

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2022.21.017

# 新型生物催化剂催化合成植物甾醇酯工艺优化

刘鑫龙, 王立晖\*

(天津现代职业技术学院 生物工程学院, 天津 300350)

**摘要:** 以具有3D开放孔隙特征的介孔有机硅球为载体构建新型生物催化剂,并用于催化合成植物甾醇酯。采用单因素试验,考察底物类型、底物浓度、酶用量、温度和反应时间5个因素对植物甾醇转化率的影响。通过响应面分析法确定植物甾醇酯的最佳合成条件,当棕榈酸(27.5 mmol/L)作为底物、酶用量21.4 U、反应温度47.2℃、反应时间11.4 h时,植物甾醇获得最大转化率为(96.8±0.7)%。此外,催化剂重复使用10次后,甾醇转化率为97.11%,表明该催化剂具有良好的稳定性。

**关键词:** 介孔有机硅球;3D开放孔道;植物甾醇酯;皱褶假丝酵母脂肪酶;响应面法

## Process Optimization for the Synthesis of Phytosterol Esters Catalyzed by A Novel Biocatalyst

LIU Xin-long, WANG Li-hui\*

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

**Abstract:** A novel biocatalyst was constructed with mesoporous organosilica spheres (with 3D open channels) as support and used for the synthesis of phytosterol esters. The effects of substrate type, substrate concentration, enzyme dosage, reaction temperature, and reaction time on the conversion of phytosterol were investigated by single factor tests. The synthesis conditions of phytosterol esters were optimized by response surface methodology. The highest conversion of phytosterols was (96.8±0.7)% in the case of 27.5 mmol/L palmitic acid as substrate, enzyme dosage of 21.4 U, the reaction temperature at 47.2 °C and the reaction time of 11.4 h. In addition, the sterol conversion rate was 97.11% after the biocatalyst was reused for 10 times, which demonstrated that the biocatalyst owned good stability.

**Key words:** mesoporous organosilica spheres; 3D open channels; phytosterol esters; *Candida rugosa* lipase; response surface methodology

引文格式:

刘鑫龙,王立晖.新型生物催化剂催化合成植物甾醇酯工艺优化[J].食品研究与开发,2022,43(21):131-137.

LIU Xinlong, WANG Lihui. Process Optimization for the Synthesis of Phytosterol Esters Catalyzed by A Novel Biocatalyst[J]. Food Research and Development, 2022, 43(21): 131-137.

心脑血管疾病威胁人类身体健康,而高胆固醇水平和高低密度脂蛋白胆固醇则是引发心血管疾病的最危险因素<sup>[1]</sup>。植物甾醇酯被认为是“降低血脂、预防动脉硬化”的天然食品新原料,是国际营养学会推荐的未来十大功能性营养成分之一<sup>[2]</sup>。

目前植物甾醇酯的合成方法可分为化学合成法和生物酶法两种。化学合成法多采用酸或碱性物质作为催化剂,合成工艺条件简单、易于操作。但是该方法副产物多、产物分离提纯困难、废液多、环境污染严重<sup>[1,3]</sup>。与此相反,生物酶法采用脂肪酶作为催化剂,其工艺

基金项目:天津市科技计划项目(20YDTPJC01580)

作者简介:刘鑫龙(1988—),男(满),讲师,硕士,研究方向:生物工程。

\*通信作者:王立晖(1981—),男(汉),教授,博士,研究方向:食品工程。

不仅反应条件温和、能耗低、副产物少,而且无溶剂污染<sup>[4]</sup>。但是受限于游离脂肪酶稳定性差和易团聚等缺点,甾醇酯产率普遍较低,且无法回收再利用,导致生产成本高<sup>[9]</sup>。利用载体固定化酶是解决该问题的有效方法,该方法操控过程简单、条件温和、酶活回收率高、催化剂稳定性好且极易与反应体系分离,简化了提纯工艺,有利于产品收率和质量的提升<sup>[6-7]</sup>。Zheng等<sup>[8]</sup>利用二氧化硅固定化脂肪酶并用于合成植物甾醇酯,当反应条件为植物甾醇 100 μmol/mL、醇酸摩尔比1:2、反应温度 55 °C、反应时间 24 h 时植物甾醇转化率为 95.3%。固定化酶重复使用 7 次后,仅保留 78.6%的初始活性,说明该固定化酶稳定性仍较差,尚有改进空间。

