

综述

细胞固定化催化生产精细化学品的研究进展

刘袖洞, 吴春凯, 裴 婕

(大连大学 环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622)

摘要: 细胞固定化技术具有流程简单、生物相容、操作稳定等优点, 可有效保证细胞活性, 发挥细胞的催化性能; 易实现胞内多种酶的共表达及催化, 且底物选择特异性强, 有利于高效的细胞催化生产精细化学品。该文简述了国内外细胞固定化催化生产的工业化程度及主要精细化学品的产业化情况, 介绍了表面附着、凝胶包埋、聚电解质层层自组装膜、共价键合细胞固定化方法, 及其在二元醇、生物乙醇、乳酸、丙酮、多糖等精细化学品生产中的研究现状和进展, 并分析讨论了各种方法存在的问题。最后对细胞固定化催化生产精细化学品面临的技术挑战及研究方向进行了展望。

关键词: 细胞固定化催化; 表面附着; 凝胶包埋; 聚电解质层层自组装膜; 共价键合

中图分类号: TQ072; TQ426.97 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 04-0657-09

Research progress of cell immobilization catalysis in fine chemicals production

LIU Xiudong, WU Chunkai, PEI Jie

(College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China)

Abstract: Cell immobilization technology has the advantages of simple process, biocompatibility, stable operation, and can effectively ensure cell activity and exert the catalytic performance of cells. Moreover, it is easy to realize the co-expression and catalysis of many enzymes in the cell, and the substrate selection specificity is strong, which is conducive to the efficient cell catalytic production of fine chemicals. The industrialization degree of cell immobilization catalysis at home and abroad and the industrialization status of some fine chemicals are briefly introduced. Then, the research status and progress of some cell immobilization methods such as surface attachment, gelation entrapment, polyelectrolyte layer-by-layer (LbL) self-assembled membranes and covalent bonding in the field of fine chemicals, especially, dihydric alcohols, bioethanol, lactic acid, acetone, polysaccharide production are mainly presented. Subsequently, the existing problems of various methods are analyzed and discussed. Finally, the technical challenge and research direction of the production of fine chemicals by cell immobilization catalysis are prospected.

Key words: cell immobilization catalysis; surface attachment; gelation entrapment; polyelectrolyte layer-by-layer self-assembled membranes; covalent bonding

精细化学品在食品、化妆品、染料、生物燃料等领域中具有举足轻重的地位^[1]。传统的精细化学品工业生产方式可分为两种: (1) 自然界中直接获取, 如从玫瑰中提取 2-苯乙醇^[1], 但产率太低, 成本高昂; (2) 通过化学方式生产, 产量高、反应快速, 但副产物的产生、环境不友好的反应工艺、有毒试剂的使用限制了产物纯度及工艺安全性^[2]。

目前, 全球涉及化学催化工艺生产的化学产品

占 90%, 带来严重的污染问题, 生物催化技术正逐步发展成为其重要的替代生产方式。生物催化包括底物和产物、反应介质、生物催化剂 3 个要素, 其中, 生物催化剂是实现自然界以及工业生产中所有生物转化的关键^[4]。生物催化分为酶催化和细胞催化。酶催化是指利用酶作为生物催化剂进行生物转化的过程; 细胞催化则定义为将完整生物有机体(即微生物、动植物细胞, 甚至组织及个体) 作为生物

收稿日期: 2021-09-14; 定用日期: 2021-11-18; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210930

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校基本科研项目 (LJKZ1183); 辽宁省“百千万人才工程”资助项目 (辽百千万立项【2017】6号)

作者简介: 刘袖洞 (1972—), 男, 教授, E-mail: liuxiudong@dlu.edu.cn.

催化剂完成生物转化的过程。相比酶催化法，细胞催化更易实现精细化学品生产中多种酶之间的级联反应，且省去分离纯化酶的复杂流程^[5]，因此受到研究者的青睐。

目前，提高细胞催化能力主要有两种方式：(1) 通过在自然界筛选或基因工程改造的方式来选育具有高效催化性能的细胞^[6-7]，但在实际生产中直接使用细胞进行催化存在细胞回收率低、生存期短、可重用性差、操作稳定性差的缺点^[8]；(2) 通过细胞固定化方法保证细胞活性来提高细胞催化性能，具有可循环使用、简化下游处理等优点^[9]。

细胞固定化方法广泛应用于环境、化妆品、医药、食品等领域（见图 1）。例如：NIE 等^[10]将铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa* NY3）固定在聚氨酯泡沫（PUF）上用于处理油田产出水中的油和悬浮固体，中试实验去除率分别在 80%和 76%以上；HUA 等^[11]将氧化葡萄糖杆菌（*Gluconobacter oxydans* NL71）通过聚乙烯醇（PVA）微球固定，用于生产在化妆品领域应用广泛的羟基乙酸（GA），小试产率达到 1.32 g/(L·h)；QIU 等^[12]将大肠杆菌（*E. coli* BL21）固定在活性炭上，用于生产降胆固醇药物 6-氰基-(3R,5R)-二羟基己酸叔丁酯，实验室小试获得 0.33 g/(L·h)的产率；TRAKARNPAIBOON 等^[13]采用 PUF 固定水稻根霉菌（*Rhizopus oryzae* DMKU 12）小试生产食品行业中应用广泛的乳酸，产率可达 1.16 g/(L·h)。

