

# 两相分配生物反应器

## ——浊点系统在生物转化中的应用

王志龙

(上海交通大学药学院, 上海 200030)

**[摘要]** 利用两相分配生物反应器可以控制底物由非水相向水相释放, 增加底物的溶解度和解除底物对微生物的抑制, 保护产物降解, 降低下游分离费用; 论述了两相分配生物反应器的基本原理和发展概况, 并以胆固醇边链切除生物转化为例, 介绍了新开发的浊点系统两相分配生物反应器的巨大潜力。

**[关键词]** 两相分配; 生物转化; 非离子表面活性剂; 浊点系统; 生物反应器

**[中图分类号]** Q81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2005)05-0073-06

### 1 引言

在生命科学的发展, 特别是基因工程的发展中, 生物催化剂在价格上与化学催化剂具有可比性<sup>[1]</sup>, 生物方法成为合成手性化学精细品和药物的关键技术<sup>[2]</sup>。为了提高生物过程的水平, 人们首先考虑的是菌种选育或构建基因工程菌, 往往忽略了生物反应器工程问题中必须考虑的工艺变化和过程优化, 一些生物反应过程, 如生物转化、生物降解等, 在常规介质中常面临底物在水溶液中溶解度小, 底物(产物)抑制微生物生长、产物进一步降解等实际困难。介质工程是在水溶液中加入具有生物相容性和本身不生物降解的组分以排除前面提到的问题, 原位产物去除(*in situ product removal*)近年来受到高度重视<sup>[3]</sup>, 其中两相分配生物反应器是介质工程中解决上述问题的有力工具之一<sup>[4]</sup>。

### 2 两相分配生物反应器的基本原理

两相分配系统常用于分离科学领域, 20世纪70年代兴起的两相分配生物反应器受到人们的高度重视<sup>[5]</sup>, 双水相系统<sup>[6]</sup>, 甚至超临界系统等应用于酶、全细胞生物反应随后都有报道<sup>[7]</sup>。其基本原理是, 在两相系统中, 一相是由水溶液组成的

生物反应相, 生物反应在反应相或两相界面进行; 另一相是以添加的成相组分为主的萃取相, 对底物(产物)两相分配, 生物转化, 的溶解性。其基本原理如图1所示。

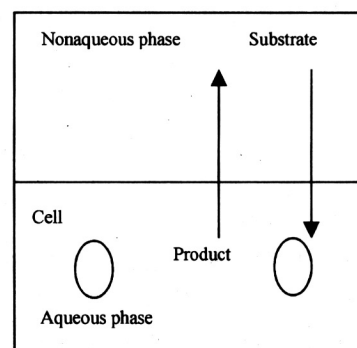


图1 两相分配生物反应器的示意图

Fig.1 Schematic diagram of a two-phase partitioning bioreactor

#### 2.1 底物的缓控释原理

疏水性底物在非水溶液相中具有的溶解性较好, 而在水溶液相中的溶解性较差。生物反应在水溶液相或两相界面进行, 底物由非水溶液相通过两相界面传递到水溶液相发生反应, 底物消耗速率由底物的传递速率和生物反应速率的相对大小控制。

非水溶液相充当底物的储存库,一方面增加底物溶解度,可实现高底物浓度的生物反应;另一方面通过缓控释作用使生物反应相的底物浓度维持在低于生物催化剂的中毒水平,解除了底物对生物催化剂的抑制作用。

## 2.2 原位产物去除

在生物转化等生物反应过程中,产物和底物的性质往往非常相似,因此产物和底物具有非常相似的分配规律。产物被萃取而不平衡分配于非水溶液相,在进行生物反应的水溶液相浓度很小。故两相分配生物反应器具有以下优势:

1) 产物的不均匀分配,移动了反应的化学平衡,使反应向有利于产物生成的方向进行。

2) 产物的原位去除,解除了产物对生物催化剂的抑制作用,同时保护了产物被生物催化剂进一步降解。

3) 产物浓缩于非水溶液相,使下游过程的处理量减少,降低了下游分离工程的费用。

## 3 两相分配生物反应器的发展概况

选择成相组分是开发两相分配生物反应器的关键。主要因素有成相组分的生物相容性、本身的生物降解性、底物(产物)的溶解性、成相组分的价格等。然而同一两相分配生物反应器很难同时满足这些条件,不同的两相分配生物反应器各有优势。有机溶剂两相系统、双水相系统研究较多。

