

学校编码: 10384
学 号: 20620061152048

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

纤维素硫酸钠的制备工艺及 NaCS-PDMDAAC
微囊化培养盘基网柄菌的研究

Study on NaCS Preparation and Immobilized Cultivation of
Dictyostelium discoideum in NaCS-PDMDAAC Microcapsules

郑 超

指导教师姓名: 卢英华 教授

专业名称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩日期: 2009 年 6 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
第一章 文献综述.....	1
1.1 生物细胞固定化技术	1
1.2 生物微胶囊	5
1.2.1 生物微胶囊的性能.....	5
1.2.2 生物微胶囊的制备方法.....	7
1.2.3 常用的生物微胶囊体系.....	9
1.2.4 生物微胶囊固定化细胞的应用.....	10
1.3 NaCS-PDMDAAC 生物微胶囊	11
1.3.1 纤维素硫酸钠的制备.....	12
1.3.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的制备方法.....	14
1.3.3 NaCS-PDMDAAC 微胶囊性能优势.....	15
1.3.4 NaCS-PDMDAAC 微胶囊在细胞固定化中的应用.....	15
1.4 盘基网柄菌	17
1.4.1 盘基网柄菌简介.....	17
1.4.2 盘基网柄菌的生命周期.....	17
1.4.3 盘基网柄菌表达系统的优越性和限制性.....	19
1.4.4 盘基网柄菌高密度培养策略.....	20
1.5 人可溶性 Fas 配体 (shFasL)	22
1.6 本论文的研究目的和研究内容	24
第二章 材料与amp;方法	26
2.1 实验试剂和仪器	26
2.2 纤维素硫酸钠的制备方法	26
2.3 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的制备方法	27
2.4 培养基和缓冲溶液	28
2.5 重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 及其悬浮培养方法	31
2.6 盘基网柄菌菌种保存方法	31

2.7 微囊化细胞培养方法	33
2.8 分析方法	34
2.8.1 NaCS 得率的测定	34
2.8.2 NaCS 动力粘度的测定	34
2.8.3 NaCS 取代度的测定	34
2.8.4 NaCS-PDMDAA 微胶囊机械强度的测定	35
2.8.5 细胞密度的测定	35
2.8.6 目标产物 shFasL 浓度的测定	36
2.8.7 葡萄糖测定	36
2.8.8 扫描电镜拍摄	38
第三章 纤维素硫酸钠的制备工艺	39
3.1 以硫酸和正丙醇为反应液制备纤维素硫酸钠	39
3.1.1 反应液中酸醇比的影响	40
3.1.2 反应时间的影响	40
3.2 以硫酸和无水乙醇为反应液制备纤维素硫酸钠	41
3.2.1 以硫酸和无水乙醇为反应液制备纤维素硫酸钠的初步探索	41
3.2.2 制备条件的响应面优化	42
3.2.3 NaCS 制备优化条件验证及重复性实验	46
3.2.4 NaCS 制备中液固比的影响	46
3.2.5 NaCS 制备中反应液的重复利用	47
3.2.6 NaCS 制备中反应液的放大	48
3.3 NaCS 的动力粘度和取代度	49
3.4 本章小结	50
第四章 微胶囊的表征	51
4.1 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的外观	51
4.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊膜结构	51
4.3 微胶囊机械强度的表征	55
4.3.1 NaCS 对 NaCS-PDMDAAC 微胶囊机械强度的影响	55
4.3.2 PDMDAAC 对 NaCS-PDMDAAC 微胶囊机械强度的影响	56

