

阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用

曾薇, 陈洪章

中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

摘要: 利用阿魏酸酯酶, 水解天然木质纤维素原料中半纤维素与木质素之间的阿魏酸酯键, 从破坏两者共价键连接的角度, 探索阿魏酸酯酶促进纤维素酶水解汽爆稻草中纤维素的可行性。结果显示, 当阿魏酸酯酶加入量为 240 mu/g 底物、水解 72 h 时, 汽爆稻草纤维素的酶解率、不溶性底物失重率较不加阿魏酸酯酶分别增加了 32.00%、32.77%; 阿魏酸酯酶(300 mu/g 底物)作用 120 min 后, 纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率、不溶性底物失重率分别增加了 29.85%、32.48%。通过比较不同酶法处理后的汽爆稻草的可及度和红外光谱图发现, 阿魏酸酯酶能有效地水解原料中的酯键, 提高原料可及度 50% 以上。由此表明, 阿魏酸酯酶和纤维素酶之间存在较大的协同作用, 添加阿魏酸酯酶能够提高纤维素酶对天然木质纤维素的酶解效率。

关键词: 阿魏酸酯酶, 纤维素酶, 汽爆稻草, 协同作用

Synergistic effect of feruloyl esterase and cellulase in hydrolyzation of steam-exploded rice straw

Wei Zeng, and Hongzhang Chen

National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Ferulic acid esterase (FAE) was used to hydrolyze feruloyl ester linkages between hemicellulose and lignin in natural lignocellulose, and the possibility of FAE accelerating cellulase to hydrolyze steam-exploded rice straw by breaking covalent linkages was studied. When the dosage of FAE was 240 mu/g substrate, the cellulose conversion rate and the weight-loss rate of insoluble substrate at 72 h were respectively 32.00% and 32.77%, more than without using FAE; Cellulose conversion rate and the weight-loss rate of insoluble substrate were respectively 29.85% and 32.48% with FAE (300 mu/g substrate) processing time of 120 min. By comparison of the accessibility and FT-IR spectra of lignocellulosic material treated by different enzyme methods, it indicated that FAE hydrolyzed some ester bonds within it, and improved the accessibility by over 50%. It is concluded that FAE and cellulase have great synergistic effect, and FAE can help cellulase hydrolyze natural lignocellulose and enhance hydrolytic efficiency.

Keywords: ferulic acid esterase, cellulose, steam-exploded rice straw, synergistic effect

在天然木质纤维素原料的结构中, 纤维素是被半纤维素和木质素包裹在里面的^[1]。纤维素酶不能充分、有效地吸附到纤维素上是酶解效率不高的一

个重要原因^[2]。阿魏酸是植物界普遍存在的一种酚酸, 主要与细胞壁多糖和木质素交联构成细胞壁的一部分^[3]。在天然木质纤维素原料中, 阿魏酸以单体

Received: April 21, 2008; Accepted: July 14, 2008

Supported by: the National Science and Technology Support Program of China (No. 2007BAD39B01).

Corresponding author: Hongzhang Chen. Tel/Fax: +86-10-82627067; E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD39B01)资助。

或者二聚体的形式分别通过醚键和酯键与细胞壁中的木质素和半纤维素相连接,以结合状态存在于其中^[4]。阿魏酸酯酶(Feruloyl esterase, E.C. 3.1.1.73, FAE)又称为肉桂酸酯酶,是一种羧酸酯水解酶^[5]。当其作用于天然木质纤维素原料时,可以水解阿魏酸与半纤维素之间的酯键,将阿魏酸从植物细胞壁中游离出来,从而破坏细胞壁的骨架结构,使得原料结构疏松^[6]。这样,各种胞壁降解酶更易吸附在底物上,从而提高天然木质纤维素原料的降解率。

近几年,关于纤维素酶与其他酶协同作用的研究主要是集中在它与半纤维素酶、木质素酶、脂肪酶或淀粉酶协同酶解,提高其酶解效率方面。关于纤维素酶与阿魏酸酯酶协同作用的研究比较少,仅有 Yu PQ 等^[7]在研究纤维素酶水解燕麦麸制备低聚糖时发现,添加阿魏酸酯酶后,还原糖产率有较大的提高。

