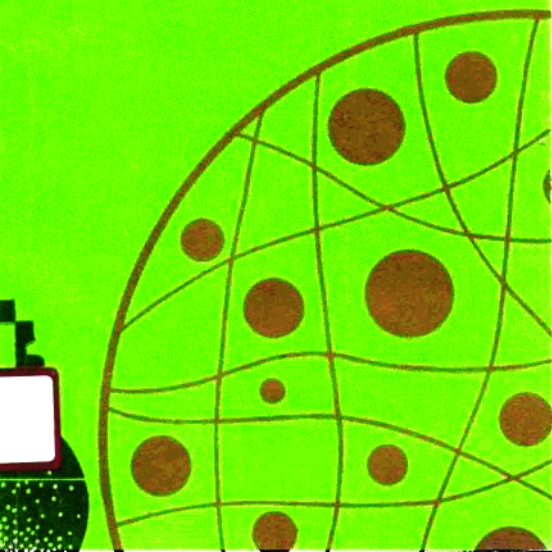


马千敏 陈淑琴 编著

固定化细胞技术及其应用

宁夏人民出版社



前 言

固定化细胞技术是限制细胞自由移动，并制备成固定化细胞的专门技术。这是在酶的固定化基础上发展起来的一项新技术。是酶工程的主要研究内容之一。

固定化细胞与游离细胞和固定化酶比较，具有许多优点，主要表现在：(1) 作为“天然多酶反应器”可以连续反复使用，既不需要分离、提纯酶，也不需要辅酶的再生，酶的活性稳定，因此，非常适用于连续操作和精确的自动控制；(2) 在工业发酵中，固定化增殖细胞生长迅速、浓度高、反应速度快、抗污染能力强，在高稀释率的情况下进行操作，不产生流失现象，不仅可以缩短发酵周期，而且能够使反应器体积大大缩小，生产成本可以大大降低。同时由于采用连续发酵工艺，一边送入培养基，一边排出发酵液，避免了反馈抑制，产物产率显著提高。所以用固定化细胞技术，代替传统的发酵工艺，应用前景十分广阔；(3) 固定化细胞既有效地利用了游离细胞的完整的酶系统和细胞膜的选择透性，又进一步运用了酶的固定化技术，由于它兼有两者的特点和优点，制备又比较容易，所以具有在工业生产中和科学研究中广泛应用的巨大潜力。

当然，固定化细胞技术也有它的局限性，如利用的是胞内酶，而细胞内多种酶的存在，会形成不需要的副产物；细胞膜、细胞壁和载体都存在着扩散限制作用；载体形成的孔隙大小影响高分子底物的透透性等，但这些缺点并不影响它

的实用价值。

事实上，固定化细胞技术现在已经在工业、农业、医学、化学分析、环境保护、能源开发和理论研究等方面得到了广泛的应用。今后，随着这一技术的进一步完善和成熟，必将取得更加丰硕的成果。

科学家们指出，未来的固定化细胞技术方面的最激动人心的发展和成就将是采用基因工程技术和细胞融合技术人工组建的细胞、固定化技术和连续操作的生物反应器三者之间巧妙的结合，这将使整个发酵工业和化学合成工业彻底改变面貌。

在本书的编写过程中，得到了甘肃省科委和甘肃省科学院的热情支持，邓学箴、姚惠芬、侯美娟、周剑平、芦洪英、刘东等同志帮助整理了部分技术资料，在此深表谢意。

限于我们的水平，本书不足之处在所难免，恳请读者批评指正。

编者 一九八九年十一月

目 录

第一章 固定化细胞

一、固定化细胞的定义和分类.....	(1)
二、固定化细胞的形态特征.....	(2)
三、固定化细胞的生理状态.....	(7)
四、固定化细胞的酶学性质	(11)

第二章 固定化细胞的载体

一、固定化细胞载体的选择	(16)
二、固定化细胞常用载体	(22)
(一) 海藻酸钠.....	(22)
(二) 卡拉胶.....	(23)
(三) 聚乙烯醇 (PVA)	(28)
(四) 聚丙烯酰胺.....	(32)
(五) 明胶.....	(35)
三、载体对固定化细胞的影响	(47)

