

## 知识介绍

## 酶 和 细 胞 的 固 定 化

王洪祚 刘世勇

(武汉大学化学系 武汉 430072)

**摘要** 本文对酶和细胞固定化技术的近期发展作了较为全面的扼要综述。

**关键词** 酶、细胞、固定化

酶和细胞的固定化是指利用化学或物理的手段将游离的细胞或酶定位于限定的空间区域并使其保持活性和可反复使用的一种基本技术。从本世纪六十年代以来,这一技术发展十分迅速,它克服了自由酶在应用中对环境敏感、性质不稳定,易在酶促反应中失活及产物难以分离提纯的缺点,逐步开始在医学、化学分析、环境保护、能源开发等许多领域得到应用。1985年日本政府推行的“Biofocus WT”大型研究计划曾引起了世界关注,固定化细胞的研究就是其中重要内容之一。目前,国内外已有不少这方面的专著及综述发表<sup>[1,2]</sup>。在我们前文<sup>[3]</sup>全面介绍和评述各种主要的固定化方法基础上,本文重点综述其近期发展动态。

## 1 通用载体的改善与研究

1. 以海藻酸盐、卡拉胶、壳聚糖、琼脂等为代表的天然高分子凝胶仍应用较广,它们虽有价廉易得、对生物无毒、传质性能好的特点,但强度低、厌氧条件下易被生物分解,为此,连续有不少改善研究报告。

为克服海藻酸钙凝胶在使用过程中不能抵抗细胞生长所必需的高浓度的磷酸盐和  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Na^+$  等阳离子,不耐热、凝胶强度不够及易破碎溶解的不稳定性质,海洪<sup>[4]</sup>、顾缪等用聚乙烯亚胺溶液来处理海藻酸钙凝胶,中野<sup>[5]</sup>将固定成型后的海藻酸钙凝胶置换成海藻酸铝,段俊英等通过加入甾醇、不饱和脂肪酸及改变  $CaCl_2$  浓度等<sup>[6]</sup>均可达到提高凝胶粒子

的机械强度,改善固定化细胞稳定性目的。添加  $2g/l CaCO_3$  也能使制得的海藻酸钙固定化颗粒在发酵时能保持稳定。Lee, K. H. 比较了未包覆的及分别用壳聚糖、聚乙烯亚胺和聚乙烯亚胺-戊二醛包覆的海藻酸钙的固定化效果,发现第二种包覆最佳<sup>[7]</sup>。Dragalova 报道了用一种水不溶性聚电解质包覆海藻酸钙凝胶的改善方法。也有人将海藻酸钙凝胶与活性炭粉末、硅胶、聚乙烯醇(PVA)等形成复合物载体的报道。

天然的卡拉胶在分离出影响其强度的  $\lambda$ -角叉菜胶成份后,强度及稳定性均有提高,在酶和细胞固定化中应用较广,为改善其耐压力、捕集能力及贮存稳定性,有人添加不同浓度的具有保水特性的多醇(甘油、丙二醇、角豆胶等)可长时间维持酶高活力。将卡拉胶、海藻酸盐和细胞或酶混合形成液体,在  $CaCl_2$  中海藻酸钙胶体,胶化后再用化学方法去除海藻酸盐而得到了多孔性的卡拉胶。将卡拉胶与 PVA<sup>[9]</sup>、丹宁、壳聚胺、聚乙烯亚胺复合或直接将卡拉胶胶化,则由于可分别形成氢键、聚离子复合物等而大大提高其稳定性。研究表明,卡拉胶固定化链霉菌株在 KCl 溶液中 40min 时硬度最大,而氧吸收速率降至暴露 2min 时的 20%。Scott 还进行了氧气在卡拉胶中的扩散作用研究,发现制备时的温度及金属离子

国家自然科学基金资助项目

1996-09-15 收稿

(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  等) 的存在却直接影响着氧在胶中的扩散。

琼脂化学性质稳定, 但强度低、透过性差, 添加聚丙烯酰胺一类聚合物可加强琼脂载体的强度。用海藻酸钙浸泡使琼脂珠成为多孔状不仅可提高其强度, 还能提高其扩散性能。王叔亭<sup>[10]</sup>报道了两相成珠法制备琼脂珠, 其通透性有很好改善。

