• 研究论文 •

手性苄基甲基亚砜的氯过氧化物酶催化定向合成

汪丽敏^a 吴金跃^a 蒋育澄^{*,a,b} 胡满成^{a,b}
李淑妮^{a,b} 翟全国^{a,b}

(^a 陕西师范大学化学化工学院 西安 710062)

(^b 陕西师范大学大分子科学陕西省重点实验室 西安 710062)

摘要 基于氯过氧化物酶(CPO)对有机底物的手性识别功能,以 CPO 催化、叔丁基过氧化氢(TBHP)氧化甲基苄基硫醚合成手性 *R*-苄基甲基亚砜,并在反应体系中引入多羟基化合物及季铵盐提高了目标产物的产率;反应主要受体系的 pH 值、氧化剂类型、反应时间、氧化剂/底物摩尔比,以及 CPO 用量等因素控制。引入多羟基化合物(甘油, PEG400, PEG600)时, *R*-苄基甲基亚砜的产率及 *ee* 值可分别达到 65.5% 和 96.3%;而引入季铵盐(TEABr, TPABr, TBABr)时,其产率提高到 78.2%~68.5%, *ee* 值为 95.4%~94%。UV-vis 及荧光光谱分析表明反应体系中引入少量添加剂时 CPO 活性中心的血红素辅基暴露程度增加,底物容易接近,同时 CPO 的 α -螺旋结构得以加强,从而有效改善了 CPO 的催化性能。与目前的合成方法相比, CPO 酶促氧化制备手性 *R*-苄基甲基亚砜高效、定向,酶用量极少,具有一定的产业化应用潜能。

关键词 氯过氧化物酶; 手性苄基甲基亚砜; 定向磺化氧化; 多羟基化合物; 季铵盐

Asymmetry Synthesis of Chiral Sulfoxide Catalyzed by Chloroperoxidase

Wang, Limin^a Wu, Jinyue^a Jiang, Yucheng^{*,a,b} Hu, Mancheng^{a,b}
Li, Shuni^{a,b} Zhai, Quanguo^{a,b}

(^a School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

(^b Key Laboratory of Macromolecular Science of Shaanxi Province, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract Benzyl alkyl sulfide was turned into chiral *R*-sulfoxide using chloroperoxidase (CPO)-catalyzed oxidation of (TBHP) based on CPO's chiral recognition to organic substrate. The yield of aim products was enhanced by the introduction of polyhydroxy compound and quaternary ammonium salt. The reaction was mainly controlled by factors such as pH, oxidants, reaction time, molar ratio of oxidant/substrate, and CPO consumption. The sulfoxide yield and enantiomeric excess (*ee*) reached 65.5% and 96.3% when polyhydroxy compounds (glycerol, PEG400 or PEG600) were introduced into reaction system. The yield and *ee* of 78.2%~68.5% and 95.4%~94% were obtained when quaternary ammonium salt (TEABr, TPABr or TBABr) was introduced. UV-vis and fluorescence spectrum assay indicated that it was easier for CPO to bind with the substrate because the introduction of above additives would intensify the exposure of heme. Moreover, it was also favorable for CPO catalytic performance due to the improvement of α -helix structure of CPO. Compared to those reported methods, the preparation of chiral sulfoxide catalyzed by CPO was very efficient. CPO consumption was very small which would ensure its potential application in industry.

Keywords chloroperoxidase; chiral sulfoxide; enantio-sulfoxidation; polyhydroxy compound; quaternary

* E-mail: jyc@snnu.edu.cn

Received June 21, 2011; revised September 2, 2011; accepted October 20, 2011.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20876094) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. GK201001005).

