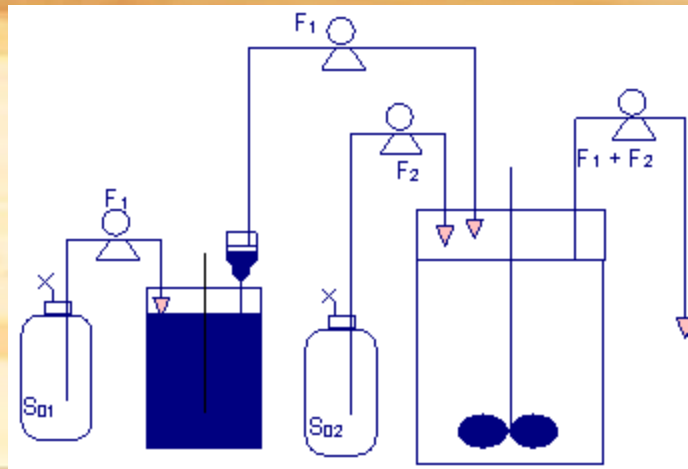


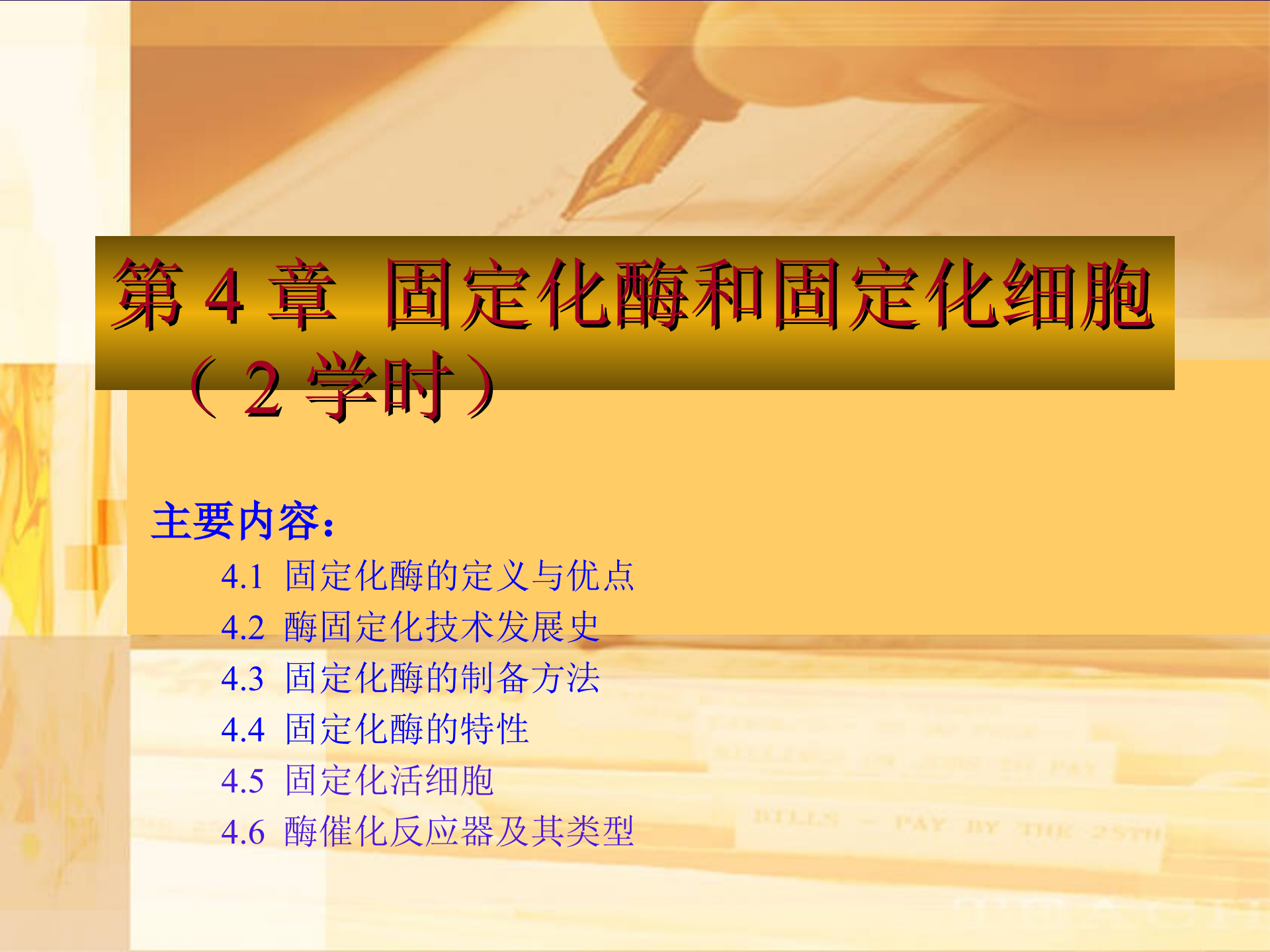
第4章 固定化酶和固定化细胞

主要内容:

4.4 固定化活细胞

4.5 酶催化反应器及其类型





第4章 固定化酶和固定化细胞 (2学时)

主要内容:

- 4.1 固定化酶的定义与优点
- 4.2 酶固定化技术发展史
- 4.3 固定化酶的制备方法
- 4.4 固定化酶的特性
- 4.5 固定化活细胞
- 4.6 酶催化反应器及其类型

- ❑ 本章主要介绍了固定化技术的发展史、酶和细胞的固定化方法以及酶经固定化后性质的变化，从动力学方面分析了固定化后酶特性变化的原因，并简要介绍了酶反应器的结构特点。



- ❑ 固定化酶、固定化细胞是一种在空间运动上受到完全约束或局部约束的酶、细胞。近代工业化利用始于 1969 年固定化氨基酰化酶的应用。利用固定化技术，解决了酶应用过程中的很多问题，为酶的应用开辟了新的前景。如可使所使用的酶、细胞能反复使用，使产物分离提取容易，并在生产工艺上可以实现连续化和自动化，故在 20 世纪 70 年代后得到迅速发展。其新的功能和新的应用正在迅速不断地扩展，是一项研究领域宽广、应用前景极为引人瞩目的新研究领域和新技术。



4.1 固定化酶的定义与优点

- ❑ 所谓固定化酶 (immobilized enzyme)，是指在一定的空间范围内起催化作用，并能反复和连续使用的酶。



固定化酶的优点：

- （1）同一批固定化酶能在工艺流程中重复多次地使用；
- （2）固定化后，和反应物分开，有利于控制生产过程，同时也省去了热处理使酶失活的步骤；
- （3）稳定性显著提高；
- （4）可长期使用，并可预测衰变的速度；
- （5）提供了研究酶动力学的良好模型。



4.2 酶固定化技术发展史

- ❑ 酶作为一种生物催化剂，因其催化作用具有高度专一性、催化条件温和、无污染等特点，广泛应用于食品加工、医药和精细化工等行业。但在使用过程中，人们也注意到酶的一些不足之处，如酶稳定性差、不能重复使用，并且反应后混入产品，纯化困难，使其难以在工业中更为广泛的应用。为适应工业化生产的需要，人们模仿人体酶的作用方式，通过固定化技术对酶加以固定改造，来克服游离酶在使用过程中的一些缺陷。



❑ 将酶固定化以后，既保持了酶的催化特性，又克服了游离酶的不足之处，使其具有一般化学催化剂能回收反复使用的优点，并在生产工艺上可以实现连续化和自动化。事实上，早在 1916 年，Nelson 和 Griffin 就用吸附的方法实现了酶的固定化，他们将蔗糖酶吸附在骨炭粉上，发现吸附以后酶不溶于水而且具有和液体酶同样的活性，可惜这个重要的发现长期以来没有得到酶学家的重视。

