

用于丁酸香叶酯合成的褶皱假丝酵母脂肪酶固定化

王璐, 冯 磊*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对褶皱假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, CRL)固定化进行研究,采用吸附法将 CRL 固定在 4 种不同树脂上,采用考马斯亮蓝法测定酶蛋白在树脂上的固定化率,GC 测定催化合成丁酸香叶酯的酯化率,筛选出固定化效果最好的弱酸性大孔阳离子交换树脂 D151。采用单因素实验考察酶液浓度、磷酸盐缓冲液 pH 值以及固定化温度对固定化效果的影响,以固定化酶催化合成丁酸香叶酯的酯化率为指标,优化固定化过程。结果表明,CRL 经树脂 D151 固定后,在酶液质量浓度 15 mg/mL,磷酸盐缓冲液 pH 6.5,固定化温度 45 ℃条件下,吸附 8 h,固定化酶具有最高的催化性能,丁酸香叶酯的酯化率可达 84%。

关键词: 树脂;固定化;优化;丁酸香叶酯

中图分类号:TS 202.3 文章编号:1673-1689(2019)11-0137-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.019

Immobilization of *Candida rugosa* lipase for the Synthesis of Geranyl Butyrate

WANG Lu, FENG Biao*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study focused on the immobilization of *Candida rugosa* lipase (CRL) onto four kinds of different resins by adsorption. The Bradford method was adopted to determine the immobilization ratio, and GC method was used to measure esterification ratio of geranyl butyrate. Finally, the weak-acidic macroporous cation exchange resin D151 obtained the best results of immobilization. Taking the influence of factors including enzyme concentration, the pH of phosphate buffer and the temperature into consideration, the esterification ratio of geranyl butyrate production catalyzed by the immobilized CRL was set as evaluation index to optimize the immobilization process. The results indicated that the highest esterification ratio of 84% could be achieved by the CRL immobilized on D151 resin under optimized conditions: 15 mg/mL CRL, pH of the phosphate buffer 6.5, and immobilization temperature 45 ℃.

Keywords: resin, immobilization, optimization, geranyl butyrate

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 国家教育部博士点基金博导类项目(20130093110009)。

* 通信作者: 冯 磊(1953—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事食品加工与配料方面的研究。E-mail:bfeng@jiangnan.edu.cn.

引用本文: 王璐,冯磊. 用于丁酸香叶酯合成的褶皱假丝酵母脂肪酶固定化[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(11):137-143.

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)甘油三酯水解酶是一类重要的工业酶,可以在油水界面上催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油以及甘油一酯和甘油二酯,广泛存在于动物、植物各种组织及微生物中,是最早研究的酶类之一^[1],在有机溶剂中,它还可以催化转酯化、酯类逆向合成、聚合物合成、生物活性剂合成以及药物合成等反应。利用一些脂肪酶的立体专一性,催化旋光异构体的拆分^[2]和手性药物的合成^[3]已成为酶工程领域新的研究热点。脂肪酶及其改性制剂在食品、化工、造纸、油脂以及制药等行业已得到广泛应用。

丁酸香叶酯天然存在于薰衣草油等精油中,主要用作玫瑰、金合欢、天竺葵、铃兰、香叶、薰衣草等香精的调和香料,也用于食品香精的调配中,如冰淇淋、口香糖、糕点、糖果等。其用途虽广,但天然来源有限^[4],目前主要依靠工业合成。传统的合成方法是化学合成,得到的是混合物,后续分离的成本较高;且由于使用浓硫酸作催化剂,存在严重腐蚀设备及需要三废处理等缺点^[5]。酶法因反应条件温和、转化率高和无副反应等优势受到研究者的青睐。在国内,肖彬曾报道使用酶法合成丁酸香叶酯,酯化率达到 92%^[6],但未具体说明实验方法以及所用的酶,且没有后续报道。国外对脂肪酶催化合成丁酸香叶酯的研究多一些,随着合成方法以及选用酶的不同,酯化率差异较大。Chwen-Jen Shieh 利用脂肪酶 AY 催化三丁酸甘油酯与香叶醇进行转酯化反应生成丁酸香叶酯,并通过响应面法和五水平五变量中心复合旋转设计法,确定最佳反应条件,最终摩尔酯化率为 96.8%^[7]。Sylviane Pulvin 利用毛霉酯酶催化合成丁酸香叶酯,研究水分活度与酶活性的关系,最高酯化率可达到 75%^[8]。

