

# 聚苯乙烯微球固定化海洋脂肪酶 YS2071 及其性能研究

张士恒<sup>1,2</sup>, 孙 溢<sup>1</sup>, 孙晶晶<sup>1</sup>, 王 伟<sup>1</sup>, 刘均忠<sup>1</sup>, 郝建华<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部极地渔业重点实验室, 海洋国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 3. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

**摘要:**采用6种不同孔径和亲疏水性的聚苯乙烯微球,通过吸附法固定化脂肪酶YS2071,筛选得到最佳载体,对固定化条件进行了优化并对其性能进行了研究。结果表明:粒径范围0.6~1 μm的氨基聚苯乙烯微球B具有最佳的固定化效果,在酶质量浓度5 mg/mL、pH 10、固定化温度20℃、振荡转速250 r/min、吸附时间6 h条件下,酶活回收率达到42.82%;与YS2071脂肪酶游离酶相比,经固定化后的载体脂肪酶的温度稳定性、金属离子稳定性、有机溶剂稳定性、pH稳定性均明显增强;25℃存储30 d后,固定化酶酶活保留率比游离酶酶活保留率提高了15.09个百分点;固定化酶重复使用5次后,酶活保留率为63.77%。

**关键词:**聚苯乙烯微球;吸附法;固定化;脂肪酶;酶活回收率

中图分类号:Q939.9;O59 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)11-0099-06

## Polystyrene microspheres immobilizing marine lipase YS2071 and its properties

ZHANG Shiheng<sup>1,2</sup>, SUN Mi<sup>1</sup>, SUN Jingjing<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>,  
LIU Junzhong<sup>1</sup>, HAO Jianhua<sup>1,3</sup>

(1. Marine National Laboratory Marine Medicine and Biological Products Functional Laboratory, Key Laboratory of Polar Fisheries of the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Food College, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resource, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

**Abstract:** Six kinds of polystyrene microspheres with different pore sizes and hydrophobicities were used to immobilize lipase YS2071 by adsorption, and the optimal carrier was obtained. The immobilization conditions were optimized and the properties of immobilized lipase were studied. The results showed that the amino polystyrene microspheres B with particle size in the range of 0.6–1 μm had the best immobilization effect. Under the conditions of enzyme mass concentration 5 mg/mL, pH 10, immobilization temperature 20℃, rotational speed 250 r/min and adsorption time 6 h, the enzyme recovery was up to 42.82%.

Compared with YS2071 lipase free enzyme, the immobilized lipase had better temperature stability, metal ion stability, organic solvent stability and pH stability. After 30 d storage at 25℃, the retention rate of immobilized enzyme activity was 15.09 percentage points higher than that of free enzyme. Being reused for five times, the enzyme activity retention rate of immobilized enzyme was 63.77%.

收稿日期:2018-03-15;修回日期:2018-07-18

基金项目:国家自然科学基金-山东省联合基金(U1606403);青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2016ASKJ14)

作者简介:张士恒(1992),男,硕士研究生,研究方向为海洋微生物酶工程(E-mail) zhangshiheng802@163.com。

通信作者:郝建华,研究员,博士生导师(E-mail) haojh@ysfri.ac.cn。

**Key words:** polystyrene microsphere; adsorption method; immobilization; lipase; enzyme recovery

脂肪酶在许多行业中均有应用,其能够在多种化学反应中起到催化效果,但由于游离脂肪酶的诸多缺陷,比如稳定性差、利用成本高等,使其在应用上受到限制。为了使脂肪酶的利用效率更高,适用于工业化生产,研究者们常常采用固定化的方法来提高其稳定性。

物理吸附是酶固定化常用的方法之一<sup>[1]</sup>,具有载酶量高、利于维持酶分子空间构象等突出优势。微球作为固定化酶的载体,由于具有比表面积大、易于回收重复利用等优越性而得到广泛认可<sup>[2]</sup>,因此在为数不多的已实现工业化应用的商品固定化酶中,大部分都是利用微球载体通过吸附固定化酶。

