

- Junctions. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [2] Loewenstein, W. R., 1979. *Biochim. Biophys. Acta*, 560: 1—65.
- [3] Wade, M. H. et al., 1986. *Science* 232: 429—552.
- [4] El-Fouly, M. H. et al., 1987. *Exp. Cell Res.*, 168: 422—430.
- [5] Chuang, Tseng, M. P. 1986. In *Cellular Endocrinology*, pp. 35—44. Alan R. Liss, Inc.
- [6] Trosko, J. E. et al., 1982. *Carcinogenesis* 7: 565—585.
- [7] Tseng, M. P., 1987. *J. Electron Microscopy Technique* 7: 85—89.
- [8] Levine, E. M. et al., 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53: 350—356.
- [9] Slack, C., and J. P. Palmer, 1969. *Exp. Cell Res.* 55: 416—419.
- [10] Meyer, D. J. et al., 1981. *J. Cell Biol.*, 91: 505—523.
- [11] Yee, A. G., and J. P. Revel, 1978. *J. Cell Biol.*, 78: 554—564.
- [12] Larson, D. M., and C. C. Haudenschild, 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 23. Asilomar.
- [13] Garfield, R. E., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 18. Asilomar.
- [14] Rose, B. et al., 1977. *Nature*, 267: 625—627.
- [15] Spray, D. C., and M. V. L. Bennett, 1985. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 281—303.
- [16] Trosko, J. E. et al., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 32. Asilomar.
- [17] Azarnia, R. et al., 1981. *J. Membr. Biol.*, 63: 133—146.
- [18] Flagg-Newton, J. et al., 1981. *J. Membr. Biol.*, 63: 105—121.
- [19] Erik, C. et al., 1983. *Nature*, 305: 433—435.
- [20] Saez, J. C. et al., 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2473—2477.
- [21] Lampe, P. D. et al., 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 22. Asilomar.
- [22] Mehta, P. P. et al., 1986. *Cell*, 44: 187—196.
- [23] Swift, J. G. et al., 1983. *J. Submicrosc. Cytol.*, 15: 799—810.
- [24] Nicolson, G. L., 1987. *Cancer Res.*, 47: 1473—1487.
- [25] Azarnia, R. and W. R. Loewenstein, 1984. *J. Membr. Biol.*, 82: 191—205.
- [26] Atkinson, M. 1987. Abs. Intl. Congr. Gap Junction, pp. 8. Asilomar.
- [27] Chang, C. C. et al., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5360—5364.
- [28] Yamasaki, H. et al., 1987. *Cancer Res.*, 47: 5658—5664.
- [29] Nishizuka, Y., 1984. *Nature*, 308: 693—698.
- [30] Weinstein, R. S. et al., 1976. *Adv. Cancer Res.*, 23: 23—89.

## 植物细胞固定化的生产技术

田中 渥夫

利用细胞筛选和最适宜的培养基、培养条件，建立有用物质高产的植物培养细胞系已在前面（细胞生物学杂志 1986，8卷第三期至1988年10卷第一期）详细叙述过。但是为了工业化的稳定生产这些有用物质，尚应解决几个问题。

- 1) 生产性能低：由于筛选增加了生产量，但因生长发育迟缓而生产性能低；
- 2) 生产的不稳定性：在各种培养中，生产性能有变动；
- 3) 发生在大量培养时的困难等等。

由于反复筛选提高了生产性能，以及随之大量培养技术的确立（请参考下节），利用细胞固定化是提高并稳定生产性能的有力解决方法。

固定化细胞的优点为：

- 1) 高度保持反应槽内的细胞（生物体催化剂）量，能提高反应效率；
- 2) 固定化使反应活性稳定，能够长期连续运行；
- 3) 产物易于和作为催化剂的细胞分离；
- 4) 柱式或槽式有可能连续运转，易于控制生产中最适的环境条件、基质浓度等，能使生产稳定；

