

固定化微生物细胞的研究和应用

孟 广 震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

固定化酶的最大特点是它可以反复或连续使用, 因而人们对它进行了十分广泛的研究。1965 年以来, 有关研究报告一直成指数关系迅速增加^[1], 专门性著作也相继问世^[2-7]。但迄今为止, 实际用于工业生产的固定化酶仍屈指可数, 主要原因是成本不易过关, 酶的多次使用所带来的经济利益未能抵消并且超过由于引入固定化工艺所带来的经济损失。因此, 寻找成本低廉的载体和简单易行的固定化方法始终是发展固定化酶技术的一个主导因素。近年来, 值得注目的是关于固定化微生物细胞的研究, 为酶学工程的研究开拓了新的前景。

固定化微生物细胞, 就是微生物细胞内特定的酶不经分离提纯, 直接用各种方法将菌体加以固定化, 然后利用它催化各种特定的生物化学反应, 这就免去了酶的分离提纯之繁, 从而最大限度地提高了酶的收率。可以认为固定化微生物细胞是固定化酶研究的一个合乎逻辑的发展结果。由于固定化微生物细胞在某些方面比酶或固定化酶更为优越, 近几年来对它的研究不断深入, 品种也不断增加。本文将通过一些实例概述固定化微生物细胞的制备方法、性质和应用的基本情况。

固定化微生物细胞的制备方法

某些制备固定化酶的方法可以搬用, 如包埋法、交联法及吸附法等。又由于微生物细胞本身从广义上讲已经是一种固定化酶, 一经简单处理 (如热、 β 射线等), 便可反复或连续使用, 这是制备固定化细胞所独具的方法。

一、包埋法

在微生物细胞本身不发生化学反应的情况下, 将其包进半透性的多聚物或膜内、小分子的底物和产物均可自由出入, 而细胞却不会漏出。

1. 聚丙烯酰胺凝胶包埋法: 将单体丙烯酰胺和甲撑双丙烯酰胺在催化剂和加速剂的存在下, 很易聚合成聚丙烯酰胺, 常用的催化剂有过硫酸钾和核黄素, 常用的加速剂有四甲基乙二胺、三乙醇胺和 β -二甲基氨

基丙腈。如果预先将细胞悬液和单体溶液混匀, 则聚合后微生物细胞便被截留在多聚物的细微格子之中。

Chibata 等^[9-12]用此方法成功地制备了固定化大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 11303), 具有高活力天门冬氨酸酶。具体方法如下: 取 10 公斤湿细胞, 悬浮于 40 升生理盐水中, 然后向悬浮液中加入丙烯酰胺 7.5 公斤, N, N'-甲撑双丙烯酰胺 0.4 公斤, 5% β -二甲基氨基丙腈 5 升和 2.5% 过硫酸钾 5 升, 混匀后在 40℃ 放置 10—15 分钟, 使聚合, 然后将得到的凝胶破碎成 2—3 毫米的颗粒, 即得固定化细胞, 天门冬氨酸酶的收率为 72.5%。

聚丙烯酰胺凝胶包埋法是制备固定化微生物细胞最基本最普遍的方法, 用相同或类似的方法已制备得到下述各种微生物的固定化细胞: 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* ATCC 4539), 有高活力的精氨酸脱亚胺基酶活力, 收率为 56%^[13]; 液化无色杆菌 (*Achromobacter liquidum* IAM 1667), 有高活力 L-组氨酸氨基裂解酶活力, 收率 63.8%^[14]; 达昆哈假单胞菌 (*Pseudomonas dacunha* IAM 1152), 有天门冬氨酸 β -脱羧酶活力^[15]; 大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 9637), 有青霉素酰化酶活力^[16]; 新月弯孢霉 (*Cucularia lunata*), 有 11- β -羟化酶活力^[16]; 产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12071), 有合成辅酶 A 的活力^[17]; 谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum* MB 1328), 有合成谷氨酸的活力^[18]; 粪链球菌 (*Streptococcus faecalis* ATCC 8043), 有转化精氨酸的活力^[19]。

2. 琼脂凝胶包埋法: Toda 等^[20]用琼脂凝胶包埋法制备了固定化酵母细胞, 先把 1 份巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) 细胞悬浮物同 4 份 50℃ 的 2.5% 琼脂溶液混合。另备一个 36×1000 毫米的玻璃管, 内装比重为 1 的甲苯-四氯乙烯混合液。将琼脂液滴入玻管, 形成酵母琼脂球, 即得固定化细胞, 琼脂凝胶比聚丙烯酰胺凝胶机械强度差, 但无毒性。

