无溶剂体系中毕赤酵母表面展示 CALB 全细胞催化合成肉桂醇酯

徐晓敏，黄奎，韩双艳

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东省发酵与酶工程重点实验室，广东广州 510006）

摘要：利用表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B(Candida antarctica lipase B, CALB)的毕赤酵母细胞（Pp-CALB）为全细胞催化剂，以不同脂肪酸作为酰基供体，在无溶剂体系中和肉桂醇发生酯化反应合成肉桂醇酯。探究了 Pp-CALB 对于不同酰基供体的选择性，并且对反应温度、摇床转速、酶加量、底物摩尔比、酶的水活度和反应体系等一系列影响酶催化反应的因素进行了优化，建立了无溶剂体系中肉桂醇酯的酶法合成工艺。结果表明，在底物摩尔比为 2：1，摇床转速为 120 r/min，反应温度为 50 ℃的条件下，添加初始水活度为 0.53 的 Pp-CALB 0.05 g，反应 3h，肉桂醇的酯化率可达 81.34%，在最适反应条件下，使用 Pp-CALB 连续反应 8 次后，肉桂醇的酯化率仍然能达到 70.00%以上，具有较好的操作稳定性。

关键词：酵母表面展示；南极假丝酵母脂肪酶 B；全细胞催化剂；无溶剂；肉桂醇酯

文章篇号：1673-9078(2018)05-101-107 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.015

Synthesis of Cinnamic Alcohol Ester Catalyzed by *Candida Antarctica* Lipase B-Displaying *Pichia Pastoris* Whole-cells in Solvent-free System

XU Xiao-min, HUANG Kui, HAN Shuang-yan

(Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Cinnamic alcohol ester were synthesized with cinnamic alcohol in solvent-free system using *Candida antarctica* lipase B-displaying *Pichia pastoris* whole-cells as catalyst and fatty acids as acyl donors. The selectivity of Pp-CALB for acyl donors was investigated, and the reaction temperatures, agitation speeds, enzyme dosage, molar ratio of substrates, initial water activity of Pp-CALB and reaction system were optimized to establish enzymatic synthesis process of cinnamyl alcohol ester in solvent-free system . The optimal reaction conditions were as follows: reaction temperature was 50 ℃, molar ratio of acid to alcohol was 2:1, agitation speed was 120 r/min, initial water activity of Pp-CALB was 0.53, and enzyme loading was 0.05 g. The reaction conversion reached 81.34% under the optimal conditions sysnthsized for 3 h, which could still reach more than 70.00% after 10 cycles of continuous reaction with Pp-CALB, indicating the good operational stability.

Key words: yeast displaying; *Candida antarctica* lipase B; whole-cell biocatalyst; solvents-free system;cinnamic alcohol ester

肉桂醇具有类似风信子的令人愉快的香气，其脂肪酸酯也是非常重要的芳香类化合物，广泛应用于食品，日化以及医药行业[1]。目前，市面上的肉桂醇酯绝大部分是由化学方法合成[2~4]。化学方法在生产香精香料的过程中，常伴随着多种副产物的生成，大大影响了产物的品质，并且具有反应环境苛刻，对设备要求高，产物分离困难等缺点[5~7]。

收稿日期：2017-10-20

基金项目：广东省高新技术产业化-工业攻关项目，新型脂肪酶 RML 生产 OPO（2012B010300008）

作者简介：徐晓敏（1993-），女，硕士，研究方向：生物催化

通讯作者：韩双艳（1976-），女，博士，教授，研究方向：酵母表面展示蛋白、剑麻生物制浆

国际立法规定，“天然”风味物质只能通过物理过程（从天然产物提取）、酶促或微生物处理来制备[8]。酶法合成香料以其反应条件温和，产物纯度高，立体选择性好以及环境友好等特点，越来越受到人们的关注。为酶促合成香料反应找到适宜的生物催化剂，使该方法能大规模使用[9~13]具有广泛的经济效益。

用于催化反应的脂肪酶主要有游离和固定化两种形式[14~18]，在实际应用的过程中，游离酶存在分离困难，难以回收重复利用等问题，目前应用于肉桂醇酯合成的酶制剂主要为商业化的固定化脂肪酶，Novozyme435[19,20]。但其成本较高，因此发展廉价易得的新酶源显得迫在眉睫。

