

重组大肠杆菌产 *Streptomyces* sp. FA1 来源木聚糖酶的摇瓶发酵优化^{*}

何洁^{1,2} 宿玲怡^{1,2} 吴敬^{1,2**}

(1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122)

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

摘要 为了实现来源于 *Streptomyces* sp. FA1 的木聚糖酶的高效胞外分泌表达,对 *E. coli* BL21 (DE3)/pET20b(+)/coe/xynA 基因工程菌的发酵产酶诱导条件进行优化,获得最优的诱导条件为 25 ℃ 发酵 6 h 后添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG。在此基础上对发酵培养基进一步优化,得到最优培养基成分为:甘油 11 g/L,酵母粉 24 g/L,蛋白胨 8 g/L,磷酸盐浓度 89 mmol/L,镁离子 4 mmol/L。最终酶活达到 780.2 U/ml,为未优化前的 2.2 倍,是目前大肠杆菌摇瓶发酵产木聚糖酶的最高表达水平,为实现该酶的工业化生产奠定基础。

关键词 链霉菌 木聚糖酶 重组大肠杆菌 发酵优化

中图分类号 Q819

木聚糖(Xylan)是植物细胞壁半纤维素组分的主要成分,占植物碳水化合物总量的三分之一。在自然界中,木聚糖是继纤维素之后含量最为丰富的多聚糖^[1]。木聚糖的主链由多个吡喃木糖基通过 β -1,4-糖苷键连接形成,侧链含多种不同取代基^[2]。木聚糖酶属于 O-glycoside hydrolases (EC 3.2.1.x),可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖单糖。它是一种复合酶,主要包括 endo- β -1,4-xylanase (EC 3.2.1.8) 和 β -xylosidase (EC 3.2.1.37)。前者从主链内部随机作用于 β -1,4-糖苷键,将木聚糖分解成低聚木糖;后者则作用于低聚木糖的末端,释放出木糖单糖^[3]。木聚糖酶可广泛应用于制浆造纸、饲料、食品和能源工业中^[4]。

迄今,已经有一些关于放线菌来源的木聚糖酶的报道,其中大部分为链霉菌,如 *Streptomyces* sp. SWU10^[5], *Streptomyces megasporus* DSM^[6], *Streptomyces* sp. S27^[7], *S. olivaceoviridis* E-68^[8] 等等;并且也有不少链霉菌来源的木聚糖酶在酵母、大肠杆菌及链霉菌中表达,其中,木聚糖酶在酵母中的表达水平普遍较高,

而在大肠杆菌中表达水平普遍很低,一般在 4.4 U/ml ~ 23.5 U/ml^[9-11]。

本实验室前期工作从来源于天然沕竹体系的一株 *Streptomyces* sp. FA1 中分离纯化出一种木聚糖酶,并成功地在 大肠杆菌中表达。本研究在此基础上对基因工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET20b(+)/coe/xynA 的发酵产酶进行优化,以实现高效胞外分泌表达木聚糖酶,为进一步工业化廉价生产木聚糖酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

由本实验室构建并保藏的基因工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET20b(+)/coe/xynA, 含 *Streptomyces* sp. FA1 木聚糖酶基因。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 5 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g。

TB 培养基(g/L):蛋白胨 12 g,酵母粉 24 g,甘油 5 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g, KH_2PO_4 2.3 g。

1.3 试剂

蛋白胨、酵母粉购自 Oxoid 公司,其他试剂均为国产分析纯,购自国药化学试剂有限公司。卡那霉素和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生工生物

收稿日期:2012-12-09 修回日期:2013-01-10

^{*} 国家自然科学基金(30970057)(111-2-06)、江苏省科学与技术支持项目(BE2012018)资助项目

^{**}通讯作者,电子邮箱:jingwu@jiangnan.edu.cn

技术公司。

1.4 培养方法

种子培养:从 -80°C 保藏的甘油管中接 $100\mu\text{l}$ 菌液于含 $100\mu\text{g/ml}$ 氨苄霉素的种子培养基中(50ml 培养基/250ml 三角瓶),于 37°C 、200 r/min 回转式摇床培养 8h。