3. 液态膜胶囊法: Mohan 等^[21]用液态膜胶囊制备了固定化反硝化微球菌 (*Micrococcus denitrificans* ATCC 21909), 把微球菌悬浮物分散到含有表面活性剂、阴离子运转促进剂、膜强化剂的有机溶剂中, 形成乳化液, 微球菌被一层液态膜所包围, 构成固定化细

胞。液态膜有选择性的通透性,阴离子 NO_3^- 和 NO_2^- 可透过膜被微球菌还原,而阳离子 Hg^{++} 虽对游离的还原酶有强烈的毒害作用,但因不能透过液态膜,故不能抑制这种固定化细胞对 NO_3^- 和 NO_2^- 的还原作用。

二、热固定法

如果说聚丙烯酰胺凝胶包埋法是制备固定化细胞最基本、最普遍的方法,那末用加热处理法制备固定化细胞则是最简单、最廉价的方法。

高崎^[22-24]用加热处理法制成固定化链霉菌,这是投入生产的固定化微生物的又一重要实例。白色链霉菌 (*Streptomyces albus* YE No. 5) 的葡萄糖异构酶产量高,耐热性良好,菌体较大,适于过滤,将培养终了之菌体,升温至 65℃,热处理 15 分钟,对细胞起自溶作用的酶系被钝化,细胞内之葡萄糖异构酶不再溶出,被固定于菌体内,即得固定化细胞,酶活力收率为 80—90%,方法极为简便。

Vieth 等^[25]的方法有些不同,先将冷冻的暗色产色链霉菌 (*Streptomyces phaeochromogenes*) 细胞悬浮于水中,于 80℃ 加热 1.5 小时,随后冷到室温,把热处理的细胞加到 pH 6.5 胶原蛋白溶液中(细胞和胶原之比为 0.2:3,待初步絮凝后,用 1N 氢氧化钠慢慢将 pH 调至 11.2,然后把上述混合物铺在一块薄板上,于室温下干燥,干膜的厚度为 $2-10 \times 10^{-3}$ 吋,将上述干膜浸入碱性甲醛或戊二醛溶液中(pH 8.0),脛化 0.5—5 分钟,用自来水冲洗半小时后,把膜铺在滤布上,以玻璃棒为轴,把膜和滤布一起卷成一卷,装柱(11.5×1 吋),此固定化细胞柱有很好的葡萄糖异构酶活力。

此外, Kosagi 等^[26]用热固定法制备固定化假单胞菌,具脂肪酶活力。

三、交联法

通过双功能试剂(如戊二醛等),微生物细胞彼此交联,凝集成网状结构,即得固定化细胞。Zienty^[2,27]报告的固定化方法如下:首先用 100 加仑发酵罐培养赭褐色链霉菌 (*Streptomyces alivacens* NRRL 3583),获得胞内葡萄糖异构酶总活力为 135 万单位,含细胞干物质 7 磅,每克含 425 单位酶活力。另取 7 磅 50% 戊二醛稀释到 0.5—0.6% (重量/体积),在搅拌 30—40 分钟的过程中慢慢加到发酵醪液中。在轻轻搅拌下,混合物于室温反应 1.5 小时,而后加入 0.5% 硅藻土,真空过滤,用水冲洗滤饼,总活力为 121.5 万单位,收率约 90%。

四、吸附法

微生物细胞表面带有一定的静电荷,在适当的条件下可以与载体的离子交换基团构成络合物,即得固定化细胞。这种固定化方法比较简单,载体可以再生,

但结合力较弱,外界条件(pH、离子强度、温度、底物浓度等)的剧烈改变,都可能使细胞解吸,这是不足之处。

Hattori^[28]报告用 Dowex-1 树脂吸附大肠杆菌,得到的固定化大肠杆菌有氧化甲酸盐、琥珀酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖、天门冬酰胺以及丙氨酸的作用。

