

## 铜金属螯合载体固定糖化酶

左文刚<sup>1</sup> 黄兵<sup>1\*</sup> 侯红萍<sup>2</sup> 张萍<sup>2</sup> 谢磊磊<sup>3</sup>

(1. 昆明理工大学 环境科学与工程学院 云南 昆明 650093)

(2. 山西农业大学 食品科学与工程学院 山西 太谷 030801)

(3. 昆明聚贤环保科技有限公司 云南 昆明 650093)

**摘要:**【目的】制备出含  $\text{Cu}^{2+}$  的琼脂糖-IDA 螯合载体及其固定糖化酶工艺条件进行优化。【方法】利用金属螯合配体(IDA- $\text{Cu}^{2+}$ )与蛋白质表面供电子氨基酸相互作用的原理制备载体,采用紫外分光光度法测定不同影响因素下固定化糖化酶的酶活。【结果】 $\text{Cu}^{2+}$  的加入量和固定化过程的酸度比给酶量对固定化糖化酶的活性影响还要大,在给酶量 80 mg/g 载体、 $1.0 \times 10^{-2}$  mol  $\text{Cu}^{2+}$ /g 载体、pH 4.6 和固定化 4 h 的固定化条件下,固定化酶活为 252.1 U/g,重复使用 5 次后酶活为首次固定化酶活的 65.1%。【结论】该  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-金属螯合琼脂糖可用于淀粉水解糖化酶的优良固定化载体材料。

**关键词:** 金属螯合载体, 固定化, 糖化酶, 铜离子

## $\text{Cu}^{2+}$ immobilization of glucoamylase on metal chelating carries

ZUO Wen-Gang<sup>1</sup> HUANG Bing<sup>1\*</sup> HOU Hong-Ping<sup>2</sup>

ZHANG Ping<sup>2</sup> XIE Lei-Lei<sup>3</sup>

(1. Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650093, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

(3. Juxian Environmental Protection Science and Technology Ltd., Kunming, Yunnan 650093, China)

**Abstract: [Objective]** A chelate carrier with agarose containing  $\text{Cu}^{2+}$  iminodiacetic acid

基金项目: 山西省科技攻关基金项目(No. 041030)

\*通讯作者: ✉ kmhuangbing@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-05; 接受日期: 2012-12-18

(IDA) for hydrolysis saccharification enzyme was prepared and the fixed the glucoamylase process conditions with the chelate carrier was optimized. **[Methods]** Based on the technology of protein separation with immobilized metal ion affinity chromatography, the method for immobilization of glucoamylase has been selected, and the enzyme activity of the immobilized glucoamylase was determined using the UV spectrophotometric for research the process influencing factors. **[Results]** The optimum immobilization conditions of enzyme were as follows: enzyme load of 80 mg/g carrier,  $\text{Cu}^{2+}$  of  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/g carriers, immobilized time of 4 h, pH value of 4.6, and the activity of immobilized glucoamylase was 252.1 U/g. The activity of immobilized glucoamylase on the regenerated matrix keep 65.1% effective of the new enzyme activity after used 5 times. **[Conclusion]** The  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-agarose magnetic metal chelate can be used excellent immobilization carriers for starch hydrolysis saccharification enzyme.

