

固定化细胞法在 5'-三磷酸腺苷合成中的应用*

王龙耀¹ 童张法^{1*} 雷爱祖²

(广西大学化学化工学院 南宁 530004)¹ (广西壮族自治区计划发展委员会 南宁 530012)²

摘要: 从生物催化活性细胞、细胞的固定化形式、固定化细胞反应器 3 个方面对固定化细胞法合成 5'-三磷酸腺苷(ATP)的研究情况作了扼要综述。分析了我国 ATP 生产的工业化现状,并对今后的研究和开发提出了建议。

关键词: ATP, 生物合成, 固定化细胞, 生物反应器

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 00-0141-06

The Application of Immobilized Cells in ATP Biosynthesis

WANG Long-Yao¹, TONG Zhang-Fa¹, LEI Ai-Zu²

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)¹

(Guangxi Development Planning Commission, Nanning 530012)²

Abstract: The process of ATP biosynthesis with immobilized cells were reviewed from three respects: the active biological material of catalysis, the form of immobilized cells and the bioreactor of immobilized cells. The developing trend of ATP production was discussed and the suggestion to its research in future was also presented.

Key words: ATP, Biological synthesis, Immobilized cells, Bioreactor

5'-三磷酸腺苷(ATP)在临床上有着广泛的应用,是用于治疗进行性肌萎缩、脑溢血后遗症、血后遗症、心肌能不全、心肌疾患及肝炎等疾病的辅酶类药物,被称为人体内的“能量货币”,是生物体内能量交换的中心物质。早期 ATP 主要从动物的肌肉组织中提取^[1],后来曾用化学合成法^[2]和光合磷酸化法来生产^[3];20 世纪 60 年代,开始用发酵法合成 ATP,此后发展起来了以不同游离菌体酶^[3]、游离细胞^[4]为催化活性物质的 ATP 合成法;20 世纪 80 年代前后,用固定化酶/细胞法生产 ATP 的方法开始出现。

开发一个高效合理的合成方法,是获得高质量、低成本 ATP 的关键。固定化细胞法具有反应器效能高、主要原材料成本低、收率高及产品的后处理简单等显著优点,并且可以实现连续生产。因此,近年来得到较快发展,并成为 ATP 生产的主要方法。该方法的中心内容包括:适宜的生物催化活性物质;适宜的固定化形式;适宜的反应器及反应操作条件。

1 生物催化活性细胞

可用于 ATP 合成的生物催化活性物质有单一酶、偶联酶和细胞酶系。在固定化酶/细胞法合成 ATP 的研究中,单一酶法和偶联酶法使用的多为纯化后的酶,成本很高;

* 广西自治区科技攻关基金资助项目(桂科攻 No.9920015)

* 联系人 Tel: 0771-3233728, E-mail: bioche@gxu.edu.cn

收稿日期: 2003-07-21, 修回日期: 2003-10-10

特殊的能量供应途径则限制了光合磷酸化法在大规模工业生产中的应用。由于可以从细胞中方便地得到偶联的多酶系统,因此在工业化生产中多采用固定化细胞来合成 ATP。

细胞中的细胞酶系是合成 ATP 的催化活性物质。选择合适的细胞酶系,能够实现以 AMP、Ado 甚至 Ade 为起始底物的 ATP 合成。目前,使用细胞酶系的 ATP 合成途径一般有以下几种:利用酵母菌的糖酵解途径,以 Ado 或 AMP 为底物,进行基质水平磷酸化合成 ATP^[3];利用产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)发酵过程,以 Ade 为初始底物合成 ATP 法^[5];利用假丝酵母菌(*Candida boidinii*)氧化磷酸化底物 Ado(也可是 AMP 或 Ade)合成 ATP^[6]。由于对酵母菌的认识较为充分,因此目前在固定化细胞合成 ATP 中应用的主要是第一种。

为提高 ATP 的产率,徐柏年等^[7]还采用基因工程技术,将假丝酵母的腺苷酸激酶(ADK)基因引入酿酒酵母,获得了具有高 ATP 产率的重组菌株。此外,作为酶的辅助因子,加入适当的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等激动剂能提高酶活力,而加入乙醚不仅能提高细胞的酶催化活性,还能消除反应过程中的泡沫。

