

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0027 - 06

# 用流化床干燥法改善颗粒酶的热稳定性

史 锋 , 王 璋 , 许时婴

(江南大学 食品学院 江苏 无锡 214036)

**摘 要 :**通过流化床干燥法制备稳定化颗粒酶 ,提高酶的耐热性 .在制备过程中进风温度为 40 ℃ ,酶活回收率达到 90% 以上 .采用海藻酸钠 (SA) 作包被剂 ,随着 SA 质量浓度的提高 ,酶的耐干热性先增加后降低 ,在 0.4 g/dL 最高 ,而其耐湿热性不断增强 .水分活度提高 ,固态酶的耐热性就随之降低 ,在  $A_w \geq 0.3$  时流化床干燥酶样品的耐热性都明显高于原酶粉 ,且 SA 质量浓度越高 ,酶对水分的耐受能力越高 .在流化床干燥酶制剂中添加硫酸铵、氯化钠、硫酸钠等盐类稳定剂 ,酶的耐干热性有的增强 ,有的减弱 ,而其耐湿热性都有所增强 ,其中硫酸铵的热稳定化效果最好 .酶在高温下的失活速度遵循一级动力学 ,即它的失活是由酶蛋白变性引起的 ,流化床干燥样品的失活常数低于原酶粉的失活常数 ,而不同温度下酶的失活遵循阿累尼乌斯方程 .

**关键词 :**流化床干燥 ; 稳定化酶 ; 热稳定性

中图分类号 :Q 814

文献标识码 :A

## The Improvement of Granular Enzyme Thermostability by Fluid-bed Drying

SHI Feng , WANG Zhang , XU Shi-ying

( School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China )

**Abstract :** The fluid-bed spraying and drying was used to prepare thermostabilized enzyme granules . During fluid-bed drying , the activity recovery of all the enzymes investigated was more than 90% . The optimal inlet temperature was chosen as 40 ℃ . Sodium alginate was used as a coating agent . As its concentration increased , the thermostability of enzymes treated in oven firstly increased and then decreased , but the thermostability of enzymes against steam treatment always increased . The heat resistance of fluid bed drying samples was about 10 times higher than that of control when water activity was higher than 0.3 . Ammonium sulfate , sodium chloride or sodium sulfate was added as salt stabilizer . The effect on stabilizing enzymes was not equal and ammonium sulfate was a better stabilizer . The rate of enzyme inactivation followed first order dynamics . The inactivation constant of fluid-bed drying sample was lower than that of controlled one . The enzyme inactivation rate at different temperature followed Arrhenius ' equation .

**Key words :** fluid-bed drying ; stabilized enzyme ; thermostability

在食品及饲料工业中 ,有时为了提高食物的消化率 ,改善受体胃肠道对多糖、蛋白质等大分子物

质的消化、吸收能力 ,需添加适量酶 .在洗涤剂工业中 ,为了增强洗涤剂对织物等的清洗能力 ,也越来

收稿日期 2001 - 09 - 25 ; 修订日期 2001 - 12 - 06 .

作者简介 :史峰 (1970 - ) ,女 ,新疆乌鲁木齐人 ,食品科学与工程博士研究生 .

万方数据

越多地使用酶类添加剂.另外,酶也广泛应用于造纸、酿造等许多行业<sup>[1,2]</sup>.在对含酶产品进行加工时,如小吃食品、颗粒饲料等,常常要经历高温过程,这势必会破坏酶的活性.由于一些加工工艺期望酶在经历高温处理后,其活性仍能保留,因此有必要改善酶的热稳定性.常用的提高酶热稳定性的方法有:选择法,即筛选耐高温的菌种释放的酶;蛋白质工程法,即通过基因工程重组得到耐高温酶的基因,再表达获得热稳定性酶;化学修饰法,通过化学试剂特异性修饰酶活性中心的某个或某类氨基酸,从而稳定蛋白质的构象,提高其耐热性;添加酶稳定用添加剂等<sup>[3,4]</sup>.由于选择法、蛋白质工程等方法复杂且只适用于单个酶,因此作者期望寻找一种通用的方法对现有的品种繁多的酶类进行简单处理以提高其热稳定性,最有效的办法就是使用酶类稳定剂,如多羟基化合物、食用胶、盐、氨基酸等.