壳聚糖安全无毒、生物相容性好, 可在室温下凝胶化, 在磷酸盐缓冲液,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  离子存在下都稳定, 对热亦稳定, 可得高密度、高活性固化酶及细胞, 是较为理想的载体材料之一。Hirano<sup>[11]</sup>研究了壳聚胺及其N-乙烯基、N-羟基、N-巯基酰基衍生物形成凝胶的机理, 并用于固定化酶及细胞<sup>[11]</sup>。壳聚胺与  $\text{CaCl}_2$  等通过离子移变形成凝胶或与卡拉胶、羧甲基纤维素钠形成复合凝胶都有不少报道。王芝祥用葡聚糖与环氧氯丙烷在无外相条件下合成凝胶, 所得产品纯净, 符合生物技术要求, 物理性质稳定, 克服了传统方法缺点。用缩水甘油醚改性制得的低温可凝胶化的琼脂衍生物作载体亦有良好性能。

2. 合成高分子凝胶一般比天然高分子的强度为好, 但其传质性能较差, 在进行细胞包埋时有时会影响到其活性。为此围绕最常用的聚丙烯酰胺 (PAm) 及聚乙烯醇 (PVA) 的改性有较多报道。日本日立工厂建设公司在“Biofocus WT”计划实施中, 最先采用 PAm 包埋硝化细菌去除水中氮, 但因其有一定毒性, 用后颗粒处理是个问题, 因而换用聚乙二醇系列树脂。而 PAm 有多种途径进行改善, 如为克服凝胶交联过程中放热及单体和交联剂自身的一些毒性造成的细胞及酶失活现象, 设乐<sup>[12]</sup>等先用琼脂包埋细胞, 再用 PAm 包埋的二次固定法。Nisson 等人报道了在充氮降温条件下, 在甲苯-氯仿溶液中制备 PAm 胶粒。春见隆文等则充氮去氧, 加致冷剂速冻到  $-78^{\circ}\text{C}$ , 再用  $\gamma$  射线、X-射线或电子束进行辐射聚合的方法。还有在聚合过程中添加木屑、多孔硅或纤维素等成形助剂的专利报道。周定<sup>[13]</sup>采用冷冻 PAm

聚合方法包埋黑曲霉生产柠檬酸, 包埋的微生物活性高, 适应期短, 可重复使用 15 批次, 使用 300 小时后活性无明显下降。在 PAm 固定葡萄糖异构酶时, 在聚合过程中添加葡萄糖可保护酶活性不变。采用 PAm-PVA, PAm-琼脂等复合固定的方法均有良好效果。李金峰等采用反相悬浮聚合法制备 PAm 及其共聚物来包埋简单杆菌效果显著。

PVA 凝胶常用冷冻法及硼酸法来制备, 其强度较度、价格低廉、对生物的毒性比 PAm 小, 是通用的固载体之一。江波曾用 DSC、动态光散射等物理方法, 仔细研究了水凝胶中水的存在状态及其相应结构。为克服交联不彻底导致使用中少量 TOC 成份溶出及高温时强度下降的缺点, 田中<sup>[14]</sup>在用硼酸法固定细胞时, 先用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  将硼酸的 pH 值调到 6.7 左右, 或将制成的凝胶在水中浸泡几天, 发现可提高其在高温使用时的稳定性。在 PVA 凝胶制备过程中加入少量活性炭粉末, 有提高强度增加传质速度的效果。而且在水污染处理时当进水不稳定或难降解组份突然进入系统时亦可显示出单一 PVA 凝胶所不能比拟的优势。近期报道的 PVA-ECH (环氧氯丙烷) 法合成的 PVA 水凝胶, PVA 与海藻酸钙混合物循环冷冻制得的凝胶, 将成形剂与凝胶增强剂作用结合在一起, 使载体具有良好耐化学性及抗水性, 形成过程不发生剧烈化学反应<sup>[15]</sup>。PVA 与 PAm 或天然卡拉胶的复合物作为载体仍有较多报道。李福锦等<sup>[16]</sup>对 PVA 进行了许多改性工作, 将 PVA 与对苯二甲醛, 以乙二醇、多缩乙二醇作致孔剂, 并以油包水型悬浮体系制备了球状大孔水不溶性 PVA, 还可进一步通过缩醛反应或酯化反应得到相应含有胺基、羧基的功能性载体, 后者尚可与 N-羟基丁二酰亚胺反应得到活性酯, 在较温和条件下与细胞和酶偶联。国外有报道<sup>[17]</sup>将酶或微生物悬浮液加入到含有乙酰乙酸乙酯基团的 PVA 载体中, 在 30 时即可平稳进行交联, 最大限度地保持了酶和细胞的活性。梁金钟曾有用 PVA 作覆膜载体的报道。

