

破壁方法对红球菌 11-3 胞内几丁质脱乙酰酶释放的影响

肖宇¹, 石文琪², 于宏伟¹, 马爱进³, 桑亚新¹, 孙纪录^{1*}

¹ 河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

² 河北科技师范学院食品科技学院 河北昌黎 066600

³ 北京工商大学食品与健康学院 北京 100048)

摘要 红球菌 11-3 是一株高产几丁质脱乙酰酶(CDA)的菌株,几丁质在该酶的催化作用下可转化为壳聚糖,该酶在壳聚糖的生产中具有重要作用。红球菌 11-3 菌株所产 CDA 为胞内酶,成为催化反应的一大障碍。为了提高 CDA 的释放率,本研究首先利用不同的物理方法(反复冻融、超声、球磨、匀浆和液氮研磨)、化学方法(表面活性剂处理、氯仿处理)和生物学方法(溶菌酶处理)对红球菌 11-3 进行破壁处理,测定 CDA 酶活力和释放率,并通过扫描电子显微镜观察细胞形态变化。结果表明,不同方法的破壁效果存在很大差异,其中,液氮研磨法破壁效果最佳,菌体表面出现细密的孔洞,CDA 释放率为 45.13%,总酶活力损失率为 2.03%;匀浆处理法次之,CDA 释放率为 16.00%,总酶活力损失率为 9.18%。利用匀浆和液氮研磨联合处理红球菌 11-3 细胞,细胞表面产生更多、更大的孔洞,CDA 释放率高达 86.17%,总酶活力损失率为 9.11%,上清液中 CDA 酶活力为 480.2 U/mL,较液氮研磨法相比提高了 1.48 倍。结论:匀浆和液氮研磨联合处理可有效破坏红球菌 11-3 细胞壁,提高胞内 CDA 释放效率。本研究结果对红球菌 11-3 内 CDA 应用于壳聚糖的生产具有参考作用。

关键词 破壁方法; 红球菌; 几丁质脱乙酰酶; 液氮研磨; 匀浆

文章编号 1009-7848(2023)07-0068-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.07.008

壳聚糖(Chitosan)是一种经过乙酰基脱除处理的物质,它的优点包括易降解、耐水、耐药、易生长、抗微生物、可循环利用、安全、无毒等,因此在食品、医疗、造纸、化妆品、环境保护、农业等众多行业得到了广泛应用^[1]。在食品领域,壳聚糖可以用于保鲜海鲜、水果和肉类^[2-4],延缓淀粉的老化,增强面包的持水性^[5],并能够澄清果汁^[6]等。

目前,高温浓碱法是几丁质制备壳聚糖最为常用的方法。然而,浓碱的使用会带来严重的环境污染问题,且具有产物不稳定,耗能高等缺点^[7]。采用酶分解技术降解几丁质,可以有效实现壳聚糖的绿色制备,这将成为壳聚糖制造行业的一个重要发展趋势^[8]。

几丁质脱乙酰酶(Chitin deacetylase, CDA)能够催化水解几丁质中的乙酰基,使其转化为壳聚糖^[9]。这种酶被认为是迄今为止发现的最能够将几

丁质转变成壳聚糖的酶^[9]。此外,迄今为止,已报道的 CDA 大多数来源是真菌,也有少部分来源于细菌^[10],并且,微生物产生的 CDA 大多为胞内酶。柴金龙等^[11]筛选了 1 株产 CDA 的海水硝酸盐还原菌(*Nitratireductor aquimarinus*)MCDA3-3,优化培养条件后,酶活力达到 4.07 U/mL。通过多级紫外线诱变育种,魏丽蓉等^[12]以海洋微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)UV-0S 为原始菌株,成功获得了高产的 CDA 突变株 UV-3S,在最佳发酵条件下,酶活力达到 11.83 U/mL。岳洪霞等^[13]经筛选,发现 1 株具有较强 CDA 酶活性的菌株 11-3,经鉴定为红球菌(*Rhodococcus* sp.),研究发现该菌所产 CDA 为胞内酶。张建旭等^[14]通过优化该菌的产酶培养基,将其 CDA 酶活力由 58 U/mL 提高到 5 890 U/mL。由此可见,红球菌是非常好的 CDA 来源。然而,该菌是革兰氏阳性菌,具有多层肽聚糖细胞壁,且当细胞老化时,其细胞壁厚度还会增加,更难以破碎。因此,从红球菌细胞中获得大量 CDA 的最大难题是细胞破碎^[15-18]。

常见的微生物细胞破壁方法有很多,不同方法对胞内酶的提取效果的影响不尽相同。按照作用方式可分为化学法、物理法和生物法。其中,化

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19273201D);河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设基金项目(HBCT2018180206)

第一作者: 肖宇,女,硕士生

通信作者: 孙纪录 E-mail: fm1311sun@163.com

学法有表面活性剂处理法等^[19];物理法有机械法、反复冻融法、玻璃珠法、超声处理法等^[19];生物法有酶解法等^[20]。这些方法均有各自的局限性。机械法损耗大,且会产生过多的热量,导致酶失活^[21];酶解法的价格昂贵,而且可能导致产物的降解;化学方法的效率很低,需要很长时间才能发挥作用,而且使用的试剂有很高的毒性,容易导致细胞酶失活,此外,还有可能对后续试验造成干扰;使用超声波进行冷却可能会使一些敏感的化学物质失去活性^[22]。

目前,国内外对于产 CDA 微生物的研究较多集中在高产菌株的选育、发酵特性、异源表达及酶学性质方面,对于 CDA 高产菌株破壁处理的报道很少。本研究拟通过物理、化学和生物方法,包括超声、反复冻融、液氮研磨、球磨、均质、表面活性剂处理、氯仿处理以及溶菌酶处理等,对红球菌 11-3 进行破壁处理,以提取的 CDA 酶活力为主要评价指标,结合菌体扫描电镜观察,筛选出适合红球菌 11-3 的单一细胞破壁方法。以此为基础,研究联合破壁方法对提取红球菌 11-3 胞内 CDA 的效果,以期探寻出一种红球菌高效破壁提取 CDA 的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 红球菌(*Rhodococcus* sp.)11-3(以下简称红球菌),山东省食品发酵工业研究设计院刘建军教授惠赠。

1.1.2 试剂 溶菌酶(20 000 U/mg)、SDS、Twiton X-100, Biotopped 公司;EDTA, 美国 Solarbio 公司;氯仿,江苏普乐司生物科技有限公司;4-硝基乙酰苯胺,上海源叶生物有限公司;对硝基苯胺,天津市华东试剂厂;其它所用化学试剂均为分析纯级。

