}{\text{初始粗酶的比活力}}$$

5.5 结果与讨论

5.5.1 三相分离提取文冠果种籽脂肪酶

5.5.1.1 硫酸铵饱和度对三相分离的影响

由图 5-2 可知，随着硫酸铵饱和度的增加，酶活回收率和纯化倍数先增加后减少，当硫酸铵饱和度为 40%时，纯化倍数最高，达到了 2.34，酶活回收率达到 50.28%，当硫酸铵饱和度为 50%时，酶活回收率达到 62.76%，但纯化倍数明显减少，继续增加硫酸铵饱和度，酶活回收率和纯化倍数均减少，可能是硫酸铵饱和度过高导致酶失活，同

时将杂蛋白也沉淀浓缩到中间酶饼层。因此选择 40% 的硫酸铵饱和度作为后续三相分离提取的条件。

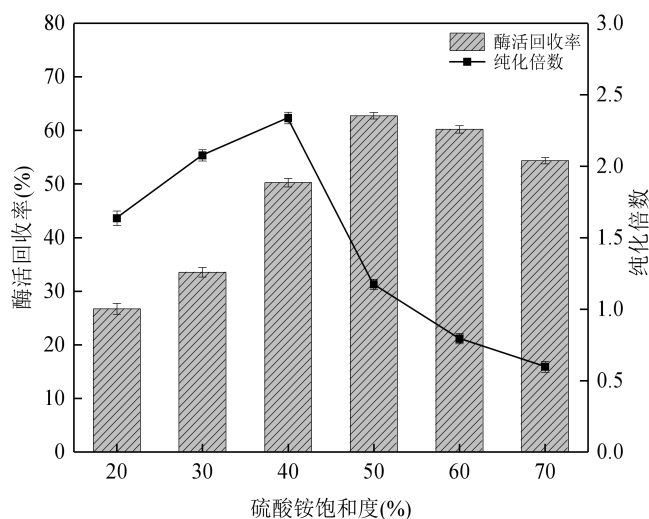


图 5-2 硫酸铵饱和度对三相分离的影响

Fig.5-2 Effect of ammonium sulfate saturation on three-phase partitioning

5.5.1.2 叔丁醇比例对三相分离的影响

由图 5-3 可知,随着叔丁醇用量的增加,纯化倍数先增加后减少,酶活回收率在一定程度上有所增加。当粗酶提取液和叔丁醇体积比为 1:1 时,纯化倍数最高,为 2.56,酶活回收率为 72.98%,继续增加叔丁醇的比例,酶活回收率和纯化倍数减少,可能是叔丁醇导致酶蛋白变性失活,同时叔丁醇和硫酸铵的协同作用使得更多的杂蛋白被沉淀,导致纯化倍数降低。因此综合考虑选择粗酶液与叔丁醇体积比为 1:1 作为分离的条件。

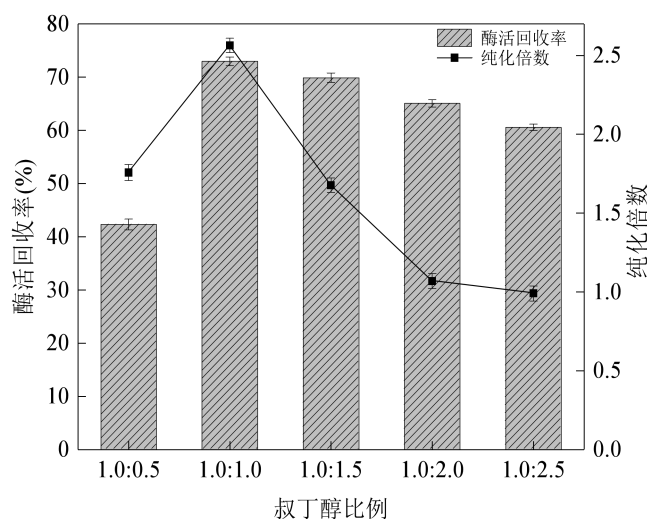


图 5-3 叔丁醇比例对三相分离的影响

Fig.5-3 Effect of tert-butanol ratio on three-phase partitioning

5.5.1.3 温度对三相分离的影响

由图 5-4 可知,在提取时随着温度的增加,酶活回收率和纯化倍数也有所增加,当

温度过低时,叔丁醇会出现结晶,影响三相体系的形成,当温度提高到 30 ℃时,酶活回收率和纯化倍数最高,酶活回收率达到了 68.23%,纯化倍数为 2.81。继续增加温度,酶活回收率和纯化倍数都减少,可能是温度过高容易引起酶蛋白的失活。综合考虑选择 30 ℃作为分离条件。

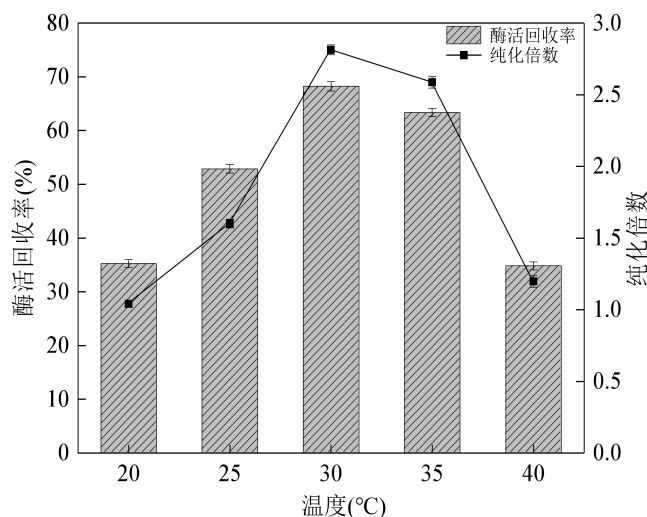


图 5-4 温度对三相分离的影响

Fig.5-4 Effect of temperature on three-phase partitioning

5.5.1.4 pH 对三相分离的影响

在三相分离体系中, pH 在等电点附近更容易使目标蛋白在中间相积累, 由图 5-5 可知, 当 pH=5 时, 纯化倍数最高, 达到 2.85, 酶活回收率为 53.08%, 随着 pH 的升高, 纯化倍数下降, 酶活回收率先升高后降低, 在 pH=7 时, 酶活回收率最高, 达到 67.89%。pH 过高或过低都会使酶蛋白失活, 不利于分离纯化, 综合考虑选择 pH=5 作为分离的条件。

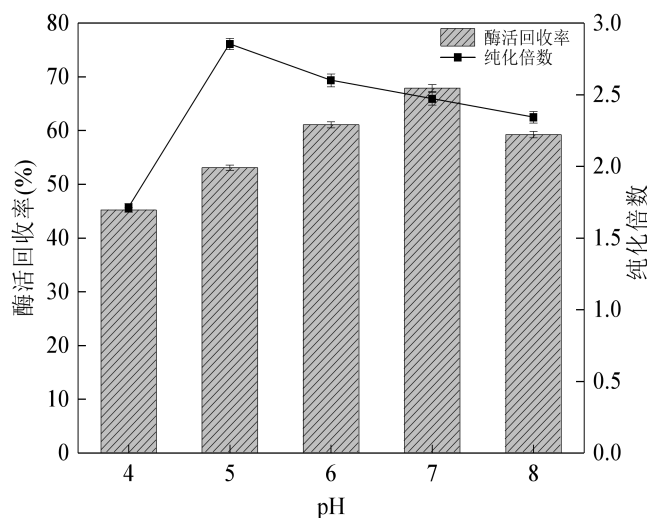


图 5-5 pH 对三相分离的影响

Fig.5-5 Effect of pH on three-phase partitioning

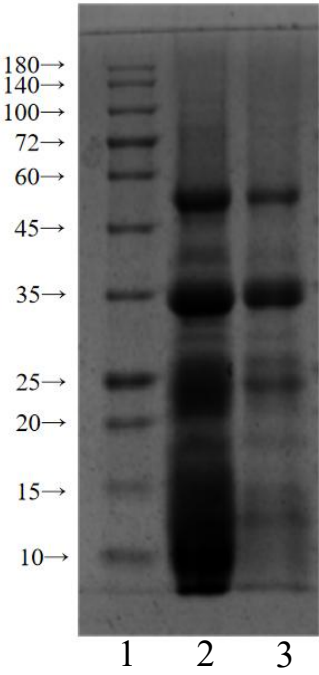
5.5.2 纯化结果及 SDS-PAGE 结果

通过三相分离及分离条件的优化，得到纯化的蛋白，由表 5-1 可知，三相分离后酶活回收率为 53.08%，纯化倍数为 2.85。由图 5-6 可以看出，通过三相分离法纯化的脂肪酶杂蛋白较少，方便后续进一步地分离。

表 5-1 文冠果种籽脂肪酶的纯化结果

Table 5-1 Purification results of lipase from *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds

	总酶活(U)	总蛋白(mg)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	酶活回收率 (%)
三相法	0.065	28.63	0.0028	2.85	53.08