Renneberg<sup>[18]</sup>曾测定了氧气在 16 种合成

聚合物凝胶中的扩散系数,发现凝胶中水的含量对其扩散有重要作用,含量越高,系数越高。Yoshida<sup>[19]</sup>发现用由亲水性及疏水性单体构成的共聚物固定葡萄糖淀粉酶法,酶的活力比单独使用亲水性聚合物包埋时要高,后者易使酶泄漏。Kanakama亦曾比较分别使用聚甲基丙烯酸 $\beta$ 羟乙酯(PHEMA),聚丙烯酸羟乙酯(PHEA)及聚环氧乙烯二甲基丙烯酸酯固定木瓜酶,在相同固定化条件下,在疏水性相应较大的PHEA凝胶中活性最高。

## 2 不同固定化方法的联用

为平衡传统单一固定化方法使用中的优缺点,联合固定化的应用有较多报道。包埋-交联法应用较早,含青霉素酰化酶的大肠杆菌及含天门冬氨酸酶的大肠杆菌等分别先用明胶包埋,再用戊二醛交联有很好效果。Mansfeld<sup>[20]</sup>, Yamashita等分别采用吸附-交联法,先将酶吸附在吸附树脂上,再用交联剂交联,提高了酶的活性及稳定性。邱广明等用此法将A.S.1.398中性蛋白酶吸附于磁性胶体粒子表面,再行交联制得活性达 $2500\mu\text{g}$ 的磁性蛋白酶,有较好耐热性、操作稳定性及重复使用性。杨萍等则采用PVA包埋-吸附法固定酵母发酵生产酒精,方法简便,适于生产。细胞聚集(凝聚)-交联法、包埋-共价结合法均有取得良好效果的报道。有人为克服明胶包埋-戊二醛交联法中戊二醛对微生物的毒性,用高碘酸钾氧化淀粉取代戊二醛作硬化剂,可保持菌体活性,细胞装容量、强度及使用稳定性均非常适应在连续生物反应器中使用<sup>[21]</sup>。

## 3 新型固定化材料和方法的研究

用高分子复合物作载体固定酶及细胞是近年来引人瞩目的发展。高分子复合物是两种不同性质的高分子体系,经由氢键力、库仑力、给、受电子体的相互作用、范德华力、疏水键力等次价力聚集而成。许多天然或(和)合成高分子复合物载体的优良传质性能、对水、电解质及氧的透过选择性和良好的生物相容性显示了

良好的应用前景。王珍治等曾报道用甲壳胺-羧甲基纤维素钠、PVA重氮衍生物-PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)及PMMA分别与聚乙烯基吡啶、聚丙烯酰胺、聚乙烯胺及聚丙烯酰肼的复合物固定纤维素酶,显示了酶活性高、强度高及操作稳定性好的特点。Jiadong用聚丙烯醛磺酸盐与聚乙烯醇缩对二甲胺基苯甲酸的季铵碱的复合物包埋葡萄糖氧化酶, Yang<sup>[22]</sup>等用三醋酸纤维素酯和海藻酸钙的复合物包埋混合好氧菌处理含酚废水,魏东芝用甲壳胺与卡拉胶复合成韧性和透过性良好的网络结构,对改善综合性能均有良好结果。此外PVA-PA<sub>m</sub>, PVA-卡拉胶,丹宁-卡拉胶,聚乙烯亚胺-卡拉胶,琼脂-PA<sub>m</sub>, PVA-海藻酸钙,硅胶-褐藻酸钙,PEAE-纤维素-PMMA及聚乙烯基吡啶-QE-Sephadex A 50等复合物凝胶的应用都有许多报道。王洪祚等<sup>[3]</sup>在离聚体的系统研究基础上,将其引入载体材料与天然及合成高分子分别形成共混及互穿聚合物网络体系,用于酶及细胞的固定化,显示了高分子复合物载体强度高、性质稳定及传质性能好的特点。