同样，由于工艺绿色、选择性强、成本低等优势，细胞固定化催化技术在精细化学品生产领域的应用也得到极大发展^[14]。国外对细胞固定化催化生产精细化学品的研究较早^[15]。欧洲、美国和日本相继实现维生素、烟酰胺、氨基酸衍生物、醇等精细化学品的细胞固定化催化工业生产^[16]。例如：瑞士龙沙（广州）公司利用固定化紫红红球菌年产 6000 t 烟酰胺；荷兰帝斯曼公司利用固定化大肠杆菌、鲁维酵母菌等年产 2000 t β-内酰胺抗生素；美国杜邦公司利用固定化重组大肠杆菌实现了 4-氰基戊酸、5-氰基戊酰胺的产业化；日本日东化学工业公司利用固定化红球菌年产 3 万 t 丙烯酰胺及其衍生物。相比国外，国内已经实现了氨基酸、乙醇、丁醇、烟酰胺、L-酒石酸、丙烯酰胺、D-泛酸等精细化学品的生物制造产业化，如中粮集团年产 500 t 生物乙醇，但多为酶催化过程^[17-18]。细胞固定化催化产业起步较晚，工业化规模、生产技术、市场占比等方面与国外存在较大差距^[16]；已经开展了细胞固定化生产氨基酸、L-酒石酸等产品的中试研究，霉菌交联固定化生产 D-泛酸钙年产能能力 5000 t^[19]，但在细

胞定向固定化^[20]、多种催化方式联合催化^[21]、生物催化剂多相催化^[22]及反应装置的开发^[23]方面需要进一步加快研发进程，以解决限制其工业应用的固定化方法研发成本高、固定化细胞稳定性差、配套设施落后等问题。

本文在对表面附着、凝胶包埋、聚电解质层层自组装膜、共价键合固定化方法的机理、优势、研究进展及存在的问题进行分析总结的基础上，讨论了细胞固定化方法在精细化学品生产领域面临的挑战及发展方向，以期促进细胞催化技术的不断完善及细胞固定化催化生产精细化学品的产业化进程。

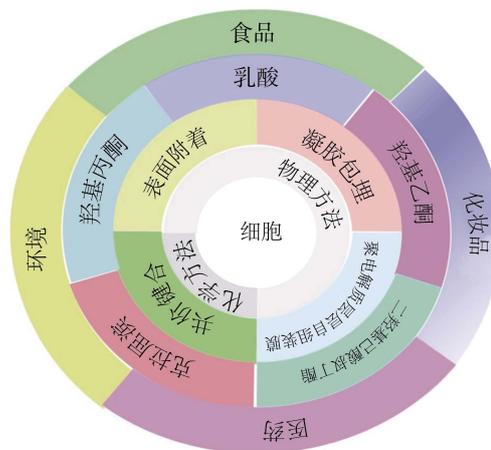


Fig. 1 Production of fine chemicals by cell immobilization catalysis

1 表面附着

表面附着是一种基于微生物细胞集群效应的细胞固定方法，一般遵循以下步骤：(1) 利用细胞和载体之间相互作用力（如静电作用力、表面张力、黏附力等）使游离细胞接触并附着在载体表面；(2) 附着在载体表面的细胞生长增殖，形成密集菌群，完成表面附着^[24]（图 2）。

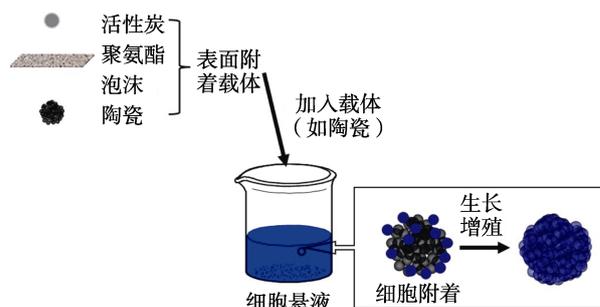


图 2 表面附着固定化细胞示意图

Fig. 2 Schematic diagram of surface attachment of cells on supports

表面附着固定化细胞的活性及催化效果与载体的孔隙率、比表面积、吸附能力息息相关^[25]。活性炭^[26]、陶瓷^[27]、聚氨酯泡沫^[28]等多孔材料均可固定化细胞用于催化生产精细化学品。1,3-丙二醇(1,3-PDO)是一种重要的精细化工单体^[29],目前主要通过化学法生产。杜邦公司开发出以甘油或葡萄糖为底物的微生物催化生产方法用于工业生产1,3-PDO;国内天冠集团已经完成500 t/a规模的微生物催化工业试验,完全有能力生产高纯度1,3-PDO,但均利用的游离细胞催化工艺。ZHANG等^[26]在5 L发酵罐中加入3 L发酵液、0.3 L体积分数10%酪酸梭菌(*Clostridium butyricum*)悬液,以及300 g活性炭对*Clostridium butyricum*进行固定化,与游离细胞相比,固定化细胞在4个重复批次后1,3-PDO产率仍可达2.12 g/(L·h),实现了连续稳定生产,达到小试水平。另外,因细胞表面广泛的负电性质,某些载体内部存在的多种阳离子亦可通过增加吸附能力、作为细胞代谢过程元素的方式提高细胞固定化效果及细胞内关键酶的催化能力。LIU等^[30]以 $V(\text{载体}):V(\text{菌液})=1:9$ 的比例将活性炭和砖固定化后的丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)分别接种到装有40 mL培养液的50 mL锥形瓶中,对比两种固定化细胞的丁醇产率发现,砖载体的丁醇产率[0.15 g/(L·h)]比活性炭载体[0.087 g/(L·h)]高0.063 g/(L·h),分析认为是砖载体中 Fe_2O_3 溶解释放 Fe^{3+} 参与合成铁氧还原蛋白,使胞内酶的活性提高,从而导致砖载体固定化细胞的丁醇产率比较高;该研究还实现了氢气和丁醇的联合生产,促进了单一细胞催化生产多产品的研究。精细化学品生产中,水力停留时间(缩写为HRT,即固定化细胞与底液接触的时间)同样是影响生产效率的重要因素,较短的HRT有利于保持细胞活性,从而在重复批次催化生产中获得较高产率。GUNGORMUSLER等^[27]将多孔惰性载体陶瓷及体积分数1%的克雷白氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)培养液加入到容积280 mL的填充床柱生物反应器中,以表面附着固定化细胞催化生产1,3-PDO,相比悬浮细胞培养体系,在较短的HRT下,陶瓷固定化细胞将1,3-PDO的产率提高两倍,达4.9 g/(L·h),而且陶瓷的引入使*Klebsiella pneumoniae*在极端条件下(高有机负荷率、细胞体积的生产阻力)的催化稳定性和生产连续性进一步增强。VERAS等^[28]用PUF对细胞固定化,证实PUF提高了细胞密度,将1,3-PDO的产率提高到0.22~0.23 g/(L·h)。

