

文章编号: 1001-3555(2007)01-0090-06

非水介质中酶促糖酯合成研究进展

陈志刚, 宗敏华¹⁾, 娄文勇

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

关键词: 酶; 糖酯; 非水介质

中图分类号: O643.3 文献标识码: A

糖酯类化合物广泛存在于自然界, 是一类具有重要生理活性的物质, 其对于物质的跨膜运输和能量传递, 对于生命体内的代谢过程, 均具有重要的作用. 糖酯作为一种生物功能分子和化工原料具有重要的应用价值. 例如, 糖酯化合物具有特殊的两亲结构, 因此可作为一种非离子型生物表面活性剂. 这类表面活性剂与来自石油工业的化学表面活性剂相比除具有优良的表面性能外, 还具有生物相容性、可生物降解性和无毒等优点, 是一类环境友好的表面活性剂^[1]. 糖酯类生物表面活性剂已广泛应用于食品、医药、发酵及石油化工行业. 糖酯还可以作为煎炸油、冰淇淋等无热量脂代用品, 例如蔗糖聚酯, 1996年被美国食品与药物管理局(FDA)批准用作无热量煎炸用油. 近年来的研究还发现, 一些糖酯及其衍生物还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等生物活性^[2, 3].

糖酯的合成方法有多种, 传统的化学合成常在高温、高压的条件下进行, 反应条件苛刻. 此外, 化学方法合成的糖酯还具有颜色较深(深褐色)的缺点. 如果用未经修饰的糖作为底物, 由于糖环上的羟基众多, 且环境相似, 酯化反应中糖环上的酰基容易发生分子内的迁移, 故反应的区域选择性较差, 易产生副产物^[4]. 欲用化学方法合成酯化位置特定的糖酯, 需将糖羟基进行保护以提高选择性, 复杂的保护和脱保护步骤, 使合成变得复杂, 且产物难于分离, 成本提高, 难于推广和应用^[4]; 总之, 化学方法合成糖酯, 选择性差, 产率低, 且因产物中常含有一些有毒的化学物质而难于应用在化妆品、食品和医药工业上. 糖酯也可用微生物发酵的

方法来制备, 但用此方法得到的产物通常是各种异构体的混合物, 且产物分离困难^[5].

受热力学限制, 糖酯合成反应不适宜在水相中进行. 近年来, 随着非水相酶学的发展, 人们对非水介质中酶促糖酯合成进行了探索, 并得到了具有区域选择性的糖酯合成方法. 非水相中, 酶促糖酯合成因具有反应条件温和、能耗少、区域选择性高、副产物少以及产物易分离等优点, 发展相当迅速, 然而国内对非水介质中酶促糖酯合成的研究甚少. 本文综述近年来国内外非水相中酶促糖酯合成研究状况.

1 常用于催化糖酯合成的酶

催化糖酯合成的酶主要为水解酶类, 包括脂肪酶、蛋白酶等. 脂肪酶是最早用于糖酯类化合物合成的酶类^[6], 且源于 *Candida antarctica* 的游离脂肪酶 CAL-B 及固定化脂肪酶 Novozym 435、源于 *Pseudomonas cepacea* 的脂肪酶 PSL、源于 *Candida cylindracea* 的脂肪酶 CCL 以及猪胰脂肪酶 PPL 最为常用^[1, 4-6]. 来源于枯草杆菌属 *Bacillus* sp. 的蛋白酶能在极性较强的有机介质(如 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)、吡啶等)中催化糖酯的合成^[7, 8]. 脂肪酶和蛋白酶的催化活性及选择性不仅与酶源相关, 且受底物结构、反应介质等的影响. 常用于催化糖酯合成的酶之种类及来源如表1所示.

2 有机介质中酶促糖酯合成

1986年 Klibanov 等^[6]首先开展了有机相中合成糖酯的研究, 他们以吡啶为溶剂用猪胰脂肪酶催

收稿日期: 2005-10-15; 修回日期: 2006-01-04.

作者简介: 陈志刚, 男, 生于1971年, 博士生.

1) 通讯联系人, 020-22236669; E-mail: btmhzong@scut.edu.cn.

