

KH560 修饰的溶胶-凝胶法二氧化硅载体用于脂肪酶的固定化

宋 聪¹, 喻晓蔚², 钱 丹¹, 孙振忠¹, 江 波¹

(1. 四川大学 化学学院, 绿色化学与技术教育部重点实验室, 成都 610064; 2. 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘 要: 以 F127 为模板剂, 采用溶胶-凝胶法制备了环氧硅烷改性剂 KH560 修饰的二氧化硅(F-560-S), 通过 TG、FTIR、SEM 和 N₂ 吸附-脱附等方法对样品表面性质和结构进行了表征。结果表明, F-560-S 表面富含环氧基, 且具有较大孔径和比表面积。以 F-560-S 为载体通过共价结合法固定南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB), 结果表明环氧基和载体形貌共同影响固定化酶固载量和酶学性质。F-560-S 对 CALB 的固载量达到 375 mg/g support, 为普通 SiO₂(U-S)的 37.5 倍; F-560-S 固定的 CALB 在多种有机溶剂中催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯的反应时, 催化转化率普遍高于 U-S 固定的 CALB, 热稳定性和操作稳定性均有明显改善, 重复使用 7 次后 F-560-S 固定的 CALB 酶活力仍为初始活力的 88.3%。

关 键 词: KH560; F127; 二氧化硅溶胶-凝胶; 酶固定化

中图分类号: O6 文献标识码: A

Immobilization of Lipase on KH560 Modified Silica by Sol-Gel Process

SONG Cong¹, YU Xiao-Wei², QIAN Dan¹, SUN Zhen-Zhong¹, JIANG Bo¹

(1. Key Laboratory of Green Chemistry & Technology, Ministry of Education, College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An epoxy-functionalized silica support was prepared through 3-glycidoxypyltrimethoxysilane (KH560) modified silica sol in the presence of triblock copolymer F127 (F-560-S). Surface chemistry, micromorphology and pore structure of the supports were characterized by TG, FTIR, SEM and N₂ adsorption-desorption, which showed that the BET surface area and pore volume of epoxy-activated supports increased with the addition of F127. The *Candida Antarctica* Lipase B (CALB) was immobilized on the resulting carrier by covalent link. The amounts of lipases immobilized were 10 mg/g support and 375 mg/g support on the unmodified silica (U-S) and modified silica (F-560-S), respectively. The immobilized lipases were examined as biocatalysts for transesterification of 1-phenethanol and vinyl acetate in nonaqueous medium. The effects of solvents and temperature on immobilized lipases were systematically investigated. The catalytic activity of the CALB immobilized on F-560-S was improved in various solvents, especially in polar solvents. The immobilized CALBs maintained high activity, while the control experiment using free lipase gave very low ester production in the temperature range of 0–60 °C. Furthermore, thermal stability of CALB immobilized on F-560-S was improved as compared to the CALB on U-S was observed. The CALB immobilized on F-560-S exhibited high operational stability in organic media which still retained 88.3%

收稿日期: 2015-08-24; 收到修改稿日期: 2015-09-18

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA022207)

National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA022207)

作者简介: 宋 聪(1991-), 男, 硕士研究生. E-mail: FPL113@163.com

通讯作者: 江 波, 教授. E-mail: jiangbo@scu.edu.cn

of its original activity for 12 h consecutive 7 runs.

Key words: KH560; F127; silica Sol-Gel; enzyme immobilization

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一种羧酸酯水解酶,广泛应用于催化酯化、水解、醇解、内酯生成等多种反应^[1-2]。在众多脂肪酶中,南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida Antarctica* Lipase B, CALB)的用途最为广泛,非水相中 CALB 仍能保持较高的催化活性^[3],因而在工业应用中具有重要的价值。

