

## 酶工程的一个重要方面 辅酶的保留和再生

黎 高 翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

随着酶学基础研究的飞速进展和酶技术的广泛应用, 作为生物催化剂的酶在现代工业中已显露出巨大的潜力<sup>[1-3]</sup>。作为生物工程一个重要组成部分——酶工程在新能源开发、新型食品、治理三废、疾病的临床检验和治疗、发酵和化学合成工业的革新等广泛领域将发挥更大的作用。

但是, 应该看到, 酶虽然具有高度特异性、高催化效率和在温和条件下催化复杂反应的能力, 但酶的不稳定性和纯化的高成本仍严重地影响酶在工业上的广泛应用。目前, 工业应用的酶差不多是催化作用相对简单, 使用成本较低的水解酶类。这只是六大酶类中一种特殊酶类。其催化反应不需要辅因子或辅酶参与。而在已发现的约2100种酶中约40%是需要辅酶参与催化的脱氢酶、磷酸转移酶和连接酶。约20%是需要烟酰胺类辅酶 (NAD 和 NADP) 的脱氢酶类。这些酶类在生物合成反应、转移葡萄糖到各种复杂化合物, 转化木质素副产物为氨基酸、光合作用捕获太阳能、甾体合成, 生物碱转化以及临床分析化学、酶缺陷病治疗等方面起着相当重要的作用<sup>[4]</sup>。可惜这些酶并未得到充分利用。主要原因是催化反应需要价格较贵的辅酶参与。因此, 辅酶的保留和再生、设计多酶再生系统、了解辅酶与脱氢酶作用的关

系, 人工合成模拟酶和辅酶已成为欧洲共同体1981—1985五年计划中一个重要的研究项目<sup>[5]</sup>。同时, 也普遍受到其他国家酶工程学家的关注。本文重点评述需要烟酰胺类辅酶的脱氢酶的固定化、辅酶的保留和再生。

### 一、辅酶的修饰

脱氢酶催化反应是以辅酶作为电子载体, 辅酶与底物是以化学计量进行氧化还原反应。为了有效地使用这催化过程, 需要将辅酶保留在酶反应系统中, 在氧化还原后再生, 回收再用。由于辅酶分子较小, 不能截留在半渗透膜中进行再生。因此, 辅酶的保留要分二步进行: 首先是化学修饰辅酶获得带有反应功能基的辅酶类似物。第二步是将这辅酶类似物共价偶联到大分子聚合物上, 这样可达到保留的目的。通常辅酶经修饰后结构改变, 表现较低的活性。实验表明, 修饰部位对辅酶活性是重要的。在辅酶的腺嘌呤环上进行取代反应才能保持活性、同时在腺嘌呤环上不同氮位置的取代反应会产生不同活性的辅酶类似物。与天然的NAD比较, N<sup>1</sup>-羧甲基-NAD 的活性很低。而 N<sup>6</sup>-羧甲基-NAD有60%的活性<sup>[6]</sup>。因此, 辅酶腺嘌

呤 N<sup>6</sup> 位置对脱氢酶活性影响不大, 可以在这位置进行修饰<sup>[7]</sup>。第一个人工合成

的 NAD 类似物是 N<sup>6</sup>-(6-(己氨基)氨基甲酰甲基)-NAD<sup>[6]</sup>, 反应图式如下:

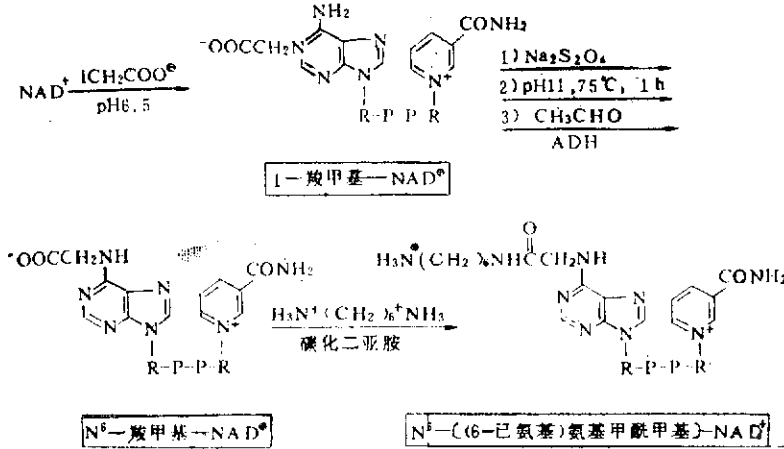


图 1 NAD 类似物的合成<sup>[6]</sup>

此外, 在 NAD C<sup>5</sup> 部位上进行修饰亦可得到有活性的辅酶类似物<sup>[8,9]</sup>。一般修饰 NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>、ATP、FAD 及 CoA 是合成 N<sup>6</sup> 取代的类似物。

## 二、固定化辅酶类似物及其性质

使用微型胶囊、中空纤维、超滤槽、离子选择膜或酶膜物理截留未修饰的辅酶, 为了阻止小分子辅酶流失, 必须有“牢固”的膜, 这会引起辅酶严重的扩散限制, 这种方法并不理想。另一种方法是辅酶类似物共价键合到水不溶性大分子载体上<sup>[1,4,10,11]</sup>如琼脂糖、纤维素等但仍

存在空间立体障碍及扩散限制降低活性。较好的方法是辅酶类似物共价键合到可溶性葡聚糖<sup>[1,12,13]</sup>、聚乙烯亚胺<sup>[14]</sup>、聚赖氨酸<sup>[14]</sup>、海藻脲酸<sup>[15]</sup>、聚乙二醇<sup>[16]</sup>、可溶性聚丙烯酰胺<sup>[17]</sup>、聚丙烯酸<sup>[18]</sup>等可溶性聚合物上可得到较高活性的固定化辅酶, 通常用溴化氰法<sup>[19]</sup>和碳化二亚胺法<sup>[20]</sup>活化这些聚合物进行辅酶固定化。此外辅酶类似物亦可与酶共固定到蛋白质膜上<sup>[21]</sup>或可溶性聚合物上。辅酶类似物亦可直接偶联到酶上<sup>[22-26]</sup>, 这也可以得到较高活性的酶-辅酶复合物。这样分子量相对高的固定化辅酶类似物可被保留, 再生回收。典型固定化辅酶结构见图 2。

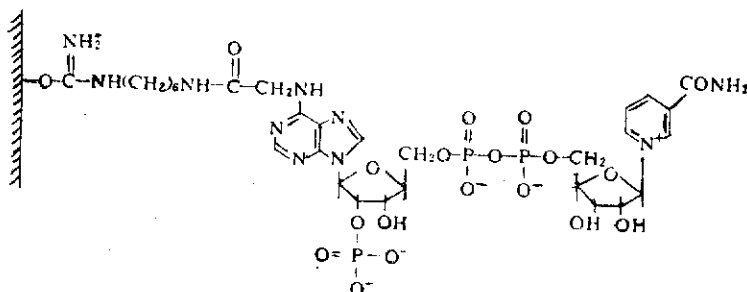


图 2 N<sup>6</sup>-(N-(6-(己氨基)氨基甲酰甲基)-NADP<sup>+</sup> 键合溴化氰活化的葡聚糖上<sup>[12]</sup>的结构

辅酶类似物的相对辅酶活性低于母体辅酶,是由于修饰后结构改变而降低了键合脱氢酶的能力。首先,腺嘌呤环上的取代位置是决定辅酶类似物的关键,其次,取代基的性质亦可扰乱结合部位的局部构型和改变腺嘌呤环上的电荷密度。但目前没有充分的实验证据详细阐明各种复杂因子如何影响辅酶类似物的活性<sup>[4]</sup>。

当辅酶类似物键合到不溶性或可溶性载体上,其活力会下降(见表1),聚合物骨架的立体障碍和酶与骨架间的非特异性吸附是活力下降的重要因素,此外辅酶偶联到水不溶聚合物上大大地降低辅酶的扩散速度。而偶联到水溶性聚合物上则保持较高的辅酶活力,是因为较大的立体构型易与底物接触增加了扩散迁移效率。但对大分子  $\text{NAD}^+$ - 葡聚糖仍表现扩散阻力而酶催化效率下降,特别是对转化率高