在固定化脂肪酶的过程中,酶的活性、温度稳定性、pH 稳定性、有机溶剂耐受性等都会受到影响,这是由于酶蛋白的氨基酸残基、电荷状态等都会在固定化时发生改变;另外,与游离酶相比,固定化酶在催化时,从单一液相变成了固液两相状态,导致传质阻力和空间效应发生变化,也会影响酶学性质<sup>[3]</sup>。Dong 等<sup>[4]</sup>通过固定化方法制备得到米曲霉氨基酰化酶交联酶聚集体,在重复使用 10 次后,仍有 82.4% 酶活保留率;López - Serrano 等<sup>[5]</sup>研究显示,一些特定的种类酶的聚集体酶活损失几乎为零,而在一些低极性有机溶剂中,多数脂肪酶聚集体酶活性都能达到 75%;Yu 等<sup>[6]</sup>的研究中,制备得到了绿豆环氧化物水解酶交联酶聚体,其热稳定性、pH 稳定性和有机溶剂耐受性均优于游离酶。所以,为了

实现固定化酶的广泛应用,首先应该探究固定化酶与游离酶在性质上的区别。

海洋中蕴藏了丰富的生物资源,与陆地微生物产生的脂肪酶相比,海洋微生物产生的脂肪酶具备耐高低温、酸碱耐受性强和有机溶剂条件下依然能保持较高催化活性的优势,应用前景广阔<sup>[7]</sup>。前期已完成海洋微生物 YS2071 所产的脂肪酶的分离、纯化、制备等工作<sup>[8]</sup>,本文在此基础上建立了海洋脂肪酶 YS2071 的固定化方法,通过筛选载体微球,利用物理吸附法,通过单因素试验对固定化条件进行优化,并对固定化酶的性能进行了研究,为进一步研究固定化酶 YS2071 提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

海洋微生物 YS2071 脂肪酶,酶活力 600 U/mg,由黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室提供。对硝基苯基月桂酸酯(*p* - nitrophenyl laurate)、对硝基苯酚(*p*NP),购自 Sigma 公司,纯度 > 98%;曲拉通 Triton X - 100、柠檬酸、柠檬酸钠、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、甘氨酸、NaOH、无水乙醇、考马斯亮蓝 G250、甲醇、硫酸铜、氯化铁、氯化亚铁、硫酸锰、硫酸镁、硫酸铝、氯化锌、氯化钠、氯化钙、氯化钾、丙酮、异丙醇、正己烷、叔丁醇、甲苯、甲酸、乙酸等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。载体聚苯乙烯微球(见表 1)。

表 1 聚苯乙烯微球种类

载体	骨架结构	功能基团	粒径/ $\mu\text{m}$	孔径/nm	来源
聚苯乙烯微球	聚苯乙烯	-	6 ~ 6.9	-	上海百舜生物科技有限公司
羧基聚苯乙烯微球	羧基聚苯乙烯	羧基	6 ~ 6.9	-	上海百舜生物科技有限公司
氨基聚苯乙烯微球 A	氨基聚苯乙烯	氨基	6 ~ 6.9	-	上海百舜生物科技有限公司
氨基聚苯乙烯微球 B	氨基聚苯乙烯	氨基	0.6 ~ 1	-	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
PST	聚苯乙烯	-	30	30	国家生化工程技术中心
LX - 1000HA	伯氨基聚苯乙烯	伯氨基	150 ~ 300	20 ~ 40	西安兰晓科技有限公司

#### 1.1.2 仪器与设备

Infinite M200Pro 多功能微孔板检测仪,瑞士帝肯(Tecan)公司;SHAKER 型恒温培养摇床,上海市离心机械研究所;H1650 - W 台式高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发公司;LKB2219 恒温水浴锅,瑞典 BROMMA 公司;ORION Model 818 pH 计,美国奥立龙;HANPING 电子天平,上海精科天平公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 脂肪酶活力测定

