

磁性壳聚糖纳米复合材料固定化褶皱假丝酵母脂肪酶催化合成木质甾醇酯

王舒舒¹, 王俞涵¹, 杨旭¹, 张鹏², 吴正章², 胡焱^{1*}

(1. 南京工业大学 材料化学工程国家重点实验室 药学院, 江苏 南京 211816; 2. 江苏科鼎生物制品有限公司, 江苏 泰兴 225400)

摘要: 以磁性壳聚糖纳米复合材料共价固定的褶皱假丝酵母脂肪酶为催化剂, 以木质甾醇和油酸为原料, 对木质甾醇油酸酯的酶法合成工艺条件进行了优化。得到的最佳工艺条件为: 催化剂用量 12.7% (以底物总质量计), 油酸与木质甾醇物质的量比为 2 : 1, 木质甾醇质量浓度为 122.9 g/L, 反应温度 50 °C, 反应时间 24 h。在该条件下, 木质甾醇转化率为 96.42%。对月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸不同碳链长度的脂肪酸或混合脂肪酸进行酯化反应, 木质甾醇的转化率可达 96.67%~98.74%, 催化剂使用 5 次时, 转化率仍可达 82.45%。

关键词: 褶皱假丝酵母脂肪酶; 固定化酶; 木质甾醇油酸酯; 酯化反应; 催化技术

中图分类号: O643.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 01-0124-06

Synthesis of lignosterol esters catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized on magnetic nanocomposites

WANG Shushu¹, WANG Yuhan¹, YANG Xu¹, ZHANG Peng², WU Zhengzhang², HU Yi^{1*}

(1. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Conat Biological Products Co., Ltd., Taixing 225400, Jiangsu, China)

Abstract: The enzymatic synthesis conditions of lignosterol oleate from lignosterol and oleic acid were systematically optimized using *Candida rugosa* lipase covalently immobilized on magnetic chitosan nanocomposites as catalyst. Under the optimized conditions of catalyst dosage 12.7% (based on the total mass of substrates), molar ratio of oleic acid to lignosterol 2 : 1, mass concentration of lignosterol 122.9 g/L, reaction temperature 50 °C, and reaction time 24 h, the conversion rate of lignosterol could reach 96.42%. Meanwhile, the lignosterol conversion rate could still maintain as high as 96.67%~98.74% when the fatty acids with different carbon chain lengths, such as lauric acid, myristic acid, palmitic acid, or mixed fatty acids were esterified. When the immobilized biocatalyst was used for 5 times, the conversion rate of lignosterol could still reach 82.45%, indicating the good reusability of the catalyst used.

Key words: *Candida rugosa* lipase; immobilized lipase; lignosterol oleate; esterification; catalysis technology

植物甾醇作为一种与胆固醇结构相似的天然化合物, 具有重要的生理和药理活性, 被广泛用作食品抗氧化剂、营养添加剂、化妆品添加剂和动物生长剂^[1-3]。植物甾醇(酯)被美国食品及药物管理局(FDA)认可为“降低血脂、预防动脉硬化”的天

然保健食品新原料, 被誉为“生命的钥匙”, 同时也是国际营养学会推荐的未来十大功能性营养成分之一^[4-5]。植物甾醇以结晶形式存在, 熔点高, 在人体内的溶解性差, 导致其生物利用性差, 给植物甾醇的广泛应用带来困难。研究发现, 与脂肪酸酯化后

收稿日期: 2022-07-19; 定用日期: 2022-08-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220540

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103802); 国家自然科学基金面上项目(22178174); 江苏省先进生物制造协同创新中心项目(XTC2206)

作者简介: 王舒舒(1996—), 女, 硕士生, E-mail: 201961218070@njtech.edu.cn。联系人: 胡焱(1975—), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: huyi@njtech.edu.cn。

