

• 研究论文 •

胰蛋白酶交联聚体的制备及性质研究

王梦凡 贾辰熙 齐 巍* 何志敏

(天津大学化工学院化学工程研究所 天津 300072)

摘要 交联酶聚体(CLEA)是一种新型的无载体固定化技术. 以胰蛋白酶为模型体系, 系统地研究了 CLEA 技术的制备工艺、应用条件、稳定性及结构形貌. (1)在制备工艺中考察了各步骤对 CLEA 酶活保留的影响, 重点分析了沉淀剂浓度、类型的影响, 结果表明 100% 乙醇是较为理想的沉淀剂; (2)在应用条件确定中测定 CLEA 的最适催化温度为 70 °C, 最适催化 pH 为 9.0, 并解释了温度-活性、pH-活性曲线的漂移现象; (3)稳定性研究结果表明 CLEA 技术大幅提高了胰蛋白酶的热稳定性、溶剂稳定性, 且无酶泄漏; (4)在形貌表征中分别利用扫描电子显微镜、光学显微镜和激光粒度分析对 CLEA 的微观结构进行了多尺度研究, 着重讨论了其独特结构与优良特性间的关系. 本文所得结论为胰蛋白酶 CLEA 的应用提供基础数据, 并为 CLEA 技术应用于其它酶种提供参考.

关键词 胰蛋白酶; 交联酶聚体; 固定化; 酶的稳定性

Preparation and Properties of Cross-linked Enzyme Aggregation of Trypsin

WANG, Meng-Fan JIA, Chen-Xi QI, Wei* HE, Zhi-Min

(Chemical Engineering Research Center, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Cross-linked enzyme aggregation (CLEA) is a novel carrier-free immobilization technique. In this study, trypsin-CLEA has been prepared and its preparation routine, application condition, stability and structure have been studied systematically. (1) Every step for CLEA preparation was investigated to evaluate the effect on the enzyme-activity retention with special aims at the precipitant concentration and type. The experimental results indicated that pure alcohol was an ideal precipitant. (2) The best temperature and pH for CLEA catalysis were determined respectively as 70 °C and 9.0, and a detailed explanation was given to clarify the phenomena about shift of the temperature-activity and pH-activity curves. (3) The enzyme stability versus temperature and solvent was tested and the enzyme leakage was examined. This investigation result confirms that the CLEA technique can fundamentally improve the stability of trypsin. (4) The structure of CLEA was characterized by scan electronic microscopy, optical microscopy and laser particle size analysis, respectively. The relationship between the structure and property of CLEA was also discussed. The obtained result of the present research may benefit the further application of CLEA technique, and the observed rules can be applied to other enzyme-type CLEA.

Keywords trypsin; cross-linked enzyme aggregation (CLEA); immobilization; enzyme stability

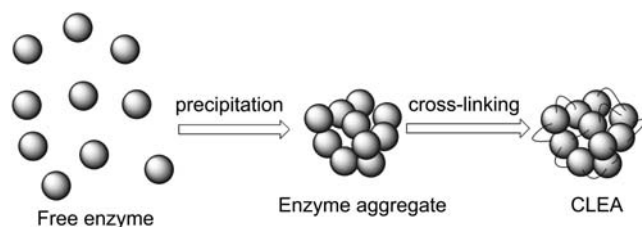
如何提高酶在工业过程中的稳定性是生物催化领域的中心议题. 早期的酶固定化技术多为载体固定方

* E-mail: qiwei@tju.edu.cn

Received June 27, 2007; revised March 5, 2008; accepted April 17, 2008.

教育部科学技术研究重点项目(No. 108031)和国家高技术研究发展计划(863 计划)专题课题(No. 2008AA10Z318)资助项目.

