

# 透性化细胞制备方法的研究进展

刘晓华, 李海星, 陈燕, 曹郁生

(南昌大学中德联合研究院, 食品科学国家重点实验室, 江西南昌 330047)

**摘要:**透性化细胞是指在不造成细胞裂解以及不破坏细胞内部有机结构的情况下,改变细胞壁和细胞膜的通透性,使得小分子和一些较大分子物质能够自由进出的细胞。细胞经过透性化处理后,胞内酶的催化作用得以充分发挥,同时完整的细胞结构对胞内酶具有一定的保护作用,延长酶的使用寿命。综述了目前透性化细胞的制备方法,包括物理法、化学法和基因工程法,比较了不同方法的特点、机制和适用性,为通过透性化细胞进行生物转化提供了新的思路。

**关键词:**透性化细胞, 制备, 方法

## Research progress in the methods for the preparation of permeabilized cell

LIU Xiao-hua, LI Hai-xing, CHEN Yan, CAO Yu-sheng

(Sino-German Joint Research Institute, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Permeabilized cell is a kind of whole cell, which the permeability of the cell wall and membrane has been improved by physical or chemical methods. Permeabilization of the cells enables fast diffusion of the substrate and product across the cell membrane. The stability and efficiency of the endocellular enzymes are increased. The paper reviewed the methods for the preparation of permeabilized cells used as whole cell biocatalysts. The methods, such as physical, chemical and gene engineering, have been introduced and compared.

**Key words:** permeabilized cell; preparation; methods

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)11-0475-05

透性化细胞是指通过物理或化学等方法,在不造成细胞裂解以及不破坏细胞内部有机结构的情况下,改变细胞壁和细胞膜的通透性,使得小分子和一些较大分子物质能够自由进出的细胞。发酵工业采用完整细胞作为生物发酵剂比用纯化的酶制剂具有两大优势:无需从细胞中提取出酶,减少了工序,并避免了酶失活;细胞易于和产物分离并回收,可以实现酶的重复使用。可是,由于细胞壁和细胞膜对底物和产物的穿透屏蔽作用,常致使转化效率很低。为提高细胞内外物质的交换速率,Felix等提出了透性化细胞的制备方法<sup>[1]</sup>。随着研究的不断深入,透性化细胞的各种制备方法:物理法、化学法以及新兴的基因工程法已有诸多报道。透性化细胞的成功应用,特别是将透性化细胞与固定化技术相结合,将为发酵工业提供更加高效和经济的生产新技术,促进行业的技术升级。本文综述了透性化细胞制备方法的最新研究进展,为开展透性化细胞的研究提供一些思路和参考。

收稿日期:2010-08-14

作者简介:刘晓华(1973-),男,博士,副研究员,研究方向:食品生物技术。

基金项目:江西省工业科技支撑重点计划项目(S00746)。

## 1 物理法

物理法是指通过冰晶、渗透压或超声波等来破坏细胞壁和细胞膜的结构,从而提高细胞的通透性。主要包括冻融法、渗透压法和超声波法。

### 1.1 冻融法

冻融法是将待处理的细胞冷至 $-20^{\circ}\text{C}$ ,然后置于室温下融化,如此反复冻融多次,反复冷冻时细胞中形成的冰晶及剩余液体中盐浓度的增高可以破坏细胞壁和细胞膜的结构,甚至引起细胞破裂。Breedveld等用三叶草根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* Biovar trifolii TA-1)将葡萄糖合成环 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-葡聚糖时发现,菌株在 $200\text{mmol/L}$  NaCl溶液中具有合成葡聚糖的能力,并且与超声波处理( $40\text{W}$   $0^{\circ}\text{C}$  处理 $30\text{s}$ ,共8次,每次间隔 $1\text{min}$ )后的细胞提取物具有相同的酶活性,但菌株在不含NaCl的溶液中不能合成葡聚糖。研究还发现,提高NaCl溶液的浓度,细胞的通透性增加。当细胞在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻,并在室温下解冻,反复处理8次后,细胞同样具有合成葡聚糖的活性<sup>[2]</sup>。Tan等将毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻8h,然后在室温解冻处理,并与 $30\%$  (v/v)丙酮、 $2.5\%$  (v/v)甲苯乙醇混合物(1:4)和 $0.4\%$  (w/v)CTAB的透性化处理效果进行比较,发现细胞的热稳定性和其胞内酶(氨基酸氧化酶

