

5-氟尿苷 5'-棕榈酸酯的酶法合成

侯雪丹¹, 张 毅¹, 刘 欢¹, 李 宁^{2,a}, 宗敏华^{2,b}¹ 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006² 华南理工大学轻工与食品学院制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640

摘要: 考察了 10 ml 丙酮-四氢呋喃 (85/15, 体积比) 混合溶剂体系中, 各关键因素对脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化 5-氟尿苷 5'-棕榈酸酯合成反应的影响。结果表明, 添加分子筛能有效除去溶剂中的水分, 从而极大地提高了目标产物收率。在最优反应条件下, 该体系被成功放大至 200 ml (5-氟尿苷克级用量), 产物收率高达 99%; 同时脂肪酶 Lipozyme TL IM 表现出优异的操作稳定性, 重复使用 10 批次后, 产物收率仍可达 97%。另外, 填充床反应器的体积生产效率为 22.4 g/(L·h), 远高于批次反应时的 0.5 g/(L·h)。

关键词: 5-氟尿苷; 5'-棕榈酸酯; 固定化脂肪酶; 区域选择性; 棕榈酰化; 填充床反应器

中图分类号: O643 **文献标识码:** A

收稿日期: 2011-07-16. 接受日期: 2011-08-25.

^a 通讯联系人. 电话/传真: (020)22236669; 电子信箱: lining@scut.edu.cn

^b 通讯联系人. 电话: (020)87111452; 传真: (020)22236669; 电子信箱: btmhzong@scut.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金 (20906032, 21072065 和 20876059); 广东省科技计划 (2007B011000005); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20090172110019); 华南理工大学中央高校基本科研业务费专项资金 (2009zz0018, 2009zz0026 和 2009zm0199)。

Enzymatic Synthesis of 5'-Palmitate of 5-Fluorouridine

HOU Xuedan¹, ZHANG Yi¹, LIU Huan¹, LI Ning^{2,a}, ZONG Minhua^{2,b}¹ College of Biosciences and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China² State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: In a 10 ml co-solvent system of acetone-THF (85/15, volume ratio), the effects of key parameters on the synthesis of 5'-palmitate of 5-fluorouridine (5-FUR) catalyzed by Lipozyme TL IM were investigated. It was revealed that water in the mixture could be removed efficiently by adding molecular sieves, thus significantly improving the yield of the desirable product. The batch enzymatic reaction was successfully scaled up to 200 ml (1 g 5-FUR scale), furnishing a yield of 99%. Moreover, Lipozyme TL IM displayed excellent operational stability in this reaction system. The yield of 97% was obtained after reuse for 10 cycles. Additionally, the volumetric productivity in a packed bed reactor for the synthesis of 5'-O-palmitoyl-5-FUR was 22.4 g/(L·h), which was much higher than that in the batch reactor (0.5 g/(L·h)).

Key words: 5-fluorouridine; 5'-palmitate; immobilized lipase; regioselectivity; palmitoylation; packed bed reactor

Received 16 July 2011. Accepted 25 August 2011

^a Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-22236669; E-mail: lining@scut.edu.cn

^b Corresponding author. Tel: +86-20-87111452; Fax: +86-20-22236669; E-mail: btmhzong@scut.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (20906032, 21072065, and 20876059), the Science and Technology Project of Guangdong Province (2007B011000005), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20090172110019), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, SCUT (2009zz0018, 2009zz0026, and 2009zm0199).

5-氟尿苷 (5-FUR) 是一种具有高抗肿瘤活性的非天然核苷, 但存在毒副作用大、脂溶性差和在血浆

中半衰期短等缺点, 因而至今仍未用于临床治疗^[1~3]。为了克服这些缺陷, 人们合成了各种 5-FUR 的衍生

物, 其中 5'-棕榈酸酯比其母药及其它酯衍生物的毒副作用小^[4,5]; 且更易胶囊化、包埋效率高、药物泄露少、体内活性和稳定性都相对较高, 还适合制成免疫脂质体^[6]。

