

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20180723.002

邱杰,刘玉婷,陈钰泉,等. 酶形式差异的三酶系统一步法转化头孢菌素 C 制备 7-氨基头孢烷酸[J]. 广西科学,2018,25(4):438-443.

QIU J,LIU Y T,CHEN Y Q,et al. Study on the one-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid by different enzyme forms of tri-enzymatic system[J]. Guangxi Sciences,2018,25(4):438-443.

酶形式差异的三酶系统一步法转化头孢菌素 C 制备 7-氨基头孢烷酸*

Study on the One-Pot Conversion of Cephalosporin C to 7 - Aminocephalosporanic Acid by Different Enzyme Forms of Tri-Enzymatic System

邱杰¹,刘玉婷¹,陈钰泉¹,廖威²,袁晶¹,谭强^{1**}

QIU Jie¹,LIU Yuting¹,CHEN Yuquan¹,LIAO Wei²,YUAN Jing¹,TAN Qiang¹

(1. 广西中医药大学药学院,广西南宁 530001;2. 广西职业技术学院食品与生物技术系,广西南宁 530226)

(1. Institute of Pharmacy,Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning,Guangxi,530001,China;2. The Food and Biotechnology,Guangxi Vocational and Technical College,Nanning,Guangxi,530226,China)

摘要:【目的】对酶形式差异的三酶系统一步法裂解头孢菌素 C(CPC)制备 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)进行研究。【方法】对重组大肠杆菌分别进行摇瓶和发酵罐高密度表达,获得最高酶活后使用两个形式差异的三酶系统一步法转化 CPC 制备 7-ACA。【结果】相较于摇瓶发酵,发酵罐发酵获得的酶活更高,发酵罐上对重组大肠杆菌的高密度表达发现,补料流加总量为 400 mL 的甘油混合液(15%甘油+7.5%鱼蛋白胨,W/V),发酵 72 h 后菌浓度达到 32.79 g/L、最高的戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶(GA)和过氧化氢酶(CAT)活力分别为 7 099.85 U/L 和 15 776.20 U/L。利用一个三酶系统包括固定化 D-氨基酸氧化酶(DAAO)、游离 GA 和 CAT,一步法催化 CPC 获得的 7-ACA 生成率为 87.28%;而另一个三酶系统包括固定化 DAAO、冻融细胞 GA 和 CAT 一步法催化 CPC 获得的 7-ACA 生成率为 87.10%。【结论】两种酶形式差异的三酶系统一步法制备 7-ACA 的得率大致相等。GA 对 α -酮己二酰-7-氨基头孢烷酸(AKA-7-ACA)的特异性和水解能力较差,限制了该工艺运用。

关键词:三酶系统 D-氨基酸氧化酶 戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶 过氧化氢酶 7-氨基头孢烷酸

中图分类号:Q81 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)04-0438-06

Abstract:【Objective】This work aimed to study the one-pot conversion of cephalosporin C(CPC) to 7 - aminocephalosporanic acid (7 - ACA) by different enzyme forms of tri-enzymatic system.

【Methods】The recombinant *E. coli* was expressed in shake flask and fermenter to obtain the highest enzyme activity. Then two different enzyme forms of tri-enzymatic system were converted CPC to 7-ACA in one-pot. 【Results】Compared with shake flask fermentation, fermenter fermentation has higher enzyme activity. When

收稿日期:2018-02-05

修回日期:2018-02-09

作者简介:邱杰(1990-),男,在读研究生,主要从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。

* 国家自然科学基金项目(31360213)和广西高校科研项目(2013ZD034)资助。

** 通信作者:谭强(1977-),男,博士,教授,主要从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究,E-mail:tan20111102@163.com。

fed-batch fermentation by adding with 400 mL feed (15% glycerin and 7.5% fish peptone), the biomass was 32.79 g/L and the highest activities of glutaryl-7-amino cephalosporanic acid acylase (GA) and catalase (CAT) in the recombinant *E. coli* reached up to 7 099.85 U/L and 15 776.20 U/L in 72 h of fermentation, respectively. Using a three-enzyme system including immobilized D-amino acid oxidase (DAAO), free GA and CAT, the yield of 7-ACA obtained by one-pot conversion of CPC was 87.28%. Another three-enzyme system included immobilized DAAO, freeze-thaw cells GA and CAT. The yield of 7-ACA obtained by one-pot conversion of CPC was 87.10%. **【Conclusion】**The yield of 7-ACA prepared by two different enzyme forms of tri-enzymatic system in one-pot was approximately equal. And the specificity and hydrolysis ability of GA to α -ketoamidyl-7-aminocephalosporanic acid (AKA-7-ACA) was poor, which restricted the application of the process.