❑ 系统地进行酶的固定化研究则是从 20 世纪 50 年代开始的。1953 年 Grubhofer 和 Schleith 将聚氨基苯乙烯树脂重氮化，然后将淀粉酶、羧肽酶、胃蛋白酶和核糖核酸酶等酶与这种载体结合，制成了固定化酶。六十年代后期，酶固定化技术迅速发展，出现了很多新的酶固定化方法。1969 年，日本的著名学者千畑一郎等将固定化氨基酰化酶应用于 DL-氨基酸的光学拆分上，来生产 L-氨基酸，开创了固定化酶应用于工业生产的先例。

❑ 在 20 世纪 60 年代后期对酶的固定化研究主要是将酶与水不溶性载体结合起来，成为不溶于水的酶衍生物，所以最初曾称为水不溶酶（water insoluble enzyme）和固相酶（solid phase enzyme）。但是随着理论与技术的发展，后来发现也可以将溶解状态的酶固定在一个有限的空间使其不能自由移动，也能达到固定酶的作用。如把酶包埋在凝胶内，酶本身是可溶的，因此，用水不溶酶和固相酶的名称就不恰当了。所以在 1971 年召开的第一届国际酶工程会议上，建议采用统一的英文名称 **Immobilized Enzyme**。

□ 用于固定化的酶，起初都是采用经提取和分离纯化后的酶，后来随着固定化技术的发展，作为固定化的对象已不一定是酶，也可对含酶细胞或细胞器进行固定化。1973年，日本的千畑一郎等成功的使用固定化大肠杆菌菌体中的天冬氨酸酶，由反丁烯二酸连续生产 L- 天冬氨酸，将固定化微生物细胞首次应用于工业生产，使细胞固定化技术迅速发展 1986 年，我国科学家利用固定化原生质体发酵生产碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶等相继获得成功。

□ 目前，固定化技术已经取得了许多重要成果，充分发挥了固定化酶和固定化细胞在改革工艺和降低成本方面的巨大潜力。但从目前的发展状况来看，尽管酶种类繁多，但已经固定化的酶却相对有限，采用固定化酶技术大规模生产的企业尚属少数，真正在工业上使用的固定化酶还仅限于葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶和青霉素酰化酶等为数不多的十几个酶种，故仍需大力研究开发使更多的固定化酶和细胞能适用于工业规模生产。



4.3 固定化酶的制备方法

- 固定化酶的制备方法、制备材料多种多样，不同的制备方法和材料，固定化后酶的特性不同。对于特定的目标酶，要根据酶自身的性质、应用目的、应用环境来选择固定化载体和方法。



❑ 在具体选择时，一般应遵循以下几个原则。

- ✚ （1）必须注意维持酶的构象，特别是活性中心的构象。酶的催化反应取决于酶本身蛋白质分子所特有的高级结构和活性中心，为了不损害酶的催化活性及专一性，酶在固定化状态下发挥催化作用时，既需要保证其高级结构，又要使构成活性中心的氨基酸残基不发生变化。



- ❑ 这就要求酶与载体的结合部位不应当是酶的活性部位，应避免活性中心的氨基酸残基参与固定化反应；另外，由于酶蛋白的高级结构是凭借疏水键、氢键、盐键等较弱的键维持的，所以固定化时应采取尽可能温和的条件，避免那些可能导致酶蛋白高级结构破坏的条件，如高温、强酸、强碱、有机溶剂等处理。



- ✚ （2）酶与载体必须有一定的结合程度。酶的固定化既不影响酶的原有构象，又能使固定化酶能有效回收贮藏，利于反复使用。
- ✚ （3）固定化应有利于自动化、机械化操作。这要求用于固定化的载体必须有一定的机械强度，才能使之在制备过程中不易破坏或受损。
- ✚ （4）固定化酶应有最小的空间位阻。固定化应尽可能不妨碍酶与底物的接近，以提高催化效率和产物的量。



- ✦ （5）固定化酶应有最大的稳定性。在应用过程中，所选载体应不和底物、产物或反应液发生化学反应。
- ✦ （6）固定化酶的成本适中。工业生产必须要考虑到固定化成本，要求固定化酶应是廉价的，以利于工业使用。



酶的固定化方法主要可分为四类：吸附法、包埋法、共价键结合法和交联法等。吸附法和共价键结合法又可统称为载体结合法。

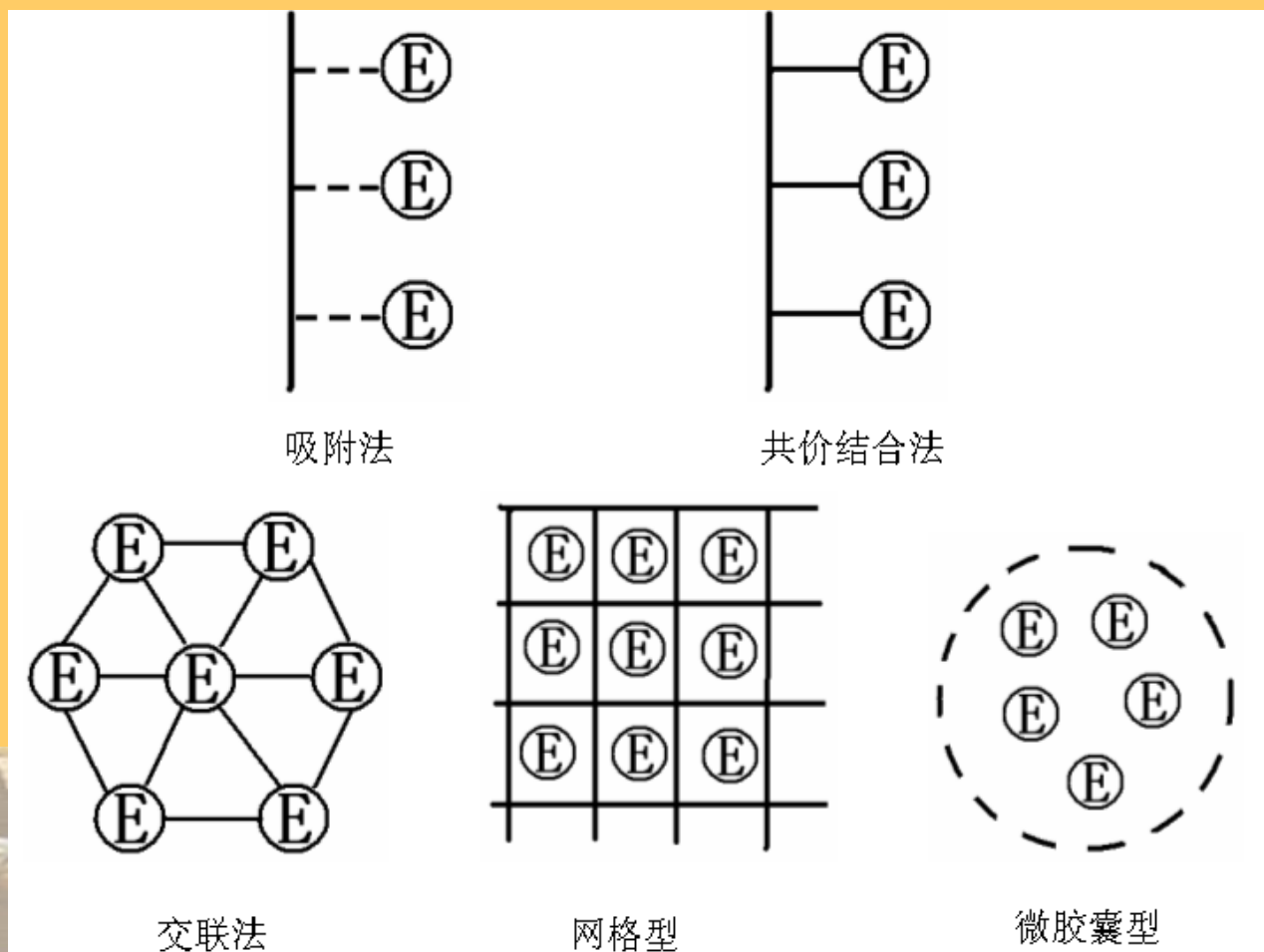


图 5-1 酶的固定方法示意图

4.3.1 吸附法

- ❑ 吸附法（adsorption）是通过载体表面和酶分子表面间的次级键相互作用而达到固定目的的方法，是固定化中最简单的方法。酶与载体之间的亲和力是范德华力、疏水相互作用、离子键和氢键等。
- ❑ 吸附法又可分为物理吸附法和离子吸附法。