第三章 固定化细胞的制备方法

一、包埋法	(59)
(一) 珠形固定化细胞的制备.....	(60)
(二) 非珠形固定化细胞的制备.....	(65)
(三) 胶囊包封法.....	(65)
(四) 制备方法实例.....	(66)
二、吸附法	(73)

三、交联法	(76)
-------------	------

四、共价结合法	(79)
---------------	------

第四章 固定化细胞的反应动力学

一、酶反应动力学	(82)
----------------	------

(一) 米氏 (Michaelis-Menten) 方程	(82)
------------------------------------	------

(二) 各种因素对酶反应动力学的影响	(87)
--------------------------	------

二、固定化细胞反应动力学	(94)
--------------------	------

第五章 固定化细胞的生物反应器

一、固定化细胞生物反应器的类型及其应用	(110)
---------------------------	-------

(一) 填充床反应器 (PBR)	(110)
------------------------	-------

(二) 连续搅拌罐反应器 (CSTR)	(112)
---------------------------	-------

(三) 流化床反应器 (FBR)	(113)
------------------------	-------

(四) 空心纤维反应器	(114)
-------------------	-------

(五) 转盘式反应器	(115)
------------------	-------

(六) 其它类型反应器	(115)
-------------------	-------

二、固定化细胞生物反应器类型的选择	(116)
-------------------------	-------

(一) 细胞存活力的要求	(117)
--------------------	-------

(二) 载体的类型	(117)
-----------------	-------

(三) 底物的性质	(118)
-----------------	-------

(四) 反应动力学方面的考虑	(118)
----------------------	-------

(五) 工艺操作要求	(118)
------------------	-------

(六) 生物催化剂更换和再生的程度	(118)
-------------------------	-------

(七) 水力学方面的问题	(118)
--------------------	-------

(八) 反应器设计和制造的难易程度与成本 ...	(119)
三、固定化细胞生物反应器的反应动力学分析.....	(120)
(一) 单酶型固定化细胞生物反应器	(120)
(二) 固定化活细胞生物反应器	(128)

第六章 固定化细胞技术的应用

一、固定化细胞技术应用与研究概况.....	(139)
(一) 在工业方面的应用	(139)
(二) 在医学方面的应用	(142)
(三) 在生物传感器方面的应用研究	(143)
(四) 在环境保护和能源开发方面的应用	(143)
(五) 其它方面的应用研究	(144)
二、固定化细胞技术应用实例.....	(145)
(一) 生产果葡糖浆	(145)
(二) 生产 L-天门冬氨酸	(163)
(三) 生产酒精	(171)
(四) 发酵啤酒	(195)
三、固定化植物细胞与应用.....	(204)

