

温度两阶段控制策略发酵生产重组角质酶*

张芙华^{1,2} 华兆哲¹ 陈坚^{1,2} 吴敬^{1,2**}

(¹江南大学生物工程学院和工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

(²江南大学食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122)

摘要 为进一步提高重组*Bacillus subtilis* WSHB06-07发酵生产角质酶的产量和生产强度,在pH两阶段控制策略的基础上,考察了温度(27~40 ℃)对菌体生长和产酶的影响。研究发现,37 ℃适于菌体生长而30 ℃适于菌体产酶。通过分析发酵过程中菌体比生长速率及产物比合成速率的变化,确定了温度两阶段控制策略,即0~4 h时控制温度37 ℃,4 h后将温度调至30 ℃。通过采用这一优化策略,角质酶酶活和生产强度分别可达312.5 U/mL和13.02 kU L⁻¹ h⁻¹,相比恒定温度37 ℃控制模式下分别提高了83.4%和10.9%。图6 表2 参13

关键词 角质酶;重组枯草芽孢杆菌;温度两阶段控制;比生长速率;比合成速率

CLC Q936

Effect of Two-staged Temperature Strategy on Production of Cutinase with Recombinant *Bacillus subtilis**

ZHANG Fuhua^{1,2}, HUA Zhaozhe¹, CHEN Jian^{1,2} & WU Jing^{1,2**}

(¹School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract On the basis of the previously published two-staged pH control strategy, the effect of temperature (from 27 ℃ to 40 ℃) on cell growth and product formation was investigated to further enhance the yield and productivity of cutinase by recombinant *Bacillus subtilis* WSHB06-07. The optimum temperature for cell growth was found at 37 ℃, while the optimum temperature for enzyme production was at 30 ℃. Through the analysis on the profile of the specific cell growth rate and specific cutinase formation rate, a two-stage temperature strategy, in which temperature was controlled at 37 ℃ for the first 4 h and then switched to 30 ℃ till the end of the fermentation, was developed. By using this temperature-shift strategy, the maximal cutinase activity and productivity reached 312.5 U/mL and 13.02 kU L⁻¹ h⁻¹, which increased by 10.9% and 83.4% respectively, compared to the constant temperature operation at 37 ℃. Fig 6, Tale 2, Ref 13

Keywords cutinase; recombinant *Bacillus subtilis*; two-staged temperature; specific cell growth rate; specific cutinase formation rate

CLC Q936

角质酶是一种多功能酶,属丝氨酸酯酶的一种,相对分子质量(M_r)约为 $22 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$,是一种具有称作 α/β 水解酶折叠的共同结构框架的蛋白质^[1,2]。角质酶既可水解不溶性多聚体角质,还可作用于长链、短链脂肪酸酯、乳化的甘油三酯和可溶性的合成酯,参与酯化、转酯化等反应,在食品工业以及生物催化、纺织业、化工、农药等诸多领域有着广泛的应用前景^[3-5]。虽然角质酶用途广泛,但其研究主要集中于重组菌的构建、提取、纯化、酶学性质以及固定化等方面,有关发

酵条件优化国内外虽然有一些报道^[6-8],但由于产量较低,迄今为止并没有工业化生产的相关报道,角质酶的市场仍处于空白。江南大学食品科学与技术国家重点实验室保藏的重组*Bacillus subtilis*表达角质酶产量较高。通过在摇瓶水平和3 L发酵罐上条件优化,酶产量提高显著,采用pH两阶段控制策略生产角质酶,产量达到168.8 U/mL^[9]。此外,在前期研究中还发现温度是影响角质酶发酵的另一个重要的环境因素。本实验在pH两阶段控制策略的基础上,考察了温度对角质酶发酵的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

出发菌株为重组*Bacillus subtilis* WSHB06-07,由江南大学食品科学与技术国家重点实验室保藏。

1.2 培养基

LB培养基($\rho/g L^{-1}$):蛋白胨10,酵母膏5,氯化钠10,琼脂20。

卡那霉素(kan)抗性培养基($\rho/g L^{-1}$):蛋白胨10,酵母膏5,氯化钠10,琼脂20,卡那霉素(kan) 50 $\mu g/mL$ 。

收稿日期:2008-08-19 接受日期:2008-11-05

*教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-06-0486),国家高技术研究发展计划资助项目(“863”计划, No. 2009AA02Z204),江苏省六大人才高峰支持计划(No. 08-B-吴敬),食品科学与技术国家重点实验室科研基金(No. SKLF-MB-200802)以及江南大学创新团队项目(No. 2008CXTD01)资助 Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-06-0486), the National High-tech Research and Development Program of China (“863” Program, No. 2009AA02Z204), the Program for Advanced Talents within Six Industries of Jiangsu Province (No. 08-B-WU Jing), the Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (No. SKLF-MB-200802), and the Program of Innovation Team of Jiangnan University (No. 2008CXTD01)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn)

种子培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$): 葡萄糖10, 蛋白胨12, 酵母膏24, 磷酸氢二钠12.54, 磷酸二氢钾2.31, pH 7.5.

