DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2017.05.005

多酶偶联催化制备手性化合物(*S*)–环氧苯乙烷

朱利娟[1]， 胡 蝶[2]， 储亚琴[3]， 臧 嘉[2]， 余 涛[1]， 邬敏辰[*3]

(1. 江南大学 药学院,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214122;3. 江南大学 无锡医学院,江苏 无锡 214122)

摘要：在水/有机两相中将羰基还原酶 SyS1、葡萄糖 1–脱氢酶 SyGDH 和卤代醇脱卤酶 C SyHheC 偶联催化 α–溴代苯乙酮以高效制备(*S*)–环氧苯乙烷(SO)。第 1 步反应催化 α–溴代苯乙酮不对称还原为(*S*)–2–溴–1–苯基乙醇((*S*)–BPE) 及 NADPH 的原位再生,其优化的反应条件:100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0)/正己烷 (*V*:*V*=4:6)、40 mmol/L α–溴代苯乙酮、80 mmol/LD–葡萄糖、0.2 mmol/L $NADP^+$和 70 mg/mL *E. coli/Sygdh–Sys1* 湿菌体(共表达 SyGDH 和 SyS1),终体积 1.0 mL,35 ℃反应 8 h。第 2 步反应催化(*S*)–BPE 脱卤闭环为(*S*)–SO,其反应条件:在上述反应体系中加入磷酸钾缓冲液(pH 8.0) 和 0.3 U SyHheC,终体积 2.0 mL,35 ℃反应 30 min。通过连续 2 步酶催化反应,终产物(*S*)–SO 的摩尔产率为 99%、对映体过量值>99%。

关键词：多酶偶联;(*S*)–环氧苯乙烷;水/有机两相;不对称还原;脱卤闭环

中图分类号:Q 814.9　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2017)05—0473—06

Multi–Enzyme Cascade Catalysis for the Preparation of Chiral Compound(*S*)–Styrene Oxide

ZHU Lijuan[1]， *HU Die*[2]， *CHU Yaqin*[3]， *ZANG Jia*[2]， *YU Tao*[1]， *WU Minchen*[*3]

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In an aqueous/organic two-phase, cascade catalysis was carried out for the efficient preparation of (*S*)-styrene oxide (SO) by a combination of carbonyl reductase (SyS1), glucose 1-dehydrogenase (SyGDH) and halohydrin dehalogenase C (SyHheC). The firststep was to asymmetrically reduceα-bromoacetophenone into (*S*)-2-bromo-1-phenylethanol ((*S*)-BPE) and to regenerate NADPH *in situ*. The optimized conditions were 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 8.0)/n-hexane(v:v=4:6), 40 mmol/L α-bromoacetophenone, 80 mmol/L D-glucose, 0.2 mmol/L $NADP^+$ and 70 mg/mL wet *E. coli/Sygdh–Sys1* cells (co-expressing both SyGDH and SyS1) in a volume of 1.0 mL at 35 ℃ for 8 h. The second step was dehalogenation ring-closure of(*S*)-BPE into (*S*)-SO by adding potassium phosphate buffer (pH 8.0) and 0.3 U SyHheC into the above reaction

收稿日期：2015–06–03

基金项目：国家自然科学基金项目(31271811);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(SJLX–0529)。

* **通信作者**：邬敏辰(1962—),男,江苏无锡人,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程与基因工程研究。

E–mail:bioch@163.com

引用本文：朱利娟,胡蝶,储亚琴,等. 多酶偶联催化制备手性化合物(*S*)–环氧苯乙烷[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(05):473–478.

system, in a volume of 2.0 mL, at 35 ℃ for 30 min. Through two steps of enzyme catalysis, the final product (*S*)-SO was obtained with a molar yield of 99% and an enantiomeric excess value more than 99%.