Johnson^[29]关于真菌孢子蔗糖酶的研究是很有趣的,考虑到真菌的孢子虽处于生长休止状态,但具有某些酶的活力,将真菌孢子固定化比菌丝体再易保持稳定。他曾对米曲霉、文氏曲霉和娄地曲霉的孢子作了固定化的比较研究,试验了多种离子交换剂和吸附剂作为载体,包括 CM-纤维素、磷酸纤维素、ECTEOLA-纤维素、Amberlite IR-120、CM-Biogel、硝酸纤维素以及硅胶等。比较结果表明,米曲霉 (*Aspergillus oryzae* NRRL 1989) 可耐受广泛的 pH 改变; ECTEOLA-纤维素在广泛的 pH 条件下均对真菌孢子保持很强的吸附能力。取 7.8 克 ECTEOLA-纤维素悬浮于 0.05M, pH 5.8 的磷酸缓冲液中,平衡后,将 3×10^3 米曲霉孢子直接加到悬浮液中,然后用此悬浮物装柱(165×15 毫米),再用 200—300 毫升缓冲液冲洗,该固定化细胞柱即可用于蔗糖的水解。

五、絮凝法

多电解质等有絮凝微生物细胞的作用,这类絮凝剂包括羧基取代的聚丙烯酰胺、聚磺化苯乙烯、聚羧酸、聚乙基胺、聚赖氨酸、活性硅胶及白土等,在絮凝过程中加入某些吸附剂或助滤剂有时也能起很好的作用。被絮凝的微生物细胞再经冷冻或干燥处理,可提高酶的稳定性并改善其机械性能^[2,30]。

用絮凝法制备的固定化节杆菌 (*Arthrobacter* NRRL B-3728) 有葡萄糖异构酶活力。在慢慢搅拌下,向节杆菌发酵醪液中加入 pH 5.0, 2% 浓度的多电解质 Promafloc C-7,使最终浓度为 0.25%,在必要时可先加助滤剂 Celite 545 (约 0.5%),轻轻搅拌至形成稳定的絮凝细胞,停止搅拌后分离出清亮的发酵液,过滤收集絮凝细胞,在使用前于 -5℃ 冷冻。使用时,将冷冻细胞浸于水或葡萄糖浆中,使其融化,并用机械方法轻轻破碎,得到大小基本一致的颗粒,抽真空除气泡后装柱。

此外,用絮凝法制备固定化米曲霉细胞,具有氨基酸酰化酶的活力。

六、其他方法

有些方法不能归入上述各类,但仍属固定化细胞范畴,故简述如下: Sato 等^[31]用机械方法把梨头霉制成颗粒状,冷冻后再予融化,装柱后可连续使用,这种固定化细胞,具蜜二糖酶活力。津村^[32]用 β -射线处理链霉菌细胞,所得固定化细胞具葡萄糖异构酶活力。南波等^[33]将酵母细胞制成冷冻干粉,和纤维素粉混合

装柱,这种固定化细胞柱具蔗糖酶活力。

固定化微生物细胞的性质

鉴于固定化细胞所涉及的微生物种类繁多,固定化方法又彼此各异,要全面归纳它们的性质,目前还是个比较困难的问题。但人们在这方面的实践活动中所揭示的一些规律和现象,对开展进一步的工作仍然是很重要的。

一、稳定性

和自然细胞相比,固定化细胞无疑增加了稳定性。以戊二醛交联的橄榄色链霉菌为例:取225磅葡萄糖,加55加仑水(42.2%重量/体积),再加入0.001% CoCl_2 和0.01% MgCl_2 ,然后和总活力为41万单位的固定化细胞混合,pH保持在7.7—7.9之间,于60℃搅拌24小时,反应混合物含40.2%果糖。固定化细胞如此反复使用9次,第9次产生38.8%果糖,这相当于第1次转化值的96.5%,与此相对照,未用戊二醛处理的细胞,使用两次,酶活力消耗殆尽。

与固定化酶不同,在固定化细胞制备过程中通常不损伤细胞本身,细胞内的酶也最大限度地保持了自然状态,因此有理由相信,固定化细胞比固定化酶有更高的稳定性。以固定化大肠杆菌为例:用该固定化细胞装柱(10×100厘米),在37℃条件下,以每小时6升的流速通过1M反丁烯二酸铵(pH 8.5,并含有1mM Mg^{++}),流出物用酸调pH 2.8,可得天门冬氨酸结晶,收率高达理论值的95%。固定化细胞十分稳定,在操作条件下 $SV^* = 0.5$ 时,一个月未观察到酶活力的丢失, $SV = 0.8$ 时,酶活力的半衰期为120天,与上述情况大不相同,如果先把天门冬氨酸酶从大肠杆菌中分离出来,再依同法用聚丙烯酰胺凝胶包埋,则制得的固定化酶稳定性极差,半衰期仅为27天^[34]。各种固定化微生物细胞的稳定性见附表。

