



微生物活细胞的固定化

张 洪 泉

(江苏省食品发酵研究所,南京)

随着固定化酶和固定化细胞技术的发展,近年来人们十分注意活细胞的固定化。众所周知,以往利用固定化细胞生产 L-天门冬氨酸和 L-苹果酸的酶反应都是单一酶催化的,这种细胞是死的,而仅仅细胞内的酶有活性^[1-3]。可是,通常许多发酵法生产的乙醇、谷氨酸、L-异亮氨酸、柠檬酸和维生素等,都是通过生长中的微生物的多酶系统进行顺序的连续反应形成的。如果我们能够将这些菌的细胞以活的状态

固定化,那末就有可能在这些多酶反应里得到应用。近几年已有许多文献报道^[4-21],采用适当的固定化方法,可以制成固定化活细胞,又称固定化生长细胞或固定化增殖细胞。不仅其中的细胞能够存活,而且能够生长和繁殖。因此有可能利用固定化活细胞来进行通常发酵法生产的产品。它的优点是:(1) 由于固定化增加了细胞浓度,使反应速度加快,缩短发酵周期,(2) 培养液可以简化,如固定化活细胞连续产

在杆菌肽过程中,只需添加蛋白胨,(3)发酵中不含或含少量的菌体,使纯化方便,收率提高,成本相对降低,(4)效率高,一般游离细胞发酵只用一次,而固定化活细胞可以反复使用数十次,(5)使发酵过程的控制更好,更容易。因此,这项新技术具有一定的实际应用价值。本文试图就微生物活细胞固定化的基本原理、方法和应用方面作一些介绍。

一、固定化活细胞的制备方法

我们在选择微生物活细胞固定化的材料和方法时,首先要考虑固定化过程在无菌条件下操作是否容易。第二,固定化过程的反应条件和所用化学试剂对活细胞无害。第三,活细胞在载体内要有一定的持留空间。第四,稳定性要好,要有一定的机械强度。目前文献报道的活细胞固定化方法大致可分为:(1)吸附法,(2)包埋法,(3)共价交联等几种方法,其中以包埋法最好。

(一) 吸附法^[4-7]

吸附法是将微生物活细胞直接结合于水不溶性载体上。一般可分为物理吸附和离子吸附。其中以离子吸附法效果较好,它的吸附机制是载体和细胞表面的静电作用。因此,我们选择吸附方法时,不仅要考虑细胞性质,即细胞壁组成、带电性和菌龄,而且也要考虑载体性质,即载体组成、表面电荷和表面积。同时,还要注意代谢过程中溶液 pH 的变化。例如酵母细胞表面带负电荷,我们应当选择带正电荷的载体。显然载体组成也很重要,如玻璃和陶瓷是由铝、硅、镁等氧化物组成,在溶液里它们的表面有离子可供交换。若将这些铝、硅、镁的氧化物变成氢氧化物,则这些载体表面的羟基在一定条件下能够被细胞表面的氨基或羧基取代,使细胞和载体之间形成键。

另外,我们根据某种活细胞的性质,有目的的修饰载体可以促进吸附。Sitton 等^[5-6]对产乙醇的啤酒酵母细胞采用了以下固定化的方法:先将已灭菌的填充圈(或称腊希格圈)浸没在无菌的 25% 明胶溶液中,然后把涂有明胶的填充

圈用 3% 戊二醛溶液喷洒,再干燥 24 小时。这样处理的填充圈具有活泼的反应基团,可以有效地吸附酵母活细胞。

(二) 包埋法

包埋法是将微生物活细胞包埋于适当的格子材料内的方法。适用于活细胞包埋的材料有聚丙烯酰胺凝胶,角叉菜聚糖凝胶,海藻酸钙凝胶和琼脂等。根据微生物活细胞的性质、底物和产物的化学性质、分子量大小、选择不同的材料和包埋方法。

1. 聚丙烯酰胺凝胶^[8-11]。采用该材料包埋活细胞要尽可能设法避免伤害细胞的活性,尤其对于需氧菌更要注意,因为丙烯酰胺聚合过程中的氧化条件将危害需氧菌细胞。

Morikawa 等^[10]用聚丙烯酰胺凝胶包埋 *Bacillus sp.* 活细胞连续生产杆菌肽,方法如下:先将培养液于 10,000g 离心 30 分钟收集菌体,用生理盐水洗两次,使菌浓度为 200mg/ml。然后将 25% 丙烯酰胺溶液 20ml 加到 25ml 菌悬浮液中,再添加生理盐水 52ml,用氮气保护,并以添加 5% 过硫酸铵 2.0ml 和 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 1.0ml 引聚,在冰浴中反应 20 分钟形成坚硬的凝胶。然后,将凝胶切成小块(8—27mm³),用生理盐水洗净即可使用。经用罐连续培养,半衰期约 10 天。