和过氧化氢酶) 的表现酶活呈负相关。冻融处理细胞的表现酶活最低, 但热稳定性最好, CTAB 处理细胞的表现酶活最高, 但热稳定性最差<sup>[3]</sup>。这表明冻融处理比超声波或化学处理更利于保留胞内酶的活性。

### 1.2 渗透压法

渗透压法是指通过盐溶液或空气干燥来改变细胞内外的渗透压, 在内外压差的作用下破坏细胞壁和细胞膜的结构, 提高细胞的通透性。Cavonas 等在研究渗透压对大肠杆菌生物合成 L-肉碱时发现, 菌体在 NaCl 溶液中具有催化反应的活性, L-肉碱的产量随着 NaCl 溶液浓度的提高而增加, 当 NaCl 溶液浓度为 0.5 mol/L 时, L-肉碱的产量比对照增加 1 倍<sup>[4]</sup>。Matsumoto 等将米根霉的脂肪酶基因克隆到酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* MT8-1), 在用酵母细胞将植物油和甲醇催化合成生物柴油时发现, 未经透性化处理的酵母细胞几乎没有催化合成酯的活性, 而透性化处理后的酵母细胞的催化活性显著提高。酵母细胞在 42℃ 下空气干燥 3h 的催化活性比冻融法高 1/3<sup>[5]</sup>。段学辉等研究了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* TB6) 的通透性对 ATP 活性的影响, 分别比较了 24℃ 下气流干燥 24h、超声波处理 (0.5min, 10 次) 和低浓度甲苯处理的效果, 结果发现空气干燥处理的效果最好, 其次是超声波处理, 低浓度甲苯处理的活性最低。经透性化处理后, 反应速率都有进一步的提高, 气流干燥处理的细胞反应时间缩短了 2h, 甲苯处理的细胞反应时间缩短了 1h, 表明酶的活性与细胞的通透性有直接的关系, 提高细胞的通透性有利于充分发挥胞内酶的催化活性作用<sup>[6]</sup>。

### 1.3 超声波法

超声波具有频率高、波长短、定向传播等特点, 当超声波在液体中传播时, 液体中交替重复的产生巨大的压力和拉力, 由于拉力的作用, 使液体拉伸而破裂, 从而出现细小的空穴, 在超声波的继续作用下, 空穴泡又迅速闭合, 产生强烈的冲击波压力, 从而破坏悬浮于其中的细胞结构。卢群等研究了超声波对酵母细胞通透性的影响, 采用频率 20~25kHz, 功率分别为 600、500、400W, 超声波的作用时间为每次 3s, 间隔时间为 4s, 作用的总时间分别为 90、135、180、225、270s。结果表明, 随着超声波功率和时间的增加, 细胞破碎程度增加, 细胞的存活率下降。在功率 500W, 作用总时间 225s 的超声波条件下, 核酸渗透增加 36%, 蛋白质渗透增加 22%, 细胞存活率为 85%<sup>[7]</sup>。

## 2 化学法

化学法是指通过有机溶剂和表面活性剂等来破坏细胞壁和细胞膜的结构, 从而提高细胞的通透性。常用的有机溶剂有甲苯、氯仿、乙醇和异丙醇等; 常用的表面活性剂有曲通 X-100、溴化十六烷基三甲基铵 (CTAB) 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 等。

### 2.1 有机溶剂处理

有机溶剂可增加细胞膜中脂类的流动性, 并能破坏细胞膜中蛋白质的氢键, 使之变性。高浓度有机溶剂可溶解细胞膜中的脂类, 破坏细胞膜的结构。甲苯和氯仿是常用的两种有机溶剂, 可以用来处理