Key words: tri-enzymatic system, D-amino acid oxidase, glutaryl-7-amino cephalosporin acid acylase, catalase, 7-ACA

0 引言

【研究意义】7-氨基头孢烷酸(7-ACA)是头孢菌素 C(CPC)的母核,是半合成头孢菌素类抗生素的重要原料,可利用它制备得到头孢匹罗、头孢唑南等几十种抗生素^[1]。随着半合成头孢菌素类抗生素在临床用药的广泛运用,7-ACA 的需求量也在日益扩大,国际竞争也益发激烈。**【前人研究进展】**7-ACA 的酶法制备工艺已经基本取代了对环境危害较大的化学法制备工艺。在酶法制备 7-ACA 中,双酶法(D-氨基酸氧化酶 DAAO 和戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶 GA)工艺最为成熟^[2-4],被大多数药企广泛运用,并产生了巨大的经济效益。一种新的三酶系统一步法工艺在 2005 年被提出^[5],其工艺就是通过载体共固定化 DAAO 和过氧化氢酶(CAT)、与载体固定化 GA 同时加入 CPC 底物体系中一步法生产 7-ACA(图 1)。CAT 能够原位水解掉 DAAO 氧化反应所产生的 H₂O₂, α -酮己二酰-7-氨基头孢烷酸(AKA-7-ACA)在无戊二酸的条件下可被 GA 水解产生 7-ACA。同时避免了当前流行的双酶法工艺路线中 H₂O₂对反应体系酶催化剂的失活及其对底物、中间产物的降解影响,这可以显著地提高酶催化剂的使用寿命^[5-7],可有效地降低 7-ACA 的生产成本。但该工艺由于催化剂都处于相同的固定化形式,经多次重复利用催化剂后,因酶形式不可分离导致有活力的催化剂与失活的催化剂被一起丢弃而造成浪费。**【本研究切入点】**本研究利用酶形式可分离的三酶系统,通过一个设计的反应器体系外流加 H₂O₂,一步法转化 CPC 制备 7-ACA。**【拟解决的关键问题】**对重组大肠杆菌分别进行摇瓶和发酵罐高密度表达,获得最高酶活后使用两种酶形式差异的三酶系统一步法转化

CPC 制备 7-ACA。

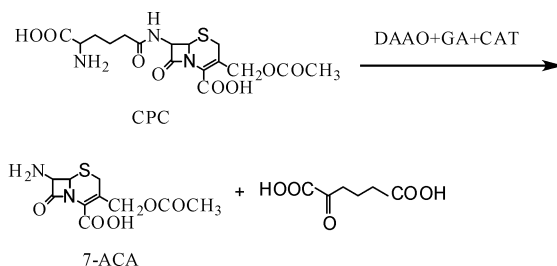


图 1 三酶系统一步法制备 7-ACA 示意

Fig. 1 Schematic diagram of preparation of 7-ACA by tri-enzymatic system in one-pot

1 材料与方法

1.1 材料

重组 pET-28b+GLA/BL21(DE3)是由金斯瑞生物科技公司合成。固定化 DAAO 购买于湖南宝利士生物技术有限公司。CPC 购买于石家庄制药有限公司,戊二酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7-ACA)由本实验室制备。十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)等其他化学试剂均为分析纯,由南宁市优科实验试剂经营部提供。

1.2 方法

1.2.1 种子培养

取重组菌在 LB 固体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)划线后 37℃ 过夜培养,挑取单菌落在 50 mL LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)于 37℃, 200 r/min 恒温摇床培养过夜备用。

1.2.2 摇瓶发酵

将上述种子培养液,按 8% 的接种量接种到 50 mL LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中,37℃ 下培养 1~2 h 到 OD₆₀₀ 达到 0.8~1.0 后,加入 2.0% (W/V)乳糖,在 25℃, 200 r/min 诱导表达 48 h,每

