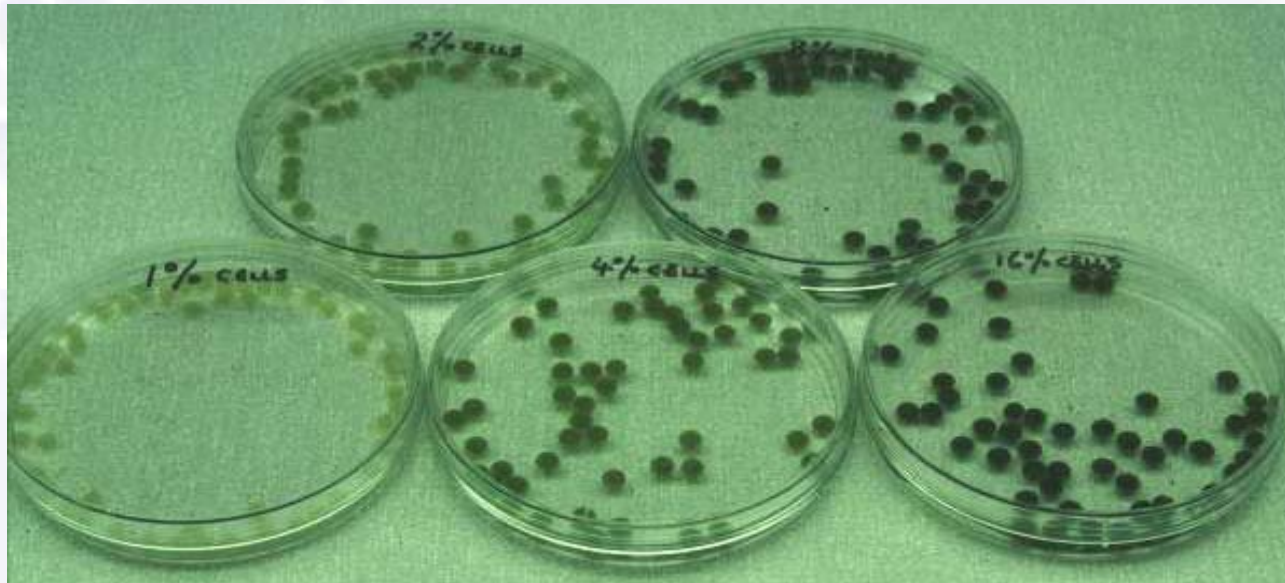


第十三章

固定化细胞发酵

(Fermentation with immobilized cells)



第一节 概述

一、定义

- 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具备能被反复或连续使用的活力。是在酶固定化基础上发展起来的一项技术。

二、固定化细胞的优点

1, 与游离细胞相比

- 固定化细胞可以将微生物发酵改为连续酶反应
- 可以获得更高的细胞浓度；
- 细胞可以重复使用；
- 在高稀释率时，不会产生洗脱现象；
- 单位容积的产率高；
- 提高遗传稳定性；
- 细胞不会受到剪切效应的影响。
- 发酵液中菌体含量少，有利与产品的分离纯化。

2, 与固定化酶相比

- 免去了破碎细胞提取酶的手续
- 酶在细胞内的稳定性较高, 完整细胞固定化后酶活性损失少
- 固定化细胞制备的成本比固定化酶低
- 无需辅酶再生

三、固定化细胞的缺点

- 仅能利用胞内酶；
- 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通透性；
- 可能有副反应。

四、固定化细胞的分类

1, 按细胞类型分为三类:

- 微生物
- 动物
- 植物

2, 按生理状态分为两大类

- 死细胞:

完整细胞、细胞碎片、细胞器。

适用于一种酶催化的反应。

- 活细胞:

增殖细胞、静止细胞、饥饿细胞。

适用于多酶反应，特别是需要辅酶的反应。

第二节 细胞固定化的方法

- Adsorption（吸附）
- covalent bonding（共价结合）
- Cross linking（交联）
- Entrapment（包埋）、Encapsulation（微胶囊）

一、吸附法

1, 原理

- 利用载体和细胞表面所带电荷的静电引力（**van der Waals forces**），使细胞吸附于载体上。吸附法可分为物理吸附和离子吸附两种。该法操作简单，固定化过程对细胞活性影响小。