褶皱假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, CRL)对人类和其他生物都是安全和无副作用的,并且已实现商品化,广泛应用于医药、油脂加工、食品、日化等工业,是目前为止全世界工业中应用最广泛的商品化脂肪酶之一。然而,游离态酶在应用过程中存在易结块、易失活、不易回收、难以重复利用等问题,而且脂肪酶的价格较高,不利于推广应用。为了降低脂肪酶的使用成本,提高其稳定性和活力,实现连续化生产,许多研究者开展了固定化脂肪酶的研究,Jasmina J. Damjanovic 利用 Sepabeads® EC-EP 树脂对 CRL 固定化,反应 48 h

酯化率为 99%^[9]。对于脂肪酶的固定化,国内外的研究重点主要集中在固定化载体的选择与固定化条件的优化上^[10],而载体大多为多孔和大孔材料^[11]。其中大孔离子交换树脂和吸附树脂吸附脂肪酶,具有吸附容量大、机械强度高、再生处理方便等优点,且吸附法处理条件温和,酶活损失少^[12-13]。本研究选用不同规格的大孔树脂为载体,以酶的固定化率和固定化酶催化丁酸香叶酯合成的酯化率为目标,选出最佳载体,然后考察酶液浓度、pH 和温度对固定化的影响,从而优化固定化过程。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 实验试剂 褶皱假丝酵母脂肪酶、香叶醇($\geq 98\%$)及正己醇(色谱纯):购于 Sigma 公司;大孔吸附树脂 DA201-V、大孔离子交换树脂 D151、D152、D311:均购于勤实科技公司;牛血清蛋白:生化试剂; Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、3Å 型分子筛、丁酸、正庚烷等:分析纯试剂,均购自国药集团上海化学试剂公司。

1.1.2 实验设备 DKZ-450B 型电热恒温振荡水槽;真空干燥箱:上海森信实验仪器有限公司;磁力搅拌器:德国 IKA 公司;pH 计:XS204 精密天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;Anke TGL-16C 离心机:上海安亭科学仪器厂;UV-1800 紫外可见分光光度计:GC-2014,日本岛津公司;高效液相色谱-半制备:沃特世科技(上海)有限公司;FTIR-iS50 型傅里叶红外光谱仪:美国 Nicolet 公司;Aduance III 400MHz 型全数字化核磁共振波谱仪:德国布鲁克 AXS 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 树脂的预处理 大孔吸附树脂:将树脂用去离子水清洗,去杂,采用乙醇浸泡过夜,最后用去离子水冲洗至中性备用。

阳离子交换树脂:将树脂用去离子水浸泡胀润,去杂,用 2%~4%NaOH 浸泡 4~8 h 后用去离子水洗至中性,再用 4%盐酸浸泡 4~8 h,用去离子水洗至 pH 6,备用。

阴离子交换树脂:将树脂用水洗至流出清水后,用 4%盐酸浸泡 4~8 h,用去离子水洗至 pH 6,再用 2%~4%NaOH 浸泡 4~8 h,用去离子水洗至 pH 7~9,备用。

1.2.2 脂肪酶的固定化 称取一定量的 CRL, 溶解于设定 pH 值的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液中, 低速搅拌 30 min, 并在 2 400 r/min 下离心 3 min, 移取一定量上清液于具塞三角烧瓶中, 再加入预处理后经真空抽滤过的湿树脂, 放在恒温振荡水槽中, 在 150 r/min 下振荡 8 h; 取上清液测定酶蛋白含量, 并用一定量 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次, 抽滤分离固定化酶, 真空干燥, 收集后于 4 ℃ 条件下保存待用。