隔 6 h 取样测定酶活力。

1.2.3 发酵罐发酵

在装有 LB 液体培养基的 5 L 发酵罐,按 8% 的接种量接入上述种子液(含 50 mg/L 卡那霉素),37℃ 下培养 2~3 h 至 OD_{600} 达到 1.0 左右,加入 2.0%(W/V)的乳糖,25℃ 下诱导表达 84 h。分别在诱导 6 h、12 h、24 h 和 36 h 后分别补料添加 100 mL 甘油混合液(15%甘油+7.5%鱼蛋白胨,W/V)。无菌空气以 2.5~3.0 L/min 速度流入,并通过调节搅拌速度控制溶氧在 30%以上,定时测定酶活力。

1.2.4 预处理

取一定量重组菌体用 0.1 mol/L pH 值为 8.0 的磷酸钠盐缓冲液洗涤一次,离心收集菌体,再用 0.1 mol/L pH 值为 8.0 的磷酸钠盐缓冲液重悬,得到重悬液。(1)超声破碎:超声波破碎条件为工作 5 s,间歇 5 s,功率 60 W,细胞悬液在冰浴中超声处理 15 min,4 000 r/min 下离心 10 min,取上清液检测酶活力;(2)CTAB 和 SDS 处理^[8]:细胞悬液分别在 4℃、200 r/min、0.3 mol/L NaCl 条件下,在含 0.5%(W/V)CTAB 和 0.5%(W/V)SDS 溶液中分别处理 24 h,离心后取上清液测定酶活力;(3)EDTA 处理^[9]:取适量细胞悬液,加入一定量的 EDTA 至终浓度 0.1 mol/L,在 200 r/min、4℃ 处理 24 h,离心后取上清液测定酶活力;(4)乙酸乙酯处理:取适量细胞悬液,加入一定量的乙酸乙酯至终浓度 5.0%(W/V),在 200 r/min、4℃ 处理 24 h,离心后取上清液测定酶活力;(5)丙酮处理:取适量细胞悬液,加入一定量的丙酮至终浓度 30%(W/V),在 200 r/min、4℃ 处理 24 h,离心后取上清液测定酶活力;(6)冻融处理:取适量菌体于 -20℃ 保存过夜后,室温条件下解冻,再用 15 mL 0.1 mol/L 磷酸钠盐缓冲液(pH 值为 8.0)悬浮,测定细胞酶活力。

1.2.5 酶活力测定

GA 酶活力的测定方法参考文献^[10],其酶活力定义:在 pH 值 8.0,37℃ 条件下每分钟催化 GL-7-ACA 产生 1 μ mol 的 7-ACA 所需的酶量为一个单位(U)。CAT 酶活测定方法参考文献^[11],其酶活定义:在 pH 值 7.0,25℃ 条件下每分钟分解 1 μ mol 的 H_2O_2 所需的酶量为一个单位(U)。

1.2.6 三酶系统一步法制备 7-ACA

在一个设计的反应器中加入 50 mL 1% 的 CPC 溶液,同时加入固定化 DAAO(约 40 U)、游离酶形式(超声破碎细胞液)或冻融细胞形式的 GA(约 40 U)和 CAT(约 80 U),调节 pH 值至 7.5,温度 28℃,气流流速 0.2 L/min,反应体系外流加 0.1 mol/L

H_2O_2 ,催化 CPC 制备 7-ACA,反应液经 HPLC 检测分析。

1.2.7 HPLC 分析

CPC,AKA-7-ACA,GL-7-ACA,7-ACA 的定量与定性分析是在装有 Zorbax Eclipse XDS-C18(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)柱的 Agilent1100 series HPLC 系统中进行,检测波长 $\lambda=254$ nm,流动相为含乙腈与磷酸二氢钾溶液(25 mmol/L,pH 值为 3.5),二者比例为 8:92,流速为 1.0 mL/min,进样量为 1 μ L,柱温为 28℃。利用峰面积计算底物的转化率及产物的生成率。各成分出峰时间为 CPC:3.3 min;AKA-7-ACA:4.6 min;GL-7-ACA:14.4 min;7-ACA:3.0 min。