针对上述问题,采用 Winsor III 微乳液双连续相体系构建一种具有分级孔剖面的介孔有机二氧化硅材料作为固定化酶的载体,受益于其内部数量众多的多级孔隙结构形成的高比表面积和强吸附能力,非常适合吸附各种分子物质,促进分子扩散<sup>[6,9]</sup>。本文以介孔有机硅球为载体,通过吸附法固定化皱褶假丝酵母脂肪酶并用于植物甾醇酯的合成。利用单因素法和响应面法探究催化剂的性能和底物类型、底物浓度、酶用量等条件对合成反应的影响,并筛选获得最佳合成条件,为植物甾醇酯的扩大生产提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

皱褶假丝酵母脂肪酶(15 U/mg):杭州创科生物科技有限公司;植物甾醇(β-谷甾醇 73.96%、菜籽甾醇 17%、豆甾醇 5%、菜油甾醇 1%、甾醇总量 95.19%):西安蓝天生物工程有限公司;油酸、亚油酸、亚麻酸、硬脂酸、棕榈酸(均为分析纯):天津市大茂化学试剂厂;乙醇、异辛烷、磷酸一氢钠、磷酸二氢钾(均为分析纯):百灵威科技有限公司;4-硝基苯基棕榈酸酯、三乙醇胺、正硅酸乙酯、1,2-二(三乙氧基硅基)乙烷(均为分析纯):天津市风船化学试剂科技有限公司;十六烷基三甲基氯化铵(分析纯):上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

水浴恒温振荡器(SHA-C):金坛市城西崢嵘试验仪器厂;集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S):河南予华仪器有限公司;电热鼓风干燥箱(DHG-9203A):上海一恒科学仪器有限公司;台式高速离心机(TG18G):盐城凯特试验仪器有限公司;气相色谱仪(SP-1000):北京北分瑞利(集团)色谱仪器中心;透射电子显微镜

(Tecnai G2):美国 FEI 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 介孔有机硅球和生物催化剂的制备

利用三乙醇胺作为碱源,通过硅前驱体的水解制备具有三维缠绕特征的介孔有机硅球,具体过程如下。首先将 13 mL 去离子水与 1.0 mL 95%乙醇混合,再加入 2.0 mL 25%十六烷基三甲基氯化铵水溶液和 0.9 mL 三乙醇胺,并于室温 25 °C 下搅拌 30 min,然后加入 1.5 mL 正硅酸乙酯和 1,2-二(三乙氧基硅基)乙烷的混合液。搅拌均匀后将混合物置于 60 °C 的电热鼓风干燥箱中恒温静置 2 h。向上述混合物中加入 10 mL 乙醇,搅拌均匀后离心(5 000 r/min)3 min,获得不透明的沉淀,即为三维缠绕的介孔有机硅球(mesoporous organosilica spheres, MOSs)。

生物催化剂的制备:称取 15 mg 介孔有机硅球 MOSs 于 10 mL 离心管中,加入一定量的皱褶假丝酵母脂肪酶溶液(*Candida rugosa* lipase, CRL),并补充 pH7.0 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)至 5 mL,室温 25 °C 下置于摇床中振荡(170 r/min),2.5 h 后离心分离,利用 PBS 洗涤 3 次,冷冻干燥获得固定化酶 CRL@MOSs。在水解 4-硝基苯基棕榈酸酯的试验中测定 CRL@MOSs 的活力为 4 000 U/g(每分钟生成 1 nmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 U)<sup>[10-11]</sup>。

