交联海藻酸钙凝胶固定化酵母醇脱氢酶研究

李桂银[1,3]，杨栋梁[2,3]，蒋玉仁[2]，丁　萍[2]，黄可龙[2]，李元建[1]

(1. 中南大学 药学院，湖南 长沙，410078；
2. 中南大学 化学化工学院，湖南 长沙，410083；
3. 湖南科技职业学院 轻化工程学院，湖南 长沙，410118)

摘　要：对用海藻酸钙包埋、戊二醛交联法固定酵母醇脱氢酶催化苯乙酮酸合成(R)-扁桃酸的过程进行研究，比较游离酶与固定化酶的酶学性质。实验结果表明：固定化酶的热稳定性显著提高，游离酶在 70 ℃时酶蛋白变性失去活力，而固定化酶在 65 ℃保温 1 h 的能保持 64%的酶活力，在 70 ℃时酶活力仍可保留 48.6%；固定化酶的最适温度由 30 ℃升至 40 ℃，最适反应 pH 值由 6.8 下降为 5.8；固定化酶保留了 62.72%的游离酶活性， 固定化酶的表观米氏常数和最大反应速率分别为 37.33 mmol/L 和 358.42 nmol/min。该固定化酶具有良好的储存稳定性和操作稳定性。

关键词：海藻酸钠；固定化；酵母醇脱氢酶
中图分类号：O642　　文献标志码：A　　文章编号：1672−7207(2009)06−1510−07

Immobilization *saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on cross-linked calcium alginate beads

LI Gui-yin[1,3], YANG Dong-liang[2,3], JIANG Yu-ren[2], DING Ping[2], HUANG Ke-long[2], LI Yuan-jian[1]

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;
3. Department of Chemical Engineering, Hunan Vocational College of Science and Technology, Changsha 410118, China)

Abstract: The optimum technology of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase (SCAD) within a calcium alginate matrix which was cross-linked with glutaraldehyde was studied. The SCAD was compared with its immobilized enzyme in some properties. The results show that the free enzyme loss all its activity when heated at 70 ℃ for 1 h but the immobilized enzyme still keeps 48.6% of the original activity. The maximal activity of the native SCAD appears at 30 ℃, but the optimum temperature of the immobilized SCAD is as high as 40 ℃. The optimal reaction pH of the immobilized enzyme is 5.8 compared to 6.8 of the free SCAD. For the reduction of phenylglyoxylic acid by immobilized SCAD, the kinetic analysis of data indicates that the immobilized SCAD retains 62.72% activity of its original activity, the maximum specific activity and the Michaelis constants for phenylglyoxylic acid are 358.42 nmol/min and 37.33 mmol/L, respectively. Furthermore, the immobilized SCAD enhances storage stability and good durability in the repeated use.

Key words: sodium alginate; immobilization; *saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase

α-羟基苯乙酸俗称扁桃酸，是合成环扁桃酯、羟苄唑、匹莫林等手性药物的重要中间体。它有一个手性碳原子，有(R)-扁桃酸和(S)-扁桃酸 2 种光学构型。单一构型的扁桃酸被广泛应用于光学纯的氨基酸、血管紧张肽转化酶抑制剂、辅酶 A 等药品的不对称合成。如(R)-扁桃酸是半合成抗生素(青霉素类或头孢菌素

收稿日期：2009−01−25；修回日期：2009−04−09
基金项目：国家自然科学基金资助项目(B061201)；湖南省教育厅资助项目(07D044)；中南大学博士后科学基金资助项目(2009 年)
通信作者：杨栋梁(1954−)，男，湖南益阳人，教授，从事生物材料和酶催化研究；电话：0731-88830827；E-mail: dongliangyang2004@yahoo.com.cn; klhuang@mail.csu.edu.cn

类)的起始原料和神经安慰药物麻黄碱的中间体[1−3]。制备光学活性的扁桃酸有不对称合成法[4−5]，外消旋体的拆分[6−8]和生物催化不对称还原法等方法[9−10]。而生物催化不对称还原法具有高效率、高立体选择性、反应条件温和以及经济效益和社会效益好等优点。因此，利用微生物细胞或酶作为催化剂来催化不对称还原苯乙酮酸制备具有光学活性的扁桃酸的方法受到研究者的关注。

