影响固相酶制备和性质的因素

孙 万 儒

（中国科学院微生物研究所，北京）

虽然早在 1916 年，Nelson 等人已将蔗糖酶吸附在活性炭和氢氧化铝胶上，制备了第一个固相酶[1]。但到五十年代，固相酶的研究才为人们所注意，到六十年代才迅速发展起来。近年来，发展了固定化微生物、固相化辅酶及其再生的方法。所研究的固相酶从较简单的水解酶类向较复杂的合成酶、需辅因子的酶类和多酶系统发展。以前，固相酶的研究多偏重于制备、性质及应用。目前，对固相酶有关理论问题的研究正在逐步深入[2,3]。

随着固相酶研究的发展，酶的固相方法也越来越多，主要有物理吸附和离子结合法、交联法、共价键合法、包埋法及微型胶囊法。各种方法的优缺点见表 1。

表 1 不同方法制备的固相酶的比较

比较内容 \ 固相方法	物理吸附和离子键合法	共价键合法	交联法	包埋法	微型胶囊法
制备方法	简单	复杂	一般	较复杂	复杂
固相酶活力	高	较低	较高	一般	高
固相酶再生可能性	有	无	无	无	无
酶结合牢度	差	强	强	一般	强
对作用大分子底物的影响	小	小	小	大	大

本文就影响固相酶制备和性质的因素介绍如下：

一、影响固相酶制备的因素

（一）物理吸附和离子结合法

许多吸附剂和离子交换树脂都能吸附蛋白质，但适用于固相酶的吸附剂和离子交换树脂应具备对酶蛋白有较强的吸附能力和较好的吸附牢度，又使酶变性最少，而且不吸附酶作用的底物和产物。酶的固相化条件可参考酶的等电点及应用条件。因为 pH、离子强度变化会使酶

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

和支持物电荷变化，引起结合能力变化。在反应时，酶与底物分子形成酶-底物复合物，改变了酶分子电荷及空间结构，影响到酶与支持物的结合[4]。若先用酰化剂如乙烯-顺丁烯二酸酐共聚物将酶加以修饰，以增加酶的负电荷，就会增加酶在阳离子交换剂上的吸附能力和牢度，改进固相酶机械性能，提高使用稳定性。其效果与修饰剂的分子大小、电荷状况及吸附剂性质有关[5]。

不同交换基团的离子交换树脂，对同一种酶吸附能力不同；具有相同交换基团不同骨架的离子交换树脂对同一来源酶的吸附能力也不同[6,7]。空间网状结构的载体如交联葡聚糖，具有较强的吸附力和保留酶分子的能力。

另外，不同菌种产生的同种酶由于分子结构、大小、电荷状态不同，在同一种离子交换树脂上的吸附能力不同。DEAE-纤维素固定泡盛酒曲霉葡萄糖淀粉酶的效果很好[6,7]，而对黑曲葡萄糖淀粉酶的效果不好[8]。

（二）交联法

用双功能试剂将酶分子之间交联形成空间网状的更大分子，或将酶分子与另一种大分子物质（如惰性蛋白质）交联起来，可使酶固相化。

双功能试剂交联法用于菌体交联，主要是将酶分子固定在细胞内，其次是菌体间的交联。交联法制备的固相酶和固定化菌体活力虽较高，但颗粒小，使用不便。

酶吸附在吸附剂上，再用双功能试剂将吸附剂表面上单分子酶层交联成网状，可增加牢度，克服吸附法和交联法的缺点[9,10]。将酶或菌体与其他蛋白质（如骨胶、明胶等）用双功能试剂交联，或用蛋白质胶将酶或菌体包埋，再用双功能试剂交联，都可得到活力较高的固相酶或固定化菌体[11,12]。

交联反应条件须有利于酶分子之间交联，尽量减少分子内的交联，酶才能固相化，且具有较高活力。低浓度的酶和双功能试剂对酶分子间交联有利，但要排除分子内的交联是困难的[13]。另外，溶液的 pH 和离子强度、温度、反应时间也很重要。以戊二醛为例，戊二醛主要和蛋白质的非离子化的赖氨酸的 ε-氨基反应。一般说来，戊二醛交联酶的最适 pH 和赖氨酸残基的 pK 值及酶的等电点有关。

