

# 磁性壳聚糖微球固定化环糊精糖基转移酶催化合成 $\alpha$ -熊果苷的研究

张欢, 吴剑荣\*, 吴淼森, 郑志永, 詹晓北

(江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 利用磁性壳聚糖微球固定化环糊精糖基转移酶合成 $\alpha$ -熊果苷, 采用透射电镜、扫描电镜及傅里叶红外光谱对凝胶颗粒及固定化载体进行表征, 探讨了固定化条件及固定化酶的相关酶学性质。结果表明, 环糊精糖基转移酶固定化最优条件为: 戊二醛体积分数为2%, 交联时间为4 h, 加酶量为0.45 mg/mL, 固定化时间为5 h。相比游离酶, 固定化酶温度稳定性提高, 重复催化反应5次后, 仍能保持初始转化率的46.3%。

**关键词:** 磁性壳聚糖微球; 离子凝胶法; 固定化酶;  $\alpha$ -熊果苷

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)06-0098-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.06.023

## Synthesis of $\alpha$ -arbutin with cyclodextrin glycosyltransferase immobilized by magnetic chitosan microspheres

ZHANG Huan, WU Jian-rong\*, WU Miao-sen, ZHENG Zhi-yong, ZHAN Xiao-bei

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:**  $\alpha$ -Arbutin is a natural small molecular compound with functions of whitening, antioxidant etc. In this study, magnetic chitosan microspheres are prepared and used to immobilize cyclodextrin glycosyltransferase for  $\alpha$ -arbutin synthesis. The prepared gel particles and immobilized carrier are characterized by transmission electron microscope, scanning electron microscope and Fourier transform infrared spectroscopy. The immobilization conditions and properties of immobilized enzymes are investigated. The optimum conditions for the immobilization of cyclodextrin glycosyltransferase are as follows: glutaraldehyde concentration 2% (*v/v*), cross-linking time of 4 h, enzyme addition 0.45 mg/mL and immobilization time of 5 h. Compared with free enzyme, the temperature stability of immobilized enzyme is improved, and the conversion rate is 46.3% of the initial one after repeated catalytic reaction for 5 times.

**Key words:** magnetic chitosan microspheres; ionotropic gelation; immobilized CGTase;  $\alpha$ -arbutin

环糊精糖基转移酶(CGTase, EC 2.4.1.19)具有多种催化功能, 如水解、歧化、环化和偶合反应等。CGTase能催化分子间的转糖基反应, 先把直链麦芽低聚糖切断, 然后将其中一段转移到另外的直链受体上<sup>[1]</sup>。如CGTase催化 $\beta$ -环糊精转移糖基到L-抗坏血酸上, 生成葡萄糖基-L-抗坏血酸, 提高产物稳定性<sup>[2]</sup>。赵等<sup>[3]</sup>的研究发现, CGTase能够催化麦芽糊精水解产生小分子糖, 转移至对苯二酚的酚羟基上, 形成HQG<sub>n</sub>, 再通过糖化酶水解糖苷键得到HQG<sub>1</sub>( $\alpha$ -熊果苷)。 $\alpha$ -熊果苷具有美白肌肤、祛斑、抗炎<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等生理功效。其美白机制主要是通过抑制黑色素细胞中酪氨酸酶活性, 阻断多巴胺的合成, 从而进一步阻止黑色素的形成, 相比 $\beta$ -熊果苷更安全有效。游离CGTase酶利用率不高, 且酶与产物混杂, 在此基础上, 提出采用固定化酶方法提

高CGTase的利用率及稳定性, 降低生产成本。

CGTase固定化方法有: 壳聚糖交联法和分子筛吸附-交联-包埋法固定化CGTase催化转糖基反应<sup>[2,6]</sup>; 功能化磁性核壳硅纳米颗粒固定化CGTase合成环糊精等<sup>[7]</sup>。其中磁性纳米颗粒载体固定化酶因具有超顺磁性, 较大比表面积, 外加磁场易分离等优点备受关注。通常会以纳米四氧化三铁为磁核, 表面包裹基质, 然后进行化学基团改性, 再用于固定化酶<sup>[8-9]</sup>。壳聚糖结构简单, 易得, 且易于改性, 常被作为四氧化三铁的表面基质。