**Keywords:** Metal chelating carriers, Immobilization, Glucoamylase,  $\text{Cu}^{2+}$

糖化酶 GA (Glucoamylase EC3.2.1.3)作为一种重要的生物催化剂<sup>[1]</sup>, 其重复利用性能与稳定性一直是国内外研究的热点之一。吸附法、包埋法、结合法、交联法和热处理法<sup>[2]</sup>等酶的固定化有可使酶的可逆和不可逆热失活及由变性剂引起的可逆性伸展, 或使寡聚酶离解成无活性亚基等过程降低<sup>[3]</sup>。糖化酶固定化的研究主要集中于选择与修饰载体, 以提高酶偶联量和相对活力、动力学研究等, 但是限于工艺和成本等因素, 固定化糖化酶尚未实现工业化生产<sup>[4-6]</sup>。固定化酶技术的核心问题是有一定的化学稳定性、良好的机械强度、一定的亲水性且能抵抗微生物及酸、碱作用, 同时还要能在温和条件下与酶牢固结合的载体材料的制备与选择, 以及提高固定化酶的活性等方面的研究。近年来新型功能高分子材料的不断涌现, 为固定化酶载体材料的选择提供了很大的空间<sup>[7]</sup>。Duong 等<sup>[8]</sup>研究糖化酶的活性炭固定, 阐明载体颗粒大小与酶活的关系。Celebi 等<sup>[9]</sup>用硅藻土吸附糖化酶。一些含有离子交换基团的固相载体如 DEAE-纤维素、DEAE-交联葡聚糖、离子交换树脂等也可吸附糖化酶。国内学者邱广亮等<sup>[10]</sup>用两亲性的聚乙二醇胶体粒子、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、多孔聚酯材料等也取得了良好的效果。陈雄<sup>[11]</sup>利用

明胶和海藻酸钠的聚合作用与海藻酸钙凝胶球的包埋作用制备固定化糖化酶, 得到固定化酶的稳定性提高。张剑等<sup>[12]</sup>以聚乙烯醇复合凝胶作为载体固定化糖化酶, 最终酶活达到 1 558 U/g 干胶, 酶活回收率是 30.2%。郭伟利等<sup>[13]</sup>以磁性壳聚糖微球为载体, 采用吸附-交联法固定化糖化酶。

金属螯合亲和层析(Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)是近三十年发展起来的一项分离技术<sup>[14-15]</sup>, 其原理是金属螯合配体与蛋白质表面的供电子氨基酸: 氨酸的咪唑基、半胱氨酸的巯醇基、色氨酸的吲哚基等(其中以组氨酸最为重要)以配位作用紧密结合, 达到对蛋白质进行分离和纯化的目的<sup>[16]</sup>。金属螯合载体对固定到表面的蛋白质构象影响小<sup>[17]</sup>, 而且具有配基简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强、载体可重复利用等特点, 使得金属螯合亲和层析在外源蛋白纯化中应用越来越广泛。金属螯合磁性载体含有非常活泼的亲电子离子, 可以不需连接剂活化, 能在 25 °C 左右与酶分子反应形成配位键, 在较温和的条件下使酶固定化, 减少了固定化过程中酶活力的损失。一方面载体具有亲水性可以稳定地分散于水中进行催化反应; 另一方面利用载体的磁响应性特点, 能在外加磁场下轻

易地将酶从反应体系中分离出来。这些都显示磁性金属螯合琼脂糖微球具有作为固定化酶载体材料的许多独特优越性。

本文采用两步法制备磁性微球,对微球用环氧氯丙烷和亚氨基二乙酸进行处理,使微球带上了金属离子螯合基团,制备出了铜金属螯合琼脂糖微球载体,进行糖化酶固定,通过研究固定化工艺条件,确定铜金属螯合载体固定糖化酶的最适条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

糖化酶(50 000 U/g),无锡杰能科技生物工程有限公司;亚氨基二乙酸(IDA, BBI)、自制  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流铁、琼脂糖(AR)、三氯甲烷(AR)、甲苯(AR)、环氧氯丙烷(AR)、硼氢化钠(AR)、可溶性淀粉(AR)、Span-80、DNS、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、石油醚等其他试剂均为国产分析纯。实验用水为蒸馏水, pH 4.6 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲液自制。

仪器与设备:恒温振荡器 SHA-BA,金坛市岸头国瑞实验仪器厂;722E 型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,金坛市科析仪器有限公司;电子万用炉 220 V AC1000W,天津市泰斯特仪器有限公司;SHZ-III 型循环水真空泵,上海亚荣生化仪器厂;DZF 型真空干燥箱,北京科伟永兴仪器有限公司等。

### 1.2 载体的制备和酶的固定化方法

**1.2.1 磁流体及待测酶液的制备:** (1) 磁流体。按照  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}=1.75:1.00$  的比例,分别加入 35 mL 0.5 mol/L 的  $\text{FeCl}_3$  和 20 mL 0.5 mol/L 的  $\text{FeCl}_2$  溶液于烧杯中,搅拌均匀,置于 50 °C 水浴中,快速滴入 2 mol/L 的 NaOH 溶液至 pH 10.0±0.2,液体由棕色变为黑色,升温至 80 °C 恒温保持 1 h,然后分别用蒸馏水和乙醇洗涤数次,最后将磁流体保存于 4 °C 蒸馏水中备用。

