

Immobilization of Lipase on Mesoporous SBA-15 and Its Characterization

Chunyan Liu, Xiaobo Wang, Jiale Liu, Suyan Wang

School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian

Email: lcybeauty@163.com

Received: Mar. 13th, 2011; revised: Apr. 28th, 2011; accepted: Apr. 29th, 2011.

Abstract: Lipase was immobilized on the mesoporous molecular sieve SBA-15 by physical adsorption method. The effects of immobilization conditions on the relative activity and the activity yield of the immobilized lipase were studied. At the same time the pH, operational and storage stability of the immobilized lipase was discussed. The results showed that the optimum conditions for immobilization were as follows: the mass of the carrier, the mass of the free enzyme, time and pH were 1 g, 50 mg, 3.0 h and 8.0, respectively. Under the optimum condition, the activity yield of the immobilized lipase was around 60%. The immobilized lipase showed a good stability compared with the free enzyme. The results showed that the mesoporous molecular sieve SBA-15 is an excellent carrier for the immobilization of lipase.

Keywords: SBA-15; Immobilized Lipase; Relative Activity; Stability

介孔分子筛 SBA-15 固定化脂肪酶性质的研究

刘春艳*, 王晓博, 刘加乐, 王素艳

辽宁师范大学化学化工学院, 大连

Email: lcybeauty@163.com

收稿日期: 2011 年 3 月 13 日; 修回日期: 2011 年 4 月 28 日; 录用日期: 2011 年 4 月 29 日

摘要: 本文以介孔分子筛 SBA-15 为载体采用吸附法对假单胞菌脂肪酶进行了固定化, 研究了固定化条件对酶的活性及酶活回收率的影响, 得到了最佳固定化条件。并对固定化酶的稳定性 (pH、操作稳定性以及储藏稳定性) 做了初步研究。结果表明: 当载体为 1 g, 给酶量为 50 mg, 固定化时间为 3 h, 溶液的 pH 值为 8.0 时, 假单胞菌脂肪酶的固定化效果最好, 此时酶活力回收率达到 60% 左右。固定化酶的稳定性较游离酶有很大提高。研究结果表明介孔材料 SBA-15 是脂肪酶进行固定化的一个优良载体。

关键词: 介孔分子筛 SBA-15; 固定化酶; 酶活; 稳定性

1. 引言

脂肪酶系统名称为三脂酰甘油酯基水解酶^[1]。它是一类特殊的酯基水解酶, 它能在油水界面上催化酯水解和醇解、酯合成、酯交换、内酯合成、高聚物合成及立体异构体拆分等有机合成反应。因其具有选择性高、催化反应条件温和、无污染等特点, 而成为目

前被重点研究的酶催化剂^[2]。然而, 游离的脂肪酶稳定性差, 易失活, 不能重复使用, 并且反应后也不易与产品分离, 使其难以实现规模化的生产。在此条件下, 通过酶固定化技术来克服脂肪酶应用的局限性成为酶工程领域研究的热点^[3-6]。目前, 固定化脂肪酶广泛应用于食品、医药、油脂加工、皮革、造纸、化工、化妆品等诸多行业。尤其是在催化合成生物柴油方面,

固定化脂肪酶可以作为催化剂来催化制备生物柴油[7-9]。

目前, 脂肪酶的固定化多采用有机载体。根据文献报道, 对于大多数脂肪酶来说, 其中聚乙烯、聚丙烯、琼脂糖、聚丙烯酰胺和葡萄糖凝胶等是固定化脂肪酶的优良载体^[10]。但是, 实际应用中还存在着许多问题, 如载体价格高, 使用寿命短。因此许多科研人员一直致力于新载体的研制和应用。无机介孔分子筛 SBA-15 因其具有较大的比表面积、高度有序的孔道结构、较大的孔容、孔径均一且在一定范围内连续可调、表面易改性、较好的热稳定性和水热稳定性、机械强度较高, 无毒、不易分解、耐酸碱、成本低、寿命长等特点, 而使介孔分子筛 SBA-15 在吸附分离和酶固定化方面有着独到的应用价值。它对分子的吸附, 特别是蛋白质分子的吸附已经引起了人们的广泛关注^[11-13]。Takahashi^[12]等人将辣根过氧化酶固定化在介孔材料 SBA-15 中, 考查了固定化酶的活性和热稳定性。裘式纶^[13]等人将分子筛 SBA-15 作为载体用来固定化 α -胰凝乳蛋白酶, 研究了固定化后的酶活性。但以介孔分子筛 SBA-15 为载体进行假单胞菌脂肪酶的固定化研究却很少见报道。脂肪酶的固定化方法大致分为四类: 吸附法、共价法、交联法和包埋法。其中, 吸附法操作过程简单, 是经济上最具吸引力的固定化方法。

