



(21) 申请号 202410223706.8

(22) 申请日 2024.02.29

(71) 申请人 山东德普新材料科技有限公司

地址 271200 山东省泰安市新泰市开发区  
光明路19号

(72) 发明人 卢伟 张新平 张弘治 贾东利  
尹东升 刘守国

(74) 专利代理机构 山东誉丰合创知识产权代理  
有限公司 37384

专利代理师 薛鹏喜

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用,属于生物工程领域。复合生物酶催化剂由扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比(4-6):(1-3):(2-4)的比例复配而成。该复合生物酶催化剂应用于酯交换法生产碳酸二甲酯工艺中,能够稳定提高碳酸二甲酯的收率和碳酸乙烯酯的转化率。

1. 一种复合生物酶催化剂,其特征在于,由扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比(4-6):(1-3):(2-4)的比例复配而成。

2. 权利要求1所述的复合生物酶催化剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将扩展青霉种子液接种至脂肪酶发酵培养基,进行发酵得到发酵液;将发酵液离心并收集上清液,将上清液浓缩干燥即得到扩展青霉脂肪酶;

(2) 将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶混合后,即得复合生物酶催化剂;

所述脂肪酶发酵培养基由如下重量百分比的成分组成:4-8%黄豆饼粉,0.5-3%玉米淀粉,1-4%洋甘菊花粉末,1-3%桦木树皮,0.2-0.6% $\text{NaNO}_3$ ,0.1-0.3% $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,0.015-0.2% $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,0.0015-0.1% $\text{MgSO}_4$ ,0.015-0.1% $\text{FeSO}_4$ ,0.025-0.03% $\text{CaCO}_3$ ,0.001-0.0015% $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,余量为水。

3. 根据权利要求2所述的复合生物酶催化剂的制备方法,其特征在于,所述洋甘菊花粉末的制备方法为:

将洋甘菊花烘干后加入液氮,研磨得到洋甘菊花粉末,所述液氮与洋甘菊花之间的重量比为(1-3):(8-10)。

4. 根据权利要求2所述的复合生物酶催化剂的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,发酵条件为:扩展青霉种子液的接种量为5-12%,在25-35℃、150-250rpm条件下,发酵24-48h。

5. 权利要求1-4任意一项所述复合生物酶催化剂在合成碳酸二甲酯中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述合成碳酸二甲酯的方法包括如下步骤:

将碳酸乙烯酯和甲醇混合,然后加入复合生物酶催化剂,进行反应得到碳酸二甲酯,所述复合生物酶催化剂与碳酸乙烯酯之间的重量比为(0.01-0.02):(1-1.5)。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述反应的条件为:在1-1.5atm、40-50℃条件下反应60-72h。

8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,碳酸乙烯酯和甲醇的摩尔比为(0.5-2):(2-6)。

## 一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体涉及一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 碳酸二甲酯(DMC)是一种环境友好的化合物,是近年来颇受重视的一种被广泛应用的基本有机合成原料。碳酸二甲酯不仅是无毒、环保、用途广泛的化工原料,而且是重要的有机合成中间体;另外,其自身可作为汽油添加剂替代甲基叔丁基醚,具有广阔的发展前景。作为汽油添加剂,碳酸二甲酯能够使汽车尾气中碳氢化合物、一氧化碳和甲醛的排放量明显降低;此外,碳酸二甲酯的水溶性相对较差,因此作为汽油添加剂可以避免汽油易溶于水以及污染地下水。

[0003] 随着碳酸二甲酯的需求量不断扩大,近年来碳酸二甲酯的合成途径也在不断开发,包括光气甲醇法、尿素醇解合成法、一步法和酯交换法。其中,光气甲醇法使用的原料剧毒,污染环境,早已被淘汰;尿素醇解法的产品单程产率太低,且主要在高压釜中进行,设备投资大,竞争力较差;二氧化碳与甲醇的一步法合成碳酸二甲酯的工艺因其原料转化率较低、受到热力学极大限制等问题,阻碍了该方法在工业上的大范围运用。酯交换法具有操作简单、反应时间短、产品易于分离、技术最成熟等优势,因此,酯交换法仍是目前工业生产中最常用的合成方法。目前,酯交换法合成碳酸二甲酯的合成路线还存在催化剂选择性差、活性不高、碳酸二甲酯产率低等缺点。