国家自然科学基金(No. 20876094)及中央高校基本科研业务费专项资金(No. GK201001005)资助。

ammonium salt

光学纯的亚砷类化合物具有良好的手性传递能力, 在手性药物制备和新型手性催化剂的开发等领域具有广泛而重要的应用价值, 如以奥美拉唑(Esomeprazole)为代表的一系列的质子泵抑制剂, 都是手性杂环亚砷类化合物, 在2004年全球畅销药物中名列第5位, 销售额高达43亿美元; 自Corey把手性亚砷应用于美登素的全合成后, 手性亚砷就被广泛运用于各种天然产物的全合成, 以及重要手性氨基酸类及手性胺类等化合物的合成^[1-4]. 此外, 手性亚砷及其衍生物近年来发展迅速, 并成为一类新型的手性催化剂和配体, 被广泛用于不对称烯丙基化、Diels-Alder环加成和氢化等反应, 如对甲基苄基亚砷首次被作为催化剂来促进烯丙基三氯硅烷与亚胺的加成反应^[5]; 亚磺酰基亚胺已经发展成易制和高效的手性配体, 例如双亚磺酰基亚胺 BISOX₂ 在杂Diels-Alder反应取得很好的光学活性(98%)^[6].

本文基于氯过氧化物酶(CPO)对有机底物的手性识别功能, 选用甲基苄基硫醚为原料, 叔丁基过氧化氢(TBHP)为氧化剂, CPO酶催化氧化一步反应制备手性(R)-苄基甲基亚砷(25 °C), 考察了反应时间、pH值、氧化剂种类、氧化剂/底物配比、酶用量以及引入少量多羟基化合物聚乙二醇(PEG400, PEG600)、甘油及季铵盐(TEABr, TPABr, TBABr)时对目标产物的产率及对映选择性的影响, 探讨了催化反应历程; 并通过紫外可见光谱(UV-vis)和荧光光谱分析, 研究了添加剂存在时CPO的结构及构象变化, 以解析添加剂对此酶促反应的增敏作用. 与已报道的苄基甲基亚砷的制备方法相比^[7-11], 此酶促反应高效、定向, 对映选择性 ee 可达95%以上(文献报道皆低于70%), 产率达到78.2%.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

真菌 *Caldariomyces fumago* 的培养及氯过氧化物酶的提纯主要参照CPO的发现者Hager等^[12]报道的方法, 但对于酶的粗提纯阶段做了改进, 以丙酮代替甲醇进行沉淀. 所提取的酶溶液浓缩至15.2 mg/mL置于4 °C冷柜保存, 2-氯-5,5-二甲基-1,3-环己二酮(MCD)活性分析^[13]表明其酶活力为7500 U/mL, 纯度达到 $R_z=1.21$ ($R_z=A_{398}/A_{280}=1.44$ 视为纯酶).

甲基苄基硫醚(分析纯)、正己烷(色谱纯)、正丙醇(色谱纯)、乙酸乙酯(分析纯)、石油醚(分析纯)、甘油、聚乙二醇400、聚乙二醇600、四乙基溴化铵(TEABr)、四丙基溴化铵(TPABr)、四丁基溴化铵(TBABr)等化学试剂

均购自国药集团化学试剂有限公司和上海成捷化学有限公司.

实验中用到的主要仪器包括: 高效液相色谱仪(LC-20 AT, 岛津公司); 手性柱(AD-H, 0.46 cm×25 cm, 日本DAICEL公司); 超导傅立叶数字化核磁共振谱仪(AVANCE 300 MHz, Bruker公司); Agilent1100-Esquire 6000型液相色谱-质谱联用仪(德国Bruker); UV-1700型紫外可见分光光度计(岛津公司); 荧光分光光度计(PE-LS55, 美国PE公司); PHS-25数显pH计(上海精密科学仪器有限公司); 旋转蒸发器(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂); 真空干燥箱(D2-1A型, 天津泰斯特仪器有限公司).

1.2 方法

1.2.1 酶催化反应

在50 mL的样品管中依次加入0.05 mol·L⁻¹的柠檬酸盐缓冲液、甲基苄基硫醚8 mmol、氯过氧化物酶(CPO) 0.25 μmol、过氧化氢(H₂O₂)或叔丁基过氧化氢(TBHP) 12 mmol, 使总体积为30 mL, 用恒温磁力搅拌器, 在25 °C及固定转速下恒温磁力搅拌, 其反应式如图1所示. 采用TLC对反应进行跟踪, 展开剂为 V (乙酸乙酯): V (石油醚)等于1:6, 反应一定时间后加入无水Na₂SO₃使反应停止, 然后用60 mL CH₂Cl₂萃取3次, 合并有机相, 再加入一定量的无水Na₂SO₄干燥, 最后通过柱色谱对产物进行分离纯化, 得到白色固体, 称其质量.

