

研究简报

触角状环氧链结构对固定化脂肪酶(YCJ01)酶活的影响

杨长青¹, 郑涛², 郁晨晨¹, 周俊², 何冰芳¹, 刘晓宁¹

(¹南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816; ²南京工业大学生物能源研究所, 江苏 南京 211816)

摘要: 为了改善酶的刚性固定化对酶蛋白构象的负面影响, 以原子转移自由基聚合法(ATRP)合成了亲水性、柔性、触角状环氧化酶固定化载体 PS-acyl-P(AM-co-GMA), 通过改变单体总量与引发剂量比例得到不同链长触角状环氧化酶固定化载体, 并将其用于耐有机溶剂脂肪酶(YCJ01)的共价柔性固定化, 重点考察了链长对固定化酶活的影响。结果表明, 链长(增重率不超过 3200%)越长, 酶活越高。

关键词: 原子转移自由基聚合; 触角状环氧化酶固定化载体; 链长; 耐有机溶剂脂肪酶; 酶的柔性固定化; 聚合物; 生物催化

DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2014.05.036

中图分类号: O 643.3

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2014) 05—1815—06

Influence of tentacles-like support with chain containing epoxy group on activity of immobilized lipase (YCJ01)

YANG Changqing¹, ZHENG Tao², YU Chenchen¹, ZHOU Jun², HE Bingfang¹, LIU Xiaoning¹

(¹School of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ²Bioenergy Research Institute, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China)

Abstract: In order to improve the enzyme conformation for the negative effect of the rigid immobilized enzyme, the hydrophilic and flexible support PS-acyl-P(acrylamide-co-glycidyl methacrylate) with tentacles-like chain containing epoxy group was prepared with the atom transfer radical polymerization (ATRP) method. A series of chain length of tentacles-like support with epoxy group were prepared *via* changing the proportion of the total monomers to the initiator, and were used for flexible immobilization of organic solvent-tolerant lipase (YCJ01) covalently. The major objective of this paper was to investigate the effect of different lengths of chain on the activity of immobilized lipase. The longer the chain length (weight gain <3200%) was, the higher the activity of immobilized lipase was.

Key words: atom transfer radical polymerization; tentacles-like support with chain containing epoxy group; length of chain; organic solvent-tolerant lipase; flexible immobilization of enzyme; polymers; biocatalysis

引 言

脂肪酶(lipase, EC 3.1.1.3) 是一类重要的酰基

水解酶, 常用于催化酯的水解或醇解、酯合成及酯交换等反应^[1]。由于游离的脂肪酶在实际应用中具有不耐高温、强酸和强碱及不易回收等缺点, 而固

2013-12-30 收到初稿, 2014-02-11 收到修改稿。

联系人: 刘晓宁。第一作者: 杨长青 (1987—), 男, 硕士。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2013CB733504); 国家高技术研究发展计划项目(2012AA021203)。

Received date: 2013-12-30.

Corresponding author: Prof. LIU Xiaoning, xiaoningliu@163.com

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2013CB733504) and the National High Technology Research and Development Program of China (2012AA021203).

定化酶可以克服游离酶的上述不足,同时可保持其催化特性,因此得到了广泛的应用^[2]。常用的固定化方法有吸附法、包埋法、交联法及共价结合法。其中共价结合法可使酶分子结合稳定,但其固定化酶自由度低,酶分子和底物之间存在较大空间位阻,不利于保留酶的游离状态下的均相催化活性,故可将其称之为“刚性固定化”。这种“刚性固定化”在固定化过程中因载体与酶分子间的刚性碰撞力易使酶的构象改变,造成酶活损失。于是有人在载体表面接上短链(手臂分子)进行酶的“手臂固定化”^[3-4],以缓和碰撞力,但由于这类手臂分子链通常较短,且有些是憎水的碳链,故效果并不好。在此基础上,刘晓宁等^[5-6]提出了酶的“柔性固定化”模型,即在固定化载体上,接上一些有足够长度的且是亲水的分子链,即所谓的“柔性链”,而后再将酶结合到柔性链上。柔性固定化不仅可减少酶在固定化过程中的失活,而且使所得到的固定化酶有较大的自由度,同时仍具有游离酶较高的均相催化活性。

