

不同载体固定化海洋微生物酯酶 ETM-b 的性能比较

张 艳^{1,2} 郑 媛¹ 王海英¹ 孙 谧^{1*}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学食品学院, 201306)

摘 要 分别采用海藻酸钠包埋法、明胶包埋交联法、壳聚糖吸附交联法制备固定化海洋芽孢杆菌酯酶 ETM-b, 并对其固定化条件进行了研究。结果发现, 壳聚糖制备的固定化酶效果最好, 壳聚糖 2%、戊二醛浓度 1%、小球与酶液 4:3 (g/ml) 时制备的固定化酶的活性回收最高, 达到 66%。壳聚糖制备的固定化酶使用 10 次, 相对活性保留 70%, 具有良好的操作稳定性。固定化酶在非水介质中具有转化 α -乙酸萘酯 (α -Naphthyl acetate) 的能力, 在异辛烷、正辛烷、正己烷中活性表现最高。

关键词 海洋芽孢杆菌酯酶 固定化酯酶 壳聚糖 非水介质催化

中图分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0110-07

Study on immobilization of marine microbial esterase ETM-b with different material

ZHANG Yan^{1,2} ZHENG Yuan¹ WANG Hai-ying¹ SUN Mi^{1*}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Shanghai Ocean University, College of Food Science and Technology, 201306)

ABSTRACT Esterase from *Bacillus* sp. was immobilized with sodium alginate, gelatin and chitosan. The enzyme, immobilized with 2% chitosan, 1% glutaraldehyde and chitosan microspheres : enzyme loading = 4 : 3 (g/ml) exhibited the highest activity recovery (66%). The immobilized esterase with chitosan could be reused for 10 times, and 70% of enzyme activity remained after the 10th batch, which exhibited good operational stability. The immobilized esterase can catalyze α -naphthyl acetate in non-aqueous system, and it displayed high activity in isooctane, *n*-octane and *n*-hexane.

KEY WORDS Esterase from *Bacillus* sp. Immobilized esterase Chitosan
Non-aqueous catalysis

酯酶 Esterase 是一种重要的工业用酶, 普遍存在于动物、植物、真菌、细菌中, 通常所说的酯酶往往指羧酸

国家 863 课题(2007AA091602; 2007AA09Z44)资助

* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2009-12-25; 接受日期: 2010-01-22

作者简介: 张 艳(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋产物资源与酶工程研究。E-mail: zhangyan0309@yahoo.com.cn

酯酶(EC 3.1.1.1),具有水解和合成酯键的能力,可水解酯类产生相应的酸和醇,在有机相中可完成酯化、转酯、酯交换等反应,形成酯、香味物质和手性化合物,广泛应用于日用化工业、食品、医药、军事等领域(Alvarez-Macarie *et al.* 2000; Chamorro *et al.* 1998; Dong *et al.* 2006; Hassa *et al.* 2000; Lee *et al.* 2003)。大量研究表明,酯化合成更适合于在非极性溶剂中进行,有机介质可以增加酶的热稳定性,增加非极性底物的溶解度,减少反应的副产物,增加合成反应的速度(田桂玲等 1998)。但是游离酯酶在有机溶剂中易凝聚,只有暴露于有机溶剂表层的酶分子能够发挥催化作用,酶的催化效率降低(郭 勇 2005),同时酶分子表面结构也会受有机溶剂的影响,活性中心发生改变,影响酶分子的水化层,从而使酶的催化活性降低(沈鸿雁等 2003)。

固定化酶是指固定在一定载体上并在一定的空间范围内进行催化反应的酶,已成为当前酶工程领域的研究热点。固定化酶的使用可以使游离酶在有机溶剂中的分散状态得到改善,加强底物或产物的转移效率,使催化效率得到提高。固定化酶既保持了酶的催化特性,又克服了游离酶的不足之处,具有性能稳定、可反复或连续使用以及易于和产物分开等显著优点(李彦峰等 2001)。Schuleit 等(2001)将溶在 AOT 反相胶束中的脂肪酶进行固定化,提高了该酶在水中及有机溶剂中的稳定性,使用该固定化酶在有机溶剂中催化酯化反应,活性产率可以达到 78%~85%,能反复使用数次。

