

# 有机溶剂及反胶束中的酶催化性能

王 丹 黄锡荣\* 李越中# 曲音波#

(山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室 济南 250100 #山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 酶是生物合成与转化的关键因素,酶催化性能既取决于酶蛋白分子自身结构,又取决于介质微环境。非水酶学和胶束酶学是近二三十年来兴起的酶学研究新领域,主要研究有机溶剂和反胶束中酶的催化性能并探索其潜在应用。表面活性剂既是区分这两个分支领域的标志,又是联系两者的桥梁。本文在对这两个领域的研究概况作一简要介绍的同时,着重介绍了表面活性剂修饰酶、微乳液凝胶固定化酶等研究进展。

**关键词** 非水酶学 胶束酶学 表面活性剂 生物合成与转化

## Advance in Studies of the Catalytic Performance of Enzyme in Organic Media and Reverse Micelles

Wang Dan, Huang Xirong\*, Li Yuezong#, Qu Yinbo#

(Key Laboratory for Colloid and Interface Chemistry of the Education Ministry of China, Shandong University, Jinan 250100)

(# State Key Laboratory of Microbial Technology of China, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract** Enzyme plays a key role in biosynthesis and biotransformation. Its catalytic properties depend on the structure of enzymic protein as well as on the microenvironment it experienced. Nonaqueous Enzymology and Micellar Enzymology are new branches of enzymology in recent decades, the research aim is to study the effect of organic solvent and reverse micelles on the catalytic properties of an enzyme. Surfactant, amphile, is viewed as both the mark to distinguish between them and the bridge to connect them. In addition to make a brief introduction of these two research fields, this review article puts emphasis on recent advances in modification of enzyme by surfactant and immobilization of enzyme in water-in-oil microemulsion.

**Key words** Nonaqueous enzymology, Micellar enzymology, Surfactant, Biosynthesis and biotransformation

生物合成与转化因其在工业生产中的巨大潜在价值,近年来逐渐受到重视并已成为生物工程领域的研究热点之一。如何获得高活性、高选择性、高稳定性的生物催化剂——酶,是生物合成与转化研究的关键所在。业已表明,除了通过蛋白质基因工程对酶分子进行改造外,还可以利用反应介质控制酶的性质,进而控制酶催化反应,后者即所谓酶催化介质工程。虽然酶在水中有一定的催化活性,但其催化性能并不十分理想:一方面,由于水溶液中酶的活性构象不易保持,造成酶在水溶液中不够稳定;另一方面,由于酶通常是水溶性的,而许多在化学化工

---

王 丹 女, 23 岁, 硕士生, 现从事胶束酶学研究工作。\*联系人 E-mail: xrhuang@sdu.edu.cn  
教育部高等学校重点实验室访问学者基金和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目  
2002-11-19 收稿, 2003-05-07 修回

中有着重要应用价值的物质(如长链醇、酸、酯及高聚物等)都是疏水性的,酶对这些水不溶性底物的转化效率较低。为此,人们尝试在有机溶剂和反胶束中进行生物合成与转化。20 多年来,人们就有机溶剂、反胶束介质对酶催化反应性能的影响进行了较为广泛而深入的研究并取得了重要进展。目前,它们已成为酶学研究领域的二个重要分支——非水酶学<sup>[1~4]</sup>与胶束酶学<sup>[5~8]</sup>。本文结合笔者在这方面的研究工作就这一领域里的研究进展作一介绍。

