

徐珊, 李任强, 张继福, 等. 孵育对环氧树脂固定化脂肪酶的稳定性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 61-67.
XU Shan, LI Renqiang, ZHANG Jifu, et al. Effect of incubation on stabilization of lipase immobilized by epoxy resin[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(3): 61-67.

孵育对环氧树脂固定化脂肪酶的稳定性研究

徐 珊¹, 李任强¹, 张继福², 张 云³, 孙爱君³, 胡云峰³

(1 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632; 2 广东省中医院, 广东 广州 510120; 3 中国科学院 南海海洋研究所/中国科学院 热带海洋生物资源与生态重点实验室/广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要:【目的】研究甘氨酸孵育对 LXEP-120 环氧树脂固定化脂肪酶稳定性的影响。【方法】使用甘氨酸孵育环氧树脂固定化脂肪酶, 消除固定化酶载体上过剩的环氧基团, 对孵育的条件进行探索和优化, 并且比较孵育前后固定化脂肪酶的酶学性质。【结果】孵育环氧树脂固定化脂肪酶的最佳条件为: 选用浓度为 2.5 mol/L、pH7.0 的甘氨酸溶液, 在 25 ℃ 条件下孵育 24 h。孵育后的固定化脂肪酶的相对酶活力在 80 ℃ 条件下处理 6 h 后仍保存 60% 左右, 而相同条件下处理后的未经孵育的固定化脂肪酶的相对酶活力只剩下 45% 左右; 与未孵育的固定化脂肪酶相比较, 孵育后的固定化脂肪酶最适反应 pH(8.0)、最适反应温度 (45 ℃) 与孵育前相同, pH 耐受性、操作稳定性和储藏稳定性变化趋势在孵育前后基本保持一致。【结论】孵育消除固定化酶载体上剩余的环氧基团是必不可少的一个技术环节, 甘氨酸孵育工艺可以较大程度地提高固定化脂肪酶的热稳定性, 对反应 pH、pH 稳定性、操作稳定性和储藏稳定性等性质影响较小。

关键词: 环氧树脂; 脂肪酶; 固定化; 甘氨酸; 稳定性
中图分类号: Q814.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)03-0061-07

Effect of incubation on stabilization of lipase immobilized by epoxy resin

XU Shan¹, LI Renqiang¹, ZHANG Jifu², ZHANG Yun³, SUN Aijun³, HU Yunfeng³
(1 Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2 Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 3 South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences/CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology/ Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangzhou 510301, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of glycine incubation on the stability of lipase immobilized by LXEP-120 epoxy resin. 【Method】Glycine solution was used to incubate lipase immobilized by epoxy resin for removing the residual epoxy groups. The incubation conditions were explored and optimized, and the enzymatic properties of the immobilized lipase before and after incubation were compared. 【Result】The optimal incubation conditions were 2.5 mol/L and pH 7.0 glycine solution incubating for 24 h at 25 ℃. Following incubation, the immobilized lipase still retained about 60% of the original activity after treatment at 80 ℃ for 6 h, while the unincubated immobilized lipase retained only about 45% of the original activity. The optimal reaction pH (8.0) and optimal reaction temperature (45 ℃) of the immobilized lipase after incubation were the

收稿日期:2018-07-22 网络首发时间:2019-04-16 09:12:00
网络首发地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190412.1740.016.html>
作者简介:徐 珊 (1992—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1396525087@qq.com; 通信作者: 胡云峰 (1980—), 男, 研究员, 博士, E-mail: yunfeng.hu@scsio.ac.cn
基金项目: 广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目 (A201701C12); 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA11030404); 中国科学院“科学”号高端用户项目 (KEXUE2018G05)

same as those of the uncubated immobilized lipase, and the pH tolerance, operation stability, and storage stability were the same as those before incubation. 【Conclusion】 Removing residual epoxy groups on immobilized enzyme through incubation is one necessary technical step. Glycine incubation can greatly improve the thermal stability of the immobilized lipase with little influence on reaction pH, pH stability, operation stability and storage stability.