#### 1.3.2 植物甾醇酯的合成

植物甾醇酯的合成与检测:由于植物甾醇的溶解性较差,在耐压瓶中预先以异辛烷为溶剂配制 10 mmol/L 的植物甾醇溶液,并恒温(55 °C)保存备用<sup>[12]</sup>。取 2 mL 的植物甾醇溶液,加入 100 μL 的蒸馏水和双倍摩尔量的脂肪酸,于 55 °C 水浴锅中加热 5 min 形成均相溶液。向其中加入 10 U CRL@MOSs 后将混合物置于 35 °C 的水浴恒温振荡器(120 r/min)中开始合成反应。每隔一段反应时间取 10 μL 样品通过气相色谱分析计算植物甾醇的转化率<sup>[13]</sup>。每个样品检测 3 次。转化率计算公式如下。

$$\text{转化率}/\% = \frac{B}{B+1.63A} \times 100$$

式中:A 为植物甾醇峰面积总和;B 为植物甾醇酯峰面积总和;1.63 为植物甾醇酯分子质量均值与植物甾醇分子质量均值的比值。

气相色谱条件:毛细管柱长 30 m,内径 0.25 mm。程序升温:初始温度为 160 °C 并保持 2 min,然后以速率 15.0 °C/min 升温到 220 °C 保持 1 min。以 8 °C/min 从 220 °C 升温到 260 °C,并保持 10 min。进样器温度 240 °C,检测室温度 280 °C,尾气气速 20 mL/min,进样

量 0.4  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3.3 植物甾醇酯的合成过程优化

#### 1.3.3.1 单因素试验优化

为了获得植物甾醇酯的最大产率,首先利用单因素试验分析在异辛烷/水两相条件下底物类型(油酸、亚油酸、硬脂酸、棕榈酸)、反应温度(30、35、40、45、50、55  $^{\circ}\text{C}$ )、酶用量(5、10、15、20、25、30 U)、底物浓度(5、10、20、30、40、50 mmol/L)和反应时间(6、8、10、12、14 h)对植物甾醇转化率的影响并以植物甾醇转化率作为评价指标,确定各因素的最适取值区间用于响应面试验优化<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.3.2 响应面试验优化

根据单因素试验分析结果,选择酶用量(10 U~30 U)、底物浓度(10 mmol/L~50 mmol/L)、反应温度(35  $^{\circ}\text{C}$ ~55  $^{\circ}\text{C}$ )、反应时间(6 h~14 h)为自变量,植物甾醇转化率为响应变量,采用响应面分析法的中心组合设计法(central complex design, CCD),利用软件 Design Expert 8.0.6 设计四因素五水平试验,因素及水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface experimental factors and levels

水平	因素			
	A 底物浓度/ (mmol/L)	B 酶用量/U	C 反应 温度/ $^{\circ}\text{C}$	D 反应 时间/h
-2	10	10	35	6
-1	20	15	40	8
0	30	20	45	10
1	40	25	50	12
2	50	30	55	14

#### 1.3.4 CRL@MOSs 的重复使用性分析

每轮反应结束后,离心分离 CRL@MOSs(4 000 r/min、5 min),并用乙醇快速洗涤 3 次去除残留底物,静置干燥 0.5 h。完成催化剂的再生后,重复上述反应步骤开展下一轮催化反应。

### 1.4 数据处理

选用 Desgin-Expert 8.0.6 和 Origin 2017 软件进行数据处理与分析作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MOSs 的表征

MOSs 的透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)图见图 1。

由图 1 所示, MOSs 的 TEM 图像展示了三维缠绕的不规则介孔有机硅球的形态,该材料枝杈众多且彼

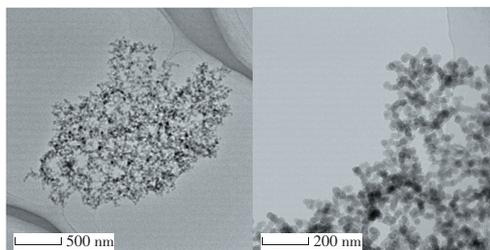


图 1 MOSs 的 TEM 图

Fig.1 TEM image of MOSs

此交织成三维网络,形成了丰富的开放孔道。单一 MOSs 直径约 1.5  $\mu\text{m}$ ,其中每一个枝杈的直径约 28.73 nm,长径比为 3:1~2:1。