## 1 有机溶剂中的酶催化性能

### 1.1 酶的活性、稳定性及选择性

有机相中酶的活性与溶剂极性 & 水分子存在与否密切相关<sup>[9]</sup>。有机溶剂会使酶失活这一传统观念的产生可能是由于酶在水/有机混合溶剂及完全无水的有机溶剂中活性很低或活力完全丧失之缘故。由于酶活力取决于酶构象,因此,研究上述体系中酶构象意义重大。Griebenow 等<sup>[10]</sup>研究发现,与水混溶的有机溶剂(如乙腈、四氢呋喃、丙二醇)和水的混合物能使酶的二级结构发生明显变化;而 Fitzpatrick<sup>[11]</sup>和 Schmitke<sup>[12]</sup>发现酶在各种无水有机溶剂(如正辛烷、乙腈、环己烷)中酶的二级结构与天然酶相比几乎不变。由此可见,决定酶催化活性的是酶蛋白的动态结构,即由静电力、疏水力、范德华力和氢键等共同参与维持的瞬态构象。水分子作为一种分子润滑剂<sup>[13]</sup>,能直接或间接地参与这些非共价作用,使酶活性中心结构显现一定的柔性,从而起到对酶分子构象的调节作用。因此,对酶活性来说,有机溶剂中存在一最适水量。当水含量远低于最适水量时,由于有机溶剂缺乏提供形成多种氢键的能力,加之介电常数较低,导致酶蛋白分子内强烈的静电作用<sup>[14,15]</sup>,此时氢键作用主要体现在酶分子内部,氨基酸残基处于一种紧密堆积状态,这种过于刚性的结构虽然可以使酶在无水有机溶剂中保持二级结构不变,但已无法表现出催化活力;反之,当水含量远高于最适水量时,大量的水分子与酶分子形成分子间氢键,此时酶处于一种十分松散的状态,柔性过大使酶的构象易于改变,这就解释了为什么在水/有机混合溶剂中酶的二级结构会变化,并最终导致酶的变性失活。只有在最适水量附近时,酶才处于一种刚柔适度的状态,表现高的催化活性。对于不同的酶,最适水量也不同,每个蛋白分子的结合水从几十至几百不等<sup>[16]</sup>,这些水必须以某种形式局限并保持在酶表面,因此又被称为“必需水”。

选择性是酶的固有特性,是酶催化反应的一个重要特征。在有机介质中,由于介质疏水性<sup>[17]</sup>、极性<sup>[18]</sup>、介电常数<sup>[19]</sup>等性质的差异,酶的选择性(包括化学选择性、区域选择性和立体选择性)会发生明显的改变。即通过调控介质的性质(包括溶剂极性与水含量)可以调控酶的选择性。据报道,脂肪酶在异辛烷中呈现出高的立体选择性,这一性质已经被用来拆分外消旋醇和酸<sup>[18, 20]</sup>。

在有机溶剂中酶的热稳定性和储存稳定性都有明显提高。如牛胰核糖核酸酶在壬烷中的热力学解链温度为 124℃,而在水中只有 61℃<sup>[21]</sup>;猪胰脂肪酶在有机溶剂中 100℃ 下保存数小时仍可保留一半活性,而在水中同样温度下几秒之内就失活了<sup>[1]</sup>。这是由于水介质中酶蛋白过于柔性,活性构象易于改变,同时水的存在会促进天冬酰胺/谷氨酰胺(Asn/Gln)残基的脱酰胺作用和肽键的水解等不利反应<sup>[22]</sup>。此外,有机溶剂中不存在由于微生物污染而使酶失活的问题,这也是酶在有机溶剂中稳定性好的原因之一。

### 1.2 水含量控制

由上可见,在有机相酶催化反应中,适量水的存在是维持酶的催化活性及稳定性的关键因素,因此,有机溶剂中的微量水调控有十分重要的意义。王智等<sup>[23]</sup>系统介绍了目前采用的一些水含量控制方法,包括气相预平衡法、气体携带法、添加干燥剂法、渗透蒸发法和水合盐对法等多种方法。这些方法各有优缺点,有的简单易行但不能对有水产生的催化反应进行连续调控,有的方法装置复杂,成本较高。因此,在实际过程中要依据具体反应的特性及规模等有目的地选择控制方法。

### 1.3 表面活性剂修饰酶

尽管有机相酶催化具有许多优势,但也有不足之处。除水含量控制外,另一个最明显的就是酶蛋白不溶于几乎所有的有机溶剂,在其中只能以悬浮状态分散。由于酶没有很好地分散,一些酶分子的活性中心被相邻的酶分子遮住,不能与底物接触,从而产生立体障碍<sup>[2]</sup>,导致在有机溶剂中酶活力的下降。传统的解决方法是在反应时进行剧烈的搅拌或在使用前用超声波将酶的颗粒变小,显然,这些方法不能从根本上解决酶在有机溶剂中不能均匀分散的问题。为此,日本科学家提出了用表面活性剂对酶进行修饰,使亲水性酶变为疏水性酶,再与底物进行均相催化的想法,为这一问题的解决开辟了一条新的途径。

