

# 固定化植物酯酶的制备及应用

范钦华<sup>1</sup>, 周小凡<sup>2\*</sup>

(1. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037;

2. 南京林业大学轻工科学与工程学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:**以麦草秸秆为原料,经环氧氯丙烷和乙二胺改性,戊二醛交联,制备了植物酯酶的固定化材料,研究了固定化植物酯酶的最优条件和固定化酶的酶学性质。结果表明,加酶量为20 mL/g(改性麦秆),固定化时间为6 h,温度为35℃,pH为7.0条件下,固定化效果最好,酶活回收率可达46%。固定化酶的pH稳定性、热稳定性和贮存稳定性都明显优于游离酶。固定化酶的米氏常数为41 mmol/L,固定化酶与底物的亲和力低于游离酶。建立了酶抑制反应的标准曲线和检测敌敌畏的方法,线性范围为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 6.25 \times 10^{-4}$  mg/L,检测下限为0.06 μg/L。

**关键词:**麦草秸秆;固定化;植物酯酶;敌敌畏

**中图分类号:**TS201.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2015)03-0112-04

## Preparation and application of immobilized plant-esterase

FAN Qin-hua<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-fan<sup>2\*</sup>

(1. College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. College of Light Industry Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** The wheat straw is modified by using epichlorohydrin, ethanediamine and glutaraldehyde to prepare the immobilized material. The optimum immobilization conditions and characterizations of the immobilized esterase are investigated. The results show that the good immobilization effect can be achieved under the following conditions: 20 mL/g of crude enzyme (with respect to modified wheat straw), 6 hours of immobilized time, 35℃ of immobilization temperature and 7.0 of pH. The recovery rate of the enzyme activity is 46%. The pH, thermal and storage stability of the immobilized enzyme are greatly improved. The Michaelis constant of the immobilized esterase is 41 mmol/L. The standard curve and method to determination of dichlorvos by enzyme inhibition are established. The linear ranges for the determination of dichlorvos are  $1.0 \times 10^{-4} \sim 6.25 \times 10^{-4}$  mg/L. The detection limit is 0.06 μg/L.

**Key words:** modified wheat straw; immobilization; plant-esterase; dichlorvos

近年来,酶抑制法被广泛应用于快速测定有机磷农药残留,动物来源的胆碱酯酶成本高,保持期短,需冷冻低温保存。而植物酯酶来源广泛,制备方便,在酶活、对农药的敏感性方面与胆碱酯酶都具有可比性<sup>[1-3]</sup>,由于游离植物酯酶易失活,稳定性差,不易保存,使其在使用中受到限制,但将酶进行固定化可以解决这些问题。关于植物酯酶固定化的研究已有报道,但固定化载体成本高,固定化酶的稳定性较差,限制了其实际应用<sup>[4-7]</sup>。

秸秆作为一种可再生资源,具有较大的比表面积、发达的微孔结构和丰富的表面官能团,具有一定的吸附性能<sup>[8-11]</sup>,麦草秸秆中的纤维素存在大量的羟基,易于进行化学改性,国内外学者利用改性秸秆制备吸附剂去除废水中的铬、铜、磷酸根等阴阳离子及染料<sup>[12-15]</sup>,取得了很好的效果,但将麦草秸秆作为载体用于固定酶的研究未见报道。笔者利用化学改性麦草固定植物酯酶,考察影响固定化效果的因素,探讨固定化酶的酶学性质,并将其应用于测定敌

敌畏农药,为秸秆在酶固定化中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

麦草秸秆取自南京郊区,切成3~5 cm小段后,水洗,60℃下烘12 h,粉碎过50目筛,存放备用;小麦购自南京市下关粮油店;敌敌畏标准品, Sigma公司生产;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

16R台式高速冷冻离心机, Thermo Scientific生产;紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司生产;S-3400N II扫描电子显微镜,日本Hitachi公司生产。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 植物酯酶粗酶液的制备

将粉碎过100目的小麦粉按1:7(m:V)加入蒸馏水,振荡提取2 h后,离心10 min,过滤即得粗酶液。

收稿日期:2014-09-28

基金项目:南京林业大学创新项目(163030045);江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介:范钦华(1977-),女,硕士,讲师,主要研究方向为生物质资源的利用及分析,njhgfqh@163.com;周小凡(1965-),男,博士,教授,研究方向为生物固定化,通讯联系人,zxiaofan@njfu.com.cn。