海洋微生物酯酶 ETM-b 是来自海洋芽孢杆菌 *Bacillus sp.*, EYB-5 的嗜热酯酶,具有良好的热稳定性和有机溶剂耐受性。本研究采用海藻酸钠、明胶、壳聚糖等材料固定海洋芽孢杆菌酯酶,通过优化固定化条件,获得较高的酶活回收,提高了酯酶的操作稳定性,并对其在有机溶剂中的催化性质进行了研究,表现出良好的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

海洋芽孢杆菌酯酶:其产生菌为海洋芽孢杆菌 *Bacillus sp.*, EYB-5,由本试验室从海洋样品中筛选获得。本研究使用酯酶 ETM-b 制备方法参照高 强硕士论文(2008),酶活为 616U/L。固蓝 B 盐购自 Sigma, α -乙酸萘酯(α -NA)、 α -萘酚购自中国医药集团上海化学试剂公司。海藻酸钠、氯化钙、明胶、戊二醛、有机溶剂等均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酯酶的活力测定

根据 van Asperenv (1962) 所述方法改进。游离酶测活方法:在试管中依次加入 3.50 ml 磷酸盐缓冲液(pH 7.0, 0.04 mol/L)、100 μ l 0.4% α -乙酸萘酯的乙醇溶液和 0.5 ml 稀释后的酶液,混匀后在 30 $^{\circ}$ C 下振荡反应 1 h,加入 1 ml 显色液(0.03%的固蓝 B 盐,溶剂为 4%的 SDS 溶液),30 $^{\circ}$ C 下静置 5 min 后,在 595 nm 处测其吸光值,用去离子水代替酶液作对照管,以消除自然水解的影响。固定化酶测活方法:与游离酶测活方法相同,酶液用去缓冲液代替,加入固定化酶,反应后用显色液显色测定吸光值,每次测活进行 3 次平行。酶活性单位定义为:30 $^{\circ}$ C 条件下,每分钟催化得到 1 μ mol α -萘酚所需的酶量为 1 个酶活单位,即 1 U。

1.2.2 固定化酯酶的制备

1.2.2.1 海藻酸钠包埋法

根据文献方法(程晓滨等 2007)改进:配制一定浓度的海藻酸钠溶液 20 ml,加入 1 ml 酶液混合均匀后,用注射器逐滴注入不断搅拌的 2% CaCl_2 溶液中,形成光滑小球后在 4 $^{\circ}$ C 下静置硬化 1 h。用蒸馏水洗涤数次,以除去多余离子,得颗粒状固定化酯酶,其颗粒大小平均为 2.2 mm,放入密封袋内于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2.2 明胶包埋交联法

根据文献方法(林建成等 2006)改进:配制一定浓度的明胶溶液 20 ml,加热溶解后,加入 1 ml 酶液,混合均匀后,加入一定浓度的戊二醛,交联 1~2 min 后迅速倒入平皿中 4 $^{\circ}$ C 下固定 4 h,取出切成 3 mm 的小方块,

再用相应浓度的戊二醛交联 10 h,用蒸馏水清洗后,放入密封袋内于 4 ℃下保存。

1.2.2.3 壳聚糖吸附交联法(程晓滨等 2007)

用 1%的乙酸配制一定浓度的壳聚糖溶液,静置 1h 后用注射器滴入含有 20%NaOH、30%甲醇的凝结液中,形成小球,用去离子水反复清洗至中性。将小球与酶液按一定的质量体积比混合,吸附 30 min 后,以不同浓度的戊二醛溶液交联 50 min 后用去离子水清洗。固定化酶颗粒大小平均为 2.6 mm,放入密封袋内于 4 ℃保存备用。