### 3.1 有机溶剂两相系统

有机溶剂两相系统在分离领域的应用已相对成熟,但两相生物反应器,因有机溶剂是经典的杀菌剂,存在生物不相容性,会导致生物催化剂失活。使人们本能地想到有机溶剂与水的极性相差越远,对生物催化剂的损伤越大。事实上正好相反,原因在于水不溶性的有机溶剂和水分相后,水相中溶解的有机溶剂浓度很低,生物催化剂暴露于有机溶剂的机会远远小于水溶性均质有机溶剂。有机溶剂在水中的溶解度成为选择有机介质的重要依据,如有机溶剂在水中的溶解性与  $\log P$  ( $P$  是溶剂在辛醇-水中的分配系数) 存在着很好的相关性, Laane 等采用  $\log P$  关联了生物催化剂与有机溶剂的生物相容性,建议采用  $\log P > 4$  的有机溶剂<sup>[8]</sup>。

然而大量的实验事实不符合  $\log P$  规则。有机溶剂在两相分配系统中以两种方式存在:以分子状态存在对生物催化剂产生分子毒性;以溶剂相存在

对生物催化剂产生相毒性<sup>[9]</sup>。在全细胞微生物转化中,有机溶剂的细胞毒性存在另一种机理<sup>[5]</sup>,细胞膜的生物活性是保持微生物催化活性的关键,溶剂分子可能对细胞膜产生毒性。有的甚至认为<sup>[10]</sup>:在有机溶剂两相分配系统中,水相中有机溶剂的溶解度与细胞毒性基本上是不相关的,而只在有机相和细胞之间的传质起作用。细胞毒性主要有有机溶剂在细胞膜中的溶解度相关。

有机溶剂两相分配系统不但存在生物相容性问题,而且存在培养基中养分去极化,降低了反应性;高度的两相不均匀分配,导致发生反应的溶液相中底物的浓度很低,降低了反应速率;有机溶剂的挥发性,增加了环境、安全的复杂性等具体问题。目前主要应用于酶的催化反应。

### 3.2 双水相系统

混合的多聚物溶液在一定条件下会形成两相或多相。Albertsson 采用混合的 PEG (polyethylene glycol) 和 DEX (dextran) 溶液形成的两相分配系统应用于分离科学<sup>[11]</sup>。之后人们以盐溶液替代价格昂贵的 DEX 形成两相系统,如  $\text{PO}_4^{3-}$ -PEG 系统、 $\text{SO}_4^{2-}$ -PEG 系统等。双水相系统提供了极性梯度差别较小的两相,为分离极性相近的组分提供了方便,成为分离生物大分子物质的有力工具。双水相系统应用于生物转化,因其两相含水率高、极性和水相近,具有环境相对温和的特点,克服了有机溶剂两相分配系统生物相容性差的缺点。在多聚物-多聚物系统的微生物转化中,系统除对细胞聚集、细胞表面增水性等有影响外,对微生物生长基本没有影响。但高浓度系统中粘度太高使氧传递成为速率控制因素<sup>[12]</sup>。

双水相系统溶剂价格高是限制其在工业中应用的主要原因。系统的复杂性也使生物催化剂活性、产品分配等缺乏有效的分析手段和理论模型。虽然 PEG-DEX 系统和 PEG-盐系统在酶催化反应中的应用都有文献报道,但全细胞生物过程目前主要采用的还是多聚物-多聚物系统。

## 4 浊点系统

非离子表面活性剂溶液不同于离子型表面活性剂溶液的特征之一,是达到一定温度或有添加物存在的条件下,溶液自动分相而形成表面活性剂浓度很小的稀相和富含表面活性剂的凝聚层相 (coacervate phase)。稀相表面活性剂的浓度高于或

与临界胶束浓度一致。溶液分相时的温度称为浊点，该系统称为浊点系统 (cloud point system, CPS)。Watanabe 首先提出基于非离子表面活性剂溶液的分相性质而发展起来的浊点萃取技术 (cloud point extraction, CPE)<sup>[13]</sup>。Bordier 成功地将这一技术引入生物物质的分离<sup>[14]</sup>。CPE 已广泛应用于分析化学、分离科学领域。CPS 不但具有分相平衡快、能耗少等优点，而且条件温和、环境友好。随着生物科学的发展和人们对环境、能源问题的高度重视，CPE 越来越受到人们的重视<sup>[15,16]</sup>。

