

海藻酸钠固定化重组川芎咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶党湫茵<sup>1</sup>,朱建全<sup>1</sup>,寸聪瑞<sup>1</sup>,冯璐<sup>1</sup>,毕宜颖<sup>1</sup>,赵蕤<sup>1</sup>,谭艳<sup>2</sup>,周嘉裕<sup>1\*</sup>,廖海<sup>1\*</sup><sup>1</sup>西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031;<sup>2</sup>中国人民解放军成都军区总医院,成都 610083

**摘要:**利用 IPTG 诱导含有川芎咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶(LCCOMT)的大肠杆菌工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-LCCOMT,经 Ni<sup>2+</sup>亲和层析、质谱鉴定获得纯化的 LCCOMT。采用海藻酸钠凝胶包埋固定 LCCOMT,单因素实验考察最佳固定化条件对固定化酶活力的影响,并确定了固定化酶的最适温度、pH 值、Km、V<sub>max</sub> 与反应批次等酶学性质。确定的条件分别为海藻酸钠质量分数 1.5%,CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.5 g/L,固定化时间 2 h,载体与酶质量比 40 000:1。通过正交实验确定最终固定化条件为 CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.5 g/L,海藻酸钠质量分数 2.0%,固定化时间 1 h,载体与酶质量比 35 000:1 时,固定化效果最好,此时相对酶活力为 75.43%。固定化酶的最适催化温度为 37℃、最适 pH 值为 7.5,较游离酶分别增加 0℃和 0.5;Km、V<sub>max</sub> 分别增高 0.40 和 0.74;实验确定固定化酶的半衰期,连续使用 6 次,酶活力仍保留 50%。

**关键词:**海藻酸钠;咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶;固定化

中图分类号:R914;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.002

## Sodium Alginate Solidified the Recombinant Chuanxiong Coffee Acid-3-*O*-methyltransferase

DANG Qiu-di<sup>1</sup>, ZHU Jian-quan<sup>1</sup>, CUN Cong-ru<sup>1</sup>, FENG Lu<sup>1</sup>, BI Yi-ying<sup>1</sup>,  
ZHAO Rui<sup>1</sup>, TAN Yan<sup>2</sup>, ZHOU Jia-yu<sup>1\*</sup>, LIAO Hai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Southwest Jiaotong University, School of Life Science and Engineering, Chengdu 610031, China;

<sup>2</sup>Chengdu military district general hospital of the people's liberation army, Chengdu 610083, China

**Abstract:** The recombinant Chuanxiong caffeic acid-3-*O*-methyltransferase (LCCOMT) was induced by IPTG from *E. coli* BL21 (DE3) containing pET28a-LCCOMT, and purified by Ni<sup>2+</sup> affinity column chromatography and identified by mass spectrometry. The recombinant LCCOMT was immobilized by calcium alginate gel. The optimal immobilization conditions, including optimum temperature, pH value, Km and V<sub>max</sub>, and the effect of reaction batch on the activity of immobilized enzyme were investigated by single factor experiment. The determined conditions were as follows: CaCl<sub>2</sub> concentration at 2.5 g/L, sodium alginate concentration at 1.5%, immobilization time at 2 h, mass ratio of carrier to enzyme at 40 000:1. According to the orthogonal experiment, The optimal conditions were as follows: CaCl<sub>2</sub> concentration at 2.5 g/L, sodium alginate concentration at 2%, immobilization time at 1 h, mass ratio of carrier to enzyme at 35 000:1. In this condition, the recovery rate of immobilized enzyme was 75.43%. Compared with the free enzyme, the optimum catalytic temperature and pH of immobilized enzyme increased by 0℃ and 0.5, and reached at 37.5℃ and 7.5, respectively. Compared with free enzyme, Km and V<sub>max</sub> increased by 0.4 and 0.74, respectively. The immobilized enzyme maintained 50% of original enzyme activity after 6 times for continuous using.