2, 载体的材料

- 硅藻土
- 木屑
- 多孔玻璃
- 活性炭
- 多孔陶瓷
- 离子交换树脂
- 塑料

3, 影响吸附固定化的因素

- ❖ Z-电位
- ❖ 细胞的性质和细胞壁的组成
- ❖ 载体的性质
- ❖ pH

二、共价结合法

- 利用细胞表面的反应基团（如氨基、羧基、羟基、巯基、咪唑基）与活化的无机或有机载体反应，形成共价键将细胞固定。用该法制备的固定化细胞一般为死细胞。

三、交联法

- 利用双功能或多功能试剂与细胞表面的反应基团（如氨基、羧基、羟基、巯基、咪唑基）反应，从而使细胞固定。
- 常用的交联剂包括：戊二醛、甲苯二异氰酸酯、双重氮联苯胺。
- 由于交联试剂的毒性，这一方法具有一定的局限性。

四、包埋法

- 包埋法是细胞固定化最常用的方法。包埋法可以分为：
 - 微胶囊法：利用半透性聚合物薄膜将细胞包裹起来，形成微型胶囊；
 - 凝胶包埋法：是在无菌条件下，将生物细胞和胶溶液混合在一起，然后再经过相应的造粒处理，形成直径为1-4mm的胶粒。
- 常用的包埋剂为：聚丙烯酰胺、琼脂、海藻酸、卡拉胶、二醋酸纤维、三醋酸纤维、明胶等。

五、固定化方法的比较

- 吸附法：条件温和、方法简便、载体可再生。但操作稳定性差。
- 共价法：操作稳定性高。但由于试剂的毒性，易引起细胞的破坏。
- 交联法：可得到高细胞浓度，但机械强度低，无法再生，不适用于实际应用。
- 包埋法：细胞和载体间没有束缚，固定化后，细胞仍保持较高活力。但这类方法只适用于小分子底物。

第三节 固定化细胞的形状及性质

一、形状

- 固定化细胞由于其用途和制备方法不同，可以是颗粒状、块状、条状、薄膜状或不规则状等。但目前大多数制备成颗粒状珠体。

二、性质

- 最适pH: 细胞经固定化后, 其最适pH因固定化方法不同而有一些调整。
- 如, 用聚丙烯酰胺包埋的大肠杆菌中的天门冬氨酸酶和产氨短杆菌中的延胡索酸酶的最适pH向酸性范围偏移。但用同一方法包埋的大肠杆菌中的青霉素酰胺酶的最适pH则没有变动。