南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica*

lipaseB，CALB)是用途最为广泛的脂肪酶之一，具有很高的催化活性，以表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母为全细胞催化剂（Pp-CALB），不但具有固定化酶的优点，而且生产工艺简单[21,22]，能够有效降低生产成本。Han 等[23]利用 Flo1p 絮凝素将米黑根毛霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase，RML)展示在毕赤酵母表面，Huang 等[24]用其催化大豆油的醇解反应制备生物柴油，72 h 甲酯产率达到 83%。Su 等[25]利用凝集素将 CALB 展示在毕赤酵母表面，发现其水解活力要比酿酒酵母展示的 CALB 高 10 倍，接近商品酶 Novozyme 435，在有机相合成丙酸乙酯和乙酸乙酯，反应 9 h 底物摩尔转化率达到 95%以上。由于毕赤酵母能进行高密度发酵，与酿酒酵母相比，毕赤酵母展示 CALB 能够有效降低全细胞催化剂的生产成本。目前尚未有用毕赤酵母表面展示CALB全细胞催化剂催化合成肉桂醇酯的相关报道。本研究基于毕赤酵母表面展示技术，用表面展示 CALB 毕赤酵母全细胞为催化剂在无溶剂体系中催化合成肉桂醇酯，初步探讨了 Pp-CALB 合成乙酸肉桂酯的最适反应条件及操作稳定性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

毕赤酵母重组菌株 GS115-pPIC9K-CALB-GCW（12+51+61），为本实验室构建及保存[26,27]。其结构示意图如图 1 所示。

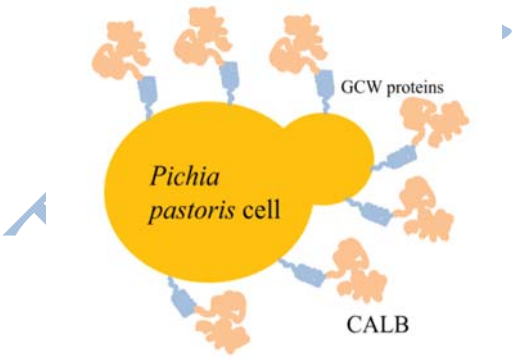


图 1 毕赤酵母表面展示脂肪酶 CALB 结构示意图

Fig.1 Structure schematic illustration of Pp-CALB whole-cell biocatalyst

Pp-CALB，指利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)壁蛋白 GCW21，GCW51 和 GCW61 作为锚定蛋白，将南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B，CALB)展示在毕赤酵母细胞表面的一种全细胞生物催化剂。

1.1.2 培养基

无氨基酸酵母氮源 YNB(Yeast nitrogen base)、蛋白胨(PEP)均购自 Difco 公司；酵母抽提物(YE)购自 Oxford 公司；YPD(Yeast extract peptone dextrose medium)、BMGY(Buffered glycerol-complex medium)、BMMY(Buffered methanol-complex medium)等培养基均按 Invitrogen 公司毕赤酵母表达操作手册配方配制。

1.1.3 试剂

肉桂醇、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、乙酸酐、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸乙烯酯、乙酸异丙烯酯、乙酸丁酯均为分析纯，无水乙醇(HPLC 级)，以上有机溶剂经分子筛脱水处理。

1.2 实验方法

1.2.1 全细胞催化剂的制备

将毕赤酵母重组菌株 GS115-pPIC9K-CALB-GCW（12+51+61）培养于 YPD 琼脂固体平板上，24 h 后接种至 YPD 液体培养基中，30 ℃、250 r/min 培养 24 h，以 1%的接种量转接到新鲜 BMGY 培养基中，30 ℃、250 r/min 培养 24 h，然后在 4 ℃、8000 r/min 离心 10 min 得到菌体，转入 BMMY 培养基中，30 ℃、250 r/min 培养 5 d，每隔 24 h 加入 1%(*V/V*)甲醇诱导。然后收集发酵菌体，离心，用 pH 8.0 的 Tris-Hcl 缓冲液洗 2 次，最后用 pH 8.0 的 Tris-Hcl 缓冲液重悬，通过真空冷冻干燥得到催化剂干粉。