CALB 在非水相催化反应中存在催化效率低、操作稳定性差、热稳定性差等问题,人们探索采用固定化技术解决上述问题。二氧化硅,尤其是具有较高比表面积和孔体积的二氧化硅,以其易修饰、易分离的特性以及对脂肪酶良好的吸附性能,而备受研究者关注^[4-6]。固定化脂肪酶的主要方法包括物理吸附、共价结合和凝胶包埋等。单独使用 SiO₂ 通过物理吸附固定 CALB 普遍存在固载量低、重复使用性差和环境耐受性差等问题,而用 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH560)修饰的二氧化硅具有生物相容性良好和化学性质稳定等优点,是一种重要的脂肪酶固定化载体^[7-8]。刘晓贞等^[9]采用后嫁接法在溶剂热条件下使用 KH560 对 SiO₂ 大孔材料进行环氧基化改性,通过共价结合法固定漆酶。Maryam 等^[10]在甲苯中以 KH560 修饰 SBA-15,修饰载体用于米根霉脂肪酶的固定化。但是,以 KH560 修饰 SiO₂ 固体颗粒,反应需在高温及有机溶剂条件下进行;而以正硅酸乙酯(TEOS)为前驱体制备的 SiO₂ 溶胶, Si 原子上含有大量活性羟基^[11],易与硅烷偶联剂反应,条件简单,耗能低,陈化后可快速变为凝胶,直接应用于 CALB 的固定化。目前尚未见到 KH560 修饰二氧化硅溶胶用于 CALB 固定化的报道。

本工作以 KH560 直接修饰二氧化硅溶胶,并引入三嵌段共聚物 Pluronic F127 为模板,得到一种比表面积和孔体积较大的环氧修饰二氧化硅颗粒。以此为载体通过共价结合法固定 CALB,系统研究了 KH560 和载体形貌对固定化 CALB 固载量和非水相催化性能的影响,包括反应时间、反应温度、反应介质等对催化反应的影响,以及固定化酶的重复使用性等问题。

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB, Sigma 公司),

TEOS(高纯,天津科密欧化学试剂有限公司), γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH560, 98%, 成都晨光化工研究院), Pluronic F127(EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆, Sigma 公司), 其它试剂均为市售分析纯。

Thermo Nicolet 670 傅里叶红外光谱仪(美国尼高力仪器公司), UV-3100PC 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), GC4000A 气相色谱仪(北京东西电子有限公司), Quadrasorb SI 比表面分析仪(美国康塔公司), HCT-2 热重分析仪(北京恒久科学仪器厂)。

1.2 载体制备

1.2.1 SiO₂ 载体制备

根据文献[12]报道方法,将由 TEOS 制得的 3% 溶胶 40℃ 旋蒸 30 min, 研磨得 SiO₂ 颗粒(U-S)。

1.2.2 改性 SiO₂ 载体制备

向 100 mL 3%(w/w)的 SiO₂ 溶胶中加入 1.5 g 98%的 KH560、1 g 氨水、0.3 g F127, 30℃ 搅拌 3 h, 室温陈化 3 d。旋蒸出乙醇, 固体粉末用无水乙醇洗涤, 230℃ 焙烧 6 h, 得到以 F127 为模板的 KH560 修饰 SiO₂(F-560-S)。未添加 F127 的 KH560 修饰二氧化硅样品记为 560-S。

1.3 CALB 固定化

取载体 0.24 g, 加入 8 mL 15 mg/mL 的 CALB 溶液中, 25℃, 180 r/min 摇床振荡 12 h, 5000 r/min 离心, 去离子水洗涤固体三次, 收集上清液。冻干固体, 得到粉末状固定化 CALB。

按照 Bradford 法测定上清液吸光度^[13], 按下述公式计算固载量:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times \frac{120}{0.24}$$

A₁、A₂ 分别为固定化前后酶液与 Bradford 试剂显色吸光度值。

1.4 CALB 催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯的反应

在 15 mL 西林瓶中分别加入 4.2 mL 溶剂(正己烷或其它溶剂), 1.2 mL 1-苯乙醇和 4.6 mL 醋酸乙烯酯, 再加入按固载量折算为 15 mg 游离酶当量的固定化酶或 15 mg 的游离酶(F-CALB)。将西林瓶置于 0~60℃ 250 r/min 气浴摇床中反应。取反应 1~48 h 后上层液体, 使用气相色谱分析产物组成。色谱柱: Grace EC-WAX; 程序升温 60/(3)-20℃/min-240/(3); 进样口温度 250℃; 进样量 0.4 μ L。