1.2.3 固定化酶的非水相介质催化

将一定量的固定化酯酶置于 4 ml 不同的常用有机溶剂中,加入 100 μ l 0.4%的 α -乙酸萘酯的乙醇溶液,常温下(25 ℃)反应 10 h,除去固定化酶后加入显色液,测定吸光值,以未加固定化酶的有机体系作为对照。

2 结果与分析

2.1 酯酶固定化条件的优化

2.1.1 海藻酸钠包埋法

海藻酸钠浓度对酯酶固定化效果的影响:海藻酸钠的浓度分别设定为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%,制备固定化酶,其中浓度低于 1.5%时成球形状较差。分别测定活性保留率,结果如图 1 所示。当海藻酸钠浓度为 3.0%时,制备的固定化酶活性回收最高,达到 15.9%,无论增大还是减小海藻酸钠的浓度,制备的固定化酶的活性回收都降低。海藻酸钠的浓度决定了固定化小球的孔径大小,影响底物和产物的扩散,进而影响到酶的扩散损失率和回收率(王亚林等 1999;Blandino *et al.* 2000)。

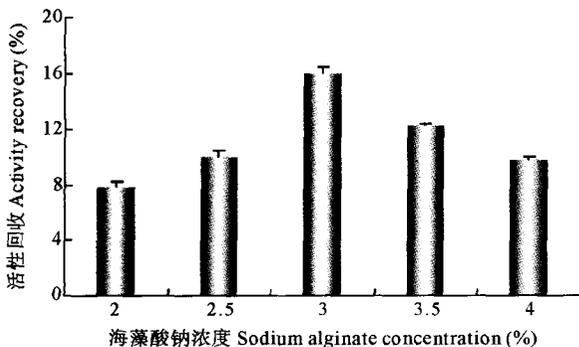
2.1.2 明胶包埋交联法

2.1.2.1 明胶浓度

分别配制 10%、13%、15%、17%、20%的明胶溶液,制备固定化酶,测定活力。从图 2 可知,明胶浓度对固定化酶的活性回收有一定的影响,随着浓度的增大,活性回收有所增大,在 15%的时候,固定化酯酶活性回收最大,达到 63.3%。此外 10%的明胶制备的固定化酶机械强度较弱,反应一段时间后膨胀变软,而 20%的明胶加入戊二醛后凝固速度快,搅拌不均匀,明胶、戊二醛和酶液不能充分混合,最终确定明胶浓度为 15%,这与文献报道(焦云鹏等 2005)果胶酯酶的明胶固定化条件是类似的。

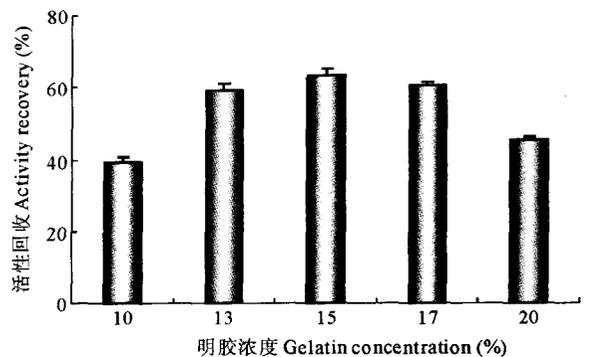
2.1.2.2 戊二醛浓度

明胶和酶液混合均匀后,分别加入 0.05%、0.075%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%的戊二醛交联 1~2



固定化条件: CaCl₂ 浓度为 2%
Immobilization condition: 2% CaCl₂

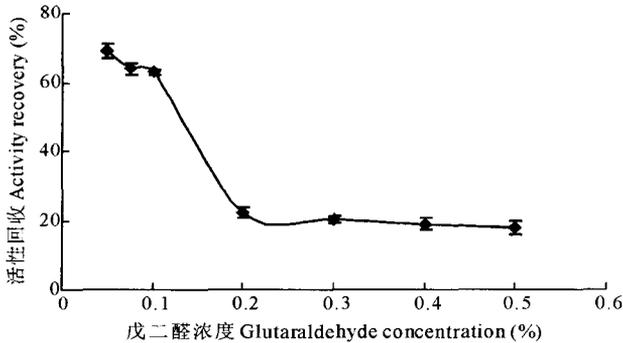
图 1 海藻酸钠浓度对酯酶固定化效果的影响
Fig. 1 Effect of sodium alginate concentration on the esterase immobilization