Key words: epoxy resin; lipase; immobilization; glycine; stability

从 20 世纪 60 年代起,酶的固定化研究已成为酶工程领域中最受关注的研究方向之一,与游离酶相比,固定化酶具有易分离回收、稳定性好、可重复多批次利用等优点,使生物酶的工业应用更为经济可行^[1-2]。酶的固定化方法很多,常用的有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法^[3-5],其中共价结合法由于其固定化酶通常具有良好的稳定性和可重复利用率而受到研究者的青睐^[6]。环氧树脂是一种人工合成的高分子聚合材料,具有多孔立体结构,且在较长的生产周期内具有很强的耐微生物和耐酸碱腐蚀作用,也具有较强的机械性能;同时,环氧基团具有很高的活性和可塑性,在常温下可与酶蛋白表面的氨基酸残基(—NH₂、—COOH、—HS 等)发生温和的开环共价结合,将酶分子固定在载体表面,使得固定化操作简单方便,作为一种新型的固定化载体材料,被广泛应用于生物酶的固定化研究^[7-8]。

利用环氧树脂固定化生物酶,得到的固定化酶的酶活力以及稳定性,主要受两方面因素的影响。一方面,某些生物酶吸附固定后,由于酶和环氧树脂的内部结构有较大差异,在短时间内并未形成多点共价链接,在碱性条件下孵育一段时间可形成牢固的多点共价链接,从而增加其温度稳定性^[9]。Torres等^[10]在利用环氧树脂固定化 L-阿拉伯异构酶和 D-葡萄糖异构酶时,2 种固定化酶在 pH8.5 的缓冲液中孵育 24 h 后,在 50 ℃ 条件下的半衰期都有了显著的提高;Mateo 等^[11]将在青霉素 G 酰基转移酶固定到 Eupergit C 的试验中也得到了类似的结果。另一方面,在生物酶的固定化过程中,载体内部的疏水微环境可以促进载体表面与蛋白质表面的接触,这是固定化生物酶所必须的条件,但在某些情况下,这种疏水微环境可能对酶的性质有强烈的负面影响^[12],欧美国家的环氧树脂生产厂家推荐使用氨基酸等亲水试剂孵育固定化酶来消除载体上过剩的环氧基团,防止酶与载体继续发生疏水相互作用和化学反应,从而消除这一负面影响^[11,13]。本试验采用国产 LXEP-120

环氧树脂固定化脂肪酶,对阻断脂肪酶与固定化载体剩余环氧基团继续反应的孵育条件进行优化探索,考察氨基酸溶液的种类、浓度、pH 以及孵育的温度和时间等因素对固定化酶的酶活力和温度稳定性的影响,从而为国产环氧树脂固定化脂肪酶的稳定性研究提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脂肪酶,购自深圳恒生生物科技有限公司; LXEP-120 环氧树脂,西安蓝晓新材料股份有限公司生产;橄榄油、吡啶、无水醋酸铜,购自阿拉丁公司;丙氨酸、丝氨酸购自麦克林试剂公司;甘氨酸购自捷瑞生物工程有限公司;其他试剂皆为国产分析纯。

瑞士 Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪; SCIENTZ-IIID 超声破碎仪。

1.2 固定化脂肪酶制备

1.2.1 环氧树脂固定化脂肪酶的制备 准确称取 LXEP-120 环氧树脂 5 g,加入 4 mL 脂肪酶液(脂肪酶酶粉用 pH6.0 的 1 mol/L 磷酸钾缓冲液溶解,至终质量浓度为 2 g/L,10 000 r/min 离心 12 min),放入 22 ℃ 摇床中,150 r/min 条件下固定 12 h。用缓冲液洗去载体表面残留的酶分子,抽滤后,4 ℃ 条件下密封保存。

1.2.2 氨基酸溶液孵育环氧树脂固定化脂肪酶 准确称取 5 g 制备好的 LXEP-120 环氧树脂固定化脂肪酶,分别加入 5 mL 不同的氨基酸溶液,放入摇床中,25 ℃、150 r/min 条件下孵育 24 h。孵育完成后,用缓冲液洗去载体表面残留的酶分子,抽滤并干燥,冰箱 4 ℃ 条件下密封保存备用。