酵母和细菌。Kubal 等通过甲苯对酵母细胞进行透性化处理, 再通过戊二醇将透性化酵母细胞固定在鸡蛋清中。透性化处理后, 酵母细胞中的过氧化氢酶的活性从 300U/g 提高到 1875U/g。固定化后的细胞在 4℃ 下放置 40d 后仍有 90% 的酶活。当该透性化细胞应用于牛奶时, 能在 45min 内完全分解牛奶中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 经过 5d 连续 10 批次的使用, 酶活几乎没有下降<sup>[8]</sup>。张峻等用 2% 甲苯在 50℃ 处理亚栖热菌 CBS-01 细胞 20min, 再将透性化细胞固定化后, 发现最适反应温度不变, 间歇反应时, 催化麦芽糖转化为海藻糖的转化率可达 60%, 重复使用 4 次 (每次 50℃、反应 24h) 酶活损失小于 20%, 转化率可保持在 50% 以上<sup>[9]</sup>。Kim 等用 0.5% 氯仿在 4℃ 处理人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropi* SY509) 15min, 通过该菌的反硝化作用来去除环境中的硝酸盐, 结果表明经透性化处理的细胞比未处理的具有更高的清除率, 且透性化细胞能将硝酸盐直接转化成氮气, 而未经处理的细胞只能将硝酸盐转化成亚硝酸盐<sup>[10]</sup>。

不同有机溶剂的比较研究表明, 甲苯处理的透性化细胞常具有较高的活性。高惠玲等比较了有机溶剂 (甲苯、氯仿和戊二醛) 及表面活性剂 (吐温 80 和司盘 20) 对微球菌透性化处理的效果, 发现各种试剂均可增加细胞的通透性, 其中, 甲苯的效果最好, 吐温 80 和司盘 20 次之, 氯仿和戊二醛对细胞破坏作用较大, 使酶基本失活。优化后的处理条件是 5% 甲苯水浴 40min, 得到的透性化细胞, 当用 10% 淀粉液化液为底物进行海藻糖转化实验时, 转化率可达 70%, 该透性化细胞连续进行 6 批次酶反应 (12h/批), 酶活基本保持稳定<sup>[11]</sup>。植物乳酸杆菌的 L-阿拉伯糖异构酶是一种胞内酶, 完整细胞的酶活较低。超声波破碎易造成酶活损失, 导致生物转化塔格糖产率较低, 而采用菌体细胞进行生物转化时, 细胞膜成为半乳糖底物和塔格糖产物进出的障碍, 同样影响生物转化率。张华等将植物乳酸杆菌 (*L. plantarum* SK-2) 细胞 (50mg) 悬浮于 1mL 磷酸盐缓冲液中, 分别添加 1mL 已知浓度渗透剂: 10% (v/v) 乙醇, 1% (v/v) 乙醚, 5% (v/v) 甲苯, 0.2% (v/v) 曲通 X-100, 0.2% (w/v) CTAB, 15℃, 振荡 10min。经过上述透性化处理的细胞酶活比完整细胞和超声波破碎的细胞表现酶活力均增加, 甲苯处理的透性化细胞的最大酶活达 9.3U, 比超声波破碎的细胞表现酶活力提高 5 倍。透性化细胞在 60℃ 保温 2h, L-阿拉伯糖异构酶的酶活达 80%, 比超声波破碎抽提液中的酶对热更为稳定<sup>[12]</sup>。

与甲苯和氯仿相比, 乙醇等醇类的毒性较低, 更适合用来处理细胞。闫亚丽等将 1g 湿乳酸克鲁维酵母用 25mL 70% 乙醇渗透处理一定时间后, 用 pH7.0 的 1.5mol/L 磷酸缓冲液洗涤菌体, 再经真空冷冻干燥, 得到透性化细胞乳糖酶。和提取方法制备的纯化乳糖酶比较, 透性化细胞乳糖酶的 pH 稳定性和热稳定性范围均大于纯化乳糖酶<sup>[13]</sup>。Panesar 等利用马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus* NCIM 3465) 中的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶分解脱脂乳中的乳糖,