本文以介孔分子筛 SBA-15 为载体采用吸附法对假单胞菌脂肪酶进行了固定化研究, 考察了不同固定化条件对酶活力回收率的影响。同时对其稳定性进行了考察。

2. 实验部分

2.1. 试剂和仪器

D8Advance 型 X 射线多晶衍射仪 (德国 Bruker AXS 公司); AUTOSORB-1MP 型 N₂ 物理吸附仪 (华嘉(香港)有限公司); Lambda 35 型紫外可见分光光度计 (珀金埃尔默仪器 (上海) 有限公司); PHS-3C 型 pH 酸度计 (上海雷磁仪器厂)。聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物、正硅酸乙酯、盐酸、假单胞菌脂肪酶 (PSL)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、二甲苯、醋酸铜均为分析纯, 橄榄油为化学纯。

2.2. 介孔分子筛 SBA-15 的制备与表征

本文以非离子表面活性剂聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物 P123 为模板剂, 以正硅酸乙酯 (TEOS) 为硅源, 酸性条件下合成介孔分子筛 SBA-15^[14]。具体制备过程如下: 在 35℃~40℃ 的条件下, 将 P123 溶解在一定量的去离子水和一定体积 2 mol/L 的盐酸(HCl)溶液中, 置于恒温加热磁力搅拌器上搅拌, 待完全溶解后将混合溶液转移至三口烧瓶, 向该混合溶液中加入一定体积的正硅酸乙酯(TEOS), 在 40℃ 下持续剧烈搅拌 24 h 以上, 然后将混合物装入不锈钢反应釜中, 80℃ 条件下晶化 48 h 以上, 取出后立即将反应釜冷却一段时间, 所得的晶体产物经过滤、洗涤, 室温下干燥, 最后在马弗炉中静态空气下 550℃ 煅烧 6 h 以除去模板剂, 最后得到白色粉末 SBA-15 介孔分子筛。实验中所用各原料的摩尔比约为 1.0 TEOS: 0.01 P123: 5.88 HCl: 136 H₂O^[15]。

SBA-15 分子筛的 X 射线衍射在 D8 Advance 型 X 射线多晶衍射仪上测定, Cu 靶, K α 线, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, 扫描区间 1°~6°, 扫描速率 1°/min, 扫描步长 0.02°。其 N₂ 吸附-脱附等温线在 77 K 下通过 AUTOSORB-1MP 型自动物理吸附仪测定, 采用 BET 和 BJH 方法计算比表面积和孔径。

2.3. 脂肪酶标准溶液的配制

配制 50 mL 4 mg/mL 的假单胞菌脂肪酶溶液的步骤如下: 用分析天平精确称取 0.2 g 的 PSL 酶粉, 加入到 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 磷酸盐缓冲溶液(0.02 mol/L, pH = 8.0)中, 室温条件下搅拌 15 min, 4000 rpm, 离心 15 min, 取上清溶液将其转移至 50 mL 容量瓶中, 向烧杯中沉淀部分再加入一定量的缓冲溶液搅拌使其溶解, 4000 rpm, 离心 15 min, 同样将上清溶液转移至容量瓶中, 如此反复三到四次, 最后将所得的全部上清液转移至容量瓶, 用 0.02 mol/L, pH = 8.0 的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲溶液定容, 得到 4 mg/mL 假单胞菌脂肪酶(PSL)的粗酶液。置于 4℃ 下保存。