表1 常用于糖酯合成酶

Table1 Enzyme often used in enzymatic synthesis of sugar esters

Enzyme	Enzyme source
Lipase	<i>Candida antarctica</i> . <i>Candida rugosa</i> . <i>Candida cylindracea</i> . <i>Mucor meihei</i> . <i>Pseudomonas cepacia</i> . <i>Chromobacterium viscosum</i> . <i>Aspergillus niger</i> . <i>Rhizopus arrhizus</i> . <i>Thermomyces lanuginosus</i> . <i>Porcine pancreas</i>
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i> . <i>Bacillus subtilis</i>

化糖酯合成,得到了6-O-酰基-葡萄糖酯.随后,有机相中酶促合成糖酯的研究工作相继在各国展开,但进展较缓慢,其主要原因是糖是多羟基物质,多羟基导致其只溶解于二甲基亚砷(DMSO)、DMF、吡啶等强极性有机溶剂中,但这些强极性溶剂易使酶变性失活;当选用非极性溶剂(如甲苯,异辛烷等)为反应介质时,酶虽然能保持较高的催化活性,但由于酶和糖均不溶于此类溶剂,导致反应速度极为缓慢.为了改善糖类化合物在非极性有机溶剂中的溶解性和提高酶促反应速度,人们做了大量的研究工作,包括酶和溶剂的选择、添加助溶剂、糖修饰及固定化等方法,现就近年来这方面的研究状况综述如下.

2.1 直接酯化法

猪胰脂肪酶在吡啶(少数能溶解碳水化合物的溶剂之一)中可催化葡萄糖、半乳糖、甘露糖及果糖的酰化反应,酰化剂用高活性的三氯乙醇脂肪酸(C2~C12)酯,反应在克规模上进行^[6].枯草杆菌蛋白酶可在DMF或吡啶中催化二糖(如蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖等)^[7,8]或一些低聚糖(如麦芽三糖至麦芽七糖)的酯化反应^[7].

2.2 糖修饰法

对糖进行修饰以增加其在有机介质中的溶解度也是在糖酯合成中普遍采用的方法.对糖的修饰有多种方式,常见的有缩酮和烷基糖苷形式.缩酮形式修饰的糖,经过酶催化反应之后,要在温和的酸解条件下脱去丙酮叉,最后得到单糖酯或双糖酯,产率较高.但是,毕竟引入丙酮叉基团和脱去丙酮叉基团的反应,在一定程度上使糖脂的合成复杂了一些^[4,9].引入烷基修饰基团的反应很简单,而且一些酶促反应后得到的产物本身就是很好的表面活性剂,无需再脱去修饰基团.

2.3 苯基硼酸增溶法

有机硼酸能与糖形成硼酸-糖复合物,与糖相比,该复合物能溶于许多非极性有机溶剂中,解决了糖的溶解性问题.该复合物反应后在极温和条件

下水解,重新得到糖酯. Ikeda等^[10]使用苯基硼酸作为糖的助溶剂,使葡萄糖与苯基硼酸形成苯基硼酸-糖复合物,在叔丁醇中用*Pseudomonas* sp 脂蛋白脂肪酶催化该复合物与乙烯酯、脂肪酸或植物油进行酯化/转酯反应,得到了较高的转化率.如果反应体系中不加苯基硼酸则几乎无反应发生.

2.4 吸附法

酶或糖固定化后,可以促进酶与糖充分接触从而提高反应的速度和产率.为了克服糖在反应介质正己烷中的不溶性, Tsitsimpikou等^[11]把一系列单糖固定在硅胶上,而后将它们引入到反应体系中,并比较了来自于*Candida antarctica*和*Candida rugosa*两种脂肪酶催化月桂酸糖酯合成的反应,得到了较好的转化率和区域选择性(反应100%在6-OH位酰化).张念湘等^[12]将脂肪酶及其底物单糖共同吸附在亲水性载体硅胶上,进行酶催化乙酸乙烯酯和单糖反应合成糖酯,得到较高转化率;同时作者的研究还表明,当单糖以晶体状态直接放入反应体系中时没有产物生成,这可能是由于糖吸附在硅胶上破坏了糖的晶体结构,使糖能够避免晶格的束缚进入酶的活性中心,同时固定化还增强了糖与酶之间的接触.