(1) 物理吸附法

- ❑ 物理吸附法 (physical adsorption) 是通过物理方法将酶直接吸附在水不溶性载体表面上而使酶固定化的方法。是制备固定化酶最早采用的方法，如 α - 淀粉酶、糖化酶、葡萄糖氧化酶等都曾采用过此法进行固定化。物理吸附法常用的有机载体如纤维素、胶原、淀粉及面筋等；无机载体如活性炭、氧化铝、皂土、多孔玻璃、硅胶、二氧化钛、羟基磷灰石等。



- ❑ 物理吸附法制备固定化酶，操作简单、价廉、条件温和，载体可反复使用，酶与载体结合后，活性部位及空间构象变化不大，故所制得的固定化酶活力较高。但由于靠物理吸附作用，酶和载体结合不牢固，在使用过程中容易脱落，所以使用受到限制。常与交联法结合使用。



(2) 离子吸附法

- ❑ 离子吸附法 (ion adsorption) 是将酶与含有离子交换基团的水不溶性载体以静电作用力相结合的固定化方法，即通过离子键使酶与载体相结合的固定化方法。此法固定的酶有葡萄糖异构酶、糖化酶、 β -淀粉酶、纤维素酶等，在工业上用途较广。如最早应用于工业化生产的氨基酰化酶，就是使用多糖类阴离子交换剂二乙基氨基乙基 (DEAE)- 葡聚糖凝胶固定化的。此外，DEAE- 纤维素吸附的 α - 淀粉酶、蔗糖酶已作为商品固定化酶。



- ❑ 离子吸附法所使用的载体是某些离子交换剂。常用的阴离子交换剂有 DEAE- 纤维素、混合胺类 (ECTEOLA)- 纤维素、四乙氨基乙基 (TEAE)- 纤维素、DEAE- 葡聚糖凝胶、Amberlite IRA-93 、 410 、 900 等；阳离子交换剂有羧甲基 (CM)- 纤维素、纤维素柠檬酸盐、Amberlite CG-50 、 IRC-50 、 IR-200 、 Dowex-50 等。其吸附容量一般大于物理吸附剂。
- ❑ 离子吸附法具有操作简便、条件温和、酶活力不易丧失等优点。此外，吸附过程同时可以纯化酶。



4.3.2 包埋法

- ❑ 包埋法（ entrapment ）是将酶包埋在高聚物的细微凝胶网格中或高分子半透膜内的固定化方法。前者又称为凝胶包埋法，酶被包埋成网格型；后者又称为微胶囊包埋法，酶被包埋成微胶囊型。



❑ （1）凝胶包埋法

- ✚ 凝胶包埋法常用的载体有海藻酸钠凝胶、角叉菜胶、明胶、琼脂凝胶、卡拉胶等天然凝胶以及聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和光交联树脂等合成凝胶或树脂。

❑ （2）微胶囊包埋法

- ✚ 微胶囊包埋即将酶包埋在各种高聚物制成的半透膜微胶囊内的方法。它使酶存在于类似细胞内的环境中，可以防止酶的脱落，防止微囊外的环境直接接触，从而增加了酶的稳定性。常用于制造微胶囊的材料有聚酰胺、火棉胶、醋酸纤维素等。

- ❑ 用微胶囊包埋法制得的微囊型固定化酶的直径通常为几微米到数百微米，胶囊孔径为几埃至数百埃，适合于小分子为底物和产物的酶的固定化。如脲酶、天冬酰胺酶、尿酸酶、过氧化氢酶等。其制造方法有界面聚合法、界面沉淀法、二级乳化法、液膜（脂质体）法等。



4.3.3 共价键结合法

- ❑ 共价键结合法 (covalent binding) 是将酶与聚合物载体以共价键结合的固定化方法。酶蛋白上可供载体结合的功能基团有以下几种：



- ❑ (1) 酶蛋白 N 末端的 α - 氨基或赖氨酸残基的 ϵ - 氨基。
- ❑ (2) 酶蛋白 C 末端的 α - 羧基、天门冬氨酸残基的 β - 羧基以及谷氨酸残基的 γ - 羧基。
- ❑ (3) 半胱氨酸残基的巯基。
- ❑ (4) 丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的羟基。
- ❑ (5) 组氨酸残基的咪唑基。
- ❑ (6) 色氨酸残基的吲哚基。
- ❑ (7) 苯丙氨酸和酪氨酸残基的苯环。

- 其中最普遍的共价键结合基团是氨基、羧基以及苯环。常用来和酶共价偶联的载体的功能基团有芳香氨基、羟基、羧基和羧甲基等。这种方法是固定化酶研究中最活跃的一大类方法，但必须注意，参加共价结合的氨基酸残基应当是酶催化活性非必需基团，如若共价结合包括了酶活性中心有关的基团，会导致酶的活力损失。



❑ （1）重氮法 重氮法是将酶蛋白与水不溶性载体的重氮基团通过共价键相连接而固定化的方法，是共价键法中使用最多的一种。常用的载体有多糖类的芳族氨基衍生物、氨基酸的共聚体和聚丙烯酰胺衍生物等。



□ （2）叠氮法 即载体活化生成叠氮化合物，再与酶分子上的相应基团偶联成固定化酶。含有羟基、羧基、羧甲基等基团的载体都可用此法活化。如 CMC、CM-sephadex（交联葡聚糖）、聚天冬氨酸、乙烯 - 顺丁烯二酸酐共聚物等都可用此法来固定化酶，其中使用最多的是羧甲基纤维素叠氮法。



❑ （3）溴化氰法 即用溴化氰将含有羟基的载体，如纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶等，活化生成亚氨基碳酸酯衍生物，然后再与酶分子上的氨基偶联，制成固定化酶。任何具有连位羟基的高聚物都可用溴化氰法来活化。由于该法可在非常缓和的条件下与酶蛋白的氨基发生反应，近年来已成为普遍使用的固定化方法。尤其是溴化氰活化的琼脂糖已在实验室广泛用于固定化酶以及亲和层析的固定化吸附剂。



□ （4）烷化法和芳基化法 以卤素为功能团的载体可与酶蛋白分子上的氨基、巯基、酚基等发生烷基化或芳基化反应而使酶固定化。此法常用的载体有卤乙酰、三嗪基或卤异丁烯基的衍生物。



□ 从上面介绍的四种制备方法可看出，用共价键结合法制备的固定化酶，酶和载体之间都是通过化学反应以共价键偶联。由于共价键的键能高，酶和载体之间的结合相当牢固，即使用高浓度底物溶液或盐溶液，也不会使酶分子从载体上脱落下来，具有酶稳定性好、可连续使用较长时间的优点。



❑ 但是采用该方法时，载体活化的难度较大，操作复杂，反应条件较剧烈，制备过程中酶直接参与化学反应，易引起酶蛋白空间构象变化，酶活回收率一般为 30% 左右，甚至酶的底物的专一性等性质也会发生变化，往往需要严格控制操作条件才能获得活力较高的固定化酶。



- ❑ 现在已有不少活化的商品化酶固定化载体，它们的使用不需做大量的处理工作，商品一般以干的固定相或预装柱的形式供应，一般情况下这些固定相已经活化好，酶的固定化只要将酶在合适的 pH 和其它相关条件下，让酶循环通过柱子便可完成。



