DOI:10.12441/spyswjs.20250805003 [文章编号] 1673-1689(2026)01-0141-13

基于壳聚糖、甲壳素载体的荧光假单胞菌脂肪酶固定化及其水解性能研究

钟浩渝[1] 覃红玉[1] 张 俊[1,2,3*] 李昆太[1,3] 夏秋瑜[1,3] 刘书成[1,3]

(1. 广东海洋大学食品科技学院,广东 湛江 524088; 2. 中国科学院广州能源研究所,广东 广州 510640; 3. 大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心,辽宁 大连 116034)

摘要:【目的】构建具有分级多孔片层结构的壳聚糖和甲壳素载体,系统评估壳聚糖和甲壳素载体对荧光假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas fluorescens* lipase,PFL)的固定化效果,以及该固定化酶催化水解鱼油的性能。【方法】基于溶胶-凝胶法对壳聚糖、甲壳素进行改性,以制备载体,使其与游离 PFL 结合,再检测其酶学性质,并分析其水解凤尾鱼油的产物组成成分。【结果】经化学修饰后的载体呈片层堆叠结构,表面含有丰富的游离氨基,有利于 PFL 的共价固定化。壳聚糖载体的固定化效率达 89.26%,酶负载量为 2.21 g/mg,壳聚糖载体固定化 PFL 的酶活力为 221.33 U/mg,是游离 PFL 的 2.54 倍;甲壳素载体的固定化效率为 71.62%,酶负载量为 1.84 g/mg,甲壳素载体固定化 PFL 的酶活力为 185.34 U/mg,是游离 PFL 的 2.12 倍。壳聚糖、甲壳素载体固定化 PFL 的最适反应条件均为 55 ℃和 pH 8.0,均表现出良好的有机溶剂(甲醇、乙醇和丙三醇)耐受性及储藏稳定性,4 ℃存放 11 d 后酶活力分别为 115.11 U/mg 与 91.43 U/mg。在凤尾鱼油水解反应中,用壳聚糖、甲壳素载体制备的固定化 PFL 水解度分别为 23.1% 和 19.7%,且壳聚糖载体固定化 PFL 中的 EPA 和 DHA 占比分别提高至 25.34% 和 18.51%,甲壳素载体固定化 PFL 中的 EPA 和 DHA 占比分别提高至 25.96% 和 18.89%。【结论】该研究展示了分级壳聚糖、甲壳素载体在增强脂肪酶催化性能方面的应用潜力,为开发新型固定化酶催化体系用于深海鱼油中 ω-3 脂肪酸的高效富集提供了理论基础与实践支持。

关键词:荧光假单胞菌脂肪酶;壳聚糖;甲壳素;固定化酶;水解性能

Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* Lipase onto Chitosan and Chitin-based Carriers and Evaluation of Its Hydrolytic Performance

ZHONG Haoyu[1] *QIN Hongyu*[1] *ZHANG Jun*[1,2,3*] *LI Kuntai*[1,3] *XIA Qiuyu*[1,3] *LIU Shucheng*[1,3]

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to construct chitosan and chitin-based carriers with hierarchical porous lamellar structures, systematically evaluate the immobilization effects of these carriers for *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL) and the performance of the immobilized enzyme in catalyzing the hydrolysis of fish oil. [**Method**] Chitin/chitosan were modified *via* the sol-gel method to prepare the carriers for the binding with free PFL. The enzymatic properties of the immobilized PFL were then evaluated, and then analysed the hydrolysate composition of anchovy oil catalyzed by the immobilized PFL. [**Result**] The modified carriers exhibited lamellar

基金项目:广东省普通高校青年创新人才项目(2023KQNCX025);广东海洋大学科研启动经费资助项目(060302042110,060302042006);广东省普通高等学校海洋食品绿色加工技术研究团队项目(2019KCXTD011)。

通信作者:张俊(1993—),男,博士,讲师,主要从事酶工程研究。E-mail:2523050416@qq.com

收稿日期:2025-08-05 **修回日期:**2025-09-26

structures with abundant free amino groups on the surface, which facilitated covalent immobilization of the enzyme. The chitosan-based carrier achieved the immobilization efficiency of 89.26%, the enzyme loading of 2.21 g/mg, and the PFL enzyme activity of 221.33 U/mg (2.54 folds that of the free enzyme). The chitin-based carrier showed the immobilization efficiency of 71.62%, the enzyme loading of 1.84 g/mg, and the PFL enzyme activity of 185.34 U/mg (2.12 folds that of the free enzyme). The chitosan and chitin-immobilized PFL exhibited optimal catalytic activity at 55 ℃ and pH 8.0, along with significant tolerance to organic solvents such as methanol, ethanol, and glycerol and storage stability. After 11 days of storage at 4 ℃, the enzyme activity reached 115.11 U/mg and 91.43 U/mg, respectively. In the hydrolysis of anchovy oil, the hydrolysis degrees of the chitosan and chitin-immobilized PFL were 23.1% and 19.7%, respectively. The proportions of EPA and DHA in the chitosan-immobilized PFL increased to 25.34% and 18.51%, respectively, while the proportions of EPA and DHA in the chitin-immobilized PFL increased to 25.96% and 18.89%, respectively. [**Conclusion**] This study demonstrates the potential of hierarchical chitosan and chitin-based carriers in enhancing the catalytic performance of lipase and provides a theoretical basis and practical support for the development of immobilized enzymatic systems for the efficient enrichment of *ω*-3 fatty acids from deep-sea fish oils.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens* lipase; chitosan; chitin; immobilized enzyme; hydrolytic performance

荧光假单胞菌脂肪酶（PFL）是一类极具工业应用价值的水解酶，在能源领域可用于生物柴油的生产，在油脂加工方面对甘油酯具有较高的水解度[1]。PFL 三维结构通常包含一个由 α 螺旋和 β 折叠组成的核心结构域，以及一个覆盖活性中心的盖子结构域，这种独特的结构赋予了该酶优异的 *sn*-1，3 位选择性和催化效率[2]。但是，游离 PFL 存在稳定性低、重复使用性差等缺点，导致其应用受限，而这些弊端可通过固定化技术来规避。固定化酶技术通过将酶锚定于载体材料，可显著提升酶的稳定性和使用寿命，但载体的理化性质（如比表面积和孔径结构等）会直接影响酶的负载效率与催化性能。然而，传统的固定化策略通常存在载体价格高昂、酶负载效率低和酶活力提升有限等问题，因此开发低成本载体且探索新的固定化策略具有迫切的现实意义。目前，关于脂肪酶固定化载体的研究主要分为无机材料（纳米颗粒、聚丙烯等）与有机材料（淀粉、甲壳素和壳聚糖等）等[2-3]。本研究所使用的壳聚糖、甲壳素这类天然聚合物因其具有成本低廉、独特的生物可降解性、生物相容性好、无毒性且对蛋白质亲和力强等特点，在研制新型脂肪酶固定化载体方面的前景广阔[4]。

甲壳素是仅次于纤维素的第二大天然多糖，是 *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺单元通过 *β*-（1，4）-糖苷键连接组成的线性聚合物[5]。天然甲壳素的结构复杂而紧密，内部空间通常存在蛋白质和碳酸钙与甲壳素相结合的扭曲网络[6-7]。Zhang 等[8]用天然甲壳素改性制备中空片状大孔载体固定化脂肪酶，酶活力可达 140 U/mg，蛋白质负载率可达 2.8 g/mg。此外，源于甲壳素脱乙酰化的天然多糖壳聚糖富含氨基和羟基，具备高度的可修饰性（如羧甲基化、季铵化），能进一步拓展其在酶蛋白负载能力等方面的适应性，可通过物理吸附、静电作用或化学交联等方式实现高效负载脂肪酶等功能性分子[9]。