2 细胞的通透性

用于 ATP 合成的酵母细胞酶系等均为胞内酶系,在细胞酶系催化合成 ATP、ADP 等磷酸化合物时,大量的物质需要进行跨膜传递。磷酸化合物具有极性负电荷基团,难以通过生物的细胞膜。研究表明,在酵母细胞酶系酶促合成 ATP 的过程中,细胞中的糖酵解酶系、腺苷激酶以及腺苷酸激酶会被释放到反应混合物的上清液中,反应主要在反应液中进行。增强细胞膜的通透性能,将会加快细胞酶系的释放速度和 ATP 的合成速度^[3]。因此,为便于合成过程中物质的跨膜传递,往往要采用物理、化学等方法对细胞进行通透化处理,以有效地提高 ATP 的生产得率^[8]。

在利用酵母酶系合成 ATP 的研究中,Akiniko 等采用限制氮源手段,将细胞培养过程中用于调节 pH 和提供氮源的 28% 氨水改为 10mol/L 氢氧化钾,使得反应液中 ATP 的积累浓度由 37mg/mL 提高到了 70.6mg/mL^[10]。林清启等^[10]把好气培养的面包酵母进行厌气转型培养,促使其膜壁的通透性发生改变,提高了细胞酶系的催化效果。段学辉等利用甲苯、超声波和气流干燥等方法对啤酒酵母分别进行了通透化处理,结果表明,Ado 转化率低于 20% 的好气培养细胞经处理后,转化率提高到 30% ~ 100%。Ado 转化率高的氧限制培养细胞经通透处理后,ATP 合成反应的时间缩短 1 ~ 2h。比较后认为,效果最好的处理方法是空气干燥法,其次是超声波处理法,最后为甲苯处理法。一般包埋的活性干酵母效果好于湿酵母。

3 细胞酶系的固定化形式

随着细胞膜通透性的增强,胞内酶系会被释放到胞外。因此,在固定化过程中,存在酶活性中心或/和调节中心构象改变、载体对酶活性的立体屏蔽和微扰等作用;在使用过程中,反应系统的微环境中存在分配效应和扩散限制效应。这些对酶活性和酶反应系统所产生的影响十分复杂,常因酶的种类、反应系统的组成、固定化方法及固定化载体的不同而显著不同。

3.1 固定化载体 固定化载体利用物理或化学的手段将游离的细胞定位于限定的空间

区域,保持其活性并使其可被反复使用。作为通用载体物质,以海藻酸盐、卡拉胶、壳聚糖、明胶、琼脂等为代表的天然高分子凝胶仍有较广的应用,并不断被加以改善。以聚丙烯酰胺(PAM)和聚乙烯醇(PVA)为代表的合成高分子凝胶一般比天然高分子凝胶的强度好,但其传质性能较差,在进行包埋时会影响细胞酶系的活性,因此在使用时常要对其进行改性。近年来,PVA-海藻酸盐、卡拉胶-魔芋多糖等由天然或(和)合成高分子构成的复合物载体得到了重视和发展。其在传质、生物相容性和对水、电解质及氧的透过选择性等方面具有优良的性能,显示了良好的应用前景。

一般地说,在选择固定化载体时,要考虑到稳定性、机械强度、通透性、对酶活力的影响、安全和成本等因素,选择条件大致有载体形式、载体结构、载体的性质及装载量等。金新根等^[11]在进行啤酒酵母细胞固定化研究时,比较了藻酸内凝胶-戊二醛交联包埋法、PAM 共价偶联法、琼脂糖凝胶包埋法和明胶-戊二醛交联包埋法,认为藻酸内凝胶-戊二醛交联包埋法各项指标均优。还有报道认为在酵母细胞固定化载体中^[12-15],固定化效果综合指标优劣顺序依次为 PVA-海藻酸盐凝胶,PVA,海藻酸钙,琼脂。

但海藻酸盐在磷酸盐缓冲液中易软化,因此,其在 ATP 合成中的应用受到了限制。表 1 列出了一些载体在 ATP 合成中的应用情况。此外还有采用纤维素硫酸钠(NaCS)-聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDMAAC)微胶囊、蛋清等作为固定化载体的报道。往固定化载体中添加 CaCO₃、粉末活性炭等通气、透水性好的多孔材料或纤维材料,或添加能被分解、溶解的有机物(如天然多糖物),可以改善固定化颗粒的通透性。

表 1 固定化细胞法合成 ATP 的研究情况^[3,12,16,17]