1.2.2 全细胞脂肪酶水解活力的测定

采用吸光度测定脂肪酶活力[28]。检测全细胞催化剂干粉的酶活：用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)配置浓度为 2 mmol/L 的 pNPB 作为酶反应底物，其中添加 0.5%的 Triton-X100。然后向 0.5 mL 的菌体重悬液中加入 0.5 mL 浓度为 2 mmol/L 的底物溶液，45 ℃下反应一定时间，测定 OD_{405} 值。每个样品均测定 3 个平行样，用未携带 CALB 基因的重组毕赤酵母菌体 GS115-pPIC9K-GCW（12+51+61）作空白对照。一个酶活力单位为每分钟水解底物生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量[29]，测得冻干粉水解酶活为 4032 U/(g·dry cell)。

1.2.3 全细胞催化剂合成肉桂醇酯

10 mL 具塞锥形瓶中加入 12 mmol 脂肪酸与 6 mmol 肉桂醇，加入适量 4Å 分子筛以去除反应生成的水，放入恒温摇床中预热 30 min。加入一定量的全细胞催化剂，于恒温摇床中反应 3 h。在不同的反应条件(摇床转速、温度、底物比例和酶加量等)下进行实验。反应结束后离心取反应液上清，-20 ℃保存待测。

1.2.4 反应过程气相色谱分析

采用 Agilent7820A 气相色谱仪进行反应底物和产物定量分析，取反应液 10 μL，用无水乙醇稀释至测定范围，经有机微孔滤膜过滤后进行分析，色谱条件如下：载气为氮气；FID 检测器，检测器温度 300 ℃，色谱柱 HP-5，分流比 40:1，柱箱温度 160 ℃，维持 1 min，以 30 ℃/min 升温至 270 ℃，维持 5 min。

1.2.5 酯化率的测定

利用外标法计算肉桂醇含量，反应酯化率由底物肉桂醇的消耗量来衡量。酯化率计算公式：

酯化率=[1-(W_2/W_1)]×100%

式中，W_1，W_2 分别为酯化反应前后体系中肉桂醇的含量(mmol)。

2 结果与讨论

2.1 酰基供体对 Pp-CALB 催化合成肉桂醇酯的影响

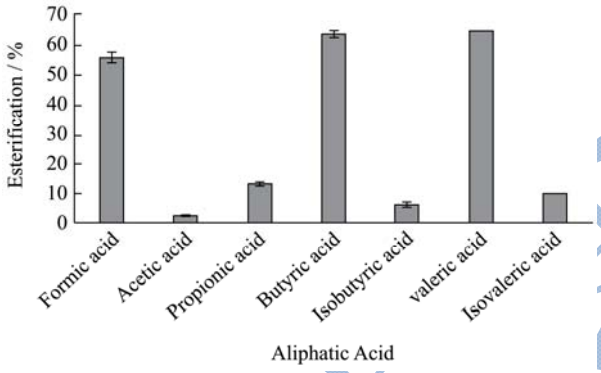


图 2 不同脂肪酸对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.2 Effect of different aliphatic acids on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

向 10 mL 反应瓶中加入 6 mmol 肉桂醇和 12 mmol 脂肪酸，以及 0.05 gPp-CALB，在无溶剂体系中进行肉桂醇酯的合成反应，采用的脂肪酸分别为甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸。考察 Pp-CALB 对脂肪酸的选择性，探讨建立无溶剂反应体系的可行性，在温度 50 ℃，摇床转速 200 r/min 下反应 3 h，结果如图 2 所示。

由图可看出，Pp-CALB 对于含有支链的脂肪酸催化活性较低，这可能与 CALB 的催化结构域大小有关[17]。乙酸和丙酸在无溶剂体系中的酯化率均很低，甲酸、丁酸、戊酸在无溶剂体系中的酯化率分别可达 55.42%，63.50%，64.22%，可能是乙酸，丙酸极性较大，易形成亲水性界面，夺取脂肪酶表面的必需水，破坏了蛋白质的三维结构，使部分酶失活[30]。

