

• 研究论文 •

基于壳聚糖/透明质酸钠胶体的温敏性 Pickering 乳液及其在生物催化中的应用

胡云, 翁闽闽, 夏春苗, 郭鑫淼, 霍慧敏, 程秀才, 张荣莉*

(安徽工程大学化学与环境工程学院, 芜湖 241000)

摘要:本文以负载脂肪酶的自组装胶体粒子为乳化剂,以十六烷为油相制备 Pickering 乳液,通过温度调控乳液的稳定性,提高脂肪酶的循环使用性能。首先,在荷正电的壳聚糖(CS)溶液中依次加入脂肪酶(CRL)和荷负电的天然大分子透明质酸钠(HA),利用壳聚糖与透明质酸钠之间的静电作用自组装形成脂肪酶@壳聚糖/透明质酸钠胶体(CRL@CS/HA CPs),将脂肪酶负载于胶体粒子内,提高 CRL@CS/HA CPs 的稳定性;以相变材料十六烷为油相,在高速均质作用下将 CRL@CS/HA CPs 组装到十六烷-水界面,构建温敏性 Pickering 乳液,应用于脂肪酶的界面催化;通过改变温度,诱导油相发生凝固-溶解实现破乳,回收 CRL@CS/HA CPs,提高脂肪酶的循环使用性能。

关键词:自组装胶体; 脂肪酶; Pickering 乳液; 温敏性乳液; 生物催化

Thermo-sensitive Pickering Emulsions Based on Chitosan/Sodium Hyaluronate Colloids and Their Application in Biocatalysis

HU Yun, WENG Min-min, XIA Chun-miao, GUO Xin-miao, HUO Hui-min,
CHENG Xiu-cai, ZHANG Rong-li*

(School of Chemical and Environmental Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: In this paper, a thermo-sensitive Pickering emulsion was prepared using self-assembled colloidal particles loaded-lipase as emulsifiers and *n*-hexadecane as oil phase. Through changing the temperature, the lipase at the interface of Pickering emulsion droplets is easy to be recycled. Firstly, lipase and negatively charged sodium hyaluronate (HA) were added into positively charged chitosan (CS) solution. The self-assembled lipase@chitosan/sodium hyaluronate colloidal particles (CRL@CS/HA CPs) are formed because of the electrostatic interactions between CS, HA and CRL. The lipase was loaded in the colloidal particles and its stability was improved. To construct a thermo-sensitive Pickering emulsion, the prepared CRL@CS/HA CPs was used as stabilizer, and *n*-hexadecane as oil phase. By changing the temperature, the oil phase undergoes solidification and dissolution, realizing the separation of oil and water and thus the recycling of CRL@CS/HA CPs.

Keywords: Self-assembled colloid; Lipase; Pickering emulsion; Thermo-sensitive emulsion; Biocatalysis

脂肪酶作为一种绿色的生物催化剂,在食品工业、油脂工业、饲料工业、医药工业、洗涤工业及生物能源等行业具有广泛的应用^[1~4]。与其他水

溶性酶在亲水环境中进行催化反应不同,脂肪酶需要通过与疏水环境接触激活它的催化活性,这与脂肪酶的结构有关。脂肪酶结构中包含亲水基

收稿:2022-07-12;修回:2022-09-10

基金项目:安徽省自然科学基金(2108085ME154),安徽工程大学校级科研项目(Xjky2022123)资助

作者简介:胡云,女,实验员,主要研究方向为 Pickering 乳液的界面催化

* 通讯联系人:张荣莉,女,教授,博士,主要研究方向为双亲性大分子多级组装。E-mail: zrl326@163.com

doi:10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.05.006

团和疏水基团两个部分,其活性位点大多被由疏水性的氨基酸残基所组成的 α -螺旋覆盖,形成具有保护作用的“lid”结构^[5,6]。当脂肪酶在接触相对疏水环境时,“lid”结构被打开,催化活性位点暴露^[7,8]。利用颗粒乳化剂制备 Pickering 乳液得到较大的油-水界面和良好的稳定性,通过油-水界面打开“lid”结构,激活脂肪酶的催化活性,在油-水界面生物催化领域具有广泛的应用。

Wu 等^[9]首次提出以疏水改性纳米 SiO_2 颗粒乳化剂代替表面活性剂形成稳定油包水(W/O)型 Pickering 乳液,将脂肪酶封装在内水相,与游离酶相比,脂肪酶的反应效率获得极大提高。Qi 等^[10]通过乙酸酐(AA)与邻苯二甲酸酐(PTA)的酯化反应对玉米淀粉进行改性,将改性的玉米淀粉超声分散在庚烷中,然后加入水通过均质形成 Pickering 乳液,通过调节 AA 与 PTA 的取代度获得亲水性与疏水性的淀粉颗粒,可以得到 O/W 或 W/O 型 Pickering 乳液体系,将其应用于 1-丁醇与乙酸乙烯酯的脂肪酶催化酯交换反应。研究表明:颗粒乳化剂具有低毒性、环境友好性、体相残留少、易于从两相分离回收以及可重复使用等优点^[11~13];制备的 Pickering 乳液体系具有较大的界面面积和良好的稳定性,不论是在 O/W 型 Pickering 乳液还是在 W/O 型 Pickering 乳液中脂肪酶均有很高的催化活性,在脂肪酶的油-水两相界面催化中引起广泛的关注^[14~19]。然而,脂肪酶自身具有双亲性,会自发从水相向油-水界面处富集。因此,很难通过简单的离心使脂肪酶与界面分离回收,降低了脂肪酶的重复利用率;此外,由于界面固体颗粒层的阻挡,传质效率会降低。

为了提高酶的循环使用性能,有学者将固定化酶技术与界面组装技术相结合,通过固定化技术将脂肪酶限定在双亲性微纳米颗粒中,在均质作用下组装在油-水界面得到 Pickering 乳液,将脂肪酶双重限域在油-水界面,强化两相界面的酶催化反应,解决脂肪酶的回收问题。目前最常用的双重限域脂肪酶方法主要有吸附-界面组装法^[20~24]、共价结合-界面组装法^[25,26]、包埋-界面组装法等^[27,28]。但是这些方法各有欠缺,如吸附-界面组装法中脂肪酶与载体之间的作用力较弱,易受外界不利因素(如酸碱、高温等)的影响,从而导致酶的泄漏及循环稳定性较低;共价结合-界面组装法所需的实验条件苛刻,容易导致脂肪酶的空

间结构发生改变,致使脂肪酶催化性能与循环性能发生下降^[29];包埋-界面组装法中脂肪酶的包埋固定化步骤与双亲性微纳米颗粒的合成步骤同时进行,双亲性微纳米颗粒合成条件苛刻,在一定程度上会影响脂肪酶的活性,且双亲性微纳米颗粒所用材料大多来自于合成的聚合物,生物相容性差,限制了在食品、化妆品和医药领域的应用。

大分子自组装是近年来常用的一种固定化酶的技术,在前期研究工作中,我们课题组利用天然大分子壳聚糖(CS)与脂肪酶(CRL)在水溶液中自组装形成壳聚糖/脂肪酶胶体(CRL/CS CPs),将脂肪酶包埋在纳米粒子内;在高速均质作用下将其组装在油-水界面形成 O/W 型 Pickering 乳液,对橄榄油具有良好的催化活性。这种方法将固定化酶的载体合成与固定化步骤分开,有利于脂肪酶活性的保持;天然大分子壳聚糖为脂肪酶提供良好的微环境,有效避免脂肪酶活性的降低。但是,在利用离心法破乳回收脂肪酶过程中,经 2 个循环后,水解率降至 87.70%;经 7 个循环后,水解率降至 52.58%^[30]。脂肪酶的循环使用性能较差,可能的原因如下:(1)离心过程中产生的热效应导致部分脂肪酶失活;(2)离心使部分脂肪酶聚集在一起,在循环使用时不能均匀分散,影响催化活性;(3)离心过程破坏了壳聚糖与脂肪酶之间较弱的静电作用力,造成酶的泄漏等。