另外也有其它的研究者采用蛋白质增溶技术使酶溶于非极性有机溶剂来提高酶促糖酯合成速度等^[13].

相对于水相而言,有机溶剂中酶促糖酯合成具有明显的优势,反应向糖酯合成方向进行,水解反应受到抑制.以有机溶剂为反应介质,酶促糖酯合成的研究向前迈进了一步,但在实际应用中存在一定缺陷.大量使用有机溶剂导致酶的活性降低,这是酶促糖酯合成的致命弱点;糖类底物溶解要求溶剂的亲水性和酶活力对溶剂的疏水性要求互相冲突,难以找到一个合适的溶剂;有机溶剂的使用,在食品和药品生产上受到极为严格的限制,而合成糖酯主要应用于食品和药品,因此这一点对于有机相中酶促糖酯合成极为不利.另外大量有机溶剂的

使用会对环境造成污染等. 为此有必要对合成糖酯的新的反应介质和体系进行探索.

3 无溶剂体系中酶促糖酯合成

Halling 等^[14]指出, 用无溶剂系 (solvent-free system) 统替代传统的低水有机溶剂系统, 是酶促生物活性肽合成的一个发展方向. 除主要用于多肽合成外, 近十多年来该反应体系用于糖酯类化合物的合成已相继报道^[5, 15, 16]. 无溶剂体系与微水有机溶剂体系相比, 具有以下优点^[14].

3.1 由于反应不需要大量的有机溶剂, 因而避免了有机介质对酶失活作用; 同时降低了成本有利于工业化生产.

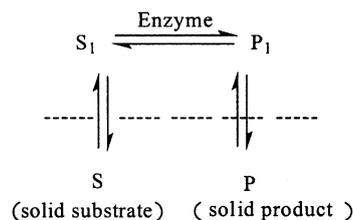
3.2 由于这种体系不使用或少量使用有机溶剂, 因而反应更加环境友好和经济; 同时避免了有机介质对产物的污染, 更适用于食品和医药工业.

Fregapane 等^[15]报道了无溶剂体系中几种脂肪酶促葡萄糖酯和半乳糖酯合成, 作者用丙酮缩糖代替单糖, 以增加底物在非极性长链脂肪酸甲酯中的溶解度, 反应在 70 °C 下进行, 在几个小时内便得到较高的单酯产率 (50% ~ 90%). Kim 等^[14]研究了在无溶剂系统中 *Mucor meihei* 脂肪酶催化蔗糖和癸酸酯化生成蔗糖酯反应, 该反应具有较好的区域选择性 (几乎 100% 在 C6-OH), 单酯产率 25.3%.

近年来, Cao 等^[5]报道了“固-固”反应体系 (Solid to Solid System) 中酶促糖酯合成. “固-固”反应体系是无溶剂体系 (或高底物浓度体系) 的一种形式. 这种反应体系主要是由不溶的反应物和产物组成. 研究表明, 虽然该体系不溶物质含量相当高, 但反应体系液相的形成是必不可少的^[17, 18], 即

在“固-固”体系中, 酶促反应仍是在液相中进行. 其反应机理如图 1 所示. 部分底物首先溶解在液相中, 而后酶催化反应生成产物, 由于液相体积很小, 生成的产物很快从液相中析出, 从而推动反应持续进行^[17]. 液相的形成主要是通过添加微量“助溶剂” (反应温度条件下呈液态) 来实现的. 助溶剂可以是水、有机溶剂或水与有机溶剂的混合物. 一定量的助溶剂可以改善液相的形成, 调节液相的体积、粘度、组成和各组分间的比例以及固相在液相中的分散量和程度, 从而提高反应速度及产率, 尤其在反应后期, 由于产物大量析出, 混合物固化现象明显, 传质受到限制, 反应速率降低, 但是通过添加助溶剂可明显改善这一现象^[5, 14].