本研究以汽爆稻草为底物,研究了阿魏酸酯酶对纤维素酶水解汽爆稻草的影响,以期能够利用阿魏酸酯酶来提高纤维素酶对天然木质纤维素原料的酶解效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 汽爆稻草

将干稻草切至 10~15 cm,每 150 g 加水 150 mL,搅拌均匀,装入汽爆罐中,通入蒸汽,待排出罐内冷空气后,关闭装料阀,升压到 1.7 MPa,维持压力 4 min,打开放料阀,瞬间减压释放即得汽爆稻草。

1.1.2 纤维素酶

购自上海丽珠东风生物技术有限公司的固体 *Trichoderma viride* 纤维素酶粉,用 pH 4.5(0.2 mol/L)的醋酸缓冲溶液配制成纤维素酶溶液。采用 Ghose TK 的方法^[8]和董国强的方法^[9]分别测定纤维素酶溶液的纤维素酶活和木聚糖酶活。纤维素酶活力单位定义为:每分钟产生 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量为一个酶活力国际单位。木聚糖酶活力单位定义为:每分钟产生 1 μmol 木糖所需要的酶量为一个酶活力国际单位。

1.1.3 阿魏酸酯酶

实验中采用的阿魏酸酯酶是利用自筛黑曲霉菌种(*Aspergillus niger* WH-4)发酵所得^[10]。

1) 阿魏酸酯酶粗酶液的制备:取培养后的固态发酵曲,加 10 倍于固体培养基的水,28 $^{\circ}\text{C}$,160 r/min 摇床浸提,8 层纱布过滤,滤液于 10 000 r/min 离心 20 min。将上清液经 Donaghy JA 的方法^[11]进行精制提纯,即得阿魏酸酯酶粗酶液。

2) 酶活的测定:以去淀粉麦麸为底物,采用 Topakas E 的方法^[12]测定上述粗酶液的阿魏酸酯酶活。酶活力单位定义为:每分钟产生 1 μmol 阿魏酸所需要的酶量为一个酶活力单位。

采用 Ghose TK 的方法^[8]和董国强的方法^[9]分别测定上述阿魏酸酯酶粗酶液的滤纸酶活和木聚糖酶活。酶活力单位定义同纤维素酶样品的测定。

1.2 酶解实验方法

1.2.1 阿魏酸酯酶及其加入量对纤维素酶水解汽爆稻草的影响

取汽爆稻草 5 g,加入 10 IU FPA/g 底物的纤维素酶液,再加入适量的阿魏酸酯酶液,然后用 pH 4.5 醋酸缓冲液将体系补充至 50 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中酶解一定时间。

1.2.2 阿魏酸酯酶作用时间对纤维素酶水解汽爆稻草的影响

取汽爆稻草 5 g,先加入 300 mu/g 底物的阿魏酸酯酶液,再用 pH 4.5 醋酸缓冲液将体系补充至 50 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中作用不同的时间。然后沸水浴 5 min 使酶失活,冷却到室温后再加入 10 IU FPA/g 底物的纤维素酶液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中酶解 72 h。

1.3 分析方法

1.3.1 酶解液还原糖含量的测定

将样品稀释一定倍数后,采用 DNS 法测定^[13]。

1.3.2 不溶性底物失重率的测定

不溶性底物失重率的测定采用称重法。

失重率(%)=[(样品起始绝干质量-样品最终绝干质量)/样品起始绝干质量]×100%

1.3.3 原料酶解前后组分含量的测定

根据 Van Soest 方法^[14]的原理,结合王玉万改进方法^[15]测定样品中纤维素、半纤维素、Klason 木质素和酸不溶灰分的含量。

1.3.4 纤维素酶解转化率(即纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率)的计算

汽爆稻草水解过程中,反应液中残留的纤维素

含量可用测得的还原糖量间接估算^[16]为, $[S_t]=[S_0]-0.9[RS]$, 其中: $[S_t]$ 是酶解时间为 t 时纤维素的理论残留量(g/L); $[S_0]$ 是纤维素的初始含量(g/L); $[RS]$ 是还原糖浓度(g/L)。