笔者以离子凝胶法制备得到磁性壳聚糖凝胶微球, 该方法操作简单, 并以此为载体, 戊二醛为交联剂, 固定化CGTase, 用以制备 $\alpha$ -熊果苷。通过单因素优化确定最佳固定化条件, 并考察固定化酶性质变化及重复使用次数。

收稿日期: 2016-12-12

作者简介: 张欢(1991-), 女, 硕士研究生, huanzhang0618@163.com; 吴剑荣(1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物资源与制品开发, 通讯联系人, kinowu76@163.com。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

环糊精糖基转移酶(CGTase),日本天野酶制剂公司生产;壳聚糖(CS,脱乙酰度为80%~95%)、冰醋酸(分析纯)、25%(体积分数)戊二醛等均购于国药集团化学试剂有限公司; $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CD)、三聚磷酸钠(TPP)、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (20 nm,99.5%)购于上海阿拉丁生化科技公司。

### 1.2 固定化载体的制备

#### 1.2.1 壳聚糖凝胶颗粒的制备

CS溶液中质子化氨基与TPP中的磷酸基团间通过静电作用相互吸引,使壳聚糖分子长链折叠团聚呈小微粒,形成壳聚糖凝胶微球<sup>[10]</sup>。通过优化,以体积分数为1%的醋酸溶液溶解和配制成质量浓度为4 mg/mL CS溶液,用2 mol/L NaOH溶液调节pH为4.5。恒温磁力搅拌下(600 r/min),用5 mL注射器缓慢将2 mg/mL TPP溶液逐滴加入CS溶液 $[V(\text{CS})/V(\text{TPP})=2:1]$ ,保持搅拌20 min,形成稳定凝胶微球乳悬液。

#### 1.2.2 磁性壳聚糖微球的制备

取适量 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 先超声分散于TPP溶液中,再逐滴加入CS溶液。随着CS与TPP形成凝胶微球,纳米 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 被包裹其中,从而形成壳聚糖包裹的磁性微球。用强磁铁块进行收集、洗涤3次,并冷冻干燥。

### 1.3 固定化酶方法

根据1.2.2中所述的方法制备磁性壳聚糖微球,并用去离子水重复收集、洗涤、收集3次,去除多余CS及TPP溶液。取一定量的磁性壳聚糖微球水重悬液作为固定化酶的载体。根据不同优化条件,加入一定体积的戊二醛,避光置于25℃,120 r/min条件下进行交联。交联结束后,用去离子水洗涤3次,去除多余戊二醛。之后,加入5 mL pH为6.0的0.1 mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液重悬载体,并加入一定量的游离CGTase,25℃,120 r/min条件下进行酶的固定化。

### 1.4 蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法(Bradford)测定蛋白浓度<sup>[11]</sup>。

### 1.5 $\alpha$ -熊果苷浓度测定

利用高效液相色谱仪(岛津LC2010)测定 $\alpha$ -熊果苷浓度。取4 mL反应液,加入1 mL甲醇(HPLC纯),混匀后于8 000 r/min条件下离心10 min,取少量上清液过滤后利用高效液相色谱测定 $\alpha$ -熊果苷浓度。色谱条件为:色谱柱为C18柱,柱温箱温度为30℃;流动相为20%甲醇,流速为0.6 mL/min;紫外检测器,检测波长为280 nm,进样量为10  $\mu\text{L}$ 。

### 1.6 酶活力测定

根据文献[12]中所述的方法测定游离酶活力,仅稍作改动:试管中依次加入0.6 mL体积分数为1%淀粉溶液,2.3 mL pH 6.0,0.1 mol/L的柠檬酸-

(上接第97页)

