聚丙烯腈膜固定化海藻糖合成酶的研究

娄倩芳[1,2]，李由然[1,2]，石贵阳[*1,2]

（1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2.江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：以聚丙烯腈膜(PAN)为载体，采用吸附法固定化海藻糖合成酶粗酶液。通过单因素法探讨最佳固定化条件，并分析固定化酶酶学性质。结果表明，最佳固定化条件为：pH 7.6、30 ℃、加酶量 0.1 mg/cm^2 条件下震荡吸附 3 h；该条件下制备的固定化酶最适反应条件为：温度 40 ℃、pH 7.4、初始麦芽糖底物浓度 200 g/L。与游离酶相比，固定化酶热稳定性提高 10 ℃、酸碱稳定性由 pH 6.6~7.4 扩展至 pH 5.4~8.0；反应达到平衡时，反应液中海藻糖含量为 50.9%，副产物葡萄糖含量为 9.1%，较游离酶降低 6 个百分点，在目前已报道的固定化海藻糖合成酶催化反应中副产物含量最低；在 40 ℃、pH 7.4、麦芽糖底物浓度 200 g/L 条件下，重复使用累计 72 h 后，固定化酶活仍保留在初始酶活的 64.4%。

关键词：海藻糖合成酶；聚丙烯腈膜；固定化酶

中图分类号：Q 786　**文章编号：**1673-1689(2019)02-00015-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.003

Research on Immobilization of Trehalose Synthase on Polyacrylonitrile

LOU Qianfang[1,2]，*LI Youran*[1,2]，*SHI Guiyang*[*1,2]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract： The crude trehalose synthase is immobilized on polyacrylonitrile membrane by adsorbtion. The optimal conditions of immobilization is research and the properties of immobilized enzyme by single factor method is analyzied. The results show that the optimum immobilization conditions are：pH 7.6，30 ℃ for 3 h with 0.1 mg trehalose synthase per square centimeter PAN membrane. The optimal reaction conditions of the immobilized trehalose synthase are 7.4，40 ℃ and initial substrate concentration 200 g/L. Compared with the free trehalose synthase，the thermal stability increases by 10 ℃，pH stability expande from pH 6.6 ~ 7.4 to pH 5.4 ~ 8.0. The max trehalose content is 50.9% when the reaction reached equilibrium，the by-product of glucose content is 9.1%，which reduced by 6 percentage points compared with the free enzyme and is the lowest byproduct content of the reported immobilization trehalose synthase. Under the optimum reaction conditions of pH 7.4，40 ℃，substrate concentration 200 g/L，the immobilized enzyme remains 64.4% of the initial enzyme activity after repeating used for 72 h.

Keywords： trehalose synthase，polyacrylonitrile membrane，immobilized enzyme

收稿日期：2016-04-14

基金项目：十三五国家重点研发计划项目(2016YFD0401400)；国家自然科学基金项目(31401674)。

* **通信作者：**石贵阳(1963—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工程研究。E-mail：gyshi@jiangnan.edu.cn

引用本文：娄倩芳，李由然，石贵阳. 聚丙烯腈膜固定化海藻糖合成酶的研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(02)：15-21.

海藻糖，是由两个吡喃型葡萄糖单体通过α，α-1，-1糖苷键连结而成的非还原型二糖，分子式为$C_{12}O_{22}H_{11}$。广泛存在于细菌、霉菌、藻类、酵母、低等植物以及一些无脊椎动物等[1]，具有独特的生物抗逆保护作用以及低甜度、非还原性等，在分子生物学、食品、化妆品、医药行业等各个领域应用广泛[2-8]。

海藻糖生产方法主要有化学合成法、微生物抽提法、微生物发酵法、酶法等[4]，其中双酶法生产海藻糖是目前工业化生产海藻糖的主要方法。但存在酶需要精制、反应中间产物多、产物分离提取过程复杂等问题，而海藻糖合成酶能够以廉价的麦芽糖为底物一步生成海藻糖，工艺简单、底物价廉、易于调控等特性，是工业化生产海藻糖的可行性方案。但是，依然存在酶制备工艺复杂、游离酶稳定性差、不能重复利用、与底物分离困难等不足，可以结合固定化技术解决这些问题。目前国内外固定化海藻糖合成酶的报道中，以介孔分子筛[9]、细菌纤维素[10]、壳聚糖[11]、磁性Fe_3O_4纳米材料[12]、Eupergit C250L为载体[13]、多孔聚苯乙烯离子交换树脂[14]为载体进行海藻糖合成酶的固定化研究，解决了固定化酶操作稳定性、转化率等问题，但依然存在固定化酶制备周期长、方法重复性差以及副产物含量高等问题。

