

究表面物理化学过程中开拓的新领域。例如用 Finnigan MAT TSQ70 型三重四极质谱计快原子轰击电离法分析短杆菌素。

微生物化学组分除上述有机化合物外,还有若干种微量无机元素。目前对微生物无机元素的研究远远落后于对有机化合物的研究。无机微量元素的分析方法除现有的原子吸收光谱(AAS)和发射光谱(OES)之外,电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)为微生物无机元素的超痕量分析提供了有利工具。

单细胞结构的定位分析可用激光诱导质谱法,也称作微探针分析(空间分析)。这种激光微探针质量检测器(LAMMA)是由激光器、飞越时间质谱计和紫外透射显微探针(空间分辨率为 $1\mu\text{m}$)组成。用此方法研究气溶胶、生物细胞结构,以及生物组织中某些元素的主体分布。

依据微生物化学组分的指纹图鉴别微生物,有的已达到自动化程度。例如 AMBIS 微生物自动鉴定系统可对蛋白质电泳图的自动识别,HP5898A 微生物鉴别系统可对微生物脂肪酸图谱的自动识别,目前都有商品出售。

2. 微生物物理化学特性的测量:由于对微生物的光学、电学、热学等物理化学特性的深入研究,不仅促进了基础研究的深入开展,而且还研制出各种不同类型的自动化仪器。

通过研究细胞在电场中的迁移行为来分离细胞和分析细胞表面结构与功能关系的细胞电泳法,自1902年至今已有近90年的历史。80年代后期,经典的细胞电泳仪配上了微机、显微录相等现代技术。1960年以来,在免疫学、临床医学、遗传工程等学科推动下,涌现出多种新的、有效的电泳方法。首先是显微细胞电泳,能在生理条件下测定细胞,并可直接观察细胞形态、测定不同深度的细胞运动速度和速度分布。本法测定细胞数目少于200个,不能用于制备;流式细胞电泳,具有分析和制备功能,流动过程中可任意截取所需滴度的细胞组分;激光-多普勒细胞电泳仪可不经分离同时测定多种细胞混合物,准确、快速,能在生理条件下测定;密度梯度细胞电泳也是同时利用电场力和重力分离细胞,由于用大管做分离室,有效地克服电渗影响,适于制备兼分析;高压毛细管细胞电泳设备简单、操作方便、快速可靠、结果处理简单,适用于常规分析和制备,但不能在生理条件下使用;电磁场法细胞电泳同时利用电场和磁场力分离细胞,目前尚未推广采用^[4]。

细菌生长过程中其周围液体的电导率会发生有规则的变化,通过对电导或阻抗的变化可以估计微生物的数量和鉴别某些细菌的种、属名称。目前市售商品有英国 Malthus 仪器公司生产的 Malthus Microbial Analyser 系统,它是测定电导率的变化。另一种是美

国 McDonnell Douglas 卫生保健系统公司生产的 Bactrometer 微生物监控系统,它可测定电阻抗变化,也叫做自动化工业微生物监控系统。主要用于乳类和乳制品、肉类及肉制品、水果和果汁、化妆品、药物、冷冻食品、特殊包装材料等。

根据细菌生长时热量变化的测量进行细菌检出和鉴别的方法称微量量热法。利用萤火虫酶系统和生物ATP接触后发光的原理研制的生物发光测定仪。微生物自动检测系统,即麦道公司生产的 Vitek AMS,它是利用计算机监控细菌生长过程浊度或颜色变化来实现对微生物的检出和鉴别,自动化程度高,基本上覆盖了临床和食品微生物常见种类,但试剂昂贵,需进行更有效地利用和开发。

3. 微生物传感器:由固态化学、电化学、膜技术和生物膜转运机制综合应用而派生的传感器称做生物传感器(Biosensors)。

微生物传感器是能感受化学量,并将其转变成电信号的装置。其识别元件是固定化的活的微生物(细菌、酵母菌、霉菌等),而转换器则是电化学电极或场效应晶体管,前者称为微生物电极,后者称为微生物场效应晶体管,二者统称微生物传感器。其选择性低于酶电极,但和酶电极相比具有简便价廉、寿命长及再生反复应用的优点。因此自1975年乙醇细菌电极问世以来得到迅速发展,在食品分析、环境监测、临床检验、发酵过程监控等方面具有广阔应用前景。目前已生产多种电位型和电流型微生物传感器供选用。

