

环氧树脂固定化卤醇脱卤酶的研究

顾 恺, 邹树平, 王志才, 郑裕国*

(浙江工业大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310014)

摘要:采用环氧树脂 ES-103B 对卤醇脱卤酶进行固定化, 对最优固定化条件及固定化酶的操作稳定性进行了研究。结果最佳固定化条件为: 吸附温度为 25℃, 吸附缓冲液为 pH 7.0 磷酸钠缓冲液, 初始酶质量浓度为 0.5 mg/mL, 共价时间为 24 h。在此优化条件下, 固定化酶的酶活回收率为 74.5%, 酶蛋白固定化效率为 94.2%, 比活力为 518.6 U/g。利用固定化酶催化 1,3-二氯丙醇制备环氧氯丙烷, 重复使用 15 批次后, 产物收率仍能保持在初始收率的 91% 以上, 具有良好的工业化应用潜力。

关键词: 固定化; 环氧树脂; 卤醇脱卤酶

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)11-0069-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.11.016

Immobilization of haloalcohol dehalogenase by ES-103B epoxy resin

GU Kai, ZOU Shu-ping, WANG Zhi-cai, ZHENG Yu-guo*

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The immobilization of haloalcohol dehalogenase is performed by epoxy resin ES-103B. The immobilization condition is optimized and the operation stability of immobilized enzyme is also investigated. The optimal immobilization conditions are shown as follows; 25℃ of absorption temperature, sodium phosphate buffer as the immobilization buffer, 7.0 of pH, 0.5 mg/mL of the initial concentration of enzyme and 24 h of alkaline treatment time. Under this condition, the recovery activity of enzyme and the immobilization yield reach 74.5% and 94.2%, respectively. The specific activity is 518.6 U/g. The immobilized enzyme can be successfully run for 15 batches and the yield still remains above 91%, which has a great potential for industrialization.

Key words: immobilization; epoxy resin; haloalcohol dehalogenase

卤醇脱卤酶 (Haloalcohol dehalogenase, EC 4.5.1.X, 简称 HHDH) 也叫卤醇卤化氢裂解酶, 是一类通过分子内亲核取代机制催化邻卤醇转化为环氧化物的脱卤酶, 是自然界微生物降解有机卤化合物的关键酶之一。卤醇脱卤酶不但可以选择性催化邻卤醇碳—卤键的断裂进行脱卤反应合成手性环氧化物, 而且可以高选择性地催化接受除卤离子外的一系列非自然亲核试剂, 合成一系列光学纯的手性 β -取代醇^[1]。卤醇脱卤酶催化过程不需要金属离子、辅基或辅酶参与, 被认为是手性环氧化物和 β -取代醇催化合成中最具潜力的生物催化剂之一^[2-3]。

由于游离卤醇脱卤酶不易回收, 难以重复利用, 限制了其大规模生产应用。而固定化酶能有效地克服以上缺点, 呈现贮存稳定性高, 分离回收容易, 可多次重复使用, 操作连续可控和工艺简便等一系列优点, 成为近年来酶工程领域最为活跃的研究重点之一^[4-5]。常用的固定化酶技术包括物理吸附、交联法、共价结合和包埋法。但在工业化应用中, 为了降低固定化酶的成本, 要求制备的固定化酶具有良

好的操作稳定性, 可以反复多次使用, 因此选用共价结合法制备结合牢固的固定化酶比其他方法具有更大优势^[6]。由于环氧基团在常温下即可与酶蛋白表面的氨基酸残基(氨基、羧基、巯基等)发生温和的开环共价结合, 从而将酶分子固定在载体表面。并且一些合成树脂载体在较长的周期内具有很强的耐微生物和酸碱腐蚀作用及较强的机械性能。故有众多学者将含有环氧基团的树脂作为载体来实现酶的共价法固定化, 并在工业化生产中得到使用^[7-9]。目前, 有关卤醇脱卤酶固定化研究报道较少, 笔者通过筛选环氧树脂作为载体, 尝试将卤醇脱卤酶进行共价固定化, 并对其固定化工艺条件进行了探讨, 从而推进卤醇脱卤酶固定化研究进展。