目前，深海鱼油因其优异的 *ω*-3 多不饱和脂肪酸（*ω*-3 PUFA）的营养价值而备受市场关注，然而，其二十碳五烯酸（EPA）和二十二碳六烯酸（DHA）的含量无法满足消费者的需求，因而如何绿色高效富集提升深海鱼油的 EPA/DHA 是目前食品与医药领域的研究热点[10]。传统鱼油水解工艺多依赖高温高压或强酸强碱条件，易造成目标产物氧化降解、副产物增多等问题；而酶法水解因其条件温和、选择性强和环境友好等优势成为理想替代方案[11]。凤尾鱼油凭借其高 EPA/DHA 含量、独特的 EPA/DHA 比例、良好的可持续前景和相对较低的污染风险，已成为 *ω*-3 PUFA 研究领域和市场的重要力量。张惠君等[12]采用米黑根毛霉源固定化脂肪酶分析了凤尾鱼油的脂肪酸组成，其中不饱和脂肪酸占比达 50% 以上，单不饱和脂肪酸（MUFA）占比为 24.67%~33.51%，多不饱和脂肪酸（PUFA）占比为 26.89%~36.15%。

基于此，本研究选取壳聚糖、甲壳素作为载体

材料以实现PFL的高效负载，通过酶学性质探究改性载体对固定化PFL催化性能的影响，并分析固定化PFL催化水解凤尾鱼油的转化效率。本研究解析了甲壳素基载体材料的结构特性，有望为固定化酶体系的创新应用提供新策略，可为开发绿色高效的酶法凤尾鱼油精炼工艺提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

甲壳素、壳聚糖、石蜡油、吐温-80、氢氧化钠、尿素、氯化胆碱、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、戊二醛、甘氨酸、三(羟甲基)氨基甲烷、三氯乙酸、异丙醇、4-硝基苯基丁酸酯、4-硝基苯基辛酸酯、4-硝基苯基癸酸酯、4-硝基苯基月桂酸酯、4-硝基苯基肉豆蔻酸酯和4-硝基苯基硬脂酸酯、4-硝基苯基棕榈酸酯(ρNPP)、PFL(75 U/mg)：上海麦克林生化科技股份有限公司；1 mol/L盐酸标准溶液：分析纯，北京普西科技有限公司；凤尾鱼油：分析纯，挪亚圣诺(太仓)生物饲料有限公司。

1.2　仪器与设备

扫描电子显微镜：JEOL 7610F型，捷欧路(北京)科贸有限公司上海分公司；傅里叶变换红外光谱仪：Thermo Scientific Nicolet iS50型，赛默飞世尔(上海)仪器公司；酶标仪：Multiskan FC型，赛默飞世尔(上海)仪器公司；冷冻干燥机：LGJ-12F型，北京四环起航科技有限公司；台式冷冻离心机：H2050R型，湖南湘仪科技有限公司；集热式恒温加热磁力搅拌器：DF-101S型，河南豫华仪器科技有限公司。

1.3　方法

1.3.1　壳聚糖、甲壳素载体的改性制备

参考Zhang等[8]的方法并稍加修改，配制m(NaOH)∶m(尿素)∶m(H_2O)=8∶4∶88的溶液，分别取3 g壳聚糖、甲壳素加入97 g上述溶液，在−20 ℃条件下冻结成冰，冰层融化前剧烈搅拌至壳聚糖、甲壳素粉末均匀分布后再次冻结，重复冻融搅拌，直至沉淀完全溶解，制得质量分数3%的壳聚糖、甲壳素溶液。

取100 g石蜡油加入1 g吐温-80，在冰浴条件下缓慢倒入上述壳聚糖、甲壳素溶液，低速搅拌3 h。在25 ℃、5 000 r/min条件下用去离子水离心，去除结构内部的石蜡油与吐温-80，然后用无水乙醇洗涤去除结构内部析出的石蜡油，最后再用去离子水离心以除去残余的无水乙醇，收集沉淀并冷冻干燥得到壳聚糖、甲壳素载体。

1.3.2　固定化PFL的绿色制备

将4 mg PFL、1 g载体加到10 mL的PBS缓冲溶液(pH=8.0)中，在冰浴条件下搅拌2 h，搅拌结束后于4 ℃放置过夜。固定化结束后用PBS缓冲溶液洗涤沉淀3次，洗去残余未固定化的游离PFL，收集洗涤出的上清液，用BCA试剂盒测定上清液中的蛋白质质量浓度，确定固定化效率。

称取1.3.1中制得的样品0.05 g至2 mL PBS缓冲溶液(0.05 mol/L、pH=8.0)中，加入200 μL的PFL(1 mg/mL)，在冰浴条件下于100 r/min混合搅拌3 h，然后于5 000 r/min离心5 min。所得沉淀即为固定化PFL，保留上清液，用PBS缓冲溶液清洗固定化PFL 3次，收集清洗的所有上清液。并测定蛋白质质量浓度，通过式(1)计算其固定化效率。

$$Q=\frac{m_0-m_1}{m_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

Q——固定化效率，%；

m_0——总蛋白质质量浓度，μg/mL；

m_1——上清液中蛋白质质量浓度，μg/mL。

1.3.3　固定化PFL的酶活力测定

脂肪酶水解4-硝基苯酚棕榈酸酯会产生对硝基苯酚，对硝基苯酚在碱性条件下显黄色。因此，检测410 nm处的吸光度，采用标准曲线法测定对硝基苯酚的浓度并测定酶活力。脂肪酶的酶活力单位定义为每分钟水解4-硝基苯酚棕榈酸酯释放出1 μmol对硝基苯酚所需的酶量。根据式(2)计算酶活力回收率。

$$R=\frac{I}{F}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

R——酶活力回收率，%；

I——固定化酶的酶活力，U/mg；

F——游离酶的酶活力，U/mg。

1.3.4　固定化PFL的催化特性

使用1.3.3的酶活力测定方法，分别对壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的最适温度和pH、储藏稳定性、底物特异性、有机试剂耐受性、重复利用性进行研究。

1）最适温度和pH：将壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL分别置于35、45、55、65、75 ℃的水浴中，以及pH分别为6.0~8.5（PBS）、9.0~10.0（Gly-NaOH）的缓冲溶液中，按照1.3.3的方法测定酶活力。

2）储藏稳定性：将壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL置于4 ℃中储藏，按照1.3.3酶活力测定方法每隔24 h测定一次酶活力，探究14 d内的酶活力变化。

3）有机试剂稳定性：在反应体系中分别加入体积分数为5%、10%、25%、50%的有机试剂（甲醇、乙醇、丙三醇、正丁醇、正己烷、糠醛），按照1.3.3的方法测定酶活力。

4）底物特异性：选择碳链长度分别为4、8、10、12、14、16、18的对硝基苯酚酯来研究固定化PFL对不同底物的偏好性。

5）重复利用性：按照1.3.3的方法测定酶活力，将壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL用PBS缓冲溶液清洗后进行重复测定。