1.3 固定化酶活力测定

固定化脂肪酶活力测定采用改进的铜皂分光光度法。在测定过程中,只需将反应体系中的游离酶换成适量的固定化脂肪酶即可,其他操作均与游离酶测定酶活力方法相同。

酶活力定义:在测定条件下(40 ℃,pH 8.0),1 min

内催化底物水解产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

相对酶活力定义: 在同一组试验中, 设定酶活力最高的一组为 100%, 其余组的酶活力与之相比, 用百分数表示结果。

残余酶活力定义: 经过不同温度或 pH 条件下处理一定时间后的相对酶活力 (以处理前的酶活力为 100%)。

1.4 甘氨酸孵育环氧树脂固定化脂肪酶条件优化

1.4.1 孵育 LXEP-120 环氧树脂的氨基酸溶液的选择 配制 1.5 mol/L 的 pH 为 7.0 的丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸溶液, 分别取 5 mL 溶液 (每 g 固定化脂肪酶取 1 mL 溶液, 下同) 加入到制备好的固定化脂肪酶中, 进行孵育操作 (放入 25 °C 摇床中, 150 r/min 条件下孵育 24 h), 测定酶活力。

1.4.2 孵育 LXEP-120 环氧树脂的甘氨酸浓度优化 配制浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mol/L 的甘氨酸溶液, 分别取 5 mL 甘氨酸溶液加入到制备好的固定化脂肪酶中, 按 1.4.1 进行孵育, 测定酶活力。

1.4.3 孵育 LXEP-120 环氧树脂的甘氨酸溶液 pH 优化 配制浓度为 2.5 mol/L, pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 的甘氨酸溶液, 分别取 5 mL 甘氨酸溶液加入到制备好的固定化脂肪酶中, 按 1.4.1 进行孵育, 测定酶活力。

1.4.4 LXEP-120 环氧树脂的孵育温度优化 配制 2.5 mol/L、pH 为 7.0 的甘氨酸溶液, 取 5 mL 甘氨酸溶液加入到制备好的固定化脂肪酶中, 分别置于 20、25、30、35、40、45 和 50 °C 摇床中, 150 r/min 条件下孵育 24 h, 测定酶活力。

1.4.5 LXEP-120 环氧树脂的孵育时间优化 配制 2.5 mol/L、pH 为 7.0 的甘氨酸溶液, 取 5 mL 甘氨酸溶液加入到制备好的固定化脂肪酶中, 放入 25 °C 摇床中, 150 r/min 条件下, 分别孵育 0、6、12、18、24、30、36 和 48 h, 测定酶活力。

1.5 固定化脂肪酶的酶学性质测定

1.5.1 固定化脂肪酶的最适反应 pH 测定 40 °C 条件下, 采用不同 pH(6.0~10.0) 的缓冲液测定甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶的酶活力, 研究 pH 对其酶活力的影响。

1.5.2 固定化脂肪酶的最适反应温度测定 设定缓冲液的 pH=8.0, 测定不同温度 (25~60 °C) 孵育后的固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶的酶活力, 研究温度对其酶活力的影响。

1.5.3 固定化脂肪酶的 pH 耐受性测定 分别将

甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶放置在 pH 为 4、5、6、7、8、9 和 10 的浓度为 0.5 mol/L 的缓冲液中, 室温条件下处理 6 h, 然后在最适反应条件下测定残余酶活力, 对照组不做处理。

1.5.4 固定化脂肪酶热稳定性测定 称取一定质量的甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶, 在 40~80 °C (间隔 5 °C) 条件下处理 6 h, 然后测定残余酶活力, 以放置在 4 °C 条件下的固定化脂肪酶为对照。

1.5.5 固定化脂肪酶操作稳定性测定 称取一定质量的甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶, 在 40 °C、pH7.0 条件下连续不间断反应 10 次, 每一次都测定酶活力, 以第 1 次反应测得的酶活力为 100%。