1 实验部分

1.1 实验材料

卤醇脱卤酶的重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/Pet28b(+)-HHDH, 浙江工业大学生物工程研究所构建并保藏; 环氧树脂 LX-1000EP(C), 西安蓝晓科

收稿日期: 2016-04-06

基金项目: 国家自然科学基金(21176224)

作者简介: 顾恺(1990-), 男, 硕士生, 主要从事生物催化与酶工程研究, gukai1212@163.com; 邹树平(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物催化与转化, zousp@zjut.edu.cn; 郑裕国(1961-), 男, 博士, 博士生导师, 研究方向为生物催化, 通讯联系人, zhengyg@zjut.edu.cn。

技术有限公司生产;环氧树脂 ES-103B、ES-105M、ES-105S,天津南开和成科技有限公司生产;环氧树脂 Sepbeads EC-EP,日本三菱化学公司生产;环氧树脂 D5759、D5730,美国 Purolite 公司生产;1,3-二氯-2-丙醇、环氧氯丙烷,百灵威科技有限公司生产;其他常规试剂均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 卤醇脱卤酶的制备

将重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28b (+)-HHDH 接种至终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的斜面培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h,获得斜面菌体;挑取斜面菌种接入终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素的种子培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 8~10 h,获得种子液;按体积分数为 2% 的接种量,将种子液接入装有 100 mL 终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素的发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 诱导培养 10~12 h。将发酵液离心 (9 000 r/min, 10 min) 收集沉淀菌体,超声破碎 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,得到粗酶液。

1.2.2 固定化载体的筛选

配制 100 mmol/L、pH 7.0 的磷酸钠缓冲液 20 mL,加入 2 g 不同的树脂和 2 mL 粗酶液,混合后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床中,180 r/min 振荡 20 h。抽滤,检测不同固定化酶样品酶活。

1.2.3 初始酶质量浓度对酶固定化的影响

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,在 20 mL、100 mmol/L、pH 7.0 磷酸盐缓冲液中加入 2 g 的环氧树脂 ES-103B,再加入不同体积的粗酶液,使得缓冲液中的初始酶质量浓度达到 0.25、0.5、1.0、1.5、2.5、5.0、7.5 mg/mL 和 10.0 mg/mL。

1.2.4 缓冲液 pH 对酶固定化的影响

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,在 20 mL、100 mmol/L 及 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 磷酸盐缓冲液中分别加入 2 g 环氧树脂 ES-103B,再分别加入一定体积的粗酶液,使得缓冲液中的初始酶质量浓度为 0.5 mg/mL。

1.2.5 吸附保温时间和温度对酶固定化的影响

配制 100 mmol/L、pH 7.0 磷酸盐缓冲液,分别加入定量的酶液,使其终质量浓度达到 0.5 mg/mL。取上述酶液缓冲液 20 mL 加入 50 mL 摇瓶中,并准确称量加入 2 g ES-103B 环氧树脂,分别在 25、30、35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于 150 r/min 振荡 12 h。

1.2.6 卤醇脱卤酶固定化吸附过程的研究

配制 100 mmol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,分别

加入定量的酶液,使其终质量浓度达到 0.5 mg/mL。取上述酶液缓冲液 200 mL 加入 500 mL 三口圆底烧瓶中,准确称量并加入 20 g ES-103B 环氧树脂,25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡 10 h。

1.2.7 共价保温时间对酶固定化的影响

将 1.2.6 中所制备的固定化酶分别置于 100 mmol/L、pH 9.0 磷酸盐缓冲液中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床、150 r/min 振荡 30 h。分别在 6、12、18、24、30 h 定时取样抽滤。再将不同条件下处理的固定化酶置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 、200 mmol/L、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液中保温 10 h,测定固定化酶的残余酶活。

1.2.8 卤醇脱卤酶的酶活测定

在 50 mL 的转化瓶中加入 10 mL、200 mmol/L、pH 9.0 硼酸盐缓冲液和 0.2 g 固定化酶或 200 μL 粗酶液,放置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴摇床中保温 10 min。然后取 40 mmol/L 的底物加入到转化瓶中,转速为 180 r/min,计时开始反应。反应 2 min 后,取 0.4 mL 反应液置于已加入 0.8 mL 乙酸乙酯的 EP 管进行萃取,12 000 r/min 离心 10 min,取上清有机相,用气相检测。

