

酶的固定化方法的研究进展

徐莉¹, 侯红萍²

(1.山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801;2.山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801)

摘要: 固定化酶是酶工程的核心,利于实现酶的重复利用及产物与酶的分离。介绍了几种常用的固定化酶的方法,如吸附法、包埋法、交联法和共价结合法,以及近几年研究的一些新型的固定化技术,如交联酶聚集体、定向固定和共固定技术。

关键词: 酶; 固定化; 研究进展

中图分类号:Q814;Q55

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2010)01-0086-04

Research Progress in the Immobilization of Enzymes

XU Li¹ and HOU Hong-ping²

(1. Food Science & Engineering College of Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: Immobilized enzyme is the core in enzyme engineering and it is helpful for the reuse of enzyme and the separation of products and enzyme. In this paper, several commonly-used immobilization methods of enzyme were introduced including absorption method, embedding method, cross-linking method and covalent binding method. Besides, some newly-developed immobilization methods in recent years such as cross-linked enzyme aggregates, orientation fixed and total fixation technique were also introduced.

Key words: enzyme; immobilization; research progress

酶是一类具有催化功能的蛋白质,与化学催化剂相比具有反应速度快、反应条件温和、底物专一性强,可在水溶液和中性 pH 下操作等优点,但同时也存在一些不足,如酶一旦从细胞中分离出来,其活性会迅速下降,由于酶是溶于水的,在水溶液中进行反应,会导致酶和底物、产物从水中分离的困难,不利于循环使用^[1]。

然而,固定化技术的出现彻底解决了这些问题,不仅提高了酶的活性,而且还实现了酶的可重复使用性。近年来,固定化酶的研究得到了人们极大的关注,并取得了许多重要成果。下面以酶的固定化方法为核心,介绍一些有关固定化技术的研究新进展。

1 吸附法

利用多种固体吸附剂将酶或含酶细胞吸附在其表面上而使酶固定的方法。该方法最显著的优点是操作简便,条件温和,不会引起酶的变异失活,且载体价廉易得,可反复使用。但酶与载体结合不牢,极易脱落,所以它的使用受到一定的限制^[2]。因此,人们不断尝试使用新的载体来解决这易脱落的问题。

通常,吸附法分为物理吸附法和离子吸附法。

1.1 物理吸附法

酶被载体吸附而固定的方法称为物理吸附法。从载体对酶的适应性来看,这个方法效果是好的,酶蛋白的活性中心不易受破坏,酶的高级结构变化也不明显,但其缺点是酶与载体的相互作用较弱,被吸附的酶极易从载体表面上脱落下来,不能获得较高活力的固定化酶^[3]。该方法常用的载体有活性炭、多孔陶瓷、纤维素及其衍生物、甲壳素及其衍生物等。

纵伟、刘艳芳等(2008)以磁性壳聚糖微球作为新型载体,并采用物理吸附法固定化脂肪酶,对影响固定化的各种因素进行考察,确定了最优条件,同时比较了游离酶和固定化酶的 pH 值和热稳定性。结果表明,固定化的适宜条件为:加酶量 600 U/g,温度 5 °C, pH 7.0,固定化时间 2 h。固定化酶的 pH 值和热稳定性都优于游离酶,固定化酶连续使用 5 次后,其相对酶活仍为使用前的 57.8%,具有较好的操作稳定性^[4]。

近年来,随着介孔分子筛制备技术的日臻成熟,人们正在考虑用其担当固定化酶的载体。与其他材料相比,介孔分子筛规则的孔道、大的比表面积、极强的吸附性能、稳定的结构等特点,使其具有担当固定化酶载体得天独