### 2.2 植物甾醇酯合成工艺单因素试验

#### 2.2.1 底物类型对植物甾醇转化率的影响

底物类型对植物甾醇转化率的影响见图 2。

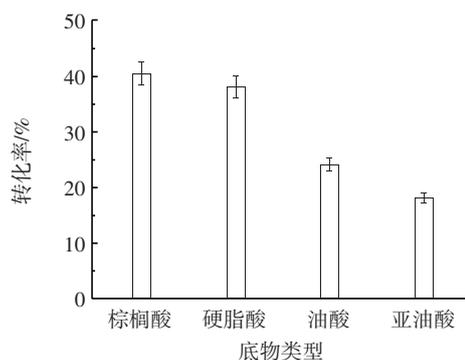


图 2 底物类型对植物甾醇转化率的影响

Fig.2 The effect of type of substrate on the conversion of phytosterol

由图 2 可知,以棕榈酸为底物时的植物甾醇转化率最高,随着底物碳链长度和不饱和度的增加,转化率逐渐降低,可能是不同脂肪酸三维结构的差异导致。棕榈酸和硬脂酸的直链分别由 16 个和 18 个碳原子组成,而油酸和亚油酸分子是不饱和的 18 碳酸,由于其结构中的不同位置存在不同数量的双键而发生不同程度地折叠,导致其更加难以接近酶的催化中心<sup>[15]</sup>。此外,碳链较长和不饱和度更高的脂肪酸在扩散过程中会遇到更大的空间位阻,这也是造成转化率较低的原因之一<sup>[12]</sup>。综上,选用棕榈酸作为底物,展开后续优化工作。

#### 2.2.2 底物浓度对植物甾醇转化率的影响

底物浓度对植物甾醇转化率的影响见图 3。

由图 3 可知,底物浓度为 5 mmol/L~30 mmol/L 时,酯化反应速度迅速提升,植物甾醇转化率呈现快速增长趋势;当底物浓度超过 30 mmol/L 时,反应速度和甾醇转化率均开始降低。这是因为在双底物酯化反应中,

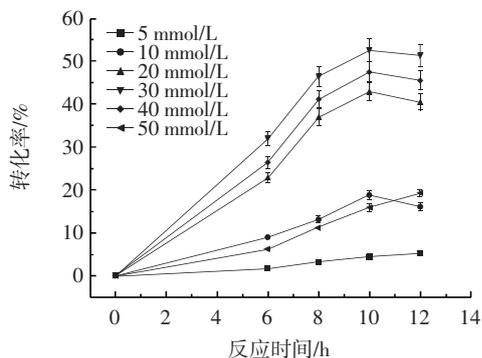


图3 底物浓度对植物甾醇转化率的影响

Fig.3 The effect of substrate concentration on the conversion of phytosterol

过量的底物(棕榈酸)有利于植物甾醇酯的合成,但也会导致反应体系黏度增大,抑制底物分子扩散,导致植物甾醇转化率降低。综合考虑生产成本和反应效率,选择 30 mmol/L 作为后续反应的底物浓度。

### 2.2.3 酶用量对植物甾醇转化率的影响

酶用量对植物甾醇转化率的影响见图 4。

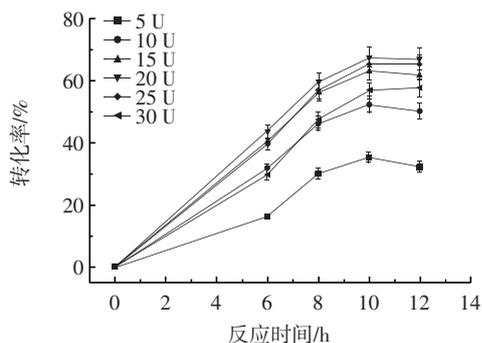


图4 酶用量对植物甾醇转化率的影响

Fig.4 The effect of enzyme dosage on the conversion of phytosterol

由图 4 可知,随着酶用量的增加(5 U~20 U),植物甾醇转化率也迅速上升。脂肪酶作为催化剂,可以明显提高反应速度;增加酶用量可以提高单位反应时间内的底物转化率。然而,继续增加酶用量,却会导致转化率降低。这是因为 CRL@MOSs 具有非常丰富的孔道结构,因此能够持续吸附大量底物分子堆积于颗粒内部,明显增大自由扩散阻力和与酶活性中心结合的难度,而且该现象随着 CRL@MOSs 用量的增加而加强。因此,选择 20 U 作为后续反应的酶用量。