纤维素的酶解量 $[Y]$ (g/L)为, $[Y]=[S_0]-[S_t]$ 。纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率为 $[Y]/[S_0] \times 100\%$ 。

1.3.5 纤维素原料可及度的测定

通过碘吸附值(V_{IS})和水吸附保持值(V_{WR})来表征纤维素原料的可及度^[17]。

碘吸附值按照 GB/T12496.8-1999 测定。一定量的试样与碘液充分振荡吸附后, 过滤分离, 滤液用硫代硫酸钠溶液滴定, 求出每克试样吸附碘的毫克数。

水吸附保持值采用离心法^[18]测定, 水吸附保持值(V_{WR})为:

$$V_{WR} = \frac{W - D}{D} \times 100\%$$

其中, W 为离心后纤维素试样湿重; D 为试样干重。

1.3.6 原料 FT-IR 红外结构分析

原料经过不同酶处理后, 对其进行红外吸收光谱分析。红外光谱分析在 American Pekin-Elmer System 2000 上进行测试, 以 KBr 进行加载, 扫描范围: $4000 \sim 370 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描 10 次进行光谱累加, 环境气氛为空气。

2 结果与讨论

2.1 阿魏酸酯酶对纤维素酶水解汽爆稻草的影响

经测定得到, 纤维素酶酶液的酶活力指标为: 滤纸酶活(Filter paper activity, FPA)为 100 IU/mL, 羧甲基纤维素酶(CMCase)活力为 5465 IU/mL, β 葡萄糖苷酶(β -glucosidase, β -Gase)活力为 42 IU/mL, 棉花酶(Cotton lyase, C_1)活力为 10 IU/mL, 木聚糖酶活为 0.1 IU/mL; 阿魏酸酯酶粗酶液的阿魏酸酯酶酶活为 150 mU/mL, 滤纸酶活和木聚糖酶活均小于 0.05 IU/mL。比较实验中纤维素酶酶液与阿魏酸酯酶酶液的加入量可知, 纤维素酶酶液中的木聚糖酶活与阿魏酸酯酶粗酶液中的滤纸酶活和木聚糖酶活对实验结果没有明显的影响, 可以忽略不计。

考察了阿魏酸酯酶对纤维素酶酶解汽爆稻草的整个过程的影响。其中, 阿魏酸酯酶添加量为 300 mU/g 底物, 每隔 12 h 取样测定。

纤维素酶对底物汽爆稻草纤维素的酶解率的变化见图 1, 不溶性底物失重率的变化如图 2 所示。

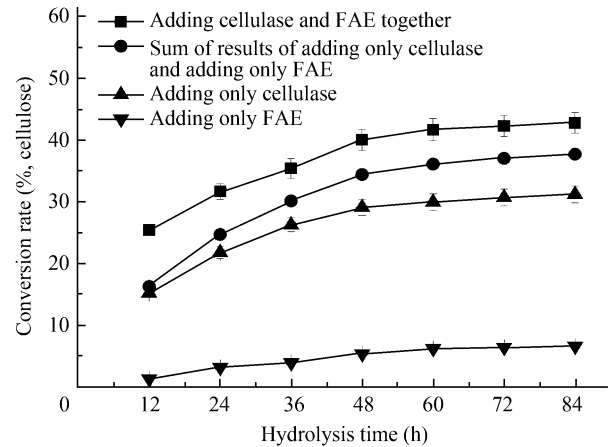


图 1 阿魏酸酯酶对纤维素酶降解汽爆稻草纤维素的影响
Fig. 1 Effect of FAE on the hydrolysis of cellulose in steam-exploded rice straw by cellulase.