收稿日期:2009-10-12

作者简介:徐莉(1984-),女,山西省孝义市,在读硕士研究生,研究方向:食品微生物与食品发酵。

通讯作者:侯红萍,女,教授,硕士生导师,主要从事食品发酵及生物工程等方面的教学与科研工作。主持、参加基金项目与科研项目多项。

厚的优势^[5]。

王炎等(2008)以介孔分子筛 MCM-41 作为载体,采用物理吸附法对漆酶进行了固定化,考察了时间、pH 和给酶量对固定化效果的影响,并对固定化酶的活性及其稳定性进行了研究,讨论了影响固定化过程和固定化酶性质的主要原因。结果显示,在 pH 为 3 时,酶和载体比例为 62.5 mg/g 时吸附 12 h 固定化效果最好,固定化酶活性回收率为 50%。与游离漆酶相比,MCM-41 固定化漆酶的最适反应 pH 略有升高,最适温度没有变化,其 pH 稳定性和热稳定性都显著优于游离漆酶。固定化漆酶具有可重复操作的性质,与底物反应反复操作 10 批次后剩余活性为 40%^[6]。

1.2 离子吸附法

将酶与含有离子交换基团的水不溶性载体以静电作用力相结合的固定化方法。该方法的处理条件温和,且酶的高级结构和活性中心的氨基酸很少发生变化,因而可以得到较高活性的固定化酶。采用此法固定的酶有葡萄糖异构酶、糖化酶、 β -淀粉酶、纤维素酶等。

陈姗姗等(2008)以阴离子交换树脂为载体、戊二醛为交联剂,对果胶酶进行固定化分析,探讨了温度、pH 值、时间、加酶量、戊二醛浓度、交联温度、交联时间对果胶酶固定化效果的影响,同时对固定化果胶酶的酶学特性进行研究。研究表明,果胶酶的最佳固定化条件为:温度 40 °C, pH 值 5.5, 固定化 6 h, 加酶量为 0.75 mL/g, 戊二醛体积分数为 0.1%, 交联温度 4 °C, 交联时间 4 h。在此条件下,固定化果胶酶的酶活回收率可达到 80% 以上。酶学特性试验表明,固定化果胶酶最适温度为 60 °C, 最适 pH 值为 4.0, 具有较好的操作稳定性^[7]。

徐娟等(2008)选择以 D380 大孔弱碱性丙烯酸系阴离子交换树脂为载体,通过先吸附后交联的方法固定化 α -淀粉酶。通过实验对影响固定化酶活力回收率的因素的进行了研究,得出较优的固定化条件为:戊二醛浓度 0.1%、处理时间 45 min、加酶量 3 mg/g(蛋白量/载体)、酶液在 pH5.8、25 °C,固定化处理时间 6~10 h 的条件下,获得的固定化酶活力可达 80 U/g(载体),并进一步对固定化酶的酶学性质作了初步研究^[8]。

2 交联法

交联法是用双功能试剂或多功能试剂进行酶分子之间的交联,使酶分子和双功能试剂或多功能试剂之间形成共价键^[9]。常用的交联剂是戊二醛,但单用戊二醛等试剂交联制备的固定化酶活力较低,因此常将此法与吸附法、包埋法结合使用,可以达到既提高固定化酶的活力,又起到加固的效果。

刘颖、高晗等(2008)利用上述混合方法,将杏仁来源的 β -葡萄糖苷酶以吸附法固定在用戊二醛交联的壳聚糖上,并对固定化条件进行优化,得到最佳条件:戊二醛浓度为 1.5%, 溶液 pH5.5, 在 25 °C 水浴中振荡吸附 4 h, 固定化 β -葡萄糖苷酶,其活力回收率达 27.34%^[10]。

王伟、杨开伦等(2008)以壳聚糖为载体,戊二醛为交联剂,用吸附交联法对氨基酰化酶进行了固定化。研究结果表明,在 pH 值为 6.0, 温度 30 °C 的条件下,0.1 g 壳聚糖微球与 5 mL 1% 戊二醛交联后,固定 0.8 mg 氨基酰化酶的固定化效果最佳。固定化酶的最适温度和 pH 值分别为 50 °C 和 7.0, 而游离酶的最适温度为 40 °C, 最适 pH 值为 7.5, 固定化酶在 50~70 °C 都保持了较高的酶活力,热稳定性远高于游离酶,固定化酶的 K_m 值为 11.796×10^{-2} mol/L, 较游离酶有所升高,该固定化酶具有良好的操作稳定性^[11]。