1:标准蛋白 Marker; 2:文冠果种籽粗酶提取液; 3:三相分离法提纯的脂肪酶

图 5-6 文冠果种籽脂肪酶的 SDS-PAGE

1:Marker; 2:Crude enzyme extract of *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds; 3:Lipase purified by three-phase partitioning

Fig.5-6 SDS-PAGE of lipase from *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds

5.5.3 LCLEAs 的制备

5.5.3.1 戊二醛浓度对 LCLEAs 制备的影响

由图 5-7 可知，随着戊二醛浓度的增加，酶活先增加后降低，当戊二醛浓度为 1% 时，脂肪酶酶活最高，继续提高戊二醛浓度，酶活降低，而蛋白固定化率随着戊二醛浓

度的升高先增加后趋于稳定。戊二醛分子中的两个醛基可以与蛋白质的氨基发生反应，使蛋白质分子形成交联网络，从而达到固定化效果。低浓度的戊二醛无法形成有效的交联网络，影响固定化效果，高浓度的戊二醛可能会影响蛋白的结构，综合考虑选择 1% 的戊二醛浓度作为固定化条件。

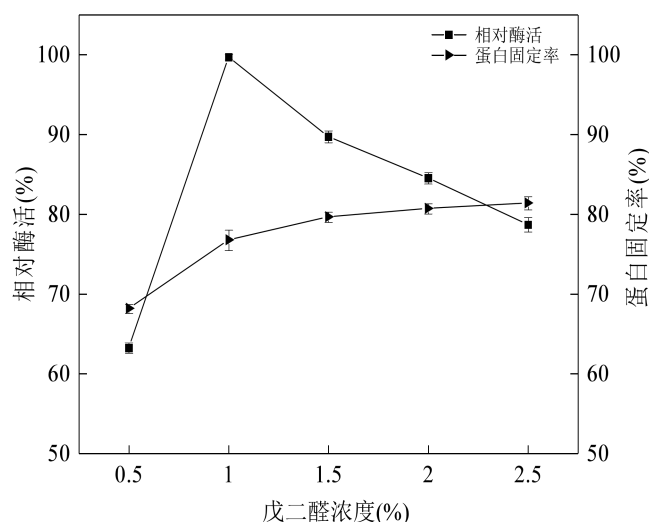


图 5-7 戊二醛浓度对 LCLEAs 制备的影响

Fig.5-7 Effect of glutaraldehyde concentration on preparation of LCLEAs

5.5.3.2 戊二醛交联时间对 LCLEAs 制备的影响

图 5-8 显示了戊二醛交联时间对固定化的影响，由图可知，随着戊二醛交联时间的延长，脂肪酶酶活提高，在 1 h 时酶活最高，继续延长戊二醛交联时间，酶活降低。可能是戊二醛的两个醛基与蛋白质氨基结合需要一定时间，但随着时间的延长，戊二醛与蛋白质过多的结合可能导致连接紧密，同时酶在交联过程中长时间的暴露可能造成酶活损失。综合考虑选择 1 h 作为固定化的条件。

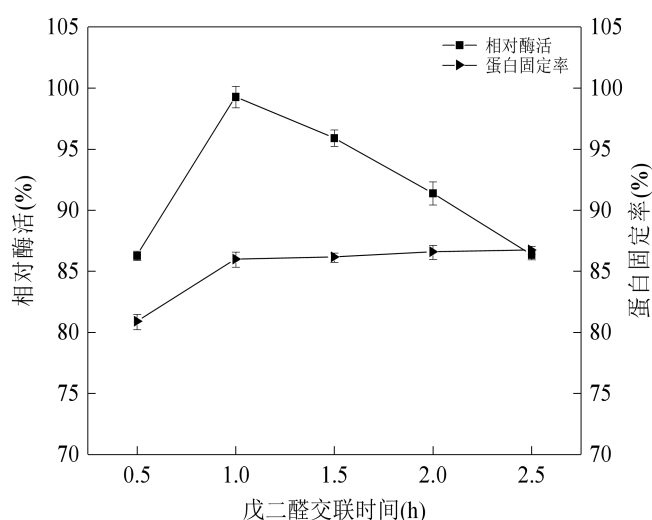


图 5-8 戊二醛交联时间对 LCLEAs 制备的影响

Fig.5-8 Effect of glutaraldehyde cross-linked time on preparation of LCLEAs

5.5.4 LCLEAs 的电镜观察

对三相分离文冠果种籽脂肪酶和戊二醛交联固定三相分离文冠果种籽脂肪酶交联聚集体进行了微观形态观测，结果如图 5-9 所示。图 A 为三相分离文冠果种籽脂肪酶，其形状不规则，利用戊二醛固定后，酶蛋白交联起来，这种结构对维持酶的催化活性和稳定性有重要意义。

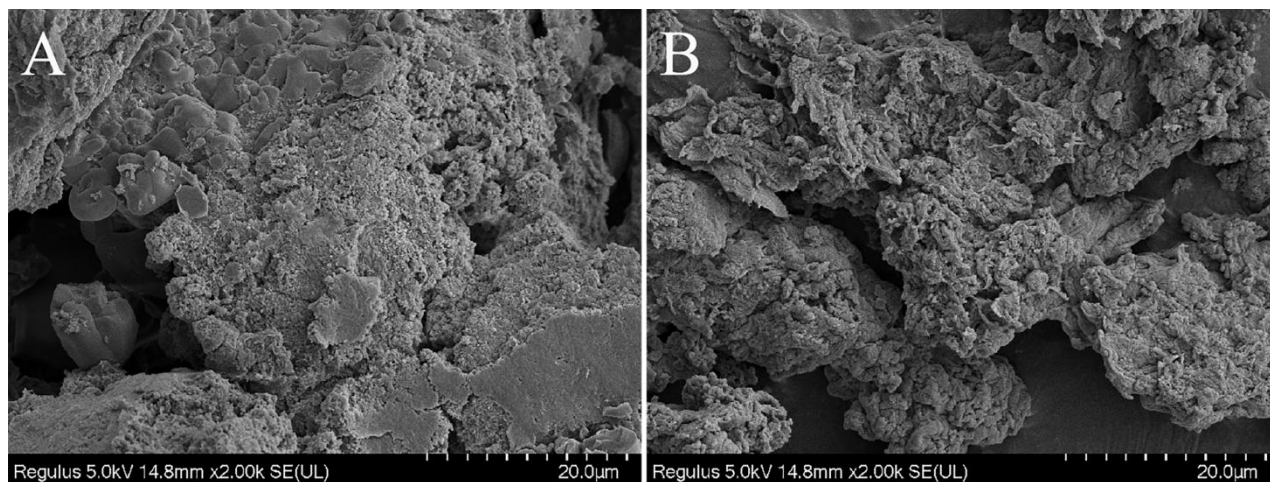


图 5-9 三相分离文冠果种籽脂肪酶(A)和脂肪酶交联聚集体(B)的 SEM 图

Fig.5-9 SEM images of three-phase partitioning of *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds lipase (A) and glutaraldehyde cross-linked immobilization of *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds lipase (B)

5.5.5 LCLEAs 酶学性质的研究

5.5.5.1 最适温度和热稳定性

图 5-10 显示了 LCLEAs 的最适反应温度，由图可知，游离酶的最适反应温度为 40 °C，而 LCLEAs 的最适温度为 50 °C，这可能是固定化后，酶的活性位点与底物分子在较高的温度下才能更好地结合。从图中还可以看出，在较高的温度下，LCLEAs 仍然具有较高的酶活，说明固定化使得酶的结构得到了加强，提高了对温度的耐受力。

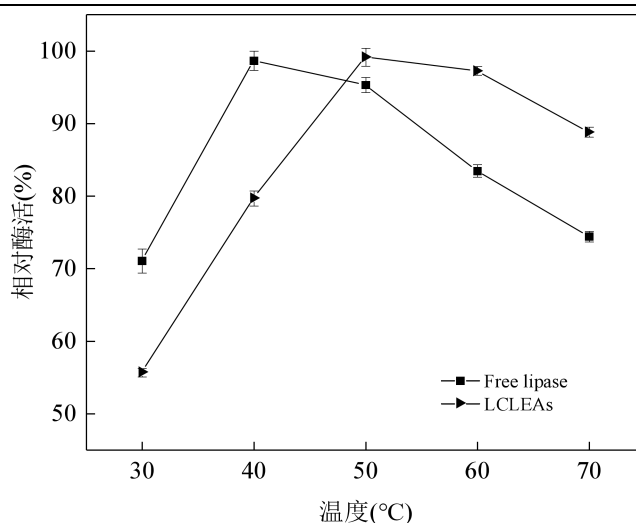


图 5-10 LCLEAs 的最适反应温度

Fig.5-10 Optimum reaction temperature of LCLEAs

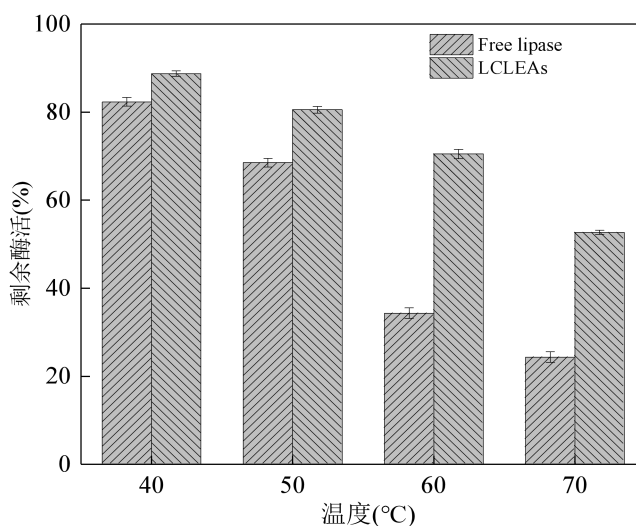


图 5-11 LCLEAs 的温度稳定性

Fig.5-11 Temperature stability of LCLEAs

图 5-11 显示了固定化脂肪酶的温度稳定性,从图中可以看出,在不同温度下保温 3 h 后,游离脂肪酶和固定化酶的酶活力都随着温度的升高而呈现下降的趋势,可能是高温破坏了酶的分子结构。但固定化酶的酶活损失远远低于游离酶,当温度达到了 70 °C 时,固定化酶仍具有 52.7%的酶活,而游离酶仅仅保留 24.34%。由此可见,固定化酶可以增加对温度的耐受性。