1.2.3 固定化脂肪酶催化合成丁酸香叶酯 将 3 Å 分子筛置于 500 ℃ 马弗炉中活化 6 h, 慢慢冷却后加入正庚烷中过夜。

将丁酸与香叶醇按 1:1.5 比例加入到预先装有 10 mL 溶剂的棕色瓶中, 加入 100 mg 分子筛, 在温度为 40 ℃ 的恒温振荡水槽中振荡 10 min。加入固定化脂肪酶, 在 200 r/min 振荡速度下反应, 于不同的时间点取 100 μL 反应液, 吸取 100 μL 的正己醇溶液作为内标, 加入溶剂稀释至 1 mL, 取 1 μL 进行气相色谱检测。

1.2.4 丁酸香叶酯的分离鉴定 反应产物经 0.22 μm 有机膜过滤, 每次取 200 μL 进行液相色谱分离制备。取得少量纯品进行红外以及核磁检测。

液相色谱条件: 色谱柱 XBridge™ Prep C18 (10 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 80% 乙腈-20% 水, 流速 3 mL/min, 柱温 25 ℃, 紫外检测波长 220 nm, 进样量 200 μL。

傅里叶红外光谱分析: 采用美国 Nicolet 公司的 FTIR-iS50 型傅里叶红外光谱仪, 将丁酸香叶酯和溶剂分别滴于溴化钾晶体上压制成片, 在室温下测定样品的吸收光谱, 扫描光谱范围为 4 000~400 cm⁻¹, 分辨率为 2.0 cm⁻¹。

核磁共振检测: 溶剂为 CDCl₃, 观测频率为 100.625 MHz, 采用 Waltz 去偶技术, 观测谱宽 24 038 Hz。

1.2.5 蛋白质含量的测定 蛋白质含量分析采用 Bradford 法^[14], 以牛血清蛋白为标准蛋白质。按下式计算酶的固定化率:

固定化率=(初始酶液总蛋白质质量-残液总蛋白质质量)/初始酶液总蛋白质质量×100%

1.2.6 气相色谱定量检测丁酸香叶酯 采用内标法进行样品的定量分析, 内标物为正己醇。

校正因子的测定: 分别配置 0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mol/L 的正己醇与丁酸香叶酯溶液, 采用

GC 准确测量正己醇与丁酸香叶酯的峰面积, 以进样量对峰面积进行线性回归, 求得两条标准曲线, 两曲线斜率之比即为校正因子。校正因子计算公式如下:

$$\phi = m_i A_s / m_s A_i$$

式中: m_i 为丁酸香叶酯质量; m_s 为正己醇质量; A_i 为丁酸香叶酯峰面积; A_s 为正己醇峰面积。

标准样品的配置: 吸取 30 μL 正己醇加入有机溶剂中, 总体积为 5 mL, 混匀。

样品溶液的配置: 吸取 100 μL 标样, 100 μL 反应样液, 加入 800 μL 溶剂中, 混匀后经 0.22 μm 有机膜过滤, 取 1 μL 进行检测。

气相检测条件: 岛津 GC-2014 色谱仪, 色谱柱 DB-Wax (30 m×0.25 mm), 载气为 N₂, 程序升温条件为 100 ℃ 保留 1 min, 10 ℃/min 升温至 220 ℃ 保留 10 min。柱流量 1.15 mL/min, 分流比 30:1, 检测器温度 260 ℃。

丁酸香叶酯酯化率定义为产物中丁酸香叶酯量与理论上完全酯化时丁酸香叶酯量之比。

2 结果与讨论

2.1 树脂载体对固定化脂肪酶的影响

各种树脂对酶固定化的适应性不同, 各种酶又具有不同的肽段和不同的极性, 从而对树脂载体的结合性有特定的要求。工业上常用离子交换树脂和大孔吸附树脂作为固定化酶的载体, 作者选取了具有代表性的几种吸附树脂和离子交换树脂, 比较固定化作用效果, 筛选出适合褶皱假丝酵母脂肪酶固定化的树脂载体。