1.5 重复使用性

取 15 mg 游离酶当量的固定化酶放于正己烷中反应 12 h 后过滤, 正己烷洗涤, 干燥后用于下一次反应。使用气相色谱分析滤液组成。

2 结果与讨论

2.1 载体表征

2.1.1 载体热重及红外分析

图 1 为 560-S 和 F-560-S 的热失重曲线。由图可知, F-560-S 在约 200~240 °C 及 250~300 °C 间存在两个失重过程, 而 560-S 从约 260 °C 开始失重。这表明加热过程中 F127 先于 KH560 分解。因此控制修饰载体烧结温度为 230 °C, 选择性去除 F127 而保留 KH560。

红外图谱(图 2)进一步证实烧结后 SiO₂ 存在环氧基。由图 2 可以看出, 3450.6 cm⁻¹ 对应硅羟基上 O-H

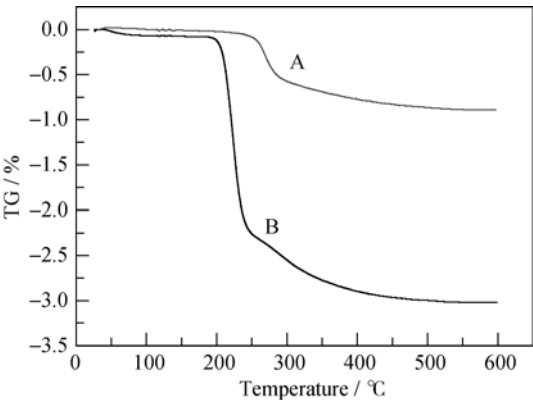


图 1 560-S(A)和 F-560-S(B)的 TG 曲线
Fig. 1 TG curves of 560-S (A) and F-560-S (B)

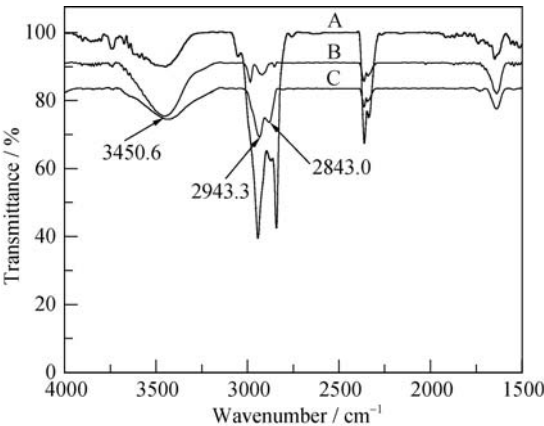


图 2 KH560 修饰前后 SiO₂ 的红外图谱
Fig. 2 FT-IR spectra of silica before and after KH560 modification
A: KH560; B: U-S; C: F-560-S

的伸缩振动吸收峰, 2943.3 和 2843.0 cm⁻¹ 对应 KH560 硅烷链上甲基和亚甲基的伸缩振动吸收峰。比较样品 U-S 和 F-560-S 可见, 随着 KH560 的加入, 硅羟基吸收峰减弱, 而甲基和亚甲基的吸收峰增强。

环氧基含量可以通过 Na₂S₂O₃ 滴定法测定。Na₂S₂O₃ 与环氧基反应后生成的 OH 用标准 HCl 滴定, 结果表明: F-560-S 烧结前后环氧基含量分别为 225 和 256 μmol/g。可见, 230 °C 烧结之后载体表面仍然含有 KH560。

2.1.2 载体微观形貌和孔结构

图 3 为 U-S 和 F-560-S 在不同放大倍数下的 SEM 照片。从图 3(a) 可见, 未改性 SiO₂ 颗粒粗大, 表面光滑, 进一步观察(图 3(b))可见, 其表面不具有孔隙, 且粒径较大。而 F-560-S 烧结后, 粗大的 SiO₂ 颗粒消失(图 3(c)), 细小的颗粒相互堆积, 形成丰富的堆积孔道结构(图 3(d))。