3 共价键结合法

共价键结合法是将酶与水不溶性载体以共价键结合的一种方法。此法研究较为成熟,其优点是酶与载体间连接牢固,即使用高浓度底物或离子强度的溶液进行反应,也不会导致酶和载体的分离,因此具有良好的稳定性及重复使用性。缺点是反应条件比较苛刻,常常会引起酶蛋白高级结构发生改变,导致酶的活性中心受损^[12]。

王宝康(2007)就采用分相法制作了多孔玻璃微珠 FXBL 载体,用物理吸附法、共价偶联法和重氮法分别固定 α -淀粉酶,比较了它们的固定效果,并选择了共价偶联法作为研究多孔玻璃微珠的制作过程对固定 α -淀粉酶的影响的实验方法。实验结果显示,580 °C 分相玻璃优于 560 °C,分相时间到 36 h 后,分相对固定化酶活力影响不大,多孔玻璃用 0.3 mol/L 的 KOH 溶液扩孔 3 h 最理想。当盐酸的浓度为 0.3 mol/L 时侵蚀成孔,固定化 α -淀粉酶活力达到最大值^[13]。

4 包埋法

包埋法是将聚合物的单体与酶溶液混合,再借助于聚合助进剂的作用进行聚合,酶被包埋在聚合物中以达到固定化。包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基进行结合反应,很少改变酶的空间构象,酶活回收率较高,因此可以应用于许多酶的固定化^[14]。但是此法只适用于小分子底物和产物的酶催化反应,因为只有小分子反应底物或产物,才可以透过高分子聚合物进行扩散。

于殿宇、罗淑年等(2008)就以海藻酸钠、明胶为包埋材料,戊二醛为交联剂固定化磷酸酯酶。对固定化条件和部分酶学特性进行了优化和研究,确定了最佳条件:海藻酸钠浓度 2%, 明胶浓度 4%, CaCl_2 浓度 7%, 戊二醛浓度

0.4%。固定化酶热稳定性增强,重复使用3次相对酶活力仍保留在70%以上^[15]。

肖志方、伍林等(2008)利用海藻酸钠凝胶颗粒固定化葡萄糖氧化酶(GOD),确定了固定化条件,并考察了温度、pH值、储存时间对固定化酶和游离酶酶活力的影响,测定了酶活回收率。结果表明,固定化的最优条件为:CaCl₂ 5.0%(质量体积比),海藻酸钠 3.0%(质量体积比)。固定化酶的最适催化温度为31℃、最适pH值为6.3,较游离酶分别提高7℃和0.6,固定化酶的平均酶活回收率为61.69%。此外,酶的储存稳定性能也有所提高,可重复多次使用^[16]。

5 交联酶聚集体

保持各种传统固定化方法的优点并改进其不足一直是固定化酶方面研究的重要内容,所以开发新型的酶固定化方法的原则是:实现在较为温和的条件下进行酶的固定化,尽量减少或避免酶活力的损失,以达到理想的固定化效果。

最近几年,交联酶聚集体(CLEAs)才被纳入无载体固定化酶范畴,它具有操作简便,获得的固定化酶稳定性好、成本低廉、无需其他载体、单位体积活性大、空间效率高优点,而被广泛应用于蛋白质的分离和纯化及酶固定化等方面^[17]。

交联酶聚集体的制备分两个步骤:聚集体形成和聚集体交联,两个步骤前后连续,对最后交联酶聚集体产品的活性和稳定性都有重要影响。

酶聚集体的形成实质上是将酶进行浓缩沉淀,使酶相互堆积形成超分子结构。该操作与分离纯化中的沉淀完全相同,可通过实验条件的调节保持酶的三维构象和活性,这已经得到实验证实^[18]。而酶聚集体的交联是指利用交联剂将酶的物理聚集体进行共价捆绑,将酶聚集体形成的超分子结构及活性保持下来,使其在反应体系中不易被破坏、并可被回收使用。用作交联剂的物质有很多种,戊二醛是最常用的一种^[19]。