- 温度：类似与pH，细胞固定化方法不同，也有可能導致最适温度产生不同的变化。
- 稳定性：一般而言，细胞经固定化后，其稳定性会有所提高。

第四节 固定化细胞反应器

一、固定化细胞反应器的优点

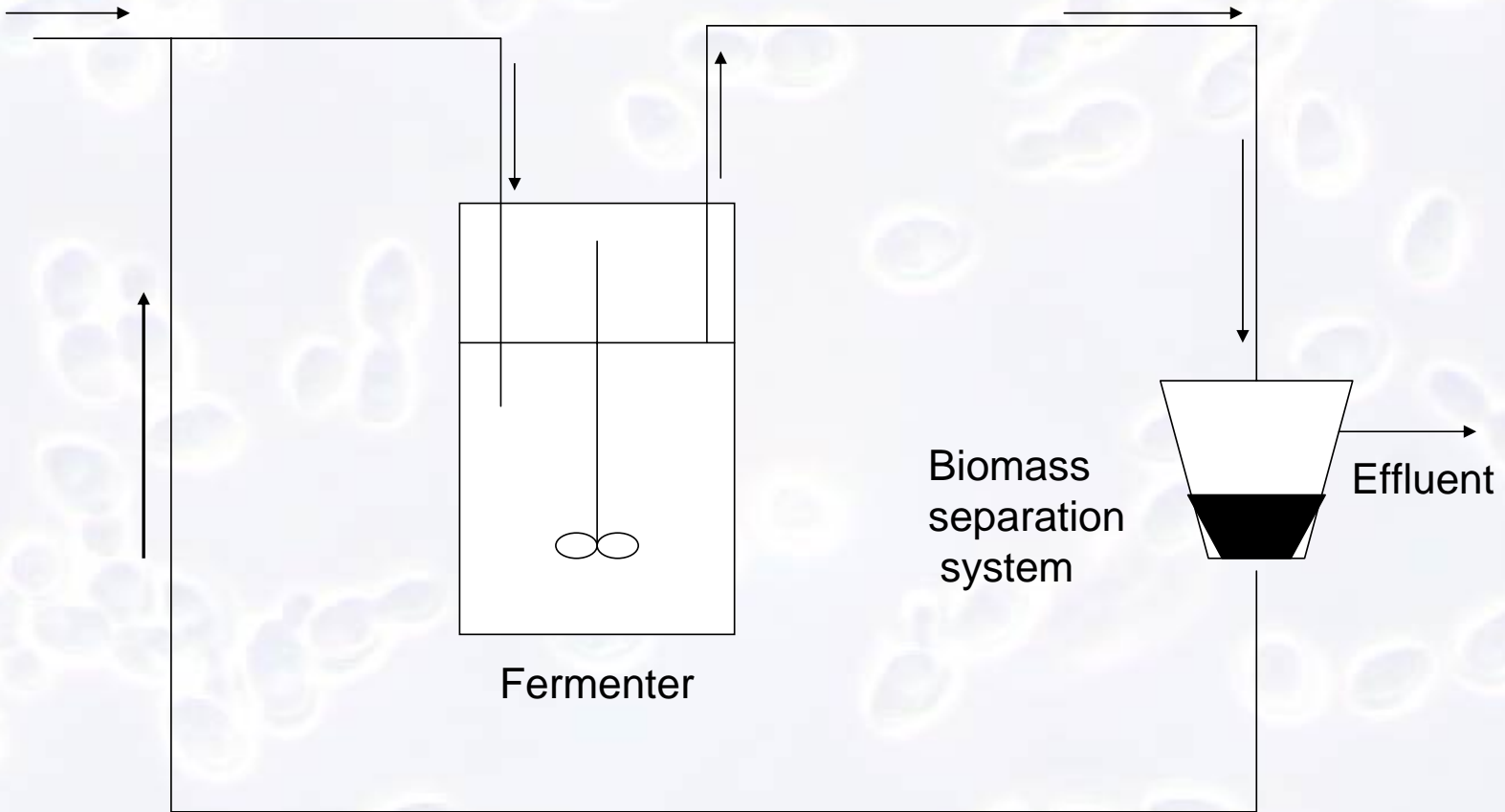
- 在固定化细胞反应器中采用高稀释率有以下优点：
 - 生产强度、转化率高；
 - 与恒化器相比，固定化细胞反应器具有更好的稳定性；
 - 节省投资和能耗。

二、固定化细胞反应器的类型

- 细胞再循环系统（Cell recycle systems）
- 填充床反应器（Fixed bed reactors）
- 流化床反应器（Fluidized bed reactors）
- 絮凝细胞系统（Flocculated cell systems）