酶固定化技术的核心是载体材料的制备或选择,酶固定化载体可分为无机载体^[7]、天然高分子载体^[8]、合成高分子载体^[9]和新型材料载体^[10]。其中合成高分子载体特别是具有亲水性的合成高分子载体,由于其具有较好的生物相容性,可最大化地与酶分子接触而固定更多的酶蛋白^[9]。Karagoz等^[11]对交联聚苯乙烯微球经乙酰氧基汞化反应、氯交换反应和2-溴乙酰溴反应三步进行表面修饰,制备出溴乙酰化聚苯乙烯(PS-acyl-Br)大分子引发剂,再通过 ATRP 法先后将苯乙烯(St)和甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)嵌段接枝到该引发剂表面,合成出含环氧基链载体(PS-acyl-PS-*b*-PGMA)。或另用己二胺(HMDA)和戊二醛(GA)先后再对该载体胺化和醛基化,获得另一种载体(PS-acyl-PS-*b*-PGMA-HMDA-GA)。将上述两种载体对脂肪酶共价固定化,结果表明,经胺化和醛基化后的载体由于具有一定的亲水作用,其固定化酶酶活高于未经胺化和醛基化载体。但由于合成上述载体的引发剂(PS-acyl-Br)合成步骤多,且其接枝率较低,并含疏水性聚苯乙烯(PS)链,曲伟光等^[12]采用(一步法合成)氯乙酰化聚苯乙烯(PS-acyl-Cl)大分子引发剂,其接枝率远高于 PS-acyl-Br。用该引发剂和亲水性接枝单体丙烯酰胺(AM)及活性单体甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)利用 ATRP 法合成得到的一含亲水性柔性链的触角状环氧化酶固定化

载体 PS-acyl-P(AM-co-GMA),可用于脂肪酶的柔性固定化。

本文在文献^[12]的基础上,设计并研究了柔性链的长短,即以不同单体总量与引发剂量的比例得到不同链长的触角状环氧化酶固定化载体,进而研究了其对固定化脂肪酶(YCJ01)^[13]的影响。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

氯乙酰化聚苯乙烯微球(PS-acyl-Cl,粒径为120~192 μm,氯担载量为4.08 mmol·g⁻¹,南京麦科菲高效分离载体有限公司),脂肪酶(YCJ01)液(酶活400 U·ml⁻¹,蛋白含量0.4 mg·ml⁻¹,本院何冰芳教授实验室提供),2,2'-联吡啶(Bipy)、丙烯酰胺(AM)、甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、阿拉伯树胶、Triton X-100等均为市售分析纯试剂。

Nicolet380 红外光谱仪(美国 Thermo 公司),TU1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 触角状环氧化酶固定化载体及不同增重率/链长载体的制备

将一定比例的大分子引发剂 PS-acyl-Cl、CuCl、Bipy、AM 和 GMA 加入配有搅拌的圆底烧瓶中,再加入 DMF,其中 DMF:GMA 体积比为 1:1。密封,抽真空,通 N₂,反复 3 次后,置于 80℃油浴中开始反应。反应结束后,所得产物分别用 DMF 和丙酮洗滤多次(除去未反应物及线性自聚物或其他杂质),再用甲醇洗滤 3 次,于 30℃真空干燥至恒重,得到触角状环氧化酶固定化载体。以反应前 PS-acyl-Cl 质量(记为 W_1)和反应后载体质量(记为 W_2)的增重量计算得增重率 ΔW

$$\Delta W = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100\%$$

按上述合成方法,改变单体总量与引发剂量的比例,可制备获得不同增重率即不同链长的载体,经环氧基测定^[14],可得到不同环氧基担载量的载体,具体配比见表 1。

1.3 触角状环氧化酶固定化载体的表征

触角状环氧化酶固定化载体的红外吸收光谱(FT-IR)由美国 Thermo Nicolet 380 红外光谱仪测定。扫描范围 4000~400 cm⁻¹,KBr 压片,并采用增重率及环氧值测定进一步予以表征。环氧值由盐酸-1,4-二氧六环法^[14]进行测定。

表 1 单体总量对 PS-acyl-P(AM-co-GMA)增重率及环氧基担载量的影响

Table 1 Influence of total monomers on weight gain and loading amount of epoxy of PS-acyl-P(AM-co-GMA)

Number	Total monomers/ X	$\Delta W/\%$	Measured $LA_{\text{epoxy}}/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	Theory $LA_{\text{epoxy}}/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	Measured	
					$LA_{\text{epoxy-PS}}/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	Theory $LA_{\text{epoxy-PS}}/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$
1	20	660	3.11	6.10	23.63	46.41
2	40	1230	4.50	6.50	59.85	86.49
3	80	2300	5.48	6.73	131.5	161.74
4	100	2700	5.77	6.78	161.5	189.74
5	120	3170	5.92	6.81	193.5	222.92
6	160	4100	5.91	6.86	248.22	288.12

Note: $M_{\text{GMA}}=142.2$; $LA_{\text{epoxy-GMA}}=7.03 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$; Cl: $\text{Cu}^+:\text{Bipy}=1:1:2$ (molar ratio); $T=80^\circ\text{C}$; $X= n_{\text{Total monomers}}:n_{\text{Cl}}$ (molar ratio); $n_{\text{AM}}:n_{\text{GMA}}=1:3$ (molar ratio); PS—polystyrene microspheres.