甾醇的水溶性和油溶性增强, 有利于人体吸收, 实现降胆固醇、抗癌、抗炎等功效^[6-8]。

目前, 植物甾醇酯的合成方法有化学法和酶法两种, 其中化学法催化合成植物甾醇酯存在催化过程所需温度较高、产品褐变、化学催化剂残留等问题^[9-10]; 酶法催化合成植物甾醇酯化因具有反应条件温和、副产物少、产品安全性高等特点^[11-12], 而受到人们的广泛关注。CHEN 等^[11]研究发现, 在水/1,4-双-2-乙基己基磺基琥珀酸酯(AOT)/异辛烷组成的反胶束体系中, 褶皱假丝酵母脂肪酶(CRL)可以高效催化 β -谷甾醇和月桂酸进行酯化反应生成 β -谷甾醇月桂酸酯, 在CRL添加量为底物总质量的18%、月桂酸和 β -谷甾醇物质的量比为3.5:1、47℃反应48 h的优化条件下, 目标产物转化率达到88.9%。ZHENG 等^[13]将乙烯基磷酸(VPA)包覆的 Fe_3O_4 与烯丙基缩水甘油醚(AGE)和乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)通过悬浮聚合制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{poly}(\text{AGE-co-EDMA})$ 磁性微球载体, 并用于共价交联固定化CRL; 在异辛烷体系中, 以底物总质量15.3%的固定化CRL为催化剂, 物质的量比为2:1的亚麻酸和植物甾醇为底物, 55℃反应15 h后, 植物甾醇转化率可达93.5%, 固定化脂肪酶重复利用5次后, 植物甾醇转化率降至80%。CUI 等^[14]通过物理吸附方法将解脂耶氏酵母脂肪酶(Ylip)固定在硅藻土上, 以底物总质量的2%固定化Ylip为催化剂, 物质的量比为2:1的油酸和植物甾醇为原料, 50℃反应78 h, 植物甾醇转化率可达91.1%。本课题组前期研究发现, 在正己烷体系中, CRL可高效催化木质甾醇和油酸的酯化反应, 在CRL添加量为甾醇质量的10%、油酸与木质甾醇物质的量比为3.8:1、反应温度为46℃、反应时间为28 h的条件下, 木质甾醇转化率达91.6%^[15]。总体上看, 目前酶法合成木质甾醇酯工艺普遍存在反应时间长、脂肪酸用量大、酶制剂重复使用性能差、转化率有待提升等问题。

最近, 本课题组以壳聚糖(CS)和 Fe_3O_4 为基质, 生物相容性良好的双醛纤维素(DAC)为交联剂, 制备了磁性有机-无机纳米复合材料(Fe_3O_4 -CS-DAC), 以其为载体, 可高效固定经阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)界面激活的CRL, 该固定化酶(Fe_3O_4 -CS-DAC-SDS-CRL, 简称固定化CRL)具有较高的脂肪酶负载量, 并在催化橄榄油水解的模型反应中显示出较高的催化活性、良好的稳定性以及重复使用性^[16]。为此, 本文拟将固定化CRL拓展应用于木质甾醇与脂肪酸的酯化反应中, 解决当前酶法合成工艺存在的诸多问题, 预期发展一种绿色、高效的木质甾醇酯合成工艺。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

木质甾醇(β -谷甾醇质量分数91.0%, 菜油甾醇质量分数7.0%, 豆甾醇质量分数0.5%, 菜籽甾醇质量分数0.3%, 其他质量分数为1.2%), 江苏科鼎生物制品有限公司; CRL(460 U/g), 美国Sigma有限公司; 正己烷(分析纯)、油酸(质量分数99%)、月桂酸(质量分数98%)、肉豆蔻酸(质量分数99%)、棕榈酸(质量分数95%)、4A分子筛(将4A分子筛置于马弗炉中350℃常压加热8 h, 自然降温至200℃后储存在干燥器中, 降温到室温, 随用随取), 萨恩化学技术(上海)有限公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

6890型气相色谱仪, 美国安捷伦有限公司; RCT磁力搅拌器, 艾卡(广州)仪器设备有限公司; TGL-16MS台式高速冷冻离心机, 上海卢湘仪实验室仪器有限公司。