本文以相变材料为油相构建温敏性 Pickering 乳液,通过温度改变分离回收负载脂肪酶的胶体粒子,提高脂肪酶的循环使用性能,具体过程如图 1 所示。首先在荷正电的壳聚糖溶液中依次加入脂肪酶和荷负电的天然大分子透明质酸钠(HA),利用壳聚糖与透明质酸钠之间的静电作用自组装形成脂肪酶@壳聚糖/透明质酸钠胶体(CRL@CS/HA CPs),将脂肪酶负载于纳米粒子内,提高 CRL@CS/HA CPs 的稳定性;以相变材料十六烷为油相,在高速均质作用下将 CRL@CS/HA CPs 组装到十六烷-水界面,构建温敏性 Pickering 乳液应用于脂肪酶的界面催化;通过改变温度,诱导油相发生凝固-溶解实现破乳,从而回收 CRL@CS/HA CPs,提高脂肪酶的循环使用性能。利用相变材料构建温敏性 Pickering 乳液方法简单,避免了对稳定剂进行温敏改性的复杂过程。

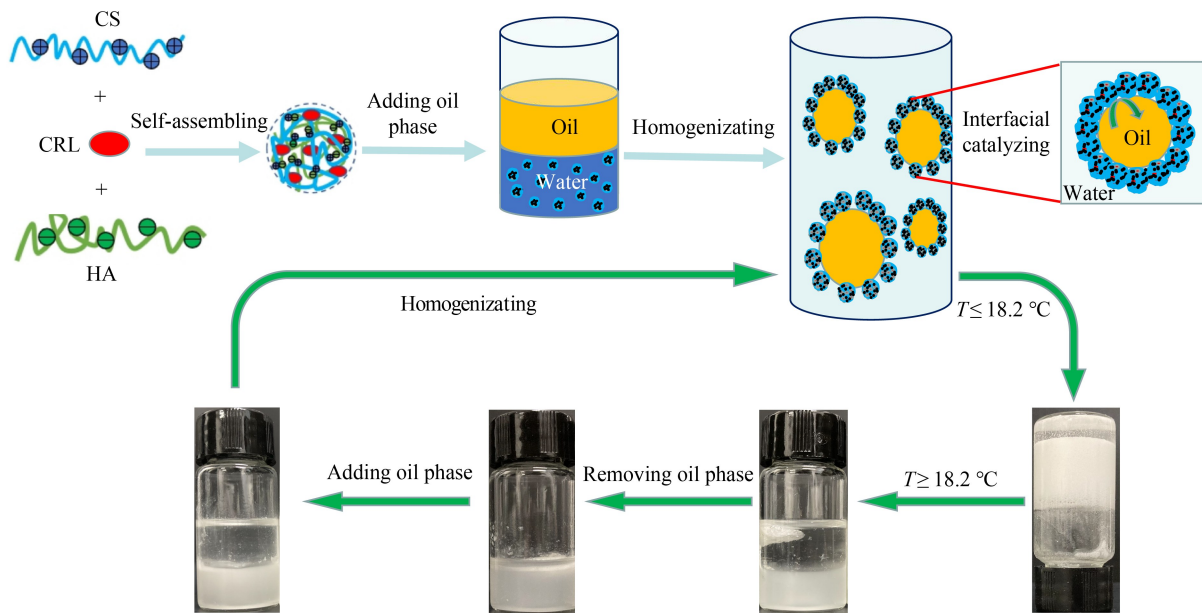


图 1 CRL@CS/HA CPs 的制备及其用于生物催化的路径

Figure 1 Preparation of thermo-sensitive Pickering emulsion based on CRL@CS/HA CPs and its application in the biocatalysis

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

壳聚糖、脂肪酶(源于褶皱假丝酵母)、正十六烷(熔点为 $18.2\text{ }^{\circ}\text{C}$)、橄榄油、冰乙酸等购置于阿拉丁试剂上海有限公司;透明质酸钠购于镇江东元生物科技有限公司,分子量约 10^5 Da 。

XBM-600 生物显微镜,上海炳宇光学仪器有限公司;UV2700 紫外分光光度计、FTIR-650S 傅里叶变换红外光谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司;Hitachi S-4800 场发射扫描电镜,日本日立公司;Leica DMI8 荧光显微镜,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;90Plus Particle size analyzer 纳米粒度/Zeta 电位分析仪,美国布鲁克海文仪器公司。

1.2 CRL@CS/HA CPs 的制备及表征

将 0.2 g 壳聚糖溶于 100 mL 1% 乙酸溶液中制备 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳聚糖水溶液;将 0.2 g 脂肪酶加入到 100 mL $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的透明质酸钠水溶液中,得到 CRL/HA 混合溶液。磁力搅拌下将 CRL/HA 混合溶液按体积比 ($V_{\text{CRL/HA}} : V_{\text{CS}} = 2 : 1$) 逐滴加到壳聚糖水溶液中,继续搅拌 1 h ,诱导壳聚糖与透明质酸钠通过分子间的弱相互作用力(氢键、静电、范德华力等)结合,用 KOH 溶液调混合溶液的 pH 值,诱导壳聚糖与透明质酸钠在水溶液中发生自组装,得到 CRL@CS/HA CPs,实

现脂肪酶的固定化。用荧光显微镜、发射扫描电镜和纳米粒度/Zeta 电位分析仪对 CRL@CS/HA CPs 进行表征。

1.3 Pickering 乳液的制备及催化性能

将 3 mL CRL@CS/HA CPs 水分散液与 3 mL 含有 5% 橄榄油的十六烷在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下混合,在 8000 r/min 高速均质作用下,使 CRL@CS/HA CPs 组装在油-水界面。用尼罗红对十六烷进行染色,染色后的油相与水相均质形成乳液,在荧光显微镜激发波长 488 nm 处对乳液液滴进行观察,表征 Pickering 乳液的类型。

将乳液置于摇床中,在一定温度下反应结束后,将乳液放入冰水浴中冷却;待十六烷完全凝固后,再将乳液置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热,使十六烷完全融化;取出上层有机相,利用铜皂显色法测定其脂肪酸含量,计算酶活与水解率。

研究 CRL@CS/HA CPs 制备条件、反应温度、反应时间、油-水体积比、均质速度等对 Pickering 乳液性能及催化活性的影响。

1.4 Pickering 乳液催化循环性能

Pickering 乳液的制备及对橄榄油的催化反应与 1.3 节相同。在进行下一个循环前加入新的含有橄榄油的十六烷,重复实验步骤,测定有机相脂肪酸含量,计算酶活与水解率。实验重复 10 次,研究 CRL@CS/HA CPs 的循环使用性能。

1.5 Pickering 乳液对不同油脂的催化性能

用大豆油、葵花籽油、玉米油、亚麻籽油、山茶油等 5 种不同的油脂依次替换油相中的橄榄油, Pickering 乳液的制备及其催化反应与 1.3 节相同, 研究 CRL@CS/HA CPs 对不同油脂的催化适用性。

1.6 CRL@CS/HA CPs 的储藏稳定性

将 CRL@CS/HA CPs 水分散液在 20 ℃ 放置 15 天, 每隔一天按照 1.3 节方法定时测试其对橄榄油的催化性能, 研究 CRL@CS/HA CPs 的储藏稳定性。

2 结果与讨论

2.1 CRL@CS/HA CPs 的制备及表征

溶液的 pH 值是影响自组装胶体结构和性能的关键因素, 进而影响 Pickering 乳液的性能和 CRL 在油水界面的催化性能。图 2 为 CRL@CS/HA CPs 在不同 pH 值下的平均粒径和 Zeta 电位。当 pH 值从 3.6 逐渐增大到 6.5 时, CRL@CS/HA CPs 的 Zeta 逐渐减小, 平均粒径逐渐增大; 当 pH 大于 6.5 时, 溶液变浑浊继而发生沉淀。Zeta 电位的减小主要是因为随着 pH 值降低, CRL@CS/HA CPs 表面荷正电的 $-NH_4^+$ 逐渐去质子化所导致; 同时, 去质子化后的 $-NH_4^+$ 变

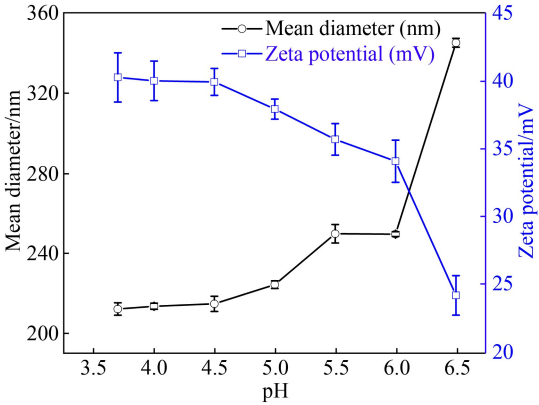


图 2 CRL@CS/HA CPs 溶液 (2.0 mg·mL⁻¹) 在不同 pH 值下的平均粒径和 Zeta 电位

Figure 2 Mean diameter and Zeta potential of CRL@CS/HA CPs in solutions (2.0 mg·mL⁻¹) at different pH values