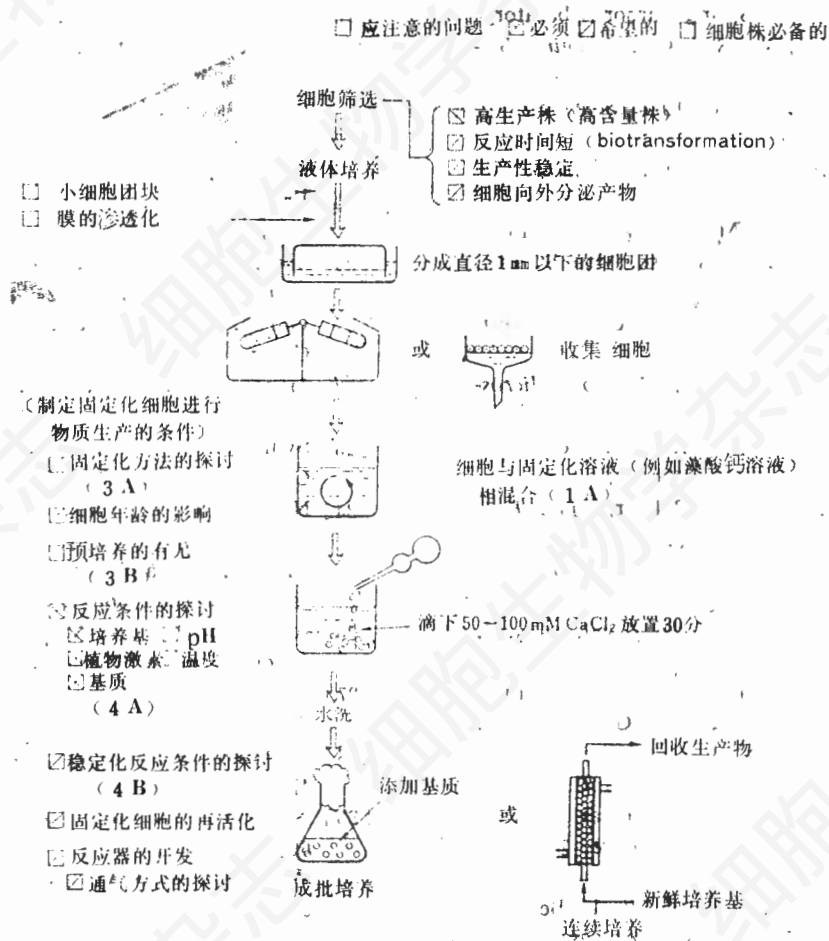


图 1 用藻酸钙使植物细胞固定化和固定化细胞进行物质生产的流程

5) 物质生产大多利用处于稳定增殖期的细胞, 由于固定化抑制生长发育, 因此应考虑尽可能模拟稳定期等等。

采用固定化植物细胞来进行物质生产的研究为数尚少, 将来可能成为重要的技术。

本节简介一般细胞固定化方法后, 叙述几种物质生产方法与问题的关键之处。

### 一、固定化方法

植物细胞体积约为微生物的十万倍, 而且易于成为细胞团块, 受机械的刺激弱, 另一方面, 固定化以后要求具有复杂的生物活性, 固定化方法是在缓和条件下固定化, 始终在包括法或吸着法的限定情况下进行。

目前一般用藻酸(alginic acid)钙来固定化, 但是角叉胶(carrageenin)、琼脂、琼脂糖和聚尿烷(polyurethane)也能将细胞在正常状态下固定化。也有因反

应目的和所用细胞种相适应的固定化方法而有不同的情况\*, 但所用的几种方法必须确定固定化细胞的活性。此外, 不论采用何种固定化的细胞, 直径在1mm以下细小细胞团的液体培养细胞最为适宜\*\*。

#### A. 藻酸钙固定化(图1)<sup>[1-6]</sup>

将过滤收集或离心分离获得的细胞(约2—10g鲜重, 细胞体积2—10ml)原封不动或制成细胞悬浮液

\*1 例如将 $\text{NAD}^+$ 与辅酶反应的情况下, 琼脂糖凝胶促进反应, 而藻酸钙作为载体时有报道不进行反应。因此, 在各种反应进行上, 必须考虑 $\text{Ca}^{++}$ 对反应的阻碍、凝胶对基质的吸附等等<sup>[15]</sup>。

\*2 因为从大的细胞团块制成液体培养细胞难以进行固定化, 所以必须仅选择细小的细胞团。依据这一情况, 可将50~100mmol/L氯化钙加入培养基进行继代培养, 可获得细小的细胞团<sup>[14]</sup>。此外, 将细胞块机械的细碎, 细胞活性虽在某些程度上受损, 但较实用。