5.5.6 LCLEAs 催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯

5.5.6.1 有机溶剂对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

为了研究有机溶剂对固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响,选择了正己烷、环己烷、正庚烷、异辛烷、二甲亚砜作为反应介质,结果如图 5-12 所示。从图中可以看出,在正己烷、环己烷、正庚烷和异辛烷中脂肪酶催化合成两种酯的效果类

似，均在 50%以上，这可能是因为它们具有相似的疏水性。以正己烷作为反应溶剂合成乙酸丁酯，其酯化率最高为 62.04%，这与前面两章在正庚烷体系合成乙酸丁酯有所不同。有机溶剂的选择是底物与酶以及溶剂共同作用所决定的，而反应结果说明这个体系中更需要正己烷用作反应介质。另外以正庚烷作为反应溶剂合成乙酸香叶酯效果最佳，其酯化率为 56.04%，但在二甲亚砜中两种酯的酯化率均在 20%左右，说明二甲亚砜不适合作为反应介质。因此选择正己烷作为合成乙酸丁酯的反应介质，以正庚烷作为合成乙酸香叶酯的反应介质。

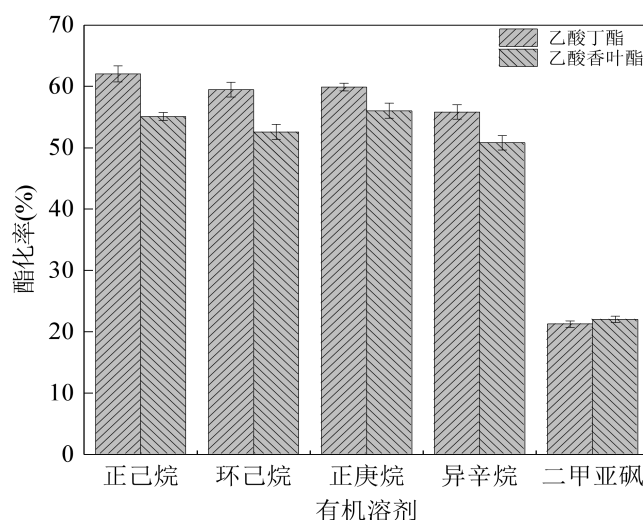


图 5-12 有机溶剂对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-12 Effect of organic solvents on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.2 底物浓度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

为了选择合适的底物浓度，在反应底物摩尔比相同的前提下，选择了 0.025-0.3 mol/L 的底物浓度，研究底物浓度对固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，结果如图 5-13 所示，当底物浓度在 0.025-0.1 mol/L 时，两种酯化率均在 50%以上，0.1 mol/L 时，酯化效果较好，乙酸丁酯和乙酸香叶酯的酯化率分别为 63.43%和 53.88%，但随着底物的继续增加，酯化率逐渐下降，当底物浓度为 0.3 mol/L 时，乙酸丁酯的酯化率为 29.22%，乙酸香叶酯的酯化率为 24.57%，可能是过高浓度的底物会抑制酶的活性，因此选择 0.1 mol/L 作为两种酯的合成条件。

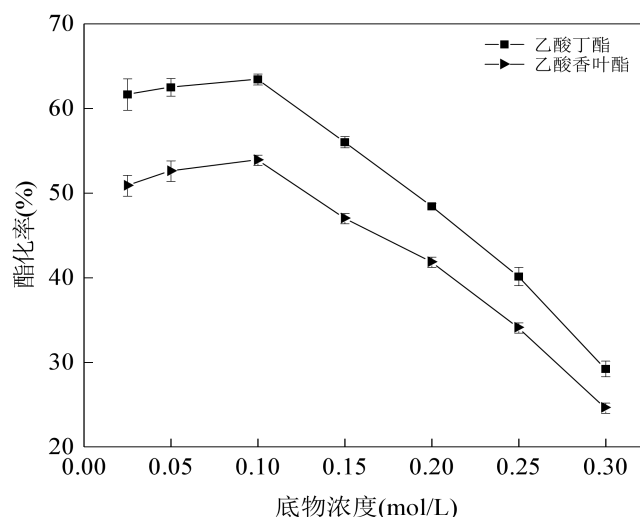


图 5-13 底物浓度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-13 Effect of substrate concentration on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.3 底物摩尔比对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

为了选择合适的底物摩尔比，在反应底物 0.1 mol/L 的前提下，选择了酸醇比为 1.4:1.0、1.2:1.0、1.0:1.0、1.0:1.2、1.0:1.4 的不同条件，研究底物摩尔比对固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，结果如图 5-14 所示，当酸醇比为 1.0:1.2 时，两种酯的酯化效果最好，酯化率分别为 69.89% 和 59.05%，因此选择 1.0:1.2 作为反应条件。与未经纯化的种籽脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯相比，纯化后对醇的耐受有所提高。

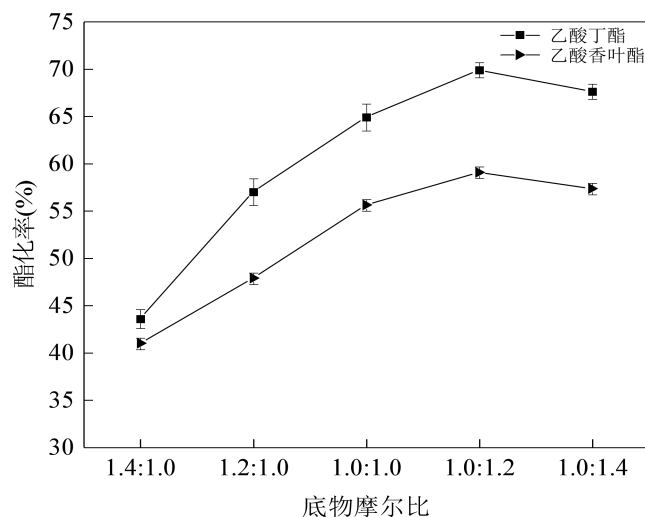


图 5-14 底物摩尔比对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-14 Effect of substrate molar ratio on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.4 温度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

为了选择合适的反应温度，在反应底物 0.1 mol/L、酸醇比 1.0:1.2 的前提下，选择了 30-50 °C 的不同温度条件，研究温度对固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯

的影响,结果如图 5-15 所示,随着温度的增加,酯化率先增加后降低,当温度为 40 °C 时,乙酸丁酯的酯化酯化效果最好,酯化率为 71.30%,而乙酸香叶酯的酯化率为 58.19%,当温度为 45 °C 时,乙酸香叶酯的酯化率为 59.91%,与前面 Gel-coated Lipase@Resins 和 PEI-PCMCLs 相比,LCLEAs 对温度更敏感。因此选择 40 °C 作为合成乙酸丁酯的条件,45 °C 作为合成乙酸香叶酯的条件。

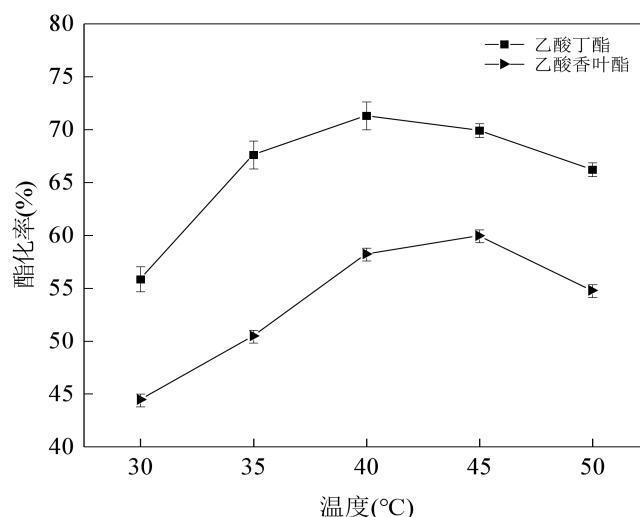


图 5-15 温度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-15 Effect of temperature on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.5 加酶量对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