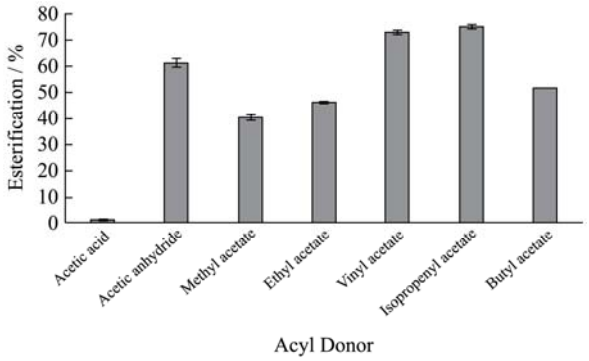


图 3 不同酰基供体对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.3 Effect of different acyl donors on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

乙酸肉桂酯是一种在工业生产中有较大需求的酯类香料，以乙酸肉桂酯合成为例，比较乙酸、乙酸酐、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸乙烯酯、乙酸异丙烯酯、乙酸丁酯几类常用酰基供体的作用效果，结果如图 3 所示。由图可看出，以乙酸乙烯酯和乙酸异丙烯酯作为酰基供体时获得的酯化率较高，由于乙酸异丙烯酯成本较高，故以下研究中选择乙酸乙烯酯作为酰基供体。

2.2 摇床转速对 Pp-CALB 催化肉桂醇转酯反应的影响

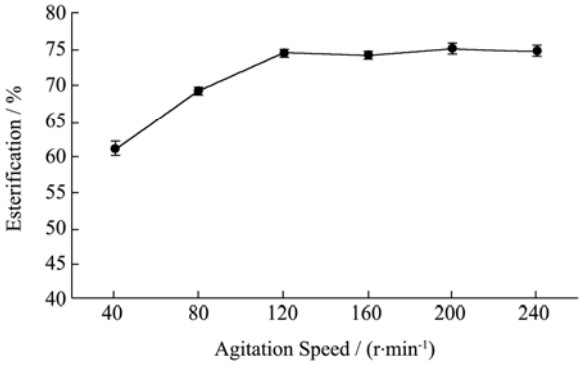


图 4 摇床转速对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.4 Effect of agitation speed on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

摇床转速影响着酶催化反应的传质，传热以及底物同酶的接触几率。控制适合的转速既能保证良好的传质传热，又可节约能耗。在无溶剂体系中考察了摇床转速对反应的影响，结果如图 4 所示。由图可看出，随着摇床转速从 40 r/min 增加到 120 r/min，酯化率逐渐提高，因为无溶剂体系粘度较高，具有一定的传质阻力，提高转速能够有效增加底物与酶接触的概率。当摇床转速再升高时，酯化率无明显提升。故 120 r/min 的转速已经可以满足体系反应要求。

2.3 温度对 Pp-CALB 催化肉桂醇转酯反应的影响

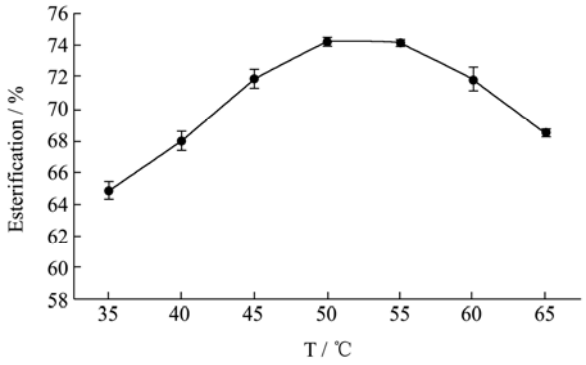


图 5 温度对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.5 Effect of temperature on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

从热力学角度来说，温度的升高有利于提高转酯反应的速率，酶促反应温度的高低对脂肪酶的分子构象也有一定的影响，进而影响酶的催化活性。反应温度对全细胞催化剂 Pp-CALB 催化合成乙酸肉桂酯的影响见图 5，由图可看出，当温度为 50 ℃时，该体系具有较高的酯化率，这是因为在较低的温度条件下，随着温度的升高，分子扩散加速，当温度达到 50 ℃的时候，达到最高酯化率，继续升高反应温度酯化率下降，表明了 Pp-CALB 在高温下有一定的失活，因为高温是蛋白质变性和失活的最常见的原因[31]。因此，50 ℃是 Pp-CALB 催化合成乙酸肉桂酯的最适温度。