**Key words:** calcium alginate gel; caffeic acid-3-*O*-methyltransferase; immobilization

收稿日期:2017-10-16 接受日期:2018-01-23

基金项目:国家自然科学基金(31500276);四川省应用基础研究项目(2017JY0222);成都市科技技术研发项目(2015-HM01-00051-SF,2016-HM01-00260-SF);中央高校基本科研业务费医学类专题研究项目(2682016YXZT09);国家级大学生创新创业训练计划(201710613069);西南交通大学本科教育教学研究与改革重点项目(1502024);四川省重点研发项目(2018SZ0061)

\* 通信作者 Tel:86-28-87600965;E-mail:ddliaohai@home.swjtu.edu.cn, spinezhou@home.swjtu.edu.cn

阿魏酸属于苯丙烷类化合物,是川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)等中药材中的指标成分之一<sup>[1]</sup>,在医药、保健品、化妆品原料和食品添加剂等领域有极其广泛的应用前景<sup>[2,3]</sup>。在高等植物中,咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶(Caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, COMT)能够催化咖啡酸和 S-腺苷甲硫氨酸合成阿魏酸<sup>[4-6]</sup>。

在前期工作中,我们已构建含有川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶(*Ligusticum chuanxiong* Caffeic acid 3-O-methyl transferase, LCCOMT)的大肠杆菌工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-LCCOMT<sup>[7]</sup>, 利用 LCCOMT 能够在体外催化生成阿魏酸,为其绿色合成开辟了一条新的思路<sup>[4]</sup>。然而,游离的 LCCOMT 不能够反复使用,导致应用成本较高,限制了其在实际工程中的应用。固定化技术可使酶具有分离回收容易、重复使用、操作连续可控等优点,这促使酶的固定化成为人们研究的热点<sup>[8]</sup>。海藻酸钙是迄今应用最为普遍的酶固定化介质,具有实验条件温和、对生物活性单元失活作用小、不易泄漏及可固定高浓度的生物活性单元等优点<sup>[9]</sup>。

本文对 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-LCCOMT 进行诱导表达,经 Ni<sup>2+</sup> 亲和和层析纯化及质谱鉴定后获得纯度较高的 LCCOMT,进而将其包埋在海藻酸钙凝胶上得到固定化 LCCOMT,并对最佳固定化条件与固定化 LCCOMT 的酶学性质进行考察,以期得到性能优良的固定化 LCCOMT,为阿魏酸工业化生产提供参考。

## 1 实验

### 1.1 菌种与试剂

LCCOMT 工程菌种 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-LCCOMT 由本实验室自行保存。异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自 MEKER 公司。卡那霉素、S-腺苷甲硫氨酸与咖啡酸均购自生工生物工程有限公司。二硫苏糖醇(DTT)为 BIOSHARP 公司产品。阿魏酸标准品购自成都市药检所。高效液相色谱用流动相试剂为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 重组 LCCOMT 的诱导表达与纯化

重组 LCCOMT 的诱导表达与纯化操作方法参考文献<sup>[3]</sup>。工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-LCCOMT 接种在含卡那霉素的 LB 液体培养基中, IPTG 诱导表达 LCCOMT。超声破碎细胞,经 Ni<sup>2+</sup> 亲和柱纯化得到 LCCOMT。随后,含有 LCCOMT 的洗脱液透析脱盐, SDS-PAEG 检测纯度。

### 1.3 重组 LCCOMT 的质谱鉴定

首先利用 SDS-PAGE(12% 分离胶,5% 浓缩胶)对 LCCOMT 纯品进行电泳,胶板经考马斯亮兰 R-250 染色和 5% 乙醇-10% 乙酸脱色。将重组 LCCOMT 条带切下,送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行质谱检测,随即选取 LCCOMT 质谱图

中的 3 个信号最强的肽片段进行二级质谱分析,并利用 *De novo* Sequencing 软件计算获得 3 个肽片段的氨基酸序列。

### 1.4 固定化酶的制备

将海藻酸钠于 70 °C 水中搅拌溶解,冷却至室温,加入 100 μg 游离 LCCOMT,4 °C 搅拌均匀。用 5 号注射器将混合液逐滴滴入 2.5 g/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,将 LCCOMT 包埋于海藻酸钙凝胶中,固化 1 h 后取出,用蒸馏水洗涤 2~3 次,真空泵抽滤去掉凝胶颗粒表面的水分,4 °C 保存备用。

