

# 还原氧化石墨烯固定化溶菌酶的研究

李慧<sup>1\*</sup>, 庞姗姗<sup>1</sup>, 田家瑶<sup>1</sup>, 龚国利<sup>2</sup>

(1. 陕西科技大学设计与艺术学院, 陕西 西安 710021;

2. 陕西科技大学食品科学与工程(生物与医药)学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:** 为了改善游离酶稳定性差、易失活、不易储存等缺点, 将还原氧化石墨烯(RGO)作为载体进行溶菌酶固定化研究。考察了溶菌酶浓度、缓冲液 pH 和固定化时间对固定化酶活力的影响, 通过正交实验得出最佳固定化条件, 溶菌酶质量浓度为 0.5 mg/mL、缓冲液 pH 为 6.0、固定化时间为 2 h 时, 固定化酶的活力最高。固定化酶的最适温度为 55°C、最适 pH 为 6.5, 热稳定性、耐酸碱性和储存稳定性都比游离酶有所提高。固定化酶的抑菌性明显优于游离酶, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌均具有较好的抑制效果。

**关键词:** 溶菌酶; 还原氧化石墨烯; 固定化; 抑菌性

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)08-0175-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.08.033

## Research on immobilization of lysozyme by reduced graphene oxide

LI Hui<sup>1\*</sup>, PANG Shan-shan<sup>1</sup>, TIAN Jia-yao<sup>1</sup>, GONG Guo-li<sup>2</sup>

(1. School of Art & Design, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2. School of Bioengineering and Pharmaceutical Science, School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** In order to overcome the disadvantages of free enzyme, such as poor stability, easy inactivation and poor storage, reduced graphene oxide (RGO) is used as a carrier for lysozyme immobilization. The effects of lysozyme concentration, buffer pH and immobilization time on the activity of the immobilized enzyme are investigated, and the optimal immobilization conditions are obtained through orthogonal experiments. The highest activity of the immobilized enzyme is obtained when the mass concentration of lysozyme is 0.5 mg · mL<sup>-1</sup>, the buffer pH is 6.0 and the immobilization time is 2 h. The optimum temperature and pH of the immobilized enzyme are 55°C and 6.5, respectively. The thermal stability, bacteriostatic property, acid and alkaline resistances, and storage stability of the immobilized enzyme are all better than that of the free enzyme. The immobilized enzyme has better inhibition effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

**Key words:** lysozyme; reduced graphene oxide; immobilization; bacteriostatic properties

溶菌酶是一种具有抗菌潜力的酶,在医药、生物技术、食品工业中应用广泛<sup>[1-2]</sup>。然而,游离态溶菌酶易失活,耐热、耐酸碱等性能较差,且不易保存,在实际应用中受到限制。酶固定化技术能有效地克服以上缺点,改善酶的稳定性、活力和重复使用性等特性<sup>[3]</sup>。近年来,国内外学者分别以天然高分子材料<sup>[4]</sup>、介孔材料<sup>[5-6]</sup>、纳米材料<sup>[7]</sup>等为载体进行了溶菌酶的固定化研究。石墨烯作为一种纳米材料,对许多药物、蛋白质、肽和 DNA 都有很好的吸附能力<sup>[8]</sup>。其中,氧化石墨烯(GO)是石墨烯的衍生物,不仅具有高比表面积和优异的热稳定性、机械稳定性,还具有优异的亲水性、生物相容性、易功能化等特点,是酶固定载体的热门材料<sup>[9]</sup>。Zhang 等<sup>[10]</sup>证明了单独的 GO 片可以作为载体来研究酶的固定化,结果显示溶菌酶能自发固定在 GO 上,在 pH 为

7.0 时,最大负载量约为 700 μg/mg。Li 等<sup>[11]</sup>研究表明,GO 与溶菌酶之间的相互作用主要为静电作用力。尽管 GO 对溶菌酶具有良好的吸附作用,但 GO 与蛋白质的相互作用会扰乱蛋白质结构的完整性,从而导致酶活力的降低<sup>[12-13]</sup>。还原氧化石墨烯(RGO)是 GO 脱去含氧基团得到的一种石墨烯,具有优异的化学稳定性、高导热性等优点<sup>[14-15]</sup>。Bai 等<sup>[16]</sup>比较研究了 GO 和 RGO 对溶菌酶活力和构象的影响,GO 和 RGO 均能吸附大量溶菌酶,但 GO 严重抑制溶菌酶活力,而 RGO 对溶菌酶活力几乎没有影响。