为了选择合适的加酶量,研究了 0.05-0.5 g 不同加酶量对固定化脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响,结果如图 5-16 所示。随着加酶量的增加,酯化率先增加然后维持稳定。当加酶量为 0.3 g 时,乙酸丁酯的酯化率为 78.24%,乙酸香叶酯的酯化率为 65.52%,继续增加酶量,酯化率没有明显增加,说明反应基本达到平衡状态,为了节约酶蛋白的使用,同时保持较高的酯化率,选择以 0.3 g 作为这两种酯的合成条件。

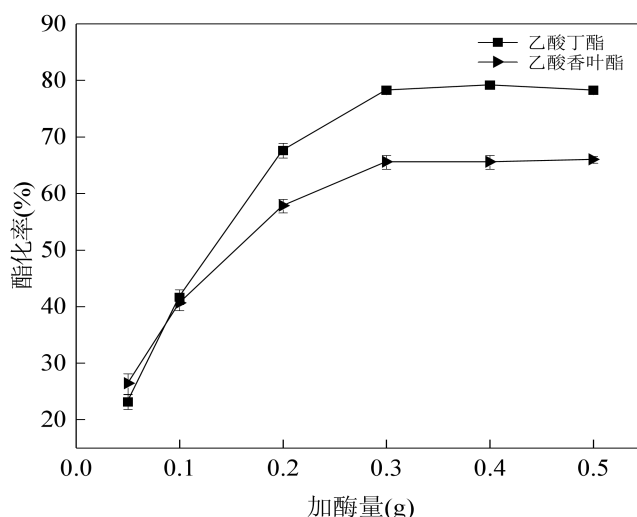


图 5-16 加酶量对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-16 Effect of enzyme addition on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.6 水活度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

如图 5-17 所示，从图中可以看出，随着水活度的增加，酯化率先增加后减少，当水活度为 0.33 时，乙酸香叶酯的酯化效果最好，达到 73.28%；当水活度为 0.54 时，乙酸丁酯的酯化率最高，为 87.96%，继续增加水活度，酯化率明显下降，说明纯化后酶合成乙酸丁酯需要更多的水。因此选择水活度 0.33 作为合成乙酸香叶酯的条件，水活度 0.54 作为乙酸丁酯合成的条件。

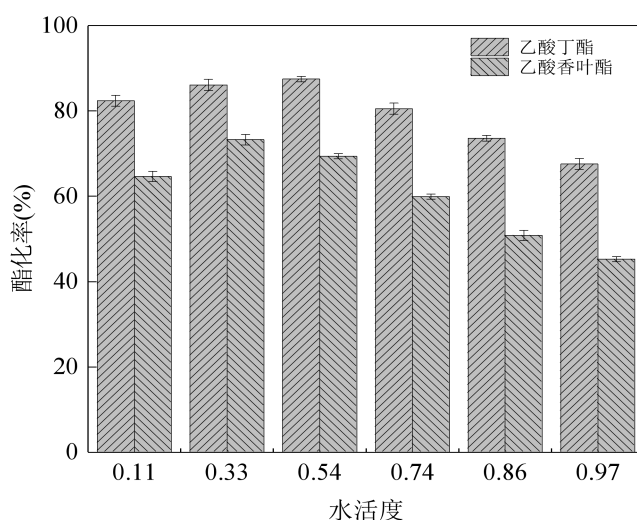


图 5-17 水活度对合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响

Fig.5-17 Effect of a_w on synthesis of butyl acetate and geranyl acetate

5.5.6.7 酯化反应进程

在反应的最佳条件下，考察时间对脂肪酶催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的影响，并绘制酯化反应时间曲线，结果如图 5-18 所示。从图上看，在反应 6-10 h 两种酯的酯化率上升较快，反应到 12 h 逐渐达到平衡，此时乙酸丁酯的酯化率为 87.97%，乙酸

香叶酯的酯化率为 72%。与未经纯化的文冠果种籽脂肪酶相比，其催化合成的乙酸丁酯和乙酸香叶酯的酯化率更高。

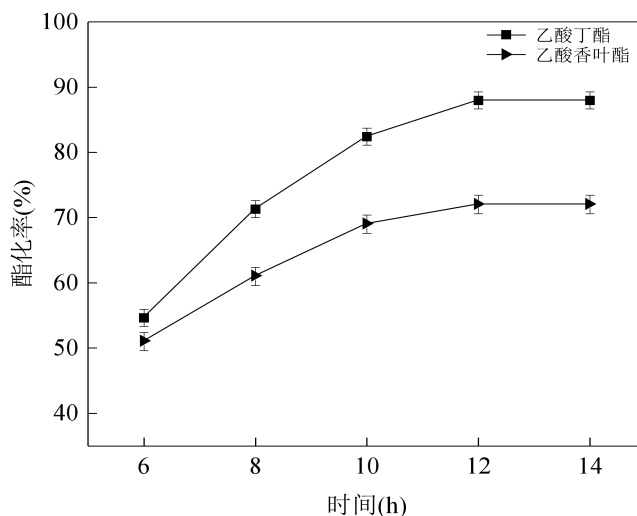


图 5-18 酯化反应时间曲线

Fig.5-18 Esterification reaction time curve

5.5.7 LCLEAs 的重复使用性

为了研究 LCLEAs 的重复使用性，每次反应结束后将 LCLEAs 从体系中分离，并将其自然风干，重复利用 4 次，结果如图 5-19 所示。在使用 4 次后，LCLEAs 催化合成乙酸丁酯的酯化率仍有 70.69%，为初始值的 80.36%；催化合成乙酸香叶酯的酯化率有 59.48%，为初始值的 82.61%，证明 LCLEAs 具有良好的重复使用性。

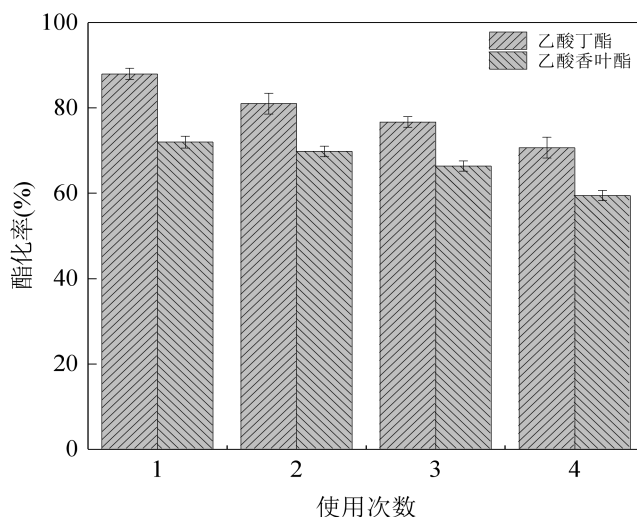


图 5-19 LCLEAs 的重复使用性

Fig.5-19 Reusability of LCLEAs

5.6 本章小结

本章采用三相法从文冠果粗酶液中分离提取脂肪酶，研究不同条件对三相分离的影响，继而以戊二醛为交联剂在此三相系统中制备交联酶聚集体 (LCLEAs)。利用所制备

的 LCLEAs 进行催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯, 确立了最佳反应条件, 主要结论如下:

(1) 通过三相法对脂肪酶进行分离纯化, 确定了最佳的分离条件为: 在硫酸铵饱和度为 40%、叔丁醇比例为 1:1、温度为 30 °C、pH 为 5 的条件下进行三相分离, 得到纯化倍数为 2.85、酶活回收率为 53.08% 的脂肪酶; 然后利用 1% 的戊二醛溶液固定 1 h, 制备了脂肪酶交联聚集体, 提高了酶的稳定性。

(2) 以所制备的 LCLEAs 为催化剂合成乙酸丁酯乙酸香叶酯, 确立了最佳反应条件为: 10 mL 正己烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 丁醇为底物、添加 0.9 g 分子筛, 并在温度为 40 °C、水活度为 0.54 的条件下, 加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯, 反应 12 h 后酯化率达到了 87.97%, 重复使用 4 次后催化合成乙酸丁酯的酯化率仍有 70.69%, 为初始值的 80.36%; 向 10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 香叶醇为底物、添加 0.9 g 分子筛, 并在温度为 45 °C、水活度为 0.33 的条件下, 加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯, 反应 12 h 后酯化率达到了 72%, 重复使用 4 次后催化合成乙酸香叶酯的酯化率为 59.48%, 是初始值的 82.61%, 证明固定化脂肪酶具有良好重复使用性。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

风味酯是存在于植物特别是水果和花卉中的天然成分，其结构一般为短链羧酸酯，是植物体特征香味的物质基础。目前，风味酯在食品、饮料、烟草、化妆品以及制药行业中广泛应用。但是天然的风味酯在生物体中含量较低，提取过程易损耗、成本较高；此外，天然提取的风味酯为多种成分的混合物，原料的产地以及提取工艺的不同会造成香味上的差别，难以标准化，为后期的使用造成不便。化学合成也是制备风味酯常用的方法之一，但是该过程通常会对环境产生不利的影响，并且化学合成不具备区域和结构选择性，造成副产物偏多，分离困难。同时，对于化学合成品，多数消费者带有抵触的情绪。通过酶法来制备风味酯，是一个更高效、更环保的途径，符合绿色化学的发展趋势。通常风味酯采用脂肪酶通过酯化或转酯进行合成。