### 1.3.2 改性麦草秸秆的制备

称取 5 g 麦草秸秆于烧瓶中,加入 100 mL 10% 氢氧化钠溶液,搅拌中滴入 50 mL 环氧氯丙烷,于 60℃ 搅拌反应 4 h,过滤,丙酮洗涤,烘干得环氧化麦秆。加入 150 mL 乙二胺和碳酸钠 0.5 g,60℃ 反应 2 h,抽滤洗涤,将产品在 80℃ 烘 24 h,得到胺化麦秆。取上述胺化麦秆,加入 2% 戊二醛溶液交联 4 h 后,烘干。

### 1.3.3 植物酯酶的固定化方法

取 1 g 改性麦秆于 30 mL 含植物酯酶的磷酸缓冲溶液中,置于振荡器上振荡一段时间,过滤,用缓冲液冲洗,自然风干。

### 1.3.4 游离酶活的测定

移取 0.5 mL 稀释酶液于比色管中,加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液至 5 mL,移入 0.5 mL 15 mmol/L  $\alpha$ -乙酸萘酯乙醇溶液,混匀,30℃ 反应 5 min,加入 0.5 mL 0.1% 固兰 B 盐溶液,30℃ 反应 5 min 后,于 595 nm 测定吸光度,以磷酸缓冲液为空白<sup>[16]</sup>。

### 1.3.5 固定化酶的酶活的测定

称 0.1 g 固定化酶于比色管中,移入 5 mL 磷酸缓冲液,加入  $\alpha$ -乙酸萘酯乙醇溶液混匀,30℃ 水浴 5 min,加入固兰 B 盐溶液,30℃ 反应 5 min,过滤,595 nm 测定吸光度,同时以磷酸缓冲液作空白。

### 1.3.6 游离酶和固定化酶的米氏常数 $K_m$ 测定

配制不同浓度乙酸萘酯溶液,分别测定游离酶和固定化酶活力,根据酶反应速度绘制动力学曲线,按 Line weaver-Burk 双倒数作图法<sup>[17]</sup>,线性拟合求出  $K_m$  值。

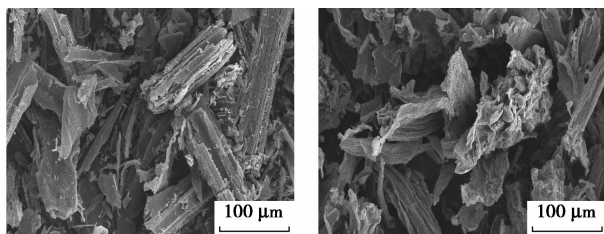
### 1.3.7 毒死蜥对酯酶抑制率的计算

称 0.1 g 固定酶于比色管中,分别加入 0.2 mL 不同浓度敌敌畏丙酮溶液,反应 5 min,分别测定酶活,以 0.2 mL 丙酮作空白,计算抑制率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 麦草秸秆的性质

麦草秸秆改性前后的电镜照片如图 1 所示。



(a) 原麦秆

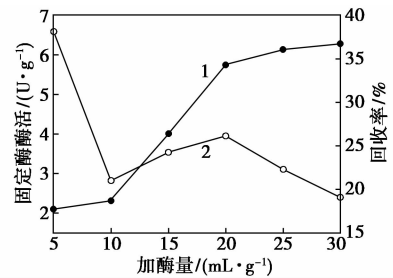
(b) 改性麦秆

图 1 麦草秸秆和改性产物的电镜照片 ( $\times 300$ )

由图 1 可以看出,改性前麦草表面较为光滑、紧凑,纵切面处出现了一些纹理。而化学改性处理后,一部分木质素溶解,大量半纤维素降解,这造成了纤维结构的破坏和表面粗糙度的增加,且出现大量的褶皱和破损,比表面积明显增大,这些变化都有利于酶在麦草表面的吸附和固定。