CPS 中凝聚层相的表面活性剂对疏水性物质的增溶能力明显高于胶束溶液中的表面活性剂。在 Brij 35 - 苯酚水溶液系统中<sup>[17]</sup>，凝聚层相与胶束溶液中的增溶量如表 1 所示。

表 1 苯酚和 Brij 35 物系室温下的基本常数

Table 1 The basic constants of phenol and Brij 35 system at room temperature

Phases	Solubilization equilibrium constant, $K/L \cdot \text{mol}^{-1}$	Quantum of solute associated to per mole of surfactant, $q/\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
Dilute phase	8.2	2.9
Coacervate phase	9.7	7.5

疏水性底物在凝集层相的增溶规律还与表面活性剂胶束的结构有关。在  $C_{12}E_7$  - 苯酚水溶液系统中<sup>[18]</sup>，凝集层相的表面活性剂可形成  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_a$  型等胶体，其增溶规律如图 2 所示。 $L_1$  相胶体的增溶规律与表面活性剂胶束溶液一致，苯酚的增溶可以用 Langmuir 吸附平衡描述。随 CPS 中苯酚浓度的增加， $L_1$  型胶体逐步转变为  $L_a$ ,  $L_2$  型胶体，凝集层相的增溶量逐渐变大而偏离 Langmuir 吸附平衡。

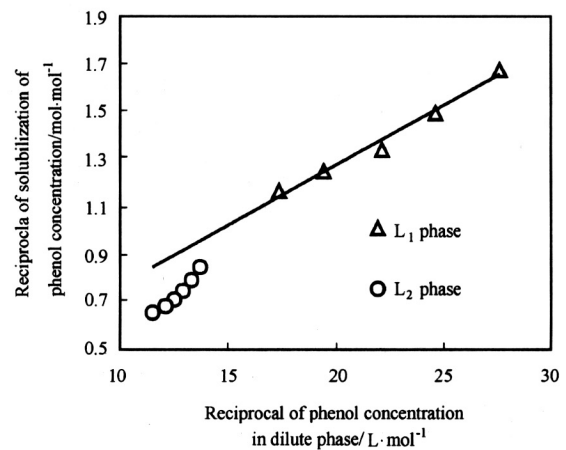


图 2  $C_{12}E_7$  和苯酚物系中稀相苯酚浓度对凝聚层相增溶量的 Langmuir 图

Fig.2 A plotting of Langmuir of phenol concentration in dilute and solubilization in coacervate phase of  $C_{12}E_7$  and phenol system

### 5 浊点系统在生物转化中的应用

雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (androst-1, 4-diene-3, 17-dione, ADD) 和雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (androst-4-ene-3, 17-dione, -AD) 是甾体医药品的重要中间体<sup>[19]</sup>。传统中间体的生产工艺是采用薯蓣皂甙类自然资源为原料的化学合成途径。由于自然资源逐渐匮乏，化学合成工艺污染严重，人们趋向于采用微生物转化广泛存在于动、植物体内的甾醇。如植物甾醇中的  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇，羊毛脂中的胆固醇等。除豆甾醇边链 24 位含有双键可采用化学方法利用外，在开发微生物转化工艺之前，其余都被当作废物而未被利用。利用 *Mycrobacterium* sp. NRRL B-3683 进行胆固醇的边链切除生产 ADD 和 4-AD 的途径被视为一条重要的资源再利用和绿色化工途径，如图 3 所示。

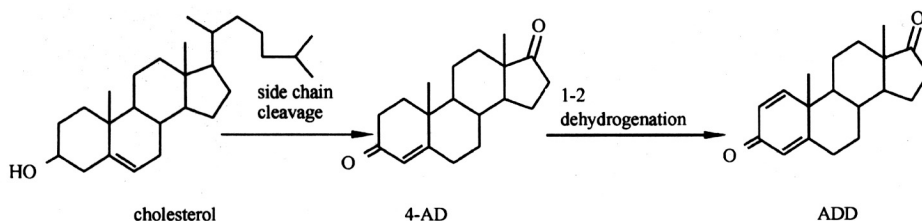


图 3 生物转化胆固醇生成 ADD 和 4-AD 的途径

Fig.3 The pathway of bioconversion of cholesterol to ADD and 4-AD

该工艺的开发依赖于筛选到能将谷甾醇、豆甾醇和胆固醇等动、植物甾醇转化为关键中间体 4-AD 和 ADD 的微生物菌株及开发能用于大规模工业化生产的微生物转化技术。微生物转化技术面临的主要问题有底物和产物的溶解性极差；底物和产物都对微生物产生毒性；产物被微生物进一步降

