

展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母全细胞催化合成短链芳香酯

金子, 林影, 黄登峰, 苏国栋, 韩双艳

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 展示酶的酵母细胞作为全细胞催化剂, 既具有固定化酶的优点, 又有制备简单、成本较低的特点。本研究将细胞表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)的重组毕赤酵母用于非水相中催化合成短链芳香酯, 通过滴定和气相色谱的方法测定底物酸的转化率, 从底物的碳链长度、醇的结构、酵母冻干粉添加量、底物浓度及底物的酸醇摩尔比等方面考察了展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化合成短链芳香酯的特性。研究结果表明: 该全细胞催化剂可催化 C₁₀ 以下的酸和醇直接酯化合成多种短链芳香酯, 酸的转化率达到 90% 以上; 其中己酸和乙醇为酶的最适底物; 酵母冻干粉的添加量 20 g/L(306.0 U/g-dry cell)、己酸浓度 0.8 mol/L、酸醇摩尔比 1:1.1 是合成己酸乙酯的最佳条件。在此条件下反应 1.5 h, 己酸的转化率达到 97.3%。在现有的关于脂肪酶非水相催化合成短链芳香酯的报道中, 该全细胞催化剂显示出较好的底物耐受性以及较高的催化反应速率。因此, 展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂在合成短链芳香酯方面具有较大的商业化应用潜能。

关键词: 酵母表面展示, 南极假丝酵母脂肪酶 B, 全细胞催化, 短链芳香酯

Synthesis of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in non-aqueous phase

Zi Jin, Ying Lin, Dengfeng Huang, Guodong Su, and Shuangyan Han

School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: An enzyme-displaying yeast as a whole-cell biocatalyst seemed an alternative to immobilized enzyme, due to its low-cost preparation and simple recycle course. Here, we tried to use a recombinant *Pichia pastoris* displaying *Candida antarctica* lipase B (CALB) to catalyze the synthesis of short chain flavor esters in n-heptane. We studied some major influential factors of esterification reactions, such as carbon chain length of the substrates, alcohol structure, enzyme concentration, substrates concentration, molar ratio of the substrates. The acid conversions were determined by titration and gas chromatography analysis. About ten kinds of esters were synthesized successfully, and the acid conversions of eight esters reached as high as 90% after reaction for 6 h. The result also indicated that ethanol and hexanoic acid were the most suitable substrates for this whole-cell catalyst. Under the optimal reaction conditions (the amount of lipase 20 g/L (306.0 U/g-dry cell), hexanoic acid concentration 0.8 mol/L, the molar ratio of hexanoic acid to ethanol 1:1.1), hexanoic acid conversion reached 97.3% after reaction for 1.5 h. To our knowledge, the CALB-displaying *P. pastoris* whole-cell biocatalyst showed good tolerance for high substrates concentration and exhibited high reaction rate on

Received: July 20, 2009; **Accepted:** October 20, 2009

Supported by: Key Science and Technology Project of Guangdong Province (Nos. 2007A010900001, 2008A010900002).

Corresponding author: Shuangyan Han. Tel: +86-20-39380618; Fax: +86-20-39380618; E-mail: syhan@scut.edu.cn

广东省科技攻关项目(Nos. 2007A010900001, 2008A010900002)资助。

esterification of short chain flavor esters among the present enzyme/cell reported. Thus, CALB-displaying *P. pastoris* whole-cell biocatalyst was promising in commercial application for flavor esters synthesis in non-aqueous phase.