聚丙烯腈(Polyacrylonitrile PAN)是指由85%以上丙烯腈与第二、第三单体聚合而成的高聚物[15]，具有易成膜、抗菌性、成本低以及良好的物理化学稳定性等优点，常用作工业化生产分离膜材料。同时，利用聚丙烯腈纤维上的多孔性以及弱酸性基团如羧酸根、磺酸根等[16]可以进行吸附染色。本实验参考聚丙烯腈纤维吸附染色原理，以聚丙烯腈膜为载体，旨在以成本低、操作简便、无污染的固定化方法和材料，获得具有良好酶学特性的固定化酶，同时探讨固定化酶反应中副产物葡萄糖含量的变化，为海藻糖合成酶新固定化材料提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种 *E.coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-TreS：由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 聚丙烯腈粉末：上海金山石化公司；N,N-二甲基甲酰胺、聚乙二醇(PEG-400)、十二水合磷酸氢二钠、一水合柠檬酸、海藻糖、麦芽糖、葡萄糖(分析纯)：国药集团化学试剂有限公司；乙腈(色谱纯)：Sigma—Aldrich公司。

1.1.3 培养基 TB培养基：蛋白胨12 g，酵母粉24 g、K_2HPO_4 12.54 g、K_2HPO_4 2.31 g，甘油5 g，去离子水定容到1 L。

1.2 仪器与设备

台式高速冷冻离心机，Hitachi公司；Sonic VCX-750超声波细胞破碎仪，南京新晨生物科技有限公司；紫外-可见光分光光度计V-1200，上海美谱达仪器有限公司；AL104分析天平，瑞士梅特勒-托利多公司；高效液相色谱系统及工作站，DIONEX公司。

1.3 方法

1.3.1 PAN膜制备 在250mL蓝盖瓶中加入55 mL二甲基甲酰胺、5 mL聚乙二醇400，轻轻混匀，加入聚丙烯腈粉末10 g，搅拌均匀，加盖子拧紧，放置65 ℃烘箱中反应，48 h后，观察成黄色均匀粘稠液体。于室温下放置24 h，除去气泡。倒入具有0.44 mm深度槽的玻璃板上，用玻璃棒刮膜，并立即将玻璃板放入去离子水中，形成薄膜后，将薄膜放置于新的去离子水中24 h以上，中间换3次水，即得聚丙烯腈膜材料。

1.3.2 游离酶液制备 将菌种接种到30 mL TB培养基中，37 ℃、200 r/min摇瓶至OD_{600}值为0.6，加入诱导剂IPTG至终浓度为1 mmol/L于25 ℃、200 r/min条件下发酵18 h。所得发酵液8 000 r/min离心5 min收集菌体，用磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液清洗后重悬，超声破碎制备粗酶液，超声后酶液离心取上清，即得海藻糖合成酶液。

1.3.3 海藻糖合成酶固定化 取制备好的PAN膜于烧杯中，加入去离子水超声处理(功率：100 W，频率：40 kHz)20 min后，去除表面水分，取30 cm^2面积的膜，裁剪为0.5 cm^2面积，放置于50 mL离心管中，加入3 mL磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液制备的海藻糖合成酶液(蛋白浓度：1.85 mg/mL)，在25 ℃水浴中吸附反应3 h后，用磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液清洗载体，除去表面附着的游离酶，离心、抽滤即得固定化海藻糖合成酶膜。

1.3.4 海藻糖、麦芽糖、葡萄糖标准曲线制作 高效液相色谱法分析海藻糖含量：色谱柱为XBridge Amide氨基柱(5 μm×250 mm×4.6 mm)，视差检测器，流动相为乙腈:水=80:20，流速1.0 mL/min，进样