Measured LA_{epoxy} : measured loading amount of epoxy per gram of support after reaction.

Theory LA_{epoxy} : loading amount of epoxy per gram of support after reaction(all monomers count for GMA).

Measured $LA_{\text{epoxy-PS}}$: measured loading amount of epoxy per gram of PS after reaction.

Theory $LA_{\text{epoxy-PS}}$: loading amount of epoxy per gram of PS after reaction(all monomers count for GMA).

1.4 固定化酶的制备

称取 50 mg 载体于三角瓶中, 加入含有 200 μl 脂肪酶(YCJ01)液的磷酸盐缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$)10 ml, 于 30°C 反应 48 h. 反应结束后, 滤去脂肪酶液, 用磷酸盐缓冲液清洗固定化酶至洗液中不含蛋白为止^[12].

1.5 酶水解活力的测定

采用 $p\text{NPP}$ 法测定脂肪酶(YCJ01)的活性^[15]. A 液为 $10.61 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $p\text{NPP}$ (对硝基苯酚棕榈酸酯)的异丙醇溶液, B 液为 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 阿拉伯树胶和 0.6%(体积分数)的 Triton X-100 的磷酸盐缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$), 底物溶液 C 液由 A 液和 B 液按体积比 1:9 混合制得.

将 50 mg 固定化酶或 0.4 ml 稀释适当倍数的酶液加入 10 ml 底物溶液 C 液中, 于 40°C 反应 10 min 后, 在 $\lambda = 410 \text{ nm}$ 处利用紫外测定反应生成的对硝基苯酚($p\text{NP}$)的量. 以每分钟产生 $1 \mu\text{mol}$ $p\text{NP}$ 所需的酶量为一个酶活力(U)单位. 文中固定化酶的酶活以载体的干重计算.

2 结果与讨论

2.1 触角状环氧酶固定化载体的红外表征

图 1 为 PS-acyl-Cl 和 PS-acyl-P(AM-co-GMA) 的 FT-IR 谱图. 由图 1 可得出, 与引发剂 PS-acyl-Cl 相比, 后者出现酯羰基 1730 cm^{-1} 和环氧基 906 cm^{-1} 吸收峰^[16], 由此可见, GMA 单体发生了接枝反应. 另外, 3440 、 3360 cm^{-1} 处吸收峰分别对应于酰胺中 N—H 的反对称和对称振动吸收, 1450 cm^{-1} 处为伯酰胺的强吸收峰^[17]. 结果表明, GMA 和 AM 都参

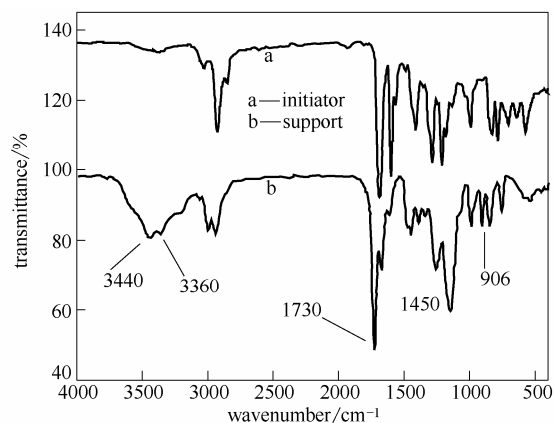


图 1 引发剂与载体的 FT-IR 谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of initiator and support

与了接枝反应, 这一表征结果与文献[12]红外表征结果一致.

