

枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的发酵过程优化

刘文涛¹, 刘柏宏^{1,3}, 张娟^{1,3}, 李江华^{*1,3}, 陈坚^{2,3}, 堵国成^{1,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了实现重组角蛋白酶在基因工程菌 *Bacillus subtilis* WB600 中的高效生产, 在 3 L 发酵罐中对发酵条件和补料策略进行了优化, 建立了补料分批发酵工艺。研究发现, 两阶段控制 pH, 前 6 小时控制 pH 7.0, 后期控制 pH 8.0、DO 20%, 发酵过程以葡萄糖为流加碳源, 7~11 h 以 μ 为 0.15 h⁻¹ 指数流加、12~15 h 以 μ 为 0.1 h⁻¹ 指数流加、16~27 h 恒速流加葡萄糖 3 g/(L·h), 在 30 L 发酵罐水平上, 27 h 酶活达到 864 U/mL, 生产强度为 31.8 U/(mL·h), 国外报道的酶活达到 2 900 mL, 酶活在国内属领先水平, 为重组枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的工业化生产打下了坚实的基础。

关键词: 重组枯草芽孢杆菌; 流加策略; 发酵优化; 角蛋白酶

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)05—0466—06

Optimization of Culture Process Conditions and Feeding Strategy for Keratinase by Recombinant *Bacillus subtilis*

LIU Wentao¹, LIU Baihong^{1,3}, ZHANG Juan^{1,3}, LI Jianghua^{*1,3}, CHEN Jian^{2,3}, DU Guocheng^{1,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to achieve the high production of keratinase by recombinant *Bacillus subtilis* WB600, fermentation conditions and feeding strategy were optimized in 3 L fermentor, and a fed-batch fermentation was established. The results showed that, using a two-stage pH control strategy in which pH was controlled at 7.0 for the first 4 h and then 8.0 for remaining time and a mixed feeding strategy in which keeping the exponential feeding from 6 h to 15 h (μ was 0.15 h⁻¹, 11~15 h μ was 0.1 h⁻¹) and then constant-fed fermentation for remaining time, the keratinase activity reached 864 U/mL. The keratinase activity reached a leading level at home, and the keratinase reached 2 900 U/mL overseas. This work reached a high keratinase productivity and it is a stable theoretical basis for the fermentation scale-up process of keratinase.

Keywords: recombinant *Bacillus subtilis*, feeding strategy, fermentation optimization, keratinase

收稿日期: 2013-10-07

基金项目: 国家 863 计划项目 (2011AA100905); 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2011BAK10B03); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012553)。

* 通信作者: 李江华 (1966—), 男, 江西九江人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事酶技术、发酵过程优化与控制方面的研究。

E-mail: a302304@163.com

角蛋白是一种广泛存在于自然界中的硬性蛋白,主要存在于各种动物的羽毛、毛发、蹄足中,角蛋白结构中的二硫键使其具有抗降解性,不会被多数蛋白酶如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶等降解^[1]。角蛋白酶是专一性降解角蛋白的一类酶,可由真菌、放线菌和细菌等多种微生物产生^[2]。角蛋白酶的应用领域十分广泛。研究报道,角蛋白可以作为饲料添加剂促进家禽类的生长,作为消毒剂可用于医药行业,在制革过程中可以减少对环境的污染实现酶法脱毛^[3]。除此之外,角蛋白酶在饲料生产、食品工业生产营养产品以及洗涤剂生产等行业,也显示出良好的应用前景。角蛋白酶使得高效率低能耗的利用含角蛋白的废物成为可能。

虽然角蛋白酶应用广泛,但其研究主要集中于菌种筛选、重组菌的构建、酶学性质等方面^[4],有关发酵条件优化方面虽然有一些报道,但由于产量较低,迄今为止并没有工业化生产的相关报道。