量 20 μL,柱温为 37 ℃,根据海藻糖标准曲线,求出样品中海藻糖的含量。

1.3.5 蛋白含量与酶活测定 采用考马斯亮蓝法测蛋白含量[17]。

固定化蛋白量(mg)=加入总蛋白量(mg)−清洗液上清中蛋白量(mg)。

固定化蛋白率(%)=负载蛋白量(mg)/加入总蛋白量(mg)×100%。

游离酶酶活测定:取制备的游离酶液稀释一定的倍数后,取 1 mL 于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 5%的麦芽糖底物,30 ℃条件下反应 12 h,沸水浴煮沸 10 min 终止反应,离心、过膜后,采用高效液相色谱(HPLC)法测定反应液中海藻糖含量。

固定化酶酶活测定:取一份固定化酶,加入 8 mL 一定浓度的麦芽糖底物,在一定温度下反应 12 h,沸水浴煮沸 10 min 终止反应,离心过膜后,采用 HPLC 法测定反应液中海藻糖含量。

酶活单位定义:在以上反应条件下每分钟生成 1 μmol 海藻糖为一个单位酶活。

比酶活:反应总的酶活与酶总蛋白含量的比值。

相对酶活定义:以反应条件中酶活最大的反应为 100%,计算其余反应酶活相对百分比。

相对比酶活定义:以反应条件中比酶活最大的反应为 100%,计算其余反应比酶活相对百分比。

酶活回收率定义:固定化酶总活力/加入酶的总活力×100%。

1.3.6 固定化条件优化方法 取 30 cm^2 面积的膜,裁剪为 0.5 cm^2 面积,放置于 50 mL 离心管中,依次考察在:pH 5.4~8.0 的酶液(蛋白浓度:1.85 mg/mL),10~45 ℃震荡水浴,吸附反应时间 0.5~5.0 h、给酶量 0.04~0.42 mg/cm^2 等不同条件,测量固定化蛋白量和固定化酶总酶活,考察 pH 对固定化效果的影响,选择最佳固定化 pH、温度、吸附时间、给酶量。

1.3.7 固定化酶学性质分析方法 在最佳固定化条件下制备固定化酶,取相同面积的固定化酶膜以及相同蛋白含量的游离酶,依次考察在:pH 5.4~8.0 的 5%(w/v)麦芽糖底物、20~60 ℃、麦芽糖底物质量浓度 50~350 g/L 以及 Cu^{2+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}、Al^{3+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}等不同金属离子溶液的条件下的总酶活,分析固定化酶最适反应 pH、温度、初始底物浓度、抑制剂和激活剂等酶学特性。

2 结果与讨论

2.1 固定化条件对固定化效果的影响

2.1.1 酶固定化过程 *pH* 对固定化效果的影响 取 pH 5.4~8.0 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液制备的酶液(蛋白浓度:1.85 mg/mL),在 25 ℃震荡水浴锅中吸附反应 3 h,考察 pH 对固定化酶活性的影响,结果见图 1。

由图 1 所示,随着 pH 值的升高,固定化酶活性逐渐升高,在 pH 7.6 时酶活最高;比酶活在 pH 7.4 后急剧下降。由于 PAN 材料上带有弱酸性基团,pH 较低时影响弱酸性基团的电离,所以,偏碱性的环境有利于酶分子中氨基与 PAN 载体上的羧酸基结合,因此选择最佳固定化反应 pH 为 7.6。

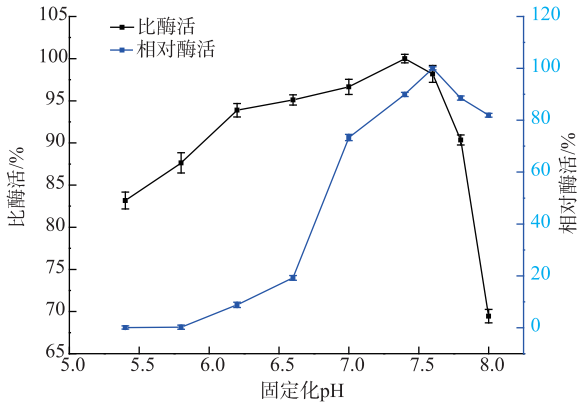


图 1 酶固定化过程 pH 对固定化效果的影响

Fig. 1 Effect of immobilized pH on immobilized enzyme

2.1.2 固定化温度对固定化酶酶活的影响 取相同的 PAN 膜载体在 pH 7.6 条件下,分别在 10、25、30、35、40、45 ℃震荡反应 3 h,制备固定化酶,测定固定化反应温度对固定化酶的影响,结果见图 2。