(2) 待测酶液。精确称取酶粉 0.2 g,用 pH 4.6 的醋酸缓冲液溶解,并稀释至 250 mL,用 4 层纱布过滤。

**1.2.2 载体的制备:** 磁性琼脂糖微球采用反相悬浮包埋法制备<sup>[18-19]</sup>:将 72 mL 甲苯和 28 mL 三氯甲烷混匀后加入三颈瓶,加入 1.0 mL Span-80 混匀,50 °C 水浴加热,在快速搅拌下将 6% 的琼脂糖溶液(2.5 g 琼脂糖粉溶于 25 mL  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体)缓慢加入三颈瓶中,继续快速搅拌,使琼脂糖在有机相中分散均匀,自然冷却,过滤,乙醚清洗 3 次,蒸馏水冲洗。

取 15 g 载体磁性琼脂糖微球置于 30 mL 2 mol/L 的 NaOH 溶液中,加入 10 mg 硼氢化钠,3 mL 环氧氯丙烷于 37 °C 摇床中振荡,在之后的 2 h 内陆续滴加 15 mL NaOH (2 mol/L) 和 9 mL 环氧氯丙烷,总反应时间为 24 h。反应结束后,用大量蒸馏水冲洗微球,于蒸馏水中浸泡 12 h。将充分洗涤过的载体加入到 40 mL 2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中,加入 2.5 g IDA,于 37 °C 摇床中振荡 24 h,反应结束后,以大量蒸馏水冲洗,浸泡过夜,载体保存于 4 °C 蒸馏水中备用。

取 IDA 化的琼脂糖载体加入一定量的  $\text{CuSO}_4$  溶液,室温下振荡,随后以大量蒸馏水洗涤,即得琼脂糖-IDA-Cu 螯合载体。载体形态和沙粒一样大小,小颗粒状,表面粗糙,见图 1。

**1.2.3 酶的固定化:** 取 0.05 g 螯合载体,加入 1 mL 酶液和 5 mL pH 4.6 的醋酸缓冲液,在室温振荡 5 h,然后用 pH 4.6 的缓冲液洗涤数次,直至上清中检测不到酶活。然后用缓冲液浸泡 5 min,倒去缓冲液,即得固定化的糖化酶。

### 1.3 分析测试方法和指标

酶活力:以 40 °C、pH 4.6 条件下,每小时水解淀粉产生 1 mg 葡萄糖作为一个酶活力单位。

酶活测定:采用比色法,配制  $1 \times 10^3$  mg/L 标准溶液于 722E 型分光光度计 0.5 cm 比色皿,

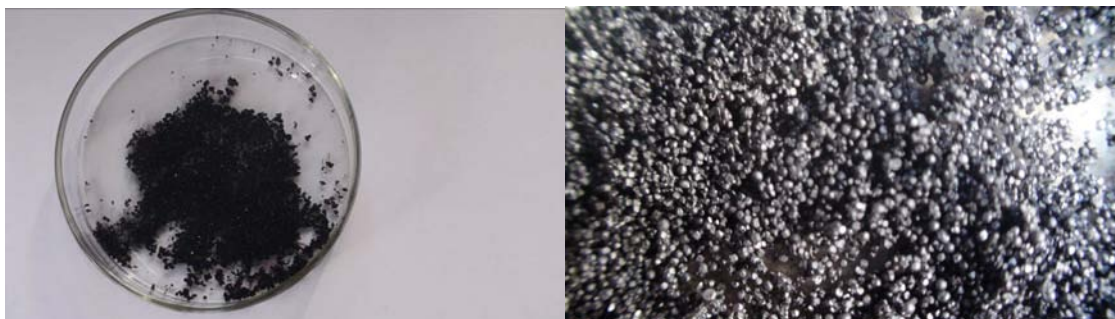


图1 螯合载体形态照片  
Fig. 1 Chelating carriers photos

550 nm 比色。标准曲线:  $OD=1.133 \ 1x$  ( $x$  为葡萄糖浓度)  $-0.017 \ 6$ ,  $R^2=0.995 \ 1$ , 求出  $k$  倾斜率  $k$  值<sup>[20]</sup>。