作者研究室在前期的研究工作中,筛选获得了一株角蛋白酶高产菌株 *Bacillus licheniformis* BBE11-1,扩增出其编码角蛋白酶的基因,构建了重组质粒 pMA5-ker,并在 *B. subtilis* WB600 中成功实现了表达。在前期摇瓶培养研究中,对初糖进行了优化,然而即使分批发酵处于较优的初糖质量浓度,最终获得的细胞量和角蛋白酶的产量依然较低,因此如何提高细胞量和角蛋白酶的产量是本研究的主要问题,其中采用流加策略是最主要的方法。首先优化了发酵条件,pH 和 DO,采用两阶段控制 pH 的策略,DO 控制在 20%,显著地提高了角蛋白酶的产量。在此基础上研究了恒速流加和指数流加对角蛋白酶活产量的影响,最终采取了两种流加方式混合流加的发酵策略,角蛋白酶酶活达到 1 425 U/mL。国外最高酶活达到 2 900 U/mL^[5]。

1 材料与方法

1.1 生产菌株

以 *B. subtilis* WB600 为宿主,携带重组表达质粒 pMA5-ker。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(组分 g/L) 蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10。

1.2.2 发酵培养基(组分 g/L) 蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10,葡萄糖 10,MgSO₄ 0.1。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 从甘油管中取 50 μ L 菌液于接入装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶,并在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 下培养 12 h。

1.3.2 发酵培养 3 L 全自动发酵罐(New Brunswick,美国):装液量 1.5 L,接种体积分数 5%,发酵温度 37 $^{\circ}$ C,通气体积分数 1:1.5,转速 400 r/min,DO 关联搅拌转速,控制 DO 保持在 20%,pH 用氨水和盐酸控制,pH 采用两阶段控制策略,即 0~6 h 内控制 pH 为 7,6 h 以后控制 pH 为 8。

30 L 发酵罐(B.Braun,德国):装液量 15 L,接种体积分数 5%,发酵温度 37 $^{\circ}$ C,通气体积分数 1:1.5,转速 400 r/min,DO 关联搅拌转速,控制 DO 保持在 20%,pH 用氨水和盐酸控制,pH 采用两阶段控制策略,即 0~6 h 时控制 pH 为 7,6 h 以后控制 pH 为 8。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干重的测定 取 10 mL 发酵液置于离心管中,8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,将离心菌体置于 105 $^{\circ}$ C,烘至恒重,称量并计算菌体干重(DCW,g/L)。

1.4.2 角蛋白酶粗酶液的制备 取一定量发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为角蛋白酶活性测定液。

1.4.3 角蛋白酶活力的测定 取粗酶液 100 μ L,100 μ L Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.0),300 μ L 的 keratin(1 g/dL)在 50 $^{\circ}$ C 下反应 20 min,加入 4 mol/L TCA 溶液 500 μ L 终止反应。经 8 000 r/min 离心 6 min 后,取上清液 200 μ L,加入 1 mL 4mol/L 的碳酸钠,再加入 200 μ L 福林酚,显色反应 15 min 后,于 660 nm 检测吸光度。酶活定义为:每 15 分钟释放出的酪氨酸含量,即 1 U 角蛋白酶活为福林酚反应中 660 nm 处吸光度 0.01 的增加值。

1.4.4 葡萄糖质量浓度的测定 用 SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定残糖质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 DO-stat

通过溶氧关联转速,控制 DO 分别保持在 10%、20%、30%,考察不同 DO 对 *B.subtilis* 发酵生产角蛋白酶的细胞生长、角蛋白酶的合成的影响,见图 1。

在所考察的 DO 范围内,当 DO 保持在 20%时,最终的菌体在 24 h 干重达到最大,为 5.3 g/L(图 1a)。从 DO 条件对产酶的影响来看(图 1b),当 DO 保持在 20%时,酶活在发酵至 21 h 时达到最大,为 168 U/mL,此时菌体干重和角蛋白酶产量最高。