固定化条件: 戊二醛浓度为 0.1%; 交联时间为 10 h
Immobilization conditions: 0.1% glutaraldehyde, cross-linking time: 10 h

图 2 明胶浓度对酯酶固定化效果的影响
Fig. 2 Effect of gelatin concentration on the esterase immobilization

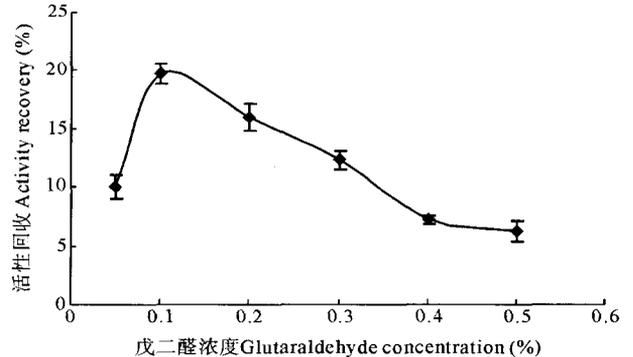
min 后迅速倒入平皿中,4 ℃下固定 4 h,再用相应浓度的戊二醛交联 10 h,清洗后测定活力,结果如图 3 所示。随着戊二醛添加量的增大,固定化酯酶活性回收降低。戊二醛浓度低于 0.1% 时,固定化酶强度低,催化反应 1 h 后非常柔软,很难回收再次利用。最终选择戊二醛浓度为 0.1%,此时的活性回收可以达到 63%。



固定化条件:明胶浓度为 15%;交联时间为 10 h
Immobilization conditions: gelatin concentration: 15%;
cross-linking time: 10 h

图 3 戊二醛浓度对酯酶固定化效果的影响

Fig. 3 Effect of glutaraldehyde concentration on the esterase immobilization



固定化条件:戊二醛浓度为 0.1%;壳聚糖小球与酶液比 (g/ml) 为 2:3;
吸附时间为 30 min;交联时间为 50 min Immobilization conditions:
chitosan concentration: 2%; microspheres/enzyme loading (g/ml):
2:3; adsorption time: 30 min; cross-linking time: 50 min

图 4 戊二醛浓度对酯酶固定化效果的影响

Fig. 4 Effect of glutaraldehyde concentration on the esterase immobilization

2.1.3 壳聚糖吸附交联法

2.1.3.1 壳聚糖浓度

分别配制 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的壳聚糖溶液制备壳聚糖小球。当壳聚糖浓度低于 1.5% 时,得到的固定化酶呈扁球形,柔软易破裂。而壳聚糖浓度大于 2.5% 时,溶液黏度非常大,成球亦不易操作。浓度为 2.0% 时,可以形成形状完好的圆球,具有一定的弹性和强度,因此确定壳聚糖的浓度为 2%。

2.1.3.2 戊二醛浓度

将壳聚糖小球与酶液 2:3(g/ml) 混合,吸附 30 min 后,用 10 ml 不同浓度 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的戊二醛溶液交联 50 min,清洗后测定固定化酶活力,结果如图 4。在壳聚糖吸附交联过程中,戊二醛作为交联剂,当其含量较大时,交联作用较大,与壳聚糖和酶的结合位点紧密,产生空间结构障碍,使酶活力降低。另一方面,戊二醛作为变性剂,浓度过大时,酶结构也会发生变化,活性也随之降低(程晓滨等 2007)。由图 4 可知,当戊二醛的浓度为 0.1% 时,戊二醛氨基可以交联壳聚糖和酶分子,形成内外分子键,使固定化小球机械强度和酶的稳定性得到增强(Kilinc *et al.* 2006),固定化酶活性回收达到最大值 19.8%。

