

文章编号: 1673-1689(2006)05-0044-05

## *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株 合成角质酶的发酵条件

张守亮<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>, 华兆哲<sup>2</sup>, 堵国成<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**以放线菌 *Thermobifida fusca* WSH03-11 一高产角质酶突变株为出发菌株, 在摇瓶中考察了碳、氮源等条件以及接种量、装液量和初始 pH 值等环境条件对突变株细胞生长和产角质酶的影响。通过优化发酵条件, 突变菌株的角质酶酶活达 10.1 U/mL, 提高了 15%。在此基础上, 在 5 L 发酵罐中进一步研究了碳源流加对突变株发酵产酶的影响, 结果发现, 分别在 0、24、48 h 添加 1% 乙醇, 角质酶酶活达到 16.4 U/mL, 细胞干重(DCW)达到 3.7 g/L, 而且发酵时间也由 110 h 缩短到 50 h。

**关键词:** *Thermobifida fusca*; 角质酶; 发酵优化; 流加

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

## Optimization of Fermentation Conditions for Cutinase Production with a Mutant of *Thermobifida fusca* WSH03-11

ZHANG Shou-liang<sup>1,2</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>, HUA Zhao-zhe<sup>2</sup>, DU Guo-cheng<sup>\*1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The effects of nutritional and environmental conditions on the production of cutinase by a mutant of *Thermobifida fusca* WSH03-11 were investigated in shaking flasks. Under the optimum fermentation conditions, the cutinase activity reached 10.1 U/mL, increased by 15% than that of the parent strain. Furthermore the effect of alcohol feeding on cutinase fermentation in 5 L fermentor was also studied, the cutinase activity and dry cell weight reached at 16.4 U/mL and 3.7 g/L, respectively. The fermentation time decreased from 110 h to 50 h.

**Key words:** *Thermobifida fusca*; cutinase; fermentation; optimization; fed-batch

角质酶(cutinase)是一种可降解植物角质的酶, 属丝氨酸酯酶的一种, 相对分子质量约为 22 000 ~ 25 000, 是一种具有称作  $\alpha/\beta$  水解酶折叠的共同结

构框架的蛋白质<sup>[1-2]</sup>。角质酶既可催化水解不溶性多聚体角质的酯键, 也可以作用于其它长链、短链脂肪酸酯、乳化的甘油三酯等。除了水解反应外,

收稿日期: 2006-01-18; 修回日期: 2006-03-10.

基金项目: 国家“863”计划项目(2003AA322050), 教育部新世纪优秀人才支持计划项目.

作者简介: 张守亮(1975-), 男, 江苏盐城人, 工学硕士; \* 通讯作者.

角质酶还能参与酸与醇的酯化、一些脂肪酸盐与醇的转酯化<sup>[3]</sup>。角质酶作为一种通用裂解酶,在纺织工业、食品工业以及化工工业等诸多领域都有着广泛的应用。由角质酶催化的水解和合成反应可水解牛奶脂肪,合成家用清洁剂、油化学(oleochemical)工业、甘油三酸酯聚体和表面活性剂,个人护肤产品成分的合成以及包含一个或几个手性中心的医药和农药产品的合成<sup>[1]</sup>。用于纺织工业是近年来角质酶的新的应用方向<sup>[4-5]</sup>,与传统的处理工艺相比,角质酶用于棉纤维角质层生物煮练,既可显著提高原棉的润湿性,改善棉纤维、涤纶等纺织品表面的亲水性,又可节约能源、碱液和水源,防止用大量的水冲洗以处理污染环境。

发现最早、研究最为广泛的角质酶产生菌为茄病镰刀菌 *Fusarium solani* 等植物病原真菌,后来研究者筛选到了产角质酶的细菌 *Pseudomonas putida* 和放线菌 *Thermobifida fusca*、*Thermoactinomyces vulgaris*、*Streptomyces acidiscabies* 等<sup>[7-10]</sup>,并从花粉中提取到了角质酶<sup>[6]</sup>。目前,国外对角质酶进行了大量的研究,其中以角质酶产生菌的构建、酶工程手段对角质酶进行改造修饰以及角质酶在纺织、食品、洗涤化工等的应用为主,而国内用产角质酶菌株进行发酵生产角质酶还未见报道。

作者以放线菌 *Thermobifida fusca* WSH03-11 为出发菌株,以对硝基苯丁酸酯为筛子,通过硫酸二乙酯诱变,获得一株高产角质酶的突变株,并对其发酵条件进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