用脂质体作载体与酶形成凝聚物来固定酶及细胞也是一种新的尝试<sup>[23]</sup>。另外有人将聚合物如PA<sub>m</sub>涂于具刚性结构的无机载体如氧化铁粒子表面,用于GOD固定化<sup>[24]</sup>,兼有聚合物及无机载体的优良特性。杨惠芳则报道了用PVA涂布无纺布等载体后再用硼酸交联固定细胞,进行了废水脱色处理,有良好效果。

由于固相酶的反应多为异相催化反应,影响催化效率,选用水溶性大分子作载体虽可使反应为均相,但所得固定化酶难于显示便于与产物及底物分离和重复使用的特点。近来有人通过水溶性大分子可发生次级键合力包括氢键-静电力及疏水相互作用等形成水不溶性大分子复合物沉淀的性质,研究了能自行调节沉淀-溶解(沉淀-溶胀)性能的载体材料。Hoshino<sup>[25]</sup>将生淀粉消化酶固定于按不同pH值而可逆地溶解和自动沉淀的载体(A.S.-1)上与凝聚性酵母一起使生淀粉生产出酒精,从而节省了淀粉蒸煮费用。沈家聪<sup>[26]</sup>等则利用自由基沉淀

聚合合成了MAA-顺丁烯二酸酐-Am三元共聚物,利用酸酐基进行木瓜蛋白酶的固定化,可通过调节pH值来改变其沉淀及溶解状态,并发现其临界转变pH值可随共聚物组成变化而不同。陆大年<sup>[27]</sup>通过改变合成聚丙烯酸凝胶组成,第三单体丙烯酰胺的含量、聚合反应浓度及交联剂类型等诸因素,系统探讨了影响水凝胶pH敏感性的规律。Zezin<sup>[28]</sup>认为这一方法结合了固定化酶的均相催化和异相分离的长处。温度敏感的载体即随温度在某一临界值上升降,而使材料规律地呈现溶解和沉淀的性质,已引起许多人的兴趣。典型的如Hoffman<sup>[29]</sup>及Steinke<sup>[30]</sup>等曾分别报道由N-异丙基丙烯酰胺同丙烯酰胺或甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚,用于固定天冬酰胺酶及胰蛋白酶,通过改变温度来调节其在水中的沉淀或溶解(后者表现为沉淀和溶胀)。Liang及国内余锡胜等均有类似报道,合成了N-乙基、正丙基、异丙基、哌啶基丙烯酰胺,N,N-二乙基丙烯酰胺,N,N-二甲基丙烯酰胺,并分别与甲叉双丙烯酰胺共聚而形成温度敏感水凝胶,研究了单体结构、浓度、交联剂用量等对合成及性能影响和相转变温度及程度的关系<sup>[31]</sup>。Kokufuda<sup>[32]</sup>曾用聚乙烯基甲醚凝胶固定葡萄糖苷酶催化麦芽糖水解反应,通过温度调节可逆膨胀和沉淀收缩,控制反应的启动和终止,反应中酶的稳定性比自由酶有较大提高。另一类电场敏感的水凝胶已有报道,将在固定化技术中呈现新的特点。