(1—5 g/10 ml)与藻酸钠水溶液(3—5% W/V, 10 ml)相混合, 均匀悬浮后用具有安全球的吸量管(komagome pipette)滴入 50—100 mmol/L 氯化钙溶液(200—500 ml)。放置 30—60 分钟, 凝胶化结束即充分水洗(例如 3% 蔗糖溶液)以备用。这一方法可用直径 3—5 mm 的小珠。若需更小的小珠可用细的注射针来制备。制备大量小珠的装置, 可参照 Brodelius<sup>1</sup> 的方法(图 2)<sup>[7]</sup>。

藻酸钙凝胶<sup>\*3</sup>是 1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5—7.0)和柠檬酸缓冲液的螯合物(1 滴对 1—2 ml), 1 小时左右可以溶化。从而易于比较固定化细胞和游离细胞<sup>\*4</sup>的活性。为使凝胶稳定, 在反应液中可加入 5—20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>。

### B. 角叉胶固定化<sup>[8]</sup>

将培养细胞(5 克鲜重)悬浮于 5 克 3% (W/V) 角叉胶水溶液(50℃), 直接滴入 0.3 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 静置 1 小时后水洗备用。此外, 将角叉胶和细胞的混合物通过直径 1—2 mm 小孔的聚四氟乙烯纤维(teflon 泰氟隆)制的板, 取出由于温度下降而固化的圆柱状凝胶, 也能在 CaCl<sub>2</sub> 溶液中稳定化<sup>[7]</sup>。为了大量制备均匀的小珠(珠状凝胶), 开发了将细胞和角叉胶的混合物滴入豆油和石蜡油等疏水剂中的方法<sup>[2,9]</sup>。制备圆柱状凝胶和珠状凝胶的方法, 也可共同使用琼脂和琼脂糖(agarose)。

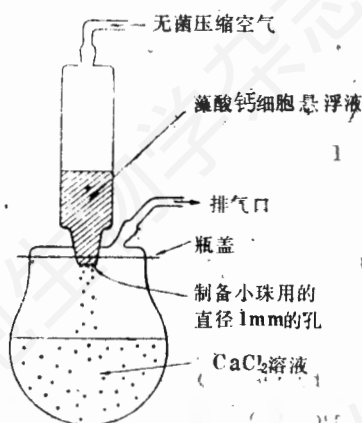


图 2 藻酸钙凝胶的大量制备

引自 P. Brodelius and K. Mosbach 1982, Adv. Appl. Microbiol., 28, 7.

此外, 用六亚甲基二胺(hexamethylene diamine)和戊二醛(glutaraldehyde)处理凝胶, 虽能提高凝胶的机械强度, 但会使植物细胞的活性受损, 因而不适宜的。

### C. 琼脂、琼脂糖固定化<sup>[8]</sup>

在 50℃ 的 4% 琼脂溶液(5 g)或 40℃ 的 4—10% 琼脂糖溶液(5 g)中, 将 5 克细胞充分悬浮后冷却到 20℃, 获得凝胶。与上述在用角叉胶情况下同样的方法制备均匀的小珠或圆柱状凝胶。

### D. 尿烷(氨基甲酸酯)·预聚物(prepolymer)固定化<sup>[10]</sup>

细胞在尿烷·预聚物(东洋橡胶工业制, pu-3:1 克)中的悬浮液(3.5 ml; 细胞 1.5 克鲜重)和冷水充分混合, 静置 30 分钟, 确认凝胶化结束后, 从容器中取出, 用剪刀等切成小断片, 水洗后备用。

### E. 吸附法固定化

将 2,6-二甲基酚(2,6-dimethyl phenol)聚合获得聚亚苯基氧化物(polyphenylene oxide, 系多孔性聚合物, 孔径 250 μm, 表面积 600 m<sup>2</sup>/g) 10 g 悬浮于 5% 戊二醛(100 ml), 搅拌 48 小时。活性化结束后, 加入 2,4-二硝基肼(2,4-dinitrophenyl hydrazine)到检查不出戊二醛为止, 进行水洗。将活性化的载体用含 0.75 mol/L CaCl<sub>2</sub> 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 5.7, 300 ml)平衡后, 用 6 g 载体加入 50 ml 的细胞悬浮液(约 10<sup>3</sup>个/ml), 在 20℃ 下搅拌 30 分钟, 重复两次, 此后在 4℃ 下静置 48 小时。将固着细胞的载体悬浮于 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 5.7, 500 ml)中, 除去未吸附的细胞, 重复 5 次后备用。反应柱运转 270 小时, 载体的性状和柱的流速并无变化。