Keywords: yeast surface display, *Candida antarctica* lipase B, whole-cell biocatalyst, short chain flavor esters

脂肪酶作为一种高效的生物催化剂,在非水相中催化合成反应是其商业化应用的重要部分。目前,脂肪酶已经被证实可催化合成一系列芳香酯^[1-2]。但是采用游离脂肪酶为催化剂,酶的分离、再生、循环使用困难。实际应用中,大多需要将脂肪酶进行固定化,增强酶的稳定性和重复利用能力,延长酶活性的半衰期^[3]。虽然已有很多文章报道了有效的固定化方法,例如:将酶吸附在固体载体表面^[4-5],共价地结合到高分子材料上^[6]以及包埋在疏水凝胶中^[7-8]。然而,商品化的固定化脂肪酶价格仍然昂贵,限制了其在工业化大生产中的应用。

利用酵母表面展示技术,将酶固定在酵母细胞表面,以全细胞作为生物催化剂实现催化是另外一种简单易行的方法。在众多脂肪酶中,南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)的用途最为广泛。目前,国外已经开展了有限的以展示 CALB 的酵母全细胞作为催化剂的应用研究。如 Kato 等^[9]通过凝集素锚定系统将 CALB 展示在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 表面,构建了对短链脂肪酸底物偏好的全细胞催化剂。Tanino 等^[10]利用絮凝素 Flo1p 将 CALB 展示在酿酒酵母表面,仅简单尝试了催化正丁醇与脂肪酸的酯化反应。但这些研究局限于酿酒酵母表面展示系统,且普遍存在反应时间长、转化率低、酶易失活等问题。国内则罕有这方面的报道。

本实验室首次成功地利用毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表面展示系统将 CALB 锚定在毕赤酵母细胞表面,在此基础上,将高密度发酵得到的毕赤酵母发酵液通过冷冻离心和真空冷冻干燥制得全细胞冻干粉,用于非水相催化合成短链芳香酯,并从底物链长、酵母冻干粉添加量、底物浓度以及底物的摩尔比等方面对该全细胞催化剂在非水相中催化合成短链芳香酯的特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂为本实验室

自制,采用吸光光度法测定酶活力为 306.0 U/(g-dry cell); 己酸乙酯、乙酸正丁酯均为色谱纯,购于 PCA 公司; 正庚烷(色谱纯)、对硝基苯酚丁酸酯(pNPB)购于 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯,反应前先用 3 Å 分子筛除水。

1.2 实验方法

1.2.1 全细胞催化剂的制备

将发酵液在 4°C、7000 r/min 下离心 10 min,弃去上清,收集细胞,用 pH 8.0、50 mmol/L 的磷酸缓冲液清洗 2 次并重悬,真空冷冻干燥约 20 h,产品为微黄色、颗粒均匀的菌体粉。

1.2.2 CALB 酶活力的测定

采用吸光光度法测定脂肪酶活力^[11]。用 pH 6.5、50 mmol/L 磷酸缓冲液配制浓度为 2 mmol/L 的 pNPB 作为酶反应的底物,其中添加 0.5% 的 Triton X-100。在 0.5 mL 浓度为 2 mmol/L 的底物溶液中加入 0.5 mL 的适当浓度的酶粉重悬液,37°C 下反应一定时间,在 405 nm 处测定反应液的吸光值。每个样品均测定 3 个平行样,以不添加酶粉作空白对照。1 个酶活力单位定义为 1 min 内水解底物生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.3 酯化反应

在 50 mL 具塞三角瓶中加入一定量的正庚烷,分别加入底物酸和一定量的酵母冻干粉,于 55°C 的恒温摇床中预热 10 min,然后加入底物醇,在 55°C 摇床中继续反应,摇床转速为 200 r/min。当反应时间为 0.5 h 和 5 h 时,分别加入 0.6 g 和 0.3 g 3Å 分子筛,并定时(0.5 h、1.5 h、3 h、6 h、9 h)取样测定底物酸的转化率。

1.2.4 底物转化率和反应效率的计算

反应一定时间后,取出 150 μL 反应液置于 1.5 mL 离心管中,4°C、5000 r/min 离心 10 min,取上清 100 μL,用 10 mmol/L 的 NaOH 溶液滴定,消耗 NaOH 溶液体积为 V_1 ; 空白对照组,即只加底物与溶剂,不加入酶粉,用 10 mmol/L NaOH 溶液滴定,消耗 NaOH 溶液体积为 V_0 ,则:

$$\text{底物酸的转化率(Conversion)} = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100\%$$

$$\text{反应效率(Reaction efficiency)} = \frac{\text{底物酸的转化率} \times \text{底物酸的浓度}}{\text{反应时间}} \times 1000 \text{ mmol/(L}\cdot\text{h)}$$