式, 存在载酶量小、酶易泄漏等缺陷. 交联酶晶体^[1] (CLEC) 是一种无载体固定化技术, 其核心在于将晶体酶的表面进行简单的交联化处理, 使其不被溶剂溶解, 从而大大提高了酶的溶剂、pH 和热稳定性, 而使酶具有更广阔的应用空间, 并有利于其循环使用. CLEC 具有催化比表面积高、底物扩散阻力小等优点; 但其缺陷在于酶的结晶过程耗时耗力, 需高纯酶, 且复合酶不可结晶, 这在很大程度上限制了 CLEC 的工业应用. 不久前, Sheldon 研究小组^[2,3] 提出了一种新型的交联酶聚体 (CLEA) 技术. 在溶液中对酶进行简单的沉淀处理以得到酶聚体, 再将之交联以得到 CLEA (图式 1). 这样在酶聚体的表面及内部就形成了一层网状的交联化酶膜, 不仅使聚体内部的酶分子不会扩散到溶液中, 而且使酶分子具有很好的舒展性, 从而保留了较高的酶活性. CLEA 技术用简单的沉淀代替了 CLEC 技术繁琐的结晶过程, 故具有更大的应用前景.



图式 1 CLEA 的制备流程

Scheme 1 Preparation routine of CLEA

胰蛋白酶是较为常见的内切酶, 广泛应用于医药、食品、蛋白质组学以及生命科学各领域^[4]. 如何提高胰蛋白酶的稳定性是一个亟待解决的问题, 由于该酶具有代表性的分子结构和催化性质, 故它是研究 CLEA 技术理想的模型酶. 本文对胰蛋白酶 CLEA 的制备工艺、应用条件、稳定性和结构形貌进行了系统研究, 重点讨论了胰蛋白酶 CLEA 的特殊结构与优良性质间的关系, 为胰蛋白酶 CLEA 的进一步应用提供基础数据, 也为 CLEA 技术应用于其它酶种积累共性规律与经验.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

胰蛋白酶(牛胰)购自东风生化技术公司, *N*-苯甲酰-精氨酸(BAEE)购于上海三杰生物技术有限公司, 50%戊二醛、乙醇、丙酮、甲醇、异丙醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃、*N,N*-二异丙基乙氨(DIEA)、硫酸铵、氢氧化钠等均为市售分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 CLEA 的制备

称取 3.25 mg 胰蛋白酶, 用 0.05 mL 的 pH 7.0 磷酸

氢二钠/磷酸二氢钠缓冲液溶解于试管中. 在上述试管中逐滴加入 0.7 mL 乙醇沉淀剂, 同时边滴加边振荡试管. 待完全沉淀后离心, 分离得到沉淀物, 向此沉淀中滴加 0.7 mL 50% 的戊二醛交联剂, 再次振荡令其混合均匀. 于 4 °C 下交联 22 h 后离心, 取沉淀物, 先用蒸馏水洗涤三次, 再用乙醇洗涤两次, 最终分离得到沉淀. 待沉淀中残留乙醇完全挥发后冻干即制得胰蛋白酶 CLEA.

1.2.2 CLEA 活性检测

本研究所有酶活性测定均采用 F.I.P.法^[5]. 定义一个 F.I.P.胰蛋白酶单位相当于在规定条件下每分钟水解 1 μmol BAEE 的酶量. 用事先配制好的一定浓度的氢氧化钠溶液滴定底物 BAEE 的分解产物, 在一定时间内维持反应体系的 pH 恒定, 测定消耗的氢氧化钠溶液的量, 酶活性可由下式计算得出: $\frac{V \times 0.05}{E_w \times t} = \text{F.I.P U/mg}$, 其中 t 为反应时间(min), V 为 t 时间内消耗的氢氧化钠溶液的体积(μL), E_w 为酶的质量(mg).

同时定义: 酶活保留 = (酶失活后所测得的酶活性/失活前的酶活性) × 100%.

本文各组实验的酶活性测定数据均经过三次重复实验取平均值, 且相对标准偏差小于 5%, 可保证 CLEA 制备方法的批次稳定性.