活性细胞	固定化载体	底物	研究结果
含有乙酸激酶活性的大肠杆菌	卡拉胶包埋	Ado	与谷胱甘肽合成酶相偶联连续生产,细胞半衰期 8d
酵母细胞 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2044)	聚丙烯酰胺凝胶共价偶联	Ado	与谷胱甘肽, NADP 生产酶相偶联,转化率 60%, 半衰期 19d
冷冻干燥的啤酒酵母细胞	乙基纤维素和聚氨基葡萄糖微胶囊包埋	AMP	起始转化率 70%, 可维持在 50% 以上
啤酒酵母细胞	胶原蛋白-戊二醛交联包埋	AMP	转化率 60% ~ 70%
啤酒酵母细胞	明胶-戊二醛交联包埋	Ado	反应 10 批次, 转化率 90% 以上
啤酒酵母细胞	k-卡拉胶-魔芋多糖复配胶包埋	Ado	底物溶液灭菌和添加 NAD ⁺ 后, 可反复使用 12 次, 转化率 95% 以上
啤酒酵母细胞	藻酸内凝胶-戊二醛交联包埋	AMP	连续反应 7 批次, 转化率在 90% 左右
芽孢杆菌	明胶-戊二醛交联包埋	ADP	连续反应 7d, 转化率在 80% 以上

特别注意,对于可以透过细胞膜的酶/细胞酶系,在固定化时要选择适当的载体,使固定化细胞既具有高的通透性能,又具有低的酶/细胞酶系流失速率。在使用过程中对于流失速率较高的酶作适当地补充,会有效地提高固定化细胞整体的酶活力,延长其使用寿命。例如在使用固定化酵母细胞合成 ATP 的过程中,往反应液中补充适当的辅酶 I (NAD),可以避免细胞酶系 ATP 转化活力的迅速下降^[17]。

3.2 固定化方法 传统的细胞固定化方法有吸附法、共价偶联法、交联法、包埋法、细胞聚集法等,工业应用上以包埋法最为普遍。广义上的固定化方法还包括以固膜或

液膜等形式将细胞封闭在生物反应器中以不断反复使用的方法。一般地说, 广义上的固定化细胞的性质还是接近于游离细胞的性质, 其稳定性比传统的固定化细胞的要差。为平衡单一固定化方法使用中的优缺点, 包埋-吸附法、细胞聚集-交联法等联合固定化法得到了重视和发展。

为便于 ATP 的生产, 固定化细胞大部分被做成颗粒状。将固定化细胞液凝固为膜块, 然后进行分割; 或将固定化酶液滴入凝固液/交联液中直接成球均可得到该颗粒状固定化细胞。在固定化过程中, 一般控制温度在 35℃ 左右, 过高的温度会导致酶失活, 过低的温度则不利于固定化操作。此外, 虽然酶促反应的速度与酶浓度成正比, 但并非所有固定化的细胞都能有效地发挥作用。一般地说, 单位载体上固定化的细胞量越小、固定化颗粒越小, 发挥作用的细胞量比例也就越大。但是, 过多的细胞装载量会影响固定化颗粒的强度^[13]。因此, 针对特定的被固定化载体和反应物系, 细胞有一个适宜的装载量范围。

在制备固定化细胞过程中, 载体浓度、交联剂浓度及交联时间等因素也会对酶产生影响, 控制适当的条件可以使细胞酶系保持较高的活力。

为减少固定化过程造成的酶活力损失, 邱蔚然等^[17]还提供了一个固定化细胞的后处理方法: 制备戊二醛交联的明胶固定化酵母细胞颗粒, 将该颗粒用含 0.1% ~ 1.0% (wt) 赖氨酸的水溶液洗涤, 以封闭残留的未反应戊二醛基; 再用 0.2% ~ 2.0% (wt) 亚硫酸氢钠水溶液洗涤, 使交联过程中失活的糖酵解酶系中巯基酶的巯基还原活化, 最后用去离子水洗净。

4 固定化细胞反应器

生物反应器是实现生物技术产品工业化的最重要的技术之一。按其操作形式和方式可分为间歇型、半连续型、连续型 3 种; 按催化物的分布形式分搅拌罐、填充床、流化床、气升式悬浮床、中空纤维式、膜式及管式等固定化细胞反应器。