面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是被广泛利用的廉价微生物之一，其细胞内存在着丰富的氧化还原酶(如醇脱氢酶)系，可催化各种羰基化合物的不对称还原反应，并对该类反应具有高度的立体选择性[11]。Xiao 等[10−11]以苯乙酮酸为原料，利用诱导后的游离酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae* FDllb)中的酵母醇脱氢酶(*Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase (SCAD) (EC1.1.1.1)，在 NADH 参与下，合成了(R)-扁桃酸。

与游离酶相比，固定化酶具有高效、专一、温和的酶催化特性以及稳定性高、可分离回收、重复使用和生产成本低等一系列优点。国内外关于固定化 SCAD 酶的方法有磁性粒子吸附法、包埋法、共价结合法、交联法等[12−14]。本文作者采用海藻酸钠包埋、戊二醛交联的方法固定化酵母醇脱氢酶 SCAD，优化了固定化工艺条件；以苯乙酮酸为酶促反应底物，研究了固定化酶的部分酶学性质，并对固定化酶的动力学进行了探讨。

1　实　验

1.1　仪器及试剂

仪器：SPX-100 生化培养箱(上海民仪电子有限公司制造)；UV2100 紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司制造)；KS-250F 超声波破碎仪(宁波新芝股份有限公司制造)。

试剂：啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, strain No.3，中南大学化学化工学院制药工程系菌种保藏室保藏)；扁桃酸外消旋体(国药集团化学试剂有限公司生产，分析纯)；R-扁桃酸(Sigma 公司生产)；苯乙酮酸(Sigma 公司生产)；尼克酰胺核苷酸(NADH) (Sigma 公司生产)；牛血清蛋白(BSA)(上海赛达生物药业有限公司生产)；其他试剂都为分析纯。

1.2　酵母菌的培养及酵母醇脱氢酶的制备

种子培养基(g/L)：蛋白胨，3；葡萄糖，50；酵母粉，2.5；$MgSO_4$，0.5；KH_2PO_4，1.0；NaCl，0.5。pH 值为 6.0~6.5。

从斜面挑取一环接种到内有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中，在温度为 28 ℃、转速为 120 r/min 的摇床中培养 28 h 后，将培养液离心(在 6 000 r/min 转速下离心 15 min)，收集菌体。称量质量。将菌体悬浮在质量为其 10 倍的生理盐水中，混匀，用超声波破碎仪对菌体进行破碎(功率为 400 W，探头振幅为 25%)，破壁次数为 120 次(操作时每工作 8 s 停 8 s，间歇操作)。将破壁后的溶液离心(在 6 000 r/min 转速下离心 10 min)后获得酵母醇脱氢酶的粗酶液。而后在粗酶液中缓慢加入硫酸铵至饱和度 30%，在 4 ℃静置，于 4 000 r/min 转速下离心 20 min，弃沉淀，取上清液，加硫酸铵至饱和度 70%；在 4 ℃静置，于 4 000 r/min 转速下离心 20 min，弃清液，沉淀用磷酸盐缓冲液(pH 值为 6.2)溶解后透析除盐初步纯化后，得到实验用酶液(蛋白质质量浓度为 0.14 g/L，酶活力为 471.0 U)。

1.3　酵母醇脱氢酶的固定化

将 1 mL 酶活力为 471.0 U 的酶液 与 1 mL 3%(质量分数)的海藻酸钠溶液混合后，用注射器(5 号针头)滴到 20 mL 2.0%的 $CaCl_2$ 溶液中，于 25 ℃静置固化 6 h，过滤洗涤，加入到 20 mL 0.5%(质量分数)戊二醛溶液中于 25 ℃室温下交联 2 h，经过滤、洗涤和干燥后得到颗粒状固定化酶。

1.4　酵母醇脱氢酶相对酶活力的测定

酶活的测定：酵母细胞产醇脱氢酶催化苯乙酮酸生成扁桃酸，反应过程需要辅酶 NADH 参与，NADH 在波长 340 nm 处有特征吸收峰，而 NAD^+无吸收峰。故可通过测定 340 nm 处吸收值的变化来测定酶活[15]。

