

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, 在无溶剂体系中与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 °C 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 °C, 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 synthesized 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amp;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。

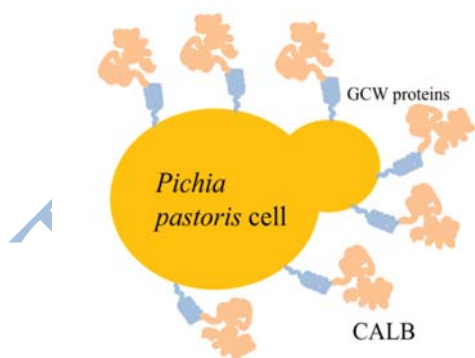


图1 毕赤酵母表面展示脂肪酶CALB结构示意图

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OD₄₀₅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 °C, 色谱柱 HP-5, 分流比 40:1, 柱箱温度 160 °C, 维持 1 min, 以 30 °C/min 升温至 270 °C, 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:

$$\text{酯化率} = [1 - (W_2/W_1)] \times 100\%$$

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

的影响

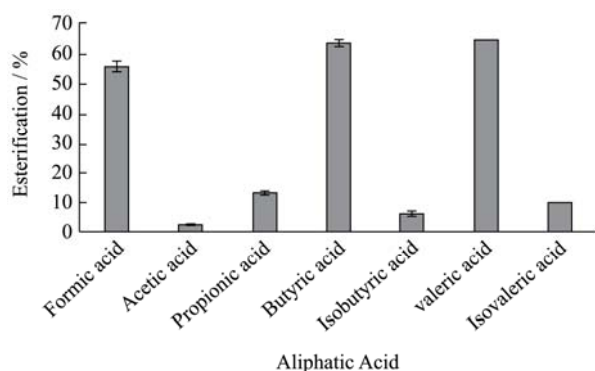


图2 不同脂肪酸对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响
Fig.2 Effect of different aliphatic acids on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

向 10 mL 反应瓶中加入 6 mmol 肉桂醇和 12 mmol 脂肪酸, 以及 0.05 g Pp-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 °C, 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^[7]。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]。

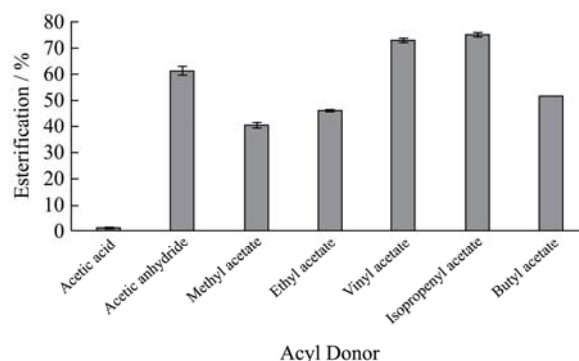


图3 不同酰基供体对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响
Fig.3 Effect of different acyl donors on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

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 催化肉桂醇酯化反应的影响

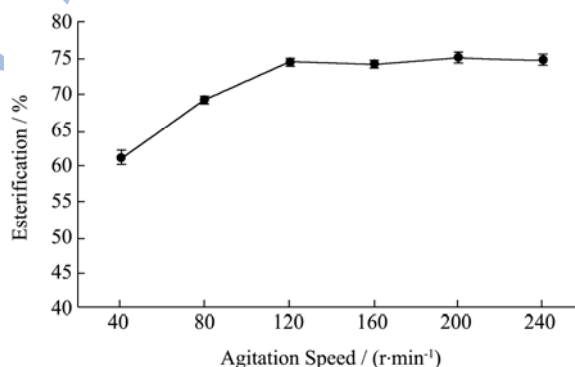


图4 摇床转速对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响
Fig.4 Effect of agitation speed on the esterification of cinnamic alcohol catalyzed by Pp-CALB

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

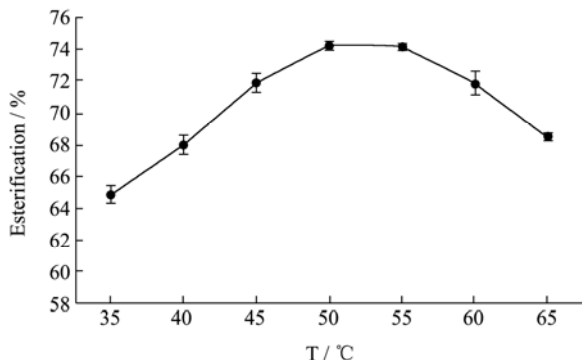


图5 温度对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

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 °C 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 °C 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 °C 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