表 1 比较了改性前后 SiO₂ 载体孔结构变化情况, 可以看出, KH560 修饰使得 SiO₂ 载体比表面积、孔容和孔径均略有下降。F-560-S 的孔结构参数明显高于 U-S 和 560-S。这是因为在凝胶过程中 SiO₂ 粒子堆积于 F127 表面, 粒子间相对距离增加^[14]。烧去 F127 后 SiO₂ 微观结构仍基本上保持完好。因此

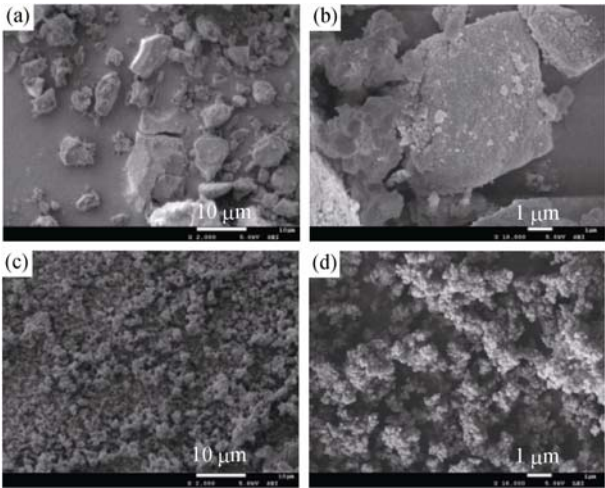


图 3 不同放大倍率下改性前后二氧化硅的 SEM 照片
Fig. 3 Low (a, c) and high (b, d) magnification SEM images of different silica support
(a) and (b): U-S; (c) and (d): F-560-S

表 1 改性前后二氧化硅载体孔结构参数 Table 1 Surface properties of silica support before and after modification			
Sample	A_{BET} /(m ² ·g ⁻¹)	Pore Volume/(cm ³ ·g ⁻¹)	Pore size/nm
U-S	538	0.563	3.9
560-S	455	0.545	3.2
F-560-S	725	0.709	10.3

F-560-S 具有较大的孔径。

2.2 不同载体对 CALB 的固载量

含环氧官能团的介孔载体对脂肪酶的固定分两步进行^[15]: 载体先通过范德华力吸附脂肪酶, 而后环氧基开环与酶上非活性位点的氨基形成稳定的化学键。Takahashi 等^[16]研究表明, 在载体大小相当的情况下, 载体与酶间作用力越强, 载体所能吸附的酶越多。由图 4 可见, 普通 SiO₂ 对 CALB 吸附能力较弱, 固载量仅为 10 mg/g support。对于普通的 SiO₂ 而言, 固定化仅通过范德华力、氢键和静电作用完成。经过 KH560 修饰的载体与 CALB 分子间的结合除了物理吸附作用, 还有化学键合作用, KH560 减小了酶分子在反复摇晃和冲洗过程中的脱落, 因此载体对 CALB 的结合能力有了明显的提升, 固载量达到 104 mg/g support。引入 F127 作为扩孔材料后, 载体对 CALB 的固载量再次提升, 达到 375 mg/g support, 这可归因于 F-560-S 较高的孔结构参数。Lei 等^[17]认为, 载体表面形貌对其固定化能力有重要的影响, 载体表面孔隙越丰富, 其容纳酶的空间也越多, 固定化能力就越强。

2.3 CALB 催化 1-苯乙醇乙酸酯的合成

使用催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯的转酯化反应来表征不同 CALB 的催化性能(式 1), 并以此考察载体对 CALB 催化活力的影响。

图 5 是不同 CALB 催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯反应转化率随反应时间的变化关系。与游离酶相比,

