

## 第六章 酶工程制药

### 6.2 酶和细胞的固定化技术

#### 一、课程目标

掌握药用酶的生产方式以及酶的各种固定化方法及固定化酶的性质。

#### 二、课程组织

导入：同学们大家好！现在我们开始学习第二节，我们来共同学习下酶和细胞的固定化技术，首先我们要了解为什么要固定化。

我们知道，酶促反应几乎都是在溶液中进行的，其中就存在一些缺点，比如说，溶液中的游离酶只能一次性地使用，不仅造成酶的浪费，而且会增加产品分离的难度和费用；还会影响产品的质量；另外溶液酶很不稳定，特别容易变性和失活。如果能将酶制剂制成既能保持其原有的催化活性、性能稳定又不溶于水的固形物，这肯定会大大提高酶的利用率。因此，固定化酶以及固定化细胞是酶工程里面非常重要的一部分内容。

##### 知识点 1 讲解：固定化酶

固定化酶，我们先来看一下定义，是指限制或固定于特定空间位置的酶，是经物理或化学方法处理，使酶变成不易随水流失即运动受到限制，而又能发挥催化作用的酶制剂。而制备固定化酶的过程就称为酶的固定化。

即具有生物催化剂的功能，又有固相催化剂的功能，这就是固定化酶，它的特点主要有以下几点：

一、可多次使用。二、反应后，酶、底物、产物易分开，产物中无残留酶，易纯化，产品质量高。三、反应条件易控制，可实现转化反应的连续化和自动化控制。四、酶的利用效率高。、比水溶性酶更适合于多酶反应。

既然固定化酶有这么多优点，那怎么来制备固定化酶呢，接下来，我们来具体学习一下固定化的方法。酶和细胞固定化方法包括几大类固定方法。

**第一大类是载体结合法。**结合法里面最简单的是物理吸附法，物理吸附法是用物理方法将酶吸附到不溶性载体上的一种固定化方法，在这里，不溶性载体种类是非常多的，主要包括一些无机载体：活性炭、多孔玻璃；还有天然高分子载体：大孔树脂和陶瓷。在这里，我们发现无论是无机载体还是天然高分子载体，它们都具有相似的特征，比如说最简单的活性炭，大家都很熟悉，它是多孔的，表面积非常大，可以吸附很多微小颗粒。每一种方法都有它的优缺点，物理吸附法的优点非常明确，就是操作简单，可选用不同电荷和不同形状的载体，酶失活后载体还可以再生。但它的缺点也很明显，最适吸附酶量没有规律可循，结合力较弱，酶容易从载体上脱落下来。所以说，这种方法虽然很简单，但是应用的不是特别多。在载体结合法里面还包括离子结合法，离子结合法，简而言之，就是靠离子力来结合，相比刚刚活性炭吸附来说，结合力要强很多，所以说它的优点也是，相对来说操作比较简单，条件温和，毕竟离子键还是比较温和的，酶的高级结构一般不容易被破坏，所以能得到较高的回收率。但是它的缺点跟它的优点也是相辅相成的，相对载体和酶的结合力较弱，它容易受到这种溶液的影响，包括溶液种类和 pH 值的影响，在离子强度高的条件下进行反应时，有的时候酶会从载体上脱落下来。

下面在载体结合法里面的第三种，**共价结合法**，共价结合法是将酶以共价键的形式与载体结合的固定化方法，也就是将酶分子上的非活性部位的功能基团与载体表面活泼基团之间

发生化学反应而形成共价键的连接方法，它是研究最广泛，内容最丰富的固定化方法，归纳起来，主要有两类，一是将载体有关的基团活化，然后与酶相关基因发生偶联反应，另一种就是在载体上接上一个双功能试剂，然后将酶偶联上去。这里我们要注意的，必须要将载体活化，使活化载体与酶分子某一特定基因发生反应，而且反应条件要尽可能温和。共价结合法的优点是结合是非常牢固，稳定性好，而它的缺点是操作复杂，反应条件苛刻，容易使酶失活。

下面我们来学习**第二大方法：交联法**。交联法定义我们来看一下：应用双功能或多功能试剂使酶—酶；微生物的细胞—细胞之间交联固定。这个是交联法的定义。

在交联法中最常用的试剂是戊二醛，也就是说使用这些功能试剂使酶分子内或酶分子间彼此连接成网络结构而形成固定化酶的技术。这里面还包括酶—辅助蛋白交联法、吸附交联法、载体交联法，等等，简单来说，这个是通过这种辅助蛋白也好，通过交联试剂也好，形成像一个立体的网一样的结构，这个过程我们就统称为交联法。