2.4 底物摩尔比对 Pp-CALB 催化肉桂醇转酯反应的影响

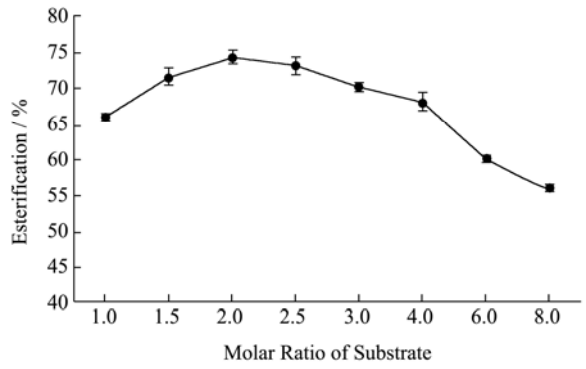


图 6 底物摩尔比对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.6 Effect of molar ratio of substrate on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

反应底物摩尔比对酶促反应进程影响较大，当某一底物的浓度固定，反应受底物摩尔比的影响十分显著[25]，实验考察了不同底物摩尔比对肉桂醇酯化率的影响，结果如图 6 所示。由图可知，随着底物摩尔比（乙酸乙烯酯:肉桂醇）的增加，酯化率也在增加，当底物摩尔比为 2:1 时，反应酯化率达到 74.11%，继续增大底物摩尔比，酯化率逐渐降低，主要原因可能在于添加的乙酸乙烯酯过量，产生底物抑制效应，以使得 Pp-CALB 催化性能降低。同时过多的底物加入进反应体系，不利于反应后期分离纯化，并且造成多余的浪费，故选择底物摩尔比 2:1 较合适。

2.5 全细胞催化剂添加量对肉桂醇转酯反应的影响

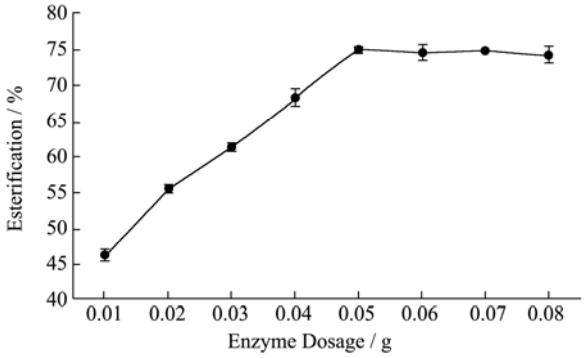


图 7 不同 Pp-CALB 添加量对肉桂醇酯化反应的影响

Fig.7 Effect of the amount of lipase on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

Pp-CALB 的添加量对反应速率和经济成本有着很大的影响，由图 7 可知，随着酶量增加，肉桂醇的酯化率提高，当酶量由 0.01 g 增加到 0.05 g 时，酯化率稳定提升；但酶量由 0.05 g 增加到 0.08 g 时，酯化率提升不明显。原因可能是在底物浓度一定的条件下，当酶量超过 0.05 g 后，由于底物浓度的限制，尽管酶量增加但酯化率不会显著提高。此外在高酶浓度的催化体系中，催化剂很难维持均匀悬浮状态，存在传质阻力[32]，而且，过量的酶加入反应体系，会大大增加反应成本，故在此反应中 0.05 g 是比较合适的添加量。

2.6 初始水活度对全细胞催化剂合成肉桂醇酯的影响

非水相酶促反应中，脂肪酶需要一定量的结合水来维持其活性构象的稳定，只有达到最佳水含量的要求时，蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间才能达到最佳平衡点[33]。本研究用饱和盐预平衡的方法控制全细胞催化剂 Pp-CALB 的初始水活度。在室温下，将酶和底物在密闭容器中与饱和盐溶液平衡 3

d，得到具有一定初始水活度的 Pp-CALB 和底物，所用的饱和盐溶液包括：LiBr (a_w=0.06)，LiCl (a_w=0.11)，$MgCl_2$ (a_w=0.33)，Mg $(NO_3)_2$ (a_w=0.53)，NaCl (a_w=0.75)，K_2SO_4(a_w=0.97)[34]。