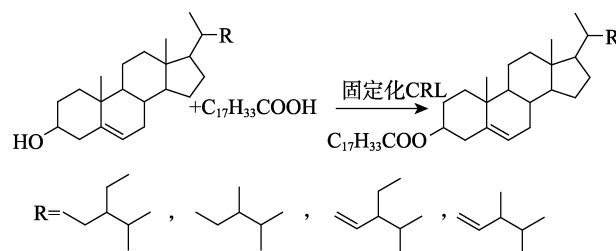
1.3 实验方法

1.3.1 固定化酶的制备

参考文献[16]方法制备固定化CRL, 制备得到的固定化酶负载量为63.6 mg/g, 比活为809.7 U/g, 酶活回收率为176.2%。

1.3.2 木质甾醇油酸酯的制备

以固定化CRL为催化剂, 对木质甾醇与油酸直接酯化法合成木质甾醇油酸酯的催化剂用量、木质甾醇和油酸底物物质的量比、反应时间和反应温度等条件进行优化。在15 mL反应管中, 加入3.5 mL正己烷为反应介质, 以占底物总质量6.3%~14.8%的固定化CRL为催化剂, 添加0.43 g(1.0 mmol)木质甾醇(底物质量浓度为122.9 g/L)和0.28~0.85 g(1.0~3.0 mmol)油酸, 反应温度设置为40~55℃, 转速300 r/min下反应20~28 h。每组实验进行3次平行实验。反应式如下所示:



1.3.3 分子筛用于酯化反应实验

在最优工艺条件下, 向反应体系中加入35 mg(占底物总质量的5%)活化后4A分子筛, 考察分子筛对固定化CRL酶催化合成木质甾醇油酸酯的影响。

1.3.4 工艺放大实验

在最优工艺条件下,将反应体系放大 10 倍,考察放大实验对固定化 CRL 酶催化合成木质甾醇油酸酯的影响。

1.3.5 产物分析与转化率测定

根据课题组前期实验中建立的气相色谱分析方法进行了定量和定性检测^[17],采用气相色谱仪对木质甾醇进行定量分析:FID 为检测器,用二氯甲烷作溶剂,采用 DB-5HT (0.1 $\mu\text{m}\times 0.25\text{ nm}\times 15\text{ m}$) 色谱柱,以 N_2 为载气,流速为 1.5 mL/min;进样口温度和检测器温度均为 350 $^\circ\text{C}$,柱温箱初始温度为 180 $^\circ\text{C}$,以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^\circ\text{C}$,以 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260 $^\circ\text{C}$,以 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 350 $^\circ\text{C}$,以 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 365 $^\circ\text{C}$,以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 380 $^\circ\text{C}$,并保持 3 min;进样量为 1 μL ,分流比为 20:1。在此条件下,绘制木质甾醇质量浓度 (x , g/L) - 峰面积 (y) 的标准曲线,得到标准曲线方程 $y=769.11x+9.1991$, $R^2=0.9987$ 。木质甾醇的转化率按下式计算:

$$\text{转化率}/\% = [(C_0 - C_t)/C_0] \times 100$$

式中: C_0 为反应混合物中木质甾醇的初始浓度, mol/L; C_t 为 t 时刻木质甾醇的浓度, mol/L。

1.3.6 催化剂重复使用实验

固定化酶的重复使用性是工业应用必须考虑的一个重要指标,因此在最优条件下对固定化酶催化木质甾醇油酸酯合成的重复使用性能进行了考察。反应结束后,使用磁铁将固定化酶从反应体系中分离出来并用正己烷洗涤多次,将得到的固定化 CRL 直接用于下一次酯化反应。

2 结果与讨论

2.1 催化剂用量对酯化反应的影响

在 3.5 mL 正己烷中添加 1.0 mmol 木质甾醇、2.0 mmol 油酸,在 45 $^\circ\text{C}$ 下反应 20 h,考察催化剂用量(以底物总质量计,下同)对木质甾醇转化率的影响,结果如图 1 所示。