Cell recycle system

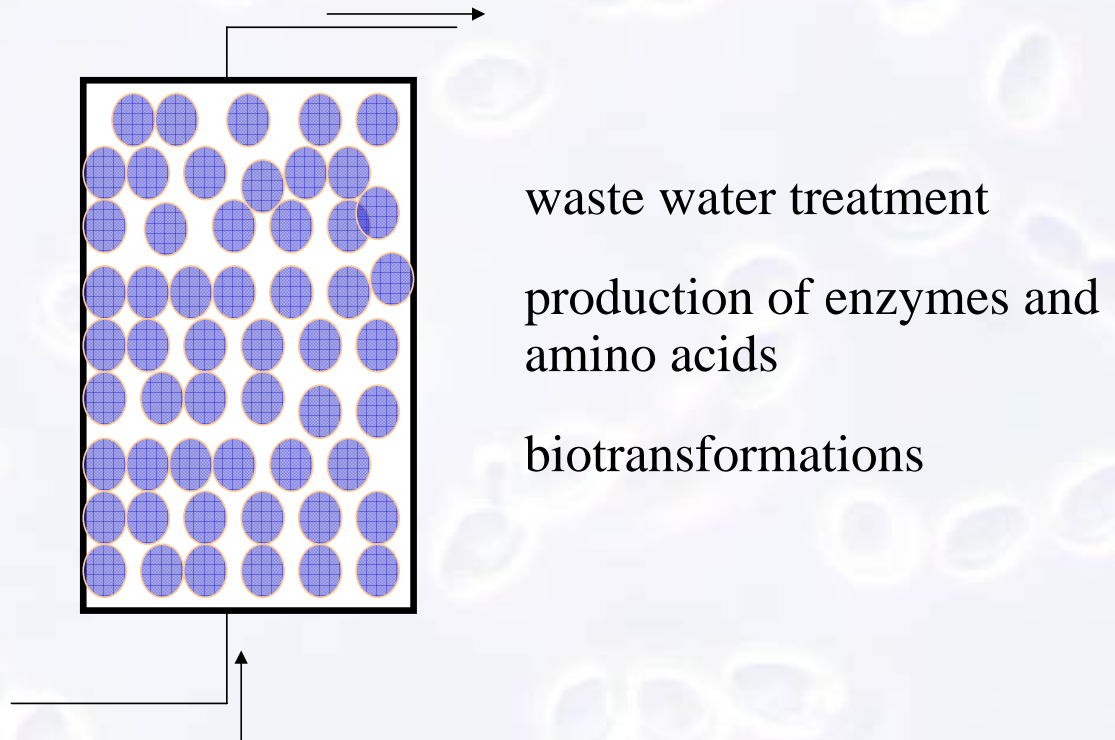
Fresh feed



Biomass recycle

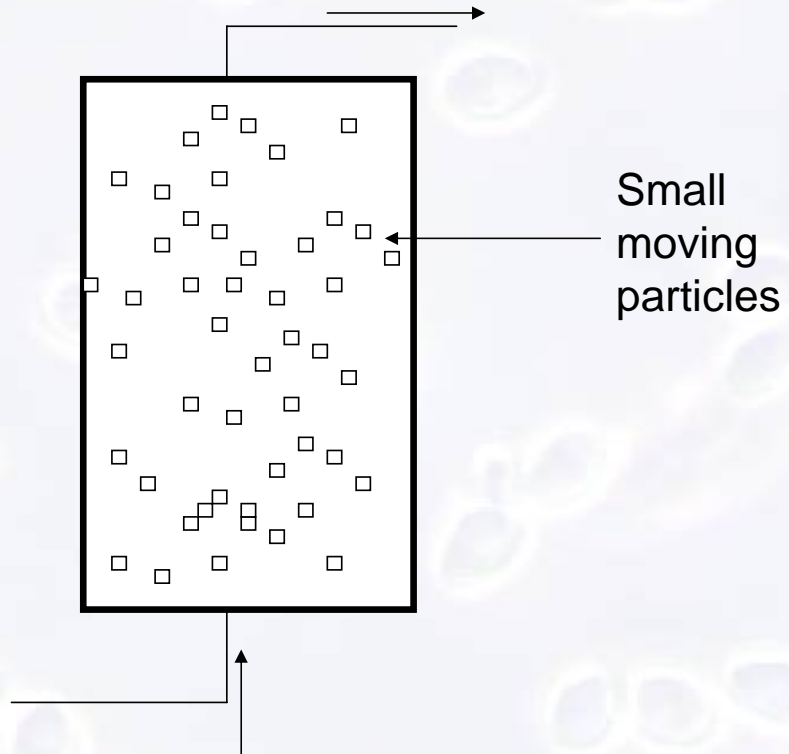
Fixed bed reactors

- In fixed bed fermenters, the cells are immobilized by absorption on or entrapment in solid, non-moving solid surfaces.