生产过程中通常所使用的高温处理方法包括干热处理(如热空气等)及湿热处理(如高温高压水蒸气等),且物料中一般都含有一定的水分,酶的变性失活不仅仅是因为热量的作用,还有水分活度的作用<sup>[5]</sup>.一般而言,酶在非常干燥的情况下,结构(构象)比较稳定,具有一定的耐热性,而当体系中含有一定水分或是在高温水蒸气作用下,酶就极易变性、失活,因此在改善酶的热稳定性方面,不仅应考虑改善酶的单纯热稳定性,还应考虑提高其耐湿热性.

固体状态酶的稳定化主要采取这样的方法:酶液+稳定剂→混合→造粒→干燥.这里常使用的干燥方法有<sup>[1,2,7~9]</sup>喷雾干燥、真空烘箱干燥、滚筒干燥、鼓风干燥及流化床干燥.流化床干燥由于条件温和(温度低),处理量大且能使产品颗粒化,因此已越来越多地受到重视.作者采用流化床干燥法对酶进行稳定化处理,选用玉米淀粉作为载体,酶液中添加适量蔗糖,并含有一定离子强度及 pH 值的缓冲液,包被剂选用聚阴离子多羟基化合物.通过这样处理后,期望提高酶的热稳定性,尤其是耐湿热性.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

混合水解酶酶粉由南方某公司提供;梓木木聚糖、果胶、木糖、半乳糖醛酸均为 Sigma 产品;酪蛋白、酪氨酸为普通生化试剂;各种盐类均为分析纯试剂;玉米淀粉、蔗糖为食用级;海藻酸钠为化学纯试剂;DNS 试剂、酸性醋酸铜试剂、砷钼酸盐、Folin-

酚试剂自行配制.

### 1.2 主要设备

FL 型沸腾制粒机、101-1-13S 型电热恒温鼓风干燥箱、YXQ-SG41-280 型电热手提式高压蒸汽消毒器、电子恒温水浴锅、试管振荡器、722 型分光光度计.

### 1.3 实验方法

**1.3.1 流化床干燥法制备稳定化酶** 将 3.0 kg 玉米淀粉载体置于 FL 型沸腾制粒机的流化床上,在设定温度下沸腾操作 20 min,然后将事先配好的交联剂-酶混合液在一定流速和气雾压力下从上方喷孔喷到载体上,待其干燥,再喷入盐类稳定剂,干燥后间歇式喷入包被剂,干燥至水分含量 5%~10%,约需 1~2 h.其示意图见图 1.

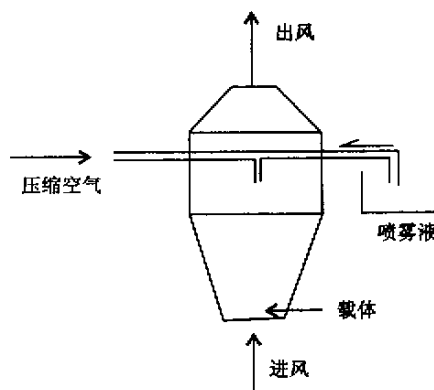


图 1 流化床干燥示意图

Fig.1 Schematic diagram of fluid bed drying

**1.3.2 干燥条件下酶的热处理方法** 采用 101-1-13S 型电热恒温鼓风干燥箱,停止鼓风状态下酶经 110℃ 空气热处理 60 min,之后取出自然冷却,分别测定酶于热处理前后的酶活,以热处理后其相对保留酶活反映其耐热性.

**1.3.3 酶的湿热处理方法** 采用 YXQ-SG41-280 型电热手提式高压蒸汽消毒器,酶经 100℃ 饱和水蒸汽处理 5 min,之后自然冷却,分别测定酶于热处理前后的酶活,以热处理后其相对保留酶活反映其耐湿热性.

**1.3.4 酶水分活度的调节** 分别在干燥器中放入饱和的 LiCl、MgCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NaCl、KCl 溶液,在 30℃ 恒温培养箱中平衡,干燥器中的水分活度分别为 0.110、0.330、0.427、0.528、0.752、0.842,将样品放入各种水分活度的干燥器中进行平衡直至恒重,样品的水分活度即达到环境之水分活度.分别将不同水分活度的样品密闭,于 100℃ 烘箱中热处理 30 min,之后自然冷却,测定酶于热处理前后的酶活,以相对保留酶活反映其耐热性.

见参考文献 [10], 稍作改动.