1.3.5 固定化PFL催化凤尾鱼油水解

根据李艳阳等[13]的方法并稍加修改，用PFL水解凤尾鱼油。将5 g凤尾鱼油置于圆底烧瓶中，分别加入质量分数5%的壳聚糖、甲壳素固定化PFL和5~20 mL磷酸盐缓冲溶液（由0.2 mol/L Na_2HPO_4与0.3 mol/L NaH_2PO_4混合调配，pH 5.5~8.0），置于磁力控温搅拌器中，在100~300 r/min、30~45 ℃条件下水解8 h。称取0.2 g凤尾鱼油水解液，加5 mL无水乙醇-乙醚溶液（乙醇与乙醚体积比为1∶2）、滴加1~2滴酚酞作为指示剂，混匀，用0.1 mol/L的NaOH溶液滴定，以反应液变为微红色且30 s内不褪色作为滴定终点，进行3次平行测定。按照式（3）计算水解度。

$$D=\frac{56.1\times c\times V}{m\times 0.25\times 187} \quad (3)$$

式中：

D——水解度；

56.1——KOH摩尔质量，g/mol；

c——NaOH溶液浓度，mol/L；

V——NaOH溶液体积，mL；

m——水解液质量，g；

0.25——油相在水解液中的占比；

187——凤尾鱼油的皂化值，mg/g。

1.3.6 水解甘油酯的提取

在水解液中加入2 mL无水乙醇终止反应，再逐滴加入0.1 mol/L的NaOH溶液中和游离脂肪酸，根据水解度计算所需NaOH溶液的体积。先后用乙醚和正己烷萃取水解甘油酯，于45 ℃旋转蒸发，氮气吹干残留的有机溶剂后，于4 ℃下密封保存。

1.3.7 表征仪器与方法

利用傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared，FTIR）分析样品官能团的光谱。将样品研磨并与KBr按质量比为1∶200进行混合，压片后进行测试，以KBr作为空白对照，在4 000~500 cm^{-1}波数范围内分析样品所含官能团变化。

用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）在2 000~20 000的放大倍数下观察不同条件处理后的样品外部形貌。

使用酶标仪测定样品的OD_{410}值和OD_{562}值。

1.3.8 PFL水解凤尾鱼油所得甘油酯的脂肪酸组成分析

1）样品甲酯化：准确称取0.2 g样品于25 mL具塞试管中，加入3 mL KOH-甲醇溶液，振荡后置于50 ℃烘箱中30 min，直至油滴消失。将试管取出，冷却至室温，向其中加入2 mL正己烷，振荡，静置2 min后，取出上清液。向上清液中加入适量的无水硫酸钠，猛烈振荡，滤膜过滤，在4 ℃下保存以供GC-MS分析。

2）GC-MS分析条件：载气为氦气，压力54.2 kPa，控制模式为线速31.5 cm/s，总流量41.7 mL/min，色谱柱流量0.7 mL/min；分流方式进样，体积比50∶1，进样量1 μL。进样口温度250 ℃，FID检测器温度250 ℃。色谱柱先于130 ℃保持5 min，然后以4 ℃/min升至240 ℃，保持30 min，直至分析完成。采用GC-MS质谱库结合脂肪酸甲酯混合标准品对样品中的脂肪酸进行定性，确定样品中脂肪酸甲酯的样品峰，用面积归一化法进行定量（不计溶剂峰面积），以确定各种脂肪酸的占比。

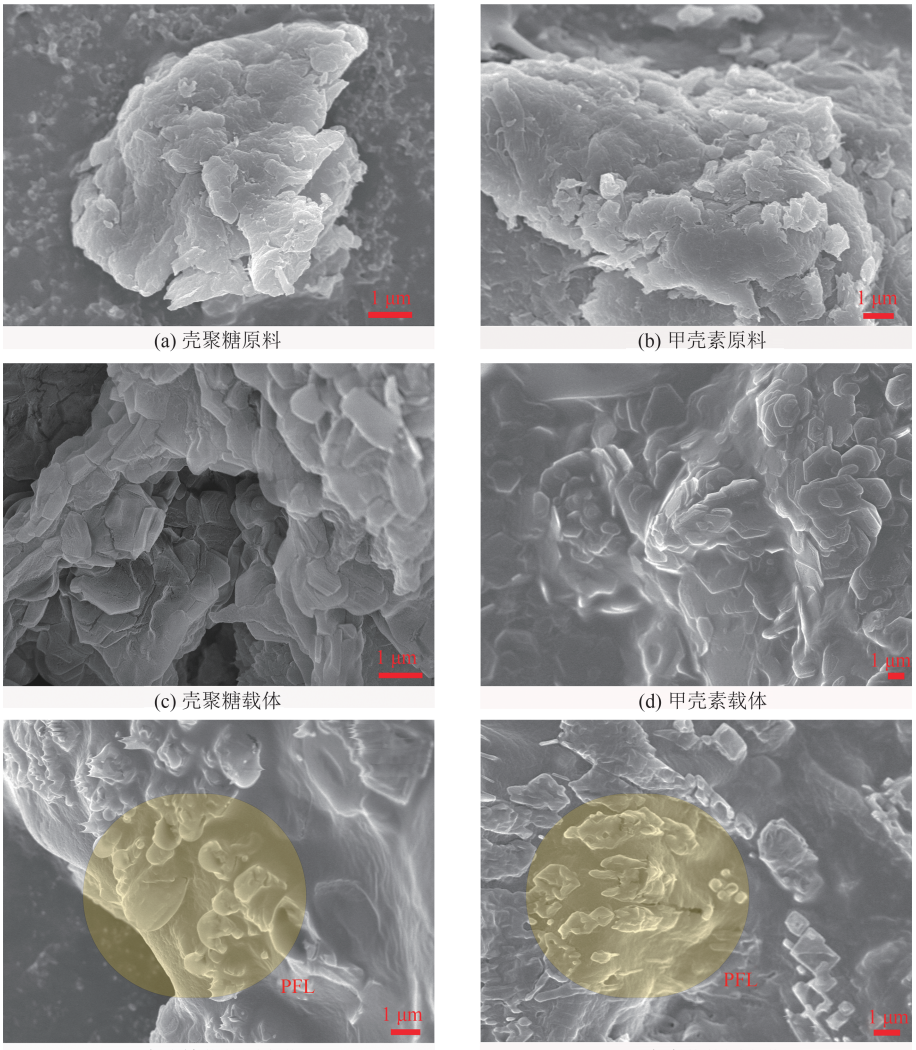
1.4 数据与分析

所有试验均重复进行3次，结果表示为平均值±标准差，采用Origin 2024进行数据分析。

2　结果与讨论

2.1　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL及固定化酶的形貌特征

载体的结构特征和特性对于脂肪酶的固定化尤为重要，使用SEM对壳聚糖、甲壳素载体进行形貌分析。如图1(a)~(b)所示，甲壳素和壳聚糖的原料基本没有区别。如图1(c)~(d)所示，制备的甲壳素载体和经过脱乙酰化的壳聚糖载体均具有明显的片层结构。此外，本课题组前期通过相同方法制备的固定化酶载体的表面大部分区域呈现片层堆叠结构，有碎片剥落状特征，整体呈现出交叠和延伸的形貌，这种结构赋予载体一定的吸附架桥能力，基于载体表面褶皱紧密结合呈现出的片层结构，可增大载体的比表面积，还有利于提升PFL的负载性能，并通过形成更多的活性结构来进一步增强载体对PFL的吸附能力[8]。如图1(e)~(f)所示，PFL被有效固载于载体表面。



(a) 壳聚糖原料　(b) 甲壳素原料

(c) 壳聚糖载体　(d) 甲壳素载体

(e) 壳聚糖载体固定化PFL　(f) 甲壳素载体固定化PFL

图1　载体材料及固定化酶形貌特征的SEM分析

Fig. 1　SEM analysis of morphological features of carrier materials and immobilized enzyme