Catalytic liquid phase consisting of adjuvant
and the substrates dissolved



Solid phase consisting of solid substrates and solid product

图 1 “固-固”反应体系酶促反应机理

Fig. 1 Schematic diagram of the enzyme-catalyzed solid phase synthesis of sugar ester

Cao 等^[5]在“固-固”体系中对 Novozym 435 催化棕榈酸和 β -D(+)-葡萄糖酯化反应进行了研究, 并考察了助溶剂性质对糖酯合成的影响, 发现助溶剂的 Log P 值对反应的转化率和产率有着较大影响 (表 2). 他们认为极性较强的助溶剂有利于反应进行, 其原因是底物葡萄糖在极性较强的助溶剂中溶

表 2 助溶剂对酶促葡萄糖棕榈酸酯合成反应的影响

Table 2 Effect of adjuvant on enzymatic synthesis of glucose palmitic acid ester

Adjuvant	LogP	Conversion (%)	Productivity (mmol/g · h)
Dioxane	-1.1	61	0.28
Acetonitrile	-0.36	62	0.29
Acetone	-0.3	86	0.40
Tetrahydrofuran	0.49	50	0.23
<i>t</i> -Amylcohol	1.4	34	0.16
3-Methyl-3-pentanol	1.5	34	0.16

解度较大, 而产物却相反, 由于产物在助溶剂中的溶解度小, 易结晶析出, 从而促进反应进行. 但是, 由表 2 可见, 并不是溶剂的极性越强转化率和产率

越高, 这可能与溶剂对酶的失活作用、底物与产物的扩散及其它因素有关. Yan 等^[19]以固定在树脂 EP100 上的 Novozym SP525 为催化剂, 硬脂酸为酰

基供体, 丙酮为助溶剂, 利用该反应体系合成 6-O-硬脂酰葡萄糖, 产物纯度大于 99%, 产率高达 90%.

在国内, 铁翠娟等^[20]以吸附在硅藻土上的假丝酵母(*Candida* sp. 1619)脂肪酶为催化剂, 在无溶剂体系中, 研究了月桂酸与海藻糖的酯化反应, 产物主要是 6, 6'-海藻糖月桂酸酯, 其纯度为 90% ~ 95%. 魏东芝等^[21]研究了脂肪酶 Novozym 435 催化合成乳酸乙基糖苷酯, 发现在无溶剂体系中以乳酸丁酯作为酰基供体可有效地合成乳酸葡萄糖苷酯, 转化率和区域选择性分别为 71% 和 100% (在 C6-OH 的酰化).

4 离子液体中酶促糖酯合成

离子液体(ionic liquids)是近几年来研究较热的一种新型反应介质, 它是由有机阳离子和无机或有机阴离子构成的低熔点盐类, 在室温或较低温(<100 °C)下呈液态, 通常称为室温离子液体(room-temperature ionic liquids)^[22]. 其作为一种新颖的、非水相的溶剂, 具有可忽略的蒸汽压力、不挥发性、高(热、化学)稳定性及对环境友好等特

性, 故称之为“绿色溶剂(green solvents)”. 另外, 离子液体的极性、疏水性、粘度及溶解性均可通过其阳离子和阴离子的适当修饰来调节, 故又称之为“设计溶剂(designed solvents)”^[23]. 离子液体作为溶剂已广泛地应用于化学过程研究(萃取、反应介质、化学催化), 并取得了令人满意的结果. 离子液体通常被认为是一种极性较强的溶剂, 一般通过 Reichardt 染料颜色的变化就可较精确地测出其极性. 以四甲基硅烷的极性为 0, 水的极性为 1 作为参照, 大多数离子液体的极性在 0.6 ~ 0.7 之间, 相当于短链的醇类(如甲醇或乙醇)和 N-甲基甲酰胺, 远大于一般的有机介质^[24, 25]. 令人惊奇的是当用甲醇或 N-甲基甲酰胺溶液为反应介质时, 生物催化剂通常会失活; 而用与之有相似极性的离子液体作为反应介质时, 生物催化剂却表现出较高活性和选择性^[24]. 离子液体与传统的有机溶剂相比, 一个突出的优点是对极性强的底物(如碳水化合物)易溶解. 例如, Liu 等^[26]对糖类化合物在 1-烷基-3-甲基咪唑为阳离子的离子液体中溶解状况进行了研究, 结果表明离子液体中葡萄糖及蔗糖的溶解度远大于在有机介质叔丁醇中的(表 3); 另外, 离子液体对