1.1.3 培养基 斜面培养基:蛋白胨 10.0 g/L,牛肉膏 5.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L,琼脂 18.0 g/L,pH 7.0~7.2;种子培养基:葡萄糖 2.5 g/L,酵母膏 5.0 g/L,硫酸铵 4.0 g/L,磷酸二氢钾 1.5 g/L,pH 值自然;发酵培养基:蛋白胨 2.5 g/L,蔗糖 7.0 g/L,硫酸铵 2.5 g/L,磷酸二氢钾 1.5 g/L,乙酸钠 2.0 g/L,玉米浆 5.0 g/L,pH 值为 7.5。

1.2 仪器与设备

FA1004 电子天平,上海越平科学仪器有限公司;PHS-3DW 型 pH 计,安徽合肥桥斯仪器设备有限公司;WP25AB 台式电热恒温培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司;ZWY-2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,金坛市良友仪器有限公司;TGL-16MG 低温高速离心机,长沙湘锐离心机有限公司;FSH-2 可调高速匀浆机,常州国华电器有限公司;JY92-II DN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;QM-100S 多功能高效球磨机,五洲鼎创(北京)科技有限公司;721G 可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;CPD 030 临界点干燥器,北京裕隆时代科技有限公司;SPI-Module 溅射镀膜机,上海铂悦仪器上海有限公司;日本 Hitachi s4800 场发射扫描电镜,昆山工研院新型平板显示技术中心有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 菌株活化与培养 将斜面上的红球菌菌株接种在营养肉汤(Nutrient broth,NB)固体培养基上,在 30 ℃下培养 24 h,然后再将其转移至 NB 液体培养基上,进行 3 次活化培养。将经过活化的菌株以 5%的比例注入发酵培养液,于 30 ℃,180 r/min 培养 60 h^[23]。在培养完成后,将液体培养物于 4 ℃,8 000 r/min 离心 20 min,弃上清,使其沉淀,接着将菌体用无菌水洗涤 2~3 次,最终将其离心得到的湿菌体置于-20 ℃,以便进行后续的破壁试验。细胞破壁前,将菌体用缓冲液悬浮即可。

1.3.2 物理方法

1.3.2.1 反复冻融破壁处理 从培养 60 h 的红球菌液体培养液中抽取 10 mL,以 8 000 r/min 的转速,在 4 ℃下离心 20 min,然后将菌体悬浮于 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,并在液氮和 37 ℃水浴中重复冻融 10 次^[24],以获得最终结果。

1.3.2.2 超声波破壁处理 将菌体悬浮于 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,在不同处理时间(5,15,25,35,45 min)及不同功率(200,300,400,500,600 W)下分别对红球菌进行破碎处理(开 5 s,关 1 s),处理过程需在冰浴中进行^[25]。

1.3.2.3 球磨破壁处理 将菌体悬浮于 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 加入玻璃珠, 在球磨仪最大振动频率 30 Hz 的条件下研磨处理 (5, 10, 15, 20, 25, 30 min)。

1.3.2.4 匀浆破壁处理 将菌体悬浮于 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 以 13 000 r/min 的冰浴条件下匀浆处理 (10, 20, 30, 40, 50 min)。

1.3.2.5 液氮研磨破壁处理 将取得的 50 mL 菌液以 8 000 r/min 的转速, 在 4 °C 下离心 20 min, 收集菌体, 将其放入液氮预冷的研钵中, 加入适量的液氮, 充分研磨, 直至菌体变成均匀的粉末状, 然后将其溶解于 40 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 并将其转移至干净的离心管中, 最后用 10 mL 缓冲液洗涤研钵^[26], 并将其转移至离心管中。

1.3.3 化学方法

1.3.3.1 表面活性剂破壁处理 将菌体细胞重新悬浮在同体积的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 分别添加 EDTA、Triton X-100 和十二烷基硫酸钠 (SDS), 质量浓度均为 20 g/L。悬浮液在 30 °C, 180 r/min 的摇瓶中处理 30 min^[27]。

1.3.3.2 氯仿破壁处理 将菌体悬浮于同体积的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 后, 添加 2.5% 氯仿并在 30 °C, 180 r/min 温育 30 min^[28]。

1.3.4 溶菌酶破壁处理 将菌体悬浮于同体积的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 后, 分别添加溶菌酶使其终质量浓度分为 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0 mg/mL, 在 37 °C 摇床中分别处理 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 h。

1.3.5 联合破壁处理方法 处理 1: 从 50 mL 菌液中取出湿菌体, 将其放入液氮预冷的研钵内, 加入适量液氮, 彻底研磨, 使菌体形成细腻的粉末后, 加入 40 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 使其完全溶解, 然后将其转入清洁的离心管中, 加入 10 mL 缓冲液清洗研钵并将其转入离心管, 制成重悬液, 将其在 13 000 r/min 的冰浴下均质 30 min。

处理 2: 将菌体悬浮于同体积的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 制成重悬液; 重悬液以 13 000 r/min 冰浴均质 30 min 后, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 留存上清液备用, 并将收集到的

湿菌体移入液氮预冷的研钵中, 倒入适量的液氮充分研磨, 直至菌体成均匀粉末状后用 40 mL 留存的上清液溶解, 并转入干净的离心管中, 再用 10 mL 上清液洗涤研钵一并转入离心管中, 制成重悬液。

1.3.6 胞内 CDA 的提取及酶活力测定

1.3.6.1 胞内 CDA 酶的提取 将红球菌培养 60 h, 此时 CDA 酶活力最高, 取 50 mL 发酵液, 于 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min 收集菌体, 用无菌蒸馏水反复洗涤 2~3 次, 之后加入 50 mL 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 分别进行反复冻融、超声、球磨、匀浆、液氮研磨、EDTA、Triton X-100 和 SDS、氯仿、溶菌酶、液氮研磨和匀浆联合进行破壁处理。将悬浮液于 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 以除去细胞残片和未破碎的细胞, 上清液即为胞内酶粗酶液。

1.3.6.2 CDA 酶活力测定 对硝基苯胺标准曲线的制作: 准确称取 0.01 g 对硝基苯胺溶解于 100 mL 蒸馏水中获得 100 mg/L 的对硝基苯胺母液, 然后用蒸馏水将母液稀释为 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/mL 的对硝基苯胺标液。通过蒸馏水作为参照物, 测量各标准液体在波长 400 nm 处的吸光度 (A_{400})。重复 3 次试验, 以 A_{400} 为横坐标, 绘制出对硝基苯胺浓度的标准曲线, 如图 1 所示。

CDA 酶活力测定方法参照文献[23], 将 1 mL 200 mg/L 的硝基乙酰苯胺水溶液、1 mL 合适浓度的酶液和 3 mL 50 °C 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 混合均匀, 构建反应体系, 在 50 °C 水浴中反应 15 min, 然后在沸水浴中终止反应, 待反应液冷却到室温, 再加入 10 mL 水, 搅拌均匀, 以