有报道选用环氧氯丙烷与胺反应的聚合物固定化细胞或酶时,因在碱性及高温下仍可与胺基、羟基及羧基等反应而形成网络结构,因而操作方便、成本低、半衰期长、产率高。在选用戊二醛作共价交联固定化时,若将GA的一端用乙二醇胺先保持后用于载体活化再脱水保护来固定酶或细胞,可有效避免酶或细胞自身交联,而大大提高固定化GOD的活力回收<sup>[33]</sup>。李丽霞还报道血红蛋白可提高固定化GOD活力。在底物反应液中加入还原性物质亦能提高固定化GOD使用稳定性,发现维生素C效果最佳。pH值和温度对酶的表面性质及载

体的微环境都有重大影响,孔维<sup>[34]</sup>报道了调节pH值使酶得到最佳固定化条件及高效率的方法。

碳氟化合物的化学惰性、稳定力学性能、比重大、柱操作流动特性好及非特异性结合特性已被引入到载体材料,包括颗粒、膜、软片、纤维及液滴等多种使用形式。Errede将活性细胞、表面活性剂、无皂聚四氟乙烯及水分散剂混匀成糊浆,高压下成纤应用。Hyde研究指出聚四氟乙烯(PTFE)膜坚固带有韧性,对生长底物有透过性,但对外源细胞或直径大于包埋细胞的胶体物质则无透过性。将其固定化的酿酒酵母用于生产酒精,效果十分理想<sup>[35]</sup>。Kobos及Rucka等围绕PTFE载体的应用亦有较多报道。

水溶液中非共价极性键(通过离子静电吸附、偶极作用及氢键等)作用力是很弱的,而疏水力等非极性力是在水介质中生物大分子间主要作用力之一,对每一个分子量较大的蛋白质来说,疏水效应实际上是保持其空间及生物结构的重要作用之一。基于上述原因,用疏水吸附剂对酶或细胞固定化后,可提高它们的稳定性,有些报道云及半衰期可达半年之久。何炳林等<sup>[36]</sup>合成了一系列具有不同结构的大孔丙烯酸甲酯-二乙烯基苯交联共聚物,以汽油作致孔剂,用多乙烯多胺进行胺解制得有不同功能基的疏水载体,用于氨基酰化酶、脂肪酶、猪胰岛素酶等的固定化,显示了酶活性高、稳定性好的特点。关于各种载体的相应表面形状及化学性质对假单胞菌细胞吸附的影响,国外已有报道<sup>[37]</sup>。Riög用疏水性吸附剂将肝乙醇脱氢酶(ADH)固定在偏二氯乙烯载体上,马林合成了N-烷基琼脂珠衍生物,研究了疏水基团含量对载体吸附固定化天冬氨酸酶效果的影响<sup>[38]</sup>。Beddows及陆兆新等分别合成了接枝共聚物和辐射共聚物,讨论了载体的亲水-疏水环境,共聚物组成中亲疏水单体的含量对固定化酵母活性的影响<sup>[39]</sup>。

#### 4 磁、光、辐射、声等物理新技术的应用

新的物理手段为固定化新方法的应用及传统方法的改进提供了良好条件。

张兆庆<sup>[40]</sup>曾用高梯度磁场进行分离,用超顺磁性磁粉对 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶及蛋白酶进行固定化,实行与产物及底物的磁性分离,固定化酶活性高、稳定性好,酶促反应可随意即时终止。Blackmore曾发现一种具有磁性的细菌,其中含有由磁铁矿构成的磁性粒子,固定于此类磁性粒子上的GOD比固定于人工磁铁或锌铁氧体上的酶活性要高40倍,经五次重复使用,固定化GOD及尿酸酶仍能保持良好活性,已显示具有重要医学应用前景。含有 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的交联PVA微球载体固定过氧化氢酶及普通磁性粒子表面吸附固定酶及细胞均有良好效果。

光交联具有条件温和、易控制交联度及对酶和细胞活性影响不大的优点。贾德民等<sup>[41]</sup>曾较详细介绍了新型光交联聚氨酯对细胞的固定化技术。Yang<sup>[9]</sup>及张国雄等曾报道光交联聚乙烯醇的合成及用于青霉素酰化酶的固定化报道。将乙烯基吡啶的盐(SbQ)与PVA形成光敏材料,再经戊二醛与羟在的反应制得含醛基的PVA-SbQ-GA,将青霉素酰化酶与之混合并经紫外光照射实现固定化,此法酶活性比自由酶高许多倍,比较稳定。Ichiman及Nishio等分别用光敏性预聚物与细胞或酶混合后,光照形成三维交联的聚合物固定化细胞或酶。Bellobono等通过光化学接枝法制得了性能良好的固定化酶的膜,可望在生物传感器中得到应用。