### 1.5 固定化 LCCOMT 酶活测定

100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)、500 μM 咖啡酸、1 mM S-腺苷甲硫氨酸、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100 μg 游离 LCCOMT 或固定化 LCCOMT,总体积 10 mL,37 °C 反应 2 h 后加 1 mL 浓盐酸终止反应。5 mL 乙酸乙酯萃取并浓缩蒸干。甲醇:甲酸(95:5)溶解并定容至 5 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤后高效液相色谱检测。色谱条件为:上样量 10 μL、流动相:0.1% 的磷酸:甲醇(66:34)、流速 1 mL/min、柱温 30 °C、检测波长为 323 nm。根据咖啡酸和阿魏酸峰面积比值计算酶活性。

### 1.6 固定化条件优化

设置单因素实验,分别考察海藻酸钠质量分数(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%),CaCl<sub>2</sub> 浓度(2.5、5、10、15、20、25、30、35、40 g/L),海藻酸钠与 LCCOMT 质量分数比(2 500:1、5 000:1、10 000:1、15 000:1、20 000:1、25 000:1、30 000:1、35 000:1、40 000:1),固定化时间(0.5、1、2、3、4、6、8、10 h)对 LCCOMT 固定化影响。

### 1.7 固定化酶性质的测定

#### 1.7.1 最适反应温度和 pH

将固定化酶和游离酶反应液分别置于 22、27、32、37、42、47、52 °C 下进行反应,测定酶活力,以每次实验中活性最高组为 100%,确定最适反应温度。配制 pH5.0~9.0 的缓冲液,代替 1.4 中反应体系 200 mM Tris-HCl(pH 7.0),确定最适反应 pH。

#### 1.7.2 热稳定性和 pH 稳定性

将游离酶和固定化酶分别置于 4、30、40、50、60、70 °C 的水浴锅中保温 0.5 h 后,冷却至室温测酶活,考察固定化前后 LCCOMT 的热稳定性。将固定化酶和游离酶置于 pH2~10 的缓冲液中保存 12 h,测定酶活力,探究 pH 稳定性。

### 1.7.3 固定化酶操作稳定性

取 100  $\mu\text{g}$  固定化 LCCOMT 测酶活,每次反应完成后,将固定化酶用去离子水反复清洗,再次重复以上方法进行酶活测定,连续进行 12 次实验,并以第 1 次酶活力为 100%,计算每次重复使用的相对酶活。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组 LCCOMT 的纯化与质谱鉴定

SDS-PAGE 结果表明纯化得到的 LCCOMT 在 43 kDa 附近处显示出单一的电泳条带(理论分子量 39.93 kDa)。切取 LCCOMT 电泳条带,选取其肽指纹图谱中的 3 个信号峰 (M + H) +  $m/z$  3 408.580 8, 1 843.967 7, 1 827.973 8 做进一步的串联质谱分析,并利用 De novo Sequencing 软件分析其氨基酸序列。测定结果表明 3 个片段的序列分别为 (M + H) +  $m/z$  3 408.580 8 (KGINFDLPHVVEDAPSYPGVEHVGGDMFVSVPKG), 1 843.967 7 (KNVIHIDVIMLAHNPGGKE), 与 1 827.973 8 (KNVIHIDVIMLAHNPGGKE)。将 3 个肽段序列分别在 NCBI 上检索,发现 3 个肽段均与 LCCOMT 有最高程度的同源性,均为 100%,表明我们获得了高纯度的重组 LCCOMT。将纯化的重组 LCCOMT 进行酶活检测,发现其能高效催化合成阿魏酸,转化效率达到了 61.92%,催化活力为 30.07 U/mg(图 1)。