1.2.5 气相色谱分析

采用安捷伦 7890A 气相色谱仪(氢火焰离子检测器, 0.25 mm×30 m 的 DB-FFAP 毛细管柱)。分析条件: 载气(N₂)流速 30 mL/min, 干燥空气流速 400 mL/min, 氢气流速 30 mL/min。柱温设定采用程序升温: 50°C 维持 1 min, 然后分别以 10°C/min、40°C/min、20°C/min、40°C/min 升温至 60°C、68°C、95°C、200°C, 200°C 维持 2 min。进样器与检测器温度都设为 250°C。乙酸正丁酯为内标, 内标法测定酯的含量, 每个样品重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同碳链长度的直链一元酸对酯合成的影响

在直接酯化反应中, 底物酸和底物醇的链长对酯的合成有十分显著的影响。本实验研究了不同的酰基供体的反应特性, 用乙酸(C₂)、丁酸(C₄)、己酸(C₆)、辛酸(C₈)、癸酸(C₁₀)分别与正丁醇进行酯化反应。反应体系共 10 mL, 加入酵母冻干粉 0.1 g, 溶剂为正庚烷, 酸和醇的浓度均为 0.4 mol/L, 结果如图 1 所示。

由图 1 可知, 从 C₂ 到 C₆, 反应速率逐渐升高; 从 C₆ 到 C₁₀, 反应速率逐渐降低, 但最大转化率基本相同。出现这种现象的原因可能是乙酸作为短链酸极性较大, 易形成亲水性界面, 夺取脂肪酶表面的

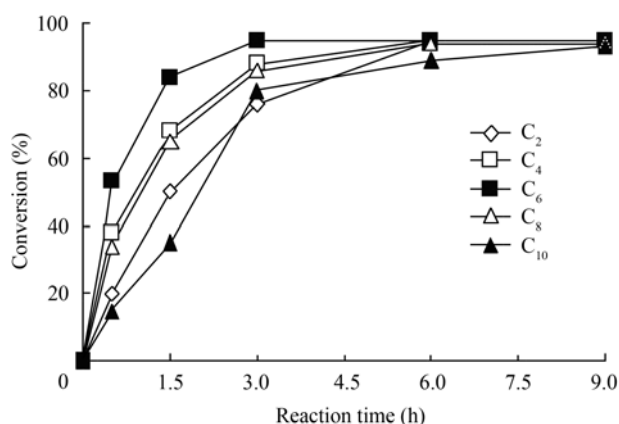


图 1 不同碳链长度的直链一元酸对酯合成的影响
Fig. 1 Effect of acid chain length on the esterification reaction.

必需水, 破坏了蛋白质的三维结构, 使酶失活^[12]; 从 C₂ 到 C₆, 分子极性变小, 对酶的抑制作用减弱; 但从 C₆ 到 C₁₀, 由于分子体积变大, 较难接近酶的活性中心, 又使得反应速率降低。

2.2 不同碳链长度的直链一元醇对酯合成的影响

选择己酸为酰基供体, 用乙醇(C₂)、丁醇(C₄)、己醇(C₆)、辛醇(C₈)分别与己酸进行酯化反应。反应体系共 10 mL, 加入酵母冻干粉 0.1 g, 溶剂为正庚烷, 酸和醇的浓度均为 0.4 mol/L, 结果如图 2 所示。