Keywords: multi-enzyme cascade, (*S*)-styrene oxide, aqueous/organic two-phase, asymmetric reduction, dehalogenation ring-closure

对映纯环氧化物是一类高附加值的手性合成子或砌块,被广泛应用于药物、精细化学品、农药和功能性材料等的合成[1]。如(*S*)-环氧苯乙烷(styrene oxide,SO)可用于合成 α1-、β2-和 β3-肾上腺素能受体激动剂[2]、抗癌药物左咪唑[3]、抗艾滋病药物(-)-hyperolactone C 和杀虫剂硫磷嗪等[4-5]。(*R*)-或(*S*)-SO 的制备有化学法和生物法,每种方法又分为合成法和拆分法。化学合成或拆分法需使用较昂贵的金属催化剂,且存在摩尔产率和对映体过量(enantiomeric excess,e.e.)值低以及环境污染大等缺陷,从而限制了其工业化应用[2,6]。迄今为止,已有较多采用生物拆分法制备(*S*)-SO 的报道,但从外消旋体(*R*,*S*)-SO 中获得某种对映异构体的最大或理论摩尔产率仅为 50%[5]。近年来,采用生物合成法制备手性环氧化物已成为研究热点。Schrittwieser 等[7] 将短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 醇脱氢酶 LBADH 偶联分支杆菌 (*Mycobacterium* sp. GP1) 卤代醇脱卤酶 HheB 催化 α-氯代苯乙酮制备(*S*)-SO,其产率为 84%、e.e.值>99%。在现有报道中多以 α-氯代苯乙酮为底物制备(*S*)-SO[8-9],而以 α-溴代苯乙酮为底物的报道极少,其原因主要是后者在水中易分解[10]。另外,α-溴代与 α-氯代苯乙醇相比,溴基团比氯基团更易被氨基或其它亲核试剂取代,也更易形成环氧化物[11]。故采用 α-溴代苯乙酮为底物更具挑战性和应用价值。本研究中拟采用水/有机两相取代纯水相,探讨多酶偶联催化 α-溴代苯乙酮制备(*S*)-SO 的可行性。

作者所在实验室分别人工合成了 SyS1、SyGDH 和 SyHheC 基因 *Sys1*、*Sygdh* 和 *SyhheC*,并将它们在大肠杆菌中进行了表达[12-13]。为了高效制备(*S*)-SO,本研究中设计一种在水/有机两相体系中多酶偶联催化的方案(见图 1)。在第 1 步反应中,SyS1 催化 α-溴代苯乙酮不对称还原为 (*S*)-BPE,并借助 SyGDH 实现 NADPH 的原位再生。在第 2 步反应中,SyHheC 催化(*S*)-BPE 脱卤闭环为(*S*)-SO。同时,对影响(*S*)-BPE 和(*S*)-SO 摩尔产率的主要因素(如温度、有机溶剂、pH 值、底物浓度和湿菌体剂量等) 进行优化。

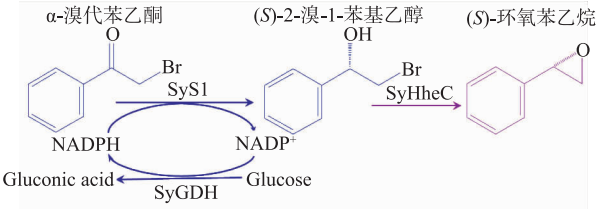


图 1 多酶偶联催化 α-溴代苯乙酮制备(*S*)-SO 流程

Fig. 1 Flow chart of multi-enzyme cascade catalysis for the preparation of (*S*)-SO from α-bromoacetophenone

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

共表达 SyGDH 和 SyS1(SyGDH/SyS1) 的 *E. coli/Sygdh-Sys1* 菌株及单表达 SyHheC 的 *E. coli/SyhheC* 菌株,由作者所在实验室构建和保藏。LB 培养基(w/v):10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物和 10 g/L NaCl(固体培养基添加 18 g/L 琼脂粉),pH 7.2。

1.2 主要试剂和仪器

NADPH 和 $NADP^+$,购自上海源叶公司;4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE),购自北京百灵威公司;α-溴代苯乙酮、(*R*)-和 (*S*)-BPE,购自上海安耐吉公司;(*R*,*S*)-和(*S*)-SO,购自上海萨恩公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。GC-2010 气相色谱仪,日本 Shimadzu 公司产品;手性气相色谱柱(CP-Chirasil-DEX CB,25 m×0.25 mm×0.25 μm),美国 Agilent 公司产品。

1.3 SyGDH/SyS1 和 SyHheC 的表达

将 *E. coli/Sygdh-Sys1* 和 *E. coli/SyhheC* 菌株分别接种于含终质量浓度为 100 μg/mL 氨苄青霉素和卡那霉素的 2 mL LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 培养过夜;再分别以 2 mL/dL 转接入 30 mL LB 培