发酵培养:将培养 8 h 的种子以 5% 的接种量接入含 $100\mu\text{g/ml}$ 氨苄霉素的发酵培养基(100 ml 培养基/500 ml 三角瓶), 25°C 、200 r/min 回转式摇床培养 48h。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体干重的测定 取 2 ml 菌液, $10\,000\times g$ 离心 10 min,将沉淀下来的细胞用 0.9% (w/v) NaCl 漂洗 2 次,然后在 105°C 烘干 16 h 以达到恒重。 $\text{DCW}(\text{g/L}) = \text{烘干后恒重}(\text{g})/0.002(\text{L})$ 。

1.5.2 酶活力测定方法 参照 DNS 还原糖量测定法^[12]:取 1 ml 适当稀释的酶液,加入到 1 ml 用 50 mmol/L, pH5.5 的磷酸缓冲液配制的 1% (w/v) beechwood xylan 底物溶液中, 50°C 反应 10 min 后加入 3 ml DNS,煮沸 10 min 迅速冷却,稀释后 540 nm 下测吸光度(以灭活的酶液同样操作作为空白对照)。以木糖作标准曲线测定释放的还原糖量。木聚糖酶活力单位(U)的定义为:在上述条件下,每分钟水解木聚糖生成 $1\mu\text{mol}$ 还原糖所需要的酶量。

2 结果与讨论

2.1 菌体生长曲线及产酶曲线研究

对发酵过程来说,种龄的选择至关重要,可影响发酵周期和产物的生成。为了确定合适的种龄,本实验对 LB 培养基中菌体生长曲线进行了研究,结果见图 1。在图 1 中,0~4 h 菌体生长较慢,为延滞期;4~8 h 菌体快速生长,为对数生长期;8~12 h 菌体干重不再增加,进入稳定期;12 h 以后菌体干重开始下降,进入衰亡期。因此,最佳接种时间为对数生长的中后期,选择生长 6~8 h 种龄的菌体转接入 TB 培养基,结果如图 2 所示。菌体生长和产酶良好,延滞期较短,48 h 后酶活可达到 346.8 U/ml ,因此可选用培养 6~8 h 的种子。

2.2 诱导条件的优化

2.2.1 诱导温度的影响 温度是影响菌体生长和诱导重组蛋白表达的重要因素,在发酵过程中应严格地控制培养温度。本实验比较了三种培养温度下大肠杆菌生长及产酶的情况,从表 1 可见,随着培养温度的升高,大肠杆菌的生长越好,但产酶情况与菌体的生长规

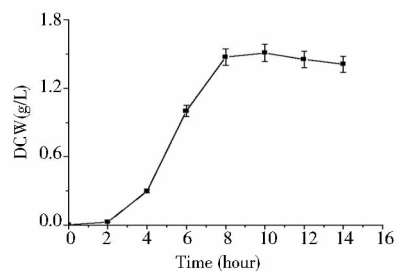


图 1 重组菌在 LB 培养基中的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *E. coli* in LB medium

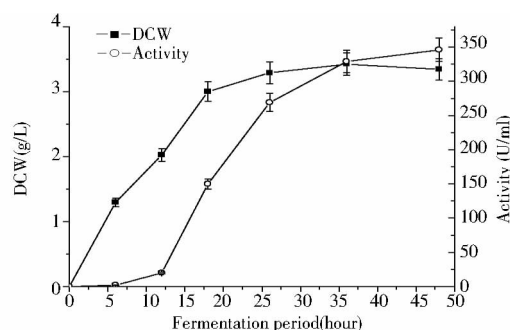


图 2 重组菌在 TB 培养基中的生长曲线和产酶曲线

Fig.2 Cells growth and xylanases production by *E. coli* in TB medium

律截然不同,当诱导温度为 25°C 时的胞外酶活最高,为 345.3 U/ml ,分别是 30°C 和 37°C 的 1.3 倍和 1.7 倍。因此,选择 25°C 低温诱导。

表 1 诱导温度对重组大肠杆菌生长和产酶的影响

Table 1 Effect of temperature on the *E. coli* growth and xylanases production

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	DCW	Activity (U/ml)
25	3.4	345.3
30	5.2	268.9
37	6.0	199.6