免疫电极是根据免疫测定原理发展的一类传感器,包括标记和非标记免疫电极。标记免疫电极有免疫球蛋白G(IgG)与免疫球蛋白M(IgM)传感器,非标记免疫电极有血型传感器和梅毒传感器等。自1980年免疫化学场效应晶体管问世以后,由此引出生物敏感场效应晶体管,主要优点是微型化、集成化,如果和电脑相结合其前景是可观的。

4. 免疫标记技术:化学标记方法和免疫学中的抗原抗体反应相结合形成免疫标记技术。自19世纪40年代开始,相继推出免疫荧光技术、铁蛋白标记技术、放射免疫技术、免疫酶标技术和酶联免疫吸附技术(ELISA),由酶标技术又引出了目前正在推广应用的ABC技术。随着固相抗体技术的发展,常规的颗粒凝集技术,如血凝、乳胶凝集等又获得新的生命力。

人们在实践过程中逐步认识到放免试剂寿命短、后期产物的放射性污染,使放免技术的推广受到限制;酶标技术的弱点是酶试剂的纯度和作用易受种种因素的干扰而不易标准化。因此,探索新的非放射性标记的竞争分析法就成为近年来的发展方向。1979年推出的标记时间分辨荧光免疫分析法使传统的荧光免疫分析法获得新进展。通常用直接夹心双位点荧光免疫分析法测抗原;用固相竞争荧光免疫分析法测抗体或

半抗原^[5]。

在核酸化学深入研究的基础上,利用核酸杂交原理,以特异性的基因探针检出和鉴别微生物。所谓基因探针就是一个带标记的特异性核苷酸片断,因此也是标记技术的一项进展。目前已应用于细菌、病毒感染的快速诊断和其他样品中某些微生物的检出和鉴别。基因探针技术和免疫学技术相结合制备成抗核酸抗体和半抗原标记探针。

1985年出现的多聚酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR),即DNA扩增技术,可用于发现或检测一些不易培养分离的病毒和细菌;检测一些不易获得的少量标本,如人体活检组织,或含微生物极少的标本,如食品、饮水中可能存在的病原微生物;并可对少量标本中检出的病原微生物DNA放大后直接做序列分析和克隆。

人类免疫缺陷病毒的出现是对临床检验技术的严重挑战。目前临床检验HIV抗体的权威方法是用EIA试验程序,另外用Western Blot蛋白电泳法做辅助。由于上述方法许多步骤需人工操作费时间,加之在有职业性接触的医院工作人员中也发现了HIV阳性反应,引起人们的忧虑。麦道保健系统公司在原有Vitek AMS微生物自动检测系统基础上,又推出第二代检测系统,即Vitek免疫诊断检测系统(Vitek Immuno-Diagnostic Assay System, VIDAS)^[6]。它是集固相吸附、酶标试验、荧光检测和乳胶凝集试验诸方法的优点于一体的综合性检测系统。

5. 微生物信息处理:微生物的生长、繁殖过程中表现出无数种状态,其中包括宏观状态(如菌落大小、形状、颜色、浊度、产气等),和微观状态(如菌体大小、形状、化学组分的定性、定量、定序、定位,大分子的结构和功能等)。这些反映客观事实的状态构成了信息,而代表这些信息的数字、字母和符号等统称数据。微生物信息处理就是对这些数据进行收集、传送、存储和加工的过程。通过形形色色的众多信息处理,找到它们的内在联系和规律性,从而更深刻地认识生命本质,以及更充分地开发利用这一类天然资源;尽量减少它们对人类的危害。

微生物学数据库就是将微生物实验室各种基础数据以一定组织方式存贮在一起的相互有关的数据集:国际菌保联合会首先于1970年建立了微生物数据中心,1974年联合国环境总署执委会提出建立世界数据中心和微生物学资源中心。目前许多国家都建立了具有一定特色的微生物数据库,我国也有了一定进展^[7]。

微生物化学组分的光谱图、色谱图、电泳图等化学模式图可用系统聚类分析法解析^[8]。微生物的数值分类法已被分类学家逐步承认并采用。以分子微生物学

为基础的生物技术专家系统已经问世。微生物发酵过程的计算机监控系统正在深入研究并逐步完善。Vitek AMS微生物自动监测系统就是用计算机对微生物生长全过程中的物理信息和化学信息的综合处理器。