一般情况下, 在 ATP 的生产过程中会有 CO₂ 产生, 在选择反应器时要充分考虑这一点。例如采用填充床反应器时, 气体就会滞留于床层间, 易造成物料沟流或偏流, 使固定化细胞不能充分发挥作用; 采用全混流式反应器又易造成固定化细胞的破裂与消耗, 因此在固定化细胞法生产中常采用活塞流式膜反应器和流化床反应器。此外, 连续搅拌罐-超滤反应器 (CSTR-UFR) 等组合式反应器也得到了发展。

4.1 膜反应器 (Membrane Reactor, MR) 这类反应器有两种类型: 一种是将细胞固定在膜上, 如中空纤维反应器 (Hollow Fibre Reactor) 是使细胞附着在膜的外表面, 而让底物从中空纤维管的内腔中循环通过; 另一种是采用半透膜, 让底物和产物可自由进出膜系统, 而细胞始终留在膜系统内。MR 具有产物易行分离的优点, 但反应液必须先行预滤, 以防止其中颗粒物在系统内积累并阻塞纤维管。

段学辉等采用耦合中空纤维膜超滤分离法对啤酒酵母酶系催化合成 ATP 过程进行了实验研究, 考察了细胞的催化效率和膜组件的操作稳定性。结果表明该工艺操作稳定, 连续进行 11 批反应后, 膜过滤速度和滤液质量没有明显下降。与游离细胞法和颗粒状固定化细胞法相比, 耦合中空纤维膜超滤分离法的 ATP 的生产效率及细胞酶系的使用寿命均得到提高。

朱宏吉等^[18]还从动力学角度分析研究了动态膜分离式固定化酶反应器 (DMIR) 中

固定化酶的反应过程,给出了无外扩散限制条件下的 DMIR 反应器的数学模型,并验证了实验方法的可靠性。

4.2 流化床反应器 (Fluidized Bed Reactor, FBR) FBR 中相混合均匀,没有阻塞与沟流现象,可用于需排气或供气的反应,并且可采用小直径的胶粒以提高传质效率,所以 FBR 是固定化细胞法 ATP 生产中最常用的一种生物反应器。

李清彪等^[19]研究了葡萄糖和乙醇对于悬浮静止酵母细胞反应动力学的影响,测定了聚丙烯酰胺包埋酵母的固定化细胞中葡萄糖和乙醇的有效扩散系数,考察了具有不同细胞包埋量和不同厚度的固定化细胞的反应特性,为模拟固定化细胞的扩散-反应特性提供了一个方便的方法。

徐茜等^[20]则在液流循环式固定化细胞流化床反应器中,考察了 Ado 到 ATP 转化过程中葡萄糖浓度、pH、溶氧 3 者与反应转化率的关系。结果表明,随着转化率的升高,葡萄糖及溶氧呈下降趋势,而 pH 则呈先下降后上升的趋势。

曲乃兵等^[21]则建立了一个固定化酵母细胞循环流化床生物反应器的表观动力学模型。该模型关联了底物发酵速率、底物初始循环速率及固定化胶体装量分数之间的关系,为分析固定化细胞循环流化床发酵过程的控制因素、强化发酵过程提供了理论依据和较为可靠的经验参数。

此外, FBR 还可以通过多种途径加以改进,如在胶珠中加入砂粒或不锈钢粒等惰性物质,提高固、液相密度差,从而提高传质效率;或在提高流速的同时提高 L/D 值,以得到较高的转化率等。

5 工业化现状与研究展望

我国 20 世纪 60 年代初开始用菠菜叶光合磷酸化等方法生产 ATP,由于采用腺苷酸作为初始底物,成本一直在 2,000 元/kg 以上。后采用游离酵母发酵工艺,以 Ado 为底物,年产 10t ATP 需 40m³ 反应罐和 500t 酵母,其成本在 1500 元左右。目前国内个别厂家采用的固定化酵母法生产 ATP,年产 10t ATP 所需反应器体积仅为 300L,酵母用量也仅为 50t,含量达到 95%,比部标高出 5 个百分点,其生产成本和质量较以往已经有了大幅提高。

固定化细胞法合成 ATP 技术,不仅可以用于 ATP 的生产,还可与其它酶系相偶联,用于一些需要 ATP 参与的生物合成反应,如谷胱甘肽 (GSH)、甘氨酸 (Glycine)、单磷酸鸟苷 (GMP)、胞二磷胆碱 (CDP)、肌苷一磷酸 (IMP)、辅酶 II (NADP) 等的合成反应^[22]。因此加强固定化细胞法合成 ATP 的研究,对于拓宽酶的利用范畴也同样具有重要的意义。

