

# 固定化细胞技术的研究与进展

王新, 李培军, 巩宗强, 张海荣

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110015; E-mail: xiaowangxin@yahoo.com)

**摘要:** 综述了近年来固定化细胞技术的固定化制备、载体的特性及对固定化技术在有机废水中的应用前景与目前所存在的问题。

**关键词:** 固定化细胞技术; 载体; 有机化合物

**中图分类号:** X-1    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-0267(2001)02-0120-03

## Development of the Immobilized Cell Technology

WANG Xin, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, ZHANG Hai-rong

(Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015 China)

**Abstract:** The present paper summarizes the immobilized cells technology including immobilized preparations, carrier's characteristics, application foreground of the immobilized technology on organic waste water, as well as comments on the presently existing problems.

**Keywords:** immobilized cell technology; carrier; organic compound

## 1 前言

早在19世纪初叶,人们发现,某些微生物细胞具有一种吸附在固体物质表面的天然倾向和特殊功能,并以这种方式被束缚,固定起来。当时,曾利用这种方式被吸附的微生物细胞,在滴滤反应系统内生产醋酸<sup>[1,2]</sup>。此后,有人将类似的方法用于污水处理<sup>[3]</sup>。

从60年代开始,国际上固定化酶的研究迅速发展起来,到70年代,作为酶源的微生物菌体本身的固定化,即固定化微生物,也引起了人们极大的注意。

所谓固定化技术,是指利用化学或物理手段将游离的细胞(微生物)或酶,定位于限定的空间区域并使其保持活性和可反复使用的一种基本技术<sup>[4]</sup>。包括固定化酶技术和固定化细胞技术。

## 2 固定化细胞的制备方法

固定化细胞的制备方式是多种多样的,任何一种限制细胞自由流动的技术,都可以用于制备固定化细胞,国内外不同的研究工作者用不同的分类方法,因此,很难对此作出精确的分

类。一般来说大致可以分成吸附法、共价结合法、交联法和包埋法等4大类,其中以包埋法使用最为普遍。

### 2.1 吸附法

很多细胞都有吸附到固体物质表面,或其他细胞表面的能力,这种吸附能力可以是天生具有的,也可以是经过处理诱导产生的,依靠这种吸附能力,人们发展起许多廉价而又有效的固定化方法。吸附法可分为物理吸附法和离子吸附法,前者是使用具有高度吸附能力的硅胶、活性炭、多孔玻璃、石英砂和纤维素等吸附剂将细胞吸附到表面上使之固定化。这是一种最古老的方法,操作简单,反应条件温和,载体可以反复利用,但结合不牢固,细胞易脱落。后者根据细胞在解离状态下可因静电引力(即离子键合作用)而固着于带有相异电荷的离子交换剂上,如DEAE-纤维素、DEAE-sephadex、CM-纤维素等。

利用细胞的表面吸附能力,早在1820年,就有人用此法由酒精生产“速酿酸”。接下来有人用此生产啤酒、酒精、生化药物和用于污水处理等方面。

### 2.2 共价结合法

共价结合法是细胞表面上功能团和固相支持物表面的反应基团之间形成化学共价键连接,从而成为固定化细胞。该法细胞与载体之间的连接键很牢固,使用过程中不会发生脱落,稳定性好,但反应条件激烈,操作复杂,控制条件苛刻。有人用此法将卡尔酵母(*Saccharomyces luteus*)固定在已活化的多孔玻璃珠上<sup>[5]</sup>,虽然细胞已经死亡,但仍然保留生产尿酸酐的活性。利用此法制备的固定化细胞,细胞大多死亡。

收稿日期:2000-09-05

基金项目:中国科学院重大项目(KZ951-B1-207-01-03)及国家自然科学基金重点资助项目(29977021)

作者简介:王新(1973—),女,中国科学院沈阳应用生态研究所硕士研究生,从事污染环境工程研究。

### 2.3 交联法

交联法与共价结合法一样,都是靠化学结合的方法使细胞固定化,但交联法所采用的载体是非水溶性的。如采用戊二醛或偶联苯胺等带有两个以上的多功能团交联剂与细胞进行交联,可形成固定化细胞,但反应条件激烈,对细胞活性影响大。

