



ShengwuXibaoDeGudinghua
JishuJiqiYingyong

生物细胞的固定化技术 及其应用

韩静淑 赵振英 周礼恺 刘增柱 编著

保存本

科学出版社

生物细胞的固定化技术 及其应用

韩静淑 赵振英 周礼恺 刘增柱 编著

科学出版社

1993

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书是以研究固定化微生物细胞为主的一本生物技术文集。内容包括：固定化细胞：历史背景；微生物细胞的固定化方法；固定化微生物细胞的应用；固定化生物细胞胞器；固定化生活细胞及其应用；用固定化细胞生产能源；固定化细胞体系的化学工程分析，共七个方面。每一章节论述全面，举证的操作方法具体，并注明产品生产开发应用之实例；正本溯源，全书分章列出重要参考文献，并分类编排，便于查找，是一本实用的现代生物技术参考用书。可供从事能源、环保、酿造、医药、有机化工等生产和研究工作人员及大专院校师生检索参考。

生物细胞的固定化技术及其应用

韩静淑 赵振英 周礼恺 刘增柱 编著

责任编辑 黄贵清

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街18号

邮政编码：100709

中科院沈阳分院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1993年6月 第 一 版 开本：787×1094 1/16

1993年6月 沈阳第一次印刷 印张：15

印数：0 001-2000 字数：360 000

ISBN 7-03-003525-9 / R · 180

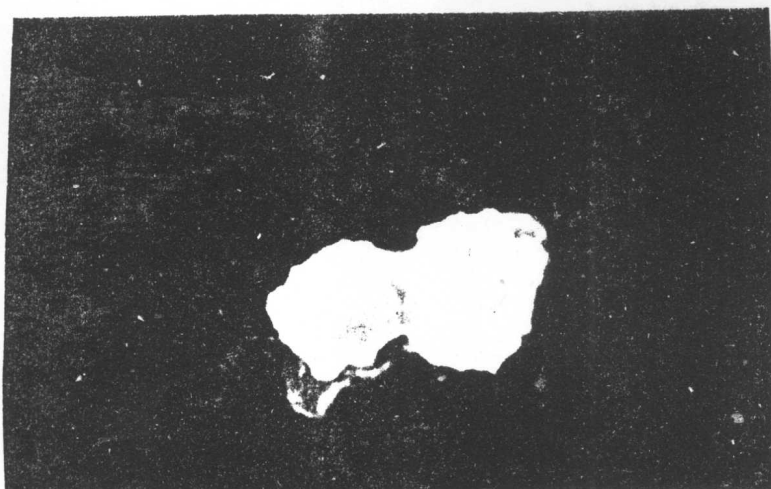
定价：12.00 元

序

近年来, 生物技术已在农业、医药、食品、能源、冶金、环保等领域得到了广泛应用, 形成一个新兴的生物技术产业。就其涉及的范围来讲, 在农业上, 实是生物工程技术应用的广阔天地, 可用于防治虫害、育种、除草、防止霜冻等, 效果显著。用于制药, 不仅可以生产廉价、优质的防治人类重大疾病的新药物, 而且将引起整个制药工业的重大变革。用于轻工、食品, 其应用面广、产值高、生产周期短、经济效益高, 可为社会提供更多的优质食品和日用品。用于能源建设, 既可节能, 又可开发新能源, 同时对提高石油开采率将产生重大作用, 为解决世界面临的石化能源的日益枯竭, 亦将作出贡献。在解决人类健康和环境污染问题上, 生物技术同样能发挥积极作用。总的来看, 在解决当代能源、资源、食品、环保等多种全球性问题方面, 生物工程将起举足轻重的作用。由于遗传工程开发的巨大进展, 专一、优质的微生物细胞制造的出现, 均大大地有利于固定和缝制, 终究将会使人们预期的特别应用成为现实。本书对制菌方法、应用以及固定化微生物细胞的用途, 次细胞胞器, 叶绿体用作生物催化剂, 作了较全面的、含理论和具体方法的论述。本书还对植物细胞和动物细胞作了研究和讨论。并对固定化细胞反应器体系的工程分析, 作了专门报道, 通过检索, 以资借鉴。按比例放大, 以臻于完善。这些都是读者和编者共同的期待。