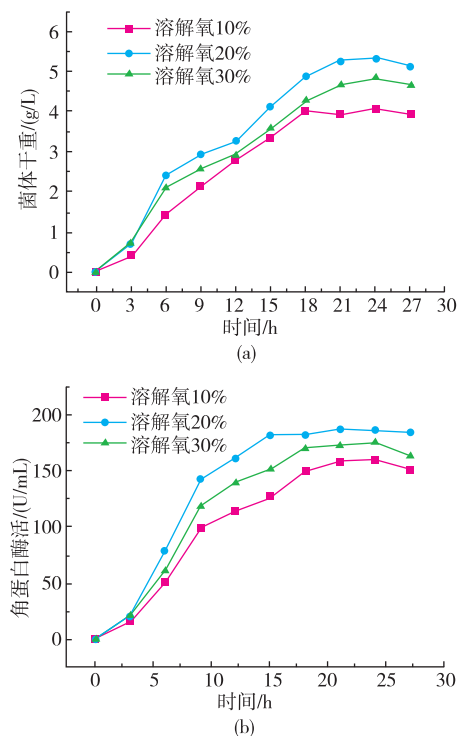


图 1 不同 DO 下角蛋白酶的发酵过程曲线

Fig. 1 Fermentation of keratinase under various DO

2.2 pH-stat

考察了 pH 在 6.0、7.0、8.0 对重组菌生长及表达目的蛋白产量的影响。如图 2a 所示,在前 6 小时内, pH 7 时菌体干重均优于其他 pH 时的菌体干重; 6 h 后, 在 pH 值为 8.0 时菌体干重优于其他 pH; 产酶情况见图 2b。在前 6 小时内, 在 pH 值为 7.0 时, 角蛋白酶酶活要稍高于 pH 6.0、pH 8.0 的酶活, 在 6 h 以后, pH 为 8.0 时的酶活要远高于其他 pH 值时的酶活。从图 2 可以看出, 当发酵时间前期时菌体合成角蛋白酶较少, 菌体生长进入对数期后角蛋白酶大量合成, 并在 15~18 h 达到酶活最大值, 这也说明角蛋白酶的合成是属于生长偶联型的。

根据前期实验结果, 采用 pH 分阶段控制策略, 发酵前期(0~6 h)控制 pH 7.0, 在发酵中后期控制 pH 8.0。因为根据前期实验结果可以发现, 菌体生长和角蛋白酶的合成具有不同的最适 pH 值。pH 是微生物生长和目的产物合成的非常重要的参数, 很多

时候微生物生长的最适 pH 和产物合成的最适 pH 不一致。pH 对菌体生长和代谢产物形成的影响是多方面的, 首先它直接影响酶的活性, 对菌体本身来说, 正常的生长繁殖及代谢很可能会受到抑制, 产物的活性也可能受到影响^[7-8]。发酵前期(0~6 h)控制 pH 7.0, 可以缩短延滞期并维持菌体快速生长; 在发酵中后期控制 pH 8.0, 有利于增强角蛋白酶的合成, 提高终产量。因此在枯草芽孢杆菌合成角蛋白酶的过程中需要采用 pH 分阶段控制策略。