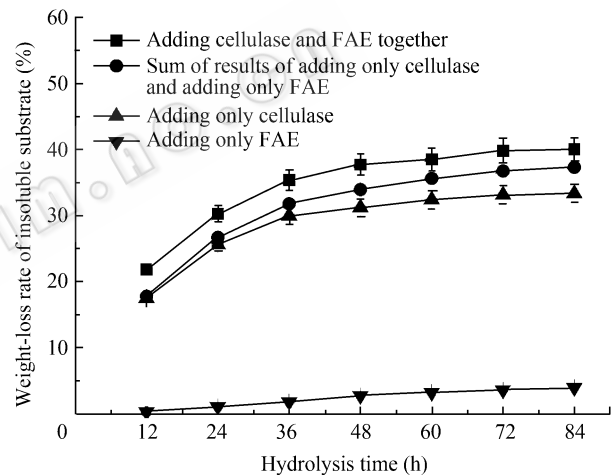


图 2 阿魏酸酯酶与纤维素酶共同作用下汽爆稻草不溶性底物失重率的变化

Fig. 2 Variation of the weight-loss rate of insoluble substrate in steam-exploded rice straw after hydrolyzing by FAE and cellulase together.

由图 1 和图 2 可以看出, 在酶解 0~48 h 区间, 汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率都在显著增加; 酶解 48~84 h 时, 两者的增加趋于平缓。酶解 84 h 时, 双酶共同作用的原料中, 纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率分别为 42.69% 和 40.03%, 比纤维素酶单独作用时增加了 37.27% 和 20.07%, 比阿魏酸酯酶单独作用时增加了 5.54 倍和 9.06 倍。

从图 1 和图 2 中还可看出, 双酶同时作用时的纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物

失重率明显高于两种酶分别单独作用时的效果之和。这表明阿魏酸酯酶对纤维素酶解的促进作用并不是两种酶单独作用效果的简单加和,而是二者在酶解过程中相互促进的协同作用。阿魏酸酯酶先将原料中木质素与阿魏酸之间的酯键打开,从而破坏木质素与半纤维素的连接,然后被木质素和半纤维素包裹的纤维素就显露出来,使得纤维素酶就更容易吸附到纤维素上,发生酶解作用^[7]。

酶解过程中半纤维素含量随酶解时间的变化情况如图 3 所示。

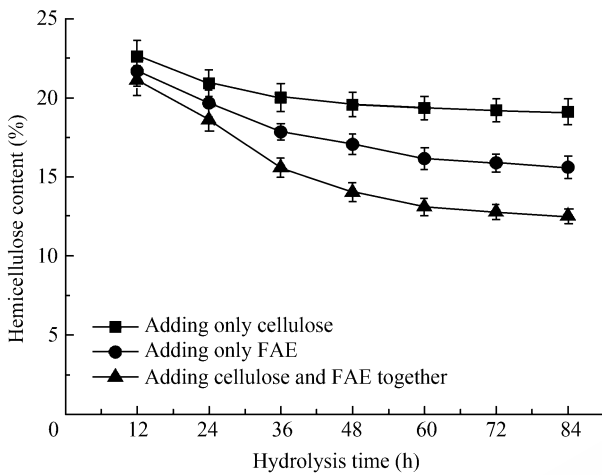


图 3 原料中半纤维素含量随酶解时间的变化
Fig. 3 Variation of the hemicellulose content.

酶解 0~48 h 时,半纤维素含量在显著降低;酶解 48~84 h 时,降低趋于平缓。酶解 84 h 时,双酶共同作用的原料中,半纤维素含量为 12.51%,比纤维素酶单独作用时低了 34.50%,比阿魏酸酯酶单独作用时低了 19.43%。纤维素酶单独作用时,酶解残渣的半纤维素含量高于阿魏酸酯酶单独作用时的酶解残渣的半纤维素含量。这可能是因为,阿魏酸酯酶可以打开半纤维素和木质素之间的酯键连接,所以它对半纤维素的降解大于纤维素酶。

2.2 阿魏酸酯酶加入量对纤维素酶酶解汽爆稻草的影响

酶解 72 h 后,进行了取样测定。阿魏酸酯酶的加入量对汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率的影响如图 4 所示。

