



王琳琳,高兴明,韦海涛,等. 固定化酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 轻工学报,2021,36(2):25-33.
WANG L L, GAO X M, WEI H T, et al. Research progress in the application of immobilized enzymes in food industry[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(2):25-33. DOI:10.12187/2021.02.004
中图分类号:TS201.1 文献标识码:A 文章编号:2096-1553(2021)02-0025-09

固定化酶在食品工业中的应用研究进展

Research progress in the application of immobilized enzymes in food industry

王琳琳¹,高兴明²,韦海涛²,范小雪¹,王存芳¹

WANG Linlin¹, GAO Xingming², WEI Haitao², FAN Xiaoxue¹, WANG Cunfang¹

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院,山东 济南 250353;
2. 山东熊猫乳品有限公司,山东 济南 251400

1. School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science), Ji'nan 250353, China;
2. Shandong Panda Dairy Co., Ltd., Ji'nan 251400, China

关键词:

固定化酶;食品工业;
加工贮藏;食品添加剂;
生物活性肽;食品
检测

Key words:

immobilized enzyme;
food industry;
processing and storage;
food additives;
bioactive peptide;
food testing

摘要:在简述固定化酶及其特性的基础上,对固定化酶在食品工业(食品加工贮藏、食品添加剂生产、生物活性肽制备和食品检测)中的应用研究进行综述.指出:将固定化酶应用于食品工业中,既可提高酶的稳定性和生产效率、实现酶的重复利用、增加目标物的工业产量、降低生产成本,还可保留产品的原有风味、增加其功能性,同时也可提高生物传感器的检测灵敏度、缩短反应时间及简化操作步骤.未来可在寻求新的固定化技术和固定化载体、优化固定化预分离技术、制备能够进行多酶反应的新型固定化酶等方面开展深入研究,以进一步推进固定化酶在食品工业中的应用.

收稿日期:2020-05-23

基金项目:山东省重点研发计划项目(2019YYSP025);国家级大学生创新创业训练计划项目(201910431002)

作者简介:王琳琳(1997—),女,山东省德州市人,齐鲁工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品生物技术.

通信作者:王存芳(1977—),女,山东省聊城市人,齐鲁工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术和食品营养学.

Abstract: On the basis of a brief description of immobilized enzymes and their characteristics, the relevant application research of immobilized enzymes in the food industry (food processing and storage, food additive production, bioactive peptide preparation and food testing) was reviewed. It was pointed out that the application of immobilized enzymes in the food industry could not only increase the decomposition rate, increase the output of industrial production, and reduce production costs; but also help to retain the original flavor of the product and increase its functionality. Biosensors based on immobilized enzymes had the advantages of fast, high efficiency and easy operation. In the future, further research could be done on seeking new immobilization technologies and immobilized carriers, optimizing immobilized pre-separation technologies, and preparing new immobilized enzymes capable of multi-enzyme reactions to promote the application of immobilized enzymes in the food industry.

0 引言

早在 80 年前,一些专家发现吸附在骨炭粉上的酶具有生物活性,启发了业界学者对固定化酶的探索. 1953 年, N. Grubhofer 等^[1]将聚苯乙烯树脂重氮化后作为载体与胃蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶、核糖核酸酶共价结合,制成了最早的固定化酶. 1969 年,日本的千畑一郎将固定化的氨基酰化酶(该固定化酶的生产成本比游离酶低 60%)成功应用于 D-氨基酸、L-氨基酸的光学分析,开拓了国际上利用固定化酶进行连续工业化生产的道路,这也是酶应用历史上的一次伟大变革^[2]. 1970 年,中国科学院生物化学研究所和中国科学院微生物所开始研究固定化酶,揭开了我国探索固定化酶的序幕. 随后,国内多家科研单位开始研究固定化酶,发展势头锐不可挡. 本文在简述固定化酶及其特性的基础上,综述了固定化酶在食品加工贮藏(乳制品加工、水产品加工、油脂改性、啤酒储存)、食品添加剂(高果糖浆、低聚果糖、L-苹果酸、L-天门冬氨酸、阿斯巴甜)生产、生物活性肽(酪蛋白磷酸肽(CPP)、高 F 值寡肽)制备和食品检测中的应用现状,并指出了未来的研究方向,以期固定化酶在食品工业中的广泛应用提供参考和新思路.