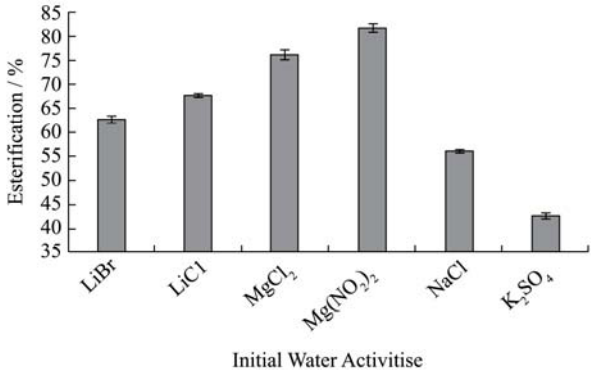


图 8 不同水活度对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

Fig.8 Effect of different initial water activities on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

由图 8 可知，使用 $Mg(NO_3)_2$ 饱和溶液 a_w=0.53 处理后的 Pp-CALB 和底物，肉桂醇酯化率最高达 81.34%。因此，Pp-CALB 催化该反应的最适水活度为 0.53。

2.7 有机溶剂及无溶剂体系中肉桂醇酯合成结果比较

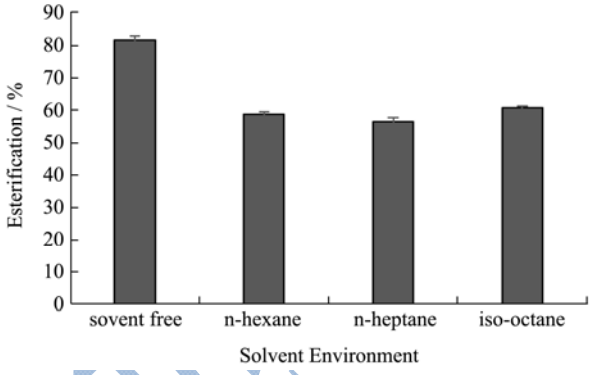


图 9 不同溶剂环境中的合成肉桂醇酯结果

Fig.9 Effect of different reaction system on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

选择乙酸乙烯酯为酰基供体，分别在有机溶剂及无溶剂体系中进行乙酸肉桂酯的合成。底物摩尔比(乙酸乙烯酯:肉桂醇）为 2，加入 3 mL 有机溶剂（正己烷、正庚烷、异辛烷），0.05 g 全细胞催化剂，120 r/min，50 ℃反应 3 h，肉桂醇酯化效果如图 9 所示。由图可看出，在无溶剂体系中，肉桂醇的酯化率最高，故对于 Pp-CALB 催化合成乙酸肉桂酯而言，无溶剂体系的酯化效果明显优于有机溶剂，这可能与无溶剂体系增大了底物的浓度有关，而且无溶剂体系比有机溶剂体系更具优势，可简化后续分离提纯过程。

2.8 全细胞催化剂在肉桂醇转酯反应中的操作稳定性

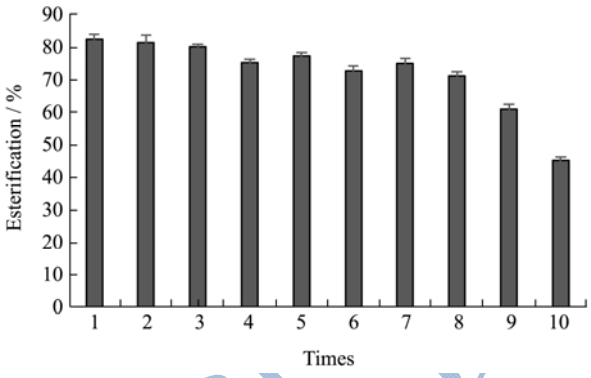


图 10 全细胞催化剂 Pp-CALB 操作稳定性

Fig.10 Operational stability of the Pp-CALB

为达到降低生产成本的目的，本文研究了 Pp-CALB 的多次重复利用，每次反应完成后，过滤 Pp-CALB，然后用丙酮连续洗涤 3~4 次。最后将其放入干燥剂中，在室温（30±2 ℃）中保存整夜，完全干燥后再次用于下一反应[2]。由图 10 可知，使用全细胞催化剂 Pp-CALB 连续反应 10 个批次，第 8 批次反应时，肉桂醇的酯化率仍能保持在 70.00%以上，因此全细胞催化剂 Pp-CALB 在本实验中表现出了良好的可重复使用性。

