

大尺寸 SiO₂ 大孔材料固定化漆酶

张 群 张育淇 刘晓贞 梁云霄* 张瑞丰 龙能兵

(新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地,
宁波大学材料科学与化学工程学院, 宁波 315211)

摘要: 以表面固定 Cu²⁺ 的改性大尺寸 SiO₂ 大孔材料作为载体, 考察了时间、pH 和给酶量对漆酶固定化效果的影响, 并对固定化漆酶的活性和稳定性进行了研究。结果表明: 5 h 时吸附达到平衡, pH 为 4.5、漆酶与载体比例为 5 mg·g⁻¹ 时固定化效果最好, 酶活回收率可达到 100.4%; 固定化漆酶的最适 pH 和最适温度较游离漆酶的均有升高且范围变宽, 固定化后, 漆酶的 pH 稳定性和热稳定性都得到显著提高; 固定化漆酶的 K_m 值略高于游离漆酶的; 固定化漆酶具有良好的操作稳定性, 与底物反应反复操作 10 批次后剩余酶活为 72.7%。

关键词: 漆酶; 固定化; 大尺寸; SiO₂ 大孔材料

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2013)10-2065-06

DOI: 10.3969/j.issn.1001-4861.2013.00.324

Immobilization of Laccase on Large-Sized SiO₂ Macroporous Materials

ZHANG Qun ZHANG Yu-Qi LIU Xiao-Zhen

LIANG Yun-Xiao* ZHANG Rui-Feng LONG Neng-Bing

(State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science,

Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract: A large-sized SiO₂ macroporous material modified by fixing Cu²⁺ on its surface was employed as the support for the immobilization of laccase. The effects of immobilization time, pH value and the amount of enzyme provided on the immobilization were investigated, and the activity and stability of the immobilized enzyme were also studied. The results show that the adsorption equilibrium is reached after about 5 hours. The optimum conditions for immobilization of laccase were at the immobilization pH of 4.5 and the ratio of enzyme to support of 5 mg·g⁻¹, and in this case, the activity recovery of the immobilized laccase is 100.4%. Comparing with the free laccase, both the optimum working pH and temperature of the immobilized laccase are higher and the ranges are wider. The experiments show that the immobilization improves the pH stability and the thermal stability of laccase significantly. The K_m of the immobilized laccase is higher than the free laccase's. The immobilized laccase has good operational stability, the remained activity is 72.7% after 10 times of reaction with the substrate.

Key words: laccase; immobilization; large-sized; SiO₂ macroporous material

收稿日期: 2013-04-22。收修改稿日期: 2013-05-29。

浙江省自然科学基金(No. LY12B01004), 宁波市社会发展项目(No. 2011C50052), 宁波大学王宽诚幸福基金(No. XKL072), 先进能源材料化学教育部重点实验室(南开大学)开放课题(No. KLAEMC-OP201201)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: liangyunxiao@nbu.edu.cn, Tel: 0574 87600874

漆酶(Laccase, E.C.1.10.3.2)是一种含铜多酚氧化酶,广泛存在于多种菌体和一些植物体内,它具有广泛的底物专一性,在废水处理、生物传感器构建、生物制浆、食品加工以及有机合成等方面有重要应用价值^[1-2]。但纯漆酶生产成本低、在使用过程中易随环境的变化变性失活、易溶于水、难以回收,限制了其在工业上的应用。对漆酶进行固定化是实现其重复利用、改善其稳定性的有效方法。近年来国际上对漆酶的固定化进行了较为广泛的研究^[3-11],使用的载体包括壳聚糖、亲水性微滤膜、SiO₂ 纳米颗粒、磁性介孔 SiO₂ 和介孔碳等多种材料。介孔材料由于具有比表面积大、吸附容量大、容易进行表面修饰等特点在固定化酶方面表现出了一些优势。