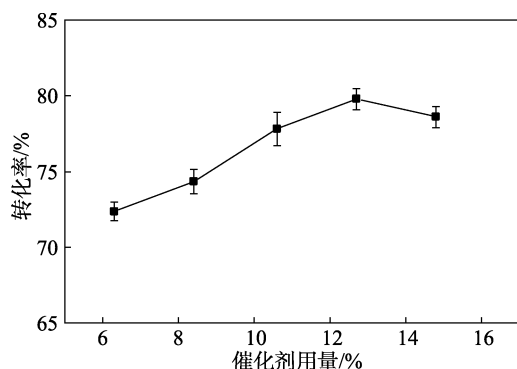


图 1 催化剂用量对木质甾醇转化率的影响

Fig. 1 Effect of catalyst dosage on conversion rate of lignosterol

可以看出,随着催化剂用量的增加,木质甾醇的转化率先增加后降低,当催化剂用量为 12.7% 时,木质甾醇转化率达到最高,为 76.55%,继续增加催化剂用量,木质甾醇转化率反而降低,可能是在酶催化反应过程中,随着过量酶制剂的加入,固定化酶的团聚加重,导致催化剂与底物的碰撞几率降低,底物进入酶活性中心的几率降低,从而使木质甾醇的转化率降低^[18]。

2.2 底物物质的量比对酯化反应的影响

在 3.5 mL 正己烷中,添加 1.0 mmol 木质甾醇,催化剂用量为 12.7%,45 $^\circ\text{C}$ 下反应 20 h,考察木质甾醇与油酸(简称醇酸)物质的量比对木质甾醇转化率的影响,结果如图 2 所示。可以看出,随着油酸物质的量的增加,木质甾醇转化率先增加后降低,当油酸与木质甾醇的物质的量比为 2:1 时,木质甾醇转化率达到最高,为 81.42%,继续增加油酸用量,木质甾醇转化率反而降低,这可能是因为随着油酸浓度进一步增大,会降低木质甾醇的相对浓度,降低反应传质过程,从而使木质甾醇的转化率略微降低^[19-20]。

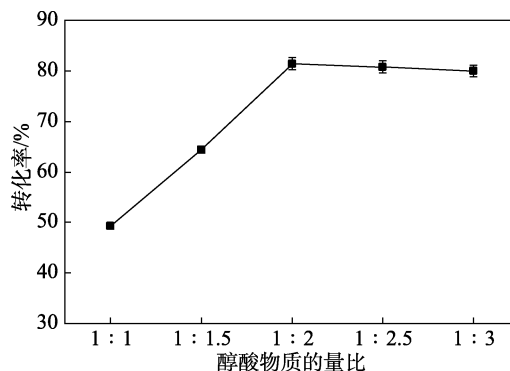


图 2 底物物质的量比对木质甾醇转化率的影响

Fig. 2 Effect of molar ratio of substrate on conversion rate of lignosterol

2.3 反应温度和反应时间对酯化反应的影响

在 3.5 mL 正己烷中添加用量为 12.7% 固定化酶为催化剂,添加 1.0 mmol 木质甾醇、2.0 mmol 油酸,考察反应温度和反应时间对木质甾醇转化率的影响,结果如表 1 所示。可以看出,反应温度对酶的催化能力影响很大(No.1~3),在 50 $^\circ\text{C}$ 时木质甾醇转化率达到最高,进一步升高温度木质甾醇转化率反而降低,这可能是温度过高导致固定化酶变性失活所致^[21]。本课题组前期研究表明,该固定化酶对于橄榄油水解模型反应的最适温度为 45 $^\circ\text{C}$,超过 50 $^\circ\text{C}$ 时活性明显降低且热稳定性也不好^[16]。如表 1 No.3~5 所示,随着反应时间的增加,木质甾醇转化率也随之增加,在 24 h 时木质甾醇转化率达到最高

