

## 酶法破碎微生物细胞的研究进展

崔丁维<sup>1</sup> 胡学超<sup>2</sup> 包姗姗<sup>1</sup> 张卡<sup>1</sup> 纪晓俊<sup>1</sup> 黄和<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)

(2. 江苏省工业生物技术创新中心 江苏 南京 211816)

**摘要:** 酶法细胞破碎技术不仅能提高胞内产物的提取效率、降低能耗,还能减少化学试剂的用量,更有利于环保。主要介绍酶法破碎细菌、真菌、微藻、原生菌类等微生物细胞的研究进展、工业化情况以及应用展望。

**关键词:** 酶法破碎, 微生物细胞壁, 裂解酶

## Research Progress in Enzymatic Disruption of Microbial Cells

CUI Ding-Wei<sup>1</sup> HU Xue-Chao<sup>2</sup> BAO Shan-Shan<sup>1</sup> ZHANG Ka<sup>1</sup> JI Xiao-Jun<sup>1</sup>  
HUANG He<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Jiangsu Provincial Innovation Center for Industrial Biotechnology, Nanjing, Jiangsu 211816, China)

**Abstract:** The technology of enzymatic cell disruption can not only improve the efficiency of intracellular products extraction, reduce energy consumption, but also reduce the usage of amount of chemical reagents, which is more friendly to environment. This paper reviewed the recent research progress of enzymatic disruption of microbial cells, such as bacteria, fungi, microalgae, protest and so on, the condition of industrialization as well as application prospect.

**Keywords:** Enzymatic disruption, Microbial cell wall, Lyase

微生物是许多有价值的酶、蛋白质、高附加值的多不饱和脂肪酸等的重要来源,而大部分的代谢产物存在于细胞内,要获得这些物质,可以通过基因工程改造细胞,或者通过物理、化学或生物的方法破碎细胞,释放胞内产物。工业上最常采用的手段是凭借固体剪切力(珠磨)和液体剪切力(高压均质)进行大规模的细胞破碎。但是,酶法细胞破碎技术的条件温和、设备简易、利于环保等优势无与伦

比,因此,国内外的专家学者在这一领域进行了一系列广泛而深入的研究。酶法细胞破碎技术从提出至今已有 50 多年的历史,直至 20 世纪 80 年代后期,许多酶种投入了工业化生产,酶的生产成本不断下降,终于为酶法大规模破碎细胞的研究奠定了坚实的基础。根据文献报道,自溶、噬菌体裂解和外用酶是 3 种主要的酶法破碎。自溶主要应用于酵母的破碎,大肠杆菌可利用噬菌体裂解,而外用酶法的

使用范围更广,更有普适性<sup>[1-3]</sup>。因此,本文主要阐述外用酶法破碎细菌、真菌、微藻、原生菌类等微生物细胞,提取胞内目标产物的研究进展。

## 1 酶法破碎微生物细胞的原理

存在于微生物细胞内的代谢产物,只有破碎其细胞壁和细胞膜,才能获得最大程度的释放。通常细胞壁较坚韧,细胞膜强度较差,易受渗透压的冲击而破碎,所以,破碎的阻力来自于细胞壁<sup>[4-5]</sup>。因此,细胞壁的结构和成分至关重要,而各种微生物的细胞壁取决于遗传和环境等因素<sup>[3,6]</sup>,从而需要选择相应的酶来水解。

事实上,有些胞内产物存在于细胞器中,所以,除了破碎细胞壁、细胞膜以外,还要破碎细胞器的膜才能最终获得目标产物。例如,微生物胞内的油脂就以几种形式存在,细胞膜中的油脂处于膜蛋白的包围中,细胞质中的油脂有的游离存在,有的以球状的脂质体存在于液泡中,脂质体是油脂与其他大分子结合成的“脂蛋白”“脂多糖”等的复合体。脂质体不仅阻碍了油脂的提取,而且对油脂分子起着包埋作用,因此只有将所有的膜都破坏,降低乳状液的稳定性,才能提高油脂的提取率<sup>[7-11]</sup>。