为 NH_3 , 壳聚糖分子链疏水性增加, 有利于聚合物链之间的进一步聚集, 从而导致胶体粒径的增加。胶体粒径越大, 形成的乳液液滴粒径越大, 传质效率变低。在 pH 在 3.7~4.5 之间形成的胶粒大小接近, 因此, 在后续研究中选择 pH=4.5。

图 3 为在 pH=4.5 的溶液中 CS/HA CPs 和 CRL@CS/HA CPs 的粒径分布及 SEM 图。由图可以看出, CS/HA CPs 和 CRL@CS/HA CPs 均

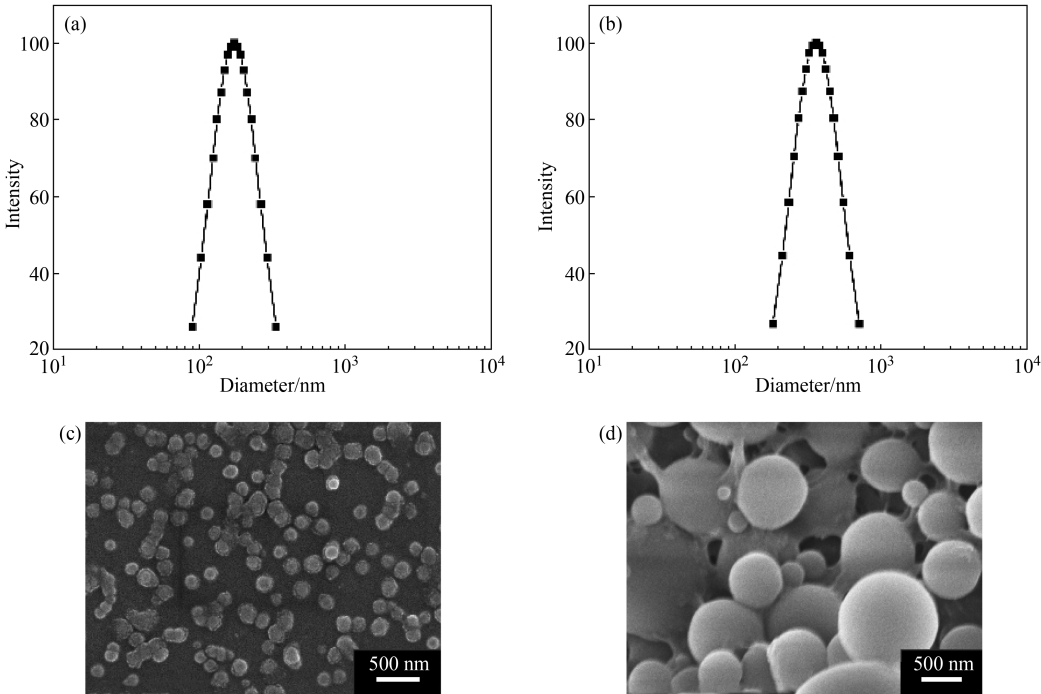


图 3 CS/HA CPs (a)和 CRL@CS/HA CPs (b) 在 pH 为 4.5 的水溶液中粒径分布, CS/HA CPs (c)和 CRL@CS/HA CPs (d)的 SEM 图

Figure 3 Size distribution of CS/HA CPs (a) and CRL@CS/HA CPs (b) in aqueous solution at pH=4.5; SEM images of CS/HA CPs (c) and CRL@CS/HA CPs (d)

为球形形貌;CS/HA CPs 的平均粒径为 150 nm 左右,而 CRL@CS/HA CPs 的平均粒径在 600 nm,表明壳聚糖、透明质酸钠和脂肪酶相互间的作用力较强,通过分子间静电作用,降低壳聚糖的带电性而增加疏水性,导致自组装形成 CRL@CS/HA CPs 粒径较大,进而导致乳液液滴粒径的增大。

2.2 Pickering 乳液的制备及催化性能

图 4 为 CS CPs、CRL/CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液的照片、光学显微镜图以及 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液的荧光显微镜图。由图 4(a)~4(c)可以看出,这三种乳化剂均能形成稳定的乳液。由图 4(d)可以看出由 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液为水包油型。

将制备的乳液应用于橄榄油的催化,结果如

表 1 所示。与 CS CPs 和 CRL/CS CPs 稳定的 Pickering 乳状液相比,CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液粒径、油水界面面积、乳化指数均介于两者之间,而 CRL@CS/HA CPs 的水解率与比活却高于前两者。由此可见,在加入阴离子 HA 后,能与壳聚糖、脂肪酶之间通过静电作用力发生自组装,故 CRL@CS/HACP s 粒径变大;HA 的强亲水性使胶体的疏水性下降,致使 Pickering 乳液液滴平均粒径变大,油水界面面积随之变小。通常乳液液滴粒径变大,传质效率会降低,进而影响催化效果,但 CRL@CS/HA CPs 乳液对橄榄油的水解率和酶比活性都较高,说明加入 HA 后,分子间的静电作用力加强,形成的 CRL@CS/HA CPs 结构更加稳定,在高速均质作用下,负载的脂肪酶不易泄漏,脂肪酶具有良好的稳定性。

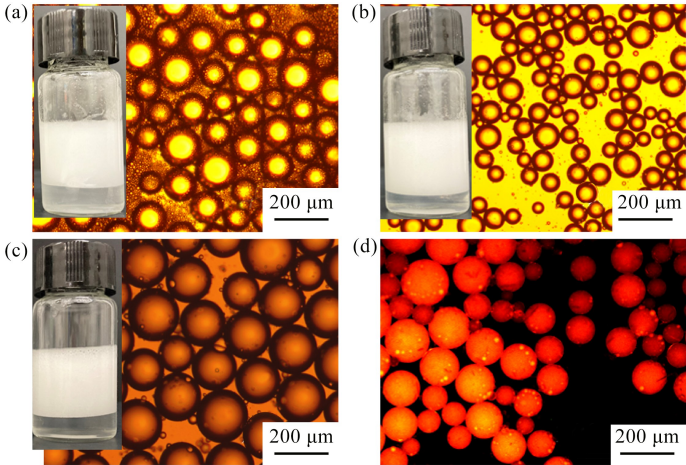


图 4 CS CPs (a), CRL/CS CPs (b)和 CRL@CS/HA CPs (c)稳定的 Pickering 乳液的数码照片和光学显微镜图像。CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液荧光显微镜图像(d)。溶液的 pH 值为 4.5,CS CPs、CRL/CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 浓度均为 2.0 mg•mL⁻¹,油与水的体积比为 1 : 1。

Figure 4 Digital photographs and optical microscope images of Pickering emulsions stabilized by CS CPs (a), CRL/CS CPs (b) and CRL@CS/HA CPs (c), respectively. Fluorescence microscope image of Pickering emulsions stabilized by CRL@CS/HA CPs (d). The concentrations of CS CPs, CRL/CS CPs and CRL@CS/HA CPs were 2.0 mg•mL⁻¹. The pH values of the solutions were 4.5. The V_{oil} : V_{water} was 1 : 1.

表 1 CS CPs、HA/CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 形成的 Pickering 乳液液滴的平均粒径、油水界面面积和乳化指数, Pickering 乳液的水解率和比活性。

Table 1 Mean diameters of the Pickering emulsion droplets, oil-water interface areas and emulsion indexes of the Pickering emulsion stabilized by CS CPs, HA/CS CPs and CRL@CS/HA CPs. Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsion interface.