解<sup>[20]</sup>。使常规介质中生物转化的底物浓度和转化率很低，成为两相分配生物反应器研究的经典例子之一，如有机溶剂两相系统<sup>[21,22]</sup>、双水相系统<sup>[23]</sup>等。

### 5.1 浊点系统的筛选<sup>[24]</sup>

选择了三类非离子表面活性剂中的 14 种进行筛选，其基本性质如表 2 所示。

表 2 非离子表面活性剂的基本性质

Table 2 The basic properties of nonionic surfactants

Nonionic surfactant	General structure*	Hydrophobic group	CMC/mmol	HLB	CP/℃)
Polyoxyethylene Alcohols					
Brij 30	C <sub>12</sub> E <sub>4</sub>	Dodecanol	0.02~0.06	9.5	4
	C <sub>12</sub> E <sub>7</sub>	Dodecanol	0.07	12.5	65
Brij 35	C <sub>12</sub> E <sub>23</sub>	Dodecanol	0.09	16.9	>100
Brij 56	C <sub>16</sub> E <sub>10</sub>	Blubber		12.9	64~69
Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters					
Span 20	C <sub>12</sub> S <sub>6</sub>	Lauric acid		8.6	
Span 40	C <sub>16</sub> S <sub>6</sub>	Palmitic acid		6.7	
Span 60	C <sub>18</sub> S <sub>6</sub>	Stearic acid		4.7	
Span 80	C <sub>18</sub> S <sub>6</sub>	Oleic acid		4.3	
Tween 20	C <sub>12</sub> S <sub>6</sub> E <sub>20</sub>	Lauric acid	0.04~0.06	16.7	
Tween 40	C <sub>16</sub> S <sub>6</sub> E <sub>20</sub>	Palmitic acid	29 <sup>a</sup>	15.6	
Tween 60	C <sub>18</sub> S <sub>6</sub> E <sub>20</sub>	Stearic acid	27 <sup>a</sup>	14.9	
Tween 80	C <sub>18</sub> S <sub>6</sub> E <sub>20</sub>	Oleic acid	0.01~0.02	15	
Alkylphenol Ethoxylate					
Triton X-100	C <sub>8</sub> ΦE <sub>9-10</sub>	Octylphenol	0.2	13.5	64
Triton X-114	C <sub>8</sub> ΦE <sub>7-8</sub>	Octylphenol	0.3	12.8	22

注 \* S<sub>6</sub>, sorbitan ring; En, the number of ethylene oxide group; Cn, the number of carbons in the alkyl chain; Φ, phenolic ring. a: mg/L

微生物在含表面活性剂的转化介质中产生 ADD 的最终产物浓度可用作筛选非离子表面活性剂的依据。图 4 是微生物在一定浓度梯度下不同表面活性剂溶液中生物转化 7 天的结果。在高表面活性剂浓度下，Triton X-114 在微生物转化条件下能形成 CPS，此转化系统中 ADD 的转化能力最高，而与 Triton X-114 同一系列的表面活性剂，Triton X-100 溶液中 ADD 的转化能力很低。CPS 中凝聚层相的微观乳浊液结构可能是生物相容性得到改善的根本原因。CPS 中两相分配的萃取作用一方面排除了底物、产物对微生物的抑制作用，另一方面保护了产物的进一步降解<sup>[25,26]</sup>。

### 5.2 生长细胞和静息细胞的生物转化<sup>[24, 26]</sup>

为了强化 CPS 的增溶能力，选用与 Triton X-114 同一类的表面活性剂，Triton X-100 形成混和表面活性剂胶束溶液以调节表面活性剂溶液的浊点和增溶能力，确立了质量比为 1:1 的优化系统。如表 3 所示，CPS 中生长细胞生物转化和其他