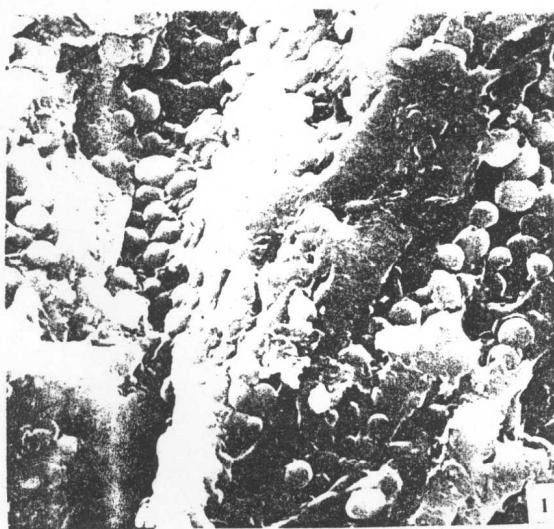
韩静淑

1990年8月

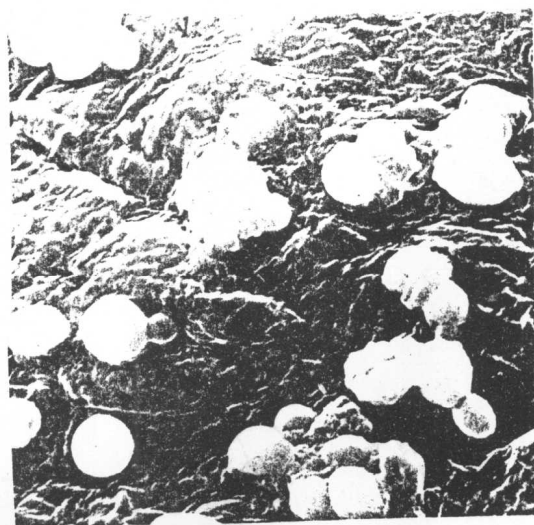


Saccharomyces cerevisiae 融合子(扫描电镜 $\times 5000$)

段俊英等：固定化酵母细胞(高产乙醇*S.cerevisiae*融合子菌种)在PVA载体中的包埋、分布和增殖



1. 固定化酵母细胞在 PVA 载体中的包埋和分布(扫描电镜 $\times 800$)



2. 固定化酵母细胞在 PVA 载体中的增殖(扫描电镜 $\times 1500$)

目 录

序

第一章 固定化细胞: 历史背景

1.1 酶特征的改进: 酶的固定	(1)
1.2 微生物细胞的固定	(2)
1.3 活的或处于生长阶段的微生物细胞的固定	(4)
1.4 亚细胞粒子和动、植物细胞的固定	(4)
1.5 结语	(5)
参考文献	(5)

第二章 微生物细胞的固定化方法

2.1 导言	(7)
2.2 固定化的主要意义	(7)
2.2.1 固定化的定义	(7)
2.2.2 固定化方法	(8)
2.3 来源不同的载体	(12)
2.3.1 总论	(12)
2.3.2 细胞吸附的载体	(13)
2.4 聚合载体的截留化学	(14)
2.4.1 由单体前体物制做网状聚合体	(15)
2.4.2 由齐分子量前体物制做网状聚合体	(17)
2.4.3 由长链预聚物制做网状聚合体	(19)
2.4.4 共价交联	(21)
2.4.5 总结	(22)
2.5 亲水-疏水反应网状体的制备	(22)
2.6 微生物细胞与支撑体的相互作用	(23)
2.6.1 静电相互作用	(23)
2.6.2 用局部共价键方法修饰离子网状体截留的细胞	(24)
2.6.3 毒性	(24)
2.7 运转稳定性	(25)
2.7.1 单酶系反应	(25)
2.7.2 多级酶系反应	(25)
2.8 工程学问题	(26)
参考文献	(27)

第三章 固定化微生物细胞的应用

3.1 导言	(33)
--------------	------

3.2	与食品有关的碳水化合物的转化	(34)
3.2.1	淀粉与糖工业中葡萄糖的异构化作用	(34)
3.2.2	制糖工业中蔗糖的转化	(43)
3.2.3	甜菜糖工业中棉子糖的水解	(44)
3.2.4	乳制品工业中的 β -半乳糖苷酶工艺	(46)
3.3	氨基酸生产	(47)
3.3.1	光学拆开	(47)
3.3.2	L-天冬氨酸的生物合成	(48)
3.3.3	其他氨基酸生产中固定化整体细胞的生物催化	(51)
3.4	有机酸生产	(55)
3.4.1	醋酸	(57)
3.4.2	L-苹果酸	(58)
3.4.3	尿刊酸(咪唑丙烯酸)	(58)
3.4.4	用固定化微生物细胞生产其他有机酸	(59)
3.5	醇类生产	(62)
3.5.1	乙醇	(62)
3.5.2	其他醇类	(68)
3.6	医学和药学应用中的化学转换	(68)
3.6.1	甾类化合物的转换	(69)
3.6.2	抗生素的生产及其改良	(74)
3.6.3	精细化学药品	(76)
3.7	固定化细胞的各种应用潜势	(80)
3.7.1	碳氢化合物的氧化	(80)
3.7.2	氢的生产	(82)
3.7.3	固氮作用	(83)
3.7.4	多种降解反应	(83)
3.8	结语与前景	(84)
	参考文献	(85)