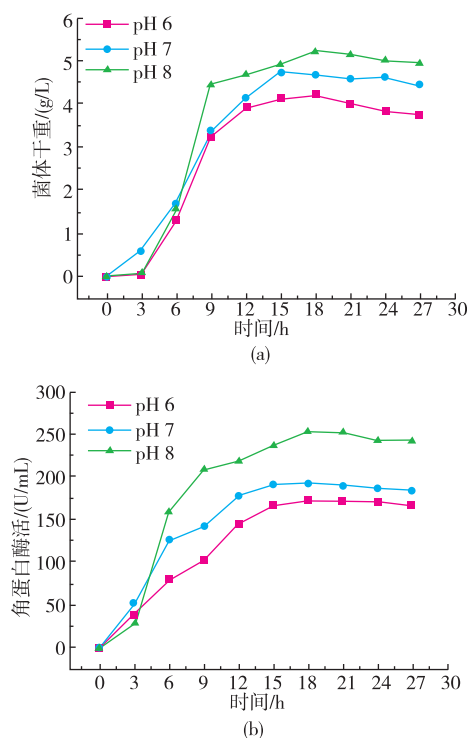


图 2 不同 pH 下角蛋白酶的发酵过程曲线

Fig. 2 Time-courses of keratinase fermentation under various pH

图 3 为采用上述 pH 两阶段控制策略下角蛋白酶的合成过程。在酶的快速合成阶段, 该过程菌体生长及角蛋白酶酶活均优于恒定 pH 8.0 控制下的相应参数, 菌体生长在 15 h 时达到最大值。此外, 角蛋白酶的最大酶活高达 302 U/mL (27 h), 比恒定 pH 8.0 (252 U/mL) 提高了 20.2%。

2.3 恒速补料控制

采用恒定流加速率进行发酵培养, 即在发酵培养 6 h 开始补糖, 总补糖量首先选择 40 g/L, 持续时间为 15 h(图 4a)即葡萄糖平均流速为 2.7 g/(L·h)。经过 30 h 培养后, 角蛋白产量最高达到 507 U/mL (21 h), 葡萄糖在发酵培养 9 h 时就全部耗尽, 补糖

量明显不足,碳源的不足严重抑制了菌体的生长和角蛋白酶的合成,因此需要进一步提高葡萄糖的平均流速。

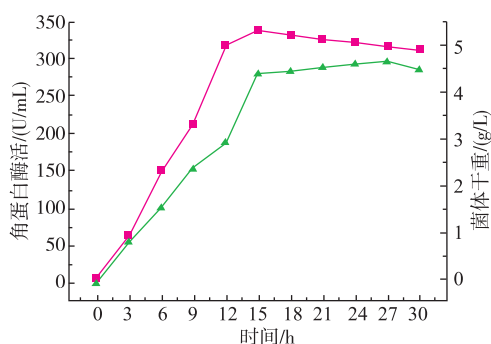


图3 两阶段控制 pH 策略下角蛋白酶的发酵过程曲线

Fig. 3 Effect of a two-stage pH control strategy on keratinase activity and dry cell weight

补糖速率过慢,增大补糖量,总补糖量选择 90 g/L,补糖时间 15 h,(图 4b)即葡萄糖补糖速率为 6 g/(L·h)。经过 30 h 培养后,角蛋白酶产量最高达到 424 U/mL(18 h),葡萄糖质量浓度最高达到 32.8 g/L,到发酵后期 30 h 时也同时达到 21.2 g/L。实验结果说明,葡萄糖的流加速率明显过快,高于细胞可以吸收利用的速度,造成了发酵液内的葡萄糖质量浓度过高,这会严重抑制菌体的生长和目的蛋白的表达,因此需要进一步研究葡萄糖的平均流速。

根据对前两次葡萄糖流速对发酵结果的影响,采取适中的葡萄糖流速,总补糖量选择 60 g/L,补糖时间 15 h(图 4c),即葡萄糖补糖速率为 4 g/(L·h)。经过 30 h 发酵后,角蛋白酶产量最高达到 680 U/mL,而葡萄糖质量浓度基本都维持在初糖 10 g/L 以下,此次葡萄糖流加速率和细胞吸收利用葡萄糖的速度基本相当,既能向菌体提供充足的碳源以维持菌体生长和目的蛋白的表达,又没有造成葡萄糖的大量积累,对菌体生长造成损害,另外也避免了原料的浪费^[9-12]。