1.5.6 固定化脂肪酶储藏稳定性测定 将抽滤干燥后的固定化脂肪酶密封保存在 4 °C 冰箱中, 每隔一段时间测定其 45 °C、pH8.0 条件下的酶活力, 以第 1 次反应测得的酶活力为 100%。

1.6 数据分析

采用 SPSS 19 软件, 通过 *t* 检验对甘氨酸孵育前后的固定化脂肪酶的酶学性质差异显著性进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 孵育环氧树脂的氨基酸溶液的选择

由图 1 可知, 在相同条件下使用不同氨基酸溶液孵育固定化脂肪酶后, 甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸孵育后得到的固定化脂肪酶的酶活力与对照组相比基本没有损失。同时, 经 70 °C 保温处理 6 h 后, 这 3 个处理的固定化脂肪酶的残余酶活力基本相同。因此, 基于经济角度以及氨基酸的溶解度考虑, 选择甘氨酸作为孵育溶液进行后续试验。

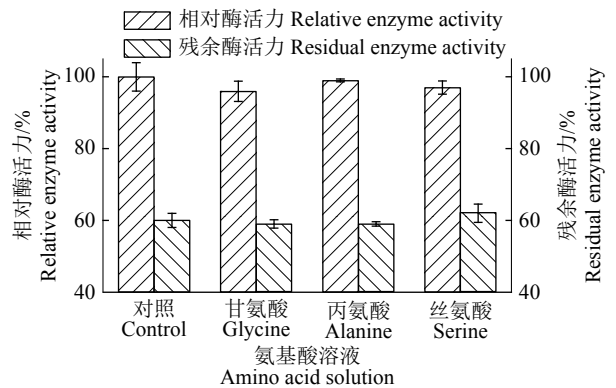


图 1 氨基酸溶液孵育对固定化脂肪酶活力的影响
Fig. 1 Effect of incubation with amino acid solution on immobilized lipase activity

2.2 孵育环氧树脂的甘氨酸溶液的浓度优化

由图 2 可知,在不同浓度甘氨酸溶液中孵育 24 h 后,当甘氨酸浓度为 0.5~2.0 mol/L 时,固定化脂肪酶的酶活力基本相同,其在 70 ℃ 处理 6 h 后的残余酶活力也基本一致;当甘氨酸浓度为 2.5 mol/L 时,固定化脂肪酶的酶活力和残余酶活力都达到最大值;当甘氨酸浓度继续增大时,酶活力和残余酶活力都呈现出较为明显的下降趋势。因此,选择浓度为 2.5 mol/L 的甘氨酸作为孵育试剂。

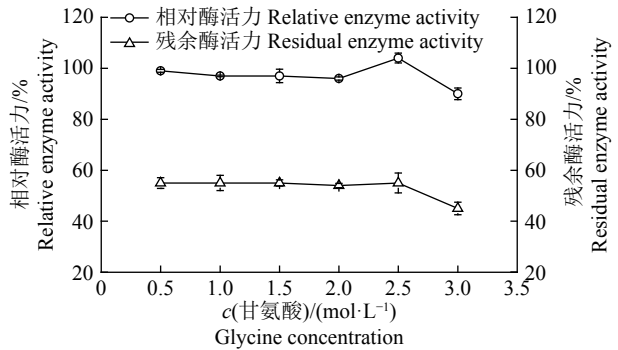


图 2 不同浓度甘氨酸溶液孵育对固定化脂肪酶活力的影响
Fig. 2 Effect of incubation with different concentrations of glycine solution on immobilized lipase activity

2.3 孵育环氧树脂的甘氨酸溶液的 pH 优化

由图 3 可知,利用中性或碱性的甘氨酸溶液孵育固定化脂肪酶后,得到的固定化脂肪酶活力较高,其中当 pH=7.0 时最佳;碱性甘氨酸孵育后,固定化酶的残余酶活力相对较低。因此,选择 pH 为 7.0 的甘氨酸溶液进行后续的研究。