1.3 分析方法

反应液中的底物 1,3-DCP 和产物 ECH 均由气相色谱法测定。气相色谱仪为美国安捷伦 Agilent-7890 型,配备 FID 检测器。色谱分析条件:色谱柱为 HP-5 毛细管柱;柱温为 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min,20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 160 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min;前进样口温度为 230 $^{\circ}\text{C}$;检测器 FID 温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;载气(N_2)流速为 54.0 mL/min。在该条件下,1,3-DCP 和 ECH 的出峰时间分别为 6.3 min 和 4.1 min。

2 结果与讨论

2.1 树脂的选择

从多种不同种类的树脂(包括国内外)中筛选得到 7 种环氧树脂对卤醇脱卤酶进行固定化,结果如表 1 所示。由于不同环氧树脂的生产工艺不同,使得这 7 种环氧树脂具有不同的颗粒形状、颗粒大小、孔径大小以及树脂表面环氧基团的含量,导致酶

表 1 不同环氧树脂对固定化酶活回收率以及固定化效率的影响

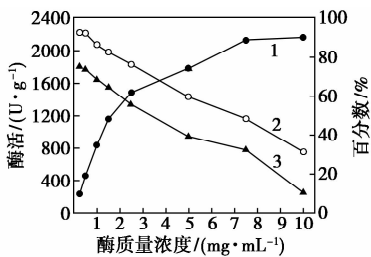
树脂类型	D5730	D5759	EC-EP	ES-105M	ES-105S	ES-103B	LX-1000EP
固定化酶回收率/%	25.7	21.0	42.7	48.4	40.8	68.7	49.3
固定化效率/%	64.5	58.3	76.8	72.4	76.9	93.2	84.7

蛋白和树脂之间的共价位点以及共价键数目不同,使得酶分子表现出不同的酶活^[10]。由表1可知,ES-103B环氧树脂的固定化酶效果最佳,酶活回收率达到68.6%,固定化效率在93.2%左右。因此选用ES-103B环氧树脂作为固定化载体进行研究。

2.2 卤醇脱卤酶的固定化条件优化

2.2.1 初始酶蛋白质量浓度对酶固定化的影响

在固定化酶研究中,单位质量的载体对酶的吸附量是有限的,因此固定化酶载体与酶蛋白浓度需要保持在一定范围之内。过低或过高的酶质量浓度会导致载体和酶蛋白的浪费从而增加固定化成本^[11-12]。酶蛋白质量浓度对卤醇脱卤酶固定化的影响如图1所示。



1—酶活;2—固定化效率;3—酶活回收率

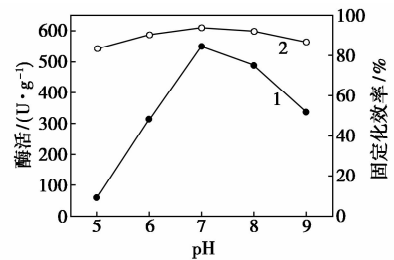
图1 酶蛋白质量浓度对卤醇脱卤酶固定化的影响

由图1可以看出,随着酶质量浓度的增加,树脂表面基团逐渐被饱和,固定化酶的单位酶活逐渐增加,当初始酶蛋白质量浓度超过5 mg/mL时,固定化酶的单位酶活上升速度开始变缓,原因是树脂已饱和或由于载体内部通道挤满了过量的酶蛋白导致空间位阻增加,导致固定化效率降低。而固定化效率始终高于酶活回收率,这是由于在固定化过程中酶蛋白与载体发生了不规律的共价结合,从而导致部分酶蛋白丧失了活性,这也是环氧树脂固定化的普遍共性问题^[11]。随着酶量的增加,由于部分酶分子无法形成刚性更好的多点共价形式,因此会导致固定化酶的稳定性下降^[13],不利于后续的酶催化过程。