发酵培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$): 蔗糖 32.5, 蛋白胨 37, 酵母膏 24, 磷酸氢二钠 12.54, 磷酸二氢钾 2.31, 七水硫酸镁 4.4, pH 7.5.

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 将保藏好的菌种接入种子培养基中, 500 mL三角瓶装50 mL培养基, 回转式摇床转速200 r/min、37 °C, 培养14~16 h.

1.3.2 发酵培养 3 L全自动发酵罐KBT (KoBio Tech Co., Ltd., 韩国)中装液量1 L, 接种量4%, 搅拌转速600 r/min, 通气量1:1.5 (V/V), 温度37 °C, pH采用两阶段控制策略, 即0~4 h时控制pH 7.5, 4 h后将pH调至6.5.

1.4 分析方法

1.4.1 角质酶粗酶液制备 取一定量发酵液于10 000 r/min下离心5 min, 上清液为角质酶活性测定液.

1.4.2 角质酶活性测定^[1-2] 采用分光光度法. 反应液体积为1 mL, 包括20 μL 酶液和980 μL 的50 mmol/L硫磺脱氧胆酸钠缓冲液(pH 8.0, 含50 mmol/L对硝基苯丁酸酯). 20 °C下、405 nm处、反应1 min后记录对硝基酚的生成速率. 酶活定义: 20 °C时, 每分钟催化对硝基苯丁酸酯水解生成1 μmol 对硝基酚的酶量即为一个酶活力单位.

1.4.3 菌体干重测定^[10] 采用细胞干重法. 取一定量发酵液于10000 r/min下离心5 min, 菌泥于105 °C烘至恒重后称重.

1.4.4 蔗糖浓度测定^[11] 取稀释适当倍数的样品900 μL , 加入100 μL 2 mol/L的NaOH溶液, 混匀后于沸水浴中反应10 min, 然后立即用流动冷水冷却至室温, 再向其中加入1 mL间苯二酚和3 mL 10 mol/L的HCl, 混匀后于沸水浴中反应8 min, 立即用流动冷水冷却至室温, 然后用分光光度计测定其500 nm处的吸光度.

1.4.5 质粒稳定性实验^[12] 在发酵过程中, 每隔2 h取样, 用灭菌的生理盐水适当稀释, 分别取100 μL 菌液涂布于不含kan LB平板, 置于37 °C培养箱中培养16 h, 然后挑取100个单菌落于含kan的LB平板上, 37 °C培养16 h后, 通过计算平板上抗kan的菌落数确定质粒稳定性.

1.4.6 菌体比生长速率、比产酶速率计算方法^[13] 菌体比生长速率用如下公式表示: $r_x = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta x}{\Delta t}$, 其中 x 为菌体量

(g/L), t 为时间(h). 用Origin绘图软件对菌体的生长数据进行线性拟合后进行插值计算(时间步长为0.1 h), 再用Excel软件求解得到不同时刻的 r_x , 再经平滑处理, 得到不同温度下的比生长速率-时间关系曲线. 根据 $r_p = \frac{dp}{dt} \frac{1}{x} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta p}{\Delta t}$ 计算

得角质酶的比生成速率 r_p (类似于 r_x 的求法), 其中 P 为角质酶产量(U/mL).

2 结果与讨论

2.1 温度对菌体生长的影响

图1为不同温度对菌体生长的影响. 由图1可知, 温度对菌体生长影响较为显著. 27 °C菌体生长缓慢, DCW在30 h后达到最大值(19.7 g/L); 当温度为37 °C时, DCW在12 h达到最

大值(24.31 g/L); 当控制温度为40 °C时, DCW在10 h达到最大值(31.2 g/L). 故随着温度升高, 菌体生长加快, 发酵周期缩短. 用Origin和Excel软件对图1菌体生长数据进行处理, 得到不同温度对菌体比生长速率的影响(图2). 从图2可以看出, 温度对菌体比生长速率影响趋势基本一致, 40 °C培养3 h时菌体比生长速率达到最大值(0.93 h⁻¹), 37 °C培养3.5 h时菌体比生长速率达到最大值(0.81 h⁻¹), 而30 °C培养6 h后菌体比生长速率才达到最大值(0.39 h⁻¹).