第四章 固定化生物细胞胞器

4.1	导言	(103)
4.2	叶绿体	(105)
4.2.1	用聚丙烯酰胺凝胶(PAG)截留	(105)
4.2.2	用聚乙烯醇(PVA)截留	(106)
4.2.3	用蛋白质截留	(110)
4.2.4	海藻多醣	(111)
4.2.5	合成的聚合体	(112)
4.3	载色体的固定及其应用	(113)
4.4	热稳定的天然叶绿体的应用	(115)
4.4.1	活电极	(116)

4.4.2 ATP 再生系统	(117)
4.5 线粒体	(118)
4.6 微粒体	(120)
4.7 过氧化体(微粒)	(121)
4.8 结语	(122)
参考文献	(123)
第五章 固定化生活细胞及其应用	
5.1 导言	(126)
5.1.1 历史回顾	(127)
5.1.2 固定化细胞分类	(128)
5.2 整细胞的固定化技术	(129)
5.2.1 固定化作用中的交联法	(129)
5.2.2 固定化作用中的载体粘合法	(132)
5.2.3 截留法	(143)
5.2.4 固定游离细胞的方法	(156)
5.2.5 固定整细胞的其他方法	(159)
5.2.6 各种固定化技术的比较	(159)
5.3 固定化作用对生活细胞动力学及其性质的影响	(161)
5.3.1 分配效应	(161)
5.3.2 内部和外部质量交换的影响	(162)
5.3.3 固定化作用对细胞稳定性的影响	(166)
5.4 固定化细胞反应器	(166)
5.4.1 分批反应器	(167)
5.4.2 连续反应器	(167)
5.5 固定化生活细胞的应用	(168)
5.6 生活细胞固定化技术的未来发展趋势	(177)
参考文献	(178)
第六章 用固定化细胞生产能源	
6.1 导言	(188)
6.2 用固定化细胞生产生物气体	(188)
6.2.1 用固定化 <i>Clostridium butyricum</i> 细胞生物量产氢	(188)
6.2.2 用固定化蓝绿藻光合产氢	(191)
6.2.3 用固定化绿藻- <i>Clostridium butyricum</i> 体系光合产氢	(193)
6.2.4 用固定化甲烷细菌生产甲烷	(195)
6.3 用固定化细胞制作微生物燃料电池	(197)
6.3.1 用固定化 <i>Clostridium butyricum</i> 制作氢-氧燃料电池	(198)
6.3.2 用固定化蓝-绿藻体系制作光化学燃料电池	(202)
6.3.3 用固定化叶绿体- <i>Clostridium butyricum</i> 制作光化学燃料电池	(203)
6.4 结语	(206)

参考文献	(206)
第七章 固定化细胞体系的化学工程分析	
7.1 导言	(208)
7.2 固定化细胞反应器的类型及其应用	(208)
7.2.1 填充床反应器	(208)
7.2.2 恒流搅拌罐反应器	(210)
7.2.3 流化床反应器	(210)
7.2.4 空心纤维反应器	(210)
7.2.5 其他类型反应器	(211)
7.3 反应器类型选择	(211)
7.3.1 细胞存活率的要求	(211)
7.3.2 载体支撑体类型	(211)
7.3.3 基质性质	(212)
7.3.4 涉及的反应动力学	(212)
7.3.5 工艺运转要求	(212)
7.3.6 有利于催化剂置换和再生	(212)
7.3.7 水压条件	(212)
7.3.8 便于设计和加工	(213)
7.3.9 反应器价格	(213)
7.4 固定化细胞反应器分析: 背景	(213)
7.5 单酶型 IMC 反应器	(214)
7.5.1 定义和假设	(214)
7.5.2 理想反应器的运行方程	(215)
7.5.3 质量转移对固定化细胞反应器运转的影响	(216)
7.5.4 反应器分析的其他有关问题	(219)
7.6 固定化生活细胞反应器	(220)
7.6.1 定义和假设	(220)
7.6.2 理想反应器的运行方程	(220)
7.6.3 质量转移中的有关问题	(225)
7.6.4 综合反应器工程模式	(226)
7.6.5 固定化细胞代谢的控制	(227)
7.7 固定化细胞体系的设计和运转实践中的有关问题	(227)
7.7.1 反应器的圆柱数目和流动方式	(227)
7.7.2 圆柱水力学	(228)
7.7.3 运转的有关问题和工艺调控方法	(229)
7.7.4 固定化生活细胞体系的专门问题	(229)
7.8 后记	(230)
7.9 符号一览表	(230)
参考文献	(232)