## 2 酶法破碎微生物细胞

### 2.1 酶法破碎细菌细胞

细菌细胞壁的主要成分是肽聚糖,作用于细菌细胞壁的溶菌酶可分为三大类:(1) N-乙酰氨基己糖苷酶:破坏细菌细胞壁肽聚糖中的 $\beta$ -(1,4)糖苷键;(2) 酰胺酶:裂解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰胞壁酸与肽“尾”之间的 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸键;(3) 内肽酶:裂解肽聚糖肽桥中的肽键。不同来源的溶菌酶有不同的抗菌范围,并对不同类型的肽聚糖有特异性。

革兰氏阴性细菌的细胞壁除了肽聚糖以外,还有一层脂多糖<sup>[12]</sup>。EDTA 作为一种螯合剂,能够使含有金属离子的蛋白质具有水溶性,细胞破碎时,加入 EDTA 能破坏脂多糖的结构稳定性。Anand H 等人<sup>[13]</sup>采用 EDTA 促进大肠杆菌释放胞内蛋白的释放,节约了大量的能源消耗。G-HCl 和 Triton X-100 共同对大肠杆菌进行预处理,同样能促进细胞膜和细胞壁中蛋白质的增溶作用。

通常,我们在高倍镜下观察细胞破碎的程度,但有些更微观的细胞裂解是无法观测到的,而在一定的浓度范围内,菌体浓度、蛋白质和核酸含量与其对应的最大吸收波长下的吸光值成正比,此法能更好地了解细胞破碎的真实情况。刘红等人<sup>[14]</sup>在进行酶解和超声波相结合的方式对大肠杆菌的破碎研究时,通过测定细胞裂解液在 650 nm、280 nm、260 nm 波长处的吸光值来反映细胞的破碎程度和胞内蛋白及核酸物质的释放情况。在优化的条件下,溶菌酶的添加量为湿菌体的 0.2%, 30°C 酶解 1 h、500 W 超声破碎 50 次,所得包含体的纯度达 57%。由于菌液经酶解处理后只降解了细胞壁的骨架,许多碎片较大,会影响离心后所得包涵体的纯度,而经过超声后的细胞碎片减小了很多,提高了包涵体的纯度,有利于重组蛋白的进一步纯化。

对于细菌胞内的贮藏颗粒而言, Kshama L 等人<sup>[15]</sup>使用可产生溶菌酶的小双孢菌的培养液的上清滤液对灭活后的苜蓿根瘤菌进行水解,提取胞内的聚羟基脂肪酸酯(PHA)。在 50°C、pH 值为 7 时, PHA 的收率为细胞内总量的 94%, 聚合物的纯度为 92%。该研究还发现,主要是上清滤液中的蛋白酶参与了 PHA 的提取,这说明蛋白酶也能较好地提取细菌的胞内产物。Fernanda MK<sup>[16]</sup>使用蛋白酶提取纯化 *Ralstonia eutropha* DSM545 生产的 PHB。结果显示,同等条件下,胰酶处理所得的 PHB 的纯度比菠萝蛋白酶处理所得的要高一些,但胰酶的成本仅为菠萝蛋白酶的 1/3,这对于工业生产中成本的节约有一定的借鉴作用。该实验还对 PHB 的分子量进行分析,结果表明聚合物没有降解。因此,就一般而言,使用酶法回收和纯化 PHB 等细菌胞内的生物性聚合物具有潜在的应用价值。

随着固定化酶技术的不断成熟,其应用也越来越广泛。Chang YK 等人<sup>[17]</sup>采用固定于沸石分子筛上的溶菌酶对 *Micrococcus lysodeikticus* 进行细胞破碎。结果显示,在 pH 为 8 时,固定化溶菌酶的活力最高,随着离子强度的增加,固定化酶的活力迅速下降。同时,固定化溶菌酶的活性随着酶量的增加而降低。通过对裂解液中的蛋白质数量和细胞碎片的比例对细胞破碎效率进行评估,并与其他机械破碎的方法进行比较,结果表明,该种固定化溶菌酶作用下的细胞破碎效果最高。同时,该种固定化溶