如图 2 所示,随着固定化温度的升高,固定化酶酶活逐渐升高,在 35 ℃时酶活性最高,随着温度的继续升高固定化酶酶活性急剧下降;固定化酶比酶活随着温度的升高先升高后急剧下降,在 30 ℃时比酶活达到最大。由此可知,随着温度的升高,偶联到载体上的蛋白含量增多,同时由于游离酶对温度的敏感性,温度的改变使酶的空间构象发生变化,导致酶活性的变化。因此,综合考虑,选择 30 ℃作为固定化温度。

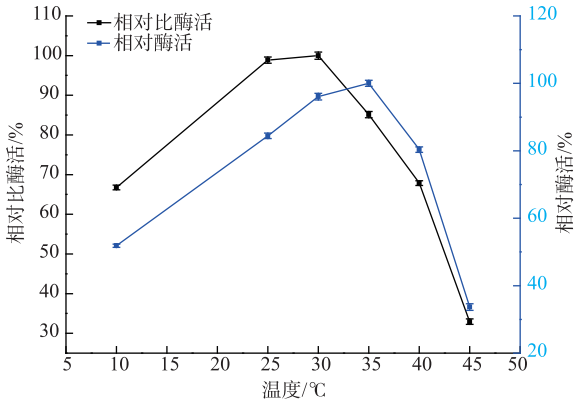


图 2 固定化温度对固定化酶的影响

Fig. 2 Influence of immobilized temperature to immobilized enzyme

2.1.3 固定化时间对固定化酶活的影响 取相同膜面积 PAN 载体,在 pH 7.6、温度 30 ℃条件下,加入 3 mL 酶液,在相同条件下分别固定化 0.5~5.0 h,通过测量不同不固定化时间条件的见固定化蛋白量和固定化酶总酶活,考察固定化时间对固定化酶的影响,结果见图 3。

如图 3 所示,随着固定化时间的延长,固定化酶活逐渐增加,并逐渐平稳;而相对比酶活先增加后逐渐降低,由此可知,随着固定化时间的延长,载酶量逐渐增加,酶活趋于稳定,说明酶分子开始从表层扩散进入载体空隙内,但有效酶仅与载体表面积有关。因此,选择固定化时间为 3.0 h。

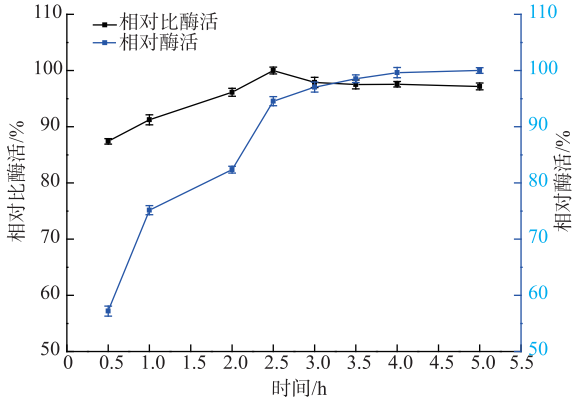


图 3 固定化时间对固定化酶的影响

Fig. 3 Influence of immobilized time to immobilized enzyme

2.1.4 固定化加酶量对固定化酶活的影响 取相同膜面积 PAN 载体,在 pH 7.6、温度 30 ℃条件下,分别加入 0.04~0.42 mg/cm² 的酶液,固定化反应 3 h,考察加酶量对固定化酶的影响,结果见图 4。

如图 4 所示,随着加酶量的逐渐增大,固定化酶活逐渐增大最后基本不变,而相对比酶活呈逐渐下降的趋势,由此可知,固定化酶有效载酶量仅与膜表面积有关。因此,选择最适加酶量为 0.1 mg/cm²。