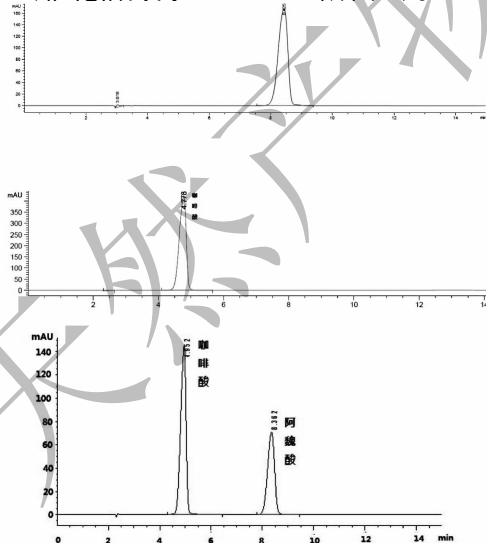


图 1 重组 LCCOMT 酶活力检测

Fig. 1 Recombinant LCCOMT enzyme activity detection

注: A: 阿魏酸标准品; B: 咖啡酸标准品; C: 重组 LCCOMT 催化合成的产物。

Note: A: ferulic acid; B: coffee acid; C: the products catalyzed by recombinant LCCOMT.

### 2.2 固定化条件的确定

#### 2.2.1 海藻酸钠质量分数对固定化酶活力的影响

由图 2A 可知,在海藻酸钠质量分数为 1.5% 时,固定化酶活力最高。质量分数低时,凝胶的孔径较大,导致酶流失;质量分数较高时,黏度较大,影响凝胶成型,同时凝胶孔径变小,影响酶与底物的结合。

#### 2.2.2 $\text{CaCl}_2$ 浓度对固定化酶活力的影响

$\text{CaCl}_2$  对形成凝胶的机械强度有重要影响<sup>[10]</sup>。图 2B 结果表明,在其他条件不变时, $\text{CaCl}_2$  浓度增高,固定化酶活性显著下降。但继续降低  $\text{CaCl}_2$  浓度,很难成球。当  $\text{CaCl}_2$  的浓度为 2.5 g/L 时,固定化酶活性达到最佳。

#### 2.2.3 固定化时间对固定化酶活力的影响

固定化时间是海藻酸钠与固定化酶的混合液滴落到  $\text{CaCl}_2$  溶液中的反应时间。结果如图 2C 所示,当固定化时间为 2 h,固定化酶的活力最高。固定化时间过长,会造成底物扩散阻力增加及酶泄露,导致固定化率和固定化酶活性降低<sup>[11]</sup>。

#### 2.2.4 海藻酸钠溶液与酶质量比对固定化酶活力的影响

将游离 LCCOMT 与浓度为 1.5% 的海藻酸钠溶液按不同质量比进行固定,测定固定化酶的活力(如图 2D),当质量比为 40 000:1 时,固定化酶的活力达到最高。

### 2.3 固定化 LCCOMT 的正交实验

在确定最佳的固定化方法后,由单因素实验的实验结果选择不同的因素和水平进行正交实验,以期得到最佳的固定化效果。本实验选取海藻酸钠质量分数、氯化钙浓度、固定化时间和海藻酸钠溶液与酶的质量分数比进行实验,实验选取  $L_9(3^4)$  正交表,如表 1 所示,正交实验结果如下表 2 所示。

### 2.4 固定酶的凝胶颗粒的制备

根据筛选出的最适固定化条件,将 1 500  $\mu\text{g}$  的游离 LCCOMT 加入到 52.5 mL 1.5% 海藻酸钠溶液中,在磁力搅拌器上混匀;然后将混合液逐滴滴入 2.5 g/L  $\text{CaCl}_2$  溶液中,即可形成包埋有 LCCOMT 的凝胶颗粒,呈无色透明状,质软,直径约 2~4 mm。

### 2.5 游离酶和固定化酶酶学性质比较

#### 2.5.1 温度对游离酶和固定化酶酶活的影响

与游离酶相比,固定化酶的最适反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ ,最适反应温度与催化活性也未发生改变(如图 3)。但固定化酶在较高温度范围内的催化活力低于游离酶,分析原因是海藻酸钙在高温下其空间结