移取 4 mL 的磷酸盐缓冲液(浓度为 0.02 mol/L, pH=6.8)，1 mL 0.1 mol/L 苯乙酮酸，1 mL 1 mmol/L NADH 于 30 ℃保温 5 min 后，加入每次制备的固定化酶颗粒(即 1 mL 游离酶制备成的固定化酶颗粒)或 1 mL 游离酶(蛋白质含量为 0.14 g/L)，测量 3 min 内在 340 nm 处吸光度的变化。

酶活的定义：1 mL 游离酶或固定化酶(即由 1 mL 游离酶制备成的固定化酶颗粒)在单位时间内(min)消耗 NADH 的量(nmol)定义为 1 个酶活单位(U)。

根据吸光度ΔA_{340}，通过标准曲线换算出 NADH 的浓度 c，再按下式计算酶活力 f：

$$f=c\times V\times 10^3/t。\quad (1)$$

其中：c 为 NADH 浓度，mmol/L；V 为酶液体积，mL；t 为反应时间，min。

酶的活力回收率是指固定化酶活力与用于固定化的游离酶活力之比，%；酶的相对活力是指单因素条件下测得各组酶活力与该条件下酶的最高活力之比，%。

1.5 固定化酶包埋率的测定

构成蛋白质的某些氨基酸(如色氨酸、苯丙氨酸等)在紫外区具有紫外吸收，通过对酵母醇脱氢酶磷酸缓冲溶液的全波长扫描发现在 280 nm 有最大吸收峰，故可通过测 280 nm 的吸光度来测定蛋白质含量。以牛血清蛋白(BSA)作为蛋白质标样，以 BSA 的浓度 x 为横坐标，A_{280} 为纵坐标 y，标准曲线为 y=0.086 98+0.630 3 x，显著性系数 R=0.991 3。

将固定化酶颗粒用 0.3 mol/L 多聚磷酸钠溶解，剧烈搅拌破坏颗粒，离心分离，取上层清液测其在 280 nm 处的吸光度，而用于固定化的游离酶按相同比例稀释测其在 280 nm 处的吸光度，计算得到固定化酶和游离酶中的蛋白质含量，两者之比即为海藻酸钙凝胶固定化酶的包埋率。

2 结果与讨论

2.1 酵母醇脱氢酶固定化条件的优化

在海藻酸钠包埋酶的固定化方法中，固定化条件对酶活力影响很大。根据预备实验和其他的相关文献，选择对实验影响较大的 5 个因素，即固定化时间、固定化温度、海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、戊二醛浓度，考察它们对固定化酶活力的影响。每个因素设 4 个水平，按正交设计表 $L_{16}(4^5)$安排实验，结果见表 1 和表 2。

表 1 正交设计固定化条件因素水平

Table 1 Level of immobilization condition factor in orthogonal design

水平	固定化时间(A)/h	固定化温度(B)/℃	海藻酸钠浓度(C)/%	氯化钙浓度(D)/%	戊二醛浓度(E)/%
1	2	4	1	0.8	0.5
2	4	25	2	1.4	1.0
3	6	35	3	2.0	1.5
4	8	40	4	2.6	2.0

表 2 正交实验直观分析

Table 2 Results of Orthogonal Experiment

序号	A	B	C	D	E	酶活力/U
1	1	1	1	1	1	161.72
2	1	2	2	2	2	148.55
3	1	3	3	3	3	189.84
4	1	4	4	4	4	180.29
5	2	1	2	3	4	228.46
6	2	2	1	4	3	250.27
7	2	3	4	1	2	233.82
8	2	4	3	2	1	285.82
9	3	1	3	4	2	306.85
10	3	2	4	3	1	363.81
11	3	3	1	2	4	191.60
12	3	4	2	1	3	208.94
13	4	1	4	2	3	292.69
14	4	2	3	1	4	332.62
15	4	3	2	4	1	237.25
16	4	4	1	3	2	198.25
K_1	170.100	247.430	200.460	234.275	262.150	
K_2	249.592	273.813	205.800	229.665	221.868	
K_3	267.800	213.127	278.783	245.090	235.435	
K_4	265.202	218.325	267.653	243.665	233.243	
R	97.700	60.686	78.323	15.425	40.282	