的酶<sup>[28]</sup>。

同时,所有固定化辅酶分子并不能同等地接近酶分子,例如,固定化辅酶分子与酵母乙醇脱氢酶结合对水溶性载体葡聚糖为80%,对水不溶性载体琼脂糖为30%<sup>[27]</sup>,由于聚合物立体结构的影响,固定化辅酶分子在还原速度上相互间有差别,有些分子被还原快,另一些则较慢。此外,不同脱氢酶对辅酶的结构有不同要求(表1),一个酶对同一的固定化辅酶制剂的不同辅酶分子的亲和性不同。也就是  $K_m$  值有一个广泛的范围。因此,酶能够还原辅酶的比例取决于聚合物骨架及键的性质。当  $\text{N}^6$ -(2-乙氨基)- $\text{NAD}^+$  结合到不溶性琼脂糖上,只有约5%辅酶可被还原。如果在辅酶与不溶性聚合物之间插入一长链分子,可还原的辅酶增加到40%<sup>[28]</sup>。当相同的长链分子插入到水溶性聚合物时可增加

表1 不同NAD衍生物对酵母醇脱氢酶(YADH)、肝醇脱氢酶(LADH)、肌肉乳酸脱氢酶(LDH)和心肌苹果酸脱氢酶(MDH)的相对反应速度

衍生物	反应速度*				文献
	YADH	LADH	LDH	MDH	
$\text{N}^6$ 取代的NAD	0.61	—	0.76	—	[27]
$\text{N}^6$ 取代的NAD偶联到葡聚糖	0.16	—	0.14	—	[27]
$\text{N}^6$ 取代的NAD偶联到琼脂糖	0.007	—	0.001	—	[27]
$\text{C}^8$ 取代的NAD	0.41	—	0.58	—	[9]
$\text{C}^8$ 取代的NAD偶联到聚乙烯亚胺	0.47	—	0.03	—	[9]
$\text{C}^8$ 取代的NAD偶联到聚赖氨酸	0.05	—	0.06	—	[9]
$\text{N}^6$ 取代的NAD	0.23	0.58	0.25	0.58	[28]
$\text{N}^6$ 取代的NAD偶联到葡聚糖	0.085	0.175	0.24	0.185	[28]
$\text{N}^6$ 取代的NAD偶联到琼脂糖	—	0.03	0.005	—	[28]
$\text{N}^6$ 取代的NADH偶联到聚丙烯酰胺	0.37	0.28	0.045	0.26	[29]

\* 以未修饰的NAD反应速度为1.0。

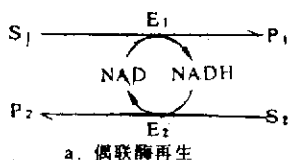
到90%<sup>[30]</sup>。

### 三、辅酶的再生

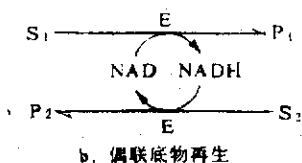
辅酶作为辅底物参与氧化还原作用,

磷酸基转移或酰基转移,辅酶再生也就是辅酶反应后重新恢复到原来状态(图3)。NAD/NADH再生最重要的方面是特异性<sup>[31]</sup>。低特异性是再生中产生一种有活性及无活性的辅酶混合物。而无活

性的辅酶仍可以结合酶,而成为一种高效的酶抑制剂。此外,在酶法再生中,pH钝化辅酶也是一个因素,NAD在低pH下稳定,而NADH在高pH值下稳定<sup>[32]</sup>。



a. 偶联酶再生



b. 偶联底物再生

图3 辅酶循环再生系统

辅酶再生分非酶再生(化学法,电化学法)和酶再生(偶联酶再生及偶联底物再生)(图3)。

### (一) 非酶再生

1. 化学法再生: 一些化学试剂,例如吩嗪甲基硫酸盐(PMS)、吩嗪乙基硫酸盐(PES)、二氢吡啶吩嗪、2,6-二氯酚(DCPIP)、亚甲基蓝、噻唑蓝及黄素衍生物等<sup>[28]</sup>能从还原型辅酶接受电子,将NADH氧化为NAD。但只有连二亚硫酸钠能使NAD还原为NADH的还原剂<sup>[33]</sup>。这些化合物与相应的酶系统组合用于辅酶的再生循环。但化学再生的主要缺点是缺乏特异性、辅酶容易被钝化以及化学试剂污染产物,使分离困难、但污染问题可以用聚合反应或固定化再生试剂去解决。例如固定化吡啶黄氧化NADH的方法<sup>[24]</sup>。