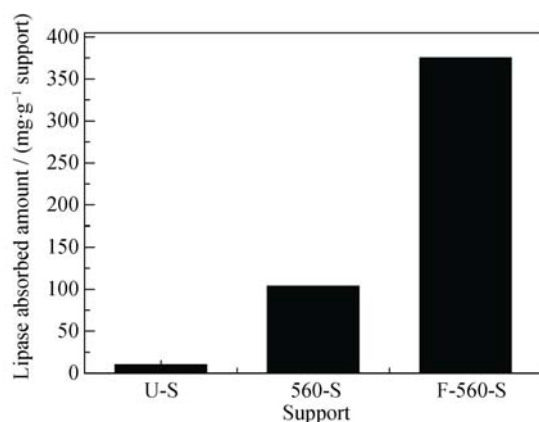
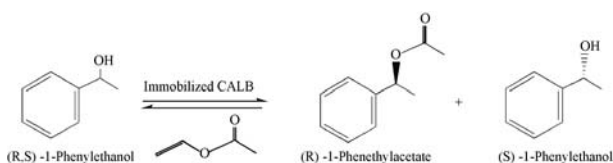


图 4 改性前后 SiO₂ 对 CALB 固载量(mg/g support)的比较

Fig. 4 Lipase absorbed amount (mg/g support) of immobilized lipases on difference supports



式 1 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯的转酯化反应

Scheme 1 Transesterification of 1-phenylethanol and vinyl acetate

固定化酶在有机相中的催化活力得到明显提高, 这与催化剂在反应底物中的状态有密切关系; 游离 CALB 在有机相中易团聚, 而固定化酶分散性好, 短时间放置, 固载酶也不易沉积; 另一方面, 固定化过程改变了脂肪酶结构, 保持了活力构型, 因而酶活有了极大提高^[18]。F-560-S 固定的 CALB 与 U-S 固定的 CALB 相比, 1 h 反应转化率略有提升, 反应 12 h, 转化率达到 53.85%, 趋于稳定。这表明 KH560 不影响酶活表达, 与 CALB 相容性好。

2.4 不同固定化 CALB 的重复使用性

重复使用性 is 任何固定化酶在应用上必须考虑的重要因素。图 6 比较了三种载体固定的 CALB 多次催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯反应后活力保持情况。

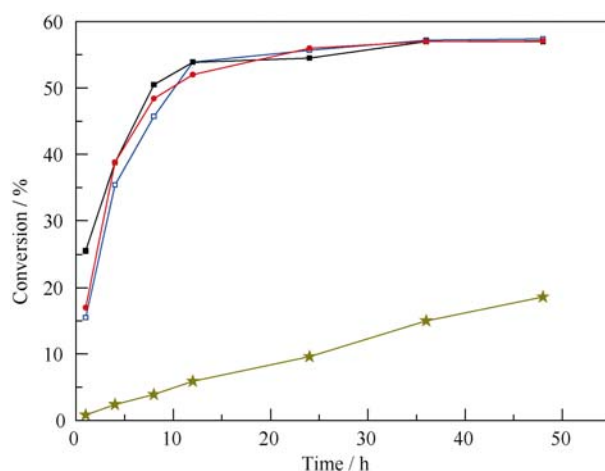


图 5 不同 CALB 催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯反应转化率随时间的变化关系

Fig. 5 Conversion of transesterification of 1-phenylethanol and vinyl acetate using CALBs as biocatalysts

(■) CALB immobilized on F-560-S; (□) CALB immobilized on 560-S; (●) CALB immobilized on U-S; (★) free CALB