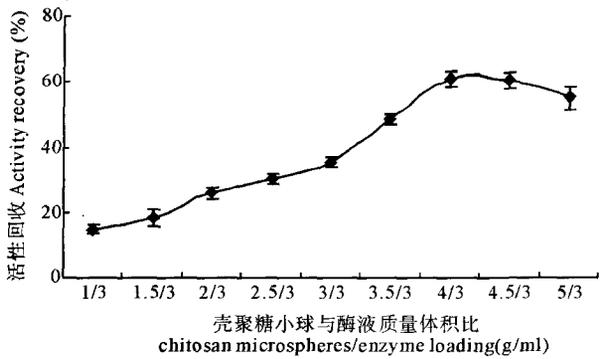
2.1.3.3 壳聚糖小球与酶液质量体积比

将壳聚糖小球与酶液分别以 1:3、1.5:3、2:3、2.5:3、3:3、3.5:3、4:3、4.5:3、5:3(g/ml) 混合,吸附 30 min 后,以 0.1% 的戊二醛溶液交联 50 min,测定保留活力,结果见图 5。随着壳聚糖小球与酶液比例的增大,小球吸附的总酶量增大,活性回收率提高,但是一定量的壳聚糖微球结合的酶量是一定的,当壳聚糖小球与酶液以 4:3(g/ml) 混合时,固定化酶的活力回收达到最大 66%。再增大壳聚糖小球与酶液比值,活性回收趋向于平衡,微球的单位活性降低,最终确定壳聚糖小球与酶液的质量体积比为 4:3。

2.2 不同固定化酯酶机械强度、表观特征、操作稳定性的比较

2.2.1 固定化酶的机械强度

分别称取不同方法制备的固定化酶 0.1 g,平铺分布在载玻片上,在固定化酶上面加 1 层载玻片,然后向载玻片上加砝码,直到小球被压成饼状破裂,以砝码重量的大小表征小球的机械强度(李慧蓉等 2002)。海藻酸



固定化条件:壳聚糖浓度为 2%;戊二醛浓度为 0.1%;壳聚糖小球与酶液比 (g/ml) 为 2 : 3;吸附时间为 30 min;交联时间为 50 min
Immobilization conditions: chitosan concentration: 2%; glutaraldehyde concentration: 0.1%; adsorption time: 30 min; cross-linking time: 50 min