笔者以 RGO 为载体固定溶菌酶,探究溶菌酶浓度、缓冲液 pH 和固定化时间对固定化溶菌酶的影响,优化固定化条件,研究游离酶及固定化酶的酶学性质和抑菌性能。

收稿日期:2022-09-21;修回日期:2023-06-03

基金项目:2020 年陕西省西安市未央区科技计划项目(202038);2021 陕西省科技厅立项资助(2021NY-124)

作者简介:李慧(1976-),女,博士,副教授,研究方向为功能材料的研究与应用,通讯联系人,lihui@sust.edu.cn。

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂

还原氧化石墨烯 (RGO), 含氧质量分数为 15%~20%, 炭美科技生产; 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP K30), 国药集团化学试剂有限公司生产; 蛋清溶菌酶, 酶活 20 000 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司生产; 溶壁微球菌粉, 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; LB 肉汤、酵母浸粉、蛋白胨, 均为 BR, 北京奥博星生物技术有限责任公司生产; 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌, 北纳创联生物技术有限公司生产。

### 1.2 实验仪器

紫外-可见分光光度计, UV 5200 型, 上海元析仪器有限公司生产; pH 测量仪, PHS-25 型, 上海仪电科学仪器股份有限公司生产; 磁力搅拌器, 78-2 型, 西安比朗生物科技有限公司生产; 离心机, TGL20M 型, 长沙英泰仪器有限公司生产。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 溶菌酶的固定化

准确称取适量 RGO, 加入 30 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH=6.0), 再加入 1.5% 的 PVP K30 为分散剂, 充分搅拌后于 4℃ 冰水超声分散 70 min, 得到 0.1 mg/mL RGO 分散液。准确称取适量溶菌酶, 用磷酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH=6.0) 配置成 0.5 mg/L 溶菌酶溶液。将上述分散液与溶菌酶溶液按体积比 1:1 混合, 在 4℃ 冰水浴中, 200 r/min 磁力搅拌 2 h, 随后, 以 8 000 r/min 离心分离 15 min, 收集上清液, 测定溶菌酶固载量, 将离心分离沉淀物真空冷冻干燥后置于 4℃ 保存, 得到固定化溶菌酶 (RGO-Ly)。

#### 1.3.2 酶固载量的计算

配制 1 mg/mL 溶菌酶溶液, 将其稀释并配成 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 溶菌酶溶液, 用紫外分光光度计测定  $\lambda=280$  nm 处吸光度值, 绘制标准曲线, 并测定上清液中酶浓度。按公式 (1) 计算溶菌酶的固载量:

$$L_0 = [(L_o - L_e) \times V] / m \quad (1)$$

式中:  $L_0$  为溶菌酶的固载量, mg/mg;  $L_o$  和  $L_e$  分别为溶菌酶溶液中的初始质量浓度和平衡质量浓度, mg/mL;  $V$  为溶菌酶溶液的体积, mL;  $m$  为 RGO 的质量, mg。

#### 1.3.3 酶活力的测定方法

采用比浊法 GB 1886.257—2016《食品安全国

家标准 食品添加剂 溶菌酶》测定溶菌酶的活力。

#### 1.3.4 相对酶活力及酶活回收率的计算

设定同组酶活力最高的相对酶活力为 100%, 以此为参照按公式 (2) 计算相对酶活力:

$$\text{相对酶活力} / \% = [(\text{固定化酶活力} / \text{U}) / (\text{同组最高酶活力} / \text{U})] \times 100 \quad (2)$$

按公式 (3) 计算酶活回收率:

$$\text{酶活回收率} / \% = [(\text{固定化溶菌酶活力} / \text{U}) / (\text{游离溶菌酶酶活力} / \text{U})] \times 100 \quad (3)$$