2.2 单体总量与引发剂比例对 PS-acyl-P(AM-co-GMA)增重率及环氧基担载量的影响

在不同单体总量 (X) 的条件下, 考察了其对 PS-acyl-P(AM-co-GMA)增重率 (ΔW) 及环氧基担载量 (LA_{epoxy}) 的影响, 结果如表 1 和图 2、图 3 所示. 由表 1 和图 2、图 3 可见, 随着单体总量的增加, 增重率呈线性增加. 该结果符合 ATRP 活性聚合的规律, 同时说明可以通过控制单体总量得到不同增重率的触角状环氧酶固定化载体. 其增重率可以表示成由 PS-acyl-Cl 引发接枝的亲水链的长短, 即增重率越高, 相应的接枝链越长. 其次, 由表 1 和图 2 还可见, 随着单体总量的增加, 链长增加, 而实测的载体环氧基担载量却先升后趋平, 即由增重率计算的理论环氧基担载量与实测值不一

致。这种“先升后趋平”的规律是由(接枝前)母核载体的质量对产物质量(作为环氧基担载量分母)的贡献不同所致,即增重率小时,母核质量的影响对产物质量(作为环氧基担载量分母)的贡献大(以660%增重率计,母核占13%);随着增重率增加,其贡献减小(以2300%增重率计,母核仅占4%),并最终趋于一个定值,即单体GMA的环氧基担载量($7.03 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)。另由表1和图3可见,随着单体总量的增加,链长增加,实测母核环氧基担载量基本呈线性增加,即单体总量虽改变,但单体接枝转化率基本保持不变,GMA转化率基本保持不变。这说明该ATRP体系具有较高的活性聚合性能,不因链长增加而降低。由表1和图2可见,当单体总量较低时,实际环氧基担载量明显低于理论环氧基担载量,且随着单体总量的增加,两者差值逐渐减小。该差值产生的原因之一是接枝单体AM对增重率的影响,因为实际增重率中其AM单体部分是不贡献环氧值的;其二则可能是链短时,链自由度差,会影响环氧基测定时的反应程度。而由表1和图3则可见,由增重率计算的理论母核环氧基担载量均高于实测值,其原因则可能是有部分环氧基在接枝过程中开环所致。

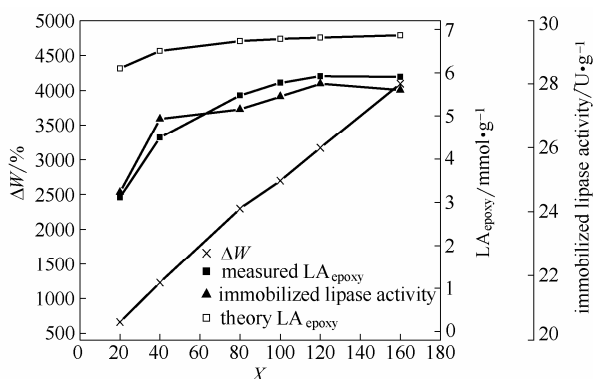


图2 单体总量对 PS-acyl-P(AM-co-GMA)增重率及环氧基量的影响

Fig.2 Influence of total monomers on weight gain and loading amount of epoxy of PS-acyl-P(AM-co-GMA)

2.3 不同链长(增重率)载体对酶活的影响

为了考察不同链长或增重率载体对固定化酶酶活的影响,选取6种不同链长或增重率载体用于固定化酶,结果见图4。由图4可见,随着链长增长,或即环氧基担载量增加,酶活逐渐增加,当增重率超过3170%时,对应载体固定化酶酶活趋于稳定。

薛屏等^[18]采用表面具有环氧基的刚性小球,用

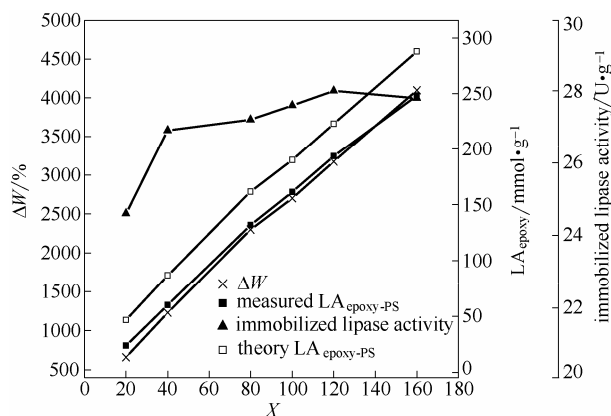


图3 单体总量对 PS-acyl-P(AM-co-GMA)增重率及母核环氧基量的影响

Fig.3 Influence of total monomer on weight gain and nucleus loading amount of epoxy of PS-acyl-P(AM-co-GMA)