### F. 其他固定方法

将培养细胞用尿烷泡沫吸附的方法<sup>[12]</sup>, 以及用含有伴刀豆蛋白 A(Con A) 缓冲液湿润膨胀微载体(microcarrier, Cytodex 1, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)吸附原生质的方法也有报道<sup>[13]</sup>。另一方面, 用丙烯酰胺(acryl amide)<sup>[8]</sup>和光架桥性树脂<sup>[14]</sup>在包括固定化的情况下, 未获良好结果。

## 二、固定化细胞生存能力的证实

### A. 直接观察

细胞固定化凝胶用刀片切成薄片(厚 0.2—0.3 mm), 直接在显微镜下观察细胞内有无原生质体流动, 原生质体分离的再现性能, 或者用伊芬蓝

<sup>\*3</sup> 期望最后的藻酸钙浓度为 3%。浓度在 2% 以下则凝胶的强度不够。藻酸钙与明胶(gelatin)混合后, 可试用戊二醛架桥, 提高凝胶的强度, 以避免细胞活性受到损失而失败<sup>[8]</sup>。

<sup>\*4</sup> 以下将未固定化的细胞称为游离细胞。

(Evan's blue)等染色以判断细胞的死活。

[实例：原生质体分离的证实]<sup>[8]</sup>

将凝胶切片浸入高渗溶液[例如0.6—1.0 mol/L甘油酰(glyccroyl)或山梨醇溶液]，确认原生质体分离以后，返回蒸馏水中证实恢复了膨压。镜检时加入酚藏红花溶液，很容易观察到原生质体的分离。

**B. 呼吸活性的证实**<sup>[4,8,14]</sup>

凝胶切成0.5—1.0 mm小片，用氧电极能直接测定呼吸活性。制备小片时要使凝胶的大小一致是困难的，因而对氧的扩散阻力不同，定量测定生存的细胞数也有困难。

**C. 细胞增殖的证实**<sup>[8,14]</sup>

最简单的证实细胞生存的方法是观察凝胶中细胞的分裂和细胞的增殖。游离细胞增殖所用的培养基中加入凝胶(细胞量1 g/25 ml培养基)，通常进行振荡培养。用琼脂和琼脂糖固定的情况下，其生长情况与游离细胞的大致相同。用藻酸钙和聚尿烷固定时则延迟生长发育<sup>[14]</sup>。用角叉胶的情况下，因固定时的温度要高，生长发育也不大好<sup>[8]</sup>。

此外，在生长发育过度时，细胞从凝胶中逸出或者凝胶被破坏。应当避免这样的凝胶被破坏，一般情况下为维持物质生产旺盛的细胞稳定增殖期，对细胞的生长发育进行抑制，实际上多用植物激素<sup>[3]</sup>以及磷酸、硫酸根离子来控制。从培养基中除去植物激素<sup>[5]</sup>、氨态氮、维生素，进而也开发了将磷酸与2-N-吗啉代乙烷磺酸[2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid]置换的单纯反应液，胡萝卜的培养细胞在24天期间保持了呼吸活性<sup>[4]</sup>。

### 三、固定化细胞的新生(de novo)合成

新生合成是从廉价的基质(例如蔗糖)获得附加价值高的产物是有经济价值的。但是，一般随着细胞的增殖而作用期延长，甚至对基质的利用率不高。由于用细胞固定化时是以高的细胞密度来保持高活性的，若能抑制细胞增殖来提高反应效率则可充分弥补新生合成所具有的缺点。此外，若凝胶向外分泌生产物的同时达到细胞活性的稳定化，则连续反应即成为可能。

在新生合成的情况下，保持多个不同酶系统的活性，特别是辅酶等再生系统的活性，是很重要的。

**A. 长春花(Catharathus roseus)固定化细胞生产阿玛碱(ajmalicine)和固定化方法的讨论**<sup>[8]</sup>。

将含有 $10^{-6}$  mol/L 2,4-D,  $10^{-6}$  mol/L NAA的LS培养基(pH 6.0)液体培养的长春花细胞，以藻酸钙、

琼脂糖、琼脂、角叉胶作为固相载体。固定化细胞(细胞量0.5 g/1.0 g凝胶)移入不含激素的培养基(10 ml)，培养两周后测定阿玛碱的生成量，与游离细胞相比，用琼脂为游离细胞的88%，角叉胶为游离细胞的66%，固定化细胞的生产性较差。但是，用琼脂糖固定化的细胞差不多没有变化，在藻酸钙固定化的情况下具有促进的效果为游离细胞的140%。此外，采用这一实验系统检查从前体物质色胺(tryptamine)和开环马钱子苷(Secologanin)合成阿玛碱的情况，也有同样的倾向。