值, 为 96.42%, 之后继续延长反应时间, 木质甾醇转化率略有降低, 可能是由于可逆反应导致生成的木质甾醇油酸酯水解向原料转化所致^[18,22]。

表 1 反应温度和反应时间对反应的影响

Table 1 Effects of reaction temperature and reaction time on esterification

No.	温度/°C	时间/h	转化率/% ^①
1	45	20	81.42
2	55	20	81.32
3	50	20	90.77
4	50	24	96.42
5	50	28	93.15

①GC 转化率。

2.4 脂肪酸种类对酯化反应的影响

在最优工艺条件, 即固定化酶用量为 12.7%、木质甾醇 (1.0 mmol)、脂肪酸 (2.0 mmol)、正己烷 (3.5 mL)、反应温度 50 °C、反应时间 24 h 下, 考察月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸等不同碳链长度 (C12~C16) 的脂肪酸对酯化反应的影响, 结果如表 2 所示。

表 2 脂肪酸种类对酯化反应的影响

Table 2 Effect of fatty acid types on esterification

No.	脂肪酸种类	转化率/% ^②
1	油酸 (C18)	96.42
2	月桂酸 (C12)	98.74
3	肉豆蔻酸 (C14)	97.54
4	棕榈酸 (C16)	96.67
5	混合酸 (C12~C18) ^①	97.22

①混合酸为 n (月桂酸): n (肉豆蔻酸): n (棕榈酸): n (油酸)=1:1:1:1; ②GC 转化率。

由表 2 可以看出, 该固定化酶对不同碳链长度脂肪酸与木质甾醇的酯化反应都显示出优异的催化活性, 木质甾醇的转化率可达 96.67%~98.74%, 木质甾醇转化率都在 96.42% 以上。此外, 对于混合脂肪酸, 木质甾醇的转化率仍高达 97.22%。YANG 等^[23]报道了路易斯酸类离子液体 $\text{ChCl}_2\text{SnCl}_2$ 可高效催化植物甾醇与月桂酸的酯化反应, 但是随着脂肪酸碳链的增长, 位阻效应也随之增强, 植物甾醇的转化率显著降低。HE 等^[24]研究表明, 在 220 °C 高温下脂肪酸可以起到自催化作用, 但是随着脂肪酸碳链长度的增加, 反应转化率和选择性都有所下降。因此, 固定化 CRL 可高效催化植物甾醇酯的合成, 相比化学合成法而言, 对于不同链长的脂肪酸具有较好的适用性。

化学催化法与酶法合成的产品的气相色谱图对比, 见图 3。值得一提的是, 气相色谱中观察到酶

催化木质甾醇与油酸的酯化反应没有任何副产物生成, 所有的木质甾醇全部转化为木质甾醇酯, 并无化学反应中普遍存在的脱水、氧化等副产物, 这有利于降低产品的分离精制成本并提高产品的品质。

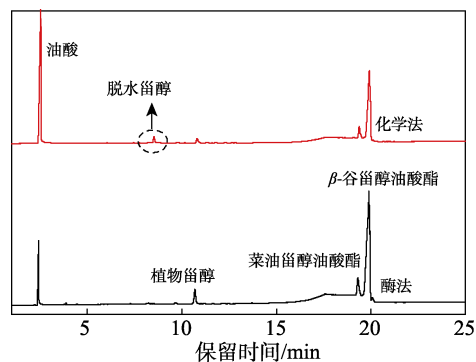


图 3 化学法^[17]与酶法合成的产物气相色谱图

Fig. 3 GC spectra between chemical synthesis^[17] and enzymatic synthesis

2.5 分子筛对酯化反应的影响

酯化反应过程中产生的水会抑制反应的进行, 移除生成的水可以打破化学反应平衡, 促进酯化反应向正方向进行, 从而提高反应转化率。因此, 在最优工艺条件下考察分子筛对木质甾醇与油酸酯化反应的影响。结果显示, 向反应体系中加入占底物总质量 5% 的活化 4A 分子筛后, 木质甾醇的转化率可提高到 98.37%。