4.3.4 交联法

- ❑ 交联法（ cross-linking ）是使用双功能或多功能试剂使酶分子之间相互交联呈网状结构的固定化方法。由于酶蛋白的功能团，如氨基、酚基、巯基和咪唑基，参与此反应，所以酶的活性中心构造可能受到影响，而使酶失活明显。但是尽可能地降低交联剂浓度和缩短反应时间将有利于固定化酶活力的提高。



- 常用的双功能试剂有戊二醛、己二胺、异氰酸衍生物、双偶氮联苯和 N,N'- 乙烯双顺丁烯二酰亚胺等，其中使用最广泛的是戊二醛。戊二醛和酶蛋白中的游离氨基发生 Schiff 反应，形成薛夫碱，从而使酶分子之间相互交联形成固定化酶。



□ 以上四种固定化酶方法各有其优缺点（见表 4-1）。往往一种酶可以用不同方法固定化，但没有一种固定化方法可以普遍地适用于每一种酶。在实际应用时，常将两种或数种固定化方法并用，以取长补短。



表4-1 各种固定化方法的比较

	吸附法		包埋法	共价键结合法	交联法
	物理吸附法	离子吸附法			
制备	易	易	较难	难	较难
结合程度	弱	中等	强	强	强
活力回收率	高，但酶易流失	高	高	低	中等
再生	可能	可能	不可能	不可能	不可能
固定化成本	低	低	低	高	中等
底物专一性	不变	不变	不变	可变	可变





4.4 固定化酶的特性

4.4.1 固定化酶的形状

- ❑ 固定化酶的形式多样，依不同用途有颗粒、线条、薄膜和酶管等形状。其中颗粒占绝大多数，它和线条主要用于工业发酵生产，如装成酶柱用于连续生产，或在反应器中进行批式搅拌反应；薄膜主要用于酶电极，应用于分析化学；酶管机械强度较大，亦宜用于工业生产。



4.4.2 固定化酶的性质

- ❑ 酶在水溶液中以自由的游离状态存在，但是固定后酶分子便从游离的状态变为牢固地结合于载体的状态，其结果往往引起酶的性质改变。为此，在固定化酶的应用过程中，必须了解固定化酶的性质与游离酶之间的差别，并对操作条件加以适当调整。
- ❑ 由于固定化的方法不同，固定化酶的活力和性质也有所不同。



4.4.3 酶活力

❑ 固定化酶的活力在多数情况下比天然酶的活力低，其原因可能是：

- ✚ ① 酶活性中心的重要氨基酸残基与水不溶性载体相结合；
- ✚ ② 当酶与载体结合时，它的高级结构发生了变化，其构象的改变导致了酶与底物结合能力或催化底物转化能力的改变；
- ✚ ③ 酶被固定化后，虽不失活，但酶与底物间的相互作用受到空间位阻的影响。

- 也有在个别情况下，酶经固定化后其活力升高，可能是由于固定化后酶的抗抑能力提高使得它反而比游离酶活力高。



4.4.4 固定化酶的稳定性

□ 游离酶的一个突出缺点是稳定性差，而固定化酶的稳定性一般都比游离酶提高得多，这对酶的应用是非常有利的。其稳定性增强主要表现在如下几个方面：

✚ （1）操作稳定性 酶的固定化方法不同，所得的固定化酶的操作稳定性亦有差异。固定化酶在操作中可以长时间保留活力，一般情况下，半衰期在一个月以上，即有工业应用价值。



✚ （2）贮藏稳定性 固定化可延长酶的贮藏有效期。但长期贮藏，活力也不免下降，最好能立即使用。如果贮藏条件比较好，亦可较长时间保持活力。例如，固定化胰蛋白酶，在 0.0025mol/L 磷酸缓冲液中，于 20°C 保存数月，活力尚不损失。

✚ （3）热稳定性 热稳定性对工业应用非常重要。大多数酶在固定化之后，其热稳定性都有所提高，但也有些酶的耐热性反而下降。一般采用吸附法来进行酶的固定化时，有时会导致酶热稳定性的降低。

✚ （4）对蛋白酶的稳定性 酶经固定化后，其对蛋白酶的抵抗力提高。这可能是因为蛋白酶是大分子，由于受到空间位阻的影响，不能有效接触固定化酶。例如，千畑一郎发现，用尼龙或聚脲膜包埋，或用聚丙烯酰胺凝胶包埋的固定化天门冬酰胺酶，对蛋白酶极为稳定，而在同一条件下，游离酶几乎全部失活。另外固定化后酶对有机试剂和酶抑制剂的耐受性也得到了提高。

□ （ 5 ） 酸碱稳定性

多数固定化酶的酸碱稳定性高于游离酶，稳定 pH 范围变宽。极少数酶固定化后稳定性下降，可能是由于固定化过程使酶活性构象的敏感区受到牵连而导致的。



4.4.5 固定化酶的反应特性

- 固定化酶的反应特性，例如，底物特异性、酶反应的最适pH、酶反应的最适温度、动力学常数、最大反应速度等均与游离酶有所不同。



✚ （1）底物特异性 固定化酶的底物特异性与底物分子量的大小有一定关系。一般来说，当酶的底物为小分子化合物时，固定化酶的底物特异性大多数情况下不发生变化。例如，氨基酰化酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖异构酶等，固定化前后的底物特异性没有变化；



✚ 而当酶的底物为大分子化合物时，如蛋白酶、 α -淀粉酶、磷酸二酯酶等，固定化酶的底物特异性往往会发生变化。这是由于载体引起的空间位阻作用，使大分子底物难以与酶分子接近而无法进行催化反应，酶的催化活力难以发挥出来，催化活性大大下降；而分子量较小的底物受到空间位阻作用的影响较小，与游离酶没有显著区别。



- ✚ 酶底物为大分子化合物时，底物分子量不同，对固定化酶底物特异性的影响也不同，一般随着底物分子量的增大，固定化酶的活力下降。例如，糖化酶用 CMC 叠氮衍生物固定化时，对分子量 8000 的直链淀粉的活性为游离酶的 77 %，而对分子量为 50 万的直链淀粉的活性只有 15% ~ 17 %。



✚ （2）反应的最适 pH 酶被固定后，其最适 pH 和 pH 曲线常会发生偏移，原因可能有以下三个方面：一是酶本身电荷在固定化前后发生变化；二是由于载体电荷性质的影响致使固定化酶分子内外扩散层的氢离子浓度产生差异；三是由于酶催化反应产物导致固定化酶分子内部形成带电荷微环境。



✚ 产物性质对固定化酶的最适 pH 的影响，一般来说，产物为酸性时，固定化酶的最适 pH 与游离酶相比升高；产物为碱性时，固定化酶的最适 pH 与游离酶相比降低。这是由于酶经固定化后产物的扩散受到一定的限制所造成的。当产物为酸性时，由于扩散限制，使固定化酶所处微环境的 pH 与周围环境相比较低，需提高周围反应液的 pH 值，才能使酶分子所处的催化微环境达到酶反应的最适 pH，因而，固定化酶的最适 pH 比游离酶的最适 pH 高一些；反之，产物为碱性时，固定化酶的最适 pH 比游离酶的 pH 为低。

✚ （3）反应的最适温度 固定化酶的最适反应温度多数较游离酶高，如色氨酸酶经共价结合后最适温度比固定前提高 $5 \sim 15^{\circ}\text{C}$ ，但也有不变甚至降低的。固定化酶的作用最适温度会受固定化方法以及固定化载体的影响。



✚ （4）米氏常数 米氏常数 K_m 反映了酶与底物的亲和力。酶经固定化后，酶蛋白分子的高级结构的变化以及载体电荷的影响可导致底物和酶的亲合力的变化。使用载体结合法制成的固定化酶 K_m 有时变动的原因，主要是由于载体与底物间的静电相互作用的缘故。

✚ （5）最大反应速度

固定化酶的最大反应速度与游离酶大多数是相同的。有些酶的最大反应速度会因固定化方法的不同而有所差异。



谢谢!