然而, 化学法合成此类衍生物需多步保护和脱保护步骤, 工艺繁琐, 产物收率低, 还产生大量废液, 污染环境^[4]; 而绿色的酶法工艺更能满足制药工业对简单、高选择性和环境友好工艺的需求^[7,8]。本课题组曾以高底物转化率 (>97%)、高选择性 (>99%) 合成了 5-FUR 的 5'-月桂酸酯及 5'-棕榈酸酯等一系列酯衍生物^[9,10]; 但其大规模制备仍存在两个较大障碍: (1) 酰基供体用量过大, 其与核苷的摩尔比为 15 (月桂酸乙烯酯: 5-FUR) 至 25 (苯甲酸乙烯酯: 5-FUR), 从而使成本增加, 且不利于产物纯化^[9,10]; (2) 反应体系规模太小 (1~2 ml), 研究结果难以为大规模制备提供理论指导。基于此, 本文进一步探讨酰基供体大大过量的原因及酰基供体的去向, 寻求降低酰基供体用量的方法; 其次, 进行实验室规模的工艺放大, 以制备克级 5-FUR 5'-棕榈酸酯, 考察填充床反应器中工艺参数的影响, 以期为该酶法工艺的工业应用可行性提供依据。

1 实验部分

1.1 酶促 5-FUR 区域选择性酰化反应

在 50 ml 带塞三角瓶中加入 10 ml 含 0.2 mmol 5-FUR (纯度 > 97%, 江阴永达化工有限公司)、0.4 mmol 棕榈酸乙烯酯 (纯度 > 96%, 日本 TCI 公司) 的丙酮-四氢呋喃 (85/15, 体积比) 混合溶剂和 0.2 g 脂肪酶 Lipozyme TL IM (50 U/mg, 来源于 *Thermomyces lanuginosus*, 固定化于二氧化硅颗粒), 及 0.4 nm 孔径分子筛 (天津市科密欧化学试剂公司), 混合均匀, 置于一定温度下振荡反应 (200 r/min), 定时取样 20 μ l, 用甲醇-水溶液稀释, 离心 (10000 $\times$ g) 10 min, 用高效液相色谱仪 (Waters 600, USA) 分析, 配置 Zorbax XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m, Agilent), 光电二极管阵列检测器 (Waters 996) 或示差检测器 (Waters 2410)。

分析条件 1: 光电二极管阵列检测器 (分析波长 269 nm); 流动相: 88/12 的甲醇-乙酸铵缓冲液 (0.01 mol/L, pH = 4.25~4.27); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ l。5-氟尿苷及其 5'-棕榈酸酯 (根据

文献[9]合成并鉴定结构) 的保留时间分别为 2.48 和 18.24 min。

分析条件 2: 示差检测器; 流动相: 甲醇-水 (95/5); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 45 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ l。棕榈酸及其乙烯酯的保留时间分别为 7.79 和 15.87 min。

以高效液相色谱峰面积计算反应初速率 (v_0)、产物收率及区域选择性。

1.2 批次反应器中酶促酰化反应的放大

在 500 ml 带塞三角瓶中加入 200 ml 丙酮-四氢呋喃 (85/15, 体积比)、4 mmol 5-FUR (1.06 g)、8 mmol 棕榈酸乙烯酯 (2.26 g) 和 20% 的 0.4 nm 孔径分子筛 (40 g), 3 g 脂肪酶 Lipozyme TL IM, 混合均匀, 振荡反应 (40 $^{\circ}$ C, 200 r/min), 定时取样 20 μ l, 用甲醇-水稀释 50 倍, 离心 (10000 $\times$ g) 10 min 后, 取上清液 20 μ l, 用高效液相色谱分析。

1.3 填充床反应器中酶法合成 5-氟尿苷 5'-棕榈酸酯

固定床反应器装置及其循环装置流程如图 1 所示。其中 (a) 为连续反应器, (b) 为循环反应器。(1) 和 (5) 为 500 ml 储液罐, 配备搅拌装置以混匀反应液; (2) 为恒流泵; (3) 为分子筛柱, 以脱去溶剂中的水; (4) 为酶反应柱 (ϕ 10 mm $\times$ 100 mm), 其中掺入了约 2 g 分子筛 (孔径 0.4 nm)。整个操作单元放置在一个恒温空间中以保证反应的顺利进行。反应过