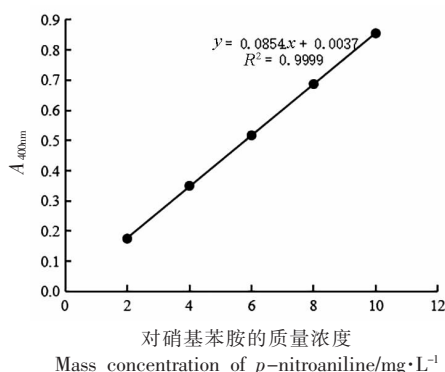


图 1 对硝基苯胺标准曲线

Fig.1 *P*-nitroaniline standard curve

8 000 r/min 离心 10 min,测定上清液的吸光度。空白对照体系为添加 1 mL 相应浓度的高温灭活酶液,其余同上,测定上清液的吸光度值。设置 3 个重复,取平均值,根据对硝基苯胺标准曲线计算 CDA 酶活力(U/mL)。

1.3.7 扫描电子显微镜 (Scanning electron microscopy, SEM) 观察 按照 Spiden 等^[29]所述,通过 SEM 对经 1.3.3~1.3.6 节各方法处理后所得到的破碎上清液 CDA 酶活力最高的样品进行可视化分析。具体步骤如下,在盖玻片上添加 0.1% 的聚乙烯亚胺溶液,并在火焰下加热干燥。将新鲜匀浆的悬浮液在盖玻片上温育 1 h。然后,将盖玻片浸入 2.5% 戊二醛中 1 h,在 PBS 中冲洗 3 次,每次 10 min。将盖玻片转移到 70% 乙醇和二甲氧基甲烷 (1:1, V/V) 的混合物中 5 min,此后浸入纯二甲氧基甲烷中 20 min。然后将盖玻片在临界点干燥器中干燥,其中溶剂逐渐被液态 CO₂ (8 °C, 50 bar) 代

替。将干燥的盖玻片安装在带有双面碳片的铝片上,并使用溅射镀膜机涂金。最后,采用扫描电子显微镜观察红球菌的细胞形态,放大倍数为 5 000 倍。

1.4 统计学分析

破壁处理与酶活力测定试验重复 3 次,运用 Excel 2019 进行数据处理;使用 Origin 2017 处理 CDA 酶活力数据,结果用折线图呈现。

2 结果与分析

2.1 几丁质脱乙酰酶在红球菌中的定位

将已活化好的红球菌以体积分数 5% 的接种量接种到发酵培养基中,180 r/min, 30 °C 培养,每 12 h 测定培养物的 OD₆₀₀ 值,反映菌株的生长情况,以培养时间为横坐标,分别以 OD₆₀₀、CDA 酶活力为纵坐标,绘制其生长曲线和 CDA 酶活力产生曲线,结果见图 2。

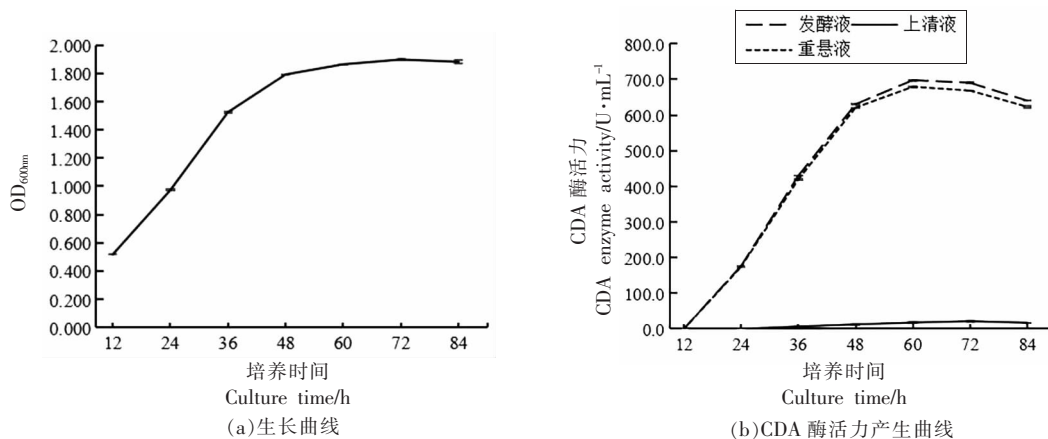


图 2 红球菌细胞生长和几丁质脱乙酰酶产生曲线

Fig. 2 Cell growth and CDA production curves for *Rhodococcus* sp. 11-3

由图 2a 可知,随着培养时间的延长,CDA 酶活力逐渐增加,在 60 h 时,达到最大。由图 2b 可知,重悬液酶活力基本接近发酵液酶活力,上清液酶活力很低,初步判断原因是该酶可能存在于细胞内或细胞壁。

为避免发酵液中有其它物质影响酶活力测定的准确性,将发酵液离心收集菌体,对菌体进行反复洗涤,并用缓冲液悬浮(重悬液),分别测定上清液及重悬液的酶活力,如果上清液中 CDA 酶活力较低,则该酶存在于胞内或者附着在细胞表面,可

用表面活性剂洗涤菌体,离心分别测定上清液及重悬液的酶活力,若上清液中酶活力仍很低,结合图 2 结果可以初步判断该酶属于胞内酶,结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出,上清液与重悬液相比 CDA 酶活力很低,因此,该酶不属于胞外酶。进一步在重悬液中加入表面活性剂吐温 80,混匀,于室温静置 20 min,离心测定上清液酶活力,以确定该酶具体位置,结果见表 2。

从表 2 可以看出,用表面活性剂处理后,上清

表1 菌体反复洗涤后上清液和重悬液中 CDA 酶活力
Table 1 CDA activity in supernatant and resuspension after repeated washing

洗涤次数	CDA 酶活力/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	上清液	重悬液
0	74.0	612.3
1	46.1	607.7
2	15.7	594.3
3	4.2	593.6

表2 吐温 80 处理后上清液和重悬液中 CDA 酶活力
Table 2 CDA enzyme activity in supernatant and resuspension after Tween 80 treatment

吐温 80 加入量 (滴)	CDA 酶活力/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	处理前发 酵液	处理后发 酵液	上清液	重悬液
0	695.9	690.3	27.4	674.3
1		683.5	33.4	677.3
2		685.7	30.1	676.5

液中的 CDA 酶活力仍很低,因此排除了该酶存在于细胞表面的可能性,可判定该酶为胞内酶,若要进一步确认此结论,应对红球菌细胞进行破壁处理。

2.2 物理破壁方法对红球菌胞内 CDA 释放的影响

2.2.1 反复冻融破壁处理 采用反复冻融法对红球菌细胞进行破壁处理,观察 CDA 的释放效果。离心收集沉淀和上清液,再将沉淀分散到同体积的缓冲液中,离心前、后分别测定重悬液和上清液