菌酶的重复利用性很好,在反复的吸附、解吸操作中,酶的浓度没有明显的变化。相比于其他的固定化系统,沸石分子筛固定酶的过程简单而廉价,工业化的前景看好。

## 2.2 酶法破碎真菌细胞

酵母的细胞壁分为两层,外层由磷酸甘露糖和蛋白质组成,内层由 $\beta$ -葡聚糖构成细胞壁的骨架。真菌细胞壁的溶菌酶主要分为两类:(1)几丁质酶:主要是内几丁质酶,与植物几丁质酶相似,主要用于真菌细胞壁的降解和重组,由于肽聚糖和甲壳质的糖骨架具有相似的结构,一些几丁质酶也具有溶菌酶活性。(2) $\beta$ -葡聚糖酶:包括 $\beta$ -(1,3)葡聚糖酶, $\beta$ -(1,6)葡聚糖酶和甘露聚糖酶等, $\beta$ -(1,3)葡聚糖酶主要作用于 $\beta$ -(1,3)糖苷键,还可以对几丁质酶降解真菌细胞壁起到显著的协同作用。

$\beta$ -葡聚糖酶与磷酸甘露糖酶及蛋白酶联合作用,可使酵母细胞壁的内外两层同时破碎,从而显著提高破壁效果<sup>[12]</sup>。Trond S等人<sup>[18]</sup>考察了混合酶(蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶)对红酵母细胞壁的破碎程度和压榨温度对膨化鱼饲料生产中虾青素的稳定性和异构体形成的影响。结果显示,在含酶45%裂解的红酵母溶液中回收的虾青素产量比含酶97%所得的虾青素产量增加8%。而压榨的温度并没有显著影响虾青素的收率。虽然酶含量较多时,所得虾青素的稳定性有所降低,但却很好地提高了红酵母的可利用性。因此,我们在实际的酶法破碎操作中除了要确保目标产物的质量外,还要考察一下其他副产物和菌渣等的可利用性,及其对后续提取的可操作性的要求,进一步提高产品的附加值。李兴明等人<sup>[19]</sup>研究了以蛋白酶和甘露聚糖酶为主的复合酶对法夫酵母的酶解破壁,破壁率接近90%,并且酶解过程不会造成色素的损失。此种酶法破壁,条件温和,酶用量少,破壁率高,方法简单,无需特殊设备。而当酶法和化学渗透法结合使用,在酶解时加入渗透剂(甘氨酸、吐温-80)与复合酶结合使用,却不能有效地提高破壁率。这与常规思维有悖,但也说明有时问题无需复杂化。

蜗牛的消化液中也含有较多的 $\beta$ -(1,3)葡聚糖酶,常用于酵母的细胞壁破碎。贾艳萍等人<sup>[20]</sup>选择酶法破碎酵母细胞来提高重组酵母的检测系统的准确性,通过计算破碎前后酵母细胞的数量,测定菌

体和上清液蛋白质的浓度(*OD*值)来判断破壁效果。结果显示,蜗牛酶破壁效果明显好于溶菌酶。万红贵等人<sup>[21]</sup>的研究也得出相同的结果。但是,王志博等人<sup>[22]</sup>用酶法对啤酒酵母细胞破壁优化条件的研究结果显示,蜗牛酶和溶菌酶破壁率的差异不显著( $P > 0.05$ )。其正交实验的结果还明确了影响破壁率的各因素的顺序为:温度 > 时间 > 酶量 > pH。通过适当地提高酶法破碎时的温度和延长反应时间,可以加速酵母细胞自溶,从而提高破碎效率,减少外加酶的用量,降低酶法破碎的成本。他们之间研究结果的差异,可能是由于后者促进了酵母的自溶,所以导致蜗牛酶的优势无法体现。