二、固定化细胞副反应的克服

微生物菌体内包含有庞大而复杂的酶系统,其中一些酶在特定的工艺过程中是不需要的,某些酶更是有害的,它们可以催化底物产生无用的产物,或把有用的产物进一步转化。因此,在固定化微生物细胞的实际应用中必须力求最大程度地避免或降低这类副反应发生。

选种是有效措施之一,例如:许多种微生物产生精氨酸脱亚氨基酶,如铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),粪链球菌(*Streptococcus faecalis*),产气荚膜杆菌(*Clostridium perfringens*),链球菌绿色群(*Viridans streptococci*)和酵母菌等。在许多情况下,这些菌除具该酶活力外,尚有相当量的鸟氨酸转甲氧基酶活

力,因此,将精氨酸转成瓜氨酸后,随即又可将瓜氨酸转成鸟氨酸。与上述各种微生物不同,恶臭假单胞菌富含精氨酸脱亚氨基酶,却不产生鸟氨酸转甲氧基酶活力,因此,催化精氨酸的生化反应仅得单一的终产物——瓜氨酸。

钝化有害酶系是有效措施之二,例如用聚丙烯酰胺包埋法,制备了几种细菌的固定化细胞,其中尿素微生物(*Micrococcus ureae*)在固定化前组氨酸氨基裂解酶活力最高,但包埋后酶活力只有0.8%,而酶活力居次的液化无色杆菌,包埋后酶活力收率高达63.3%。但此菌含有尿狗酸酶,它可把形成的尿狗酸进一步转化为二氢咪唑酮丙酸(imidazolone propionic acid),如果在固定化前将菌体于70℃加热处理30分钟,则可使尿狗酸酶全部失活,却无损于组氨酸氨基裂解酶活力,从而阻止了反应产物尿狗酸的进一步转化。

控制反应条件是有效措施之三,大肠杆菌(*E. coli* ATCC 9637)细胞内具有高活力的青霉素酰化酶,而仅有微量的青霉素酶,后者能破坏青霉素G和6-APA,生成抑菌无效的青霉素裂酸,选择适当的反应条件,也可不除去青霉素酶,依然可有效地获得6-APA。用聚丙烯酰胺凝胶包埋大肠杆菌制得固定化细胞,将其装柱,以 $SV = 0.12—0.24$ 的流速通过0.05M, pH 8.5的青霉素G,流出物中有30%的青霉素G转化为6-APA。再如前面讲到的用ECTEOA-纤维素吸附米曲霉孢子制备的固定化细胞柱,柱长超过300毫米时,蔗糖转化率下降,可能是产物被其他酶系进一步转化所致,控制柱长和流速可以得到克服。

三、固定化细胞的活化

固定化处理有时可以改变细胞的通透性,例如将恶臭假单胞菌和底物精氨酸一起保温,不加入表面活性剂CTAB(溴化十六烷基三甲基胺)时,几乎没有瓜氨酸形成,这被解释为细胞壁对底物和产物的屏蔽作用。但用聚丙烯酰胺凝胶包埋的恶臭假单胞菌,即使不加入CTAB时,同样可形成瓜氨酸,这说明固定化细胞的通透性得到了明显的改善,但是目前还不能断言,这种通透性的改变是否具有普遍意义。

不少固定化细胞,再经一些特殊处理后,可使酶活力大幅度提高,最典型的例证是用聚丙烯酰胺凝胶包埋法制备的大肠杆菌。固定化细胞和底物反丁烯二酸溶液一起,在37℃保温24—48小时后,天门冬氨酸酶活力可提高9—10倍,用扫描电镜观察,发现包埋在凝胶间隙中的大肠杆菌在保温之后已经自溶,底物和产物更易通过,致使固定化细胞表现更大的催化活力。

* SV 为 Space velocity 的缩写,直译作“空间速度”,指每小时通过底物溶液的毫升数除以柱床体积的毫升数,即每小时通过的底物溶液相当于柱体积的倍数。