因此本文以脂肪酶为研究对象，通过凝胶涂层包覆大孔树脂固定化和蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定化两种方式，对脂肪酶(源自 *Thermophila sparsiformis*)进行固定，以提高酶的稳定性，初步研究了其酶学性质，并对形态结构进行表征，然后利用固定化酶催化合成风味酯；从植物中筛选出酶活高的文冠果种籽，利用三相分离技术进行分离纯化，并使用戊二醛进行交联，然后考察其合成风味酯的能力。主要研究内容和主要结论如下：

(1) 采用凝胶涂层包覆大孔树脂固定脂肪酶，并优化制备工艺，对所制备的凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶(Gel-coated Lipase@Resins)进行形态结构观测和酶学性质研究；以 Gel-coated Lipase@Resins 为催化剂，在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸异戊酯，其最佳条件为：以 10 mL 正庚烷为反应溶剂，加入 1 mmol 乙酸和丁醇和 0.9 g 分子筛、反应温度为 45 °C、加酶量为 1 g、水活度为 0.54，反应 12 h，其酯化率为 93.05%；在 3 mL 乙酸乙烯酯中添加 2.4 mmol 的异戊醇、0.5 g 固定化酶，在 45℃反应 14 h，其酯化率为 92.35%；在连续重复利用 4 次后乙酸丁酯和乙酸异戊酯的酯化率仍然有 70.83% 和 84.80%，证明 Gel-coated Lipase@Resins 具有很好的重复利用性，能够被回收再利用。

(2) 采用蛋白包覆微晶-聚乙烯亚胺共固定对脂肪酶进行固定，并优化制备的条件，对制备的蛋白包覆微晶脂肪酶-聚乙烯亚胺共固定(PEI-PCMCLs)进行酶学性质研究，结果表明其温度稳定性和有机溶剂耐受性有了明显提高；利用 PEI-PCMCLs 在非水相中催

化合成乙酸香叶酯，其最佳反应条件：在 10 mL 正庚烷中加入乙酸 0.5 mmol、香叶醇 0.6 mmol、0.9 g 分子筛、反应温度为 50 °C、水活度 0.54、加酶量为 0.4 g，反应 12 h 后酯化率达到了 88.4%，在重复使用 4 次后的酯化率为 69.71%。

(3) 从植物种籽中筛选出酶活最高的文冠果种籽，并在浸泡 4 h 促进萌发后达到最佳催化效果；利用戊二醛进行交联固定，并对固定前后形态结构进行表征；利用固定化脂肪酶在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其最佳反应条件：在 10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 的酸和醇为底物、0.9 g 分子筛、温度为 45 °C、水活度为 0.33，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯，反应 12 h 后酯化率达到了 72.83%，加入 0.4 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯，反应 12 h 后酯化率达到了 67.24%；在重复使用 4 次后，催化合成乙酸丁酯的酯化率为 63.95%；合成乙酸香叶酯的酯化率为 58.79%，证明具有一定的重复使用性。

(4) 利用三相法对文冠果种籽脂肪酶进行分离纯化，并研究了因素对分离的影响，研究表明：在硫酸铵饱和度为 40%、叔丁醇比例为 1:1、温度为 30 °C、pH 为 5 的条件下进行三相分离效果最佳，其纯化倍数和酶活回收率分别为 2.85 和 53.08%；利用 1% 的戊二醛溶液交联固定 1h，并对固定化酶进行形态结构观测；利用交联脂肪酶聚集体在非水相中催化合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯，其最佳反应条件：在 10 mL 正己烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 丁醇为底物、0.9 g 分子筛，并在温度为 40 °C、水活度为 0.54 的条件下，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸丁酯，反应 12 h 后酯化率达到了 87.97%，重复使用 4 次后催化合成乙酸丁酯的酯化率仍有 70.69%，为初始值的 80.36%；向 10 mL 正庚烷溶液中加入 1 mmol 的乙酸和 1.2 mmol 香叶醇为底物、添加 0.9 g 分子筛，并在温度为 45 °C、水活度为 0.33 的条件下，加入 0.3 g 固定化酶催化合成乙酸香叶酯，反应 12 h 后酯化率达到了 72%，重复使用 4 次后催化合成乙酸香叶酯的酯化率为 59.48%，证明固定化脂肪酶具有良好重复使用性。

6.2 本文的创新点

(1) 目前常用的商业化固定化脂肪酶价格都比较昂贵，使用成本较高，本文通过建立凝胶涂层包覆大孔树脂固定化和蛋白微晶包覆-聚乙烯亚胺共固定化这两种方式，制备了 Gel-coated Lipase@Resins 和 PEI-PCMCLs，有效提高了脂肪酶的稳定性和重复使用性，降低了使用成本，并将其用于酯的合成，拓宽了酶的用途。

(2) 常用的商业化脂肪酶大多数都来自于微生物，本文从新的酶源挖掘出发，从植物来源中筛选出文冠果种籽脂肪酶，并考察其合成风味酯的能力，有效拓宽了酶的来源，并为风味酯的制备提供了新方向。

6.3 展望

本文以开发新酶源、新用途为目标，建议了新的脂肪酶固定化方式，并从植物种籽中筛选脂肪酶，考察风味酯的合成能力，拓宽酶的来源和应用，但本论文的研究工作仅是一个开端，后续的研究重点可以主要包括以下几个方面：

(1) 本文所制备的固定化脂肪酶的酯合成实验只是实验室规模，后续可以考虑进行放大实验，以考察其实际应用的性能；

(2) 风味酯种类丰富，各自具有不同的应用价值，本论文所制备的固定化脂肪酶仅涉及了乙酸丁酯、乙酸异戊酯和乙酸香叶酯等风味酯的合成，后续可以研究其对不同风味酯的合成情况以及扩展到油脂水解和改性、糖脂合成和生物柴油的制备等方面；

(3) 植物来源的脂肪酶目前研究较少，本文也仅仅考察了文冠果种籽中脂肪酶合成乙酸丁酯和乙酸香叶酯的性能，后续可以对其脂肪酶进行分离纯化，研究其酶的组成以及性质，探究其催化机理，挖掘其潜在的催化性能。

参考文献

- [1] LEE W J, QIU C, LI J, *etc.* Sustainable oil-based ingredients with health benefits for food colloids and products [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2022, 43: 82-90.
- [2] SARMAH N, REVATHI D, SHEELU G, *etc.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases [J]. *Biotechnol Progress*, 2018, 34(1): 5-28.
- [3] NAZARIAN Z, ARAB S S. Discovery of carboxylesterases via metagenomics: putative enzymes that contribute to chemical kinetic resolution [J]. *Process Biochemistry*, 2022, 121: 439-454.
- [4] REMONATTO D, MIOTTI JR R H, MONTI R, *etc.* Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review [J]. *Process Biochemistry*, 2022, 114: 1-20.
- [5] YAO W, LIU K, LIU H, *etc.* A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 743377.
- [6] MURPHY D J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms [J]. *Progress in Lipid Research*, 2001, 40(5): 325-438.
- [7] FILHO D G, SILVA A G, GUIDINI C Z. Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18): 7399-7423.
- [8] MELANI N B, TAMBOURGI E B, SILVEIRA E. Lipases: From production to applications [J]. *Separation & Purification Reviews*, 2020, 49(2): 143-158.
- [9] PATIL K, CHOPDA M, MAHAJAN R. Lipase biodiversity [J]. *Indian Journal of Science and Technology*, 2011, 8: 971-982.
- [10] VISSERS R J, ABU-LABAN R, MCHUGH D. Amylase and lipase in the emergency department evaluation of acute pancreatitis [J]. *The Journal of emergency medicine*, 1999, 17(6): 1027-1037.
- [11] SUNDARAMAHALINGAM M A, AMRUTHA C P, SIVASHANMUGAM P, *etc.* An encapsulated report on enzyme-assisted transesterification with an allusion to lipase [J]. *3 Biotech*, 2021, 11: 481.
- [12] SANTOS K C, CASSIMIRO D M J, AVELAR M H M, *etc.* Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 49: 462-470.
- [13] SETH S, CHAKRAVORTY D, DUBEY V K, *etc.* An insight into plant lipase research-challenges encountered [J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 95: 13-21.
- [14] DING L-N, LI M, WANG W-J, *etc.* Advances in plant gDSL lipases: From sequences to functional mechanisms [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41(9): 151.
- [15] ALI S, KHAN S A, HAMAYUN M, *etc.* The recent advances in the utility of microbial lipases: A review [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2):510.
- [16] ESKANDARI A, LEOW T C, RAHMAN M B A, *etc.* Recent insight into the advances and prospects of microbial lipases and their potential applications in industry [J]. *International Microbiology*, 2024.
- [17] ROCHA K S C, QUEIROZ M S R, GOMES B S, *etc.* Lipases of endophytic fungi *stemphylium lycopersici* and *sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived monoacylglycerols [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 142: 109664.
- [18] YAO W, LIU K, LIU H, *etc.* A valuable product of microbial cell factories: Microbial lipase [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12.
- [19] BORNSCHEUER U T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 73-81.