稳定剂	平均粒径 (μm)	油水界面面积 (m ²)	乳化指数 (%)	水解率 (%)	比活 (U•mg ⁻¹)
CS CPs	210.91	0.0853	58.88	1.78	—
CRL/CS CPs	63.56	0.2832	81.00	87.34	1.66
CRL@CS/HA CPs	165.21	0.1089	74.88	92.19	1.75

注:生物催化反应温度为 37 ℃,反应时间为 60 min。

为了研究油水界面上的胶体形貌与乳液的关系,利用油相固定法,以苯乙烯代替十六烷制备 Pickering 乳液,通过自由基聚合使油相固定,通过 SEM 观察固化液滴的表面形貌,从图 5 中可以看出生成的乳液滴粒径为 $221.6\text{ }\mu\text{m}$ 。而 CRL@CS/HA CPs 吸附在油-水界面形成界面层,有利于 CRL@CS/HA CPs 的传质效率和循环性能的提高。

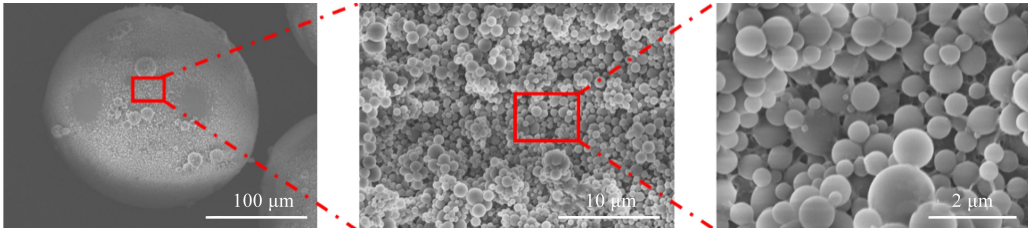


图 5 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液扫描电子显微镜图像。CRL@CS/HA CPs 浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶液的 pH 为 4.5,油水体积比为 1 : 1。

Figure 5 SEM images of Pickering emulsions stabilized by the CRL@CS/HA CPs with different magnifications. The concentration of CRL@CS/HA CPs solution was $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the pH values of the aqueous solutions were 4.5. $V_{\text{oil}}:V_{\text{water}}$ was 1 : 1.

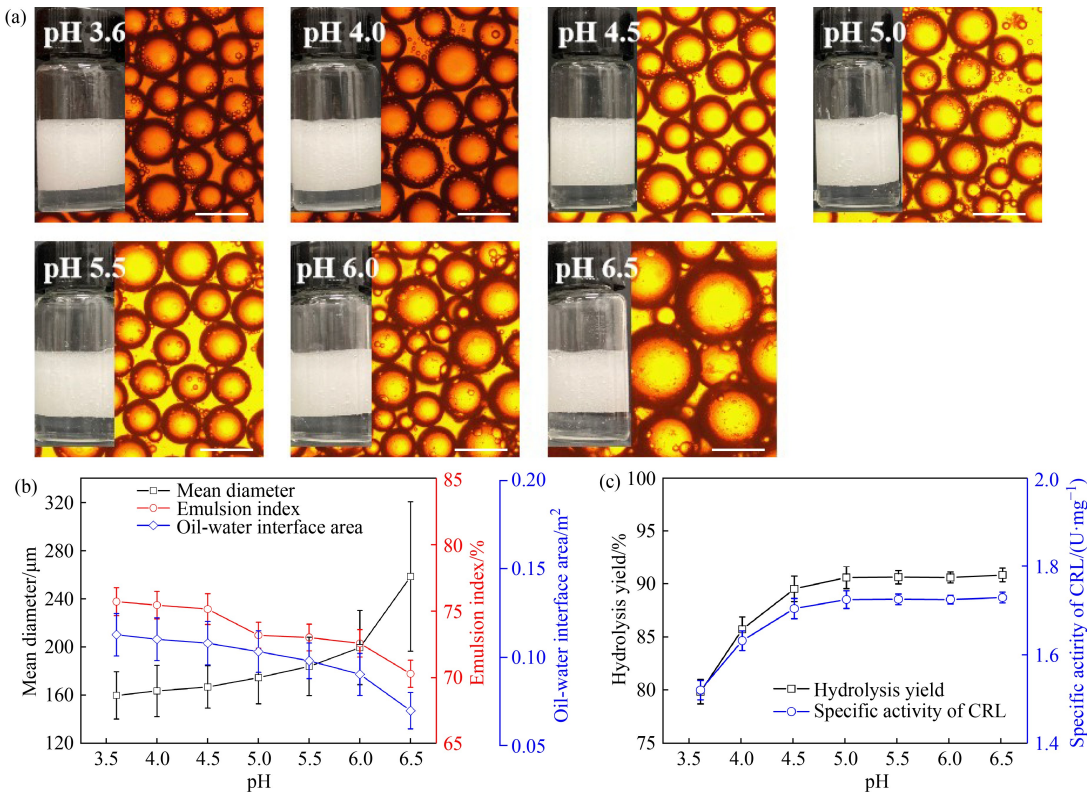


图 6 (a)不同 pH 值 Pickering 乳液的数码照片和光学显微镜图像,所有标尺为 $200\text{ }\mu\text{m}$; (b)平均粒径、油水界面面积和乳化指数; (c)不同 pH 的 Pickering 乳液催化水解率和酶的比活。催化反应温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应时间 60 min,油水体积比为 1 : 1。

Figure 6 (a) Digital and optical microscope images of Pickering emulsions at different pH values. All the scales are $200\text{ }\mu\text{m}$. (b) Mean diameter, oil-water interface area and emulsification index at different pH values. (c) Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsion at different pH values. The reaction temerature was $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the reaction time was 60 min. $V_{\text{oil}}:V_{\text{water}}$ was 1 : 1.

逐渐增加至 258.57 nm。Pickering 乳状液的油水界面面积从 0.1126 m² 逐渐降低到 0.069 m², Pickering 乳液的乳化指数从 75.70% 降低到 70.23%。

图 6 (c)为不同 pH 值下 Pickering 乳液对橄榄油水解率和乳液界面脂肪酶比活。由图可以看出,随着 pH 值从 3.5 增加至 4.5,橄榄油的水解率由 79.83% 上升至 89.54%, CRL 的比活性从 1.52 U·mg⁻¹ 上升到 1.70 U·mg⁻¹; 进一步增加溶液 pH, 橄榄油的水解率基本维持在 90.63%, 酶活维持在 1.72 U·mg⁻¹。由于 CRL@CS/HA CPs 表面带有的正负电荷改变了脂肪酶的催化微环境, 有效地提高了固定化酶的稳定性, 因此催化体系具有较大的 pH 适用范围。后续研究中溶液的 pH 值设置为 4.5。

2.4 V_{oil} : V_{water} 对 Pickering 乳液及其催化性能的影响

图 7(a)不同 V_{oil} : V_{water} 下 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液照片和光学显微镜图。可

以看出,V_{oil} : V_{water} 为 4 : 1 时,没有形成稳定的乳液;随着 V_{oil} : V_{water} 由 3 : 1 降低至 1 : 4,均可以形成稳定的乳液,且生成的乳液层高度逐渐下降,乳液滴的粒径逐渐降低。

图 7(b)为不同 V_{oil} : V_{water} 构建的乳液液滴平均粒径、油水界面面积和乳化指数。随着油水比从 3 : 1 降低至 1 : 4,乳液的平均粒径由 344.0 μm 下降至 57.4 μm, 乳化指数由 98.74% 下降至 48.47%, 乳液的界面面积由 0.0784 m² 增加至 0.1253 m²。随着 V_{oil} : V_{water} 的增加,乳液粒径随之增大,这是因为在油相体积分数较低时,体系中有大量的 CRL@CS/HA CPs 能够参与油相中油滴的稳定,形成多重屏障,所以形成的乳液液滴粒径较小;当油相体积分数逐渐增大,乳化剂浓度变小,液滴要通过增大自身体积来维持两相界面稳定性,乳液粒径便会增大。但油水体积比为 4 : 1 时,上层乳液几乎没有,底部为白色,这是因为当液滴粒径过大,油滴表面被大量的 CRL@CS/HA CPs 包围,形成的液滴因密度过大而下沉。