2.2.2 IPTG 诱导时间及浓度的影响 目前,T7 启动子启动的诱导剂主要有两种:异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)和乳糖。IPTG 是一种极强的诱导剂,十分稳定,不易被菌体代谢,而乳糖可能在菌体的代谢过程中充当碳源和能源被降解^[13]。因此,本实验选用 IPTG 作为诱导剂,并采用单因素实验考察 IPTG 诱导时间及浓度对菌体生长和产酶的影响。结果如图 3、4 所示,当 25°C 发酵 6 h 后在培养基中添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,酶活达到最高,为 516.5 U/ml ,是优化前酶活(345.3 U/ml)的近 1.5 倍。

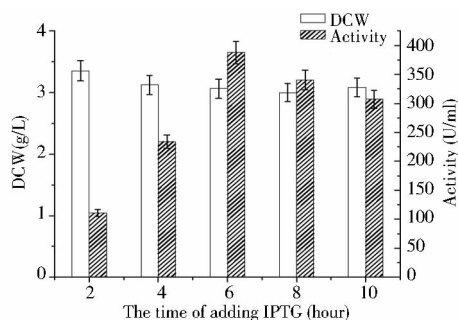


图3 诱导时间对重组大肠杆菌生长和产酶的影响

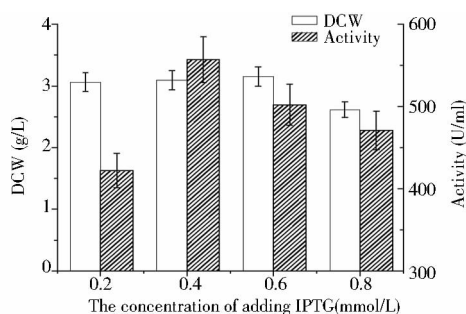
Fig.3 Effect of the time of adding IPTG on the *E. coli* growth and xylanases production

图4 诱导浓度对重组大肠杆菌生长和产酶的影响

Fig.4 Effect of the concentration of IPTG on the *E. coli* growth and xylanases production

2.3 发酵培养基的优化

培养基是微生物生存的营养来源,不同微生物所需要的营养成分及浓度配比并不完全相同,需要按照实际情况加以选择。因此,在优化了诱导产酶条件的基础上,本实验对初始发酵培养基(TB)实施进一步优化,以促进菌体的生长并提高产酶量。

2.3.1 碳源及其浓度对重组菌产酶的影响 碳源作为培养基的主要成分之一,是生命过程中的重要的能源物质,它参与菌体的生长和产物的合成,对菌株的发酵生产影响重大^[14]。按照含碳质量分数相等的原则,分别以葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉代替TB培养基中的甘油(5 g/L)为碳源进行单因素实验。如图5所示,重组菌对6种碳源的利用情况有所不同,最容易利用的是甘油,其次是葡萄糖,而对其他碳源利用程度较差。当以甘油为碳源时,菌体生长良好,且酶活最高,因此选用甘油作为最佳碳源。

在甘油作为唯一碳源的基础上,选择合适的甘油浓度至关重要。由图6可知,随着甘油浓度的增加,胞外酶活先增加后降低的趋势。当甘油浓度为8 g/L时,胞外

酶活达到最高,为611.1 U/ml,并且由图6可见适当提高甘油浓度有利于菌体的生长,但是当甘油浓度达到15 g/L以上时,菌体的产酶能力明显受限。

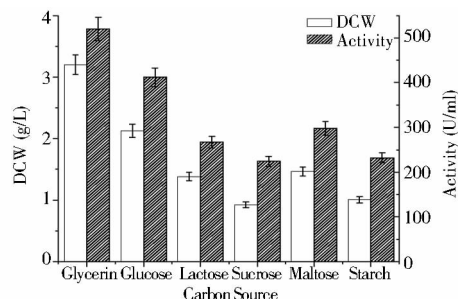


图5 碳源对重组菌生长及产酶的影响

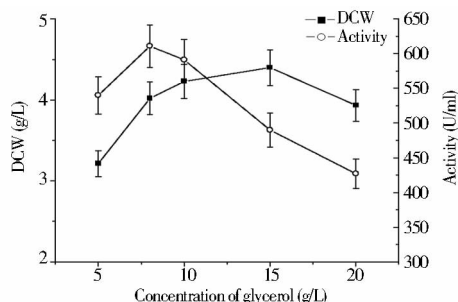
Fig.5 Effects of different carbon sources on the *E. coli* growth and xylanases production