2 结果与分析

2.1 GA 和 CAT 在摇瓶中的表达

研究发现最高的菌浓度(8.10 g/L)出现在 36 h,而最高的 GA 活力(1 327.73 U/L)和 CAT 活力(1 852.09 U/L)分别出现在 24 h 和 30 h(图 2)。最高 GA 活力的出现早于最大菌浓度,说明 GA 酶活力受诱导剂乳糖影响。当摇瓶发酵前期因含有充足的生长营养元素而利于产生大量 GA,但到了发酵后期,由于碳源消耗而导致不足,乳糖被作为碳源消耗,菌体代谢保证了菌体的自身生长而不是产酶,因而影响 GA 的表达,所以导致酶活积累的下降。

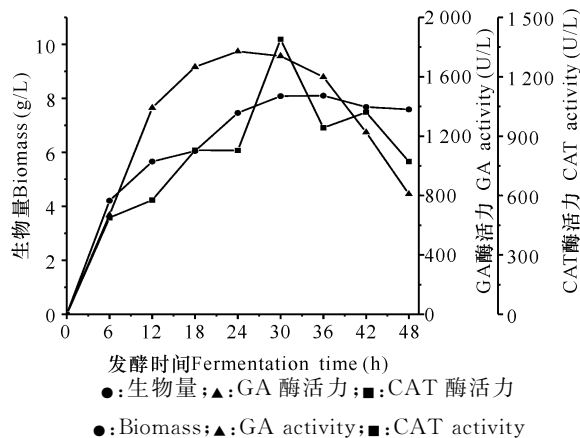


图 2 摇瓶发酵表达对 GA 和 CAT 酶活力的影响

Fig. 2 The effect of shaking flask fermentation on the activity of GA and CAT

2.2 GA 和 CAT 在发酵罐中的表达

最大的菌浓度(35.21 g/L)出现在 60 h,而最大的 GA(7 099.85 U/L)和 CAT(15 776.20 U/L)活力同时出现在 72 h,当发酵时间超过 72 h,菌体自溶,泡沫增多,导致菌体含量和酶活力同时下降(图 3)。通过发酵罐补料高密度发酵,由于营养物浓度和

溶氧等有利因素的提高,导致菌体含量和酶活力都大幅提高。对比摇瓶发酵,菌体含量提高了4.3倍,GA酶活提高了5.3倍,CAT酶活提高了8.5倍。

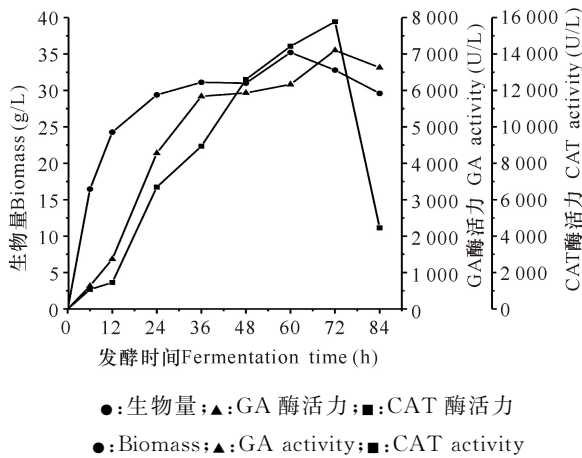
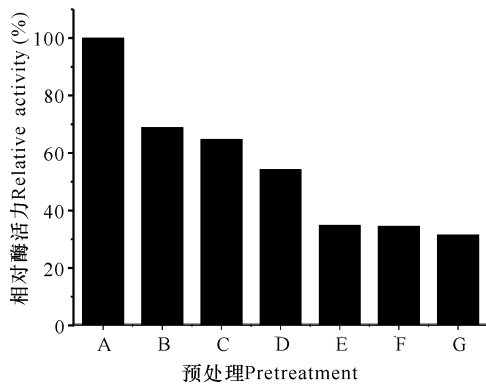


图3 发酵罐发酵表达对GA和CAT活力的影响

Fig. 3 The effect of tank fermentation on the activity of GA and CAT

2.3 不同预处理对酶活力的影响

发酵罐高密度表达重组菌中CAT的酶活力较高,大约是GA酶活力的2倍,在酶促反应中不是一个限制因素。因此,本研究以GA酶活力作为指标考察不同预处理对酶活力的影响。不同的预处理对细胞壁/膜的损伤程度不同,导致胞内酶的失活程度及细胞壁/膜对底物和产物扩散阻力不同,因此造成表观酶活力的不同。本研究以冻融处理细胞的表观酶活力为100%。冻融细胞GA酶活力最高,超声破碎细胞液的GA酶活力次之(图4)。冻融处理,其操作简便,因避免了化学试剂对环境的影响,成本较低且有利于放大,可作为理想的酶催化剂使用。