4.4 固定化活细胞

- ❑ 利用胞内酶制作固定化酶时，先要把细胞破碎，才能将里面的酶提取出来，这就增加了工序和成本，且提取的酶往往不够稳定。因此人们设想直接固定那些含有所需胞内酶的细胞，并且就用这样的细胞来催化化学反应。20 世纪 70 年代，在固定化酶的基础上科学家们研制成固定化细胞（ Immobilized Cell ），并且用于生产。70 年代末，法国研究成功固定化细胞生产啤酒，80 年代初我国居乃琥等用固定化细胞批量生产啤酒和酒精取得重要研究成果。



□ 固定化细胞按其生理状态又可分为固定化死细胞和活细胞两大类。最初固定化的细胞是死细胞或静止态细胞，只利用其酶活性，近年来发展到固定化活细胞。前者经固定化后，虽然整个细胞活力消失，但是，需要利用的“目的酶”仍保持催化活力；而后者经固定化后，细胞仍保存活性，能进行正常的生长、繁殖和新陈代谢，所以称为固定化活细胞或固定化增殖细胞。例如，琼脂包埋的酵母细胞数初时为 10^6 个 / m^3 ，在营养培养基里培养两天后，细胞数可达 $10^9 \sim 10^{10}$ 个 / m^3 。



- 与酶的固定化相比，固定化细胞保持了胞内酶系的原始状态与天然环境，有效地利用游离细胞完整的酶系统和细胞膜的选择通透性，既具有固定化酶的优点，又具有其自身的优越性：



固定化细胞的优越性

- ✚ ① 无需进行酶的分离和纯化，减少酶的活力损失，同时大大降低了成本；
- ✚ ② 可进行多酶反应，且不需添加辅助因子，固定化细胞不仅可以作为单一的酶发挥作用，而且可以利用菌体中所含的复合酶系完成一系列的催化反应，对于这种多酶系统，辅助因子再生容易；

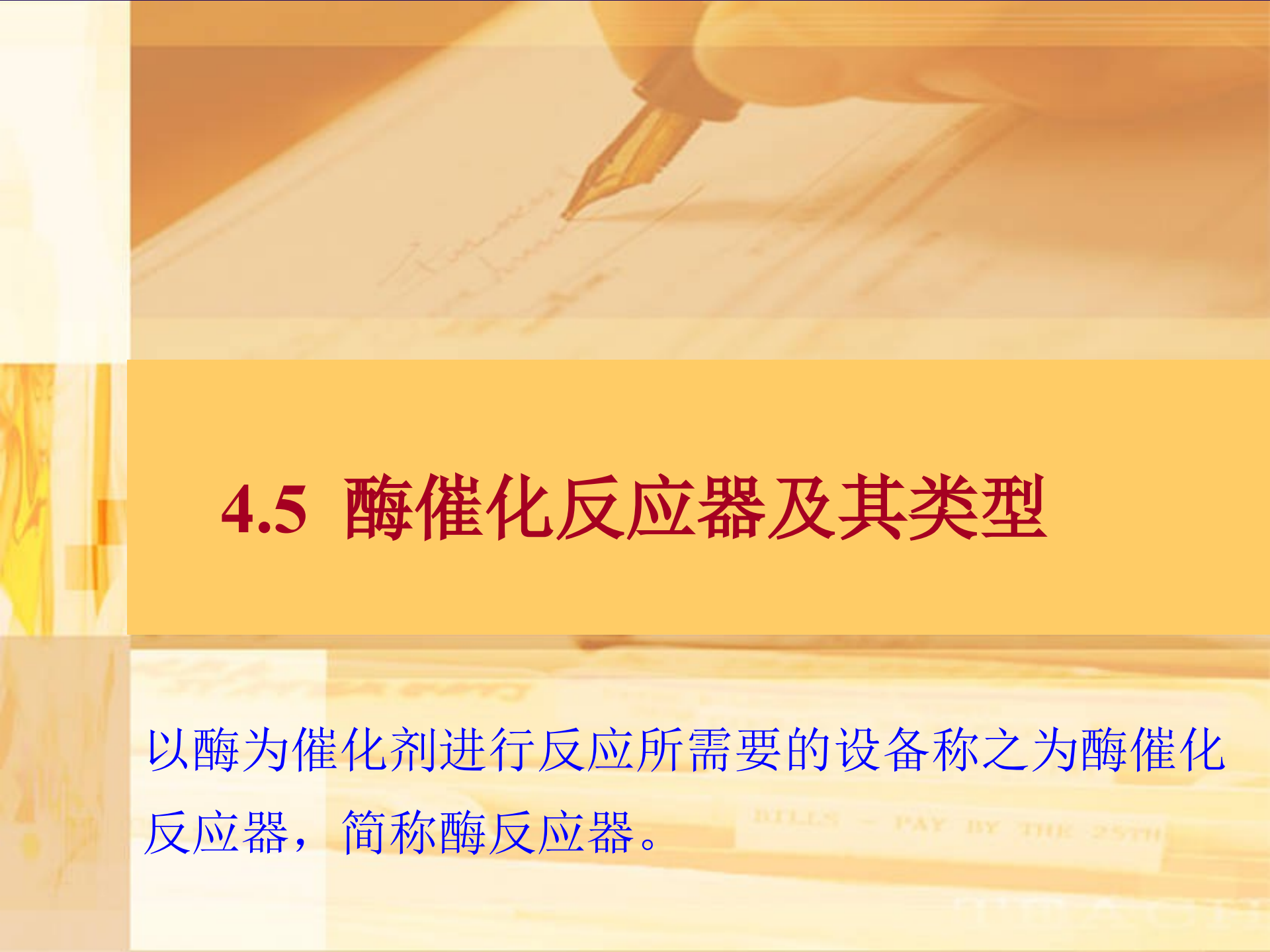


固定化细胞的优越性

- ✚ ③ 对于活细胞来说，保持了酶的原始状态，酶的稳定性更高，对污染的抵抗力更强；
 - ✚ ④ 细胞生长停滞时间短，细胞多，反应快等等。
- 正是由于固定化细胞的这些无可比拟的优势，尽管其出现远远晚于固定化酶，但其应用范围比固定化酶更为广泛。



- ❑ 当然，固定化细胞也有其自身的缺点，如：必须保持菌体的完整，需防止菌体的自溶，否则影响产物的纯度；必须抑制细胞内蛋白酶对目的酶的分解；胞内多酶的存在，会形成副产物；载体、细胞膜或细胞壁会造成底物渗透与扩散的障碍等。
- ❑ 固定化酶和固定化细胞都是以酶的应用为目的，其制备方法也基本相同。固定化活细胞的制备条件比固定化酶更要温和，其制备方法主要有物理吸附法和包埋法两种。



4.5 酶催化反应器及其类型

以酶为催化剂进行反应所需要的设备称之为酶催化反应器，简称酶反应器。

4.5.1 酶反应器的类型

□ 酶反应器有两种类型：

- ✦ 一类是直接用游离酶进行反应，即均相酶反应器；
- ✦ 另一类是应用固定化酶进行的非均相酶反应器。

□ 均相酶反应能在批量式搅拌桶反应器或超滤膜反应器中进行，而非均相酶反应则可在多种反应器中进行，适用于连续催化反应，包括：连续流搅拌桶反应器、填充床反应器、流化床反应器、连续搅拌桶 - 超滤和循环式反应器等。



4.5.2 反应器的结构特点

4.5.2.1 批量式搅拌桶反应器

✚ 这类反应器结构简单，造价较低，传质阻力很小，反应能迅速达到稳态，主要应用在**饮料等食品工业中**。其缺点是操作麻烦，在反复回收过程中固定化酶容易损失，所以工业规模的固定化酶很少采用。但是，常用于游离酶。