养基中,培养至 OD_{600} 约为 0.8 时,加入 IPTG 至终摩尔浓度 0.6 mmol/L,26 ℃诱导表达 12 h。离心收集菌体,用 6 mL 磷酸钾缓冲液(20 mmol/L,pH 7.5)悬浮,冰浴超声波破细胞,上清液作为 SyGDH/SyS1 和 SyHheC 酶液。

1.4 分析方法

1.4.1 酶活性的测定 SyS1 活性测定参照文献[13]并略作修改。酶催化反应体系:100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)、2 mmol/L COBE、0.2 mmol/L NADPH 及适量 SyGDH/SyS1 酶液,终体积 220 μL,35 ℃反应 10 min,用酶标仪测定 OD_{340} 降低值。SyGDH 活性测定参照文献[12]。在上述反应条件下,每分钟氧化 1 μmol NADPH (SyS1) 或还原 1 μmol $NADP^+$(SyGDH) 所需的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。

SyHheC 活性测定参照文献[15]并略作修改。在 1.5 mL EP 管 A 和 B 中各加入 20 μL 200 mmol/L (*R*,*S*)-SO 溶液、330 μL 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)和 50 μL 600 mmol/L $NaNO_2$,35 ℃预热 5 min;在 A 和 B 管中分别加入 100 μL SyHheC 酶液和磷酸钾缓冲液,35 ℃反应 10 min;立即各加入 50 μL 50 mmol/L 对硝基苄基吡啶,80 ℃保温 10 min;迅速冷却至室温,各加入 500 μL 体积分数 50%三乙胺显色,用酶标仪测定 OD_{595} 值。在上述反应条件下,每分钟水解 1 μmol(*R*,*S*)-SO 所需的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。

1.4.2 温度对 SyS1 催化效率的影响 在 20~50 ℃下,按 1.4.1 方法测定 SyS1 活性,最高反应速率以相对酶活性 100%计。将 SyGDH/SyS1 酶液置于 25、35 ℃和 40 ℃下处理 6 h,每隔 1 h 取样,按 1.4.1 方法测定 SyS1 残余活性,未处理酶液的酶活性以 100%计。当残余酶活性大于 80%,即定义为热稳定。

1.4.3 酶对有机溶剂的耐受性 将 SyGDH/SyS1 和 SyHheC 酶液分别与各种有机溶剂按等体积混合,35 ℃、150 r/min 处理 1 h,离心取下层水相,按 1.4.1 方法测定残余酶活性,未处理酶液的酶活性以 100%计。当残余酶活性在 80%以上,表明有机溶剂对酶活性影响不显著。

1.4.4 气相色谱分析 酶催化反应液加入等体积乙酸丁酯(含 1 mL/L 正己醇作内标),混匀,8 000 r/min 离心,吸取 600 μL 上层有机相,无水硫酸镁干燥,过 0.22 μm 有机膜。样品分析采用 GC-2010 气相色谱仪、CP-Chirasil-DEX CB 手性气相色谱柱和氢火焰离子检测器(FID)。参数设置:进样口和检测器温度均为 220 ℃;色谱柱温度自 100 ℃以 10 ℃/min 升温至 200 ℃;载气为氮气,流量 3.0 mL/min,分流比 1:39。(*R*)-和(*S*)-SO、α-溴代苯乙酮、(*S*)-和(*R*)-BPE 的保留时间分别为 3.536、3.631、7.415、8.608 min 和 8.728 min。

$$摩尔产率=(S/B_0)\times100\% \quad (1)$$

$$e.e.值=[(S-R)/(S+R)]\times100\% \quad (2)$$

其中,*S* 和 *R* 分别代表(*S*)-和(*R*)-BPE 或(*S*)-和(*R*)-SO 的最终摩尔浓度,B_0 代表 α-溴代苯乙酮的初始摩尔浓度。

1.5 多酶偶联催化制备(*S*)-环氧苯乙烷

1.5.1 不对称还原反应的初始条件 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)/正己烷(v/v=4:6)、20 mmol/L α-溴代苯乙酮、80 mmol/LD-葡萄糖、0.2 mmol/L $NADP^+$和 60 mg/mL *E. coli/Sygdh-Sys1* 湿菌体(共表达 SyGDH 和 SyS1),终体积 1.0 mL,35 ℃、150 r/min 反应 10 h。

1.5.2 不对称还原反应条件的优化 基于 α-溴代苯乙酮不对称还原反应的初始条件,采用单因素试验拟对主要因素(pH 值、底物浓度、*E. coli/Sygdh-Sys1* 湿菌体剂量和反应时间)进行优化。酶催化反应液按 1.4.4 方法分析,以(*S*)-BPE 摩尔产率为指标。