作者曾分别采用酒精酵母酶系和啤酒酵母酶系系统研究了 ATP 的合成,筛选、优化了 ATP 的合成条件,并总结了 ATP 的分析方法^[23]。随着研究及工业化应用的深入,固定化细胞法合成 ATP 仍存在一些问题,如:固定化细胞的质量不稳定;固定化成本高,可操作性差;反应机理研究少,缺乏对工业生产具有指导性的认识等。因此,就固定化细胞法合成 ATP 的现状,应着力加强以下几个方面的研究,以提高产品质量,降低产品的生产成本。(1) 选择、培育合适的 ATP 合成细胞酶系,增强细胞酶系的催化活力和稳定性。对固定化细胞采取合适的通透化处理,提高细胞膜的通透性,提高固定化细胞的催化活力和效率。(2) 开发价廉、安全无毒、性能稳定、对酶活力影

响小、通透性好、具有一定机械强度的固定化载体和简便适当的固定化方法。(3) 深入研究 ATP 生产的反应机理, 优化固定化细胞反应及其控制条件, 提高工业生产效率。

参 考 文 献

- [1] 世界精细化工网. 兔肌提取法制备 ATP 二钠盐. www.worldfinechemical.com/jskf-8.htm, 2003-4-2.
- [2] Fukuzuka K, Suda F, Ishikawa M, et al. Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 693 ~ 694.
- [3] Atsushi K, Toshikazu S, Yumi K, et al. J Biosci Bioeng, 2001, 91 (6): 557 ~ 563.
- [4] Tatsuro F, Akiniko M, Kiyoshi S, et al. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1992, 66 (10): 1457 ~ 1465.
- [5] Fujio T, Furuya A. J Ferment Technol, 1983, 61 (3): 261 ~ 267.
- [6] Yoshik T, Tetsu Y, Yasuyoshi S. Proc Jpn Acad, 1994, 70 (5): 53 ~ 57.
- [7] 徐柏年, 张添元, 罗进贤, 等. 中山大学学报 (自然科学版), 2000, 39 (5): 1 ~ 4.
- [8] O, Connor-Cox E S C, Lodolo E J, Axcell B C. J Am Soc Brew Chem, 1993, 51 (3): 97 ~ 107.
- [9] Akiniko M, Tatsuro F. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65 (3): 644 ~ 650.
- [10] 林清启. 工业微生物, 1985, 15 (6): 1 ~ 4.
- [11] 金新猷, 王丽影, 姜云龙. 中国医药工业杂志, 1990, 21 (7): 292 ~ 295.
- [12] 陈世忠, 姜 权, 武文华. 酿酒科技, 2001, 4: 51 ~ 53.
- [13] 郑婉玲, 邹云珍, 臧向莹. 工业微生物, 1998, 28 (3): 15 ~ 23.
- [14] 谭 锋, 易欣欣. 北京农学院学报, 1996, 11 (2): 45 ~ 50.
- [15] 陈九武, 赵学慧, 吴思方. 工业微生物, 1997, 27 (3): 27 ~ 31.
- [16] 张惠勇, 梅乐和, 姚善泾. 生物工程学报, 1999, 15 (3): 297 ~ 300.
- [17] 邱蔚然, 徐 茜, 王永法. 发明专利申请公开说明书, 1993, 92113813.x.
- [18] 朱宏吉, 王晓静. 化学反应工程与工艺, 2001, 17 (2): 138 ~ 142.
- [19] 李清彪, 陈洪钊. 化学反应工程与工艺, 1994, 10 (1): 82 ~ 89.
- [20] 徐 茜, 邱蔚然, 俞俊棠. 药物生物技术, 1996, 3 (4): 235 ~ 238.
- [21] 曲乃兵, 朱振常, 张苓花, 等. 大连轻工业学院学报, 1994, 13 (2): 9 ~ 14.
- [22] Tatsuro F, Akiniko M, Hideo M. Baiosaiensu to Indasutori, 2001, 59 (2): 83 ~ 88.
- [23] 王龙耀, 范利华, 肖安凤, 等. 天津化工, 2003, 17 (2): 36 ~ 33.