为克服细胞膜对乳糖的屏障作用,用乙醇对酵母细胞透性化处理 15min,该透性化细胞能水解脱脂乳中 89% 的乳糖<sup>[14]</sup>。Lee 等采用 50% 的乙醇在 4℃ 下处理乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 菌悬液 (10.4g/L) 15min,获得透性化细胞,利用其中的  $\beta$ -半乳糖苷酶将乳糖和果糖合成乳果糖,当底物乳糖和果糖的浓度分别为 40% 和 20% (w/v)、pH7.0、60℃ 下反应 3h 后,乳果糖的浓度达到 20g/L,乳果糖的产率为 6.8g/L·h,乳果糖的浓度和产率分别是未透性化处理的 1.3 倍和 2.1 倍<sup>[15]</sup>。这些研究均表明,乙醇是透性化处理真核酵母细胞的良好溶剂。

乙醇在透性化处理原核细菌细胞方面同样表现良好,Somkuti 等比较了丙酮-甲苯 (9:1, 50 $\mu$ L/mL)、0.1% SDS 和乙醇溶液 (5%~70%) 三种处理方法对嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 中  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响,发现随处理温度 (4~37℃) 的升高和处理时间 (5~30min) 的延长,均能提高透性化细胞的酶活,当菌体经 30%~55% 的乙醇处理后,菌体已全部死亡,但  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性提高了 15 倍。该透性化细胞在 -40℃ 下存放 6 个月,  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性没有损失,将其加入到脱脂乳中, 37℃ 反应 30min,近 80% 的乳糖被水解,从而生产出低乳糖奶<sup>[16]</sup>。

一些不同醇透性化处理酵母细胞的研究表明,异丙醇处理方法更有利于保存细胞中酶的活性。Liu 等比较了甲醇、乙醇和异丙醇处理高效表达乙二醛酶 I 的重组酿酒酵母细胞,乙二醛酶 I 在谷胱甘肽存在时能将甲基乙二醛转化为 S-乳酰谷胱甘肽。经醇处理后,酵母细胞中的乙二醛酶 I 活性显著提高,当用 40% 的乙醇或异丙醇在 4℃ 处理 10min 后,初始 S-乳糖谷胱甘肽的产率比未处理细胞的分别提高了 364 倍和 582 倍。重复实验显示,经透性化处理的细胞连续使用了 3 批次后,酶活仍然具有初始的 80%。研究结果还显示,经醇溶液处理后,酵母细胞的细胞膜受到破坏,细胞内的乙二醛酶 I 只有很少量的泄漏,但底物和产物却有很好的通透性。与采用乙酸乙酯从细胞内提取出乙二醛酶 I 相比,透性化细胞的初始 S-乳糖谷胱甘肽的产率要高出 1.5~2.5 倍<sup>[17]</sup>。Liu 等比较了不同醇处理对 3 株酵母细胞中乙二醛酶、异柠檬酸裂合酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响,发现相同浓度下,经异丙醇处理后的酶活性总是高于乙醇处理方法,且细胞经 40% 异丙醇在 4℃ 下处理 30s 后的 3 种酶的活性均较高。分子量稍低的乙二醛酶在透性化细胞使用过程中会有少量的泄漏出细胞,而分子量较大的  $\beta$ -半乳糖苷酶 (540kDa) 则不能从透性化细胞中泄漏出去<sup>[18]</sup>。Kondo 等研究了不同醇透性化处理对絮状酵母中乙二醛酶活性的影响,结果同样表明异丙醇处理的效果要好于乙醇,且 40% 的异丙醇处理 10min 后,所得透性化细胞中乙二醛酶的活性较高,加入 EDTA 同时处理不影响酶的活性。当醇的浓度高于 40% 时,决大部分透性化细胞都已成为死细胞,酵母细胞的絮凝能力不受醇