1 固定化酶

采用人工措施将酶从生物体内提取出来并

固定到相应的载体上,即可制得在一定空间内具有催化效应的固定化酶. 固定化酶主要有线条、颗粒、薄膜、酶管等形状,其中,颗粒固定化酶的应用最为广泛,它和线条固定化酶主要用于发酵工业生产,可大大提高发酵的反应效率;薄膜固定化酶主要用于酶电极;酶管固定化酶的机械强度较大,主要用于食品检测^[3-5]. 固定化酶除了具有酶的一般催化特性(如底物特异性、反应温和、高效等)^[6]外,还具有如下优点:可提高对温度、pH 值的适应性,以及对蛋白酶、抑制剂的抗性^[7];可通过简单的方法回收再利用,且酶活力损耗少;后续与产物、底物的分离纯化较容易^[8];可批量操作并具有连续性,适用于连续化、自动化的工业生产^[9]. 然而,固定化酶在固定化处理、分离等过程中具有如下缺点:工业化生产投资较大;固定化预分离时酶活力的损失较大,其中胞内酶尤为明显;不易进行多酶反应,辅助因子在某些酶的反应中起关键作用;小分子底物易与固定化酶反应,大分子底物与其反应概率较低,且只对水溶性底物具有催化作用^[10].

固定化酶的固定方法主要包括包埋法、吸附法、共价法和交联法^[11-18]. 其中,包埋法不涉及酶的构象和酶分子的化学变化,合成简单,但存在扩散限制、传质受阻等问题,不适合催化大分子底物^[17];吸附法工艺简单,条件温和,载体选择范围广且可再生,主要通过一些较弱的相

相互作用力(如氢键、范德华力、亲疏水作用、静电作用等)实现酶的固定化;共价法和交联法属于化学固定方法,所形成的化学键由于能量较高而难以断裂,故这两种固定方法不可逆^[18]。

近年来,固定化酶被广泛应用于食品、医药、化工等行业^[19],因其具有节约资源和能源、减少或防治污染的生态环境效应而符合当代可持续发展的战略要求。王欢等^[20]利用氨基化树枝状介孔 SiO₂ 固定葡萄糖氧化酶,用于检测血清和饮料中的葡萄糖,该固定化酶重复使用 36 次以上仍具有 80% 的相对酶活力。该方法操作方便、准确度高,提高了酶的 pH 稳定性和热稳定性,降低了检测成本。N. Marjan 等^[21]使用多醛交联剂制备了磁性纳米粒子固定果胶酶,提高了果胶酶的回收率和酶活力。M. M. D. Júlia 等^[22]利用固定化壳聚糖酶生产壳寡糖,与 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶相比,该固定化酶表现出较高的稳定性,在水解 6 个周期后,仍可保持 70% 的初始酶活力。

2 固定化酶在食品加工贮藏中的应用

2.1 乳制品加工

乳制品是人们日常所需蛋白质等的重要来源,其对固定化酶的要求较高,因而,如何利用固定化酶生产高质量的乳制品是研究人员一直关注的重点。1998 年底,中国食品添加剂标准化委员会将乳糖酶列为食品添加剂的新品种,使乳糖酶在乳制品工业中的应用更为广泛。固定化乳糖酶可分解乳糖、制造干酪,主要应用于液体乳制品(如低乳糖牛奶)、冷冻乳制品(如冰激凌、雪糕、速冻酸乳酪)、糖的替代添加剂(如低聚半乳糖)等方面。牛奶中的乳糖含量一般为 4.3%~4.5%,乳糖酶可将其分解为葡萄糖和半乳糖,避免乳糖不耐症患者产生腹胀、腹

泻等不良反应。固定化乳糖酶能够连续水解乳制品中的乳糖,大大提高乳糖的分解效率^[23]。李燕等^[24]采用聚丙烯酰胺凝胶包埋米曲霉制备了固定化乳糖酶,该固定化酶的热稳定性明显增强且适宜的温度范围增大,酶活力损失较少,机械强度也有所增大。使用该固定化酶水解牛奶,不但能够保持牛奶原有的风味,还能增加甜度,减少其他糖类的添加量^[25]。将固定化乳糖酶应用于冰淇淋类产品的加工中,既可提升冰淇淋类产品的口感和甜度,还可弥补乳糖在低温时易结晶的缺点^[26]。