2.9 肉桂醇酯化反应的进程曲线

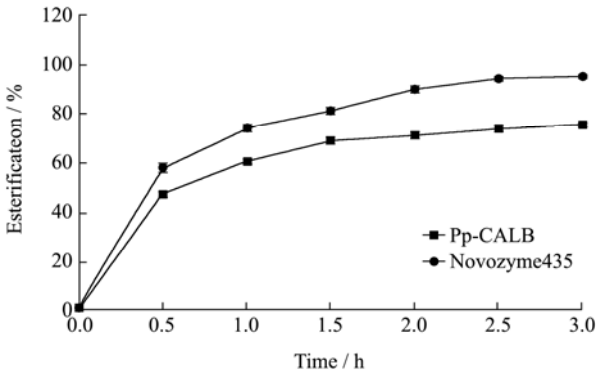


图 11 脂肪酶催化合成乙酸肉桂酯反应进程曲线

Fig.11 Time course of esterification catalyzed by Pp-CALB and Novozyme 435

综合以上各单因素优化的结果，在无溶剂反应体系中，酶加量 0.05 g（其中添加的 Pp-CALB 初始水活度为 0.53），肉桂醇 6 mmol，乙酸乙烯酯 12 mmol，反应温度 50 ℃，摇床转速 120 r/min，反应 3 h，在此条件下比较本实验室自制全细胞催化剂 Pp-CALB 与 Novozyme435 对乙酸肉桂酯的催化效率。由图 11 可

知，Pp-CALB 与 Novozyme435 合成乙酸肉桂酯有一定的差距，可能的原因是全细胞催化剂比酶活小，单位重量酵母细胞表面展示的 CALB 蛋白较少，而且单因素之间的交互作用没有进一步优化，Pp-CALB 合成乙酸肉桂酯的催化效率有进一步提高的空间。

3 结论

3.1 本研究以毕赤酵母表面展示 CALB 为全细胞催化剂，构建了无溶剂体系中肉桂醇酯的绿色合成工艺。在底物摩尔比（乙酸乙烯酯:肉桂醇）为 2:1，添加 0.05 g 初始水活度为 0.53 的全细胞催化剂 Pp-CALB，50 ℃，120 r/min 的条件下反应 3 h，肉桂醇酯化率可达 81.34%。且该全细胞催化剂重复利用性好，连续反应 8 次后，肉桂醇仍能达到较高的酯化率。

3.2 全细胞催化剂 Pp-CALB 不但具备固定化酶的特性，而且制作过程简单，有效节省了设备投资和运行费用。且构建的无溶剂体系具有条件温和，无溶剂挥发和产物更易提取等优势，是一条环境友好的酶法合成工艺路线，为优质香料的高效制备与应用奠定了基础。

参考文献

[1] Waghmare G V, Chatterji A, Rathod V K. Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2017, 183(4): 1-15

[2] Tomke P D, Rathod V K. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 27: 241-246

[3] Mantashlob F. p-Toluenesulfonyl chloride (p-TsCl) as a new and effective catalyst for acetylation and formylation of hydroxyl compounds under mild conditions [J]. Journal of Applied Chemistry, 2009, 21(12): 1430-1434

[4] Qiu R, Zhu Y, Xu X, et al. Zirconocene bis (perfluorooctanesulfonate)s-catalyzed acylation of alcohols, phenols, thiols, and amines under solvent-free conditions [J]. Catalysis Communications, 2009, 10(14): 1889-1892

[5] Devulapelli V G, Weng H S. Synthesis of cinnamyl acetate by solid-liquid phase transfer catalysis: Kinetic study with a batch reactor [J]. Catalysis Communications, 2009, 10(13): 1638-1642

[6] Moyo M. Catalytic oxidation of cinnamyl alcohol tocinnamaldehyde using hydrogenperoxide [J]. Carbon, 2012, 2: 2250-3498

[7] Bokade V V, Yadav G D. Transesterification of edible and nonedible vegetable oils with alcohols over heteropolyacids supported on acid-treated clay [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009, 48(21): 9408-9415