2.4. 脂肪酶的固定化

用移液管移取一定量的已经制备好的 4 mg/mL 上述脂肪酶粗酶液于反应瓶中, 向其加入一定质量的介

孔分子筛, 室温下磁力搅拌 3 小时, 将所得混合物 4000 rpm, 离心 15 min, 保留上清液, 用缓冲液清洗沉淀, 清洗时应少量多次, 最后再用去离子水清洗一次后抽滤, 所得沉淀于室温下自然干燥, 即得到介孔分子筛固定化酶。

2.5. 脂肪酶的活力测定

本实验采用铜皂法来测定脂肪酶的活力。具体操作如下: 用移液管移取 3 mL 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液和 1 mL 橄榄油于锥形瓶中, 37°C 下恒温磁力搅拌 5 min 后, 加入 0.1 mL 假单胞菌脂肪酶的游离酶溶液, 搅拌 10 min, 立即向混合物中加入 8 mL 二甲苯, 继续搅拌 2 min 后终止反应, 回收生成的脂肪酸, 将该溶液转移至离心试管中, 4000 rpm, 离心 15 min, 这时有机相和水相分层澄清。取有机相 4 mL 与锥形瓶中, 加入 1 mL 显色剂, 磁力搅拌 3 min, 产生的脂肪酸与 Cu^{2+} 络合, 生成绿色的络合物。4000 rpm, 离心 15 min, 取上层含有脂肪酸铜的二甲苯溶液, 用紫外分光光度计在 710 nm 波长处测其吸光度。按同种方法制备不含脂肪酶的空白溶液, 将其作为参比, 对照脂肪酸吸光度工作曲线, 求出脂肪酸的浓度。

2.5.1. 脂肪酸吸光度工作曲线的绘制

配制一系列不同浓度的油酸/二甲苯溶液, 分别取 6 mL 于锥形瓶中加入 1.5 mL 上述配制的显色剂溶液, 磁力搅拌 3 min, 待油酸分子与 Cu^{2+} 完全络合, 生成绿色的络合物, 高度离心机下离心, 取上层有机相于 710 nm 处测定脂肪酸的吸光度。用未加油酸的空白溶液作参比, 以吸光度对油酸浓度作图, 得一直线, 该直线即为脂肪酸吸光度的工作曲线^[5], 得到吸光度与浓度二者的关系方程: $A = 0.2c + 0.0139$, 方程中 A 为脂肪酸的吸光度, c 为油酸的物质的量的浓度(单位: mmol/L)。

2.5.2. 酶活定义及酶活计算公式

脂肪酶的酶活力单位就是指在一定条件下, 每分钟释放出 1 μmol 脂肪酸的酶量, 将其定义为 1 个脂肪酶活力单位(U)。酶活的计算公式 $X = (cV)/(tV')$ (其中 X 为脂肪酶活力, 单位为 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$; c 为脂肪酸浓度, 单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$; V 为脂肪酸溶液的体积, 单位为 mL; V' 为酶液的用量, 单位为 mL; t 为作用时间, 单

位为 min)。

2.5.3. 固定化酶的计算公式

(1) 酶的活性回收率

脂肪酶被载体固定化后, 固定化酶显示的活力占被固定的等当量游离酶总活力的百分数, 该百分数称为固定化酶的活力回收率。用公式表示: 酶活力回收率(%) = (固定化酶总活力/原酶液总活力) \times 100%。

(2) 酶的相对活性

游离酶或固定化酶的相对活性的定义: 在同组实验中将活性最高的点的值记为 100%, 其它实验点的数值与该最高点的数值之比, 通常用百分数表示。

3. 结果与讨论

3.1. 介孔分子筛 SBA-15 载体的表征

3.1.1 介孔分子筛 SBA-15 的 XRD 分析

图 1 是制备的介孔分子筛 SBA-15 粉末的 XRD 谱图, 图中可以看出: 样品在 2θ 为 0.8° 附近出现一个很强的衍射峰, 该峰对应着 SBA-15 的(100)峰, 在 1.5° 和 1.8° 较高角度附近出现两个较小的特征衍射峰, 分别对应着 SBA-15 的(110)和(200)衍射峰, 是典型的二维六角结构的特征衍射峰。另外从 XRD 谱图中我们还可以看出样品的骨架结构的有序性保持良好, 表明具有较好结晶度的 SBA-15 介孔分子筛被合成出来了。