图1 CPO催化甲基苄基硫醚磺化氧化

Figure 1 Sulfoxidation of benzyl alkyl sulfide catalyzed by CPO

1.2.2 产物表征及产率计算

取一定量产物分别用于¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)和¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃)分析, 以确定产物结构; 另取一定量的产物配成溶液, 以高效液相色谱求产物的对映体过量.

定性分析: 色谱条件分离条件: 流动相为: V (正己烷): V (异丙醇)=80:20; 流速0.60 mL/min, 柱温为25 °C, 检测波长254 nm; 进样量10 μL. 以苯作内标物对其进行定量分析.

反应的收率和对映体选择性分别定义为:

收率:

$$C_i = \frac{m_i}{m} \cdot 100\% = \frac{m_{\text{内标}}}{m} \cdot f_i' \cdot \frac{A_i}{A_{\text{内标}}} \cdot 100\%$$

$$m_i = f_i \cdot A, \quad m_{\text{内标}} = f_{\text{内标}} \cdot A_{\text{内标}}$$

$$m_i = \frac{f_i}{f_{\text{内标}}} \cdot \frac{A_i}{A_{\text{内标}}} \cdot m_{\text{内标}} = f_i' \cdot \frac{A_i}{A_{\text{内标}}} \cdot m_{\text{内标}}$$

对映选择性:

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 产物分析

甲基苄基硫醚酶催化氧化产物的¹H和¹³C核磁共振检测结构如下:¹H NMR: 化学位移 δ_{H1}=2.48 (s, 3H), δ_{H2}=3.951 (s, 2H), δ_{H3}=7.330~7.237 (m, 5H), 其积分比为 δ_{H3}:δ_{H2}:δ_{H1}=5:2:3, 由此可得出化合物中氢的个数为10个, 与产物相符;

¹³C NMR: 化学位移 δ₁=36.777, δ₂=59.764, δ₃=129.149~127.526, 其实测值与理论值(δ_a=38.0, δ_b=60.6, δ_c=130.1~127.5)基本相符。

产物质谱图(ESI-MS)见图2, 其分子离子峰(M+Na)⁺的质荷比(*m/z*)为177, 去掉一个钠原子(*M*_{Na}=23)后, MS检测到的质荷比*m/z*=154, 与苄基甲基亚砜分子量相吻合, 证实主产物为苄基甲基亚砜。图中*m/z*为178, 179的分子是*m/z*=177的同位素。

图2 CPO酶促磺化氧化产物的质谱图

Figure 2 Mass spectrum of the product from sulfoxidation catalyzed by CPO

产物经高效液相色谱分析(HPLC)及旋光性检测确定其构型为*R*-苄基甲基亚砜。综合以上光谱表征的结果, 证明所合成的产物为手性苄基甲基亚砜; 此外HPLC-MS分析表明反应的主要副产物为过度氧化产生的砷。

2.2 影响因素及条件优化

2.2.1 氧化剂的选择

制备过程中分别尝试了以过氧化氢和叔丁基过氧化氢作为氧化剂。反应体系中加入两者的量相同, 但加入方式不同: H₂O₂是先经过稀释, 然后再分次滴加; 而TBHP则采用一次性加入, 其磺化氧化反应的结果如表1所示。从表中可以看出当以TBHP作氧化剂时*R*-苄基甲基亚砜的收率和*ee*值分别为57.3%和91.7%; 而以H₂O₂作氧化剂时, 不管其产率还是*ee*值都相对较低。这主要是由于以下几个方面的因素造成的: (1)高浓度H₂O₂导致酶活性降低是血红素过氧化物酶普遍存在的问题, 原因是羟氧自由基对卟啉环及其周围氨基酸残基的氧化损伤^[14,15]; (2) H₂O₂容易把亚砜进一步氧化为砷, 从而导致目标产物收率降低, 而TBHP则可以避免因浓度较大或加入速度过快而导致CPO失活, 同时还对亚砜产物有一定的稳定作用; (3)体系中少量的叔丁醇有助于甲基苄基硫醚溶解在体系中, 使其与酶分子有效接触。因此本文采用TBHP作为氧化剂。