**1.3.6 果胶酶酶活测定方法** 40 ℃、pH 4.2 下底物 + 酶反应 30 min ,然后用酸性醋酸铜显色<sup>[11]</sup>. 酶活定义为 :每分钟催化底物生成 1 μg 半乳糖醛酸的酶量定义为一个酶活单位.

**1.3.7 酸性蛋白酶酶活测定方法** 见参考文献 [12].

2 结果与讨论

2.1 流化床干燥操作参数的确定

在酶的流化床干燥过程中 ,进风温度、喷雾液流速及气雾压力是几个重要的影响因素 ,由于流速不稳 ,因此分别测定了进风温度和气雾压力这两个参数对酶在流化床干燥过程中酶活回收率的影响 ,见表 1. 包被剂均为 1% SA ,酶液中含有适量蔗糖作交联剂.

表 1 流化床干燥时操作参数对酶活回收率的影响  
Tab.1 Effect of operation parameters on rate of recovery of enzymes

进风温度/℃	气雾压力/MPa	木聚糖酶回收率/%	果胶酶回收率/%	酸性蛋白酶回收率/%
30	0.08	96.21	93.42	96.61
30	0.16	90.08	97.67	92.45
30	0.24	94.17	93.91	92.09
30	0.16	90.08	97.67	92.45
40	0.16	96.55	94.14	94.37
50	0.16	91.55	94.11	94.21

用流化床干燥法制备稳定化酶制剂时 ,各种酶的酶活回收率都能达到 90% 以上 ,即流化床干燥过程对酶活的损失较少 ,这是因为这种操作相对温和 ,不易使酶变性 .温度对酶活回收率的影响较大 ,综合 3 种酶的酶活回收情况 ,确定进风温度为 40 ℃. 气雾压力必须达到一定大小以使喷雾液形成雾状 ,从而均匀喷到载体上并快速干燥.

2.2 海藻酸钠作为包被剂其浓度的影响

流化床干燥时包被剂的选择是非常重要的 ,这里采用海藻酸钠作为包被剂 ,质量分数 0.2% ~ 2% 经过流化床干燥处理后 ,得到的颗粒酶中几种酶的单纯耐热性如图 2 所示.

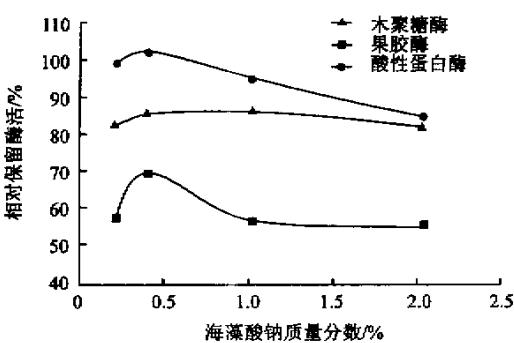


图 2 干燥状态下海藻酸钠浓度对酶制剂耐热性的影响

Fig.2 Effect of sodium alginate concentration on enzyme thermal stability against dry heat

可以看出 ,经过烘箱内 110 ℃热处理 1 h ,酸性蛋白酶的酶活能保留 95% 左右 ,木聚糖酶的酶活能保留 85% 左右 ,而果胶酶活力能保留 60% 左右 .即酸性蛋白酶的耐热性要优于木聚糖酶的 ,而果胶酶的耐热性最差 .随着海藻酸钠质量分数的增加 ,酶的耐热性先提高后降低 ,在 SA 质量分数为 0.4% 时 3 种酶的耐热性都达到最高 ,这是因为 SA 质量分数增高 ,一方面能降低样品水分活度 ,另一方面使溶液粘度增大 ,SA 线形分子不易伸展 ,从而膜性能较差 .作者进一步考察了流化床干燥酶制剂于 100 ℃ 高压蒸汽灭菌锅中( 即在水分活度达 1 的 100 ℃ 饱和水蒸气作用下 )的耐热性 ,结果见图 3.