附录 固定化细胞技术常用术语和词汇.....	(231)
------------------------	-------

主要参考文献

第一章

固定化细胞

研究和应用固定化细胞技术，首先要全面了解固定化细胞。这是我们掌握这一技术的基础。本章重点讨论固定化细胞的分类、形态和各种特征。

一、固定化细胞的定义和分类

固定化细胞就是被限制自由移动的细胞，即细胞受到物理化学等因素约束或限制在一定的空间界限内，但细胞仍保留催化活性并且具有能被反复或连续使用的活力。

固定化细胞按其细胞类型有固定化微生物、植物和动物细胞三大类；按其生理状态又可分为固定化死细胞和活细胞两大类（图 1.1）。

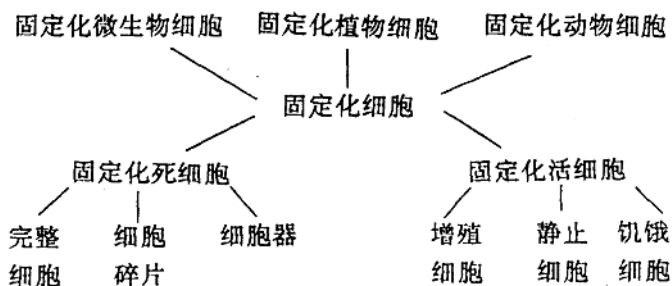


图 1.1 固定化细胞分类

自从二十世纪七十年代开始研究和应用固定化细胞技术以来，固定化细胞已经发展到第三代。第一代固定化细胞以固定化死细胞为主体，大部分是催化比较简单的单酶反应，如异构酶、水解酶等。第二代固定化细胞以固定化增殖细胞（细菌和酵母）为主体，主要利用增殖细胞内的多酶系统或整个代谢过程来连续生产各种氨基酸、有机酸、多肽、酒精和啤酒等产品。第三代固定化细胞就是固定化动、植物细胞。动、植物细胞固定化之后，可以克服游离细胞大规模培养时生长缓慢、靶物质产率低、对机械作用敏感，需支持物等技术上的困难，这就大大促进了动植物细胞大规模培养、生产工业化和商品化的可能性，从而开拓了一个新的非常重要的应用领域。

二、固定化细胞的形态特征

固定化细胞由于其用途和制备方法的不同，可以是颗粒状、块状、条状、薄膜状或不规则状（同吸附物形状）等，目前大多数制备成颗粒状珠体。这是因为不规则形状的固定化细胞易磨损，在反应器内尤其是柱反应器内易受压变形，流速不好，而采用珠体就可以克服上述缺点。另外，圆形珠体由于其表面积最大，与底物接触面较大，所以生产效率相对比较高。

细胞被固定在载体内形态是否会有变化？通过光学显微镜、电子显微镜和扫描电子显微镜观察表明，固定化细胞在形态学上一般没有明显变化，细胞形态与自然细胞没有明显

差别 (图 1.2, 1.3)。陈家任等观察到固定化酵母细胞膜有内陷现象 (图 1.4), 无论用海藻酸钙、聚乙烯醇或聚丙烯酰胺凝胶包埋, 都有类似情况。形成“凹池”的原因尚待进一步研究。

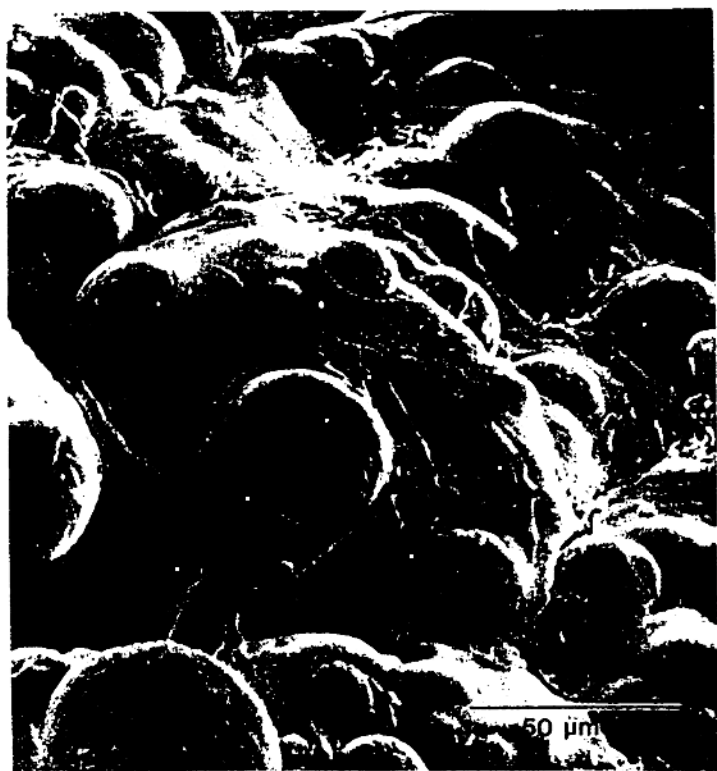


图 1.2 包埋在 α -纤维素珠里的游动放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)
完整细胞的扫描电镜照片