戊二醛在水溶液中往往聚合成为 α，β-不饱和醛的二聚体、三聚体和多聚体。在碱性条件下，不饱和键易和氨基发生亲核加成，此反应是不可逆的。在强碱性条件下，戊二醛本身易发生聚合而不溶解。所以弱碱性条件有利。酸性条件下，戊二醛以单体形式存在，酸催化下醛基与氨基加成，脱水形成西佛碱（Schiff's base）。酸浓度大时，氨基离子化，阻碍了醛基与氨基的加成。因此，以弱酸性为宜。在酸性条件下交联，发生分子内交联机率大，酶被修饰而不发生固相化。西佛碱在碱性条件下不稳定，易分解。用硼氢化钠将西佛碱还原成取代胺，可使其稳定，且不影响固相酶活力[14-16]。

降低离子强度，酶分子之间的吸附力增加[17]，酶分子易交联而固相化。温度影响较复杂，如木瓜蛋白酶用戊二醛在 pH6，0℃下交联，80% 酶被修饰，但始终保持水溶性，在室温下交联，即使戊二醛的浓度低 10 倍，在半小时内也可固相化[18]。而 α-胰凝乳蛋白酶与木瓜蛋白酶则正好相反[17]。

除戊二醛外，也可把重氮化的联苯二胺及其衍生物 4，4′-二异硫氰基联苯-2，2′-磺酸和己撑二异氰酸酯等作为交联剂使用。

（三）共价键合法

酶蛋白分子的一些基团与载体的活泼反应基团发生反应，形成共价键，将酶结合在载体上。现在使用的方法对酶活力必须功能基团和非必须功能基团的反应无选择性，结合反应可能发生在活性中心及其附近的基团上。一般共价键合法制备的固相酶活力较低。

用共价键合法制备固相酶，虽使用同一方法同一结合剂活化，如果载体不同，则制备的固相酶活力和性质不同。使用不同来源的载体如纤维素，由于纤维结构不同，表面暴露的可反应的羟基数也不同，以致影响它与结合剂反应、结合基团数和固相酶活力[19,20]。

载体相同，结合剂结构相同，如果反应基团

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

不同，则制备的固相酶活力不同[21]。这是因为不同结合剂反应基团与酶的不同氨基酸基团反应，这些氨基酸基团在酶分子内对其催化活性影响不同所致。结合剂的结构、链长度、空间构型、电子效应、亲水性等也会影响固相酶性质和活力[22-24]。

在制备固相酶的结合反应中加入一些化学保护剂，可以提高固相酶活力和相对活力。用重氮化的 ABSE-纤维素制备固相葡萄糖淀粉酶时，加入硫酸铵可使相对活力从 20—25% 提高到40—45%[25]。用溴乙酰纤维素制备固相氨基酸酰化酶[26]时也有相似结果。在结合反应中加入底物或抑制剂，甚至汞类的巯基保护剂都可以对酶活性中心起到保护作用。若首先用大分子抑制剂与胰蛋白酶结合，将酶活性中心保护起来，再用含醛基或重氮基的载体与酶结合固相化，然后洗脱大分子抑制剂，可提高固相酶的相对活力[27,28]。

葡萄糖淀粉酶的糖蛋白分子中的糖部分用高碘酸钠氧化，形成醛基，酶活力可保留 78%，然后与 CMC-酰肼作用，将葡萄糖淀粉酶固相化[29]。这种将酶分子中非活性中心部分的基团给以化学改变，与载体结合，即可避免偶联反应发生在活性中心上，从而达到提高固相酶活力的目的。

将过渡金属盐处理的纤维素、尼龙等，用于固相酶[30,31]，方法简便，固相酶活力较高。固相酶活力降低后，再次用过渡金属盐处理，去络合酶。再生的固相酶活力及蛋白含量更高。此法制备的固相酶易受 pH、离子强度变化的影响。使用稀酶溶液或发酵液以此法制备固相酶效果不好，不如物理吸附或离子键合法。

（四）包埋法

在一些物质如琼脂、蛋白质和醋酸纤维素溶液凝聚时，或单体聚合形成聚合物（如聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、聚 α-羟基甲基丙烯酸甲酯、聚 N-乙烯基四氢吡咯等）过程中，酶或菌体被包埋在所形成的凝胶中，使酶或菌体固相化。这种方法可同时包埋几种酶，形成多酶体系[32]。使用最多的有聚丙烯酰胺[33]和三醋酸纤维[34]。