[0004] 酶作为一种生物催化剂,近年来已被人们广泛应用于食品生产与检测、环保技术、生物技术、生物医药等领域。目前研究和应用最广泛的脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一类能催化油脂和短链醇进行转酯化反应生成脂肪酸甲酯的生物催化剂,脂肪酶所介导的反应具有反应条件温和、醇用量小、产品易收集纯化、无污染物排放等优点,适合作为制备碳酸二甲酯的催化剂。发明专利CN103525798B公开了用于制备碳酸二甲酯的生物酶催化剂及其制备方法。该方法使用离子液体与脂肪酶作为催化剂,所得催化剂在酯化反应制备碳酸二甲酯的过程中催化效率高。但是该催化剂催化反应的碳酸丙烯酯转化率不稳定,且尚未解决生物酶催化剂活性低、碳酸二甲酯收率低的问题。因此,亟需开发研制一种用于酯交换法制备碳酸二甲酯的活性高、收率高的生物酶催化剂。

### 发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的是提供一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

本发明的第一方面,提供一种复合生物酶催化剂,由扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比(4-6):(1-3):(2-4)的比例复配而成。

[0007] 本发明的第二方面,提供上述复合生物酶催化剂的制备方法,包括如下步骤:

(1) 将扩展青霉种子液接种至脂肪酶发酵培养基,进行发酵得到发酵液;将发酵液离心并收集上清液,将上清液浓缩干燥即得到扩展青霉脂肪酶;

(2) 将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶混合后,即得复合生物酶催化剂;

所述脂肪酶发酵培养基由如下重量百分比的成分组成:4-8%黄豆饼粉,0.5-3%玉米淀粉,1-4%洋甘菊花粉末,1-3%桦木树皮,0.2-0.6%NaNO<sub>3</sub>,0.1-0.3%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.015-0.2%K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.0015-0.1%MgSO<sub>4</sub>,0.015-0.1%FeSO<sub>4</sub>,0.025-0.03%CaCO<sub>3</sub>,0.001-0.0015%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,余量为水。

[0008] 优选的,所述洋甘菊花粉末的制备方法为:

将洋甘菊花烘干加入液氮,研磨得到洋甘菊花粉末,所述液氮与洋甘菊花之间的重量比为(1-3):(8-10)。

[0009] 优选的,步骤(1)中,发酵条件为:扩展青霉种子液的接种量为5-12%,在25-35℃、150-250rpm条件下,发酵24-48h。

[0010] 本发明的第三方面,提供上述复合生物酶催化剂在合成碳酸二甲酯中的应用。

[0011] 优选的,所述合成碳酸二甲酯的方法包括如下步骤:

将碳酸乙烯酯和甲醇混合,然后加入复合生物酶催化剂,进行反应得到碳酸二甲酯,所述复合生物酶催化剂与碳酸乙烯酯之间的重量比为(0.01-0.02):(1-1.5)。

[0012] 优选的,所述反应的条件为:在1-1.5atm、40-50℃条件下反应60-72h。

[0013] 优选的,碳酸乙烯酯和甲醇的摩尔比为(0.5-2):(2-6)。

[0014] 本发明的有益效果:

(1) 本发明将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶复配得到复合生物酶催化剂,该复合生物酶催化剂应用于酯交换法生产碳酸二甲酯工艺中,能够稳定提高碳酸二甲酯的收率和碳酸乙烯酯的转化率。

(2) 本发明在脂肪酶发酵培养基中添加了洋甘菊花粉末和桦木树皮,将扩展青霉接种于该培养基所得的扩展青霉脂肪酶具有较高的酶活性,将所得的扩展青霉脂肪酶作为生物酶催化剂,进一步解决了酯交换法生产碳酸二甲酯工艺中酶类催化剂活性低的问题。

## 具体实施方式

[0016] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0017] 如前所述,现有技术中,酯交换法凭借其操作简单、反应时间短、产品易于分离、技术最成熟等优势,是目前最为广泛运用于工业生产的方法。然而,目前的酯交换法生产碳酸二甲酯还存在因催化剂不稳定、活性低而导致的转化率低和收率低的问题。

[0018] 基于此,本发明提供了一种复合生物酶催化剂及其制备方法和应用。该复合生物发酵剂具有较高的酶活性和稳定性,应用于酯交换法合成碳酸二甲酯时,能够提高酯交换法合成碳酸二甲酯中原料的转化率及产品的收率。发明人在酶的种类上,首先选择的便是能够催化酯化反应,且在工业方面运用广泛的脂肪酶。在查阅资料后,发明人得知,已有使用青霉脂肪酶作为催化剂催化碳酸二甲酯合成的技术,其中,将扩展青霉脂肪酶与离子液