随着阿魏酸酯酶的加入量增加,汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率逐渐升高;当阿魏酸酯酶的加入量为 240 mu/g 底物时,纤维素的酶解

率和不溶性底物失重率分别为 39.72%、36.71%,比不加阿魏酸酯酶时提高了 32.00%和 32.77%;但是当加入量在 240 mu/g 底物以后继续增加时,变化趋势平缓,这可能是由于阿魏酸酯酶加入量为 240 mu/g 底物时,加入的阿魏酸酯酶的量已经趋于饱和,所以再继续添加阿魏酸酯酶时,其作用就逐渐变缓了。

以上结果说明阿魏酸酯酶能够促进纤维素酶对原料的降解,释放还原糖。

2.3 阿魏酸酯酶作用时间对纤维素酶酶解汽爆稻草的影响

阿魏酸酯酶作用时间对纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率的影响如图 5 所示。

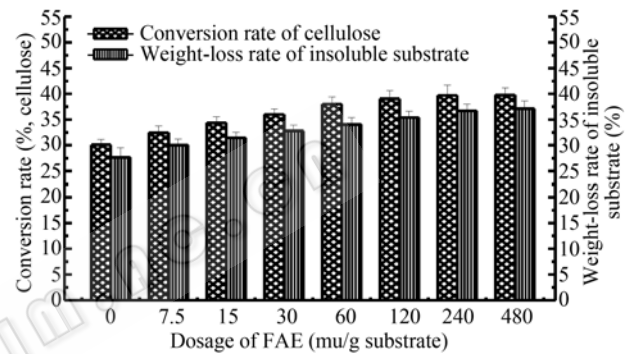


图 4 阿魏酸酯酶加入量对汽爆稻草纤维素酶解率和不溶性底物失重率的影响

Fig. 4 Effect of the dosage of FAE on cellulose conversion rate and weight-loss rate of insoluble substrate.

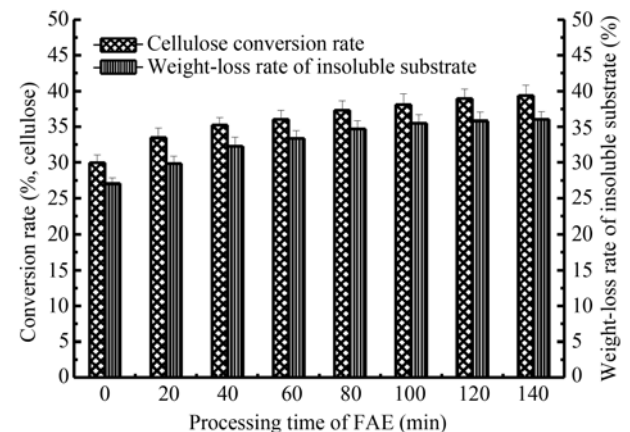


图 5 阿魏酸酯酶作用时间对纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率和不溶性底物失重率的影响

Fig. 5 Effect of the processing time of FAE on cellulose conversion rate of steam-exploded rice straw by cellulase and weight-loss rate of insoluble substrate.

由图 5 的结果可以看出,在阿魏酸酯酶作用一

段时间后, 添加的纤维素酶对汽爆稻草纤维素的酶解率以及引起的不溶性底物失重率随着阿魏酸酯酶作用时间的增加而逐渐升高。当阿魏酸酯酶的作用时间为 120 min 时, 原料中的纤维素酶解率和不溶性底物失重率分别为 38.93% 和 35.81%, 比作用 0 min 时分别提高了 29.85% 和 32.48%; 但是当作用时间在 120 min 以后继续增加时, 变化趋势平缓。