浓度和处理时间的影响<sup>[19]</sup>。

## 2.2 表面活性剂处理

曲通 X-100 是一种非离子表面活性剂,它具有亲水性和疏水性基团,能溶解细胞壁和细胞膜上的蛋白质和脂质,因而具有破坏细胞壁和细胞膜的作用。Fontanille 等比较了物理法 (冻融、超声波) 和化学法 (甲苯、氯仿、二乙酯和曲通 X-100) 单独或组合处理假单胞菌 (*Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491) 的效果,通过细胞中的  $\alpha$ -蒎烯氧化裂解酶将  $\alpha$ -蒎烯转化为 isonovalal。发现冻融法与 5% 的甲苯、氯仿或二乙酯,或与 1% 的曲通 X-100,或与超声波 (125W/cm, 30s, 3 个循环,间隙 1min) 组合处理,所得透性化细胞的酶活性均高于酶提取液,并比未经处理的细胞高近 3 倍<sup>[20]</sup>。王舒等用 15% (w/v) 甘氨酸和 1% (v/v) 曲通 X-100, pH6.81, 冰浴 1h, 处理氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*), 经透性化处理的细胞中右旋糖酐糊精酶可达到酶活最大值的 90% 以上,而单独应用其中一种化学试剂的提取效率均不理想,相对酶活小于 50%。小分子的甘氨酸易渗透到细胞壁外侧的肽聚糖孔隙间,通过氢键、范德华引力、静电引力等化学亲和力改变肽聚糖网状结构,从而改变细胞壁和细胞膜的通透性。与超声波细胞破碎法相比,该方法条件温和,酶的释放率较高并易于工业放大<sup>[21]</sup>。De Groeve 等用 1% 曲通 X-100 在室温下处理大肠杆菌 (*E. coli* CGSC8974) 5min,该透性化细胞中的乳糖磷酸化酶能将乳糖转化成  $\alpha$ -D-半乳糖 1-磷酸盐 ( $\alpha$ -Gal1P), 产率达 9.5g/L,透性化处理能显著提高反应底物和产物在细胞膜的通透性,细胞中只有不到 5% 的乳糖磷酸化酶渗漏到细胞外<sup>[22]</sup>。毛地黄皂苷也是一种非离子型表面活性剂,可增加细胞膜的通透性。Khlopova 等利用 0.1% 毛地黄皂苷在 30℃ 处理多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 15min,利用该透性化细胞中的乙醇氧化酶将其做成测定甲醛的生物传感器,其测定甲醛的灵敏度约为完整细胞的 10 倍<sup>[23]</sup>。

CTAB 是一种阳离子表面活性剂,能溶解细胞壁和细胞膜上的蛋白质和脂质,亦具有破坏细胞壁和细胞膜的作用。魏明等分别用 5% (v/v) 乙醇、20% (v/v) 乙醚、20% (v/v) 甲苯、1% (w/v) CTAB,对嗜酸乳杆菌细胞进行透性化处理,结果发现经过透性化处理的细胞亚油酸异构酶活性显著提高,其中 CTAB 处理法最好,酶活高达 405.6U/g,是超声波处理的 5.4 倍。同时透性化细胞中亚油酸异构酶热稳定性提高,60℃ 保温 2h,残余酶活达 80%,透性化细胞生物转化共轭亚油酸转化率达 84.5%<sup>[24]</sup>。该透性化细胞转化亚油酸为共轭亚油酸的反应动力学表明,透性化嗜酸乳杆菌细胞有利于共轭亚油酸的生物转化<sup>[25]</sup>。崔建东等研究了不同表面活性剂 (曲通 X-100、吐温 80、CTAB、SDS) 和有机试剂 (丙酮、异丙醇、乙醇) 对苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌细胞通透性的影响。发现曲通 X-100、吐温 80、SDS、异丙醇和乙醇对提高细胞的通透性没有显著影响,但 CTAB 和丙酮可以显著改善细胞通透性,提高反式肉桂酸

转化率。原子力显微镜检测结果表明,用 0.15g/L CTAB 处理细胞后可以明显改变细胞形态,处理后的细胞表面粗糙,多皱折,表明细胞膜的通透性得到提高。流式细胞仪检测表明,CTAB 处理细胞后,平均荧光道数( MnX) 是对照的 23 倍,细胞通透性得到显著提高,反式肉桂酸转化率是对照的 1.83 倍,达到 82%<sup>[26]</sup>。