4.3.3 反应时间对 NaCS-PDMDAAC 微胶囊机械强度的影响.....	56
4.4 微胶囊抗剪切力的性能表征	57
4.5 本章小结	58
第五章 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化培养盘基网柄菌	59
5.1 盘基网柄菌的悬浮培养	59
5.2 微胶囊体系和盘基网柄菌的生物相容性	61
5.2.1 NaCS 对盘基网柄菌生长的影响	61
5.2.2 PDMDAAC 对盘基网柄菌生长的影响.....	62
5.2.3 盘基网柄菌在胶囊内部的生长情况.....	63
5.3 微囊化细胞培养条件的优化	67
5.3.1 响应面实验设计	67
5.3.2 响应面优化实验结果.....	68
5.3.3 培养基体积与胶囊体积之比对细胞生长的影响.....	72
5.4 微囊化培养盘基网柄菌表达 shFasL.....	73
5.4.1 利用复杂 HL-5C 培养基表达 shFasL.....	73
5.4.2 利用全合成 SIH 培养基表达 shFasL.....	74
5.5 微囊化盘基网柄菌的多批次培养	75
5.5.1 微囊化盘基网柄菌在复杂 HL-5C 中的多批次培养	76
5.5.2 微囊化盘基网柄菌在全合成 SIH 中的多批次培养	77
5.6 鼓泡塔生物反应器培养固定化细胞	78
5.6.1 鼓泡塔生物反应器的结构.....	79
5.6.1 鼓泡塔生物反应器培养微囊化盘基网柄菌.....	79
5.7 本章小结	80
第六章 结论与展望	82
参 考 文 献.....	85
附 录.....	92
在读期间发表论文	95
致 谢.....	96

CONTENTS

Abstract	I
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Cell immobilization technology	1
1.2 Biomicrocapsules	5
1.2.1 Properties of biomicrocapsules	5
1.2.2 Preparation of biomicrocapsules	7
1.2.3 Different biomicrocapsule systems	9
1.2.4 Application of biomicrocapsules in cell cultivation.....	10
1.3 NaCS-PDMDAAC microcapsule system	11
1.3.1 Preparation of NaCS	12
1.3.2 Preparation of NaCS-PDMDAAC microcapsules	14
1.3.3 Advantages of NaCS-PDMDAAC microcapsules	15
1.3.4 Application of NaCS-PDMDAAC microcapsules in cell cultivation.....	15
1.4 Introduction of <i>Dictyostelium discoideum</i> (<i>D. discoideum</i>)	17
1.4.1 Characterization of <i>D. discoideum</i>	17
1.4.2 Life cycle of <i>D. discoideum</i>	17
1.4.3 Advantages and limitations of <i>D. discoideum</i> expression system	19
1.4.4 High cell density cultivation of <i>D. discoideum</i>	20
1.5 Soluble human Fas ligand (shFasL)	22
1.6 Contents and purpose of the thesis	24
Chapter 2 Materials and methods	26
2.1 Materials and Instruments	26
2.2 Preparation of NaCS	26
2.3 Preparation of NaCS-PDMDAAC microcapsules	27
2.4 Media and buffer	28
2.5 Recombinant <i>D. discoideum</i> AX3-pLu8 and its suspension culture	31
2.6 Strain preservation of <i>D. discoideum</i>	31
2.7 Encapsulated cell cultivation	33
2.8 Analysis methods	34
2.8.1 Yield of NaCS	34
2.8.2 Viscosity of NaCS	34
2.8.3 Substitution degree of NaCS	34

2.8.4 Mechanical strength of NaCS-PDMDAAC microcapsules	35
2.8.5 Cell counting	35
2.8.6 Analysis of shFasL	36
2.8.7 Analysis of glucose concentration.....	36
2.8.8 Sample preparation of scanning electron microscopy	38
Chapter 3 Preparation of NaCS	39
3.1 Sulphuric acid and n-propyl alcohol as reaction solution.....	39
3.1.1 Effect of acid and alcohol proportion.....	40
3.1.2 Effect of reaction time.....	40
3.2 Sulphuric acid and alcohol as reaction solution.....	41
3.2.1 Preliminary study	41
3.2.2 RSM optimization of preparation conditions.....	42
3.2.3 Verification of the optimized conditions.....	46
3.2.4 Effect of liquid to solid ratio on NaCS preparation	46
3.2.5 Reuse of reaction solution.....	47
3.2.6 Scale-up preparation	48
3.3 Kinetic viscosity and substitution degree of NaCS	49
3.4 Conclusions.....	50
Chapter 4 Characterization of NaCS-PDMDAAC microcapsules ...	51
4.1 Appearance of NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	51
4.2 Membrane structure of NaCS-PDMDAAC microcapsule.....	51
4.3 Mechanical strength of NaCS-PDMDAAC microcapsules	55
4.3.1 Effect of NaCS on the mechanical strength.....	55
4.3.2 Effect of PDMDAAC on the mechanical strength.....	56
4.3.3 Effect of reaction time on the mechanical strength.....	56
4.4 The shearing stress resistivity of microcapsules.....	57
4.5 Conclusions.....	58
Chapter 5 Immobilized cultivation of <i>D. discoideum</i> in	
NaCS-PDMDAAC microcapsules	59
5.1 Suspended cultivation of <i>D. discoideum</i>	59
5.2 Biocompatibility of <i>D. discoideum</i> and NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	61
5.2.1 Effect of NaCS on the growth of <i>D. discoideum</i>	61
5.2.2 Effect of PDMDAAC on the growth of <i>D. discoideum</i>	62