在下述条件下进行固定化: 取 1 g 树脂, 酶液浓度 10 mg/mL, 缓冲液 pH 6.0, 温度 30 ℃, 吸附 8 h, 固定化后的酶用于丁酸香叶酯的合成反应。考察不同树脂的固定化率和固定化后酶催化丁酸香叶酯合成的酯化率, 结果分别见表 1 和图 1。从表 1 可知, 这几种树脂都有固定化效果, 效果最好的 D151 树脂固定化率达到 83%, 而 D311 和 DA201-V 两种树脂的固定化率都比较低, 说明大孔弱碱性丙烯酸系阴离子交换树脂和弱极性大孔苯乙烯型吸附树脂均不适于 CRL 的固定化。

另一方面, 固定化率这一指标仅表示蛋白质被固定化的程度, 并不等价于酶活力的固定化效果, 因此将固定化酶用于催化丁酸香叶酯的合成, 从酯

化率的角度进一步作比较。从图 1 的结果看,阳离子交换树脂 D151 和 D152 不仅蛋白质固定化率高,酯化率也比其余两种树脂高。吸附树脂与阴离子交换树脂相比,固定化率接近,但阴离子交换树脂的酯化率明显低于吸附树脂。阳离子交换树脂固定化率和酯化率高的原因可能是:因为离子交换树脂依靠表面功能基团与脂肪酶作用,形成化学键,其结合力较强,与吸附结合力相比,使酶不易脱落,还可以使酶更好地暴露在载体外面,增加酶分子与底物分子的作用几率,最大限度地降低酶分子的作用位阻^[15]。而吸附树脂为弱极性树脂,无功能基团,对于脂肪酶的吸附仅靠其较大的表面积,作用力比较弱,导致固定化率较低,且酶在内表面的吸附使酶分子被包埋在载体里面,就增加了空间位阻。阴离子交换树脂固定化率和酯化率都低的原因可能是褶皱假丝酵母脂肪酶是一种碱性蛋白质,而阴离子交换树脂适于选择性地作用于酸性物质。总之,大孔阳离子交换树脂 D151 固定化效果最好。

表 1 各种树脂的固定化率

Table 1 Immobilization ratio of different resins

型号	性质	蛋白质固定化率/%
DA201-V	弱极性大孔苯乙烯型吸附树脂	57
D151	大孔弱酸性丙烯酸系阳离子交换树脂	83
D152	大孔弱酸性丙烯酸系阳离子交换树脂	80
D311	大孔弱碱性丙烯酸系阴离子交换树脂	56

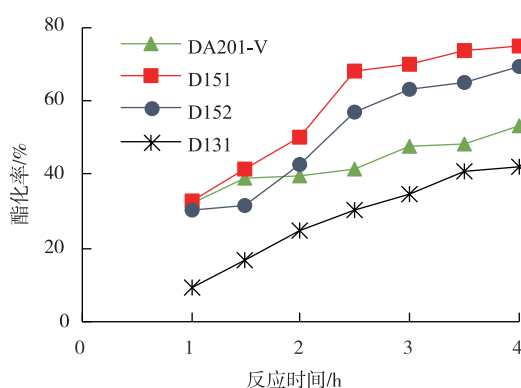


图 1 各种树脂固定化后的酶催化丁酸香叶酯合成的酯化率
Fig. 1 Esterification ratios of geranyl butyrate catalyzed by enzyme immobilized with different resins