潘延芳、孔珊珊等(2007)制备了交联重组枯草杆菌纤溶酶聚集体(CLEAs),并对其酶学性质进行研究。该实验方法是通过微生物发酵,分离得到天然rBSFE,经硫酸铵沉淀后,以戊二醛作为交联剂对其进行化学交联,得CLEAs。用常规方法测定各种因素对rBSFE稳定性的影响。结果在对耐热性、稳定性、对抗血清蛋白水解酶的能力的研究中,CLEAs均显示比游离酶更高的稳定性^[20]。

邵卫祥、莫晓燕等(2008)采用磁性纳米颗粒与酶蛋白共沉淀后经戊二醛交联的方法,制备了磁性交联核酸酶P1聚集体,并且对比分析了游离酶和固定化酶的部分

酶学性质。该聚集体的最佳制备条件为:硫酸铵质量浓度0.8 g/mL,沉淀时间0.5 h,戊二醛体积分数0.6%,交联时间2 h,所制得的固定化酶活性回收率32.4%。酶学性质研究表明,固定化酶的*K_m*值(30.7 mmol/L)明显高于游离酶的(7.27 mmol/L),二者的最适反应温度分别为90℃和75℃,最适pH值均为5.2,固定化核酸酶P1对热和酸碱的耐受性明显增强,连续反应6次后酶活力仍保留70%^[21]。

6 定向固定

传统的酶固定化方法,即酶是在随意位点和载体进行连接,通常的连接位点是一个ε-氨基酸,一般是赖氨酸,因为酶通常含有多个赖氨酸,所以酶会和载体在许多位点进行反应,这样,有些位点的反应就会阻碍底物进入到酶的活性位点。另外,当酶随意固定化在载体上时一般是发生多位点的结合,这样就会降低酶的固定化量。

通过使用不同的方法,把酶和载体在酶的特定位置上连接起来,使酶在载体表面按一定的方向排列,使它的活性位点面朝固体表面的外侧,这样有利于底物进入到酶的活性位点里去,能够显著提高固定化酶的活性^[22]。

目前,已经发展了一些不同的定向固定化酶的方法:利用酶和它的抗体之间的亲和性;通过酶分子上的糖基部分固定化;酶和金属离子形成复合物;用分子生物学方法使酶定向固定化。

刘琳琳、曾力希等(2005)以磁性金属螯合琼脂糖微球为载体,利用金属螯合配体与蛋白质表面供电子氨基酸相互作用的原理,定向固定了木瓜蛋白酶。固定化的最适条件为:Cu²⁺ 1.5×10⁻² mol/g载体、固定化时间4 h、固定化pH7.0、给酶量30 mg/g载体。固定化酶的最适反应温度70℃、最适反应pH8.0,固定化酶的热稳定性明显高于溶液酶,固定化酶活力回收为68.4%,且有较好的操作稳定性,载体重复使用5次后固定化酶酶活为首次固定化酶的79.71%^[23]。

周建芹、陈韶华等(2008)利用戊二醛将伴刀豆球蛋白(ConA)和壳聚糖载体进行交联,然后利用ConA与脲酶糖链的特异性结合作用,实现了脲酶的定向固定。定向固定化的最适条件为:戊二醛浓度3.5%,ConA浓度1 mg/mL,ConA溶液pH值7.0,脲酶浓度0.4 mg/mL。定向固定化脲酶的最适pH5.0~6.0,最适温度77℃,米氏常数为11.76 mmol/L,与游离酶及非定向固定化脲酶比较,定向固定化脲酶的最适pH向酸性范围发生了偏移并有更宽的pH适用范围,最适温度提高,与底物的亲和力较大,且有较好的操作稳定性^[24]。