1.3.1 修饰酶的制备 Okahata 等<sup>[24]</sup>最先制得了表面活性剂修饰脂肪酶。方法是將一定 pH 的含酶水溶液(pH 是影响水溶液中酶催化活力的主要因素之一,冻干酶蛋白具有 pH 记忆,即悬浮于有机溶剂中的冻干酶,其构象与冻干前相应 pH 水溶液中的相当<sup>[4,25]</sup>)与一分散有表面活性剂的水溶液在超声波下混和,所得溶液在 4℃ 下保温 24h,收集沉淀并将其冷冻干燥,即得表面活性剂修饰酶粉末。研究表明,表面活性剂类型不同,修饰酶的活性也不一样,非离子型表面活性剂修饰酶的催化活性明显高于阴、阳离子型表面活性剂和两性表面活性剂。目前的解释是,阴、阳离子型表面活性剂以及两性表面活性剂与脂肪酶之间均存在着较强的电性作用,从而易于引起酶活性构象的改变,使表面活性剂修饰酶活力下降。最初的表面活性剂修饰酶制备方法只能使 10%左右的酶被修饰,转化率很低,造成了酶的浪费。为此,他们对原有方法又做了些改进<sup>[26]</sup>,将表面活性剂溶于某有机溶剂(改善表面活性剂的溶解度),再与一定 pH 的含酶水溶液混和,4℃ 下剧烈搅拌 24h,蒸去溶剂后,离心过滤,收集沉淀并用水洗去未修饰的酶,冻干后得到表面活性剂修饰酶粉末。通过这种方法可使酶的修饰转化率达 50%左右。1997 年,Okazaki 等<sup>[27]</sup>采用了一种利用油包水乳状液制备表面活性剂修饰酶的新方法,这种方法不仅简单且可使酶完全被修饰而不损失。他们将一定 pH 的含酶水溶液与溶有表面活性剂的某有机溶剂按一定比例混和,高速搅拌 3~5min 后,将所得稳定的油包水乳状液迅速用液氮冷冻,并用冻干仪冻干,得到表面活性剂修饰酶粉末(这种粉末含有 1%左右的水)。经表面活性剂修饰后的酶溶于大多数的有机溶剂中,且像在水介质中那样在分子水平上得到分散,大大提高了酶的催化效率,同时,酶的稳定性也明显提高。目前这种方法已成功用于脂肪酶<sup>[27]</sup>、锰过氧化物酶<sup>[28]</sup>、漆酶<sup>[29]</sup>、乳过氧化物酶<sup>[30]</sup>等多种酶的修饰。

1.3.2 修饰酶的结构 由紫外可见吸收光谱和元素分析得知<sup>[31]</sup>,修饰酶中的蛋白质含量约为 12%,这意味着在一个酶分子表面的周围约有 300~400 个表面活性剂分子。由于一个表面活性剂分子的截面积约为 0.45nm<sup>2</sup>,酶分子的直径约为 3nm,据此粗略估算,如果以单层的方式覆盖

满一个酶分子, 约需  $150 \pm 50$  个表面活性剂分子。这表明另  $150 \sim 250$  个表面活性剂分子可能是通过分子间作用力与修饰酶发生作用。即修饰酶分子用表面活性剂分子可分为两部分: 一部分表面活性剂分子通过其亲水基团与酶外表面的亲水基团发生静电和/或氢键强相互作用在酶分子周围形成单分子紧密层, 而另一部分表面活性剂分子则通过分子间作用力与修饰酶分子在外围发生弱相互作用形成松散层。凝胶过滤色谱也证实, 在有机溶剂介质中, 紧密层不会从酶的表面脱落, 但松散层则很容易地在有机溶剂中除掉。