CTAB 处理不仅对原核细胞有效,同样可以提高真核酵母细胞的通透性,于明安等用 2% 的 CTAB 处理啤酒酵母,所得透性化酵母细胞中的醇脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性分别比未经处理的酵母细胞高 482 倍和 615 倍,在相同条件下,透性化细胞对 3-羧基丁酸乙酯的还原反应比未经处理的酵母细胞快<sup>[27]</sup>。Presecki 等对面包酵母用 0.2% (w/v) CTAB 透性化处理 5min,该细胞在 2.5h 内能将 79.4% 的富马酸转化成 L-苹果酸,而未经透性化处理的细胞转化率只有 10.9%,这主要是由于细胞壁和膜影响反应底物和产物的传递所致<sup>[28]</sup>。

透性化细胞经固定化后可以重复使用,从而节省生产成本。Vignoli 等用 0.2% CTAB 的氯化钠溶液 (0.1N) 在 4℃ 下处理运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 10min,并用丝瓜囊进行固定化,透性化细胞将蔗糖转化为山梨醇的产率从 1.06g/L·h 提高到 1.65g/L·h<sup>[29]</sup>。Cheng 等用 0.3% (w/v) CTAB 在 25℃ 处理粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 75min,并用 2% (v/v) 戊二醛固定透性化细胞,分批发酵时青霉素 G 转化成 6-氨基青霉烷酸的转化率达 75%,连续使用 15 批次,细胞中青霉素 G 酰化酶的酶活没有损失,连续使用 31 批次,其中的酶活仍保留 65%<sup>[30]</sup>。Gong 等用 0.2% (w/v) CTAB 在 24℃ 处理面包酵母细胞 15min,并用聚乙烯醇固定透性化细胞,该细胞连续使用 20 批次,胞内的乙醇脱氢酶酶活仍保留 88%,存放 1 个月后的乙醇脱氢酶酶活仍有 81%<sup>[31]</sup>。这些研究均表明,透性化处理后的细胞经固定化后具有很高的酶活,能够实现多次重复使用,满足工业生产的需求。

也有研究表明,细胞先固定化后再进行透性化处理更有利于保存胞内酶的活性和工业应用,Upadhyay 等用 0.4% CTAB 的磷酸钾溶液 (0.1mol/L) 在 pH7.0、25℃ 下处理瘦弱红酵母 (*Rhodotorula gracilis*) 30min,可显著提高细胞内 D-氨基酸氧化酶和过氧化氢酶的活性,但是这些酶会从透性化细胞中缓慢泄漏出来,泄漏出的 D-氨基酸氧化酶在缺少 EDTA、β-巯基乙醇和甘油的环境中迅速失活,而在透性化细胞中的 D-氨基酸氧化酶则不需要这些保护剂。当用 0.2% 戊二醛在 4℃ 对透性化细胞处理 10min,能有效防止细胞内的 D-氨基酸氧化酶和过氧化氢酶的泄漏。CTAB 处理后的透性化细胞能将 D-苯丙氨酸转化为 97% 的苯基丙酮酸和 3% 的苯乙酸,透性化细胞可重复使用 3 次。而经戊二醛再处理后的透性化细胞的 D-苯丙氨酸的转化率大于 99%,细胞可重复使用 20 次。如先用 1% 的戊二醛在 4℃ 处理细胞 60min,再用 CTAB 处理,则更易于工业放大<sup>[32]</sup>。

### 3 基因工程法

基因工程法是指通过重组 DNA 技术来改变细

胞壁和细胞膜的遗传形状,从而提高细胞的通透性。Ni 等通过基因工程改变大肠杆菌的外膜结构,降低细胞外膜的屏障作用,提高细胞的通透性。分别构建了一株脂多糖突变体 SM101 和一株脂蛋白突变体 E609L,并选取两个分子大小和疏水性不同的底物 (头孢硝噻、四肽) 来研究突变菌株的通透性,发现两株菌的反应速率提高了 3.8 倍,四肽底物能完全透过两个突变菌株的外壁。研究结果还发现,如要提高亲水性底物的通透性,基因工程修饰部位应在类脂 A 上,突变株 E609L 编码脂蛋白的 *lpp* 基因插入了外缘 Tn10 片段,但 *lpp* 缺失对突变体的生长毫无影响,因此 *lpp* 缺失是用来提高大肠杆菌乃至其它革兰氏阴性菌外膜通透性的一种有效方法<sup>[33]</sup>。尽管基因工程法与物理法和化学法相比,具有一劳永逸的优势,但目前有关该研究的报道仍较少,基因工程菌的构建方法和机理还有待更深入的研究。