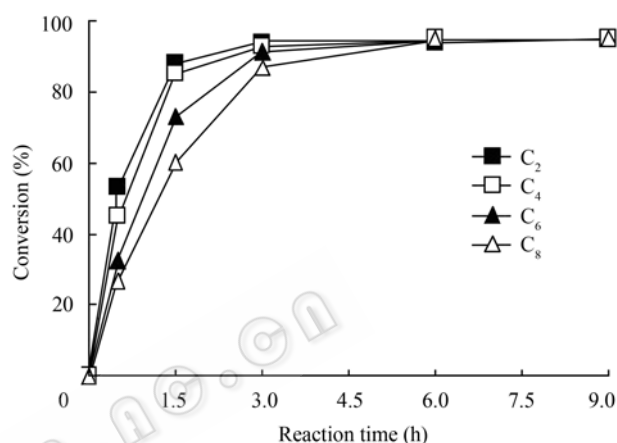


图 2 不同碳链长度的直链一元醇对酯合成的影响
Fig. 2 Effect of alcohol chain length on the esterification reaction.

由图 2 可知, 随着醇链长度的增加, 反应速率逐渐降低, 但最大转化率基本相同。尽管醇的极性变化规律与酸一样, 即乙醇相对丁醇、己醇和辛醇对酶应该表现出更强的抑制能力, 但事实上并没有出现如图 1 中先增大后减小的规律。这种现象可以用 CALB 的活性口袋理论来解释。在酶的立体结构中, 决定底物选择性的最重要因素是活性口袋的空间限制。X-结晶衍射研究表明, CALB 的活性口袋有两个凹槽: 一个接受酰基, 一个接受醇基。其中, 醇基凹槽比酰基凹槽狭窄得多, 造成 CALB 对醇的分子大小变化更为敏感, 使醇的分子体积成为主要限制因素^[13]。因此小分子醇更容易接近活性中心, 抵消了小分子醇的抑制作用。

2.3 醇结构对酯合成的影响

选择己酸为酰基供体, 用正丁醇、仲丁醇、叔丁醇分别与己酸进行酯化反应。反应体系共 10 mL, 加入酵母冻干粉 0.1 g, 溶剂为正庚烷, 酸和醇的浓度均为 0.4 mol/L, 结果如图 3 所示。

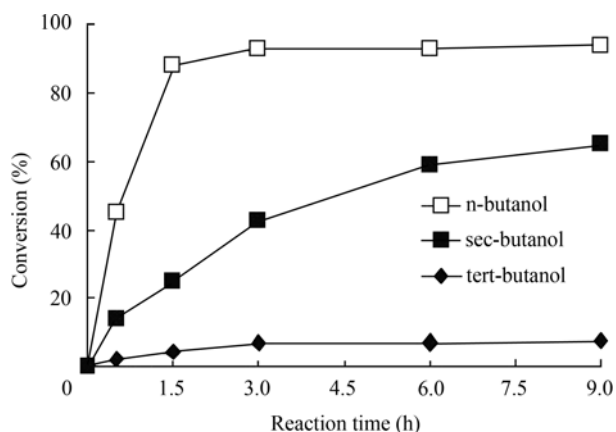


图3 羟基位置对酯合成的影响

Fig. 3 Effect of hydroxyl group position on the esterification reaction.

由图3可知,正丁醇的反应速率最大,1.5 h达到90%以上的转化率;仲丁醇9 h左右才达到最大转化率,为65%;而叔丁醇几乎不反应。这可能是由于仲丁醇和叔丁醇的羟基要到达活性中心,必须将分子主链进行一定的折叠,造成空间位阻的增大从而减慢了反应的进行。

2.4 酵母冻干粉的添加量对己酸乙酯合成的影响

根据以上结果,确定了己酸和乙醇为酶的最适底物。反应体系共10 mL,溶剂为正庚烷,己酸和乙醇的浓度均为0.4 mol/L,酵母冻干粉的添加量从5 g/L增加到30 g/L,结果如图4所示。