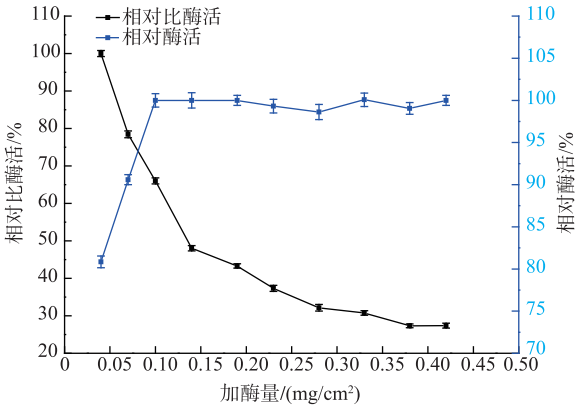


图 4 固定化加酶量对固定化酶的影响

Fig. 4 Influence of enzyme dosage to immobilized enzyme

2.2 固定化酶酶学性质分析

由以上实验可知,最佳固定化条件为 pH 7.6、温度 30 ℃、时间 3 h、加酶量 0.1 mg/cm²。

2.2.1 固定化酶最适反应 pH 在最佳固定化条件下制备固定化酶以及取相同偶联蛋白含量的游离酶,分别加入不同 pH 缓冲液配制的底物,在 25 ℃条件下反应 12 h,采用 HPLC 法测定酶活。结果如图 5 所示,固定化酶最适反应 pH 7.4,与游离酶相比,固定化酶 pH 稳定性在 pH 5.4~8.2 范围均保持良好的稳定性,说明经过固定化后,使得酶活性中心对环境 pH 的敏感性变弱,酶分子更加稳定。

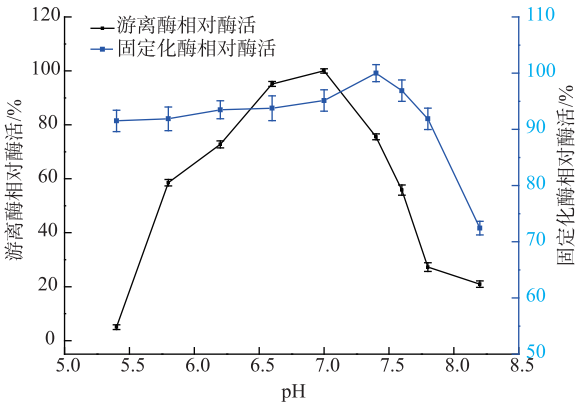


图 5 固定化酶与游离酶最适反应 pH 探讨

Fig. 5 Research on the optimal reaction pH of the immobilized enzyme and the free enzyme

2.2.2 固定化酶最适反应温度　在最佳固定化条件下制备固定化酶以及取相同偶联蛋白含量的游离酶，分别加入 pH 7.4 缓冲液配制的麦芽糖底物，分别在 20~60 ℃之间反应 12 h,采用 HPLC 法测定酶活。结果如图 6 所示,固定化酶最适反应温度为 40 ℃，且在 25~45 ℃范围内均保持较高的酶活,相对于游离酶最适温度 30 ℃,最适温度提高了 10 ℃,且在 50、60 ℃比游离酶耐热性高，经过固定化后,酶的热稳定性得到提高。

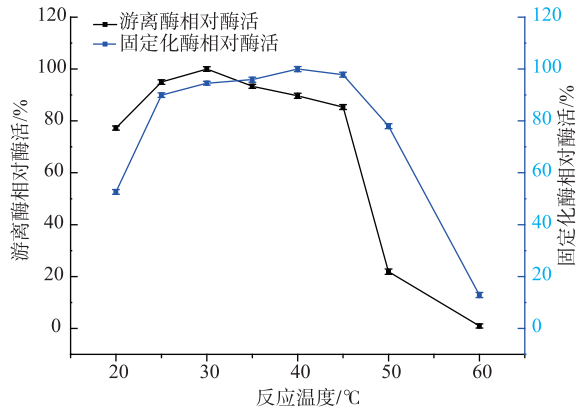


图 6　固定化酶与游离酶最适反应温度探讨

Fig. 6　Research on the optimal reaction temperature of the immobilized enzyme and the free enzyme

2.2.3 固定化酶反应最适初始底物浓度　在最佳固定化条件下制备固定化酶以及取相同固定化蛋白含量的游离酶,分别加入 pH 7.4 与 pH7.0 缓冲液配制的质量浓度为 50~350 g/L 梯度的麦芽糖底物,在 40 ℃反应 12 h,采用 HPLC 法测定酶活,结果如图 7 所示。由图 7 可知,固定化酶最适初始底物浓度为 200 g/L,伴随着底物浓度的升高,有略微的下降,推测,由于酶被固定在载体上,且底物浓度越高,底物流动性越差,从而影响固定化酶酶反应进程,游离酶最适初始底物浓度为 25%,与文献[18]的结果基本一致,说明采用聚丙烯腈膜为载体,传质阻力较小。