2.2 酶液质量浓度对固定化的影响

每一种固定化酶载体的固载量是一定的,如果在固定化的过程中加入的酶量超过载体固载量,造成载体分子表面吸附酶量过多,就会使酶分子相互

聚集成团,酶的活性中心有可能被遮盖,尽管吸附酶量较多,但酶的催化活性仍较低^[16]。

取 1 g D151 树脂,酶液质量浓度分别为 10、15、20、25 mg/mL,缓冲液 pH 6.0,在 30 ℃下吸附 8 h。酶固定化后即用于催化丁酸香叶酯的合成。考察酶液质量浓度对固定化率和丁酸香叶酯合成效果的影响,结果见表 2 和图 2。随着酶液质量浓度的增加,固定化率先增大后减少,在酶液质量浓度 20 mg/mL 时达到最大值,说明此时大孔树脂集团的结合位点已趋于饱和。总体而言,固定化率的数值都比较高。而从酯化率角度看,虽然酶液质量浓度 20 mg/mL 时的固定化率最高,但给酶量已经过多,空间位阻效应显著,导致酶的活性中心被掩盖,酯化率低于酶液质量浓度 10 mg/mL 和 15 mg/mL 时的酯化率。两项指标综合考虑,选择 15 mg/mL 为最适酶液质量浓度。

表 2 不同酶液浓度下的固定化率

Table 2 Immobilization ratios at different enzyme concentrations

酶液质量浓度/(mg/mL)	蛋白质固定化率/%
10	83
15	84
20	86
25	80

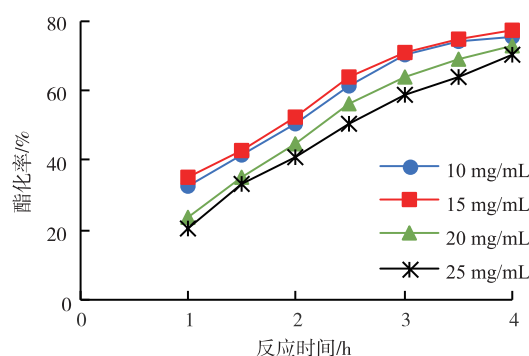


图 2 固定化时酶液质量浓度对酯化率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme concentration during immobilization on esterification ratio

2.3 pH 对固定化的影响

酶分子能够“记忆”进入固定化前所在缓冲液的 pH 状态,这种“记忆”pH 改变了酶分子所处的微环境,影响到酶分子相关功能基的解离,从而影响酶的酯化活性^[17],因此应选择合适的固定化 pH。

取 1 g D151 树脂,酶液质量浓度 15 mg/mL,缓

冲液pH分别为5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,在30℃下吸附8 h,然后将固定化酶用于催化丁酸香叶酯的合成。研究不同pH对丁酸香叶酯固定化效果的影响,结果见表3和图3。由表3可知,当pH低于6.5时,固定化率较高,说明弱酸条件下褶皱假丝酵母脂肪酶与载体的亲和吸附作用较强。观察酯化率,在pH 6.5下固定化时酯化率最高,因为只有在特定pH值下,酶分子上的活性基团才能处于最佳离子状态,所以选择6.5为最适的固定化pH。CRL在弱酸环境下固定时具有更高的酯化活性,反映了该酶作为弱碱性脂肪酶的特点。

表3 不同pH下的固定化率

Table 3 Immobilization ratios at different pH

pH 值	蛋白质固定化率/%
5.5	83
6.0	85
6.5	84
7.0	81
7.5	79

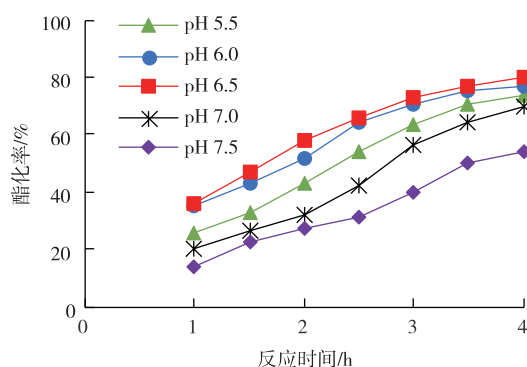


图3 pH对酯化率的影响

Fig. 3 Effect of pH on esterification ratio

2.4 温度对固定化脂肪酶的影响

取1 g D151树脂,酶液质量浓度15 mg/mL,缓冲液pH 6.5,分别在温度30、35、40、45、50、55℃下吸附8 h,固定化后酶用于催化丁酸香叶酯的合成。表4和图4表示了不同固定化温度对固定化效果的影响。表4表明,从30~45℃,固定化率随温度的升高而增加,而从45~60℃,则随温度的升高,逐渐降低。这归因于蛋白质的吸附是一个吸热过程,在温度较低时,酶不容易吸附到树脂上,随着固定化温度的升高,分子运动逐渐加剧,载体对酶的吸附量有所提高。然而,高温又容易使蛋白质变性失活,所以继续升高温度,固定化率反而下降。45℃下进