图 5 加酶量对酯酶固定化效果的影响

Fig. 5 Effect of enzyme loading on the esterase immobilization

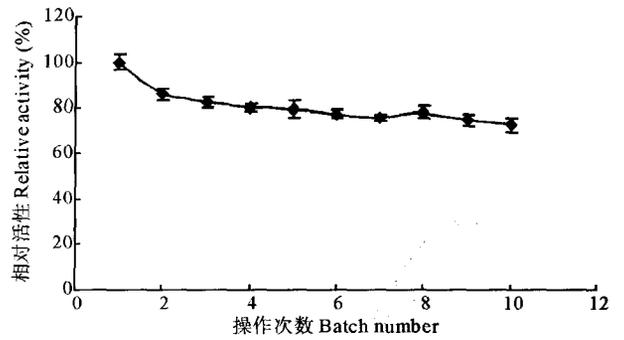


图 6 壳聚糖固定化酶的操作稳定性

Fig. 6 Stability of immobilized esterase

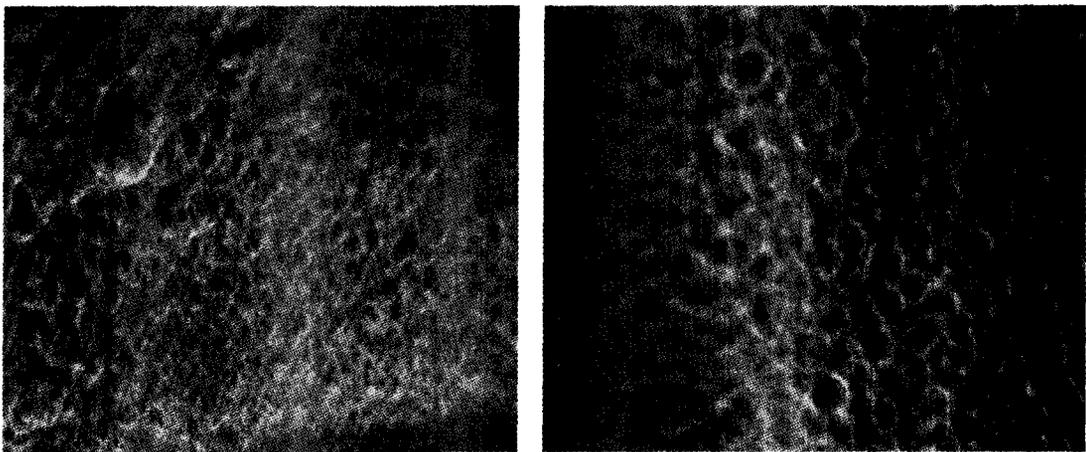
钠、明胶、壳聚糖固定化酶分别可以承受 500 g、200 g、300 g 的重量,海藻酸钠、壳聚糖制备的酯酶固定化酶机械强度优于明胶固定化酶。

2. 2. 2 固定化酶的操作稳定性

海藻酸钠固定化酶虽然具有一定的机械强度,但在磷酸盐缓冲液系统中容易破裂,操作稳定性差,且与明胶、壳聚糖固定化酶相比较其活性回收较低。在 30 °C 下连续测定明胶和壳聚糖固定化酶的活力,结果表明,明胶固定化酶使用 4 次后,活性仍保留 76%,但固定化酶颗粒变的非常柔软,形状扭曲,不易进行回收。而使用壳聚糖制备的固定化酶使用 10 次以后(图 6),酶活损失率小于 30%,小球具有一定的强度,未破裂,易于回收,重复使用性好。可见用壳聚糖制备的固定化酯酶活性回收高,操作稳定性强,其效果最好。

2. 2. 3 固定化酶的表现特征

通过机械强度和操作稳定性的研究可知,在 3 种固定化材料中,壳聚糖效果最好。图 7 为壳聚糖微球的显微结构。壳聚糖微球吸附酶液、交联戊二醛后,微球孔径变大。可能是有机溶剂戊二醛具有一定的致孔作用,使底物和产物传递加快,增大了酶与底物反应的机会(Yang *et al.* 2008)。



a.未吸附酶液、未交联戊二醛的壳聚糖小球
a. Chitosan microspheres without esterase and glutaraldehyde
b.吸附酶液、交联戊二醛的壳聚糖小球
b. Chitosan microspheres with esterase and glutaraldehyde

图 7 壳聚糖微球的显微照片(×200)

Fig. 7 Micrograph of chitosan microspheres without (a) or with (b) esterase and glutaraldehyde (×200)