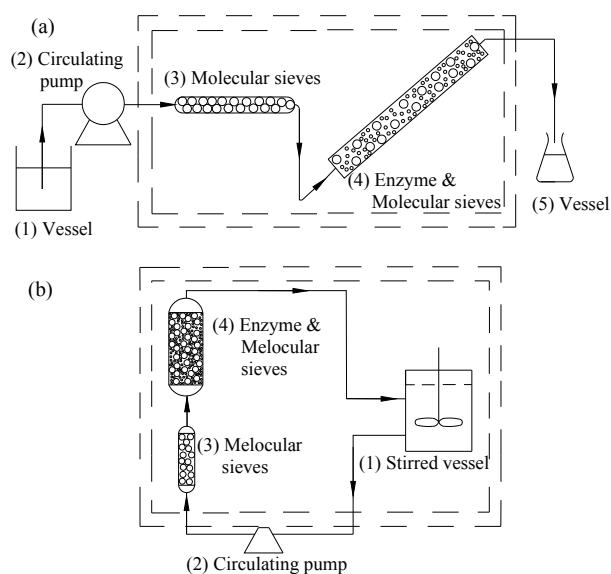


图 1 填充床反应器流程示意图

Fig. 1. Schematic diagram of the packed bed reactor system. (a) The continuous reactor; (b) The loop reactor.

程中定时取样进行高效液相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 分子筛对 Lipozyme TL IM 催化 5-FUR 酰化反应的影响

图 2 为分子筛及其含量对酶促 5-FUR 酰化反应的影响。可以看出, 在酶促酰化反应中, 由于体系中少量水的存在会引发一个竞争性的副反应, 即酶促酰基供体水解反应, 它是整个体系中的优势反应。这可能是由于水解反应的活化能远低于 5-FUR 棕榈酰化反应的。因此, 只要体系中存在微量的水, 酰基供体便会迅速水解。由图 2(a) 可见, 在未加分子

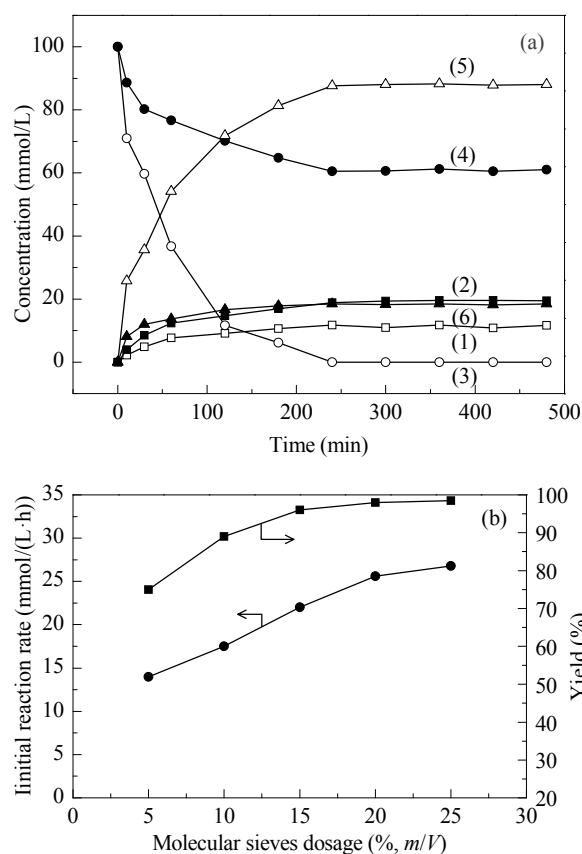


图 2 分子筛 (a) 及其含量 (b) 对酶促 5-FUR 酰化反应的影响

Fig. 2. Effects of molecular sieves (a) and their dosage (b) on the enzymatic acylation. Reaction conditions: 20 mmol/L 5-FUR, 100 mmol/L vinyl palmitate, 0.2 g Lipozyme TL IM, 40 °C, 200 r/min, 10 ml acetone-THF (85/15). Open symbols: reactions in the absence of molecular sieves, and the solvents used as received; filled symbols: reactions in the presence of molecular sieves, and the solvents dried overnight with molecular sieves prior to use. (1) Product; (2) Product (in the presence of molecular sieves); (3) Vinyl palmitate; (4) Vinyl palmitate (in the presence of molecular sieves); (5) Palmitic acid; (6) Palmitic acid (in the presence of molecular sieves).