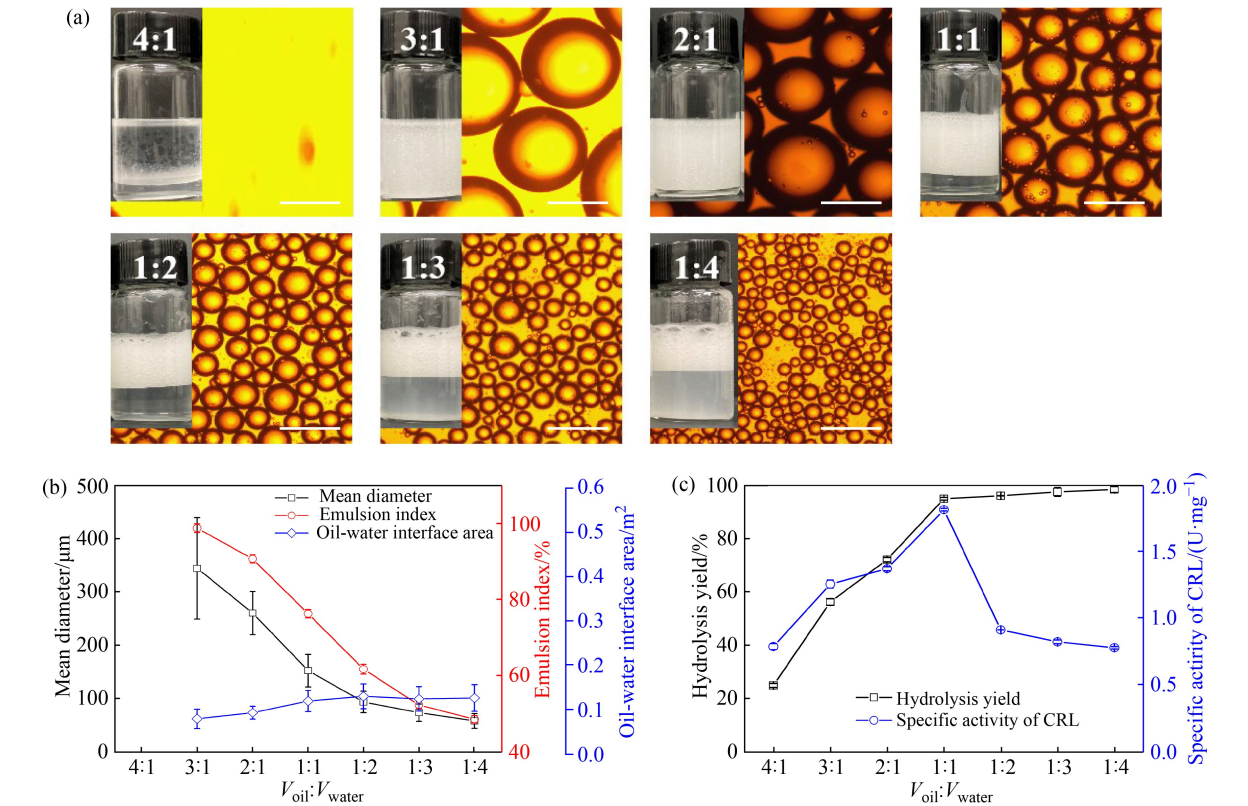


图 7 (a)不同油水体积比的 Pickering 乳液的数码照片和光学显微镜图像,标尺为 200 μm;(b)平均粒径、油水界面面积和乳化指数;(c)不同油水体积比的 Pickering 乳液催化水解率和酶比活。

Figure 7 (a) Digital photographs and optical microscope images of Pickering emulsions at different $V_{oil} : V_{water}$ ratios. All the scales are 200 μm;(b) The mean diameter of Pickering emulsion droplets, oil-water interface area and emulsification index at different $V_{oil} : V_{water}$ ratios;(c) Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsion at different $V_{oil} : V_{water}$ ratios.

图 7(c)为不同油水比的 Pickering 乳液对橄榄油催化率和乳液界面脂肪酶比活,由图可知,随着 $V_{oil} : V_{water}$ 从 4 : 1 降到 1 : 1 时,橄榄油水解率由 24.8% 上升至 95.2%,脂肪酶的比活由 $0.7886 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 上升至 $1.815 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$;当 $V_{oil} : V_{water}$ 从 1 : 1 上升至 1 : 4 时,水解率并没有发生显著提升,而脂肪酶的比活显著下降。一方面由于反应底物的减少和产物的增加限制了反应的正向发生,因此增加脂肪酶的浓度对催化反应的水解率提升不大。另一方面,研究者^[31]发现随着界面酶浓度的提升,到达临界值以上时,酶分子之间由于空间位阻效应会导致部分界面酶的催化活性不能完全发挥,这也是水解率增加不明显的一个原因。

2.5 均质速度对 Pickering 乳液及其催化性能的影响

图 8(a)为不同均质速度下 CRL@CS/HA CPs

稳定的 Pickering 乳液照片和光学显微镜图。可以看出,不同均质速度下均可以形成稳定的乳液,乳液层高度基本不变。

图 8(b)为不同均质速度下的 Pickering 乳液滴平均粒径、油水界面面积与乳化指数。可以看出,随着均质速度从 4000 r/min 增加到 12000 r/min,乳液的平均粒径由 $146.01 \mu\text{m}$ 降低至 $116.43 \mu\text{m}$,乳液的界面面积由 0.1233 m^2 增加至 0.1546 m^2 ,而溶液的乳化指数基本不变维持在 74.40%。

图 8(c)是不同均质速度下 Pickering 乳液对橄榄油水解率和乳液界面脂肪酶比活。由图可以看出,橄榄油水解率随着均质速度先上升后下降,在 8000 r/min 时达到最大值 90.1%,脂肪酶的比活性从 $1.59 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 上升到 $1.71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。虽然均质速度高有利于形成小的 Pickering 乳液,有利于使脂肪酶的催化面积增大,但是过高的转速下,

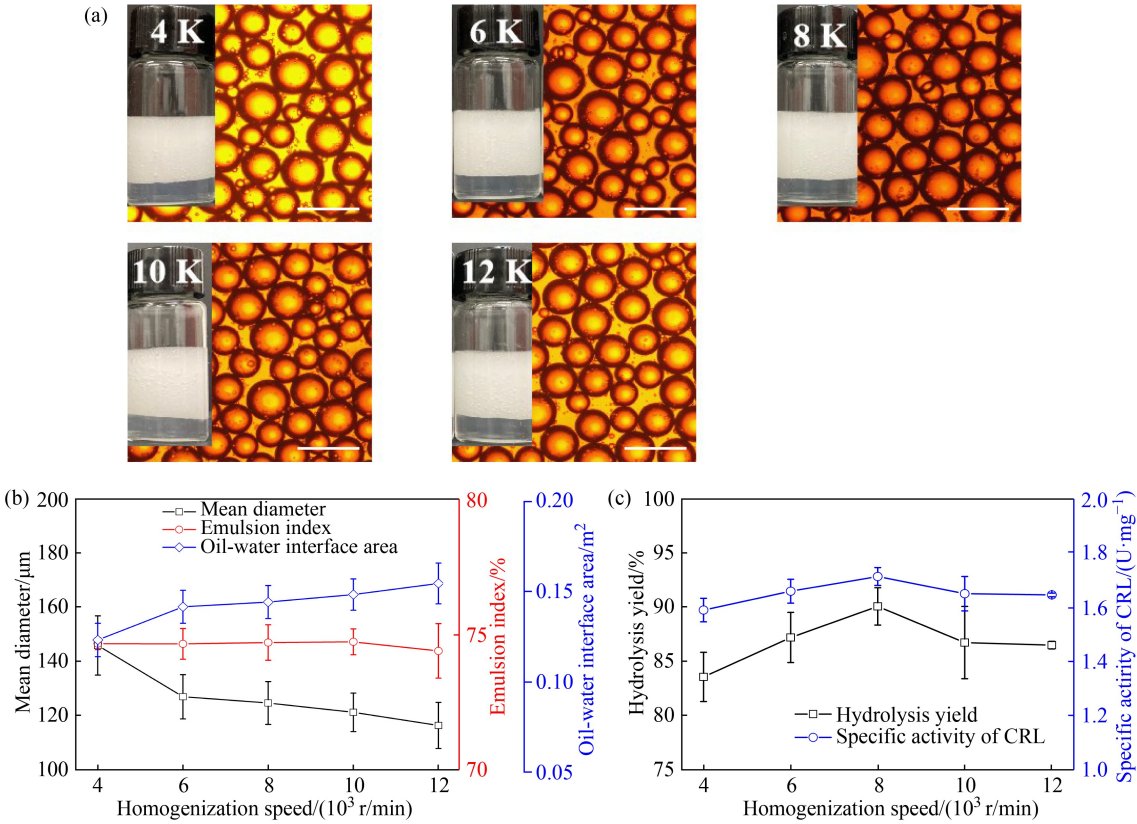


图 8 (a)不同均质速度的 Pickering 乳液的数码照片和光学显微镜图像,标尺为 $200 \mu\text{m}$; (b)平均粒径、油水界面面积和乳化指数; (c)不同均质速度的下 Pickering 乳液催化橄榄油的水解率和比活性。CRL@CS/HA CPs 溶液的 pH 值为 4.5, CRL@CS/HA CPs 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 油水体积比为 1 : 1, 催化反应温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 反应时间 60 min。

Figure 8 (a) Digital photographs and optical microscope images of Pickering emulsions at different homogenization rates. All the scales are $200 \mu\text{m}$. (b) Mean diameter of Pickering emulsion droplets, oil-water interface area and emulsification index. (c) Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsions at different homogenizing rates. The pH of solution was 4.5. The CRL@CS/HA CPs concentration was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. $V_{oil} : V_{water}$ was 1 : 1. The reaction temperature was $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and the reaction time was 60 min.