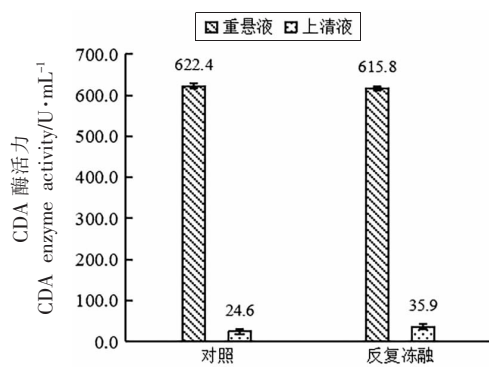


图3 反复冻融法对红球菌释放 CDA 的影响
Fig.3 The effect of repeated freezing and thawing on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

CDA 酶活力,结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,反复冻融法对红球菌细胞的破碎效果不明显。冻融前后重悬液、上清液酶活力相差甚微,CDA 仅释放了 1.82%,说明仅采用冻融法不能显著破坏红球菌细胞壁,其胞内 CDA 不能得到有效释放。

2.2.2 超声破壁处理

1) 超声输出功率对细胞释放 CDA 的影响
超声处理已被用于释放许多重要的细胞内产物^[30-32]。水浴超声处理也已成功地应用于改善各种微生物的细胞壁通透性^[33-37]。超声波将电输入能量转换为高频超声波能量,这种机械能通过水浴超声波中的液体传输^[38]。分别在 200,300,400,500,600 W 的超声波输出功率下对红球菌细胞进行超声处理,处理总时间为 25 min。测定上清液中 CDA 的酶活力,结果见图 4。

由图 4 可知,当功率为 200~400 W 时,破壁上清液中 CDA 酶活力随着超声波输出功率的增加而渐强。这是由于较大的超声输出功率使液体中形成较多的空穴,进而产生更多的空化泡,使破碎作用增强。当功率为 400~600 W 时,随着超声波输出功率增强,对 CDA 的破坏逐渐变大,CDA 酶活力逐渐减小。因此,选择 400 W 为适宜的输出功率。

2) 超声处理总时间对细胞释放 CDA 的影响
输出功率为 400 W,冰浴条件下,研究不同超声波处理总时间对细胞释放 CDA 的影响,结果见图 5。

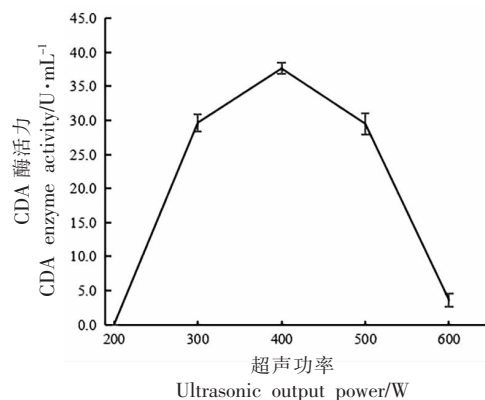


图4 超声输出功率对红球菌释放 CDA 的影响
Fig.4 The effect of ultrasound output power on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

超声波处理总时间为 5~35 min 时,上清液中 CDA 酶活力随着超声波处理总时间的延长而增大。到达 35 min 时,CDA 酶活力达到最大。当超声波处理总时间超过 35 min 后,CDA 酶活力骤降为 0。这可能是由于超声过程中处理液局部温度骤

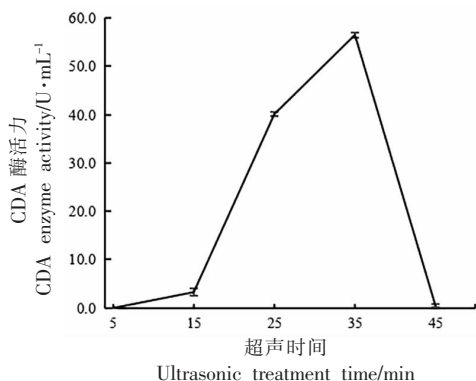


图 5 超声时间对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.5 The effect of total working time of ultrasonic on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

在 400 W,35 min 的超声处理条件下,处理前、后总酶活力损失了 49.89%,且 CDA 仅释放了 5.13%,因此超声波破壁法并不适用于红球菌。

2.2.3 球磨破壁处理 球磨是在物料研磨中是一种常用的设备,物料经球磨处理后,其表面积和孔隙率会大幅增加,其分散性、化学活性也会相应升高^[39]。采用球磨法对红球菌进行破壁处理,在最大振动频率 30 Hz 的条件下研磨 0~30 min,分时段取样,离心收集上清液并测定其酶活力,观察 CDA 的释放效果,结果如图 7 所示。

由图 7 可知,球磨时间为 0~30 min 时,细胞破碎液的上清液中 CDA 酶活力随着球磨时间的延长而均匀增大。球磨时间为 30 min 时,CDA 酶活力达到最大,为 40.3 U/mL,CDA 释放率仅为 6.97%。

2.2.4 匀浆破壁处理 匀浆器可以产生流体动力空化作用。在这个过程中,细胞壁被匀浆机产生的水动力裂解。在匀浆器中以最大可达到的水动力运行会产生最大数量的破碎细胞,从而使酶的释放达到最大化。据 Pandi^[40]报道,水动力空化对于释放位于周质空间中的酶最有效。本试验采用匀浆法对红球菌细胞进行破壁处理。在功率 185 W,13 000 r/min 转速的条件下匀浆 0~50 min,分时段

增,导致酶失活。

3) 在优化条件下超声处理对细胞释放 CDA 的影响 在 400 W,35 min 的最优超声处理条件下,研究其对 CDA 酶活力的影响,结果见图 6。

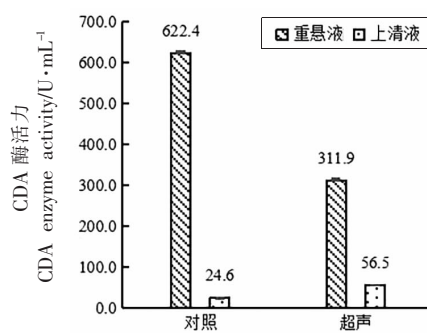


图 6 超声处理对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.6 The effect of ultrasonic treatment on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

取样,离心收集上清液并测定其酶活力,观察 CDA 的释放效果,结果如图 8 所示。

由图 8 可知,匀浆时间为 0~50 min 时,细胞破碎液的上清液中 CDA 酶活力随着匀浆时间的延长而增大,匀浆时间为 50 min 时,CDA 酶活力达到最大,为 114.1 U/mL,释放率达到 16%,且在匀浆过程中酶活力损失较小,为 9.18%。