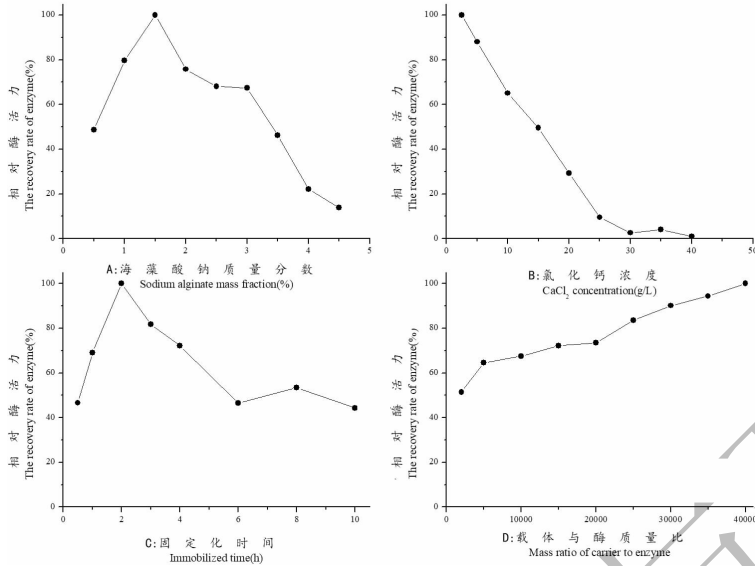


图2 固定化条件对固定化 LCCOMT 的影响

Fig. 2 The influence of immobilization conditions on immobilized LCCOMT

注:A:海藻酸钠质量分数对固定化酶活力的影响;B:CaCl<sub>2</sub> 浓度对固定化酶活力的影响;C:固定化时间对固定化酶活性的影响;D:海藻酸钠溶液与酶质量比对固定化酶活力的影响。

Note: A:effect of sodium alginate quality fraction on immobilized enzyme activity B:effects of CaCl<sub>2</sub> concentration on immobilized enzyme activity C:influence of fixation time on immobilized enzyme activity D:effects of sodium alginate solution and enzyme quality on the activity of immobilized enzyme.

表1 固定化 LCCOMT 正交实验因素表

Table 1 The orthogonal experimental factors of LCCOMT

水平 Level	因素 Factors			
	A:海藻酸钠质量分数 A:Sodium alginate concentration (%)	B:氯化钙浓度 B:CaCl <sub>2</sub> concentration (g/L)	C:固定化时间 C:Immobilization time (h)	D:载体与酶质量比 D:Mass ratio of carrier to enzyme
1	1.0	2.5	1	25 000: 1
2	1.5	7.5	2	30 000: 1
3	2.0	10.0	3	35 000: 1

表2 正交实验结果

Table 2 Orthogonal experiment results

实验编号 Serial number	A	B	C	D	相对酶活力 Recovery rate of enzyme (%)
1	1	1	1	1	58.57
2	1	2	2	2	51.01
3	1	3	3	3	42.74
4	2	1	2	3	68.64
5	2	2	3	1	54.65
6	2	3	1	2	48.95
7	3	1	3	2	70.30
8	3	2	1	3	61.48

续表 1 (Continued Tab. 1)

实验编号 Serial number	A	B	C	D	相对酶活力 Recovery rate of enzyme (%)
9	3	3	2	1	45.36
均值 1 Mean value 1	50.773	65.837	56.333	52.860	以最佳组合 A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> 实验 Optimal combination of A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> experiment
均值 2 Mean value 2	57.413	55.173	55.003	56.753	
均值 3 Mean value 3	59.047	45.683	55.897	57.620	
极差 Extreme difference	8.274	20.154	1.330	4.760	
最优水平 Optimal level	A3	B1	C1	D3	
因素影响 Factors affecting	B > A > D > C				

构可能变化,导致包埋其中的酶分子与底物接触受到影响。将固定化酶与游离酶分别于 4、30、40、50、60、70 °C 保存 0.5 h,冷却到室温,在 37 °C 条件下反应 2 h,分别检测活性。如图 4 所示,固定化酶在高温下的稳定性较高,推测是由于海藻酸钙载体对酶具有保护作用,稳定了酶的空间结构,使酶对热的稳定性有所提高。