丙烯酰胺和交联剂 N,N′-甲撑双丙烯酰胺聚合反应需有游离基引发剂，用量要适当，如用量大时，产生的游离基浓度高，连锁反应终止机率大，凝胶分子量小，包埋不住酶，极易使酶失活。光照聚合形成的凝胶孔径大，且随时间延长而变小；聚合反应要在无氧条件下进行，因氧会使游离基聚合，形成凝胶不稳定。反应温度高时，酶要变性；反应温度低时，聚合速度低，酶与凝胶易分离。聚合温度一般以 30—60℃ 为宜。将单体、交联剂、酶和催化剂的水溶液悬浮在矿物油中，分散成悬浮小滴进行聚合，因其表面积大、热传导好而酶失活少，固相酶活力高，颗粒均匀。而整体聚合因热传导差，酶易变性，制备的固相酶活力较低。

包埋酶的凝胶孔不能大于酶分子，否则酶分子会漏出；但又不能小于底物和产物分子，保证底物和产物能通过。酶凝胶机械性能和稳定性与孔大小有关。而孔大小主要取决于凝胶浓度及交联度，加大单体和交联剂的浓度及比例，可减小孔径，增加机械强度和稳定性。聚丙烯酰胺凝胶包埋的酶和菌体的活力也和丙烯酰胺单体及交联剂-N, N′-甲撑双丙烯酰胺浓度有关[35]。

一般说来，包埋法对作用大分子底物的酶效果差些。为了提高水解大分子底物的固相酶活力，在聚合反应混合物中加入大分子底物，聚合后用自然酶将其水解，留下适当的孔，可减少凝胶的扩散阻力，提高固相酶活力[36]。

（五）微型胶囊法

利用微型胶囊法制备固相酶一般有两种方法：凝聚法和界面聚合法。凝聚法是利用溶液中聚合物相分离的现象制备微型胶囊。将酶水溶液用有机表面活性剂分散在有机溶剂中形成油包水的乳浊液，然后加入溶有聚合物（如火棉胶、聚苯乙烯、醋酸纤维等）的有机溶剂，聚合物在水相小滴表面上凝聚，形成半透性胶囊。然后用与水不混溶的另一种有机溶剂（与聚合物溶剂混溶，但聚合物不溶解）处理，使胶囊更牢固。

界面聚合法是利用合成聚合物的两种单体

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

在油水界面上进行聚合形成微型胶囊。将酶和溶于水的单体如己二胺和酶的水溶液用有机表面活性剂分散在有机溶剂中，制成乳浊液，然后将含有另一种单体如癸二酰氯的有机溶剂加入乳浊液中，剧烈搅拌，于水相和有机溶剂的界面上己二胺和癸二酰氯聚合，把酶包含在形成的尼龙 6—10 微型胶囊中。

微型胶囊的大小取决于乳浊液的水相在有机溶液相中的分散度，并与表面活性剂量及搅拌速度有关。另外，有机溶剂的比重要接近于1，乳浊液才稳定。微型胶囊半透膜的薄厚取决于水溶性单体在水相和有机溶剂相中的分配系数 $C_{水}/C_{有机溶剂}$。若己二胺分配系数大，膜就厚，反之就薄。

若要改变微型胶囊半透膜的电荷性质，可使用带有不同基团的单体，如用 4，4′-二氨基-2，2′-联苯磺酸代替 1，6-己二胺，可得带有负电荷的微型胶囊，以增加带正电荷底物通过半透膜的能力[37,38]。

二、影响固相酶性质的因素

（一）固相化时给酶量和固相酶结合酶量

制备固相酶时（包括固定化菌体），不论是用哪一种方法，在一定范围内增加给酶量，或是增加给酶浓度都能增加固相酶的结合酶量，固相酶活力增加，反应溶液中未被固相化的酶量也增加。结合酶量低的固相酶活力低，但相对活力（固相酶活力/相应的酶液活力）和活力回收（固相酶活力/固相化时加入的总酶活力）高。固相酶活力随着固相酶结合酶量的增加而增加，固相酶结合酶量增加到一定程度后，固相酶活力增加渐趋减小；而固相酶相对活力和活力回收却随结合酶量的增加而逐渐降低（图 1）。因为在结合酶量高的固相酶反应中，酶催化反应速度受扩散作用限制，只有部分酶起作用，另一部分酶处于闲置状态，反应速度与结合酶量无关。