表 3 葡萄糖及蔗糖在离子液体中的溶解度

Table 3 Solubility of β -D-glucose and sucrose in ionic liquids at 25 °C

Solvent			Solubility (g/L)	
	R	X	β -D-glucose	Sucrose
<i>tert</i> -Butanol	-	-	0.3	-
[BMIm][BF ₄]	C ₄ H ₉	BF ₄	<0.5	-
[BMIm][PF ₆]	C ₄ H ₉	PF ₆	<0.5	-
[MOMMIm][Tf ₂ N]	CH ₃ OCH ₂	(CF ₃ SO ₂) ₂ N	0.5	-
[MOMMIm][BF ₄]	CH ₃ OCH ₂	BF ₄	4.4	-
[MOMMIm][TfO]	CH ₃ OCH ₂	CF ₃ SO ₃	4.3	-
[MOEMIm][Tf ₂ N]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	(CF ₃ SO ₂) ₂ N	0.5	0.13
[MOEMIm][PF ₆]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	PF ₆	2.5	0.7
[MOEMIm][BF ₄]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	BF ₄	2.8	0.4
[MOEMIm][TfO]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	CF ₃ SO ₃	3.2	2.1
[EOEMIm][Tf ₂ N]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	(CF ₃ SO ₂) ₂ N	0.5	-
[EOEMIm][PF ₆]	C ₂ H ₅ OCH ₂ CH ₂	PF ₆	0.7	-
[EOEMIm][BF ₄]	C ₂ H ₅ OCH ₂ CH ₂	BF ₄	2.8	-
[MOMMIm][dca]	CH ₃ OCH ₂	(CN) ₂ N	66	249
[MOEMIm][dca]	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	(CN) ₂ N	91	220
[EOEMIm][dca]	C ₂ H ₅ OCH ₂ CH ₂	(CN) ₂ N	70	50
[BMIm][dca]	C ₄ H ₉	(CN) ₂ N	145	195

一些多糖如直链淀粉、 β -环糊精也有较强的溶解能力. Swatloski 等^[27]对离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑

盐酸盐([C₄MIm]Cl)中的纸浆纤维溶解状况研究表明, 在用微波加热(脉冲 3 ~ 5 s)的条件下, 纸浆

纤维的溶解率高达 25%，而在水和大多数有机溶剂中纤维素是极难溶解的。

离子液体替代传统的有机溶剂作为绿色反应介质用于生物催化与生物转化，最近几年才引起人们的重视。2000 年，Cull 等^[28]首次报道了离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($C_4MIm \cdot PF_6$)/水双相体系中 *Rhodococcus* R312 细胞催化 1, 3-二氰基苯水解生成 3-氰基苯酰胺的反应。随后，有关离子液体中酶催化各类反应(水解、酯化、转酯、氨解、酰化和氧化还原)的研究报道日渐增多^[29]。

由于离子液体对碳水化合物有着较强的溶解能力，因而为该类化合物的生物转化提供了一个良好的反应介质。离子液体中脂肪酶催化糖类化合物合成糖酯的研究已陆续有报道。Park 等^[30]研究了离子液体 1-甲氧乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($[MOEMIm][BF_4]$)和丙酮中 Novozyme 435 催化葡萄糖和乙酸乙烯酯(作酰基供体)酰化反应，在两种反应介质中葡萄糖的转化率分别为 99% 和 72%，产物中单酯(6-O-乙酰葡萄糖)含量分别是 93% 和 76%。表明脂肪酶 Novozyme 435 在离子液体中比在丙酮中具有更高活性和区域选择性。产生此结果是因为

表 4 皱落假丝酵母脂肪酶催化的葡萄糖苷酰化反应

Table 4 CRL-catalyzed acylation of glycosides

Entry	Medium	Reaction time (h)	2-AcG/3-AcG ^a	Yield (%) ^b
1	THF	96	62/38	20
2	CHCl ₃	90	77/23	25
3	$[BMIIm][PF_6]$	60	90/10	82
4	$[MOEMIm][PF_6]$	50	90/10	76

^aDetermined on the basis of the analyses of ¹H NMR spectroscopy.