从表 2 可以看出：第 10 组实验制备的固定化酶的活力为 363.81 U，明显比其他组的高。通过极差分析(R)得到影响因素显著性的顺序从大至小为：A，C，B，E，D。通过比较每一组的 K_1，K_2，K_3 和 K_4 可选出优化水平组合，即 $A_3B_2C_3D_3E_1$。而此条件恰好不包含在已做过的 16 次实验中，按此条件进行确认试验，测得固定化酶的酶活力为 383.51 U，综合以上结果得固定化最佳条件为：3.0%海藻酸钠，2.0%氯化钙，0.5%戊二醛，固定化温度为 25 ℃，固定时间为 6 h。其中，固定化时间和海藻酸钠浓度的影响最显著。

在实验中发现，海藻酸钠浓度偏低(＜2%)时，酶泄漏严重，清洗酶珠时，酶损失较多，酶活力下降；海藻酸钠浓度偏高时，微环境效应和扩散阻力对反应影响很大，且不易操作，很难将酶液从注射器中挤出。因此，选用 3%的海藻酸钠对酶进行固定化较适宜。

钙离子对固定化酶活力有 2 个方面的影响：一方面，钙离子浓度对固定化酶的强度起正面影响；另一方面，钙离子会抑制酶的活力。当 $CaCl_2$ 浓度小于 1.4%时，造粒效果不理想，颗粒状固定化酵母醇脱氢酶的机械强度偏小，抽滤时容易塌陷变形，酵母醇脱氢酶包埋不完全；当 $CaCl_2$ 浓度过大时，高浓度的 Ca^{2+}对酵母醇脱氢酶活性有抑制作用。

戊二醛作为一种双功能交联剂[16]，可以使海藻酸钠分子发生交联，同时，也能使酶交联在载体上，能够增强海藻酸钠的机械强度和固定化酶的稳定性，但同时也影响酵母醇脱氢酶的活性。

当固定化时间为 6 h 时，固定化酶活力最强。固定化时间过短或过长，固定化酶活力均有不同程度的下降。究其原因，固定化酶的活性受到 2 个方面的综合影响：一方面，随着固定化时间的延长，酵母醇脱氢酶固化越来越充分，酶在海藻酸钙凝胶中包埋得更牢固，有利于固定化酶活力的提高；另一方面，随着固定化时间的延长，Ca^{2+}对固定化酶的抑制作用加剧，使酶活力下降。综合考虑以上因素，通过正交实验得到的最适固定化条件比较合理。

2.2　最佳固定化条件下固定化酶的包埋率

在最佳固定化条件下进行 5 组平行实验，测定蛋白质包埋率并计算相对标准偏差(RSD)，结果如表 3 所示。由表 3 可见，平均包埋率为 45.6%，相对标准偏差为 4.6%。这说明该固定化条件较好，有较好的稳定性。

2.3　固定化酶酶学性质

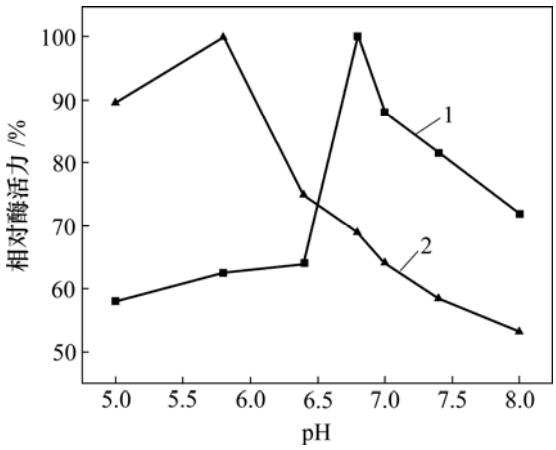
2.3.1　固定化酶的最适反应 pH 值

以苯乙酮酸为酶促底物，将固定化酶和游离酶在不同 pH 值(5.0，5.8，6.4，6.8，7.0，7.4 和 8.0)的磷酸盐缓冲液中反应后，测量其酶活力，考察酶的最适反应 pH 值。实验结果如图 1 所示。