图6 甘油浓度对重组菌生长及产酶的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of glycerol on the *E. coli* growth and xylanases production

2.3.2 氮源及其浓度对重组菌产酶的影响 氮源是构成菌体细胞物质的主要成分,如氨基酸、蛋白质、核酸等和含氮代谢物等。按照上述碳源的研究方法,通过改变发酵培养基中的氮源来研究不同氮源对重组菌生长和产酶的影响。按照含氮质量分数相等的原则(TB培养基中含氮量为4.32 g/L),分别以 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、尿素、酵母粉、蛋白胨为氮源进行单因素实验。如图7所示,菌体对蛋白胨和酵母粉利用较好,酶活相应较高。进而考察酵母粉和蛋白胨复配使用的效果,酵母粉:蛋白胨的比例为4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4。如图8所示,当酵母粉:蛋白胨的比例为3:1时,菌体生长良好,且酶活最高,达到627.7 U/ml。

为了进一步提高木聚糖酶的产量在此基础上对复配氮源浓度进行考察,结果如图9所示,复配氮源浓度对菌体的生长影响很小,而对菌体产酶影响较大。当氮源浓度为24 g/L时(酵母粉浓度为18 g/L,蛋白胨6

g/L), 酶活达到最高, 为 646.6 U/ml。

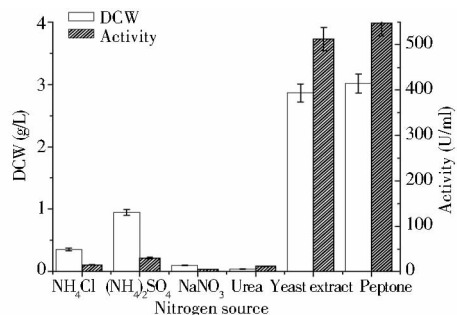


图7 不同氮源对重组菌生长及产酶的影响

Fig.7 Effects of different nitrogen sources on the *E. coli* growth and xylanases production

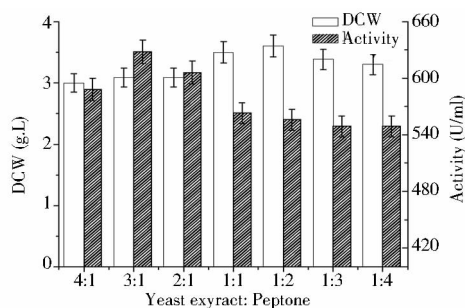


图8 氮源复比对重组菌生长及产酶的影响

Fig.8 Effects of different ratio of Yeast Extract: Peptone on the *E. coli* growth and xylanases production

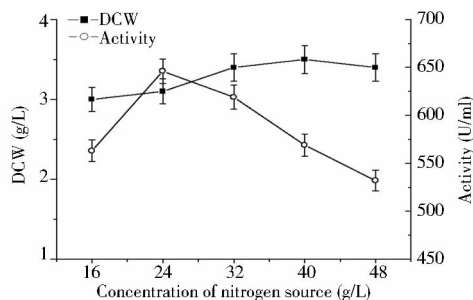


图9 复合氮源浓度对重组菌生长及产酶的影响

Fig.9 Effects of different concentrations of nitrogen source on the *E. coli* growth and xylanases production

2.3.3 磷酸盐浓度对重组菌产酶的影响 磷是构成核酸、脂和三磷酸腺苷的重要组分,在能量代谢中起重要的调节作用。磷的存在有利于糖代谢,并能缓冲培养基的 pH 变化,但当培养基中磷的含量过高时,某些酶的活性和产物的合成会受到抑制。本实验以初始培养基 TB 中 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O : KH_2PO_4 = 7:1$ 的比例配置不同浓度的磷酸盐溶液,考察不同浓度磷酸盐对重组

大肠杆菌生长及胞外产酶的影响。由图 10 可知,当磷酸盐浓度低于 50 mmol/L 时,菌体生长受到抑制;而胞外酶活则随着磷酸盐浓度的增加先上升后下降,其中磷酸盐浓度为 89 mmol/L 时的胞外酶活最高,为 665.3 U/ml。