图3 CPO酶促磺化氧化产物的HPLC分析图谱

Figure 3 HPLC spectrum of the product from sulfoxidation catalyzed by CPO

表1 氧化剂对亚砜化反应的影响

Table 1 The influence of oxidants on sulfoxide reaction

氧化剂	硫醚/mmole	pH	CPO/ μ mol	转化率	产率/%	ee/%
TBHP	8	5	0.15	>98%	57.3	91.7
H ₂ O ₂	8	5	0.15	>98%	49.5	90.2

2.2.2 酶用量

R-苄基甲基亚砜的收率随着CPO用量的增加逐渐提高(图4A), 当体系中CPO的量达到0.15 μ mol时苄基甲基亚砜的收率达到57.3%, 之后继续增加CPO的用量时, 苄基甲基亚砜的收率基本趋于平缓。综合考虑反应的经济性, 最佳酶用量选用0.15 μ mol。

2.2.3 缓冲溶液 pH

如图4B所示, 当pH小于5时, 随着pH值的增大,

图4 反应体系条件考察(A) CPO 用量, (B) 缓冲体系 pH, (C) 氧化剂/底物用量比, (D) 反应时间

Figure 4 Investigation of effects on sulfoxidation catalyzed by CPO. (A) consumption of CPO, (B) pH of buffer, (C) molar ratio of oxidant/substrate, (D) reaction time

亚砷产物的收率和 *ee* 值逐渐增大, 反应体系的最佳 pH 对应于 5, 此时收率与 *ee* 值达到最大, 分别为 57.3% 和 91.7%.

pH 值也是影响此酶促反应的一个重要因素. pH 值往往通过影响酶表面的离子状态及活性中心微环境调控酶的活性, 例如 Chang 等^[16] 发现, pH 值由 7 变为 10 时, 会导致辣根过氧化物酶(HRP)的催化中间体 compound II 中卟啉铁的第六配体的键长改变. CPO 稳定存在的适宜 pH 范围在 4.5~5.5, 与此酶促磺化氧化所需的 pH 值吻合.

2.2.4 氧化剂与底物用量比

本文还考察了 TBHP 用量对磺化氧化反应的影响, 其结果如图 4C 所示. 甲基苄基硫醚的转化率及苄基甲基亚砷的收率随着 TBHP 与底物用量比的增加而逐渐增大, 当氧化剂用量与底物的比为 1.5 : 1 时, 其硫醚转化率已基本完全, 同时苄基甲基亚砷的收率和 *ee* 值分别达到了 57.3% 和 91.7%, 继续增大氧化剂用量, 甲基苄基硫醚的转化率基本不变, 但目标产物产率反而降低, 这有可能是产物被进一步氧化为砷导致的; 另一方面, CPO 是一种不耐有机溶剂的亲水性酶蛋白, TBHP 量过

多时, 也使反应体系中的有机溶剂的含量增多, 引起酶中蛋白表面构象发生变化. 为此在本实验中, 氧化剂的最佳用量为 $n(\text{氧化剂}) : n(\text{底物}) = 1.5 : 1$.

2.2.5 反应时间

如图 4D 所示, 底物甲基苄基硫醚的转化率及产物苄基甲基亚砷的收率都随着反应时间的延长而逐渐增高, 30 h 时硫醚的转化已基本完全, 亚砷产物的收率达到 57.3%. 此后如果反应继续进行, 产率开始下降, 这是由于亚砷被进一步氧化为砷所导致.

2.3 添加剂效应

为了进一步提高目标产物的产率及对映选择性, 本文基于 CPO 的结构特点, 筛选了两类添加剂, 通过溶剂工程改善酶的催化性能, 优化反应体系.