脂肪酶活力测定参照文献[9]。

#### 1.2.2 蛋白质含量的测定

蛋白质含量采用 Bradford<sup>[10]</sup>方法测定。

#### 1.2.3 聚苯乙烯微球固定化脂肪酶

将载体微球在 4℃ 甲醇溶液中振荡处理 24 h,再用纯水洗涤,以去除微球中可能残留的有机溶

剂<sup>[11]</sup>。称取 10 mg 微球于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 一定质量浓度的酶液(一定 pH 的磷酸缓冲液溶解),混合后在一定温度和转速条件下振荡一定时间进行酶固定化。酶固定化完毕,于 12 000 r/min 条件下离心 10 min 进行固液分离,吸除上清液,载酶微球用 0.2 mol/L、pH 8.0 磷酸钠缓冲液洗涤 2 次至洗涤液中无酶蛋白为止。收集上清液与洗涤液,用 Bradford<sup>[10]</sup>方法测定溶液中蛋白质的质量浓度,根据物料衡算计算出固定化在载体上的酶量。

酶活回收率计算公式如下:

酶活回收率 = 固定化酶的活力/用于固定化的酶的总活力 × 100%

负载量计算公式如下:

$$L_{\text{负载量}} = (C_0V_0 - C_1V_1 - C_{\text{洗液1}}V_{\text{洗液1}} - C_{\text{洗液2}}V_{\text{洗液2}}) / M$$

式中: $L_{\text{负载量}}$ 为载体微球的负载量,mg/g; $C_0$ 为原酶液的蛋白质质量浓度,mg/mL; $V_0$ 为原酶液的体积,mL; $C_1$ 为上清液的蛋白质质量浓度,mg/mL; $V_1$ 为上清液的体积,mL; $C_{\text{洗液1}}$ 为第一次洗涤液的蛋白质质量浓度,mg/mL; $V_{\text{洗液1}}$ 为第一次洗涤液的体积,mL; $C_{\text{洗液2}}$ 为第二次洗涤液的蛋白质质量浓度,mg/mL; $V_{\text{洗液2}}$ 为第二次洗涤液的体积,mL; $M$ 为载体微球的质量,g。

#### 1.2.4 固定化脂肪酶的酶学性质测定

将固定化酶和游离酶置于 4 ~ 60 °C 的恒温水浴锅中处理 4 h,分析其温度稳定性;将固定化酶和游离酶置于 5 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{K}^+$  9 种金属离子中处理 4 h,分析其金属离子稳定性;将固定化酶和游离酶置于丙酮、异丙醇、正己烷、叔丁醇、甲苯、甲酸、甲醇、乙酸、乙醇 9 种有机溶液中处理 4 h,分析其有机溶剂稳定性;将固定化酶和游离酶置于 pH 3 ~ 12 的缓冲液中处理 4 h,分析其 pH 稳定性;将固定化酶与游离酶在 25 °C 放置 0 ~ 30 d,分析其储存稳定性;根据脂肪酶活力的测定方法<sup>[9]</sup>,将固定化酶与底物在最适反应条件下催化反应,测定酶活力,反应结束后,将固定化酶从反应体系中分离,重复上述反应,总计 10 次。以首次测定的酶活力为 100%,研究其重复使用性。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体微球的筛选

研究显示,在固定化的过程中,载体材料的选择对固定化的成败有着至关重要的作用,同时也会极大地影响固定化酶的酶活<sup>[12]</sup>,筛选合适的固定化载体,常常成为固定化过程中的研究热点。脂肪酶分子活性结构附近有几个疏水区域,而 6 种微球均含

有聚苯乙烯骨架<sup>[13]</sup>,所以脂肪酶在这 6 种聚苯乙烯微球上的固定化,主要是利用聚苯乙烯分子中苯环与酶分子疏水区域的相互作用来实现的<sup>[14]</sup>。

在酶质量浓度 2 mg/mL、pH 8、固定化温度 10 °C、振荡转速 150 r/min、吸附时间 6 h 的固定化条件下,不同聚苯乙烯微球固定化效果如表 2 所示。