2.2.5 液氮研磨破壁处理 液氮研磨可以将细胞冷冻起来,质地变得很脆,这样更容易破坏细胞壁。同时,液氮的超低温可防止胞内酶被降解。另一方面,研磨细腻,能对细胞造成更大程度的破坏。本试验用液氮对红球菌进行充分研磨,将得到的细胞破碎液于 10 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液,测定其中的 CDA 酶活力,结果见图 9。

由图 9 可以看出,红球菌经液氮研磨后,上清液中 CDA 酶活力明显提高,释放率达到 45.13%,且在处理过程中重悬液中基本没有酶活力损失,仅为 2.03%。因此与其它方法相比,液氮研磨提取 CDA 是有效的。

2.3 化学破壁方法对红球菌胞内 CDA 释放的影响

2.3.1 表面活性剂破壁处理 化学方法的选择是基于它们攻击细胞膜中特定抗性区域的能力。这

些方法被用于改变细胞壁和细胞膜的通透性或弱化。本试验采用 EDTA、TritonX-100、SDS 和联合方法对红球菌细胞进行破壁处理。悬浮液在 30 ℃ 的摇瓶中培养 30 min, 并在 4 ℃, 12 000 r/min 离

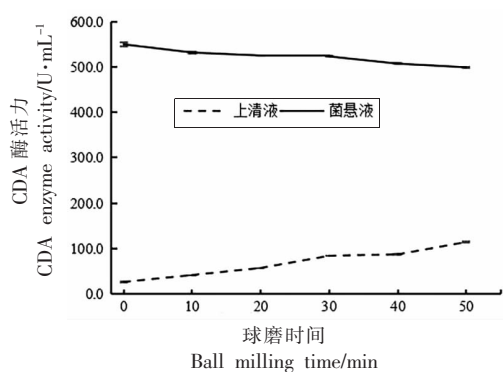


图7 球磨处理时间对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.7 The effect of ball milling treatment time on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

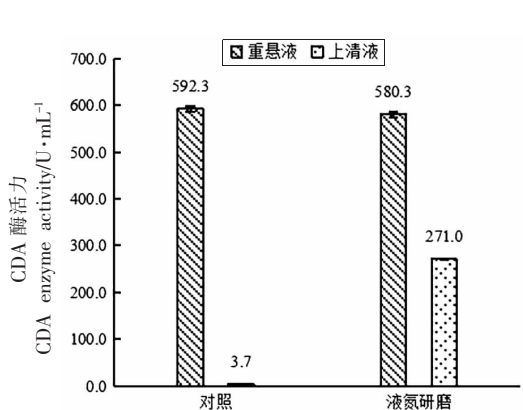


图9 液氮研磨处理对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.9 The effect of liquid nitrogen grinding treatment on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

由图 10 可知, 用 EDTA 处理红球菌细胞, 上清液 CDA 酶活力得到提高, 达到 12.8 U/mL; 用 TritonX-100 和 SDS 及联合方法对红球菌细胞进行破壁处理时, 上清液酶活与未处理前上清液 CDA 酶活力相比并未得到提高。此外, 分别用 4 种方法处理后总酶活比未处理前分别降低了 8.2%, 10.2%, 19.5%, 11.9%。综上所述, 在 4 种化学方法中, 用质量浓度为 20 g/L 的 EDTA 处理红球菌细胞, 总酶活损失最小, 且破碎后上清液 CDA 酶活

心 5 min。离心前、后, 分别测定重悬液和上清液的 CDA 酶活力, 观察 CDA 的释放效果, 结果如图 10 所示。

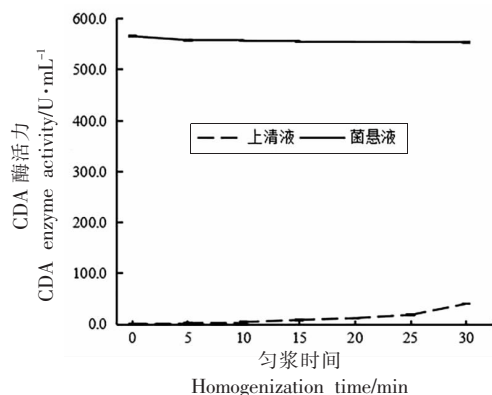


图8 匀浆时间对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.8 The effect of homogenization time on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

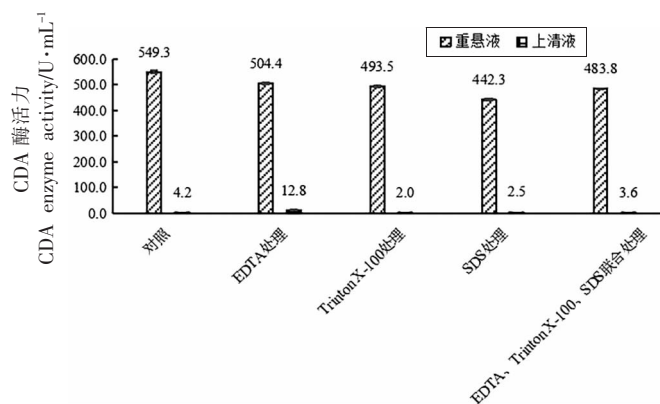


图10 EDTA、TritonX-100 和 SDS 处理对红球菌细胞释放 CDA 的影响

Fig.10 The effect of EDTA, TritonX-100 and SDS treatment on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

力最高, 然而 CDA 释放率仅 1.57%。

2.3.2 氯仿破壁处理 经 2.5% 氯仿处理的重悬液以 4 ℃, 10 000 r/min 离心 5 min。离心前、后, 分别测定重悬液和上清液的 CDA 酶活力, 观察 CDA 的释放效果, 结果如图 11 所示。

由图 11 可知, 用氯仿处理红球菌细胞, 总酶活仅损失了 2.06%, 且上清液 CDA 酶活力得到提高, 达到 30.1 U/mL, CDA 释放率为 3.70%。由此可见, 该方法虽然能保持较低的总酶活损失, 但破碎