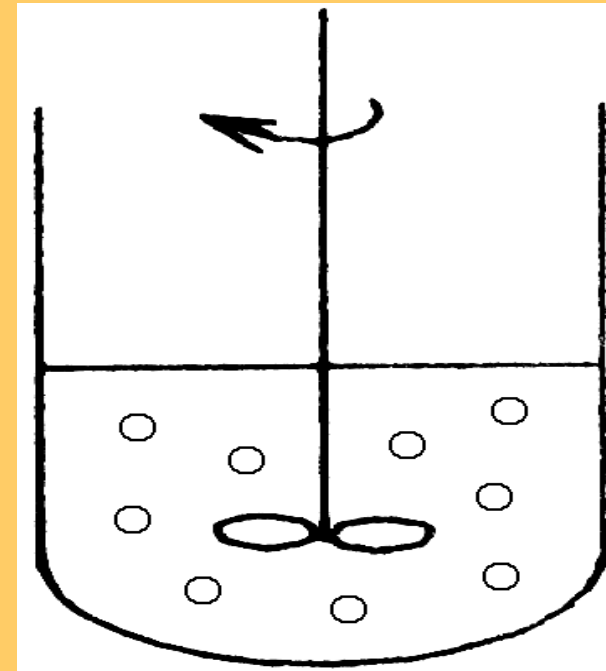


图 4-2 批量式搅拌桶反应器



4.5.2.2 连续流搅拌桶反应器 (Continuous Flow Stirred Tand Reactor, 缩写 CSTR)

- 这种反应器在运转过程中，底物以恒定的流速流入反应器，与此同时，反应液则以同样的流速流出反应器。反应桶内装有搅拌器，使反应组分与固定化酶颗粒混合均一，出口处有过滤膜，可使不断补充新鲜底物与反应液流量维持动态平衡，如图 4-3。

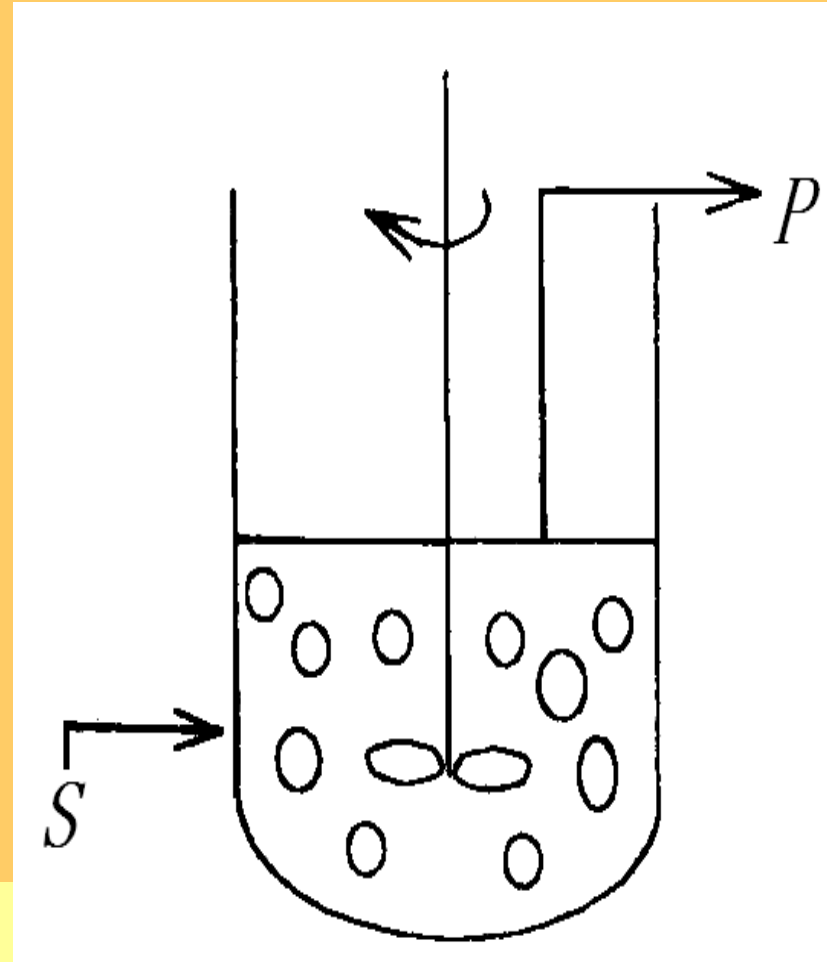


图 4-3 连续流搅拌桶反应器

- ✦ 在理想的连续流搅拌桶反应器中，反应液混合良好，各部位的成分相同，并与流出液的组成也一致。CSTR 的开放结构使得调换固定化酶比较容易，而且有利于控制温度和调节 pH，还能够处理胶态或不溶性底物，受底物抑制的固定化酶采用 CSTR 有较高的转化率。



✚ 其缺点是，由搅拌产生的剪切力较大，易打碎磨损固定化酶颗粒。近来对此类型反应器进行了改良，就是将载有酶的圆片聚合物固定在搅拌轴上或者放置在与搅拌轴一起转动的金属网筐内，这样，既能保证反应液搅拌均匀，同时又不致损坏固定化酶。



4.5.2.3 填充床反应器 (Packed Bed Reactor, 缩写 PBR)

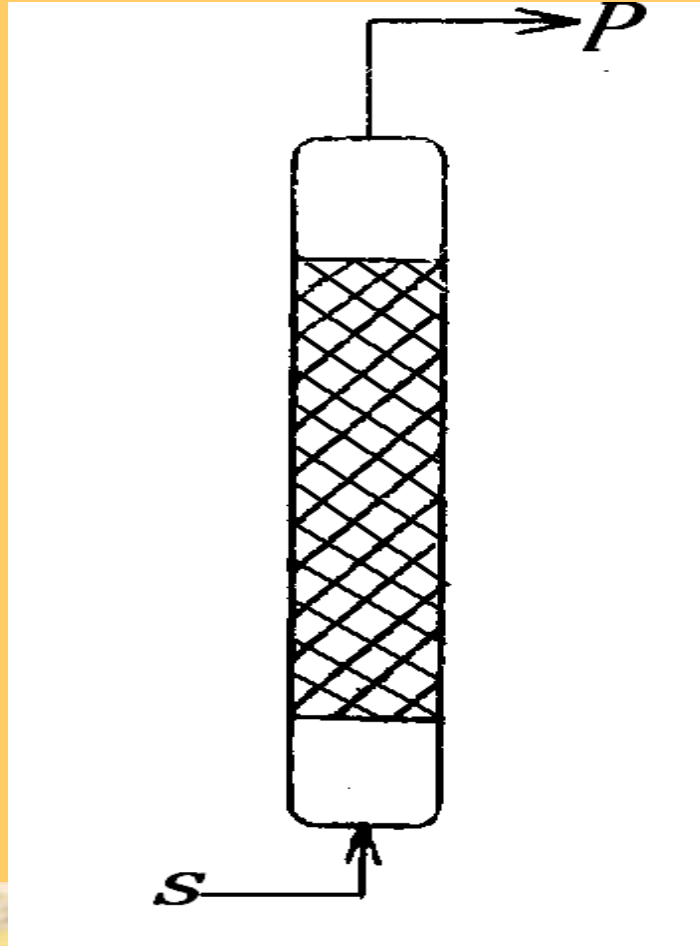


图 4-4 填充床反应器

✚ 填充床反应器又称固定床反应器（如图 4-4）。可填充多向异性半透性中空纤维制成管状，内部填充酶膜、酶片等。在填充床反应器内，底物在一定方向上以恒定的速度通过固定化酶柱。若柱的横截面上每一点液体流动的速度完全相同，则可以认为反应器是在理想条件下作为活塞式流动反应器（ Plug Flow Reactor ， PFR ）运转。由于流动方向上存在速度和温度梯度，在轴方向上存在底物的扩散，所以实际上总是不可能完全符合理想化的条件。

4.5.2.4 流化床反应器 (Fluidized Bed Reactor , 缩写为 FBR)