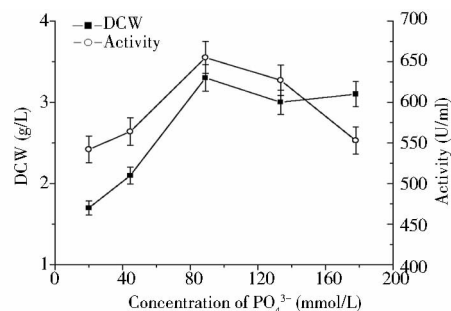


图10 磷酸盐浓度对重组菌生长及产酶的影响

Fig.10 Effects of different concentrations of phosphate on the *E. coli* growth and xylanases production

2.3.4 金属离子及其浓度对重组菌产酶的影响 金属离子对细胞的生长和酶的活性具有重要的影响,因此在微生物发酵生产酶的过程中也经常会会在培养基中添加相应的金属离子。为了考察不同金属离子对重组大肠杆菌胞外生产木聚糖酶的影响,本实验在发酵培养基中添加了终浓度为 2.5 mmol/L 的不同金属离子。由图 11 可知,钙离子和锰离子均能促进菌体的生长,

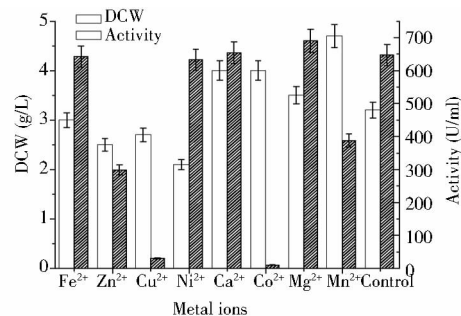


图11 金属离子对重组菌生长及产酶的影响

Fig.11 Effects of different metallic ions on the *E. coli* growth and xylanases production

铜离子和钴离子明显抑制菌体生长。至于产酶能力,只有镁离子对大肠杆菌的胞外产酶能力有一定的帮助,酶活可达到 681.6 U/ml;而锌离子、铜离子、钴离子和锰离子则抑制了大肠杆菌的胞外产酶。

不同浓度的镁离子对大肠杆菌生长及产酶的影响不同。如图 12 所示,随着镁离子浓度的增加,菌体生长基本无影响;而酶活则随着镁离子浓度的增加,先上

升后降低,当镁离子浓度为 4 mmol/L 时,胞外酶活最高,为 723.5 U/ml。

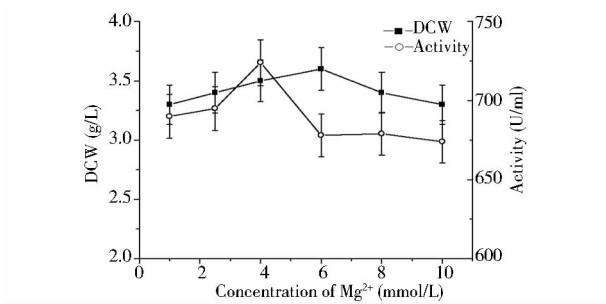


图 12 Mg^{2+} 在不同浓度对重组菌生长及产酶的影响
Fig. 12 Effects of different concentrations of Mg^{2+} on the *E. coli* growth and xylanases production

2.3.5 发酵培养基的正交试验研究 为综合考察各因素对菌体生长和产酶的效果,选取甘油、复配氮源、磷酸盐浓度、 Mg^{2+} 浓度四个因素进行正交实验,每个因

素选取三个水平,实验设计如表 2 所示:

表 2 正交实验方案设计

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment				
Levels	Factors			
	A Glycerol (g/L)	B Nitrogen source (g/L)	C PO ₄ ³⁻ (mmol/L)	D Mg ²⁺ (mmol/L)
1	5	16	60	2
2	8	24	90	4
3	11	32	120	6