蛋白酶仿佛是用之四海而皆准的一种通用酶,因为微生物的细胞壁和细胞膜中或多或少都含有蛋白质。徐栋和王春维<sup>[23]</sup>采用高压均质与蛋白酶法相结合的方法破碎酵母细胞壁,以得率、细胞溶出物中上清液的RNA含量和氨基酸态氮含量来衡量酵母细胞的破壁率。实验中,高压均质初步破碎细胞壁的结构,消除酶与底物的空间位阻,便于蛋白酶水解细胞壁中的蛋白质,得到尽可能多的小肽和氨基酸,提高产物的营养价值。结果表明,60 MPa高压均质3次后,添加0.6%的木瓜蛋白酶和中性蛋白酶(1:1配比)制成的复合蛋白酶,在pH值为5.0、55°C恒温水解8 h可获得最佳破壁效果。相似地,马森和卢家炯等人<sup>[24]</sup>提出了超声-酶-碱法提取酵母中 $\beta$ -(1,3)葡聚糖的工艺,采用功率为140 W的超声波处理60 min,破壁率达到94.22%;添加208 U/g底物的木瓜蛋白酶,最佳条件下进行酶解,蛋白质去除率达到最大值62.82%;再加入NaOH处理,最终 $\beta$ -(1,3)葡聚糖的得率为10.21%,纯度为88.14%,蛋白质含量为1.19%。该方法工艺简单,耗时短,成品得率、纯度较高,且蛋白质含量低,是提取 $\beta$ -(1,3)葡聚糖的理想方法。

霉菌的细胞壁结构比较复杂,不同种属的霉菌,其细胞壁结构和组分有较大差别。毛霉、根霉等藻菌纲霉菌的细胞壁破碎主要采用放线菌或细菌产生的细胞壁溶解酶(包括几丁质酶、壳多糖酶及蛋白酶等多种酶的混合物)。米曲霉、黑曲霉等半知菌纲霉菌的细胞壁破碎主要使用 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的混合物<sup>[12]</sup>。王燕等人<sup>[25]</sup>采用正交实验研究米曲霉的复合酶法破壁制备原生质体,得出的最佳破壁

条件为: 纤维素酶、溶菌酶、蜗牛酶的混合浓度比为 5:3:1。但是, 万红贵等人<sup>[21]</sup>在研究不同破壁工艺提取三孢布拉霉内番茄红素的过程中, 发现复合酶的效果低于单一纤维素酶和蜗牛酶, 很可能是酶与酶之间的相互作用, 降低了彼此的活性。

对于子实体真菌而言, 复合酶法细胞破碎的效果却是颇为理想的。娄在祥等人<sup>[26]</sup>采用超声波协同复合酶法提取黑木耳多糖, 最佳工艺条件为: 料液比 1:50, 浸提时间 2.5 h, 浸提温度 80°C, 超声波功率 125 W, 超声波复合酶作用时间 60 min, 作用温度 50°C, 纤维素酶用量 390 U/g, 中性蛋白酶用量 650 U/g。与热水浸提法、碱提取法、超声波提取法、酶解提取法、超声波协同单一酶提取法相比, 超声波协同复合酶法进一步缩短了提取时间, 提高了多糖提取率, 多糖提取率可达 10%–41%。

### 2.3 酶法破碎微藻细胞

微藻细胞壁的结构骨架多由纤维素组成, 以微纤丝的方式层状排列, 含量占干重的 50%–80%, 其余部分为间质多糖所占。间质多糖主要是杂多糖, 其成分随种类而异<sup>[11]</sup>。纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称, 由多个酶起协同作用的多酶体系。一般将纤维素酶分为 3 类: (1) 葡聚糖内切酶(EG): 作用于纤维素分子内部的非结晶区, 随机水解  $\beta$ -(1,4)糖苷键, 将长链纤维分子切断, 产生大量非还原性末端的小分子纤维素; (2) 葡聚糖外切酶(CBH): 作用于纤维素线状分子末端, 水解  $\beta$ -(1,4)糖苷键, 每次切下一个纤维二糖分子, 故又称纤维二糖水解酶; (3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG): 大分子首先在 EG 酶和 CBH 酶的作用下逐步降解成纤维素二糖, 再由 BG 酶水解成 2 个葡萄糖。