结合酶量高的固相酶虽然相对活力较低，但它的稳定性要比结合酶量低的要好；若增加底物浓度、增加搅拌速度或柱流速就可以提高

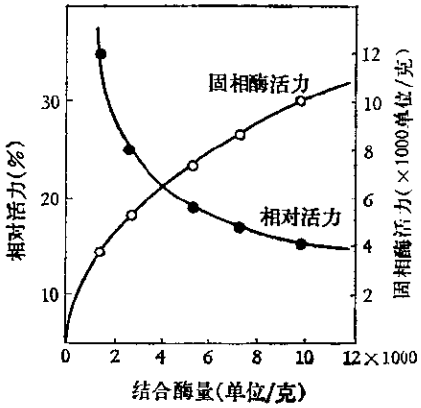

图 1 DEAE-交联葡聚糖作载体制备固相葡萄糖淀粉酶时，结合酶量与固相酶活力及相对活力的关系[7]

反应速度，增加酶反应的产量。因此，在制备固相酶时，主要考虑的是固相酶要有较高的活力。

（二）载体性质

小颗粒、空间网状、多孔性和表面粗糙的载体的比表面积大，可增加结合酶量，增加固相酶与底物接触面积，减少空间阻碍。因此固相酶活力随其颗粒比表面积增加而增加。固相酶颗粒越小，其最适 pH、温度、米氏常数（Km）和 pH-活力曲线越接近于自然酶（表 2）。

多孔性载体的孔径大小必须适合于酶和底物分子自由出入，否则孔是无效能的。例如，多孔玻璃作载体，对某一酶来说，有一个最适孔径，大于或小于这个值，固相酶活力和相对活力均下降（表 3）[40,41]。

酶在疏水环境中，保持空间结构的氢键极易受破坏，空间构型易发生变化使酶失活。因此，疏水性载体制备的固相酶，其活力和稳定性一般不如亲水性载体（如交联葡聚糖、交联琼脂

表 2 溴乙酰纤维素制备的固相葡萄糖淀粉酶颗粒大小与酶活力、相对活力和 Km 的关系*[39]

颗粒直径（微米）	蛋白含量（%）	活力（单位/克）	比活（%）	相对活力（%）	Km（M）	最适温度（℃）
自然酶					0.90×10^3	55
0—15	1.2	39.8	3.3	60	1.35×10^3	55
15—55	1.8	32.4	1.8	33	1.60×10^3	—
70—190	1.8	26.4	1.5	27	2.15×10^3	50
130—270	2.3	9.6	0.36	7	—	

* 底物为麦芽糖。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3　多孔玻璃孔径大小对制备的固相葡萄糖淀粉酶活力的影响[41]

平均孔径(Å)	表面积(米²/克)	酶活力(单位/克)
2300	8	502
1380	12	723
875	29	1950
550	60—80	3000
248	80—120	50

糖)高,其米氏常数增大也多[42—45]。用无机载体制备的固相酶比用天然有机载体制备的固相酶稳定性好,因天然有机载体易受微生物的降解。因此多孔玻璃为一个较好的载体被广泛应用于制备各种固相酶。

载体所带电荷对许多酶，特别是固相蛋白酶，作用于低分子量底物时的最适 pH 与自然酶比较发生了明显变化。用阴离子树脂制备的蛋白酶在离子强度低的情况下，pH-活力曲线和自然酶相比,向 pH 值高的方向移动 1.0—2.5 个单位;而阳离子制备的固相酶则相反，pH-活力曲线向 pH 值较低的方向移动（图 2)。在高离子强度下，这种现象消失[46]。带电荷载体的微环境影响载体和酶附近的氢离子分布，使之不同于整体溶液的 pH。为保持酶在最适 pH 条件下作用,就需增加或减少整体溶液 pH。

载体电荷也影响固相酶对带电荷底物的米氏常数。若载体电荷与底物电荷相反，米氏常数比自然酶的低;电荷相同时，米氏常数增加;主要是由于带电荷载体的静电场对与之相同或相反电荷底物分子的排斥或吸引所致[47]。增加反应液离子强度,这种影响也可减少。