2. k-角叉菜聚糖凝胶^[12-16]。k-角叉菜聚糖是一种从海藻分离出来的多糖,它由 β -D-半乳糖硫酸脂和 3,6-脱水- α -D-半乳糖组成。首先被 Chibata 等^[12]应用于酵母活细胞和细菌活细胞的固定化,分别连续产生乙醇和 L-异亮氨酸。一般方法如下:16g 湿菌体悬浮于 25—30℃ 的 16ml 生理盐水中,3.4g k-角叉菜聚糖溶解于 37—60℃ 的 68ml 生理盐水中。将两者混合均匀,并且在 10℃ 冷却 30 分钟。为增加凝胶强度再在冷的 0.3MKCl 溶液中浸透,然后切成 3×3×3mm 方块。或将上述混合液通过 1mm 小孔的特殊喷嘴,以恒速滴入 KCl 溶液中形成直径 3mm 的小球。若稳定性不够满意,还可使用戊二醛和己二胺交联。Yamamoto 等^[16]用该材料包埋 *Pseudomonas dacunhae* 活细胞连续生

产 L-丙氨酸时,经戊二醛交联的可用 46 天,而未经交联的仅用 14 天。

3. 海藻酸钙凝胶^[17-20]。海藻酸是由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L- 古洛糖醛酸组成的一类共聚物,在钙离子存在下凝胶化,能够在温和条件下包埋活细胞,而且通透性好。一般方法是:在无菌条件下以 2% 海藻酸钠溶液与活细胞混合得到 20% 浓度的细胞浆。然后,滴入 0.1M CaCl₂ 溶液中,形成 1.9mm 直径 30 μ l 体积的小球,并在 30℃ 保温 2 小时使其充分固化。Makiguchi 等^[19]用海藻酸钙凝胶包埋 *Photobacterium phosphoreum* 的活细胞制取生物发光材料,其方法很巧妙,先将聚氨酯泡沫塑料浸没在活细胞和海藻酸钠混合液中,经充分除泡后投入 0.4M CaCl₂ 溶液中固化 15 分钟,然后用 3% NaCl 溶液洗。用该法可以制成各种形状的生物发光材料。

(三) 共价交联法^[14,21]

这是一种通过交联剂把活细胞共价交联到载体上的方法。交联剂有异氰酸盐、氨基硅烷、戊二醛和氰尿酸氯等。但是,由于共价键形成过程中往往毒害了活细胞,所以应用受到限制。

二、固定化活细胞的应用

近十年来,国外对固定化活细胞技术进行了广泛的应用研究,可以列举数例来说明,见表 1。

除表 1 所列实例以外,近来我国已有一些单位进行啤酒酵母等活细胞的固定化,用于生产啤酒已取得可喜的进展^[20,21]。

总之,对于涉及多酶系统,进行顺序的连续多步反应生产的代谢产物如乙醇、氨基酸、类固醇、维生素和肽类抗生素等,采用活细胞固定化技术是有益的,易于连续化、自动化、提高效率、提高产品质量、减少设备投资费用和降低生产成本。但是,该技术应用于工业实际尚有不少问题,如需氧菌的活细胞固定化后,氧的传递受到固-液界面的阻碍,底物和产物的扩散受到凝胶粒大小、形状和底物浓度的影响,以及连续使用过程中如何保持细胞活性的稳定性等都有待

表 1 固定化活细胞应用实例

微生物	材料和方法	产物	使用稳定性	参考
啤酒酵母菌 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	填充圈 吸附法	乙 醇		6
简单芽杆菌 <i>Arthrobacter simplex</i>	聚丙烯酰胺 凝胶包埋法	脱氢考的松		8
生黑葡萄糖杆菌 <i>Gluconobacter melanogenus</i> IF3293	同 上	L-山梨糖 酮	使用 15 天	9
芽孢杆菌 <i>Bacillus. sp.</i>	同 上	杆菌肽	半衰期 10 天	10
谷氨酸棒状杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> MB-1328	同 上	谷氨酸		11
卡尔斯伯酵母菌 <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	k-角又菜聚 糖凝胶包埋 法	乙 醇	连续 3 个月以 上	4, 12
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i> IAM1133	同 上	2,3-丁二醇	连续10天	14
粘质赛氏杆菌 <i>Serratia marcescens</i>	同 上	L-异亮氨酸	连续 30 天以上	15
德阿昆哈假单胞菌 <i>Pseudomonas dacuhae</i>	k-角又菜聚 糖凝胶包埋法	L-丙氨酸	连续 46 天	16
碱光发光杆菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> MT-10201	海藻酸钙凝 胶包埋法	生物发 光物		18, 19
葡萄汁酵母菌 <i>Saccharomyces uvarum</i> ATCC 26602	同 上	乙 醇	21 天	17

进一步研究。

参 考 文 献

[1] Durand, G. and M. Navarra: *Process Biochemistry*, 13(9): 14—23, 1978.
 [2] 千畑一郎,土佐哲也:醱酵と工業,55(4):13—24,1977.
 [3] Chibata, I. and T. Tosa: *Industrial Applications of Immobilized Enzymes and Immobilized Microbial Cells*, *Immobilized Enzyme Principles* (ed. by Lemuel B. Wingard, Jr., Ephraim Katchalski-Katzir and Leon Goldstain), Vol. 1. pp. 329—357. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976.
 [4] Friedla, B. K.: *Process Biochemistry*, 15(7): 2—8. 1980.
 [5] Sitton, O. C. and J. L. Gaddy: *Biotechnol Bioeng*, 22(8): 1735—1748, 1980.
 [6] Sitton, O. C. et al.: *Biotechnol & Bioeng Symp.*

(下转第 100 页)