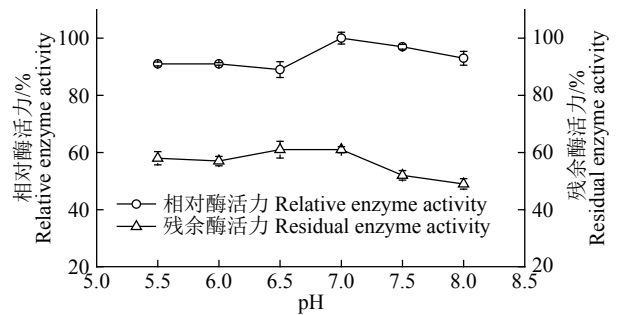


图 3 不同 pH 甘氨酸溶液孵育对固定化脂肪酶活力的影响
Fig. 3 Effect of incubation of glycine solution with different pH on immobilized lipase activity

2.4 甘氨酸孵育环氧树脂的温度优化

由图 4 可知,25 ℃ 条件下孵育后得到的固定化脂肪酶活力最高,之后随着温度的上升,固定化脂肪酶逐渐失活,当温度超过 40 ℃ 后酶活力急剧下降。因此选择 25 ℃ 条件进行固定化脂肪酶孵育的后续研究。

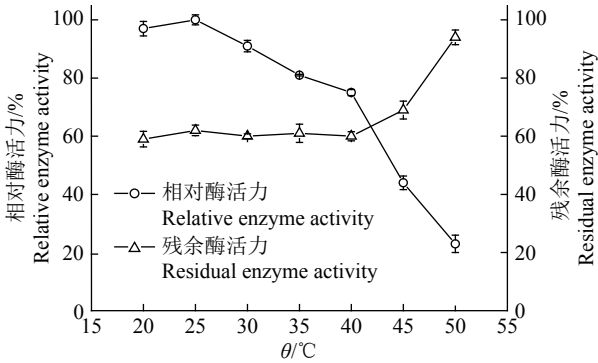


图 4 孵育温度对固定化脂肪酶活力的影响
Fig. 4 Effect of incubation temperature on immobilized lipase activity

2.5 甘氨酸孵育环氧树脂的时间优化

由图 5 可知,当孵育 0~20 h 时,孵育时间对固定化酶的酶活力基本没有影响;当温度从 20 ℃ 升高到 25 ℃ 时,固定化脂肪酶活力有较大的提高;超过 25 ℃ 后,随着温度的不断升高,酶活力下降。从图 5 中可知,未孵育的固定化脂肪酶的残余酶活力为 53% 左右,而孵育后的固定化脂肪酶的残余酶活力都大于 60%,说明甘氨酸孵育可以在一定程度上提高固定化脂肪酶的稳定性。因此选择 24 h 的孵育条件进行后续的研究。

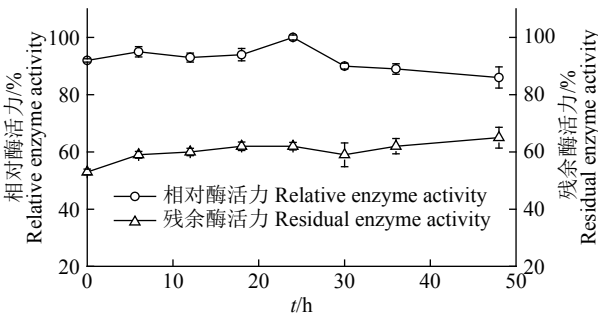


图 5 孵育时间对固定化脂肪酶活力的影响
Fig. 5 Effect of incubation time on immobilized lipase activity