表 3　固定化酶的包埋率

Table 3　Entrapment rate of immobilized SCAD

实验号	1	2	3	4	5
包埋率/%	45.7	48.3	46.8	44.1	43.0



1—游离酶；2—固定化酶

图 1　固定化酶的最适反应 pH

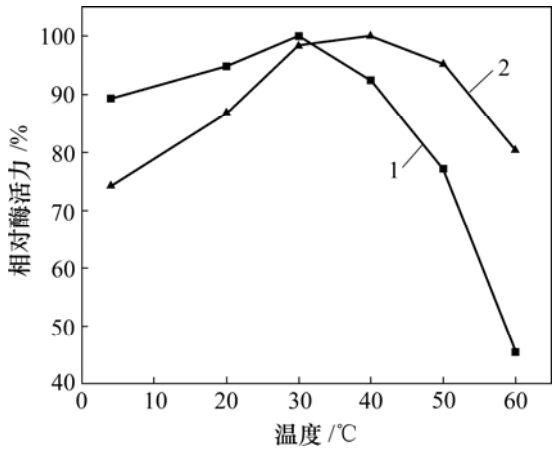
Fig.1　Optimal reaction pH of immobilization SCAD

由图 1 可看到，游离酶的最适反应 pH 值为 6.8，固定化酶的最佳反应 pH 值为 5.8。酶经过固定化后，其最适 pH 值会发生一些变化。影响固定化酶的最适 pH 值的因素主要有 2 个：一个是载体的带电性质，另一个是酶催化反应产物的性质。一般来说，用带负电荷的载体制备的固定化酶，其最适 pH 值比游离酶的最适 pH 值高；用带正电荷的载体制备的固定化酶的最适 pH 值比游离酶的最适 pH 值低；而用不带电荷的载体制备的固定化酶，其最适 pH 值一般不改变。酶催化作用的产物性质对固定化酶的最适 pH 值有一定的影响。一般来说，当催化反应的产物呈酸性时，固定化酶的最适 pH 值要比游离酶的最适 pH 值高一些；当产物呈碱性时，固定化酶的最适 pH 值要比游离酶的最适 pH 值低一些；当产物呈中性时，最适宜 pH 值一般不变[17]。海藻酸钙凝胶带正电，而固定化酶催化苯乙酮酸生产扁桃酸，产物呈酸性，2 个因素作用的方向相反。在此实验中，可能前者因素起主要作用，故结果显示固定化酵母醇脱氢酶的最适反应 pH 值为 5.8。

2.3.2　固定化酶的最适反应温度

分别在 4，20，30，40 和 50 ℃用固定化酵母醇

脱氢酶和游离酶催化苯乙酮酸，其结果见图 2。游离酶的最适反应温度为 30 ℃，而固定化酶的最适反应温度上升至 40 ℃。固定化酶的最适温度有明显提高，可能是固定化载体提高了酶的空间结构对热的稳定性；但是当温度超过 40 ℃后，相对酶活力大大降低，可能是因为高温使酶蛋白变性。所以，固定化酶的最佳催化温度为 40 ℃。酵母醇脱氢酶经固定化后，最适反应温度的提高不仅能提高反应速度，同时可以防止外界微生物的污染，有利于酶的工业化应用。



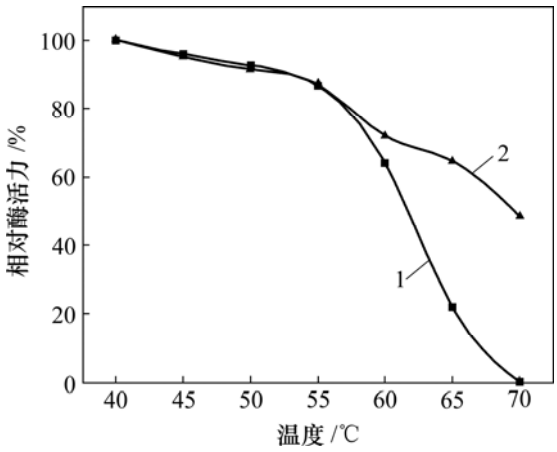
1—游离酶；2—固定化酶

图 **2** 固定化酶的最适反应温度

Fig.2 Optimal reaction temperature of immobilization SCAD

2.3.3 固定化酶的热稳定性

将固定化酶和游离酶在 40，45，50，55，60，65 和 70 ℃保温 1 h，测其酶活力，考察固定化酶的热稳定性，其结果见图 3。SCAD 经固定化后，热稳定性显著提高，游离酶在 65 ℃保温 1 h，酶活力仅剩 22%；