何扩等人<sup>[27]</sup>在小球藻破壁技术的研究中发现, 纤维素酶单独作用的最佳酶量为 2%, 复合酶(粉剂)作用的最佳酶量为 1%, 而纤维素酶与复合酶、糖化酶复合作用的效果不及纤维素酶单独作用效果好。而 Seung PC 等人<sup>[28]</sup>采取分步加酶进行细胞裂解, 避免了不同酶同时加入产生的相互作用。他们采用正交实验优化酶法预处理衣藻发酵产酒精的过程, 液化阶段添加 0.005%  $\alpha$ -淀粉酶, 90°C 反应 30 min, 糖化阶段添加 0.2% 糖化酶, 在 55°C、pH 4.5 的条件下反应 30 min。结果很理想, 1.0 g 生物量衣藻的水解淀粉通过酵母的发酵能得到 235 mg 酒精。因此, 我

们在实际操作中, 需要提前考察各种不同配比下的复合酶的破壁效果, 以此确定最佳酶的种类和比例。此外, 不同来源的同一种酶的破壁效果也有所差异, 这是很容易被忽视的, 所以, 一旦确定了使用哪种酶, 就不要轻易更改, 否则会给随后的实验带来不必要的误差。

鉴于以上技术只能对单一生物的细胞壁进行破壁, 需前处理且不通用, 所以, 福州恒丰量子生物科技有限公司<sup>[29]</sup>研发出了一种可以通用于动植物和微生物细胞壁溶解的酶反应液, 通过采用细胞壁溶解酶(枯草杆菌/芽孢杆菌为产酶菌)、原生质液、酶促进剂(酵母膏/吐温 80/红曲粉)、无机盐、矿泉水和辅料, 制备了一种酶反应液。使用时将微生物原料放入发酵罐, 与细胞溶解酶反应液混合后发酵, 其中原料干物质与细胞壁溶解酶反应液的质量比为 1:(0.05–0.15)。该反应液无毒, 生物降解性好, 可将原料中的有效成分和化学成分进行有效的提取, 由于对微生物原料的酶解发酵, 产物的分子结构发生了根本性的变化, 使细胞内的小分子蛋白、游离氨基酸、亚麻酸和多肽等生物活性物质的质量大大提高, 更容易被人体吸收。此法与 Kshama L 等人<sup>[15]</sup>研究中采用的方法相类似, 不失为一种有工业化前景的新颖的发酵分离技术。

此外, 武汉友芝友保健乳品有限公司<sup>[30]</sup>研究了酶法破碎寇氏隐甲藻生产二十二碳六烯酸油脂, 该破壁方法是在发酵液中按比例加入主体酶(碱性蛋白酶(2709)、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶)和辅助酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶), 升温至 50°C–70°C, 保温搅拌 3–9 h 酶解, 再加入 95% 的乙醇使裂解液分层, 然后加入正己烷萃取油脂。此法的破壁率在 95% 以上, 不需要经过干燥, 防止了二十二碳六烯酸毛油的氧化, 且所得油脂的过氧化值极低, 过氧化值(POV)在 0.5 以下, 得油率为总油的 90% 以上, 精炼后毛油得率为 75% 以上, 这些数据说明酶法破碎在该领域已经拥有了很好的工业化应用价值。

### 2.4 酶法破碎原生菌类细胞

原生菌类细胞壁因种属的不同而各异, 基本上都含有纤维素、葡聚糖和蛋白质等, 与低等真菌类似, 所以, 可用蛋白酶、纤维素酶等破壁<sup>[11]</sup>。工业上最常用的蛋白酶是碱性蛋白酶, 其最适 pH 值为