第一章 固定化细胞：历史背景

1.1 酶特征的改进：酶的固定

酶是一种蛋白质生物催化剂，在活的有机体中参与多种化学反应。酶区别于普通的化学催化剂(触媒)，它的特有功能，是在温和条件之下，完成催化反应。比如，在常温常压下，在中性水溶液中，有很高专择性。

在酶的概念产生之前，人们就已开始使用酶。可以认为，酶的应用正随人类历史的发展，而逐渐扩展到各个领域。比如，酿造、食品工业、纺织、鞣革和医药等，尤其是生物化学领域的近期发展以及后来有关酶反应机制的分类等，更能说明这一点。新酶源的发展，尤其是应用微生物与遗传工程的进展，都非常明显地促进了酶的利用。作为一种催化剂，酶虽然具备许多优势，但它们是由有机体为其自身需要而产生，不是为人类的应用而形成的。尽管在谈到酶的催化活性时，人们认为酶是很有效的催化剂，并且具有优势，但在实际应用中还不很理想。有时，酶的上述优势，还可能变为劣势，比如，酶一般不稳定，不能在有机溶剂中与高温条件下使用。

依照常规，在批次生产过程中，可溶性酶与基质混合培养，而进行酶触反应。此时，从混合反应系中，欲回收具有活性的酶，在再生利用技术上非常困难。采用调节 pH 和加热方法，去除酶与其他污染的蛋白质，从该混合反应中提取得到产品，从经济学观点讲来，酶的这种使用方法很不经济。因为，在每一批次作用之后，仍然具有高活性的酶，常弃而不用。为消除这种弊端，针对应用特点，通常在化学触媒和酶中，可用两种方法得到更为高质的催化剂，即高活性、具适当专一性、稳定的催化剂。近来，在有机合成和高聚合物化学中，发展了类似于酶活性的合成触媒，这种触媒称为“合成酶”。另一种方法，是将有机体产生的酶进行修饰。在后一方法中，含酶的固定化。假设能制出不溶于水，稳定而具有酶活性的制品(固相酶)，那么，上述弊端，完全可以消除。所期望达到的优点如下：

- (1) 酶的稳定性得到改进。
- (2) 具专择性用途的触媒可以“缝制”。
- (3) 酶，可以再生利用。
- (4) 连续化操作可得以实践。
- (5) 反应所需的空间小。
- (6) 反应的最优化控制成为可能。
- (7) 可得到高纯度、高产量的产品。
- (8) 资源方便，减少污染。

1916 年 Nelson 和 Griffin 将酵母菌抽出的转化酶，吸附在木炭上，试验表明，这种酶的活性与天然酶一致。32 年之后 Summer(1948)自杰克豆中发现了尿酶，将其置入 30% 乙醇-NaCl 中，室温放置 1—2 天，不溶解于水。这种不溶于水的尿酶，具有酶活性。由此得知，非水溶性酶，具有催化活性。早年间的研究，虽只顾观察现象，而在应用

效果方面,缺乏酶的固定以验证其性质。但在1953年为了应用目的,却已瞄准酶的固定化。Grubhofer和Schleith,曾将羧肽酶(carboxypeptidase)、淀粉酶(diastase)、胃蛋白酶(pepsin)、核糖核酸酶(ribonuclease)固定在重氮化聚氨基聚苯乙烯树脂上。在此之前,1949年,Miheel和Ewers,已将蛋白质的生理活性实行固定,几年之后,Campbell等(1951)又将抗原蛋白粘合于重氮基对氨基苄基纤维素使之固定。继后,许多文献报道了固定化抗原和抗体的制备与应用。在固相酶的研究方面,这些报道,被视为蛋白质生理活性固定的前驱。随后,据Grubhofer调查表明,50年代固相酶发表的文章不到10篇,到60年代就有许多固相酶文章发表,特别是Katzir-Katchalski及其同事,在伊雷斯曼兹曼科学研究所,发表了有关固相酶物理、化学的固定化新技术的广泛研究。此外,Tosa(1966)研究了以连续工业生产为目标的固相酶的应用。1969年,Tosa利用氨基酰基转移酶,在连续工业化生产中,解决了DL-氨基酸的旋光度问题。这是世界上首次利用固相酶于工业生产的开端(Chibata等,1972)(表1·1)。60年代以来,固定化酶的研究,在美国、欧洲、日本同时很快兴起;固定化酶的报告,由此而显著增加。到60年代末,以酶的有效利用为目的,酶工程学已成为一门技术科学。1971年,首届酶工程学术会议,在新罕布夏州的亨尼克召开,会议论文数量,以固定化酶占居优势。会议还建议提出:固相酶的定义为:“酶自然固定或定位于一定的有限空间,保持固有的催化活性,并能连续地重复使用”。因此,通过专有技术修饰后的酶,不溶解于水,均符合固定化酶的定义。将高分子量基质放进装有半渗透-超过滤膜的反应器进行酶触反应时,低分子量的反应产物不断地透过该膜而被排出,这种装置实质上与固定化酶体系相似。在此之前,各种术语名称,如“水-不溶性酶”、“诱捕酶”、“固定酶”与“母体-支撑酶”,都曾援用过。1971年,会议同样提出了固定化酶的分类:酶分为天然酶与修饰酶,固定化酶属于修饰酶。随同可溶性酶的化学修饰与生物修饰(即:遗传修饰),作为催化剂已经在生产实践中应用。酶分下列三种形式:(1)溶解;(2)固化溶解;(3)固化不溶解,称第(2)种与第(3)种形式为固相酶,比分别称作溶解酶与不溶解酶更为合适。