Fluidised bed reactors

wastewater treatment
animal cell culture



Comparing fluidised bed and fixed reactors

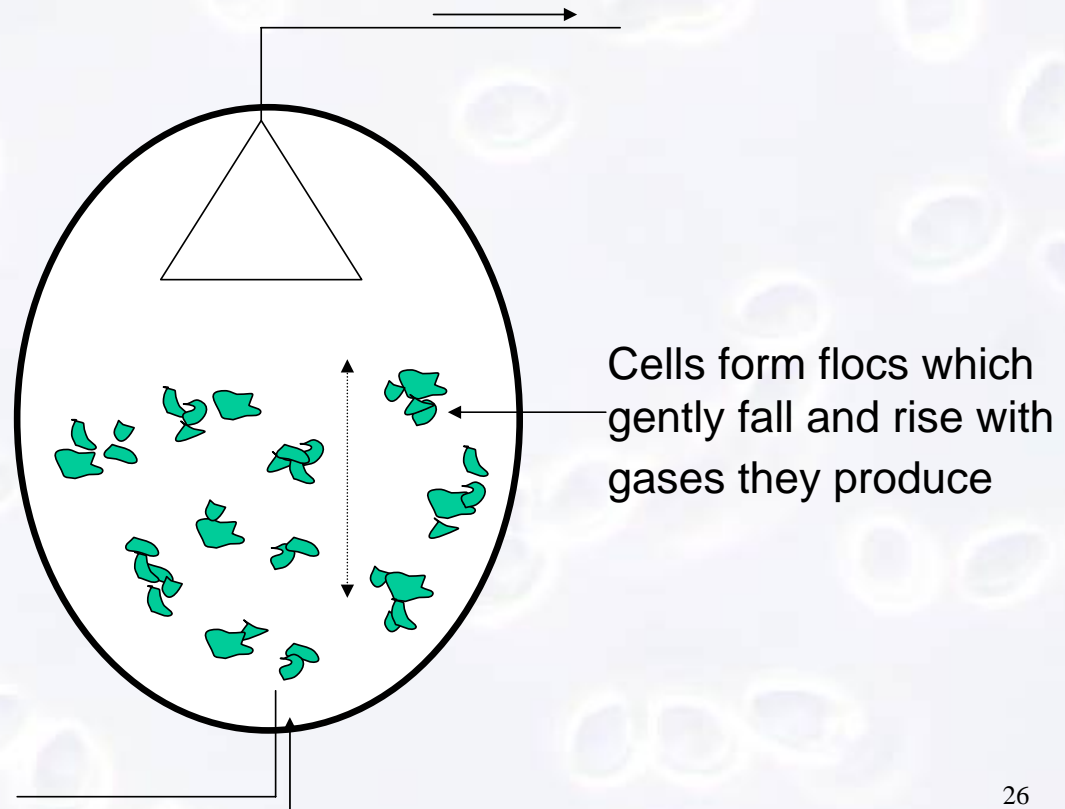
- Fluidised bed reactors are considerably more efficient than fixed bed reactors for the following reasons:
 - 1) A high concentration of cells can be immobilized in the reactor due to the larger surface area for cell immobilization is available
 - 2) Mass transfer rates are higher due to the larger surface area and the higher levels of mixing in the reactor.
 - 3) Fluidised bed reactors do not clog as easily as fixed bed reactors.

Comparing fluidised bed and fixed reactors

- Fluidised bed reactors are however more difficult to design than fixed bed reactors.
- Design considerations include:
 - Setting the flow rate to achieve fluidisation
 - Ensuring that bubble size remains small during the fermentation.
 - Prevention of the cells from falling or "sloughing" off the particles.
 - Minimising particle damage.

Flocculated cell reactors

anaerobic waste treatment



第五节 固定化细胞的应用

- 抗生素的生产
- 有机酸的生产
- 氨基酸的生产
- 废水处理

一、抗生素的生产

- 抗生素是次级代谢产物，属非生长关联型，以游离细胞采用连续发酵很难生产抗生素。
- 抗生素的发酵为非生长关联型，因此生长和代谢产物合成阶段所需的营养条件不同。从理论上，阻止固定化细胞的增殖是可能的，因而可以使用较稀的培养基来连续合成抗生素。

二、有机酸的生产

- 柠檬酸是有机酸中的主要品种，柠檬酸一般是以黑曲霉为菌种来生产。在发酵过程中，由于菌体的生长，导致发酵液粘度的上升，会影响氧的传递。而采用固定化细胞技术，由于生长被抑制，因而不会影响氧的传递。

三、氨基酸的生产

- 例如固定化*Escherichia coli*和*Pseudomonas putida*，将D, L-丝氨酸和吲哚转化为L-色氨酸。
- 在200升的反应器中，L-色氨酸的产率可达到110g/L。丝氨酸和吲哚的摩尔转化率可分别达到91%和100%。
- 这一过程可以连续化操作。

四、废水处理

1, 处理氨、氮废水

- 微生物去除氨氮需经过硝化、厌氧反硝化两个阶段。硝化菌、脱氮菌的增殖速度慢，要想提高去除率，必须要较长的停留时间和较高的细胞浓度。采用固定化细胞技术可以做到这点。固定化细胞技术在处理氨氮废水中的主要优势在于可通过高浓度的固定细胞，提高硝化和反硝化速度，同时还可以在反硝化过程低温时易失活的反硝化菌保持较高活性。

2, 含酚废水

- 含酚废水的处理普遍采用活性污泥法, 但此法存在污泥产率高, 易产生污泥流失, 处理效率低等缺点。固定化细胞对废水中酚类等有毒物质的降解能力远大于游离细胞。

3, 含芳香烃废水

- 利用固定化混合菌群可降解芳香烃废水。固定化细胞能利用这些物质生长并使之完全降解。与游离细胞相比，固定化细胞表现生长稳定，降解能力强的优点。

4, 处理重金属废水

- 由于微生物经固定化后，其稳定性增加，抗生物毒性物质的能力也大大增强，因此可以被广泛地用于各种有机废水中重金属离子的去除。