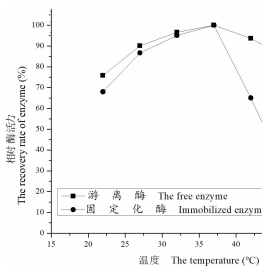


图 3 反应温度对游离酶和固定化酶酶活的影响

Fig. 3 Effects of reaction temperature on the activity of free enzyme and immobilized enzyme

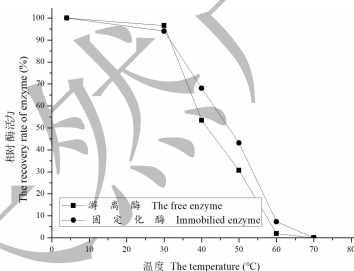


图 4 贮藏温度对游离酶和固定化酶酶活的影响

Fig. 4 Effects of storage temperature on free enzyme and immobilized enzyme activity

### 2.5.2 pH 值对游离酶和固定化酶酶活的影响

从图 5 可以看出,随着 pH 值的提高,固定化酶活性逐渐上升,其最适 pH 为 7.5,而游离酶的最适 pH 为 7.0,相比提高了约 0.5。固定化酶在 pH 8.0-9.0 范围内,仍保持较高的相对酶活(80%),这显示

固定化酶比游离酶较耐碱,相比游离酶有更宽泛的适应性。这可能是因为固定化后,载体对酶空间结构产生影响,带负电荷的载体制备的固定化酶,最适 pH 向碱性偏移。将固定化酶和游离酶分别于不同 pH 的缓冲体系中保存 1 h,检测游离酶与固定化酶的活性,发现固定化酶的最适保存 pH 为 7.0,与游离酶相同(如图 6)。

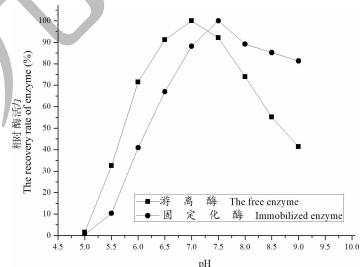


图 5 反应 pH 值对游离酶和固定化酶酶活的影响

Fig. 5 Effects of pH value on free enzyme and immobilized enzyme activity

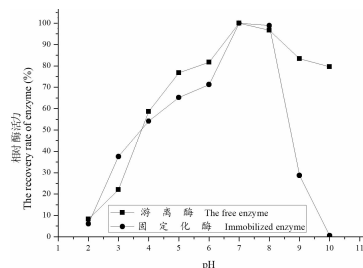


图 6 贮藏 pH 值对游离酶和固定化酶酶活的影响

Fig. 6 The effect of storage pH on free enzyme and immobilized enzyme activity

### 2.5.3 游离酶与固定化酶的米氏常数的比较

计算出固定化酶的  $K_m$  与  $V_{max}$  均超过游离酶,分别增加 0.40 和 0.74,推测海藻酸钙载体降低 LCCOMT 与底物的亲和力 ( $K_m$  增加),但是海藻酸钙微球内部 LCCOMT 与底物形成复合物的浓度要远高于微球外部,导致  $V_{max}$  变大(如图 7)。

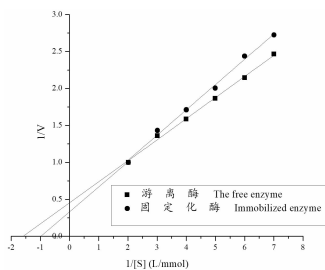


图7 游离酶与固定化酶的米氏常数的比较

Fig. 7 Comparison of the rice's constant of free enzyme with immobilized enzyme

## 2.6 固定化酶使用批次对酶活力的影响

将包埋 LCCOMT 的固定化酶,于 pH7.5、37 °C 的条件下测定酶活力。测完后分离出凝胶颗粒,再次测定酶活,重复使用 7~8 次后,固定化酶仍保留 50% 左右酶活;重复使用 12 次后,固定化酶仍保留 30% 左右酶活(以第一次反应的酶活力为 100%),可见固定化的 LCCOMT 可以重复使用(如图 8)。