由于明白了固定化细胞也能保持新生合成的活性，使物质生产超过游离细胞也就有了可能。

实际上，鸡眼藤植物(Marinda citrifolia)固定化细胞培养大约三星期，显示出蒽醌(anthraquinone)的产量平均超过游离细胞10倍。

**B. 薰衣草(Lavandula vera)固定化增殖细胞生产绿色色素**<sup>[6]</sup>

固定化细胞的反应速度增加，凝胶中的细胞高密度是重要因素，并且必须考虑到基质和氧气的扩散的情况，特别是凝胶近表面的细胞密度高。在含有L-半胱氨酸(1—2 mmol/L)培养基中筛选出来的生产绿色色素的薰衣草细胞株，细胞在用藻酸钙固定化后，若一直培养在生产色素培养基中则完全不产生色素。而用比较低的密度(细胞鲜重1 g/10 ml凝胶)固定化以后，通常培养三星期，凝胶中的细胞密度约9 g/10 ml凝胶)，用这样固定化的细胞其色素生产量平均超过游离细胞生产量30—50%。

图3\*A和C为薰衣草细胞固定化后不久的藻酸钙凝胶，B和D是培养三星期后的凝胶，在图片上能够清楚的观察到凝胶近表面的细胞增殖。图4\*A为不含半胱氨酸的培养基(生长发育培养基)培养固定化的薰衣草细胞，B是在含有半胱氨酸培养基(生产色素培养基)培养的固定化细胞，仅后者生产出绿色的色素。

这里所讲的绿色色素的生产<sup>[6]</sup>和在活性聚亚苯基氧化物(Polyphenylene Oxide)中固定化的澳洲茄(Solanum aviculare)生产甾类糖苷(Steroid glucoside)<sup>[11]</sup>，都是特定的细胞株，将产物分泌到培养基中。但在一般情况下，细胞内积聚的产物要多一些。因此在柱形反应器进行连续生产的情况下，须事先筛选能分泌目的物质的细胞株。用有机溶剂或界面活性剂处理细胞使生产物的膜透性增高也是必要的。关于

\*译者注：图3与图4原文系采用彩色照片制成的图版，译文中予以省略。

提高膜通透性的操作将于下节D项内叙述。

#### 四、依据生物化学的转化进行物质生产

新合成有用物质的生产，从基质的价格考虑是最经济的，由于细胞的必要增殖因而生产须有较长时间的倾向。在有用产物生产活性的最高时期，加入前体物质，能在短期内获得大量的目的产物，则前体物质价格高一点也是经济的生产方法。在仅只代谢系统的一部分反应进行生物化学转化(biotransformation)的情况下，即使新生合成的全部生物合成活性不高，作为目标的一部分反应活性高也是好的。此外，除原产目标化合物的植物种外，也可使用具有必要的反应高活性的多种细胞种。

但是，在确定转化系统之后，重要的事情是：在筛选活性高的细胞株和设计反应条件(基质种类等)时，新生合成的情况不能改变。首先，以毛地黄细胞在游离细胞中转化的研究为例，予以说明。

##### A. 毛地黄细胞从毛地黄毒苷(digitoxin)向地高辛(digoxin)转化的羟化反应

用四种毛地黄的共10个细胞株，培养基中加入1—2 mg 卡烷内酯(cardanolide, 50%乙醇溶液1 mg/ml)，追踪转化反应，其结果说明于下。

1) 由于物种不同，加入的卡烷内酯的代谢亦不相同。

2) 由于给予的基质构造不同[例如毛地黄毒苷，毛地黄毒苷配基(digitoxigenin)， $\beta$ -甲基毛地黄毒苷( $\beta$ -methyl digitoxin)等]，代谢方向(配糖化，羟化，乙酰化或者分解)以及反应的程度均有不同。