2.3 固定化酶的非水相催化

壳聚糖制备的固定化酶在非水介质中转化 α -乙酸萘酯的能力见图 8。结果显示,固定化酶在二甲基亚砜、苯甲醇、丙酮、乙醇、环氧氯丙烷中转化萘酯的能力很小,而在甲醇、1,2-丙二醇、正丁醇、异戊醇、乙二醇、异丙醇、苯酚、三氯甲烷中转化萘酯的能力相对较高,在苯酚中可以达到 32%。在异辛烷、正辛烷、正己烷中活性最高,都达到 60%以上。产生这种结果的可能原因(沈鸿雁等 2003)是(1)二甲基亚砜、苯甲醇、丙酮、乙醇 4 种有机溶剂的极性很强,容易夺取酶分子的结合水,对酶活性影响大,所以在有机介质酶催化过程中,应选择好所使用的溶剂,控制好介质中的水含量,或者经过酶分子修饰提高酶分子的亲水性,以免介质中因脱水作用而影响其催化活性。王爱玲等(2007)用海藻酸钠明胶复合载体制备的固定化荧光假单胞菌脂肪酶进行酶促酯交换合成生物柴油,结果发现有机转酯体系中含有 6% 的水时,甲酯转化率达到最大值,继续增加水的含量,甲酯得率变化平缓,并且有所下降。因为一定量的水是维持酶催化活性构象的必要条件,过多的水会使酶聚集成团,增大传质阻力,酶的催化效率降低。杨昌英等(2003)用固定化猪胰脂肪酶催化牛油合成单甘酯,反应过程中,加入的甘油中含有 5% 水分时,固定化酶表现出最高活力。(2)有机溶剂影响酶分子表面结构和酶活性中心结合位点,降低活性中心的极性,降低酶与底物的结合能力,对酶活具有一定的影响。

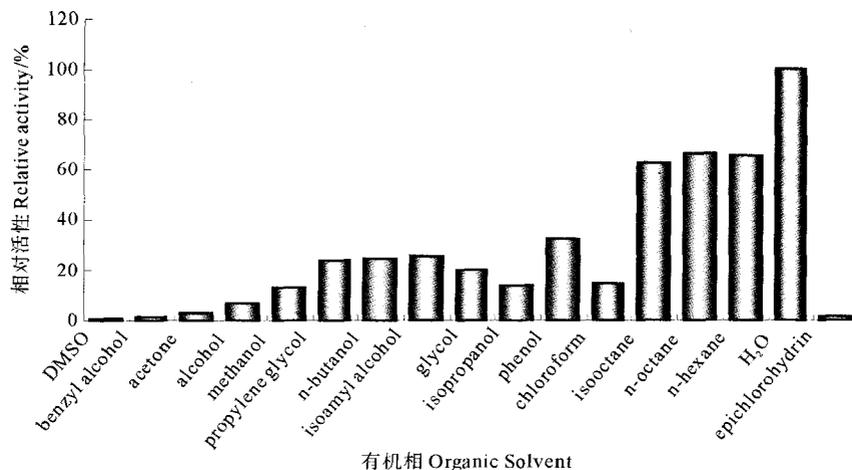


图 8 固定化酶的非水介质催化

Fig. 8 Non-aqueous biocatalysis of immobilized esterase

3 讨论

(1)分别比较了海藻酸钠包埋法、明胶包埋交联法、壳聚糖吸附交联法固定化海洋芽孢杆菌酯酶 ETM-b 的效果。其中海藻酸钠制备的固定化酶活性回收率较低,在磷酸盐缓冲液中小球容易破裂;明胶固定化酶活性回收能达到 66% 以上,但操作稳定性差,使用 4 次后不能回收;壳聚糖固定化酶效果最好,操作稳定性强,酶活回收达到 66%。这是因为包埋法仅可用于低分子量的底物,常有底物扩散限制问题,限制酶的活性(孙志浩 2005);本文采取的壳聚糖固定化酯酶综合了吸附和交联两种方法的优点,制备条件温和,方法简便,成本低,酶的结合力强,稳定性较高,同时也克服了单一吸附法酶结合力较弱,对 pH、温度敏感,酶易脱落,装载容量小等缺点。