5.2.3 Growth of <i>D. discoideum</i> in the microcapsules	63
5.3 Optimization of encapsulated cultivation conditions of <i>D. discoideum</i>.....	67
5.3.1 RSM design.....	67
5.3.2 Results of the RSM optimization.....	68
5.3.3 Effect of different mass of microcapsules on encapsulated cell growth	72
5.4 Cultivation of encapsulated <i>D. discoideum</i> for the expression of shFasL.....	73
5.4.1 Expression of shFasL on complex HL-5C medium.....	73
5.4.2 Expression of shFasL on synthetic SIH medium	74
5.5 Repeated-batch cultivation of <i>D. discoideum</i> in microcapsules	75
5.5.1 Repeated-batch cultivation on complex HL-5C medium	76
5.5.2 Repeated-batch cultivation on synthetic SIH medium.....	77
5.6 Encapsulated cultivation of <i>D. discoideum</i> in bioreactors.....	78
5.6.1 Structure of the bubble column bioreactor.....	79
5.6.1 Encapsulated cultivation of <i>D. discoideum</i> in bubble column.....	79
5.7 Conclusions.....	80
Chapter 6 Conclusions and prospects	82
References	85
Appendix	92
Publications during graduate study	95
Acknowledgements	96

摘 要

本文的研究目的是利用纤维素硫酸钠-聚二甲基二烯丙基氯化铵 (NaCS-PDMDAAC) 生物微胶囊系统固定化培养重组盘基网柄菌, 以提高其细胞密度并高通量表达目的蛋白。由于纤维素硫酸钠 (NaCS) 尚未商品化, 故本文先对纤维素硫酸钠的制备工艺进行了研究。在成功制备出纤维素硫酸钠后, 对 NaCS-PDMDAAC 微胶囊进行了一些表征, 然后将其应用到细胞培养中。

首先利用硫酸和正丙醇作为反应液制备纤维素硫酸钠。为了减小纤维素硫酸钠的制备成本, 用无水乙醇代替了反应液中的正丙醇。利用响应面实验设计, 在 100 mL 反应液体系下, 以制备胶囊 (2% NaCS 溶液滴加到 6% PDMDAAC 溶液中, 反应 10 min) 的机械强度为响应值, 优化了反应液中酸醇比和反应时间的影响, 得到制备纤维素硫酸钠的最佳条件为酸醇比 1.51:1, 反应时间 60.9 min, 相应的微胶囊机械强度为 463 g。为了进一步降低制备成本, 对反应液的重复利用进行了研究, 发现反应液可以重复利用 3 次。将制备纤维素硫酸钠的反应体系放大到 1000 mL, 取得了良好的放大效果。对最佳条件下制备得到的纤维素硫酸钠的取代度和粘度进行了测量, 其取代度为 0.29, 而 4% 的 NaCS 溶液动力粘度高达 489 mPa.s。