1—游离酶；2—固定化酶

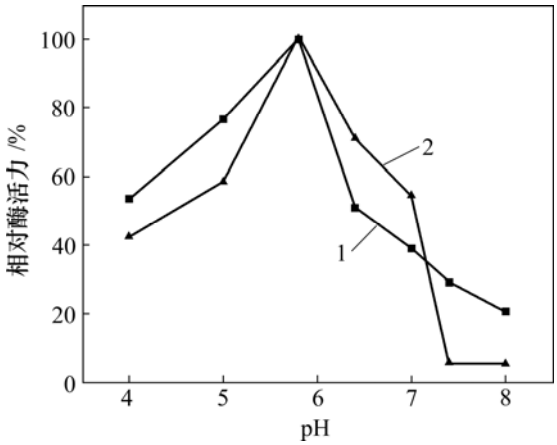
图 **3** 固定化酶的热稳定性

Fig.3 Thermal stability of immobilized SCAD

在 70 ℃时酶蛋白变性失去活力，而固定化酶在 65 ℃保温 1 h 保持 64%的酶活力，在 70 ℃仍可保留 48.6%。这可能是 SCAD 经海藻酸钠包埋和戊二醛交联后，酶蛋白被固定在凝胶中，分子整体运动受到限制，阻挡了不利因素对酶的作用，增加了酶构型的牢固程度，从而增加了酶的热稳定性。

2.3.4 固定化酶的 pH 值稳定性

将固定化酶和游离酶置于不同 pH 值(4.0，5.0，5.8，6.4，7.0，7.4 和 8.0)的缓冲液中室温静置 1 h 后，测定酶活力，考察固定化酶的 pH 值稳定性(图 4)。由图 4 可见，固定化酶和游离酶在酸性环境下，酶活力强；而在碱性环境下，酶活力急剧下降。并且当 pH＞7.0 时，固定化酶颗粒开始溶解，机械强度变小，酶活力迅速降低，因此，海藻酸钠作为酵母醇脱氢酶的包埋载体，其耐碱性能有待提高。



1—游离酶；2—固定化酶

图 **4** 固定化酶的 pH 稳定性

Fig.4 pH stability of immobilized SCAD

2.3.5 固定化酶的操作稳定性和贮存稳定性

将固定化酶在最适反应条件下(pH=5.8，温度为 40 ℃)反应，测其酶活力。而后取反应后的固定化酶，用蒸馏水洗涤、抽滤 3 次，在最适条件下进行第 2 次反应，如此反复。以第 1 次酶活力作为 100%，测得前 5 次的相对酶活力分别为 100%，67.78%，62.86%，42.65%和 39.63%。随着反应次数增加，粒子逐渐胀大，酶活力降低。经过 5 次循环后，相对酶活力保持在 39.63%。

在不加任何保护剂的条件下，以 1 mL 游离酶固定化所得的固体颗粒与 1 mL 游离酶比较，将固定化酶和游离酶于 4 ℃放置 20 d 后游离酶活力下降近 70%，而固定化酶活力下降不超过 30%。可见，固定化酶的贮存稳定性比游离酶的贮存稳定性强。