Pandya 等^[12]研究 α -淀粉酶在介孔 SiO₂ 上固定化时发现,介孔材料 SBA-15 和 MCM-41 对酶的固定主要在载体外表面,固定化酶比活力很低,而孔径大的介孔材料 MCF 可以将酶固定到孔内,提高了单位载体上酶的固载量,因而提高了比活力。酶是大分子,如果载体孔径小,将会影响酶在固定化过程和固定化酶催化反应时底物与酶间的传质。以大孔材料作为载体,则可以加快固定化过程的速度,提高底物和酶之间的传质速度,提高反应效率,但目前这方面的研究很少^[13]。由此可见,研制新型、经济的大孔载体,根据载体和酶的结构和性质研发高效的固定化技术以提高固定化酶的效率,将是今后研究中需要解决的核心问题。

本课题组在前期工作中制备了一种新型 SiO₂ 大孔材料,它由二氧化硅超薄膜构成,比表面积可达 130 m²·g⁻¹、空隙率 93%^[14-16]。由于简单的物理吸附法对酶的作用力较弱导致酶容易脱落^[17],本文利用该大孔材料机械强度高、水热稳定性好的特点,先在水热条件下用铝酸钠对其进行表面改性,再经离子交换得到表面固定 Cu²⁺ 的改性大孔材料。采用这种表面改性方法是基于以下考虑:(1) Cu²⁺ 对漆酶具有激活作用^[1],有可能提高固定化漆酶的催化活性;(2) 通过 Cu²⁺ 与漆酶的静电和配位作用(Cu²⁺ 与漆酶的氨基酸残基)可以提高漆酶的固载量和稳定性。纯漆酶价格昂贵,从实际应用方面考虑,我们以表面固定 Cu²⁺ 的大孔材料为载体研究了其对粗漆酶的固定化条件并考察了固定化前后漆酶的性质。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

S-4800 场发射扫描电子显微镜(SEM), Optima2100DV 电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP),

T6 新世纪紫外-可见分光光度计。2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS, UP, 西安热默尔生物科技有限公司),牛血清白蛋白(BIOSHARP 公司),考马斯亮蓝 G250(BS, 上海强顺化学试剂有限公司),成品粗漆酶(北京华迈科),其它试剂均为分析纯。

1.2 SiO₂ 大孔材料的制备

称取 18.0 g 聚乙二醇 1000、14.0 g 聚乙二醇 2000 和 16.0 g 环氧树脂混合加热熔化,在强烈搅拌下迅速加入 4.0 g 二乙烯三胺,将反应液体倒入聚四氟乙烯模具中,在 70 °C 固化反应 3 h。澄清溶液经相分离过程变成乳白色固体,取出后用水浸泡、反复洗涤除去聚乙二醇,常温下干燥,得到的白色固体即具有三维骨架结构的多孔聚合物。将上述聚合物模板于 60 °C 下干燥 2 h,置于正硅酸四乙酯中浸泡 3 h,然后于 50 °C 下在 NH₃·H₂O 气氛中放置 12 h,使正硅酸四乙酯充分水解转化为 SiO₂,将得到的复合物先在 60 °C 下干燥 2 h 去除反应生成的乙醇及吸附的 NH₃·H₂O,然后置于马弗炉中以 5 °C·min⁻¹ 的升温速度,煅烧至 820 °C 并维持 30 min,去除聚合物模板后即得与聚合物模板外形、尺寸一样的整体型 SiO₂ 大孔材料^[14-16]。

1.3 载体的制备

将上述制备好的 SiO₂ 大孔材料(长 10 cm、宽 3 cm、厚 0.3 cm)切割成长和宽为 0.3~0.4 cm 的块状。称取 1 g 块状 SiO₂ 大孔材料于 80 °C 下干燥 2 h,置于含 50 mL、0.3 mol·L⁻¹ 铝酸钠溶液的水热反应釜聚四氟乙烯内衬中,在 120 °C 下反应 12 h,自然冷却后,取出大孔材料,用去离子水反复冲洗,干燥后得到铝酸钠改性的 SiO₂ 大孔材料(Al-SiO₂)^[18]。将 Al-SiO₂ 浸入 0.5 mol·L⁻¹ 的 Cu(Ac)₂ 溶液、在转速为 50 r·min⁻¹ 的摇床中振荡 5 h,将大孔材料用 8~10 目的筛网滤出后,每次用一定体积的去离子水反复冲洗,将冲洗液与 Cu(Ac)₂ 溶液合并、稀释一定倍数,用 ICP 测定 Cu²⁺ 的含量、计算固载量,大孔材料干燥后即得表面固定 Cu²⁺ 的载体(Cu²⁺-Al-SiO₂)。