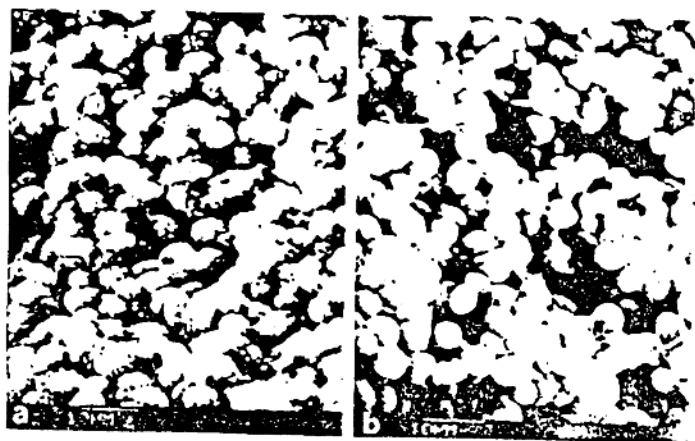


图 1.3 固定化增殖酵母细胞在不同载体表层的分布

a. 海藻酸钙固定化酵母珠体

b. 聚乙烯醇固定化酵母凝胶



图 1.4 不同载体的固定化细胞扫描电镜观察

A.B.C 分别为海藻酸钙、聚丙烯酰胺凝胶和聚乙烯醇凝胶固定化酵母细胞

游离酵母细胞被包埋固定之后，凝胶内的活细胞数一般约在 10^6 – 10^8 个 / ml 的范围之内。在未增殖之前，酵母细胞在载体里处于均匀分布状态，这在不同的凝胶材料中都可得到证实。当固定化酵母细胞在完全培养基中通气培养（摇床，28–30℃）16–40 小时，则酵母细胞增殖非常迅速（图 1.5）。固定化细胞的重量也显著增加（表 1.1）。

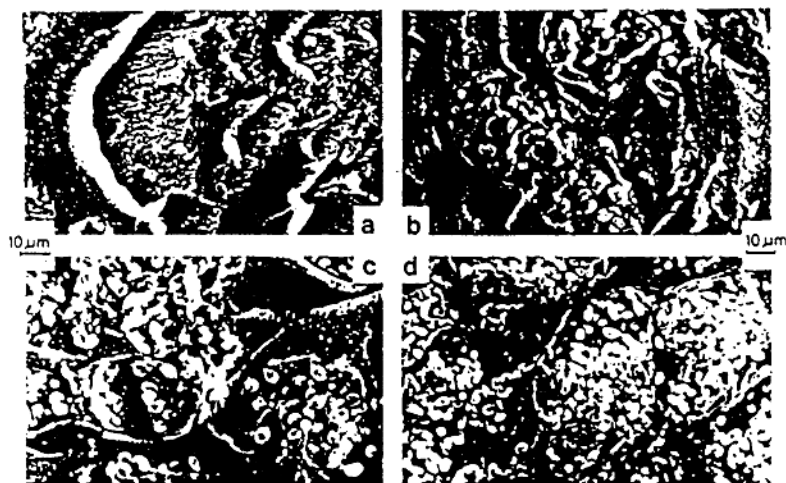


图 1.5 在完全培养基中培养的凝胶珠体中细胞群落的变化

- a. 细胞刚包埋以后
- b. 培养 16 小时以后(对数生长初期)
- c. 培养 40 小时以后(对数生长后期)
- d. 培养 1200 小时以后(静止生长期)

表 1.1 固定化细胞增殖情况对比

		固定化酵母		固定化增殖酵母	固定化增殖细菌
增 重	发酵前重量(g)	22.0		22.0	22.0
	发酵后重量(g)	34.5		33.0	27.0
	增重(%)	56.8		50.0	22.7
酵母数 / ml		发酵前	2.2×10^8	5.4×10^8	
凝 胶		发酵后	4.3×10^9	5.6×10^9	

从表 1.1 中可以看出, 用海藻酸钙凝胶固定的细胞(酵母和细菌)不论事先是否培养增殖, 这些活细胞在反复发酵中都不同程度地增殖了。其中, 以事先未培养的固定化酵母增殖量最大。固定化细胞增殖以后, 酵母细胞在凝胶内的分布状态也发生了明显的变化。凝胶切片表明在凝胶的表层形成了稠密的增殖酵母细胞薄层, 厚约 1mm, 而凝胶中央细胞很少。在海藻酸钙凝胶珠体表层形成的酵母细胞群比较均匀、致密, 而在聚乙烯醇、琼脂等凝胶表层形成的酵母细胞团比较分散, 有大有小(图 1.6)。长时间发酵后增殖酵母细胞几乎充满凝胶内所有可利用的表层空间。部分凝胶块表面上的酵母增殖细胞团常常形成米粒状的小突起, 用肉眼就