超声波固定化方法在克服加热反应或反应放热可能导致酶及细胞活性下降方面有良好效果,固定化反应不仅可在温和条件下进行,且可随反应温度降低而加速反应。徐僖等<sup>[42]</sup>将高温淀粉酶与PVA等混合后,经20KHZ的空化超声作用二小时,发现酶活性尚存。为减少超声波使酶失活,采用增加酶浓度、加护酶活性

点的抑制剂及在反应器中充氢等气体等方法均有良好效果。

辐射技术用于酶的固定化多将酶与水溶性单体置于缓冲溶液中,在低温下直接用<sup>60</sup>C。辐射引发聚合而使酶包埋固定,酶活力有较大提高。颜文礼<sup>[43]</sup>曾采用低温辐射聚合将葡萄糖淀粉酶固定到聚甲基丙烯酸 $\beta$ 羟乙酯载体上,并探讨了固定化条件及工业化应用的可能性,所得固定化酶性能稳定、活力回收高。利用低温辐射进行接枝聚合制备新型载体的报道也很多。

等离子体技术使载体单位面积固定化酶的量增大,酶结合率较高。Demura等用等离子体引发Am聚合包埋固定化GOD或进行载体的等离子体处理改性,皆使酶稳定性及活性提高。静电吸附法用于酶的固定,可使之长期保存和重复使用,因载体可再生和重新用于固定化,所以成本较低。

#### 5 多酶联合固定化技术的发展

联合固定化是酶、辅酶和细胞固定化技术发展的综合产物。它可充分利用其各自特点,把不同来源的酶和整个细胞的生物催化性能结合在一起。最初是将外来酶固定于固定化完整细胞上,后来发展到将两种、多种酶或微生物细胞以及生物催化剂与底物或其它物质联合固定在一起。Kajiwara将苹果酸脱氢酶和富马酸脱氢酶包埋固定在聚乙二醇双丙烯酸酯凝胶中,用于生产苹果酸。Tanka等将好氧菌Aspergillus Awamori与专性厌氧菌Zymomonas Mobiles联合包埋固定于海藻酸钙中,用于由淀粉直接生产乙醇,前者使淀粉水解,后者生产乙醇。徐俊等将醇脱氢酶、乳酸脱氢酶及辅酶I(NDA)联合固定化,发现辅酶再生能力较强。李春华等<sup>[45]</sup>将葡萄糖淀粉酶、葡萄糖异构酶及 $\alpha$ -淀粉酶联合固定化,使淀粉一步转化为葡萄糖,效果良好。姜涌明等将黑曲霉与过氧化氢酶联合固定化后成功用于葡萄糖生产。国内外已有很多联合固定化的成功报道。

## 6 展望

经历了近三十多年的研究发展, 细胞及酶的固定化技术已成为生物技术中非常活跃的跨学科的研究领域之一。虽然已有不少具有一定规模成功应用的工业实例, 但面对其稳定性及使用效率提高、成本降低及实现较大规模连续应用等方面, 仍存在许多理论及实际问题有待进一步解决。可以展望, 随着酶活性及失活机制这一酶学基本理论的深入研究, 将对细胞和酶的固定化设计及合成和这一生物技术最佳应用条件的选择具有指导意义。除进一步完善从胞外源提取酶作固定化酶外, 使用胞内源酶直接作固定化细胞, 使培养过程保留在不受损害的细胞中且可原位再生其活性, 不仅对控制付反应, 提高稳定性, 而且对细胞内多酶系统的应用有重要作用, 这也是降低成本、适应工业化发展的合适选择。遗传工程、杂交技术、动物细胞技术的发展及新的物理手段的广泛应用和高分子化学等多学科的相互渗透, 无疑地将成为细胞及酶固定化技术的新的推动力。着眼于在具有综合性能的新型载体及简便固定化方法基础上的, 具有效率高、稳定性强的固定化体系及可连续操作与运行的器件的建立, 将必然会使这一技术在更为广泛的领域内得到工业化应用。