3.1.2. N_2 物理吸附分析

图 2 是 SBA-15 的吸附-脱附等温线和孔径分布曲线, 由图 2 我们可以看出该材料的等温线属于第 IV 类吸附等温线, 在低压段, 吸附量平缓增加, 在 P/P_0 为 $0.6 \sim 0.7$ 之间等温线出现一个明显的突跃, 且伴随一

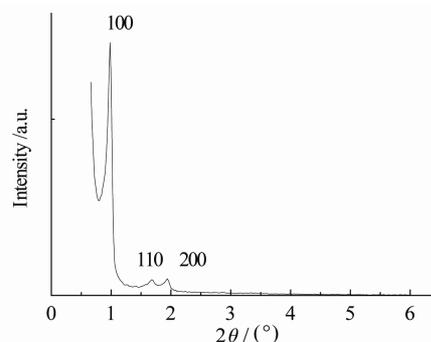


Figure 1. XRD pattern of SBA-15
图 1. 样品 SBA-15 的 XRD 图

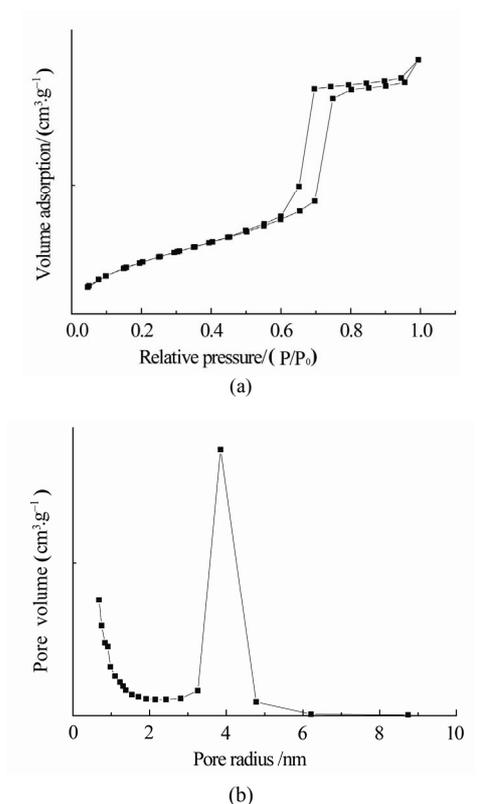


Figure 2. (a) N_2 adsorption-desorption isotherms and (b) Pore size distribution curve of SBA-15
图 2. SBA-15 分子筛的吸附-脱附等温线(a)和孔径分布曲线(b)

个 H1 型迟滞环, 该等温线为典型的介孔分子筛所呈现的吸附类型。由该图我们还可以知道样品的孔径分布非常均一。经计算该样品的孔径约为 7.704 nm, 比表面积为 $679 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔容为 $0.856 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。

3.1.3. 透射电镜(TEM)分析

图 3 是介孔分子筛 SBA-15 的透射电镜照片, 从图中可以看到合成的材料其孔道结构排列规整有序, 呈柱状结构。另外, 在垂直于孔轴方向, 可观察到 SBA-15 有序的六方孔道结构, 证明介孔分子筛 SBA-15 呈二维六方结构。此结果与 N_2 物理吸附的结果是相符的。

3.2. 固定化酶的 N_2 物理吸附分析

采用相同的表征方法对以介孔分子筛 SBA-15 为载体固定化假单胞菌脂肪酶进行 N_2 物理吸附表征。从图 4 我们可以看出: SBA-15 分子筛在固定化酶前后, 其 N_2 吸附/脱附等温线均属于 IV 型, 是典型的介孔材