9.5-10.5, 因其是胞外酶, 培养简便, 产量丰富, 适于工业化生产。由于碱性蛋白酶的活性中心含有丝氨酸, 当遇到作用于丝氨酸的二异丙基氟磷酸 (DFP) 便失活, 这是碱性蛋白酶的一个重要特征。碱性蛋白酶发挥作用时需要金属离子激活, 必须的金属离子有  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  等, 而  $Ca^{2+}$  能提高大多数碱性蛋白酶的稳定性和耐热性。虽然蛋白质水解后所得的活性肽可以与钙离子形成螯合物, 未经过乙醇沉淀的螯合钙具有明显的抗氧化活性, 经过 80% 乙醇沉淀的螯合物具有显著的抗枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的活性, 但在 pH 较高 (pH > 7) 的碱性条件下, 羟基与供电子基团争夺金属离子而形成氢氧化物沉淀, 不利于多肽钙螯合物的形成<sup>[31]</sup>。因此, 在实际操作中添加  $CaCl_2$  的意义并不大。碱性蛋白酶的作用位点要求在水解处的羧基侧具有芳香族氨基酸 (如酪氨酸、苯丙氨酸) 或疏水性氨基酸 (如亮氨酸) 所构成的肽键, 它比中性蛋白酶水解能力更大而且还具有水解酯键、酰胺键和转酯、转肽的功能<sup>[32]</sup>。我们选用产自枯草芽孢杆菌的碱性蛋白酶进行酶解, 采用福林酚法<sup>[33]</sup>测得的粗酶的蛋白酶活为 400000 U/g 左右, 采用 BP63 法<sup>[34]</sup>测得该酶的酯酶活性为 25000 U/g 左右。所以, 碱性蛋白酶在酶解的同时水解了不少酯类物质, 简化了油脂的精炼工艺, 在一定程度上既提高了生产效率, 又降低了生产成本。

湖北福星生物科技有限公司<sup>[35]</sup>在利用裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp. ATCC20888) 发酵生产甘油三酯型的 DHA 的方法中应用了酶法细胞破碎, 在充分洗涤离心后的菌体中, 加入复合酶 (酸性/中性/碱性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶、淀粉酶的两种或几种的复合) 进行破壁, 酶的添加量为发酵液的 0.01%-1%, 所得生物量在 40-50 g/L 之间, 油脂含量为 70% 左右, 气相色谱检测 DHA 含量为 52% 以上, 与压榨破壁的效果相差无几, 工业化优势显而易见。我们在实际的操作中也进行了类似的探索, 在发酵结束后的发酵液中加入相当于菌体干重 1%-3% 的碱性蛋白酶, 于 50°C-60°C、pH 8.5-10.5 搅拌反应 2-4 h。然后选用正己烷:乙醇:发酵液的比例为 3:1:1 进行萃取, 毛油产率高达 80% 以上, 比机械破碎法的提油率提高了 20%-30%。据文献报道, 裂殖壶菌的脂肪酸含量为 40%-50%<sup>[36]</sup>, 这说明碱性蛋白酶对裂

殖壶菌的破碎效果很理想。但由于酶也是蛋白质, 而蛋白酶在与其他酶协同作用时, 会不可避免地将其他酶水解, 因此, 当使用的复合酶中含有蛋白酶时, 可以采取最后加蛋白酶<sup>[27]</sup>的方法避免以上情况, 以达到最佳破碎效果。酶解反应结束后, 通常需要在至少 80°C 下保持 20 min 来灭酶活, 但这很可能会导致多不饱和脂肪酸产物的氧化变性, 影响油脂产品的质量, 因此我们选择乙醇灭酶活, 同时沉析菌渣, 可谓一举两得。目前的工业化生产中所采用的酶大都以游离的蛋白酶为主, 成本低廉, 破碎效果不错, 如再结合放罐时菌体的自身情况, 适当添加一些辅助酶, 控制好酶法破碎时的温度、pH、时间、酶用量等影响因素, 就能达到最佳的效果。

### 3 展望

在过去的几年中, 微生物细胞破碎技术中的新问题取得的进展相对缓慢, 现有技术的大多数知识产生于 80 年代的早中期。在过去的 20 多年中, 微生物细胞破碎技术的研究重点一直集中在对现有知识的商业化和工业化应用。最佳的细胞破碎条件应该从高的产物释放率、低的能耗和便于后期提取这三方面进行权衡<sup>[1,6]</sup>。研究方向主要为以下 3 方面。