### 2.2 给酶量筛选

在 pH 为 7,温度为 25℃,固定化时间为 4 h 条件下,考察酶加入量对固定化酶酶活和回收率的影响,结果如图 2 所示。



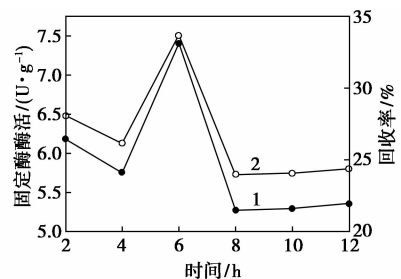
1—酶活;2—回收率

图 2 加酶量对植物酯酶固定化效果的影响

从图 2 可以看出,加酶量在 5~20 mL 时,固定化酶活性呈快速上升趋势;当加酶量大于 20 mL 后,酶活的增加趋于平缓,而固定化酶的回收率整体趋于下降。加酶量较少时,载体分子表面未吸附足够酶蛋白,表现出固定化酶活力较低,随着加酶量在较低水平增加,载体结合位点较多,固定化酶活力迅速增大,但超过一定量,载体表面吸附的酶蛋白量过多会造成酶分子相互聚集成团,酶分子的活性中心有可能被遮盖,同时部分酶分子进入载体孔深处,底物扩散相对较难,使酶分子发挥作用的能力减弱,反而使酶的活性增加不明显甚至下降<sup>[18]</sup>。综合考虑固定化酶酶活及回收率,选择加酶量为 20 mL/g(改性麦秆)为宜。

### 2.3 固定化时间对酶活力的影响

在给酶量为 20 mL,温度为 25℃,pH 为 7 固定



1—酶活;2—回收率

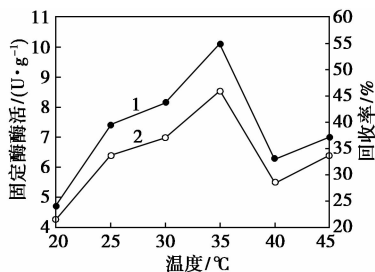
图 3 固定时间对植物酯酶固定化效果的影响

条件下,考察固定化时间对固定化酶的酶活的影响,结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,固定化酶的酶活力随吸附时间的延长显著提高,在 6 h 时固定化酶活力最高,之后即下降。这是由于时间太短,固定化不完全,时间过长,会造成部分酶失活;另一方面是载体上酶量的继续增多使酶分子相对集中,空间位阻增大,影响了酶与底物的有效接触以及产物在溶液中的扩散<sup>[19]</sup>。

### 2.4 固定化温度的确定

在给酶量为 20 mL,固定化时间为 6 h,pH 为 7 固定条件下,观察固定化酶的酶活随温度的变化情况,结果如图 4 所示。



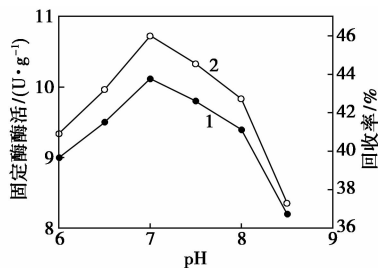
1—酶活;2—回收率

图 4 温度对固定化效果的影响

由图 4 可以看出,随着温度的升高,固定化酶的酶活升高,这主要是因为蛋白质的吸附是一种吸热过程,温度升高,则有利于固定化。当温度为 35℃ 时,酶活力最大。过高则会对蛋白质的空间结构产生破坏,导致酶变性失活<sup>[20]</sup>。

### 2.5 固定化 pH 的影响

在给酶量为 20 mL,温度为 35℃,固定 6 h 条件下,考察 pH 对固定化酶的酶活的影响,结果如图 5 所示。



1—酶活;2—回收率

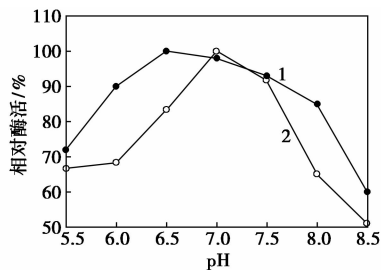
图 5 pH 对植物酯酶固定化效果的影响

由图 5 可以看出,缓冲液的 pH 对固定化酶活力有一定的影响,随着 pH 的升高,酶活力先升高后降低。当 pH 过低时,酶的活性较低,pH 过高会使植物酯酶分子和载体的亲和吸附作用力降低,选用

pH 为 7.0 的磷酸缓冲液为宜。

### 2.6 pH 稳定性

将固定化酶和游离酶分别在 pH 5.5 ~ 8.5 范围内的磷酸缓冲液中于 40℃ 保温 1 h 后,取样测定其残余活性,以最高活性为 100%,比较其酸碱稳定性,结果如图 6 所示。