由图4可知,当酵母冻干粉的添加量从5 g/L增加到20 g/L,反应速率显著增大,达到最大转化率的时间从3 h减少到1.5 h,0.5 h的转化率从8%上升

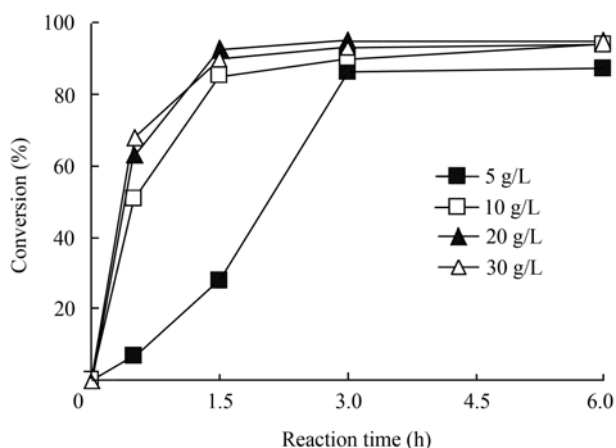


图4 酵母冻干粉的添加量对己酸乙酯合成的影响

Fig. 4 Effect of amounts of whole-cell biocatalyst on the synthesis of ethyl hexanoate.

到65%;当酵母冻干粉的添加量从20 g/L增加到30 g/L时,反应速率变化很小,若再增加酵母冻干粉的量会使成本增加,而且过多的酵母冻干粉会使传质阻力增大^[14],因此最适添加量为20 g/L。

2.5 底物浓度对己酸乙酯合成的影响

在考察酶的活性时,底物浓度的影响很重要。反应体系共10 mL,溶剂为正庚烷,己酸浓度从0.2 mol/L增加到1.0 mol/L,乙醇与己酸等摩尔量,酵母冻干粉添加量为0.2 g,图5为0.5 h时己酸的转化率和反应效率曲线。

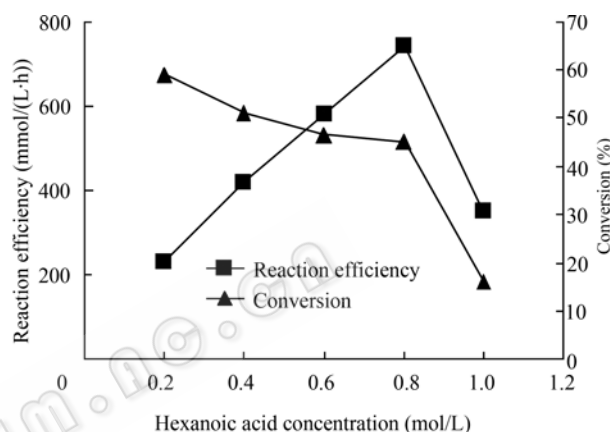


图5 己酸浓度对己酸乙酯合成的影响

Fig. 5 Effect of the substrate concentration on the synthesis of ethyl hexanoate.

由图5可知,随着己酸浓度的增大,0.5 h的转化率逐渐下降,特别是己酸浓度为1.0 mol/L时,转化率只有16.1%,说明在酯化反应中存在着底物抑制作用,这在本实验室以往研究中已经发现。但是随着反应的继续进行,最大转化率都能达到90%以上,说明酵母展示的CALB对高浓度的己酸有良好的耐受性。这可能是由于在有机溶剂中,酵母细胞的亲水性提供了合适的微环境来避免过量的极性底物破坏酶分子表面的微水层^[15]。

在实际生产中,更多时候是希望得到大量的产品。由于底物浓度不同,转化率不能反映己酸乙酯生成量的多少,这就有必要考察另外一个参数—反应效率。由图5可知,己酸浓度为0.8 mol/L时,转化率为46.2%,但是其反应效率高于其他浓度,达到740 mmol/(L·h),而且在0.8 mol/L的浓度下,反应1.5 h己酸也能达到最大转化率。故选择0.8 mol/L