2.2 水产品加工

酶工程是对水产品加工影响最大的一种生物技术,固定化酶不仅可改善水产品的品质,还可提升水产品的营养价值。海参是一种营养价值较高的海鲜产品,由于放养密度过大、日常管理不科学、池底环境含氮量较高、人工复合饵料研究滞后等问题,海参的多种并发症日益凸现。在饵料中适量添加益生菌和有助于海参消化的酶制剂是解决上述问题的关键。李向阳等^[27]采用包埋法,将真菌 α -淀粉酶固定化在环保、无毒、廉价的海藻酸钠上制成海参饵料添加剂,提高了海参肠道内淀粉的消化利用率,减少了代谢产物的排出量。固定化酶也可使一些低附加值水产品副产物得到更为合理的利用。罗非鱼是较为常见的淡水养殖鱼类,在水产加工方面主要用于鱼片的生产,其副产物一般用作饲料或肥料,利用率很低。瞿叶辉^[28]采用吸附法制备壳聚糖埃洛石(CS/HNTs)复合微球并用于固定木瓜蛋白酶,该固定化酶储存性更好,稳定性更高,可大大提高木瓜蛋白酶的利用价值。利用该固定化酶从罗非鱼副产物中提取的抗氧化活性多肽,可作为添加剂应用于食品、化妆品等行业。

2.3 油脂改性

脂肪酶是一种能够显著提高油脂催化效率

的绿色生物催化剂,在油脂工业中应用广泛,可通过水解、酯交换、酯转移等反应达到油脂改性的目的^[29],例如,1,3-特异性脂肪酶可进行酶促酯交换反应,将棕榈油催化改性为制作巧克力的代可可脂^[30]。然而,脂肪酶易受水、温度、pH值、酶液浓度、底物浓度、酶的激活剂或抑制剂等因素影响,导致酶失活、目标物产率降低^[31]。为了解决上述问题,R. Rao等^[32]使用固定化的脂肪酶M60催化鳕鱼肝油,获得了富含 $w-6$ 或 $w-3$ 系列多不饱和脂肪酸等脂类物质;J. B. Lyu等^[33]通过共价连接方式,将用醛标记的枯草芽孢杆菌脂肪酶A固定在 Fe_3O_4 单分散磁铁矿微球上,重复反应10次后,该固定化脂肪酶的酶活力仍能保持在90%,同时,酶的热稳定性和溶解度大大提高,酶凝聚在一起的可能性也被降低。

2.4 啤酒储藏

在储藏过程中,啤酒中的多肽和多酚成分会发生聚合反应,造成啤酒出现浑浊现象。木瓜蛋白酶可以水解啤酒中的多肽和蛋白质,但由于水解度的大小直接影响啤酒的泡沫稳定性,所以需要控制水解程度^[34]。温燕梅等^[35]采用吸附-交联法使胰蛋白酶先吸附于磁性胶体粒子表面,然后利用戊二醛双功能试剂交联形成固定化酶,该固定化酶对预防啤酒浑浊有明显的效果。赵炳超等^[36]以戊二醛为交联剂、介孔分子筛MCM-48为载体固定木瓜蛋白酶,所得固定化酶的热稳定性显著提高,pH稳定性和储藏稳定性也有明显改善。经固定化酶处理的啤酒,既可保持储藏过程中良好的澄清度,也可保证风味上与传统啤酒无明显差异。

3 固定化酶在食品添加剂生产中的应用

高果糖浆、低聚果糖、L-苹果酸等是常用的食品添加剂,利用性能稳定的固定化酶生产

这些食品添加剂,具有产量高、成本低等优点。

3.1 高果糖浆的生产

固定化葡萄糖异构酶是目前全球产量最高、应用范围最广的一种固定化酶,一般是将其固定在菌体上,常用的固定方法是热处理法,温度需达到60~65℃,热处理时间持续15min。以淀粉为原料生产高果糖浆的关键酶主要有以下3种: α -淀粉酶,又称液化酶,主要起到淀粉液化的作用;葡萄糖淀粉酶,其水解产物为 β -葡萄糖;葡萄糖异构酶,可将葡萄糖异构为果糖,是催化淀粉最关键的酶。早在1973年,研究者就使用固定化的葡萄糖异构酶催化淀粉生产高果糖浆。采用此方法获得的高果糖浆,果糖含量高达55%,且价格比蔗糖低10%~20%,经济效益较高^[37]。使用高果糖浆替代蔗糖是固定化酶应用最成功的工业案例,500t固定化的葡萄糖可生产约 1×10^7 t高果糖浆^[38]。但该工艺在我国发展比较缓慢,目前只应用于高果糖浆的小规模生产^[39],因此,急需寻找新型固定化载体,制备可以高产量生产高果糖浆的固定化葡萄糖异构酶,以降低生产成本,提高经济效益。