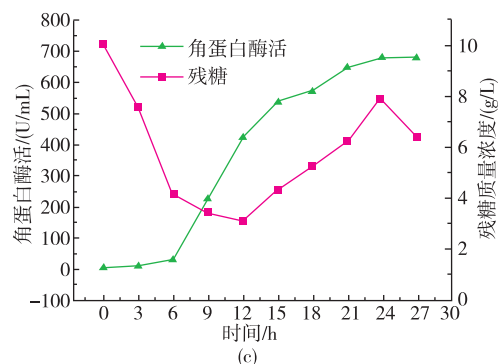
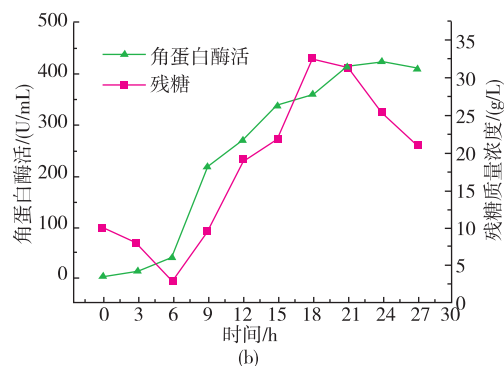
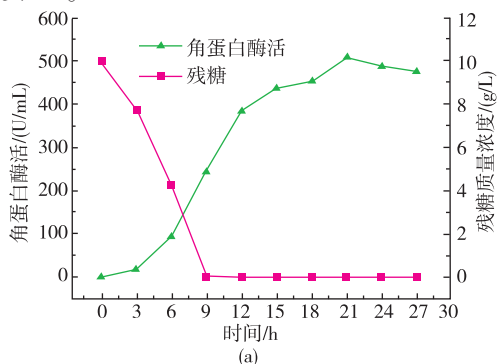


图4 不同补糖速率下角蛋白酶的发酵过程曲线

Fig. 4 Time-courses of keratinase constant-fed fermentation under different glucose feeding rate

2.4 指数流加

根据上述恒速流加策略的结果,发现在指数期菌体对葡萄糖的消耗明显逐步增大,此时采用恒速流加并不能满足菌体的生长需要,采用指数流加策略能够保持补糖速率与菌体生长所消耗的葡萄糖相一致,而在稳定期葡萄糖的消耗并无较大变化,因此进一步采用了指数期采用指数流加,稳定期采用恒速流加的混合发酵策略^[13-15]。

根据对分批发酵数据的处理,得到比生长速率曲线,见图 5。利用流加速率的计算公式计算底物流加的速率,对葡萄糖进行指数流加,力图寻找一种适合细胞生长的最优的葡萄糖流加策略,从而提高细胞生产强度,缩短发酵周期。因此本实验设置比生长速率 μ 为 0.1、0.15 h⁻¹,发酵起始采取分批培养,第 6 小时开始采用指数流加方式流加限制性基质,15 h 之后恒速流加,补糖速率为 4 g/(L·h)。

根据图 6a 可以看出,以比生长速率为 0.1 h⁻¹流加培养时,发酵结果表明,酶活最高达到 790 U/mL。在 7~11 h 期间,葡萄糖质量浓度低于 4 g/L,葡萄糖消耗很快,尤其是 7~9 h 期间,葡萄糖质量浓度为

0, 流加进去葡萄糖立刻被消耗殆尽, 底物流加的速度低于菌体消耗的速度, 导致葡萄糖质量浓度很低甚至完全消耗。因此有必要提高菌体设定的比生长速率。

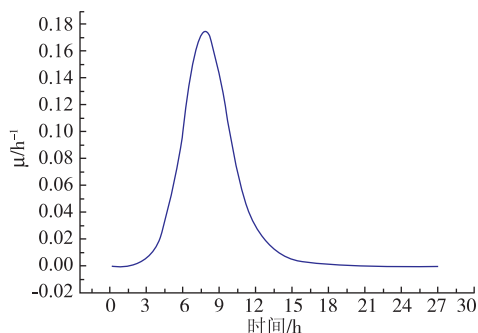


图5 分批发酵条件下比生长速率 μ 的发酵过程曲线

Fig. 5 Time-courses of μ in keratinase batch fermentation

根据图 6b 可以看出, 以比生长速率为 0.15 h^{-1} 流加培养时, 酶活最高达到 658.5 U/mL 。在 $13 \sim 27 \text{ h}$ 期间, 葡萄糖质量浓度均超过初糖 10 g/L , 葡萄糖流加的速率远远超过了菌体消耗的速率, 导致葡萄糖大量累积, 葡萄糖质量浓度过高对菌体产生抑制, 影响了菌体的生长和角蛋白酶的合成。