2.3.1 多羟基化合物

反应体系中引入多羟基化合物(甘油、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600)时, 亚砷产物的收率及对映选择性均有所提高, 这种提高作用与添加剂浓度高度相关, 经考察其最佳浓度分别在 0.06, 0.1, 0.06 mol/L 附近. 如图 5 所示, 加入甘油的效果最好, 收率和 *ee* 值分别达到了 65.5% 和 96.3%.

图5 添加剂对磺化氧化反应的影响

Figure 5 Effect of additives on the sulfonated oxidation

多羟基化合物的作用可能主要体现在以下两个方面: 首先通过与酶蛋白表面的氨基酸残基形成氢键, 有助于强化蛋白表面的“溶剂层”, 这种溶剂层与整体水相不同, 对维持酶的催化构象起着一定的作用; 同时水、油两亲性的 PEG 分子还具有憎水基团, 这些憎水基团连接到蛋白质的疏水区域而起到了稳定酶的作用。

2.3.2 季铵盐

反应体系中加入季铵盐(TEABr, TPABr, TBABr)时, 产物 *R*-苄基甲基亚砜的收率都较在缓冲溶液中的高, 添加剂的最佳浓度均在 0.05 mol/L 左右, 如图 5 所示, 加入 TEABr 的效果最好。推测原因有可能是季铵盐与 CPO 疏水性底物通道某些位点上氨基酸残基之间的非特定相互作用, 增强了周围的疏水性环境, 从而有利于疏水性有机底物的通过; 但由于底物通道埋在 CPO 分子内部, 疏水链较长的季铵盐不容易接近^[17], 从结果来看, TEABr 的链长比较匹配, 作为添加剂时反应效果最理想, *R*-苄基甲基亚砜的收率提高到 78.2%, *ee* 值达到 95.4%。

为了进一步解析引入季铵盐提高 CPO 催化性能的结构因素, 本文通过 UV-vis 光谱及荧光光谱分析, 探讨了添加剂存在时 CPO 的活性中心微环境及蛋白构象。如图 6A 所示: CPO 在 398 nm 处的 Soret 吸收带, 是由血红素辅基的卟啉环的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的^[18], 引入添加剂时, Soret 带的峰位没有移动, 但吸收强度略有增强, 其中加入 TEABr 时强度最大; 同时在其它波长处未有新峰出现。这表明季铵盐没有引起 CPO 活性中心血红素辅基的脱落, 也没有新的酶-季铵盐配合物产生^[19], 即活性中心结构没有发生明显变化, 季铵盐只是对其周围环境产生了微扰, 使得深埋于分子内部的活性中心域相对于蛋白表面更加暴露, 因而更有利于底物接近活性中心。

荧光光谱法具有较高的灵敏度, 是研究生物大分子

图6 引入添加剂时的 CPO 结构的谱学分析: (A) UV-vis 光谱, (B) 荧光光谱

Figure 6 The structure of CPO in the presence of additives: (A) UV-vis spectrum, (B) fluorescence

和各种有机、无机小分子与之相互作用的重要手段。荧光特征峰的位移和强度的变化, 可以提供蛋白质分子中荧光生色基团所处的微环境、蛋白质分子构象变化等许多的有用信息。CPO 活性中心的铁卟啉环被认为是非荧光活性的, 酶蛋白的内源性荧光主要来自分子中的三个生色团: 色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)残基。其中由于能量的传递和转移, 蛋白质荧光主要表现为色氨酸荧光。以 278 nm 激发, CPO 的荧光发射峰出现在 335 nm 处。图 6B 表明, 引入季铵盐时, CPO 的荧光发射峰位没有发生移动, 说明分子中的肽链没有出现解螺旋现象; 但荧光强度都比在纯缓冲溶液中强, 这有可能是色氨酸周围的酪氨酸和苯丙氨酸的荧光量子转移造成的, 这说明酶蛋白分子的 α -螺旋结构得以加强, 这对 CPO 保持催化活性所需的构象无疑是十分有利的。