3.2 低聚果糖的生产

低聚果糖(Fructo Oligosaccharids, FOS),又称蔗果低聚糖,以菊芋粉为原料,通过菊糖内切酶水解作用制得。低聚果糖既是一种新型糖源,又是一种功能性保健食品,受到广大消费者的青睐。低聚果糖的生产主要采用液体深层发酵法,但此方法存在一定的缺点:生产酶的菌体不能够再利用,酶的利用率也较低;过滤、除杂、脱色等工艺使后处理过程成本增加。1995年,魏远安等^[40]以少量 $CaCl_2$ 和戊二醛作为交联剂,固定了GX-0010菌株中的果糖基转移酶和壳聚糖凝胶,发现1kg固定化果糖基转移酶可生产11330kg的低聚果糖浆,且该糖浆中的果糖含量高达58%。2000年,该团队研究发现,经固

定化的果糖基转移酶对温度的适应性更强,热稳定性、酸碱稳定性和储存稳定性更高^[41]。目前,低聚果糖生产中的主要问题是产率较低,仅为40%~60%^[42],而酶的固定化技术为提高低聚果糖生产效率、降低成本提供了可能。

3.3 L-苹果酸、L-天门冬氨酸和阿斯巴甜的生产

L-苹果酸是一种人体必需的有机酸,在三羧酸循环中起重要作用,广泛应用于食品和医药行业。L-天门冬氨酸是一种良好的营养增补剂,主要添加于各种清凉饮料,是糖代用品阿斯巴甜(Aspartame, APM)的主要生产原料。研究发现^[43],固定化的富马酸酶在生产L-苹果酸和L-天门冬氨酸方面具有得天独厚的优势:富马酸在固定化的富马酸酶催化下,可生成L-苹果酸;富马酸与氨的结合物在L-天门冬氨酸酶(从大肠杆菌中提取)催化下,可生成L-天门冬氨酸。通过该方法获得的L-苹果酸和L-天门冬氨酸产量较高,一个10 m³的固定化细胞柱每月可生产数吨L-苹果酸和L-天门冬氨酸。阿斯巴甜,又称阿斯巴坦,是由L-天门冬氨酸和L-苯丙氨酸(或L-甲基苯丙氨酸酯)以化学或酶催化反应合成的一种氨基酸二肽衍生物,作为一种非碳水化合物类的人造甜味剂,已被广泛应用于食品添加剂行业。目前,工业生产阿斯巴甜最常用的方法是固定化酶耦合反应。与传统的酶催化反应相比,固定化酶耦合反应具有反应时间短、酶的回收利用率高、产物分离纯化简单等优势。陈飞飞^[44]采用一种NaCl增溶和微波辅助的方法,快速高效地制备了固定化嗜热菌蛋白酶,该固定化酶的催化活力是游离酶的1.6倍,其热稳定性和耐有机溶剂性均有所提高,且可回收利用,极大地节约了生产成本。

4 固定化酶在生物活性肽制备中的应用

生物活性肽是一类对机体具有积极作用的

特异性蛋白片段,在蛋白序列中通常不具有活性,但可通过酶解或微生物发酵等方式释放后发挥作用^[45]。生物活性肽来源广泛,易消化利用,安全性较高,因具有降胆固醇、降血压、抗菌、抗氧化等生物活性而成为食品领域的研究热点。然而,生物活性肽在食品中的应用受其制备方法的影响^[46]。固定化酶酶解是制备生物活性肽的主要方法之一,与酸水解、碱水解等化学水解方法相比,不仅是一种绿色安全的方法,还可最大限度地保护氨基酸不被破坏。

4.1 CPP的制备

CPP是一类源于酪蛋白的磷酸肽,在促进机体对矿物质吸收和预防龋齿方面具有重要作用,可添加到婴幼儿奶粉、中小學生营养奶、高钙饼干、预防龋齿的牙膏等产品中^[47]。目前,日本已生产液体营养食品、儿童咖喱饭、口香糖等多种CPP商业产品^[48]。1999年,吴思方等^[49]采用固定化酶酶解酪蛋白制备了CPP,并通过正交试验优化了其工艺参数,获得了粗制的CPP产品。张黎明^[50]以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂,利用固定化的胰蛋白酶酶解酪蛋白生产CPP,得率较高,生产成本较低。尽管CPP的制备方法有很多,但每种方法各有利弊。其中固定化酶酶解法具有天然、易控制、效果佳、可大批量工业化生产等优势而应用广泛,但因酶的种类有限,在食品工业中的应用也存在一定的局限性。