1.4 漆酶的固定化

取 0.1 g Cu²⁺-Al-SiO₂ 置于 5 mL 用缓冲溶液配置的漆酶溶液中,在 25 °C、转速为 50 r·min⁻¹ 的摇床中振荡一定时间,将大孔材料用 8~10 目的筛网滤出后,用缓冲液洗涤至上清液中检测不到漆酶,即得到固定化漆酶。用 Bradford 法^[19]对漆酶固载量进行测定。pH $\geq$ 4 时,用 HAc-NaAc 缓冲液;pH<4 时,在 HAc-NaAc 缓冲液中加稀盐酸调节。

1.5 漆酶性质的测定

用紫外-可见分光光度法,以 ABTS 为底物测定

漆酶的活性。定义 1 min 使 1 μmol 的 ABTS 氧化所需的酶量为 1 个酶活单位。

漆酶活性测定:取一定量漆酶,加入相应 pH 的缓冲液 6 mL 和 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 3 mL 进行反应,6 min 后冰浴停止反应,测上清液在 420 nm 处的吸光度值。式(1)、(2)分别为漆酶酶活(Enzyme activity)和固定化漆酶的酶活回收率(Enzyme activity recovery)计算公式:

$$\text{Enzyme activity}(\text{U}\cdot\text{g}^{-1})=\frac{\Delta A\times V_{\text{总}}\times 10^6}{\Delta t\times M\times \varepsilon} \quad (1)$$

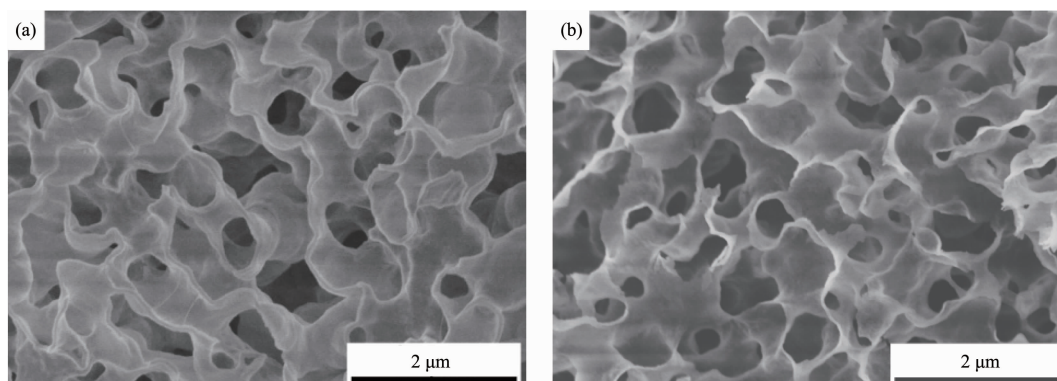
$$\text{Enzyme activity recovery}(\%)=\frac{A_1}{A_2}\times 100\% \quad (2)$$

式中: Δt 为反应时间 (min); ΔA 为 Δt 时间内溶液在 420 nm 的吸光度变化; $V_{\text{总}}$ 为反应体系体积 (mL); ε 为 ABTS 在 420 nm 处的摩尔消光系数 ($36\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); M 为加入反应体系中漆酶的质量 (g); A_1 为固定化漆酶的酶活 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$); A_2 为与固定化漆酶等量的自由漆酶的酶活 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)。