2.4 CPO 催化磺化氧化机理

CPO 酶催化 TBHP 磺化氧化硫醚的反应机理如图 7 所示, 该反应始于 TBHP 分子的异裂, 此过程需要来自血红素的两个电子转移(一个来源于静态 CPO 中的 Fe^{3+} , 另一个来源于血红素辅基的卟啉), 形成一分子叔丁醇和化合物 I, 即所谓的 compound I, compound I 是血红素

图 7 CPO 催化硫醚磺化氧化反应历程

Figure 7 Mechanism of sulfide sulfoxidation catalyzed by CPO

过氧化物酶催化反应典型的中间体,它是一个高铁(IV)卟啉自由基阳离子 $[\text{Fe(IV)=O}\cdot]^+$,极不稳定,具有很强的氧化性。当底物为硫醚时,硫醚作为电子给体,按线路(b)将 compound I 自由基阳离子还原至静态 CPO,同时硫醚中硫原子得到一个氧而被氧化为亚砷^[20]。

3 结论

CPO 酶催化、TBHP 氧化甲基苄基硫醚, 一步反应制备(R)-苄基甲基亚砷可以获得理想的光学异构体产物, 与已有报道相比, 对映选择性大大提高; 同时反应时间大为缩短, 反应体系中酶用量极少, 因而具有一定的产业化应用潜能。

筛选到两类添加剂可有效提高目标产物的产率。引入多羟基化合物(聚乙二醇 PEG400、PEG600 或甘油)时, *R*-苄基甲基亚砷的产率可提高到 65.5%, *ee* 值为 96.3%, 以甘油效果最好; 当引入季铵盐(TEABr, TPABr 或 TBABr)时, 其产率最高提高到 78.2%, *ee* 值达到 95.4%。结构分析及 UV-vis 和内源性荧光等图谱表征说明反应体系中引入添加剂时, CPO 的血红素辅基暴露程度增加, 底物容易接近活性中心; 同时 CPO 的 α -螺旋结构得以加强, 从而有效提高了产物收率。

References

- 1 Fernández, I.; Khiar, N. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3651.
- 2 Li, L.; Shi, J. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1745.
- 3 Jacobsen, E. N.; Paltz, A.; Yamamoto, H. *Comprehensive Asymmetric Catalysis I-III*, Springer, Heidelberg, **1999**, p. 1178.

- 4 Li, S. K.; Bai, D. L. *Prog. Chem.* **2001**, *13*, 351 (in Chinese).
(李树坤, 白东鲁, 化学进展, **2001**, *13*, 351.)
- 5 Kobayashi, S.; Ogawa, C.; Konihi, H.; Suqiura, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6610.
- 6 Bolm, C.; Simic, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3830.
- 7 Andersson, M. A.; Allenmark, S. G. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15293.
- 8 Holland, H. L.; Brown, F. M.; Larsem, B. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1561.
- 9 Pitchen, P.; Duñach, E.; Deshmukh, M. N.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8188.
- 10 Brink, H. B.; Holland, H. L.; Schoemaker, H. E.; Lingen, H.; Wever, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4563.
- 11 Pasta, P.; Carrea, G.; Holland, H. L.; Dallavalle, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 933.
- 12 Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763.
- 13 Hager, L. P.; Morris, D. R.; Brown, F. S.; Eberwein, H. J. *Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1769.
- 14 Park, J. B.; Clark, D. S. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 1190.
- 15 Ayala, M.; Batista, C. V.; Vazquez-Duhalt, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 63.
- 16 Chang, C. S.; Yamazaki, I.; Sinclair, R.; Khalid, S.; Powers, L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 923.
- 17 Sundaramoorthy, M.; Terner, J.; Poulos, T. L. *Structure* **1995**, *3*, 1367.
- 18 Egawa, T.; Proshlyskov, D. A.; Miki, H.; Makino, R.; Ogura, T.; Kitagawa, T.; Ishimura, Y. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 46.
- 19 Jiang, T. J.; Ji, X. S.; Yuan, Z. Y. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **1998**, *30*, 132 (in Chinese).
(蒋太交, 吉鑫松, 袁中一, 生物化学与生物物理学报, **1998**, *30*, 132.)
- 20 Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 554.

(A1106212 Lu, Y.)