7 共固定技术

共固定化是将不同的酶与酶、细胞与细胞或细胞与酶同时固定于同一载体内形成共固定化系统的一种技术,综合了混合发酵和固定化技术的优点。这种系统稳定,可将几种不同功能的酶,细胞和细胞器在同一系统内进行协同作用^[25]。鉴于上述优越性,采用固定化,共固定化技术生产酒精、啤酒、果酒及食醋的等的研究十分盛行。

沈雪亮、夏黎明(2008)为提高纤维素原料对乳酸的转化率,将富含纤维二糖酶的黑曲霉孢子和德氏乳酸杆菌细胞共固定在海藻酸钙凝胶珠中,将共固定化细胞体系与纤维素原料的酶水解相耦联,组建成新型串联式生物反应器。研究表明,共固定化细胞中的纤维二糖酶可将纤维素水解液中的纤维二糖迅速转化成葡萄糖,而葡萄糖又能被乳酸杆菌迅速转化成乳酸,从而解除了纤维二糖及葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制作用。当酶解罐和共固定化细胞反应柱的温度分别控制在 50℃和 48℃时,共固定化细胞反应柱的装填量为 40%时,串联式生物反应器中生成的乳酸浓度和纤维素对乳酸的转化率分别达到 55.7g/L 和 91.5%。采用分批添料工艺,乳酸终浓度和反应器生产效率分别提高到 106.7 g/L 和 1.270 g/(L·h),而单位底物的纤维素酶用量降低 25%^[26]。

李雪雁等(2008)利用凹凸棒土的强吸附作用,首先将乳糖酶吸附于凹凸棒土上,在采用壳聚糖溶液包埋的方法制成乳糖酶与酿酒酵母细胞的共固定化凝胶颗粒。实验结果表明,凹凸棒土与壳聚糖的适宜比例为 5:1,加酶量为 300 U/g 凹凸棒土,室温下吸附时间为 4 h,所制得的共固定化酶-酵母细胞发酵乳糖的最适 pH 和温度分别为 6.0 和 32℃,乳糖浓度 13%~15%。在适宜的发酵条件下,以 20%的乳清为底物发酵 30 h,酒精浓度为 8.3%vol,乳糖转化率为 93.2%^[27]。

在过去几年,研究者已经开始研究酶膜的固定化技术,即将多种酶同时固定在膜材料上,利用各自的功能协同催化复杂的生物转化过程。

Lin 等(1997)在辅酶 NADH 的存在下,将丙氨酸脱氢酶(ALDH)和葡萄糖脱氢酶(GDH)同时固定于纳滤膜反应器内用于连续生产 L-丙氨酸。其中,ALDH 在辅酶 NADH 的协同下催化由丙酮酸酯转化为 L-丙氨酸的立体专一性反应,而 GDH 则用于催化辅酶 NADH 的再生过程^[28]。

Spohn 等(1995)将微生物过氧化酶与相应的氧化酶共固定于传感器的膜材料上,用来检测谷氨酸、赖氨酸和黄嘌呤^[29]。Conrath 等(1995)将麦芽糖磷酸化酶、磷酸酶、葡萄糖氧化酶和变旋酶同时固定在再生纤维素膜上,制成电极用于检测无机磷酸盐^[30]。由此可见,将多酶共固定

技术用于膜生物传感器的研究也早已成熟。

此外,酶还可以与细胞及其他一些生物分子共固定,构成更为复杂的生物转化体系。

8 展望

与游离酶相比,固定化酶可以回收并反复利用,从而降低了生产成本,并且易于底物和产物的分开,提高了酶的稳定性。但是当酶分子从游离态变成牢固态结合于载体时,酶蛋白活性构象会发生变化,使得酶的活性中心受损。当固定化酶经过多次重复使用后,酶活力就开始慢慢下降。为了克服这些不足,我们今后的研究重点是,探索新的固定化方法,以及应用新的载体,以提高固定化酶的活性回收率,延长其半衰期,从而达到人们理想的使用效果。

参考文献:

- [1] 乔德亮,胡冰,曾晓雄.酶固定化及其在食品工业中应用新进展[J].食品工业科技,2008,(1):304-307.
- [2] 贾鹏翔,刘雪莹.固定化酶及其在化工等领域中的应用[J].皮革科学与工程,2004,14(5):31-37.
- [3] 李晔.酶的固定化及其应用[J].分子催化,2008,22(1):86-96.
- [4] 纵伟,刘艳芳,赵光远.磁性壳聚糖微球固定化脂肪酶的研究[J].食品与机械,2008,24(1):13-15.
- [5] 李丽,薛屏.介空分子筛在生物酶固定化中的应用[J].化学研究与应用,2007,19(1):10-15.
- [6] 王炎,郑旭翰,赵敏.漆酶在介孔分子筛 MCM-41 上的固定化研究[J].高校化学工程学报,2008,22(1):83-87.
- [7] 陈姗姗,仇农学.阴离子交换树脂固定化果胶酶研究[J].陕西师范大学学报,2008,36(2):102-105.
- [8] 徐娟,张梁,石贵阳.离子交换树脂固定化 α -淀粉酶的研究[J].食品工业科技,2008,29(4):75-77.
- [9] 李勤.固定化技术在食品工业中的应用和发展研究[J].四川食品与发酵,2006,42:16-19.
- [10] 刘颖,高晗,范婷婷.壳聚糖-戊二醛交联吸附法固定 β -葡萄糖苷酶的研究[J].食品科学,2008,29(5):315-318.
- [11] 王伟,杨开伦,李华.壳聚糖固定化氨基酰化酶的研究[J].新疆农业大学学报,2008,31(3):21-24.
- [12] 刘秀伟,司芳.酶固定化研究进展[J].化工技术经济,2003,21(4):12-17.
- [13] 王宝康.多孔玻璃微珠的制作过程对固定 α -淀粉酶的影响[J].安徽化工,2007,33(6):24-27.
- [14] 张磊,侯红萍.固定化细胞技术的研究进展[J].畜牧兽医科技信息,2006,17-18.
- [15] 于殿宇,罗淑年,王瑾,王世让.海藻酸钠-明胶固定化磷脂酶的研究[J].食品工业,2008,(3):9-10.
- [16] 肖志方,伍林,易德莲,秦晓蓉,杨春琪.海藻酸钙凝胶固定葡萄糖氧化酶的研究[J].化学与生物工程,2008,25(2):42-44.

(下转第 94 页)

- [17] 姜丽艳,李雪,逯家辉,等.应用统计学分析方法优化乳链菌肽发酵培养基[J].化学反应工程与工艺,2008,24(6):562-567.
- [18] 钟国华,何玥,罗建军,等.高效氯氟菊酯降解菌株 HG-P-01 的培养基筛选及优化[J].微生物学通报,2009,36(5):672-677.
- [19] 王普,孙立明,何军邀.响应面法优化热带假丝酵母 104 菌株产羧基还原酶发酵培养基[J].生物工程学报,2009,25(6):863-868.
- [20] 王惠,吴兆亮,董应凯,等.应用二次回归正交旋转组合设计优化黄霉素发酵培养基[J].食品研究与开发,2006,27(6):19-22.
- [21] 张钟元,王强,田金强.奇异变形杆菌产 L-肉碱脱水酶的培养基优化[J].食品工业科技,2009,30(7):181-184.
- [22] 刘晓永,王强,刘红芝.基于二次正交旋转回归试验的酵母 β -葡聚糖发酵培养基优化[J].酿酒科技,2007,4:32-36.
- [23] 刘雄恩,陈聪,骆兰,等.基于遗传算法的苏云金芽孢杆菌培养基配方优化[J].应用与环境生物学报,2008,14(5):705-709.
- [24] Freyer S, Weuster B.D, Wandrey C. Medium optimization using genetic algorithms [J]. Biochem eng, 1992,(8):16-25.
- [25] Zuzek M, Friedrich J, Cestnik B, et al. Optimization of fermentation medium by a modified method of genetic algorithms[J]. J Biotechnol technol, 1996, 10: 991-996.
- [26] Nagata Y, Chu K H. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms[J]. Biochnol Lett, 2003,25(21):1837-1842.
- [27] Franco-Lara E, Link H, Weuster-Botz D. Evaluation of artificial neural networks for modeling and optimization of medium composition with a genetic algorithm[J]. Process Biochemistry, 2006,41:2200-2206.
- [28] Desai K M, Akolkar S K, Badhe Y P, et al. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques[J]. Process Biochemistry, 2006,41:1842-1848.
- [29] 罗剑飞,林炜铁.基于神经网络和遗传算法培养基优化的发酵经济学[J].食品与生物技术学报,2009,28(3):424-428.
- [30] 宋文军,陈宁,熊明勇,等. L-异亮氨酸发酵培养基的遗传算法优化及发酵过程的神经网络建模[J].天津师范大学学报(自然科学版),2003,23(1):46-50.
- [31] 熊明勇,陈宁,张克旭. L-缬氨酸生产菌的选育及其发酵培养基的模式识别优化[J].氨基酸与生物资源,2003,25(1):52-54.
- [32] 罗致强,宫衡,付水林.聚类分析在红霉素摇瓶培养基无机盐分析中的应用[J].中国抗生素杂志,2006,31(3):172-175.