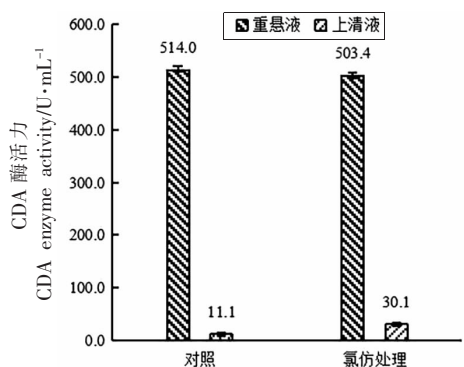


图 11 氯仿处理对红球菌释放 CDA 的影响

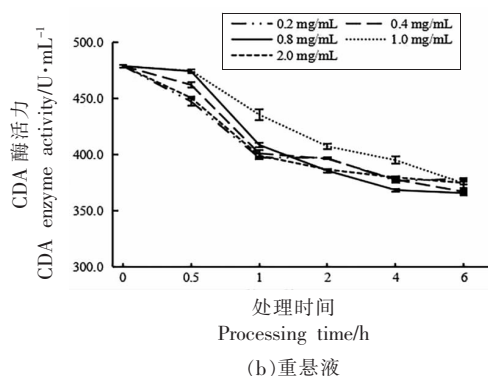
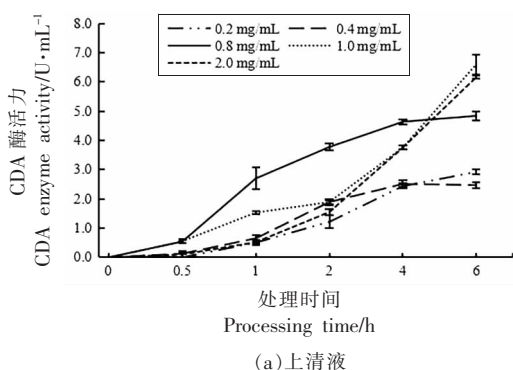
Fig.11 The effect of chloroform treatment on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

图 12 不同溶菌酶浓度下处理时间对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.12 The effect of treatment time under different lysozyme concentrations on the release of CDA from *Rhodococcus* sp. 11-3

2.5 联合破壁方法对红球菌胞内 CDA 释放的影响

根据 2.2~2.4 节各单一破壁方法的 CDA 释放率及总酶活损失率,选择液氮研磨和匀浆两种方法联合对红球菌进行破壁处理。将处理 1 和处理 2 中的重悬液分别以 4 °C, 10 000 r/min 离心 5 min。离心前、后,分别测定重悬液和上清液的 CDA 酶活力,观察 CDA 的释放效果,结果如图 13 所示。

由图 13 可知,用处理 1 和处理 2 两种联合方法处理红球菌细胞,上清液 CDA 酶活力得到大幅度提高,分别达到 313.3 U/mL 和 480.2 U/mL, CDA 释放率分别为 55.52% 和 86.17%, 两种处理总酶活

效果并不理想,因此该方法并不适用。

2.4 溶菌酶破壁方法对红球菌胞内 CDA 释放的影响

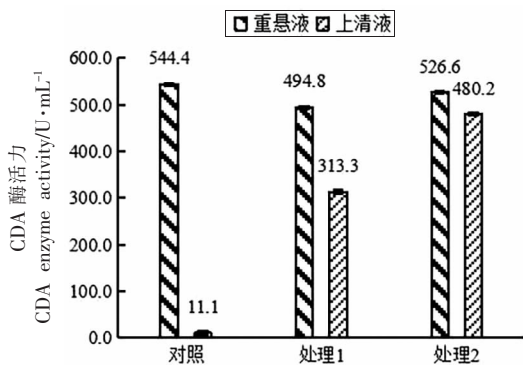
溶菌酶可专一地作用于革兰氏阳性菌的细胞壁肽聚糖分子中的 β -1,4 键,从而使其细胞壁轻易裂解,释放出细胞内含物^[28]。本试验采用不同浓度的溶菌酶于 37 °C 处理红球菌,观察在不同溶菌酶质量浓度下,处理时间对 CDA 酶活的影响,结果如图 12 所示。

结果表明,溶菌酶质量浓度为 1.0 mg/mL,处理 6 h,上清液 CDA 酶活力达到最大,为 6.6 U/mL,释放率为 1.38%。用溶菌酶处理红球菌菌体细胞,酶解后菌体残留 CDA 酶活力与未处理基本没有差别。

力损失分别为 9.11% 和 3.27%。由此可见,用处理 2 破碎红球菌效果较理想。

2.6 不同破壁方法处理的红球菌细胞的 SEM 观察

利用扫描电子显微镜观察经不同破壁方法处理的红球菌,包括:未处理组、反复冻融组、超声波处理组(400 W, 35 min)、球磨处理组(30 Hz, 50 min)、匀浆处理组(13 000 r/min, 30 min)、液氮研磨组、EDTA 处理组、氯仿处理组、溶菌酶处理组(1.0 mg/mL, 6 h)、处理 1(液氮研磨后,匀浆处理 13 000 r/min, 30 min)、处理 2(匀浆处理 13 000 r/min, 30 min 后,液氮研磨),结果见图 14。