表 2 不同聚苯乙烯微球固定化效果

载体	酶活回收率/%	负载量/(mg/g)
聚苯乙烯微球	10.757	22.463
羧基聚苯乙烯微球	21.714	24.114
氨基聚苯乙烯微球 A	9.701	21.360
氨基聚苯乙烯微球 B	30.126	32.184
PST	14.148	30.638
LX-1000HA	5.330	21.766

由表 2 可知,海洋脂肪酶 YS2071 在 6 种微球上的负载量都大于 20 mg/g,其中购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司的粒径为 0.6 ~ 1 μm 的氨基聚苯乙烯微球 B 负载量最高,为 32.184 mg/g,其固定化酶活回收率为 30.126%,对脂肪酶的吸附能力最强,因此选择阿拉丁的氨基聚苯乙烯微球 B 为固定化的载体进行固定化条件优化。

### 2.2 单因素试验

#### 2.2.1 酶质量浓度对固定化脂肪酶酶活力的影响

在 pH 8、固定化温度 10 °C、振荡转速 150 r/min、吸附时间 6 h 条件下,不同酶质量浓度对脂肪酶固定化效果的影响见图 1。

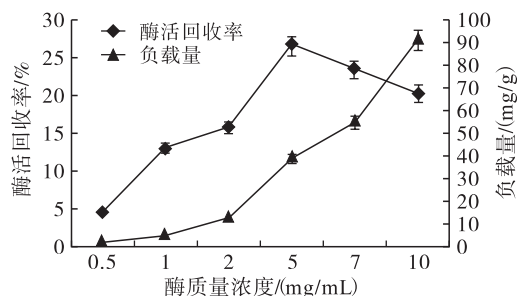


图 1 酶质量浓度对脂肪酶固定化效果的影响

由图 1 可知,随着酶质量浓度的增加,酶活回收率随之增加,当酶质量浓度达到一定程度,酶活回收率开始下降。这可能是由于载体微球的空间及负载量有限,当酶质量浓度很低时,载体表面的空间足够大并使酶能够充分与之结合,但当酶质量浓度上升至 5 mg/mL 时,微球能够负载的酶量达到上限,再持续增加酶质量浓度时,多余的酶分子无法继续与载体结合,反而由于酶分子过度集中,导致多个酶分子在空间上形成重叠,使酶活性部位的空间构型产生改变,其分子之间的空间位阻也变大,阻碍与底物

分子相结合,造成酶的回收率降低<sup>[15]</sup>。而且当酶质量浓度为 5 mg/mL 时,微球的负载量为 38.45 mg/g。综合酶活回收率和负载量考虑,选择 5 mg/mL 为最佳酶质量浓度。

### 2.2.2 pH 对固定化脂肪酶活力的影响

在固定化过程中,缓冲液的 pH 会改变酶分子和孔壁表面的离子化状态,影响酶与载体的结合程度,进而影响固定化酶的酶活力<sup>[16]</sup>。在酶质量浓度 5 mg/mL、固定化温度 10 °C、振荡转速 150 r/min、吸附时间 6 h 条件下,不同 pH 对脂肪酶固定化效果的影响见图 2。

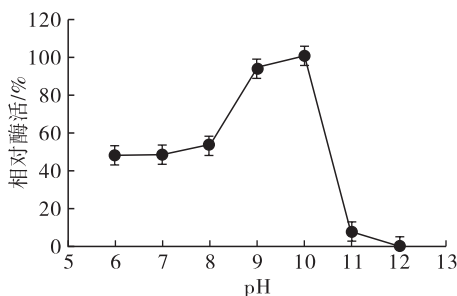


图 2 pH 对脂肪酶固定化效果的影响

由图 2 可知,随着 pH 的升高,相对酶活先增加后降低,pH 10 时,相对酶活最大。可能是过酸、过碱的环境会对部分酶的活性有一定的抑制作用,也可能是 pH 影响酶分子周围的微环境,在特定的 pH 环境下,酶分子处于适合与载体结合的状态,pH 过高或过低,酶分子均处于不适合与载体结合的状态。因此,选择 pH 10 为最佳缓冲液的 pH。