3) 从相同植物种诱导的细胞株，也可获得代谢活性不同的细胞株(12 $\beta$ -羟化活性和脱甲基化活性的有无)。

因此，为使目标反应(在这一情况下系12 $\beta$ -羟化反应)有效的进行，选择了基质( $\beta$ -甲基毛地黄毒苷)，从有希望的植物种希腊毛地黄(Digitalis lanta L)诱导愈伤组织，并须筛选出主反应活性高，副反应活性低，而且反应时间短的细胞株。

##### B. 毛地黄游离细胞羟化活性的稳定化

控制生物化学反应的因素之一是基质的添加时期，毛地黄细胞于增殖的恒定期显示高的羟化反应活性，大瓶发酵培养的恒定期极短，容易发生细胞的自溶，因而目的物 $\beta$ -甲基毛地黄毒苷生产量低下。为此，延长恒定期成为重要问题。在毛地黄细胞添加适量的糖以抑制pH的上升从而抑制细胞的自溶，特别是添

加糖使pH保持在6.1—6.5，可有效地保持毛地黄细胞的活性(促进羟化反应)。

因此，反复利用游离细胞进行反应，连续运转是困难的，因而须试用固定化细胞使活性稳定。

##### C. 毛地黄细胞固定化使12 $\beta$ -羟化反应活性稳定化

毛地黄细胞用藻酸钙固定化后，分批培养进行转化反应。在61天期间内每两天按40 mg/l(最初两次为20 mg/l)的比例添加基质 $\beta$ -甲基毛地黄毒苷，经过61天固定化凝胶崩解使反应中止。但是在这一期间，12 $\beta$ -羟化反应是稳定的(图5)<sup>[1]</sup>。加入基质共1120 mg，生成 $\beta$ -甲基地高辛共443.5 mg，回收未反应的基质531.5 mg，在被消耗的基质中约75%转化为12 $\beta$ -羟化物。固定化细胞的羟化反应速度约为游离细胞的一半，活性的持续时间延长到60天，在经济上是补足而有余的。在毛地黄细胞生成的 $\beta$ -甲基地高辛分泌到培养基中有利于连续反应。

但是，除了向细胞外分泌生产物的细胞外，是不向培养基中分泌产物的。必须改变细胞膜的通透性，连续反应才成为可能。此外，在转化反应中，提高膜对基质的通透性，对提高反应的效率也是极为重要的。

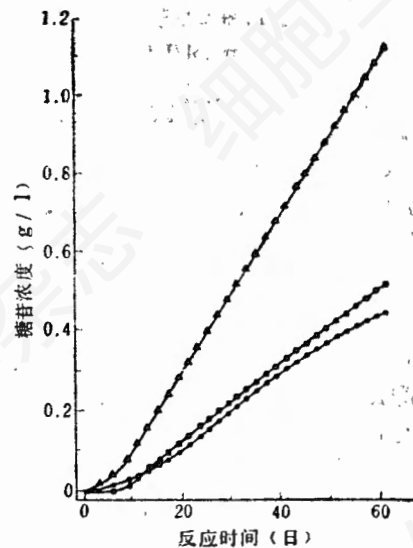


图5 固定化的毛地黄细胞从 $\beta$ -甲基毛地黄毒苷向 $\beta$ -甲基地高辛的转化

[引自 A. W. Alfermann 等. Planta Medica, 40, 221(1980)]

- ▲-▲  $\beta$ -甲基毛地黄毒苷加在培养基中的总量
- 未反应的 $\beta$ -甲基毛地黄毒苷的数量
- 生成的 $\beta$ -甲基地高辛的数量

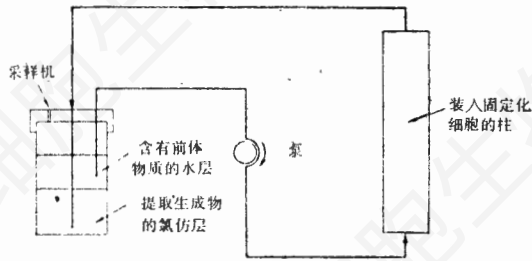


图6 从有机溶剂连续提取生成物的再循环型柱形反应器

[引自 P. Brodelius and K. Mosback, 1983, Adv. Appl. Microbiol, 28, 13]