进一步进行定量分析，以蛋白质质量浓度为横坐标，OD_{410}值为纵坐标建立标准曲线，用于测定固定化效率。曲线方程为y=0.010 6x+0.150 8，R^2=0.990 4。壳聚糖载体的固定化效率为89.26%，酶活力为221.33 U/mg，酶负载量为2.21 g/mg；甲壳素载体的固定化效率为71.62%，酶活力为185.34 U/mg，酶负载量为1.84 g/mg。综合上述分析可知，经改性处理后的壳聚糖、甲壳素载体的片

层多孔结构有利于PFL的负载，从而能增强固定化PFL的性能。

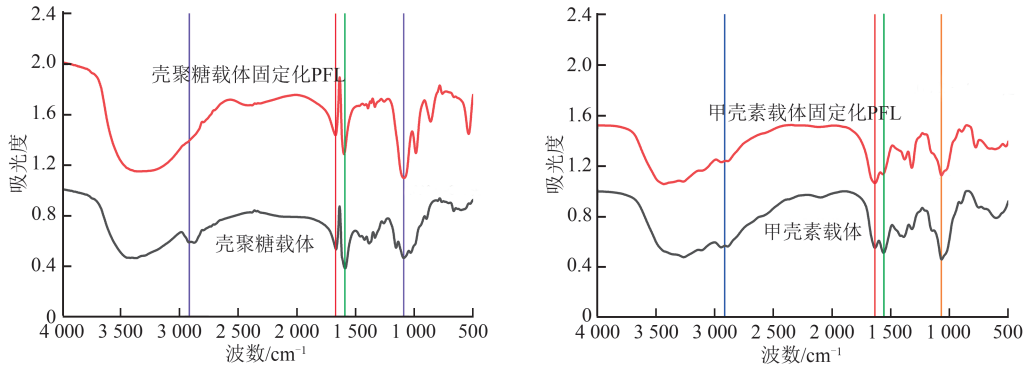
2.2 壳聚糖、甲壳素载体及其固定化PFL的化学结构

参照Dwivedee等[14]的PFL游离酶红外光谱分析结果，分析PFL的化学结构，结果见图2。3 700~3 100 cm^{-1}之间的吸收峰与OH的伸缩振动有关，反映氢键的强度。通过对比固定化前后3 700~3 100 cm^{-1}之间光谱带的变化，在经过固定化处理后，羟基的特征峰增强，表明经过处理后的壳聚糖、甲壳素载体O—H数量增加，载体可能具有亲水性表面，且该载体可能将PFL进行了固定化，同时也证实了PFL经固定化后的天然构象得到固定和保存。

固定化载体在2 915 cm^{-1}处出现C—H伸缩振动特征吸收峰，该峰为有机修饰层（如长链烷基、氨基官能团）的特征峰，证实载体骨架中C—H结构完整。值得注意的是，Dwivedee等[14]的PFL游离酶却有该特征峰，而PFL经过固定化处理后，此特征峰明显减弱甚至消失，表明PFL通过表面修饰层与载体发生特异性结合，导致原有C—H振动信号被屏蔽或修饰层构象发生重排。这一现象可作为载体功能化修饰及酶成功固载的双重光谱学证据。

而1 670、1 635 cm^{-1}附近的谱带可认为是次级酰胺C=O伸缩振动产生的酰胺I带，此处的特征峰表明PFL通过物理吸附或共价结合固定在载体上。纳米壳聚糖、甲壳素的胺官能团有利于酰胺化反应等，这取决于官能团与胺基团连接的反应活性。纳米壳聚糖与酶的共轭可通过桥接机制和相反电荷的相互作用形成酰胺键[15]。1 590、1 558 cm^{-1}的特征带则属于酰胺II带[15]，这与1 670 cm^{-1}处的峰共同说明了PFL存在，结合上述分析证明，PFL已成功固定于壳聚糖、甲壳素材料上。

固定化载体在1 090、1 068 cm^{-1}处检测到的吸收峰可能是壳聚糖、甲壳素载体的醚键或酯键的C—O—C振动，说明载体可能为多糖类材料，具有高机械强度或生物相容性。对比固定化前后的峰值，表面经固定化后的载体具有更高的机械强度或生物相容性。壳聚糖载体在2 915 cm^{-1}处检测到的吸收峰，进一步说明载体具有完整的碳链骨架并确认载体经过有机修饰。



(a) 壳聚糖载体固定化PFL (b) 甲壳素载体固定化PFL

图2 壳聚糖、甲壳素载体材料及其固定化PFL的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 2 Fourier transform infrared spectra of chitosan and chitin carrier materials and their immobilized PFL

2.3 固定化PFL的生化特性评估

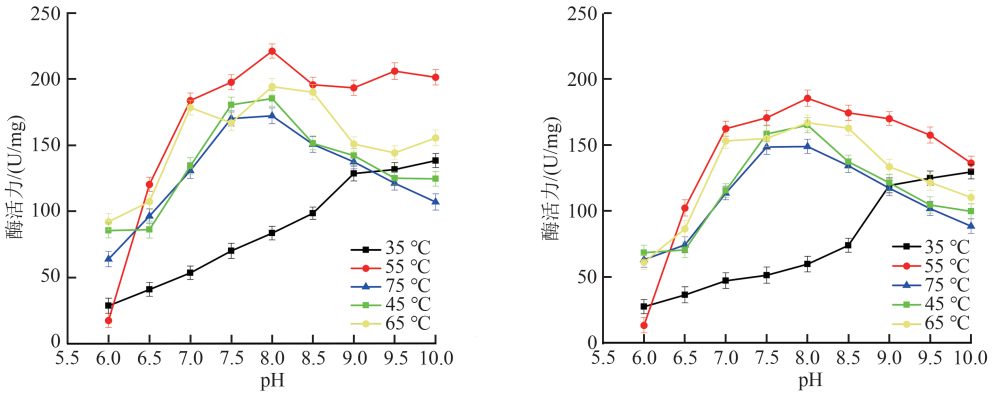
2.3.1 温度及pH对固定化PFL的酶活力的影响

壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在不同pH体系下的酶活力变化见图3。结果表明，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的最佳pH均为8.0，偏酸性的缓冲体系会大幅抑制其酶活力，PFL更倾向于在碱性条件下表达活性。对比同pH下的体系，Gly-NaOH缓冲体系在pH=9.0时的酶活力弱于在pH=8.0的2种缓冲溶液；当pH>9.0时，Gly-NaOH缓冲体系中NaOH配比增大，会对试验中的显色反应造成干扰，因此不对后续pH进行进一步探究。

不同pH条件下不同孵育温度（35~75 ℃）的影响研究结果表明，固定化PFL的最佳孵育温度为55 ℃，在不合适的孵育温度下，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的酶活力均受到明显抑制，导致酶活力低于最佳温度条件下酶活力的50%。由此