#### 1.3.5 溶菌酶固定化条件的优化

首先通过单因素实验考察溶菌酶浓度、缓冲液 pH 和固定化时间对固定化溶菌酶活力的影响。其次采用  $L_9(3^3)$  正交实验对溶菌酶固定化条件进行优化。

#### 1.3.6 固定化溶菌酶的性质测定

##### (1) 最适温度

将 0.03 mg/mL 游离酶和固定化酶溶液分别置于 25、35、45、55、65、75、85℃ 不同温度下孵育 2 min, 立即测其酶活力, 以得到的最大酶活力为 100%, 通过温度-相对酶活力曲线确定酶的最适温度。

##### (2) 热稳定性

将 0.03 mg/mL 游离酶和固定化酶溶液分别置于 25、35、45、55、65、75、85℃ 不同温度条件下保温 2 h, 冰水浴冷却酶液, 测定其残留酶活力, 以未经保温处理酶液的酶活力为 100%, 通过温度-相对酶活力曲线确定酶在不同温度下的稳定性。

##### (3) 最适 pH

将 0.03 mg/mL 游离酶和固定化酶溶液在 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 不同 pH 条件下与底物反应, 测定其残留酶活力, 以得到的最大酶活力为 100%, 通过 pH-相对酶活力曲线确定酶的最适 pH。

##### (4) 酸碱稳定性

在 25℃ 条件下, 将游离酶和固定化酶分别保存于 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 PBS 缓冲液中, 静置 2 h 后立即测其残留酶活力, 以得到的最大酶活力作为 100%, 通过 pH-相对酶活力曲线确定酶的 pH 稳定性。

##### (5) 储存稳定性

将游离酶和固定化酶分别保存于 0.1 mol/L、pH 6.2 的 PBS 缓冲液中, 在 4℃ 条件下保存 30 d, 每隔 5 d 按 1.3.3 中的方法测其酶活力。

#### 1.3.7 抑菌性测试

对参考文献 [17] 中抑菌性的测试方法进行改

进,测试固定化酶质量浓度 0.25、0.5、1、2 mg/mL 下对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌率。按公式(4)计算抑菌率:

$$B_R = [(A - B)/A] \times 100\% \quad (4)$$

式中: $A$ 为对照组最终培养出的菌落数,CFU; $B$ 为实验组最终培养出的菌落数,CFU。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶菌酶质量浓度标准曲线

溶菌酶质量浓度标准曲线如图 1 所示,标准曲线方程为  $y = 2.26254x + 0.00773$ ,相关系数  $R^2$  为 0.99974 > 0.99,表明该标准曲线有效, $k = 2.26254$ ,表明当样品溶液 OD 值为 2.26254 时,溶菌酶质量浓度与 1 mg/mL 溶菌酶标准溶液质量浓度相同,即溶菌酶质量浓度与 OD 值成正比关系。

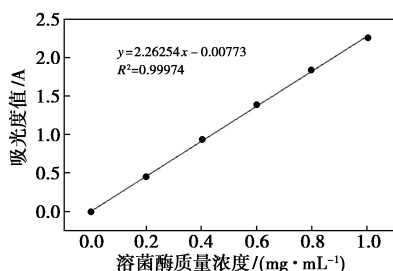


图 1 溶菌酶质量浓度标准曲线

### 2.2 固定化条件单因素实验

#### 2.2.1 酶质量浓度对固定化酶活力的影响

溶菌酶质量浓度对固定化酶活力的影响如图 2 所示。随着酶质量浓度的增大,固定化酶活力呈现先增大后降低的趋势。酶质量浓度由 0.3 mg/mL 增加至 0.5 mg/mL 时,固定化酶的相对酶活力增加较快,分别增长了 27.35% 和 25.62%;酶质量浓度 > 0.5 mg/mL 后,固定化酶的相对活力略有下降。一定质量的载体可吸附的酶量有限,酶质量浓度较大时,酶分子在载体表面相互堆积,造成酶活性位点被覆盖,过多的酶蛋白增加了空间位阻,导致固定化酶活力降低<sup>[18-19]</sup>。