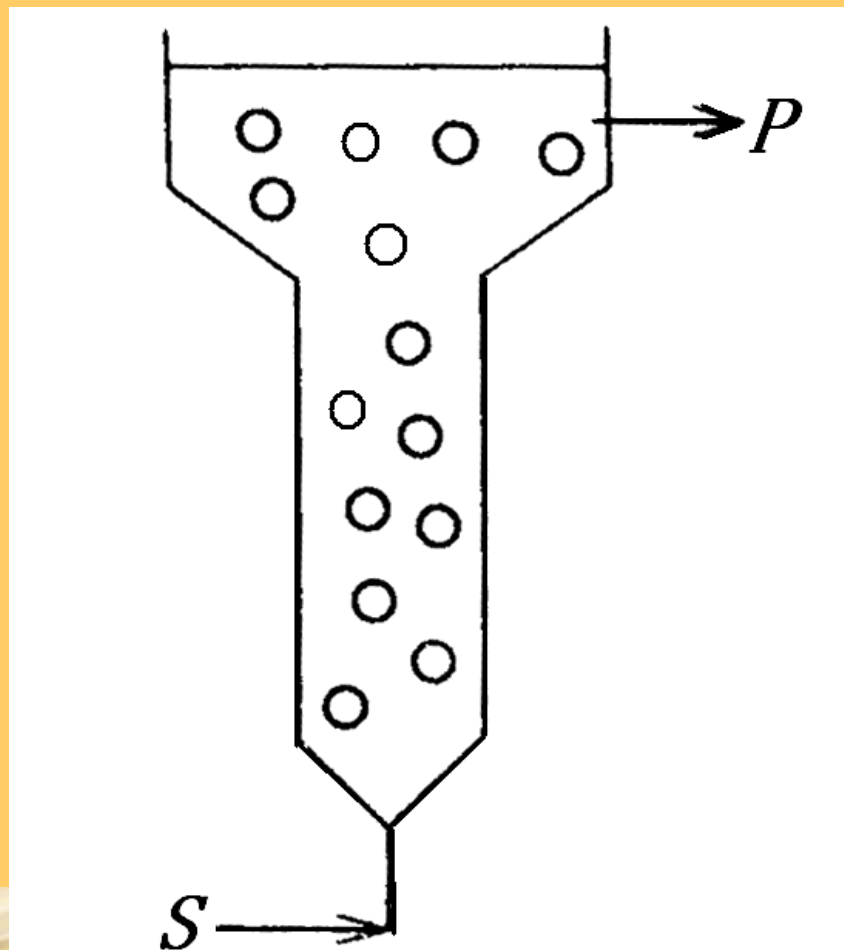


图 4-5 流化床反应器

✚ 流化床型反应器是一种装有较小颗粒的垂直塔式反应器。反应时，底物溶液以足够大的流速，从反应器底部向上通过固定化酶柱床，便能使固定化酶颗粒始终处于流化状态。其结构如图 4-5。其流动方式使反应液的混合程度介于 CSTR 的全混型和 PFR 的平推流型之间。由于反应器内混合程度高，因此，传热、传质情况良好。



4.5.2.5 连续搅拌桶 - 超滤反应器 (CSTR / UF)

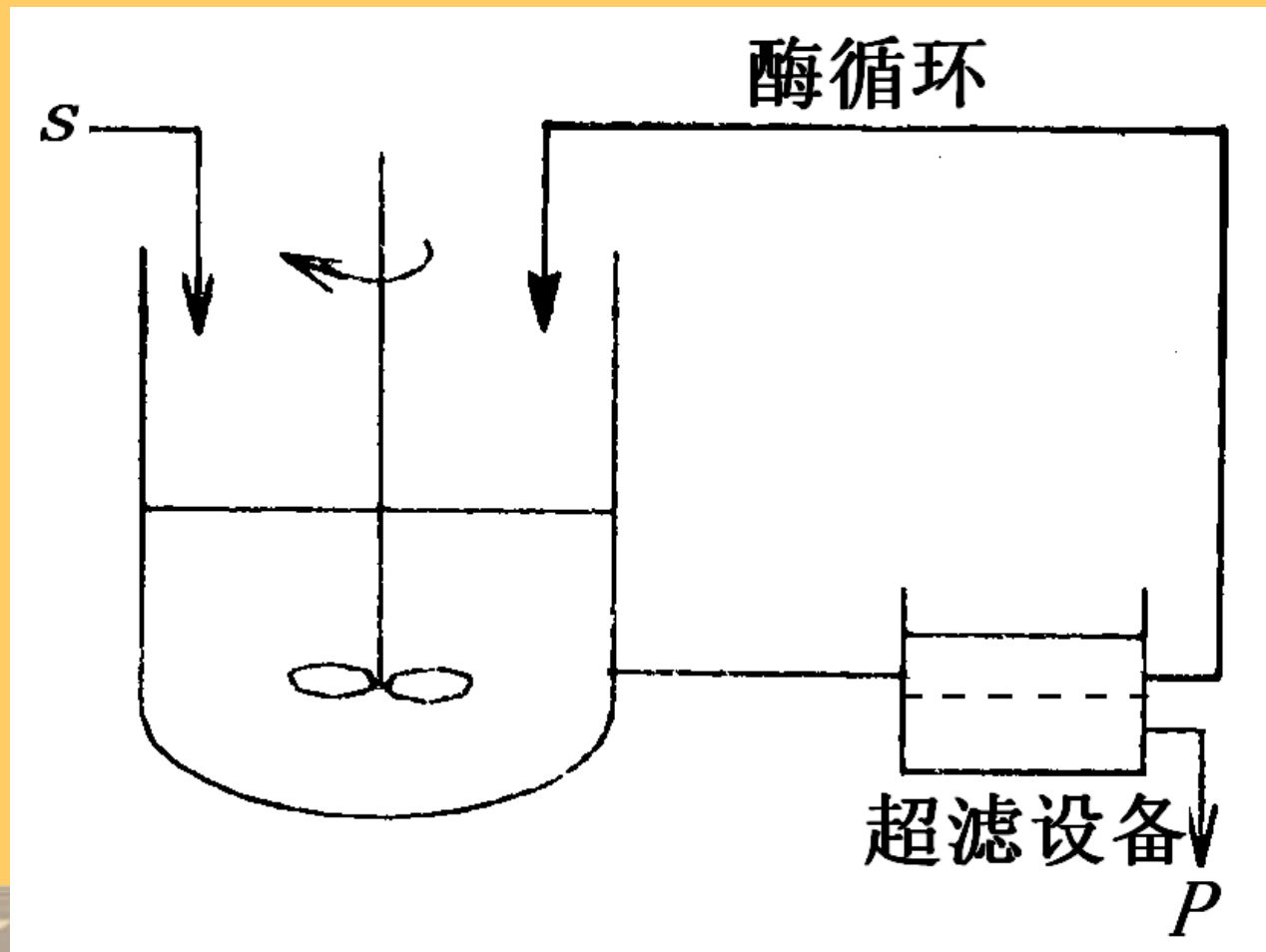


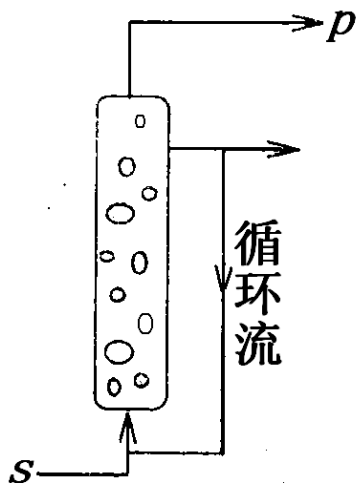
图 4-6 连续搅拌桶 - 超滤反应器

✚ CSTR / UF 结构是 CSTR 与超滤装置联用的酶膜反应器。在 CSTR 出口处设置一个超滤装置，通过超滤装置，酶可以循环使用。其结构如图 5-6。该超滤器中的半透性超滤膜只允许小分子产物通过，不允许大分子酶和底物通过。因此，可以将小分子产物与大分子酶和底物分开，有利于产物回收。该反应器适用于颗粒较细的固定化酶、游离酶和细胞以及小分子产物与大分子底物。