此后,每两年召开一次会议,会议主题仍然是固相酶。60年代末,日本固相酶研究工作,已经相当活跃。在这一领域中,目前,日本已是领先的国家之一。固相酶除应用于化学合成反应之外,已扩展到新的领域,如化学与临床分析、医药、食品加工以及阐明反应机制等,尤其是60年代,生理活性物质包括酶的固定化,已被瑞典Uppsala大学的Porath及其同事成功地付诸实行。这种固定化技术,作为专择性提取手段之一,叫做“亲和层析法”,美国国家卫生研究院的Anfinsen和Johns Hopkins大学的Cuatrecasas对它的发展做出了突出贡献。

1.2 微生物细胞的固定

酶,虽然皆由有机体——动物、植物与微生物产生,但以微生物为来源制酶,很适于工业生产的目的。其理由如下:(1)生产价格低廉,(2)生产环境不受季节、地点限制,(3)生产周期短,(4)能够大量生产。微生物酶可分为两类:胞外酶(即:由细胞分泌至培养液中)和胞内酶(培养过程中贮存于细胞内)。为了利用胞内酶,必须从微生物细胞中提取,但这种提取出来的酶很不稳定,用作固相酶很不理想。同样,利用微生物多酶系统的催化

活性,通过发酵可以生成许多有用的化学物质。

为了排除从微生物细胞中提取酶,并利用微生物固定化的多酶系统,人们企图将整个微生物细胞直接予以固定,同时研究固定化微生物细胞的连续酶反应(Chibata 等, 1974; Sato, 1975)。用固定化微生物细胞,连续生产 L-天冬氨酸,已在工业生产上取得成功,这是固定化微生物细胞首次应用于工业之始。后来,利用固定化微生物细胞,分别在 1974 年(Yamamoto 等, 1976)和 1980 年从富马酸工业生产 L-苹果酸,从 L-天冬氨酸生产 L-丙氨酸(Yamamoto 等, 1980; Takamatsu 等, 1981)。

根据记载,目前已经工业化的有七种固相酶-微生物细胞系统(表 1·1)。用葡萄糖异构酶连续生产高果糖糖浆,已成为固定化系统的重要领域。

对固定化微生物细胞而言,仍有许多问题,其中如基质与产品通过细胞膜时,渗透度的限制以及副反应的发生等。如果这些问题能够解决,那么,固定化微生物细胞系统将大有希望,微生物体内酶系的使用效率也将愈来愈大。

表 1·1 工业化生产中固相酶与固定化细胞的近期应用

固相酶和固定化微生物	应 用	生 产 时 间
氨基酸转移酶	DL-氨基酸的旋光度解析	1969
葡萄糖异构酶	将葡萄糖异构变为果糖	1973
青霉素酰胺酶	生产 6-APA	1973
大肠埃希氏菌(天冬氨酸酶)	生产 L-天冬氨酸	1973
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> (延胡索酸酶)	生产 L-苹果酸	1974
β -半乳糖苷酶	水解乳糖	1977
<i>Pseudomonas dactiniae</i> (L-天冬氨酸 β -脱羧酶)	生产 L-丙氨酸	1982

固定化微生物细胞的定义,也就是将固定化酶定义中的酶字,更换成微生物细胞,即:“将微生物自然固定或定位于一定的有限空间,保持固有的催化活性,并能连续地重复使用”。固定化微生物细胞,能继续增殖、休眠和死亡,但它的酶活性保持不变。正如前面提到过的,当细胞增殖时,你很难将此固定化系统与某种常规连续发酵工艺区分。这种“固定化增殖细胞”或“固定化活细胞”将在下一章节讨论。

按著者经验,一种固相酶系统用之于工业化,需要三个固定化微生物细胞体系,我们认为,固定化微生物细胞的作用反应,在下述范围内具有优势:

- (1) 酶为胞内酶时。
- (2) 固定化过程中或在其后,从细胞提取的酶,均不稳定时。
- (3) 微生物不含干扰酶,即使含任何干扰酶都很容易失活或者去除时。
- (4) 基质与产品都不是高分子量化合物时。

在此情况下,我们所期望的固定化微生物细胞,具有下述优势。

- (1) 不需要提取酶和酶的纯化工艺。
- (2) 酶活产量在制动过程中很高。
- (3) 工艺稳定产量很高。
- (4) 酶的价格低廉。

(5) 多级酶反应的应用成为可能。

另一方面,对于一种理想的复合生产装置,在连续操作情况下,应当考虑的是装液量体积;使用固定化细胞与常规批次发酵比较,它要求的发酵液体积非常小。因此,在连续生产工艺中,从减少工厂污染角度讲,使用固定化细胞则是非常有利的。

使用固定化微生物细胞系统,碰到的问题之一,就是细菌污染,可使用嗜热与耐高盐细菌调节反应环境,即使有少许污染也很少能存活。

1.3 活的或处于生长阶段的微生物细胞的固定

表 1·1 列举的工业化反应,只是单一酶种的初级催化作用;固定化细胞虽已死亡,但其酶系既具有活性又很稳定。许多有用的化合物,尤其是发酵法生产的产品,通常皆由微生物生活细胞内的各种酶系,通过多级酶触反应而形成。这些反应常需要 ATP 与其它辅酶,如 NAD、NADP 以及辅酶 A 的参与。假如,固定化细胞呈生活状态,那么,这些多酶系反应,可以由它们来完成,而付诸应用。

众所周知,醋发酵工艺中,生物-滤池的发展,始于上一世纪。其主要原理,在于用活体微生物制膜。这种工艺,实质上就是固定化活细胞系统的一种方式。除了这种生物-滤池之外,尚未见到活的固定化细胞用于工业化过程。70 年代,有些研究工作者,开始用活的固定化细胞生产有用产品;如生产乙醇、有机酸、氨基酸、抗生素、酶以及用于有毒化学物质的分解。这方面, Kennedy 和 Cabral 已作了详细描述(本书,第五章)。

1.4 亚细胞粒子和动、植物细胞的固定

70 年代中期,有几篇关于固定化亚细胞粒子的报道,如叶绿体、微体、过氧化物酶体、线粒体。Arkles 和 Brinigar(1975)报道了大鼠肝脏线粒体,吸附于烷基硅烷的玻璃球上,这是有关亚细胞粒子固定化的第一篇报告。两年之后, Tanaka 等(1977),将含有乙醇氧化酶、接触酶、D-氨基酸氧化酶的酵母过氧化物体,以光-交联-树脂为基质,予以固定。之后, Kastle 等(1978),将大鼠肝脏截留的微体,用作体外解毒剂。Yagi 和 Ochiai(1978),将固定化的叶绿体,用来制备叶绿体电极,用作光电流发生器。由此可见,亚细胞固定化的制备,无论在科学与应用研究方面,都是非常有兴趣的课题。

除了微生物整体细胞与亚细胞粒子固定化之外,近期以来,又有动、植物细胞固定化的文献发表。植物细胞的固定化,有利于从植物来源中生产药物,而有催化效果。动物细胞的固定化,实际上用于制作生物传感器,体外支路系统以及用于有用生物材料的生产。

至于植物细胞, Lambert (1979)用玻璃球体吸附,制作固定化藻类(*Anabaena cylindrica*),作放氢气试验。Brodelius 等(1979)用藻酸钙法作 *Morinda*, *Catharanthus* 与 *Digitalis* 的固定化细胞、用于天然产品,如蒽醌、阿吗灵异构体与地谷新的转化。在动物细胞方面,1979 年 Rechnitz 等将猪肾脏薄片,固定于电极膜表面,通过气体-渗透来检测氨气,并用此装置,检测 L-氨基酸的产生。此后, Ikariyama 等(1979),将蚕丝腺后部,用聚丙烯酰胺凝胶固定,此固定化器官,当有氨基酸和能源存在时,能产生丝蛋白。1980 年, Nilsson 和 Mosbach(1980)将动物细胞培养在微载体上,如明胶球体或脱乙酰壳