行固定化的效果最好。从图4看,也是45℃下固定化的酶的酯化率最高,其原因一方面是在一定的范围内,温度的升高能提高酶与底物的反应速度;而另一方面,温度较高时蛋白质构象改变,酶分子发生不可逆失活,导致酯化率降低。两方面因素拮抗的结果,45℃为固定化的最适温度。

表4 不同温度下的固定化率

Table 4 Immobilization ratios at different temperatures

温度/℃	蛋白质固定化率/%
30	77
35	81
40	81
45	82
50	79
55	73

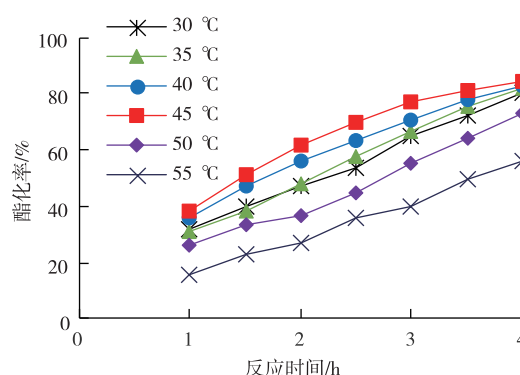


图4 固定化温度对酯化率的影响

Fig. 4 Effect of immobilization temperature on esterification ratio

2.5 验证试验

根据以上单因素考察的结果,得到以下条件:1 g D151树脂,酶液质量浓度15 mg/mL,缓冲液pH 6.5,温度45℃,吸附8 h。在这些条件下进行验证实验,结果见图5。实验结果表明,在上述优化后的反应条件下,酯化率可达84%。

2.6 定性分析

2.6.1 丁酸香叶酯的红外光谱表征 图6所示为丁酸香叶酯的红外光谱图,在1 735 cm^{-1} 处出现中等宽度的强吸收峰,代表了酯($-\text{COO}-$)上的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动,1 173 cm^{-1} 处代表酯键中 $\text{C}-\text{O}$ 的振动吸收峰,1 670 cm^{-1} 处的弱吸收峰代表 $-\text{C}=\text{C}-$ 的伸缩振动,3 000 cm^{-1} 附近的吸收峰为 $\text{C}-\text{H}$ 键振动,丁酸香叶酯的官能团在此光谱图上已全部显示。

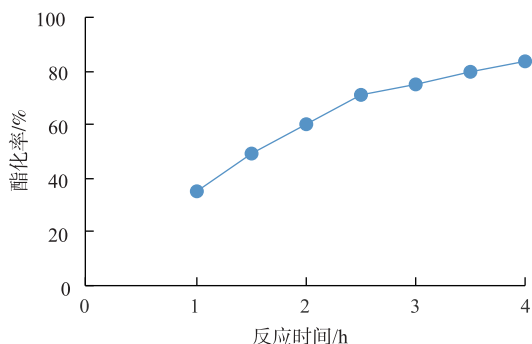


图5 最适固定化条件下的酯化率验证
Fig. 5 Verification of esterification ratio with optimal immobilization conditions