2.4　酶促反应动力学

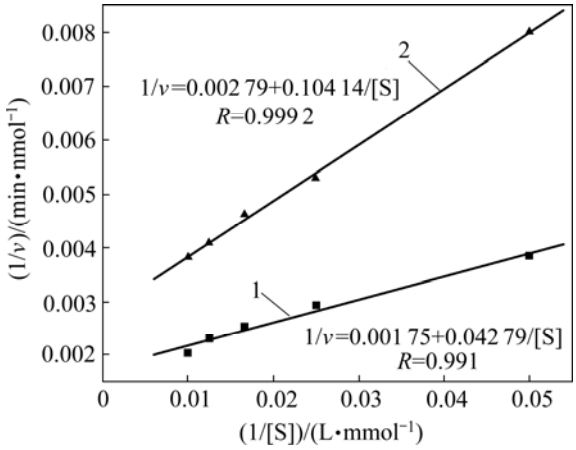
分别配制浓度为 0.02，0.04，0.06，0.08 和 1.00 mol/L 的苯乙酮酸溶液，按照 SCAD 酶活测定方法，测定在不同底物浓度([S])下游离酶和固定化酶的反应初速度(v)。依据米氏方程，利用 Lineweaver-Burk 双倒数法以 1/ v 对 1/[S]作图(图 5)，并对数据进行线性回归，得到游离酶和固定化酶的动力学参数表观米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{max}，如表 4 所示。

表 4　游离 SCAD 和固定化 SCAD 的动力学参数

Table 4　Kinetic parameters for free and immobilized SCAD

SCAD	K_m/ (mmol·L^{-1})	v_{max}/ (nmol·min^{-1})	v_{max}/K_m	相对酶活性/%
游离酶	24.45	571.43	23.39	100.00
固定化酶	37.33	358.42	9.60	62.72

由表 4 可知，固定化 SCAD 的 K_m (37.33 mmol/L)是游离 SCAD 的 K_m(24.45 mmol/L)的 1.53 倍。K_m 变大，说明固定化 SCAD 对底物的亲和力有所降低。这可能是由于受内扩散限制，固定化凝胶粒附近底物的浓度要比溶液中的低，导致底物与酶的接触几率变小，亲和力降低。固定化 SCAD 的 v_{max} 为游离 SCAD 的 1/1.59，固定化酶保留了 62.72%的游离酶的活性，这可能是经过戊二醛的交联作用，引起酶空间结构发生变化，从而使酶的催化活性降低。



1—游离 SCAD 酶；2—固定化 SCAD 酶

图 5　由 Lineweaver-Burk 双曲线法得到的底物浓度和反应初速度之间的关系

Fig.5　Relationship between substrated concentration and velocity using Lineweaver-Burk double reciprocal plots

SCAD 催化苯乙酮酸还原为(R)-扁桃酸的反应机理为：在反应过程中，苯乙酮酸的羧基接受来自 NADH 的氢负离子，同时又与酶结合，使羰基还原为羟基生成产物(R)-扁桃酸，辅酶 NADH 则转化为 NAD^+(如图 6 所示)。

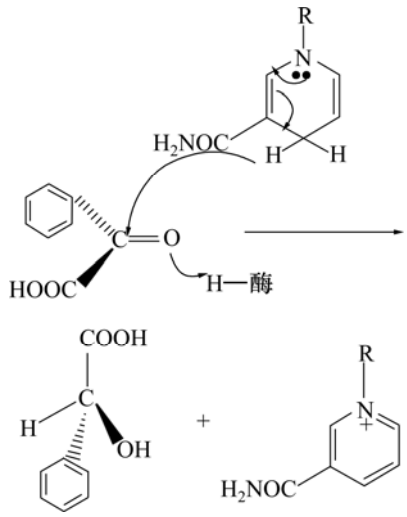


图 6　SCAD 催化苯乙酮酸还原为(R)-扁桃酸的反应机理

Fig.6　Reaction mechanism of SCAD catalyzed resolution of phenylglyoxylic acid to (R)-mandelic acid

3　结　论

a. 采用海藻酸钙包埋、戊二醛交联的方法固定化酵母醇脱氢酶 SCAD。利用正交实验设计法对固定化 SCAD 酶的条件进行了优化。固定化 SCAD 最佳条件如下：3.0% 海藻酸钠，2.0% 氯化钙，0.5% 戊二醛，固定化温度为 25 ℃，固定时间 6 h，此时，固定化酶的酶活力为 383.51 U。

b. 利用固定化 SCAD 酶为生物催化剂，催化苯乙酮酸来合成(R)-扁桃酸。固定化 SCAD 酶的最适酶促反应温度为 40 ℃，最适反应 pH 值为 5.8。与游离 SCAD 酶相比，固定化 SCAD 酶的热稳定性显著提高，在 65 ℃时保持 64%的酶活力，在 70 ℃时酶活力仍可保留 48.6%，而游离 SCAD 酶在 70 ℃时变性失去活力。

c. 固定化 SCAD 的 K_m 是游离 SCAD 的 1.53 倍，SCAD 对底物的亲和力有所降低。固定化 SCAD 的 v_{max} 为游离 SCAD 的 1/1.59，固定化酶保留了 62.72%的游离酶的活性。重复利用固定化 SCAD 酶 5 次后仍保持 39.63%酶活力，在 4 ℃放置 20 d 后，固定化 SCAD