在成功制备出纤维素硫酸钠后, 对 NaCS-PDMDAAC 微胶囊做了一些表征。对微胶囊的直径和膜厚进行了测量, 并对膜的结构进行了扫描电镜的拍摄。考察了影响微胶囊机械强度的因素, 发现在胶囊球形度良好的情况下, 其机械强度可高达 2010 g, 远远高于文献报导。对微胶囊在长时间振荡中的抗剪切性能进行了研究, 将胶囊放在摇瓶中置于摇床上 150 rpm 振荡时, 在 44 天内未出现破碎。

利用 NaCS-PDMDAAC 微胶囊体系对表达人类可溶性 Fas 配体 (shFasL) 的重组盘基网柄菌进行了固定化培养。首先考察了微胶囊体系和盘基网柄菌的生物相容性, 发现 NaCS 对细胞的生长有一定的促进作用, 而且细胞在微胶囊内生长良好, 表现出较好的生物相容性。对微胶囊应用于盘基网柄菌固定化培养的制备条件进行了优化, 得到的最佳条件是 NaCS 浓度 3.59%, PDMDAAC 浓度 6.18%, 反应时间 15.4 min。在优化条件下, 分别在复杂 HL-5C 培养基和全合成 SIH 培养基中对盘基网柄菌进行了固定化培养, 细胞密度分别达到了 $1.61 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 和

$1.92 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ，是悬浮培养时的 6~8 倍，胶囊内产物 shFasL 的浓度分别达到了 $1057 \mu\text{g L}^{-1}$ 和 $1216 \mu\text{g L}^{-1}$ ，是悬浮培养时的 4~7 倍。对盘基网柄菌在固定化条件下的多批次培养进行了研究，在细胞生长到一定时期后，将固定化细胞进行回收，并转移到新鲜的培养基中培养，结果细胞出现了二次生长，整个培养过程可以持续 20~30 天，最高细胞密度达到了 $2.02 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ，最大产物浓度达到 $1304 \mu\text{g L}^{-1}$ 。最后，利用鼓泡塔生物反应器在 HL-5C 培养基中对固定化细胞的培养进行了初步的放大。结果表明细胞在鼓泡塔中的生长速度比摇瓶中略慢，但是可以达到比摇瓶略高的细胞密度，为 $1.73 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 。

关键词：盘基网柄菌；人类可溶性 Fas 配体；纤维素硫酸钠；NaCS-PDMDAAC 微胶囊；固定化细胞培养

Abstract

In this work, NaCS (sodium cellulose sulphate)-PDMDAAC (poly dimethyl diallyl ammonium chloride) microcapsule immobilization system was applied to cultivate recombinant *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*), in order to raise its cell density and increase the product concentration. However, the NaCS has not been commercialized, thus its preparation process, characterization of NaCS-PDMDAAC microcapsules and application of the microcapsules in cell culture were investigated.

In NaCS preparation, sulfate acid and n-propyl alcohol were used as the reaction solution according to the report at first. Then the n-propyl alcohol was replaced by alcohol to reduce the preparation cost. The response surface methodology (RSM) was employed to optimize the NaCS preparation condition. Two factors, i.e. the proportion of sulfate acid to alcohol in reaction solution and the reaction time were considered with the response of mechanical strength of the NaCS-PDMDAAC microcapsules. In general, higher mechanical strength of the NaCS-PDMDAAC microcapsules indicates better quality of the prepared NaCS. The optimized results were as follows: the ratio of acid to alcohol 1.51:1, and the reaction time 60.9 min. After the optimization of the preparation conditions, the reuse of the reaction solution was studied in order to reduce the preparation cost as much as possible, and it was found that the reaction solution could be reused for three times. The reaction system was scaled up to 1000 mL. After high quality NaCS has been prepared successfully, its substitution degree and viscosity were measured, which was 0.29 and 489 mPa.s (with 4% NaCS solution), respectively.

The NaCS-PDMDAAC microcapsules were characterized. The diameter of the microcapsules and the membrane thickness were measured. Scan electron microscopy was employed to investigate the membrane structure. The factors influencing the microcapsule mechanical strength were investigated, and the results show that the mechanical strength could be

obtain as high as 2010 g while the capsules remained sphere shape, which was much higher than that ever reported. In order to investigate their resistivity to shearing force, the microcapsules were shaken in a shake flask at 150 rpm on a rotating shaker, and the results indicate that they were not broken within 44 days.