### 2.2.3 固定化温度对固定化脂肪酶活力的影响

酶是一种受温度影响很大的蛋白质<sup>[17]</sup>。在酶质量浓度 5 mg/mL、pH 10、振荡转速 150 r/min、吸附时间 6 h 条件下,不同固定化温度对脂肪酶固定化效果的影响见图 3。

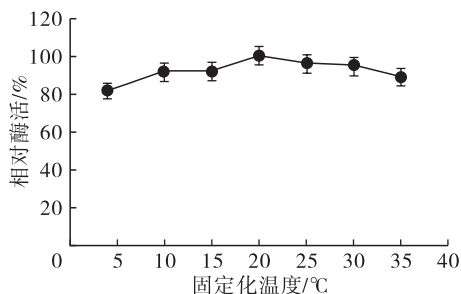


图 3 固定化温度对脂肪酶固定化效果的影响

由图 3 可知,相对酶活随着固定化温度的升高,先升高后降低,20 °C 时相对酶活最高。因此,将 20 °C 设为最佳的固定化温度。

### 2.2.4 振荡转速对固定化脂肪酶活力的影响

在加酶量 5 mg/mL、pH 10、固定化温度 20 °C、

吸附时间 6 h 条件下,不同转速对脂肪酶固定化效果的影响见图 4。

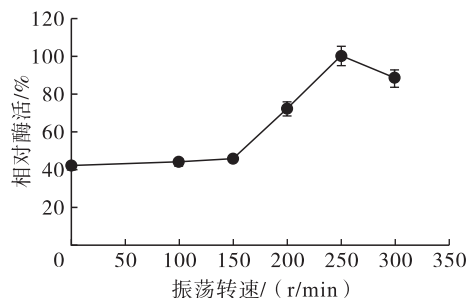


图 4 振荡转速对脂肪酶固定化效果的影响

由图 4 可知,当振荡转速从 0 r/min 逐渐增大时,相对酶活也随之增大,可能是因为当振荡转速较低时,脂肪酶与载体微球无法充分接触,使载体微球对酶的吸附不够充分,当振荡转速达到 250 r/min 时,相对酶活达到最大,随后相对酶活开始下降,原因可能是振荡速率太快,致使酶蛋白从载体微球结合位点脱落<sup>[18]</sup>。因此,最佳振荡转速为 250 r/min。

### 2.2.5 吸附时间对固定化脂肪酶活力的影响

吸附时间是影响固定化酶活和载体吸附蛋白量的重要因素之一。在加酶量 5 mg/mL、pH 10、固定化温度 20 °C、振荡转速 250 r/min 条件下,不同的吸附时间对脂肪酶固定化效果的影响见图 5。

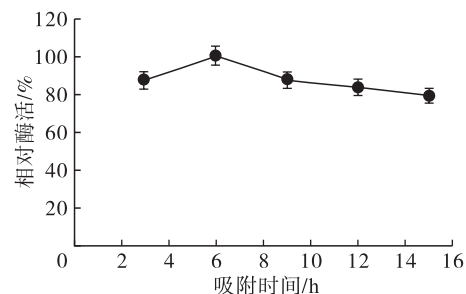


图 5 吸附时间对脂肪酶固定化效果的影响

由图 5 可知,3 ~ 6 h 时,随着吸附时间的延长,相对酶活逐渐增加,6 h 时相对酶活最大,可能是因为吸附时间较短,载体承载的酶量较少,传质的动力较大,吸附迅速<sup>[19]</sup>;在 6 ~ 15 h,随着吸附时间的延长,相对酶活逐渐降低,可能是长时间的吸附导致部分酶失活,并且载体的载酶量有限,吸附时间过长导致酶的空间增大,固定化酶的酶活位点被掩盖,相对酶活降低。因此,选择 6 h 为最佳吸附时间。