2.6 工艺放大实验结果

将最优化反应条件中投料量放大 10 倍, 考察工艺放大对固定化酶催化木质甾醇与油酸酯化反应的影响。具体条件为: 在 100 mL 三口烧瓶中加入 35 mL 正己烷, 10.0 mmol 木质甾醇, 20.0 mmol 油酸, 1.26 g 固定化酶 (占底物总质量的 12.7%), 在 50 °C 下反应 24 h。结果显示, 该反应具有较好的放大性能, 在不添加分子筛的条件下木质甾醇的转化率仍达 94.82%。

2.7 重复使用性分析

在最优工艺条件下, 考察催化剂重复使用性, 结果见图 4。可以看出, 随着催化剂使用次数的增加, 木质甾醇转化率略有下降, 但催化剂使用 5 次, 转化率仍保持在 82.45%。对第 6 次使用后和未使用的固定化酶进行圆二色谱分析, 结果见表 3。可以看出, 第 6 次使用后酶的二级结构基本保持不变, 证明酶在重复使用过程中酶的结构保持较完整。这可能是由于酶分子与含丰富醛基位点的纤维素二醛交联剂间的共价结合、酶分子和多官能团的 CS 以及交联剂之间的氢键和静电作用等相互作用力使固定化酶的刚性结构增强, 从而增强了固定化酶的

结构稳定性^[16,25]。在重复使用 5 次后,固定化酶的活性为初始活性的 75.30% (初始活性定义为 100%)。在长时间反应过程中,少量酶不可避免地 从载体上脱落,固定化酶相对活性也有所降低,从而 而导致转化率随着重复使用次数的增加而略有降低。

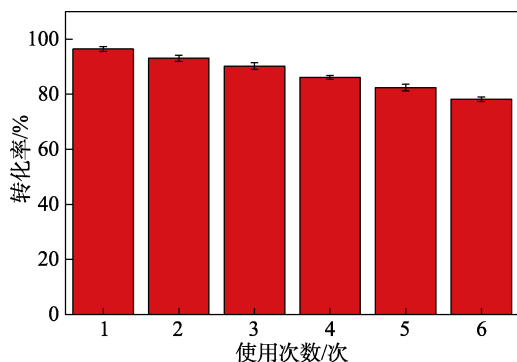


图 4 固定化酶的重复使用性
Fig. 4 Reusability of immobilized enzyme

表 3 固定化酶重复使用后的圆二色谱分析数据
Table 3 Circular dichroism analysis of immobilized enzyme after reuse

样品	α 螺旋/%	β 折叠/%	β 转角/%	无规则卷曲/%
使用前	21.7	21.5	35.2	18.3
使用后	21.1	21.7	35.4	18.6

2.8 催化性能对比分析

选取一些文献报道的酶法合成植物甾醇酯工艺与本文方法进行了比较,结果见表 4。可以看出,与已报道的酶法催化工艺相比,本工艺具有反应时间短、脂肪酸用量较少、转化率较高、磁性固定化酶易回收等优点。本文合成的固定化 CRL 的优异催化性能得益于其结合了磁性 Fe_3O_4 的高稳定性和易于分离回收、CS 和大分子交联剂 DAC 良好的生物相容性、表面活性剂 SDS 的界面活化以保持脂肪酶的活性构象等优点,使固定化酶具有较高的活性和稳定性^[16]。

表 4 与文献报道的催化体系的对比
Table 4 Comparison with the catalytic system reported in the literature