筛的体系中, 水解反应初速率 (154.8 mmol/(L·h)) 是酰化反应的 12 倍 (13.2 mmol/(L·h)). 分子筛是一种具有精确微孔结构的晶体状硅铝酸盐, 对水分子具有较强的吸附能力, 已广泛用于有机介质中的酯化反应以除去体系中的水, 提高产物收率^[11~13]. 由图 2(a) 可见, 添加分子筛后, 水解反应初速率降至 48.6 mmol/(L·h), 仅为酰化反应 (23.4 mmol/(L·h)) 的 2 倍. 而且, 分子筛还促进了酰化反应的进行, 产物收率达 98%, 远高于未加分子筛体系的 (58%). 这正是由于分子筛吸附了反应体系中的水, 从而部分抑制了酰基供体棕榈酸乙烯酯的水解. 其中, 反应体系中的水来自溶剂、反应底物、酶颗粒以及整个操作过程中空气溶解入反应体系中的微量水. 此外, Fontes 等^[14]研究了丙酮、乙醇及乙腈中枯草杆菌蛋白酶催化转酯化反应中分子筛的作用机理, 证实分子筛除了能通过控制反应体系中的水来改变酶的水合状态外, 还能通过其中阳离子的离子交换作用影响酶的质子化状态, 对酶分子产生酸碱效应, 进而影响酶的催化行为. 因而, 这可能是酶促 5-FUR 棕榈酰化反应更易进行的另一个原因.

另外, 本文还优化了分子筛用量, 结果如图 2(b) 所示. 可以看出, 反应初速率及产物收率随分子筛用量的增加而逐渐升高. 至 20% 时, 产物收率达最高; 进一步增加分子筛用量, 产物收率变化很小. 故适宜分子筛用量为 20%.

2.2 其他因素对 Lipozyme TL IM 促 5-FUR 酰化反应的影响

如前所述, 由于竞争性水解反应的存在, 通常需要大大过量的酰基供体以达到较高的核苷底物转化率, 从而导致成本增加及产物分离纯化复杂化等问题. 因此, 本文在 5-FUR 浓度为 20 mmol/L 时探讨棕榈酸乙烯酯浓度对酶促酰化反应的影响, 结果列于表 1. 可以看出, 反应初速率随棕榈酸乙烯酯/5-FUR 底物摩尔比的增大而显著升高. 例如, 在含分子筛体系中, 当底物摩尔比为 1:1 时, 酶反应初速率仅为 6.0 mmol/(L·h) (实验 8); 当底物摩尔比增至 8:1 时, 反应初速率提高至 30.5 mmol/(L·h) (实验 12); 当底物摩尔比进一步增至 15:1 时, 反应初速率达 34.7 mmol/(L·h) (实验 14). 有趣的是, 当体系中添加分子筛, 使用 2 倍摩尔当量的棕榈酸乙烯酯时, 产物收率即可达到 99% (实验 9); 而未加分子筛的

表 1 底物摩尔比及酶量对脂肪酶 Lipozyme TL IM 促 5-FUR 棕榈酰化反应的影响
Table 1 Effects of molar ratio and enzyme amount on Lipozyme TL IM-catalyzed palmitoylation of 5-FUR

Entry	Molecular sieves (%)	Enzyme amount (g)	Acyl donor (eq.)	v_0 (mmol/(L·h))	Yield (%)	Time (h)	5'-Regioselectivity (%)
1	0	0.20	1	4.7	32	7.5	>99
2	0	0.20	2	11.3	54	7.5	>99
3	0	0.20	3	15.8	83	7.0	>99
4	0	0.20	5	19.9	96	6.5	>99
5	0	0.20	8	26.2	99	6.0	>99
6	0	0.20	10	29.6	99	6.0	>99
7	0	0.20	15	30.9	99	5.5	>99
8	20	0.20	1	6.0	55	9.5	>99
9	20	0.20	2	16.7	99	8.0	>99
10	20	0.20	3	20.6	99	7.5	>99
11	20	0.20	5	25.4	99	7.0	>99
12	20	0.20	8	30.5	98	6.5	>99
13	20	0.20	10	33.8	99	6.0	>99
14	20	0.20	15	34.7	99	5.0	>99
15	20	0.05	2	6.6	91	14.0	>99
16	20	0.10	2	9.8	98	10.0	>99
17	20	0.15	2	11.6	99	8.5	>99
18	20	0.18	2	12.3	99	8.0	>99
19	20	0.20	2	13.9	99	7.5	>99
20	20	0.25	2	16.4	99	6.0	>99
21	20	0.30	2	18.0	99	5.5	>99

Reaction conditions: 20 mmol/L 5-FUR, vinyl palmitate and Lipozyme TL IM, 10 ml acetone-THF (85/15) dried overnight with molecular sieves, 2 g molecular sieves, 40 °C, 200 r/min.