多糖(chitosan)上。有关动、植物细胞制动术工作,目前,仍属寥寥。估计在不远的将来,这方面的研究,将会有所增加。

1.5 结语

如前所述,始用于固定化酶的技术,同样,适合于制做固定化微生物细胞;以及固定活的微生物细胞,甚至能固定植物和动物细胞。这种固定化系统,已在不同领域中应用,尤其在生物技术领域中起到非常重要作用。遗传工程以及酶工程,被视为生物技术中两门最有前途的技术。尤以固定化的生物触媒,起着重要作用,但两者都不是一门竞技;甚至,各自领域可以互为补充。遗传工程欲成为有效生产技术,必须与发酵工艺学、酶工程、纯化和提取工艺技术相结合。通过遗传工程,固相酶或固定化活的微生物细胞,一种新奇的、为人们所期望的、带有特征性和实用性的微生物会生产出来。这是一门很有希望的生产技术。

因此,著者确信,如果在生物技术有关的不同领域中,加强科学家和工程学家之间相互合作(即:遗传工程、发酵工艺、酶工程和分离工序技术),那么,生物技术将对人类未来的福利事业,作出重要贡献。

(本文据 Ichiro Chibata and Tetsuya Tosa 所著固定化细胞的有关资料编写)

参 考 文 献

- Arkles, B., and Brinigar, W.S.(1975). *J. Biol. Chem.* 250, 8856.
- Brodellius, P., Deus, B., Mosbach, K., and Zenk, M.H.(1979). *FEBS Lett.* 103, 93.
- Campbell, D. H., Luescher, E., and Lerman, L.S.(1951). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 575.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., and Matuo, Y. (1972). *Ferment. Technol. Today, Proc. Int. Ferment. Symp.*, 4th, 1972 p. 383.
- Chibata, I., Tosa, T., and Sato, T.(1974). *Appl. Microbiol.* 27, 878.
- Grubhofer, N., and Schleith, L.(1953). *Naturwissenschaften* 40, 508.
- Ikariyama, Y., Aizawa, M., and Suzuki, S.(1979). *J. Solid-Phase Biochem.* 4, 69.
- Kastle, P.R., Baricos, W.H., Chambers, R.P., and Cohen, W.(1978). *Enzyme Eng.* 4, 199.
- Lambert, G.R., Daday, A., and Smith, G.D.(1979). *FEBS Lett.* 101, 125.
- Micheel, F., and Ewers, J.(1949). *Makromol. Chem.* 3, 200.
- Nelsson, J.M., and Griffin, E.G.(1916). *J. Am. Chem. Soc.* 38, 1109.
- Nilsson, K., and Mosbach, K.(1980). *FEBS Lett.* 118, 145.
- Rechnitz, G.A., Arnold, M.A., and Meyerhoff, M.E.(1979). *Nature (London)* 278, 466.
- Sato, T., Mori, T., Tosa, T., Chibata, I., Furui, M., Yamashita, K., and Sumi, A.(1975). *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1797.
- Sumner, J.B.(1948). *Science* 108, 410.
- Takamatsu, S., Yamamoto, K., Tosa, T., and Chibata, I.(1981). *J. Ferment. Technol.* 59, 489.
- Tanaka, A., Yasuhara, S., Osumi, M., and Fukui, S.(1977). *Eur. J. Biochem.* 80, 193.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I.(1966). *Enzymologia* 31, 214.

Yagi, T., and Ochiai, H.(1978).Adv. Hydrogen Energy 3, 1293.

Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K.,and Chibata, I.(1976).Eur.J.Appl.Microbiol.3,169.

Yamamoto, K.,Tosa, T., and Chibata, I.(1980).Biotechnol.Bioeng. 22, 2045.

第二章 微生物细胞的固定化方法

2.1 导言

本书的其它章节已对各种固定化方法作了历史性的描述,因此在本章中,将略去其历史描述,着重选择与本章有关的主题予以论述:它导源于①固定化方法;②细胞生物学;③反应条件或应用工程学。在每一主题内,将比较和选择各种固定化方法,对其优、劣加以评价。尽管出自各种不同观点,最终,我们希望能将本领域中全部重要文献列制成一幅完整图案。近来,有许多评论性文章非常有用,它概括了许多题目和细目,较之本书包括的内容更多。因囿于参考范围限制及固定化方法论本身的进展,尚不能在许多领域中加以应用。

2.2 固定化的主要意义

2.2.1 固定化的定义

在详细讨论整体细胞固定化之前,必须对此领域作若干重要设计。最好的出发点就是搞清定义。这一定义仍以1971年首届酶工程学会议对固定化酶的定义为依据。所谓固定化细胞,是指“自然固定或定位于一定限制性空间,并保持固有的催化活性,一旦需要和可能,其活性能反复地重复使用”。