2 结果与讨论

2.1 大孔材料的表征

SiO₂ 大孔材料和铝酸钠改性后 SiO₂ 大孔材料(Al-SiO₂)的 SEM 图分别如图 1(a)和(b)所示。从图中可以看出,大孔材料由二氧化硅薄膜构成,在孔径为 300~500 nm 和 1~2 μm 有两套虫洞一样的孔道,孔道相互贯通;用铝酸钠进行表面改性时,通过控制水热反应温度、反应时间和铝酸钠浓度可保持大孔材料的骨架结构完好,孔道不被破坏^[18]。经 ICP 分析测定,计算得 Al-SiO₂ 对 Cu²⁺ 的固载量为 $64.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。



(a) SiO₂; (b) SiO₂ modified by sodium aluminate

图 1 大孔材料的 SEM 图

Fig.1 SEM images of macroporous materials

2.2 漆酶的固定化条件

2.2.1 固定化时间选择

用 Bradford 法测得粗漆酶的蛋白含量为 10.0%,以下漆酶浓度均表示溶液中的蛋白含量。分别称取 6 份 Cu²⁺-Al-SiO₂、每份 0.1 g,置于 pH=7、漆酶浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液中,测定不同振荡时间下漆酶的固载量,得漆酶的固载量随时间变化曲线如图 2 所示。由图 2 可知,初始阶段,漆酶的固定量随时间逐渐增加,5 h 后基本不随时间变化,所以本实验确定漆酶的最佳固定化时间为 5 h。

2.2.2 pH 对漆酶固定化的影响

在不同 pH 下、漆酶浓度均为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,测定漆酶的活力回收率和固载量随 pH 的变化曲线,如图 3 所示。在吸附法中,通常认为载体表面的带电性质和酶分子的带电性质决定了两者之间作用力的大小,而 pH 影响着两者的带电情况。由图 3 可以看出,随着

pH 的增大,漆酶固载量逐渐增加。这是由于 SiO₂ 大孔材料用铝酸钠改性后表面带负电荷,再经过 Cu²⁺ 交换 Na⁺ 后表面带正电荷,当 pH 小于漆酶的等电点(本文所

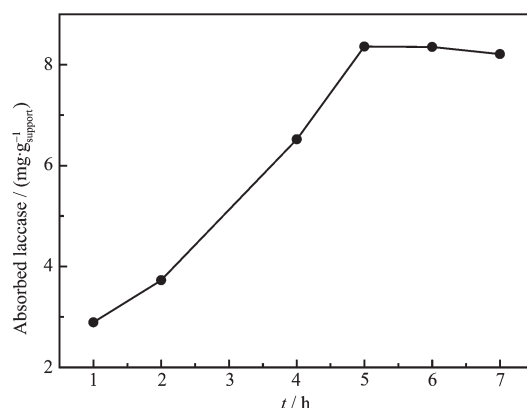


图 2 时间对漆酶固定化的影响

Fig.2 Effect of adsorption time on the immobilization of laccase

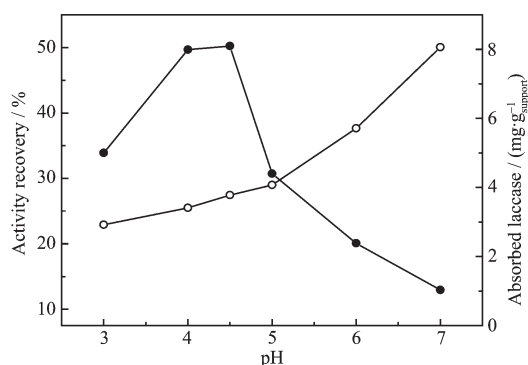


图 3 pH 对漆酶固定化的影响

Fig.3 Effect of pH on the immobilization of laccase

用云芝漆酶的 $pI \approx 3.5^{[9]}$ 时,酶分子与载体相互排斥,当 pH 大于漆酶的等电点时,则变为相互吸引,而且漆酶分子表面的组氨酸残基可以与 Cu^{2+} 通过配位作用进一步增强酶分子与载体的结合力。但是,酶的活力回收率并不随 pH 的增大而单调增大,当 pH 为 4.5 时,酶活回收率达到最大。当溶液 pH 高出一定范围后,酶的微观结构会发生变化,从而引起酶的失活。