### 2.2.4 反应温度和反应时间对植物甾醇转化率的影响

反应温度和反应时间对植物甾醇转化率的影响见图 5。

由图 5 可知,同一温度转化率整体呈上升的趋势。随着温度的升高(30 ℃~45 ℃),植物甾醇转化率逐渐增加;在 45 ℃(反应时间 12 h)时,转化率达到最大值

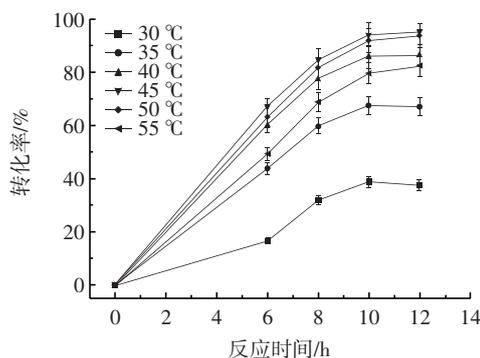


图5 反应温度和反应时间对植物甾醇转化率的影响

Fig.5 The effect of reaction temperature and reaction time on the conversion of phytosterol

94.89%;此后继续提高温度,转化率开始下降,而且温度越高,转化率下降越明显。这是因为低温环境不利于底物分子扩散及与酶活性中心的结合,进而限制酶活性;而升高反应温度,不仅能释放生物酶的催化性能还能提高底物溶解度和促进分子扩散,但是太高的温度会促使酶空间结构变化,严重时导致酶蛋白变性失活。因此,选择 45 ℃为最佳反应温度。

图 5 同样描述了 45 ℃条件下植物甾醇酯合成的进程曲线。随着反应时间的推移,植物甾醇转化率逐渐提高。酯化反应时间为 10 h 时,植物甾醇转化率达到 94.28%;继续反应 2 h,转化率(95.39%)增长不明显。考虑成本因素,选择 10 h 作为后续工艺优化的反应时间。

### 2.3 植物甾醇酯合成条件的响应面优化

响应面试验优化结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Response surface experimental scheme and results

序号	A 底物浓度/ (mmol/L)	B 酶用量/ U	C 反应 温度/℃	D 反应 时间/min	转化率/%
1	30	20	45	10	95.4
2	30	20	45	10	93.2
3	30	20	45	10	94.5
4	30	20	35	10	68.8
5	30	10	45	10	77.3
6	20	15	50	12	87.6
7	40	15	40	12	72.7
8	20	15	50	8	78.6
9	20	25	50	12	90.0
10	20	15	40	8	65.8
11	30	30	45	10	85.3
12	20	15	40	12	75.0
13	40	15	40	8	67.0
14	40	25	50	12	82.4
15	20	25	50	8	78.8

续表2 响应面试验方案及结果

Continue table 2 Response surface experimental scheme and results

序号	A 底物浓度/ (mmol/L)	B 酶用量/ U	C 反应 温度/°C	D 反应 时间/min	转化率/%
16	40	15	50	8	64.6
17	40	25	50	8	65.6
18	40	25	40	8	69.2
19	10	20	45	10	70.9
20	20	25	40	8	65.0
21	30	20	55	10	78.5
22	30	20	45	10	94.1
23	30	20	45	10	93.8
24	50	20	45	10	59.0
25	30	20	45	6	66.5
26	30	20	45	10	94.7
27	40	25	40	12	79.0
28	40	15	50	12	75.6
29	20	25	40	12	75.0
30	30	20	45	14	88.5