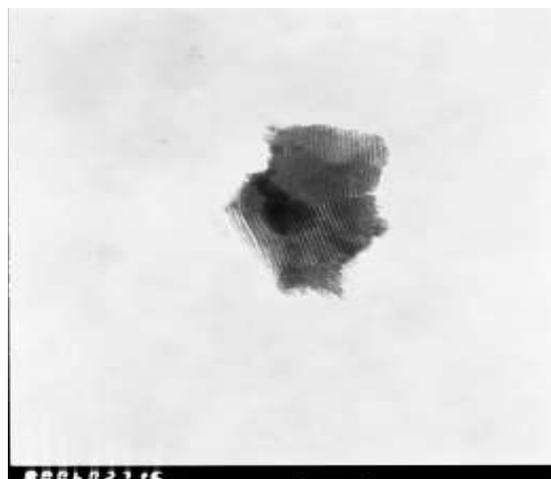


Figure 3. TEM image of SBA-15
图 3. SBA-15 分子筛的 TEM 图

料吸附。所不同的是, 对于 SBA-15 分子筛模板来说, 它的迟滞环是典型的 H1 型迟滞环, 说明它是独立的柱状孔模型。而吸附脂肪酶后的等温线的迟滞环类型归属为 H4 型, 表明该材料具有的是无序孔模型。从孔径分布图中我们可以看到, 其孔径大小相应的有所

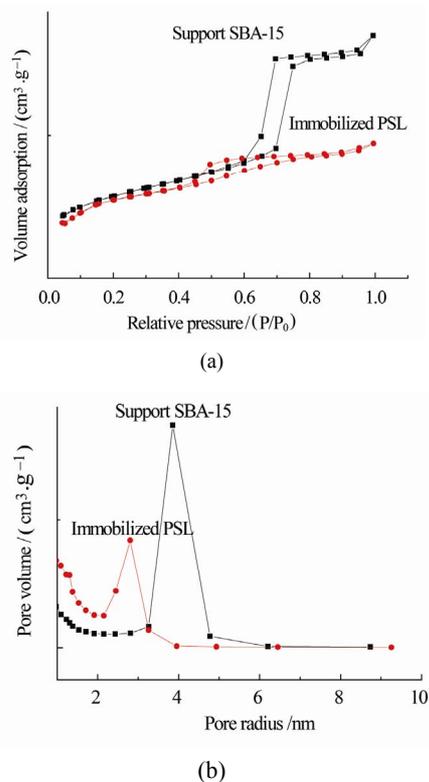


Figure 4. (a) N_2 adsorption-desorption isotherms and (b) Pore size distribution curves of the support and immobilized PSL
图 4. 载体和固定化酶的吸附-脱附等温线(a)和孔径分布曲线(b)

下降。经计算分析, SBA-15 介孔分子筛在固定化假单胞菌脂肪酶后, 其孔径由固载前的 7.70 nm 缩小到 5.28 nm。这种材料孔型及孔径的改变都说明了脂肪酶固定化到 SBA-15 分子筛孔道里了。

3.3. 固定化条件对 SBA-15 固定化酶活力的影响

3.3.1. 固定化时间的影响

图 5 是不同的固定化时间(其它固定化条件相同)对以 SBA-15 分子筛为载体固定化脂肪酶活的影响。图中我们可以看出随着搅拌时间的逐渐延长, 载体吸附的酶量增加, 酶活增加, 当搅拌时间为 3 h 时, 固定化酶的活性达到最高。3 h 后开始平缓下降直到平衡。原因可能是: 一方面酶的固定化过程就是酶扩散进入介孔分子筛孔道的过程, 其速度与酶扩散进入孔道的速度有关。由于介孔分子筛 SBA-15 载体的结构为二维六方孔状结构, 假单胞菌脂肪酶(PSL)的分子直径为 5 nm^[17], 而 SBA-15 分子筛的孔径为 7.70 nm, 二者孔径相匹配, 酶在固定化时很容易进入 SBA-15 分子筛的孔道中, 所以完成固定化过程不需要较长的时间。另一方面, 一部分酶分子进入载体孔道, 另一部分酶分子则停留在载体的孔口处达到饱和, 由于这一部分酶分子阻塞在孔口处, 导致别的酶分子无法再进入载体的孔道内。另外, 随着固定化时间的延长, 已经固定上去的酶有可能会脱落下来。综上所述, 以介孔分子筛 SBA-15 固定化脂肪酶的最佳时间为 3 h。