（三）酶结合位点及基团

共价键合法和交联法及离子键合法制备的固相酶活力与酶和载体或交联剂的结合点有关。为避免结合在酶活性中心上，由酶的 pH-活力曲线推算活性中心基团的 pKa 值，根据化学一致性推断活性中心是哪一种氨基酸残基。选择在固相化时不会与酶的活性中心基团发生反应的结合基团，如活性中心有组氨酸或酪氨酸，就不要选择能与咪唑基或苯酚基反应的结合基团，如重氮基。一个酶分子与载体或与交联剂结合时，可能发生多点结合。这样虽然能使酶与载体结合得更牢，但多点结合容易将酶束缚住，有碍于催化过程中底物与酶形成复合物。对于由若干亚基组成的酶，最理想的固相方式是酶只通过一个亚基与载体结合。

酶共价结合到载体上，结合臂的长短很重要,在亲合层析上,已证明臂短时影响配基的亲合能力。在固相酶上,结合臂短时,载体的空间阻碍大,酶的自由度小、活力低,米氏常数增加。增长结合臂，可提高固相酶活力，但结合臂太长,结合臂易发生卷曲,对与酶结合不利。

酶与载体形成的共价键比较牢固。如葡萄糖淀粉酶与重氮化的芳氨基多孔玻璃形成的偶氮键能量要比它在反应器中所受的切变力大十个数量级[48]。

（四）固相化对酶底物特异性的影响

蛋白酶固相化后,降低水解大分子底物——蛋白质的能力往往比水解小分子肽或氨基酸酯化物的能力降低更显著，一般的能相差 5—10 倍。有的甚至对大分子蛋白质底物几乎没活力，而对小分子底物的活力能保留百分之百。用重氮化的对-氨基苯丙氨酸-亮氨酸共聚物制备的细菌蛋白酶相对活力与底物分子量对数成反比关系[49]。在固相核糖核酸酶上也表现出类似的现象[50]。

自然葡萄糖淀粉酶对不同分子量底物（除麦芽糖外）的活力，随底物分子量的增加而减小;米氏常数也随分子量增加而减小;但反应速度变化不大。它对直链淀粉水解速度比对支链水解速度要小。葡萄糖淀粉酶不论用哪一种方法固相化，这些趋势基本不变。但与自然酶相比,对同一分子量的底物,固相酶的米氏常数大;固相酶米氏常数随底物分子量增加而减小的趋势比自然酶小的多,底物分子量到一定大小时，固相酶米氏常数大于自然酶米氏常数的倍数保持不变。固相酶相对活力随底物分子量减小而增大(表 4, 5)。固相化葡萄糖淀粉酶对水解底物的突出影响，表现在它对支链淀粉水解速度比自然酶大大下降,几乎等于零[50—53]。

用重氮化的聚对-氨基苯乙烯固相化的 α-

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表 4　自然葡萄烯淀粉酶和 CMC-葡萄糖淀粉酶的活力与底物(淀粉)分子量的关系[51]

底物分子量	固相酶活力*	自然酶活力*
204.0×10^4	17	100
58.0×10^4	23	148
12.6×10^4	42	167
3.5×10^4	72	184
3.0×10^4	80	186
8.8×10^3	185	240
342(麦芽糖)	35	36

* 以自然酶对 204.0×10^4 直链淀粉的活力为百分之百，计算对其他分子量淀粉的活力。固相酶按其结合蛋白质以上法计算。

表 5　自然葡萄糖淀粉酶和吸附在活性炭上的葡萄糖淀粉酶对不同分子量底物的 Km 比较[52]

底物分子量	自然酶 Km	固相酶 $\bar{K}m$	$\bar{K}m/Km$
8.0×10^3	7.9×10^6	59.3×10^6	7.5
7.0×10^3	83×10^6	190×10^6	2.3
5.0×10^3	170×10^6	228×10^6	1.52
2.5×10^3	370×10^6	407×10^6	1.1
1.0×10^3	940×10^6	1034×10^6	1.1
342(麦芽糖)	2100×10^6	2520×10^6	1.1

淀粉酶和自然酶分别作用于同样的可溶性淀粉，反应混合物达到同一蓝色值时，固相酶反应混合物中还原糖量比自然酶的高；达到同一还原糖量时，固相酶反应混合物的蓝色值高，说明固相α-淀粉酶作用于可溶性淀粉时具有多重作用能力(图 3)[54]。固相 β-淀粉酶[55]和葡萄糖淀粉酶[56]也具有类似的变化。固相葡萄糖淀粉酶水解液化淀粉，即使达到和自然酶水解液化淀粉同样水平(如 DE 值为 95)，固相酶反应混合物中醇不溶物(即糊精)比自然酶高。这或是由于固相酶对支链淀粉水解能力差，残留的界限糊精多，或是由于固相酶水解淀粉的作用方式改变，将淀粉分段水解产生小分子糊精的能力增加，从还原末端开始以葡萄糖为单位的水解能力降低所致。同样，蛋白酶固相化后，水解蛋白质的作用点也发生改变，随载体不同酶的水解能力有所不同[57,58]。