作为反应的最适底物浓度。

2.6 酸醇摩尔比对己酸乙酯合成的影响

在酸过量的情况下进行酯化反应, 由于所得粗产品中有大量未反应完全的酸, 精制时很难彻底除去, 导致产品的酸值高, 达不到产品的质量要求。若增加碱洗工序, 又使下游工程的流程变长, 成本增加, 故酯化反应不宜采用酸过量。而且在本实验中, 己酸的价格要高于乙醇的价格, 为了尽可能地利用己酸, 在反应中采用乙醇过量。固定己酸浓度为 0.8 mol/L, 以不同的酸醇摩尔比进行反应。反应体系共 10 mL, 溶剂为正庚烷, 酸醇摩尔比从 1:1 变化到 1:2, 酵母冻干粉添加量为 0.2 g, 测定己酸的转化率, 结果见图 6。

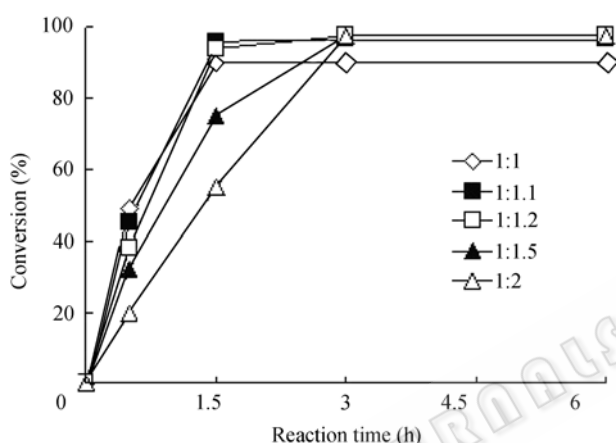


图 6 酸醇摩尔比对己酸乙酯合成的影响

Fig. 6 Effect of the molar ratio of hexanoic acid to ethanol on the synthesis of ethyl hexanoate.

由图 6 可知, 当酸醇摩尔比为 1:1 时, 反应速率最快, 但是此时的最大转化率只有 91.8%, 未能充分利用己酸; 当酸醇摩尔比增大到 1:1.1 时, 尽管反应速率略慢, 但是最大转化率达到 97.3%, 且仅需 1.5 h; 继续增大酸醇摩尔比, 反应速率明显变慢, 最大转化率虽然有所提高, 但提高很少, 而且过多的乙醇会增加精制工序的负担; 因此, 应将酸醇摩尔比控制在 1:1.1 左右。

3 讨论

利用酵母表面展示技术, 外源脂肪酶可借助锚定于细胞壁的载体蛋白固定在酵母细胞表面, 类似于酶的固定化^[16-17]。展示 CALB 的毕赤酵母全细胞

作为催化剂因以下几个方面的优势, 具有较大的工业化应用潜能。首先, CALB 对非水溶性和水溶性物质都有很强的催化活性, 近几年的研究表明, CALB 在酯化、水解、转酯以及其他类型反应中都表现出比其他脂肪酶更为出色的催化活性^[18]。其次, 毕赤酵母高密度发酵的工艺比较成熟, 易得到大量展示有 CALB 的酵母细胞发酵液, 经过冷冻干燥即得到全细胞催化剂。再次, 展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂具有固定化酶的优点, 操作稳定性好, 利于回收和重复利用, 能降低生产与应用的成本^[16-17]。

在已有的关于脂肪酶全细胞催化的报道中, 用于生物柴油的研究较多, 而合成短链芳香酯的报道较少。Xu 等^[14]以华根霉全细胞催化合成己酸乙酯, 0.5 mol/L 己酸, 反应 72 h 己酸达最大转化率(96.5%); 本实验室的 Han 等^[19]以展示 CALB 的酿酒酵母全细胞催化合成己酸乙酯, 0.2 mol/L 己酸浓度, 反应 12 h 己酸达最大转化率(98.2%)。而详细的关于展示酶的酵母全细胞催化合成多种短链芳香酯的可能性和反应特性至今尚无报道。