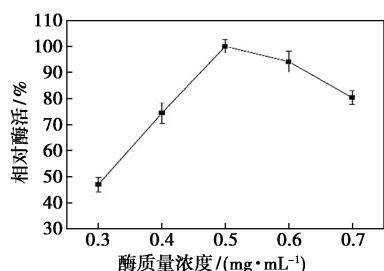


图 2 酶质量浓度对固定化酶相对酶活力的影响

#### 2.2.2 缓冲液 pH 对固定化酶活力的影响

缓冲液 pH 对固定化酶活力的影响如图 3 所示。pH 为 4.5~6.0 时,随着 pH 的升高,固定化酶活力升高;当 pH > 6.0 时,固定化酶相对酶活力急剧下降。研究表明,缓冲液的 pH 会影响酶分子微观结构,强酸强碱会导致蛋白质变性和失活<sup>[20]</sup>,因此,酸性或碱性条件下酶活均会受到一定程度的影响。

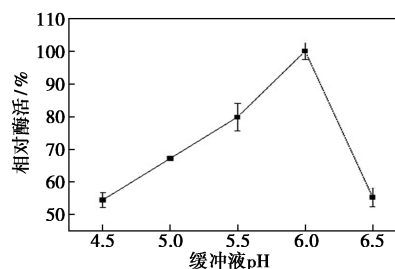


图 3 缓冲液 pH 对固定化酶相对酶活力的影响

#### 2.2.3 固定化时间对固定化酶活力的影响

固定化时间对固定化酶活力的影响如图 4 所示。当固定化时间为 1~2 h 时,固定化酶的相对酶活力逐渐增大;当固定化时间 > 2 h 时,固定化酶的相对酶活力出现下降的趋势,说明 RGO 对溶菌酶的吸附达到饱和状态。随着固定化时间的延长,RGO 表面酶分子相互聚集,其活性基团之间较为拥挤,在反应过程中,溶液中底物不易与酶分子充分接触;另外,随着固定化时间的延长也会造成酶的失活,因此固定化酶的相对酶活力呈现下降的趋势<sup>[19,21]</sup>。

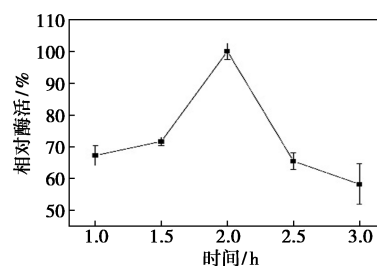


图 4 固定化时间对固定化酶相对酶活力的影响

### 2.3 固定化酶工艺条件优化

RGO 固定溶菌酶正交实验结果与方差分析如表 1 和表 2 所示,各影响因素的影响顺序为  $C > B > A$ ,固定化时间( $C$ )对固定化有显著影响( $P < 0.05$ ),这与表 1 的分析结果一致。得到工艺条件为  $A_2B_2C_2$ ,即溶菌酶质量浓度为 0.5 mg/mL、缓冲液 pH 为 6.0、固定化时间为 2 h,由此制备的固定化酶活回收率最高,为 82.27%,酶活力为  $(16454 \pm 434.66)$  U/mg。

表 1 RGO 固定溶菌酶  $L_9(3^3)$  正交实验结果

实验号	溶菌酶质量浓度 (A)/(mg·mL <sup>-1</sup> )	缓冲液 pH (B)	固定化时间 (C)/h	酶活回 收率/%
1	1	1	1	27.45
2	1	2	2	61.19
3	1	3	3	43.21
4	2	1	2	61.66
5	2	2	3	58.44
6	2	3	1	26.91
7	3	1	3	37.72
8	3	2	1	38.38
9	3	3	2	56.14
$K_1$	131.85	126.82	92.75	
$K_2$	147.01	158.01	178.99	
$K_3$	132.24	126.27	139.36	
$k_1$	43.95	42.27	30.92	
$k_2$	49.00	52.67	59.66	
$k_3$	44.08	42.09	46.45	
R	5.05	10.58	28.75	
主次顺序		C>B>A		
最优水平		A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>		