- [20] GUPTA R, KUMARI A, SYAL P, *etc.* Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology [J]. *Progress in Lipid Research*, 2015, 57: 40-54.
- [21] STRZELCZYK P, BUJACZ G D, KIELBASINSKI P, *etc.* Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase b from *candida antarctica* [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 63(1): 103-109.
- [22] SILVEIRA R L, KNOTT B C, PEREIRA C S, *etc.* Transition path sampling study of the feruloyl esterase mechanism [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(8): 2018-2030.
- [23] BRADY L, BRZOZOWSKI A M, DEREWENDA Z S, *etc.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase [J]. *Nature*, 1990, 343(6260): 767-770.
- [24] RODRIGUES R C, VIRGEN-ORTIZ J J, DOS SANTOS J C S, *etc.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions [J]. *Biotechnology Advances*, 2020:2100:143-158.
- [25] SCHRAG J D, LI Y G, WU S, *etc.* Ser-his-glu triad forms the catalytic site of the lipase from *geotrichum candidum* [J]. *Nature*, 1991, 351(6329): 761-764.
- [26] TAN Z, CHEN G, CHEN S, *etc.* Engineering lipase at the molecular scale for cleaner biodiesel production - a review [J]. *Molecular Catalysis*, 2023, 546: 113271.
- [27] CHANDRA P, ENESPA, SINGH R, *etc.* Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review [J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 169.
- [28] RAY A. Application of lipase in industry [J]. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2012, 2: 33-37.
- [29] REYES-REYES A L, VALERO BARRANCO F, SANDOVAL G. Recent advances in lipases and their applications in the food and nutraceutical industry [J]. *Catalysts*, 2022, 12(9): 960.
- [30] SHOJAEI ZINJANAB M, GOLMAKANI M T, ESKANDARI M H, *etc.* Natural flavor biosynthesis by lipase in fermented milk using in situ produced ethanol [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 58(5): 1858-1868.
- [31] LI Q, LIU K, CAI G, *etc.* Developing lipase inhibitor as a novel approach to address the rice bran rancidity issue—a critical review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(7): 3277-3290.
- [32] QI Y, CHEN M, JIN T, *etc.* Computer-aided engineering of lipases solvent tolerance enhanced their applications in sugar esters synthesis: State of the art [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2024, 144: 104323.
- [33] RODRIGUES R C, AYUB M A Z. Effects of the combined use of *thermomyces lanuginosus* and *rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(3): 682-688.
- [34] ALONAZI M, AL-DIAHAN S K, ALZAHIRANI Z R A, *etc.* Combined immobilized lipases for effective biodiesel production from spent coffee grounds [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2023, 30(9): 103772.
- [35] IULIANO M, SARNO M, DE PASQUALE S, *etc.* *Candida rugosa* lipase for the biodiesel production from renewable sources [J]. *Renewable Energy*, 2020, 162: 124-133.
- [36] SHALINI P, DEEPANRAJ B, VIJAYALAKSHMI S, *etc.* Synthesis and characterisation of lipase immobilised magnetic nanoparticles and its role as a catalyst in biodiesel production [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2023, 80: 2725-2730.
- [37] WANG H H, ZHANG Q, YU X, *etc.* Application of lipase b from *candida antarctica* in the pharmaceutical industry [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2023, 62(39): 15733-15751.
- [38] OKADA T, YAMAMOTO T, KATO D, *etc.* Synthesis of 8-deoxypumiliotoxin 193h and 9-deoxyhomopumiliotoxin 2070 [J]. *Tetrahedron Letters*, 2018, 59(42): 3797-3800.

- [39] LÓPEZ-IGLESIAS M, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ D, RODRÍGUEZ-MATA M, *etc.* Asymmetric biocatalytic synthesis of fluorinated pyridines through transesterification or transamination: Computational insights into the reactivity of transaminases [J]. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2017, 359(2): 279-291.
- [40] ZHANG H, ZHANG X, WANG L, *etc.* Synthesis of a lignin-enhanced graphene aerogel for lipase immobilization [J]. *American Chemical Society Omega*, 2023, 8(2): 2435-2444.
- [41] ROSANGZUALA K, PATLOLLA R R, SHAIKH A, *etc.* Streamlined chemo-enzymatic synthesis of molnupiravir via lipase catalyst [J]. *American Chemical Society Omega*, 2024, 9(4): 4423-4428.
- [42] REEVE J L V, TWOMEY P J. No abdominal pain, no lipase [J]. *International Journal of Clinical Practice*, 2019, 73(12): 13412.
- [43] MEHTA A, BODH U, GUPTA R. Isolation of a novel lipase producing fungal isolate *aspergillus fumigatus* and production optimization of enzyme [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2018, 36(6): 450-457.
- [44] SINGH A K, MUKHOPADHYAY M. Overview of fungal lipase: A review [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(2): 486-520.
- [45] KUMAR A, VERMA V, DUBEY V K, *etc.* Industrial applications of fungal lipases: A review [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1142536.
- [46] SONG M, XIN Y, CAI S, *etc.* Immobilized kdn lipase on macroporous resin for isopropyl myristate synthesis [J] *Catalysts*, 2023, 13(4): 772
- [47] PINTO BRITO M J, FLORES SANTOS M P, SOUZA JÚNIOR E C D, *etc.* Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: Effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8(5): 104391.
- [48] ADNAN M, LI K, WANG J, *etc.* Hierarchical ZIF-8 toward immobilizing burkholderia cepacia lipase for application in *biodiesel preparation* [J]. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1424.
- [49] PEDRO K C N R, DA SILVA J V V, CIPOLATTI E P, *etc.* Adsorption of lipases on porous silica-based materials for esterification in a solvent-free system [J]. *3 Biotech*, 2023, 13(11): 380.
- [50] SECUNDO F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6250-6261.
- [51] CAO Y-P, ZHI G-Y, HAN L, *etc.* Biosynthesis of benzyl cinnamate using an efficient immobilized lipase entrapped in nano-molecular cages [J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130428.
- [52] CHEN M, SHE W, ZHAO X, *etc.* Immobilization of *thermomyces lanuginosus* lipase in a novel polysaccharide-based hydrogel by a two-step crosslinking method and its use in the lauroylation of α -arbutin [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2024, 11(1): 7.
- [53] MULEY A B, AWASTHI S, BHALERAO P P, *etc.* Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *aspergillus niger*: Process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(7): 1383-1404.
- [54] OLIART-ROS R M, BADILLO-ZEFERINO G L, QUINTANA-CASTRO R, *etc.* Production and characterization of cross-linked aggregates of *geobacillus thermoleovorans* ccr11 thermoalkaliphilic recombinant lipase [J]. *Molecules*, 2021, 26(24):7569.
- [55] FAHIM Y A, EL-KHAWAGA A M, SALLAM R M, *etc.* A review on lipases: Sources, assays, immobilization techniques on nanomaterials and applications [J]. *BioNanoScience*, 2024.
- [56] XU L, GENG X, LI Q, *etc.* Calcium-based mofs as scaffolds for shielding immobilized lipase and enhancing its stability [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 237: 113836.

- [57] LEE H, YANG E, KWON H K, *etc.* Innovative approach for semi-continuous production of puerarin palmitate via transesterification with novel immobilized lipase [J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2024, 11(1): 40.
- [58] LIU Z, DAI L, LIU D, *etc.* Enhanced stability and performance of immobilized lipase using hydrophobically modified single-crystalline ordered macro-microporous cubtc as a carrier material [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(10): 3909-3920.
- [59] DAS NEVES A M, VISIOLI L J, ENZWEILER H, *etc.* Lipase from *candida rugosa* incorporated in pectin hydrogel via immobilization for hydrolysis of lipids in dairy effluents and production of fatty acids [J]. Journal of Water Process Engineering, 2024, 58: 104821.
- [60] LIU X, WU J, YANG S, *etc.* Carboxy-functionalized covalent organic framework as a carrier for lipase immobilization and its application in inhibitors screening [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023.
- [61] PARANDI E, SAFARIPOUR M, MOSLEH N, *etc.* Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil [J]. Biomass and Bioenergy, 2023, 173(1): 106794.
- [62] WANG J, YUE C, WANG G. Beef quality monitoring using immobilization lipase on modified polypropylene non-woven fabric based on time-temperature indicator [J]. Journal of Food Engineering, 2023, 357: 111586.
- [63] VILAS BôAS R N, DE CASTRO H F. A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(3): 725-742.
- [64] BADGUJAR K C, PAI P A, BHANAGE B M. Enhanced biocatalytic activity of immobilized *pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39(2): 211-221.
- [65] BRAULT G, SHARECK F, HURTUBISE Y, *etc.* Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. Coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase [J]. Public Library of Science ONE, 2014, 9(3): e91872.
- [66] CONG S, TIAN K, ZHANG X, *etc.* Synthesis of flavor esters by a novel lipase from *aspergillus niger* in a soybean-solvent system [J]. 3 Biotech, 2019, 9(6): 244.
- [67] JAISWAL K S, RATHOD V K. Process intensification of enzymatic synthesis of flavor esters: A review [J]. Chemical Record, 2022, 22(3): e202100213.
- [68] SINGH S, DEEPA N, RASTOGI D, *etc.* Biotransformation of ricinoleic acid to γ -decalactone using novel yeast strains and process optimization by applying taguchi model [J]. Journal of Biotechnology, 2023, 377: 34-42.
- [69] BRAGA A, GUERREIRO C, BELO I. Generation of flavors and fragrances through biotransformation and de novo synthesis [J]. Food and Bioprocess Technology, 2018, 11(12): 2217-2228.
- [70] BANSODE S R, RATHOD V K. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate under microwave irradiation [J]. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2018, 129: 71-76.
- [71] GUILLÉN M, BENAIGES M D, VALERO F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *rhizopus oryzae* lipase expressed in *pichia pastoris* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 65: 1-9.
- [72] CORRADINI M C C, COSTA B M, BRESSANI A P P, *etc.* Improvement of the enzymatic synthesis of ethyl valerate by esterification reaction in a solvent system [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2017, 47(1): 100-109.