反应过程中的剪切力会破坏脂肪酶的结构,使其失去应有的活性,因此转速由 8000 r/min 继续增加至 12000 r/min, CRL@CS/HA CPs 的水解率由的 90.1% 下降至 86.5%, 脂肪酶的比活性从 $1.71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 下降到 $1.64 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。后续选择 8000 r/min 作为均质速度。

2.6 反应温度和反应时间对 Pickering 乳液及其催化性能的影响

图 9(a) 为不同反应温度下 Pickering 乳液对橄榄油的水解率和乳液界面脂肪酶的比活。由图可以看出,当反应温度由 20°C 升至 37°C , 脂肪酶水解率由 35.98% 升高至 92.19%, 比活性由 $0.6849 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 升高至 $1.748 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; 反应温度在 $37\sim 60^\circ\text{C}$ 范围内, 脂肪酶都具有较高的催化活性, 橄榄油的水解率与脂肪酶的比活性基本维持不变; 反应温度高于 60°C , 随着温度的上升, 橄榄油的水解度由 93.19% 下降至 75°C 时的 55%, 脂肪酶的比活性由 $1.773 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 下降至 75°C 时的 $1.048 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。以上结果表明, 该体系在较大的温度范围内都具有较高的催化活性。图 9(b) 为不同反应时间 Pickering 乳液对橄榄油的水解率。由图可以看出, 在反应时间在 $5\sim 360 \text{ min}$ 范围内, 随着反应时间的增加, 水解率逐渐提高, 30 min 时达到 78.73%, 60 min 时达到 89.64%, 之后水解率基本保持不变。反应初期催化反应速率较快是因为反应初期乳液中橄榄油浓度较大, 随着反应时间的延长, 橄榄油浓度逐渐降低, 催化反应渐缓。此外, 脂肪酶不仅可以催化橄榄油水

解成甘油与高级脂肪酸, 也能反向催化甘油与高级脂肪酸反应合成橄榄油, 因此, 当反应时间达到 150 min 时, 橄榄油的水解速率与橄榄油的合成速率相同, 反应达到平衡。

2.7 Pickering 乳液循环使用性能

图 10 为 CRL@CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 稳定的 Pickering 乳液循环使用性能对比。CRL@CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 在第一次循环时, 酶的比活很接近, 分别是 1.802 和 $1.774 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。CRL@CS/HA CPs 循环 10 次后, 酶的比活仍有 $1.064 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 酶的比活是初始比活的 57%; 而 CRL@CS CPs 在经过循环 7 次后相对酶活只有 $0.348 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 酶的比活是初始比活的 19.62%。这是由于添加了透明质酸钠后, 透明质酸钠分子与壳聚糖分子间的静电作用力有助于负载脂肪酶, 形成 CRL@CS/HA CPs 结构比 CRL@CS CPs 更稳定, 故表现出更好的循环使用性能。

通过对比分析, 添加了透明质酸钠后, 透明质酸钠分子与壳聚糖分子间的静电作用力有助于稳定的负载脂肪酶, 形成 CRL@CS/HA CPs 结构相比 CRL@CS CPs 更稳定, 表现出的循环使用性能更强。研究中也尝试用离心的方式破乳, 第 2 个循环时, 酶的比活降至 88.3%, 第 7 个循环时, 相对酶的比活降至 56.7%, 对比发现, 利用温敏特性回收酶效果比较好。

随循环次数的增加 Pickering 乳液对橄榄油水解率也在下降, 是因为在制备 Pickering 乳液的时, 需用高速均质机对其进行剪切, 操作过程中乳

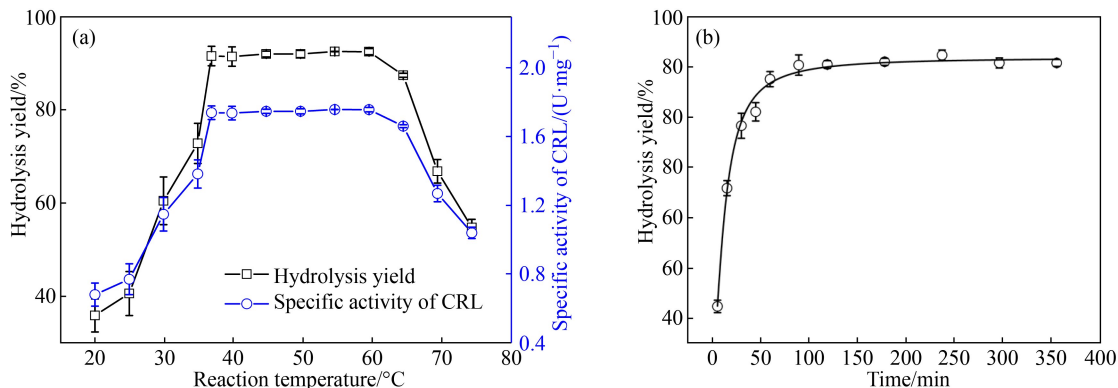


图 9 (a)不同催化反应温度下 Pickering 乳液对橄榄油的水解率和比活性;(b) 在不同反应时间下 CRL@CS/HA CPs 对橄榄油的水解率。CRL@CS/HA CPs 溶液的 pH 值为 4.5, CRL@CS/HA CPs 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 油水体积比为 1 : 1。

Figure 9 (a)Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsion for olive oil at different reaction temperatures; (b) Hydrolysis yield of Pickering emulsion at different time. The pH of solution was 4.5. The concentration of CRL@CS/HA CPs was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. $V_{\text{oil}} : V_{\text{water}}$ was 1 : 1.

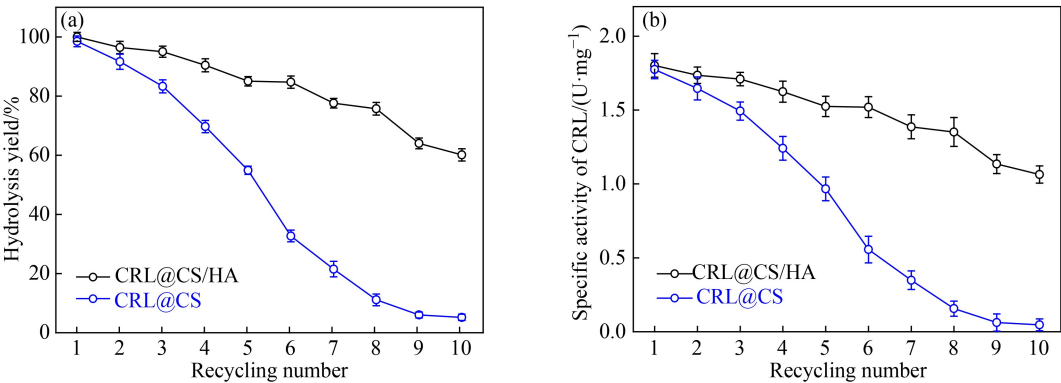


图 10 (a)两种 Pickering 乳液循环催化时对橄榄油的水解率;(b)两种 Pickering 乳液循环催化时酶的比活。CRL@CS CPs 和 CRL@CS/HA CPs 溶液的浓度为 2.0 mg·mL⁻¹,pH 值为 4.5,油水体积比为 1:1,反应温度为 37℃,反应时间为 120 min。

Figure 10 (a) Hydrolysis yield of two Pickering emulsions to cycling catalysis olive oil; (b)Specific activity of two Pickering emulsions to cycling catalysis olive oil. The concentration of CRL@CS CPs and CRL@CS/HA CPs was 2.0 mg·mL⁻¹. The pH of solution was 4.5. V_{oil}:V_{water} was 1:1. The reaction temperature were 37℃. The reaction time was 120 min.