催化剂	催化剂用量/%	产物	$n(\text{油酸}) : n(\text{甾醇})$	温度/ $^{\circ}C$	时间/h	转化率/%	文献
CRL	2.8	植物甾醇油酸酯	3.8 : 1	46	28	91.5	[15]
	9.0	植物甾醇油酸酯	4 : 1	微波辅助	0.6	75.3	[26]
	8.9	植物甾醇油酸酯	5 : 1	30	24	80.0	[27]
	4.0	植物甾醇月桂酸酯	3 : 1	45	48	84.7	[28]
混合酶	5.0	植物甾醇油酸酯	3 : 1	35	24~72	90.8	[29]
固定化 CRL	12.7	植物甾醇酯	2 : 1	50	24	96.42~98.37	本文
	18.0	β -谷甾醇月桂酸酯	4 : 1	47	48	88.9	[11]
	10.0	植物甾醇月桂酸酯	2 : 1	50	24	87.9	[12]
	15.3	植物甾醇亚麻酸酯	2 : 1	55	15	93.5	[13]
固定化 Ylip	2.1	植物甾醇油酸酯	2 : 1	50	78	91.1	[14]
Novozyme 435	12.1	植物甾醇月桂酸酯	4 : 1	55	96	79.3	[30]
	71.1	豆甾醇油酸酯	3 : 1	80	48	88.7	[31]
	84.0	植物甾醇油酸酯	1 : 1	45	24	34.6	[32]

注: 催化剂用量以底物总质量计。

3 结论

以自制的磁性纳米复合材料固定化酶 (Fe_3O_4 -CS-DAC-SDS-CRL) 为催化剂,对木质甾醇油酸酯的酶法合成工艺条件进行优化,得到最佳工艺条件为催化剂用量 12.7% (以底物总质量计)、木质甾醇与油酸的物质的量比为 1 : 2 (木质甾醇质量浓度为 122.9 g/L)、50 $^{\circ}C$ 下反应 24 h,木质甾醇转化率达 96.42%。在添加 4A 分子筛条件下,木质甾醇转化率可提高到 98.37%。对于不同碳链长度的脂肪酸 (月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸) 或混合脂肪酸,木质甾醇酯的转化率可高达 96.42~98.37%。此外,固

定化酶具有良好的重复使用性,使用 5 次时,木质甾醇转化率仍保持在 82.45%。相比文献报道的植物甾醇酯酶法合成工艺,本法具有脂肪酸用量少、反应时间短、转化率高、酶制剂重复使用性能好等优点,本文可为酶法合成高品质木质甾醇酯提供参考。

参考文献:

- [1] MEL N S, HOORN J, EIJKELBOOM A. Effect of phytosterols and phytosterols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: An *in vitro* study[J]. Chemistry & Physics of Lipids, 2004, 127(3): 121-141.
- [2] PATEL M, THOMPSON P D. Phytosterols and vascular disease[J]. Atherosclerosis, 2006, 186: 12-19.
- [3] REN J M (任建敏). The bioactivities of the phytosterols in foods and