表 2  $L_9(3^3)$  正交实验结果方差分析

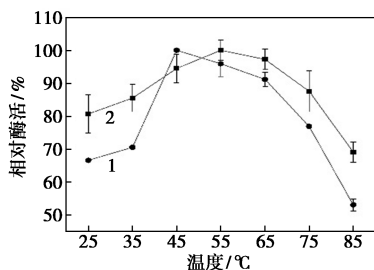
方差来源	SS	DF	MS	F	P
A	49.754	2	24.877	0.788	0.559
B	220.087	2	110.044	3.487	0.223
C	1242.202	2	621.101	19.683	0.048
总和 S	1575.153	8			

注:  $P < 0.05$  表示呈显著性。

## 2.4 固定化酶的酶学性质

### 2.4.1 最适温度

温度对游离溶菌酶及固定化溶菌酶活力的影响如图 5 所示。游离酶的最适反应温度为 45℃, 固定化酶的最适反应温度提高到 55℃, 与游离酶相比, 固定化酶的耐热性增强。



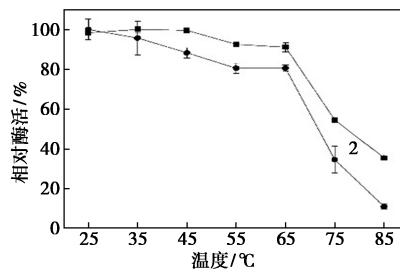
1—游离溶菌酶; 2—固定化溶菌酶

图 5 温度对游离溶菌酶及固定化溶菌酶活力的影响

### 2.4.2 热稳定性

游离溶菌酶和固定化溶菌酶的热稳定性如图 6

所示。在 65~85℃ 温度范围内, 与游离酶相比, 固定化酶活力下降较为缓慢, 85℃ 时, 游离酶活力仅保留 11.03%, 而固定化酶仍保留了 35.47% 的酶活力。表明与游离酶相比, 固定化酶在高温下能更好地保持其酶活力, 热稳定性提高。固定化可以增加酶分子的刚性, 避免酶分子因加热而发生三级结构变化, 从而增加酶的热稳定性<sup>[22]</sup>。固定化后的酶的构象灵活性降低, 因此热变性能力也降低<sup>[23]</sup>。

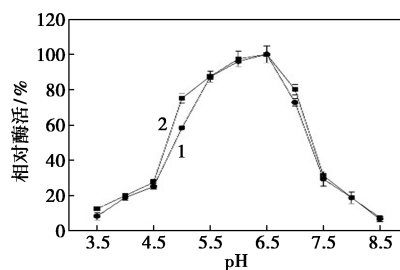


1—游离溶菌酶; 2—固定化溶菌酶

图 6 游离溶菌酶和固定化溶菌酶的热稳定性

### 2.4.3 最适 pH

pH 对游离溶菌酶及固定化溶菌酶活力的影响如图 7 所示。随着 pH 的升高, 两者的活力均呈现先增加后减小的趋势; pH=6.5 时达到最大值, 与游离酶相比, 固定化酶 pH 适宜范围略微变宽。

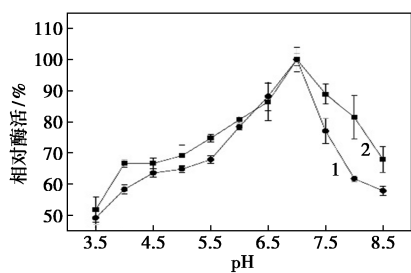


1—游离溶菌酶; 2—固定化溶菌酶

图 7 pH 对游离溶菌酶及固定化溶菌酶活力的影响

### 2.4.4 酸碱稳定性

游离溶菌酶和固定化溶菌酶的酸碱稳定性如图 8 所示。固定化酶的酸碱稳定性明显优于游离酶, pH 为 6.0~8.0 之间均保持了 80% 以上的活力, 在酸性条件下, 固定化酶的相对酶活力略高于游离酶。游离酶在酸性条件下带正电, 酶之间的静电斥力限制了游离酶活性部位对底物的吸收, 导致酶活力降低<sup>[24]</sup>。而固定化可通过改变酶表面电荷降低这种静电斥力, 这也是 RGO 固定化后溶菌酶活力提高的原因。在 pH>7 的条件下, 随着 pH 的变化, 固定化酶活力下降比游离酶缓慢, 表明固定化酶的耐碱性增强, 扩展了固定化酶的应用领域。