游离酶活力测定<sup>[17]</sup>: 在 25 mL 磨口塞试管中, 加入于 40 °C 水浴中预热 3–5 min 的 2% 可溶性淀粉 9.8 mL, 加入稀释一定倍数的酶液 0.2 mL, 准确反应 20 min, 立刻取出 0.5 mL 移入预先吸有 1.5 mL DNS 液的比色管中, 开水煮沸 15 min, 冷却后加 10.5 mL 蒸馏水, 摇匀, 比色测定, 条件与标准曲线一致。空白用高温灭活酶液。酶活力用如下公式计算:

$$\text{酶活力} = OD \times n \times k \times 5 \times 20 \times 3. \quad (1)$$

式中:  $OD$ : 吸光度; 5: 将 0.2 mL 酶液换算成 1 mL 酶液;  $k$ : 比色常数;  $n$ : 酶稀释倍数; 20: 将 0.5 mL 反应液换算成 10 mL; 3: 将 20 min 按换算成 1 h。

固定化酶活力的测定<sup>[21]</sup>: 在 0.05 g 固定化酶中加入 5 mL 0.2 mol/L 醋酸缓冲液浸泡 10 min 后倒出浸泡液, 按照上述方法测得固定化酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化酶的制备

**2.1.1 固定化载体的铜改性:** 取 IDA 化的载体 (琼脂糖-IDA-Cu 螯合载体), 改变加入  $\text{Cu}^{2+}$  的量 ( $0.5 \times 10^{-2}$ – $2.5 \times 10^{-2}$  mol/g 载体), 制备吸附不同  $\text{Cu}^{2+}$  量的螯合载体, 再以此金属螯合载体固定糖化酶, 测其酶活, 结果见图 2。

从图 2 可见, 适当添加  $\text{Cu}^{2+}$  对固定化载体 (IDA) 进行改性是有效的, 随着加入  $\text{Cu}^{2+}$  量对 IDA 化载体改性, 固定化酶的酶活先升高后降低。当  $\text{Cu}^{2+}$ : 载体  $< 1.0 \times 10^{-2}$  mol/g 时, 酶活随给  $\text{Cu}^{2+}$  量的增加而增加, 这是因为琼脂糖-IDA 只有在结合了  $\text{Cu}^{2+}$  后才能以配位作用固定酶, 随给  $\text{Cu}^{2+}$  量的增加载体表面糖化酶的位点增多, 导致结合的酶量增加而引起酶活上升; 当  $\text{Cu}^{2+}$ : 载体  $> 1.0 \times 10^{-2}$  mol/g 时, 载体表面的 IDA 逐渐被  $\text{Cu}^{2+}$  饱和和至过饱和, 载体结合的酶量达到并稳定在最大值, 但被琼脂糖-IDA 载体过量吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的酶在随后的反应过程中,  $\text{Cu}^{2+}$  可能溢出至溶液中抑制了糖化酶的活性, 所以在  $\text{Cu}^{2+}$ : 载体  $> 1.0 \times 10^{-2}$  mol/g 时, 固定化酶活随给  $\text{Cu}^{2+}$  量的增加而减少。在以后的实验中, 加入的量为  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/g  $\text{Cu}^{2+}$  载体, 这

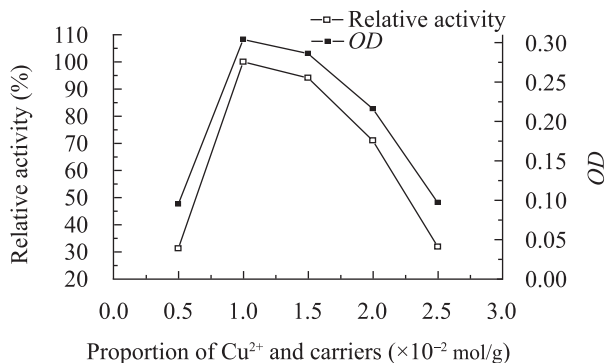


图2  $\text{Cu}^{2+}$  的添加量与固定化酶活的关系  
Fig. 2 Influence of different proportion of  $\text{Cu}^{2+}$  and carriers on relative activity