目前，有关固相酶的理论研究正在引起人们的注意，随着它的深入和发展，必将对固相酶的实际应用、酶化学、细胞学、催化理论等有关学科起推动作用。

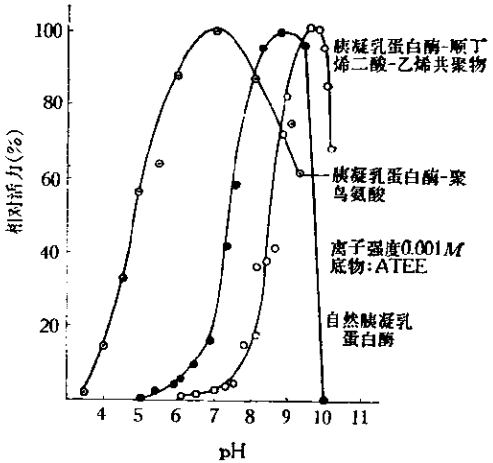

图 2　载体电荷对固相酶的 pH-活力曲线的影响

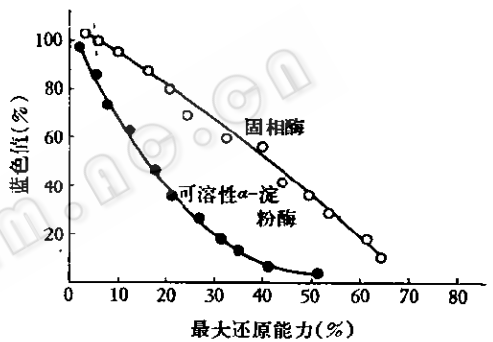

图 3　可溶性α-淀粉酶(▲)和重氮化聚对-氨基苯乙烯-α-淀粉酶(■)水解淀粉时产物的还原能力和蓝色值的关系[64]

参 考 资 料

[1] Nelson, J. M. and E. G. Griffin: *J. Am. Chem. Soc.*, **38**:1109, 1916.

[2] Goldstein, L. and E. Katchalski-Katzir: Applied Biocnemistry and Bioengineering, Vol. I: pp. 1—22, 1976 Wingard, L. B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein, L., Academic Press, N. Y.

[3] Broun, G. B.: Analysis and Cotrol of Immobilized Enzyme Systems, pp. 291, 1976. Thomas, D. and Kernevez, J-P., North Holland/American Elsevir.

[4] 宇佐美昭次、武富升: 发酵协会志, **23** (6): 23, 1965。

[5] Solomo, B. and L. Levin: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**(9):1161, 1974.

[6] Smiley, K. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**(2):309, 1971.

[7] 中国科学院微生物研究所不溶酶组: 微生物学报, **13** (1): 25, 1973。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