Subsequently, the NaCS-PDMDAAC microcapsule system was applied in immobilized cultivation of *D. discoideum* for production of soluble human Fas ligand (shFasL). The biocompatibility of the microcapsules with *D. discoideum* cells was studied at first. It was found that the NaCS could promote the cell growth, and the cells grew very well in the microcapsules. Then the microcapsule preparation conditions for the immobilized cultivation of *D. discoideum* were optimized as follows: NaCS 3.59%, PDMDAAC 6.18%, and reaction time 15.4 min. The encapsulated *D. discoideum* cells were cultivated on complex HL-5C and synthetic SIH medium, and cell densities up to $1.61 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ and $1.92 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ were reached, respectively, which were 6~8 times as much as those could be obtained in suspension culture. In the meanwhile, shFasL concentration of $1057 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1216 \mu\text{g L}^{-1}$ were accumulated on these two medium, respectively, which were 4~7 times higher than those could be achieved in suspension culture. Repeated-batch cultivation of immobilized *D. discoideum* in microcapsules was also studied. The repeated-batch cultivations were carried out by replacing the spent medium with fresh one when cell density reached a maximum stationary level in the microcapsules. It appeared diauxic growth during a cultivation period of 20~30 days. Finally, The cultivation of immobilized *D. discoideum* cells was scaled up by in a bubble column reactor. The results show that a considerable high cell density of $1.73 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ could be achieved, although the cells grew a bit slower in the bubble column than in the shake flask culture.

Keywords: *Dictyostelium discoideum*; soluble human Fas Ligand; sodium cellulose sulphate; NaCS-PDMDAAC microcapsule; immobilization

第一章 文献综述

基因技术的逐步成熟和广泛应用,使各种人类疾病如癌症、肿瘤、高血压和艾滋病的治疗成为可能^[1]。应用基因工程技术构建重组细胞,生产目标产物已成为现代生物技术中最活跃的研究方向之一,并被广泛应用于生产异源蛋白质及代谢工程等领域^[2]。盘基网柄菌作为一个前景广阔的真核表达系统,在表达(糖)蛋白方面具有很多优越性,自90年代已成功用于表达多种需要翻译后修饰的重组药用蛋白^[3]。生物固定化技术作为生物技术的重要一支,广泛应用于亲和分离、固相免疫分析、药物载体、生物反应器、生物传感器等诸多领域^[4]。近年来生物固定化技术在微生物培养中的应用研究非常活跃,通过控制载体的物化特性和与细胞的结合方式,可提高菌体密度和稳定性,优化菌体生长的微环境,更好地表达目标产物。

1.1 生物细胞固定化技术

固定化技术是指通过采用化学或物理的方法将酶或细胞等生物催化剂限制在一定的空间范围内,保持其固有的生物催化活性,并能连续重复使用的技术。固定化技术不仅具有小型高效、稳定性好、可重复并连续使用、产物分离提取容易、操作稳定性好和易实现自动化控制等优点,而且还能克服游离酶或细胞对环境敏感、性质不稳定、易失活或死亡等一些缺点,因而,使得化工过程中非均相催化技术的优点在生物工程中得到充分的发挥。固定化细胞与固定化酶同被称为固定化生物催化剂。固定化细胞既具有细胞的特性,又具有固相催化剂的功能,因此它比固定化酶的应用更为普遍,对传统发酵工艺的技术改造有非常重要的影响。

理想的固定化方法应当具备的条件:(1)合适的粒径和孔隙度;(2)固定化条件温和,生物相容性好;(3)具有良好的物理、化学稳定性,能够耐受长时间的反应;(4)单位体积固定的生物质尽可能多,以利于高效反应。

从上世纪初开始出现固定化方法以来,到现在已经开发出了很多种生物固定化方法,主要可以分为吸附法、包埋法、交联法、化学共价法、逆胶束固定化法

等^[5]。常用的各种固定化方法的比较见表 1.1。

表 1.1 常见的各种固定化方法的特点^[5]
Table 1.1 Characters of different kinds of immobilizations