2.2.3 给酶量对漆酶固定化的影响

固定化时间为 5 h,溶液 pH 为 4.5 时,给酶量对漆酶固定化的影响见图 4。随着给酶量的增加,漆酶固载量逐渐增加,但酶活回收率在酶液浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时已达到最大值。当酶液浓度较大时,会造成酶分子相互聚集,导致酶分子的活性中心相互遮盖,致使酶的活性降低。漆酶的固载量和酶活回收率随给酶量的这种变化趋势与磁性介孔材料固定化漆酶^[9-10]的情况类似。酶活回收率的最大值为 100.4%,高于文献报道的其它载体固定化漆酶的酶活回收率(见表 1^[9,20-23])。酶活回收率较高有以下几种原因:(1) Cu^{2+} 是漆酶的激活剂^[1],载体表面的 Cu^{2+} 很容易与漆酶表面的组氨酸残基结合,对漆酶产生激活作用^[9];(2) 载体的孔径比酶分子直径大得多,酶分子在载体孔道内易保持天然构象、具有高催化活性;(3) 以大孔材料作为

载体,催化底物反应时传质阻力小,提高了底物和酶之间的传质速度,提高了反应效率;(4) 采用物理吸附法,避免了化学结合法造成的酶活损失。酶活回收率最大时,固定化漆酶的酶活为 $59.2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,高于一些用纯漆酶制备的固定化漆酶的酶活^[23-24]。

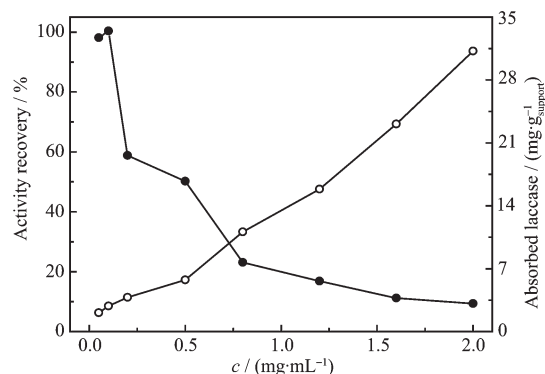


图 4 给酶量对漆酶固定化的影响

Fig.4 Effect of the amount of enzyme on immobilization of laccase

2.3 固定化漆酶的性质

2.3.1 固定化漆酶的最适 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 下及在不同 pH 的缓冲液中保存 2 h 后测定酶的活力,结果如图 5 和图 6 所示。由图 5 可

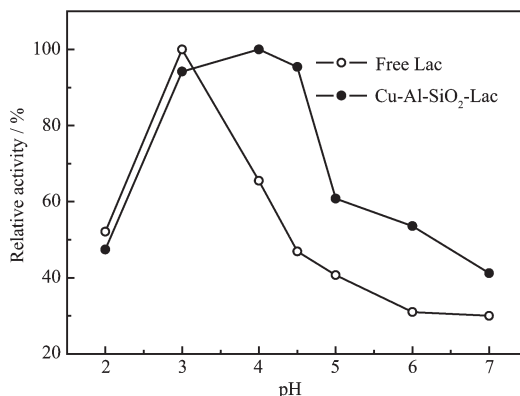


图 5 pH 对游离漆酶和固定化漆酶活性的影响

Fig.5 Effect of pH on the activities of free and immobilized laccase

表 1 不同载体固定化漆酶活力回收率比较

Table 1 Comparison of the activity recovery of laccase immobilized on different supports

Immobilization support	Activity recovery / %	References
MMSNPs	81.5	[9]
MMSNPs-CPTS-IDA- Cu^{2+}	92.5	[9]
Poly(GMA/EGDMA) beads	88	[20]
Chitosan	52	[21]
Magnetic polymer microspheres	68	[22]
Magnetic mesoporous silica spheres	79.4	[23]
Cu^{2+} -Al-SiO ₂	100.4	This study