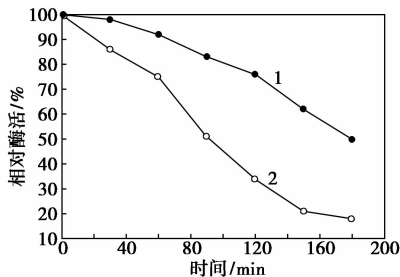
1—固定酶;2—游离酶

图 6 酯酶的 pH 稳定性

由图 6 可以看出,游离酶活性受 pH 影响较大,pH 过高或过低均会大幅度下降;而固定化酶活性在不同 pH 条件下相对比较稳定,由于载体对酶蛋白的保护,使得酶蛋白周围的微环境改变有了一定的减缓,其表现为固定化酶在较宽 pH 范围保持较高的酶活力<sup>[21]</sup>。

### 2.7 温度稳定性

取适量固定化酶和游离酶分别在 60℃ 0.1 mol/L pH = 7 的磷酸缓冲液中处理 30 ~ 180 min,测其残留酶活力。结果如图 7 所示。



1—固定酶;2—游离酶

图 7 温度稳定性

热稳定性是固定化酶用于应用的重要特性。图 7 中表明,固定化酶的稳定性较好,尤其是在较高温度 60℃ 固定化 3 h,游离酶酶活仅为 18%,而固定化酶为 50%。酶经固定化后温度稳定性明显提高,活性保持的温度范围较游离酶宽,这是由于固定化酶的空间结构受载体影响,温度对酶空间结构的影响变弱,使得固定化酶对温度改变不很敏感。

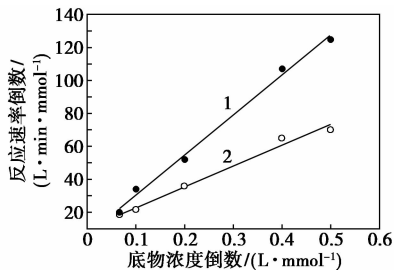
### 2.8 固定化酶的保存稳定性

将自由酶和固定化酶在 4℃ 下存放,每 2 d 测定

其酶活力。游离酶存放4 d后酶活已下降10%,而固定化酶存放36 d后酶活下降10%,固定化酶的储存稳定性大大提高。

## 2.9 酶反应动力学研究

以乙酸萘酯为底物,测定游离酶和固定化酶在不同底物浓度下的反应速率,以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图,结果如图8所示。由图8可以看出,固定酶的米氏常数 $K_m$ 为41.1 mmol/L,较游离漆酶的米氏常数 $K_m$  12.4 mmol/L大,即固定化漆酶对底物的亲和力比游离酶小,固定化过程使酶分子空间构象发生一定改变,酶与底物接触时存在空间障碍或扩散阻力,影响两者亲合力,使固定化酶 $K_m$ 提高<sup>[22]</sup>。



1—固定酶;2—游离酶

图8 游离酶和固定化酶 Line weaver-Burk 图

## 2.10 固定化酶酶活与毒死蜱浓度的关系研究

以敌敌畏浓度对数为横坐标,酶活抑制率为纵坐标作拟合曲线,结果如图9所示。由图9可知,敌敌畏对固定化酶活性的抑制率与浓度对数成线性关系,毒死蜱的质量浓度在0.000 1~0.062 5 mg/L之间线性关系良好, $y = 11.2 + 115 \ln x$ ,相关系数 $r$ 为0.98。若以酶活性抑制率5%对应的敌敌畏浓度作为检测下限<sup>[23]</sup>,可计算出测定敌敌畏的检测下限为0.06  $\mu\text{g/L}$ 。

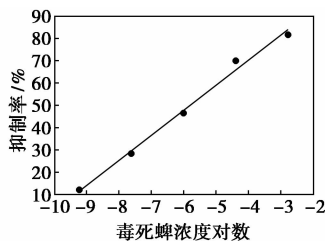


图9 农药浓度与抑制率的关系

## 3 结论

采用胺化麦草秸秆为载体,戊二醛为交联剂,进行植物酯酶固定化研究,优化了加酶量、时间、温度、pH等固定化条件。经固定化后,酶的热稳定性、酸碱稳定性均有显著提高。并可应用于测定敌敌畏农

药的残留量,检测下限为0.06  $\mu\text{g/L}$ 。由于植物酯酶对不同有机磷农药的抑制强度不同,应进一步探索更有效的分离纯化方法并对其结构进行研究,提高酯酶的专一性和检测灵敏度。