可知，温度过低或者过高不仅会影响酶的聚集状态，还可能导致壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的变性失活。而经过壳聚糖、甲壳素载体的固定化后并没有改变PFL的pH和温度适应性，其最佳pH为8.0，最佳反应温度为55 ℃。结果表明，固定化PFL的pH和温度特性没有受到影响。

pH通过调控酶分子表面电荷分布及活性中心影响2种载体固定化PFL与底物的结合亲和力与催化能力。由图3可知，尽管壳聚糖因脱乙酰化暴露氨基而带正电荷（甲壳素不带电荷），但2种载体固定化PFL的酶活力无显著差异（两者最高酶活力相差约35 U/mg）。两者结合机制上可能存在差别，原因如下：一是缓冲体系屏蔽效应，PBS（pH 8.0）的高离子强度削弱了壳聚糖正电荷的静电吸附优势；二是脱乙酰化仅改变了官能团，未能显著破坏壳聚糖、甲壳素的晶体结构，这使得负载酶的作用力主要依赖物理包埋与疏水作用，而非静电引力；三是对于大分子酶，固定化的主导机制是载体大孔结构对酶的空间限域作用，而非静电吸附[16]。因此，决定酶活力的关键因素包括由反应条件、酶特性及载体物理结构，三者共同调控酶活力。通过测定酶在pH 6.0~10.0与35~65 ℃范围内的固定化酶活力响应曲线，可解析其最适工作区间、酸碱/热稳定性阈值及热失活临界点，为工业级酶反应的参数优化和极端环境适用型固定化酶的理性设计提供依据[17]。结果表明，在最适温度和pH条件下，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力优于甲壳素载体固定化PFL。同时，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL均保持了PFL的最适pH与温度特性，证实固定化过程未改变该酶的固有特性。



(a) 壳聚糖载体固定化PFL　　(b) 甲壳素载体固定化PFL

图3　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在不同pH和温度环境下的酶活力

Fig. 3　Activities of chitosan and chitin-based carrier-immobilized PFL in different pH and temperature environments

2.3.2　热稳定性

固定化酶在实际工业应用（如油脂水解、生物柴油生产等）中，往往需要在特定温度下长时间运行或经历预热阶段。评估其在预设温度下经历一段孵育时间后的剩余酶活性，直接反映了酶的热稳定性，这是决定其工业实用价值和使用寿命的关键性能指标[18]。图4显示了不同孵育温度（35~75 ℃）、不同孵育时间（0.5~3.0 h）对壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL活性的影响。当孵育温度为35 ℃时，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力先随着孵育时间的延长而提升，在孵育1.5 h时的酶活力达到顶峰，而甲壳素载体固定化PFL在孵育1.0 h时，酶活力达到顶峰，后续随着孵育时间的延长两者的酶活力均逐渐下降；当孵育温度为55 ℃时，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力在孵育时间为0.5~2.0 h时逐步提升，并在2.0 h时达到峰值，而甲壳素载体固定化PFL的酶活力在1.5 h时达到峰值；当孵育温度为75 ℃时，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力也在孵育时间为0.5~2.0 h时逐步提升，并在2.0 h时达到峰值，但甲壳素载体固定化PFL的酶活力却在逐步下降。游离PFL的最佳孵育温度为55 ℃，而壳聚糖载体固定化PFL在75 ℃展现出较高的酶活力，说明固定化技术提高了PFL的热稳定性。当孵育时间为2.0~3.0 h时，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的酶活力逐步下降，这种现象为不可逆的，原因可能是热量的累积使酶的空间结构发

生扭转，部分酶失活引起总体酶活性下降[8]。进一步提高孵育温度可以看到固定化PFL逐渐失活，孵育温度为35 ℃时，在0.5~1.0 h时仍能看到因热量累积触发的激活效应，但酶活力明显低于55 ℃。酶活力随孵育时间延长而逐步降低，该变化趋势从侧面表明：长时间的孵育可能引发固定化PFL空间构象发生不可逆改变，最终造成固定化PFL的渐进性失活。

综上，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力在最佳反应温度下孵育2.5 h前高于甲壳素载体固定化PFL，但在2.5 h后略低于甲壳素载体固定化PFL，说明壳聚糖载体固定化PFL的热稳定较好。载体固定化脂肪酶失活现象同样存在于其他材料固定化脂肪酶的研究中。Zha等[19]通过简便的一锅法和配位驱动的自组装策略开发出一种混合脂肪酶@ZIF-8的生物催化剂，当反应温度超过50 ℃时，脂肪酶活力逐渐降低；当孵育温度达到70~80 ℃时，持续暴露在高温下最终导致脂肪酶完全失活。

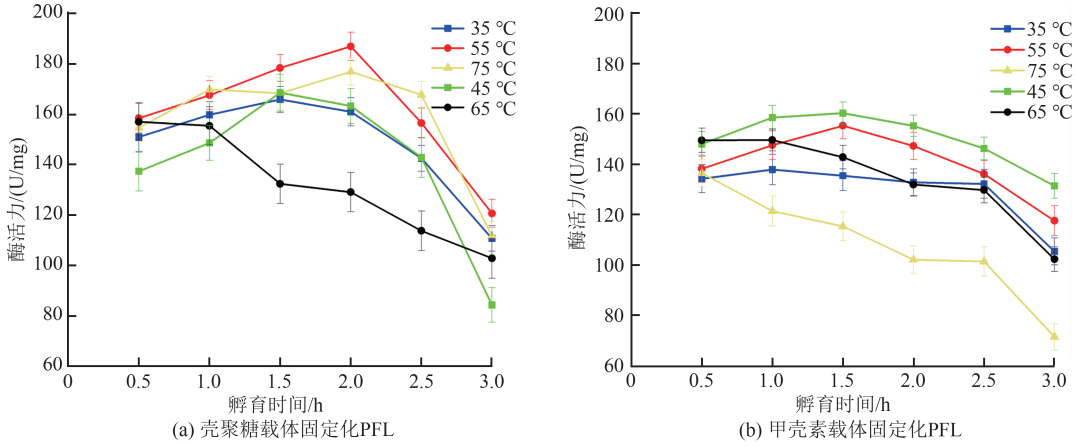
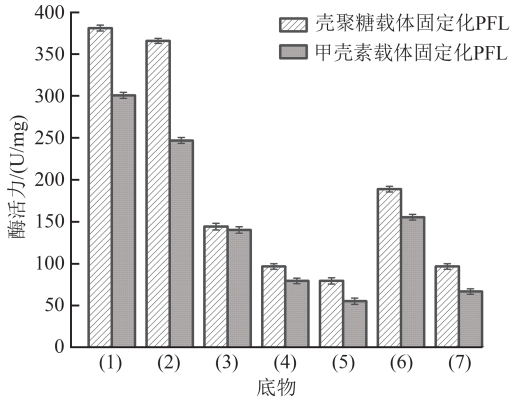


图4　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在不同孵育温度和时间下的酶活力

Fig. 4　Activities of chitosan and chitin-based carrier-immobilized PFL incubated at different temperatures and for different time periods

2.3.3　底物特异性

由图5得知，以壳聚糖、甲壳素为载体制备的固定化酶对底物4-硝基苯基丁酸酯的作用效果最强，对4-硝基苯基硬脂酸酯的作用效果最弱，说明其对水解短链脂肪酸的偏好性更强。其原因为丁酸为C_4链脂肪酸，苯基硬脂酸为C_{18}链脂肪酸，而PFL更倾向于水解短链脂肪酸，因此在同时间内对4-硝基苯基丁酸酯水解最彻底。另外，固定化PFL对中链脂肪酸的水解能力也表现出优异的效果。壳聚糖载体固定化PFL在水解短链和中链脂肪酶方面表现优异，其水解各类底物所展现的酶活力远高于甲壳素载体固定化PFL，在面对长链脂肪酸时，随着碳链的增长，两者的酶活力呈下降趋势。在长链脂肪酸底物体系中，酶活力随碳链增长呈下降趋势，说明2种载体固定化的PFL更倾向于中链脂肪酸底物。固定化过程改变了酶的水解特性，使其最佳底物由中链脂肪酸转变为短链脂肪酸。