(上接第 89 页)

- [17] 武仙山,何立千.交联酶聚集体——一种无载体酶固定化方法[J].生物技术,2005,15(2):90-92.
- [18] Linqu Cao, Fred van Rantwijk. Cross - linked enzyme aggregates :A simple and effective method for the immobilization of *Penicillin acylase* [J]. Org.Lett. ,2000 ,2 (10):1361-1364.
- [19] 董晓毅,夏仕文.交联脲酶聚集体的制备和初步应用[J].生物工程学报,2003,19(3):332-336.
- [20] 潘延芳,孔珊珊,陈怡倩,吴自荣,王隆华.交联重组枯草杆菌纤溶酶聚集体的制备及其性质研究[J].中国生化药物杂志,2007,28(5):318-321.
- [21] 邵卫祥,莫晓燕,李黎.磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备及性质研究[J].西安交通大学学报,2008,42(8):1035-1039.
- [22] 曹黎明,陈欢林.酶的定向固定化方法及其对酶生物活性的影响[J].中国生物工程杂志,2003,23(1):22-28.
- [23] 刘琳琳,曾力希,刘婷,邓乐.金属螯合载体定向固定化木瓜蛋白酶的研究[J].生物工程学报,2005,21(5):789-793.
- [24] 周建芹,陈韶华,王剑文.以伴刀豆球蛋白为介质定向固定化脲酶的研究[J].生物工程学报,2008,24(4):617-621.
- [25] 闫跃文,侯红萍.共固定化技术的发展现状[J].畜牧兽医科技信息,2006,(3):90-91
- [26] 沈雪亮,夏黎明.共固定化细胞协同糖化发酵纤维素原料产乳酸[J].化工学报,2008,59(1):167-172.
- [27] 李雪雁,戈凌云.乳糖酶和酿酒酵母的共固定化及其在乳清发酵中的应用[J].中国酿造,2008,(3):54-57.
- [28] Lin S S, Miyawaki O, Nakamura K. Continuous production of L - alanine with NADH regeneration by a nanofiltration membrane reactor[J]. Biosci Biotech Bioch ,1997 ,61 :2029-2033.
- [29] Spohn U , Preuschoff F, Blankenstein G, et al . Chemilumino-metric enzyme sensors for flow - injection analysis[J] . Anal Chim Acta ,1995 ,303 :109-120.
- [30] Conrath N , Grundig B ,Huwel St , et al . A novel enzyme sensor for the determination of inorganic phosphate [J] .Anal Chim Acta ,1995 ,309 :47-52.

欢迎订阅《酿酒科技》