2.2.2 吸附缓冲液 pH 对酶固定化的影响

在pH 5.0~9.0内,固定化效率保持在90%左右,这说明酶蛋白分子已基本吸附在树脂微孔内部或者表面。但比酶活呈随pH升高而上升然后下降的趋势,约在pH 7.0左右时,比酶活达到最大549.2 U/g。原因是pH过低或过高都会影响酶分子上所含的氨基酸残基的解离状态^[14]。当pH为7.0~8.0时,酶分子表面的氨基与载体的环氧基发生共价结合使得酶分子活性口袋的位置能朝着正确

的方向;而缓冲液在pH为8.0~9.0时,由于酶分子表面更多的氨基残基与环氧基发生共价结合,使得酶分子的构象发生了过大的变化,从而导致酶活下降。并且从已有文献可得出,卤醇脱卤酶在酸性环境下表现出较差的酶活和稳定性,因此酸性缓冲液不利于卤醇脱卤酶的固定化。

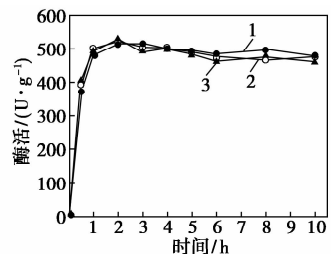


1—酶活;2—固定化效率

图2 缓冲液 pH 对酶固定化的影响

2.2.3 吸附保温时间和温度对酶固定化的影响

吸附保温时间和温度对酶固定化的影响如图3所示。由图3可看出,当吸附过程的温度从25℃上升到35℃,固定化酶的酶活几乎没有发生变化,这说明温度在卤醇脱卤酶固定化吸附过程中并不是主要的影响因素。因此考虑到酶的稳定性以及生产成本,选用室温25℃作为固定化吸附体系的温度。在0~2 h,固定化酶酶活达到最高点,这时的酶分子只是简单的吸附在载体表面,只有少量的酶与载体发生共价结合;在2~10 h,固定化酶酶活有轻微的下降,这是酶与载体形成单点共价键所导致的。故后续实验选择10 h作为固定化吸附过程的吸附时间。



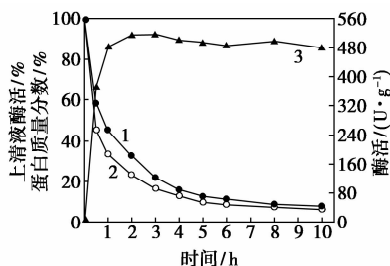
1—25℃;2—30℃;3—35℃

图3 吸附保温时间和温度对酶固定化的影响

2.2.4 卤醇脱卤酶固定化吸附过程进程

卤醇脱卤酶固定化的吸附过程如图4所示。由图4可看出,在吸附过程的前1 h,固定化酶的酶活快速上升,而上清液中的酶液酶活以及蛋白质量分数也随之快速降低。这与之前2.2.3的结论相对应,在这段时间基本上是物理吸附起主导作用。在吸附过程的1~2 h阶段,固定化酶的酶活达到最大值515.4 U/g,在后续2~10 h内,固定化酶的酶活

略有下降。但上清液中酶液酶活和酶蛋白含量在 2~4 h 内仍保持较快的下降趋势。这是由于酶分子与环氧基形成了单点的共价键,导致酶分子活性口袋方位发生变化,使得酶分子难以表现出活力。

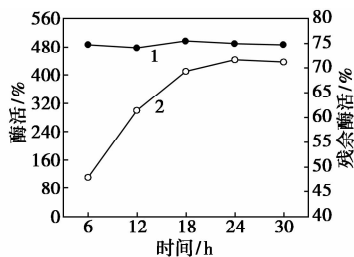


1—蛋白质量分数;2—上清液酶活;3—酶活

图 4 卤醇脱卤酶固定化的吸附过程

2.2.5 共价保温时间对酶固定化的影响

在环氧树脂固定化的第 1 阶段中,酶蛋白分子通过吸附作用吸附在环氧树脂表面,然后通过单点共价键相结合^[15]。单点共价键并不能满足工业化生产中的操作强度,因此需要对固定化酶进行第 2 阶段的多点共价过程。但是共价过程会造成一定的酶活损失,同时会增加生产固定化酶的时间成本。因此选择合适的共价保温时间尤为必要。共价保温时间对酶固定化的影响如图 5 所示。