出发菌株为放线菌 *Thermobifida fusca* WSH03-11 的突变株,由江南大学生物工程学院环境生物技术研究室选育保存。

### 1.2 培养基

斜面培养基(组分 g/L):可溶性淀粉 1,蛋白胨 5,酵母膏 5,氯化钠 5,琼脂 20,pH 8.0,121 °C 灭菌 15 min。

种子培养基(组分 g/L):可溶性淀粉 20,牛肉膏 10,酵母膏 5,磷酸氢二钾 2,氯化钠 5,pH 8.0,121 °C 灭菌 15 min。

基本发酵培养基(组分 g/L):蛋白胨 5,酵母膏 5,磷酸氢二钾 2,氯化钠 5,角质 1,pH 8.0,121 °C 灭菌 15 min。以 10% 乙醇为发酵碳源,考虑到乙醇的挥发,在灭菌后接种时加入。

### 1.3 角质的制备

将西红柿先放在沸腾的蒸馏水中煮 5 min,水冷却后剥下皮,用蒸馏水洗,再在草酸缓冲液(每升中含草酸 4 g、草酸铵 16 g)中煮沸 1 h,洗净后于 105 °C 烘箱中烘干后磨碎<sup>[11]</sup>。

### 1.4 菌种培养方法

1.4.1 斜面活化和种子培养 将冰箱中保藏的斜面菌种接种到活化斜面上,50 °C 静置培养 10 h;将活化后的斜面菌种接入种子培养基,50 °C 下 200 r/min 转速振荡培养 35~40 h。

1.4.2 发酵培养 取种子培养液,以 6% 接种量接入发酵培养基,50 °C 下 200 r/min 振荡培养 110 h。每个样品做 3 个平行样。

### 1.5 细胞干重(DCW)测定

取 20 mL 发酵液于 50 mL 离心管中,以 3 000 r/min 转速离心 15 min,倾去上清液,于 105 °C 烘干 5 h,至恒重后称重。

### 1.6 角质酶活测定

发酵液经 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。酶活测定用分光光度法在 20 °C 下进行。反应体积为 1 mL,包括 20 μL 酶液、20 μL 50 mmol/L 对硝基苯丁酸酯和 960 μL 50 mmol/L 硫磺脱氧胆酸钠缓冲液(pH 8.0),在 405 nm 处记录对硝基酚的生成速率。酶活定义为 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<sup>[12-13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳源对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株角质酶发酵的影响

2.1.1 不同碳源对角质酶发酵的影响 维持发酵基本培养基其它成分不变,考察培养基中碳质量浓度为 1.2 g/L 时不同碳源对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株发酵生产角质酶的影响,结果见图 1。结果表明,以乙醇为碳源时有利于产角质酶的合成,其酶活达到 8.2 U/mL,且细胞干重也最大;而以葡萄糖为碳源时,菌体生长和酶活均较低,说明以葡萄糖作为发酵碳源对突变株发酵产酶有抑制作用,这与 Fet<sup>[8]</sup>等研究的一致。

2.1.2 乙醇体积分数对角质酶发酵的影响 培养基中乙醇浓度对发酵生产角质酶的影响见图 2。乙醇体积分数为 1.0% 时,角质酶酶活最高,达 8.5 U/mL,进一步提高乙醇浓度则会对菌体生长和角质酶活积累产生一定的抑制作用。