#### D. 有机溶剂处理促进细胞膜的通透性

改变膜透性的一种方法是在培养基中加入有机溶剂。固定化的长春花细胞从色胺和开环钱子苕进行合成阿吗碱反应，反应液中溶解微量的氯仿，可促进阿吗碱的分泌(图6)。固定化胡萝卜细胞在有25—50%饱和的氯仿存在下，可促进毛地黄毒苷配基的5 $\beta$ -羟化反应<sup>\*5</sup>。

再有一个方法是预先将膜通透性高的细胞(permeabilized cell)固定化(或固定化后进行处理)，用以进行反应的方法<sup>[15,17]</sup>。

1) 将细胞悬浮于10%二甲基砒(50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.5, 1.5 mmol/L 氯化镁, 28 mmol/L  $\alpha$ -巯基乙醇)中30分钟, 水洗后固定。

2) 细胞悬浮液和等量的乙醚振荡处理1分钟后, 不经水洗即固定化用于反应, 或固定化后在50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.5, 含有1.5 mmol/L 氯化镁)中, 用等量乙醚悬浮振荡10分钟后, 直接用于反应。

3) 将水洗的细胞(鲜重2g), 在含有5 mmol/L 乙酸和100  $\mu$ g/ml 的多聚赖氨酸(polylysine)或100  $\mu$ g/ml 的细胞色素C和500  $\mu$ g/ml 鱼精蛋白硫酸的水分(最终量10 ml)中悬浮, 22 $^{\circ}$ C下处理30分钟, 水洗后固定化。用经溶血卵磷脂(lysolcithin 250  $\mu$ g/ml)处理而除去乙酸的水溶液中进行同样的处理。

在长春花细胞经第1)项处理的膜通透性最高, 并且有持续效果。膜的通透性处于被促进状态的持续时间, 固定化细胞(半寿期3—4天)比游离细胞(半寿期数小时)要长。

随着有机溶剂处理日益重要, 开发制备氨基甲酸酯(尿烷)预聚物(urethane prepolymer)这样疏水性高凝胶的可行的固定化方法, 今后是很有希望的。

## 五、反应器

利用固定化植物细胞生产有用物质的试验很多, 用烧瓶小规模地进行分批培养<sup>[1,3,6,18]</sup>, 有用物质工业化生产必须大量的细胞培养, 期望使用各种型式的发酵罐(反应槽)。考虑到固定化细胞与游离细胞相比具有较大的弹性, 利用构造较简单的发酵罐是有可能的。

数量少的连续反应也可考虑采用柱形反应器(图7)<sup>[3,11,19]</sup>和中空纤维反应器的方法。

A. 柱形反应器用于芫皂配基(gitoxigenin)5 $\beta$ -羟化反应中通气方法的讨论

图7所示的柱(高210 mm, 直径34 mm)中装入藻酸钙固定化的胡萝卜细胞, 加满含有15 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L 硝酸钾, 40 mmol/L 氯化钾, 0.1 mmol/L 硫酸镁, 5 mmol/L 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸[2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid], 20 mmol/L 氯化钙, 0.1 mg/l 微量元素溶液(储备液), 5 mg/l 芫皂配基(pH 5.0)的溶液。与反应液交换24小时, 测定芫皂配基的转化率。用空气提升泵从柱上方向下通气, 与

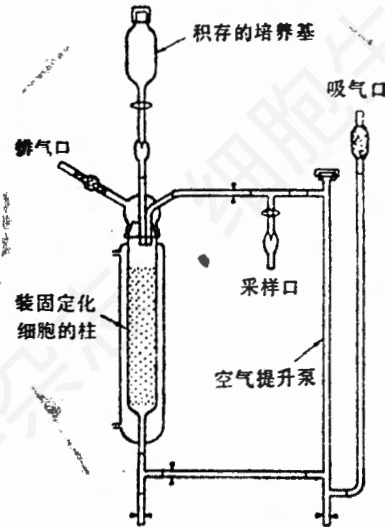


图7 柱形反应器

[引自 I. A. Yeliky and A. Jones 1981, Biotechnol. Lett. 3, 552.]