2. 电化学再生: 通过电极的电子传递进行辅酶再生。例如,黄素通过一间隔臂共价键合到电极上可使NADH再生<sup>[35]</sup>,酶和辅酶包埋在有机导体或半导体中也是一种有希望的再生方法。而固定化电解质(如苯醌)在电极上会大大增加

NAD<sup>+</sup>的电化学活性。电化学再生的优点是不需要加入任何试剂,只用电极。有时可得到92%NADH氧化的结果<sup>[36]</sup>。但缺点是缺乏特异性,再生的辅酶比活低。酶系统会由于电化学反应所损害。

### (二) 酶再生

酶再生可分为偶联酶再生和偶联底物再生

1. 偶联酶再生: 是一个酶E<sub>1</sub>使辅酶还原及另一个酶E<sub>2</sub>则氧化这还原型辅酶恢复到它原来氧化型状态(图3.a)。同时底物S<sub>1</sub>及S<sub>2</sub>转化为相应产物P<sub>1</sub>及P<sub>2</sub>。使用游离酶/固定化酶与游离辅酶/固定化辅酶不同组合进行辅酶的偶联酶再生已有许多报道<sup>[12,37]</sup>。该法亦用于磷酸腺苷<sup>[37]</sup>、FAD<sup>[14]</sup>、辅酶A<sup>[38]</sup>的再生。

2. 偶联底物再生: 是用两种以上底物由同一个酶进行辅酶再生的方法(图3.b)。该法是基于一些酶具有广泛的底物特异性。例如马肝醇脱氢酶可以以醇、酮、醛作底物<sup>[39]</sup>进行各种氧化还原反应使辅酶再生。这酶亦用于难得到的立体特异化合物的合成<sup>[40,41]</sup>。

## 四、辅酶再生系统

由于使用的反应条件不同,对不同辅酶再生系统进行比较是有困难的。通常,大致有以下几种再生系统:

### (一) 固定化吡啶黄的辅酶再生系统

固定化在琼脂糖上的吡啶黄能氧化NADH到NAD,同时形成还原型吡啶黄又为氧所氧化复原(图4)。这个再生系统用于乳酸脱氢酶试验80h,辅酶再循环较没有吡啶黄体系高达40倍次。产物形成多222倍。此外,制备含有吡啶黄及NAD的双功能辅酶复合物作为“内组合”辅酶再生系统是一种新尝试,但这新型辅酶必

需与酶相容。这系统的优点是辅酶扩散较快, 另外, 一种含有烟酰胺和黄素的双辅酶人工合成物已用于电子传递的研究<sup>[42]</sup>

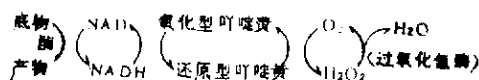


图4 固定化吡啶黄的辅酶再生系统

## (二) 共固定化辅酶与酶的再生系统

磷酸化酶B和 $N^6$ -(6-己基氨基)-AMP共固定在琼脂糖上得到一种不需要外源辅酶而有持久活性的酶<sup>[43]</sup>。以后, 硫辛酰胺脱氢酶与NAD共固定在微孔玻璃<sup>[44]</sup>, 马肝醇脱氢酶与 $N^6$ -(6-己氨基)-氨基甲酰甲基-NAD(H)二元复合物固定在琼脂糖上<sup>[45]</sup>, (图5) 这酶-辅酶固相复合物不再外加辅酶的酶活性相当于加入过量辅酶的40%活性。用偶联底物系统进行再生辅酶循环的最高速度为3400次/h。此外, ADH与NAD共固定在蛋白质膜上不需外加NAD亦有酶活性。这系统可用于制备放射标记立体特异化合物。这固定化酶热稳定性增加, 在50℃ 1h后, 仍有70%活性, 而自然酶则完全失活, 单独固定ADH活性下降到20%。但这共固定辅酶-酶系统只限于使用马肝ADH, 只能用于偶联底物再生系统。