[8] Suslick K S, Casadonte D J, Doktycz S J. Ultrasonic irradiation of copper powder [J]. Chemistry of Materials, 1989, 1(1): 6-8

[9] Lee J, Snyder J K. ChemInform abstract: Ultrasound-promoted diels-alder reactions: syntheses of tanshinone IIA, nortanshinone, and (+-)-Tanshindiol B [J]. Journal of the American Chemical Society, 1989, 111(4): 1522-1524

[10] Pizzuti L, Piovesan LA, Flores AF, et al. Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(6): 728-731

[11] Pizzuti L, Martins P L, Ribeiro B A, et al. Efficient sonochemical synthesis of novel 3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-Carboximidamides [J].Ultrasonics Sonochemistry, 2010, 17(1): 34-37

[12] Gogate P R, Kabadi A M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 44(1): 60-72

[13] Rokhina, Ekaterina V, Piet, et al. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(5): 298-306

[14] Lopresto C G, Calabrò V, Woodley J M, et al. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized candida antarctica lipase B [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2014, 110(110): 64-71

[15] Wang Y, Zhang D H, Zhang J Y, et al. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 629-633

[16] Larios A, García H S, Oliart R M, et al. Synthesis of flavor and fragrance esters using Candida antarctica lipase [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004, 65(4): 373-376

[17] Anderson E M, Larsson K M, Kirk O. One biocatalyst-many applications: The use of candida antarctica B-lipase in organic synthesis [J]. Biocatalysis & Biotransformation, 1998, 16(3): 181-204

[18] Welsh F W, Williams R E, Dawson K H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters [J]. Journal of Food Science, 1990, 55(6): 1679-1682

[19] Yadav GD, Trivedi AH. Kinetic modeling of immobilized-

lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2003, 32(7): 783-789

[20] Yadav G D, Devendran S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(3): 496-502

[21] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004, 64(1): 28-40

[22] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2001, 92(5): 405

[23] Han Z, Han S, Zheng S, et al. Enhancing thermostability of a Rhizomucor miehei lipase byengineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 85(1): 117-126

[24] Huang D, Han S, Han Z, et al. Biodiesel production catalyzed by Rhizomucor miehei, lipase-displaying Pichia pastoris, whole cells in an isooctane system [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 63(3): 10-14

[25] Su G D, Huang D F, Han S Y, et al. Display of Candida antarctica lipase B on Pichia pastoris and its application to flavor ester synthesis [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 86(5): 1493

[26] Pan Wang, Li Zhang, Ying Lin, et al. Accurate analysis of fusion expression of Pichia pastoris glycosylphosphatidy-linositol-modified cell wall proteins [J]. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(9): 1355-1365

[27] Zhang L, Liang S, Zhou X, et al. Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in Pichia pastoris and their recombinant expression on the cell surface [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(18): 5519

[28] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, et al. Extracellular lipase of pseudomonas sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(15): 4836

[29] Pan Z, Han S, Lin Y, et al. Expression of candida antarctica lipase B on yeast surface and synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(4): 673-678

[30] 金子.毕赤酵母细胞展示的 CALB 脂肪酶的表征及非水相催化特性研究[D].广州:华南理工大学,2013
JIN Zi. Representation of the Candida antarctica lipase B-displaying Pichia pastoris and it's catalytic characteristics in non-aqueous phase [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013

[31] Gokalp N, Ulker C, Guvenilir YA. Synthesis of polycaprolactone via ring opening polymerization catalyzed by *candida antarctica* lipase B immobilized onto an amorphous silica support [J]. Journal of Polymer Materials, 2016, 33(1): 87-100

[32] 郑穗平,任昌琼.表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母全细胞催化合成糖酯[J].生物工程学报,2009, 25(12): 1933-1939
ZHENG Sui-ping, REN Chang-qiong. Synthesis of glucose laurate monoester catalyzed by Candida antarctica lipase B-displaying Pichia pastoris whole-cells [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(12): 1933-1939

[33] Duan Y, Du Z, Yao Y, et al. Effect of molecular sieves on lipase-catalyzed esterification of rutin with stearic acid [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2006, 54(17): 6219-6225

[34] Ma L, Persson M, Adlercreutz P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2002, 31(7): 1024-1029