- [6] Boland E D, Telemeco T A, Simpson D G, et al. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2004, 71B(1): 144-152.
- [7] Gao J M, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 42(3): 417-424.
- [8] Ma Z W, Gao C Y, Gong Y H, et al. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(21): 3725-3730.
- [9] Chim H, Ong J L, Schantz J T, et al. Efficacy of glow discharge gas plasma treatment as a surface modification process for three-dimensional poly(D,L-lactide) scaffolds[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65A(3): 327-335.
- [10] 刘瑞来, 刘俊劭, 刘海清. 聚乳酸/醋酸纤维素复合多孔超细纤维的制备[J]. *高分子学报*, 2013, (10): 1312-1318.
- [11] 王江南, 刘海清. 静电纺丝制备多孔醋酸纤维素超细纤维[J]. *高分子材料科学与工程*, 2012, 27(5): 133-136.
- [12] Li A, Sun H X, Tan D Z, et al. Superhydrophobic conjugated microporous polymers for separation and adsorption[J]. *Energy and Environmental Science*, 2011, 4(6): 2062-2065.
- [13] Zhao J H, Han W Q, Tang M J, et al. Structure, morphology and cell affinity of poly(L-lactide) films surface-functionalized with chitosan nanofibers via a solid-liquid phase separation technique[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(3): 1546-1553.
- [14] Zhang W B, Shi Z, Zhang F, et al. Superhydrophobic and superoleophilic PVDF membranes for effective separation of water-in-oil emulsions with high flux[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(14): 2071-2076.
- [15] Park K, Jung H J, Kim J J, et al. Acrylic acid-grafted hydrophilic electrospun nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffold[J]. *Macromolecular Research*, 2006, 14(5): 552-558. ■

柠檬酸钠缓冲液。将上述混合液置于 40℃ 水浴保温 10 min 后,加适量稀释一定倍数的 CGTase,40℃ 水浴反应 10 min。加入 150 μL 6 mol/L HCl 停止反应,加入 0.1 mL,1 mmol/L 的甲基橙溶液,并置于 16℃ 下水浴静置显色 15 min。用紫外-可见分光光度计于 505 nm 下测定吸光度  $A_{505}$ 。对照组不加 CGTase,其他条件不变。以对照组和样品组的吸光度之差  $\Delta A_{505}$  对应的  $\alpha$ -CD 浓度标准曲线得出上述反应条件下所合成的  $\alpha$ -CD 浓度。

固定化酶活力测定:用 10 mL pH 6.0,0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液重悬固定化酶,取 0.1 mL 加入反应液中(同游离酶活力测定反应体系)。其他条件与上述反应过程相同。

酶活定义:在确定的反应条件下,每分钟合成 1 μmol  $\alpha$ -CD 所需酶量为一个酶活力单位 U。

$$\text{固定化酶蛋白回收率 } R_1 =$$

$$[(\text{初始加入酶量} - \text{上清液含酶量}) / \text{初始加入酶量}] \times 100\%$$

$$\text{固定化酶活回收率 } R_2 =$$

$$[(\text{初始加入酶比酶活} - \text{固定化酶比酶活}) / \text{初始加入酶比酶活}] \times 100\%$$

### 1.7 固定化载体的表征

利用透射电镜(日立 H-7650)和扫描电镜(德国蔡斯 Merlin)观察壳聚糖凝胶颗粒及磁性壳聚糖微球的大小及形态;利用傅里叶红外光谱(美国尼高力 NEXUS)对壳聚糖、纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  及磁性壳聚糖微球化学结构进行图谱分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 磁性壳聚糖微球的表征

#### 2.1.1 壳聚糖凝胶微球 TEM 分析

根据 1.2.1 中所述的方法制备壳聚糖凝胶颗粒,采用乙醇分散。透射电镜分析结果如图 1 所示。由于 CS 溶于乙酸溶液中,自身也会形成多糖凝胶,图 1 中白色背景即为该多糖凝胶。黑色原点状即为 CS 与 TPP 形成的壳聚糖凝胶颗粒,大小近似为 200~600 nm 左右,个别颗粒间有粘连。

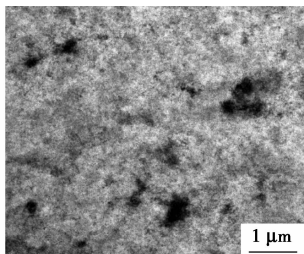


图 1 壳聚糖凝胶颗粒的 TEM 分析

#### 2.1.2 磁性壳聚糖凝胶微球 SEM 分析

根据 1.2.2 中所的方法制得磁性壳聚糖凝胶微球,采用乙醇分散,硅片制样。对磁性凝胶微球进行扫描电镜分析,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,磁性壳聚糖凝胶微球大小在 1 μm 左右,与图 1 中制得的凝胶颗粒平均粒径相比较,这是由于凝胶中包裹有磁性纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。磁性壳聚糖凝胶颗粒表面粗糙不平、多孔,有助于颗粒对酶蛋白分子的吸附和交联。