体系, 达到 98% 以上收率则需 8 倍摩尔当量的乙烯酯 (实验 5)。

另外, 表 1 还给出了酶量对该反应的影响。由实验 15~21 可以看出, 当酶量为 0.05 g 时, 产物收率仅为 91%, 其原因可能是多次取样过程中空气中的微量水溶解于反应体系, 从而引起酰基供体和产物的水解, 故核苷底物未能完全转化为其酯衍生物。随着酶量的增加, 反应初速率显著加快, 但酶量对产物收率的影响较小。综合考虑, 0.15 g 的酶量较适于工业化应用。

2.3 酶促 5-FUR 棕榈酰化反应放大的研究

在上述研究基础上, 本文将该反应体系由 10 ml 直接放大到 100 ml, 发现反应速率和产物收率皆无变化。随后将其进一步放大到 200 ml, 结果示于图 3。由图 3(a) 可见, 反应 8 h 时, 产物收率达 99%, 区域选择性也未因反应体系的增大而降低 (仍保持在 99% 以上)。同时, 本文还考察了 200 ml 反应体系中脂肪酶 Lipozyme TL IM 的操作稳定性, 待上次反应完毕, 固定化酶经过滤、新鲜介质清洗 3 遍, 于室温

晾干后直接用于下次反应。由图 3(b) 可以看出, 脂肪酶 Lipozyme TL IM 重复利用 10 次后, 其催化核苷酰化反应产物收率仍能保持 97% 以上。可见该酶法工艺具有较大的工业化应用潜力。

2.4 固定床反应器中酶促 5-FUR 5'-棕榈酸酯合成的研究

在固定床反应器中, 连续操作过程使后续的分选过程更简便有利于酶的分离和重复利用; 机械损伤小, 有利于保持酶的活性和稳定性^[15-18]。另外, 由于本反应体系中两底物均能完全溶解, 反应液粘度小, 且所用的脂肪酶 Lipozyme TL IM 为不均匀的颗粒状固体, 故较适于固定床酶反应器。

在固定床反应器中, 底物在酶层中的停留时间是一个重要影响因素^[15,16,18]。改变固定化酶层高度及反应液流速均能改变底物在酶层中的停留时间。表 2 给出了这两个参数对产物收率及固定化酶生产效率的影响。由表可见, 相同流速下, 酶层越高, 产物收率越高; 相同酶层高度下, 反应液流速越低, 所得产物收率也越高。总之, 反应液在酶层中停留时

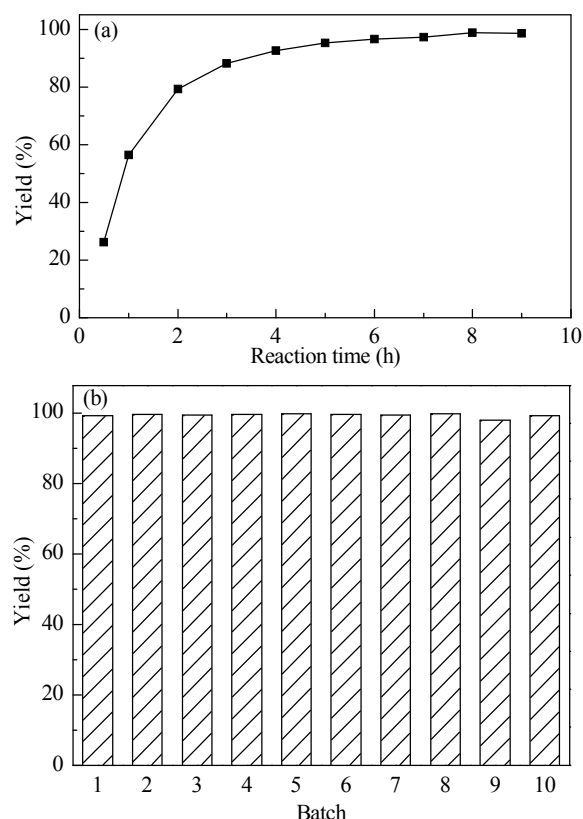


图3 在 200 ml 反应体系中酶促酰化反应过程 (a) 及酶的操作稳定性 (b)

Fig. 3. Time course of enzymatic acylation (a) and operational stability of the enzyme (b) in a 200 ml reaction system. Reaction conditions: 20 mmol/L 5-FUR, 40 mmol/L vinyl palmitate, 3 g Lipozyme TL IM, 200 ml acetone-THF(85/15) dried overnight with molecular sieves, 40 g molecular sieves, 40 °C, 200 r/min, reaction time 8 h for each batch.