1.5.3 脱卤闭环反应的条件 在上述优化的反应体系中添加磷酸钾缓冲液(pH 8.0)和 0.3 U SyHheC,终体积 2.0 mL,35 ℃反应 40 min。酶催化反应液按 1.4.4 方法分析,以(*S*)-SO 摩尔产率为指标。

2 结果与分析

2.1 温度对多酶偶联催化效率的影响

温度对酶催化反应具有双重作用,温度升高可加快酶催化反应速率,但温度过高又会引起酶蛋白变性失活。因此,在某一温度下多酶偶联催化效率的高低取决于各种酶在该温度下催化反应速率和热稳定性的综合平衡因素。按 1.4.2 方法分析了温度对 SyS1 催化效率的影响(见图 2)。由图 2(a)可见,SyS1 在 35~45 ℃范围内具有较高的催化反应速率。由图 2(b)可见,SyS1 在 35 ℃及其以下较稳定(残余酶活性>80%)。另据报道,SyGDH 和 SyHheC

的催化反应速率分别在 30~50 ℃和 35~50 ℃范围内较高,且两种酶均在 55 ℃及其以下(热处理 1 h)稳定[12-13]。综合考虑 SyS1、SyGDH 和 SyHheC 的催化反应速率和热稳定性，选择在 35 ℃进行多酶偶联催化,包括 α-溴代苯乙酮不对称还原及(*S*)-BPE 脱卤闭环。

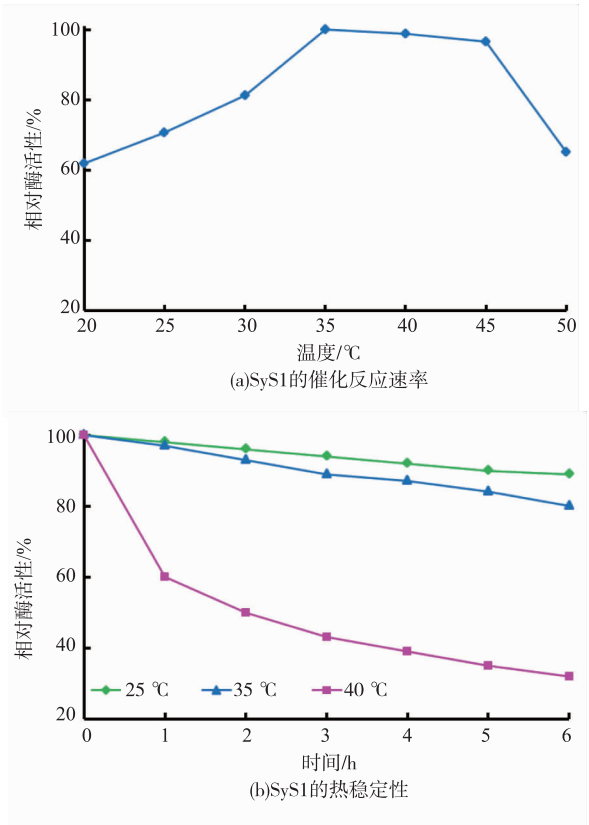


图 2　温度对 SyS1 催化效率的影响

Fig. 2　Effect of temperatures on the catalytic efficiency ofSyS1

2.2　水/有机两相中有机溶剂的选择

据文献报道,与 α-氯代苯乙酮不同,α-溴代苯乙酮在纯水相中不稳定，能自发产生 1-苯基-1,2-二醇和苯基乙醇等副产物[10],故在纯水相中催化 α-溴代苯乙酮不对称还原所获产物的纯度低。因此,选择合适的有机溶剂组成水/有机两相,是提高底物稳定性和产物纯度的关键。本研究中选取乙酸乙酯等 6 种常见的非极性有机溶剂与 SyGDH/SyS1 或 SyHheC 酶液等体积混合，分析有机溶剂对酶活性的影响(见图 3)。由图 3 可见:乙酸乙酯、乙酸丁酯和甲基叔丁醚显著能使 SyS1 变性失活（残余酶活性<20%)；正辛烷使 SyHheC 的残余酶活性<30%;正已烷和环己烷对 SyS1 和 SyHheC 活性的影响较小;SyGDH 对 6 种有机溶剂均有较强的耐受性（残余酶活性>70%)。综合考虑不同有机溶剂对 3 种酶的影响程度,选择正己烷组成水/有机两相(酶活性>80%）作为多酶偶联催化反应的有机相。