### 参 考 文 献

- 1 陈陶声, 居乃虎. 固定化酶理论与应用. 北京: 轻工业出版社, 1987
- 2 Kennedy J P et al Chem. Eng Prog 1990, 86 (7): 81
- 3 王洪祚, 刘世勇. 待发表, 1994
- 4 海洪. 中国抗生素杂志, 1990, 15 (6): 451
- 5 中野. 水处理技术, 1990, 31 (3): 13
- 6 段俊英. 生物工程学报, 1990, 6 (4): 344
- 7 Lee K H. J. Chem. Technol Biotechnol 1992, 54 (4): 375
- 8 Dragalova E K. Biotechnologiya, 1992 (6): 65
- 9 Yang L W. Ann. N. Y. Acad. Sci 1992, 672: 563
- 10 王叙亭. 吉林大学学报 (自然科学版) 1992, (1): 122
- 11 Hirano S. Progr. Biotechnol 1987, (3): 163
- 12 设乐等. 下水道协会志, 1983, 20 (234): 1
- 13 王建龙等. 食品与发酵工业, 1995 (1): 25
- 14 田中等. 用水と水 1988, 30 (6): 36
- 15 Kuraray. JO 2167—077: 19, 12, 88- JP 321681 (27, 06, 90)
- 16 李福绵. 高分子学报, 1993, (6): 753
- 17 Nippon Synth. Chem. JO 2046—288: 08, 08, 88- JP 1985, 36 (15, 02, 90)
- 18 Rennebery R et al Appl Microbiol Biotechnol 1998, 28: 1
- 19 Yoshida J. Macromol Sci Chem. 1980, 14: 555
- 20 Manseld J. Biotechnol Bioeng 1992, 40 (9): 997
- 21 Elisabetta de A Iterilis. Enzyme Microb Technol 1992, 12 (12): 1036
- 22 Yang P Y. Wat. Sci Tech. 1990, 22 (3/4): 343
- 23 Akita H et al Chem. Pharm. Bull 1991, 39 (16): 1632
- 24 Alves da Silva M i Mater Lett 1991, 11 (3): 96
- 25 Hoshino K. Agric Biol Chem. 1989, 53 (7): 1961
- 26 马林等. 高等学校化学学报, 1991, 12 (5): 695
- 27 陆大年. 华东理工大学学报, 1994, (12): 818
- 28 Zezio A B. Makromol. Chem. Makromol Symp. 1989, 26: 249
- 29 Hoffman A S et al J. Controlled release, 1986, 4 (3): 233
- 30 Steinke K et al Ger. Offen DE, 3, 700, 308
- 31 余锡胜等. 高分子学报, 1989, (4): 488
- 32 Kokufuda et al J. Chem. Soc. Commun. 1992, (5): 416
- 33 李丽霞等. 高等学校化学学报, 1987, 8 (6): 562
- 34 孔维等. 生物化学杂志, 1992, 8 (2): 212
- 35 Hyde F W. Appl Environ Microbiol 1991, 57 (1): 219
- 36 何炳林. 离子交换与吸附, 1995, 11 (1): 24
- 37 Prikl Biokhim. Mikrobiol 1993, 29 (1): 138
- 38 马林. 生物化学杂志, 1991, 7 (6): 671, 1993, 9 (5): 534
- 39 Beddows C G et al Biotech Bioeng 1986, 28: 51
- 40 张兆庆. 生物工程学报, 1992, 8 (1): 99
- 41 贾德民. 高分子材料与科学, 1990, (3): 32
- 42 徐儒等. 成都科技大学学报, 1989, (5): 109
- 43 颜文礼. 华侨大学学报, 1993, 14 (3): 320
- 44 Denura M. Biomaterial, 1992, 13 (5): 276
- 45 李春华等. 四川大学学报, 1990, 27 (1): 73