### 4 结语

细胞经过透性化处理后,胞内酶的催化作用得以充分发挥,同时完整的细胞结构对胞内酶具有一定的保护作用,延长酶的使用寿命。目前,常用的透性化处理方法主要是物理法和化学法,这两种方法均可对原核细胞和真核酵母细胞进行透性化处理。物理法处理的显著优点是没有溶剂等其它毒性试剂的残留,便于下游操作,但存在放大困难,不能满足工业化生产的要求,特别是超声波产生的热量会使细胞内的酶失活。化学法处理的显著优点是操作简单,易于放大,多数研究表明甲苯是一种非常有效的有机溶剂,但一些有毒试剂会残留在细胞内,影响产品的品质。醇处理是一种经济、简便和安全的方法,异丙醇比其它醇更有利于保存酶的活性。曲通 X-100 和 CTAB 是研究最多的两种表面活性剂,透性化处理原核细胞和真核酵母细胞均可获得很高的活性。新兴的基因工程技术能从基因上根本改变菌体细胞壁和细胞膜的遗传形状,将为透性化细胞的制备提供更加便捷的方法,但该研究还处于起步阶段,其构建方法和机理还有待更深入细致的研究。现有的研究均表明,透性化细胞经固定化后仍保持很高的活性,并可防止胞内酶的渗漏,菌体可以多次重复使用,提高了酶的使用效率。因此,将透性化细胞与固定化技术相结合,将为发酵工业提供更加高效、持久和经济的生物催化剂。由于透性化方法对细胞壁和细胞膜产生孔隙大小的不可控性,以及底物、产物和酶大小的不同,最优的透性化细胞制备方法仍需根据具体情况而定。

### 参考文献

- [1] FELIX H. Permeabilized cells [J]. *Anal Biochem*, 1982, 120: 211-234.
- [2] BREEDVELD M W, ZEVENHUIZEN L P T M, ZEHNDER A J B. Synthesis of Cyclic β-(1,2)-Glucans by *Rhizobium leguminosarum* Biovar trifolii TA-1: Factors Influencing Excretion [J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(20): 6336-6342.
- [3] TAN Q, ZHANG Y, SONG Q, et al. Single-pot conversion of

