

固定化生物催化剂的研究动向

姜涌明 隋德新

(江苏农学院基础课部生化教研室, 扬州 225001)

提 要

近年来,国内外对于固定化酶、固定化细胞、固定化细胞器以及生物传感器的研究很活跃,在固定化方法上取得了较大进展,一部分固定化酶、固定化微生物细胞以及生物传感器在食品发酵工业、有机合成工业、化学分析、临床诊断以及能源开发等方面得到了应用。目前,大多数固定化酶、固定化细胞以及生物传感器还处在实验室研究阶段或中试阶段,有待改进;动物细胞、植物细胞以及细胞器的固定化研究还处于探索阶段、有待深入。

关键词 固定化酶,固定化细胞,固定化细胞器,生物传感器,固定化生物催化剂

自 20 世纪 50 年代初固定化酶技术问世以来,固定化酶、固定化细胞、固定化细胞器、生物传感器以及生物反应器的研究迅速发展形成了一个范围广泛的固定化生物催化剂研究领

域。目前,固定化生物催化剂已经在食品与发酵工业、有机合成工业、化学分析、诊断治疗、环境保护、能源开发以及理论研究方面,得到了日益广泛的应用,显示了较多的优越性,吸引了国

炎患者的滑膜细胞和滑膜液中也发现 IL-6 的 mRNA 和 IL-6 表达,甚至有些患者血清中也可测到 IL-6,因此认为 IL-6 可能与自身免疫病的表现和急性期反应有关^[1]。

最近发现垂体细胞和某些神经细胞均可分泌 IL-6; 以及 IL-1, IL-6 和 IL-8 具有对中枢神经系统的致热源性质等进一步提示白细胞介素很可能在人体神经-免疫-内分泌系统中起重要的联接和调节作用。白细胞介素系统的调控机制和天然抑制物的研究也日益受到更广泛的重视。这些研究将不仅为分子免疫学增添新的篇章,还将为更有效的临床治疗提供重要的依据。

参 考 文 献

- 1 Balkwill F R, Burke F. *Immunology Today*, 1989;

10:299

- 2 O' Garra A *et al. Immunology Today*, 1988;9:45
- 3 Goodwin R G *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:302
- 4 Westwick J *et al. Immunology Today*, 1989;10:146
- 5 Moreau J-F *et al. Nature*, 1988; 336: 690
- 6 Dinarello C A *et al. Immunology Today*, 1989;10:49
- 7 Herrmann T, Dinmantstein T. *Mol Immunol*, 1988; 25:1201
- 8 Kishimoto T. *Abs of the 5th congress of the federation of asian and oceanian biochemists*. Seoul, 1989
- 9 Lenardo M J, Baltimore D. *Cell*, 1989; 58:227
- 10 Loughman M S, Nossal G J V. *Nature*, 1989;340: 76
- 11 Wong G C, Clark S C. *Immunology Today*, 1988; 9:137

[本文于 1989 年 12 月 26 日收到,

1990 年 6 月 22 日修回]

内外广大的科学工作者。

一、固定化酶

固定化酶是指：处于能够反复使用状态的酶。它包括不溶性固定化酶和可溶性固定化酶两种类型。前者是指：用固相的载体与酶结合所制成的不溶于水的固定化酶；后者是指：用半透膜包围酶溶液所制成的固定化酶。所谓固

定化酶通常指前者。近 30 年来,许多科学工作者对各种酶的固定化技术进行了大量的研究,摸索出各种方法(图 1)。一种酶的固定化方法能否应用于工业生产,关键在于:固定化方法要简单易行;固定化酶的活性要高;操作半衰期要长;固定化费用要低。现在,有一小部分固定化酶已经应用于工业生产(表 1),并显示了较多的优越性。