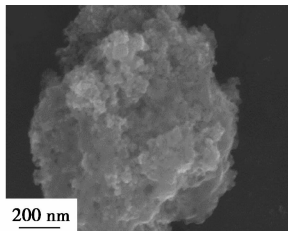
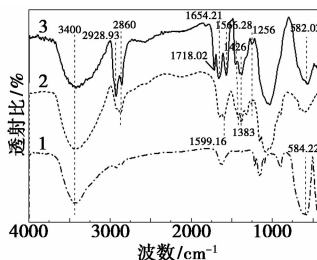


图 2 磁性壳聚糖凝胶颗粒的 SEM 分析

#### 2.1.3 傅里叶红外光谱图

对磁性壳聚糖凝胶微球进行红外分析,结果如图 3 所示。从图 3 中谱线 1 可看出,584.22  $\text{cm}^{-1}$  处有明显的 Fe—O 振动峰。从图 3 中谱线 2 可以看出,3 400  $\text{cm}^{-1}$  左右处为缔合—OH 和—NH<sub>2</sub> 的伸缩振动峰,2 860  $\text{cm}^{-1}$  左右处为脂肪族 C—H 的伸缩振动峰,1 599.16  $\text{cm}^{-1}$  对应于 N—H 的伸缩振动峰,1 426、1 383、1 256  $\text{cm}^{-1}$  分别是壳聚糖 C—H 的不对称、对称弯曲振动峰和 C—N 的伸缩振动峰。图 3 中谱线 3 与谱线 1、2 对照可以看出,在 3 400  $\text{cm}^{-1}$  附近也表现—OH 和—NH<sub>2</sub> 的伸缩振动峰,2 860、1 566.28  $\text{cm}^{-1}$  和 580.04  $\text{cm}^{-1}$  处分别也表现出脂肪族 C—H、N—H 和 Fe—O 的振动峰,说明壳聚糖成功包埋  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。并且,1 654.21  $\text{cm}^{-1}$  是—C=N—的特征峰<sup>[13]</sup>,说明壳聚糖与戊二醛交联形成席夫碱。同时,2 928.93、1 718.02  $\text{cm}^{-1}$  处的振动峰表明颗粒表面存在游离—CH=O,从而能够用于下一步固定化酶。



1—纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; 2—壳聚糖; 3—戊二醛交联载体

图 3 壳聚糖、纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  及戊二醛交联载体的傅里叶红外光谱图

## 2.2 固定化酶制备工艺

将磁性壳聚糖凝胶微球进一步用于固定化酶。吸取 0.9 g(湿重)固定化载体(以下所用载体质量相同),加入戊二醛溶液进行交联反应,结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,随着戊二醛体积分数的增加, $R_1$  增大,这是由于载体表面醛基量随着戊二醛体积分数的提高而增多,结合酶量增加; $R_2$  随着戊二醛体积分数的增加而降低,这与戊二醛本身对蛋白构象的影响有关。戊二醛体积分数过高,与之结合的酶蛋白分子上的氨基也增多,会引起相应催化活性中心构象的变化,从而导致酶活性下降。当戊二醛体积分数为 2% 时, $R_1$  及  $R_2$  都相对较高,以此戊二醛体积分数作为后续优化条件。

表 1 戊二醛体积分数对固定化酶的影响

戊二醛 体积分数/%	固定化酶蛋白 回收率 $R_1$	固定化酶酶活 回收率 $R_2$
1	40.83±0.98	89.14±4.26
2	57.51±2.65	77.32±3.96
3	64.56±2.77	62.41±5.16
4	66.35±4.79	59.33±3.32
5	71.79±1.14	21.30±1.50
6	75.23±1.69	16.73±2.17

交联时间对固定化酶过程影响如表 2 所示。由表 2 可以看出,当交联时间较短(2 h),能够与壳聚糖交联的戊二醛量有限,不足以固定化更多的酶;而当交联时间太长(6~7 h),则增加了戊二醛的不稳定性,使得戊二醛上的 2 个醛基都被交联的机会增大,从而使载体表面游离醛基数量减少,固定酶量下降。当交联时间为 4 h 时, $R_2$  最大。这是由于交联 4 h 时,固定化酶量达到最适宜的水平,使酶的催化位点及空间构型不至于被过多的酶蛋白遮蔽或挤压,从而表现出较高的催化活性。