（1）—4-硝基苯基丁酸酯；（2）—4-硝基苯基辛酸酯；（3）—4-硝基苯基月桂酸酯；（4）—4-硝基苯基肉豆蔻酸酯；（5）—4-硝基苯基硬脂酸酯；（6）—4-硝基苯基棕榈酸酯；（7）—4-硝基苯基癸酸酯。

图5　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的底物水解偏好性

Fig. 5　Substrate hydrolysis preferences of chitosan and chitin-based carrier-immobilized PFL

该结果可能是由PFL与壳聚糖、甲壳素载体共价交联时，酶结构上的某些基团与载体上的基团结

合引发了酶活力的改变[8]。Stemler等[20]研究了各种脂肪酶的底物特异性，发现常见的脂肪酶只能水解1种或2种脂肪酸，因此本研究所用的壳聚糖载体能在一定程度上扩展PFL的应用范围。

2.3.4　储藏稳定性

固定化脂肪酶的储藏稳定性是衡量其商业化应用的重要指标之一[21]。壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在14 d内的储藏稳定性结果见图6。以0 d测得的酶活力为原始酶活力，间隔24 h测定固定化PFL的酶活力。结果表明，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力均高于甲壳素载体固定化PFL，两者的酶活力均在5 d时下降至原始酶活力的80.6%，在6 d时下降至原始酶活力的80.0%以下，后续其酶活力呈梯度下滑趋势。

这可能是由于储藏时固定在壳聚糖载体的纤维网状结构不太稳定，重复洗涤使得外层的PFL较容易脱落成游离PFL，缺少载体保护的PFL在反复冻融操作下容易发生蛋白质变性导致PFL失活；而固定于壳聚糖内部的PFL取代了杂蛋白质与壳聚糖的交联位点，且被壳聚糖内部的层叠结构束缚，最后使得固定化PFL的稳定性显著提升，可耐受反复冻融的恶劣条件，且在2~9 d内能保留较为稳定的酶活力[8]。Atiroğlu等[22]合成了透明质酸涂层的磁性纳米粒子功能化氧化石墨烯复合材料作为脂肪酶的固定化载体，并在60 d的储藏周期内保持了80%的酶活力。壳聚糖、甲壳素固定化载体经过本研究中的方法处理后，能够表现出与合成材料类似的特性，且壳聚糖载体固定化PFL在14 d内的酶活力均高于甲壳素载体固定化PFL。

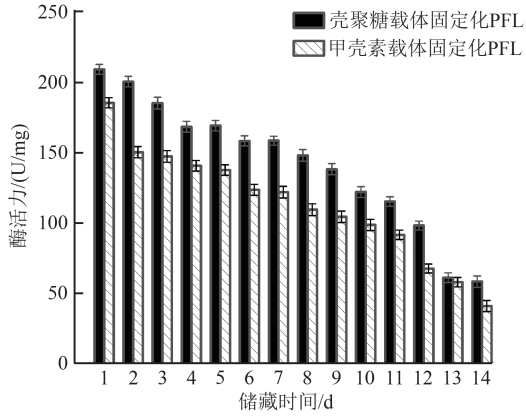


图6　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的储藏稳定性

Fig. 6　Storage stability of chitosan and chitin-based carrier-immobilized PFL

2.3.5　有机试剂耐受性

有机试剂耐受性是影响脂肪酶在非水相中催化能力的重要因素。一般来说，当酶暴露在非水体系中时，酶的结合水极易受到影响，进而容易被剥离，从而导致酶的天然结构受到破坏，引起酶的快速失活[23]。为探究壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在有机试剂中的酶活力变化，在其反应体系中选择不同的有机溶剂，包括甲醇、乙醇、丙三醇、正己烷、糠醛和正丁醇。

以最佳反应条件（pH 8.0的PBS缓冲溶液，温度55 ℃）下的酶活力为原始酶活力，不同的反应溶剂对2种载体固定化PFL的影响结果见图7。与原始酶活力相比，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在甲醇、丙三醇和乙醇体系中的酶活力有所升高，说明在甲醇和丙三醇体系中固定化PFL的酶活力反而得到了强化。壳聚糖载体固定化PFL在甲

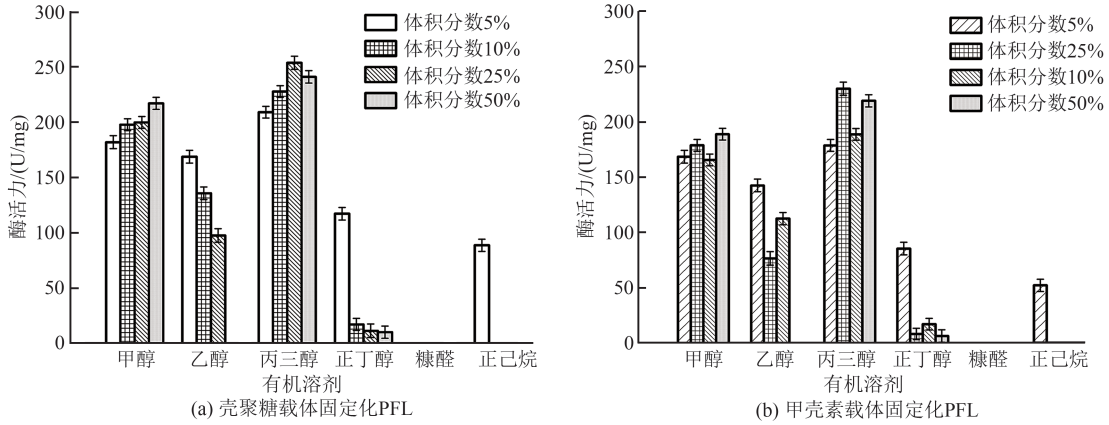


图7　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的有机溶剂耐受性

Fig. 7　Organic solvent tolerance of chitosan and chitin-based carrier-immobilized PFL

醇体系中的耐受性能最强，最高可达216.72 U/mg。覃红玉等[24]研究发现，甲醇与诱导酶失活及酶促反应活化自由能升高密切相关，这可能是造成壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在不同水平甲醇溶液中酶活力变化无规律的原因。

当丙三醇体积分数为5%~25%时，2种载体固定化PFL的酶活力呈升高趋势；当丙三醇体积分数为50%时，其酶活力开始下降，但仍高于原始酶活力，说明固定化酶在丙三醇中的酶活力得到提升。此外，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在体积分数为5%~10%的乙醇体系中也表现出良好的耐受性；壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在糠醛反应体系中的酶活力被完全抑制。壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在甲醇、乙醇和丙三醇等短链醇中表现出较好的耐受性能，说明其在短链醇参与的有机合成中具有良好的应用前景。

2.3.6 重复利用性

壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在10次重复利用过程中酶活力的变化见图8，壳聚糖载体固定化PFL的酶活力始终高于甲壳素载体固定化PFL。通过载体结合法固定化的PFL可循环使用，这种稳定性源自固定化材料对酶分子结构的保护作用及较高的抗变性能力[25]。在重复利用7次时，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的酶活力下降幅度较明显，酶活力分别减少了168.80 U/mg和145.07 U/mg，可能是由于在对固定化酶清洗过程中，材料表面遭到破坏，使PFL从材料中剥离，导致酶活力骤降。随着使用次数的增加，固定化PFL的酶活力逐渐下降，在重复利用2~6次时，仍能保持较好的酶活力，而在重复利用8次时，酶活力基本消失，直至第9次重复利用时，酶活力完全消失。相较于游离PFL的单次使用模式，具有良好重复利用性的壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL在实际应用中可大大降低生产成本。在油脂水解和酯类合成等连续化生产过程中，该特性可大幅减少酶制剂的消耗量，同时降低反应后分离纯化的设备投入，从而有效控制酶催化环节的成本[25]。