3.3.2. 给酶量的影响

酶与载体的比对固定化酶的活力有一定的影响。图 6 是不同质量的酶液与 1 g SBA-15 载体固定化

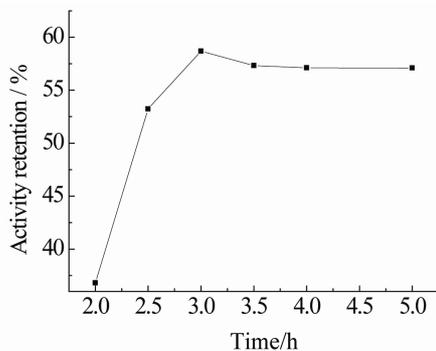


Figure 5. Effect of immobilization time on the activity retention of the immobilized PSL

图 5. 固定化时间对固定化酶活力回收率的影响

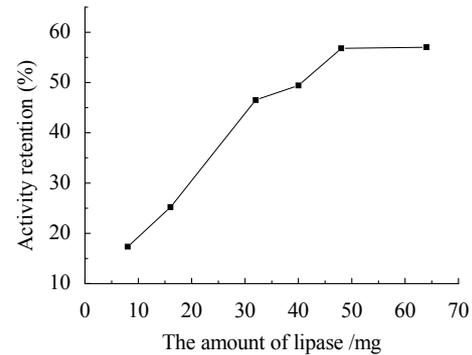


Figure 6. Effect of enzyme concentration on the activity retention of the immobilized PSL

图 6. 给酶量对固定化酶活力回收率的影响

3 h 后所得到的给酶量对载体 SBA-15 固定化脂肪酶的活性影响。由图 6 可以看出随着给酶量的增加, 固定化酶的相对活性逐渐增高, 当 SBA-15 载体为 1 g, 给酶量为 50 mg 时, 固定化酶的活性达到最高。随后固定化酶的活性随着给酶量的增加基本保持稳定。原因是一定质量的载体固定化酶的能力是有限的, 介孔材料 SBA-15 固定化酶达到饱和状态后不再吸附, 因此酶活保持基本不变。

3.3.3. pH 值的影响

在不同的 pH 值(其它固定化条件相同)条件下, 进行假单胞菌脂肪酶的固定化反应。图 7 是溶液 pH 值对固定化酶活性影响的示意图。从图中看出, 溶液在酸性条件下, 固定化酶的活力较低, 随着溶液 pH 的增高, 固定化酶的酶活逐渐增大, 当溶液 pH 为 8.0 时, 固定化酶的酶活达到最高, 此时酶活回收率最大, 表明固定化酶在 pH 为 8.0 的弱碱性条件下吸附的酶分子最多, 固定化效果最好。溶液的 pH 高于 8.0 后, 固

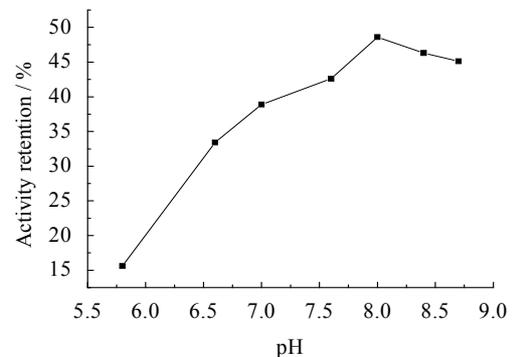


Figure 7. Effect of pH on the activity retention of the immobilized PSL

图 7. pH 值对固定化酶活力回收率的影响

定化酶的酶活有所下降, 但是不明显, 由此看来 SBA-15 分子筛固定化脂肪酶(PSL)的酶活在酸性环境下很容易失活, 弱碱性环境下相对稳定。这可能是因为, 酸性条件下, 假单胞菌脂肪酶(PSL)的活性中心氨基酸的解离状态不利于酶活性的充分发挥; 酶分子外表面的氨基酸的带电状态有可能使酶分子和载体 SBA-15 内表面的硅羟基相互作用的能力减弱; 酶分子本身构象在固定化时可能会有所改变, 这样不利于酶分子进入到载体的孔道中去, 因此, 固定化酶的酶活降低, 酶活回收率下降。