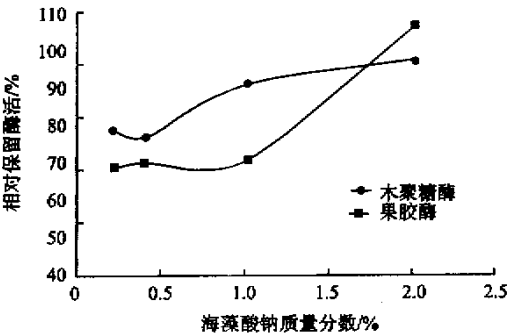


图 3 湿热状态下海藻酸钠质量分数对酶制剂耐热性的影响

Fig.3 Effect of sodium alginate concentration on enzyme thermal stability against moist heat

可见在水分活度达到 1 的情况下 ,用 100 ℃ 饱和水蒸气只处理 5 min ,不管是木聚糖酶还是果胶酶其酶活都下降了不少 ,也就是说高温饱和水蒸气对酶的失活作用是剧烈的 ,而热干燥空气温度即使更高、作用时间即使更长 ,它对酶的损伤也是有限的.

酶的变性是由其空间三维结构的变化引起的 ,

即构象发生了变化从而导致酶活性中心的结构受到破坏,使其催化能力降低或丧失.在热作用下,酶蛋白的分子运动能力加强,当吸收了酶变性所需活化能后,酶就发生变性、失活,温度越高,热作用时间越长,酶失活越严重.而氢键在维持酶的空间构象中起着重要的作用,当体系中含有大量自由水时,就会破坏酶分子内部的氢键相互作用,使酶分子的构象容易发生变化,酶易于变性失活.于是在热空气作用下,酶仅仅是吸收热量,三维结构发生变化导致其失活,而在热的水蒸气作用下,酶不仅吸收热量导致构象发生变化,同时由于水分子对酶分子内氢键相互作用的破坏,使得酶的构象更易发生变化,酶失活也就更加严重.

从图 3 中可以看出,不管是木聚糖酶还是果胶酶,其耐湿热性都是随着 SA 浓度的增加而提高的. SA 浓度增加利于降低样品水分活度,稳定酶分子内的氢键相互作用,使酶的构象更加稳定;且 SA 浓度越高,包被膜越厚,更利于阻挡高温水蒸气的渗透,减缓酶的变性.果胶酶的单纯耐热性虽然明显低于木聚糖酶的耐热性,但其耐湿热性却与木聚糖酶差不多,这与两种酶的分子构象的致密性及分子内氢键相互作用的强弱有关.

接着作者将流化床干燥样品和原酶粉分别调整到不同的水分活度,然后取适量样品密闭后于 100℃下热处理 30 min,测定不同水分活度( $A_w$ )下木聚糖酶的耐热性,如图 4 所示.

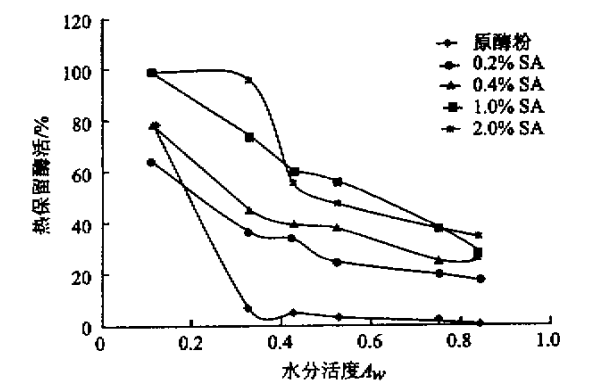


图 4 水分活度对酶热处理后相对保留酶活的影响  
Fig.4 Effect of water activity on relative retaining activities of enzyme after heating

可见随着  $A_w$  的增加,所有样品的耐热性都随之降低.原酶粉只有在  $A_w$  极低 ( $< 0.15$ ) 的情况下耐热性才较好,  $A_w$  高于 0.3 其热保留酶活低于 10% 甚至 1%,而流化床干燥样品在  $A_w \geq 0.2$  时的耐热性都明显高于原酶粉,特别是在  $A_w \geq 0.33$  时,所有流化床干燥样品的耐热性都比原酶粉高出约一个

数量级;且随着包被剂 SA 浓度的增加,木聚糖酶的耐热性不断提高.由于在实际加工中,产品的水分活度多高于 0.3,在这种条件下,流化床干燥酶制剂的耐热性显然就能被接受.

2.3 盐类稳定剂的稳定化效果

比较了几种盐类交联剂对酶的稳定化效果.考虑到阴离子的稳定化作用是  $SO_4^{2-} > Cl^- > Br^- > NO_3^-$ , 阳离子是  $(CH_3)_4N^+ > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$  [13], 因此选择了 NaCl、 $Na_2SO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$  这 3 种交联剂,包被剂均为 1% 的 SA,酶液中含适量蔗糖.比较不同盐用于流化床干燥时对酶的耐热性的影响,如图 5、6 所示.