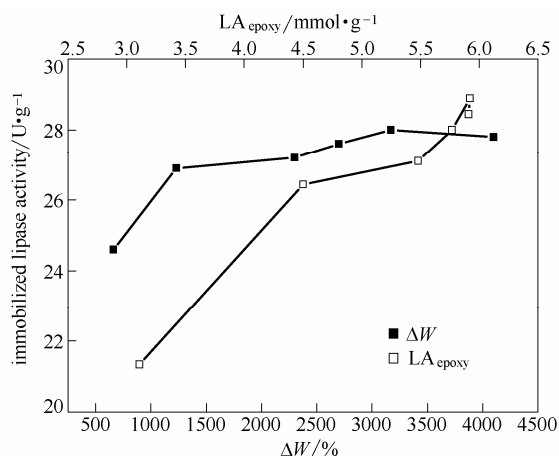


图4 不同链长载体对固定化酶酶活的影响

Fig.4 Influence of different chain lengths supports on activity of immobilized lipase

于固定化酶,其固定化酶的酶活随着环氧基含量的逐渐增加而降低,这可能是因为当环氧基含量较高时,易将酶分子过度束缚于刚性载体上,阻碍了酶分子与底物的有效接触及产物的扩散,且导致酶分子起催化作用的亚基空间构型改变,活性下降。Choi等^[19]以GMA和二甘醇二甲基丙烯酸酯(DEGMA)为单体,通过改变GMA/DEGMA投料比(总投料物质的量不变),经辐射引发聚合得到不同环氧基相对含量的载体,用于固定化酶,结果表明随着载体环氧基相对含量的增加,酶活呈线性增加。尽管其结论与本文一致,但当其载体仅含GMA时,其环氧基含量最高仅为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$,相比本文载体,其载体链长较短。

Kartal等^[20]在聚乙烯醇上接枝GMA合成出含

聚 GMA 链的聚合物载体(PVA-g-PGMA), 用于固定化酶。结果表明, 随着反应投料 GMA 增加, 接枝 GMA 增加, 其固定化酶酶活先逐渐增加, 然后降低。当反应投料 GMA 量为 0.25~2.3 mol 时, 投料越多, 其固定化酶酶活越高, 且当反应投料 GMA 量达到 2.3 mol 时, 即 $\Delta W = 4\%$, 载体相应环氧基含量为 $0.27 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 其固定化酶酶活达到最大; 当反应投料 GMA 量超过 2.3 mol 后(ΔW 超过 4%), 其固定化酶酶活逐渐下降。由于文献增重率及环氧基含量远低于本文载体, 相比本文载体, 其载体链长短很多, 因此不仅可能对酶分子产生空间位阻, 也阻碍底物与酶活性位点的接触, 从而导致酶活降低。而触角状环氧链结构的载体其柔性链具有足够的链长及更大的自由度, 不仅可增加环氧基对酶固定化的反应活性, 也可降低底物或产物扩散的阻碍, 还可使固定化的酶分子也有较大的自由度, 达到提高固定化酶酶活的目的, 而其柔性固定更可有效维持酶蛋白分子的自然构象, 保持原酶活性^[21]。此外, 合成过程中 AM 单体的添加, 除了起到载体接枝链的亲水柔性作用外, 还降低了环氧基团密集程度, 避免了固定化过程中, 酶分子被多点固定的负面效果, 从而提高固定化酶酶活。

3 结 论

通过合成不同增重率/链长的触角状环氧化酶固定化载体, 并将其用于固定化酶, 结果表明: 以不同增重率/链长载体(增重率为 600%~3200%、环氧基担载为 $3.0 \sim 5.9 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)固定化酶时, 链长越长, 固定化酶的酶活越高。