通过上述单因素试验,得到了脂肪酶固定化的最优条件为酶质量浓度 5 mg/mL、pH 10、固定化温度 20 °C、振荡转速 250 r/min、吸附时间 6 h,在此条件下,固定化酶的酶活回收率为 42.82%。

## 2.3 固定化脂肪酶性能研究

### 2.3.1 固定化酶与游离酶的温度稳定性(见图 6)

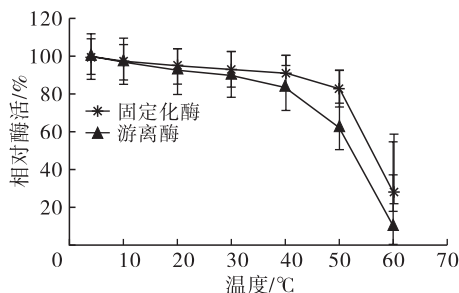


图6 固定化酶与游离酶的温度稳定性

由图6可知,两种状态的酶相对酶活均随着温度的升高而逐渐降低,而在4~40℃区间,相对酶活降低趋势较为平缓;40~60℃,相对酶活陡然下降。60℃时,固定化酶相对酶活为27.49%,而游离酶的相对酶活仅为9.86%。此试验结果显示固定化酶较游离酶有更好的温度稳定性,可能是由于酶和载体结合后,酶分子受到载体的保护,使其结构更加稳定。

2.3.2 固定化酶与游离酶的金属离子稳定性(见图7)

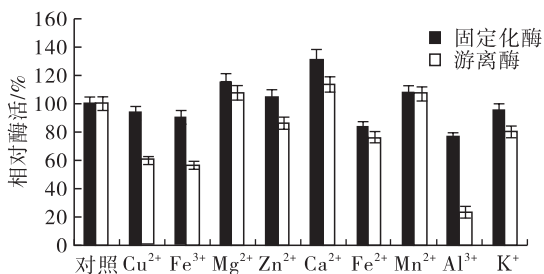
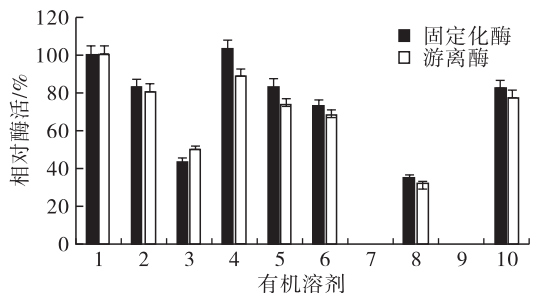


图7 固定化酶与游离酶的金属离子稳定性

由图7可知,置于金属离子中的脂肪酶的酶活与未经处理的酶相比均发生变化。与脂肪酶YS2071的游离酶相比,固定化酶对金属离子有更强的耐受性。由于酶吸附在载体上,使其有了更加稳定的空间构象,从而提高了对外界环境的耐受性,其中,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>能够在一定程度上提升酶活,K<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对酶影响效果不明显,而Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>对酶活有明显抑制作用。

2.3.3 固定化酶与游离酶的有机溶剂稳定性(见图8)



注: 1.对照; 2.丙酮; 3.异丙醇; 4.正己烷; 5.叔丁醇; 6.甲苯; 7.甲酸; 8.甲醇; 9.乙酸; 10.乙醇。

图8 固定化酶与游离酶的有机溶剂稳定性

由图8可知,在甲酸、乙酸体系中,固定化酶与游离酶的酶活均降低为零,可能是由于该酶在酸性条件下极易失活;在丙酮、异丙醇、甲苯、甲醇、乙醇的体系中,两种状态的相对酶活相差不大;而在正己烷、叔丁醇的环境下,固定化酶明显具有更高的稳定性。但叔丁醇的特殊性,其较高的空间位阻使其具有一定惰性,不易与其他物质发生反应,也正是因为如此,叔丁醇常被用作反应的溶剂<sup>[20]</sup>,这一试验结果对以后选择脂肪酶的反应体系也有很大帮助。