- cephalosporin C to 7-amincephalosporanic acid in the absence of hydrogen peroxide [J]. World J Microbiol Biotechnol 2010 26: 145-152.
- [4] CAVONAS M, TORROGLOSA T, KLEBER H, et al. Effect of salt stress on crotonobetaine and D-carnitine biotransformation of L-carnitine by resting cells of *Escherichia coli* [J]. J Basic Microbiol 2003 43: 259-268.
- [5] MATSUMOTO T, TAKAHASHI S, KAIEDA M, et al. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2001 57: 515-520.
- [6] 段学辉, 叶勤, 张嗣良. 啤酒酵母的通透性对 ATP 生产活性的影响 [J]. 华东理工大学学报 2000 26(1): 33-36.
- [7] 卢群, 刘晓艳, 丘泰球, 等. 超声对酵母细胞膜通透性的影响 [J]. 食品与发酵工业 2005 31(9): 14-17.
- [8] KUBAL B S, D' SOUZA S F. Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde [J]. J Biochem Biophys Methods 2004 59: 61-64.
- [9] 张峻, 陈颖, 陈晓云, 等. 亚栖热菌透性化细胞的耦合固定化研究 [J]. 中国生物工程杂志 2007 27(11): 32-36.
- [10] KIM Y, PARK Y, SONG S, et al. Nitrate removal without carbon source feeding by permeabilized *Ochrobactrum anthropi* SY509 using an electrochemical bioreactor [J]. Enzyme and Microbial Technology 2007 41: 663-668.
- [11] 高惠玲, 袁其朋, 周延, 等. 用透性化细胞技术合成海藻糖 [J]. 微生物学通报 2004 31(3): 92-96.
- [12] 张华, 江波, 潘蓓蕾, 等. 透性化植物乳酸杆菌细胞 L2 阿拉伯糖异构酶表现活力的研究 [J]. 食品与发酵工业 2006 32(10): 17-19.
- [13] 闫亚丽, 王昌禄, 刘会娟, 等. 透性化细胞乳糖酶与提纯的乳糖酶酶学性质比较 [J]. 食品科学 2008 29(10): 436-439.
- [14] PANESAR R, PANESAR P, SINGH R, et al. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells [J]. Food Chemistry 2007 101: 786-790.
- [15] LEE Y J, KIM C S, OH D K. Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2004 64: 787-793.
- [16] SOMKUTI G A, DOMINIECKI M E, STEINBERG D H. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with ethanol [J]. Current Microbiology 1998 36: 202-206.
- [17] LIU Y, HAMA H, FUJITA Y, et al. Production of s-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999 64(1): 54-60.
- [18] LIU Y, FUJITA Y, KONDO A, et al. Preparation of high-activity whole cell biocatalysts by permeabilization of recombinant yeasts with alcohol [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000 89(6): 554-558.
- [19] KONDO A, LIU Y, FURUTA M, et al. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol [J]. Enzyme and Microbial Technology 2000 27: 806-811.
- [20] FONTANILLE P, LARROCHE C. Optimization of isovalal production from  $\alpha$ -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2003 60: 534-540.
- [21] 王舒, 毛相朝, 张鲁嘉, 等. 应用细胞透性化技术快速提取氧化葡萄糖杆菌胞内右旋糖酐糊精酶 [J]. 生物加工过程, 2010 8(3): 35-39.
- [22] DE GROEVE M, DEPREITERE V, DESMET T, et al. Enzymatic production of  $\alpha$ -D-galactose 1-phosphate by lactose phosphorolysis [J]. Biotechnol Lett 2009 31: 1873-1877.
- [23] KHLUPOVA M, KUZNETSOV B, DEMKIV O, et al. Intact and permeabilized cells of the yeast *Hansenula polymorpha* as bioselective elements for amperometric assay of formaldehyde [J]. Talanta 2007 71: 934-940.
- [24] 魏明, 崔玮, 薛正莲. 透性化处理对嗜酸乳杆菌细胞亚油酸异构酶表现活力的影响 [J]. 食品工业科技 2010 31(4): 159-161.
- [25] 魏明, 崔玮, 薛正莲. 透性化嗜酸乳杆菌细胞转化亚油酸为共轭亚油酸的反应动力学 [J]. 生物工程学报 2010 26(4): 503-508.
- [26] 崔建东, 贾士儒, 谭之磊. 改善苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌细胞通透性提高反式肉桂酸转化率 [J]. 高校化学工程学报 2008 22(6): 1015-1019.
- [27] 于明安, 朱晓冰, 祁巍, 等. CTAB 透性化酵母细胞生物催化合成 (S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯 [J]. 催化学报 2005 26(7): 609-613.
- [28] PRESECKI A, ZELIC B, VASIC-RACKI D. Comparison of the l-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells [J]. Enzyme and Microbial Technology 2007 41: 605-612.
- [29] VIGNOLI J A, CELLIGOI M A C, SILVA R S F, et al. The production of sorbitol by permeabilized and immobilized cells of *Z. mobilis* in sucrose [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology 2006 49(4): 683-687.
- [30] CHENG S, WEI D, SONG Q, et al. Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde [J]. Biotechnol Lett 2006 28: 1129-1133.
- [31] GONG G, HOU Y, ZHAO Q, et al. A new approach for the immobilization of permeabilized brewer's yeast cells in a modified composite polyvinyl alcohol lens-shaped capsule containing montmorillonite and dimethyldioctadecylammonium bromide for use as a biocatalyst [J]. Process Biochemistry, 2010 45: 1445-1449.
- [32] UPADHYA R, NAGAJYOTHI, BHAT S G. Stabilization of D-amino acid oxidase and catalase in permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its application for the preparation of  $\alpha$ -ketoacids [J]. Biotechnology and Bioengineering 2000 68(4): 430-436.
- [33] NI Y, CHEN R. Accelerating whole-cell biocatalysis by reducing outer membrane permeability barrier [J]. Biotechnology and Bioengineering 2004 87(6): 804-811.