1—酶活;2—残余酶活

图 5 共价保温时间对酶固定化的影响

从图 5 可以看出,随着保温时间的延长,固定化酶的酶活并没有发生变化,但是固定化酶在 65℃ 保温 8 h 后的残余酶活却发生了很大的变化。没有经过碱性环境中保温的固定化酶在 65℃ 保温 12 h 后残余酶活在 50% 左右。但经过 18~32 h 的保温后,同样热处理后的残余酶活可以达到 70%。其原因为随着保温时间的延长,更多的共价键在酶分子与环氧载体之间形成,从而提升了固定化酶的热稳定。

2.3 固定化酶在反应釜中的操作稳定性

固定化酶的操作稳定性是衡量固定化酶是否具有酶催化经济可行性的一个重要指标^[16]。因此,固定化酶在 100 mL 体系搅拌下进行的批次实验,并以第 1 批的产物收率计为 100%,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,在 15 批次后仍保留 91% 以上的产物收率。这表明酶分子与载体之间的共价键非常牢固,有效地克服了由于搅拌剪切力对酶结构的破坏,从而使得酶分子在每批反应中脱落以及失活的比例较少。

表 2 固定化卤醇脱卤酶在反应釜中的操作稳定性

批次	1	3	6	9	12	15
ECH 收率/%	100	99.6	97.8	95.1	93.7	91.3

3 结论

通过对不同环氧树脂载体固定化卤醇脱卤酶的效果进行比较发现,ES-103B 环氧树脂是比较固定化的载体。研究了各相关因素对制备固定化卤醇脱卤酶的影响规律,以及固定化酶的稳定性。在吸附温度为 25℃,吸附缓冲液 pH 7.0 磷酸钠缓冲液,初始酶质量浓度为 0.5 mg/mL,共价时间为 24 h 制备固定化酶,具有良好的温度稳定性和操作稳定性。固定化酶在重复使用 15 批后,产物收率仍能保持在 91% 以上。因此,以环氧树脂 ES-103B 为卤醇脱卤酶固定化的载体,具有很好的工业应用开发前景。

参考文献

- [1] Ghannia H D, Maja M E, Lutje S J H, *et al.* Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening[J]. *Ecol Entomol*, 2007, 32(5): 567-574.
- [2] 郑楷, 汤丽霞. 多功能生物催化剂——卤醇脱卤酶的研究进展[J]. *化工学报*, 2008, 59(12): 2971-2977.
- [3] You Z Y, Liu Z Q, Zheng Y G. Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: Current state and future perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(1): 9-21.
- [4] Sheldon R A, Pelt S V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6223-6235.
- [5] Tan I S, Lee K T. Immobilization of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* on kappa-carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 386-394.
- [6] Rodrigues R C, Clusidia O, Ngel B M, *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6290-6307.
- [7] 颜淑玮. 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶的固定化应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [8] Vaidya A, Miller E, Bohling J, *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on macroporous resins: Effects of resin chemistry, reaction conditions and resin hydrophobicity[C]. *Proceedings of the American Chemical Society*, F, 2006.