以看出,游离漆酶的最适 pH 为 3,固定化漆酶的最适 pH 为 4,较游离漆酶的最适 pH 略有上升且适宜范围变宽。由图 6 可以看出,固定化漆酶的 pH 稳定性明显优于游离漆酶,当 pH 在 3~6 之间时,固定化漆酶的相对酶活均保持在 80% 以上。

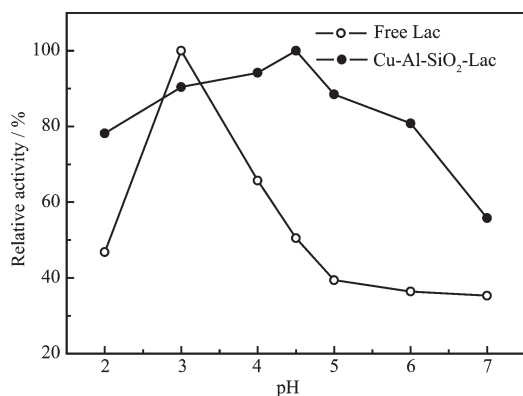


图 6 游离漆酶和固定化漆酶的 pH 稳定性

Fig.6 pH stabilities of free and immobilized laccase

2.3.2 固定化漆酶的热稳定性及最适温度

在不同温度下以及在不同温度下保温 2 h 后测定酶的活力,结果如图 7 和图 8 所示。可见,游离漆酶和固定化漆酶的最适温度分别为 30 °C 和 40 °C;但固定化漆酶的热稳定性明显高于游离漆酶。游离漆酶在 70 °C 保温 2 h 后剩余酶活降到 45% 以下,而固定化漆酶剩余酶活保持在 75% 以上。酶的变性通常是三级结构改变、高温下某些不稳定性基团氧化或蛋白质的其他物理变化的结果。在一些条件下,固定化作用可通过增加分子的刚性来增加酶的热稳定性,避免因加热而导致分子的三级结构改变^[25]。