2.6 孵育后固定化脂肪酶的酶学性质

2.6.1 固定化脂肪酶的最适反应 pH 由图 6 可知,固定化脂肪酶孵育前后在不同 pH 缓冲液中的酶活力变化趋势基本一致,最适反应 pH 都是 8.0,在 pH 为 6.0~9.0 范围内的相对酶活力都在 75% 以上。在 pH 为 6.0~8.0 时,甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶相对酶活力大于未孵育的固定化脂肪酶;而当 pH>9.0 时,未孵育的固定化脂肪酶的相对酶活力相对较大,且差异极显著 ($P>0.01$)。说明甘氨酸孵育固定化脂肪酶这一操作,使固定化脂肪酶对反应环境 pH 的敏感性产生了一定的影响。

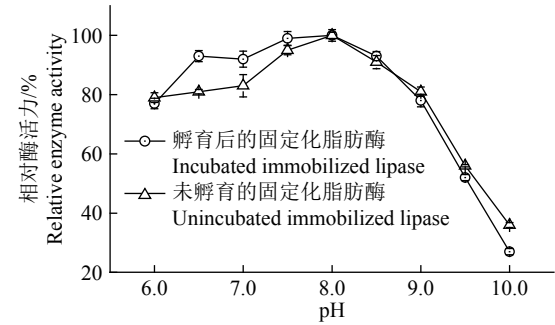


图 6 固定化脂肪酶的最适反应 pH

Fig. 6 The optimal reaction pH of immobilized lipase

2.6.2 固定化脂肪酶的最适反应温度 由图 7 可知, 固定化脂肪酶孵育前后在不同反应温度中的酶活力变化趋势基本一致, 最适反应温度均为 45 ℃。但是当温度>55 ℃ 后, 孵育后的固定化脂肪酶的相对酶活力比未孵育的高, 且差异显著 ($P>0.05$), 随着温度的升高, 这种趋势越明显。说明甘氨酸孵育后, 固定化脂肪酶对温度的敏感性降低了, 具有更宽广的温度适用性。

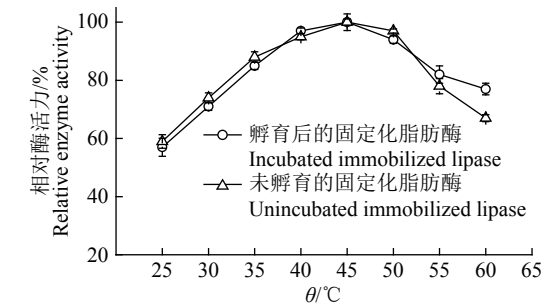


图 7 固定化脂肪酶的最适反应温度

Fig. 7 The optimal reaction temperature of immobilized lipase

2.6.3 固定化脂肪酶的 pH 耐受性 由图 8 可知, 2 种固定化脂肪酶在不同 pH 缓冲液中都表现出良好的耐受性, 在 pH5.0~9.0 范围内处理 6 h 后, 都保持 90% 以上的酶活力。其中, 孵育后的固定化脂肪酶在 pH8.0 时耐受性最好, 为最初酶活力的 99%; 未孵育的固定化脂肪酶在 pH7.0 时耐受性最好, 为最初酶活力的 97%。说明甘氨酸孵育对固定化脂肪酶的 pH 稳定性并未产生明显的影响 ($P>0.05$)。

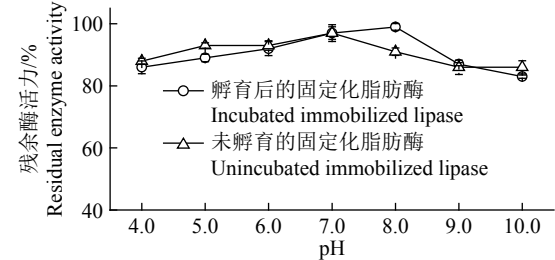


图 8 固定化脂肪酶的 pH 耐受性

Fig. 8 pH stability of immobilized lipase

2.6.4 固定化脂肪酶的温度耐受性 由图 9 可知, 相较于未经孵育的固定化脂肪酶, 甘氨酸孵育后的固定化脂肪酶显示出良好的温度耐受性。在 80 ℃ 条件下处理 6 h 后仍保存 60% 左右的酶活力, 而相同条件下处理后的未经孵育的固定化脂肪酶只剩下 45% 左右的酶活力, 差异极显著 ($P<0.01$)。说明甘氨酸孵育可以提高固定化脂肪酶的温度耐受性。