样可以保证载酶量又可以消除  $\text{Cu}^{2+}$  对酶的抑制作用。

**2.1.2 固定化时间的影响:** 取金属螯合载体 ( $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/g Cu}^{2+}$ ), 加入糖化酶溶液, 测定不同反应时间固定化酶活, 结果如图 3 所示。

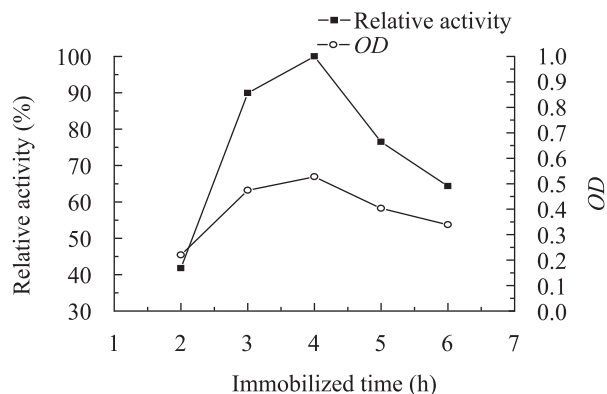


图 3 固定化时间对酶活的影响

Fig. 3 Effect of immobilized time on relative activity

图 3 表明固定化酶的活力随固定化时间的延长先增加后减少, 在 4 h 达到最大值, 然后开始有下降的趋势。这是因为随着反应时间的增加, 载体结合的酶量增大, 酶活逐渐升高, 当结合的酶量达到饱和时, 酶活最高, 继续增加反应时间, 由于载体上酶量的继续增多而使酶分子相对集中, 空间位阻增大, 影响酶与底物的有效接触以及产物在溶液中扩散而使固定化酶活下降。

**2.1.3 固定化液酸度对固定化酶活的影响:** 在  $\text{Cu}^{2+}$  为  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/g}$ 、不同酸度(pH 3.6–6.6)的醋酸缓冲液中固定化 4 h, 制备固定化酶, 研究缓冲液的 pH 与固定化酶相对活力的关系, 结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出, 固定化酶活随 pH 的增大而增加, 在 pH 5.6 时饱和。根据价键理论, 蛋白质与金属的螯合是通过蛋白质表面的氨基酸上给电子原子(组氨酸的 N 原子)的孤对电子与金属离子上的空杂化轨道结合形成的, 而氢原子也可以

提供空轨道, 因此会与金属离子竞争蛋白质表面的孤对电子, pH 越低(氢离子浓度越高), 它的这种竞争就越强烈, 所以随着 pH 的减小, 固定化酶活也降低, 在 pH 超过 5.6 后, 可能由于 pH 过高会使糖化酶损失部分酶活。

**2.1.4 给酶量对固定化酶的影响:** 在  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/g Cu}^{2+}$ 、固定化时间 4 h、pH 5.6 的条件下, 取金属螯合载体, 通过改变添加酶液的量得到不同给酶量的固定化酶, 测定固定化酶活, 结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 随着给酶量的增大, 固定化酶活在给酶量为 60 mg/g 时达到最大值, 此时载体上金属螯合配体结合位点基本饱和, 再继续增加给酶量, 载体上结合的酶分子增多, 酶与载体的亲和力降低, 影响酶与载体的结合, 导致酶活的下降。