References

- [1] Tan Tianwei (谭天伟), Chen Biqiang (陈必强). Lipase from *Candida* sp. 99-125 and its application in synthesis of chemicals[J]. *CIESC Journal* (化工学报), 2012, **61**(7): 1685-1692
- [2] Wu Dongliang (吴东亮), Zhao Qiaoling (赵巧玲), Guo Yanglong (郭杨龙), Wang Ying (王莹), Wang Yunsong (王筠松), Zhan Wangcheng (詹望成), Lu Guanzhong (卢冠忠). Improvement of the preparation method for polymer support with epoxy groups and immobilization of penicillin G acylase[J]. *Chin. J. Catal.* (催化学报), 2010, **31**(5): 586-590
- [3] Bayramoglu G, Hazer B, Altintas B, Arica M Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis[J]. *Process Biochem.*, 2011, **46**: 372-378
- [4] Nevena Z P, Zorica D K, Dusan Z M, Dejan I B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads :the effect of lipase oxidation by periodates[J]. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2011, **34**: 803-810
- [5] Shen Bin (沈斌), Wei Rongqing (魏荣卿), Liu Xiaoning (刘晓宁), Zhu Jianxing (朱建星), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Flexible immobilization of papain on amino polystyrene support[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2005, **56**(6): 1070-1075
- [6] Wang Haiping (汪海萍), Wei Rongqing (魏荣卿), Shen Bin (沈斌), Liu Xiaoning (刘晓宁), Wei Ping (韦萍), Zhou Hua (周华), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Study on flexible immobilized papain with dialdehyde Stach[J]. *Chin.J.Process Eng.* (生物加工过程), 2004, **2**(1): 25-29
- [7] Dong Huaping, Li Yimin, Sheng Guodong, Hu Liujiang. The study on effective immobilization of lipase on functionalized bentonites and their properties[J]. *J. Mol. Catal. B*, 2013, **95**: 9-15
- [8] Romdhane I Belhaj-Ben, Romdhane Z B, Gargouri A, Belghith H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan[J]. *J. Mol. Catal. B*, 2011, **68**: 230-239
- [9] Yi S S, Noh J M, Lee Y S. Amino acid modified chitosan beads: improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*[J]. *J. Mol. Catal. B*, 2009, **57**: 123-129
- [10] Dong Qing (董青), Ouyang Liming (欧阳立明), Liu Jianwen (刘建文), Xu Jianhe (许建和). Efficient synthesis of α -D-glucose-1-phosphate by maltodextrin phosphorylase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles[J]. *Chin. J. Catal.* (催化学报), 2010, **10**(31): 1227-1232
- [11] Karagoz B, Bayramoglu G, Altintas B, Bicak N, Arica M Y. Poly(glycidyl methacrylate)-polystyrene diblocks copolymer grafted nanocomposite microspheres from surface-initiated atom transfer radical polymerization for lipase immobilization: application in flavor ester synthesis[J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2010, **49**: 9655-9665
- [12] Qu Weiguang (曲伟光), Wei Rongqing (魏荣卿), He Bingfang (何冰芳), Liu Xiaoning (刘晓宁), Zhong Yu (仲玉), Chen Xinying (陈新营). Flexible immobilization of lipase on hydrophilic and comblike polymer support containing epoxy group[J]. *Chin.J.Catal.* (催化学报), 2011, **32**(12): 1869-1874
- [13] Yao Changjin, Cao Yan, Wu Shanshan, Li Shuang, He Bingfang. An organic solvent and thermally stable lipase from *Burkholderia ambifaria* YCJ01: purification, characteristics and application for chiral resolution of mandelic acid[J]. *J.Mol.Catal.B*, 2013, **85/86**: 105-110
- [14] Lee S S, Park K Y, Kim J Y, Suh K D. Effect of GMA on monodisperse epoxy-functionalized polymer microsphere particles by dispersion copolymerization of styrene with glycidyl methacrylate[J]. *J.Appl.Polym.Sci.*, 2001, **80**(8): 1206-1212
- [15] Winkler U K, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*[J]. *J.Bacteriol.*, 1979, **138**(3): 663-670
- [16] Tsarevsky N V, Bencherif S A, Matyjaszewski K. Graft copolymers by a combination of ATRP and two different consecutive click reactions[J]. *Macromolecules*, 2007, **40**(13): 4439-4445
- [17] Zhu Minghua (朱明华). Instrumental Analysis (仪器分析)[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2000: 294
- [18] Xue Ping (薛屏), Lu Guanzhong (卢冠忠), Guo Yun (郭耘), Guo

- Yanglong(郭杨龙), Wang Yunsong(王筠松). Influence of preparation methods of copolymer supports containing oxirane groups on activity of immobilized penicillin acylase[J]. *Chin.J.Catal.*(催化学报), 2003, **24**(10): 733-738
- [19] Choi S H, Lee K P, Kang H D. Immobilization of lipase on a polymeric microsphere with an epoxy group prepared by radiation-induced polymerization[J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2003, **88**(5): 1153-1161
- [20] Kartal F, Akkaya A, Kilinc A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol[J]. *J. Mol. Catal. B*, 2009, **57**: 55-61
- [21] Lin Sicong(林思聪). Molecular engineering researches on polymeric biomaterials[J]. *Polym.Bull.*(高分子通报), 1997(1): 1-7