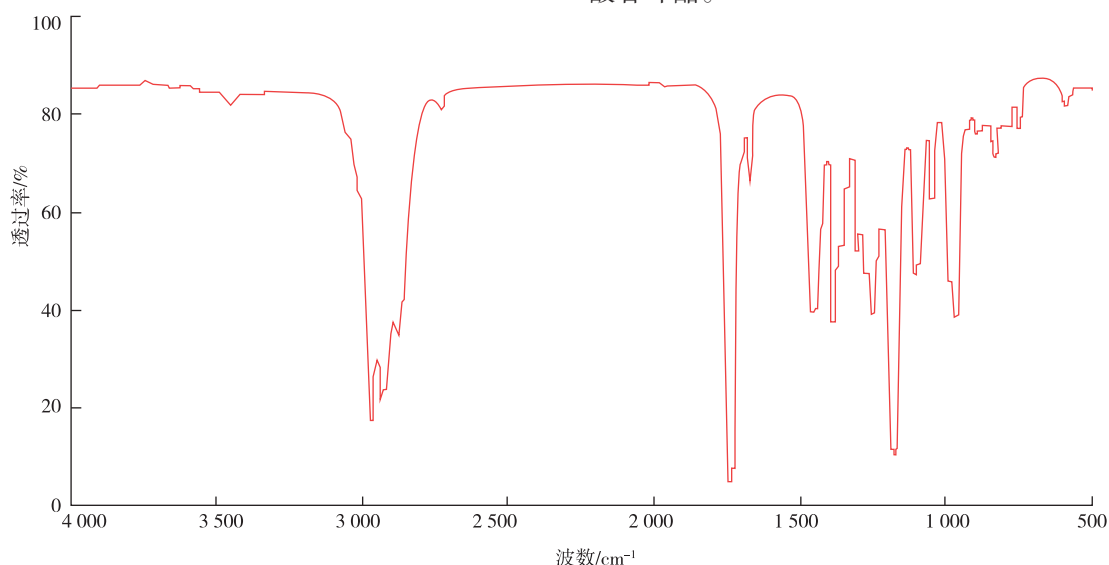


图6 丁酸香叶酯的红外光谱
Fig. 6 FT-IR spectrum of geranyl butyrate

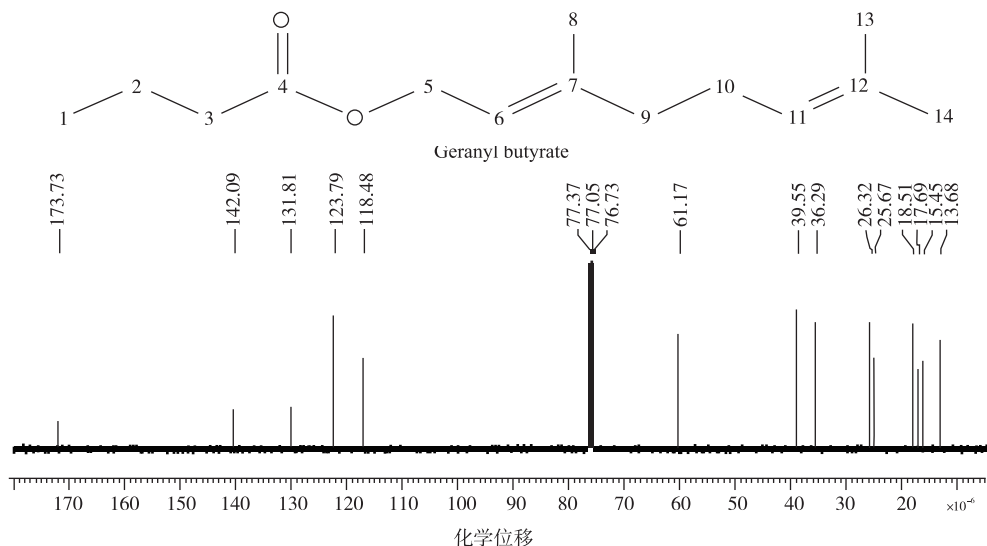


图7 丁酸香叶酯核磁共振图谱
Fig. 7 ^{13}C -NMR spectrum of geranyl butyrate

2.6.2 丁酸香叶酯的核磁表征 图7为丁酸香叶酯的碳谱谱图,共有14个有效峰,其中4个伯碳峰、5个仲碳峰、4个烯碳峰和一个羰碳峰。归属 δ 13.68、16.46、17.69、25.67分别为1位、8位、13位、14位甲基伯碳。 δ 18.51、36.29、61.17、39.55、26.32分别为2位、3位、5位、9位、10位亚甲基仲碳。 δ 118.48、123.79分别为6位、11位一取代烯碳。 δ 142.09、131.81分别为7位、12位二取代烯碳。 δ 173.73为4位羰碳,77处的三个峰为 CDCl_3 溶剂峰。