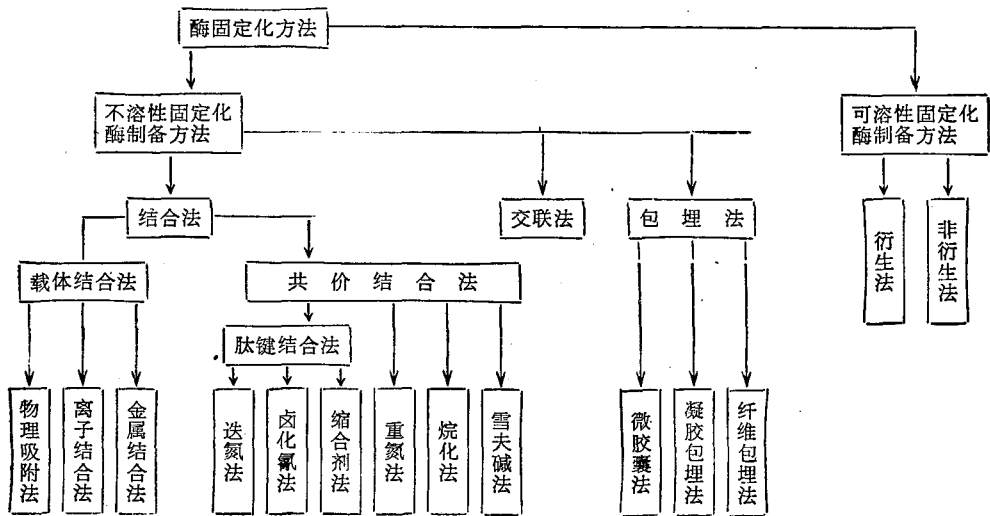


图 1 酶的各种固定化方法^[1,2]

表 1 已应用于工业生产的固定化酶^[3]

固定化酶种类	工业原料	工业产品
葡萄糖淀粉酶	淀粉	葡萄糖
葡萄糖异构酶	葡萄糖	果糖
乳糖酶	含乳糖的牛奶	去乳糖的牛奶
青霉素 G 酰化酶	青霉素 G	6-氨基青霉烷酸 (6-APA)
青霉素 V 酰化酶	青霉素 V	6-APA
氨基酰化酶	DL-乙酰氨基酸	L-氨基酸
腈酶	丙烯腈	丙烯酰胺

固定化酶的研制与应用,近年来,虽然有不少的报道,但在工业生产上真正应用的并不多。主要存在下列问题:①大多数固定化酶的活性收率不高,操作半衰期不够长;②有些酶固定化之后,难以与高分子底物作用;③不适合应用于多酶序列反应、需辅酶的氧化还原反应以及合成反应;④大多数固定化酶的制备成本过高。今后的研究方向是:①大力开展中试生产研究,

将现有的有希望的许多实验室研究成果推向工业生产;②探索新的固定化材料和方法,提高固定化酶活性收率,延长操作半衰期,降低成本;③探索固定化酶在有机合成工业上应用的可能性,以改造有机合成生产的老工艺;④进一步开展固定化酶在人工脏器上的应用研究。

二、固定化细胞

1. 固定化微生物细胞

目前,微生物细胞固定化采用下列方法:吸附法;包埋法;交联法;共价结合法;多孔物质包络法;超过滤法;包埋交联法;热固定法以及 β -射线照射法等。其中,以吸附法和包埋法的使用最为普遍。固定化微生物细胞的应用研究很广泛。表 2 列举了一部分固定化微生物细胞的应用。现在,绝大多数微生物细胞的固定化研究,还处于实验室研究阶段,或中试生产阶

段。为了使各种固定化微生物细胞应用于各种产品的工业生产,必须在菌种的选育、载体的筛选与合成、固定化技术、生物反应器以及生产工艺等各方面,进行深入的研究,特别是,要大力开展中试生产的研究,将现有的有希望的实验室研究成果推向工业生产。同时,更要注意探索新的载体、新的固定化技术、研制先进的生物反应器。此外,还要加强对固定化细胞特性的研究。

2. 微生物细胞与酶共固定化

目前建立了一种微生物细胞与酶共固定化的新方法。即:利用交联剂将微生物细胞与一种或几种其它来源的酶结合起来,形成一种结合型的固定化生物催化剂。表3列举了一部分研究结果。这种共固定化的生物催化剂在发酵工业中将有应用的可能性。

3. 动物细胞固定化^[3,7]

八十年代开始研究动物细胞固定化。动物

表 2 固定化微生物细胞的应用^[4,5]