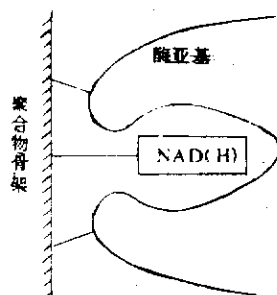


图5 共固定化NAD(H)和ADH

## (三) 固定化多酶的再生系统

最近, 用人工合成的双辅酶(Bis-NAD<sup>+</sup>)化合物, 成功地进行了ADH和LDH活性中心定位定向的固定化, 形成两酶活性中心对峙的双酶交联固定化复合物(图6(a))可进行辅酶的循环。在这系统中<sup>[46]</sup>, a: 在Bis-NAD存在下用戊二醛交联LDH到已固定化的ADH上, 乙醇氧化形成的NADH由附近的LDH循环再生, 而小部分NADH则被硫辛酰胺脱氢酶(LiDH)氧化(图6(a))。b: 或将ADH、LDH和LiDH三酶直接键合在聚合物上, 但NADH为LDH氧化的比例很小(图6(b))、这系统能建造一种适合于辅酶与酶活性中心相互作用的理想结构。但仍不能完全消除载体骨架立体障碍和扩散效应的影响。

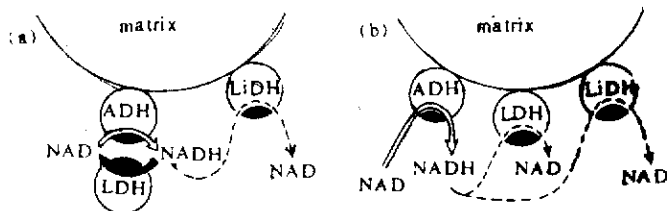


图6 共固定化ADH、LDH及LiDH在琼脂糖上的辅酶再生系统<sup>[46]</sup>

## (四) 辅酶偶联到酶分子上的辅酶再生系统

上述共固定化酶和辅酶不能消除立体障碍效应, 如果辅酶直接偶联到酶分子

上, 可排除骨架立体障碍及扩散限制, 由于辅酶永久地固定在酶活性中心, 增加了酶的稳定性。例如 $N^6$ -(6-(己氨基)氨基甲酰甲基)-NAD末端氨基偶联到肝

ADH 的羧基上形成一种酶-辅酶复合物, 每个酶亚基大约含有一个NAD 分子, 这复合物比活性相当于自然酶的40%<sup>[23]</sup>, 这复合物的辅酶能够接近第二个酶或化学试剂, 这辅酶能游摆出第一个酶活性中心进入第二个酶的活性中心进行再生<sup>[22,23]</sup>。

(图7) 这就提供了使用偶联酶系统再生的可能性。使这系统有广泛的应用前景。未来的发展可能是结合LDH 到酶-辅酶复合物上, 理想的构型是一个酶的活性中心定向于另一个酶活性中心, 并使 NAD 类似物间隔臂长度适合于与两个酶活性中心的相互作用。

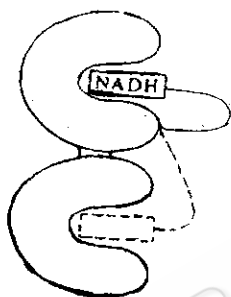


图7 辅酶固定在脱氢酶活性中心附近

## 五、需辅酶的酶系统的应用

需辅酶的酶在某些工业中有很大的潜力, 一些酶模式反应器的研究显示其实用的价值。

如山梨醇脱氢酶转化山梨醇到果糖<sup>[13]</sup>。用 L-丙氨酸脱氢酶转化丙酮酸到 L-丙氨酸<sup>[47,48]</sup>。用 L-亮氨酸脱氢酶还原胺化酮异己酸到 L-亮氨酸<sup>[18]</sup>。亮氨酸脱氢酶及甲酸脱氢酶包在超滤膜中连续生产 L-亮氨酸 48 天, 最高转化率为 99.9%, 酶活力降低主要由于辅酶的钝化。因此, 辅酶稳定性是一个重要因素。