上述结果表明, 通过用阿魏酸酯酶对原料进行预处理, 能够使原料的结构变得更加疏松, 纤维素酶则更容易吸附在底物上, 促进了原料的降解和还原糖的释放。

2.4 阿魏酸酯酶对原料可及度的影响

经过不同的酶法处理, 原料的 V_{IS} 和 V_{WR} 变化如表 1 所示。

表 1 的结果说明, 阿魏酸酯酶协同纤维素酶酶解之后的汽爆稻草的 V_{IS} 和 V_{WR} 分别提高了 50.19% 和 50.00%, 比纤维素酶单独处理后的原料的 V_{IS} 和 V_{WR} 分别提高了 22.92% 和 15.66%。这可能是由于经过阿魏酸酯酶处理的原料, 其半纤维素和木质素之间的酯键连接被打开, 使原料结构变得疏松, 减弱了原料中木质素和半纤维素对纤维素的屏蔽作用, 从而使汽爆稻草的可及度增加。

2.5 原料 FT-IR 红外结构分析

阿魏酸酯键的特征峰主要是 1700 cm^{-1} 左右的羰基振动^[19]。从图 6 中可以看出, 经过不同酶法处理的原料结构存在着差异, 主要表现在 1700 cm^{-1} 处酯键的特征吸收峰的变化(图中箭头所指)。经纤维素酶处理的汽爆稻草, 其酯键的羰基吸收峰较未处理的汽爆稻草变化不大, 但是经过纤维素酶和阿魏酸酯酶协同处理的原料, 其酯键的羰基吸收峰有明显减弱。这说明阿魏酸酯酶水解了原料中的阿魏酸酯键, 从而使羰基振动减弱。

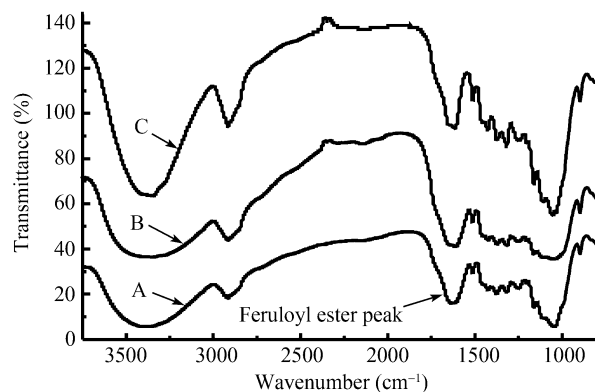


图 6 原料经过不同酶法处理后的红外光谱图

Fig. 6 FT-IR spectra of cellulosic materials treated by different enzyme methods. A: steam-exploded rice; B: steam-exploded rice straw hydrolyzed by 10 IU FPA/g substrate of cellulase; C: steam-exploded rice straw hydrolyzed by 10 IU FPA/g substrate of cellulase and 300 μg substrate of FAE.

3 结论

纤维素与纤维素酶的相互作用是酶被底物分子所吸附, 然后进行酶解催化。因此, 如何提高纤维素与纤维素酶的可及度和有效接触面积, 是提高纤维素酶作用效率的关键。

本实验结果表明, 阿魏酸酯酶和纤维素酶同时作用时, 阿魏酸酯酶对纤维素酶解的促进作用并不是两种酶单独作用效果的简单加和, 而是二者在酶解过程中相互促进的协同作用。通过红外光谱对汽爆秸秆结构变化进行分析表明, 阿魏酸酯酶先将原料中木质素与阿魏酸之间的酯键打开, 在一定程度上破坏半纤维素和木质素之间的连接, 然后被木质素和半纤维素包裹的纤维素就显露出来, 提高天然木质纤维素原料的可及度, 使更多的纤维素酶进入原料内部, 吸附在纤维素成分上, 发生水解作用, 从而提高纤维素酶的酶解效率。这对于利用酶解后的还原糖进一步发酵具有积极意义。

表 1 原料经不同酶法处理后 V_{IS} 和 V_{WR} 的变化

Table 1 V_{IS} and V_{WR} change of cellulosic materials treated by different enzyme methods