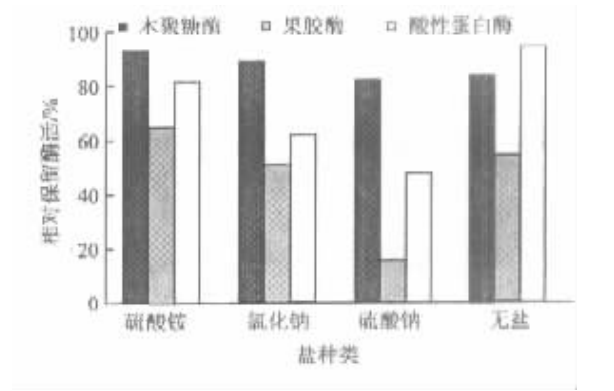


图 5 盐种类对酶耐干热性的影响  
Fig.5 Effect of salt on thermal stability of enzyme

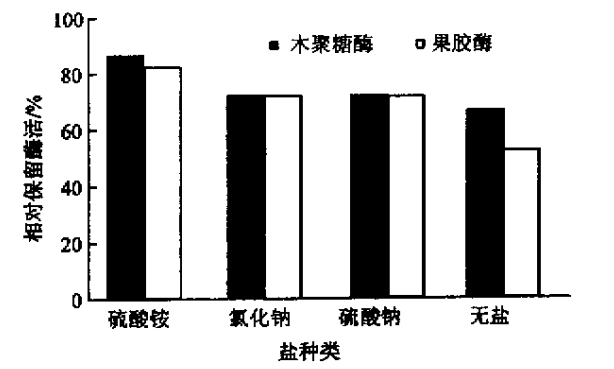


图 6 盐种类对酶耐湿热性的影响  
Fig.6 Effect of salt on stability of enzyme against steam heat

在 3 种盐中,硫酸铵和氯化钠能提高木聚糖酶和果胶酶的单纯耐热性,却不能提高酸性蛋白酶的耐热性.果胶酶本身耐热性最差,推测其分子构象比较松散,盐通过争夺游离水,使酶的构象稳定,从而热稳定性增强.本文所述的木聚糖酶极易盐析,盐通过使其疏水残基盐析出来,而使其构象更加致密,热稳定性提高.酸性蛋白酶本身就较耐热,推测其分子构象致密,盐不能使它的构象更致密,从而无法提高它的热稳定性.而硫酸钠却使 3 种酶的耐

热性都下降.总的来说,硫酸铵的热稳定化效果最好.

3 种盐都能改善木聚糖酶和果胶酶的耐湿热性,硫酸铵的效果最好.因为盐能通过多点交联减少酶的柔韧性,使其构象更稳定,盐离子也可以使蛋白质的疏水残基“盐析出来”,从而使其采取一个更致密的结构,并且盐还可作为水分子的替代物占据水的位置,排除自由水对酶造成的不稳定化影响,于是酶的耐湿热性增强.3 种盐中,硫酸铵的稳定化效果要明显优于氯化钠和硫酸钠的,因此应选择硫酸铵作为盐类稳定剂.

2.4 酶的热失活动力学

假设酶的失活都是由蛋白质变性引起的,而在某一温度下酶的变性速度遵循一级动力学,于是有  $\ln E = \ln E_0 - kt$ ,  $E$  为热处理一定时间后的酶活,  $E_0$  为起始酶活,  $k$  为变性速度常数,  $k$  越大则酶的变性速度越高,酶越易失活.作者对原酶粉及流化床干燥样品(2% 的 SA 作包被剂,硫酸铵作盐类稳定剂)分别于 110 ℃、130 ℃、150 ℃烘箱内敞开热处理 0~3 h,测定酶活损失情况.样品起始水分质量分数均在 9% 左右,其结果如图 7、图 8 所示.

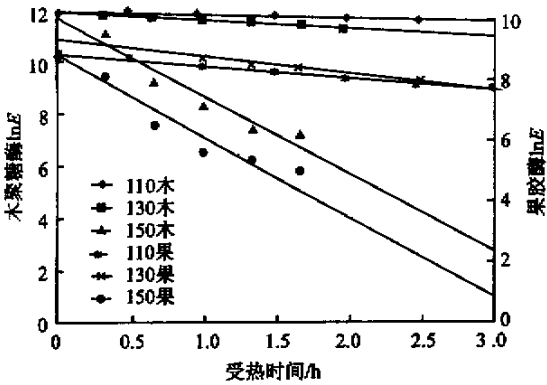


图 7 原酶粉于不同温度下的热失活过程

Fig.7 Heat inactivation of original enzyme powder at different temperatures

可见,经过流化床干燥处理后,酶的耐热性显著提高.