2.2.4 固定化酶稳定性　在最佳固定化条件下制备固定化海藻糖合成酶,在 pH 7.4、40 ℃、麦芽糖质量浓度 200 g/L 的条件下反应 12 h,反应结束后,取出反应液煮沸 10 min，用 HPLC 法测反应总酶活,将载体用 pH 7.4 的缓冲液进行清洗，除去表面水分,重复上述操作共 15 次,考察固定化酶的重复稳定性,结果见图 8。

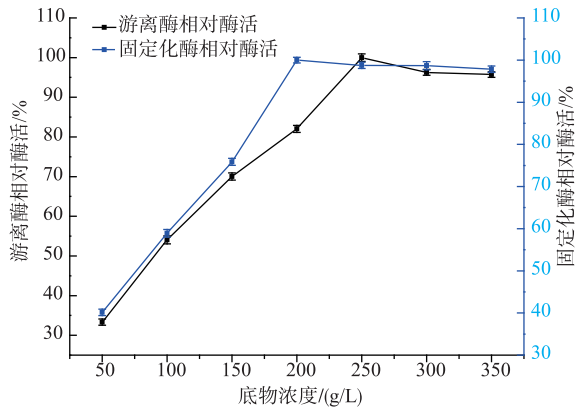


图 7　固定化酶与游离酶最适初始底物浓度探讨

Fig. 7　Research on the optimal initial substrate concentration of the immobilized enzyme and the free enzyme

结果如图 8 所示,固定化酶随着使用次数的增多,酶活逐渐下降,在最适反应温度 40 ℃条件下使用 6 次后,固定化酶活仍保持初始酶活的 64.4%。

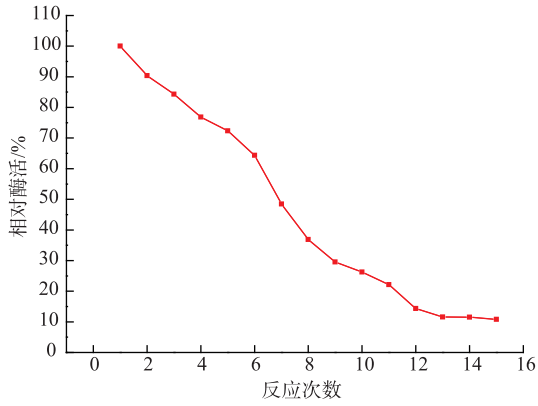


图 8　固定化酶 40 ℃反应条件下重复使用稳定性探讨

Fig. 8　Research on the stability of immobilized enzyme reaction repeated use under 40 ℃

2.2.5 金属离子对固定化酶的影响　在最佳固定化条件下制备固定化酶,同时相同固定化酶含量的海藻糖合成酶酶液，分别加入 200 g/L pH 7.4 麦芽糖底物和 25% pH 6.6 麦芽糖底物，以及配制的 10 mmol/L 浓度的 Cu^{2+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}、Al^{3+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}溶液，使得金属离子终浓度为 0.4 mmol/L,固定化酶与游离酶分别在 40、30 ℃条件下反应 12 h,用 HPLC 法测定酶活,以不加入金属离子的反应为空白对照。结果如图 9 所示。

结果表明，对于游离酶而言,Ni^{2+}具有激活作用,Cu^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}均具有轻微的抑制作用,其余的金

属离子基本无影响;对于固定化酶而言,仅 Cu^{2+}均具有轻微的抑制作用,Ca^{2+}、Zn^{2+}具有激活作用,而其余的金属离子对酶活基本无影响。说明固定化后酶的空间构象发生改变,金属离子对酶的作用发生变化,固定化后提高了酶的稳定性。