能观察到。

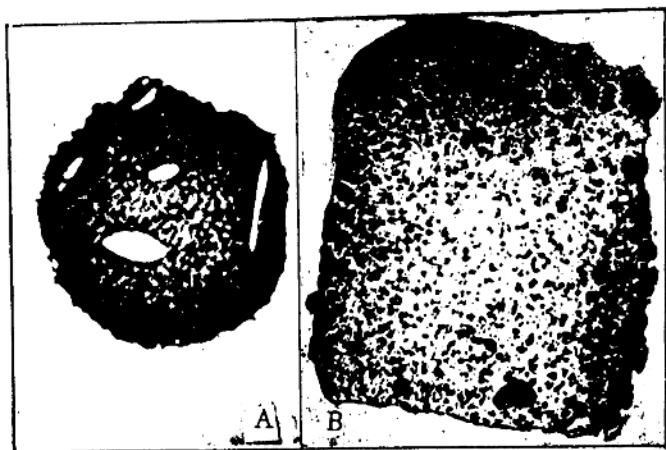


图 1.6 固定化酵母细胞载体切片显微观察(增殖后)

A. 海藻酸钙固定化酵母珠体

B. 聚乙烯醇固定化酵母凝胶块

三、固定化细胞的生理状态

固定化死细胞一般在固定化之前或之后细胞经过物理或化学方法的处理，如加热、匀浆、干燥、冷冻、酸及表面活性剂等处理，目的在于增加细胞膜的渗透性或抑制副反应，所以比较适于单酶催化的反应。

固定化静止细胞和饥饿细胞在固定化之后，细胞是活的，但是由于采用了控制措施，细胞并不生长繁殖，而是处于休眠状态或饥饿状态。

固定化生长细胞又称固定化增殖细胞，是将活细胞固定在载体上并使其在连续反应过程中保持旺盛的生长、繁殖能力的一种固定化方法。与固定化酶和固定化死细胞比较，由于细胞能够不断繁殖、不断更新，反应所需的酶也就可以不断更新，而且反应酶处于天然的环境中，更加稳定，因此，固定化增殖细胞更适宜于连续使用。从理论上讲，只要载体不解体，不污染，就可以长期使用。固定化细胞保持了细胞原有的全部酶活性，因此更适合于进行多酶顺序连续反应。所以说，固定化增殖细胞在发酵工业中最有发展前途。

固定化增殖细胞的生活力如何？催化活性怎样？这是大家都关心的基本问题。

图 1.7 表示海藻酸钙凝胶中细胞的生长与完全培养液中的游离细胞生长的比较。在初期，两者的生长速度相类似。在 30 小时时，游离细胞达到最高的生长率 (4.8×10^8 细胞/ml 培养液)。而固定化酵母细胞表现出比游离细胞生长得更好。经 40 小时培养后，凝胶中的活细胞数可达到游离细胞数的 10 倍以上。

固定化增殖培养之前，凝胶珠看上去是透明的，因为它含有少数细胞。增殖培养后，凝胶珠的外观变成与均匀地埋大量细胞的凝胶相似。千畑一郎等人研究表明载体表层的固定化增殖细胞团（薄层）在连续发酵过程中呈现高效率的催化活性（表 1.2），而均匀的未增殖的固定化细胞则其活

力不能得到充分利用。根据我们的研究，用不同的载体包埋的固定化增殖酵母细胞，在分批发酵或柱式反应器连续发酵过程中，凝胶内的固定化酵母细胞数一般都可达到 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml，而发酵液（分批发酵）或发酵流出液（连续发酵）中的酵母细胞数一般只有 $10^6 \sim 10^7$ / ml，也就是说，凝胶中的酵母细胞数是发酵液中的细胞数的 100 倍以上，显然，发酵液中的酒精绝大多数是凝胶中的增殖酵母细胞发酵生产的。