3.4 固定化酶的稳定性研究

3.4.1. 固定化酶与游离酶的 pH 稳定性

酶在固定化后本身特性会发生一定的变化, 如酶的活性、稳定性、最适 pH 范围的改变等。取 0.02 mol/L 不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液下的游离酶和固定化酶, 分别进行其活力的测定, 比较它们的稳定性。结果如图 8 所示。由图 8 可以看出固定化酶与游离酶的最适 pH 值均为 8.0, 在 pH 5.8~8.7 的范围内, 游离酶的活力能保持约 40% 以上的酶活, 而固定化酶在此条件下却能保持约 75% 的酶活, 这表明固定化酶的 pH 适应范围较游离酶有所变宽, 酶经过固定化后, pH 稳定性得到一定程度的提高。

3.4.2. 固定化酶与游离酶的储藏稳定性

酶的储藏稳定性是商业化应用的一个重要的指标, 将等活力的固定化脂肪酶与游离的酶溶液分别置于 4℃ 保存, 间隔相同的时间对其活力测定, 以存放前的活力为标准, 计算不同储藏时间后的相对活性,

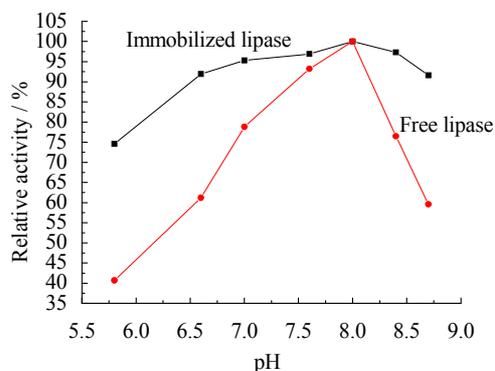


Figure 8. Effect of pH on the stability of free and immobilized PSL
图 8. pH 对固定化酶及游离酶稳定性的影响

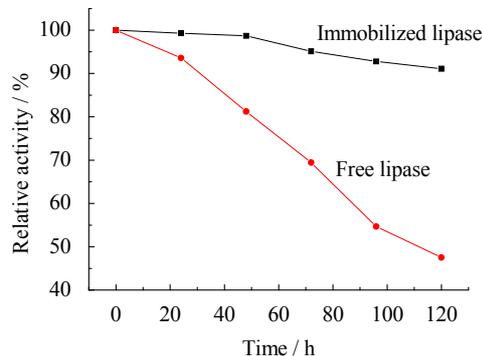


Figure 9. Storage stabilities of free and immobilized PSL
图 9. 游离酶与固定化酶的储藏稳定性

图 9 为 SBA-15 固定化假单胞菌脂肪酶与游离酶储藏稳定性的比较, 由图中我们可以看出, 脂肪酶的活力随着时间的增长而逐渐下降, 但固定化酶与游离酶相比, 活力下降趋势比较缓慢。经过 120 h, 固定化酶的活力仍然保持在 90% 以上, 而游离酶的活力只能保持在 45% 以上。由此可见载体固定化酶可以明显提高酶的储藏稳定性。

3.4.3 固定化酶的操作稳定性

固定化酶的操作稳定性与 pH 稳定性有着直接的关系, 固定化酶的 pH 稳定性越高, 其操作稳定性就越高。在脂肪酶的浓度为 4 mg/mL、温度为 25℃、pH 为 8.0 的条件下测定重复使用多次的固定化酶活性, 测定结果如图 10 所示, 图中我们可以看出固定化酶的操作稳定性较好。重复回收 3 次, 利用效果较好, 经过连续 5 批次的酶解反应, 固定化酶的活力仍保持在 50% 左右。其活力下降可能是由于一些酶分子脱落流失或失活造成的。