2.4 PFL水解凤尾鱼油

2.4.1 壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL水解凤尾鱼油的水解度分析

游离PFL与壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL对凤尾鱼油的水解效果见图9。随着反应时间的

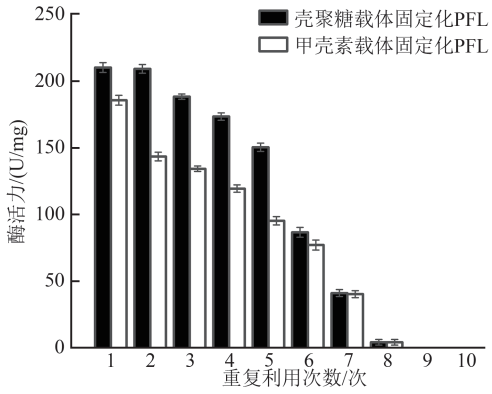


图8 壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的重复利用性

Fig. 8 Reusability of chitosan and chitin-based carrier-immobilized enzyme

延长，3种酶的水解度均呈现典型的酶促反应动力学特征：在0.5~4.0 h内呈现快速上升趋势；4.0~8.0 h增速逐渐放缓；8.0 h后各体系均达到相对稳定状态；最终在12.0 h时达到峰值，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的水解度分别达到23.1%和19.7%。值得注意的是，与游离PFL相比，壳聚糖载体固定化PFL表现出最优异的催化性能。在相同水解时间下，壳聚糖载体固定化PFL的最高水解度较游离PFL提升了约38.2%，相同条件下甲壳素固定化PFL的水解度较游离PFL增加了25.6%。李艳阳等[13]利用固定化脂肪酶ROL水解凤尾鱼油，优化后的水解度为21.3%，证明载体固定化技术能显著增强酶活力。

本研究中，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL催

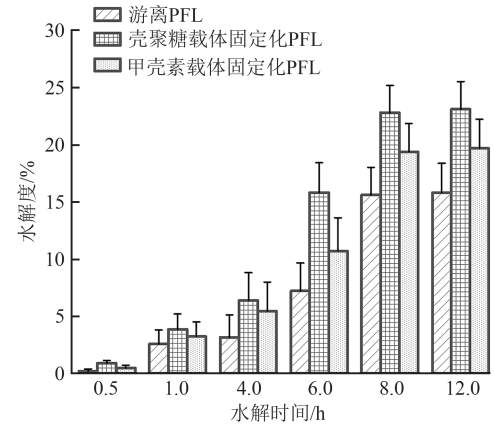


图9 不同水解时间下壳聚糖、甲壳素固定化PFL催化水解凤尾鱼油的水解度

Fig. 9 Degree of anchovy oil hydrolysis catalyzed by chitosan and chitin-based carrier-immobilized enzyme after hydrolysis for different time periods

化水解凤尾鱼油水解度的提升主要归因于固定化载体的多重优势：一方面，壳聚糖、甲壳素的三维网状结构为PFL提供了稳定的微环境，有效维持其活性构象；另一方面，载体表面的氨基等活性基团可通过化学交联增强PFL的固定作用，增加PFL的活性位点，使酶活力显著提升[26]。另外，壳聚糖载体较甲壳素载体表现出更优的固定化效果，这可能与其更好的亲水特性有关，且这些结构优势有利于底物的传质扩散和酶-底物复合物中间体的形成[27]，从而提升了壳聚糖载体固定化PFL对凤尾鱼油的水解度。

2.4.2　壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL水解凤尾鱼油所得甘油酯的脂肪酸组成分析结果

酶法水解凤尾鱼油时，不同水解度所得水解甘油酯的组成和结构有差异。由于ω-3 PUFA极不稳定，水解时间过长容易导致产物氧化变质，因此本研究选择在12 h时终止反应，提取水解甘油酯，分析其脂肪酸组成，见表1。结果表明，不同载体固定化PFL对鱼油脂肪酸具有选择性水解作用。随着壳聚糖、甲壳素固定化载体的加入，饱和脂肪酸（SFA）和单不饱和脂肪酸（MUFA）占比降低，SFA占比从31.88%分别降至24.88%和25.73%，MUFA占比从26.11%分别降至19.45%和20.80%；而多不饱和脂肪酸（PUFA）占比显著提升，从42.15%分别增至55.95%和53.54%。其中EPA、DHA占比显著提升，EPA占比从17.11%分别增至25.34%和25.96%，DHA占比从15.47%分别增至18.51%和18.89%。这可能是因为EPA与DHA分子中顺式碳碳双键形成的分子构象会导致脂肪酸链发生弯曲折叠，使脂肪酸链末端的甲基与酯键的空间距离大幅缩短，进而产生显著的空间位阻效应，增大了PFL的活性位点接近脂肪酸与甘油主链之间酯键的难度[28]。壳聚糖载体固定化PFL对SFA和MUFA的水解强度高于甲壳素载体固定化PFL，且壳聚糖载体固定化PFL对PUFA的富集效果最突出。这表明不同载体的选择性存在差异，壳聚糖载体固定化PFL更适用于凤尾鱼油的生产。这些差异对凤尾鱼油在食品、医药等领域的应用具有重要意义。

综上，与甲壳素载体固定化PFL相比，壳聚糖载体固定化PFL水解凤尾鱼油能降低SFA占比，并增加PUFA占比，表现出较好的脂肪酸改性效果。因此，经过壳聚糖载体固定化酶改性后的凤尾鱼油脂质具有作为功能性结构脂质的潜力。

表1　凤尾鱼油水解前后的主要脂肪酸组成及占比

Table 1　Composition and proportions of major fatty acids in anchovy oil before and after hydrolysis

样品	脂肪酸占比/%					
	C14∶0	C16∶0	C16∶1	C18∶0	C18∶1	C20∶4
凤尾鱼油	8.19	18.45	11.79	3.80	12.69	0.85
壳聚糖载体固定化PFL水解的凤尾鱼油	6.78	14.47	8.49	2.61	9.57	1.04
甲壳素载体固定化PFL水解的凤尾鱼油	6.97	14.96	9.32	3.75	10.46	0.98
样品	脂肪酸占比/%					
	C20∶5n3（EPA）	C22∶5n3（DPA）	C22∶6n3（DHA）	SFA	MUFA	PUFA
凤尾鱼油	17.11	3.10	15.47	31.88	26.11	42.15
壳聚糖载体固定化PFL水解的凤尾鱼油	25.34	3.25	18.51	24.88	19.45	55.95
甲壳素载体固定化PFL水解的凤尾鱼油	25.96	3.29	18.89	25.73	20.80	53.54

3　结论

本研究采用生物相容性良好、成本低廉的壳聚糖与甲壳素材料构建固定化载体，系统比较了其对PFL的固定化性能。结果表明，壳聚糖载体在PFL负载能力及催化性能方面明显优于甲壳素载体，其固定化效率高达89.26%，酶负载量为2.21 g/mg，固定化PFL的酶活力最高达221.33 U/mg。同时，固定化PFL在pH及温度稳定性、热稳定性、有机溶剂耐受性、储藏稳定性及重复使用性方面均优于游离PFL。在凤尾鱼油水解反应中，壳聚糖、甲壳素载体固定化PFL的水解度分别达到23.1%和19.7%，且壳聚糖载体固定化PFL中的EPA和DHA占比分别提高至25.34%和

18.51%，甲壳素载体固定化 PFL 中的 EPA 和 DHA 占比分别提高至 25.96% 和 18.89%。根据前人的制备方法，本研究使用脱乙酰度更高的壳聚糖为载体，与更适合催化凤尾鱼油的 PFL 结合，构建出更高效、稳定的新型酶固定化材料；同时也将其进一步应用到凤尾鱼油中，为深海鱼油的酶催化高值化加工提供了潜在的技术路径。但本研究未明确揭示酶在壳聚糖与甲壳素载体上的负载机制，该作用机制的缺失，限制了从载体设计维度解析固定化效率、酶催化活性之间的构效关系，也难以明确各参数调控固定化酶性能的核心逻辑。

参考文献

[1] ZHANG J，CHEN X Y，LV P M，et al. Bionic-immobilized recombinant lipase obtained *via* bio-silicification and its catalytic performance in biodiesel production[J]. Fuel，2021，304：121594.