体催化剂相复配后得到的催化剂的催化效果并不稳定,且尚未解决生物酶催化剂活性低、产品收率低的问题。因此,发明人以扩展青霉脂肪酶为基础,研制一种活性高、催化效果稳定且产品收率高的生物酶催化剂。

[0019] 为达到此目的,一方面,发明人在扩展青霉的脂肪酶发酵培养基中加入桦木树皮和洋甘菊花粉末,以提高扩展青霉脂肪酶自身的酶活力;其中,洋甘菊花中有效成分中包含萘磺酸钠,萘磺酸钠在培养基中与脂肪酶接触后,能够有效抑制脂肪酶的酶活性衰变;桦木树皮含碳量较高,能够为扩展青霉的发酵提供大量碳源,为扩展脂肪酶的制备提供营养。

[0020] 另一方面,在对扩展青霉脂肪酶自身的酶活性做出改善后,发明人将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶相复配,得到复合生物酶催化剂。金龟子绿僵菌发酵提取物与洋葱假单胞菌脂肪酶能够增强扩展青霉脂肪酶的稳定性的,从而提高所得复合生物酶催化剂的催化效果,提高碳酸二甲酯的收率和原料的转化率。

[0021] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0022] 以下各实施例和对比例中,所用材料的来源或制备方法如下:

扩展青霉购自中国典型培养物保藏中心,菌株编号为CCTCC AF 93007;金龟子绿僵菌购自中国典型培养物保藏中心,菌株编号为CCTCC CF 2008439;洋葱假单胞菌脂肪酶( $\geq 30\text{U}/\text{mg}$ )购自西格玛奥德里奇生化科技有限公司(Sigma-Aldrich),产品编号为62309。

[0023] 金龟子绿僵菌发酵提取物的制备方法如下:

(1) 将金龟子绿僵菌接种于PDA培养基,在 $25^{\circ}\text{C}$ 下培养7d,待其产孢子,即活化;将活化后的菌株的孢子粉接种至种子培养基,在 $25^{\circ}\text{C}$ 、15rpm条件下培养48h,即为金龟子绿僵菌发酵液;

PDA培养基的组成如下:1L质量浓度为20%的土豆汁、20g葡萄糖、20g琼脂;

种子培养基的组成如下:20g/L酵母膏、20g/L葡萄糖、1g/L磷酸二氢钾、1g/L七水硫酸镁、0.01g/L硫酸铁、50ml/L三醋酸甘油酯。

[0024] (2) 将步骤(1)的金龟子绿僵菌发酵液在 $5^{\circ}\text{C}$ 、5000rpm条件下离心5min得到上清液,将上清液浓缩干燥即得到金龟子绿僵菌发酵提取物。

[0025] 扩展青霉种子液的制备:将扩展青霉接种至PDB培养基中,在 $25^{\circ}\text{C}$ 、150rpm条件下培养24h,得到扩展青霉种子液。PDB培养基的制备:称取200g马铃薯,加水煮沸20min,双层纱布趁热过滤,往滤液中加入20g葡萄糖,蒸馏水定容至1000ml,  $121^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌20min。

[0026] 实施例1:碳酸二甲酯的制备。

[0027] 1. 复合生物酶催化剂的制备。

[0028] (1) 将扩展青霉种子液按照7%的接种量接种至脂肪酶发酵培养基,在 $27^{\circ}\text{C}$ 、200rpm条件下发酵36h得到发酵液,将发酵液在5000rpm条件下离心得到上清液,将上清液浓缩干燥后得到扩展青霉脂肪酶。

[0029] 脂肪酶发酵培养基由如下成分组成:5份黄豆饼粉,1份玉米淀粉,2份洋甘菊花粉末,2份桦木树皮,0.4份 $\text{NaNO}_3$ ,0.2份 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,0.1份 $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,0.05份 $\text{MgSO}_4$ ,0.002份 $\text{FeSO}_4$ ,0.01份 $\text{CaCO}_3$ ,0.0013份 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 。

[0030] (2) 将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比3:2:3的比例混合后,得到复合生物酶催化剂。