千烟一郎曾用此法制得具有天门冬氨酸活力的固定化大肠杆菌细胞<sup>[6]</sup>,也有人用此法制得具有葡萄糖异构酶活力的固定化细胞。

### 2.4 包埋法

包埋法是细胞固定化最常用的方法。按照包埋系数的结构可分为凝胶包埋和微胶囊法,即将细胞包裹于凝胶的微小格子内或半透膜聚合物的超滤膜内,该方法操作简单,对细胞活性影响较小,制作的固定化细胞球的强度较高,目前被广泛地用于废水处理。

## 3 固定化细胞载体的特性

人们对一种较为理想的固定化载体有以下 5 个要求: a. 具有高的载体活性,即固定化酶或微生物的活性回收率要高; b. 材料容易获得; c. 价格便宜; d. 操作制备方便,能适用于大规模生产; e. 有较高的机械强度,能较长时间使用和重复使用。

目前,所采用的载体主要有以下几种:琼脂、明胶、海藻酸

表 1 固定化载体的性能比较

Table 1 Comparison of properties for immobilized carriers

载体	SA	PVA	明胶	琼脂	ACRM
强度	较好	好	较差	差	好
传质性能	较好	好	差	差	差
耐生物分解性	较好	好	差	无	好
对生物性	无	适中	无	无	强
固定难易	易	易	易	易	较难
价格	较贵	便宜	较贵	便宜	贵

钙(简称 SA)、聚乙烯醇(简称 PVA)和丙烯酰胺(简称 ACRM),其性能比较如表 1。

(1) 在 5 种包埋剂中,琼脂机械强度极差,无实际工程应用价值。

(2) ACRM 凝胶中未聚合的单体对生物有毒,且在聚合过程中发热,对细菌杀伤大;传质性能较差,固定化细胞小球内的微生物增殖不好;固定操作不易。

(3) 明胶强度较低,内部结构密实,传质性能较差。

(4) SA 凝胶和 PVA 凝胶,机械强度较好;电镜观察表明内部呈多孔结构,对生物的毒性小,固定操作容易。

对 SA 凝胶和 PVA 凝胶进一步的研究表明,PVA 凝胶的机械强度优于 SA 凝胶,但 SA 凝胶的传质性能比 PVA 凝胶好。

现阶段,有学者成功地运用了以 PVA 为载体主要成分,适

量添加少量海藻酸钠和活性炭<sup>[7,8]</sup>,其优点是可克服两液滴粘连现象,有助于颗粒成型,改善通透性,增加固定化颗粒的孔隙,达到吸附和包埋的双重效果。另有学者采用无纺布-PVA 复合载体对优势菌种进行包埋固定降解有机物,取得了理想的效果。

## 4 固定化细胞技术的应用

目前,固定化细胞技术已经在工业,医学,化学分析,环境保护,能源开发及理论研究等方面得到了广泛的应用,本文主要论述其在环境保护中处理有机废水方面的应用研究。

### 4.1 固定化细胞处理含苯酚等芳香族有机废水的研究

#### 4.1.1 苯酚的降解

Anselmo 等<sup>[9]</sup>研究了用琼脂、海藻酸钙、卡拉胶和聚乙烯酰胺等载体包埋固定化微生物降解苯酚。随后,他们又以聚氨酯泡沫为载体固定镰刀菌 *Fusarium sp.* 菌丝体,在完全混合器中降解酚。结果表明,与游离菌相比,固定化细胞降解苯酚的速率要大得多,且固定化细胞生物产量低。

周定等<sup>[10]</sup>人对固定化微生物法处理含酚废水进行了研究,他们利用海藻酸钙包埋热带假丝酵母(*Candida tropicalis*),采用固定化微生物法连续处理含酚废水,进水酚浓度为  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,出水酚浓度小于  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与悬浮生物法(如活性污泥法)相比,酚的容积负荷可提高 1 倍以上,污泥发生量可减少 90%。