表面附着固定化应用于精细化学品生产,不仅在细胞培养、HRT等方面缩短了生产周期,而且固定化细胞多批次重复使用使生产成本显著降低。但

表面附着固定化在研究中依旧存在产物抑制问题,如在LIU等^[30]的研究中,丁醇在活性炭孔隙中滞留是导致活性炭固定细胞丁醇产率低于砖载体的另一原因。因此,开发与细胞固定化催化精细化学品生产相适应的产物分离技术尤为必要。

2 凝胶包埋

凝胶微球、微胶囊是目前工业应用最广泛的细胞固定化载体之一^[31],其原理是通过包埋将微生物细胞嵌入非水溶性聚合物凝胶网络的孔隙中或聚合物微胶囊内,同时允许细胞需要的营养物质和反应底物进入、细胞代谢废物和反应产物排出^[32]。以海藻酸钠(SA)、壳聚糖(CS)为例,图3展示了两种载体(微球、微胶囊)的制备过程,两者以是否外覆聚电解质络合膜区分。

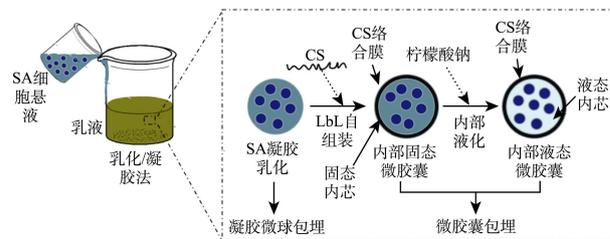


图3 凝胶包埋固定化细胞示意图

Fig. 3 Schematic diagram of gelation entrapment for cell immobilization

凝胶微球包埋要求载体既有一定的机械强度和稳定性,又具备良好的生物相容性及抗微生物分解的能力,目前以SA凝胶微球固定化方法最为成熟,已获得较高的精细化学品产率,促进精细化学品的工业规模生产。MILOŠ等^[33]将PVA和SA等质量混合后与鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469)混合成细菌悬液,使用静电挤出装置将细菌悬液以70 mL/h流速挤压到 CaCl_2 溶液内形成内嵌*Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469的凝胶微球,将微球转移到葵花籽油中在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下冷冻12 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 缓慢解冻,清洗后用于在食品、制药、化妆品和化工行业广泛应用的乳酸生产,微球良好的机械和操作性能保证了细胞活性,乳酸产率达到0.8 g/(L·h)。相对于游离细胞催化工业生产(目前90%的乳酸通过游离细胞催化进行工业生产^[34],如美国Nature Works LLC、国内江南大学、安徽丰原集团有限公司、河南金丹乳酸科技股份有限公司等),该研究良好的细胞活性及催化剂稳定性为固定化细胞催化工业生产乳酸提供了可行思路。

相比游离细胞催化,凝胶微球固定化细胞催化在精细化学品上游生产及下游处理中均具有优势^[35-36]。在上游生产中,通过调节装载的凝胶比例控制凝胶

微球的机械强度,可避免微球在上游生产中因细胞生长及环境中物理压力(如搅拌)的影响发生裂解导致产物产率下降。如 WANG 等^[35]将 SA 和 PVA 共混后与 1.0×10^9 CFU/mL 的五糖乳酸菌 (*Lactobacillus pentasaccharide* ATCC8041) 悬液混合,使用挤压装置将其注入 CaCl_2 和硼酸的混合溶液中,4 °C 静置 12 h 后得到微球固定化后的 *Lactobacillus pentasaccharide* ATCC8041,研究表明,凝胶微球显示出良好的强度和耐热性能,相比游离细胞,凝胶微球固定化细胞乳酸产量高出 11.3%,生产时间减少 33.3%,生产能力提高 70.7%。在下游处理中,凝胶微球在反应液中耐洗脱的特性有利于固定化细胞与底液的快速分离,降低精细化学品下游分离成本。MARINA 等^[36]比较了具有悬浮细胞的搅拌罐生物反应器和具有凝胶微球固定化细胞的流化床生物反应器的连续生产能力,结果证实,虽然两系统最大生产能力相似,但凝胶微球固定化细胞在高稀释率下更耐洗脱,容易与反应液分离,大大降低分离成本。

凝胶微球包埋存在一定的缺点,以应用广泛的海藻酸钙凝胶微球为例,其在钙离子螯合剂(如柠檬酸盐)的存在下容易发生凝胶-溶胶转变而崩解^[37],通过聚电解质的进一步包覆使凝胶微球变为内部固态的微胶囊,进而改变载体的通透性、亲疏水性、强度,可在一定程度上缓解崩解压力,提高对内部细胞的保护能力^[38]。然而,实心的微胶囊营养物质及代谢废物扩散性差、细胞存活率低的缺点无法更好解决,因此,更能保证内部细胞活性的内部液态微胶囊被开发出来^[39]。