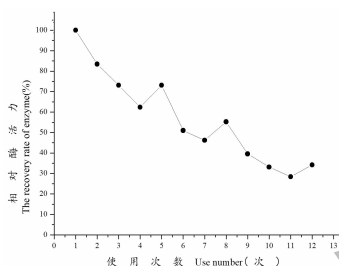


图8 固定化酶使用批次对酶活力的影响

Fig. 8 The effect of immobilized enzymes on enzyme activity

## 3 结论

用海藻酸钠凝胶颗粒包埋 LCCOMT,操作简便易行,反应条件温和。通过对胶凝条件的研究和游离酶及固定化酶的活力研究,每个单因素实验确定出的最优固定化条件分别为海藻酸钠质量分数 1.5%,CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.5 g/L,固定化时间 2 h,载体与酶质量比 40 000:1 时,固定化效果最好。综合考虑以上因素,正交实验确定最优固定化条件为:海藻酸钠质量分数 2%、CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.5 g/L、固定化时间为 1 h、载体与酶质量比为 35 000:1。游离酶的最适催化条件为 37 °C、pH 值 7.0,而固定化酶的最适催化条件为 37 °C、pH 值 7.5,相比分别提高 0.5 °C,固定化酶的平均酶活回收率为 75.43%;固定化酶的 K<sub>m</sub>、V<sub>max</sub> 较游离酶增加。此外,固定化酶的储存稳定性也有所提高,且可重复使用。本文以价格低廉,性质稳定的海藻酸钙为载体,固定化 LCCOMT,工艺简单,酶活回收率高,稳定性好,具有

较好的工业前景。

## 参考文献

- Zhang XL, Liu LF, Zhu LY, *et al.* A high performance liquid chromatography fingerprinting and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry chemical profiling approach to rapidly find characteristic chemical markers for quality evaluation of dispensing granules, a case study on Chuanxiong Rhizoma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88:391-400.
- Lv GH (吕光华), Cheng SQ (程世琼), Chen JQ (陈金泉), *et al.* Determination of free ferulic acid and total ferulic acid in Chuanxiong by high-performance liquid chromatography for quality assessment [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 02:194-198.
- Tan XF (谭秀芳), Li XJ (李晓瑾), Du CL (杜翠玲), *et al.* General situation and research progress of medicinal plant ferulic [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药杂志), 2016, 01:12-15.
- Yu JH (俞继华), Li YY (李洋洋), Song J (宋婧), *et al.* Homology modeling and site-directed mutagenesis of caffeic acid-3-O-methyltransferase from *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 20:3677-3682.
- Lee JE, Vogt T, Hause B, *et al.* Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38:851-862.
- Nagy K, Actis-Goretta L, Redeuil K, *et al.* Identification of cholesteryl ester of ferulic acid in human plasma by mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1301:162-168.
- Li JJ, Zhang G, Yu JH, *et al.* Molecular cloning and characterization of caffeic acid 3-O-methyltransferase from the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Biotechnol Letters*, 2015, 37:2295-2302.
- Meng TT (孟廷廷), Ma HL (马海乐), Wang WW (王薇薇), *et al.* Studies on the hydrolyzing casein by immobilized alkaline protease [J]. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2016, 08:87-93.
- Xiao ZF (肖志方), Wu L (伍林), Yi DL (易德莲), *et al.* Study on immobilization of glucose oxidase by calcium alginate gel capsules [J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2008, 02:42-44.
- Qiu GL (邱广亮), Qiu GM (邱广明). Study on magnetic immobilized neutral protease [J]. *J Biomedical Eng Res* (山东生物医学工程), 1994, 01:18-24.
- Zhang FX (张富新), Zhang YY (张媛媛), Dang YL (党亚丽), *et al.* A study of the neutral proteinase's immobilization in sodium alginate [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For; Nat Sci* (西北农林科技大学学报: 自科版), 2005, 11:89-93.