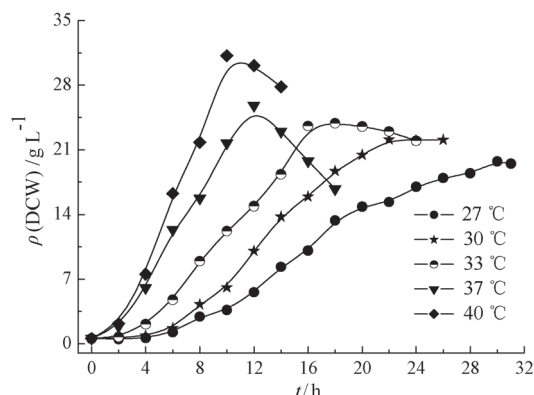


图1 不同温度对菌体生长的影响
Fig. 1 Effect of different temperatures on cell growth

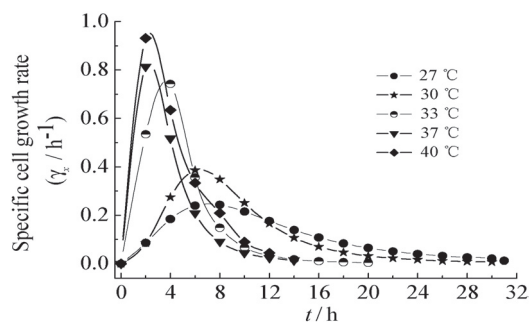


图2 不同温度对菌体比生长速率的影响
Fig. 2 Effect of different temperatures on specific cell growth rate

2.2 温度对菌体产酶的影响

图3为不同温度对菌体产酶的影响. 由图3可知, 随着温度(27~40 °C)的升高, 菌体有利于进入产酶期, 在40 °C虽然菌体产酶速度较快, 但最终酶活较低, 8 h酶活只有98.96 U/mL. 随着温度的降低, 虽然菌体进入产酶期的时间有所延迟, 但最终的酶活较高, 特别是温度30 °C时, 酶活达到243.12 U/mL. 用Origin和Excel软件对图3菌体产酶数据进行处理, 得到不同温度对菌体比产酶速率的影响(图4). 由图4可知, 随着温度的升高, 菌体比产酶速率先增加后下降, 温度为30 °C时菌体比产酶速率达到最大(0.975 kU g⁻¹ L⁻¹), 所以30 °C是菌体产酶最适温度.

2.3 温度对工程菌质粒稳定性的影响

对于工程菌的发酵生产来说, 质粒的稳定性是一个需要考察的重要因素. 图5为不同温度对质粒稳定性的影响. 由图5可见, 随着温度的升高, 质粒稳定性逐渐下降. 40 °C时质粒很不稳定, 发酵10 h后, 质粒保存率只有60%, 而在≤37 °C发酵时, 发酵10 h后, 质粒保存率还有95%以上.

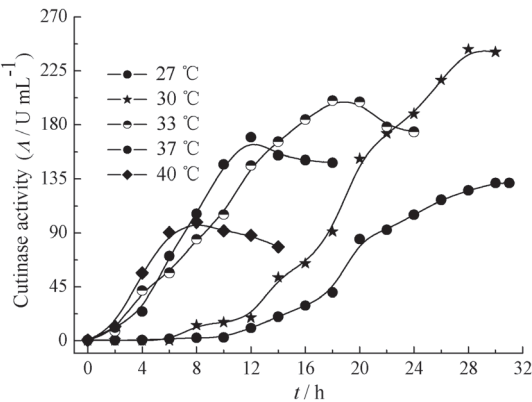


图3 不同温度对菌体产酶的影响
Fig. 3 Effect of different temperatures on cutinase formation

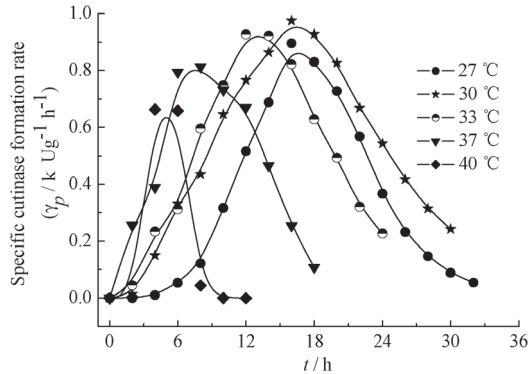


图4 不同温度对角质酶比产酶速率的影响
Fig. 4 Effect of different temperatures on specific cutinase formation rate