特点	吸附	离子/共价交联	包埋	微胶囊固定化
负载能力	低	高	高	高
机械保护	无	有	有	有
细胞活性	高	高	低	高
制备	简单	简单	简单	复杂
扩散限制	无	有	有	有
细胞泄漏	有	无	无	无

1.1.1 吸附法

吸附剂载体与酶或细胞以一定比例混合，通过范德华力、氢键、静电力等非共价键结合，酶或细胞被固定于载体表面与底物或培养基接触，反应效率、细胞密度和稳定性有显著提高。目前常用的吸附剂载体有：各种矿物质、纤维素粉、离子交换剂、胶原蛋白等^[5]。吸附法简单经济，固定化条件温和，扩散限制小，但是吸附剂对酶的非特异性吸附会引起蛋白质失活，固定生物物质相对于其他固定化方法较低，结合作用受 pH 值、温度或离子强度影响较大，对细胞没有抗机械剪切的保护。由于结合力较弱，细胞或酶易与吸附剂脱离。

Komaraiah^[6]等人通过诱导和原位吸附的方法使用 Ca-alginate 载体固定化 *Plumbago rosea* 细胞生产白花丹素 (plumbagin)，当细胞装载率为载体体积的 20% 时，plumbagin 获得最高产量 92.13 mg g^{-1} 细胞干重，是普通固定化方法的 5.7 倍。Oztop^[7]等人通过吸附的方法把啤酒酵母细胞固定在丙烯酰胺凝胶上，乙醇的产量明显上升。

1.1.2 交联法

交联法是采用双功能或多功能基团试剂与酶或细胞表面的基团反应从而达到固定的目的。常采用的试剂有戊二醛、甲苯二异氰酸酯、乙烯-马来酸酐共聚物等。使用聚合物处理细胞悬液，会在细胞之间形成桥使之絮结。通常细胞活性

高，但机械稳定性差，易发生细胞泄漏，存在扩散限制。

Angelova^[8]等人采用辐射交联的预聚体固定化培养 *Humicola lutea* 120-5 菌株生产酸性蛋白酶，在预聚体浓度为 20%，循环周期为 56 h 时，可获得最大凝胶体积的蛋白酶，连续培养时间和酶活分别为普通悬浮培养的 10~12 倍和 18 倍。

1.1.3 化学共价法

化学共价法是通过酶或细胞表面的氨基、羧基、羟基、咪唑基等活性基团和非水溶性载体的活性基团以共价键结合达到固定化目的。化学共价法的主要反应有酰化反应、烷基化反应、溴化氰法和重氮化反应等。采用化学共价法固定结合牢固，稳定性好，但是操作复杂，反应条件剧烈，易引起酶失活，不能用于活细胞的固定化。与交联法不同的是化学共价法采用生物活性物质与载体连接，而交联法是活性物质之间的相互连接。

1.1.4 逆胶束固定法

利用逆胶束固定化酶进行有机相催化也是一种重要的固定化方法，与固体载体不同，该方法利用表面活性剂等两性分子在有机相中自发形成聚集体，其非极性端向外伸展进入有机相主体，而极性端向内形成内核，酶等水溶液可以进入这种逆胶束的极性核中，形成油包水型乳状液。目前该方法在有机催化中应用很广，如对映体的拆分，甾体的氧化还原等^[9]。

1.1.5 包埋法

包埋法是通过凝胶或者胶囊将酶或细胞包裹在狭小的空间内，底物和产物能够自由扩散，从而实现固定化的方法。相对于其他生物固定化方法，酶和细胞不参与反应，因此具有条件温和、对细胞本身的依赖性小、稳定性高等优点，是应用最为广泛的固定化方法之一。包埋法固定化培养微生物细胞的应用见表 1.2。根据所用材料和方法的不同又可分为凝胶包埋法和微胶囊法两种。

表 1.2 包埋法固定化培养微生物细胞^[10]
Table 1.2 Cell cultivations in entrapment

菌种	载体	应用
<i>S. cerevisiae</i>	k-角叉菜胶或	将葡萄糖转化成乙醇

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库