1.3.3 修饰酶的催化性能 Okazaki 等在表征表面活性剂-脂肪酶复合物催化性能时发现, 修饰脂肪酶的催化活性是未修饰酶粉的 16 倍, 且储存稳定性好, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下保存两个月后仍具有较高的催化活性<sup>[27]</sup>。用表面活性剂修饰过的其它酶也有类似的结果<sup>[28-30]</sup>。此外, 近来的研究表明表面活性剂修饰酶还可有效地保留酶原有的立体选择性<sup>[32]</sup>, 如用表面活性剂修饰脂肪酶选择性催化 (*R*)-1-苯乙醇与月桂酸的酯化反应, 当 (*R*)-醇完全转化为酯时, (*S*)-醇几乎没反应<sup>[33]</sup>。Basheer<sup>[34]</sup>将表面活性剂修饰酶的工作向商业化应用又推进了一步。他先将表面活性剂修饰酶固定在含活性炭的不溶性硅胶或离子交换树脂上, 再用于有机溶剂中的酯合成和酯交换反应, 实现了酶的回收和重复使用。随着功能表面活性剂分子结构的不断改进、表面活性剂修饰酶制备方法的进一步完善, 可以预见, 固定化表面活性剂修饰酶作为一种可以应用于有机相酶催化的新型催化剂, 有着广阔的应用前景。

## 2 反胶束中的酶催化性能

### 2.1 反胶束体系的组成、特征与控制

反胶束是由水/表面活性剂/有机溶剂所组成的低水含量的油包水(W/O)微乳液, 它是一个宏观均匀、微观多相的热力学稳定体系。该体系是一种两亲介质, 既能溶解水溶性物质, 又能增溶疏水性物质; 其中, 有机相(简称油相)是连续相, 水相是分散相, 油相与水相之间通过表面活性剂单分子层隔开, 形成球状的反胶束微粒。当体系中水、有机溶剂、表面活性剂三者比例一定时, 每个反胶束微粒的组成、结构及大小相似, 宏观上可视为不变。

水与表面活性剂的摩尔比( $w_0$ )是反胶束结构的特征参数。在恒定  $w_0$  下, 增大表面活性剂浓度或水含量只会增加胶团的个数但不会改变单个胶团的大小; 在给定表面活性剂浓度下, 随着含水量的增加(即  $w_0$  的增大), 反胶团逐渐胀大、胶团数逐渐减小; 在给定水含量下, 随着表面活性剂浓度的增大, 反胶团变小、胶团数逐渐增大。用反胶束作为酶催化反应的介质有很多优点, 它不仅能在分子水平上把酶分散在有机介质中, 增加酶与水不溶性底物的接触面积, 通过调节加入水量还能很容易地实现反应体系中水含量的控制。

### 2.2 酶的活性、稳定性及选择性

在反胶束体系中, 酶大多数处在核心水团(又称小水池)中, 也有的附着于反胶束内膜上, 有的甚至部分伸入膜中<sup>[5]</sup>。由于反胶束中酶处在一种十分类似于天然环境的氛围中(这可从核心水团中水的性质<sup>[35,36]</sup>和表面活性剂单分子层结构等特征中看出), 故其活性、稳定性都得到了很好的保持。此外, 通过调整反胶束结构(如体系的  $w_0$ )及其界面特性(如表面活性剂头基类型与构型)可以调控酶的催化性能。最为突出的是某些酶在反胶束中可表现出超活性, 如漆酶在反胶束体系中的活性约为水中的 60 倍, 过氧化物酶约为水中的 100 倍, 而酸性磷酸酶约为水中的 200