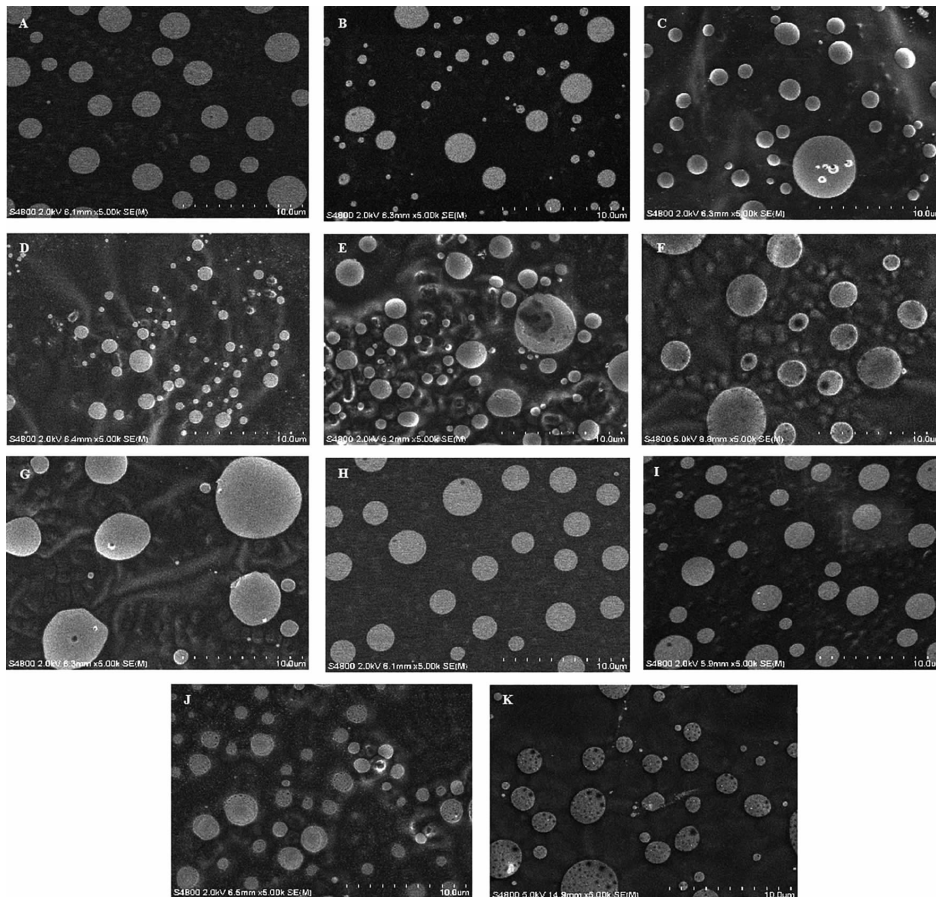
注:处理1为先液氮研磨后匀浆处理;处理2为先匀浆处理后液氮研磨。

图 13 液氮研磨和匀浆联合处理对红球菌释放 CDA 的影响

Fig.13 The effect of combined treatment of liquid nitrogen grinding and homogenization on the release of CDA

from *Rhodococcus* sp. 11-3

由图 14 可知, 未经处理的红球菌细胞表面光滑(图 14A); 经反复冻融、超声波、球磨、EDTA、氯仿、溶菌酶处理后的红球菌细胞表面变化很小, 仅有个别细胞出现小孔洞(图 14B、14C、14D、14G、14H、14I)。经匀浆处理的红球菌个别细胞表面出现较大孔洞, 内容物外泄(图 14E); 经液氮研磨处理的红球菌细胞表面都遭到破坏, 出现密密麻麻的孔洞, 个别细胞表面被严重破坏, 出现较大的孔洞(图 14F); 经液氮研磨和匀浆联合处理的红球菌细胞表面出现更多密集孔洞(图 14J); 经匀浆和液氮研磨联合处理的红球菌细胞表面的孔洞比图 14J 的更大且密集。以上结果表明, 匀浆处理和液氮研磨对红球菌细胞破壁有效果, 匀浆处理和液氮研磨联合处理效果更明显。



注:A 为对照组;B 为反复冻融处理;C 为超声处理;D 为球磨处理;E 为匀浆处理;F 为液氮研磨处理;G 为 EDTA 处理;H 为氯仿处理;I 为溶菌酶处理;J 为先液氮研磨后匀浆处理;K 为先匀浆处理后液氮研磨。

图 14 不同破壁方法处理的红球菌细胞的 SEM 图

Fig.14 SEM images of *Rhodococcus* sp. 11-3 cells treated by different breaking methods

3 结论

不同的破壁方法对红球菌菌株的胞内 CDA 释放效率及细胞形态变化的影响有明显差别。对于红球菌细胞,液氮研磨和匀浆是两种较优的破壁方法。破壁处理后的细胞表面出现明显孔洞,CDA 释放率分别达到 45.13% 和 16.00%,处理过程中总酶活力损失较小。利用先匀浆后液氮研磨的联合方法处理红球菌,能够在更大程度上破坏细胞壁,产生更多、更大的密集孔洞,CDA 释放率达到 86.17%。由此可见,匀浆和液氮研磨联合处理有效提高了红球菌胞内 CDA 的释放程度,作为一种操作简单且高效的处理方式,为胞内 CDA 的分离纯化提供了一种有效途径,同时,也为红球菌应用于壳聚糖的酶法工业化生产,提供了重要的推动作用。

参 考 文 献

- [1] 朱先玉,丛海花,尹恒. 几丁质脱乙酰酶的特点及应用[J]. 渔业研究, 2019, 41(2): 167-174.
ZHU X Y, CONG H H, YIN H. Characteristics and application of chitin deacetylase[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(2): 167-174.
- [2] OLATUNDE O O, BENJAKUL S. Natural preservatives for extending the shelf-life of seafood: A revisit[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17(6): 1595-1612.
- [3] BATISTA R A, PEREZ ESPITIA P J, JULYANA D S S Q, et al. Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 205: 106-116.
- [4] CUI H Y, YUAN L, LIN L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for bio-control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 177: 156-164.
- [5] NO H K, MEYERS S P, PRINYAWIWATKUL W, et al. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(5): 87-100.
- [6] RUNGSARDTHONG V, WONPUTTANAKUL N, KONGPIEN N, et al. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(3): 589-593.
- [7] ABDOU ENTSAR S, NAGY KHALED S A, ELSABEE MAHER Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 1359-1367.
- [8] 秦汪艳. 几丁质脱乙酰酶产生菌的诱变育种及产酶条件研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.
QIN W Y. Mutagenesis breeding of a strain or chitin deacetylase production and study on its fermentation condition[D]. Haikou: Hainan University, 2018.
- [9] ASPRAS I, JAWORSKA M M, GORAK A. Kinetics of chitin deacetylase activation by the ionic liquid [Bmim][Br][J]. Journal of Biotechnology, 2017, 251: 94-98.
- [10] CHANG K L B, TSAI G, LEE J, et al. Heterogeneous *N*-deacetylation of chitin in alkaline solution[J]. Carbohydrate Research, 1997, 303(3): 327-332.
- [11] 柴金龙,王敏卜,杭加豪,等. 产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 89-95.
CHAI J L, WANG M B, HANG J H, et al. Screening, identification and enzyme production conditions optimization of chitin deacetylase-producing marine bacteria[J]. China Brewing, 2019, 38(10): 89-95.
- [12] 魏丽蓉,秦汪艳,李永成. 几丁质脱乙酰酶高产菌株的选育及其发酵特性研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(7): 61-66.
WEI L R, QIN W Y, LI Y C. Screening and fermentation characterization of high yield chitin deacetylase-producing strains[J]. China Brewing, 2018, 37(7): 61-66.
- [13] 岳洪霞,赵祥颖,田延军,等. 储存条件对菌株 11-3 几丁质脱乙酰酶稳定性的研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(7): 61-63.
YUE H X, ZHAO X Y, TIAN Y J, et al. Effect of storage conditions on the stability of chitin deacetylase[J]. China Brewing, 2010, 29(7): 61-63.
- [14] 张建旭,王璐颖,郑晓卫,等. 红球菌利用小龙虾壳粉产几丁质脱乙酰酶的培养条件优化[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 216-223.
ZHANG J X, WANG L Y, ZHENG X W, et al. Optimization of cultivation conditions of *Rhodococcus* for producing chitin deacetylase using crayfish shell powder[J]. Journal of Chinese Institute of Food Sci-