间越长, 流过酶层后的产物收率则越高. 但酶层过高, 增加成本; 而流速太慢则完成反应耗时较长, 致使生产效率低下. 因此, 需综合考虑以选择合适的酶层高度和流速. 由表 2 可见, 当酶层高度为 5.5 cm、反应液流速为 0.33 ml/min 时底物在酶中的保留时间较长 (13.1 min), 此时产物收率最高 (76%). 但就单位质量固定化酶的生产效率而言, 实验 1 最高, 可达 183 mg/(g·h).

在确定了最佳流速和酶层高度后, 采用循环装置 (见图 1(b)) 使反应液循环流过酶层, 以提高最终产物收率, 结果示于图 4. 可以看出, 反应 3 h, 200 ml 反应液完成一次循环, 产物浓度为 8.3 mmol/L (收率为 41%). 至 6 h 时, 整个反应体系已完成两次循环, 产物浓度达 14.0 mmol/L (收率约 70%). 至第三次时, 反应 9 h 后产物浓度为 15.8 mmol/L (收率

表 2 酶层高度和反应液在流速对酶反应的影响

Table 2 Effects of enzyme bed height and flow rate of reaction mixture on enzymatic reaction

Entry	Enzyme bed height (cm)	Flow rate (ml/min)	Residence time (min)	Yield (%)	Productivity (mg/(g·h))
1	3.0 (1.5 g)	1.12	2.1	41	183
2	3.0 (1.5 g)	0.80	3.0	52	166
3	3.0 (1.5 g)	0.54	4.4	59	128
4	3.0 (1.5 g)	0.43	5.5	64	111
5	3.0 (1.5 g)	0.24	9.8	71	69
6	4.5 (2.0 g)	1.12	3.2	52	176
7	4.5 (2.0 g)	0.80	4.4	59	141
8	4.5 (2.0 g)	0.54	6.5	62	100
9	4.5 (2.0 g)	0.33	10.7	73	73
10	5.5 (3.0 g)	2.13	2.0	40	168
11	5.5 (3.0 g)	1.12	3.9	55	124
12	5.5 (3.0 g)	0.80	5.4	64	102
13	5.5 (3.0 g)	0.54	8.0	70	76
14	5.5 (3.0 g)	0.33	13.1	76	50

Reaction conditions: 20 mmol/L 5-FUR, 40 mmol/L vinyl palmitate, Lipozyme TL IM, 200 ml acetone-THF(85/15) dried overnight with molecular sieves, 40 g molecular sieves, 40 °C.

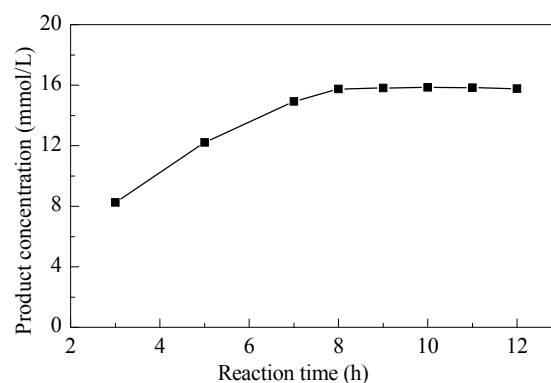


图4 固定床循环反应器中脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化 5-FUR 棕榈酰化反应的历程

Fig. 4. Time course of Lipozyme TL IM-promoted palmitoylation of 5-FUR in the packed bed loop reactor. Reaction conditions: 20 mmol/L 5-FUR, 40 mmol/L vinyl palmitate, 1.5 g Lipozyme TL IM, 200 ml acetone-THF (85/15) dried overnight with molecular sieves, 40 g molecular sieves, 40 °C, flow rate 1.12 ml/min.