倍<sup>[6]</sup>。造成这种超活性现象的因素是多方面的。Ruckenstein 等<sup>[37]</sup>认为,反胶束相当于一个微反应器,它对水溶性底物有浓缩作用,使底物在核心水团中的实际浓度远高于水溶液中的浓度,从而产生超活性;而 Caracia-Carmona 等<sup>[38]</sup>则认为,超活性现象是由于表面活性剂膜引起酶分子构象刚性增加和胶束中结构水的特殊性质<sup>[35]</sup>共同作用产生的。酶在反胶束中稳定性的提高可解释为由于反胶束中的酶分子构象受到反胶束微粒的限制,结构变化的自由度较小,有利于其构象保持。酶在反胶束体系中有较高选择性<sup>[39]</sup>。据报导脂肪酶在 AOT 反胶束中的立体选择性明显高于水/异辛烷两相体系<sup>[40,41]</sup>。由于酶在反胶束体系中有较好的催化性能,故反胶束中酶催化研究备受关注。以往的研究多集中在基础方面,现在已开始从基础向应用基础研究过渡。利用脂肪酶的区域选择性和立体选择性合成精细化学品、拆分手性药物已有较多报导。如利用酶的选择性拆分萘普生<sup>[40]</sup>、布洛芬<sup>[41]</sup>和薄荷醇<sup>[42]</sup>以及用于合成一些有应用价值的酯类<sup>[43]</sup>和高分子材料<sup>[44]</sup>。

### 2.3 微乳液凝胶固定化酶

由于反胶束体系非常稳定,其存在着产物不易分离、酶无法重复利用等问题,这些技术上的困难一度阻碍了胶束酶学向应用研究领域的拓宽。这种僵局随着 20 世纪 80 年代末微乳液凝胶现象<sup>[45]</sup>的发现而打破。20 世纪 90 年代初,Rees 等<sup>[44]</sup>首次尝试利用这一现象来固定化脂肪酶,并对固定化脂肪酶的酶学性质进行了大量研究。

制备微乳液凝胶固定化脂肪酶的一般方法是<sup>[46]</sup>:先依据油/水/表面活性剂三元相图配制含酶的 W/O 微乳液,并置于 50°C 左右的水浴中预热,然后加入已在 50°C 左右溶胀的明胶中并强力搅拌至混合物均匀、粘稠,取出后自然冷至室温。使用时只要将冷冻切块后的上述含酶凝胶放入含有底物的有机溶剂中即可。由适当配比微乳液制出的有机凝胶在 -20~30°C 的范围内有足够高的机械强度且不溶于构成其微乳液的油相和其它碳氢溶剂中。

微乳液凝胶的微观结构研究初步表明<sup>[47,48]</sup>,凝胶可能是由大量管状结构交错而成的三维网状结构,这些管状结构是一水相通道,通道内部是明胶(呈轴向线状)和水,管壁是亲水基朝内、亲油基朝外的表面活性剂单分子层,管外是由有机溶剂与微乳液液滴形成的油相通道。

据报道,用上述方法得到的固定化脂肪酶在有机介质中表现出较高的催化活性<sup>[49]</sup>。常温下,其催化的线性的、不饱和的、芳香的、带支链的和环状结构的醇或酸的酯化反应,产率都在 90% 以上。此外,微乳液凝胶固定化脂肪酶还可以在 0°C 以下进行酶促反应。这一低温酶学特征可能与微乳液凝胶中水的状态有关。微乳液凝胶体系中的水大多是结合水而非游离水,其凝固点较低。从生物技术角度来看,这一特征对温度敏感、易重排或外消旋化的反应物或产物的合成与转化有很大的潜在价值。微乳液凝胶固定化脂肪酶的稳定性也很好<sup>[46,50]</sup>,25°C 下经过 15 次连续使用的固定化酶仍可保留 75% 的活性,低温储存 2 个月后的固定化酶与放置 5~6h 的固定化酶具有相近的酯化速率。在选择性方面,微乳液凝胶固定化脂肪酶对中长链的脂肪醇或酸同系物所显示出的底物选择性不高,但其区域选择性及立体选择性较好。如用固定化脂肪酶催化 1,3-丁二醇、1,5-己二醇以及 1,2-癸二醇的 1 位羟基与癸酸反应生成癸酸单酯的产率分别占单酯总量的 75%、98% 和 97%<sup>[51]</sup>。固定化酶拆分 2-辛醇所达到的对映体过量值(ee 值)高达 92%(需要注意的是,ee 值有时与底物的转化率有关,对 3-辛醇来说,只有在低转化率下才能得到高光