(2)用壳聚糖制备的固定化酶在非水介质中具有转化 α -乙酸萘酯的能力,在选择的 16 种常用有机溶剂中,固定化酶在异辛烷、正辛烷、正己烷中活力最高。Magnin 等(2001)曾报道过,用壳聚糖和黄原胶制备的固定化微生物脂肪酶水解甘油三酯,在辛烷和己烷中比在甲苯中的催化能力高。固定化酯酶具有在非水介质中催化多种反应的性质,在医药、食品、化工、环境保护等领域具有重要的应用价值,显示出广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 王亚林, 严建芳, 吴灵英. 1999. 产纤维素酶细胞固定化研究. 武汉工业学院学报, 18(4): 1~3
- 王爱玲, 黄 瑛, 周 位, 闫云君. 2007. 荧光假单胞菌脂肪酶固定化及催化制备生物柴油的工艺研究. 天然产物研究与开发, 19: 1 027~1 031
- 孙志浩. 2005. 生物催化工艺学. 北京: 化学工业出版社, 302~311
- 田桂玲, 邢国文, 叶蕴华. 1998. 在非水介质中进行酶促反应的几个重要问题. 有机化学, 18: 11~20
- 李彦峰, 李军荣, 伏莲娣. 2001. 固定化酶的制备及应用. 高分子通报, (2): 13~23
- 李慧蓉, 高云霞, 尹 艳. 2002. 卡拉胶与明胶包埋黄孢原毛平革菌的方法研究. 上海环境科学, 21(4): 205~209
- 沈鸿雁, 田桂玲, 叶蕴华. 2003. 非水介质中酶催化反应研究新进展. 有机化学, 23(3): 221~229
- 杨昌英, 潘家荣, 李远志, 田丽红, 杨金梅. 2003. 明胶固定化猪胰脂肪酶催化牛油合成单甘酯. 日用化学工业, 33(1): 64~66
- 林建城, 朱丽华, 王志鹏, 黄志明, 陈国强. 2006. 明胶固定化果胶酶的制备及酶学性质研究. 食品科学, 17(12): 315~318
- 郭 勇. 2005. 酶工程. 北京: 科学出版社, 212~213
- 高 强. 2008. 海洋芽孢杆菌酯酶 BSE-1 的分离纯化和生化性质研究. 见: 青岛科技大学硕士学位论文, 27~45
- 焦云鹏, 王志民, 蒋长兴. 2005. 固定化果胶酯酶的研究. 食品与发酵工业, 31(8): 137~140
- 程晓滨, 莱 荣, 李平生, 朱 芹, 涂仕前, 唐文忠. 2007. 锰过氧化物酶的耦合固定化及其性质研究. 生物工程学报, 23(1): 90~95
- Alvarez-Macarie, E., and Baratti, J. 2000. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10(4): 377~383
- Blandino, A., Macas, M., and Cantero, D. 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology, 27(3): 319~324
- Chamorro, S., Sanchez, J. M., and Akcabtara, A. R. 1998. Treatment of *Candida rugosa* lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities. Biotechnol. Lett. 20 (5): 499~505
- Dong, Y., Meng, C., and Shi, X. 2006. Lipase catalyzed transesterification of ethyl mandelate in n-butanol. J. Mol. Catal. 20(4): 351~354
- Hassa, P., Granado, J., Freydl, E., and Dudler, R. 2000. Syringolin-mediated activation of the *Pir7b* esterase gene in rice cells is suppressed by phosphatase inhibitors. Molecular Plant-Microbe Interactions, 13 (3): 342~346
- Kilinc, A., Teke, M., and Onal, S. 2006. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. Prep. Biochem. Biotechnol. 36(2): 153~163
- van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 3: 401~416
- Lee, E. G., Won, H. S., and Ro, H. S. 2003. Preparation of enantiomerically pure(S)-flurbiprofen by an esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 26(3-6): 149~156
- Magnin, D., Dumitriu, S., and Magny, P. 2001. Lipase immobilization into porous chitoxan beads; activities in aqueous and organic media and lipase localization. Biotechnol. Prog. 17(4): 734~737
- Schuleit, M., and Luisi, P. L. 2001. Enzyme immobilization in silica-hardened organogels. Biotech. Bioeng. 72(2): 249~253
- Yang, Y., Yong, X. B., and Yan, F. L. 2008. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophobicity. Prog. Biochem. 43: 1 179~1 185