能保持 70%的酶活力，显示出较强的操作稳定性和储存稳定性。

参考文献：

[1] Challener C A. Chiral intermediates[M]. London: Ashgate Publisher, 2001: 502−504.

[2] Fulenmeier A, Quitt P, Volgler K, et al. 6-Acyl derivatives of aminopenicillanic acid: US Patent 3957758[P]. 1976−05−18.

[3] LI Gui-yin, HUANG Ke-long, JIAN Yu-ren, et al. Production of (R)-mandelic acid by immobilized cells of *saccharomyces cerevisiae* on chitosan carrier[J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 1465−1469.

[4] Blacker A J, Houson I N. Preparation of mandelic acid derivatives: WO 02066410[P]. 2002−08−29.

[5] 吴珊珊. 相转移催化法合成扁桃酸的工艺研究[D]. 南京: 南京理工大学化工学院, 2003.
WU Shan-shan. The synthesis of mandelic acid in the presence of phase transfer catalyst[D]. Nanjing: School of Chemical Engineering of Nanjing University of Science &Technology, 2003.

[6] 阮源萍, 张雪曼, 陈安齐, 等. 2, 6-二-O-β-戊基糊精涂渍 Symmetry C_8 柱拆分扁桃酸及其类似物对映体[J]. 色谱, 2004, 22(4): 420−423.
RUAN Yuan-ping, ZHANG Xue-man, CHEN An-qi, et al. Enantiomeric separation of mandelic acid and its analogues high performance liquid chromatography with 2,6-di-O-pentyl-β-cyclodextrin coated symmetry C_8 column[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2004, 22(4): 420−423.

[7] Ganpatid Y, Sivakumar P. Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via methyl mandelate in non-aqueous media[J]. Journal of Biochemical Engineering, 2004, 19: 101−107.

[8] Silvia R, Amaya S, Vicente U, et al. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 88−93.

[9] LI Gui-yin, HUANG Ke-long, JIAN Yu-ren, et al. Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42: 405−412.

[10] XIAO Mei-tian, HUANG Ya-yan, SHI Xiao-ai, et al. Bioreduction of phenylglyoxylic acid to R-(-)-mandelic acid by *Saccharomyces cerevisiae* FD11b[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 589−596.

[11] XIAO Mei-tian, HUANG Ya-yan, MENG Chun, et al. Kinetics of asymmetric reduction of phenylglyoxylic acid to R-(-)-mandelic acid by *Saccharomyces Cerevisiae* FDllb[J]. Chinese Journal Chemical Engineer, 2006, 14(1): 73−80.

[12] LIAO Ming-huang, CHEN Dong-wang. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23: 1723−1727.

[13] Schopp W, Grunow M. Immobilization of yeast ADH by adsorption onto polyaminomethylstyrene[J]. Application Microbial Biotechnology, 1986, 24: 271−276.

[14] Cochrane F C, Petach H H, Henderson W. Application of tris(hydroxymethyl)phosphine as a coupling agent for alcohol dehydrogenase immobilization[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18: 373−378.

[15] Pankaj S, Himani K, Uttam C B. Purification and characterization of an enantioselective carbonyl reductase from *Candida viswanathii* MTCC5158[J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 1632−1640.

[16] Murat E, Antonio R M. Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 1445−1450.

[17] 刘建龙, 王瑞明, 刘建军. 酶的固定化技术研究进展[J]. 中国酿造, 2005, 9: 4−6.
LIU Jian-long, WANG Rui-ming, LIU Jian-jun. Research progress in immobilized enzyme[J]. China Brewing, 2005, 9: 4−6.