不同配比的水/有机两相对产物的回收率和酶的催化效率都有一定的影响。提高有机溶剂的比例,可以提高底物的稳定性和产物的回收率,但高浓度的有机溶剂对细胞有毒害作用,影响酶活性从而导致产率下降[12]。实验结果表明当缓冲液/正己烷体积比在 4:6 以下,产物的摩尔产率均>95%。综合考虑产物的回收率和酶的催化效率(为第 2 步脱卤闭环反应奠定基础)，因而选择缓冲液/正己烷的体积配比为 4:6。

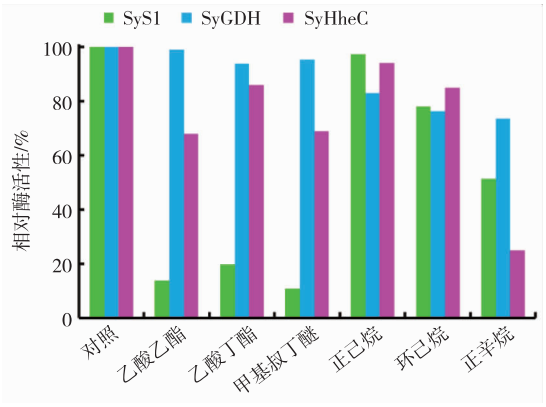


图 3　各种有机溶剂对酶稳定性的影响

Fig. 3　Effect of organic solvents on the enzyme stabilities

2.3　不对称还原反应条件的优化

2.3.1　底物浓度的影响　在 35 ℃、缓冲液/正己烷体积比为 4:6 的条件下，考察了不同初始摩尔浓度(10~60 mmol/L）的底物 α-溴代苯乙酮对不对称还原反应的影响(见图 4),结果表明,当底物浓度在 40 mmol/L 以下,(*S*)-BPE 摩尔产率均能达到 95%以上(e.e.值>99%);当底物浓度大于 40 mmol/L 时,摩尔产率下降较快,一方面可能是底物对酶的抑制作用,另一方面也可能是酶的催化中心达到饱和状态。最终催化反应底物的初始浓度定为 40 mmol/L。

2.3.2　pH 值的影响　反应体系的 pH 值通过影响酶活性中心氨基酸的解离状态,从而影响酶活性及催化效率。在上述条件(底物浓度 40 mmol/L,35 ℃,缓冲液/正己烷体积比为 4:6）下，考察了不同 pH(100 mmol/L,4.0~12.0)对反应的影响(见图 5)。结果表明,在 pH<6.0 和>9.0 时,(*S*)-BPE 摩尔产率降低较快;在 pH 6.0~9.0,摩尔产率>95%,e.e.值>99%

且保持不变。同时根据文献*[13]*研究,*SyHheC* 参与的第二步脱卤闭环反应的最适*pH* 范围是 *8.0~10.0*,最终选定催化反应的 *pH* 为 *8.0*。