- their pharmacological actions[J]. Science and Technology of Food Chemistry (食品工业科技), 2015, 36(22): 389-399.
- [4] ZHANG Q (张强), ZHAO X H (赵新淮). Phytosterols and their anticancer effects[J]. China Oils and Fats (中国油脂), 2006, 31(10): 57-60.
- [5] ZHANG L, ZHANG T, CHANG M, *et al.* Effects of interaction between α -tocopherol, oryzanol, and phytosterol on the antiradical activity against DPPH radical[J]. LWT-Food Science Technology, 2019, 112: 108206.
- [6] COUDER G B D C, TAVAREZ S Z, MARTINEZ V M, *et al.* The phytosterol penicicanol inhibits cell proliferation and tumor growth in a colon cancer xenograft model[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 1341.
- [7] CUSACK L K, FERNANDEZ M L, VOLEK J S. The food matrix and sterol characteristics affect the plasma cholesterol lowering of phytosterol/phytostanol[J]. Advances in Nutrition, 2013, 4(6): 633-643.
- [8] ZHANG C R (张春如), LI T T (李婷婷), LI D (李丹), *et al.* Antioxidant effect of plant sterol ester and Vitamin E on corn oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association (中国粮油学报), 2018, 33(3): 58-63.
- [9] HE W S, WANG H H, JING Z M, *et al.* Highly efficient synthesis of hydrophilic phytosterol derivatives catalyzed by Ionic liquid[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2018, 95(1): 89-100.
- [10] HE W S, ZHU H Y, CHEN Z Y. Plant sterols: Chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(12): 118-123.
- [11] CHEN S N, LI J, FU Z J, *et al.* Enzymatic synthesis of β -sitosterol laurate by *Candida rugosa* lipase AY30 in the water/AOT/isooctane reverse micelle[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 192(2): 392-414.
- [12] ZENG C X, QI S J, LI Z G, *et al.* Enzymatic synthesis of phytosterol esters catalyzed by *Candida rugosa* lipase in water-in-[Bmim]PF₆ microemulsion[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(5): 939-946.
- [13] 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): 16-23.
- [14] CUI C X, GUAN N, XING C, *et al.* Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase Ylip2 for the biocatalytic synthesis of phytosterol ester in a water activity controlled reactor[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 146: 490-497.
- [15] WANG S S (王舒舒), ZHANG Y D (张议丹), SHI H G (石宏刚), *et al.* Optimization of *Candida rugosa* lipase-catalyzed synthesis of lignosterol oleate by response surface methodology[J]. Fine Chemical (精细化工), 2021, 38(10): 2089-2095.
- [16] WANG S S, LI S, LIU R T, *et al.* Immobilization of interfacial activated *Candida rugosa* lipase onto magnetic chitosan using dialdehyde cellulose as cross-linking agent[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 946117.
- [17] SHI H G, LI S, LIU J L, *et al.* Green and efficient synthesis of pine sterol oleate catalyzed by SO₃H-functionalized ionic liquid[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2022, 97(11): 3083-3090.
- [18] WANG L J (王丽君). Optimization of lipase catalyzed synthesis of phytosterol linolenate esters[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2015, 36(8): 77-81.
- [19] SHANG C Y, LI W X, ZHANG R F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on ZnO nanowires/macroporous silica composites for biocatalytic synthesis of phytosterol esters[J]. Materials Research Bulletin, 2015, 68: 336-342.
- [20] YANG F M, OYEYINKA S A, YING M. Novel synthesis of phytosterol ester from soybean sterol and acetic anhydride[J]. Journal of Food Science, 2016, 81: C1629-C1635.
- [21] ZHANG X Y, YU J, ZENG A W. Optimization and modeling for the synthesis of sterol esters from deodorizer distillate by lipase-catalyzed esterification[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017, 64(2): 270-278.
- [22] JIANG Z H (蒋振华), YU M (于敏), REN L W (任立伟), *et al.* Synthesis of phytosterol esters catalyzed by immobilized lipase in organic media[J]. Chinese Journal of Catalysis (催化学报), 2013, 34(12): 2255-2262.
- [23] YANG Y B, HE W S, JIA C S, *et al.* Efficient synthesis of phytosteryl esters using the Lewis acidic ionic liquid[J]. Journal of Molecular Catalysis A-Chemical, 2012, 357(10): 39-43.
- [24] HE B Q, DENG T, LI J X, *et al.* An innovative auto-catalytic esterification for the production of phytosterol esters: Experiment and kinetics[J]. RSC Advances, 2014, 119(4): 64319-64327.
- [25] QIU X, WANG Y, XUE Y, *et al.* Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 391: 123564.
- [26] PAN L J, LIAO J, JIANG S T, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of phytosterol oleic acid ester by microwave[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(8): 95-100.
- [27] KOBAYASHI T, OGINO A, MIYAKE Y, *et al.* Lipase-catalyzed esterification of triterpene alcohols and phytosterols with oleic acid[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014, 91(11): 1885-1890.
- [28] MIAO M, LIU H L, JIANG B, *et al.* Enzyme-catalyzed synthesis of plant sterol laurate in non-aqueous media using salt hydrate pairs and its characterisation[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 452-461.
- [29] VILLENEUVE P, TURON F, CARO Y, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2005, 37(1): 150-155.
- [30] 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.
- [31] WEBER N, WEITKAMP P, MUKHERJEE K D. Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(11): 5210-5216.
- [32] PAN X X, CHEN B Q, WANG J, *et al.* Enzymatic synthesizing of phytosterol oleic esters[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168 (1): 68-77.