A:冻融;B:超声破碎;C:CTAB;D:丙酮;E:SDS;F:乙酸乙酯;G:EDTA

A: freeze thaw; B: sonicate; C: CTAB; D: acetone; E: SDS; F: ethyl acetate; G: EDTA

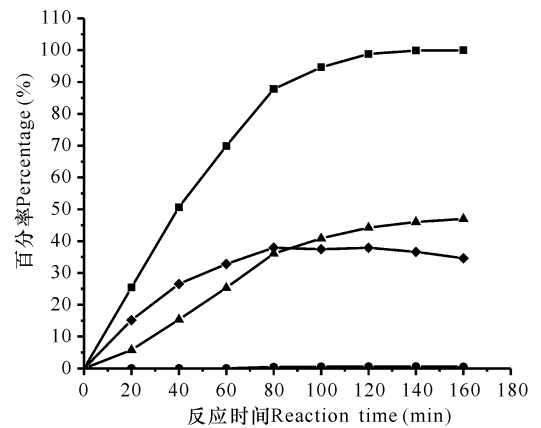
图4 不同预处理对GA酶活力的影响

Fig. 4 The effect of various pretreatments on the activity of GA

2.4 三酶系统一步法制备7-ACA

2.4.1 固定化DAAO、游离酶GA和CAT一步法制备7-ACA

通过固定化DAAO和游离酶GA、CAT一步法催化CPC制备7-ACA,反应体系中充足的CAT分解反应过程中产生的 H_2O_2 ,CPC完全转化变成AKA-7-ACA,反应过程中几乎检测不到GL-7-ACA。尽管反应结束时CPC已经被完全转化,但7-ACA的产率只达到46.98%。反应体系中36.65% AKA-7-ACA并没有转化成7-ACA,导致了7-ACA的产率很低(图5)。这表明GA对中间产物AKA-7-ACA的偏好性差、水解能力较弱,远不及对GL-7-ACA水解能力强。



■:CPC转化率;◆:AKA-7-ACA生成率;●:GL-7-ACA生成率;▲:7-ACA生成率

■:CPC conversion rate;◆:AKA-7-ACA production rate;●:GL-7-ACA production rate;▲:7-ACA production rate

图5 游离酶组成的三酶系统一步法制备7-ACA

Fig. 5 Preparation of 7-ACA by tri-enzymatic system composed of free enzyme in one-pot

上述反应过程中损失的GA和CAT可以通过流加新冻融细胞液或者游离酶液进行补偿。由于3种酶的形式可分离,反应的最后,失活的游离酶可被选择的丢弃,而固定化DAAO可以回收重复利用,避免浪费。考虑到 H_2O_2 对酶的影响,因此根据反应的需求设计了一个反应器,结构如图6所示。反应器的底部装有一层过滤膜用于截留固定化酶及冻融酶液,而反应液可以自由通过。利用蠕动泵把反应液抽到外部串联的一个容器,通过流加适量的 H_2O_2 把多余的AKA-7-ACA全部转化成GL-7-ACA,再把反应液抽到系统中继续反应,这样能有效地避免了 H_2O_2 与酶催化剂的不良影响。