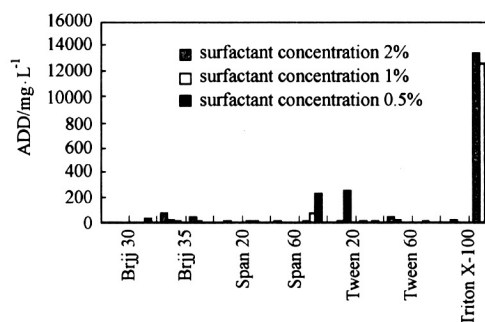


图 4 不同表面活性剂介质中生物转化培养的最终产物浓度

Fig. 4 The final product concentration in different surfactant-amended transformation culture

两相分配生物反应器相比，转化率和底物浓度（对应着最终产物浓度）都有很大程度的提高，表明浊点两相分配生物反应器是提高疏水性底物生物转化效率的有效方法。

静息细胞是不生长的活细胞，基本上保持了生

长细胞的酶活性。如果生物转化和细胞生长是独立的，采用静息细胞比生长细胞实现生物转化更具有优势：底物、产物对细胞生长的抑制可排除，能实现高细胞浓度下的生物转化，缩短转化周期；细胞生长和生物转化过程可独立优化；生物催化剂（细胞）可回收；生物转化可在自然条件下操作等<sup>[27]</sup>。

以植物甾醇为底物的静息细胞生物转化结果如图5所示，静息细胞生物转化保持了CPS中生物转化的优势，同时具有静息细胞生物转化的优点，进一步显示了CPS作为新型两相分配生物反应器的工业应用前景。

表3 微生物转化系统的基本参数

Table 3 The basic parameters of bioconversion system

Substrate	Product	Medium system	Microorganism	Substrate concentration /g·L <sup>-1</sup>	Conversion efficiency/%	Reference
Cholesterol	ADD, 4-AD	Two-phase aqueous system	<i>Mycobacterium</i>	1	80	24
Sitosterol	4-AD	Aqueous-organic two-phase system	Immobilization <i>Mycobacterium</i>	5	89	22
Sitosterol	4-AD	Aqueous-organic two-phase system	Immobilization <i>Mycobacterium</i>	5	70	23
Cholesterol	ADD, 4-AD	Cloud point system	<i>Mycobacterium</i>	14.5	93	26

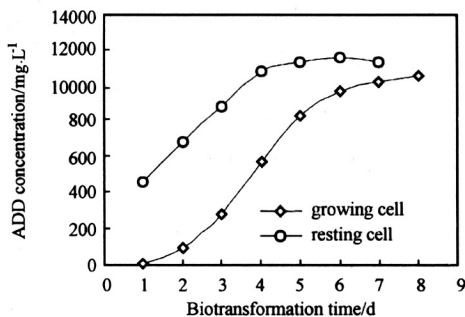


图5 静息细胞和生长细胞生物转化时 ADD 浓度的对照

Fig.5 Comparison ADD concentration of bioconversion using growing cell and resting cell

## 6 结语

随着精细化学品和手性药物研究不断深入，生物转化的作用将愈加重要。对环境问题的日益重视，使生物降解成为处理有毒污染物的研究热点。这为两相分配生物反应器提供了广阔的应用前景。

浊点系统作为一种新开发的两相分配生物反应器，其作用机理还有待进一步深入研究。开发新的测试手段和研究方法，研究微生物在浊点系统微环境中生长等生理特性将具有重要的理论意义。有关大规模表面活性剂回收工艺的文献报道不多，进一步研究产物与浊点系统中表面活性剂的分离工艺对完善浊点系统在生物过程中的应用具有实际意义。

### 参考文献

[1] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32: 688~705

[2] Pudge I B, Daugulis A J, Dubois C. The use of *Enterobacter cloacae* ATCC 43560 in the development of a two-phase partitioning bioreactor for destruction of hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5, -s-triazine (RDX) [J]. *J Biotechnol*, 2003, 100: 65~75

[3] Stark D, Stockar U V. In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years [J]. *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2003, 80: 149~175

[4] Malinowski J J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19: 525~538

[5] Halling P J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 178~206

[6] Kaul R, Mattiasson B. Extractive bioconversion in aqueous two-phase system [J]. *Appl Microb Biotechnol*, 1986, 24: 259~265