Sample material	V_{IS}	V_{IS} improve extent (%)	V_{WR}	V_{WR} improve extent (%)
Steam-exploded rice straw	59.42 ± 2.08		0.64 ± 0.02	
Steam-exploded rice straw hydrolyzed by 10 IU FPA/g substrate of cellulase	72.6 ± 2.18	22.18	0.83 ± 0.03	29.69
Steam-exploded rice straw hydrolyzed by 10 IU FPA/g substrate of cellulase and 300 μg substrate of FAE	89.24 ± 2.77	50.19	0.96 ± 0.03	50.00

REFERENCES

- [1] Chen HZ. Cellulose Biotechnology. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
陈洪章. 纤维素生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Chen HZ, Xu J, Yao JZ, *et al.* Studies on multi-level conversion of liquid fuel with straw. *Chin J Bioproc Eng*, 2005, **3**(1): 9–13.
陈洪章, 徐建, 姚建中, 等. 秸秆分层多级转化液体燃料新工艺的研究进展. *生物加工过程*, 2005, **3**(1): 9–13.
- [3] Ou SY, Kwok KC. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agr*, 2004, **84**(11): 1261–1269.
- [4] Saulnier L, Jean-François T. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran. *J Sci Food Agr*, 1999, **79**(3): 396–402.
- [5] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem*, 2007, **42**(4): 497–509.
- [6] Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2004, **24**(2): 59–83.
- [7] Yu PQ, Mckinnon JJ. Enzymic release of reducing sugars from oat hulls by cellulase, as influenced by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase. *J Agr Food Chem*, 2003, **51**(1): 218–223.
- [8] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257–268.
- [9] Dong GQ, Zhang MB, Lin KJ. Measure hemicellulase activity by DNS chromogenic reaction. *J Zhejiang Agri Sci*, 1989, **2**: 88–89.
董国强, 张孟白, 林开江. 半纤维素酶的DNS液显色法测定. *浙江农业科学*, 1989, **2**: 88–89.
- [10] Wang HC, Chen HZ. Screening of high producing-feruloyl esterases strain and study on its solid state fermentation conditions. *Food & Ferm Indu*, 2007, **33**(4): 11–14.
王洪川, 陈洪章. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其固态发酵的研究. *食品与发酵工业*, 2007, **33**(4): 11–14.
- [11] Donaghy JA, Bronnenmeier K, Soto-Kelly PF, *et al.* Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *J Appl Microbiol*, 2000, **88**(3): 458–466.
- [12] Topakas E, Kalogeris E, Kekos D, *et al.* Production and partial characterisation of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochem*, 2003, **38**(11): 1539–1543.
- [13] Liu LY. The fractionation of straw and its high value conversion. Ph. D Dissertation. Institute of Process Engineering, CAS, 2006.
刘丽英. 秸秆组分分离及其高值化转化的研究. 中国科学院过程工程研究所博士学位论文, 2006.
- [14] Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agricultural Handbook No. 379. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington DC, 1970: 1–20.
- [15] Wang YW, Xu WY. Quantitative analysis method of hemicellulose, cellulose, and lignin in lignocellulose after fermentation. *Microbiology*, 1987, **14**(2): 81–84.
王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序. *微生物学通报*, 1987, **14**(2): 81–84.
- [16] Shen Y, Sun K. Study on the relationship between cellulose weight loss and reducing sugar amount of enzyme hydrolysis solution. *Dyeing & Finishing*, 1999, **25**(7): 10–13.
沈勇, 孙凯. 纤维减量率与酶解液中还原糖量的相关性研究. *印染*, 1999, **25**(7): 10–13.
- [17] Su MY, You LL, Gao G, *et al.* The effect of liquid ammonia pretreatment on the accessibility and carboxymethylation reactivity of cotton linter cellulose. *J Cellu Sci Tech*, 1998, **6**(3): 44–51.
苏茂尧, 由利丽, 高洸, 等. 液氨预处理对纤维素可及度和反应性的影响. *纤维素科学与技术*, 1998, **6**(3): 44–51.
- [18] Dean WL, Ferguson GN. US patent, C08b, 3589364. 1969-09-10.
- [19] Topakas E, Vafiadi C, Stamatis H, *et al.* *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme Microb Tech*, 2005, **36**(5): 729–736.