1.2.3 SDS-PAGE 电泳、扫描电镜、光学显微镜、粒度分析

按文献方法^[6]采用伯乐 mini Protean III 电泳仪对 CLEA 在有机溶剂中的泄漏进行检测; 采用岛津 SS-550 扫描电子显微镜对 CLEA 进行电镜观察^[7]; 利用 NIKON 光学显微镜依次得到放大 100, 200 和 400 倍的 CLEA 结构图像^[8]; 使用英国马尔文 MASTERSILERSION 激光粒度分析仪对 CLEA 交联聚体粒径进行测定^[9].

2 结果与讨论

2.1 胰蛋白酶 CLEA 制备条件优化

2.1.1 CLEA 酶活保留影响因素初探

CLEA 的制备过程主要包括沉淀和交联两个步骤^[10], 为确定哪个步骤制约 CLEA 的酶活保留, 设计了表 1 内的 5 组实验, 每组实验仅改变其中一个影响因素的参量. 当改变沉淀剂浓度和类型时, CLEA 相对酶活保留分别为原来的 167% 和 21%; 而改变交联剂用量和交联时间仅使相对酶活保留变为 91% 和 112%. 此结果表明沉淀步骤是造成 CLEA 活性降低的主要因素, 故本研究将重点考察沉淀剂浓度和沉淀剂类型对胰蛋白酶 CLEA 酶活保留的影响.

表 1 各因素对 CLEA 酶活保留的影响

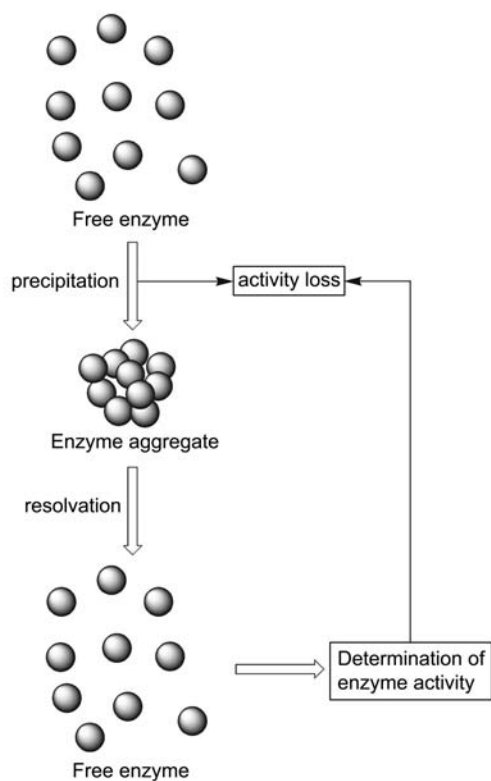
Table 1 The effects of different factors on activity retention of trypsin during preparing CLEA

		A	B	C	D	E
Precipitation step	Precipitant concentration ^a /%	80	100	80	80	80
	Precipitant type	ethanol	ethanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	ethanol	ethanol
Cross-linking step	Cross-linker amount ^b /(mL·mg ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
	Cross-linking time/h	24	24	24	24	48
Relative activity residue retention ^c /%		100	167	21	91	112

^a Precipitant volume/(precipitant + water) volume; ^b cross-linker volume/free enzyme weight; ^c note that the activity residue of the experiment A is 100%.

2.1.2 沉淀剂浓度对制备 CLEA 酶活保留的影响

研究中发现, 沉淀过程会造成酶的部分失活, 即使使用适量缓冲液将酶聚体重新溶解回游离酶状态, 活性仍然不可恢复, 表明沉淀造成的酶失活是不可逆的, 这为我们提供了一种研究思路(图式 2): 可将沉淀后的酶聚体溶回游离酶, 通过测定此游离酶活性变化来考察沉淀步骤对胰蛋白酶活性的影响。