[7] Berberich J A. Whole cell biocatalysis in presence of supercritical and compressed solvents [D]. University of Kentucky, Lexington, USA, 2001

[8] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 30: 81~87

[9] Angelova B, Schmauder H P. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems [J]. *J Biotechnol*, 1999, 67: 13~32

[10] Salter G J, Kell D B. Solvent selection for whole cell biotransformation in organic media [J]. *Critic Rev Biotechnol*, 1995, 15 (2): 139~177

[11] Albertsson P A. Chromatography and partition of cells and fragments [J]. *Nature*, 1956, 177: 771~774

- [12] Zijlstra G M, Gooijer C D, Tramper J. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, (9): 171~176
- [13] Watanabe H. Nonionic Surfactant in Photometric Determination of Trace Metals. In: *Solution Behavior of Surfactants, Theoretical and Applied Aspects* [M]. Mittal K L, Fendler E J. Eds. Plenum Press, New York and London, 1982. 1035~1313
- [14] Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256 (4): 1604~1607
- [15] Quina F H, Hinze W L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach [J]. *Ind Eng Chem Res*, 1999, 38: 4150~4168
- [16] 王志龙, 王劲松, 赵凤生. 双水相胶束萃取苯酚 [J]. *化工学报*, 2002, 53 (3): 269~273
- [17] Wang Z, Zhao F, Li D. Determination of solubilization of phenol of coacervate phase in cloud point extraction [J]. *Colloid Surf A*, 2003, 216: 207~214
- [18] 王志龙, 赵凤生, 李道棠. 苯酚在浊点萃取中凝聚层相的增溶规律 [J]. *化工学报*, 2003, 54 (10): 1387~1390
- [19] Cruze A, Fernandes P, Cabral J M S, et al. Effect of phase composition on the whole cell bioconversion of  $\beta$ -sitostreol in biphasic media [J]. *J mol Catal B: Enzym*, 2002, 19-20: 371~375
- [20] Mahata S B, Majumdar I. Current trends in microbial steroids biotransformation [J]. *Phytochem*, 1993, 34 (4): 883~898
- [21] Cabral J M S, Aires-Barros M R, Pinheiro H D, Prazeres MF. Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells [J]. *J Biotechnol*, 1997, 59: 133~145
- [22] Dias A C P, Cabral J M S, Pinheiro H D. Sterol side-chain cleavage with immobilised *Mycrobacterium* cells in water immiscible organic solvents [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 708~713
- [23] Flygare S, Larsson P O. Steroids transformation in aqueous two-phase systems: side-chain degradation of cholesterol by *Mycrobacterium* sp. [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1989, (11): 752~759
- [24] Wang Z, Zhao F, Hao X, et al. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2004, 27: 147~153
- [25] Wang Z, Zhao F, Hao X, et al. Model of bioconversion of cholesterol in cloud point system [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 19: 9~13
- [26] 王志龙. 浊点系统中全细胞生物转化. [D]. 上海: 上海交通大学, 2004
- [27] Mutafov S, Angelova B, Avramova T, et al. The inducibility of  $9\alpha$ -steroid hydroxylating activity in resting *Rhodococcus* sp. cells [J]. *Process Biochem*, 1997, (7): 585~589

## Two-phase Partitioning Bioreactor, Application of Cloud Point System in Bioconversion

Wang Zhilong

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**[Abstract]** The two-phase partitioning bioreactor is usually applied in many bioprocesses for enhancing the productivity. The controlled substrate delivery from the non-aqueous phase to aqueous phase opens a new area of application of this strategy for enhancing the substrate solubility and eliminating the substrate inhibition of bioprocesses, such as bioconversion, biodegradation, etc. The extraction product from bioreaction phase has advantages over conventional media, such as removing the product inhibition on the microorganism, protecting the product form further degradation and cutting down the effluent treatment costs as a result of the use of a more concentrated feedstock. This article examines recent research on methods of the two-phase partitioning bioreactor. The practical potential of cloud point system as a novel two-phase partitioning bioreactor is illustrated by reference to a particular bioconversion, namely the side-chain cleavage of cholesterol to produce a pharmaceutical intermediate androsta-diene-dione (ADD).

**[Key words]** two-phase partitioning; bioconversion; nonionic surfactant; cloud point system; bioreactor