固定化微生物种类	固定化方法	酶种类	工业原料	工业产品
酿酒酵母	海藻酸钙或卡拉胶包埋法	多酶系统	糖 蜜	酒精 ¹⁾
酿酒酵母	海藻酸钙包埋法	多酶系统	麦芽汁	啤酒 ²⁾
大肠杆菌	卡拉胶包埋法	天冬酰胺酶	延胡索酸+氨	L-天冬氨酸 ²⁾
德阿昆哈假单孢菌突变株	卡拉胶包埋法	L-天冬氨酸-β-脱羧酶	L-天冬氨酸	L-丙氨酸 ²⁾
米曲霉	卡拉胶包埋法	氨基酰化酶	N-酰基-DL-氨基酸	L-氨基酸 ²⁾
大肠杆菌	各种固定化方法	青霉素酰化酶	青霉素 V	6-氨基青霉烷酸 ²⁾
链霉菌	卡拉胶包埋法	葡萄糖异构酶	葡萄糖	果糖 ²⁾

1) 进入中试生产; 2) 已投入工业生产。

表 3 微生物细胞与酶共固定化研究结果^[6]

共固定化生物催化剂		应 用 领 域
微 生 物	酶	
酵 母	胃蛋白酶	葡萄汁经酵母发酵成果酒。胃蛋白酶消除果酒中蛋白质造成的混浊,从而增加果酒透明度。
酵 母	纤维二酶	$\text{纤维二糖} \xrightarrow{\text{纤维二糖酶}} \text{葡萄糖} \xrightarrow{\text{酵母}} \text{酒精}$
黑曲霉(内含葡萄糖氧化酶)	过氧化氢酶	$\text{O}_2 + \text{葡萄糖} \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}} \text{葡萄糖酸} + \text{H}_2\text{O}_2$, 过氧化氢酶分解 H_2O_2 。利用此二酶可以除去罐头食品中的葡萄糖和 O_2 。
酿酒酵母	果 胶 酶	葡萄汁经酿酒酵母发酵成果酒,果胶酶分解果酒中的果胶

细胞比较娇嫩,需要最温和的固定化方法。目前,只有吸附和包埋两种方法被用于动物细胞固定化,已取得了一些进展。例如:用微型胶囊或微载体、海藻酸钙等技术固定杂交瘤细胞,能产生单克隆抗体,已进入中试生产阶段。用固定化动物细胞生产干扰素、胰岛素、生长因子和白细胞介素等正在研究之中。目前,动物细胞的固定化方法并不完善,应用研究还刚刚开

始,需要研究新的载体、新的固定化方法,需要研究固定化动物细胞特殊生长与生产的规律,需要研制适合固定化动物细胞的生物反应器。

4. 植物细胞固定化^[8]

植物细胞固定化也是八十年代才开始研究的。利用固定化植物细胞产生烟碱、蛇根碱、毛地黄苷、葱醌以及西萝芙木碱的研究,正在进行之中。用吸附或包埋法对藻类细胞进行固定

化,用来生产氢或烃、多糖、氨以及发电等方面的研究,亦在进行中。今后需要开发新产品、寻找新的载体、探索新的固定化方法,研制高效率的生物反应器。

三、细胞器固定化^[9]

细胞器的固定化研究也是 80 年代才开始的。在原生质体、线粒体以及微粒体、叶绿体等方面,采用包埋法进行了固定化研究,取得了一些进展。目前,细胞器固定化研究处于实验室阶段,有不少问题需要解决:①细胞器分离技术;②细胞器的载体及固定化技术;③固定化细胞器的稳定性;④固定化细胞器的最适工艺条件。

四、生物传感器

生物传感器是以生物活性物质作为分子识别元件与换能器密切结合的分析装置。它可将生化信号转变成电信号,从而测定某种或某几种物质的含量。固定化酶、固定化细胞、固定化细胞器,或者其它生物活性物质(如:抗体、激素受体等),都可以作为分子识别元件。离子选择性电极、气体电极、光导纤维、光二极管、热敏电阻以及离子敏场效应晶体管 (ISFET) 等都可以作为换能器。