#### 3.1 多种破碎方法相结合

机械法和非机械法相结合可起到“取长补短”的作用, 大大提高破碎效率。现行的主要有两种方式: 一种是采用化学、物理、酶法三者结合破碎; 另一种是利用化学、物理、酶法预处理, 再进行机械破碎<sup>[3]</sup>。例如, 吴润娇等人<sup>[37]</sup>采用高压均质、酶促溶和温差破壁 3 种方法相结合的综合破壁法制取啤酒废酵母的酵母味素, 在适宜的自溶条件下, 该技术具有时间短、提取率高、呈味物质肌苷酸、鸟苷酸溶出多的特点, 产品干物质的得率达 77%、蛋白质的溶出率为 86.5%、氨基氮的得率为 5.9% 以上。马森等人<sup>[24]</sup>提出的超声-酶-碱法提取酵母中  $\beta$ -(1,3) 葡聚糖的方法, 不但简单且耗时短, 成品得率、纯度较高, 蛋白质含量低。

此外, Vivek DF 等人<sup>[38]</sup>建立了热诱导酶易位的动力学, 在优化细胞破碎之前, 能将  $\beta$ -半乳糖苷酶从细胞质易位至周质空间, 减少了细胞破碎的时间和能源需求, 并能使随后的纯化步骤更容易。

### 3.2 与上游过程相结合

在上游细胞培养过程中, 通过改变培养基成分、生长期或操作参数(pH、温度、通气量、稀释率等), 使细胞破碎变得容易。Koutinas AA 等人<sup>[39]</sup>的研究显示酵母的自溶程度不受 pH 范围的影响, 而会严重受到温度、初始固体浓度和培养时间的影响, 其中蛋白水解酶积累的最佳温度为 55°C。

### 3.3 与下游操作相结合

细胞碎片的固液分离通常很困难, 除了应从后步分离过程的整体考虑破碎条件外, 还可将破碎操作直接与纯化过程结合起来。刘红等人<sup>[14]</sup>在酶解大肠杆菌后进行超声, 减小了细胞碎片, 提高了包含体的纯度, 有利于重组蛋白的进一步纯化。因此, 我们在实际操作中, 要把握好细胞破碎的程度, 既要确保目标产物的顺利释放, 又要有利于后期的分离纯化, 从而减少分离时间和能耗。