^bIsolated yields.

有利于酶与底物的诱导契合作用有关。

离子液体作为酶催化糖酯合成的反应介质有以下两方面的不足：1) 离子液体的高粘度。与有机溶剂相比，离子液体的粘度较高，这不仅使底物和产物的传质受到一定程度的限制，降低酶反应速度，而且增加了反应液过滤和酶分散的困难。由于酶在离子液体中具有较高的热稳定性，因而可通过适当提高反应温度来降低离子液体的粘度，加快酶反应速度。另外，在离子液体中加入能与之相溶的有机溶剂，也可降低离子液体的粘度。2) 离子液体的回收。离子液体的价格比有机溶剂昂贵得多。因此，欲将离子液体应用于工业化生产，除了降低离子液体的生产成本，还必须很好地解决离子液体的回收

葡萄糖在有机溶剂丙酮中溶解性极差(0.04 mg/mL, 60 °C)，反应速度很慢，而生成的产物 6-O-乙酰葡萄糖在有机溶剂中溶解性却非常好，产物进一步乙酰化生成 3, 6-O-二乙酰葡萄糖，从而降低目的产物 6-O-乙酰葡萄糖的产率和纯度。反之，葡萄糖在离子液体中溶解性很好(大约是丙酮中的一百倍)，产物 6-O-乙酰葡萄糖在离子液体中难溶，避免了产物进一步酰化，故大大提高了产率和产物的纯度。在含有离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($[BMIIm][BF_4]$)的反应介质中，南极假丝酵母脂肪酶(*Candida antarctica* lipase B, CAL-B)能有效地催化葡萄糖脂肪酸酯合成，在以月桂酸乙酯为酰基供体时，产率高达 90% 且酰化反应几乎 100% 在 C6-OH 进行^[1, 31]。Kim 等^[32]报道了皱落假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, CRL)在两种离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[BMIIm][PF_6]$)和 1-甲氧乙基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[MOEMIm][PF_6]$)中催化 6 位-OH 被保护的葡萄糖苷选择性酰化，与在有机溶剂四氢呋喃(THF)、氯仿中相比，显著地提高了反应速度和区域选择性(表 4)。这可能与离子液体中底物溶解度提高和更

及循环使用这一重要问题。目前，分离产物、回收离子液体的主要方法有萃取法、蒸馏法、柱层析法和超临界二氧化碳法。高效回收离子液体新技术的问世将极大地加速与离子液体相关的研究和应用的进程。

尽管离子液体中酶催化糖类化合物合成糖酯尚有一些待解决的问题，但作为绿色反应介质的离子液体具有传统有机介质不可比拟的优良性质。因此，随着相关研究的进一步深入，将彰显离子液体中酶促糖酯合成的诱人前景。

5 展 望

糖类作为一种多羟基物质，对其多羟基的区域

选择性酯化是有机合成化学中的难题之一. 迄今为止, 大部分实验室和工业生产制备糖酯, 还停留在化学合成阶段, 而非水相酶促糖酯合成相对于化学合成具有优越性. 酶作为一种生物催化剂, 在非水介质中为高效、高区域选择性地合成糖酯类化合物提供了一条行之有效的途径. 相对传统的有机溶剂反应体系而言, 无溶剂体系由于不使用(或少量使用)有机介质, 避免了由于大量有机溶剂的使用而对环境的污染, 因而更加环保和绿色. 离子液体作为一种新型的生物催化反应介质, 由于对碳水化合物等强极性底物有较大的溶解能力、对环境友好及其它一些优良性质而具有诱人的应用前景.