- ence and Technology, 2021, 21(4): 216–223.
- [15] PRASAD S, BHALLA T C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 725–741.
- [16] DAVIS B J. Disc gel electrophoresis–II. Method and application to human serum proteins[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1964, 121: 404–427.
- [17] PRASAD S, RAJ J, BHALLA T C. Purification of a hyperactive nitrile hydratase from resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA–34[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2009, 49(3): 237–242.
- [18] 王世伟, 王卿惠, 王惟熠, 等. 脲水合酶蛋白质纯化的研究进展[J]. *高师理科学刊*, 2013, 33(1): 4. WANG S W, WANG Q H, WANG W Y, et al. Research process on protein purification of nitrile hydratase[J]. *Journal of Science of Teachers' College and University*, 2013, 33(1): 4.
- [19] 李琦, 张兰威, 韩雪, 等. 破壁方法对嗜热链球菌 SP1.1 胞内乳糖代谢关键酶活性的影响及其条件优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 183–187. LI Q, ZHANG L W, HAN X, et al. Effect of different cell wall disruption methods on key enzyme activities involved in intracellular lactose metabolism in *Streptococcus thermophilus* SP1.1 and optimization of lysozyme digestion conditions[J]. *Food Science*, 2011, 32(9): 183–187.
- [20] CHANG Y K, CHU L. A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite – ScienceDirect[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35(1): 37–47.
- [21] MARTINA S, DAVOR V, ZVJEZDANA F, et al. Effect of different variables on the efficiency of the baker's yeast cell disruption process to obtain alcohol dehydrogenase activity[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2013, 169(3): 1039–1055.
- [22] LIU D, ZENG X A, SUN D W, et al. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 18(18): 132–137.
- [23] 刘丽萍. 几丁质脱乙酰酶产生菌的筛选[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007. LIU L P. Screening of the strains producing chitin deacetylase[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2007.
- [24] FARRANT J, WALTER C A, LEE H, et al. Use of two–step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing[J]. *Cryobiology*, 1977, 14(3): 273–286.
- [25] BHAT P, PAWASKAR G M, RAVAL R, et al. Expression of *Bacillus licheniformis* chitin deacetylase in *E. coli* pLysS: Sustainable production, purification and characterisation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 1008–1013.
- [26] PHILLIPS ERNEST O N, GIOVINAZZ S, MENZ SARAH L, et al. Preparation of cell extracts by cryogrinding in an automated freezer mill[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(167): e61164.
- [27] ANAND H, BALASUNDARAM B, PANDIT A B, et al. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35(2): 166–173.
- [28] AYTEKIN Ö Ü, ARISOY S, AYTEKIN A Ö, et al. Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X–prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 29: 163–171.
- [29] SPIDEN E M, SCALES P J, YAP B, et al. The effects of acidic and thermal pre treatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp.[J]. *Algal Research*, 2015, 7: 5–10.
- [30] GERMEC M, TARHAN K, YATMAZ E, et al. Ultrasound - assisted dilute acid hydrolysis of tea processing waste for production of fermentable sugar[J]. *Biotechnology Progress*, 2016, 32(2): 393–403.
- [31] ARIKAWA H, SATO S, FUJIKI T, et al. Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS–sonication treatment[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124(2): 250–254.
- [32] KULA M R, SCHUTTE H. Purification of proteins and the disruption of microbial cells[J]. *Biotechnology Progress*, 1987, 3(1): 31–42.
- [33] AVHAD D N, RATHOD V K. Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(1): 182–188.
- [34] MONKS L M, RIGO A, MAZUTTI M A, et al. Use

- of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids[J]. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 2013, 2(2): 165-169.
- [35] GAJENDRAGADKAR C N, GOGATE P R. Intensified recovery of valuable products from whey by use of ultrasound in processing steps - A review[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016(32): 102-118.
- [36] KUROKAWA M, KING P M, WU X G, et al. Effect of sonication frequency on the disruption of algae[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31: 157-162.
- [37] BOUKROUFA M, BOUTEKEDJIRET C, PETIGNY L, et al. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, 24: 72-79.
- [38] PATIL M D, SHINDE A S, DEV M J, et al. Combined effect of attrition and ultrasound on the disruption of *Pseudomonas putida* for the efficient release of arginine deiminase [J]. *Biotechnology Progress*, 2018, 34(5): 1185-1194.
- [39] 唐永康, 俞建峰, 夏晓露. 球磨联合超声波提取榛子蛋白的研究[J]. *现代化工*, 2021, 41(9): 149-154. TANG Y K, YU J F, XIA X L. Study on extraction of hazelnut protein by ball milling and ultrasound[J]. *Modern Chemical Industry*, 2021, 41(9): 149-154.
- [40] PANDIT B. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8(3): 251-256.

Effects of Cell Wall Disruption Methods on the Release of Intracellular Chitin Deacetylase from *Rhodococcus* sp. 11-3

Xiao Yu¹, Shi Wenqi², Yu Hongwei¹, Ma Aijin³, Sang Yaxin¹, Sun Jilu^{1*}

¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

²College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, Hebei

³School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract *Rhodococcus* sp. 11-3 is a high-yielding chitin deacetylase (CDA) strain. The enzyme catalyzes chitin to produce chitosan, which plays an important role in the green production of chitosan. However, the CDA produced by *Rhodococcus* sp. 11-3 is an intracellular enzyme, which has become a major obstacle to the catalytic reaction. In order to improve the release efficiency of CDA, different physical methods (repeated freezing and thawing, ultrasounding, ball milling, homogenization and liquid nitrogen grinding), chemical methods (surfactants treatment, chloroform treatment) and biological method (lysozyme treatment) were used to disrupt the cell wall of *Rhodococcus* sp. 11-3. The enzyme activity and release efficiency of CDA were determined, and the changes of cell morphology was observed by scanning electron microscope. The results showed that different methods had very different effects on the cell wall breaking. Among them, liquid nitrogen grinding was the best method. By using it, there were fine holes on the cell surface, the release efficiency of CDA was 45.13%, and the loss rate of total enzyme activity was 2.03%. Homogenization was next only to liquid nitrogen grinding, the release efficiency of CDA was 16.00%, and the loss rate of total enzyme activity was 9.18%. Then, *Rhodococcus* sp. 11-3 cell was treated with homogenization and liquid nitrogen grinding in succession. The results showed that more and larger pores were produced on the cell surface, the release efficiency of CDA was up to 86.17%, the loss rate of total enzyme activity was 9.11%, and the CDA activity in the supernatant was 480.2 U/mL, which was 1.48 times higher than that of liquid nitrogen grinding. Therefore, the combined treatment of homogenization and liquid nitrogen grinding could effectively disrupt the cell wall of *Rhodococcus* sp. 11-3 and improve the release efficiency of intracellular CDA. The results would promote the application of *Rhodococcus* sp. 11-3 CDA in the production of chitosan.

Keywords cell wall disruption method; *Rhodococcus*; chitin deacetylase; liquid nitrogen grinding; homogenization