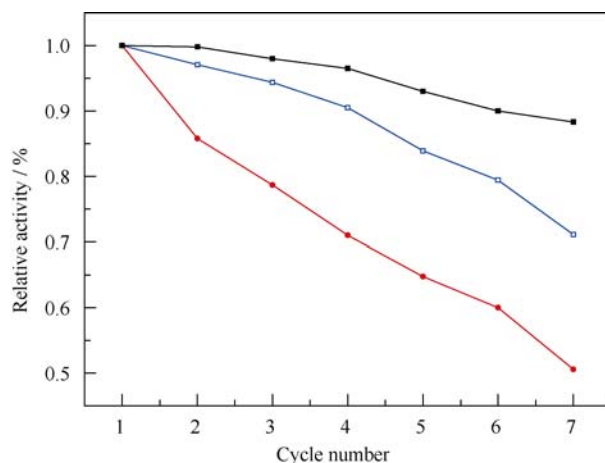


图 6 固定化 CALB 的重复使用性

Fig. 6 Reusability of the immobilized CALBs

(■) CALB immobilized on F-560-S; (□) CALB immobilized on 560-S; (●) CALB immobilized on U-S

载体与酶之间形成化学键是一种最为稳定的固定化方式,同时载体与酶间形成多点键合是提高固定化酶重复使用性的重要因素^[19]。从图6可以看出,U-S 通过物理吸附固定的 CALB 重复使用七次后,剩余酶活仅为初始酶活的 50.5%,这是由于酶分子仅仅依靠物理吸附方式吸附于载体材料上,因而在多次操作过程中易于脱落^[20]。U-S 经过修饰后,固定化酶的重复使用性明显提高,重复使用 7 次后以 F-560-S 为载体的固定化 CALB 活力仍为初始活力的 88.3%。CALB 的水解/酯化催化活性位点为 Ser-His-Asp 三联体^[21],KH560 修饰的 SiO₂,固定化过程主要通过环氧基与酶分子赖氨酸(Lys)残基上的氨基键合完成^[10],而不影响 CALB 的活性位点。因此 KH560 在保证酶活的同时,又实现了载体与酶的稳定结合。在 560-S 基础上,加入 F127 使得载体堆积孔更多,形貌更加丰富。Zhou 等^[22]认为,具有弯曲结构的载体对酶的结合更为牢固。因此经过多次冲洗、反应后,F-560-S 上的 CALB 流失较少,仍具有较高的催化活力。

2.5 固定化 CALB 在不同溶剂中的催化活力

溶剂极性及其自身毒理特性对生物酶活力有至关重要的影响,酶通过“必需水”保持其构象变化所需的柔性,进而在有机溶剂中表现出催化活性。由于极性溶剂与水的结合能力强于非极性溶剂,因此在非水相反应中,以疏水性较强的溶剂为反应介质可以观察到较高的酶催化活力^[23]。图7比较了固定在不同载体上的 CALB 在甲苯、叔丁醇、四氢呋喃、吡啶、DMSO、DMSO-80%甲苯和 DMSO-80%叔丁醇混合溶液中催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯反应的结果。前五种溶剂极性依次增强,且均高于正己烷。由图7可见,固定化酶在甲苯、叔丁醇、四氢呋喃、吡啶、DMSO-80%甲苯、DMSO-80%叔丁醇混合溶液中均表现出了一定的催化活力,但在极性最强的 DMSO 中,三种固定化酶均失活。这是由于 DMSO 的极性过强,夺取了酶分子中的结合水,使得酶构象发生变化而造成的^[24]。因此在 DMSO 中混入 80% 甲苯或 80% 叔丁醇后,固定化酶再次恢复催化活力。SiO₂ 经过 KH560 修饰后,固定 CALB 的催化活力在除 DMSO 以外的其他溶剂中均有明显提高。加入 F127 改变载体形貌后,固定化酶的催化活力进一步提高,在极性较强的吡啶中,560-S 和 F-560-S 固定的 CALB 对目标反应的催化转化率分别为 36.9%和 38.8%,而 U-S 固定的 CALB 仅为 8%。这表明 KH560 和载体形貌共同影响固定化 CALB 的催化活力:一方面 KH560 与 CALB 间形成共价键改变了酶分子结构;另一方面载体微环境的改变能够