4.2 高F值寡肽的制备

高F值寡肽是一个由2—9个氨基酸残基组成的混合小肽(或称寡肽)体系,其支链氨基酸与芳香族氨基酸的物质的量比值大于20,具有保肝、护肝、治疗肝脏疾病、抗疲劳、抗氧化、延缓衰老等生理功能,食品和医学界对其关注度均较高^[51]。黄程^[52]以碎鱿鱼肉为原料,以固定化风味酶和固定化胃蛋白酶(由壳聚糖和戊二醛为材料制备)作为催化酶制备了高F值寡

肽,并利用活性炭吸附法降低了其芳香族氨基酸的含量.固定化的胃蛋白酶在酶解反应之后仍可保持较高的酶活力,并可实现重复再利用.

5 固定化酶在食品检测中的应用

随着食品安全问题重要性的日益凸显,快速、即时、低成本、便捷化的食品安全检测方法受到研究者的重视^[53].生物传感器是一种对生物物质敏感,并可将生物物质浓度转换为电信号进行检测的仪器,主要应用于食品检测、环境监测等领域^[54].生物传感器不仅可快速高效地鉴定食品成分,降低检测仪器、试剂成本,而且可实现实时在线检测,其可快速进行分子识别和有毒有害物质检测得益于利用生物活性物质固定化制备的敏感膜^[55].张彦等^[56]制备了利用壳聚糖将葡萄糖氧化酶固定在蛋膜和氧电极的葡萄糖传感器,建立了快速测定葡萄糖含量的方法,该生物传感器具有灵敏度高、反应时间短、操作简单、成本低等特点.舒友琴等^[57]将固定化酶和生物传感器联用,采用化学发光法高效精准地检测食品中的淀粉含量,该方法误差较小.伍周玲等^[58]采用固定化乙酰胆碱酯酶和多碳纳米管制备了电化学生物传感器,该传感器可用于食品中农药残留的快速高效检测,其中,氨基甲酸酯类杀虫剂的含量可通过峰电流值来定量.在酶基生物传感器中,酶固定化是影响传感器性能的关键步骤,纳米生物催化技术可大大提高其性能,展现出更好的选择性、稳定性、可重复性和再现性.

6 结语与展望

本文对固定化酶及其特性、制备方法进行了简述,对固定化酶应用于食品加工贮藏、食品添加剂生产、生物活性肽制备和食品检测的研究现状进行了综述,指出了固定化酶以其高催

化效率、高剩余酶活力、高稳定性已被广泛应用于食品工业的多个领域;以固定化酶为基础的生物传感器以其高选择性、高灵敏度已被成功应用于食品中有毒有害物质和营养物质的检测,在食品检测领域取得了较大进展.然而,目前固定化酶在食品工业化生产中的投资较大且应用技术尚不成熟,固定化预分离时酶活力的损失较大,不易进行多酶反应.因此,研究者未来可着重探索新的固定化技术和固定化载体,优化固定化预分离技术,制备能够进行多酶反应及对大分子底物具有催化效应的新型固定化酶,以降低生产成本,提高经济效益.随着生物、化学、信息技术等相关学科快速发展,符合当代可持续发展战略要求的固定化酶在食品行业中的应用前景将会更加广阔.

参考文献:

- [1] GRUBHOFER N, SCHLEITH L. Protein coupling with diazotized polyaminostyrene [J]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1954, 297(2): 108.
- [2] TADASHI S, TAKAO M, TETSUYA T, et al. Studies on immobilized enzymes: IX. Preparation and properties of aminoacylase covalently attached to halogenoacetylcelluloses [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 147(2): 788.
- [3] 李青山, 刘铠, 张嗣良, 等. 用固定化酶管流动注射测定谷氨酸[J]. 华东理工大学学报, 1995, 21(3): 316.
- [4] 李青山, 刘铠, 张嗣良, 等. 固定化酶管安培法快速测定青霉素[J]. 华东理工大学学报, 1995, 21(2): 161.
- [5] 胡伟平, 张先恩, 李翔, 等. 蔗糖酶在尼龙丝上的固定化及酶管性能研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(5): 380.