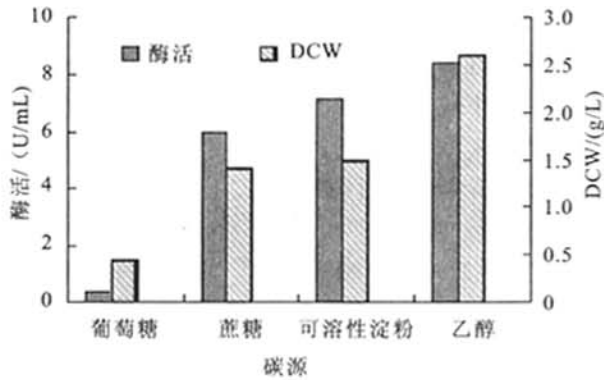


图1 不同碳源对角质酶发酵的影响

fig.1 Effect of carbon sources on cutinase fermentation

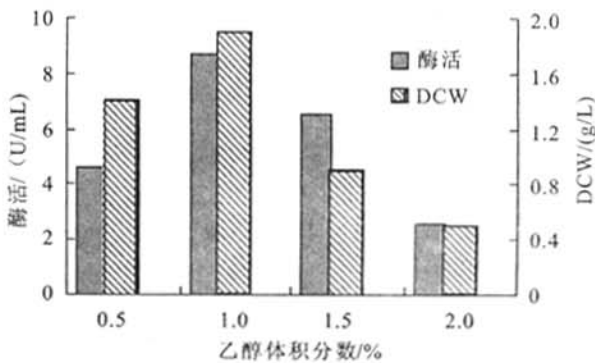


图2 乙醇体积分数对角质酶发酵的影响

Fig.2 Effect of alcohol concentration on cutinase fermentation

## 2.2 氮源对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株角质酶发酵的影响

2.2.1 不同氮源对角质酶发酵的影响 维持发酵基本培养基其它成分不变,考察培养基中氮源质量浓度为 1 g/L 时,不同氮源对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株发酵生产角质酶的影响,结果见图3。以蛋白胨、酵母膏为氮源时有利于产角质酶,其酶活分别达到 7.7 U/mL 和 6.8 U/mL。

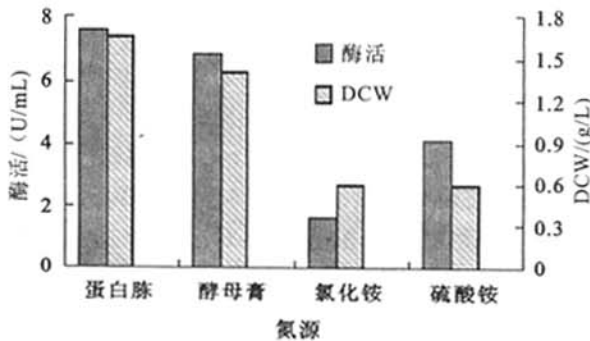


图3 不同氮源对角质酶发酵的影响

fig.3 Effect of nitrogen sources on cutinase fermentation

2.2.2 复合氮源对发酵产角质酶的影响 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株以蛋白胨、酵母膏为单

一氮源时角质酶酶活与细胞干重(DCW)都较高。为了考察复合氮源是否能够进一步提高角质酶产量,其余条件不变,以蛋白胨、酵母膏为研究对象,研究不同氮源配比对产角质酶的影响,结果见表1。

表1  $L_9(2^3)$  正交实验结果

Tab.1 Results of orthogonal experiment

编号	实验因素		角质酶活/(U/mL)
	蛋白胨	酵母膏	
1	1 (2 g/L)	1 (2 g/L)	6.6
2	1 (2 g/L)	2 (5 g/L)	7.5
3	1 (2 g/L)	3 (10 g/L)	7.4
4	2 (5 g/L)	1 (2 g/L)	8.4
5	2 (5 g/L)	2 (5 g/L)	8.9
6	2 (5 g/L)	3 (10 g/L)	8.6
7	3 (10 g/L)	1 (2 g/L)	8.8
8	3 (10 g/L)	2 (5 g/L)	8.0
9	3 (10 g/L)	3 (10 g/L)	7.7
$K_1$	21.5	23.8	
$K_2$	25.9	24.4	
$K_3$	24.5	23.7	
极差 R	4.4	0.7	

根据表1,比较各因素极差 R 值大小,可以看出,各因素对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株产生角质酶的影响主次顺序为:蛋白胨 > 酵母膏,蛋白胨、酵母膏的最优化水平组合为 22,即在实验的质量浓度范围内,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 5 g/L 为最佳氮源配比,在此氮源配比条件下,其它条件不变,角质酶产量可达 8.9 U/mL,比单一氮源时(图3)的最高酶活提高了 16%。

## 2.3 环境条件对角质酶发酵的影响

2.3.1 初始 pH 值对角质酶发酵的影响 初始 pH 值对菌体生长和角质酶合成的影响见图4。在 pH 8.0 时角质酶酶活与细胞干重分别达到 9.2 U/mL 和 2.4 g/L,故初始 pH 值选择为 8.0。