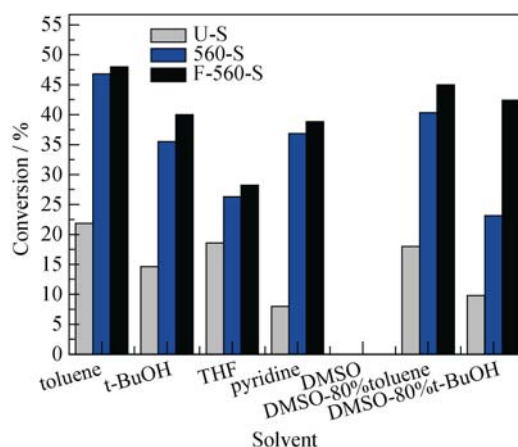


图7 溶剂对固定化 CALB 催化活力的影响

Fig. 7 Effect of solvents on transesterification of the immobilized CALBs

减弱有机溶剂对酶必需水的结合能力,保护酶的活力构型^[18]。

2.6 温度对固定化 CALB 催化性能的影响

以正己烷为溶剂,分别考察 0~60℃下 CALB 催化性能的变化。图8为不同温度下 CALB 催化 1-苯乙醇和醋酸乙烯酯反应的转化率。随着温度升高,酶的催化活力随之提升。与游离酶相比,固定化 CALB 的催化活力在 0~60℃温度范围内都有极大提高,表明 CALB 经过固定化后热稳定性得到了显著改善。当温度超过 40℃时,F-560-S 固定的 CALB 催化手性醇的转化率即超过了 50%,这是因为在酶能够保持正常活力的情况下,提高温度降低了酶的手性选择能力^[25],高温条件下酶同样可催化(S)-1-苯乙醇转参与酯化反应。经过 KH560 修饰的 SiO₂,由于载体与酶分子的共价键键合强于 U-S 的物理吸附作用,使得酶分子构象不易受温度影响,固定化酶

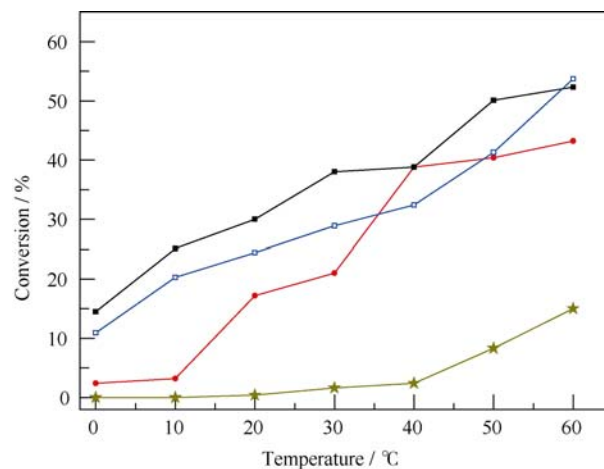


图8 温度对固定化 CALB 催化活力的影响

Fig. 8 Effect of temperature on transesterification of the immobilized CALBs

(■) CALB immobilized on F-560-S; (□) CALB immobilized on 560-S; (●) CALB immobilized on U-S; (★) free CALB