对于原酶粉,其中的木聚糖酶在 110 ℃ 下,  $\ln E = 11.8943 - 0.08880 t$ ,  $r = 0.9884$  ;  
130 ℃ 下,  $\ln E = 11.7783 - 0.29691 t$ ,  $r = 0.9957$  ;  
150 ℃ 下,  $\ln E = 11.5889 - 2.95754 t$ ,  $r = 0.9713$  ;  
其中的果胶酶在 110 ℃ 下,  $\ln E = 8.4601 - 0.33093 t$ ,  $r = 0.9696$  ;

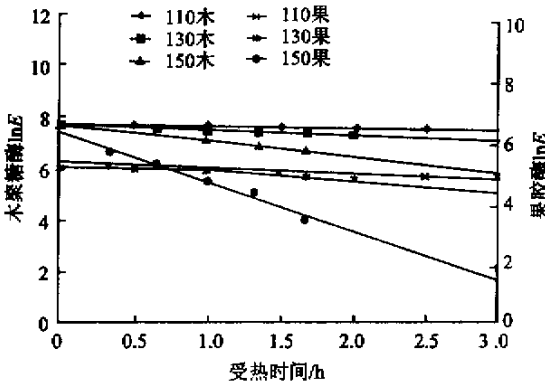


图 8 流化床干燥颗粒酶于不同温度下的热失活过程

Fig.8 Heat inactivation of fluid bed drying enzyme granules at different temperatures

130 ℃ 下,  $\ln E = 8.9330 - 0.52213 t$ ,  $r = 0.9728$  ;  
150 ℃ 下,  $\ln E = 8.5219 - 2.57789 t$ ,  $r = 0.9540$  ;  
对于流化床干燥颗粒酶,其中的木聚糖酶在 110 ℃ 下,  $\ln E = 7.7441 - 0.04798 t$ ,  $r = 0.9228$  ;  
130 ℃ 下,  $\ln E = 7.6030 - 0.10998 t$ ,  $r = 0.8987$  ;  
150 ℃ 下,  $\ln E = 7.7339 - 0.58152 t$ ,  $r = 0.9881$  ;  
其中的果胶酶在 110 ℃ 下,  $\ln E = 5.0100 - 0.07481 t$ ,  $r = 0.9851$  ;  
130 ℃ 下,  $\ln E = 5.2829 - 0.29641 t$ ,  $r = 0.9837$  ;  
150 ℃ 下,  $\ln E = 6.1041 - 1.53495 t$ ,  $r = 0.9797$  ;

$\ln E - t$  的线性相关性较好,因此可以认为酶在高温下的失活主要是由酶蛋白质的变性引起的.假设在不同温度下酶的变性速度遵循阿累尼乌斯方程,于是有  $k = A \exp(-E_a/RT)$ ,  $k$  为不同温度下的变性速度常数,  $E_a$  为变性活化能,于是有  $\ln k = \ln A - E_a/RT$ ,  $\ln k$  与  $1/T$  呈线性相关性.

对于原酶粉中的木聚糖酶,有  $\ln k = 34.2296 - 14114/T$ ,  $r = 0.9787$  ;

对于流化床干燥颗粒酶中的木聚糖酶,有  $\ln k = 23.0261 - 10040/T$ ,  $r = 0.976$  ;

对于原酶粉中的果胶酶,有  $\ln k = 20.2357 - 8251/T$ ,  $r = 0.9437$  ;

对于流化床干燥颗粒酶中的果胶酶,有  $\ln k = 29.2189 - 12209/T$ ,  $r = 0.9968$ .

总之,  $\ln k$  与  $1/T$  的线性相关性都较好,因此可以认为酶变性速度遵循阿累尼乌斯方程.