液会粘在均质机上,酶有少量损失;其次,乳液分层后,对油相分离时,留在油水界面的酶也会有少量损失,故随着循环次数的增加,酶活会逐渐降低。

我们把本文中脂肪酶对橄榄油的水解率及酶的比活与其他类似文献进行了对比^[32~38],具体数据见表 2。通过对比可知,本文中用 CRL@CS/HA CPs 为稳定剂制备 Pickering 乳液进行界面催化是有一定优势的。

2.8 Pickering 乳液对不同油脂的催化性能及 CRL@CS/HA CPs 储存稳定性

用 CRL@CS CPs 在 Pickering 乳液界面催化水解大豆油、葵花籽油、玉米油、亚麻籽油、山茶油

等 5 种不同油脂,结果如图 11(a)所示。与催化橄榄油进行对比,CRL@CS CPs 对大豆油、葵花籽油、玉米油、亚麻籽油等 4 种油的催化率都达到 80%以上,对山茶油的催化率达 74.4%。研究中用的橄榄油是分析纯的,其他几种油购于当地超市,相比橄榄油纯度低一些,故催化水解率也低一点,但从结果也能看出,CRL@CS/HA CPs 对其他几种油脂的催化效果也很好,具有普适性。

将 CRL@CS/HA CPs 水分散液在 20℃放置 15 天,每隔一天测试其 Pickering 乳液对橄榄油催化性能,结果如图 11(b)所示。CRL@CS/HA CPs 第一天酶的比活是 1.720 U·mg⁻¹,设第一天水解率为 100%,CRL@CS/HA CPs 在第 5 天对橄榄油

表 2 几种不同方法固定化脂肪酶与催化橄榄油效果比较

Table 2 Comparison of immobilized lipase and catalytic effect of olive oil by several different methods		水解率 (%)	酶活 (U·mg ⁻¹)	参考文献
固定材料	固定方式			
CRL@CS/HA CPs Pickering emulsion	Adsorb	94.8	1.815	本文
FeCOC ₁₀ N 改性 SiO ₂ 颗粒	Adsorb	90.0	—	[32]
rGOB4@CRL	Adsorb	89.7	—	[33]
壳聚糖/膨润土	Adsorb	—	0.56	[34]
The silica-based materials: SnS23	Adsorb	—	0.268	[35]
改性核桃壳	Adsorb	—	0.166	[36]
Mesoporous fibrous silica nanoparticles (MSNPs)	Glutaraldehyde as a bifunctional cross linker	—	0.700	[37]
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂ /PAMAM	Glutaraldehyde as a bifunctional cross linker	—	0.395	[38]

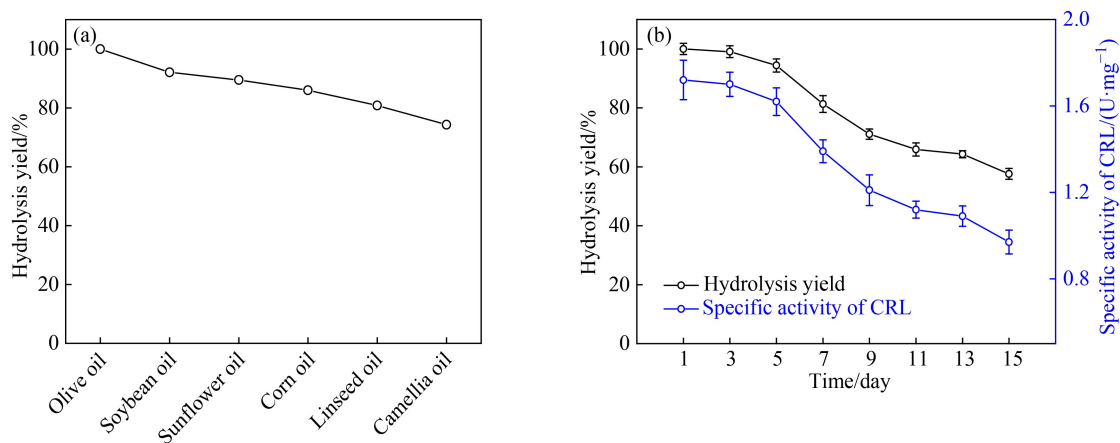


图 11 (a)在 Pickering 乳液界面 CRL@CS/HA CPs 对不同油脂的催化水解率;(b) CRL@CS/HA CPs 溶液存放时间对 Pickering 乳液催化率及酶活的影响。CRL@CS/HA CPs 溶液的浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 值为 4.5, 油水体积比为 1 : 1, 反应温度为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 反应时间为 60 min。

Figure 11 (a) Hydrolysis yield of CRL@CS/HA CPs for different oils at Pickering emulsion; (b) Hydrolysis yield and specific activity of Pickering emulsion at different storage time of CRL@CS/HA CPs. The concentration of CRL@CS/HA CPs was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The pH of solution was 4.5. $V_{\text{oil}} : V_{\text{water}}$ was 1 : 1. The reaction temperature were $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and the reaction time was 60 min.

的水解率是 94.4%，酶比活是 $1.621 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，随后变化幅度变大，第 15 天乳液对橄榄油的水解率是 57.6%，酶活降为 $0.970 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。这说明本文中用大分子自组装固定化酶的方法具有一定的使用寿命，但因为 CRL@CS/HA CPs 水分散液中含有一定量的壳聚糖、透明质酸钠等多糖分子，在常温下易滋生微生物，导致其变质，所以，这种方式固定的脂肪酶，在 5 天内的使用效果较好。

3 结论

本文以 CRL@CS/HA CPs 为稳定剂，以相变材料正十六烷为油相制备温敏性 O/W 型 Pickering 乳液，提高脂肪酶的循环使用性能。在 pH 值 4.5、 $V_{\text{oil}} : V_{\text{water}}$ 为 1 : 1、均质转速为 8000 r/min 条件下制备的 Pickering 乳液，当反应温度为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、反应 60 min，橄榄油水解率达到 94.8%，脂肪酶的催化活力能达到 $1.815 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ；通过简单的温度变化实现脂肪酶的分离回收以及重复利用，经 7 个循环后橄榄油的水解率为 76%，酶活是 $1.455 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，经 10 个循环后橄榄油的水解率仍能达到 57%，酶活还有 $1.091 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。此方法对其他油脂也具有较好的催化效果，具广泛的适用性，且 CRL@CS/HA CPs 在常温下存放 5 天，酶活性保持较好。该研究为 Pickering 乳液两相界面脂肪酶的回收提供了一种新的思路，在食品、

能源、精细化学品、医药等行业具有潜在应用价值。

参考文献：

- [1] 郭勇. 酶工程. 北京: 科学出版社, 2016, 224—263.
- [2] Fabrício, M.; Gomes, Ernandes, B. P.; Heizer, F.; Castro, D. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Bio-macromolecules*, 2004, 5(1), 17-23.
- [3] Parwani, L.; Bohra, Y.; Gupta, S.; Kumar, R. Effect of temperature on α -glucosidase, lipase inhibition activity and other nutritional properties of Moringa oleifera leaves: intended to be used as daily antidiabetic therapeutic food. *J. Food Nutr. Res.*, 2016, 55(1), 69-77.
- [4] Verri, F.; Diaz, U.; Macario, A.; Corma, A.; Giordano, G. Optimized hybrid nanospheres immobilizing rhizomucor Miehei lipase for chiral biotransformation. *Process. Biochem.*, 2016, 51(2), 240-248.
- [5] Li, D. M.; Wang, W. F.; Liu, P. Z.; Xu, L.; Faiza, M.; Yang, B.; Wang, L. Y.; Lan, D. M.; Wang, Y. H. Immobilization of candida antarctica lipase B onto ECR1030 resin and its application in the synthesis of n-3 PUFA-rich triacylglycerols. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, 2017, 119, 1700266.
- [6] Lee, D. G.; Kanagasabai, M. P.; Mir, K.;