- [73] BHAVSAR K V, YADAV G D. Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2019, 34(4): 288-293.
- [74] TÜR K M. Synthesis of isoamyl acetate using protein-coated microcrystals of different lipases [J]. Polish Journal of Chemical Technology, 2023, 25: 15-20.
- [75] DESHMUKH A R, RATHOD V K. Intensification of enzyme catalysed synthesis of hexyl acetate using sonication [J]. 2017, 6(1): 55-62.
- [76] DUARTE N G, DE QUEIROZ D S, VELOSO C D O, *etc.* Effects of acetic acid addition methods on butyl acetate enzymatic synthesis [J]. Chemical Engineering Communications, 2020, 207(2): 177-184.
- [77] SUN J, LEE L, LIU S. Biosynthesis of flavour-active esters via lipase-mediated reactions and mechanisms [J]. Australian Journal of Chemistry, 2014, 67.
- [78] AZUDIN N Y, MASHITAH M D, ABD SHUKOR S R. Optimization of isoamyl acetate production in a solvent-free system [J]. Journal of Food Quality, 2013, 36(6): 441-446.
- [79] GÜVENÇ A, KAPUCU N, KAPUCU H, *etc.* Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology [J]. Enzyme Microb Technol, 2007, 40(4): 778-785.
- [80] GÜVENÇ A, KAPUCU N, BAYRAKTAR E, *etc.* Optimization of the enzymatic production of isoamyl acetate with novozym 435 from *candida antarctica* [J]. Chemical Engineering Communications, 2003, 190(5-8): 948-961.
- [81] BEN SALAH R, GHAMGHUI H, MILED N, *etc.* Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *rhizopus oryzae* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(4): 368-372.
- [82] DE MENESES A C, LERIN L A, ARAÚJO P H H, *etc.* Benzyl propionate synthesis by fed-batch esterification using commercial immobilized and lyophilized Cal B lipase [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(10): 1625-1634.
- [83] RAGHAVENDRA T, SAYANIA D, MADAMWAR D. Synthesis of the ‘green apple ester’ ethyl valerate in organic solvents by *candida rugosa* lipase immobilized in mbgs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 63(1): 31-38.
- [84] ZHANG C, LIANG X, ABDO A A A, *etc.* Ultrasound-assisted lipase-catalyzed synthesis of ethyl acetate: Process optimization and kinetic study [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2021, 35(1): 247-255.
- [85] GRAEBIN N G, MARTINS A B, LORENZONI A S G, *etc.* Immobilization of lipase b from *candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis [J]. Biotechnol Progress, 2012, 28(2): 406-412.
- [86] CORRADINI M C, COSTA B M, BRESSANI A P, *etc.* Improvement of the enzymatic synthesis of ethyl valerate by esterification reaction in a solvent system [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2017, 47(1): 100-109.
- [87] KAUR M, MEHTA A, GUPTA R. Synthesis of methyl butyrate catalyzed by lipase from *aspergillus fumigatus* [J] Journal of Oleo Science, 2019, 68(10): 989-993.
- [88] 蒋平平, 李晓婷, 冷炎, 等. 离子液体制备及其化工应用进展 [J]. 化工进展, 2014, 33(11): 2815-2828.
- [89] ALVAREZ E, RODRÍGUEZ J, VILLA R, *etc.* Clean enzymatic production of flavor esters in spongelike ionic liquids [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(15):13307 – 13314.
- [90] KIRDI R, BEN AKACHA N, MESSAOUDI Y, *etc.* Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(4): 413-422.

- [91] CVJETKO M, VORKAPIĆ-FURAČ J, ŽNIDARŠIČ-PLAZL P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(9): 1344-1350.
- [92] FEHÉR E, MAJOR B, BÉLAFI-BAKÓ K, *etc.* Semi-continuous enzymatic production and membrane assisted separation of isoamyl acetate in alcohol - ionic liquid biphasic system [J]. Desalination, 2009, 241(1): 8-13.
- [93] 周建国, 陈培丽, 李海明. 超临界流体技术在绿色化学化工中的应用 [J]. 天津化工, 2010, 24(01): 5-8.
- [94] KOBATA K, KOBAYASHI M, KINPARA S, *etc.* Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(18): 1575-1578.
- [95] DIAS A L B, HATAMI T, MARTÍNEZ J, *etc.* Biocatalytic production of isoamyl acetate from fusel oil in supercritical co₂ [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2020, 164: 104917.
- [96] DIAS A L B, UBEYITOGULLARI A, HATAMI T, *etc.* Continuous production of isoamyl acetate from fusel oil under supercritical CO₂: A mass transfer approach [J]. Chemical Engineering Research and Design, 2021, 176: 23-33.
- [97] ROMERO M D, CALVO L, ALBA C, *etc.* Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *candida antarctica* lipase in n-hexane [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(1): 42-48.
- [98] JAVED S, AZEEM F, HUSSAIN S, *etc.* Bacterial lipases: A review on purification and characterization [J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2018, 132: 23-34.
- [99] DONG Z, JIN J, WEI W, *etc.* Hyperactivation of lipase by oil-water interface in interfacial immobilization on hierarchical porous hollow silica microsphere: Dynamics, mechanism and application [J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103706.
- [100] Sá A G A, DE MENESES A C, LERIN L A, *etc.* Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(5): 585-591.
- [101] MARTINS A B, DA SILVA A M, SCHEIN M F, *etc.* Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 105: 18-25.
- [102] HE S, SONG D, CHEN M, *etc.* Immobilization of lipases on magnetic collagen fibers and its applications for short-chain ester synthesis [J] 2017, 7(6): 178.
- [103] SUO H, GENG H, ZHANG L, *etc.* Covalent immobilization of lipase on an ionic liquid-functionalized magnetic cu-based metal-organic framework with boosted catalytic performance in flavor ester synthesis [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2023, 11(6): 1302-1311.
- [104] SHI Y, ZHOU H, DAI L, *etc.* Preparation of ordered macroporous ZIF-8-derived magnetic carbon materials and its application for lipase immobilization [J] 2024, 14(1): 55.
- [105] KAUR P, JANA A K. Amino functionalization of magnetic multiwalled carbon nanotubes with flexible hydrophobic spacer for immobilization of *candida rugosa* lipase and application in biocatalytic production of fruit flavour esters ethyl butyrate and butyl butyrate [J]. Applied Nanoscience, 2023, 13(6): 4291-4311.
- [106] CAI X, ZHANG M, WEI W, *etc.* The immobilization of *candida antarctica* lipase b by ZIF-8 encapsulation and macroporous resin adsorption: Preparation and characterizations [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(2): 269-276.