图式 2 沉淀过程酶失活的测定

Scheme 2 Determination of enzyme activity loss during precipitation

为考察沉淀剂浓度在形成酶聚体过程中对活性的影响, 分别选用不同浓度的硫酸铵、丙酮及乙醇对胰蛋白酶进行沉淀. 图 1 中结果表明: 不论是作为沉淀剂的中性盐(硫酸铵)还是有机溶剂(乙醇, 丙酮), 其浓度越高, 酶的活性保留越高. 这是因为酶的沉淀过程存在着

酶分子聚集与变性的竞争^[11]: (1)高浓度的沉淀剂使游离酶立即沉淀完全, 酶的活性中心瞬时被锁定在高酶活状态, 在一定程度上避免了酶活的剧烈损失; 同时, 活性中心被包围在聚体中, 不易受到沉淀剂的进一步破坏, 使酶活得以保持; (2)反之, 若加入低浓度的沉淀剂, 体系含水量大, 酶沉淀速度慢, 致使大量游离酶的活性中心暴露于沉淀剂中而遭到破坏, 即使形成聚体, 这些变性的活性中心也不会恢复到高酶活的状态. 总之, 高沉淀剂浓度导致聚集成为主导, 而低沉淀剂浓度则导致变性成为主导. 因此, 高沉淀剂浓度有利于得到高酶活保留的 CLEA.

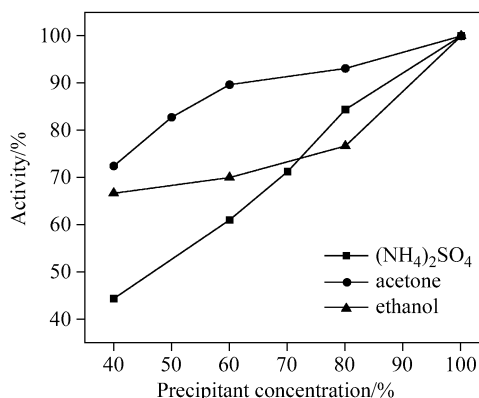


图 1 不同沉淀剂浓度对胰蛋白酶酶活保留的影响

Figure 1 The activity residues of trypsin aggregates under different precipitant concentrations

2.1.3 沉淀剂种类对 CLEA 酶活保留的影响

中性盐和水溶性有机溶剂是较为常用的两类蛋白沉淀剂. 根据 2.1.2 节所得结论, 本节在考察沉淀剂种类对酶活保留的影响时均选用浓度为 100% 的沉淀剂, 采用图式 2 所述方法测定沉淀所得聚体的酶活保留, 结果列于表 2. 表中 9 种沉淀剂都会造成胰蛋白酶不同程度的失活. 有机溶剂引起的蛋白质沉淀是多种效应的结果, 主要效应是降低了水溶液的介电常数, 对于具有表面水膜的酶分子, 有机溶剂也可使分子表面水膜破坏而聚集沉淀. 同时很多事实证明有机溶剂不仅是酶的沉淀

表2 沉淀剂种类对胰蛋白酶活性保留的影响

Table 2 The activity of resolved trypsin aggregation using different precipitants

	No precipitant	(NH ₄) ₂ SO ₄	ethanol	methanol	acetone	DMF	isopropanol	DHF	DMSO	DIEA
Activity/(U·mg ⁻¹)	18.98	13.67	13.75	13.1	12.87	11.9	11.25	11.16	11.06	8.06
Relative activity residue/%	100	72.0	72.4	69.0	67.8	62.7	59.3	58.8	58.3	42.4

剂, 在某种程度上也是酶的变性剂^[12], 即破坏酶分子的氢键等化学键, 使酶分子的空间结构发生某种程度的变形, 造成酶失活. 本实验发现以乙醇作为沉淀剂对胰蛋白酶的沉淀最为完全, 在聚集与变性的竞争中酶的活性保留最大, 为不加沉淀剂时的 72.4%. 因此, 以纯乙醇作为沉淀剂是制备胰蛋白酶 CLEA 的最佳选择.