本研究对展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂在非水相中催化合成短链芳香酯的特性进行了研究, 发现该全细胞催化剂可催化合成近 10 种短链芳香酯, 其中乙酸丁酯、丁酸丁酯、己酸乙酯、己酸丁酯、己酸己酯、己酸辛酯、辛酸丁酯、癸酸丁酯 8 种酯的合成反应进行 6 h 后, 底物酸达到 90% 以上的转化率, 表明该全细胞催化剂的底物适应性较广。其中又以己酸乙酯的合成速率最快, 故确定己酸和乙醇为最适底物并对其合成条件进行了优化。当酵母冻干粉的添加量为 20 g/L、己酸浓度为 0.8 mol/L、酸醇摩尔比为 1:1.1 时, 反应 1.5 h 己酸转化率达到 97.3%。因此, 研究结果证实了展示 CALB 的重组毕赤酵母细胞不仅可在非水相中催化合成多种短链芳香酯, 更进一步提高了催化反应的速率和酶的底物耐受浓度。

展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂能在非水相中催化合成多种短链芳香酯, 合成活力较高。研究结果显示, 将脂肪酶展示在毕赤酵母表面实现“天然”固定化有望成为传统制备固定化酶的替代方法之一, 展示酶的全细胞催化反应的实现可为

CALB 的进一步商业化应用和开发提供基础和思路。

REFERENCES

- [1] León R, Fernandes P, Pinheiro HM, *et al.* Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **23**(7/8): 483–500.
- [2] Larios A, García HS, Oliart RM, *et al.* Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(4): 373–376.
- [3] Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, **9**(4/6): 113–148.
- [4] Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P, *et al.* Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1345**(2): 188–196.
- [5] De Oliveira PC, Alves GM, De Castro HF, *et al.* Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem Eng J*, 2000, **5**(1): 63–71.
- [6] Soares CMF, De Castro HF, De Moraes FF, *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **79**(1/3): 745–757.
- [7] Keeling-Tucker T, Rakic M, Spong C, *et al.* Controlling the material properties and biological activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organosilane and polymer doping. *Chem Mater*, 2000, **12**(12): 3695–3704.
- [8] Reetz MT, Zonta A, Simpelkamp J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **49**(5): 527–534.
- [9] Kato M, Fuchimoto J, Tanino T, *et al.* Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(3): 549–555.
- [10] Tanino T, Ohno T, Aoki T, *et al.* Development of yeast cells displaying *Candida antarctica* lipase B and their application to ester synthesis reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(6): 1319–1325.
- [11] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, *et al.* Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J Bacteriol*, 1991, **173**(15): 4836–4841.
- [12] Yang BH, Wu K, Cai JM, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl valerate in nonaqueous medium. *Food Ferm Ind*, 2005, **31**(4): 21–24.
杨本宏, 吴克, 蔡敬民, 等. 非水介质中脂肪酶催化合成正戊酸异戊酯的研究. *食品与发酵工业*, 2005, **31**(4): 21–24.
- [13] Orrenius C, Haeffner F, Rotticci D, *et al.* Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatal Biotransform*, 1998, **16**(1): 1–15.
- [14] Xu Y, Wang D, Mu XQ, *et al.* Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, **18**(1/3): 29–37.
- [15] Laane C, Boeren S, Vos K, *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**(1): 81–87.
- [16] Shiraga S, Kawakami M, Ueda M. Construction of combinatorial library of starch-binding domain of *Rhizopus oryzae* glucoamylase and screening of clones with enhanced activity by yeast display method. *J Mol Catal B: Enzym*, 2004, **28**(4/6): 229–234.
- [17] Shiraga S, Kawakami M, Ishiguro M, *et al.* Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4335–4338.
- [18] Huang DF, Pan ZY, Lin Y, *et al.* Properties of *Candida antarctica* lipase B displayed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mord Food Sci Technol*, 2008, **24**(7): 627–630.
黄登峰, 潘志友, 林影, 等. 酿酒酵母表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的酶学性质研究. *现代食品科技*, 2008, **24**(7): 627–630.
- [19] Han SY, Pan ZY, Huang DF, *et al.* Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole cells in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, **59**(1/3): 168–172.