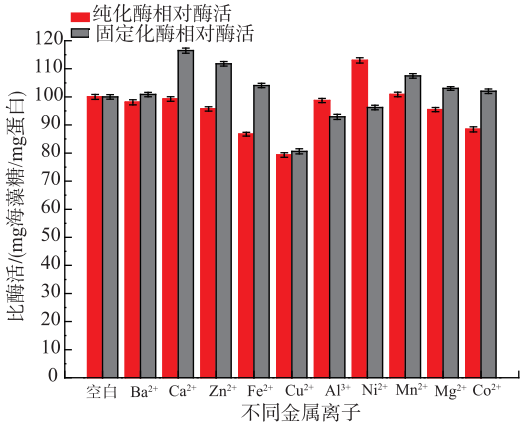


图 9 金属离子对固定化酶以及游离酶的影响

Fig. 9 Influence of metal ions of immobilized enzyme and free enzyme

2.2.6 *固定化效率* 取一定面积的 PAN 载体,在最佳固定化条件下制备固定化酶,计算蛋白偶联率,并在最适反应条件下反应 12 h;同时取进行固定化的等量游离酶液在 pH 6.6、温度 30 ℃、初始底物浓度 250 g/L 的最适反应条件下反应 12 h,采用 HPLC 法进行海藻糖含量的测定。经过 3 次平行实验,蛋白负载率平均 70.09%,而酶活回收率仅为 50.21%,推测有 3 种可能性:①所接入的蛋白超过膜面积应接入的有效蛋白;②固定化载体负载上的蛋白部分失活;③负载的蛋白中,杂蛋白的比例高于游离酶液中的比例。

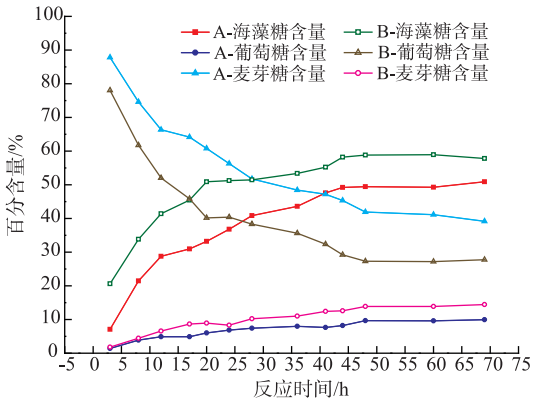
表 1 固定化效率

Table 1 Immobilization efficiency %

样品	固定化蛋白率	酶活回收率
固定化酶 1	69.46	51.64
固定化酶 2	71.83	45.64
固定化酶 3	68.99	53.35
平均值	70.09	50.21

2.2.7 *固定化酶与游离酶反应进程* 在最佳固定化条件下,分别制备相同的固定化酶膜,加入 8 mL 200 g/L 浓度的麦芽糖底物,在 40 ℃、pH 7.4 条件分别反应 4~70 h;同时,取相同蛋白含量的游离酶液,加入 8 mL 质量浓度为 250 g/L 的麦芽糖底物,在 30 ℃、pH 6.6 条件分别反应 4~70 h,取固定化酶和游离酶不同反应时间的反应液,沸水浴 10 min,离心、过膜,用 HPLC 法测不同反应时间各个成分的含量。结果如图 10 所示。

结果表明,对于固定化酶、游离酶而言,随着反应时间的进行,海藻糖含量逐渐升高,伴随着麦芽糖含量的降低以及副产物葡萄糖的增加,最终基本趋于稳定状态;相比之下,经过固定化后的海藻糖合成酶,海藻糖含量变化趋势较游离酶的缓慢,同时副产物葡萄糖的含量较游离酶而言减少近 6%左右,说明,经过固定化后的海藻糖合成酶,相对于游离酶,与底物的亲和力受到影响,但相对于游离酶结构状态更为稳定,副产物葡萄糖含量减少。



注:A-固定化酶反应进程;B-游离酶反应进程

图 10 固定化酶与游离酶反应进程曲线

Fig. 10 Reaction process curve of immobilized enzyme and free enzyme

3 结 语

实验表明,以 PAN 为载体进行海藻糖合成酶固定化,在 pH 7.6、温度 30 ℃,加酶量 0.1 mg/cm² 条件下固定化 3 h,即可制备固定化海藻糖合成酶膜,与文献[9-14]的海藻糖合成酶的固定化而言,载体材料制备方法简单、操作容易、易于控制、成本低、可规模化生产,且固定化条件简单、时间短、无污染等,同时,海藻糖合成酶固定化时使用粗酶液即可,无需纯化。

根据研究表明,游离酶在 pH 6.0~7.0、温度 25~40 ℃较稳定,而固定化海藻糖合成酶在 pH 5.4~8.0、20~50 ℃范围内均保持良好的稳定性,固定化