2.3.4 固定化酶与游离酶的pH稳定性(见图9)

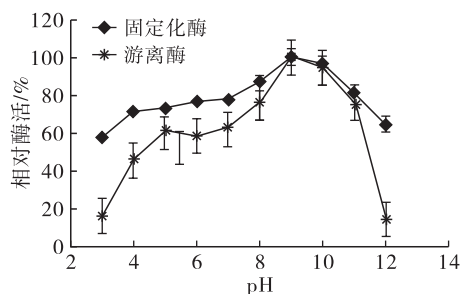


图9 固定化酶与游离酶的pH稳定性

由图9可知,两种状态酶的相对酶活均随着pH的增加呈先增加再减小的趋势,pH9时,两者相对酶活最高。当pH10~11时两种状态酶的相对酶活差异较小,pH3~8、pH12时,游离酶的相对酶活明显低于固定化酶,与游离酶相比,固定化酶对酸及碱的耐受性明显增强,且固定化酶的稳定性优于游离酶的稳定性,原因可能是酶分子与载体的结合后,使得分子构象更加稳定,进一步提高了酶的稳定性。

2.3.5 固定化酶与游离酶的储存稳定性(见图10)

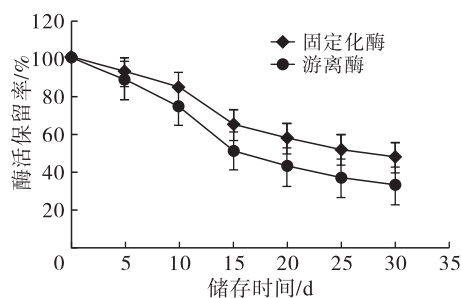


图10 固定化酶与游离酶的储存稳定性

由图10可知,两种状态下酶的酶活保留率均随着储存时间的延长而降低,而相比于游离酶,固定化酶的酶活保留率下降的趋势更加缓慢。储存30d后,固定化酶仍有47.24%酶活保留率,而游离酶的酶活保留率只剩32.15%。该试验结果显示,固定化后的脂肪酶YS2071与游离酶相比较,储存稳定性明显提升。

2.3.6 固定化酶的重复使用性

固定化的主要目的是设计可重复使用的生物催化

剂,固定化酶的制备不仅可提高其操作稳定性,还可重复回收利用,使固定化酶的使用成本极大降低,将固定化脂肪酶重复催化 10 批次,结果如图 11 所示。

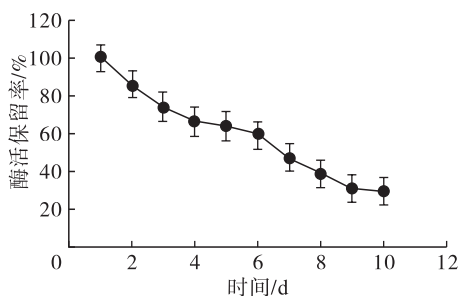


图 11 固定化酶的重复使用性

由图 11 可知,固定化酶重复利用 5 次后,酶活保留率为 63.77%,重复催化 10 次后,酶活保留率仍有 29%。试验结果表明,该固定化酶具有很好的重复使用性,适用于工业化的重复回收利用和多批次操作。

### 3 结论

对 6 种不同种类的聚苯乙烯微球进行脂肪酶 YS2071 固定化,通过筛选,确定粒径范围为 0.6 ~ 1  $\mu\text{m}$  的氨基聚苯乙烯微球 B 为最佳载体,对固定化过程中酶质量浓度、pH、固定化温度、振荡转速及吸附时间进行条件优化,最终确定脂肪酶固定化的最优条件为酶质量浓度 5 mg/mL、pH 10、固定化温度 20  $^{\circ}\text{C}$ 、振荡转速 250 r/min、吸附时间 6 h,在该条件下,酶活回收率为 42.82%。