相比于凝胶微球,微胶囊多是由两种及以上的聚电解质材料通过层层自组装、静电作用等来制备。相比于内部固态微胶囊,内部液态微胶囊的液芯化结构降低了营养物质及代谢废物的扩散阻力,有利于细胞活性的提高。李会静^[40]通过对比一定时间内游离酵母菌(Yeast)、凝胶微球和内部液态微胶囊固定化 Yeast 的菌浓生长曲线,证实内部液态微胶囊具有更佳的细胞保护能力。同样地,YANG 等^[41]将分散在 SA 中的胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* AB-1) 溶液挤压入 CaCl_2 溶液中形成 SA 凝胶微球,然后以 $V(\text{微球}):V(\text{CS})=1:10$ 的比例将微球转移入 CS 溶液中振荡 20 min 得到内部固态的微胶囊,清洗后加入 0.055 mol/L 柠檬酸钠溶液,振荡 5 min,获得内含 *Lactobacillus plantarum* AB-1 的内部液态微胶囊,相比于游离细胞,微胶囊内细胞活性始终保持较高水平,3-苯基乳酸产量提高 19.96%。GAO 等^[42]发现,微胶囊中微生物细胞之间的群体感

应和对苛刻环境的抗逆现象是提高微胶囊内细胞成活率和催化生产效率的有效途径,有助于调控微胶囊固定化细胞在苛刻环境中的状态以实现高效催化生产。在此基础上,HOU 等^[43]在培养基-有机溶剂两相体系中对海藻酸钙凝胶微球及内部液态 SA-CS 微胶囊对酵母菌的保护性能,结果表明,在相同的体系及底物浓度下,相比游离酵母细胞,两种载体均能提高细胞活性,但内部液态微胶囊具有更高的保护效能,得到较高产量(4.5 g/L)的细胞代谢产物芳香醇,分析认为,内部液态的微胶囊结构不仅使物质扩散性能增强,而且有利于细胞之间的信息传递,满足细胞群体感应的需要,从而有利于保持固定化细胞活性,提高细胞催化功能。

3 聚电解质层层自组装膜

聚电解质层层自组装膜(LbL-PEMs)是一种能够在分子水平上调节膜结构(包括孔径、渗透性、选择性)和物化特性(亲疏水性、表面电荷、表面基团等)的多层膜^[44]。20 世纪 90 年代首现开创性研究以来^[45],LbL-PEMs 就因加工技术灵活、电荷和纳米结构可协同控制等优点在精细化学品生产领域得到广泛应用^[46]。而且孔径、亲疏水性、渗透性可调的优点使其在降低精细化学品催化生产中产物抑制作用方面发挥着重要作用^[47]。

聚电解质层层自组装是具有相反电荷的聚电解质以弱相互作用力(如静电相互作用、氢键键合、疏水相互作用、共价键相互作用)为驱动,在纳米尺度上形成有组织结构的过程^[48](图 4)。

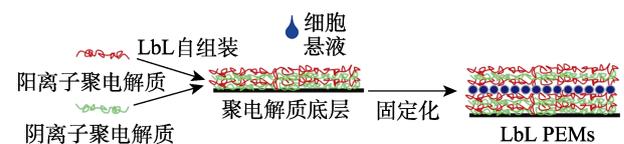


图 4 聚电解质层层自组装膜固定化细胞示意图

Fig. 4 Schematic diagram of cell immobilization with polyelectrolyte layer-by-layer self-assembled membranes

目前,聚电解质层层自组装膜主要通过两种方式提高精细化学品产率:(1)通过自组装技术开发用于下游分离纯化的渗透汽化膜^[49],如在 ETSCHMANN 等^[50]研究中,聚辛基甲基硅氧烷膜的引入不仅实现了 2-苯乙醇及 2-苯乙基乙酸酯的有效分离,而且通过控制温度即可控制反应的选择性;(2)将无机或有机催化剂、酶、细胞固定在 LbL-PEMs 内以提高重复催化效率^[47]。浸没相转化法、旋转辅助法、喷涂辅助法是目前该领域比较成熟的 3 种自组装方法(图 5),3 种方法均可保证 LbL-PEMs 具有一定的

孔隙率, 从而促进产物与催化剂的快速分离, 降低产物抑制, 但相比浸没相转化法, 喷涂辅助和旋转辅助 LbL 自组装形成 LbL 自组装膜的流程更简单, 膜孔隙更均匀^[51]。