达 79%), 产物收率提高不大. 反应液组成检测结果表明核苷底物未完全转化, 而酰基供体已消耗完全. 这可能是由于固定床反应器具有一定的管路空间, 其中空气中的水含量不易控制, 从而导致大部分酰基供体水解, 使产物收率偏低. 此外, 流动的反应液与酶分子的接触时间较短, 易造成短路, 使其与酶分子接触不充分, 最终导致酰化反应进行不完全.

尽管填充床循环反应器中 5-FUR 棕榈酰化反

应的终收率 (79%) 低于批次反应 (99%), 但其体积生产效率 (22.4 g/(L·h)) 却远高于批次反应 (0.5 g/(L·h)). 在批次反应中, 酶与底物充分接触, 而且接触时间长, 产物收率较高, 但固定化酶颗粒会因长时间的机械搅拌和碰撞而破裂, 且每个批次间的操作也相对繁琐、耗时; 而填充床固定化酶反应器体积小, 体积生产效率高, 操作方便, 易于连续化生产. 对其操作工艺的系统优化可进一步提升其体积生产效率.

3 结论

向反应体系中添加分子筛能有效地抑制酰基供体水解, 降低酰基供体用量, 提高产物收率. 在 10 ml 反应体系中, 酰基供体与核苷底物的摩尔比为 2 时, 反应 8 h 后, 目标产物收率高达 99%, 5'-区域选择性大于 99%. 在此基础上, 成功地将该体系放大至 200 ml 体系. 此外, 填充床反应器中酶法合成研究结果也初步证明, 混合溶剂中固定化脂肪酶 Lipzyme TL IM 催化 5-FUR 棕榈酰化生产 5-FUR5'-棕榈酸酯大规模应用的可行性, 从而为酶法制备核苷类酯衍生物的工业应用奠定了一定的基础.

参 考 文 献

- 1 Heidelberg C, Griesbach L, Cruz O, Schnitzer R J, Grunberg E. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1958, **97**: 470
- 2 Heidelberg C, Ansfield F J. *Cancer Res*, 1963, **23**: 1226
- 3 Wilkinson D S, Crumley J. *Cancer Res*, 1976, **36**: 4032
- 4 Ozaki S, Akiyama T, Ike Y, Mori H, Hoshi A. *Chem Pharm Bull*, 1989, **37**: 3405
- 5 Ozaki S, Awaya A. JP 63 196 519 A. 1988
- 6 Crosasso P, Brusa P, Dosio F, Arpicco S, Pacchioni D, Schuber F, Cattel L. *J Pharm Sci*, 1997, **86**: 832
- 7 单海霞, 陆杨, 李在均, 李明, 蔡燕, 孙秀兰, 张银志. 催化学报 (Shan H X, Lu Y, Li Z J, Li M, Cai Y, Sun X L, Zhang Y Zh. *Chin J Catal*), 2010, **31**: 289
- 8 Li N, Smith T J, Zong M H. *Biotechnol Adv*, 2010, **28**: 348
- 9 Wang H, Zong M H, Wu H, Lou W Y. *J Biotechnol*, 2007, **129**: 689
- 10 Wu J, Zong M H, Wu H, Lou W Y. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, **83**: 814
- 11 Huang J H, Song Z H, Liu Y F, Jin Q Z, Wu X J, Cai C M, Wang X G. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011, **113**: 609
- 12 Ye R, Hayes D G. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, **88**: 1351
- 13 Chen B L, Liu H Z, Guo Z, Huang J, Wang M Z, Xu X B, Zheng L F. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**: 1256
- 14 Fontes N, Partridge J, Halling P J, Barreiros S. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **77**: 296
- 15 Watanabe T, Sugiura M, Sato M, Yamada N, Nakanishi K. *Process Biochem*, 2005, **40**: 637
- 16 Laudani C G, Habulin M, Knez Ž, Della Porta G, Reverchon E. *J Supercrit Fluids*, 2007, **41**: 74
- 17 Severac E, Galy O, Turon F, Pantel C A, Condoret J S, Monsan P, Marty A. *Enzyme Microb Technol*, 2011, **48**: 61
- 18 Xia Y M, Fang Y, Xu G Z, Hu X Y, Shen Y A, Brown J. *J Mol Catal B*, 2004, **31**: 111