参考文献:

- [1] Ganske F, Bornscheuer UT. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* [J], 2005, **36**(1): 40 ~ 42
- [2] Scholz C, Mthta S, Bisht K, et al. *Polym. Prep* [J], 1998, **39**(2): 168 ~ 169
- [3] Zhao Jin(赵瑾), Liu Lei(刘蕾), Song Jin-yong(宋金勇), et al. *Chin. J. Org. Chem.* (有机化学) [J], 2004, **24**(12): 1 601 ~ 1 605
- [4] Li Zhu-yi(李祖义), Chen Qian(陈倩). *Ind. Micro.* (工业微生物) [J], 2001, **31**(2): 42 ~ 48
- [5] Cao L, Fischer A, Bornscheuer U, et al. *Biocatal. Bio-transfor.* [J], 1997, **14**(3): 269 ~ 281
- [6] Therisod M, Klibanov A M. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1986, **108**(18): 5 638 ~ 5 640
- [7] Riva S, Chopineau, Kieboom A P, et al. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1988, **110**(2): 584 ~ 589
- [8] Park O J, Kim D Y, Dordick J S. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 2000, **70**(2): 208 ~ 216
- [9] Ward O P, Fang J, Li Z. *Enzyme Microb. Tech.* [J], 1997, **20**(1): 52 ~ 56
- [10] Ikeda I, Klibanov A M. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 1993, **42**(6): 788 ~ 791
- [11] Tsitsimpikou C, Daflos H, Kolisis F N. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* [J], 1997, **4**(3): 189 ~ 192
- [12] Zhang Nian-xiang(张念湘), Chao Shu-gui(曹淑桂), Dong Huan(董桓), et al. *Chem. J. Chin. Univer.* (高等学校化学学报) [J], 1996, **17**(9): 1 404 ~ 1 407
- [13] Bruno F F, Akkara J A, Ayyagari M, et al. *Macromolecules* [J], 1995, **28**(26): 8 881 ~ 8 883
- [14] Markus E, Ni X W, Halling P J. *Enzyme. Microb. Tech.* [J], 1998, **23**(2): 141 ~ 148
- [15] Fregapane G, Sarney D B, Vulfson E N. *Enzyme Microb. Tech.* [J], 1991, **13**(11): 796 ~ 800
- [16] Kim J E, Han J J, Yoon J H, et al. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 1998, **57**(1): 121 ~ 125
- [17] Ulijn R V, Halling P J. *Green Chem.* [J], 2004, **6**(9): 488 ~ 496
- [18] Kuhl P, Elchhorn U, Jakubke H D. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 1995, **45**(3): 276 ~ 278
- [19] Yan Y, Bornscheuer U T, Cao L, et al. *Enzyme Microb. Tech.* [J], 1999, **25**(8~9): 725 ~ 728
- [20] Tie Chui-juan(铁翠娟), Kou Xiu-fen(寇秀芬), Xu Jia-li(徐家立). *Chin. J. Catal.* (催化学报) [J], 2002, **23**(1): 81 ~ 84
- [21] Wei D Z, Zou P, Tu M B, et al. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* [J], 2002, **17**(1): 94 ~ 98
- [22] Baudoux J, Judeinstein P, Caharda D, et al. *Tetrahedron Lett.* [J], 2005, **16**(6): 1 137 ~ 1 140
- [23] Chiappe C, Pieraccini D. *J. Phys. Org. Chem.* [J], 2005, **18**(4): 275 ~ 297
- [24] Yang Z, Pan W B. *Enzyme. Microb. Tech.* [J], 2005, **37**(1): 17 ~ 28
- [25] Reichardt C. *Chem. Rev.* [J], 1994, **94**(8): 2 319 ~ 2 358
- [26] Liu Q B, Janssen M H, Rantwijk F, et al. *Green Chem.* [J], 2005, **7**(1): 39 ~ 42
- [27] Swatloski R P, Spera S K, Holbrey J D, et al. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 2002, **124**(18): 4 974 ~ 4 975
- [28] Cull S G, Holbrey J D, Vargas-Mora V, et al. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 2000, **69**(2): 227 ~ 233
- [29] Rantwijk F V, Lau R M, Sheldon R A. *Trends. Biotechnol.* [J], 2003, **21**(3): 131 ~ 138
- [30] Park S, Kazlauskas R J. *J. Org. Chem.* [J], 2001, **66**(25): 8 395 ~ 8 401
- [31] Ganske F, Bornscheuer U T. *Org. Lett.* [J], 2005, **7**(14): 3 097 ~ 3 098
- [32] Kim M J, Choi MY, Lee J K, et al. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* [J], 2003, **26**(3): 115 ~ 118