## 参考文献

- [1] 王仲海,徐斐. 农药生物传感器所用酶的比较研究[J]. 食品科学,2003,24(1):21-23.
- [2] 李远平,陈华才,朱旭华. 毒死蜱对植物胆碱酯酶活性的抑制作用研究[J]. 中国计量学院学报,2010,21(4):364-368.
- [3] Schulze H, Vorlova S, Villatte F, et al. Design of acetylcholinesterases for biosensor applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003,18(2/3):201-209.
- [4] Hwa-Young No, Young Ah Kim, Yong Tae Lee, et al. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphates and carbamate pesticides[J]. Analytica Chimica Acta,2007,594(1):37-43.
- [5] 许学勤,许斐. 用于有机磷农药残留快速检测的固定化小麦酯酶研究[J]. 食品科学,2003,24(5):27-32.
- [6] 王继军,黄永春. 应用植物酯酶固定化酶检测有机磷和氨基甲酸酯农药[J]. 环境科学学报,2004,24(3):558-560.
- [7] 马文石,汪军. 固定化植物酯酶-显色剂传感膜的制备与性能[J]. 华南理工大学学报,2007,35(2):89-92.
- [8] 韩彬,周美华,荣达. 稻草秸秆活性炭的制备及其表征[J]. 农业环境科学学报,2009,28(4):828-832.
- [9] Mentasti C, Sarzanini M C, Gennaro, et al. Nitrilotriacetic acid, thio-urea and cysteine ligands immobilized on cellulose for the uptake of trace metal ions[J]. Polyhedron,1987,6(6):1197-1202.
- [10] Sekar M, Sakthi V, Rengaraj S. Kinetics and equilibrium adsorption study of lead (II) onto activated carbon prepared from coconut shell[J]. J Colloid Interface Sci,2004,279(2):307-313.
- [11] Orlando U S, Baes A U, Nishijima W, et al. Preparation of agricultural residue anion exchangers and its nitrate maximum adsorption capacity[J]. Chemosphere,2002,48(10):1041-1046.
- [12] Xu Xing, Gao Baoyu, Wang Wenyi, et al. Adsorption of phosphate from aqueous solutions onto modified wheat residue: Characteristics, kinetic and column studies[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,2009,70(1):46-52.
- [13] Chen Suhong, Yue Qinyan, Gao Baoyu, et al. Equilibrium and kinetic adsorption study of the adsorptive removal of Cr(VI) using modified wheat residue[J]. Journal of Colloid and Interface Science,2010,349(1):256-264.
- [14] 陈钰,龚正君,杨顺生,等. 改性玉米秸秆吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的动力学和热力学[J]. 环境工程学报,2013,7(2):524-529.
- [15] 钟倩倩,岳岳艳,李倩,等. 改性麦草秸秆对活性艳红的吸附动力学研究[J]. 山东大学学报(工学版),2011,41(1):133-139,150.
- [16] 肖建军,华泽钊,徐斐,等. 用于测量农药残留的小麦酯酶的选择[J]. 分析测试学报,2002,21(2):11-14.
- [17] 陈大勇,杨小红,钱立武,等. 磁性壳聚糖复合微粒固定化SOD的研究[J]. 现代化工,2013,33(6):78-81,83.

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂与仪器

苯甲醛、甘油、石油醚, AR, 天津河东区红岩试剂厂生产; 对甲苯磺酸、氧化铜, AR, 上海山浦化工有限公司生产; 氯化铜, AR, 天津百世化工有限公司生产; 正己烷、乙醚、二氯甲烷、甲醇、环己烷、苯、甲苯, AR, 天津致远化学试剂有限公司生产; TEMPO, AR, 上海晶纯生化科技股份有限公司生产; 氮气, 北京氮普工业气体有限公司生产。

FTS165 型傅里叶红外光谱仪, 美国 BIO-RAD 公司生产; VARINA 核磁共振波谱仪, 美国 VARINA 公司生产; Agilent 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪, 美国 Agilent 公司生产。

### 1.2 合成方法

#### 1.2.1 催化剂对甲苯磺酸铜的合成

取 0.2 mol 氧化铜、0.3 mol 对甲苯磺酸和 200 mL 蒸馏水加入三口烧瓶中<sup>[13]</sup>, 100℃ 下搅拌回流 2 h; 趁热过滤, 得蓝色的液体, 滤液冷却析晶, 晶体放入烘箱干燥; 再用 95% 乙醇重结晶, 真空干燥至恒重, 得淡蓝色对甲苯磺酸铜晶体。