表3 回归模型及方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

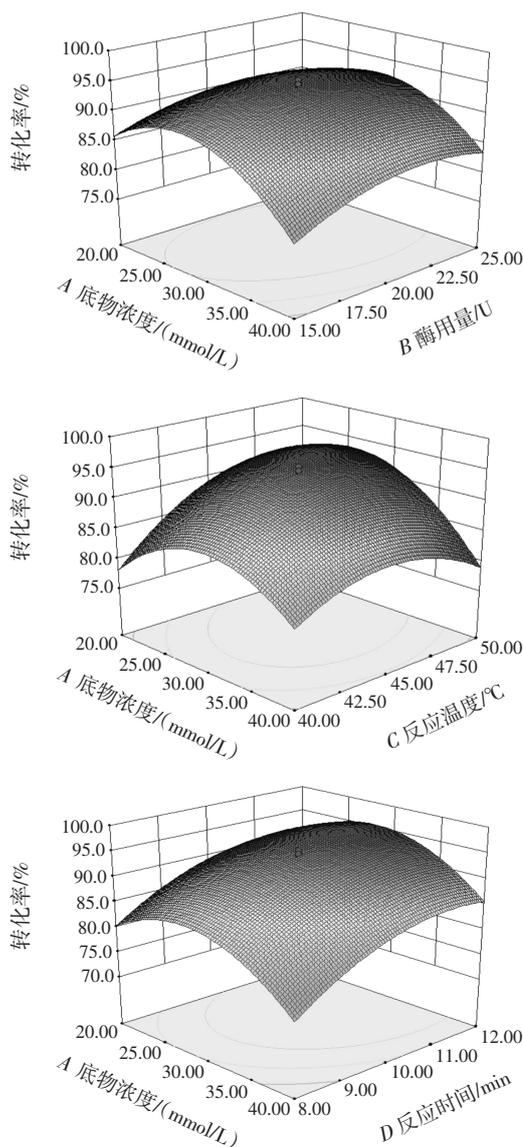
项目	平方和	自由度	F值	P值	显著性
模型	3 513.88	14	141.50	<0.000 1	**
A	495.49	1	279.34	<0.000 1	**
B	37.55	1	21.17	0.000 3	**
C	677.49	1	381.94	<0.000 1	**
D	122.27	1	68.93	<0.000 1	**
AB	13.21	1	7.45	0.015 5	*
AC	181.58	1	102.36	<0.000 1	**
AD	0.96	1	0.54	0.473 2	
BC	0.46	1	0.26	0.619 7	
BD	10.43	1	5.88	0.028 4	*
CD	11.16	1	6.29	0.024 1	*
A <sup>2</sup>	1 467.15	1	827.12	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	285.48	1	160.94	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	722.87	1	407.52	<0.000 1	**
D <sup>2</sup>	477.22	1	269.04	<0.000 1	**
残差	26.61	15			
失拟项	23.74	10	4.14	0.065 1	不显著
纯误差	2.87	5			

注:\*表示差异显著(P<0.05);\*\*表示差异极显著(P<0.01)。

由表2可知,甾醇最低转化率为59.0%,最大转化率为95.4%。利用3D响应面更细致地研究各因素水平对甾醇转化率的影响,构建多项式方程:转化率=611.683 58+6.670 16A+3.789 87B+20.147 62C+17.755D+0.018 175AB-0.067 375AC+0.012 25AD+0.006 75BC+0.080 75BD+0.083 5CD-0.073 137A<sup>2</sup>-0.129 05B<sup>2</sup>-0.205 35C<sup>2</sup>-1.042 79D<sup>2</sup>。

由表3可知,模型P<0.000 1,失拟项P=0.065 1说明模型极显著,失拟项不显著,模型方程误差小,可以用于数据分析和结果预测<sup>[6]</sup>。底物浓度、酶用量、反应温度和反应时间的P值均小于0.01,表明对转化率均有极显著影响;此外,底物浓度和酶用量、底物浓度和反应温度、酶用量和反应时间、反应温度和反应时间的交互作用对转化率同样具有显著或极显著影响<sup>[6]</sup>。校正决定系数R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>数值为0.985 5,表明某产量98.55%的变异分布在方程的因子中;与相关系数R<sup>2</sup>(0.992 5)数值接近,表明产量的实测值与预测值之间具有较好的拟合度,该模型可用于预测植物甾醇的实际转化率<sup>[17]</sup>。Adeq-Precision为检测到的噪音信号的比率,其值通常大于4,本试验数值为36.669,进一步说明本模型能真实地反映试验结果<sup>[18]</sup>。