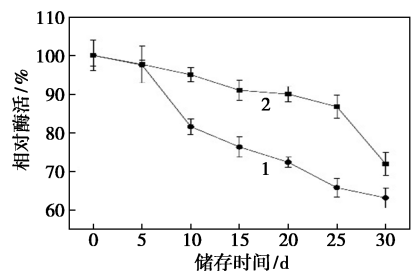


1—游离溶菌酶;2—固定化溶菌酶

图8 游离溶菌酶和固定化溶菌酶的酸碱稳定性

#### 2.4.5 固定化LY的储存稳定性

酶的储存稳定性在工业应用中有着重要的作用<sup>[21]</sup>。参照文献<sup>[25]</sup>的方法测定游离酶和固定化酶在4℃下储存30 d的剩余酶活力来评价游离酶和固定化酶的储存稳定性,结果如图9所示。在相同的储存条件下,固定化酶活力的下降速率远比游离酶的下降速率慢。游离酶储存15 d后失去23.68%的初始活力,30 d后失去36.84%的活力。而固定化酶在储存15 d后失去9.01%的初始活力,30 d后失去28.06%的初始活力,表明固定化酶表现出较高的储存稳定性。



1—游离溶菌酶;2—固定化溶菌酶

图9 游离溶菌酶和固定化溶菌酶的储存稳定性

#### 2.5 固定化酶的抑菌性

溶菌酶与RGO-Ly的抑菌性测试结果可知,溶菌酶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的MIC分别为10.0、5.0、5.0 mg/mL,RGO-Ly对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的MIC分别为1.0、0.5、1.0 mg/mL。固定化酶提高了对测试菌种的敏感性,抑菌性能得到很大提高。原因如下:①固定化提高了溶菌酶的酶学性质,其酶活不易损失<sup>[21]</sup>;②溶菌酶和载体RGO两者协同作用抑菌的结果,有研究表明<sup>[15,26]</sup>,RGO可能对细菌细胞膜产生物理损伤,导致细菌细胞死亡。

### 3 结论

以RGO为载体,通过单因素和正交实验优化得

出固定化酶最佳工艺条件:溶菌酶质量浓度(A)为0.5 mg/mL、缓冲液pH(B)为6.0、固定化时间(C)为2 h,影响显著性为C>B>A。固定化酶的最适反应温度由45℃升高到55℃,最适pH基本不变,热稳定性和耐酸碱稳定性均得到一定改善。4℃下的储存稳定性提高,保存30 d后酶活力仅损失28.06%。固定化酶的抑菌性大大提高,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的MIC分别为1.0、0.5、1.0 mg/mL。RGO-Ly具有良好抑菌性能,是一种环境友好型抗菌剂,在纺织品、食品包装、生物医药等领域应用前景广阔。