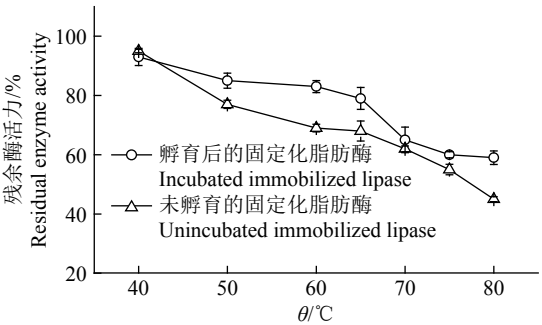


图 9 固定化脂肪酶的温度耐受性

Fig. 9 Thermal stability of immobilized lipase

2.7 固定化脂肪酶的操作稳定性

固定化酶的操作稳定性是衡量其是否具有工业使用价值的一个重要指标, 因此试验比较了孵育后固定化脂肪酶和未孵育的固定化脂肪酶的操作稳定性。由图 10 可知, 2 种固定化脂肪酶的操作稳定性基本相似, 在连续反应 10 批次后, 相对酶活力都保持在初始酶活力的 70% 以上, 整体上孵育后固定化脂肪酶的相对酶活力高于未孵育固定化脂肪酶或者与未孵育固定化脂肪酶基本持平, 二者差异不显著 ($P>0.05$), 说明甘氨酸孵育对固定化脂肪酶的操作稳定性没有影响。

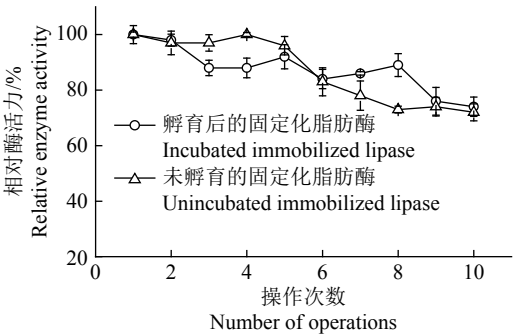


图 10 固定化脂肪酶的操作稳定性

Fig. 10 Operation stability of immobilized lipase

2.8 固定化脂肪酶的储存稳定性

由图 11 可知, 2 种固定化脂肪酶在 4 ℃ 条件下储存 10 d 左右酶活力基本没有损失, 储存 4 周后保持 80% 以上的酶活力, 差异均不显著 ($P>0.05$), 说明该固定化脂肪酶较易储存, 且甘氨酸孵育不影响固定化脂肪酶的储存稳定性。

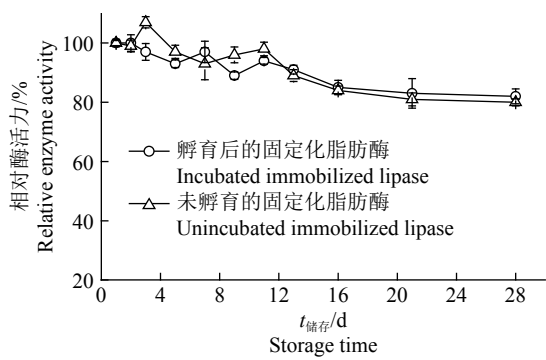


图 11 固定化脂肪酶的储存稳定性

Fig. 11 Storage stability of immobilized lipase

3 讨论与结论

由于载体上剩余的环氧基团可以使得固定化的工业酶失活, 因此孵育消除剩余环氧基团是环氧树脂固定化酶必不可少的一个技术环节。在过去的研究中, 有人分别采用巯基乙醇和甘氨酸孵育环氧树脂 Eupergit C 青霉素 G 酰基转移固定化酶和胰凝乳蛋白固定化酶^[11, 14], 利用甘氨酸孵育环氧改性丙烯酸固定化半乳糖苷酶, 对环氧树脂固定化酶的稳定性进行了初步的研究^[15], 但都未系统地研究孵育的具体条件以及孵育操作对固定化酶性状的影响, 本研究系统地对甘氨酸孵育固定化脂肪酶的条件进行了优化, 并研究了孵育后固定化酶的相关酶学性质。