各因素交互作用及对植物甾醇转化率影响的响应面见图6。



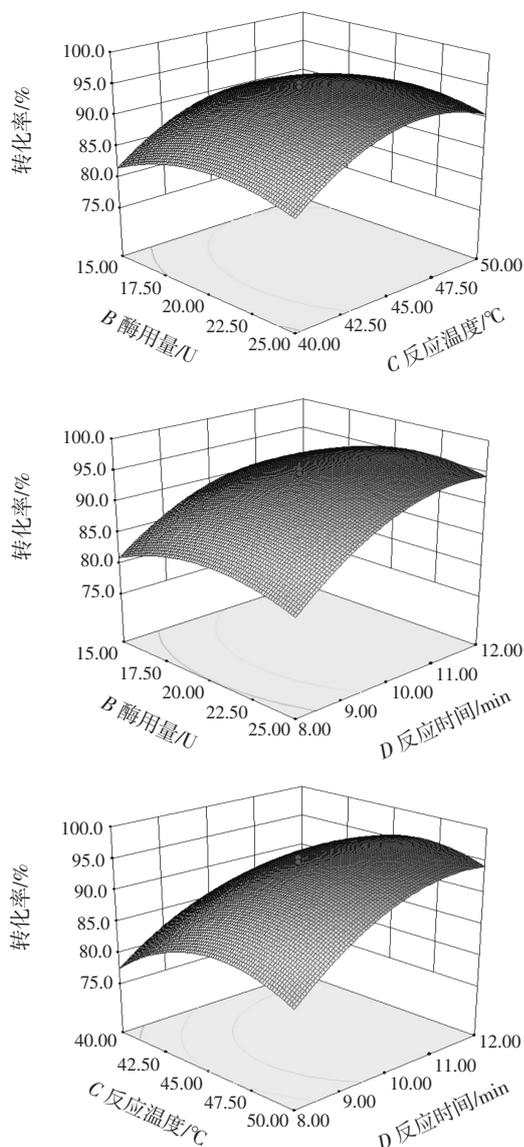


图6 各因素交互作用对植物甾醇转化率影响的响应面

Fig.6 Response surface plots showing effect of the interaction of various factors on phytosterol conversion efficiency

由图6可知,A(底物浓度)与B(酶用量)、A(底物浓度)与C(反应温度)、B(酶用量)与D(反应时间)、C(反应温度)与D(反应时间)的响应面较陡峭,形似“伞状”,说明因素间交互作用对植物甾醇转化率的影响显著,而A(底物浓度)与D(反应时间)、B(酶用量)与C(反应温度)的曲面较为平缓,说明交互作用不显著,这与表3方差分析的结果一致。

#### 2.4 优化工艺验证

响应面分析结果表明,植物甾醇酯最佳合成条件为以棕榈酸作为底物,底物浓度 27.47 mmol/L,酶用量 21.42 U,反应温度 47.226 °C,反应时间 11.393 h,此条件下多项式预测转化率为 97.346%。为了确定预测结果的可靠性,开展 3 次平行试验加以验证。考虑试验的

便利性,将反应条件调整为底物浓度 27.5 mmol/L、酶用量 21.4 U、反应温度 47.2 °C、反应时间 11.4 h,最终植物甾醇的实际转化率为(96.8±0.7)%,与预测结果接近。

#### 2.5 CRL@MOSs 的重复使用性

催化剂的重复使用性能是衡量催化剂应用价值的一个重要参数,性能优异的催化剂能有效降低工艺成本。CRL@MOSs 的重复使用性见图 7。

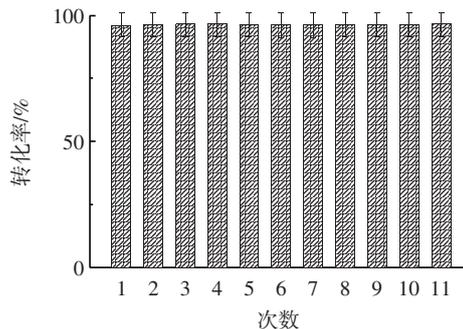


图7 CRL@MOSs 的重复使用性  
Fig.7 The reusability of CRL@MOSs

由图7可知,CRL@MOSs 第一次用作催化剂时,植物甾醇转化率为 97.16%;重复使用 10 次后,转化率为 97.11%,衰减并不明显。由此可见,CRL@MOSs 具有良好的重复使用性。