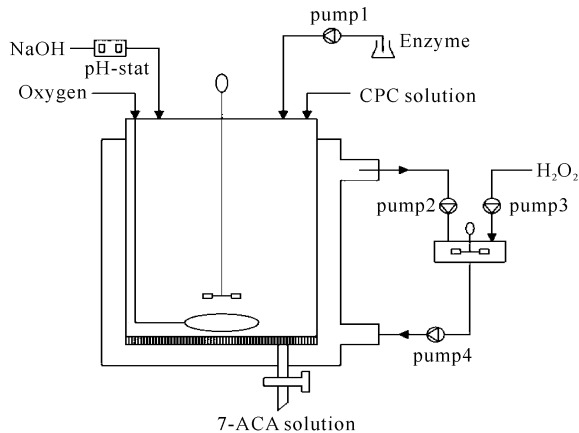


图 6 反应器示意

Fig. 6 Schematic diagram of reactor system

通过设计的反应器,体系外流加适量 H_2O_2 把系统中的 AKA-7-ACA 氧化生成 GL-7-ACA,最终被 GA 催化生成 7-ACA。如图 7 所示,经过对 H_2O_2 的流加量优化,在系统中加入 13 mL 0.1 mol/L H_2O_2 ,反应结束时,AKA-7-ACA 完全被 H_2O_2 氧化生成 GL-7-ACA,7-ACA 的产率高达 87.28%。相对于不流加 H_2O_2 工艺,7-ACA 的产率提高了 40.30%;同时 CPC 也能被完全转化。

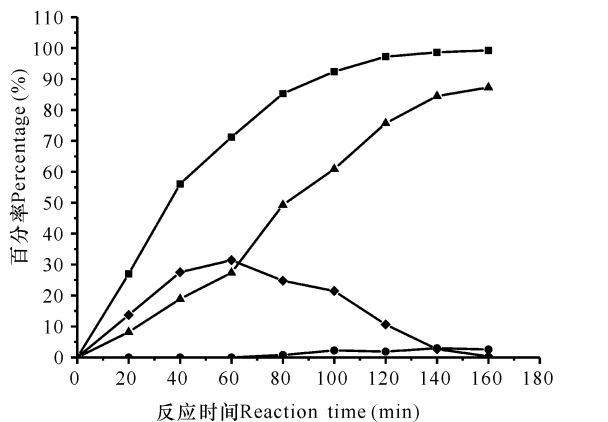


图 7 流加 H_2O_2 条件下游离酶组成的三酶系统一步法制备 7-ACA

Fig. 7 Preparation of 7-ACA by tri-enzymatic system composed of free enzyme under adding H_2O_2 in one-pot

2.4.2 固定化 DAAO、冻融细胞 GA 和 CAT 一步法制备 7-ACA

由上述酶反应器,在相同的反应条件下,利用冻融细胞形式 GA 和 CAT 代替游离酶形式,反应过程中酶活力损失通过流加细胞悬液补充,结果如图 8 所示。在 160 min 的反应时间,CPC 的转化率达到 100%,7-ACA 的生成率达到 87.10%。反应过程未

被转化的 AKA-7-ACA 被体系外加入的 H_2O_2 氧化生成 GL-7-ACA,再被转化成 7-ACA。该工艺所获得 7-ACA 产率与前述工艺大致相等,但由于冻融细胞处理更简便,易于扩大生产,酶活力更高且稳定性更好,所以选择冻融细胞制备 7-ACA 更能降低生产成本。固定化 DAAO 可以被选择的重复多次利用。

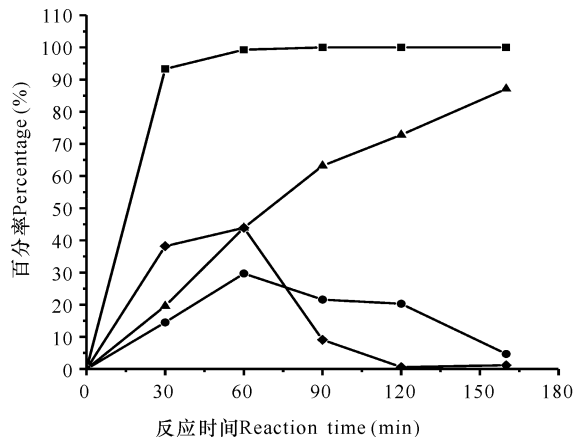


图 8 流加 H_2O_2 条件下冻融细胞组成的三酶系统一步法制备 7-ACA

Fig. 8 Preparation of 7-ACA by tri-enzymatic system composed of freeze-thaw cells under adding H_2O_2 in one-pot