2.3.2 装液量对角质酶发酵的影响 发酵摇瓶的不同装液量在一定程度上影响发酵过程的溶氧水平。作者考察了 250 mL 三角瓶中不同装液量对菌体生长与角质酶合成的影响。考虑到环境温度为 50 °C,故选择了 40、50、60、70 mL 不同装液量对角质酶发酵的影响。由图5可知,装液量为 50 mL 时,角质酶活和细胞干重都达到最高,分别为 9.8 U/mL 和 2.2 g/L。

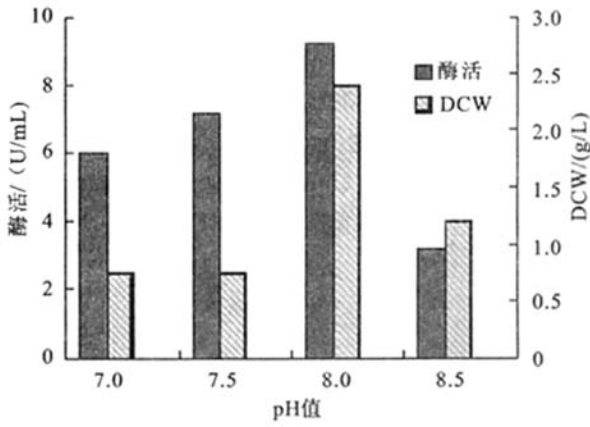


图 4 不同初始 pH 值对角质酶发酵的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on cutinase fermentation

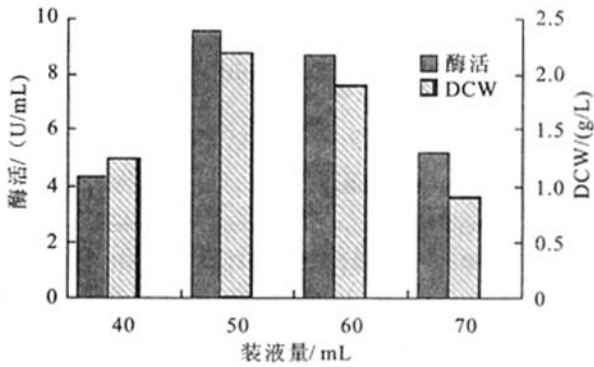


图 5 不同装液量对角质酶发酵的影响

Fig. 5 Effect of medium volume on cutinase fermentation

2.3.3 接种量对角质酶发酵的影响 在 pH 8.0 的发酵培养基中,以体积分数 6%、8%、10%、12% 接入种子培养液,考察不同接种量对角质酶发酵的影响,结果见图 6。以 8% 的接种体积分数时,角质酶酶活达到最高,为 10.1 U/mL,故接种体积分数以 8% 较适宜。

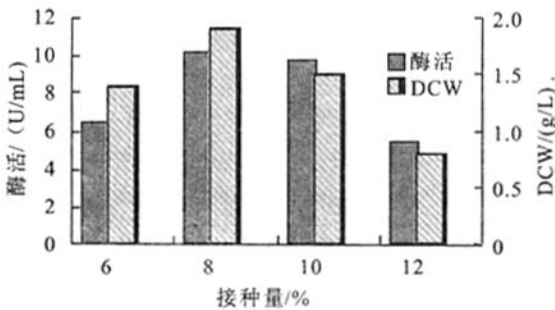


图 6 不同接种量对角质酶发酵的影响

Fig. 6 Effect of inoculum size on cutinase fermentation

2.4 5 L 罐中乙醇流加对角质酶发酵的影响

由于 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株产角质酶的环境温度为 50 °C,发酵时间为 110 h,考虑到乙醇的挥发,故有必要考察补加碳源 - 乙醇对突变株发酵产酶的影响。分别考察了在 12、24、36、48、60 h 添加 1% 乙醇对突变株发酵的影响,结果见表

2。

表 2 不同时间添加乙醇对角质酶发酵的影响

Tab.2 Effect of the time of alcohol feeding on cutinase fermentation

时间/h	酶活/( U/mL )	DCW/( g/L )
对照	11.6	1.8
12	9.8	1.3
24	15.8	3.2
36	13.2	2.4
48	12.1	1.7
60	11.9	1.8

从表 2 可以看出,在 24、36、48 h 添加乙醇有利于角质酶的发酵,而在 12 h 添加乙醇反而不利于角质酶发酵,角质酶酶活为 9.8 U/mL,而在 60 h 添加 1% 乙醇对突变株角质酶发酵影响不大,角质酶酶活为 11.9 U/mL,与对照酶活 11.6 U/mL 基本一样。在此基础上,还考察了分次添加乙醇对发酵产酶的影响,结果发现,在 0、24、48 h 添加 1% 乙醇有利于突变株发酵生产角质酶。