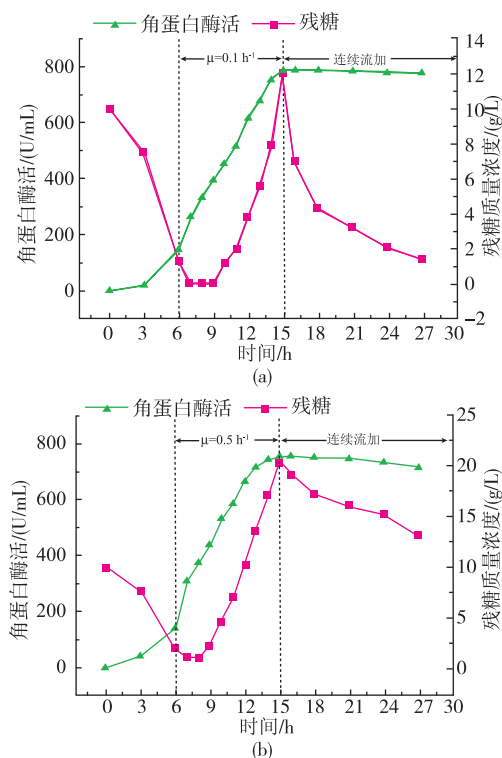


图6 不同比生长速率下角蛋白酶的指数流加发酵过程曲线

Fig. 6 Time -courses of keratinase exponential -fed fermentation under different μ

根据前两次指数流加实验数据分析, 采用分阶段设定比生长速度进行葡萄糖流加控制, 流加前期比生长速度设定值适当提高, 随着菌体逐步降低设定值进行指数流加, 以达到缩短菌体的生长时间, 提高生产强度的目的。菌体密度达到在后期实验中可以采用分段指数流加方式来缩短菌体的生长时间, 可以很好地避免有害物质的积累, 维持菌体的继续生长, 并实现提高生产强度的目的^[17-18]。在对数期 ($6 \sim 11 \text{ h}$) 菌体生长较快, 拟比生长速率为 0.15 h^{-1} , $11 \sim 15 \text{ h}$ 期间菌体生长较慢, 拟比生长速率为 0.1 h^{-1} , 采用指数流加, 稳定期采用恒速流加, 流加速率为 $4 \text{ g/(L} \cdot \text{h)}$ 。从图 7 可以看出, 葡萄糖质量浓度并未超过 10 g/L , 也未出现葡萄糖消耗完、残糖为 0 的情况, DCW 和酶活均高于单一比生长速率情况的相关参数, 酶活最高达到 864 U/mL 。

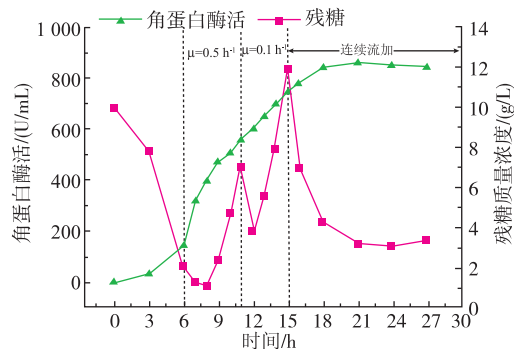


图7 混合补料策略下角蛋白酶的发酵过程曲线 (3 L)

Fig. 7 Effect of a two-stage exponential-fed strategy on keratinase activity and dry cell weight

3 结语

基因工程菌在发酵过程中影响因素较多, 需要在多方面调控以保证重组蛋白的高效表达。作者分析了 pH、DO 对发酵产酶的影响, 得到最适宜的 DO 及其 pH。通过混合流加策略, 阶段性指数流加、恒速流加, 最终酶活达到 864 U/mL , 酶活达到国内领先水平。此结果为后期中试发酵, 工业化生产角蛋白酶奠定了扎实的基础。