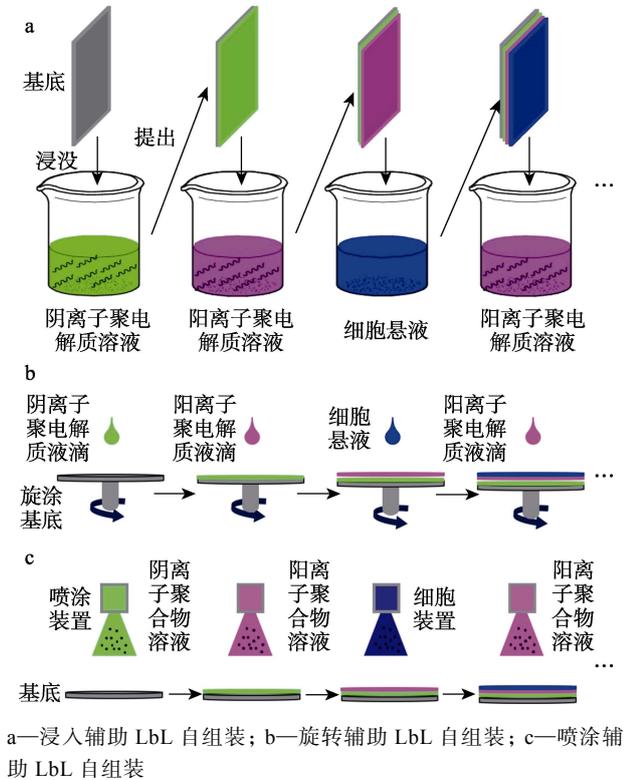


图5 自组装膜固定化细胞技术示意图

Fig. 5 Schematic diagram of cell immobilization with self-assembled membranes

近年来, 中空纤维膜 (HFM) 因其比表面积大、孔隙率高的优点而被用于细胞固定化。高豪等^[52]指出, HFM 用于细胞固定化催化精细化学品生产更稳定、制备方式更灵活, 微米/纳米尺度的 HFM 更因为高负载率、高转化率的特点促使研究者对其特性进行深入研究。CHEN 等^[53]将聚乳酸 (PLLA) 和聚乙二醇 (PEG) 以 $V(\text{PLLA}) : V(\text{PEG}) = 3 : 7$ 的比例混合, 利用自制的同轴静电纺丝自旋仪开发出一种高孔隙率微管阵列膜 (MTAM, 布满单层空心管的单一膜片), 干燥后与嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 培养液混合即可完成 *Lactobacillus acidophilus* 的固定化用于乳酸生产, 其结构 (图 6) 与 HFM 相似, 但直径 ($40 \mu\text{m}$) 比 HFM 小 1~2 个数量级, 管壁厚度薄 2 个数量级, 管壁孔径仅 30 nm。研究者不仅利用材料的性质对 MTAM 的性能进行优化, 而且从细胞密封率和操作稳定性等方面对 MTAM 进行了评价, 结果表明, MTAM 高孔隙率提高了细胞包封效果, 相比游离细胞, MTAM 催化生产乳酸性能更稳定, 耗糖量提高 4.85%, 乳酸产率达到 $0.58 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。

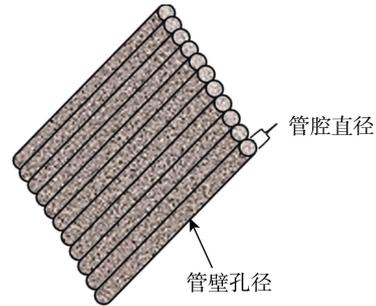


图6 微管阵列膜示意图

Fig. 6 Schematic diagram of microtube array membrane

利用生物材料将大量细胞包埋在一定空间内的多细胞固定方法, 物质在多孔载体内传递效果存在差异, 使得底物自外而内、产物自内而外存在浓度梯度, 即载体中内部细胞得不到足够底物和营养, 会导致生物资源的浪费, 同时, 细胞代谢产物不能及时外排, 会对细胞活性产生抑制, 降低生产效率^[54]。

单细胞纳米涂层固定化原理与聚电解质层层自组装膜类似, 但在纳米尺度对细胞进行固定化, 其纳米级超薄胞外涂层 ($< 100 \text{ nm}$) 极大地降低了营养物质和代谢产物的扩散阻力, 在恶劣环境中展现出比游离细胞更好的活性和稳定性^[55], 为解决多细胞固定化方法面临的问题提供了可行思路。

单细胞纳米涂层固定化方法机理与工艺流程示意图如图 7 所示: (1) 以单个细胞为研究对象, 利用细胞表面与聚电解质之间的弱相互作用力如吸附 (静电力、盐析、氢键等)^[56]完成聚电解质在细胞表面的第一层涂层; (2) 引入聚电解质或者无机材料对纳米涂层强度、通透性、功能性进行改良。

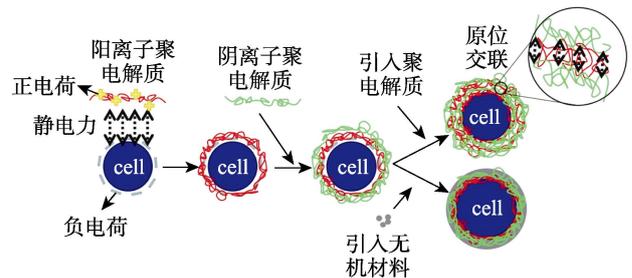


图7 单细胞纳米涂层固定化示意图

Fig. 7 Schematic diagram of immobilization of single-cell nano-coating

纳米涂层的机械强度是保证细胞活性、发挥细胞催化功能的前提, 静电力原位交联 (图 7) 可通过改变涂层结构的方式提高涂层强度^[57]。如 LEE 等^[58]将 Yeast 交替浸在儿茶酚接枝的聚乙烯亚胺 (PEI-C, $2 \text{ g}/\text{L}$) 和儿茶酚接枝的透明质酸 (HA-C, 质量浓度为 $2 \text{ g}/\text{L}$) 的 NaCl 水溶液中, 分别成膜 5 min, 离心得到涂层 Yeast, 将其置于 pH 8.5 下 12 h, 使 PEI-C

和 HA-C 中邻苯二酚基团充分氧化交联, 最终涂层强度进一步增强, 保证细胞活性的同时实现对细胞分裂的控制。

在聚合物涂层中引入金属离子、金属氧化物同样可有效增强涂层机械强度, 而且可以赋予细胞如磁性等非生物物理性能。如 KONNOVA 等^[59]首先将 10 mL 质量浓度为 10 g/L 聚(烯丙胺)盐酸盐 (PAH) 溶液与 2.8 mL 质量浓度为 18 g/L 磁性纳米颗粒悬浮液混合反应 24 h 得到多环芳烃稳定的磁性纳米颗粒 (PAH-MNPs), 然后将泊库岛食烷菌 (*Alcanivorax borkumensis*) 与 PAH-MNPs 等体积混合, 通过一步沉积法在细胞表面制备厚度 70~100 nm、松散粗糙、具有磁响应的铁矿涂层, 该涂层良好的机械强度和粗糙表面有助于提高菌体活性, 且在实际工业应用中, 氧化铁纳米粒子的引入有利于实现对细胞的定向操纵, 提高细胞催化效率。