2.4 角质酶发酵过程温度分阶段控制策略的确定和验证

以上实验数据表明,当温度为30 ℃时,菌体生长和产酶的延滞期较长,总体来说不利于提高发酵生产强度,但最终的酶活较高,说明30 ℃有利于菌体产酶不利于菌体生长.在较高温度(≥37 ℃)下虽然菌体生长和进入产酶期较快,有利于提高发酵的生产强度,但最终的酶活较低.由于40 ℃时菌体质粒丢失率很严重,所以选择37 ℃作为菌体生长的适宜温度.结合菌体生长和产酶结果,本研究可采用两阶段温度控制策略,即将菌体控制在37 ℃生长再控制在30 ℃产酶.考虑到30 ℃时0~4 h属于产酶滞后期,4 h以后菌体一直可维持较

高的比产酶速率,而37 ℃前4 h内菌体可保持较高的生长速率,故以4 h为控制温度的转折点.即温度两阶段发酵的具体策略为:选择0~4 h控制温度37 ℃,使菌体快速生长,缩短发酵延滞期;4 h以后控制温度30 ℃,利于菌体产酶.

对上述提出的优化策略的实验验证结果见图6,表1为不同温度下角质酶分批发酵过程参数比较.实验结果表明,采用这一温度两阶段控制策略,角质酶酶活最终达到312.5 U/mL,生产强度13.02 kU L⁻¹ h⁻¹,相对于恒定37 ℃下分别提高了83.4%和10.9%.对两阶段温度控制策略重复性实验结果(表2)表明,此策略对角质酶发酵重复性强.

综上所述,根据不同温度下发酵动力学参数所包含的信息而提出的温度分阶段控制策略,可以有效地运用于角质

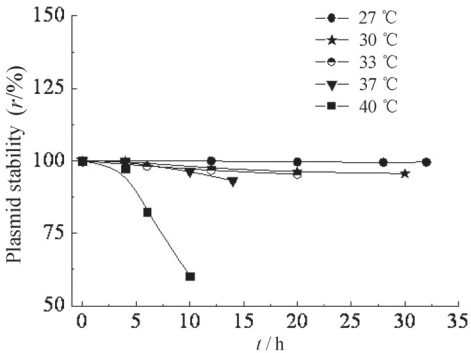


图5 不同温度对质粒稳定性的影响
Fig. 5 Effect of different temperatures on plasmid stability

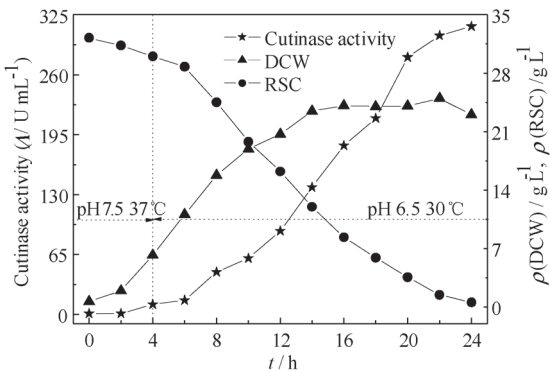


图6 采用分阶段控制温度的发酵过程曲线
Fig. 6 Time courses of cutinase fermentation with two-staged temperature strategy

表1 不同温度下角质酶分批发酵过程参数比较

Table 1 Comparison of fermentation parameters among batches at different temperatures

$\theta/^\circ\text{C}$	$r_x/$ h^{-1}	$p_x/$ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	$q_p/$ $\text{kU L}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\rho_{(\text{DCW})\text{max}}/$ g L^{-1}	$p_{\text{pmax}}/$ kU L^{-1}	$Y_{p,x}/$ kU g^{-1}	$Y_{x,s}/$ g g^{-1}	$Y_{p,s}/$ kU g^{-1}
27	0.24	0.64	4.25	19.90	131.69	6.62	0.61	4.05
30	0.39	0.79	9.35	20.45	243.12	11.89	0.66	7.84
33	0.74	1.07	8.35	25.59	200.42	7.83	0.80	6.26
37	0.81	1.35	11.74	24.31	168.8	6.99	0.74	5.15
40	0.93	2.23	7.0691	31.19	98.96	3.17	1.01	3.19
温度分段控制 Two-staged temperature ¹⁾	0.78	1.04	13.02	24.98	312.47	12.51	0.78	9.76