本定义概括三个不同方面,与酶的固定化比较,它更多地涉及了固定化微生物细胞的专有特征。

第一方面,关于“限制和定位”,是指几何学的性质,并对异质化产生影响。当与没有催化剂的液体反应物基质,或分散状固相基质相接触时,能形成显而易见的催化活性。这种细胞群的分隔化作用,通常是指固相中的细胞密度变得很高而言。它与游离细胞悬浮液反应器比较,将大大节约反应器的体积。Klein和Eng(1979a)报道了在环氧载体上,每毫升触媒的细胞负荷为0.7g湿细胞。如果使用部分干燥法于藻酸钙-固定的细胞,它的负荷值更高。在细胞群体基础的表面,角叉聚糖的细胞密度可达到 10^{10} 个细胞/ml(Chihata, 1979)。因此,对数量巨大的固相细胞讲来,除部分膜构型外,彼此相对地固定在一个位置上。通过细胞体的渗滤作用,控制反应物的输送。粒子内建立形成的渗滤输送阻力、浓度梯度以及pH的影响,使固定化品系的环境状态与批次液相环境不一致。在大规模生产中,可制做成各种不同构型的反应器,例如叠集-床柱(Lilly, 1978),或颗粒状粒子悬浮液,将其固定于管状膜上(Vieth and Venkatsubramanian, 1979)或纤维上(Marconi, 1978),从而在填料流量和发酵槽搅拌装置间,可以得到分布停留时间变差

的全部特征。这个定义，不包括反应器构型中，细胞仍然自由悬浮、虽然已通过膜过滤分隔装置或者离心，但仍然留存于反应空间的分离物实体(Webster等, 1981)。该反应器中，催化剂酶品种活动于对流区域，在液体中分布均匀，整个细胞体均衡地进入于反应物基质。至于反应器类型，只能用附装单一搅拌器或系列搅拌器(栅状)的类型。关于“限制和定位”，细胞的固定与酶的固定，是没有差异的。

定义的第二方面，是“保持酶活性(尤其是细胞体)的存活性”。保持酶活性，不要求十分完整，只须在一个部位点很高，实际就有足够影响。整体细胞酶活性的保持，可以达到50%，若其效价值低于25%就不宜采用。和提取出的酶不同，整体细胞有一个特殊的问题，也就是活性保留问题。长期以来，对固定化细胞的生活能力只采用了间接的证明，所以对这种预期的活性保留是否真实存在尚具有疑虑。后来，在含营养物的基质中，在重培养条件下，直接观察了细胞生长(Klein等, 1976, 1978; Somerville等, 1977)。报道了载体内细胞生长的直接数据。这方面的报道，已越来越多(Klein and Wagner, 1979)，因此，其自身效应已毫无疑问地为今天所接受。

在固定化试验中，酶活保留的百分数与细胞体存活的百分数，将是不同的两种数值；取决于酶催化反应的复杂水平，完全不要求细胞体的存活能力(Chibata and Tosa, 1977)。对于触媒运转的稳定性，也可能无足轻重，但在乙醇生产中，无论是静息细胞或者是生长细胞，它们的催化作用都成为必要的条件。

定义的第三方面，是在连续方式中，固定化细胞重复使用的问题。这种可能性，通常在不失去活性的反应基质中，与触媒容量分离有关。将异质细胞用适当的固定化方法制做成固定化酶，可以解决这个问题。因此，就连续使用来说，概括起来，是了解固定化作用对酶系统自身的触媒活性的稳定性是否能产生影响。这里，对可溶性酶或固定化酶讲来，可能存在差异；实质上，可溶性酶能表现出较高的稳定性和重复应用的因素(Wandrey, 1979)。采用专择性的固定化工艺(例如多位点固定)，定能有效地改善其稳定性。悬浮的游离细胞，一般是在一天或低于一天时间，就很快衰退。它至多有两个或者三个循环重复的批次；而固定化细胞，实质上都能提高酶活性的稳定性。所以，如想延长并重复使用细胞体，固定化作用成为必要的先决条件。Klein和Wagner(1978)对这种游离细胞与固定化细胞的稳定性作了比较。自此之后，Kokubu等, 1981，又进一步证明了这个问题。在运转中，不使用特别稳定工艺的情况下，它的半衰期是20—25天。值得提到的是，如果在细胞固定化之后使用一种特殊的化学处理，这种运转稳定性可以延迟到一年(Chibata, 1979)。

定义的另一问题，是在固定化之后，细胞结构已经破坏。此时，固定化酶与固定化细胞间有一个界限问题。我们对细胞固定化的定义，适用于发酵中生成生物量的全部过程；也用于固定化操作。通过加热或者使用化学药物使细胞体变性的一些处理方法，会使细胞体的酶活突破细胞壁的包裹。但在已经固定化的整个细胞体内部，它的情况是没有变化的。

2.2.2 固定化方法

对怎样取得寿命长的整体细胞触媒，事实上，固定化具有决定性的重要意义。为达到此目的，我们正在寻求可供诸利用的主要途径方法。从固定化酶工作出发，采用下列类型