- [6] RUSHIKESH F, SANTHOSH P, PARESH K, et al. Strategies, challenges and opportunities of enzyme immobilization on porous silicon for bio-sensing applications [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8 (5): 104266.
- [7] ROSWANIRA A W, NURSYAFIQAH E, FAIZUAN A, et al. On the taught new tricks of enzymes immobilization: an all-inclusive overview [J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2020, 152: 104613.
- [8] JOSE C S S, OVEIMAR B, CLAUDIA O, et al. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes [J]. *Chemcatchem*, 2015, 7(16): 2413.
- [9] 李彦峰, 李军荣, 伏莲娣. 固定化酶的制备及应用[J]. *高分子通报*, 2001(2): 13.
- [10] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 轻工业出版社, 2001.
- [11] DU Y J, GAO J, ZHOU L Y, et al. Enzyme nanocapsules armored by metal-organic frameworks: a novel approach for preparing nanobio-catalyst [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 327: 1192.
- [12] DU Y J, GAO J, ZHOU L Y, et al. MOF-based nanotubes to hollow nanospheres through protein-induced soft-templating pathways [J]. *Advanced Science*, 2019, 6(6): 1801684.
- [13] ANA P M T, CLÁUDIA G S, GORAN D, et al. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes; kinetic, thermodynamic and stability studies [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 454: 52.
- [14] GAO J, KONG W X, ZHOU L Y, et al. Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309: 70.
- [15] KAHINA L, HABIBA D, AMINA K, et al. Tyrosinase immobilization on functionalized porous silicon surface for optical monitoring of pyrocatechol [J]. *Applied Surface Science*, 2018, 446: 3.
- [16] LIU D M, CHEN J, SHI Y P, et al. Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1006: 90.
- [17] 陈海欣, 张赛男, 赵力民, 等. 固定化酶: 从策略到材料设计 [J]. *生物加工过程*, 2020, 18(1): 88.
- [18] MOHAMAD N R, MARZUKI N H C, BUANG N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes [J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 205.
- [19] YANG J O, PU S J, WANG J Z, et al. Enzymatic hydrolysate of geniposide directly acts as cross-linking agent for enzyme immobilization [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 99: 187.
- [20] 王欢, 所金泉, 王春艳, 等. 氨基化树枝状介孔二氧化硅固定葡萄糖氧化酶用于检测葡萄糖 [J]. *高等学校化学学报*, 2020, 41(8): 1731.
- [21] MARJAN N, FARAMARZ K. Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly-aldehyde kefirin cross-linker to immobilize pectinase enzyme [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101681.
- [22] JÚLIA M M D, NAYARA S S, CARLOS E A P, et al. Enhancing chitosan hydrolysis aiming chitooligosaccharides production by using immobi-