(三) 分析微生物学展望

随着生物技术、宇航技术、生命科学和人类卫生保健事业的迅速发展,使过去鲜为人知的分析微生物学,开始受到各国政府、工业集团和科学家的高度重视。例如美国科学基金会每年拨款专款用于加强分析化学和生物化学学科间的协作研究。Battelle Columbus 试验室建立了国家生物医学红外光谱学中心,研究RNA·DNA 施实付立叶变换红外光谱监测生物反应和组成。在美国国防工业和宇航技术中占有重要地位的麦克唐纳·道格拉斯公司先后推出Vitek系列化的微生物自动检验和免疫诊断系统,服务于太空科技事业;另一家有影响的公司—惠普公司为响应生物学革命的挑战,成立了HP-Genenchem公司,加紧研制免疫诊断、分离科学、微生物发酵过程和生物过程的计算机监控系统。国际上许多著名分析仪器厂商对生物技术表现了极大关注,纷纷开拓新产品。围绕上述内容举办了各种专题内容的国际学术讨论会,如今年10月将在旧金山举行第三届生物工程中的分析方法讨论会,以及9月赫尔辛基微生物学快速自动化讨论会。

中国微生物学会为适应现代微生物学和微生物工程发展的需要,组建了分析微生物学分会,并于1985、1987和1989年举办了三届学术讨论会,是我国分析微生物学发展的良好开端。

分析微生物学的发展前景是美好的,但任务是艰难的。首先必须打破学科间的界限,克服分散经营思想,强化综合技术方法学的研究。组建开放性实验室,形成解决问题培养人材的基地,多学科协作的枢纽。尽早高等学校培养新型的专业人材。预计在今后的十年,分析微生物学将获得突破性进展。

参 考 文 献

1. M. J. 小佩尔扎等编著,武汉大学生物学系微生物学教研室译:微生物学,第四版,739页,科学出版社,北京,1987。
2. 周方等:微生物学通报,16: 343—347,1989。
3. Terabe S et al.: Anal. Chem., 56: 111, 1984。
4. 陈义,竺安:色谱,7(4): 209—214,1989。
5. 陈惠文:国外分析仪器,1: 14—18,1987。
6. VIDAS, A major breakthrough in automated microbiology testing, VITEK Systems, Inc., Printed in the USA, VTK 101088-15K。
7. 赵玉峰:分析微生物学专辑(程光胜等主编),269—288页,科学出版社,北京,1988。
8. 朱厚础:分析微生物学专辑(程光胜等主编),256—262页,科学出版社,北京,1988。

固定化技术研究的新进展

夏晓明 侯文华 岳奇贤 周定

(湘潭大学)

(哈尔滨工业大学)

固定化生物催化剂的研究近一、二十年来发展非常迅速。它已由原来的单一固定化酶、固定化微生物细胞发展到动植物细胞、组织器官、微生物孢子^[1]、细胞与酶^[2]、好氧微生物与厌氧微生物^[3]的混合固定化等,其应用研究已涉及发酵、食品、化工、分析、医疗、生化、环境净化等各个领域^[4],展示了广阔的发展前景。为了加速固定化技术的研究与发展,推进固定化生物催化剂的应用,本文就最近固定化技术的一些新的发展,如改善固定化颗粒的成型、比重、传递通透性、固定化过程中的活性损失等方面作一综述介绍。