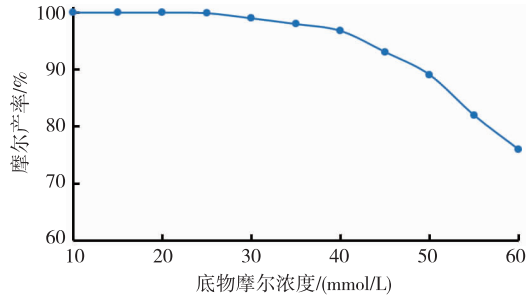


图 4　底物摩尔浓度对不对称还原反应的影响

Fig. 4　Effect of substrate concentrationson the asymmetric reduction reaction

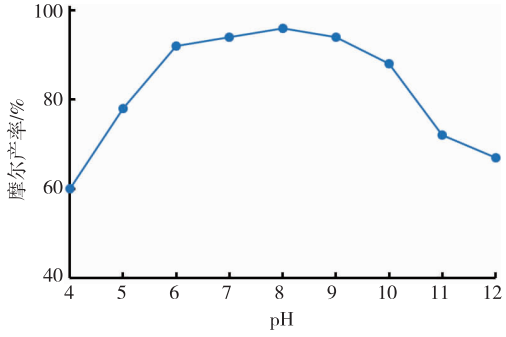


图 5　pH 值对不对称还原反应的影响

Fig. 5　Effect of pH values on the asymmetric reduction reaction

2.3.3　湿菌体剂量的影响　在上述优化的条件(底物浓度 40 mmol/L,35 ℃,缓冲液/正己烷体积比为 4:6,pH 8.0)下,考察不同质量浓度(50~100 mg/mL)的 *E. coli/Sygdh–Sys1* 湿菌体对反应的影响(见图 6),结果表明,菌体质量浓度在 50~70 mg/mL 时,(*S*)–BPE 摩尔产率随菌体质量浓度的增大而增大;在 70 mg/mL 时,摩尔产率达到最大值 99.1%。当菌体质量浓度大于 70 mg/mL 时,产率反而下降,原因可能是在一定范围内,催化体系中结合底物的酶分子活性位点随菌体浓度的增大而增大,但菌体浓度过多增大了反应体系的传质阻力使得底物分子与酶分子不能充分接触而降低催化效率,综合考虑选定湿菌体剂量为 70 mg/mL。

2.4　多酶偶联催化体系的反应进程

在底物 α–溴代苯乙酮摩尔浓度 40 mmol/L、35 ℃、缓冲液/正己烷体积比为 4:6、pH 8.0、*E. coli/Sygdh–Sys1* 湿菌体质量浓度为 70mg/mL 的条件下,

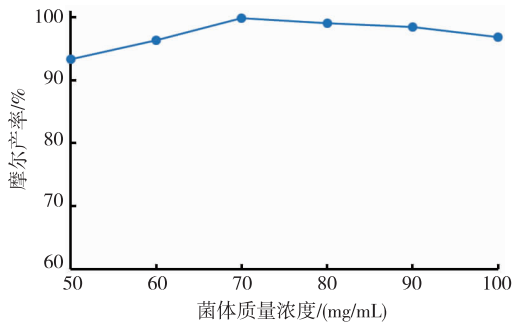


图 6　菌体质量浓度对不对称还原反应的影响

Fig. 6　Effect of cell concentrations on the asymmetric reduction reaction

第 1 步不对称还原反应的进程如图 7(a)所示,中间产物(*S*)–BPE 在反应 2 h 内生成的速度较快;2~8 h 内放缓,可能是随着反应的进行酶活性不断下降,且产物的积累对酶活性也有一定的抑制作用。8 h 时摩尔产率达到 99.1%,e.e.值>99%。随后,SyHheC 催化中间产物(*S*)–BPE 进行脱卤闭环合成终产物(*S*)–SO,第 2 步脱卤闭环反应进程如图 7(b)所示,在 20 min 内(*S*)–SO 迅速积累,30 min 时(*S*)–SO 的摩尔产率可达 99%且 e.e.值一直保持在 99%以上。