1. 酶传感器(酶电极)

将纯酶固定在高分子膜上,然后附在一种电极上,从而制成酶电极。根据被检化合物选择一种合适的酶,并对该酶进行适当的固定化,用来专一催化被检物的化学反应,同时,还要选择一种合适的电极,用于测定底物的减少或产物的增加。现在,用作酶传感器的电极,一般有:离子选择性电极(如: H^+ 、 NH_4^+ 、 CN^- 等)、气体电极(如: O_2 、 CO_2 、 NH_3 等),以及铂电极等。最近几年,各种酶电极已被广泛地研究。其中,对于测定葡萄糖和尿素的酶电极研究的最多。不少酶电极已进入商品市场,用来测定葡萄糖、尿素、乳酸、乙酸、尿酸、赖氨酸、乙醇、胆碱、乳糖、果糖、蔗糖、过氧化氢等物质含量^[10]。表 4 列举了一部分酶电极及其应用特性。酶电极可以快速、连续、精确地测定血液或发酵液中微量化合物的浓度,稳定性较好,能使用几十次,甚至于几千次。酶电极的研究正朝着下列几个方向发展:多功能酶电极、微型酶电极、抗干扰酶电极、介体酶电极和高导电有机盐酶电极等。

2. 微生物电极(微生物传感器)

微生物电极是由固定化微生物细胞和电极所构成的。在大多数情况下,微生物以活的状态固定在膜上,作为传感器的分子识别元件。微

表 4 酶电极反应特性^[11]

被 检 物	酶	固定化方法	电 极	稳定性 (d)	反应时间 (min)	测定范围 (mol/L)
葡 萄 糖	葡萄糖氧化酶	自然酶 包埋 共价	$Pt(H_2O_2)$ 或 $Pt(O_2)$	7 14 >420	5—10 2—5 1	10^{-1} — 10^{-3} 10^{-2} — 10^{-4} 2×10^{-2} — 10^{-4}
尿 素	脲 酶	包埋 共价	NH_4^+ NH_4^+	14—21 >120	1—2 1—2	10^{-2} — 10^{-4} 10^{-2} — 10^{-4}
尿 酸	尿酸酶	共价	$Pt(O_2)$	>120	0.5	10^{-2} — 10^{-4}
乙 醇	乙醇脱氢酶	自然酶 共价	Pt Pt	7 >120	1 0.5	10^{-2} — 5×10^{-3} 10^{-2} — 5×10^{-3}
总胆固醇	胆固醇酯酶/ 胆固醇氧化酶	共价	$Pt(O_2)$	60	5	10^{-2} — 10^{-4}
青 霉 素	青霉素酶	包埋	pH	14—21	0.5—2	10^{-2} — 10^{-4}
L-赖氨酸	赖氨酸脱羧酶	共价	CO_2	180	5	10^{-2} — 5×10^{-3}

生物传感器在发酵过程中已用于测定葡萄糖、乙醇、乙酸、甲酸、头孢霉素、谷氨酸、甲烷、氨、BOD 等^[12]。表 5 列举了一部分微生物电极及其特性。

表 5 微生物电极及其特性^[12]

被检物	微生物	电 极	检测范围 (mg/ml)	感应时间 (min)
葡萄糖	荧光假单孢杆菌	氧电极	$3 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2}$	10
乙醇	腌菜丝孢酵母	氧电极	$3 \times 10^{-3} - 3 \times 10^{-2}$	15
头孢霉素	弗氏柠檬酸杆菌	pH 电极	$6 \times 10^{-2} - 5 \times 10^{-1}$	10
精氨酸	屎链球菌	氨电极	$1 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-1}$	10
谷氨酸	大肠杆菌	CO ₂ 电极	$8 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-1}$	5

3. 免疫传感器

免疫传感器是由受体(固定化抗体或抗原)与换能器(氧电极或 Ag/AgCl 电极)所构成的,用来检测抗原或抗体含量。免疫传感器分为酶标记和非酶标记两种形式。酶标记免疫传感器是一种新型的免疫传感器。用过氧化氢酶标记抗体或抗原,使抗原-抗体复合物带有过氧化氢酶。该酶能催化 H₂O₂ 分解成 O₂ 和水。用氧电极检测该酶活力。过氧化氢酶活力与被测抗原或抗体的含量呈一定的函数关系,从而确定抗原或抗体的含量。表 6 列举了一部分免疫传感器。