#### 参考文献

- [1] 梁勋,胡杰,汪乐川,等.溶菌酶高分子复合抗菌材料的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(15):193-200.
- [2] Wang Y, Li S, Jin M, et al. Enhancing the thermo-stability and antibacterium activity of lysozyme by immobilization on chitosan nanoparticles[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5):1635.
- [3] Annie A, Lorraine N, Samuel N, et al. Synthesis of chitosan-lysozyme microspheres, physicochemical characterization, enzymatic and antimicrobial activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 185:572-581.
- [4] 张永勤,许文廷,邢明霞,等.表面脱乙酰化甲壳素颗粒固定溶菌酶及酶学性质研究[J].食品工业科技,2019,40(5):188-192,200.
- [5] Badun G A, Chernysheva M G, Razzhivina I A. Use of tritium-labeled lysozyme for studying its adsorption on porous carbon materials[J]. Radiochemistry, 2017, 59(3):292-296.
- [6] 陈晓蕊,鲁新,孙俊芝,等.氨基改性SBA-15介孔分子筛固定化双酶/环氧复合涂层的制备及其耐蚀性[J].腐蚀与防护,2020,41(12):7-14,20.
- [7] Chaudhary K, Kumar K, Venkatesu P, et al. Protein immobilization on graphene oxide or reduced graphene oxide surface and their applications: Influence over activity, structural and thermal stability of protein[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2021, 289:102367.
- [8] 王晓娟,刘真真,陈奇,等.石墨烯材料与蛋白质的相互作用[J].化学进展,2019,31(Z1):236-244.
- [9] 毛梦雷,孙丹阳,孟子晖,等.氧化石墨烯和过渡金属碳/氮化合物固定化酶[J].化工进展,2022,41(4):1941-1955.
- [10] Zhang J L, Zhang F, Yang H J, et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization[J]. Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2010, 26(9):6083-6085.
- [11] Li S H, Mulloor J J, Wang L Y, et al. Strong and selective adsorption of lysozyme on graphene oxide[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(8):5704-5712.
- [12] Pandit S, De M. Roles of edges and surfaces of graphene oxide in molecular recognition of proteins: Implications for enzymatic inhibition of alpha-chymotrypsin[J]. ACS Applied Nano materials, 2020, 3(4):3829-3838.

(下转第184页)

基-D-丙氨酸的合成中,当  $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$ ,第 1 步反应温度为  $30^\circ\text{C}$ 、停留时间为 2 min;第 2 步反应温度为  $10^\circ\text{C}$ 、停留时间为 1.5 min 时,产物的收率达到 84.8%。