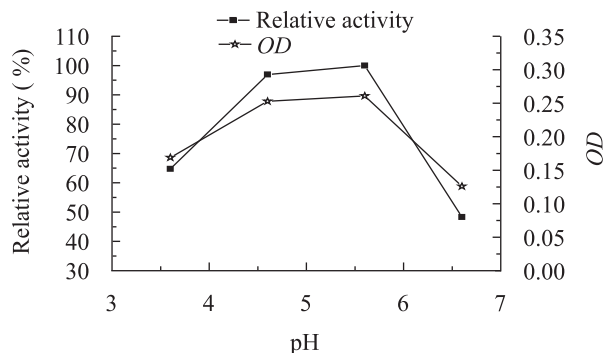


图 4 固定化反应介质 pH 对固定化酶活的影响

Fig. 4 Effect of pH on relative activity

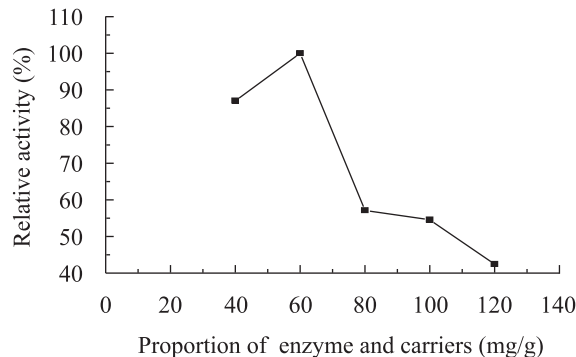


图 5 给酶量与固定化相对酶活的关系

Fig. 5 Effect of the ratio of enzyme and carriers on relative activity

2.2 固定化酶影响因素及工艺条件优化

在单因素试验基础上对影响固定化酶的 4 个主要因素做正交试验, 得出其最佳组合, 因素水平如表 1 所示, 结果如表 2 所示。

通过极差分析, 各因素影响固定化酶活主次顺序是: 固定化的酸度>螯合剂  $\text{Cu}^{2+}$  的添加量>给

酶量>固定化时间。其中固定化溶液的酸度和  $\text{Cu}^{2+}$  的添加量为重要因素,  $\text{Cu}^{2+}$  的添加量直接关系到酶固定化的量。综合单因素试验, 最后得出最佳组合为  $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_1\text{D}_2$ , 即  $\text{Cu}^{2+}$  为  $1.0\times 10^{-2}\text{ mol/g}$  载体、固定化时间 4 h、固定化液的 pH 4.6、给酶量 80 mg/g 载体, 固定化酶活为 252.1 U/g。

表 1 正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	添加 $\text{Cu}^{2+}$ 的量 Proportion of $\text{Cu}^{2+}$ and carrier (mol/g)	固定化时间 Immobilized time (h)	pH	给酶量 Proportion of enzyme and carriers (mg/g)
1	$0.5\times 10^{-2}$	3	4.6	60
2	$1.0\times 10^{-2}$	4	5.6	80
3	$1.5\times 10^{-2}$	5	6.6	100

表 2 正交试验结果  
Table 2 Results of orthogonal test

试验号 Test number	添加 $\text{Cu}^{2+}$ 的量 Proportion of $\text{Cu}^{2+}$ and carriers (mol/g)	固定化时间 Immobilized time (h)	pH	给酶量 Proportion of enzyme and carriers (mg/g)	酶活 Enzyme activity (U/g)
First	1	1	1	1	174.7
Second	1	2	2	2	87.9
Third	1	3	3	3	94.3
Fourth	2	1	2	3	137.7
Fifth	2	2	3	1	175.8
Sixth	2	3	1	2	252.1
Seventh	3	1	3	2	131.3
Eighth	3	2	1	3	185.3
Ninth	3	3	2	1	116.5
$K_1$	356.9	443.7	612.1	467.0	
$K_2$	565.6	449.0	342.1	471.3	
$K_3$	433.1	462.9	401.4	417.3	
$\overline{K}_1$	119.0	147.9	204.0	155.7	
$\overline{K}_2$	188.5	149.7	114.0	157.1	
$\overline{K}_3$	144.4	154.3	133.8	139.1	
$R$	69.5	6.4	90.0	18.0	

注:  $K_i$ : 同一水平之和;  $\overline{K}_i$ : 各因素同一水平的平均值;  $R$ : 各因素的极差。

Note:  $K_i$ : The sum of the level of experimental results;  $\overline{K}_i$ : The average value of  $K$ ;  $R$ : The range.