孙艳等<sup>[11]</sup>对一种耐酚菌种及其固定化细胞降解含酚废水性能进行了比较研究,结果表明,固定化细胞的降解效果明显高于游离细胞。

#### 4.1.2 芳香族类化合物的降解

Shreve 等<sup>[12]</sup>利用固定化假单胞菌降解甲苯,研究了固定化细胞生长和底物降解过程动力学,并与游离细胞进行了比较,结果表明,固定化细胞体系的半饱和常数( $K_s$ )增加了 30 倍,细胞的最大比生长( $\mu_m$ )降解了 2 倍。

Bokhamy 等<sup>[13]</sup>利用固定化混合微生物体系降解蒽醌-2-磺酸钠(SAS),并与游离微生物体系进行了比较。结果表明,当稀释率  $0.005 \text{ h}^{-1}$  时,固定化细胞体系与游离细胞体系 SAS 的最大降解率分别为  $89$  和  $59 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

Lee 等<sup>[4]</sup>用海藻酸钙凝胶包埋固定化 *Pimelobacter sp.* 细菌进行了降解吡啶的研究。结果表明,与游离细胞相比,固定化细胞的降解速率和对吡啶毒性的承载力并没有提高,这与大多研究者的结论相反。但由于固定化细胞具有较高的生物浓度,所以其体积降解率较高,鉴于固定化细胞具有较高的生物浓度和可以重复利用,他们认为固定化细胞降解吡啶是可行的。

黄霞等<sup>[15]</sup>以 PVA-无纺布混合载体包埋固定化优势菌种用于降解吡啶、异吡啶和喹啉,结果表明,3 种难降解有机物经

固定化细胞处理 8h 后,降解率均在 90% 以上。

#### 4.2 固定化细胞处理农药、杀虫剂废水的研究

陈敏等<sup>[8]</sup>利用聚乙烯醇包埋活性炭和微生物的固定化技术对有机磷农药水胺硫磷的降解进行了试验研究,结果表明,经固定的微生物对温度、pH 值和水样水胺硫磷浓度的适应范围扩大,在 3 个月的连续试验中,若水样初始 COD<sub>Cr</sub> 浓度为 1 300—2500 mg · L<sup>-1</sup>,停留时间 24 h,在恒温摇床(30 ℃, 150 r · min<sup>-1</sup>)内降解,其去除率为 55%—70%。

张小荷等<sup>[16]</sup>对水胺硫磷水样在固定化微生物降解前后的性能评价指标进行了研究。

Portier 等研究了固定化微生物处理含氯乙酸盐的杀虫剂生产废水。进水氯乙酸钠浓度为 6 000 mg · L<sup>-1</sup>,停留时间为 10.9—16.2 h 时,出水中氯乙酸钠小于 10 mg · L<sup>-1</sup>,去除率达 99%,TOC 去除率也达 89%。

Aitkhozhina 等研究了固定化假单胞菌用于除去残留在土壤中的杀虫剂。

#### 4.3 固定化细胞处理印染废水和硝化、反硝化作用研究

韩树琴<sup>[17]</sup>等曾利用蜡状芽孢菌固定化细胞对染料酸性红进行了脱色研究。

刘志培等<sup>[18]</sup>分别采用多孔硅酸盐材料吸附固定化和聚乙烯醇包埋固定化混合菌细胞,进行了印染废水脱色的研究,并取得了较高的使用价值。

Nilsson 等<sup>[19、20]</sup>用海藻酸钙固定假单胞反硝化菌(*Pseudomonas denificans*),固定化细胞的 NO<sub>3</sub>-N 去除速率为自由细胞的 50%。固定化后,细胞的存活比例很大,但内扩散是脱氮过程的速度控制步骤。固定化细胞在低温下的活力保留上升,热稳定性及储藏稳定性增加。在用固定床处理含氮地表的试验中,脱氮活力可稳定 53 d,并且脱氮活性可以通过在营养培养基中的活化而得到恢复。此法脱氮效果好,反硝化速度为 66 mg · h<sup>-1</sup> · kg<sup>-1</sup> 凝胶,容积负荷为 3.6 kg · m<sup>-3</sup> · d<sup>-1</sup>。此后,许多工作者在此领域作出了大量的工作。