- Hwang, S. ; Ahn, I. S. ; Lee, C. H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2009**, 57(1-4), 62-66.
- [7] Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6406-6436.
- [8] Rafael, C. R. ; Jose, J. V. O. ; Santos, J. C. S. ; Ángel, B. M. ; Andres, R. A. ; Oveimar, B. ; Claudia, O. ; Roberto, F. L. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Bio-technol. Adv.*, **2019**, 37, 746-770.
- [9] Wu, C. Z. ; Bai, S. ; Ansorge-Schumacher, M. B. ; Wang, D. Y. Nanoparticle cages for enzyme catalysis in organic media. *Adv. Mater.*, **2011**, 23(47), 5694-5699.
- [10] Qi, L. ; Luo, Z. G. ; Lu, X. X. Modulation of starch nanoparticle surface characteristics for the facile construction of recyclable Pickering interfacial enzymatic catalysis. *Green Chem.*, **2019**, 21(9), 2412-2427.
- [11] Marc, P. T. ; Loïc, L. ; Clacens, J. M. ; Campo, F. D. ; Véronique, N. R. Pickering interfacial catalysis for biphasic systems: from emulsion design to green reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(7), 2006-2021.
- [12] Feng, L. B. ; Wang, J. L. ; Chen, L. ; Lu, M. Z. ; Zheng, Z. ; Jing, R. ; Chen, H. L. ; Shen, X. B. A green strategy to enhance a liquid-liquid heterogeneous reaction with a magnetic recyclable Pickering emulsion. *ChemCatChem*, **2015**, 7(4), 616-624.
- [13] Zhang, W. J. ; Fu, L. M. ; Yang, H. Q. Micrometer-scale mixing with Pickering emulsions: biphasic reactions without stirring. *ChemSusChem*, **2014**, 7(2), 391-396.
- [14] Wei, L. J. ; Zhang, M. ; Zhang, X. M. ; Xin, H. C. ; Yang, H. Q. Pickering emulsion as an efficient platform for enzymatic reactions without stirring. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4(12), 6838-6843.
- [15] Cao, W. ; Huang, R. L. ; Qi, W. ; Su, R. X. ; He, Z. M. Self-assembly of amphiphilic Janus particles into monolayer capsules for enhanced enzyme catalysis in organic media. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7, 465-473.
- [16] Jiang, H. ; Li, Y. X. ; Hong, L. Z. ; Ngai, T. Submicron inverse Pickering emulsions for highly efficient and recyclable enzymatic catalysis. *Chem. Asian J.*, **2018**, 13, 3533-3539.
- [17] Qu, Y. N. ; Huang, R. L. ; Qi, W. ; Qu, Q. ; Su, R. X. ; He, Z. M. Structural insight into stabilization of Pickering emulsions with Fe_3O_4 @ SiO_2 nanoparticles for enzyme catalysis in organic media. *Part. Part. Syst. Char.*, **2017**, 34, 1700117.
- [18] Liu, L. ; Jiang, L. L. ; Xie, X. M. ; Yang, S. Amphiphilic carbonaceous microsphere-stabilized oil-in-water Pickering emulsions and their applications in enzyme catalysis. *ChemPlusChem*, **2016**, 81(7), 629-636.
- [19] He, X. ; Binks, B. P. ; Hu, J. G. ; Gates, I. ; Lu, Q. Y. Lipase-immobilized cellulosic capsules with water absorbency for enhanced Pickering interfacial biocatalysis. *Langmuir*, **2021**, 37(2), 810-819.
- [20] Dong, Z. ; Liu, Z. S. ; Shi, J. ; Tang, H. ; Xiang, X. ; Huang, F. H. ; Zheng, M. M. Carbon nanoparticle-stabilized Pickering emulsion as a sustainable and high-performance interfacial catalysis platform for enzymatic esterification/transesterification. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, 7, 7619-7629.
- [21] Meng, T. ; Bai, R. X. ; Wang, W. H. ; Yang, X. ; Guo, T. ; Wang, Y. L. Enzyme-loaded mesoporous silica particles with tuning wettability as a Pickering catalyst for enhancing biocatalysis. *Catalysts*, **2019**, 9, 78-89.
- [22] Wang, L. H. ; Liu, X. L. ; Jiang, Y. J. ; Liu, P. ; Zhou, L. Y. ; Ma, L. ; He, Y. ; Li, H. Y. ; Gao, J. Silica nanoflowers-stabilized Pickering emulsion as a robust biocatalysis platform for enzymatic production of biodiesel. *Catalysts*, **2019**, 9, 1026-1039.
- [23] Anja, H. ; Matthias, K. ; Anja, D. The impact of lipases on the rheological behavior of colloidal silica nanoparticle stabilized Pickering emulsions for biocatalytical applications. *Colloid Surf. B*, **2019**, 185, 110580.
- [24] Tong, W. G. ; Kuiren, C. ; Ziyue, L. ; Lianzhou, J. ; Dianyu, Y. ; Jinju, C. ; Wang, L. Q. Construction of an enzyme-Pickering emulsion catalytic system and its application in the interfacial catalytic reaction of rice bran oil deacidification. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2021**, 150, 111921.
- [25] Wang, J. H. ; Huang, R. L. ; Qi, W. ; Su, R. X. ; He, Z. M. Oriented enzyme immobilization at the oil/water interface enhances catalytic activity and

- recyclability in a Pickering emulsion. *Langmuir*, **2017**, 33(43), 12317-12325.
- [26] Wang, M.; Wang, M. J.; Zhang, S. M.; Chen, J. D. Pickering gel emulsion stabilized by enzyme immobilized polymeric nanoparticles: a robust and recyclable biocatalyst system for biphasic catalysis. *React. Chem. Eng.*, **2019**, 4(8), 1459-1465.
- [27] Wu, C. Z.; Bai, S.; Marion, B.; Ansorge, S.; Wang, D. Y. Nanoparticle cages for enzyme catalysis in organic media. *Adv. Mat.*, **2011**, 23, 5694-5699.
- [28] Sun, M. M.; Yin, W.; Chen, J. L.; Wang, W. H.; Guo, T.; Meng, T. Hollow colloidosomes with an enzyme confined in a porous shell as Pickering interfacial biocatalysts for efficient bioconversions. *Green Chem.*, **2021**, 23, 740-744.
- [29] Liu, J.; Lan, G. J.; Peng, J.; Li, Y.; Yang, C.; Li, Q. H. Enzyme confined in silica-based nanocages for biocatalysis in a Pickering emulsion. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 9558-9560.
- [30] Weng, M. M.; Xia, C. M.; Xu, S.; Liu, Q. Z.; Liu, Y.; Liu, H.; Huo, C. F.; Zhang, R. L.; Zhang, C. G.; Miao, Z. C. Lipase/chitosan nanoparticle-stabilized Pickering emulsion for enzyme catalysis. *Colloid Polym. Sci.*, **2022**, 300, 41-50.
- [31] Passas-Lagos, E.; Schüth, F. Amphiphilic Pickering emulsifiers based on mushroom-type Janus particles. *Langmuir*, **2015**, 31(28), 7749-7757.
- [32] 张杜炎. 开关型 Pickering 乳状液中酶催化反应研究. 无锡: 江南大学, **2018**.
- [33] Chen, M.; Wu, H. M.; Li, Z. T.; Wu, K. K.; Jiao, Y. P.; Zhou, C. R. Preparation of reduced graphene oxide porous beads for lipase immobilization and its application for oil adsorption and glycerolysis reaction *in situ*. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **2020**, 294, 109920.
- [34] 曹婕, 董华平. 壳聚糖/膨润土固定化脂肪酶水解橄榄油的研究. 绍兴文理学院学报, **2016**, 8(36), 77-81.
- [35] Parmegiani Marcucci, S. M.; Zanin, G. M.; Arroyo, P. A. Synthesis of SBA-15 and pore-expanded SBA-15 and surface modification with tin for covalent lipase immobilization. *Microporous. Mesoporous. Mat.*, **2022**, 337, 111951.
- [36] 韩本勇, 周志梅, 耿树香, 马婷, 宁德鲁, 赵鹏, 徐军伟, 余旭亚, 李涛. 改性核桃壳固定化脂肪酶研究. 江苏农业科学, **2020**, 48(2), 282-286.
- [37] Ali, Z. F.; Tian, L.; Zhao, P.; Zhang, B. L.; Ali, N.; Khan, M.; Zhang, Q. Y. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2016**, 134, 129-135.
- [38] Li, X.; Tian, L.; Ali, Z. F.; Wang, W. Y.; Zhang, Q. Y. Design of flexible dendrimer-grafted flower-like magnetic microcarriers for penicillin G acylase immobilization. *J. Mater. Sci.*, **2018**, 53, 937-947.