学纯度的产物)<sup>[49]</sup>。此外,通常条件下制得的微乳液凝胶固定化酶在胶凝温度以下皆有很好的机械强度,反复使用,其物理形貌可保持不变。

目前,利用微乳液凝胶固定化脂肪酶进行不对称有机合成与对映体拆分的研究报道<sup>[52~56]</sup>已渐渐多了起来。笔者在国内也较早地开展了这方面的研究工作<sup>[57,58]</sup>,曾系统研究了由 AOT/水/正庚烷所构成的 W/O 微乳液的百分组成、 $w_0$ 、pH 等对以此微乳液为基底的明胶固定化脂肪酶酶活及机械强度的影响,并优化得到了超高活性的微乳液明胶固定化脂肪酶,其活力约为水凝胶固定化酶的 10 倍,且在 4°C 下活性半个月无明显变化。鉴于脂肪酶是界面激活酶<sup>[59]</sup>,目前,宜研究由不同头基类型与构型的表面活性剂构成的微乳液的结构与界面特性对脂肪酶催化性能的影响,构建使脂肪酶呈现高催化性能的微乳液凝胶新载体,并将之用于外消旋 2-芳基丙酸类非甾体抗炎药物的拆分<sup>[60,61]</sup>。

### 3 结语

非水酶学和胶束酶学是近二三十年来兴起的酶学研究新领域,主要研究有机溶剂和反胶束中酶的催化性能,探讨它们在生物合成与转化领域中的应用。随着表面活性剂修饰酶的出现以及利用微乳液凝胶固定化酶在有机溶剂中进行酶催化研究的开展,过去被看成是区分非水酶学和胶束酶学标志的表面活性剂如今又成了联系两者的桥梁。尽管有机溶剂及反胶束中酶催化机制目前还不十分清楚,在从基础研究向应用基础研究过渡过程中还有许多基本问题需要解决和解答,然而鉴于各介质中酶催化反应所具有的独特优越性,可以预见随着研究工作的深入,它们在生物合成与转化领域里的巨大应用潜力将得到充分发挥。

### 参考文献

- [1] A Zaks, A M Klibanov. *Science*, 1984, 224: 1249~1251.
- [2] A Zaks, A M Klibanov. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 3194~3201.
- [3] 彭立凤. *化学进展*, 2000, 12 (3): 296~304.
- [4] A M Klibanov. *Nature*, 2001, 409 (6817): 241~246.
- [5] K Martinek, A V Leavashov, N L Klyachko et al. *Science*, 1982, 218(4575): 889~891.
- [6] K Martinek, A V Leavashov, N L Klyachko et al. *Eur. J. Biochem.*, 1986, 155: 453~468.
- [7] 夏仕文, 俞耀庭, 董明容. *化学通报*, 1998, (2): 8~13.
- [8] 黄应平, 蔡汝秀. *分析化学*. 2002, 30(5): 615~620.
- [9] K Xu, K Griebenow, A M Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 56(5): 484~490.
- [10] K Griebenow, A M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 11695~11700.
- [11] P A Fitzpatrick, A C U Steinmetz, D Ringe et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 8653~8657.
- [12] J L Schmitke, C R Wescott, A M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 3360~3365.
- [13] J A Rupley, G Careri. *Adv. Protein Chem.*, 1991, 41: 37~172.
- [14] R Affleck, C A Haynes, D S Clark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 5167~5170.
- [15] P A Burke, R G Griffin, A M Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 43: 515~520.
- [16] A M Klibanov. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, 14 (4): 141~144.
- [17] E Rubio, A Fernandez-Mayorales, A M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113: 695~696.
- [18] S Parida, J S Dordick. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113(6): 2253~2259.
- [19] P A Fitzpatrick, A M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113(8): 3166~3171.
- [20] F Francalanci, P Cesti, W Cabri et al. *J. Org. Chem.*, 1987, 52(23): 5079~5082.
- [21] D B Volkin, A Staubli, R Langer et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 37: 843~853.
- [22] T J Ahern, A M Klibanov. *Methods Biochem. Anal.*, 1987, 33: 91~127.
- [23] 王 智, 冯 雁, 曹淑桂. *自然科学进展*, 2002, 12(2): 130~134.
- [24] Y Okahata, K Ijior. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1988, 20: 1392~1394.
- [25] K Xu, A M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 9815~9819.