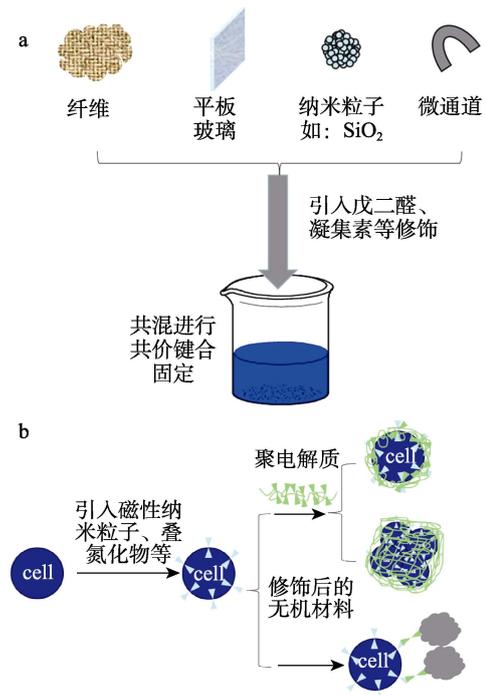
目前, 单细胞纳米涂层研究多停留在如何实现单细胞纳米涂层, 而少有用于某种物质 (尤其是精细化学品) 生产的研究阶段, 而且固定化工艺成本高昂, 但是单细胞纳米涂层方法生物相容性、涂层结构可调性以及可功能化的优点使其在精细化学品生产领域有着广阔的应用前景。

4 共价键合

上述 3 种细胞固定化方法基于弱相互作用力, 很大程度保证了细胞原始的结构状态, 对保证细胞活性、提高细胞催化效率起到重要的作用, 但结合能力弱的缺点易导致细胞与载体分离^[60], 而丧失固定化细胞催化的优势。

共价键合固定化细胞有两种方式: (1) 利用细胞表面原有或人工赋予细胞表面的价键基团, 将细胞固定在载体上^[61-62]; (2) 在细胞表面引入特性基团, 随后利用有机、无机材料与基团形成共价键完成细胞固定^[63-64] (图 8)。相比表面附着, 其细胞负载及生产效率更高^[65]; 相比包埋法, 底物无需额外扩散进入包埋层, 可有效降低传质与扩散限制^[66]; 而相比 LbL-PEMs, 其应用基底更加广泛, 包括纳米粒子^[61]、纤维^[67]、平板玻璃^[68]、全氟烷氧基管 (PFA)^[62]等 (图 8)。

载体及细胞表面的特异性修饰是提高细胞固定化效果及精细化学品产率的关键, 对增强细胞稳定性、延长细胞催化能力、简化下游处理、降低成本等方面有重要的影响。但是, 细胞和材料之间较强的共价键力易使细胞结构破坏, 导致细胞活性难以长久维持^[69]。因此, 开发更具生物相容性的共价键合机制以长时间维持细胞活性, 是共价键合固定化细胞方法须首先解决的任务。



a—细胞共价键合固定到载体上; b—材料共价键合固定细胞

图 8 共价键合示意图

Fig. 8 Schematic diagram of covalent bonding

凝集素是一种于动植物中提取的蛋白质, 可与细菌表面特定碳水化合物部分结合而不对细菌产生伤害。ZHUANG 等^[61]将从刀豆蛋白中提取的凝集素刀豆球蛋白 A (Con A) 引入到外覆多巴胺的磁性 Fe_3O_4 纳米粒上, 4 °C 下与质量浓度为 9 g/L 的重组 *E. coli* 悬液共混 2 h, 使 ConA 与细菌表面甘露糖充分结合以完成对 *E. coli* 的共价键合固定化, 相比游离细胞, Con A 的引入使固定化细胞对 pH、温度的耐受能力增强, 10 个应用批次后, 细胞活性依旧可达 62%, 1, 3-二羟基丙酮 (DHA) 转化率提高两倍, 产率达到 15 mg/(L·h)。相比河南大学和长兴制药公司开发的游离细胞催化生产 DHA 产业化工艺, 此法的高细胞活性及固定化细胞的重用性, 为降低 DHA 的工业生产成本提供了可行方式。

RIVERO 等^[70]采取共价键合和包埋两步法固定德尔布鲁克乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii* NDT) 用于生产治疗白血病的克拉屈滨 (Cla), 其首先将 *Lactobacillus delbrueckii* NDT 共价键合固定在戊二醛预处理的 SiO_2 纳米粒上, 接着与 SA 溶液均匀混合, 最后将混合溶液滴入 Ca^{2+} 溶液中完成包埋固定化, 结果显示, 两步固定化后菌体活性高达 98%, 且在 pH (5~9) 和 30~60 °C 范围内表现出良好的活性和稳定性 (重复使用批次可达 2100 次), Cla 产率达到 2.6 mg/(L·h)。

如何通过改进固定化方法简化下游处理流程同样是共价键合固定化细胞方法需要考虑的问题。

(R)-(-)-甘露烯酸是一种在抗生素药物合成领域常用的多功能手性构件,NI等^[64]将大肠杆菌(*E. coli*)与氧化铁纳米粒(IONPs)简单混合后加入到儿茶酚壳聚糖溶液(CCS)中,通过改变pH使细胞聚集,利用CCS与细胞表面硫醇基的共价键合及CCS凝固作用完成对*E. coli*的固定化,相比游离细胞,共价键合固定化*E. coli*在水-有机双相体系中催化效果更稳定,6个批次后产率达到40.9 g/(L·h),而且氧化铁纳米粒子的引入简化了下游处理步骤,利用磁铁便可使固定化细胞催化剂与底液分离,具有一定的工业应用潜力^[64]。

不同种类的细胞具有不同的表面结构,很难利用一种共价键合机制完成对不同种类细胞的固定化。FAN等^[63]开发了一种基于活细胞的载体和细胞双修饰的共价键合固定化方法,在细胞活性保持方面取得良好效果,其首先将叠氮化物代谢整合到细胞表面,接着用二氯甲烷(DCM)化学修饰磁性纳米离子,然后在温和条件下,通过炔基和叠氮基之间的点击反应完成对*E. coli*的共价键合固定化,固定化细胞在45℃、pH 6.0、Cu²⁺存在的条件下,具有良好的活性回收率(94%)及操作稳定性(10个批次后活性依旧保持50%以上)。载体与细胞的双功能化修饰拓宽了共价键合在固定化细胞催化精细化学品生产中的应用范围,在工业应用上具有很大的应用潜力。