表 6 免疫传感器和酶标记免疫传感器^[13]

被检物	传感器	生物传感器组合	
		受 体	换能器
人绒毛膜促性腺激素 (HCG)	免疫传感器	抗 HCG 抗体	氧电极
	酶标免疫传感器	抗 HCG 抗体 (过氧化氢酶标记)	氧电极
甲胎蛋白 (AFP)	酶标免疫传感器	抗 AFP 抗体 (过氧化氢酶标记)	氧电极
清蛋白	免疫传感器	抗清蛋白抗体	Ag/AgCl 电极 氧电极
	酶标免疫传感器	抗清蛋白抗体 (过氧化氢酶标记)	
血型	免疫传感器	血型物质	Ag/AgCl 电极

4. 组织传感器和亚细胞传感器^[14]

组织传感器是由动物或植物的组织切片与电极构成的。亚细胞传感器是由细胞器和电极所构成的。无论是组织还是细胞器,均含有多

酶系统。这类传感器的研究处于早期阶段。其反应机制还不大清楚。表 7 列举了一部分组织和亚细胞传感器。

表 7 组织传感器和亚细胞传感器^[14]

被检物	生物催化剂材料	电 极
鸟嘌呤	兔肝(含鸟嘌呤脱氨酶)	NH ₃ 电极
尿 素	刀豆切片(含脲酶)	NH ₃ 电极
AMP	兔肌(含 AMP 脱氨酶)	NH ₃ 电极
谷氨酰胺	猪肾线粒体(含谷氨酰胺酶)	NH ₃ 电极
过氧化氢	牛肝(含过氧化氢酶)	氧电极
酪氨酸	甜菜切片(含酪氨酸酶)	氧电极

5. 生物亲和传感器^[15]

最近,国际上正在研制一种新型的生物传感器。该传感器亦是由受体和电极所构成的。它是利用生物亲和性的差异来测定生物分子含量的。将被检物的类似物固定在载体上,然后让类似物与被酶标记的结合蛋白(受体)结合。当它与被检物分子接触时,由于结合蛋白对被检物分子的亲和力大于结合蛋白对被检物类似物的亲和力,因而结合蛋白与被检物分子形成复合物,而从载体上释放下来,用酶联法测定载体上结合蛋白的残留量,即可确定溶液中被检物的浓度。

6. 酶热敏电阻传感器^[16]

酶热敏电阻传感器是由固定化酶和热敏电阻所构成的。热敏电阻可以将酶催化反应所产生的吸热或放热的微小变化,转变成电信号,从而检测底物浓度。该传感器在临床诊断中用于检测胆固醇、尿素、尿酸、乳酸、ATP、肌酐,以及葡萄糖等;在食品与发酵工业中用于检测乙醇、乳糖、半乳糖、以及纤维二糖等;在环境监测中用于检测氰化物、杀虫剂、重金属离子,以及酚等。该传感器的灵敏度急需提高;其器件有待于小型化。

7. 光学生物传感器(酶光纤传感器)

光学生物传感器是酶促化学反应与光电效应相结合的传感器。将酶与染料(酸碱指示剂)共固定化,并与换能器(光导纤维或光二极管)

结合,从而制成光学生物传感器。酶促反应所产生的 pH 变化,导致染料的颜色变化,用光导纤维或光二极管检测染料最大吸收波长处的透光度,从而测定溶液中某种物质的浓度。将虫荧光素酶固定在光导纤维末端,制成生物发光传感器,可以在 4 秒钟内检测 ATP 浓度。检测范围为 1×10^{-11} — 3×10^{-6} mol/L。

8. 酶-离子敏场效应晶体管传感器^[17]