<sup>\*5</sup> 但是, 在氯仿饱和的培养液中, 未观察到呼吸活性和羟化反应的活性。低浓度乙醇(0.5%)稍促进羟化反应。另一方面, 表面活性剂(0.01%, 0.05%)有的无效果(如 Tween 20), 有的也许有阻碍的作用<sup>[5]</sup>(如十二烷基磺酸钠, 十六烷基三甲基溴化铵)。

单纯的从柱下法通气情况相比较,后者(转化率75—80%)比前者(转化率60—85%)的转化率高。这一柱形反应器中固定化细胞在23天期间维持了羟化反应。

柱形反应器是易受杂菌感染的复杂装置,为能长期进行连续运转必须进一步改良。

固定化细胞在多数情况下具有与游离细胞相同的代谢生产活性,而且其活性具有较稳定的倾向。因此,固定化细胞技术可考虑作为今后物质生产极为有力的手段<sup>[21]</sup>。但是现阶段在反应活性的稳定性和反复利用性方面,还存在一些不足之处。

首先,固定化细胞大多在抑制生长发育的条件下利用的,当然有降低细胞活性反应的倾向。因此每隔一定时期应移入生长发育培养基以保持高活性的状态(再活性化)等等,成为必须的工作<sup>[14]</sup>。

其次,用细胞的变异处理和培养(反应)条件的改良等以增强反应活性,采用的基质和分泌的促进,植物细胞的适应,以及各种适于反应的固体化载体和固定化方法的开发,适于固定化细胞培养的反应器的设计等等,为使固定化植物细胞能广泛反应的应用,要解决的问题还很多。

固定化植物细胞的研究还仅只是一个开端,本节就这一领域的研究作了一些基础的介绍,甚感荣幸。

(本文译自山田康之编著:植物细胞培养マニュアル,122-134页。講談社サイエンスティフィク1984,周荣仁译,周郑校)

### 参 考 文 献

- [1] A. W. Alfermann, I. Schuller and E. Reinhard, 1980 *Planta Medica*, 40, 218.
- [2] P. Brodelius, 1983 *Immobilized Cells and Organelles* (ed. B. Mattiasson), vol. 1, p. 27, CRC Press.
- [3] P. Brodelius, B. Deus, K. Mosbach and M. H. Zenk, 1979 *FEBS Lett.*, 103, 93.
- [4] A. Jones and I. A. Veliky, 1981 *Can J. Bot.*, 59, 2095.
- [5] A. Jones and I. A. Veliky, 1981 *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 84.
- [6] 佐藤文彦,渡边克美,山田康之,血井直规,田中渥夫,福井三郎,日本農芸化学会大会要旨集 p. 543, 1983.
- [7] P. Brodelius and K. Mosbach, 1982 *Advances in Applied Microbiology*, vol. 28, p. 1, Academic Press.
- [8] P. Brodelius and K. Nilsson, 1980 *FEBS Lett.*, 122, 312.
- [9] K. Nilsson, S. Birnbaum, S. Flygare, L. Linse, U. Schröder, U. Jeppsson, P. O. Larsson, K. Mosbach and P. Brodelius, 1983 *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 319.
- [10] A. Tanaka, K. Sonomoto and S. Fukui, Abstr. 7th International Enzyme Engineering Conference, White Haven, USA, p. 107, 1983.
- [11] V. Jirku, T. Mecek, T. Vanék, V. Krumphanzl and V. Kubánek, 1981 *Biotechnol. Lett.*, 3, 447.
- [12] K. Lindsey, M. M. Yeoman, G. M. Black and F. Mavituna, 1983 *FEBS Lett.*, 155, 143.
- [13] C. H. Bornman and A. Zachrisson, 1982 *Plant Cell Reports*, 1, 151.
- [14] 中岛宽樹,血井直规,園元谦二,田中渥夫,福井三郎,佐藤文彦,田山康之,日本醱酵工学会大会要旨集, p. 198 (1983).
- [15] H. Felix, P. Brodelius and K. Mosbach, 1981, *Anal. Biochem.*, 116, 462.
- [16] A. W. Alfermann, H. M. Boy, P. C. Döller, W. Hagedorn, M. Heins, J. Wahl and E. Reinhard, *Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application* (eds. W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk), p. 125, Springer-Verlag 1977.
- [17] P. Brodelius and K. Nilsson, 1983 *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 275.
- [18] P. Brodelius and K. Mosbach, 1982, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, 330.
- [19] I. A. Veliky and A. Jones, 1981, *Biotechnol. Lett.*, 3, 551.
- [20] J. E. Prenosil and H. Pedersen, 1983, *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 323.
- [21] C. A. Lambe and A. Rosevear, 1983 *Proc. Biotech.*, 83, p. 565.