5 结束语与展望

在细胞固定化催化生产精细化学品领域,大部分细胞固定化方法非常有效,此法可提高细胞在应用环境中的耐受性,保持细胞活性,延长细胞催化时间,提高生产效率,显著降低生产成本;可多批次重复使用,提高细胞操作稳定性和细胞催化效率等。然而,细胞固定化催化工艺在实际应用中也存在一定限制。例如:细胞固定化技术对材料、设备、成本等要求高,现有技术处在实验室阶段;细胞固定化方法本身存在技术限制,例如:表面附着法因细胞附着在载体表面而对细胞活性保护作用有限;凝胶包埋法存在底物/产物扩散阻力增加的问题,易降低细胞催化能力,引起细胞毒性(产物抑制);共价键合法中细胞活性的保持是难题。

国内生物技术生产精细化学品的研发整体上落后于欧美日地区。但在基础研究方面,如定向进化、细胞工程、合成生物学等领域处于领先/首创水平,如中国科学院天津工业生物技术研究所首次利用生物催化技术在实验室实现了二氧化碳到淀粉的从头合成^[71]。但是,在技术研发转化方面与欧美日地区

差距较大,一方面是产业化环境不佳,即多数生物技术企业规模小、技术积累弱,难以有效稳定支撑长期技术研发投入;另一方面是仍有许多关键性技术未解决,如固定化细胞发酵过程中存在高密度细胞培养-固定化载体固有的物质扩散阻力之间的矛盾,导致细胞密度低、产物浓度低,需要从细胞群体感应的认知及利用角度加强细胞间相互作用的研究,结合载体制备工艺中载体结构-扩散能力的调控,以及放大工艺优化等加以解决;又如:固定化细胞发酵过程多涉及气液固三相,是一个复杂的生物化学反应过程,目前对反应器中流体流动、物质传递、热量传递的认识不足阻碍了高效生物反应器的设计与制造、下游加工工艺设计与过程优化,可以加强反应器中多相流体模拟、微米级固定化载体传质动力学等应用基础研究与不同级别实验验证以求取得突破。最后,通过产学研的高效结合,促进有自主知识产权的细胞固定化催化技术及其产品的中试、工业化装置及工艺的快速转化,壮大可持续、绿色生物技术生产精细化学品的产业,提高中国生物技术产品的国际竞争力。

参考文献:

- [1] QIAN X J, YAN W, ZHANG W M, *et al.* Current status and perspectives of 2-phenylethanol production through biological processes[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(2): 235-248.
- [2] FENG L G, WANG M, WANG J. Isolation of 2-phenylethanol biosynthesis related genes and their relationship with 2-phenylethanol accumulation in *Rosa rugosa*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(12): 256-265.
- [3] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: The future of chemical production[J]. *Science*, 2017, 355(6230): aag0804.
- [4] ZHAO Q C, ANSORGE S M B, HAAGA R, *et al.* Living whole-cell catalysis in compartmentalized emulsion[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 595: 1-7.
- [5] HAQUE R U, PARADISI A. *Haloferax volcanii* as immobilised whole cell biocatalyst: New applications for halophilic systems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 15(103): 3807-3817.
- [6] WANG Q (汪庆), HOU Z L (侯泽林), WANG L Q (王利群), *et al.* Whole cell catalytic synthesis of ethyl (R)-2-hydroxy-4-ethylbutyrate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2018, 35(2): 207-212.
- [7] PAN X R (潘鑫茹), LIU J Z (刘均忠), ZHANG H J (张宏娟), *et al.* Synthesis of L-theanine by whole cell catalyst co-expressing PPK and GMAS[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(9): 1828-1832.
- [8] HANG X L, LIUY F, LIU L, *et al.* Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: Advances and perspectives[J]. *Biotechnol Advances*, 2019, 37(5): 787-800.
- [9] KISUKURI C M, ANDRADE L H. Production of chiral compounds using immobilized cells as a source of biocatalysts[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(40): 10086-10107.
- [10] NIE H Y, NIE M Q, DIWU Z J, *et al.* Biological treatment of high salinity and low pH produced water in oilfield with immobilized cells of *P. aeruginosa* NY3 in a pilot-scale[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 381(5): 121232-121237.
- [11] HUA X, DUA G L, XU Y. Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 283(6): 326-331.