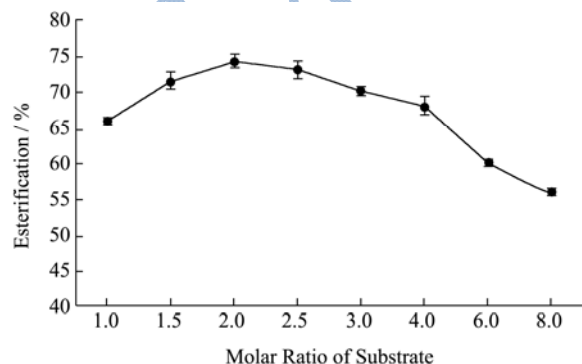


图6 底物摩尔比对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

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

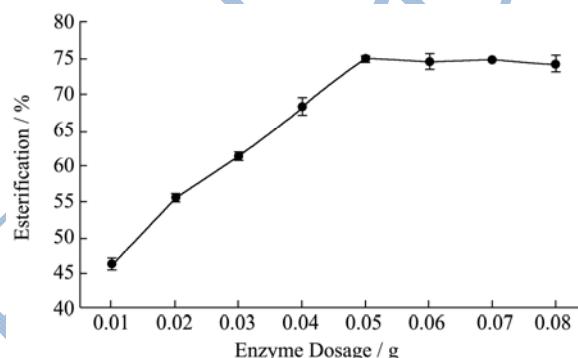


图7 不同 Pp-CALB 添加量对肉桂醇酯化反应的影响

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]。

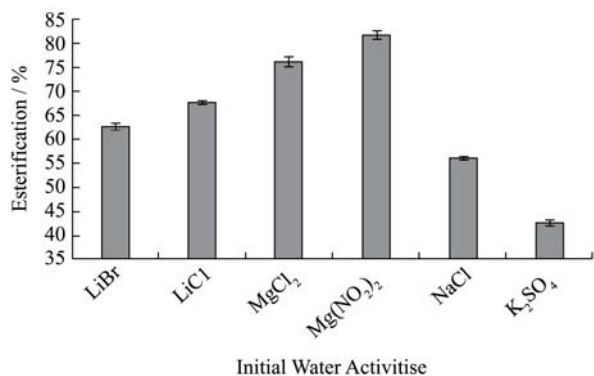


图 8 不同水活度对 Pp-CALB 催化肉桂醇酯化反应的影响

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

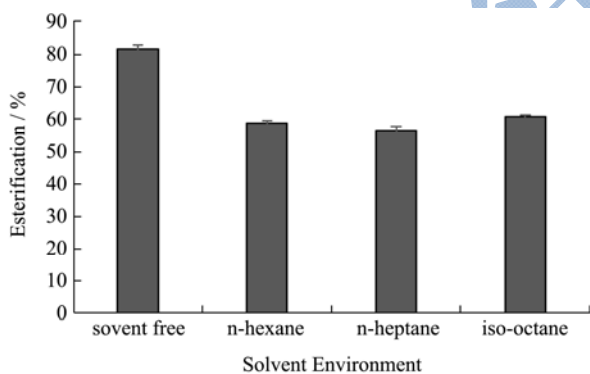


图 9 不同溶剂环境中的合成肉桂醇酯结果

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 °C 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

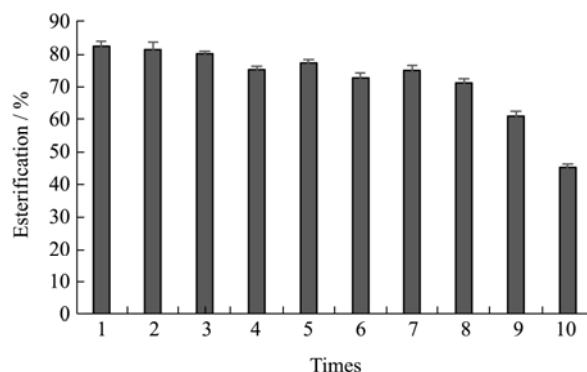


图 10 全细胞催化剂 Pp-CALB 操作稳定性

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 °C) 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

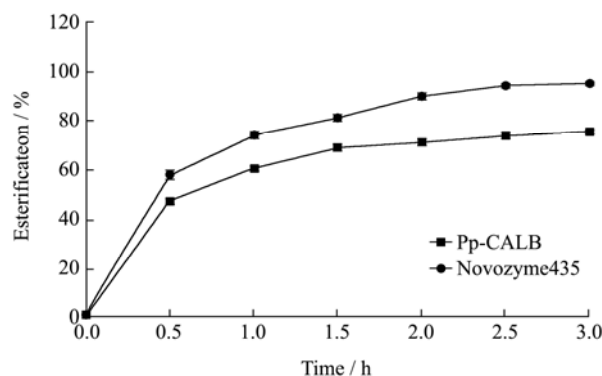


图 11 脂肪酶催化合成乙酸肉桂酯反应进程曲线

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 °C, 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 °C, 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 to cinnamaldehyde 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-thiocarbonyl-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 by engineering 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* glycosylphosphatidylinositol-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 脂肪酶的特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 its 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