需辅酶的酶亦用于流动性分析。葡萄糖脱氢酶和乳糖脱氢酶电极用于相应的底

物测定<sup>[49,50]</sup>。NAD-葡聚糖与 LDH、L-GDH 共包埋与氨离子敏感电极组合用于 L-谷氨酸浓度分析<sup>[47]</sup>。ADH 及甲醇脱氢酶用于酶燃料电池<sup>[35,51]</sup>。用甲醇脱氢酶氧化甲醇到甲酸对燃料电池的发展是很有吸引力的, 这反应能产生四个电子<sup>[51]</sup>。

此外, 酶-辅酶系统在生物医学方面可用来治疗酶缺陷病, 例如 ATP、NAD 和 NADP 包埋的多酶的微型胶囊中治疗某些酶缺病<sup>[52,53]</sup>。半乳糖血病可以用共包埋半乳糖激酶、丙酮酸激酶及 LDH 的酶系来治疗, 其他包埋多酶及辅酶系统在肾功能衰竭中可减少血氨肝中毒<sup>[4]</sup>。

## 六、结 论

辅酶-酶系统的研究进展使其在经济上进行小规模生产是可能的, 但应用不够广泛。该系统最直接的应用是分析领域和合成立体特异化合物。

共固定化酶、辅酶和辅酶偶联到酶上是目前两种较有效的辅酶再生系统。共固定化酶及辅酶系统只能用于偶联底物再生, 但制备简单, 固定化酶稳定性好。迄今, 马肝乙醇脱氢酶是唯一用于底物偶联再生的脱氢酶。但可能会在细菌中找到有这样特异性的其他脱氢酶。辅酶偶联到酶分子上有较好的偶联底物辅酶再生的作用, 亦可用于偶联酶再生系统, 较共固定化系统用途广泛、能够得到辅酶与酶相互作用和有关酶表面、活性点与氨基酸残基之间距离的情报。

在这领域中需要考虑的方面是: 首先找寻本身带有完整辅因子的新酶, 以解决游离辅酶离解问题, 包括从嗜热、嗜碱、嗜酸、嗜荧光的微生物中的酶进行固定化及稳定化的基础研究。第二, 为了提高辅酶工作条件下的稳定性, 应对固定化辅酶

的经济合成及稳定化进行探讨。第三, 应利用重组 DNA 技术或化学技术人工合成氧化还原酶或转移酶或辅酶模式催化剂用于大批量的化学合成。第四, 发展第二代生物催化剂反应器, 使用液膜技术、二