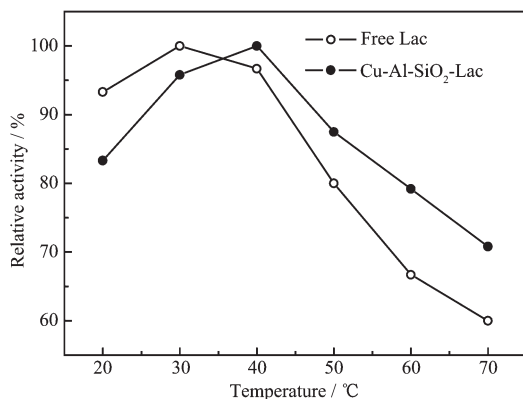


图 7 反应温度对游离漆酶和固定化漆酶活性的影响

Fig.7 Effect of temperature on the activities of free and immobilized laccase

2.3.3 固定化漆酶的操作稳定性

游离漆酶由于难以从体系中分离,因此不具有可重复操作的性质。固定化漆酶与底物在室温下反复反

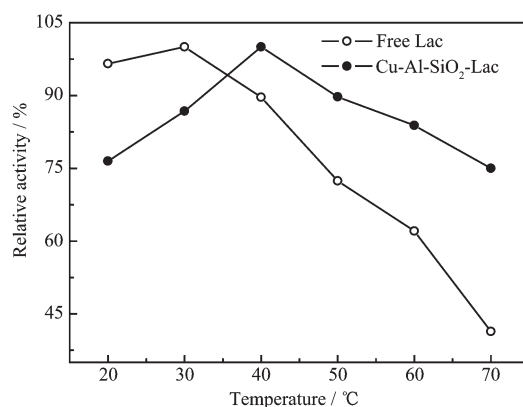


图 8 游离漆酶和固定化漆酶的热稳定性

Fig.8 Thermal stabilities of free and immobilized laccase

应 10 批次的结果如图 9 所示。经过 4 个批次反应后,酶活损失相对较大,剩余酶活约为原来的 81.8%,可能是在催化底物反应过程中某些与载体结合较弱的漆酶分子脱落所致,但接下来的反应批次剩余酶活变化不大,8~10 批次反应后漆酶活性几乎无变化,剩余酶活约为初始酶活的 72.7%。固定化漆酶具有良好的操作稳定性,可重复使用。除与载体的静电作用外,由于漆酶分子表面含有丰富的组氨酸残基,通过这种组氨酸残基与 Cu^{2+} 的作用,漆酶分子与载体表面有较强的亲和力^[26],因此采用金属亲和法固定化漆酶可获得良好的操作稳定性。

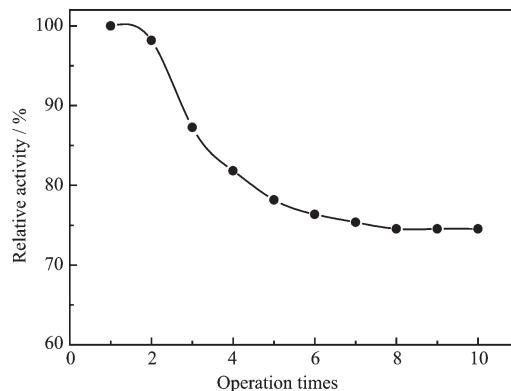


图 9 固定化漆酶的操作稳定性

Fig.9 Operational stability of immobilized laccase

2.3.4 动力学常数

配置不同浓度的 ABTS 作为底物,在 420 nm 处测定游离漆酶和固定化漆酶反应前后的吸光度变化,计算酶反应的初速度。以底物浓度的倒数 $1/c_s$ 作为横坐标,酶反应初速度的倒数 $1/v$ 为纵坐标,作 Lineweaver Burk 双倒数图如图 10,由双倒数法求得游离漆酶和固定化漆酶的米氏常数 K_m 分别为 $0.045 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.074 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。固定化漆酶的米氏常数增

大说明其较自由漆酶的亲和力降低了,这是由于自由漆酶能够与底物充分接触,而固定化漆酶在与底物接触时要经过一个扩散过程所致。

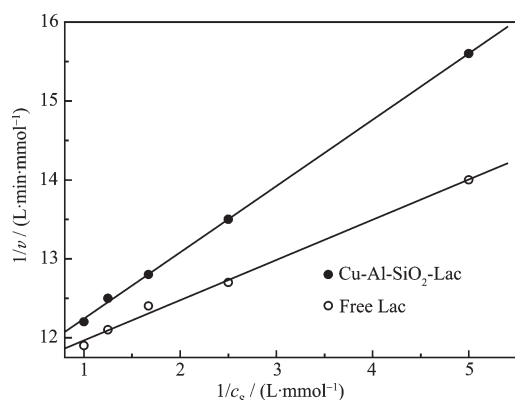


图10 漆酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.10 Lineweaver-Burk plots of free and immobilized laccase