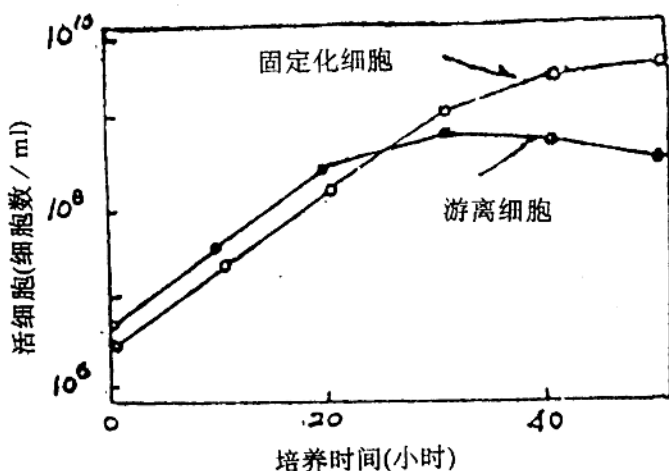


图 1.7 游离的和固定化的酵母细胞的生长

表 1.2 游离的和固定化的酵母细胞
生产酒精的活力对比

类 别	活细胞 细胞数 / ml	活 力 mg / ml / h	比活力 mg / 10 ⁸ 个细胞 / h
游离细胞	4.3×10^8	3.6	0.87
固定化增殖细胞 (薄层)	5.4×10^9	50.0	0.92
固定化活细胞 (均匀)*	5.4×10^9	18.7	0.33
	1.3×10^{10}	21.2	0.12

* 用常规固定, 未增殖

在凝胶表层形成高密度增殖细胞团的主要原因可以认为是凝胶的扩散限制作用的结果。这一作用导致在凝胶内部形成有效营养成分浓度梯度(包括溶解氧), 由于凝胶表层有效营养成分最高, 氧含量充足, 最适合于细胞生长, 加上表层有利于细胞分泌代谢产物, 促进新陈代谢。所以就在表层形成了高密度细胞薄层。

由于固定化细胞的催化活性主要集中在凝胶表层, 所以凝胶颗粒或凝胶块大小, 必然影响它的催化效率, 可以认为用包埋法制备的凝胶颗粒最适大小应该是 2~3mm。但考虑到工业生产中因凝胶颗粒过小可能造成各种困难和问题, 使

用多大的固定化细胞可以根据实际情况确定，但要充分考虑固定化细胞的这一特性。采用多孔性载体在一定程度上可以改变大凝胶块的内部结构，形成一种网状“通道”凝胶结构，从而人为的增加许多条底物和产物的“通道”，这对于提高大凝胶块的催化效率是十分有效的方法。

长期维持固定化增殖细胞的活性和良好的生理状态，一般有两种方法：一种是连续供给营养物质，在固定化细胞持续增殖状态下加以利用；另一种是每隔一定时间，供给一定营养物质，使固定化细胞的活性处于不断恢复状态下而加以利用。除此之外，适当的供给氧气也是十分必要的，尤其是在固定化增殖细胞好氧发酵中更为重要。

在研究和应用固定化细胞时，经常需要确定固定化细胞的生理状态，这是十分必要的。对固定化细胞的生理状态可以用多种方法进行定性和定量的观察与测定，对于固定化微生物细胞，一般多采用血球计数板法，也可以用曲线法、细胞重量法、比浊测定法、菌落计数法等。由于细胞被凝胶固定，在计数前要用一定的方法将凝胶溶解。海藻酸钙凝胶可以加磷酸缓冲液缓缓溶解，或用碳酸钠等溶液溶解；卡拉胶等可以先用乳钵将凝胶研碎，然后用生理盐水稀释；聚乙烯醇等载体机械强度高，又不溶于磷酸缓冲液，不能用上述方法，但可以加热溶解，然后测其细胞总数和出芽率。

固定化植物细胞的活性，则可采用质壁分离法、特定染色法、呼吸熵测定法等。