表 2 交联时间对固定化酶的影响

交联时间/h	固定化酶蛋白回收率 $R_1$	固定化酶酶活回收率 $R_2$
2	42.43±0.27	61.70±1.56
3	74.21±1.24	75.02±1.82
4	66.28±0.28	88.66±2.25
5	61.98±1.66	70.24±4.56
6	55.44±1.24	63.97±1.86
7	36.66±2.91	49.35±1.19

加酶量对固定化酶过程影响如表 3 所示。由表 3

可以看出,随酶质量浓度的增加, $R_1$  逐渐增大, $R_2$  也适当增大。当加入酶质量浓度过高,载体上蛋白质结合位点趋于饱和,固定化酶量达到稳定<sup>[14]</sup>。但是固定化酶活力在加酶质量浓度大于 0.45 mg/mL 后逐渐下降。这是由于当固定化酶质量浓度过大时,导致酶活性位点被遮蔽,酶活性下降。

表 3 加酶量对固定化酶的影响

加酶量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	固定化酶蛋白 回收率 $R_1$	固定化酶酶活 回收率 $R_2$
0.37	0.25±0.001	69.54±2.82
0.45	0.28±0.008	84.96±0.52
0.54	0.32±0.004	72.39±1.00
0.62	0.37±0.002	65.55±2.63
0.69	0.41±0.005	50.40±1.67
0.76	0.43±0.006	45.13±1.28

固定化时间对固定化酶过程的影响如表 4 所示。由表 4 可以看出, $R_1$  随着固定化时间的增加而提高,6 h 后, $R_1$  趋于稳定,固定化蛋白的收率趋于饱和。而固定化酶质量浓度的增加也引起  $R_2$  随固定化时间先升后降。当固定化时间为 5 h 时,固定化酶质量浓度最适宜, $R_2$  较高。

表 4 固定化时间对固定化酶的影响

固定化时间/h	固定化酶蛋白回收率 $R_1$	固定化酶酶活回收率 $R_2$
3	54.04±0.71	70.77±2.09
4	62.37±1.12	85.74±3.14
5	68.70±1.65	90.56±3.09
6	72.11±1.29	77.25±0.95
7	72.36±0.24	66.91±3.50

## 2.3 固定化酶酶学性质

通常情况下,固定化酶性质将会发生改变,结果如图 4 所示。由图 4(a)可以看出,游离酶和固定化酶的最适 pH 相近,都在 pH 6.0 左右;由图 4(b)可以看出,游离酶最适温度在 35~45℃ 左右,而固定化酶最适温度提高至 40~60℃。固定化酶在高温下仍能保持 75% 以上的催化活性。CGTase 通过多点交联固定在壳聚糖载体上,依附于载体的刚性,在较高温度下,固定化酶依然表现出较好的结构稳定性<sup>[15]</sup>。由图 4(c)可以看出,固定化酶的热稳定性较游离酶好,在静置 5 h 后,仍能保持初始酶活力的 90% 以上。