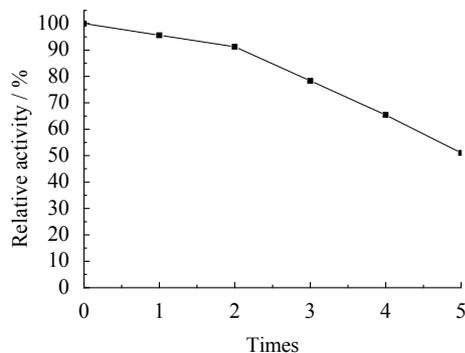


Figure 10. The operation stability of immobilized PSL
图 10. 固定化酶的操作稳定性

4. 结论

以介孔材料 SBA-15 为载体在固定化脂肪酶时, 当固定化时间为 3 小时, 载体 1 g, 给酶量为 50 mg, pH 为 8.0 的条件下, 固定化酶的酶活回收率最高, 能达到 60% 左右。假单胞菌脂肪酶在固定化后其 pH 值的稳定性范围变宽, 在 pH 5.8~8.7 的范围内, 固定化酶的活力由原来游离酶的活力 40% 以上提高到 75% 以上。脂肪酶固定化后, 其储藏稳定性较游离酶有较大幅度的提高。经过 120 h 储藏, 游离酶的活力为 45%, 而固定化酶的活力仍可保持在 90%。固定化酶的操作稳定性较好, 重复回收 3 次, 利用效果较好。

由此可知, 介孔材料 SBA-15 是脂肪酶进行固定化的一个优良载体。脂肪酶固定化后, 不仅使脂肪酶在更宽广的 pH 范围内仍然具有较高的酶活性, 而且有利于有效地重复利用脂肪酶。

5. 致谢

本课题为辽宁省教育厅科研项目(L2010224), 在此感谢辽宁省教育厅的大力支持。

参考文献 (References)

- [1] 邹国林, 朱汝璠. 酶学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997: 13-15.
- [2] S. M. O. Van Dyck, G. L. F. Lemièrè, T. H. M. Jonckers., et al. Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neolignan by lipase-catalysed acetylation. *Tetrahedron Asymmetry*, 2001, 12(5): 785-789. 金杰, 杨艳红, 吴克等. 二氧化硅纳米材料固定中性脂肪酶的条件优化及其特性[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 2003-2007.
- [3] 刘春雷, 于殿宇, 屈岩峰等. 吸附-交联法固定化脂肪酶的研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(6), 104-106.
- [4] 徐佳音, 张弛, 宋锡瑾等. 荧光标记脂肪酶的固定化及其稳定性[J]. *生物工程学报*, 2010, 26 (1): 100-107.
- [5] 王章存, 魏翠平, 王瑛瑶等. 脂肪酶固定化研究及应用初探[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(5), 174-177.
- [6] 王建龙, 谢文磊. 固定化脂肪酶催化酯交换制备生物柴油的研究进展[J]. *四川化工*, 2010, 13(4), 23-26.
- [7] 张宝华, 潜飞, 叶俊丹等. 脂肪酶的固定化及其催化合成生物柴油[J]. *石油化工*, 2009, 38(12), 1336-1341.
- [8] 邓欣, 曾虹燕, 冯波. 固定脂肪酶催化制备生物柴油条件优化[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(1), 113-116.
- [9] 陈秀琳. 脂肪酶固定化的研究概况[J]. *海峡药学*, 2007, 19(12), 114-116.
- [10] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, et al. Adsorption and activity of cytochrome c on mesoporous silicates. *Chem Commun*, 2001, 5: 465-465.
- [11] H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, et al. Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica. *Chem. Mater*, 2000, 12(11): 3301-3305.
- [12] 高波, 朱广山, 傅学奇等. 介孔分子筛 SBA-15 中 α -胰凝乳蛋白酶组装及催化活性研究[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(6): 1100-1102.
- [13] 赵起龙, 沈健, 袁兴东等. 介孔分子筛 SBA-15 的研究进展[J]. *广州化工*, 2005, 33(1): 12-15.
- [14] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 1998, 279(5350): 548-552.
- [15] 纪建业. 脂肪酶活力测定方法的改进[J]. *通化师范学院学报*, 2005, 26(6): 51-53.
- [16] K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, et al. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 1997, 5(2): 173-185.