活力有所提高。加入 F127 改变了载体形貌, 进一步提高了固定化 CALB 的热稳定性。

3 结论

以 F127 为扩孔材料, KH560 修饰 SiO_2 溶胶, 凝胶经烧结后得到一种具有较大比表面积和孔体积的环氧修饰 SiO_2 介孔材料(F-560-S)。改性 SiO_2 对南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)的固载量达到 375 mg/g support, 为普通 SiO_2 的 37.5 倍。F-560-S 与 CALB 具有良好的生物相容性。与游离酶、普通 SiO_2 固定的 CALB 相比, 用这种新型载体固定的 CALB 在催化 1-苯乙醇与醋酸乙烯酯的反应时, 重复使用性、热稳定性和在极性溶剂中的稳定性均有明显提高。F-560-S 是一种固定 CALB 的优良载体, 具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 2001, **19**(8): 627–662.
- [2] CHEN B, HU J, MILLER E M, *et al.* Candida antarctica lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules*, 2008, **9**(2): 463–471.
- [3] ANTONIA P, VAN RANTWIJK F, SHELDON R A. Effective resolution of 1-phenyl ethanol by Candida antarctica lipase B catalysed acylation with vinyl acetate in protic ionic liquids (PILs). *Green Chemistry*, 2012, **14**(6): 1584–1588.
- [4] WEI Y, XU J G, FEN Q W, *et al.* Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated Sol-Gel process. *Materials Letters*, 2000, **44**(1): 6–11.
- [5] KRAMER M, CRUZ J C, PFROMM P H, *et al.* Enantioselective transesterification by Candida antarctica Lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of Biotechnology*, 2010, **150**(1): 80–86.
- [6] JIANG Y, WANG Y, WANG H, *et al.* Facile immobilization of enzyme on three dimensionally ordered macroporous silica via a biomimetic coating. *New Journal of Chemistry*, 2015, **2**(2): 978–984.
- [7] KATCHALSKI-KATZIR E, KRAEMER D M. Eupergit®C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2000, **10**: 157–176.
- [8] WANG F, NIE T T, SHAO L L, *et al.* Comparison of physical and covalent immobilization of lipase from Candida antarctica on polyamine microspheres of alkylamine matrix. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2014, **32**: 314–326.
- [9] LIU X Z, ZHENG L M, ZHANG Y Q, *et al.* Immobilization of laccase on epoxy-functionalized macroporous SiO_2 block materials. *Journal of Functional Materials*, 2014, **45**(20): 20028–20032.
- [10] MARYAM A, MEHDI M, RASHID B. Chemical amination of Rhizopus oryzae lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, **115**: 128–134.
- [11] YE L Q, ZHANG X X, XIAO B, *et al.* Design and preparation of $\text{SiO}_2/\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ antireflective coating with excellent environmental resistance. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2012, **33**(5): 897–901.
- [12] HU T, YE L Q, LI W L, *et al.* Preparation and characterization of $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2/\text{TiO}_2$ two-layer antireflective coating photo-catalyst. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2014, **30**(8): 1778–1782.
- [13] MARION M B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254.
- [14] VOORT P V D, BENJELLOUN M, VANSANT E F. Rationalization of the synthesis of SBA-16: controlling the micro- and mesoporosity. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**(35): 9027–9032.
- [15] MATEO C, TORRES R, FERNANDEZ-LORENTE G, *et al.* Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, 2003, **4**(3): 772–777.
- [16] TAKAHASHI H, LI B, SASAKI T, *et al.* Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chemistry of Materials*, 2000, **12**(11): 3301–3305.
- [17] LEI J, FAN J, YU C, *et al.* Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. *Microporous & Mesoporous Materials*, 2004, **73**(3): 121–128.
- [18] MATEO C, PALOMO J M, FERNANDEZ-LORENTE G, *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**(6): 1451–1463.
- [19] RAFAEL C R, CESAR A G, GIANDRA V, *et al.* Immobilization–stabilization of the lipase from thermomyces lanuginosus: critical role of chemical amination. *Process Biochemistry*, 2009, **44**(9): 963–968.
- [20] LAN J N, NA W, WEI Q, *et al.* Immobilization of laccase on epoxy group functionalized periodic mesoporous organosilicas. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2010, **31**(8): 1579–1584.
- [21] UPPENBERG J, HANSEN M T, PATKAR S, *et al.* The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. *Structure*, 1994, **2**: 293–308.
- [22] ZHOU G, CHEN Y, YANG S. Comparative studies on catalytic properties of immobilized Candida rugosa lipase in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009, **119**(1): 223–229.
- [23] XU K, GRIEBENOW K, KLIBANOV A M. Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56**(5): 485–491.
- [24] TANG S S, HU Y, YU D H, *et al.* Immobilization of Burkholderia Cepacia Lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Chinese Journal of Catalysis*, 2012, **33**(9): 1565–1571.
- [25] LI X L, WANG D, XU Y, *et al.* Kinetic Resolution of 2-methylbutyric acid and its ester by esterification and hydrolysis with lipases. *Chinese Journal of Catalysis*, 2009, **30**(9): 951–957.