- [0031] 2. 酯交换法制备碳酸二甲酯。
- [0032] 将碳酸乙烯酯和甲醇按照摩尔比为1.5:4的比例放入反应装置,然后将复合生物酶催化剂放入反应装置中,在1.25atm、45℃条件下反应65得到碳酸二甲酯。所述复合生物酶催化剂与碳酸乙烯酯之间的重量比为0.015:1.125。
- [0033] 实施例2:碳酸二甲酯的制备。
- [0034] 1. 复合生物酶催化剂的制备。
- [0035] (1) 将扩展青霉种子液按照5%的接种量接种至脂肪酶发酵培养基,在25℃、150rpm条件下发酵24h得到发酵液,将发酵液在5000rpm条件下离心得到上清液,将上清液浓缩干燥后得到扩展青霉脂肪酶。
- [0036] 脂肪酶发酵培养基由如下成分组成:4份黄豆饼粉,0.5份玉米淀粉,1份洋甘菊花粉末,1份桦木树皮,0.2份NaNO<sub>3</sub>,0.1份Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.015份K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.0015份MgSO<sub>4</sub>,0.015份FeSO<sub>4</sub>,0.025份CaCO<sub>3</sub>,0.001份Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。
- [0037] (2) 将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比4:1:2的比例混合后,得到复合生物酶催化剂。
- [0038] 2. 酯交换法制备碳酸二甲酯。
- [0039] 将碳酸乙烯酯和甲醇按照摩尔比为0.5:2的比例放入反应装置,然后将复合生物酶催化剂放入反应装置中,在1atm、40℃条件下反应60h得到碳酸二甲酯。所述复合生物酶催化剂与碳酸乙烯酯之间的重量比为0.01):1。
- [0040] 实施例3:碳酸二甲酯的制备。
- [0041] 1. 复合生物酶催化剂的制备。
- [0042] (1) 将扩展青霉种子液按照12%的接种量接种至脂肪酶发酵培养基,在35℃、250rpm条件下发酵48h得到发酵液,将发酵液在5000rpm条件下离心得到上清液,将上清液浓缩干燥后得到扩展青霉脂肪酶。
- [0043] 脂肪酶发酵培养基由如下成分组成:8份黄豆饼粉,3份玉米淀粉,4份洋甘菊花粉末,3份桦木树皮,0.6份NaNO<sub>3</sub>,0.3份Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.2份K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.1份MgSO<sub>4</sub>,0.1份FeSO<sub>4</sub>,0.03份CaCO<sub>3</sub>,0.0015份Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。
- [0044] (2) 将扩展青霉脂肪酶、金龟子绿僵菌发酵提取物和洋葱假单胞菌脂肪酶按照重量比6:3:4的比例混合后,得到复合生物酶催化剂。
- [0045] 2. 酯交换法制备碳酸二甲酯。
- [0046] 将碳酸乙烯酯和甲醇按照摩尔比为2:6的比例放入反应装置,然后将复合生物酶催化剂放入反应装置中,在1.5atm、50℃条件下反应72h得到碳酸二甲酯。所述复合生物酶催化剂与碳酸乙烯酯之间的重量比为0.02:1.5。
- [0047] 对比例1:碳酸二甲酯的制备。
- [0048] 将实施例1中的复合生物酶催化剂替换为扩展青霉脂肪酶,并制备碳酸二甲酯;所述扩展青霉脂肪酶的制备方法同实施例1,其余制备方法和条件与实施例1一致。
- [0049] 对比例2:碳酸二甲酯的制备。
- [0050] 按照实施例1的方法制备复合生物酶催化剂和碳酸二甲酯,区别在于,本对比例的复合生物酶催化剂中不包含洋葱假单胞菌脂肪酶。
- [0051] 对比例3:碳酸二甲酯的制备。

[0052] 按照实施例1的方法制备复合生物酶催化剂和碳酸二甲酯,区别在于,本对比例的复合生物酶催化剂中不包含金龟子绿僵菌发酵提取物。

[0053] 对比例4:

按照实施例1的方法制备复合生物酶催化剂,区别在于,本对比例的脂肪酶培养基不包含洋甘菊花粉末和桦木树皮。

[0054] 对比例5:

按照实施例1的方法制备复合生物酶催化剂,区别在于,本对比例的脂肪酶培养基不包含桦木树皮。

[0055] 对比例6:

按照实施例1的方法制备复合生物酶催化剂,区别在于,本对比例的脂肪酶培养基不包含洋甘菊花粉末。

[0056] 试验例1:碳酸二甲酯的收率及反应物的转化率。

[0057] (1) 试验方法:

计算实施例1-3、对比例1-6所制备碳酸二甲酯的收率和碳酸乙烯酯的转化率,碳酸二甲酯的收率和碳酸乙烯酯的转化率的测定方法参考硕士学位论文《应用酯交换法高活性制备碳酸二甲酯的研究》中所记载的测定方法。