#### 1.2.2 2-苯基-1,3-二氧六环-5-醇的合成

在装有分水器和磁力搅拌器和冷凝器的三口瓶中加入催化剂、甘油、苯甲醛和带水剂, 氮气保护下搅拌加热, 当反应至分水器中无水分出时, 停止反应, 趁热分出有机层, 加入等体积的甲苯, 用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液洗涤, 再用蒸馏水洗至中性, 有机层加入碳酸钾搅拌, 得到淡黄色液体, 过滤, 滤液放置在 -20℃ 结晶, 趁冷抽滤得到的晶体用冷石油醚洗涤数次, 真空干燥得到白色纤维状固体即为 2-苯基-1,3-二氧六环-5-醇。<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz),  $\delta$ : 7.26 ~ 7.52 (m, 5H), 5.56 (s, 1H), 4.20 (d, 2H), 4.11 (d, 2H), 3.63 (s, 1H), 3.04 (1H, OH); IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3 242 (—OH); EI-MS:  $m/z = 180$ , [M - e]<sup>+</sup>;  $m/z = 179$ , [M - H]<sup>+</sup>。

#### 1.2.3 2-苯基-1,3-二氧六环-5-酮的合成

取 0.02 mol 2-苯基-1,3-二氧六环-5-醇、0.002 mol 溴化钠和 0.000 4 mol Tempo 置于 500 mL 烧瓶中, 加入 20 mL 二氯甲烷, 冰浴搅拌, 取 1 mol/L 的次氯酸钠溶液, 加入碳酸氢钠调节 pH = 9.5, 缓慢滴加进反应瓶, 溶液开始呈现深红色, 随着反应的进行, 溶液变为乳白色, 滴加完成后继续搅拌反应 30 min, 然后分出有机层, 用 0.05 mol/L 的氢氧化钠碱洗 3 次, 硫酸镁干燥, 过滤得到透明的液体, 旋蒸出溶剂, 固体加入甲苯浸泡洗涤, 过滤得固体用石油醚洗涤数次, 真空干燥, 得到白色 2-苯基-1,3-二氧六环-5-酮晶体。<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz),  $\delta$ : 7.26 ~ 7.54 (m, 5H), 5.91 (s, 1H), 4.51 (d, 2H), 4.49 (d, 2H); IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1 741 (C=O); EI-MS:  $m/z = 178$ , [M - e]<sup>+</sup>。

#### 1.2.4 1,3-二羟基丙酮的合成

取 0.01 mol 的 2-苯基-1,3-二氧六环-5-酮、20 mL 蒸馏水和 20 mL 四氢呋喃加入反应瓶中, 滴加 1 mol/L 的盐酸溶液 100 mL, 搅拌, 加热到 50℃, 反应 1 h 后, 分出水相, 用正己烷洗涤数次后, 减压蒸馏出水, 固体用乙醇重结晶得到白色粉末状的 1,3-二羟基丙酮。从 <sup>1</sup>HNMR 可以看出, 结晶后的 1,3-二羟基丙酮是以二聚体的形式存在。<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz),  $\delta$ : 3.31 ~ 4.32 (m, 8H), 4.35 (m, 4H); IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3 456 (—OH), 1 762 (C=O), EI-MS:  $m/z = 80$ , [M - e]<sup>+</sup>,  $m/z = 72$ , [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z = 43$ , [M - H<sub>2</sub>O - CHO]<sup>+</sup>,  $m/z = 31$ , [M - CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 催化剂对羟醛缩合反应的影响

选择对甲苯磺酸、氯化铜、对甲苯磺酸铜 3 种催化剂进行对比。取苯甲醛 0.5 mol、甘油 0.65 mol 和石油醚 80 mL, 催化剂物质的量为苯甲醛物质的量的 1%, 设定反应温度为 75℃, 结果如图 2 所示。从

(上接第 115 页)

- [18] 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.
- [19] 李全文, 严东, 侯杰, 等. 纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 协同海藻酸钠固定化桑叶多酚氧化酶 [J]. 现代化工, 2012, 32(10): 58 - 61.
- [20] 周敬豪, 徐存华, 李玉娟, 等. 磁性壳聚糖微球的合成及其在固定化血管紧张素转化酶的应用 [J]. 化工进展, 2013, 32(10): 2440 - 2445.

- [21] 郭明, 燕冰宇, 王春鹏, 等. 纤维素基质固载酶材料制备及固定化漆酶性能 [J]. 林业科学, 2013, 49(11): 122 - 128.
- [22] Yong Y, Bai Y X, Li Y F, *et al.* Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(11): 1179 - 1185.
- [23] 张爱静, 孟范平, 杨菲菲. 以壳聚糖微球为载体的固定化乙酰胆碱酯酶的基本性质 [J]. 环境化学, 2011, 30(6): 1068 - 1074. ■