水吸收并通过换热器与温度较低的水进行二次换热。

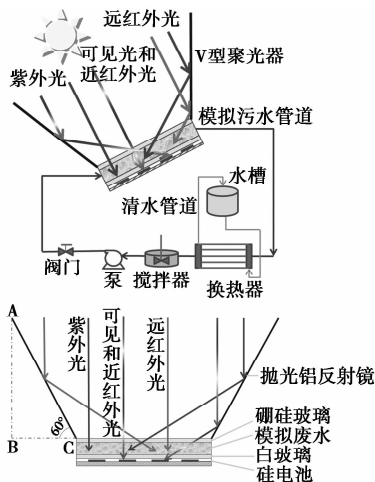


图 1 V 型聚光太阳能水处理系统

1.2 系统与模拟污染物

1.2.1 系统搭建

采用北京天柱阳光公司生产的单晶硅电池组件,尺寸为 536 mm × 477 mm,标准状况下(AM1.5, 25℃和 1 000 W/m²)最大输出功率(P_m)为 30 W,发电效率(η)为 16.5%。在 200 ~ 1 200 nm 波段具有较好的透光性高纯硼硅酸盐玻璃(秦皇岛众和有限公司生产)作为流道盖板,微型泵(流量为 2.8 L/min,额定功率为 6 W)推动污水循环流动,V型聚光器所使用的反射镜为抛光镜面铝,对太阳光有较高的反射率。为了与非聚光 SOLWAT 系统的性能进行对比,建立了非聚光 SOLWAT 系统;同时将相同型号单晶硅电池组件作为参比系统,与 SOLWAT 系统的电性能进行对比分析。

1.2.2 模拟污染物与催化剂

选择有机染料酸性红 AR26 (Acid Red 26, TCI)

为模拟污染物。AR26 是一种具有单偶氮结构的芳香族化合物,颜色为深红色,主要用于染料和生物染色。催化剂是德固赛公司生产的 TiO₂ 纳米颗粒 P25,平均粒径为 21 nm,比表面积为 50 m²/g,锐钛矿与金红石 2 种晶型的比例为 4:1,实验中考察的催化剂质量浓度分别为 0.1、0.15 g/L 和 0.2 g/L。

2 光伏-光催化性能测试

2.1 数据采集与记录系统

为了考察 SOLWAT 系统的电性能,建立了数据采集和记录系统,其中总辐射表(300 ~ 3 000 nm)和紫外辐射表(280 ~ 400 nm)用于测量实验中太阳总辐照度和紫外辐照度;利用温度传感器(Pt100)监测电池板以及污水的温度;3 个分流电阻器(型号 2A-100 mV)用于检测 3 块电池组件的输出短路电流。以上数据均由 1 台数据记录仪(DI-710 型,美国康泰公司生产)实时采集,采样间隔为 10 s。3 块电池组件的 I-V 曲线由 I-V 记录仪(DS-100c 型,美国 Daystar 公司生产)实时采集,采样间隔为 5 min。

2.2 样品采集与检测

首先,将定量的酸性红和 TiO₂ 溶于 16 L 去离子水中,并等分成 2 份,并在避光条件下充分搅拌 40 min 使其达到吸附平衡;然后,将 2 份 8 L 的模拟废水分别通入聚光和非聚光 SOLWAT 系统的水槽中,开启水泵,在避光条件下使系统运行 10 min,稳定后开始实验。

每隔一定时间采样并避光保存,然后在 12 000 r/min 离心取上清液通过 0.45 μm 纤维素膜过滤,滤液即为待测样品。利用紫外-可见分光光度计检测样品在最大吸收波长处吸光度,测定污染物的浓度。

(上接第 72 页)

- [9] Mendes A A, Freitas L, DE Carvalho A K, *et al.* Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies [J]. *Enzyme Research*, 2010, 2011: 967239 - 967239.
- [10] 钱俊青, 蒋盛蓝, 秦德怀, 等. 214 型离子交换树脂固定化假丝酵母脂肪酶的研究 [J]. *浙江工业大学学报*, 2013, 41 (3): 244 - 249.
- [11] 崔培梧, 黎继烈, 肖作为, 等. 环氧树脂固定化青霉菌柚苷酶的工艺条件 [J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40 (5): 87 - 92.
- [12] 李全文, 严东, 侯杰, 等. 纳米 Fe₃O₄ 协同海藻酸钠固定化桑叶多酚氧化酶 [J]. *现代化工*, 2012, 32 (10): 58 - 61.
- [13] Torres P, Batista-viera F. Immobilization of β -galactosidase from Ba-

cillus circulans onto epoxy-activated acrylic supports [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 74 (3/4): 230 - 235.

- [14] Liu H, Liu J, Tan B, *et al.* Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* beta-galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35 (8): 1287 - 1295.
- [15] Blanco R M, Calvete J J, Guisán J M. Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1989, 11 (6): 353 - 359.
- [16] Fessner W D, Turner N J, Wang M X. Biocatalysis-A Gateway to Industrial Biotechnology [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353 (13): 2189 - 2190. ■