### 5 固定化细胞技术的应用前景与展望

近年来固定化细胞技术以其独特的优点在有机废水处理领域中引起了人们的普遍关注,进行了广泛的研究,但大多是在实验室规模上进行的,要实用化,还有许多问题需要解决:

① 针对不同的废水体系和所包埋的菌系细胞,选择合适的包埋材料以提高处理能力,有关载体对细胞浓度、活性的影响及其传质阻力的研究有待深入。因此,开发研究载体仍为固定化细胞技术的重要课题之一。

② 实际废水是一个十分复杂的混合体系,用单一菌株处理,一般很难达到要求,因此,对于复杂的废水体系,是采用混合菌,还是单一高效菌分级处理,有待进一步探索。

③ 固定化载体的成本及使用寿命是决定其经济可行性的关键,开发适合固定化微生物的高效生化反应器也是一个急待解决的问题。

④ 加强工业化连续处理废水的自动化成分,找出精确测

定载体中的细胞浓度的方法和较佳的动力学处理法,系统管理优化设计,降低成本,将废水处理和回收偶联。

基因工程技术在水处理中的应用还很遥远,但有效地利用遗传工程菌的降解潜力,防止其泄露而引起生态问题,开拓固定化细胞技术应用新领域,仍是一个发展方向。包埋固定化微生物在水处理中的应用研究尚处于初级阶段,随着该技术的不断深入研究和发 展,固定化细胞技术必将在废水生物处理领域中获得广泛的应用。

#### 参考文献:

- [1] Comer M A and Allgeier R J. *Adv Appl Microbiol*, 1976, 28: 878—885.
- [2] Chibata Z and Tosa T. *Appl Biochem. Bioeng*, 1983, 4: 1—9.
- [3] Scott C D. *Enzyme Microb Technol*, 1987, 9: 66—73.
- [4] 王洪祥,刘世勇. 酶和细胞的固定化[J], 化学通报, 1997, 2: 22—27.
- [5] Navarro J M and Durand G. *Fur J Appl Microbil*, 1977, 4: 243—254.
- [6] Chibata I, et al. *Appl Microbil*, 1974, 27: 878—885.
- [7] 李淑彬,钟英长. 固定化假单胞菌降解甲胺磷的研究[J], 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 422—426.
- [8] 陈敏,罗启芳. 聚乙烯醇包埋活性炭与微生物的固定化技术及对水胺硫磷降解的研究[J], 环境科学, 1993, 15(3): 11—14.
- [9] Anselmo A M, et al. Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture[J]. *Wat Sci Tech*, 1992, 25(1): 161—168.
- [10] 周定,等. 固定化细胞在废水处理中的应用及前景[J], 环境科学, 1993, 14(5): 15—54.
- [11] 孙艳,李京,谭立扬. 一种耐酚菌种及其固定化细胞降解含酚废水性能的比较研究[J], 环境科学研究, 1999, 12(1): 1—4.
- [12] Shreve G S, et al. Comparison of substrate utilization and growth kinetics between immobilized and detoxification of aromatic compounds[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41: 370.
- [13] Bokhamy M, et al. Degradation of sodium anthraquinone sulphonate by free and immobilized bacterial cultures[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41: 652—657.
- [14] Lee S T, et al. Biodegradation of pyridine by freely and suspended immobilized *pimelobacter* sp. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41: 652—657.
- [15] 黄霞,陈戈,邵林广,等. 固定化优势菌种处理焦化废水中几种难降解有机物的试验研究[J], 中国环境科学, 1995, 15(1): 1—4.
- [16] 张小荷,等. 固定化微生物对水胺硫磷降解活性指标的研究[J], 环境科学, 1994, 15(4): 53—55.
- [17] 韩树琴,等. 固定化细胞对染料脱色研究[J], 环境科学学报, 1988, 8(1): 93.
- [18] 刘志培,等. 吸附法固定化细胞对印染废水脱色研究[J], 环境科学, 1992, 13(1): 2.
- [19] Nilsson I, et al. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1980, 10: 261.
- [20] Nilsson I, et al. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1982, 14: 86.