参考文献:

- [1] 李明珠,王雁萍,秦广雍. 角蛋白酶的研究现状及发展前景[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):1689-1692.
LI Mingzhu,WANG Yanping,QIN Guangyong. Research status and further development of keratinase [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**,2010,38(4):1689-1692.(in Chinese)
- [2] 许冰斌,谢菲,韩瑞枝,等. 角蛋白酶生产菌种选育及脱毛应用的研究[J]. 皮革科学与工程,2010,20(4):23-28.
XU Bingbin,XIE Fei,HAN Ruizhi,et al. Screening of the keratinase-producing strain and dehairing applications [J]. **Leather Science and Engineering**,2010,20(4):23-28.(in Chinese)
- [3] 管军军,裘爱泳,周瑞宝,等. 糖对大豆分离蛋白及其改性物乳化性能的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(1):84-88.
GUAN Junjun,QIU Aiyong,ZHOU Ruibao,et al. Effects of saccharides on the emulsifying characteristics of soybean protein and its modified products[J]. **Journal Of Wuxi University Of Light Industry**,2004,23(1):84-88.(in Chinese)
- [4] Eun-Ja Jeong,Moon-Soo Rhee,Gwan-Pil Kim. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus lichemifonnis* strain SH-517 [J]. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**,1992,58(10):3271-3275.
- [5] Jeng-Jie W,K Rojanatavorn,SJC H. Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the *kerA* Gene[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2004(4):459-464.
- [6] Mazotto A M,A C N d Melo. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* sp.[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2011,27(6):1355-1365.
- [7] 张芙华,陈晟,张东旭,等. pH 两阶段控制策略发酵生产重组角质酶[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(5):59-64.
ZHANG Fuhua,CHEN Sheng,ZHANG Dongxu,et al. Studies on two-stage pH control strategy of recombinant cutinase production[J]. **Chin J Biotech**,2008,28(5):59-64.(in Chinese)
- [8] Liang J D,Y F,Hanet. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora* thermophila strain GZUIFR-H49-1[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2011,110(4):871-880.
- [9] Ashis K Mukherjee,S K R,Naba K Bordoloi. Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline keratinase (Mukartinase) purified from a mutant *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II [J]. **International Biodeterioration and Biodegradation**,2011,65(8):1229-1237.
- [10] Awad G E A,M A Esawy,et al. Keratinase production by *Bacillus pumilus* GHD in solid-state fermentation using sugar cane bagasse:optimisation of culture conditions using a Box-Behnken experimental design[J]. **Annals of Microbiology**,2011,61(3):663-672.
- [11] Da Rosa Gioppo,N M,F G Moreira-Gasparin,et al. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2009,36(5):705-711.
- [12] Daroit D J,APF Correa,A Brandelli,et al. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45[J]. **International Biodeterioration and Biodegradation**,2011,65(1):45-51.
- [13] Fonseca C F D. Keratinase production by new strain of *Bacillus amyloliquefaciens*:application of statistical experimental design for optimization of keratinase production[J]. **Biotechnology and Environmental Science**,2012,14(3):307-317.
- [14] Sahoo D K,A Daset. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2012,167(5):1040-1051.
- [15] Tiwary E,R Gupta. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15:biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides [J]. **Bioresource Technology**,2010,101(15):6103-6110.
- [16] Wang D,X S Piao. Effects of keratinase on performance,nutrient utilization,intestinal morphology,intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein [J]. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**,2011,24(12):1718-1728.
- [17] 熊晓辉,张李阳,韦策,等. 红曲霉菌产 Monacolin K 固体发酵条件的优化[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(1):9-13.
XIONG Xiaohui,ZHANG Liyang,WEI Ce,et al. Optimizing solid fermentation of *Monascus* sp.3 for producing monacolin K[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**,2004,23(1):9-13.(in Chinese)