酶具有更好的耐热性和酸碱稳定性;40 ℃条件下,固定化酶重复使用 6 次后保持初始酶活的 64.4%,具有良好的操作稳定性;固定化酶反应达到平衡后,反应液中副产物葡萄糖的含量仅为 9.1%并呈现稳定状态,文献[13]的固定化酶相比,副产物含量降低约 23%,同游离酶相比降低 6 个百分点,固定化后海藻糖合成酶更加稳定;固定化海藻糖合成酶与游离酶最适初始底物浓度分别为 200 g/L 与 250 g/L,酶固定在载体上后,与底物之间的亲和性相对于游离酶而言仍有一定的局限性,但相对于采用颗粒状载体而言,以膜的形式进行酶的固定化,在很大程度上降低了载体对传质的影响。

因此,以 PAN 作为载体为海藻糖合酶固定化具有很好的应用价值,为海藻糖合成酶的固定化研究提供实验依据并拓展了 PAN 载体在酶固定化中的应用。

参考文献:

[1] PENG Yafeng,ZHOU Yaobin,LI Qing,et al. The characteristics and applications of trehalose [J]. **China Food Additives**,2009(1):65-69.(in Chinese)

[2] CHEN Pei,ZHAO Bing,PANG Yuchen,et al. Research on the effects of trehalose on cake quality [J]. **Guangdong Agricultural Sciences**,2015,42(3):94-98.(in Chinese)

[3] CHEN Yan,LU Zhigang,BAI Hai,et al. Effect of intra/extra-cellular trehalose on the preservation of red blood cells by lyophilization[J]. **Chinese Journal of Blood Transfusion**,2012,25(3):236-239.(in Chinese)

[4] MA Lukai,ZHANG Bing,WANG Xiaoling,et al. Comparison of the cryoprotective effects of trehalose,alginate and alginate-derived oligosaccharides on cooked shrimp(Litopenaeus vannamei)[J]. **Food Science**,2015,36(16):266-271.(in Chinese)

[5] NIE Linhong,NING Zhengxiang. Trehalose in Biopreservation[J]. **Chemisfry Flife**,2001,21(3):206-209.(in Chinese)

[6] QIN Jiamin,LUO Shudong,HE Shaoyu,et al. Researching in characters and functions of trehalose and trehalase in insects[J]. **Natural Enemies of Insects**,2015(1):163-169.(in Chinese)

[7] ZHANG Yuhua,LING Peixue,JI Baoping. Current status of research for trehalose and its prospective applications [J]. **Food and Drug**,2005,7(3):8-13.(in Chinese)

[8] SHANG Hongli,GU Ying. Research on immobilization of trehalose synthase on mesoporous molecular sieve [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**,2012,40(10):6173-6176.(in Chinese)

[9] DING Zhen,LIU Jianlong,WANG Ruiming. Immobilization of trehalose synthase on bacterial cellusose [J]. **China Brewing**,2006(9):19-23.(in Chinese)

[10] WANG Jun. Studies on immobilization of trehalose synthesizing to chitosan as carrier [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**,2004,23(10):1117-1120.(in Chinese)

[11] PANEK A,PIETROW O,SYNOWIECKI J,et al. Immobilization on magnetic nanoparticles of the recombinant trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*[J]. **Food and Bioproducts Processing**,2013,91(4):632-637.

[12] CHO Y J,PARK O J,SHIN H J. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose [J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2006,39(1):108-113.

[13] WU T T,LIN S C,SHAW J F. Integrated process for the purification and immobilization of recombinant trehalose synthase for trehalose production[J]. **Process Biochemistry**,2011,46(7):1481-1485.

[14] 李光. 高分子材料加工工艺学[M]. 北京:中国纺织出版社,2010.

[15] WANG Chunmei,JIA Mengli,YU Jingyu. Dyeing of waste polyacrylonitrile-based carbon fiber precursor [J]. **Dyeing and Finishing**,2015(3):33-35.(in Chinese)

[16] WU Qingyun,WAN Lingshu,XU Zhikang. Enzyme immobilization on polyacrylonitrile-based membranes [J]. **University Chemistry**,2010,25(5):1-7.(in Chinese)

[17] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:78.

[18] 黄日波. 海藻糖:21 世纪的新型糖类[M]. 北京:化学工业出版社,2010:48.