- [12] QIU S, WANG Y J, YU H, *et al.* *t*-Butyl 6-cyano-(3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate synthesis *via* asymmetric reduction by immobilized cells of carbonyl reductase and glucose dehydrogenase co-expression *E. coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 80(5): 43-51.
- [13] TRAKARNPAIBOON S, PRANEETRATTANANON S, KITPREECHAVANICH V. Simultaneous saccharification and fermentation of L-(+)-lactic acid production from liquefied cassava starch by immobilized *Rhizopus oryzae* in a 3 L airlift fermenter[J]. *Chiang Mai Journal of Science*, 2018, 45(1): 77-91.
- [14] GUILLERMO S, ENCANTACION F F, JOSEFINA V C, *et al.* Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 170(1): 1-14.
- [15] STRAATHOF A, PANKE S, SCHMID A. The production of fine chemicals by biotransformation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(6): 548-556.
- [16] POLAKOVIC M, SVITEL J, BUCKO M. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: Systems development, reaction engineering and applications[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(5): 667-683.
- [17] TAN T W (谭天伟), YU J L (俞建良), ZHANG X (张翔). Advance in biorefinery technology[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress (化工进展)*, 2011, 30(1): 117-125.
- [18] LIN J P (林建平), WU J P (吴坚平), YANG L R (杨立荣). Biosynthesis of fine chemicals[J]. *Biotechnology and Business (生物产业技术)*, 2016, 5(5): 7-16.
- [19] SUN Z H (孙志浩), HUA L (华蕾). Progress on production of D-calcium pantothenate and D-panthanol by biotechnology[J]. *Fine and Specialty Chemicals (精细与专用化学品)*, 2004, 12(10): 11-15.
- [20] VANELLA R, TA D T, NASH M A. Enzyme-mediated hydrogel encapsulation of single cells for high-throughput screening and directed evolution of oxidoreductases[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(6): 1878-1886.
- [21] STEWART K N, HICKS E G, DOMAILLE D W. Merger of whole cell biocatalysis with organocatalysis upgrades alcohol feedstocks in a mild, aqueous, one-pot process[J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2020, 8(10): 4114-4119.
- [22] ADEBAR N, GRÖGER H. Heterogeneous catalysts "on the move": Flow chemistry with fluid immobilised bio-catalysts[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2020, 2020(38): 6062-6067.
- [23] KRAUSE J, KRUTZ R, SCHEMBECKER G, *et al.* Whole cell immobilization and catalysis in a centrifugal partition chromatograph[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 117(1): 188-197.
- [24] GEORGE O T, HEIDI B K, ROBERTO K. Biofilm formation as microbial development[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(4): 49-79.
- [25] MARTINEZ C, RUIZ S, NOGUEIRA M, *et al.* Effective immobilization of *Agrobacterium sp.* IFO 13140 cells in loofa sponge for curdlan biosynthesis[J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 7957-7973.
- [26] ZHANG A H, LIU H L, HUANG S Y. Metabolic profiles analysis of 1,3-propanediol production process by *Clostridium butyricum* through repeated batch fermentation coupled with activated carbon adsorption[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(3): 684-693.
- [27] GUNGORMUSLER M, GONEN C, AZBAR N. Use of ceramic-based cell immobilization to produce 1,3-propanediol from biodiesel-derived waste glycerol with *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1138-1147.
- [28] VERAS S, ROJAS P, FLORENCIO L, *et al.* *Lourdinha Florencio* 1,3-propanediol production from glycerol in polyurethane foam containing anaerobic reactors: Performance and biomass cultivation and retention[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(10): 45662-45674.
- [29] KURIAN J V. A new polymer platform for the future sorona from corn derived 1,3-propanediol[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2005, 13(2): 159-167.
- [30] LIU J Y, ZHOU W C, FAN S Q. Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(23): 11617-11624.
- [31] QU B, LUO Y C. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors-A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152(6): 437-448.
- [32] ZHANG Q (张强), JI Y (嵇冶). Research progress of immobilized cell technology in alcohol fermentation[J]. *Chemical Industry Progress (化工进展)*, 2017, 36(4): 1404-1409.
- [33] MILOŠ R, STEVA L, MIONA B, *et al.* Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(2): 315-322.
- [34] UKI-VUKOVI A J, LJILJANA M, DUANKA P, *et al.* New trends and challenges in lactic acid production on renewable biomass[J]. *Hemjska Industrija*, 2011, 65(4): 411-422.
- [35] WANG J F, HUANG J Q, GUO H Y, *et al.* Optimization of immobilization conditions for *Lactobacillus pentosus* cells[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(9): 1071-1079.
- [36] MARINA L P, MONICA C, GERARDO G B. Continuous bioproduction of 1,3-propanediol from biodiesel raw glycerol: Operation with free and immobilized cells of *Clostridium butyricum* DSM 10702[J]. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2017, 95(5): 819-826.
- [37] PAN L X, FANG X J, YU Z, *et al.* Encapsulation in alginate-skim microspheres improves viability of *Lactobacillus bulgaricus* in stimulated gastro-intestinal conditions[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013, 64(3): 380-384.
- [38] KIM B J, PARK T, MOON H C, *et al.* Cytoprotective alginate/polydopamine core/shell microcapsules in microbial encapsulation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(52): 14443-14446.
- [39] WANG W, LIU X D, XIE Y P, *et al.* Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2006, 16(32): 3252-3267.
- [40] LI H J (李会静). Growth and metabolism performance of microbial cells immobilized on non-aqueous polymer carrier[D]. Dalian: Dalian University (大连大学), 2012.
- [41] YANG X Y, LI J P, SHI G C, *et al.* Improving 3-phenyllactic acid production of *Lactobacillus plantarum* AB-1 by enhancing its quorum-sensing capacity[J]. *Journal of Food Science Technology*, 2019, 56(5): 2605-2610.
- [42] GAO M, SONG H Y, ZHENG H Z, *et al.* Culture of lowdensity *E. coli* cells in alginate-chitosan microcapsules facilitates stress resistance by up-regulating lux S/AI-2 system[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 141(1): 160-165.
- [43] HOU D D, YU W T, ZHANG D M, *et al.* Culture of yeast cells immobilized by alginate-chitosan microcapsules in aqueous-organic solvent biphasic system[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(3): 863-870.
- [44] LI X, LIU C, BRUGGEN B B V. Polyelectrolytes self-assembly: Versatile membrane fabrication strategy[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2020, 8(20): 20870-20896.
- [45] SHUKLA A, ALMEIDA B. Advances in cellular and tissue engineering using layer-by-layer assembly[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2014, 6(5): 411-421.
- [46] HAMMOND P T. Form and function in multilayer assembly: New applications at the nanoscale[J]. *Advanced Materials*, 2004, 16(12): 1271-1293.
- [47] CAO Z Q, XIA C J, JIA W, *et al.* Enhancing bioethanol productivity by a yeast-immobilized catalytically active membrane in a fermentation-pervaporation coupling process[J]. *Journal of Membrane Science*, 2020, 595(11): 117485-117494.
- [48] DASP B, TSIANOU M. From polyelectrolyte complexes to polyelectrolyte multilayers: Electrostatic assembly, nanostructure, dynamics, and functional properties[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 244(4): 71-89.