根据以上实验,初步确定的角质酶发酵较优的营养及环境条件,以乙醇为碳源(分别在 0、24、48 h 加入 1% 乙醇),5 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母膏,2 g/L  $K_2HPO_4$  和 5 g/L 氯化钠为较优的培养基组成,初始 pH 8.0,5 L 罐的装液量为 3 500 mL,接种量为 8%,搅拌转速为 300 r/min,通气体积分数为 1:1,培养温度为 50 °C,考察 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株产角质酶的过程,结果见图 7。

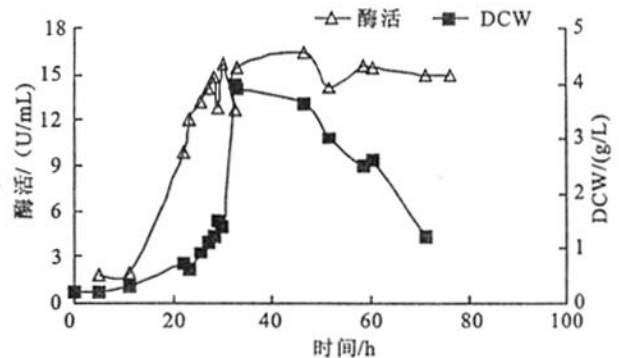


图 7 角质酶发酵过程曲线

Fig. 7 Time courses of cutinase fermentation

在 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株的发酵过程中,角质酶的合成和菌体生长时部分偶联,发酵至 50 h,角质酶活和菌体干重达到最大,分别为 16.4 U/mL 和 3.7 g/L。另外,培养基和环境条件优化后,发酵时间由 110 h 减少至 50 h,大大缩短了发酵周期。

### 3 结 论

1) 以前期研究中对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 诱变选育到一株高产角质酶菌为出发菌株, 通过摇瓶实验优化了突变株产角质酶的营养条件和环境条件, 最终角质酶酶活由 8.7 U/mL 达到 10.1 U/

mL, 提高了 15%。

2) 在 5 L 发酵罐上考察了流加乙醇对 *Thermobifida fusca* WSH03-11 突变株合成角质酶的影响, 结果发现, 分别在 0、24、48 h 添加 1% 乙醇, 角质酶酶活达到 16.4 U/mL, 细胞干重(DCW)达到 3.7 g/L, 而且发酵时间也由 110 h 减少到 50 h。

### 参考文献:

- [1] Maarten R Egmond, Jacob de Vlieg. *Fusarium solani pisi* cutinase[J]. **Biochimie**, 2000, (82): 1015 - 1021.
- [2] Martinez C, Degeus P. *Fusarium solani pisi* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent[J]. **Nature**, 1992 (356): 615 - 618.
- [3] Garc a-Lepe R, Nuero O M. Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 1997, (25): 127 - 130.
- [4] Ofir Degani, Shimon Gepstein. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 2002 (102 - 103): 277 - 289.
- [5] 周文龙. 酶在纺织中的应用[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2002. 140 - 145.
- [6] Kolattukudy P E, Purdy R E. Cutinase from fungi and pollen[J]. **Methods in enzymology**, 1981, 71: 652 - 664.
- [7] Joseph Sebastian, P E Kolattukudy. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1988, 263(1): 77 - 85.
- [8] Fett W F, Gerard H C. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin degrading enzymes[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1992, 58(7): 2123 - 2130.
- [9] Fett W F, Herv C. Cutinase production by *Streptomyces spp*[J]. **Current microbiology**, 1992, 25: 165 - 171.
- [10] Fett W F, Wijey C. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2000, 31: 25 - 29.
- [11] Fett W F, Wijey C, Moreau R A et al. Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC27730[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 1999, 86: 561 - 568.
- [12] Sheryl Fernandes, G Te Johansson. Purification of recombinant cutinase by extraction in an aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate[J]. **Biotechnol bioeng** 2001, 73: 465 - 475.
- [13] Sheryl Fernandes, Bo Mattiasson. Recovery of recombinant cutinase using detergent foam[J]. **Biotechnol Prog**, 2002, 18: 116 - 123.

(责任编辑: 李春丽)