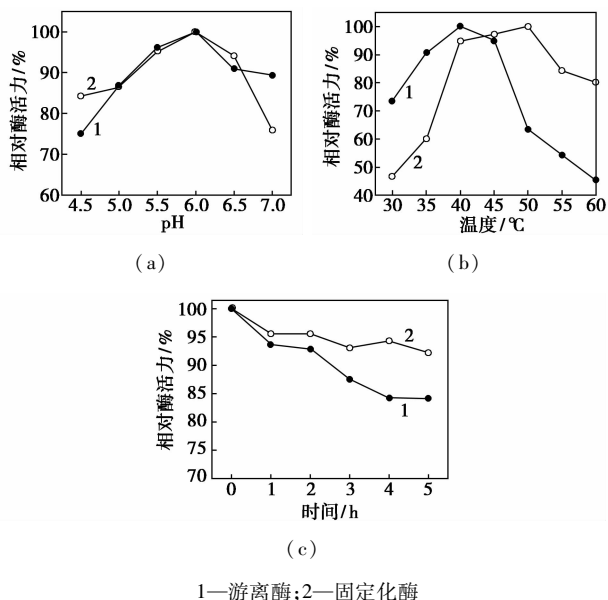


图 4 固定化 CGTase 和游离酶的性质比较

### 2.4 固定化酶 CGTase 制备 $\alpha$ -熊果苷

以 8% 麦芽糊精, 220 mmol/L 氢醌为底物, 固定化酶于 50°C, 100 r/min 的恒温水浴锅中进行催化反应 24 h。反应结束后磁铁收集固定化酶, 收集反应液加入糖化酶水解 1 h, 并测定水解液中  $\alpha$ -熊果苷的质量浓度。用缓冲液冲洗固定化酶, 再加入相同反应体系重复上述过程。每次测得  $\alpha$ -熊果苷的质量浓度如表 5 所示。固定化酶初始转化率低于同条件下游离酶转化率。这是因为在固定化过程中酶的部分空间结构受交联影响, 与底物的接触不如游离酶条件下充分。

表 5 固定化 CGTase 应用合成  $\alpha$ -熊果苷

反应次数	1	2	3	4	5
$\alpha$ -熊果苷质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	2.515±0.035	2.21±0.028	1.79±0.099	1.39±0.071	1.165±0.035

### 3 结论

以磁性壳聚糖微球为载体, 戊二醛为交联剂, 固定化环糊精糖基转移酶用于合成  $\alpha$ -熊果苷。结果表明, 采用离子凝胶法制备的壳聚糖凝胶颗粒成功包裹纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 形成磁性壳聚糖凝胶微球; 并以此为载体, 采用 2% 戊二醛为交联剂, 交联 4 h, 加酶 0.45 mg/mL, 固定化 5 h, 固定化酶蛋白回收率可达 72%, 酶活回收率达 90%。相比于游离酶, 固定化酶的最适 pH 不变, 最适温度范围提高 5~10°C; 与游离酶转化率(相同底物及反应条件下合成 3.3 g/L)

相比, 固定化酶初始转化率为前者的 75%。重复使用该固定化酶 5 次后,  $\alpha$ -熊果苷产量为初始的 46.3%。该方法实现了酶的重复使用, 提高了 CGTase 催化合成  $\alpha$ -熊果苷的利用率。

### 参考文献

- [1] 李兆丰, 顾正彪, 堵国成, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶的结构特征与催化机理[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6): 144-150.
- [2] Zhang Z C, Li J H, Liu L, et al. Enzymatic transformation of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) by immobilized  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(3/4): 223-229.
- [3] 赵如奎, 吴剑荣, 詹晓北, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶催化合成  $\alpha$ -熊果苷[J]. 生物加工过程, 2015, 13(4): 36-41.
- [4] 王佩, 赖瑛, 吴锡铭. 熊果苷抗炎作用的研究[J]. 中华中医药学, 2008, 26(9): 1933-1935.
- [5] Bang S H, Han S J, Kim D H. Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2008, 7(3): 189-193.
- [6] 校春燕, 夏咏梅. 固定化环糊精葡萄糖基转移酶的催化转苷[J]. 中国食品添加剂, 2013, 1: 116-120.
- [7] Ibrahim A S S, Al-Salamah A A, El-Toni A M, et al. Cyclodextrin glucanotransferase immobilization onto functionalized magnetic double mesoporous core-shell silica nanospheres [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2014, 17(2): 55-64.
- [8] Feng J, Yu S, Li J, et al. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 286: 216-222.
- [9] Wang J Z, Zhao G H, Li Y F, et al. Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic chitosan nanocarriers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 681-692.
- [10] 谢宇, 胡金刚, 魏娅, 等. 离子凝胶法制备壳聚糖纳米微粒[J]. 应用化工, 2009, 38(2): 171-173.
- [11] 黄德娟. 生物化学实验教程[M]. 上海, 华东理工大学出版社, 2007: 59-61.
- [12] Lejeun A, Kale S B. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin) glucanotransferase [J]. Analytical Biochemistry, 1989, 181: 6-11.
- [13] 寇灵梅, 李冰, 郭祀远, 等. 磁性壳聚糖微球的表征及其磁响应性[J]. 华南理工大学学报, 2006, 34(12): 92-95.
- [14] Pan C, Hu B, Li W, et al. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of beta-D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 61: 208-215.
- [15] Rodrigues R C, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(15): 6290-6307. ■