3 结 论

采用流化床干燥法制备颗粒酶,能改善酶的热稳定性.包被剂海藻酸钠浓度的增加能提高流化床干燥酶制剂在较高水分活度下的耐热性.添加硫酸铵等盐类稳定剂能使酶的耐湿热性有所改善.高温

下酶的失活速度遵循一级动力学 ,流化床干燥酶制剂遵循阿累尼乌斯方程。  
剂的失活速度常数较低 ,而不同温度下酶的失活过

参考文献：

[ 1 ] BARENDSE RUDOLF. Carbohydrate-based Enzyme Granulates[ P ]. 世界专利 :PCT WO 54980 ,1998.  
[ 2 ] GHANI , MAHRNOOD M. Microgranule for Food/feed Applications[ P ]. 世界专利 :PCT WO 12958 ,1997.  
[ 3 ] MARIA A LONGO , DIDIER COMBES. Thermostability of Modified Enzymes : a Detailed Study[ J ]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** , 1999 , 74 : 25 – 32.  
[ 4 ] 罗贵民.酶稳定化研究进展[ J ].生物化学与生物物理进展 ,1992 , 19( 2 ) : 85 – 89.  
[ 5 ] GERARD A , WALS H , RONAN F ,*et al.* Enzymes in the Animal-feed Industry[ J ]. **Trends in Biotechnology** , 1993 , 11( 10 ) : 424 – 430.  
[ 6 ] 王璋.食品酶学[ M ].北京 :中国轻工业出版社 ,1990.  
[ 7 ] BECKE R , NATHANIEL T , CHRISTENSE N. Salt and Protein or Enzyme-containing Granules and Method for Preparing them with Fluid-bed Coating[ P ].世界专利 :PCT WO 32612 ,1999.  
[ 8 ] BECKE R , NATHANIEL T , CHRISTENSE N. Sugar- or Sugar Alcohol- and Protein-containing Granules and Method of Their Preparation [ J ]. 世界专利 :PCT WO 32613 ,1999.  
[ 9 ] GIBSON TIMOTHY DAVID. Enzyme Stabilization on Drying Using Anionic Polyelectrolytes and Cyclic Polyols[ P ].世界专利 :PCT WO 14773 ,1991.  
[ 10 ] 蔡敬民 ,张洁.芽孢杆菌木聚糖酶的发酵条件研究[ J ].工业微生物 ,1996 26( 2 ) : 1 – 6.  
[ 11 ] MILNER Y. A Copper Reagent for the Determination of Hexuronic Acid and Certain Kethexoses[ J ]. **Carbohydrate Research** , 1967 , 4 : 359 – 361.  
[ 12 ] B.施特马赫著 酶的测定方法[ M ].钱嘉渊译.北京 :中国轻工业出版社 ,1992.  
[ 13 ] CIARAN O FAGAIN , RICHARD O KENNEDY. Functionally stabilized Proteins-a Review[ J ]. **Biotech Adv** , 1991 , 9 : 351 – 409.

( 责任编辑 杨 萌 ,秦和平 )

( 上接第 26 页 )

2 )以良溶剂甲苯和非良溶剂环己烷为混合致孔剂 ,可以调节间聚物的孔结构 ;通过选择合适的交联剂和致孔剂的用量和配比 ,可制备出不同比表面积、孔径较大的树脂。

3 )两性离子交换树脂对柠檬酸的等温吸附说明 ,它具有较高的吸附能力 ,尤其在低浓度的柠檬酸溶液中仍能保持较高的吸附能力。

参考文献：

[ 1 ] 安徽华源生物药业有限公司.采用清洁生产新技术改造传统柠檬酸提取工艺[ A ].全国发酵行业环境保护和综合利用技术交流会 ,北京 ,2001.  
[ 2 ] 钱庭包 ,刘维琳 ,李金和.吸附树脂及其应用[ M ].北京 :化学工业出版社 ,1990.  
[ 3 ] 何炳林 ,黄文强.离子交换与吸附树脂[ M ].上海 :上海科技教育出版社 ,1995.  
[ 4 ] 邓欢 ,郭贤权 ,赵芬芝等.交联乙烯吡咯-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物的合成及其结构性能研究( I ) [ J ].离子交换与吸附 , 1987( 1 ) : 20 – 25.  
[ 5 ] LANGMUIR I. Study of the thermodynamic properties of the stationary phase in chromatographic separation[ J ]. **J Am Chem Soc** , 1996 , 38 : 2221 – 2230.  
[ 6 ] KUN K A , KUNIN R. Hole structure properties of resins[ J ]. **J Polym Sci** , 1968 6 : 2689 – 2695.

( 责任编辑 李春丽 )