本试验的最佳条件为选用 pH7.0、浓度为 2.5 mol/L 的甘氨酸溶液, 在 25 ℃ 条件下孵育 24 h。比较了甘氨酸孵育前后固定化脂肪酶的酶学性质, 发现孵育后固定化脂肪酶的最适反应 pH(8.0) 和温度 (45 ℃) 不变, pH 耐受性变化较小, 但是对温度的敏感性降低, 具有更为宽广的温度适用性。本试验探索了甘氨酸孵育对环氧树脂固定化脂肪酶稳定性的影响, 发现甘氨酸孵育可以较大程度地增加固定化脂肪酶的温度稳定性, 在最佳条件下孵育得到的固定化脂肪酶在 80 ℃ 条件下处理 6 h 后仍保存 60% 左右的酶活力, 而相同条件下处理后的未经孵育的固定化脂肪酶只剩下 45% 左右的酶活力。此外, 甘氨酸孵育对于固定化脂肪酶的机械稳定性和储存稳定性的影响较小。

致谢: 感谢“科学”号科考船对本工作的支持!

参考文献:

[1] 朱珊珊, 邵佩霞, 王永华. LipozymeTL100L 脂肪酶的固定化及其性质研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 97-100.

[2] KIM H, CHOI N, OH S W, et al. Synthesis of alpha-linolenic acid-rich triacylglycerol using a newly prepared immobilized lipase[J]. Food Chem, 2017, 237: 654-658.

[3] FARIAS S, MAYER D A, DE OLIVEIRA D, et al. Free and Ca-alginate beads immobilized horseradish peroxidase for the removal of reactive dyes: An experimental and modeling study[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 182(4): 1290-1306.

[4] VAZQUEZ-ORTEGA P G, ALCARAZ-FRUCTUOSO M T, ROJAS-CONTRERAS J A, et al. Stabilization of dimeric beta-glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions[J]. Enzyme Microb Technol, 2018, 110: 38-45.

[5] AGHABABAIE M, BEHESHTI M, RAZMJOU A, et al. Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on a novel functionalized Fe₃O₄@SiO₂ dip-coated nanocomposite membrane[J]. Food Bioprod Process, 2016, 100: 351-360.

[6] 刘文涛, 段洪东, 王兴建, 等. 环氧基固定化酶载体的研究进展 [J]. 山东轻工业学院学报, 2012, 26(3): 40-44.

[7] 顾恺, 邹树平, 王志才, 等. 环氧树脂固定化卤醇脱卤酶的研究 [J]. 现代化工, 2016, 36(11): 69-74.

[8] SHELDON R A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance[J]. Adv Synth Catal, 2007, 349 (8/9): 1289-1307.

[9] BLANCO R M, CALVETE J J, GUISAN J M. Immobilization-stabilization of enzymes : Variables that control the intensity of the trypsin (amine) agarose (aldehyde) multipoint attachment[J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(6): 353-359.

[10] TORRES P, BATISTA-VIERA F. Immobilized trienzymatic system with enhanced stabilization for the biotransformation of lactose[J]. Molecules, 2017, 22(2): 284.

[11] MATEO C, ABIAN O, FERNANDEZ-LAFUENTE R, et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(7): 509-515.

[12] MATEO C, GRAZU V, PESSELA B C C, et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization[J]. Biochem Society Trans, 2007, 35(6): 1593-1601.

[13] BARBOSA O, ORTIZ C, BERENGUER-MURCIA A, et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts[J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(5): 435-456.

[14] GUISAN, JOSE M. Immobilization-stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment on supports activated with epoxy groups[J]. Immobil Enzyme Cell, 2006, 22: 47-54.

[15] TORRES P, BATISTA-VIERA F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2012, 74(3/4): 230-235.