### 3 结论

本试验以介孔有机硅球作为载体,利用其 3D 开放孔隙特征吸附脂肪酶 CRL 构建性能优异的生物催化剂 CRL@MOSs,并用于催化合成植物甾醇酯。通过单因素试验分析不同碳链长度和饱和度的脂肪酸、底物浓度、酶用量、反应温度和反应时间对植物甾醇转化率的影响,确定最佳的底物类型等反应条件。借助响应面分析法,筛选并获得植物甾醇酯的最优合成条件:棕榈酸作为底物,底物浓度为 27.5 mmol/L、酶用量 21.4 U、反应温度 47.2 °C 和反应时间 11.4 h,植物甾醇的最大转化率为(96.8±0.7)%。同时,CRL@MOSs 在重复使用 10 次后,植物甾醇的转化率未见明显降低,为 97.11%,说明其具有优秀的稳定性。

#### 参考文献:

- [1] KIM B H, AKOHC C. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosterol esters of oleic acid by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 336-342.
- [2] LAGARDA M J, GARCÍA-LLATAS G, FARRÉ R. Analysis of phytosterols in foods[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(5): 1486-1496.

- [3] HE W S, JIA C S, MA Y, et al. Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67(1/2): 60-65.
- [4] HE Y J, LI J B, KODALI S, et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization[J]. *Biore-source Technology*, 2017, 224: 445-456.
- [5] MOLINA-GUTIÉRREZ M, HAKALIN N L S, RODRÍGUEZ-SANCHEZ L, et al. Green synthesis of  $\beta$ -sitostanol esters catalyzed by the versatile lipase/sterol esterase from *Ophiostoma piceae*[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1458-1465.
- [6] CHEN B Y, QIU J H, MO H D, et al. Synthesis of mesoporous silica with different pore sizes for cellulase immobilization: Pure physical adsorption[J]. *New Journal of Chemistry*, 2017, 41(17): 9338-9345.
- [7] RODRIGUES R C, VIRGEN-ORTÍZ J J, DOS SANTOS J C S, et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 746-770.
- [8] ZHENG M M, DONG L, LU Y, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 74(1/2): 16-23.
- [9] DOU J, ZENG H C. Integrated networks of mesoporous silica nanowires and their bifunctional catalysis-sorption application for oxidative desulfurization[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(2): 566-576.
- [10] ZHANG H X, LIU T S, ZHU Y W, et al. Lipases immobilized on the modified polyporous magnetic cellulose support as an efficient and recyclable catalyst for biodiesel production from yellow horn seed oil[J]. *Renewable Energy*, 2020, 145: 1246-1254.
- [11] KUMAR D, DAS T, GIRI B S, et al. Optimization of biodiesel synthesis from nonedible oil using immobilized bio-support catalysts in jacketed packed bed bioreactor by response surface methodology[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 244: 118700.
- [12] PANPIPAT W, XU X B, GUO Z. Improved acylation of phytosterols catalyzed by *Candida antarctica* lipase A with superior catalytic activity[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 70: 55-62.
- [13] KUMAR D, NAGAR S, BHUSHAN I, et al. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 87: 51-61.
- [14] BARBA CEDILLO V, PRIETO A, MARTÍNEZ M J. Potential of *Ophiostoma piceae* sterol esterase for biotechnologically relevant hydrolysis reactions[J]. *Bioengineered*, 2013, 4(4): 249-253.
- [15] HAKALIN N L S, MOLINA-GUTIÉRREZ M, PRIETO A, et al. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of  $\beta$ -sitostanol esters by response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2018, 261: 139-148.
- [16] BABAKI M, YOUSEFI M, HABIBI Z, et al. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology[J]. *Renewable Energy*, 2017, 105: 465-472.
- [17] RAZACK S A, DURAIARASAN S. Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme[J]. *Waste Management*, 2016, 47: 98-104.
- [18] LIU L, HONG Y L, YE X, et al. Biodiesel production from microbial granules in sequencing batch reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 908-915.
- [19] MIAO M, LIU H L, JIANG B, et al. Enzyme-catalysed synthesis of plant steryl laurate in non-aqueous media using salt hydrate pairs and its characterisation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 452-461.
- [20] TENG W K, NGOH G C, YUSOFF R, et al. A review on the performance of glycerol carbonate production via catalytic transesterification: Effects of influencing parameters[J]. *Energy Conversion and Management*, 2014, 88: 484-497.

加工编辑:姚骏

收稿日期:2021-08-23