3 结论

本研究对酶形式差异的三酶系统一步法制备 7-ACA 进行研究。通过设计的反应器体系外流加适量 H_2O_2 ,利用固定化 DAAO、游离酶 GA 和 CAT 转化 CPC 一步法制备 7-ACA,CPC 转化率达到 100%,7-ACA 的生成率达到 87.28%;利用固定化 DAAO、冻融细胞 GA 和 CAT 转化 CPC 一步法制备 7-ACA,CPC 转化率达到 100%,7-ACA 的生成率达到 87.10%。因 GA 对中间产物 AKA-7-ACA 的底物选择性差,限制了三酶系统一步法工艺的工业运用。如能进一步深入对 GA 分子结构改造,通过突变技术提高 GA 对 AKA-7-ACA 的水解能力;或者通过微生物筛选技术寻找到一种对 AKA-7-ACA 催化活力更好的酶,就能完全避免由于 H_2O_2 带来的不良影响,该工艺将会产生巨大的经济效益。

参考文献:

[1] 徐兆瑜. 7-ADCA 和 7-ACA 的应用与市场[J]. 化工技术经济,2004(4):18-23.

- intermediates of 7-ADCA and 7-ACA[J]. *Chemical Techno-Economics*, 2004(4):18-23.
- [2] CONLON H D, BAQAI J, BAKER K, et al. Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-amino cephalosporanic acid[J]. *Biotechnology and Bio-engineering*, 1995, 46(6):510-513.
- [3] BIANCHI D, BORTOLO R, GOLINI P, et al. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-ACA by simultaneous action of immobilized d-ammo acid oxidase and glutaryl-7-ACA acylase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 73(2/3):257-268.
- [4] LUO H, LI Q, YU H, et al. Construction and application of fusion proteins of d-amino acid oxidase and glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase for direct bioconversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(11):939-945.
- [5] LOPEZ-GALLEGO F, BATENCOR L, HIDALGO A, et al. One-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid in the absence of hydrogen peroxide[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2005, 347(14):1804-1810.
- [6] TAN Q, ZHANG Y W, SONG Q S, et al. Single-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid in the absence of hydrogen peroxide[J]. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26:145-152.
- [7] TAN Q, YUAN J, SONG Q S, et al. Conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid using cell-bound and support-bound enzymes[C]. *The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Products*, 2008:155-159.
- [8] CHENG S W, WEI D Z, SONG Q X. Extraction penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* in recombinant *Escherichia coli* with cetyl-trimethylammoniumbromide[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32(1):56-60.
- [9] KHEIROLOMOOM A, ARDJMAND M, FAZELINIA H, et al. Isolation of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by physical and chemical treatments[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8(3):223-227.
- [10] PARK S W, KIM Y I, CHUNG K H, et al. Improvement of stability of immobilized GL-7-ACA acylase through modification with glutaraldehyde[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 37(2):153-163.
- [11] BAI J, RODRIGUEZ A M, MELENDEZ J A, et al. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(37):26217-26224.

(责任编辑:陆雁)

(上接第 437 页 Continue from page 437)

- [11] LIU B, ZENG H C. Hydrothermal synthesis of ZnO nanorods in the diameter regime of 50 nm[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(15):4430-4431.
- [12] 杨詹, 施媛媛, 孙喜莲, 等. 化学浴沉积过程中的氧化锌微米棒与纳米棒研究[J]. *材料导报*, 2009, 23(z2):93-96.
- YANG Z, SHI Y Y, SUN X Y, et al. Study on ZnO nanorods as well as mirorods formed in the chemical bath deposition combined with sol-gel processes[J]. *Mayerials Review*, 2009, 23(z2):93-96.
- [13] 张春梅, 姚凤兰, 齐磊, 等. 聚乙烯亚胺对氧化锌纳米阵列形貌的影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(10):2762-2765.
- ZHANG C M, YAO F L, QI L, et al. Effect of polyethyleneimine on the morphology of ZnO nanorod arrays[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2013, 33(10):2762-2765.
- [14] 李经忠, 王青青, 余海. 新型非病毒载体聚乙烯亚胺介导基因转染参数的研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2006, 25(4):481-487.
- LI J Z, WANG Q Q, YU H. Gene transfer by the new type nonviral vector polyethylenimine[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2006, 25(4):481-487.
- [15] WU W B, HU G D, CUI S G et al. Epitaxy of vertical ZnO nanorod arrays on highly (001)-oriented ZnO seed monolayer by a hydrothermal route[J]. *Cryst Growth Des*, 2008, 8(11):4014-4020.

(责任编辑:米慧芝)