- lized chitosanolytic enzymes [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 28: 101759.
- [23] 陈雄. 固定化糖化酶的研究 [J]. 中国酿造, 2001 (2): 19.
- [24] 李燕, 刘庆军, 王锦, 等. 乳糖酶的固定化及应用 [J]. 山东轻工业学院学报 (自然科学版), 2003, 17 (3): 52.
- [25] CHIBALA I. Immobilized enzymes [M]. New York: Johy Wily and Sons, 1978.
- [26] 罗丽萍, 熊绍员. 固定化酶及其在食品工业中的应用 [J]. 江西食品工业, 2003 (3): 10.
- [27] 李向阳, 单守水, 徐世艾. 固定化真菌 α -淀粉酶在海参饵料添加剂方面的应用研究 [J]. 烟台大学学报 (自然科学与工程版), 2011, 24 (4): 275.
- [28] 瞿叶辉. 罗非鱼副产物酶解工艺优化及壳聚糖埃洛石微球固定化木瓜蛋白酶的研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2016.
- [29] 陈冬梅. 固定化酶及其在食品工业中的应用 [J]. 现代农业科技, 2010 (19): 330.
- [30] MERON F B, ANNA G L S, NOBREGA R. Enzyme hydrolysis of babassu oil in a membrane bioreactor [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77 (10): 1043.
- [31] 张灿, 姜国芳, 杨江楠, 等. 多孔材料固定化脂肪酶的研究进展 [J]. 分子催化, 2020, 34 (4): 378.
- [32] RAO R, M ANOHAR B, SAMBAIAH K, et al. Enzymatic acidolysis in hexane to produce *w*-3 or *w*-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil optimization of reactions by response surface methodology [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2002, 79 (9): 885.
- [33] LYU J B, LI Z D, MEN J C, et al. Covalent immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A on Fe₃O₄ nanoparticles by aldehyde tag: an ideal immobilization with minimal chemical modification [J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 63.
- [34] 侯瑾, 李迎秋. 固定化酶的研究进展及其在食品工业中的应用 [J]. 江苏调味副食品, 2017 (1): 9.
- [35] 温燕梅, 邱彩虹. 吸附-交联法固定胰蛋白酶及在澄清啤酒中的应用 [J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 12 (4): 42.
- [36] 赵炳超, 马润宇, 石波. 介孔分子筛 MCM-48 固定化木瓜蛋白酶性质的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31 (10): 60.
- [37] 韩文静. 固定化酶的新型制备方法及其在食品工业中的应用 [J]. 食品工业科技, 2009, 30 (2): 345.
- [38] TUFVESSON P, FU W J, JENSEN S J, et al. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis [J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88 (1): 3.
- [39] 冯柏成, 张田林, 金青. 固定化酶在食品和药物工业中的应用 [J]. 化学工业与工程技术, 1998, 19 (1): 36.
- [40] 魏远安, 马丽, 杨海, 等. 固定化酶法合成蔗果低聚糖的研究 [J]. 食品与发酵工业, 1995, 21 (4): 12.
- [41] 魏远安, 姚评佳, 谢庆武, 等. 蔗果低聚糖的研究和生产应用 [J]. 食品与发酵工业, 2000, 26 (1): 48.
- [42] 张伟. 固定化酶制备低聚果糖的研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2000.
- [43] 胡永红, 欧阳平凯. 苹果酸生产中残留富马酸转成天门冬氨酸的研究 [J]. 南京化工大学学报 (自然科学版), 1995 (2): 58.
- [44] 陈飞飞. 微波辅助嗜热菌蛋白酶的固定化及其在阿斯巴甜前体合成中的应用 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2012.
- [45] BHAT Z F, SUNIL K, HINA F B. Bioactive peptides of animal origin: a review [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 57 (3):

- 566.
- [46] 谢博,傅红,杨方. 生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J/OL]. 食品工业科技:1-19[2020-04-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200826.1133.004.html>.
- [47] 孙延春. 酪蛋白磷酸肽应用研究进展[J]. 中国乳品工业,2011,39(2):53.
- [48] 汤亚杰,吴思方. 酪蛋白磷酸肽的研究进展[J]. 食品科学,1998,19(5):3.
- [49] 吴思方,汤亚杰,方尚玲. 固定化酶生产活性肽 CPP 研究[J]. 食品科学,1999(12):15.
- [50] 张黎明. 固定化胰蛋白酶酶解酪蛋白产生酪蛋白磷酸肽的条件研究[D]. 成都:西华大学,2009.
- [51] YING M, LIN L, SUN D W. Preparation of high fischer ratio oligo-peptide by proteolysis of corn gluten meal [J]. Czech Journal of Food Sciences,2008,26(1):38.
- [52] 黄程. 固定化酶法制备鱿鱼高 F 值寡肽的研究[D]. 舟山:浙江海洋学院,2015.
- [53] 齐骥,范鑫霞,邓冬梅,等. 基于纸基平台的食物安全快速检测方法研究进展[J/OL]. 分析化学:1-10[2020-04-26]. <https://doi.org/10.19756/j.issn.0253-3820.201172>.
- [54] 董文玥,姚培圆,吴洽庆. 纳米材料固定化酶的研究进展[J]. 微生物学通报,2020,47(7):2161.
- [55] 尹志娜. 固定化酶及其在食品和生物领域的研究进展[J]. 生命科学仪器,2009,7(8):11.
- [56] 张彦,南彩凤,冯丽,等. 壳聚糖固定化葡萄糖氧化酶生物传感器测定葡萄糖的含量[J]. 分析化学,2009,37(7):1049.
- [57] 舒友琴,徐军. 固定化酶化学发光法测定食品中的淀粉含量[J]. 中国粮油学报,2013,28(8):102.
- [58] 伍周玲,梁东军,郭明,等. 新型固定化乙酰胆碱酯酶传感器的制备及氨基甲酸酯农残检测[J]. 浙江农林大学学报,2014,31(3):457.