- [26] W Tsuzuki, Y Okahata, O Katayama et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1991, 1: 1245~1247.
- [27] S Y Okazaki, N Kaniya, K Abe et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 55(2): 455~460.
- [28] S Y Okazaki, M Goto, S Furusaki et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 28: 329~332.
- [29] S Y Okazaki, M Goto. *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16(4): 583~588.
- [30] S Y Okazaki, Y Uchimura, M Goto. *Biochem. Eng. J.*, 2000, 6(2): 103~107.
- [31] Y Okahata, K Ijro. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1992, 65: 2411~2420.
- [32] N Kamiya, H Kasagi, M Inoue et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 65(2): 227~232.
- [33] Y Okahata, T Mori. *Tibtech. February*, 1997, 15: 50~54.
- [34] S Basheer. *WO: 62906*, 24, 2000.
- [35] G Y Xu, L Zhang, S L Yuan, X R Huang et al. *J. Disp. Tech.*, 2001, 22(6): 563~567.
- [36] R D Newman, T H Ibrahim. *Langmuir*, 1999, 15(1): 10~12.
- [37] E Ruckenstein, P Karpe. *J Colloid Interface Science*, 1990, 139(2): 408~436.
- [38] A Sanchez-Ferrer, F Garacia-Carmona. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16(5): 409~415.
- [39] H Stamatis, A Xenakis, F N Kolisis. *Biothech. Lett.*, 1993, 15(5): 471~476.
- [40] S W Tsai, C C Lu, C S Cheng. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51: 148~156.
- [41] G Hedstrom, M Backlund, J P Slotte. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 42: 618~624.
- [42] B Orlich, R Schomacker. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 28(1): 42~48.
- [43] H Stamatis, A Xenakis, F Kolisis. *Methods Biotechnol.*, 2001, 15: 331~338.
- [44] A M Rao, V T John, R D Gomzalez. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 41: 531~540.
- [45] G Haering, P L Luisi. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90(20): 5892~5895.
- [46] 黄锡荣, 张文娟, 宋少芳 等. *微生物学杂志*, 2001, 21(2): 33~35.
- [47] C Petit, T Zemb, M P Pileni. *Langmuir*, 1991, 7(2): 223~231.
- [48] H Caldararu, G S Timmins, B C Gilbert. *Phys. Chem. chem. Phys.*, 1999, 1(24): 5689~5695.
- [49] G D Rees, M G Nascimento, T R J Jenta et al. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1073: 493~501.
- [50] K Nagayama, K Karaiwa, T Dio et al. *Biochem. Eng. J.*, 1998, 2(2): 121~126.
- [51] G D Rees, T R J Jenta, M G Nascimento et al. *Indian J. Chem.*, 1993, 32B: 30~34.
- [52] M G Nascimento, M C Rezenda, R D Vecchia et al. *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33(40): 5891~5894.
- [53] S Backlund, F Eriksson, G Hedstrom et al. *Colloid Polym. Sci.*, 1996, 274(6): 540~547.
- [54] I Uemasu, W L Hinze. *Chirality*, 1994, 6: 649~653.
- [55] P C Jesus, L F Silva, J J Joao et al. *Syn. Commun.*, 1998, 28(15): 2893~2901.
- [56] A Pastou, H Stamatis, A Xenakis. *Colloid Polym. Sci.*, 2000, 15: 192~195.
- [57] 黄锡荣, 李越中, 姜兴涛 等. *药物生物技术*, 2000, 7(2): 93~97.
- [58] 周国伟, 黄锡荣, 李干佐 等. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 224~228.
- [59] H V Tilbeurgh, M P Egloff, C Martinez et al. *Nature*, 1993, 362(29): 814~820.
- [60] 陈志龙, 吴毓林, 伍贻康. *有机化学*, 2002, 22(1): 22~32.
- [61] 宋少芳, 黄锡荣, 张文娟 等. *药物分析杂志*, 2002, 22(1): 54~56.