[0058] (2) 试验结果:

碳酸二甲酯的收率与碳酸乙烯酯的转化率如表1所示:

表1:酯交换法生产碳酸二甲酯的收率和转化率

	碳酸乙烯酯的转化率 (%)	碳酸二甲酯的收率 (%)
实施例 1	92.4	86.4
实施例 2	90.7	87.1
实施例 3	89.5	90.5
对比例 1	79.8	50.8
对比例 2	82.4	62.8
对比例 3	83.9	71.5

如表1所示,实施例1-3的碳酸乙烯酯转化率均高于88%,碳酸二甲酯的收率均高于86%,这说明本发明提供的复合生物酶催化剂针对生产碳酸二甲酯的反应具有较高的稳定性和催化能力;将实施例1-3的数据与对比例1-3相对比,可知在扩展青霉脂肪酶的基础上,添加金龟子绿僵菌发酵提取物与洋葱假单胞菌脂肪酶对提高催化剂稳定性、碳酸乙烯酯转化率和碳酸二甲酯收率上起到了协同增效的作用。

[0059] 试验例2:扩展青霉脂肪酶的酶活力测定。

[0060] 脂肪酶在一定条件下,能使甘油三酯水解成脂肪酸,甘油二酯,甘油单酯和甘油。所释放的脂肪酸可用标准碱溶液进行中和滴定,用酚酞指示剂指示反应终点,根据消耗的碱量,计算其酶活力。

[0061] 本对比例中酶活单位的定义:在温度为45℃,pH值为7.5的条件下,样品水解脂肪每分钟释放出的1 $\mu$ mol游离脂肪酸,即为1个脂肪酶活力单位(U)。

## [0062] (1) 试验方法:

设置试验组1-6,均取4ml橄榄油与PVA的乳化液加入到5mL、25mmol/L的磷酸盐缓冲液(PH7.5),45℃水浴预热5分钟,得到混合溶液。各试验组的处理方法如下:

分别取实施例1、对比例4-6在制备扩展青霉脂肪酶时所得上清液,用水将各上清液分散为相同质量浓度的扩展青霉脂肪酶的酶液;

试验组1:向混合溶液中加入1ml的实施例1所得扩展青霉脂肪酶的酶液;

试验组2:向混合溶液中加入1ml的对比例4所得扩展青霉脂肪酶的酶液;

试验组3:向混合溶液中加入1ml的对比例5所得扩展青霉脂肪酶的酶液;

试验组4:向混合溶液中加入1ml的对比例6所得扩展青霉脂肪酶的酶液;

试验组1-4各自设一个对照组,记为对照组1-4,对照组1-4的操作方法为:先加入15mL终止液再加1mL相应的扩展青霉脂肪酶的酶液。

[0063] 将上述试验组和对照组在45℃水浴的条件下反应15分钟,加入15mL 95%的乙醇终止反应。用0.05mol/LNaOH滴定样品和对照中生成的脂肪酸,计算消耗0.05mol/L的NaOH的量。

[0064] 酶活力的计算公式为:酶活力(U/mL) = (B-A) × C/0.05 × 50 × 1/15 × N

其中:

B:滴定试验组样品时消耗NaOH标准溶液的体积,mL;

A:滴定对照组样品时消耗NaOH标准溶液的体积,mL;

C:NaOH标准溶液浓度min/L;

0.05:NaOH标准溶液浓度换算系数;

50:0.05mol/LNaOH标准溶液1mL相当于脂肪酸50mM;

N:酶液的稀释倍数;

1/15:反应时间15min,折算为1min的系数;

(2) 试验结果:

各试验组扩展青霉脂肪酶的酶活力如表2所示。

[0065] 表2:扩展青霉脂肪酶的酶活力

	酶活力 (U/ml)
试验组 1	2234
试验组 4	1243
试验组 5	1482
试验组 6	1672

由表中数据可知,试验组1中扩展青霉脂肪酶的酶活力为2834U/ml,这说明实施例1所得的扩展青霉脂肪酶在45℃时具有较高的酶活力。进一步的,将试验组1的数据与试验组4-6的数据相比较,可以看出,在培养基中添加桦木树皮与洋甘菊花粉末后,能够显著提高所得扩展青霉脂肪酶的酶活力,同时,桦木树皮与洋甘菊花粉末在提高所得扩展青霉脂

肪酶活力方面起到了 $1+1>2$ 的协同增效作用。

[0066] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并非用以限制本发明实施应用,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何实施应用的修改、等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。