## 参 考 文 献

- [1] Jana G, Dean B, Paul J. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. *International Dairy Journal*, 2002(12): 541–553.
- [2] Yusuf C, Murray MY. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microbiology and Technology*, 1986(8): 194–204.
- [3] Anton PJM. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(3): 491–551.
- [4] Sauer T, Robinson CW, Glick BR. Disruption of native and recombinant *E. coli* in a high pressure homogenizer. *Biotechnol Bioeng*, 1989(33): 1330–1342.
- [5] Kuboi R, Umakoshi H, Naoyuki T, *et al.* Optimal disruption methods for the selective recovery of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79(4): 335–341.
- [6] 欧阳平凯, 胡永红. 生物分离原理及技术. 北京: 化学工业出版社, 1999: 59, 71.
- [7] Ramon MC, Kim HJ, Zhang C, *et al.* Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil. *Journal of the American oil Chemist's Society*, 2008, 85(4): 383–390.
- [8] 李大房, 马传国. 水酶法制取油脂研究进展. *中国油脂*, 2006, 31(10): 29–32.
- [9] Eiko M, Yasuyuki K, Toro N, *et al.* Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. *Marine Biotechnology*, 2006(8): 319–327.
- [10] Ashforda A, Barclaya WR, Weavera CA, *et al.* Electron microscopy may reveal structure of docosahexaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium sp.* *Lipids*, 2000(35): 1377–1386.
- [11] 周德庆. 微生物学教程. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 42.
- [12] 郭勇. 酶工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 298–299.
- [13] Anand H, Balasundaram B, Pandit AB, *et al.* The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2007(35): 166–173.
- [14] 刘红, 潘红春, 蔡绍哲, 等. 酶解-超声法破碎大肠杆菌提纯包含体. *重庆大学学报*, 2004, 27(10): 75–78.
- [15] Kshama L, Ramachandriah ST. Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora sp.* culture and its enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006(39): 1471–1475.
- [16] Fernanda MK, Alexandre PV, Rita CPA, *et al.* Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 2006(122): 453–462.
- [17] Chang YK, Chu L. A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Biochemical Engineering Journal*, 2007(35): 37–47.
- [18] Trond S, Mette S, Bjørn B, *et al.* Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feedprocessing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. *Aquaculture*, 2004(231): 489–500.
- [19] 李兴鸣, 徐学明. 法夫酵母的酶法破壁研究. *粮食与饲料工业*, 2006(6): 38–39.
- [20] 贾艳萍, 魏群, 赵军. 对酵母细胞酶法破壁的研究. *中国酿造*, 2005(9): 11–13.
- [21] 万红贵, 徐传学. 不同破壁工艺对三孢布拉霉提取番茄红素的影响. *食品工业科技*, 2009(7): 209–211.
- [22] 王志博, 潘军, 张永根, 等. 用酶法对啤酒酵母细胞破壁优化条件的研究. *东北农业大学学报*, 2008, 39(3): 76–79.
- [23] 徐栋, 王春维. 高压均质与酶法破碎酵母细胞壁的工艺条件研究. *饲料工业*, 2009, 30(12): 44–47.
- [24] 马森, 卢家炯, 高俊永, 等. 超声-酶-碱法提取啤酒废酵母  $\beta$ -1,3-葡聚糖的研究. *酿酒科技*, 2009(2): 96–99.
- [25] 王燕, 车振明, 唐洁, 等. 米曲霉酶法破壁的研究. *食品工业科技*, 2006(2): 121–122.
- [26] 娄在祥, 张有林, 王洪新. 超声波协同酶法提取黑木耳多糖. *食品工业*, 2007(1): 29–31.

- [27] 何扩, 张秀媛, 李玉锋. 小球藻破壁技术及其藻片研制. 食品工业科技, 2006(2): 147-149.
- [28] Seung PC, Minh TN, Sang JS. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 2010(101): 5330-5336.
- [29] 福州恒丰量子生物科技有限公司. 一种动植物和微生物细胞壁溶解酶反应液及其应用. CN: 1740327A, 2006-03-01.
- [30] 武汉友芝友保健乳品有限公司. 生物酶法破壁用于二十二碳六烯酸油脂生产方法. CN: 101307341A, 2008-11-19.
- [31] 杨桑, 邓尚贵, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究. 食品科学, 2008, 29(1): 202-206.
- [32] 林敏刚. 碱性蛋白酶在水解植物蛋白中的应用. 中国油脂, 2009, 34(12): 30-33.
- [33] SB/T 10317-1999. 蛋白酶活力测定法.
- [34] 施特马赫. 酶的测定方法. 钱嘉渊, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [35] 湖北福星生物科技有限公司. 用裂殖壶菌发酵生产二十二碳六烯酸的方法. CN: 101519676A, 2009-09-02.
- [36] 朱路英, 张学成, 王淑芳, 等. 一种海洋真菌——裂殖壶菌的营养成分分析. 食品科学, 2009, 30(24): 272-275.
- [37] 吴润娇, 刘振扬, 张秀廷, 等. 啤酒废酵母综合破壁法提取酵母味素技术. 酿酒科技, 2007(11): 95-96.
- [38] Vivek DF, Sue H, Aniruddha BP. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. *Biochemical Engineering Journal*, 2005(23): 247-257.
- [39] Koutinas AA, Wang RH, Webb C. Development of a process for the production of nutrient supplements for fermentations based on fungal autolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005(36): 629-638.



## 征订启事

### 2011年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwxzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linykh@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月刊	480	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net