综合两种定性方法的结果,可确定产物确为丁酸香叶酯。

3 结 语

大孔阴阳离子交换树脂和吸附树脂都对 CRL 有一定的固定化作用,但阳离子交换树脂的固定化性能最好,符合阳离子交换树脂作用于碱性物质的原则。树脂的固定化性能与功能基团的含量等多种

因素有关,并非固定化率越高,酶的活性越高。CRL 适宜在弱酸环境下固定,可显示更高的酯化活性。在 45 ℃下固定化的 CRL 能得到高的酯化率。

以 D151 离子交换树脂为载体,固定化的最佳条件为:每克预处理过的树脂加酶 15 mg/mL,在 pH 6.5 缓冲液下,温度为 45 ℃,吸附 8 h 得到的固定化酶催化合成丁酸香叶酯,最高酯化率达到 84%。

参考文献:

- [1] WANG Chunyu, CHI Naiyu, ZHANG Qingfang, et al. Purification and enzymatic properties of cryogenic lipase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(8): 809-813. (in Chinese)
- [2] VANDYCK S M O, LEMIER G L F, JONCKERS T H M, et al. Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neolignan by lipase-catalysed acetylation[J]. **Tetrahedron Asymmetry**, 2001, 12: 785-789.
- [3] MARGOLIN A L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1993, 15: 266-280.
- [4] ZHANG Hui, JIA Jingdun, WANG Wenyue, et al. Current status and future trends of food additives research in China[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(3): 225-233. (in Chinese)
- [5] YIN Xianhong, SHI Huahong. Studies on synthesis of neryl butyrate and geranyl butyrate on solid superacid catalyst[J]. **Chemical Reagents**, 1998, 20(6): 378-379. (in Chinese)
- [6] XIAO Bin. Enzymatic preparation of natural butyrate[J]. **Flavour Fragrance Cosmetics** 1994, 2: 12-13.
- [7] Chwen-Jen Shieh, Casimir C Akoh, Lisa N Yee. **Communication Biotechnology and Bioengineering**, 1996, 51: 371-374.
- [8] KARRA-CHAABOUNI C M, Pulvin S. Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a *Mucor miehei* esterase in a solvent-free system[J]. **Biotechnology Letters**, 2002, 24: 1951-1955.
- [9] DAMNJANOVIC J J, ZUZA M G, SAVANOVIC J K, et al. Coval batch and fluidized bed reactor[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2012, 75: 50-59.
- [10] YANG Jianjun, MA Xiaoxun. A study on mechanism of lipase immobilized with macroporous resins[J]. **Journal of Northwest University**, 2009, 39(2): 241-245. (in Chinese)
- [11] RAHMAN M B A, ZAIDAN U H, BASRI M, et al. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilized on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2008, 50(1): 33-39.
- [12] ZHANG Ruzhuang, ZHOU Yanbo, et al. Lipase immobilization through ion exchange resins[J]. **Science Technology Review**, 2013, 31(5-6): 54-57. (in Chinese)
- [13] GAO Yang, TAN Tianwei. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2006, 22(1): 114-118. (in Chinese)
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1): 248-255.
- [15] ZHANG Yan, JIANG Bo, CHEN Chao. Immobilizing fructosyltransferase with ion-exchange resin and the optimal conditions[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2004, 23(4): 60-64. (in Chinese)
- [16] LOPEZ-LOPEZ A, LOPEZ-SABATER M C, CAMPOV-FOLGOSO C, et al. Fatty acid and Sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and infant formulas[J]. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2002, 56(12): 1242-1254.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2): 248-254.