(3)与常规间歇式反应工艺相比,连续流微通道反应工艺的原料消耗较低,大大缩短了反应时间,提升了装备效率和产品收率,为后续工业化应用提供了研究基础。

### 参考文献

- [1] 孙薇,丁冬芹,柏丹阳,等.芳香族氨基酸及其衍生物的细胞工厂构建策略[J].合成生物学,2021,2(6):18-19.
- [2] Rijkers D T S, Jo W M Hoppener, Posthuma G, *et al.* Inhibition of amyloid fibril formation of human amylin by N-alkylated amino acid and alpha-hydroxy acid residue containing peptides[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2002, 8(18):4285-4291.
- [3] 布晓东,许艳杰.氨基酸的 N-甲基化方法[J].化工中间体,2008,(4):1-5.
- [4] 王玲丽.生物质平台化合物合成噁唑烷酮类及胺类化合物的研究[D].石家庄:河北科技大学,2018.
- [5] Hannachi J C, Vidal J, Mulatier J C, *et al.* Electrophilic amination of amino acids with N-Boc-oxaziridines: Efficient preparation of N-orthogonally diprotected hydrazino acids and piperazic acid derivatives[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69(7):2367-2373.
- [6] 葛新.还原胺化反应的应用及其机理研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [7] Sukanta, Bhattacharyya, Arindam, *et al.* Reductive amination with zinc borohydride. efficient, safe route to fluorinated benzylamines [J]. *Synthetic Communications*, 1997, 27(24):4265-4274.
- [8] Ranu B C, Majee A, Sarkar A. One-pot reductive amination of conjugated aldehydes and ketones with silica gel and zinc borohydride [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63(2):370-373.
- [9] Kumpaty H J, Bhattacharyya S. Efficient synthesis of N-alkyl tetrahydroisoquinolines by reductive amination [J]. *Synthesis*, 2005, (13):2205-2209.
- [10] 丁云成,王法军,艾宁,等.微反应器内连续重氮化/偶合反应进展[J].化工学报,2018,69(11):4542-4552.
- [11] Avon E D L, Cesson P W. Process intensified microfluidic devices: US, 7939033B2 [P]. 2011-05-10.
- [12] 刘建武,张跃.丙酮液相氨脲化连续流反应[J].精细化工,2021,38(5):1075-1080.
- [13] 郭冰蒙,张跃,严生虎,等.微通道反应器中 3,5-二硝基苯甲酸的连续合成工艺[J].天然气化工: C1 化学与化工,2021,46(2):77-80.
- [14] 岳家委,辜顺林,刘建武,等.重氮乙酸乙酯的连续合成工艺研究[J].现代化工,2021,41(6):205-208.
- [15] 祁锴铤,辜顺林,刘建武,等.硫酸苯肼的合成及分析方法[J].化学试剂,2022,44(6):936-940.
- [16] 严生虎,韩玲玲,沈卫,等.微通道中环己酮氧化合成  $\epsilon$ -己内酯的连续流工艺[J].化工进展,2014,33(11):3061-3066.
- [17] Huy P H, Koskinen A M P. Efficient, stereodivergent access to 3-piperidinols by traceless P(OEt)<sub>3</sub> cyclodehydration [J]. *Organic Letters*, 2013, 15(20):5178-5181.
- [18] Fu X, Li Z, Wei J, *et al.* Schiff base and reductive amination reactions of  $\alpha$ -amino acids: A facile route toward N-alkylated amino acids and peptoid synthesis [J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2018, 9(37):4617-4624.
- [19] Aboussafy C L, Clive D L J. A Dieckmann cyclization route to piperazine-2,5-diones [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77(11):5125-5131.
- [20] Huy P H, Westphal J C, Koskinen A M P. Concise, stereodivergent and highly stereoselective synthesis of cis- and trans-2-substituted 3-hydroxypiperidines-development of a phosphite-driven cyclodehydration [J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2014, 10(1):369-383.
- [21] Yoon U C, Jin Y X, Oh S W, *et al.* A synthetic strategy for the preparation of cyclic peptide mimetics based on SET-promoted photocyclization processes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(35):10664-10671. ■
- [13] Huang S, Li H M, Liu Y, *et al.* Investigations of conformational structure and enzymatic activity of trypsin after its binding interaction with graphene oxide [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 392:122285.
- [14] Xiang X, Zhu Y, Gao C, *et al.* Study on the structure of reduced graphene oxide prepared by different reduction methods [J]. *Carbon Letters*, 2022, 32(2):557-566.
- [15] Feng J L, Ye Y Q, Xiao M, *et al.* Synthetic routes of the reduced graphene oxide [J]. *Chemical Papers*, 2020, 74(11):3767-3783.
- [16] Bai Y T, Ming Z, Cao Y Y, *et al.* Influence of graphene oxide and reduced graphene oxide on the activity and conformation of lysozyme [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 154:96-103.
- [17] 刘绰绰.负载溶菌酶的聚醚砜杂化超滤膜制备及其抗菌性能研究[D].郑州:郑州大学化工与能源学院,2014.
- [18] Luo R P, Zhou X R, Xiu Y, *et al.* Preparation of hierarchically mesoporous bioactive glass and immobilization of lysozyme [J]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2018, 87(3):584-592.
- [19] 郭庆启,张娜,符群,等. AB-8 大孔树脂固定化溶菌酶及酶学性质研究 [J]. *食品科学*, 2012, 33(17):216-220.
- [20] 傅婷,万骥,王丹,等.牛肾溶菌酶的分离纯化及部分酶学性质 [J]. *食品科学*, 2016, 37(5):126-131.
- [21] Lian Z X, Ma Z S, Wei J, *et al.* Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(2):201-208.
- [22] 张群,张育淇,刘晓贞,等.大尺寸 SiO<sub>2</sub> 大孔材料固定化漆酶 [J]. *无机化学学报*, 2013, 29(10):2065-2070.
- [23] Xue F, Chen Q, Li Y L, *et al.* Immobilized lysozyme onto 1,2,3,4-butanetetracarboxylic (BTCA)-modified magnetic cellulose microsphere for improving bio-catalytic stability and activities [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131:109425.
- [24] Bayazidi P, Almasi H, Asl A K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107(Pt B):2544-2551.
- [25] 朱衡,张继福,张云,等.基于羧基载体 LX-1000IDA 的脂肪酶固定化研究 [J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 38(6):88-101.
- [26] 宋雅丽,王林变,高莉,等.氧化石墨烯抗菌性及生物安全性研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(1):109-118. ■

(上接第 179 页)