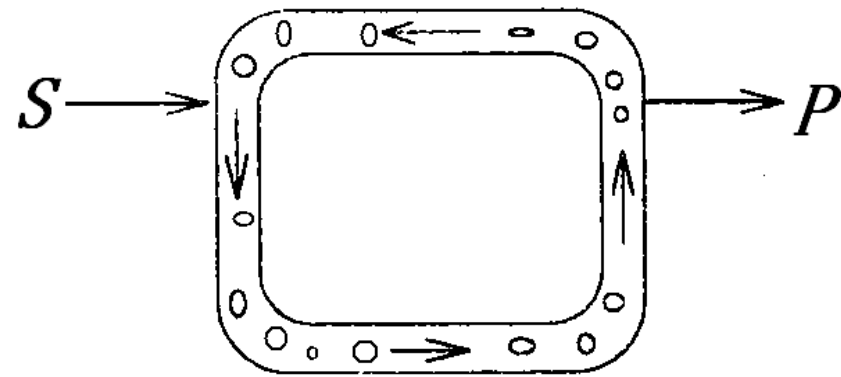


✚ 对这类反应器在技术上的可行性已得到了证实，例如进行纤维素的连续糖化、用 α - 淀粉酶水解淀粉、用转化酶水解蔗糖和用青霉素酶把青霉素 G 转化成 6- 氨基青霉烷酸（6-APA）等生化过程。此外，还用于小分子产物（葡萄糖、麦芽糖）与大分子底物（淀粉、纤维素）的分离。





外循环反应器



内循环反应器

4.5.2.6 循环反应器（Recycle Reactor，RCR）

循环操作仍能为底物与酶提供足够的接触机会，以达到所需的转化率。这种反应器可用于难溶或者不溶性底物的转化反应。

4.5.3 膜式反应器

- 膜式反应器是 20 世纪 70 年代以来发展起来的一种新型反应器，它是利用膜的分离功能，同时完成反应和分离过程的一种反应器。



□4.5.3.1 膜式反应器的类型

- ✦ 根据酶的存在状态、相数、膜组件型式、膜材料类型、耦合方式、传质推动力等的不同，酶膜反应器有不同的分类方式。根据膜组件的型式不同，可把酶膜反应器分为板框式、螺旋卷式、管式和中空纤维式酶膜反应器。以下以螺旋卷膜式反应器和中空纤维膜式反应器为例来说明。



✚ （1）螺旋卷膜式反应器 此反应器的螺旋结构是将含酶的膜片与支持材料交替地缠绕在中心棒上。所用的膜片一般是胶原蛋白；而支持材料则是一种称为凡克塞 (vexar) 的惰性聚合网状物。后者可以将相邻的两层含酶膜片分离开，以防止膜层相互重叠，堵塞流道。把上述螺旋元件装进圆筒，筒两端加盖板，并安装进出口管，这样，就制成了螺旋卷膜式反应器。



✚ 含酶的膜是半透性膜，只允许小分子的底物和产物通过膜，而大分子酶则不能通过。该反应器有许多优点，例如，螺旋模型可将流体流动的单元分隔成许多独立空间，当底物溶液流经各个独立空间，并与酶接触时，均有相同的流体力学条件和停留时间，可改善接触效果，消除短路；另外，网状支持材料可以提高每一流动间隔的混合效果，加快物质传递。

✚ （2）中空纤维膜式反应器 这类反应器是把酶结合于半透性的中空纤维上，中空纤维壁的内外结构一般是不同的。其内层是紧密光滑的半透性膜，有一定的分子截留值，可以截留大分子物质如酶，而允许小分子物质通过。其外层是多孔海绵状的支持层。将酶固定于中空纤维的支持层中，然后，将许多含酶的中空纤维集中成一束，装进圆筒内，筒两端封闭，并安装进出口管道，这样便制成了中空纤维膜式反应器。



✚ 用这种固定化酶填充的反应器可以提供较大的催化表面，其缺点是中空纤维的制造极为困难，难以保证纤维束内流体流动的均匀性，以及存在较大的物质传递阻力等。



□4.5.3.2 膜式反应器的特点

- ✦ 与一般反应器相比，酶膜反应器具有以下优点：
- ✦ （1）反应转化率不受化学平衡转化率的限制，这是酶膜反应器最为显著的特点之一。许多重要的化学反应都是平衡反应，使用传统的反应器无法突破平衡转化率的限制。而在膜反应器中，膜的选择透过性可使某些组分（如产物）的连续脱除成为可能，从而可促使化学平衡发生移动，大大提高了反应的转化率。



✚ （2）酶膜反应器可将目的产物分离出去，而酶可以重复利用，可实现连续操作，并有可能提高复杂反应的选择性。

✚ （3）膜作为酶的固定化载体可以使酶在类似生物膜的环境中高效发挥作用。



✚ （4）可实现对流传质代替自由扩散，强化了传质速率，提高了反应速率。填充床与流化床反应器中，质量传递常会因分子扩散的制约而影响反应的进程，而酶膜反应器可通过对流扩散消除这种影响，从而使传质速率加快，反应速度提高。



✚ （5）可以简化工艺流程和操作步骤，有可能使产物分离、反应物净化及化学反应等几个单元操作在一个膜反应器中进行，从而可以同时起到降低生产成本和增加产量的作用。

✚ （6）膜作为相分离器和相接触器，避免了乳化和破乳等问题，也摆脱了液泛的限制。

- ✦ 但是膜反应器在使用过程中也存在着一些问题，这些问题严重制约了膜反应器的推广应用：
- ✦ 由于膜的加工水平较低，膜孔分布与形态结构的均一性差，造成酶分子和小分子激活剂（金属离子或辅助因子等）的泄漏损失，需要在酶促反应过程中不断添加，既增加成本又造成操作过程的复杂化。



- ✚ 酶在膜表面的随机吸附引起酶空间构型的改变或活性位点的遮蔽，有些膜材料还可使酶中毒失活，从而降低或破坏酶的催化活性。
- ✚ 酶分子在酶膜反应器中容易因湍流等原因而发生剪切失活。



- ✚ 有些情形下，由于产物分子在靠近膜面的位置逐渐积聚而形成凝胶层，造成酶膜反应器中严重的产物抑制降低了生产效率。
- ✚ 浓差极化和膜污染使酶膜反应器的传质速率和生产能力急剧下降，膜孔堵塞、膜厚增加使膜的结构形态发生不利变化，膜需要频繁地清洗或更换。



□4.5.3.3 膜式反应器的应用

- ✦ 酶膜反应器把酶促反应与膜的选择性物质传递有效地结合在一起，从而创造出有利的过程热力学和动力学，在生物、医药、化工、环境等领域得到了越来越广泛的应用。目前膜反应器的应用主要有：辅酶或辅助因子的再生、有机相酶催化、手性拆分与手性合成、反胶团中的酶催化、生物大分子的水解等。



✚ 其在食品中的应用如：①透过果胶水解来降低果汁粘度；②通过将乳糖转化为可以消化的糖类来降低牛奶和乳清中乳糖的含量；③通过多酚化合物和花色素的转化来进行白酒的处理；④从牛奶产品中去除过氧化物等。

✚ 酶膜反应器与传统反应器相比，具有许多现实意义。随着膜式反应器应用中一些问题的解决，膜式反应器将会得到越来越广泛的应用。



✚ 以上各种类型的酶反应器都可供使用，但并不存在一种通用的理想反应器。在酶促反应中，反应器的选择是一个十分重要的问题。在选择反应器时，除应考虑固定化酶的形状及稳定性、底物与产物性质和载体性质外，还需考虑生产成本、操作方式及反应器应用的可塑性等因素。在生产中，必须根据具体情况，针对系统的特点，选择和使用合适的反应器。



- 1 简述固定化酶有哪些优点？
- 2 简述固定化酶制备方法有几种，并进行比较