[8] Bachlov, M. J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**(1): 85, 1970.
[9] Wang, S. S. and W. R. Vieth: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**:93, 1973.
[10] Watanabe, Katsuyuki, et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(3):547, 1977.
[11] Wang, S. S. et al.: Enzyme Engineering, **2**:123, 1974, Pye, E. K. and Winagard, L. G. (eds), Plenum Press, N. Y.
[12] Shnarr, G. Wayne, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**(3):732—734, 1977.
[13] Zaborsky, O. P.: Immobilized Enzyme, pp. 64—68, 1974. CRC Press.
[14] Whipple, E. E. B. and M. Huta. *J. Org. Chem.*, **39**(12):1666, 1974.
[15] Monsan, P. et al.: Analysis and Cotrol of Immobilized Enzyme Systems, pp. 275, 1976. Thomas, D. and Kernevez, J-P. (eds), North-Holland/American Elsevier.
[16] Richards, F. M. and J. R. Knowles: *J. Mol. Biol.*, **37**:231, 1968.
[17] Tomimatsu, Y. et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, **36**:51, 1971.
[18] Ottesin, M. and B. Svesson: *C. R. Trav. Lab. Carlsterg*, **38**:171, 1971.
[19] 黎高翔等: 微生物学报, **13** (1): 31 1973。
[20] Svensson, Birte: *Biochim. Biophys. Acta*, **429**(3). 954, 1976.
[21] Barker, S. A. et al.: *Carbohyd. Res.*, **9**(3):257, 1969.
[22] Варламов, В. П. и др: *Биоорганицеская химия*, **2** (4): 558, 1976.
[23] Bouin, J. C. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**(2): 179, 1976.
[24] Weetall, H. H.: *Rereach/Development*, **22**:18, 1971.
[25] 杨麻婉、孔祥荃: 微生物学报, **16** (4): 335, 1976。
[26] Sato, T. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**(2): 788, 1971.
[27] Eric Briwn et Anedre Racoic: Analysis and Cotrol of Immobilized Enzyme Systems, pp. 111, 1976. Thomas, D. and Kernevez, J-P. (eds) North-Holland/American Elsevier.
[28] 中国科学院上海生物化学研究所固相酶组: 生物化学与生物物理学报, **9** (1): 14, 1977。
[29] Christison, J.: *Chem. Ind.*, (*London*), **4**(5): 215, 1972.
[30] Barker, S. A. et al.: *Process Biochem.*, **6**(10): 11, 1971.
[31] Goldstein, L. et al.: *Biochem.*, **3**:1913, 1964.
[32] 孟广震: 微生物学通报, **4** (1): 41, 1977。
[33] O'Driscoll, K. F.: Advance in Biochemical Engineering, **4**:155, 1976. Ghose, T. K., Fiechter, A. and Blakebrough, N. (eds).
[34] Dinelli, D. and F. Morisi: Enzyme Engineering, **2**:293, 1973. Pye, E. K. and Winagard, L. B. (eds). Plenum Press., N. Y.
[35] Plichon, B. et al.: Analysis and Control of Immobilized Enzyme Systems, pp. 1—7, 1976. Thomas, D. and Kerneves, J-P., (eds). North-Holland/American Elsevier.
[36] Beck, S. R. and H. F. Rase: *Prod. D/R.*, **12**(4): 260, 1973.
[37] Chang, T. M. S.: *Science*, **146**:524, 1964.
[38] Chang, T. M. S.: *J. Macromol. Sci.*, Chem. **A10**(1—2):245, 1976.
[39] Maeda, H. and H. Suzuki: *Agr. Biol. Chem.*, **36**(9):1581, 1972.
[40] Silman, I. H. and E. Katchalski: *Ann. Rev. Biochem.*, **35**:873, 1966.
[41] Weetall, H. H. and N. B. Havewala: Enzyme Engineering, **3**:241, 1972.
[42] Caldwell, K. D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**(4):613, 1975.
[43] Kucera, J. and J. Hanus: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **40**(8):2536, 1975.
[44] Cook, D. and W. W. Ledingham: *Biochem. Soc. Trans.*, **3**(6):996, 1975.
[45] Royer, G. P. et al.: *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A10**(1—2):289, 1976.
[46] Goldstein, L. and E. Katchalski: *Freseniu's' Z. Anal. Chem.*, **243**:375, 1968.
[47] Katchalski, E. et al.: *Advances in Enzymelogy and Related Areas of Molecular Biology*, **34**: 445, 1971.
[48] Weetall, H. H. and B. Havewala: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**(2):167, 1974.
[49] Cresswell, P. and A. R. Sanderson: *Biochem. J.*, **119**:447, 1970.
[50] 栗山义明、江上不二夫: 生化学, **38**: 735, 1966。
[51] 前田英胜、铃木英雄: 日本农芸化学会志, **44** (12): 547, 1970。
[52] 宇佐美昭次、白崎春海: 发酵工学杂志, **48** (8): 506, 1970。
[53] Maeda, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **315**(1):18, 1973.
[54] Ledingham, W. M. and W. E. Hornby: *FEBS Lett.*, **5**:118, 1969.
[55] Cook, D. and W. M. Ledingham: *Biochem. Soc. Trans.*, **3**(6):996, 1975.
[56] Ledingham, W. M. and M. Do. S. S. Ferrira: *Carbohyd. Res.*, **30**(1):196, 1973.
[57] Lowey, S. et al.: *J. Mol. Biol.*, **23**:287, 1967.
[58] Lowey, S.: Symp. Fibrous Proteins, pp. 124, 1967. Plenum Press., N. Y.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn