

# 固定化藻类细胞的制备和应用

杨 廉 婉

(中国科学院微生物研究所,北京)

自 1940 年以来,世界上一些国家对藻类培养以及有关实验室和室外规模的研制工作报告日益增多<sup>[1]</sup>。这些研究激起了这些国家和私人企业的投资热。由于藻类的多种用途,对藻类的开发生产及其代谢产物的研究引起了人们的浓厚兴趣。例如用小球藻和螺旋藻生产的“保健食品”,每公斤 10—20 美元<sup>[2]</sup>。在日本、墨西哥、泰国、以色列、美国和我国台湾等藻类保健食品的生产大约 200 吨/年(干重)<sup>[3]</sup>。在日本,从某些螺旋藻中提取藻青甙,这是一种天然蓝色食品色素。由杜氏藻中生产  $\beta$ -胡萝卜素已在以色列研制成功<sup>[3,4]</sup>,10 年前已建立了试验性工厂,最近在美国南加利福尼亚、夏威夷和澳大利亚建厂投产。微藻可作为肥料和土壤团粒结构促进剂。某些藻类可吸收废水中的有害物质,消除环境污染。藻类还可用来生产石油烃类物质,用藻类生产的氢等可作为无公害生物能源。在有机化学产品方面,藻类可生产多糖、甘油和有机酸等。

藻类含有叶绿素 a,可进行光合作用,并有简单的生殖结构。这些藻包括单细胞类型(如小球藻),小的集落型(如团藻)和大的多细胞类型(如“海草”),也包括蓝藻(细菌)。从 80 年代开始,国外开展藻类细胞固定化的研究十分活跃,在不久的将来,有可能用于实际生产。藻类细胞固定化的优点是可重复使用,减少培养时间,进行连续化培养;产物与藻细胞容易分开回收;固定在载体中的藻细胞浓度高,促进了反应速度;工作稳定性较好;固定化藻类细胞的体积和所占的场地小,易于控制;可节省资金等。国外有关藻类细胞固定化的报道逐年增多,但国内尚未见到有关报道。本文简要介绍

国外有关固定化藻类细胞的制备、用途及今后的研究方向等。

## (一) 固定化藻类细胞的制备方法

文献报道的藻类细胞固定化方法主要采用吸附法和包埋法。

1. 吸附法:藻类细胞被吸附到各种不同的载体上,例如聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料,聚乙烯泡沫塑料和玻璃珠等。吸附法的优点是被固定的藻类细胞是活的,方法简便。但实际上吸附法是一个复杂的过程。此过程与藻类细胞和载体所带的电荷,两者的特性以及细胞与载体之间发生的相互作用有关。只有这些参数配合适当时才能形成稳定的藻类细胞-载体复合物,才能应用于连续培养的系统。此法的缺点是藻类细胞容易从载体上脱落下来。现在以聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附藻类细胞为例,说明此法的操作步骤。首先把泡沫塑料切成小块(一般在 0.2—0.5cm<sup>3</sup>之间),用水洗净,放在培养基中灭菌之后,把藻种子悬浮液接入培养液中。经过一段时间的培养,藻细胞被吸附到载体上。无菌操作取出固定化藻细胞,用生理盐水洗 1—2 次,放入新鲜的培养基中,继续培养适当时间后取出,把固定化细胞过滤掉,取样分析培养液中的产物。

2. 包埋法:将藻类细胞用物理的方法包埋各种载体中,例如:琼脂、琼脂糖、角叉菜聚糖、海藻酸盐等。现列举三例。

(1) 海藻酸盐包埋法:在室温下以无菌操作将配制成一定浓度(一般在 2—8%之间)的海藻酸盐和藻细胞均匀地混合后,滴注到 0.05—0.2mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中,形成凝胶小珠。此法操作简便,制备成活的固定化藻类细胞。

(2) 琼脂包埋法: 将配制成一定浓度的琼脂(一般在2.5—5.0%之间)加热溶化后,在30℃左右和藻细胞混合均匀,快速冷至10℃左右切成0.2—0.5mm<sup>3</sup>小块,或者分散在适当的液体中快速搅拌形成小珠状,内含有均匀的藻细胞。此法主要的缺点是琼脂的机械强度较差。

(3) 角叉菜聚糖包埋法: 通常将角叉菜聚糖配成2—4%的浓度,在35℃以上和藻细胞混合均匀,快速冷至10℃左右,加到2% KCl溶液中。根据需要可制成珠状、片状或切成小块。包埋在此载体中的藻细胞,一般不影响藻细胞的新陈代谢。

## (二) 反应器的类型

目前用于培养固定化藻类细胞的反应器有四种类型。填充床反应器,流动床反应器,平行-板式反应器和气升式反应器。在前两种反应器中通气,光照和固定化藻细胞的接触常常会出现不均匀的情况。第三种反应器有利于日光能的有效利用。第四种反应器具有提供均匀的反应系统的优点,为实验室经常采用。至今在国外的许多实验室仍然常用摇瓶培养。

## (三) 固定化藻类细胞的用途

固定化藻类细胞的用途目前尚处在实验室的研究阶段。由于开展这方面的研究较晚,近几年来才逐渐有较多的科学工作者从事这方面的工作。现将固定化藻类细胞的固定化方法和用途列于表1中。

1. 产氢: 藻类产氢可作为燃料,发电和合成氨的来源。因此用藻类产氢的研究具有重要的意义。用于固定化藻类细胞产氢的研究报道较多<sup>[5-15]</sup>。产氢的藻种有满江红鱼腥藻,柱胞鱼腥藻,佛氏绿胶藻,层理鞭枝藻,灰色念珠藻,沼泽颤藻,层理席藻,紫色紫球藻和斜生栅藻等。用固定化藻类细胞产氢的研究已引起了科学工作者的兴趣,曾发现佛氏绿胶藻,灰色念珠藻和层理鞭枝藻连续产氢超过9天<sup>[7]</sup>,柱胞鱼腥藻21天<sup>[10]</sup>和57天<sup>[11]</sup>。Hall等<sup>[8]</sup>和Shi等<sup>[9]</sup>报道,把满江红鱼腥藻分别固定在聚氨基甲酸酯泡沫塑料和聚乙烯泡沫塑料中5个月之后,固定化藻细胞分别产氢约为800μmol/mg

叶绿素和400μmol/mg叶绿素。Kayano等<sup>[16]</sup>和Welltall等<sup>[17]</sup>报道,分别把小球藻和组囊藻共固定化后,成功地用来还原NADP,接着分别由梭菌和红螺菌在一个共固定化的反应系统中,把水生物光解产生氢。氢释放速度达1.34μmol/mg叶绿素/h<sup>[16]</sup>。

2. 产生电流: Ochiai等<sup>[18,19]</sup>报道,分别把层理席藻和层理鞭枝藻固定在SnO<sub>2</sub>光透射电极上,前者产生的光电流为8μA/10μg叶绿素/cm<sup>2</sup>,后者产生光电流为2.5mA/mg叶绿素/cm<sup>2</sup>,并能连续运转20天以上<sup>[18]</sup>。Kayano等<sup>[22]</sup>把鱼腥藻包埋于琼脂中,在光照条件下释放氧,通过在一个反应器中的好气菌(枯草杆菌)利用掉,由该藻产生的氢通过光化学燃料电池系统,氢转化为电流的比例为80—100%。

3. 产烃: 丛粒藻是用于固定化细胞产生石油烃类的主要藻种之一。该藻是一种群生的浮游生物,广泛分布于淡水湖泊中,也在第三纪石油有机物沉积中发现了它们的化石。该藻产石油烃类高达细胞干重的15—75%,故有“油藻”之称。有报告指出,在有石油沉积的地方,几乎所有的有机质都是由丛粒藻造成的<sup>[20]</sup>。所以人们设想,通过大量培养这种藻作为获得持久性生物能源的途径。据Bailliez等<sup>[21-24]</sup>和Largreau等<sup>[25]</sup>报道,把丛粒藻分别固定在海藻酸盐和聚氨基甲酸酯泡沫塑料中,产烃量分别为0.167g/L和0.439g/L。Yang等<sup>[26]</sup>把该藻固定在纱布上产烃量为0.8g/L左右,为藻细胞干重的20%以上。

4. 固氮: 用于固氮的固定化藻种有满江红鱼腥藻和层理鞭枝藻等。固氮的藻种产生固氮酶,用它催化乙炔的还原速度表示固氮的效果。据Shi等<sup>[27]</sup>报道,固定在聚氨基甲酸酯泡沫塑料中的满江红鱼腥藻对乙炔还原速度高于游离细胞。特别是在培养10—20天后,该藻固氮酶的活力高于游离藻细胞的5—10倍。把该藻分别固定在海藻酸盐和聚乙烯泡沫塑料中,连续光照40小时之后,总的乙炔还原量也是游离藻细胞的5—10倍,而且固定化藻细胞在40天后,固氮酶活力仍然很高,而游离藻细胞的固氮

表1 固定化藻类细胞的制备方法和用途

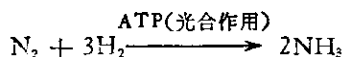
藻名称	制备方法	用途	文献
满江红鱼腥藻 ( <i>Anabaena azollae</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附; 聚乙烯泡沫塑料吸附	氢	[5,6,8,9]
柱胞鱼腥藻 ( <i>A. cylindrica</i> )	聚乙烯泡沫塑料吸附; 玻璃珠吸附	氢	[6,10,11]
鱼腥藻 ( <i>A. sp.</i> )	琼脂包埋		[12]
佛氏绿胶藻 ( <i>Chlorogloea fritschii</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	氢	[5-7]
层理鞭枝藻 ( <i>Mastigocladus laminosus</i> )	琼脂包埋; 海藻酸盐包埋; 聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	氢	[5,7,13]
灰色念珠藻 ( <i>Nostoc muscorum</i> )	琼脂包埋; 聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	氢	[5-7]
沼泽颤藻 ( <i>Oscillatoria limnetica</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	氢	[6]
层理席藻 ( <i>Phormidium laminosum</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附; 海藻酸盐包埋;	氢	[5,6,13]
紫色紫球藻 ( <i>Porphyridium purpurcum</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	氢	[14]
斜生栅藻 ( <i>Scenedesmus obliquus</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附; 海藻酸盐包埋	氢	[14,15]
鱼腥藻 ( <i>Anabaena sp.</i> )	琼脂包埋	电	[12]
层理鞭枝藻 ( <i>Mastigocladus laminosus</i> )	海藻酸盐包埋	电	[18]
席藻 ( <i>Phormidium sp.</i> )	海藻酸盐包埋	电	[19]
丛粒藻 ( <i>Botryococcus braunii</i> )	海藻酸盐包埋; 聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附; 纱布吸附	烃	[21-26]
满江红鱼腥藻 ( <i>Anabaena azollae</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附; 聚乙烯泡沫塑料吸附; 海藻酸盐包埋	固氮	[8,28]
层理鞭枝藻 ( <i>Mastigocladus laminosus</i> )	聚乙烯泡沫塑料吸附	固氮	[29]
满江红鱼腥藻 ( <i>Anabaena azollae</i> )	海藻酸盐包埋	氮	[9,29]

藻 名 称	制 备 方 法	用 途	文 献
鱼腥藻 ( <i>Anabaena</i> sp.)	海藻酸盐包埋	氮	[30,35]
层理鞭枝藻 ( <i>Mastigocladus laminosus</i> )	聚乙烯泡沫塑料吸附	氮	[8]
墨西哥衣藻 ( <i>Chlamydomonas mexicana</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	多糖	[37]
裸衣藻 ( <i>Chlamydomonas gymnogama</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	多糖	[37]
沙角衣藻 ( <i>Chlamydomonas sajuo</i> )	聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料吸附	多糖	[37]
紫球藻 ( <i>Prophoridium cruentum</i> )	聚氨基泡沫塑料包埋	多糖	[38-43]
小杜氏藻 ( <i>Dunaliella parva</i> )	海藻酸盐包埋	甘油	[57]
杜氏藻 ( <i>Dunaliella tertiolecta</i> )	海藻酸盐包埋	甘油	[47]
蛋白核小球藻 ( <i>Chlorella pyrenoidosa</i> )	海藻酸盐包埋	二羟丙酮	[48]
埃默森小球藻 ( <i>Chlorella emersonii</i> )	海藻酸盐包埋	乙醇酸盐	[46]
巢形组囊藻 ( <i>Anacystis nidulans</i> )	琼脂包埋; 琼脂糖包埋	生物转化/ 共固定化	[17,49]
普生小球藻 ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	琼脂糖包埋	生物转化/ 共固定化	[49]
弯曲栅藻 ( <i>Scenedesmus arcutus</i> )	角叉菜聚糖包埋	氮/磷吸收	[44]
斜生栅藻 ( <i>Scenedesmus obliquus</i> )	角叉菜聚糖包埋	氮/磷吸收	[44]
四尾栅藻 ( <i>Scenedesmus quadricauda</i> )	角叉菜聚糖包埋	氮/磷吸收	[58]
地中海伞藻 ( <i>Acetabularia mediterranea</i> )	海藻酸盐包埋	水处理	[59]
海囊藻 ( <i>Halicystis parvula</i> )	海藻酸盐包埋	水处理	[59]

藻名称	制备方法	用途	文献
囊状法囊藻 ( <i>Valonia utricularis</i> )	海藻酸盐包埋	水处理	[53]
<i>Pratoshorea kopfii</i>	琼脂包埋	烃生物积累	[45]
纤细裸藻 ( <i>Euglena gracillus</i> )	海藻酸盐包埋	细胞学/贮存	[50]
帕斯克毛枝藻 ( <i>Stigeoclonium pascherii</i> )	海藻酸盐包埋	生理/生化	[60]
斜生栅藻 ( <i>Scenedesmus obliquus</i> )	血清清蛋白,戊二醛交联/海藻酸盐包埋	生理/生化	[61]

酶活力没有被测定出来<sup>[6]</sup>。Hall 等<sup>[29]</sup>报道,固定在聚乙烯泡沫塑料中的层理鞭枝藻对乙炔还原的速度为  $3.6\mu\text{mol}$  乙炔还原/ $\text{mg}$  叶绿素/ $\text{h}$ ,比游离藻细胞还原的速度快得多。从这些研究的结果表明,固定化藻细胞的固氮效果比游离藻细胞好得多。

5. 产氨:用于固定化细胞产氨的藻种有满江红鱼腥藻,柱孢鱼腥藻和层理鞭枝藻等。据报道<sup>[6]</sup>,满江红鱼腥藻通常有两种类型的细胞,即营养细胞和异形细胞。后者产生固氮酶。该藻能固定大气中的氮,在有磷酸腺苷(ATP)存在时通过光合作用把氮还原为氨,见下列反应式。



据 Hall 等<sup>[28]</sup>报道,在有 MSX(L-methionine-D<sub>2</sub>L-sulfoximine, 谷酰胺合成酶的抑制剂,干涉细胞把氮转到有机氮)存在时,固定在聚乙烯泡沫塑料上的满江红鱼腥藻产氨速度达  $390\mu\text{mol}/\text{mg}$  叶绿素/ $24\text{h}$ ;而固定在海藻酸盐中的满江红鱼腥藻的产氨量达  $160\mu\text{mol}/\text{mg}$  叶绿素/ $24\text{h}$ 。Kerby 等<sup>[29]</sup>报道,包埋于上述载体中的满江红鱼腥藻在有 MSX 存在时,产氨的最高速度达  $40.8\mu\text{mol}/\text{mg}$  叶绿素/ $\text{h}$ ,对突变型的藻株不加 MSX,产氨速度达  $112.2\mu\text{mol}/\text{mg}$

叶绿素/ $\text{h}$ 。Brouers 等<sup>[30]</sup>报道,将培养液通过装有聚乙烯泡沫塑料固定的满江红鱼腥藻的柱式反应器( $2 \times 25\text{cm}$ ),稀释率  $0.4/\text{h}$ ,连续光照,运转 400 小时以上,最高产氨浓度为  $5.5 \times 10^{-4}\text{mol}/\text{L}$ 。这些结果表明,有可能用固定化满江红鱼腥藻细胞设计一种生物反应器用来转化日光能,水和大气中的氮为氨作为肥料。英国皇家学院,苏格兰的 Dundee 大学,以色列,印度和美国的一些研究单位已完成了光合氨的生物反应器的研究和发展<sup>[35]</sup>。

6. 多糖的生产:据 Yang 等<sup>[36]</sup>报道,把三株衣藻分别固定在聚氨基甲酸酯泡沫塑料中,产生胞外多糖为  $2\text{g}/\text{L}$  左右,与游离藻细胞的产量接近。较长时间的研究是由 Gudín 等<sup>[37-41]</sup>和 Thepenier 等<sup>[42]</sup>完成的。他们把紫球藻固定在上述的载体上连续产多糖超过 17 个月,产生的多糖为  $0.7\text{g}/\text{天}/\text{m}^2$  反应器的面积。

7. 废水处理:据 Chevalier 等<sup>[43]</sup>报道,固定在角叉菜聚糖中的弯曲栅藻和斜生栅藻能从废水中吸收 90% 的氨和 100% 的磷酸盐。Pore 等<sup>[44]</sup>对聚氯化烃的生物累积的研究结果表明,固定在琼脂中的佐夫原盖藻除去溶液中的烃类化合物的效率类似活性炭。

8. 其它:据 Day 等<sup>[45]</sup>报道,用海藻酸盐包埋的小球藻生产乙醇酸盐,运转 6 个多月,产量

为 52—69 $\mu\text{g}/\text{mg}$  叶绿素/h。包埋于上述载体中的杜氏藻产生甘油量为 5g/L<sup>[46]</sup>。Adlercrentz 等<sup>[47]</sup>报道,采用共固定化在海藻酸盐中的蛋白核小球藻和葡萄糖酸杆菌的反应器生产二羟丙酮,发现有固定化藻细胞比没有藻细胞的相同反应器累积的二羟丙酮多 5.4 倍。原因是在光合作用期间由于藻细胞释放氧气,由此提供了异氧菌对氧气的需要,因而提高了固定化细胞的生产率。

#### (四) 固定化对藻类细胞生产率的影响

许多研究报告指出固定化藻类细胞比游离细胞的生产率高。例如,固定在海藻酸盐中的丛粒藻比游离细胞的产氧量高 16%<sup>[23]</sup>。固定化的鱼腥藻在光化学燃料电池系统中释放的氢高于游离细胞的 3 倍<sup>[22]</sup>。固定在聚乙烯泡沫塑料中固氮的层理鞭枝藻对乙炔还原的初速度高于游离细胞的 10 倍<sup>[28]</sup>。但是也有固定化藻细胞的生产率比游离细胞的低。例如,包埋于琼脂糖中的巢形组囊藻和鱼腥藻产生的 $\alpha$ -酮酸仅为游离细胞的 13—30%<sup>[48]</sup>。固定在聚氨基甲酸酯泡沫塑料中的紫球藻对多糖的生产仅为游离细胞的 35%<sup>[42]</sup>。

#### (五) 固定化对藻类细胞生长和生理学的影响

固定化对藻类细胞生长的影响,一般采用破碎载体用计数器直接计算藻类细胞的数目或者称干重(生物量)来表明藻类细胞的生长状况。从计算细胞生长的数目来看,生长速度较低于游离细胞<sup>[23,49]</sup>。由于固定化细胞在载体中有漏失现象,也很难精确地测定出细胞生长的数目。这种办法仅限于单细胞藻类中使用。固定化藻类细胞叶绿素含量已发现较高于游离藻细胞<sup>[49,51]</sup>。可能由于自我遮暗(selfshading)和在固定化状态下入射光的减少,结果促进了光合色素的合成。

固定化对藻类细胞生理学方面的影响已有许多作者做了光合放氧的研究,其中最令人感兴趣的是 Bailliez 等<sup>[24]</sup>发现了固定化丛粒藻细胞释放的氧高于游离细胞的 3 倍。在固定化藻类细胞的呼吸速度方面的研究,Robinson 等<sup>[49]</sup>

发现固定化小球藻的呼吸速度低于游离细胞。固定化藻类细胞颗粒的大小和在载体中藻类细胞的浓度直接影响到呼吸速度,这表明直接影响到固定化藻类细胞的代谢活性。

固定化藻类细胞的 77K 荧光发射光谱已被用作提供蛋白质-叶绿素复合物和能量转化的信息。Bailliez 等<sup>[24]</sup>指出固定化对丛粒藻的蛋白质-叶绿素复合物稳定性有某些影响。Tampouret 等<sup>[50]</sup>也发现了类似的结果。

各种光学显微镜,透射电子显微镜和扫描电子显微镜已完成了固定化藻类细胞形态学的研究。大多数的研究表明固定化几乎没有改变单细胞藻类<sup>[43,51]</sup>和多细胞藻类<sup>[32]</sup>的形态。据报道,固定化丛粒藻群体在形态上较规则,大小为游离细胞的 2.5 倍<sup>[23]</sup>。用电子显微镜观察固定在海藻酸钙小珠中的小球藻生长在载体小珠的外围<sup>[45,49,52]</sup>,进一步的研究表明此结果是  $\text{CO}_2$  在载体中的扩散受到限制。在裸藻细胞学的研究中<sup>[50]</sup>用透射电子显微镜观察固定在海藻酸钙中的藻细胞贮存在黑暗、4 $^{\circ}\text{C}$ 、0.1mol/L $\text{CaCl}_2$  溶液中,形态没有变化。这在藻类细胞培养物的保藏中,有可能作为长时间贮存藻株的有用方法。

#### (六) 今后的研究方向

固定化藻类细胞的研究仍处于初期阶段,大多数的报道是关于固定化后对藻类细胞的生长,形态,生理和生物化学以及代谢产物等方面的影响。在应用方面,除了藻类本身作为食品在市场上有较多量的出售之外,其它产品很少。从研究固定化藻细胞的应用角度考虑,今后需要开展以下几方面的工作。

1. 选育优良的藻种,以便进行固定化的研究和应用。采用遗传工程中的一些方法,增加所希望的特性的表达。真核藻类细胞容易通过杂交技术获得杂交特性<sup>[53]</sup>。采用原生质体融合技术和遗传育种也是可能的。新的代谢过程的引入(通过外源 DNA 的结合),用遗传操作技术是可能达到的,例如,巢形组囊藻天生具有接受外源染色体 DNA 的能力<sup>[54,55]</sup>。

2. 新产品的开发:用藻类生产药物和精细化工产品。例如从蓝藻提取出的产品在体外和

体内均能有效地抗癌<sup>[56]</sup>。从蓝藻中提取藻胆蛋白磷光染料。此染料是用于免疫测定临床诊断试剂盒的重要组成部分之一<sup>[56]</sup>。

3. 固定化方法的研究: 现在仅有吸附法和包埋法两种, 今后仍需要研究更简便, 无公害, 廉价的方法, 其中也包括新载体的研制。

4. 研制高效的生物反应器, 以提高固定化藻细胞的生产率和重复使用的稳定性等。

近几年的研究表明, 今后对固定化藻类细胞的研究和应用, 在一段时间内可能被限制在体积小, 价钱贵的一些产品中。

藻类在自然界分布很广, 是栖息在各种环境中的生物, 其中有相当大的一部分未开发的资源, 这一大类的低等植物有待于人们去开发利用。目前在国外已积极开展这方面的研究并成立专门的研究机构。例如日本科技界在加紧筹建“海洋生物技术研究会”。发起人是东京大学应用微生物研究所所长官地重远。他在研究藻类光合成能力比其它植物强得多的机制时, 发现了在光合成过程中起关键作用的酶。科学家们预感到拥有广泛来源的食品资源和工业原料的藻类, 必将生出下一代技术革命的萌芽。

### 参 考 文 献

- [1] Benemann, J. R. et al.: *Tibtech-February*, 5: 47—53, 1987.
- [2] Kawaguchi, K.: in *Algae Biomass: Production and Uses*, Elsevier, p. 25, 1980.
- [3] Ben-Amotz, A. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 95, 1983.
- [4] Ben-Amotz, A. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 6: 297, 1981.
- [5] Rao, K. K. et al.: *Trends in Biotechnol.*, 2: 124, 1984.
- [6] Muallem, A. et al.: in *Biotech 83*, P. 1037, 1983. (Northwood, Middlesex: Online Conference Publication).
- [7] Muallem, A. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 5: 365, 1983.
- [8] Hall, D. O. et al.: *Photobiochem. Photobiophys.*, Suppl., 167—180, 1987.
- [9] Shi, D. J. et al.: *Planta*, 172: 298—308, 1987.
- [10] Smith, G. D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 213, 1981.
- [11] Lambert, G. R. et al.: *FEBS Lett.*, 101: 125, 1979.
- [12] Kayano, H. et al.: *Proc. J. Appl. Microbiol. E:otechnol.*, 12: 1—5, 1981.
- [13] Rao, K. K. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 10: 525,

- 1982.
- [14] Brouers, M. et al.: in Hall, D. O. et al. (Eds.), *Photochemical, Photoelectrochemical and Photobiological Processes*, 2: 171, 1983. (Dordrecht: Reidel Publishing Co.).
- [15] Brouers, M. et al.: in Sybesma, C. (Ed.), *Advances in Photosynthesis Research*, 2: 773, 1984. (The Hague: Nijhoff/Junk Publishers).
- [16] Kayano, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 638: 3, 1981.
- [17] Weetall, H. H.: *J. Solid-Phase Biochem.*, 5: 115, 1980.
- [18] Ochiai, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2442, 1980.
- [19] Ochiai, H. et al.: *Appl. Biochem. Biotech.*, 8: 289, 1983.
- [20] 何承全: *古生物学报*, 20(2): 115—125, 1981.
- [21] Bailliez, C. et al.: *C. R. Acad. Sci. Paris (III)*, 296: 199, 1983.
- [22] Bailliez, C. et al.: In Strub, A. et al. (Eds.), *Energy from Biomass*, P. 286, 1983. (London: Applied Science Publishers).
- [23] Bailliez, C. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 99—105, 1985.
- [24] Bailliez, C. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 361, 1986.
- [25] Largeau, C. et al.: in *Proceedings of International Congress of the Applied Algology Society, Marine, France*, P. 1—9, 1987.
- [26] Yang, L. W. et al.: in press.
- [27] Shi, D. J. et al.: in *Proceedings of the VIIth International Congress on Photosynthesis Providence, Rhode, Island, USA, August. 10—15, 1986*.
- [28] Hall, D. O. et al.: in *Annual Proceedings of the Photochemical Society of Europe*, Fullertal, K. W. et al. (Eds.), 26: 161—185, 1985.
- [29] Kerby, N. W. et al.: in *Biotech' 83*, P. 1029, 1983. (Northwood, Middlesex: Online Conference Publications).
- [30] Musgrave, S. C. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 4: 647, 1982.
- [31] Musgrave, S. C. et al.: in *Proc. Conf. Advances in Fermentation*, Suppl. to *Proc. Biochem.*, P. 184, 1983. (Rickmansworth: Turret Wheatland Ltd.).
- [32] Musgrave, S. C. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 133, 1983.
- [33] Jeanfils, J. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8: 265, 1986.
- [34] Brouers, M. et al.: *Photosynthesis Research*, 11(12): 645—648, 1987.
- [35] Shi, D. J. et al.: *Plants Today*, Jen-Feb., p. 5—12, 1988.
- [36] Yang, L. W. et al.: in *International Conference on Enzyme Engineering*, Helsingør, Denmark, P. 215, 1985.
- [37] Gudín, C. et al.: *C. R. Aca. SC. Paris (III)*, 293: 35—37, 1981.
- [38] Gudín, C. in Palz, W. et al. (Eds.), *Energy from Biomass*, P. 659, 1981. (London: Applied Science Publishers).

(下转第 83 页)

- [39] Gudín, C. et al.: in Hall, D. O. et al. (Eds.), *Solar World Forum*, P. 2255, 1982. (Oxford: Pergamon Press).
- [40] Gudín, C., in Villet, R. (Ed.), *Biotechnology for the Production of Chemicals and Fuel from Biomass*, P. 113, 1982. (Golden, Colorado: Solar Energy Research Institute).
- [41] Gudín, C. et al.: in *Biotech' 84*, P. 541, 1984. (Northwood, Middlesex: Online Conference Publications).
- [42] Thepenier, C. et al.: *Biomass*, 7: 225—240, 1985.
- [43] Chevalier, P. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 621, 1985.
- [44] Pore, R. S. et al.: *J. Environ. Sci. Health (A)*, 16: 51, 1981.
- [45] Day, J. G. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 7: 573, 1985.
- [46] Grizeau, D. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8: 261, 1986.
- [47] Adlercreutz, P. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 4: 395, 1982.
- [48] Wikstrom, P. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 4: 153, 1982.
- [49] Robinson, P. K. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 212, 1985.
- [50] Tamponnet, C. et al.: *Physiol. Plant.*, 63: 277, 1985.
- [51] Brouers, M. et al.: in Hall, D. O. et al. (Eds.), *Photochemical, Photoelectrochemical and Photobiological Processes*, 1: 134, 1982. (Dordrecht: Reidel Publishing Co.).
- [52] Dainty, A. L. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 210, 1986.
- [53] Luning, K. et al.: *Phycologia*, 17: 293, 1978.
- [54] Orkwiszewski, K. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 98: 31—37, 1984.
- [55] Shetakov, S. V. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 107: 372—375, 1970.
- [56] Lem, N. W. et al.: *Biotech. Adv.*, 3: 195—208, 1985.
- [57] Grizeau, D. et al.: *Comptes Rendus de l'Association Française Pour l'Algologie Appliquée*, p. 185, 1983.
- [58] Chevalier, P. et al.: *J. Biotechnol. Lett.*, 7: 395, 1985.
- [59] Buchner, K. H. et al.: *Planta*, 154: 318, 1982.
- [60] Nicholas, P. J.: *Studies on the Immobilization of Filamentous Algae*: BSc Project, 1986. CNA A, Hatfield Polytechnic.
- [61] Jeanfils, J. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 254, 1983.