1) 0~4 h pH 7.5, 37 ℃; 4~24 h, pH 7.5, 30 ℃.
 r_x , 比生长速率; p_x , 菌体生产强度; q_p , 酶生产强度; $\rho_{(\text{DCW})\text{max}}$, 最大菌体干重; p_{pmax} , 最大角质酶产量; $Y_{p,x}$, 酶比菌体产率; $Y_{x,s}$, 菌体比基质产率; $Y_{p,s}$, 酶比基质产率
 r_x , Specific cell grow rate; p_x , Productivity of cell; q_p , Productivity of cutinase; $\rho_{(\text{DCW})\text{max}}$, Maximum amount of DCW; p_{pmax} , Maximum amount of cutinase; $Y_{p,x}$, Yield of cutinase on cell; $Y_{x,s}$, Yield of DCW on substrate; $Y_{p,s}$, Yield of cutinase on substrate

表2 两阶段温度控制策略稳定性实验
Table 2 Stability of two-stages temperature strategy

批次 Batch	角质酶酶活最大值 Maximum of cutinase activity ($A/U\ mL^{-1}$)	角质酶生产强度最大值 Maximum of productivity ($q_p/kU\ L^{-1}\ h^{-1}$)
1	312.5	13.02
2	322.5	12.45
3	317.9	13.76

酶的分批发酵过程中, 对于细胞生长特别是对角质酶的合成促进作用是非常明显的. 温度分阶段控制策略的成功实施, 不但对角质酶的发酵生产具有积极的效果, 而且对于其它类似发酵产品的生产同样具有借鉴意义.

3 结 论

较高的发酵温度(37 ℃)有利于细胞的生长, 缩短延迟期, 可使菌体提前进入产酶期; 而较低的温度(30 ℃)则有利于角质酶的合成.

提出重组*Bucillis subtilis*分批发酵生产角质酶的两阶段温度控制策略, 即0~4 h时发酵温度为37 ℃, 4 h后将温度调制30 ℃. 采用这一最优温度两阶段控制策略, 最高酶活和生产强度比37 ℃恒温培养分别提高了83.4%和10.9%.

References

1 Egmond MR, De Vlieg J. *Fusarium solani* pisi cutinase. *Biochimie*, 2000, **82**: 1015~1021

2 Martinez C, De Geus P, Lauwereys M, Matthyssens G, Cambillau C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 1992, **356**: 615~618

3 Johan S. Laundry detergent and/or fabric care compositions comprising a modified transferase. US Patent 6410498. 2002-06-25

4 Masaki K, Kamini NR, Ikeda H, Iefuji H. Cutinase-like enzyme from

the yeast *Cryptococcus* sp. strain s-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl & Environ Microbiol*, 2006, **12**: 7548~7550

5 Degani O, Gepstein S, Posoretz CG. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. *Appl & Biochem Biotechnol*, 2002, **102**: 277~289

6 Fontes PT, Macedo GA. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, 2008, **35**: 59~67

7 Rispoli F, Shah V. Optimization of the media ingredients for cutinase production from *Colleotrichum lindemuthianum* using mixture design experiments. *Biotechnol Progr*, 2008, **24**: 648~654

8 Bi FZ (毕凤珍), Shi JL (师俊玲), Li Y (李寅), Chen J (陈坚). Cutinase production conditions with *Thermobifida fusca*. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2005, **11** (5): 608~610

9 Zhang FH (张芙华), Chen S (陈晟), Zhang DX (张东旭), Hua ZZ (华兆哲), Chen J (陈坚), Wu J (吴敬). Studies on two-stage pH control strategy of recombinant cutinase production. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2008, **28** (5): 59~64

10 Yang YT, Bennett GN, San KY. The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Metabolic Engin*, 2001, **3**: 115~123

11 Ning ZX (宁正祥). 食品成分分析手册 北京: 中国轻工出版社, 1998. 18~20

12 Janice L, Carnie T. Development of a high cell-density fed-batch bioprocess for the heterologous production of 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2004, **110**: 95~103

13 Zheng MY, Du GC, Chen J. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme & Microbial Technol*, 2002, **31**: 477~481