与 YS2071 脂肪酶游离酶相比,经固定化后的脂肪酶的温度稳定性、金属离子稳定性、有机溶剂稳定性、pH 稳定性均明显增强。其中,在正己烷、叔丁醇的体系下,固定化酶的稳定性明显提高。储存 30 d 后,固定化酶酶活保留率比游离酶酶活保留率提高了 15.09 个百分点;固定化酶重复使用 5 次后,酶活保留率为 63.77%,重复使用 10 次后,酶活保留率为 29%。脂肪酶 YS2071 经固定化后,稳定性增强,具有良好的操作性,可进一步进行应用研究。

### 参考文献:

[1] 俞宏峰,孙志浩,郑璞,等. 树脂吸附法制备固定化乳糖酶及其操作稳定性的研究[J]. 离子交换与吸附, 2006, 22(5): 423 - 428.

[2] 胡友根,周志平,盛维琛. 多孔苯乙烯-二乙烯基苯共聚物微球的磺化及其对牛血清蛋白的吸附[J]. 离子交换与吸附, 2010, 26(4): 334 - 343.

[3] 冉凡娇. Bohai sea-9145 重组脂肪酶发酵条件优化、制备及固定化酶研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2016.

[4] DONG T, ZHAO L, HUANG Y, et al. Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive[J].

Bioresour Technol, 2010, 101(16): 6569 - 6571.

[5] LÓPEZ - SERRANO P, CAO L, VAN RANTWIJK F, et al. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases[J]. Biotechnol Lett, 2002, 24(16): 1379 - 1383.

[6] YU C Y, LI X F, LOU W Y, et al. Cross-linked enzyme aggregates of mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides[J]. J Biotechnol, 2013, 166(1/2): 12 - 19.

[7] JAEGER K E, EGGER T, EIPPER A, et al. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55: 519 - 530.

[8] 张权. 海洋微生物 YS2071 脂肪酶的纯化、酶学性质和固定化研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2014.

[9] 姜峻颖,马子宾,孙晶晶,等. 海洋脂肪酶 YS2071 的固定化及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(6): 41 - 48.

[10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. Anal Biochem, 1976(1/2): 248 - 254.

[11] 樊亚超,张松平,马光辉,等. 聚苯乙烯微球吸附脂肪酶催化油酸环氧化的研究[J]. 离子交换与吸附, 2013, 29(3): 200 - 210.

[12] 牛亚楠,侯红萍. 固定化酶载体的研究进展[J]. 酿酒科技, 2011(9): 97 - 99.

[13] WANNERBERGER K, ARNEBRANT T. Comparison of the adsorption and activity of lipases from *Humicola lanuginosa* and *Candida antarctica* on solid surfaces[J]. Langmuir, 1997(3): 3488 - 3493.

[14] SILINA Y E, KUCHMENKO T A, KORENMAN Y I, et al. Use of a complete factorial experiment for designing a gas sensor based on extracts of *Pleurotus ostreatus* mycelium Mushroom[J]. J Anal Chem, 2005, 60(7): 678 - 683.

[15] 王秋雨,钦传光,张秋禹,等. 自组装磁性聚苯乙烯微球固定化木瓜蛋白酶[J]. 应用化学, 2009, 26(5): 557 - 561.

[16] 张育淇,刘晓贞,李云,等. 氨基功能化大孔  $\text{SiO}_2$  固定化漆酶[J]. 宁波大学学报(理工版), 2015(2): 108 - 113.

[17] 刘媛媛,郑永杰,田景芝. 改性硅藻土对脂肪酶固定化研究[J]. 化学工程师, 2014, 28(3): 14 - 17.

[18] 钱俊青,蒋盛蓝,秦德怀,等. 214 型离子交换树脂固定化假丝酵母脂肪酶的研究[J]. 浙江工业大学学报, 2013, 41(3): 244 - 247.

[19] 刘自琴. 脂肪酶和胰蛋白酶的固定化及共固定化研究[D]. 广州:华南理工大学, 2012.

[20] 辛嘉英,柳眉,张蕾,等. 有机相脂肪酶催化合成阿魏酸乙酯[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 137 - 140.