2.2 胰蛋白酶 CLEA 应用条件确定

2.2.1 CLEA 的最适催化温度

温度是酶促反应的一个重要影响因素, 大多数酶经固定化后, 因载体的影响最适催化温度较游离酶会有所提高^[13]; 然而, CLEA 作为一种无载体的固定化技术是否也可改善酶的最适催化温度呢? 本研究在各温度下对胰蛋白酶 CLEA 和游离酶的活性进行了测定, 结果如图 2 所示: 游离酶的最适温度为 60 °C, 而 CLEA 的最适温度可达 70 °C. 同时, 在 80 °C 时游离酶的活性已经全部丧失, 而此温度下 CLEA 仍能保持 81% 的活性. 这表明 CLEA 技术提高了胰蛋白酶的最适催化温度, 使其在高温下应用成为可能.

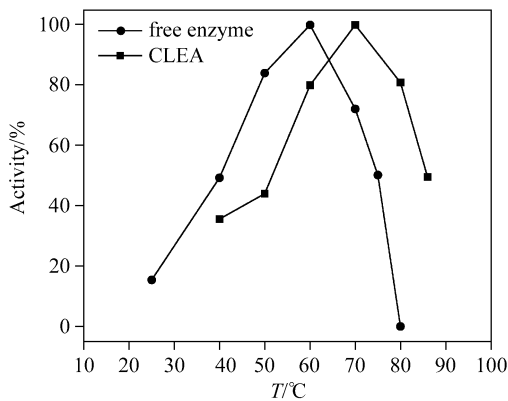


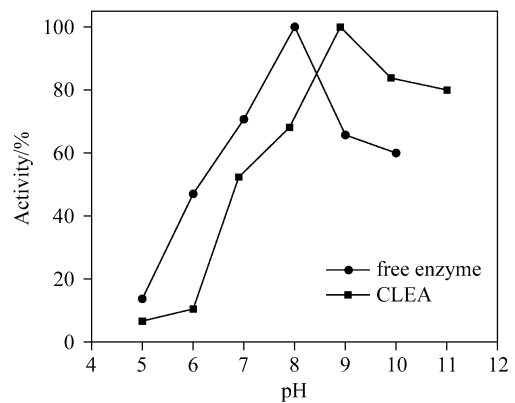
图2 胰蛋白酶 CLEA 和游离酶的最适温度

Figure 2 The optimum temperature of CLEA and free trypsin

2.2.2 CLEA 的最适催化 pH

酶的催化能力对 pH 非常敏感. 酶经固定化后, 由于载体对微环境中离子强度的影响, 最适催化 pH 值往往会发生漂移^[14,15]. CLEA 作为一种无载体的固定化技术是否也存在这一现象呢? 本研究在不同 pH 下对胰蛋白酶 CLEA 及游离酶的活性进行了测定, 所得 pH-活性曲线示于图 3. 可知 CLEA 的最适 pH 为 9.0, 相对于游离酶的最适 pH 8.0 向碱性偏移了一个单位. 分析其原因

可能为: 在交联过程中戊二醛分子上的羰基与酶分子上的氨基反应生成—C=N—基团, 此基团的氮原子存在孤对电子, 可吸引溶液中的阳离子 H⁺ 而形成氢键. 大量 H⁺ 附着于 CLEA 表面, 形成一个致密的 H⁺ 边界层. 边界层中 H⁺ 浓度高于外部溶液, 呈酸性, 这样外部溶液中的 pH 必须向碱性偏移才能中和边界层中的酸性作用, 以使微环境达到游离酶的最适 pH 8.0, 最终反映在图 3 中的宏观现象是 CLEA 的 pH-活性曲线较游离酶整体向碱性偏移了一个单位.

图3 胰蛋白酶 CLEA 和游离酶的最适催化 pH
Figure 3 The optimum pH of CLEA and free trypsin

2.3 胰蛋白酶 CLEA 稳定性研究

2.3.1 CLEA 的热稳定性

由 2.2.1 节结果可知 70 °C 为胰蛋白酶 CLEA 的最适催化温度, 但在此温度下它是否也具有较高的热稳定性呢? 如假设成立, 则可实现 CLEA 高温下的高效应用. 为验证此假设, 本研究选择在 40, 60, 70 °C 下测定胰蛋白酶 CLEA 和游离酶的活性保留, 即将二者在各温度下保存一段时间后, 迅速冷却至室温测定其活性, 所得结果示于图 4. 在相同温度下 CLEA 的稳定性均高于游离酶; 在二者的各自最适催化温度下, CLEA (70 °C) 保温 5 min 后仍保留 33% 的活性, 而游离酶 (60 °C) 保温 3 min 后活性仅存 24%. 40 °C 时 CLEA 保温 2 h, 其活性保留仍能维持 100%, 而在此温度下游离酶 5 min 后活性保留已降为 57%. 可见 CLEA 技术成功改善了胰蛋白酶的热稳定性, 但值得一提的是, 在 CLEA 的最适催化温度 70 °C 下, 其稳定性相对较差, 故不宜进行长时间连续反应, 而应控制在较低温度进行; 若反应所需时间较短, 且 CLEA 无需回收, 则最适催化温度 70 °C 是理想选择.

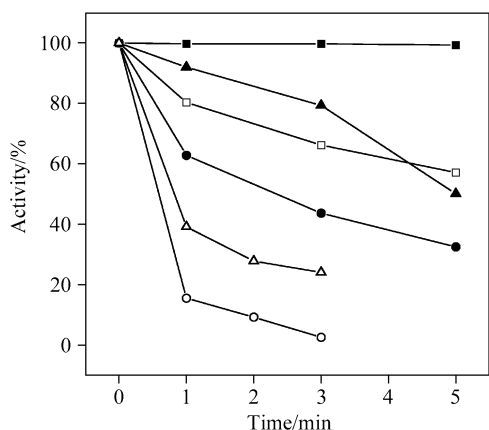


图4 CLEA和游离态胰蛋白酶的热稳定性

Figure 4 Thermal stability of CLEA and free trypsin

■—40 °C CLEA, ▲—60 °C CLEA, ●—70 °C CLEA, □—40 °C free enzyme, △—60 °C free enzyme, ○—70 °C free enzyme

2.3.2 溶剂中CLEA的酶泄漏

通常固定化酶在使用过程中会向溶剂中泄漏游离酶,这是固定化技术的一个棘手问题.因此,实验考察了所制备的胰蛋白酶CLEA在溶剂中的泄漏.实验时首先确定游离态胰蛋白酶在乙醇中形成沉淀的溶剂浓度,以防止可能泄漏出的游离酶在上清液中再次沉淀.结果表明,当乙醇溶液浓度大于50%时,游离态胰蛋白酶将发生沉淀.因此实验中将CLEA浸泡于50%乙醇中,若有酶泄漏,则泄漏的游离酶将溶解于50%乙醇上清液中;再于不同时间取乙醇溶液进行电泳分析,所得图像示于图5.泳道1为胰蛋白酶标样,泳道2~5分别为不同时间CLEA浸泡溶剂的分析结果.在2~5道几乎看不到胰蛋白酶的存在,即使在第5道(浸泡54天)也未见酶的痕迹.这充分说明CLEA几乎不会发生泄漏,此优良特性源于沉淀聚体交联过程中不仅发生聚体表面酶分

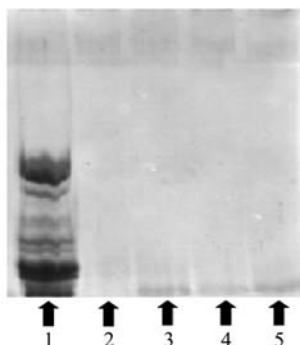


图5 胰蛋白酶CLEA在乙醇中泄漏的电泳图像

Figure 5 SDS-PAGE analysis of the leakage for CLEA trypsin in ethanol

Lane 1: Trypsin marker; Lane 2: Leakage of CLEA after 48 h; Lane 3: Leakage of CLEA after 168 h; Lane 4: Leakage of CLEA after 504 h; Lane 5: Leakage of CLEA after 1272 h

子的交联,同时聚体内部酶分子,聚体与聚体之间都存在着不同程度的交联,形成了以“戊二醛网层”紧密包裹相连的簇状交联酶聚体结构.这使得胰蛋白酶分子被牢牢锁在一起,从而抵制了酶泄漏的发生.

2.3.3 CLEA的溶剂稳定性

溶剂稳定性也是衡量固定化酶性能的一个重要指标,实验比较了胰蛋白酶CLEA与游离态酶在乙醇溶剂中的稳定性.由2.3.2节可知,胰蛋白酶CLEA在乙醇溶液中几乎不发生泄漏,可基本排除酶泄漏造成的CLEA稳定性下降,故实验时将胰蛋白酶CLEA浸泡于无水乙醇中,相应地,为防止游离态胰蛋白酶沉淀,将游离酶浸泡于50%乙醇溶液中.分别将含两种形式酶的乙醇溶液于4 °C保存,实验结果令人惊讶:浸泡54 d后CLEA仍能维持66%的活性,而游离酶在浸泡2 d后活性仅存15%(图6).此结果有力地说明了CLEA技术可实质性地提高胰蛋白酶的溶剂稳定性.

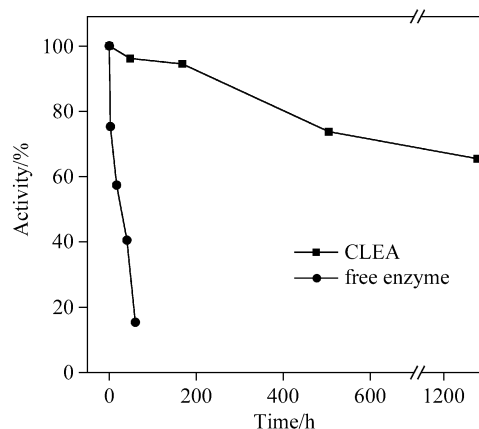


图6 CLEA和游离态胰蛋白酶的溶剂稳定性

Figure 6 Stability of CLEA and free trypsin in organic media

2.4 胰蛋白酶CLEA的形貌表征

CLEA的优良性质与其特殊的外观形貌密切相关.目前,已有多篇CLEA结构研究的文献^[16],但对于胰蛋白酶CLEA的形貌表征却未见报道.归纳这些研究可将CLEA分为两类:一类CLEA在交联过程中几乎未发生糖基化,故表面高度疏水,呈规则的立体几何形貌,以球形较为常见^[15];另一类CLEA则发生糖基化,其表面多为极性基团故显亲水性,呈现不规则的类似松糕状形貌^[15].本研究利用扫描电子显微镜、光学显微镜和激光粒度分析仪对胰蛋白酶CLEA的外部形貌进行了表征.

图7为SEM放大两万倍的图像,由图可见胰蛋白酶CLEA表面呈现规则的“短棒”状形貌(直径约0.2 μm,长约0.5 μm),这些“短棒”即为酶聚体,此结构属于上述第一种类型,即表面为疏水性.无数的“短棒”又组成一个个集簇,在放大400倍的光学显微镜下(图8)清晰可

见. 这些集簇经激光粒度测定可知粒径集中在 20~100 μm 范围内, 这说明一个集簇内大约包含 $10^5\sim 10^7$ 数量级的“短棒”聚体. 分析其结构与性质的关系为: (1)“短棒”表面的交联层把酶分子紧紧包围其中, 使 CLEA 具有优良的稳定性; (2)“短棒”结构使得集簇具有较大的催化表面积, 故 CLEA 具有较高的酶活; (3)大量交叉相连的“短棒”构成了类似“脚手架”的集簇, 使其具有优良的力学性质, 故 CLEA 具有良好的抗剪切力、抗压等能力.

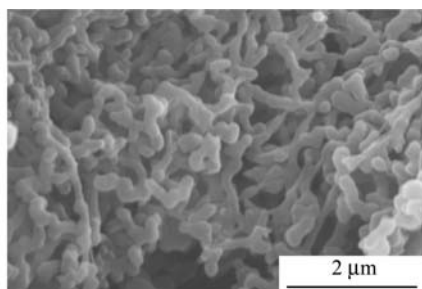


图7 胰蛋白酶 CLEA 扫描电镜图象
Figure 7 SEM micrograph of CLEA trypsin

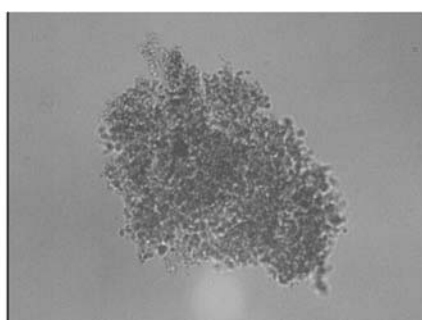


图8 胰蛋白酶 CLEA 集簇的光学显微镜图象
Figure 8 CLEA trypsin cluster magnified

3 结论

对胰蛋白酶 CLEA 的制备工艺、应用条件、稳定性和结构形貌进行了系统研究. 结果表明: (1)制备过程中的沉淀步骤是控制 CLEA 酶活保留的关键, 高沉淀剂浓度有利于酶活保留, 纯乙醇是其理想的沉淀剂; (2)胰蛋白酶 CLEA 的最适催化温度(70 $^{\circ}\text{C}$)和最适催化 pH (9.0)

较游离酶都有所偏高, 这有利于其在极端环境下的应用; (3) CLEA 技术大幅提高了胰蛋白酶的热稳定性及溶剂稳定性, 且无明显酶泄漏现象, 但胰蛋白酶 CLEA 在其最适催化温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 下也会缓慢失活; (4)胰蛋白酶 CLEA 的微观形貌中, 以众多“短棒”状聚体交叉相连构成“脚手架”状集簇, 此结构使其具有优良的稳定性、活性和力学性质.

References

- Roy, J. J.; Abraham, T. E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *38*, 31.
- Cao, L. Q.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361.
- Mateo, C.; Palomo, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 273.
- Wu, H.-L.; Yang, P.-Y.; Fan, G.-R.; Tian, Y.-P.; Lu, H.-J.; Jin, H. *Chin. J. Chem.* **2006**, *24*, 903.
- Chen, J.; Zhang, J.-L.; Han, B.-X.; Li, Z.-H.; Li, J.-C.; Feng, X.-Y. *Colloids Surf., B* **2006**, *48*, 72.
- Eduard, C.; Francisc, R. G. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3935.
- Tyagi, R.; Batra, R.; Gupta, M. N. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *24*, 348.
- Kiss, A.; Fekete, E.; Pukánszky, B. *Compos. Sci. Technol.* **2007**, *67*, 1574.
- Hao, H.-X.; Hou, B.-H.; Wang, J.-K.; Lin, G.-Y. *J. Cryst. Growth* **2006**, *290*, 192.
- van Langen, L. M.; Janssen, M. A.; Oosthoek, N. P.; Pereira, S. M.; Svedas, V. K.; Rantwijk, F. A.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *79*, 224.
- Schoevaart, R.; Wolbers, M. W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kieboom, A. P. G.; van Rantwijk, F.; van der Wielen, L. A. M.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 754.
- Simon, L. M.; Kotormán, M.; Szabó, A.; Nemcsók, J.; Laczkó, I. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 909.
- Choa, Y. J.; Park, O. J.; Shin, H. J. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 108.
- Silvaa, C. J. S. M.; Zhang, Q.; Shen, J.; Cavaco-Paulo, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 634.
- Yildiz, H. B.; Toppare, L.; Gursel, Y. H.; Yagci, Y. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 945.
- Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M. N. *Anal. Biochem.* **2006**, *351*, 207.

(A0706276 LU, Y. J.; ZHENG, G. C.)