3 结 论

在水热条件下用铝酸钠对大尺寸 SiO₂ 大孔材料进行表面改性,再经离子交换得到表面固定 Cu²⁺的大孔材料,研究了其对粗漆酶的固定化条件和固定化前后漆酶的性质。实验结果表明:5 h 时载体对漆酶的吸附达到平衡,在 pH 为 4.5、漆酶与载体质量比为 5 mg·g⁻¹ 时酶活回收率最高,达到 100.4%;与游离漆酶相比,固定化漆酶的 pH 稳定性和热稳定性得到明显改善,并具有良好的操作稳定性。因此,该大尺寸 SiO₂ 大孔材料可作为固定化漆酶的优良载体,直接利用粗漆酶进行固定化、易于从体系中分离等特点大大降低了漆酶的使用成本,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] LI Yang(李阳), JIANG Guo-Xiang(蒋国翔), NIU Jun-Feng(牛军峰), et al. *Prog. Chem.(Huaxue Jinzhan)*, **2009**,**21**(10): 2028-2036
- [2] LAI Chao-Feng(赖超凤), LI Shuang(李爽), PENG Li-Li(彭丽丽), et al. *Chem. Ind. Eng. Prog.(Huagong Jinzhan)*, **2010**, **29**(7):1300-1308
- [3] Demarche P, Junghanns C, Nair R R, et al. *Biotechnol. Adv.*, **2012**,**30**:933-953
- [4] Bayramoglu G, Yilmaz M, Arica M Y. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2010**,**33**:439-448
- [5] Karagoz B, Bayramoglu G, Altintas B, et al. *Bioresour. Technol.*, **2011**,**102**:6783-6790
- [6] Labus K, Gancarz I, Bryjak J. *Mater. Sci. Eng. C*, **2012**,**32**: 228-235
- [7] Wang Y, Zhang D, He F R, et al. *Chin. Chem. Lett.*, **2012**, **23**:197-200
- [8] Lloret L, Hollmann F, Eibes G, et al. *Biodegradation*, **2012**, **23**:373-386
- [9] Wang F, Guo C, Yang L R, et al. *Bioresour. Technol.*, **2010**, **101**:8931-8935
- [10] Liu Y Y, Zeng Z T, Zeng G M. *Bioresour. Technol.*, **2012**, **115**:21-26
- [11] WANG Lei(王磊), CHEN Cheng(陈诚), TIAN Mei-Juan(田美娟), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2013**,**29**(4):677-688
- [12] Pandya P H, Jasra R V, Newalkar B L, et al. *Microporous. Mesoporous. Mater.*, **2005**,**77**:67-77
- [13] CAI Hong-Ju(蔡宏举), WANG Man-Yi(王满意), ZHOU Xin(周鑫), et al. *CIESC J.(Huagong Xuebao)*, **2007**,**58**(6):1529-1534
- [14] Zhang R F, Long N B, Zhang L L. *Thin Solid Films*, **2009**, **517**:6677-6680
- [15] LONG Neng-Bin(龙能兵), ZHANG Rui-Feng(张瑞丰). *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(7): 1153-1158
- [16] LI Wen-Li(李文丽), ZHANG Rui-Feng(张瑞丰), WANG Wen-Qin(王文钦), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2010**,**26**(8):1382-1388
- [17] HU Yi(胡燧), LIU Wei-Ming(刘维明), ZOU Bin(邹彬), et al. *Prog. Chem.(Huaxue Jinzhan)*, **2010**,**22**(8):1656-1664
- [18] ZHANG Qun(张群), LIANG Yun-Xiao(梁云霄), ZHANG Yu-Qi(张育淇). *J. Ningbo Univ.: NSEE(Ningbo Daxue Xuebao: Ligong Ban)*, **2012**,**25**(3):92-96
- [19] Bradford M N. *Anal. Biochem.*, **1976**,**72**:248-254
- [20] Arica M Y, Altintas B, Bayramoglu G. *Bioresour. Technol.*, **2009**,**100**:665-669
- [21] Zhang J B, Xu Z Q, Chen H, et al. *Biochem. Eng. J.*, **2009**, **45**:54-59
- [22] Wang F, Guo C, Liu H Z, et al. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2008**,**83**:97-104
- [23] Zhu Y F, Kaskel S, Shi J L, et al. *Chem. Mater.*, **2007**,**19** (26):6408-6413
- [24] Cabana H, Alexandre C, Agathos S N, et al. *Bioresour. Technol.*, **2009**,**100**(14):3447-3458
- [25] WANG Yan(王炎), ZHENG Xu-Han(郑旭翰), ZHAO Min(赵敏). *J. Chem. Eng. Chinese Universities(Gaoxiao Huaxue Gongcheng Xuebao)*, **2008**,**22**(1):82-87
- [26] Rodríguez-Argüelles M C, Villalonga R, Serra C, et al. *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**,**348**:96-100