(一) 改善固定化颗粒的成型

聚丙烯酰胺、聚乙烯醇(PVA)、光聚合树脂等作为微生物固定化的载体具有机械强度高、抗微生物分解、经久耐用等优点,因此受到了广泛的重视。但是它们都存在着成型(球状)难或不易控制的缺点。经过研究发现,在其固定化的过程中引入少量的多糖类物质,则能很好地解决这一问题。如角野立夫等人^[5]采用添加海藻酸盐的办法,解决了聚丙烯酰胺凝胶包埋过程中成球难的问题。其具体方法是:将欲固定的微生物悬浮在15%的丙烯酰胺和8%的交联剂N,N'-甲撑双丙烯酰胺溶液中,再往其中加入1%的海藻酸钠、0.5%的催化剂四甲基乙二胺和0.25%的引发剂K₂S₂O₈,使其充分溶解、混匀,然后通过喷嘴将其滴入20%的氯化钙溶液中,即形成2mm左右的球状海藻酸钠固定化颗粒。然后迅速将这种球粒转入甲苯溶液中,使丙烯酰胺和交联剂充分反应聚合,滤出洗净,即制得了强度为1.5kg/cm²的球形固定化颗粒。岳奇贤^[6]采用类似的方法,也很好解决了PVA-硼酸法中成球难以控制、固定化微生物颗粒因带气泡而上浮等问题。其方法是:先将一定量的PVA和海藻酸钠用蒸馏水溶好,加入一定量的微生物,搅拌均匀,然后用注射器滴入饱和硼酸、氯化钙和OP乳化剂的混合溶液中,充分反应,滤出洗净即得球形固定化微生物颗粒。饭田高三等^[7]则通过研究解决了光聚合树脂固定化过程中成球难的问题。其方法是:将亲水性光聚合树脂、光聚合引发剂苯偶姻乙醚、3%的多糖类物质(海藻酸钠或K-卡拉胶)溶解混匀,加入一定量的微生物或酶,并使之分散均匀,然后用注射器滴入5%的氯化钙或5%的氯化钾和2%的抗坏血酸钠混合溶液中,得球状固定化颗粒凝胶,接着将这种颗粒和含有抗坏

血酸钠的氯化钙或氯化钾溶液一起转入Petri氏培养皿中,用300—400nm的光波从上面和下面同时照射3分钟,即可得压缩强度高达40kg/cm²的球形固定化颗粒,他的研究还表明,加抗坏血酸钠可以减少活性损失和提高固定化颗粒的压缩强度。

(二) 调节固定化颗粒的比重

为了改善固定化微生物颗粒在生化反应器中的流化特性以及水力筛分特性,通过引入各种比重不一的无机颗粒或粉末、发泡剂等可以改善和调节固定化微生物颗粒的比重,从而使之符合人们的愿望以满足不同的要求。角野立夫等人^[5]在制备固定化微生物颗粒的过程中,通过添加无烟煤、活性炭、石榴石等,以调节固定化微生物颗粒的粒径与比重的关系。另外,他还采用添加发泡剂苯乙烯微缩片的办法^[9],来调节固定化微生物颗粒的比重并使之小于1。梅山公一等^[10]采用加二氧化硅的办法定向地改变固定化微生物颗粒的比重。其方法是:合成高分子物质PVA或光敏性聚乙烯醇树脂,加成型调节剂海藻酸钠或K-卡拉胶,然后再加入一定量的二氧化硅和微生物或酶,混匀,分别采取PVA-硼酸、光聚合树脂固定的方法和操作,用注射器滴制成球形固定化颗粒。SiO₂的加入量不同,其比重可以调节为1.03、1.04、1.05等。对于光敏性聚乙烯醇树脂固定,加入SiO₂还可以使其压缩强度由14kg/cm²提高到55kg/cm²。丹羽千明^[11]采用有机高分子物质覆盖无机固定化颗粒(0.1—0.6mm)来调节其比重。硅藻土微粉(比重2.7),加脱氮菌和卡拉胶,加热(低于40℃)溶解混匀,滴入KCl溶液中固化得固定化微生物颗粒,然后将此颗粒弄碎,并使之与硝化菌、丙烯酰胺、交联剂、催化剂、引发剂一起混合,在40℃下聚合反应完毕,冷却、切块成形,即得固定化微生物。它的特点是使粒径为0.1—0.3mm的固定化无机颗粒粉末的比重由2.7降为1.15,从而使流化床反应器的流化能耗减少1/3—1/2。

(三) 改善固定化微生物颗粒的传递特性

添加各种多孔性物质或可以溶出的物质,可以改善固定化微生物颗粒的传递特性。如村上幸夫等人^[12]通过高空隙率的聚酯短纤维来提高固定化微生物颗粒的通透性。其方法是:将由聚酯短纤维形成的直径为10—15mm的球形载体(空隙率96%)投入到聚丙烯酸钠或聚甲基丙烯酸钠和要固定的微生物混合溶胶