酶-离子敏场效应晶体管传感器是由固定化酶与离子敏场效应晶体管 (ISFET) 所构成的一种新型的微型传感器。酶促反应所产生的离子变化可以使离子敏场效应晶体管的栅极产生电荷、电位,从而检测某种物质的含量。该传感器具有微型化、集成化、灵敏度高、响应时间短、线性好等优点。它有可能测定体外单一细胞内某种物质的含量,但是,离开实用化还有一定距离。对于酶的稳定性,酶与换能器的相容性,分析的重现性,以及噪音的干扰,都需要作深入的研究。

现在国际上正在研制各种新型的生物传感器,例如:视觉生物传感器、香味生物传感器、图形生物传感器、细菌侵染性传感器等。此外,还有测定鱼肉新鲜程度的集成化生物传感器。新一代生物传感器应具有体积小、灵敏度高、稳定性好、专一性强、多功能、价格低的优点。

许多研究者正在研制“固态”型生物传感器以及微型生物传感器。将这些传感器组装到电子计算机上,有可能完善机器人的视觉、触觉以及操作目的物的能力。

新一代生物传感器有可能发展为生物芯片。生物芯片是生物分子作为功能原件的电子器件。运用生物芯片有可能制造生物电子计算机。如果将生物芯片植入人体有关部位,并与神经组织、计算机相连,有可能恢复盲人视力、聋哑人听力,以及瘫痪病人的运动机能等。

参 考 文 献

- 1 Kennedy J F et al. In: Wiseman A ed, *Handbook of enzyme biotechnology*, A Wiscman: Ellis Horwood Limited, 1985: 147
- 2 姜涌明.生物科学动态,1988;4:6
- 3 Poulsen P B. In: Wiseman A ed, *Handbook of enzyme biotechnology*, A Wiscman: Ellis Horwood Limited, 1985: 121
- 4 Scott C D. *Enzyme Microb Technol*, 1987; 9: 66
- 5 居乃琥.见:陈驹声等编著,固定化酶理论与应用,北京:轻工业出版社,1987:169—384
- 6 隋德新.生物科学动态,1988;3:19
- 7 Buteer M. In: Fiechter A ed, *Advances in biochemical engineering and biotechnology*, Berlin: Springer, 1987; 34: 57
- 8 Brodelius P. In: Woodward J ed, *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, Oxford: IRL Press, 1985: 127—145
- 9 Karube I et al. *Appl Microbiol Biolechnol*, 1985; 21: 270
- 10 Owen V M. *Enz Engineering*, 1987; 8: 233
- 11 Guilbault G G. *Ann N Y Acad Sci*, 1981; 269: 385
- 12 Karube I et al. *Ann Rep on Fermentation Processes*. N Y: Academic Pr, 1983; 6: 203
- 13 Aizawa M et al. *J Membe Sci*, 1980; 7: 1
- 14 Arnold M A et al. *Biosensors*, 1987: 30
- 15 Ikariyama Y et al. *Proc 2nd Sensor Symp*, 1982: 97
- 16 Danielsson B et al. *Biosensor*, 1987: 575
- 17 Caras S et al. *Anal Chem* 1980; 52: 1935

[本文于1989年12月26日收到,1990年3月9日修回]

北京市星火技术研究所出售废物综合利用技术资料汇编

357号《糠饼、麦麸制作饴糖新技术》资料费10元 402号《米油的加工技术》资料费10元 447号《玉米秸、玉米芯制饴糖技术》资料费10元 495号《玉米皮编制工艺》资料费9元 723号《稻草加工纸筋新技术》资料费9元 794号《玉米芯的综合利用技术5例》资料费11元 795号《豆腐渣的综合利用技术》资料费10元 1448号《油饼和油籽的综合利用技术》资料费30元 1449号《油料作物皮壳的综合利用技术》资料费25元 1462号《稻壳的综合利用技术24例》资料费16元 1463号《稻草的综合利用技术》资料费11元 1464号《米糠的综合利用技术6例》资料费15元 1473号《大豆残渣的综合利用技术》资料费15元 1474号《大豆皮(壳)及废水的综合利用技术》资料费15元 1644号《粉丝副产品的利用技术》资料费9元 2135号《马铃薯的加工和利用技术》资料费49元 2136号《甘薯、木薯的加工和利用技术》资料费10元 2140号《大豆加工及综合利用技术》资料费30元

(下转第50页)