液相技术、超过滤膜技术设计各种可溶性固定化酶及辅酶反应器, 进行有效的辅酶再生并连续生产有价值的产品, 这将会是很有前途的。

### 参 考 文 献

- [1] Mosbach, K.: In *Methods in enzymology*, Vol. 44 (ed. Mosbach, K.) Academic Press, New York, p. 1—999, 1976.
- [2] Dunnill, P.: In *Enzymic and non-enzymic catalysis*, (ed. Dunnill, P., Wiseman, A., & Blakebrough, N.) Chichester: Ellis Horwood, pp. 28—53, 1980.
- [3] Samejima, H. et al.: *Biochimie*, 62:299—315, 1980.
- [4] Lowe, C.R.: In *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*, Vol. 5, (ed. Wiseman, A.) Chichester: Ellis Horwood, pp. 13—146, 1981.
- [5] Walgate, R.: *Nature*, 283:125—126, 1980.
- [6] Lindberg, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 40:187—193, 1973.
- [7] Brändén, C.I. et al.: In *the Enzymes* Vol. XI, Third ed. (ed. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, pp. 103—190, 1975.
- [8] Lee, C.Y. and Kaplan, N.O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 168:665—676, 1975.
- [9] Zappelli, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 62:211—215, 1976.
- [10] Lowe, C.R.: *Trends biochem. Sci.*, 3:134—137, 1979a.
- [11] Lowe, C.R.: *Pure Appl. Chem.*, 51:1429—1441, 1979b.
- [12] Lowe, C.R. and K. Mosbach: *Eur. J. Biochem.*, 49:511—520, 1974.
- [13] Wang, S.S. and King, C.K.: In *Advances in biochemical engineering*, 12:119—149, 1979.
- [14] Zappelli, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 89:491—499, 1978.
- [15] Coughlin, R.W. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 18:199—208, 1976.
- [16] Wichmann, R. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 23:2789—2802, 1981.
- [17] Furukawa, S. et al.: *Biochimie*, 62:629—634, 1980.
- [18] Fuller, C.W. and H.J. Bright: *J. biol. Chem.*, 252:6631—6639, 1977.
- [19] Axén, R. et al.: *Nature*, 214:1302—1304, 1967.
- [20] Larsson, P.O. and K. Mosbach: *Biotech. Bioeng.*, 13:393—398, 1971.
- [21] Legoy, M.D. et al.: *FEBS Lett.*, 94:335—338, 1978.
- [22] Månsson, M.O. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 86:455—463, 1978.
- [23] Månsson, M.O. et al.: *FEBS Lett.*, 98:309—313, 1979.
- [24] Venn, R.F. et al.: *Acta Chem. Scand.*, B31:141—144, 1977.
- [25] Gacea, P. and R.F. Venn: *Biochem. J.*, 177:369—372, 1979.
- [26] Voss, M.F. et al.: In *Enzyme engineering*, 3:155—161, 1978.
- [27] Larsson, P.O. and K. Mosbach: *FEBS Lett.*, 46:119—122, 1974.
- [28] Schmidt, H.C. and G. Grenner: *Eur. J. Biochem.*, 67:295—302, 1976.
- [29] Fuller, C.W. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 103:421—430, 1980.
- [30] Buckman A.F. et al.: In *Enzyme engineering*, 4:395—397, 1978.
- [31] Schmid, R.D.: *Process Biochemistry*, 14: 2—8, May, 1979.
- [32] Lowry, O.H. and J.V. Passoneau: *A Flexible System of Enzymatic Analysis* Academic Press, New York, 1972.
- [33] Jones, J.B. et al.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pp. 856—857, 1972.
- [34] Månsson, M.O. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 18:1145—1159, 1976.
- [35] Wingard, L.B. et al.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, 4:137—142, 1982.
- [36] Aizawa, M. et al.: *Biochim. biophys. Acta.*, 385:362—370, 1975.
- [37] Mosbach, K. et al.: In *Methods in enzymology*, Vol. 44, Academic Press, New York, pp. 859—887, 1976.
- [38] Rieke, E. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 100:203—212, 1979.
- [39] Sund, H. and H. Theorell: In *the Enzyme*, 7:25—83, 1963.

(下转第11页)

- [40] Jones, J.B.: In *Methods in enzymol* Vol.44 (ed. Mosbach, K.) Academic Press, New York, pp.831—844, 1976.
- [41] Davies, J. and J.B. Jones: *J. Am. Chem. Soc.*, 101:5405—5410, 1979.
- [42] Blankenhorn, G.: *Eur. J. Biochem.*, 50:351—356, 1975.
- [43] Mosbach, K. and S. Gestrelus: *FEBS Lett.*, 42:200—204, 1974.
- [44] Scouten, W.H. et al.: *Biochim. biophys. Acta*, 482:11—18, 1977.
- [45] Gestrelus, S. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 57:529—535, 1975.
- [46] Månsson, M.O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 80:1487—1491, 1983.
- [47] Davies, P. and K.: Mosbach *Biochim. biophys. Acta*, 370:329—338, 1974.
- [48] Wandrey, C. & N.Y. Ann, *Acad. Sci.*, 326:87—96, 1979.
- [49] Blaedel W.J. and R.A. Jenkins: *Analyt. Chem.*, 48:1240—1247, 1976.
- [50] Pfeiffer, D. et al.: *Biochimie*, 62:587—593, 1980.
- [51] Plotkin, E.V. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 3:187—192, 1981.
- [52] Campbell, J. and T.M.S. Chang: *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 69:562—569, 1976.
- [53] Chang, T.M.S. and N. Kantarian: In *Enzyme engineering*, 4:193—197, 1978.