[2] ISMAIL A R，BAEK K H. Lipase immobilization with support materials，preparation techniques，and applications：present and future aspects[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，163：1624-1639.

[3] BISHT M，THAYALLATH S K，BHARADWAJ P，et al. Biomass-derived functional materials as carriers for enzymes：towards sustainable and robust biocatalysts[J]. Green Chemistry，2023，25(12)：4591-4624.

[4] 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)：378-396.
ZHANG C，JIANG G F，YANG J N，et al. Research progress of immobilized lipase on porous materials[J]. Journal of Molecular Catalysis (China)，2020，34(4)：378-396.(in Chinese)

[5] EL KNIDRI H，BELAABED R，ADDAOU A，et al. Extraction，chemical modification and characterization of chitin and chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，120：1181-1189.

[6] KUMARI S，RATH P，SRI HARI KUMAR A，et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method[J]. Environmental Technology & Innovation，2015，3：77-85.

[7] HOU F R，GONG Z Q，JIA F J，et al. Insights into the relationships of modifying methods，structure，functional properties and applications of chitin：a review[J]. Food Chemistry，2023，409：135336.

[8] ZHANG J，LEI J C，LI K T，et al. Sustainable design of hollow macroporous chitin carrier with enhanced loading capacity for high-performance lipase bioreactor[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2025，310：143494.

[9] MAERVOET V E T，DE MEY M，BEAUPREZ J，et al. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1，3-propanediol using metabolic engineering[J]. Organic Process Research & Development，2011，15(1)：189-202.

[10] SETH S，CHAKRAVORTY D，DUBEY V K，et al. An insight into plant lipase research：challenges encountered[J]. Protein Expression and Purification，2014，95：13-21.

[11] MANGOS T J，JONES K C，FOGLIA T A. Lipase-catalyzed synthesis of structured low-calorie triacylglycerols[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society，1999，76(10)：1127-1132.

[12] 张惠君，王兴国，金青哲. 3种海洋鱼油脂肪酸组成及其位置分布[J]. 食品与机械，2017，33(9)：59-63.
ZHANG H J，WANG X G，JIN Q Z. Composition and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of three marine fish oils[J]. Food and Machinery，2017，33(9)：59-63.(in Chinese)

[13] 李艳阳，王春艳，罗婷予，等. 脂肪酶水解金枪鱼油的工艺优化及脂质成分分析[J]. 广东海洋大学学报，2024，44(6)：109-117.
LI Y Y，WANG C Y，LUO T Y，et al. Process optimization and lipid composition analysis of tuna oil hydrolyzed by lipase[J]. Journal of Guangdong Ocean University，2024，44(6)：109-117.(in Chinese)

[14] DWIVEDEE B P，SONI S，LAHA J K，et al. Facile immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on polyaniline nanofibers (PANFs-PFL)：a route to develop robust nanobiocatalyst[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，119：8-14.

[15] SRIWONG C，SUKYAI P. Simulated elephant colon for cellulose extraction from sugarcane bagasse：an effective pretreatment to reduce chemical use[J]. Science of the Total Environment，2022，835：155281.

[16] ALMULAIKY Y Q，ALKABLI J，EL-SHISHTAWY R M. Improving enzyme immobilization：a new carrier-based magnetic polymer for enhanced covalent binding of laccase enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2024，282：137362.

[17] RASMUSSEN H Ø，WOLLENBERG D T W，WANG H

B，et al. The changing face of SDS denaturation：complexes of *Thermomyces lanuginosus* lipase with SDS at pH 4.0，6.0 and 8.0［J］. Journal of Colloid and Interface Science，2022，614：214-232.

［18］DA ROCHA T N，CARBALLARES D，GUIMARÃES J R，et al. Determination of immobilized lipase stability depends on the substrate and activity determination condition：stress inactivations and optimal temperature as biocatalysts stability indicators［J］. Sustainable Chemistry and Pharmacy，2022，29：100823.

［19］ZHA F C，SHI M，LI H，et al. Biomimetic mineralization of lipase@MOF biocatalyst for ease of biodiesel synthesis：structural insights into the catalytic behavior［J］. Fuel，2024，357：129854.

［20］STEMLER C D，SCHERF K A. Comparative characterization of baking lipase substrate specificities using emulsions and the *p*-nitrophenyl assay[J]. LWT-Food Science and Technology，2022，168：113914.

［21］李佥，曾祥冰，孙西同，等. 酚氨基改性MCM-41固定化脂肪酶的工艺优化及应用[J]. 食品工业科技，2025，46（5）：168-177.
LI Q，ZENG X B，SUN X T，et al. Process optimization and application of lipase immobilized on phenol amino modified MCM-41[J]. Science and Technology of Food Industry，2025，46（5）：168-177.（in Chinese）

［22］ATİROĞLU V. Lipase immobilization on synthesized hyaluronic acid-coated magnetic nanoparticle-functionalized graphene oxide composites as new biocatalysts：improved reusability，stability，and activity［J］. International Journal of Biological Macromolecules，2020，145：456-465.

［23］WANG S H，MENG X H，ZHOU H，et al. Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems：a mini review[J]. Catalysts，2016，6（2）：32.

［24］覃红玉，张俊，李昆太，等. 木质纤维甘蔗渣载体固定化嗜热脂肪酶及其催化特性研究[J]. 食品工业科技，2025，46（21）：228-237.
QIN H Y，ZHANG J，LI K T，et al. Immobilization of thermophilic lipase on lignocellulosic sugarcane bagasse carrier and its biocatalytic properties[J]. Science and Technology of Food Industry，2025，46（21）：228-237.（in Chinese）

［25］XU J C，LI Y Y，YANG J W，et al. Plasma etching effect on the molecular structure of chitosan-based hydrogels and its biological properties［J］. International Journal of Biological Macromolecules，2023，230：123257.

［26］AFSHARI O，SALEHI Z. *β*-Cyclodextrin and APTES functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for improved lipase immobilization，transesterification efficiency，and reusability[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry，2025，144：476-486.

［27］MU L X，WU L Q，WU S Q，et al. Progress in chitin/chitosan and their derivatives for biomedical applications：where we stand［J］. Carbohydrate Polymers，2024，343：122233.

［28］ENGELMANN J I，SILVA P P，IGANSI A V，et al. Structured lipids by swine lard interesterification with oil and esters from common carp viscera[J]. Journal of Food Process Engineering，2018，41（4）：e12679.