### 2.3 固定化酶的重复利用

从表 3 可以看出,在正交试验得出的最适条件下制备固定化酶,重复使用 5 次后酶活为首次固定化酶活的 65.1%,说明载体的重复利用性较好,使用寿命较长。

表 3 固定化酶重复利用与固定化酶活力的关系  
Table 3 The relationship of immobilized enzyme for repeated use and immobilized enzyme activity

重复使用次数 Number of cycles	相对酶活 Relative activity (%)
First	100.0
Second	94.2
Third	83.1
Fourth	75.6
Fifth	65.1

## 3 结论

利用磁性琼脂糖微球表面的亚氨基二乙酸(IDA)螯合  $\text{Cu}^{2+}$  得到铜金属改性的螯合载体,当将其用于固定糖化酶时,可与糖化酶稳定结合。 $\text{Cu}^{2+}$  的加入量和 pH 对酶活的影响较大,在较优的条件下制得铜金属螯合载体固定糖化酶,其活性可达 252.1 U/g,重复使用 5 次后酶活为首次固定化酶活的 65.1%,说明铜金属螯合琼脂糖微球能作为优良固定化酶载体材料。

## 参 考 文 献

- [1] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 科技出版社, 2004: 179-198.
- [2] 彭志英. 食品酶学导论[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 182-189.
- [3] Cheng Z, Kong W, Zhou H, et al. The study of immobilized glucoamylase to grafted starch carrier[J]. Chinese Biochemical Journal, 1995, 11(2): 150-154.
- [4] 薛胜平, 闫洪波, 张瑞平, 等. 蛋白质与酶工程精品课程的建设[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1579-1583.
- [5] 唐文竹, 陈放, 李宪臻. 蔗糖异构酶催化生产异

- 麦芽酮糖研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1314-1322.
- [6] 朱文优, 王新惠, 张超. 糖化酶的结构及催化机制的研究进展[J]. 酿酒, 2009, 36(1): 21-23.
- [7] 袁定重, 张秋禹, 侯振宇, 等. 固定化酶载体材料的最新研究进展[J]. 材料导报, 2006, 20(1): 69-72.
- [8] Duong DD, Douglas SC, James EB. Modeling enzyme immobilization in porous solid supports[J]. Biotechnology and Bioengineering 1982, 24(7): 1527-1546.
- [9] Celebi SS, Tsai GJ, Tsao GT. Characterization of glucoamylase immobilized on celite[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991(27): 163-171.
- [10] 邱广亮, 栗淑媛, 郝翠秀, 等. 磁性聚乙二醇载体固定  $\alpha$  淀粉酶的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(2): 240-242.
- [11] 陈雄. 固定化糖化酶的研究[J]. 中国酿造, 2001(2): 19-20, 44.
- [12] 周剑平, 龚伟中, 魏甲乾, 等. 聚乙烯醇复合凝胶固定化糖化酶研究[J]. 微生物学通报, 2003 30(3): 10-13.
- [13] 郭伟利, 侯红萍. 磁性壳聚糖微球固定化糖化酶的研究[J]. 酿酒科技, 2010(3): 17-19.
- [14] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelating affinity chromatography, a new approach to protein fractionation[J]. Nature, 1975(258): 498-499.
- [15] Ueda EM, Gout PW, Morganti L. Current and prospective application of metal ion protein fractionation[J]. Nature, 1975(258): 598-599.
- [16] Zhang CM, Reslewic SA, Glatz CE. Suitability of immobilized metal affinity chromatography for protein purification from canola[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(1): 52-58.
- [17] Schmid EL, Keller TA, Dienes Z, et al. Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces[J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(11): 1979-1985.
- [18] 刘琳琳, 曾力希, 刘婷, 等. 金属螯合载体定向固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5): 789-793.
- [19] 刘琳琳. 金属螯合载体的制备及其用于固定化酶的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2006.
- [20] 左文刚. 金属螯合载体固定糖化酶的研究[D]. 晋中: 山西农业大学学士学位论文, 2010.
- [21] 孙淑琴, 邵冬梅. 比色法快速测定糖化酶活力新方法[J]. 河北省科学院学报, 1997(2): 35-40.