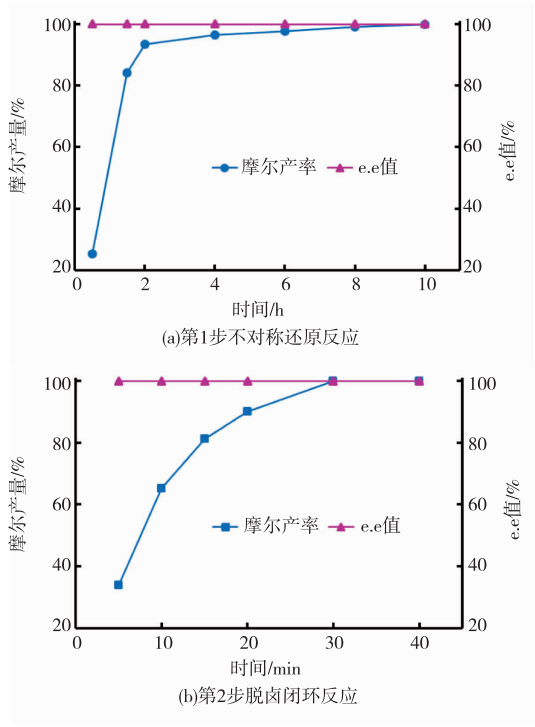


图 7　多酶偶联催化体系的反应进程

Fig. 7　Reactioncourses of the multi –enzyme cascade catalysis

3 结 语

本文作者在 SyGDH 催化葡萄糖提供辅酶循环的基础上，于水/有机两相中将 SyS1 和 SyHheC 偶联催化 α-溴代苯乙酮合成重要的手性药物中间体(*S*)-SO,并对其第 1 步不对称还原反应的条件进行了优化,较 Ren 等[11]报道的底物浓度提高 2.4 倍、时间缩短 6 h。研究表明在优化的催化反应条件下反应 8 h 后，添加 0.3 U SyHheC,35 ℃反应 30 min 后可得到终产物(*S*)-SO 的摩尔产率达 99%且 e.e.值>99%。实验结果说明所设计的水/有机两相中多酶偶联催化的体系可以将前手性酮转化为光学纯的药物中间体,具有原料经济,过程方便易行,产物摩尔产率大、高 e.e.值等优点,具有很大的应用价值,本研究也为多酶偶联催化反应体系合成手性药物中间体奠定了良好的基础。另外,多酶偶联催化反应体系中第 1 步不对称还原反应的催化时间(8 h)是第 2 步脱卤闭环反应(30 min)的 16 倍,下一步可以考虑通过理性改造 SyS1 以解除第 1 步限速反应,达到提高(*S*)-SO 生产效率的目的。

参考文献:

[1] CHOI W J. Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,84(2):239-247.

[2] HAMADA T,TORII T,IZAWA K,et al. Practical synthesis of optically active styrene oxides via reductive transformation of 2-chloroacetophenones with chiral rhodium catalysts[J]. **Organic Letters**,2002,4(24):4373-4376.

[3] MOERTEL C G,FLEMING T R,MACDONALD J S,et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma[J]. **The New England Journal of Medicine**,1990,322(6):352-358.

[4] HODGSON D M,MAN S. Synthesis of the anti-HIV agent (-)-hyperolactone C by using oxonium ylide formation rearrangement [J]. **Chemistry:A European Journal**,2011,17(35):9731-9737.

[5] WU S,LI A,CHIN Y S,et al. Enantioselective hydrolysis of racemic and *meso*-epoxides with recombinant *Escherichia coli* expressing epoxide hydrolase from *Sphingomonas* sp. HXN-200:preparation of epoxides and vicinal diols in high *ee* and high concentration[J]. **ACS Catalysis**,2013,3(4):752-759.

[6] KLUNDER J M,KO S Y,SHARPLESS K B. Asymmetric epoxidation of allyl alcohol:efficient routes to homochiral β-adrenergic blocking agents[J]. **Journal of Organic Chemistry**,1986,51(19):3710-3712.

[7] SCHRITTWIESER J H,LAVANDERA I,SEISSER B,et al. Shifting the equilibrium of a biocatalytic cascade synthesis to enantiopure epoxides using anion exchangers[J]. **Tetrahedron:*Asymmetry***,2009,20(4):483-488.

[8] SEISSER B,LAVANDERA I,FABER K,et al. Stereo-complementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides[J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**,2007,349(8/9):1399-1404.

[9] CHEN S Y,YANG C X,WU J P,et al. Multi-enzymatic biosynthesis of chiral β-hydroxy nitriles through co-expression of oxidoreductase and halohydrin dehalogenase[J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**,2013,355(16):3179-3190.

[10] ROCHA L C,FERREIRA H V,PIMENTA E F,et al. Biotransformation of α-bromoacetophenones by the marine fungus *Aspergillus sydowii*[J]. **Marine Biotechnology**,2010,12(5):552-557.

[11] REN J,DONG W Y,YU B Q,et al. Synthesis of optically active α-bromohydrins via reduction of α-bromoacetophenone analogues catalyzed by an isolated carbonyl reductase[J]. **Tetrahedron:Asymmetry**,2012,23(6):497-500.

[12] YU Tao,HU Die,WU Minchen,et al. Enzymatic characterization and coenzyme regeneration of a recombinant glucose 1-dehydrogenase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(9):910-916.(in Chinese)

[13] 冯峰. 卤代醇脱卤酶 SyHheC 的基因克隆、表达及应用研究[D]. 无锡:江南大学,2014.

[14] 宿宇宁. 双酶共表达重组菌不对称还原制备光学纯(R)-2- 羟基 -4- 苯基丁酸乙酯[D]. 无锡:江南大学,2013.

[15] TANG Yanfa,XU Jianhe,YE Qin. A spectrophotometric assay for determination of epoxide concentration and epoxide hydrolase activity[J]. **Journal of Analytical Science**,2002,18(2):142-144.(in Chinese)