

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左右的球状海藻酸钙固定化颗粒。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^[8]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溶液中固定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

中,减压下浸没 30 分钟,使微生物混合溶液浸入载体的空隙中,然后将这种载体球投入到 1% 的氯化钙溶液中,放置 4 小时,滤出洗净,即得固定化微生物颗粒。片岡克之^[13]通过添加粉末活性炭来改善固定化凝胶颗粒内的分子的粒内扩散。其方法是:粉末活性炭加微生物,搅拌混匀,然后再用聚丙烯酰胺法包埋固定。田沢竜三^[14]通过添加通气、透水性好的纤维材料和多孔性材料来改善固定化微生物颗粒的传递特性,消除固定化微生物颗粒中心部位的死区,使颗粒内部和外部得到有效的疏通,充分发挥整个固定化微生物颗粒的效能。其方法是将纤维材料(如中空丝梢、锦丝、脱脂棉和绞纱等)和多孔性材料(如海绵、海绵状物等)和微生物、海藻酸钠混合,滴入氯化钙溶液中形成固定化微生物颗粒,将此颗粒再用聚丙烯酰胺包埋,即得最终的固定化微生物颗粒。丹羽千明^[15]利用添加 CaCO_3 和能被微生物分解的有机物改善固定化微生物颗粒的传递特性。其具体方法是:将卡拉胶、 CaCO_3 和能被微生物分解的有机物预先溶解好,然后加入要固定的微生物,混匀滴入 1—10% 的 KCl 溶液中,凝胶化后滤出,再用聚丙烯酰胺包埋,即得所需的固定化微生物颗粒。其特点是 CaCO_3 和能被微生物分解的有机物质在相当短的时间内(1—2 天)即被除去,卡拉胶也随着时间的推移,慢慢被微生物分解掉,从而使得固定化颗粒内的空隙增大,利于微生物的增殖和固定化颗粒的通气性、通水性以及有机物的扩散传递。小林浩志等^[16]通过将微生物固定在凝胶化颗粒的表面来降低传递阻力。其方法是:首先将亲水性塑料(如 PVA)的水溶液滴入凝胶化试剂中(如饱和硼酸)形成凝胶化颗粒,然后将凝胶化颗粒的表面在水中溶化、膨胀,再使之与欲固定的微生物混合,经过反复冷冻(-40°C)、解冻(室温)两次,即得固定化微生物颗粒。它的特点是将微生物半包埋在固定化凝胶颗粒的表层。市村国宏等^[17]通过将天然多糖物溶出来改善固定化微生物颗粒的通透性和微生物的生存空间。其方法是:将光敏预聚物、卡拉胶或海藻酸钠和微生物混匀滴入 KCl 或 CaCl_2 溶液中,再移去光照,即得固定化微生物颗粒。将此颗粒再通过浸入生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中分别溶出卡拉胶或海藻酸钠,即得所要求的固定化微生物颗粒。

(四) 减少固定化过程中的活性损失

固定化试剂、固定化条件以及固定化过程中的放热等等均影响固定化微生物颗粒的活性。为了提高固定化微生物的活性,人们开发了各种方法。如市村国宏等^[18]开发的光敏树脂包埋法具有不需光敏剂、感光速度快、常温下反应、固定化时间短、包埋的活性高等特点。其方法是:将光敏聚乙烯醇溶液和微生物菌体混合制成均一的菌体悬液液,然后将之扩散到透明的丙烯酸树脂平板上,用 8 盏 20W 的荧光灯从 20cm 的

位置上下照射 10 分钟,得膜状固定化微生物,将此固定化膜再浸入光敏聚乙烯醇溶液中,然后采用同样的方法照射,即制得所需的固定化微生物。桥本奖等^[19]在 PVA-硼酸法固定过程中引入多孔性载体也具有活性下降小、能长期保持等特点。其方法是:将微生物加到预先溶解好的 PVA 溶液中,混匀,再加入海绵状多孔性载体,搅匀,然后滴入饱和硼酸溶液中,充分凝胶化即得固定化微生物颗粒。三村精男等^[20]采用改性淀粉减少聚丙烯酰胺包埋过程中的活性损失。其方法是:将接有丙烯酰胺甲基基团的聚合性淀粉单独和微生物混合或是将它与含有乙烯基的聚合性单体(如丙烯酸胺或丙烯酸等)和微生物混合,然后加入催化剂、引发剂混匀,使之聚合即得固定化微生物块。角野立夫等通过添加絮凝剂^[21]与酯类^[22]的办法来减少聚丙烯酰胺包埋过程中的活性损失。其方法分别是:首先将絮凝剂加到欲固定的微生物悬液中,使微生物形成絮状颗粒微生物,然后再用聚丙烯酰胺包埋,即可得活性较高的固定化微生物;将 5—30% 的聚乙二醇双丙烯酸酯和 1—15% 的交联剂(如 N, N' -甲撑双丙烯酸胺等)以及一定量的微生物混匀,加入一定量的催化剂(如四甲基乙二胺)和引发剂(如 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$),使之聚合,切块即可得固定化微生物,它的特点是避开了毒性强的丙烯酰胺单体。片贝信義等^[23]采用安全无毒的不饱和聚酯树脂单体避开有毒的丙烯酰胺单体。其方法和上法类似,它是将不饱和和聚酯树脂(PEGMA)和交联剂以及微生物混匀,然后再加催化剂和引发剂,使之聚合,冷却切块,即得所要的固定化微生物。片岡克之等^[24]通过有机高分子絮凝剂,先将菌体包裹成颗粒,然后再包埋,以减少其包埋活性损失,方法是:将有机高分子絮凝剂加入微生物悬液中,使之成球状颗粒菌体,然后再用聚丙烯酰胺包埋。

(五) 提高固定化微生物颗粒的强度

桥本奖^[25]报道,在 PVA 凝胶包埋过程中,添加酪蛋白、铝盐、铜盐、钛盐,有利于提高固定化微生物颗粒的强度,而且活性下降小。岳奇贤^[6]的研究表明,添加适量的活性炭、 CaCO_3 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末,可以提高凝胶颗粒的压缩强度。梅山公一等^[10]的结果表明,添加 SiO_2 ,不仅可以定向地调节固定化微生物颗粒的比重,而且还可以大大提高固定化微生物颗粒的压缩强度。

(六) 其他

三岛浩二等^[26]在固定硝化菌的过程中,添加能吸附氨的吸附剂(如沸石),则可以提高固定化凝胶内的氨浓度或增大凝胶内氨的透过性,使得固定化颗粒内的硝化菌活性提高,氨的去除能力增大。其方法是:将预先溶解好的海藻酸钠和亚硝化菌、硝化菌以及吸附剂粉末 [$(\text{Ca}, \text{Na}_2)(\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_{10}) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] 搅拌混匀,滴入 CaCl_2 溶液中,即得固定化微生物颗粒。森直道等^[27]