**第三种方法，包埋法**，包埋法主要分为两大类，包括网格型和微囊型。我们先来看一下包埋法的特点，条件温和、不改变酶结构，但是只适合作用于小分子底物和产物的酶，对于那些作用于大分子底物和产物的酶是不适合的，大家想一下，包埋是埋在里面，只有小分子才能通过，分子量太大时候是通不过去的。网格型的载体材料主要有聚丙烯酰胺、聚乙醇、光敏树脂、淀粉、明胶、海藻胶、卡拉胶、琼脂等，而且网格包埋法是固定化细胞中用的最多、最有效的方法。微囊型，由包埋法制得的微囊型固定化酶通常为直径几微米到几百微米的球状体，它的表面积会非常大，所以包埋的酶量也比较多，颗粒比网格要小得多，比较有利于底物与产物扩散，但是反应条件要求高，制备成本也高。

最后一种方法比较简单，**选择性热变性法**，这个方法专门用于细胞固定化，主要指的是使用适当的温度处理，使细胞的膜蛋白变性但不使酶变性，从而使酶固定于细胞内。以上就是酶和细胞固定化的主要方法我们总结了固定化细胞的很多优点，但同时，它的缺点也很明显，只能利用胞内酶，酶一副产物就多，可能会产生一些不期望的物质，这个大家要注意。还有就是，细胞膜、细胞壁和载体都存在，它们会在空间上制约整个反应，扩散等等。而且，载体形成的这个空隙的大小也影响着高分子底物的通透性。

我们了解了固定化细胞的优缺点，现在看一下固定化细胞的制备技术，这里跟前面讲到的固定化酶的制备技术非常接近。包括载体结合法，包埋法，交联法，我们前面都已经讲到，在这就不做具体讲解了，下面我们来看一下无载体法，这个是固定化酶方法中没有的。无载体法指的是靠细胞自身的絮凝作用制备固定化细胞的技术，就是说细胞不需要什么载体，它自己在一定条件下就可以发生絮凝，从而就可以实现细胞的固定化，这个方法是非常简单，非常适合细胞的固定的。

## 知识点 2 讲解:固定化方法与载体的选择依据

接下来，我们来学习一下固定化方法与载体的选择依据。前面我们已经讲到，固定化酶对产品纯度和收率的提高是非常有利的，应尽可能采取操作简单，活力回收高及载体和试剂价格低廉的固定化方法。同时它还应该具备几点：安全性，固定化酶应用的安全性：试剂本身不能有毒的，尤其在医疗食品中应用时，必须要保证安全性。还有就是固定化酶在操作中的稳定性，还要考虑固定化的成本，如果太昂贵的话就失去了意义。这是从方法来看，固定化的选择。

下面我们来看一下载体的选择。跟我们在实验室是完全不一样的，在工业化中这个成本是非常重要的，在这里我们强调一下，酶工程主要是面向工业化的，在工业上控制成本是个非常重要的一点。此外还要注意的就是，当底物为大分子时，包埋型的载体不能用于转化反应，只能用可溶性的固定化酶，若是底物不完全溶解或黏度大，要采用不锈钢这种比较结实点的材料来制备吸附型的固定化酶，以便实现转化反应和回收固定化酶。

固定化酶和固定化细胞的形状和性质,形状主要根据反应器类型和应用目的的不同来选择的,它的形状一般分为四种:颗粒、纤维、膜状、管状,这四种是最多的。

整个固定化酶的性质,一般来说,固定化酶的活力变化情况是下降的。而酶的稳定性反而有所提高,不管是操作稳定性、贮藏稳定性,对热,以及对蛋白酶的稳定性,都有所提高。同时酶学性质也有一定的变化,比如说底物专一性,最适 pH,最适温度,米氏常数,最大反应速度等等,都会受到一定的影响。细胞也一样,也会受到前面提到的温度、pH 值等等变化的影响,此外,细胞膜的通透性影响酶转化效率。

**知识总结** 以上就是这节课的全部内容,这节课我们主要学习了固定化酶和固定化细胞的制备方法,同时我们还要了解固定化酶的优点和载体所需要具备的条件,掌握固定化酶的性质。好,同学们,这节课我们就先学习到这里,谢谢大家,我们下节课见。