- [107] SIAR E-H, ARANA-PEÑA S, BARBOSA O, *etc.* Solid phase chemical modification of agarose glyoxyl-ficin: Improving activity and stability properties by amination and modification with glutaraldehyde [J]. Process Biochemistry, 2018, 73: 109-116.
- [108] CARBALLARES D, FERNANDEZ-LAFUENTE R, ROCHA-MARTIN J. Immobilization-stabilization of the dimeric d-amino acid oxidase from porcine kidney [J]. Process Biochemistry, 2022, 122: 120-128.
- [109] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进 [J]. 化学与生物工程, 2007, (08): 72-75.
- [110] 陈茂霞, 周后珍, 朱晓华, 等. 考马斯亮蓝法检测活性污泥中蛋白质含量优化 [J]. 环境科学与技术, 2015, 38(04): 1-5.
- [111] 陈尚文, 邓乾春, 周彬, 等. 蛋白酶的固定化及其在食品工业中应用的研究进展 [J]. 食品科学, 2024: 1-17.
- [112] 吴茜茜, 穆文侠, 孙健, 等. 大孔树脂 d101 固定中性脂肪酶及其生物催化应用 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(8): 4.
- [113] 水龙龙, 操丽丽, 庞敏, 等. 大孔树脂固定化磷脂酶 A1 及其用于菜籽油脱胶工艺的优化 [J]. 食品科学, 2018, 39(04): 241-247.
- [114] 戈钧. 脂肪酶纳米凝胶及其非水相催化合成有机化学品的研究 [D]. 北京: 清华大学, 2011.
- [115] DE OLIVEIRA U M F, LIMA DE MATOS L J B, DE SOUZA M C M, *etc.* Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *rhizomucor miehei* lipase [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(1): 597-608.
- [116] MONTEIRO R R C, NETO D M A, FECHINE P B A, *etc.* Ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipases a and b from *candida antarctica* immobilized onto magnetic nanoparticles. Improvement of biocatalysts' performance under ultrasonic irradiation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22):5807.
- [117] SOUZA M, SANTOS K, FREIRE R, *etc.* Production of flavor esters catalyzed by lipase b from *candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2017, 34: 681-690.
- [118] KOUTEU P A N, BLIN J, BARÉA B, *etc.* Solvent-free biodiesel production catalyzed by crude lipase powder from seeds: Effects of alcohol polarity, glycerol, and thermodynamic water activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8683-8690.
- [119] 何汉平 杨立荣, 朱自强. 在有机相酶催化反应中用盐/盐水合物控制水活度 [J]. 有机化学, 2001, 21(5): 376-379.
- [120] KREINER M, PARKER M C, MOORE B D. Enzyme-coated micro-crystals: A 1-step method for high activity biocatalyst preparation [J]. Chemical Communications, 2001, (12): 1096-1097.
- [121] GAO J, YIN L, FENG K, *etc.* Lipase immobilization through the combination of bioimprinting and cross-linked protein-coated microcrystal technology for biodiesel production [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2016, 55(42): 11037-11043.
- [122] HUANG S, LI X, XU L, *etc.* Protein-coated microcrystals from *candida rugosa* lipase: Its immobilization, characterization, and application in resolution of racemic ibuprofen [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(1): 36-47.
- [123] XU X, DU C, REN Z, *etc.* Conformational change and activity enhancement of rabbit muscle lactate dehydrogenase induced by polyethyleneimine [J]. American Chemical Society Omega, 2021, 6(16): 10859-10865.
- [124] WU S, ZHANG P, SUN B, *etc.* Polyethyleneimine-mof composite as a support for immobilization of lipase with enhanced activity in kinetic resolution [J]. Applied Catalysis A: General, 2023, 661: 119232.

- [125] ARGAMAN O, BEN-BARAK ZELAS Z, FISHMAN A, *etc.* Immobilization of aldehyde dehydrogenase on montmorillonite using polyethyleneimine as a stabilization and bridging agent [J]. Applied Clay Science, 2021, 212: 106216.
- [126] PENCREAC'H G, BARATTI J C. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media [J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 18(6): 417-422.
- [127] 马丽, 魏佳奥, 周丽亚, 等. 蛋白包覆微晶固定化脂肪酶的制备及催化合成生物柴油的研究 [J]. 河北工业大学学报, 2016, 45(04): 37-44.
- [128] TENG L, YUE C, ZHANG G. Epoxied SiO₂ nanoparticles and polyethyleneimine (pei) coated polyvinylidene fluoride (pvdf) membrane for improved oil water separation, anti-fouling, dye and heavy metal ions removal capabilities [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2023, 630: 416-429.
- [129] 刘艳红, 李静, 王娜, 等. 聚乙烯亚胺负载基因和蛋白质共递送实验 [J]. 实验室研究与探索, 2022, 41(09): 45-49.
- [130] MONTEIRO R R C, DOS SANTOS J C S, ALCÁNTARA A R, *etc.* Enzyme-coated micro-crystals: An almost forgotten but very simple and elegant immobilization strategy [J] 2020, 10(8):891
- [131] WANG X, ZHANG X, ZHANG J, *etc.* Genetic and bioprocess engineering for the selective and high-level production of geranyl acetate in *escherichia coli* [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10(9): 2881-2889.
- [132] REMONATTO D, FANTATTO R R, PIETRO R C L R, *etc.* Enzymatic synthesis of geranyl acetate in batch and fed-batch reactors and evaluation of its larvicidal activity against *rhinipicephalus (boophilus) microplus* [J]. Process Biochemistry, 2022, 120: 287-300.
- [133] PATEL V, SHAH C, DESHPANDE M, *etc.* Zinc oxide nanoparticles supported lipase immobilization for biotransformation in organic solvents: A facile synthesis of geranyl acetate, effect of operative variables and kinetic study [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(8): 1630-1651.
- [134] ZHAI Y, CONG F, YUAN M, *etc.* Melia azedarach leaf powder stabilizing *pseudomonas fluorescens* lipase to catalyze synthesis of geranyl acetate [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 37: 102170.
- [135] 王璐. 非水相体系中褶皱假丝酵母脂肪酶催化合成丁酸香叶酯的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [136] ROSA B H, SILVA G S, CONCEIÇÃO G J A, *etc.* Application of partially concentrated *candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 12: 90-95.
- [137] BARROS M, FLEURI L, MACEDO G. Seed lipases: Sources, applications and properties - a review [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering - BRAZ J CHEM ENG, 2010, 27.
- [138] FAN X, ZHANG P, TENG S, *etc.* Recent research on lipase immobilization with multipoint covalent treatment by glutaraldehyde [J]. Current Organic Chemistry, 2023, 27(4): 248-259.
- [139] SU E-Z, ZHOU Y, YOU P-Y, *etc.* Lipases in the castor bean seed of chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization [J]. Journal of Shanghai University (English Edition), 2010, 14(2): 137-144.
- [140] ENUJUGHA V N, THANI F A, SANNNI T M, *etc.* Lipase activity in dormant seeds of the african oil bean (*pentaclethra macrophylla benth*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 405-410.
- [1401] NANSSOU KOUTEU P A, BARÉA B, BAROUH N, *etc.* Lipase activity of tropical oilseed plants for ethyl biodiesel synthesis and their typo- and regioselectivity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(46): 8838-8847.

-
- [142] ABIGOR R D, UADIA P O, FOGLIA T A, *etc.* Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *jatropha curcas l* [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79(11): 1123-1126.
- [143] EASTMOND P J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(44): 45540-45545.
- [144] XU Y Q, MINHAZUL K A H M, LI X T. The occurrence, enzymatic production, and application of ethyl butanoate, an important flavor constituent [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2020, 35(6): 601-615.
- [145] MOUSSAVOU MOUNGUENGUI R W, BRUNSCHWIG C, BARÉA B, *etc.* Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? [J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2013, 39(5): 441-456.
- [146] LIU Z, YU D, LI L, *etc.* Three-phase partitioning for the extraction and purification of polysaccharides from the immunomodulatory medicinal mushroom *inonotus obliquus* [J]. Molecules, 2019, 24(3):403.
- [147] SAGU S T, NSO E J, HOMANN T, *etc.* Extraction and purification of beta-amylase from stems of *abrus precatorius* by three phase partitioning [J]. Food Chemistry, 2015, 183: 144-153.
- [148] CHAUHAN V, KAUSHAL D, DHIMAN V K, *etc.* An insight in developing carrier-free immobilized enzymes [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 2(10): 794411.
- [149] BOUGUERRA O M, WAHAB R A, HUYOP F, *etc.* An overview of crosslinked enzyme aggregates: Concept of development and trends of applications [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024.

攻读学位期间发表的学术论文目录

- [1] 魏胜华, 程瑶纳, 高碧云, 等. 凝胶涂层包覆大孔树脂固定化脂肪酶的制备及在风味酯合成中的应用 [J]. 食品与发酵工业 (已接收).
- [2] Purification and immobilization of lipase from *xanthoceras sorbifolium bunge* seeds and its application in synthesis of butyl acetate and geranyl acetate[J]. Bioresource Technology (in submission)

致谢

首先,非常感谢魏老师这三年来对我的指导和照顾。无论是学业还是生活,魏老师都给予了我莫大的关心,也正是因为如此,我在这三年收获了很多。在能力培养和人生观的塑造方面,我有了很大的进步。

其次我也非常感谢我的父母,正是他们,我才能够没有后顾之忧地读研,不用操心经济上的问题。尽管我有时候很叛逆,我们也曾闹过矛盾,但随着年龄的增长,我也渐渐意识到了父母的不易,他们已经在能力范围内给了我最好的,所以我非常感谢父母这些年来对我的付出。

我也想感谢我的师兄和师妹们,在我的读研生活中,正是有了你们的帮助,我的课题才能够顺利地进行下去,并且在生活中也给了我很多关心。感谢我的朋友叶景、韩孟秀、黄茜琳、崔婷、徐光林,在我遭遇挫折的时候,给予我关心和帮助。我们共同度过了许多难忘的时光,在探讨学术问题、交流研究心得的过程中,我们相互启发、共同进步。正是你们的陪伴和支持让我在研究的道路上不再孤单。在研究过程中,我也遇到了不少挑战和困难。有时实验数据不尽如人意,有时研究思路陷入困境。但正是这些挑战让我学会了如何面对困难、克服困难。

再次感谢所有给予我帮助和支持的人。你们是我人生道路上的重要伙伴,也是我学术生涯中的宝贵财富。我会将这份感激之情铭记于心,继续前行。