对正交试验结果进行极差分析,表格 3 表明各指标对重组酶的影响大小依次为:甘油 > 磷酸盐浓度 > 复合碳源 > Mg^{2+} 浓度;较好的实验方案应该是: $A_3B_3C_2D_2$,即甘油 11 g/L,酵母粉 24 g/L,蛋白胨 8 g/L,磷酸盐浓度 89 mmol/L,镁离子 2.5 mmol/L。采用此较优组合的发酵培养基进行发酵验证,酶活为 780.2 U/ml,相对于未优化前(516.5 U/ml),酶活提高了 51% 左右。

表 3 正交试验极差分析结果

Table 3 Orthogonal experiment result analysis

Factors	A	B	C	D	Activity (U/ml)
	Glycerol	Nitrogen source	PO ₄ ³⁻	Mg ²⁺	
1	1	1	1	1	689.8
2	1	2	2	2	714.0
3	1	3	3	3	704.4
4	2	1	2	3	697.8
5	2	2	3	1	681.4
6	2	3	1	2	687.4
7	3	1	3	2	760.2
8	3	2	1	3	687.6
9	3	3	2	1	767.2
k ₁	702.733	715.923	688.267	712.8	
k ₂	688.867	694.333	726.333	720.533	
k ₃	738.333	719.667	715.333	696.6	
R	49.466	25.334	38.066	23.933	
The optimal level	A ₃	B ₃	C ₂	D ₂	

3 结 论

本文以含 *Streptomyces* sp. FA1 木聚糖酶基因的重组大肠杆菌为出发菌株,从发酵过程中诱导温度、时间及浓度入手进行优化,使得重组木聚糖酶在大肠杆菌中的表达得到了较大的提高。在考察诱导产酶条件的基础上,对发酵培养基中的营养成分进行了研究,考察了碳源、氮源、磷酸盐和金属离子对重组大肠杆菌产酶的影响,确定了最佳培养基成分。通过正交试验优化得到的培养基为甘油 11 g/L,酵母粉 24 g/L,蛋白胨 8

g/L,磷酸盐浓度 89 mmol/L,镁离子 4 mmol/L,在此条件下 25 ℃ 发酵 6 h 后添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,酶活从初始 346.8 U/ml 提高到 780.2 U/ml,是未优化前的 2.2 倍,是目前所报道的大肠杆菌摇瓶发酵产木聚糖酶的最高表达水平,为实现该酶的工业化生产打下基础。

参考文献

[1] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol

- Biotechnol, 2001, 56(3-4): 326-338.
- [2] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(1): 3-23.
- [3] Biely P. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol 1985; 3(11): 286-290.
- [4] Polizeli M L, Rizzatti A C, Monti R. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 67(5): 577-591.
- [5] Deesukon W, Nishimura Y, Harada N, et al. Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10. Process Biochem, 2011, 46(12): 2255-2256.
- [6] Qiu Z, Shi P, Luo H, et al. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. Enzyme Microb Tech, 2010, 46(6): 506-512.
- [7] Li N, Shi P, Yang P, et al. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-region-truncated versions. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83(1): 99-107.
- [8] Jiang Z, Deng W, Yan Q, et al. Subunit composition of a large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. J Biotechnol, 2006, 126(3): 304-312.
- [9] Li N, Meng K, Wang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(2): 231-234.
- [10] Li N, Yang P, Wang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of protease-resistant xylanase from *Streptomyces fradiae* var. k11. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(3): 410-416.
- [11] Choi J H, Lee O S, Shin J H, et al. Thermostable xylanase encoded by xynA of *Streptomyces thermocyanoeviolaceus*: Cloning, purification, characterization and production of xylooligosaccharides. J Microbiol Biotechnol, 2006, 16(1): 57-63.
- [12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959, 31(5): 426-428.
- [13] 纪丽萍, 吴丹, 吴敬等. 重组大肠杆菌产 γ -环糊精葡萄糖基转移酶的摇瓶发酵优化. 中国生物工程杂志, 2011, 31(10): 50-56.
- Ji L P, Wu D, Wu J, et al. Optimization of fermentation in Shake Flasks for recombinant γ -CGTase expression in *E. coli*. China Biotechnology, 2011, 31(10): 50-56.
- [14] 张芙华. 重组枯草芽孢杆菌生产角质酶发酵条件优化. 无锡: 江南大学, 生物工程学院, 2008.
- Zhang F H. Fermentation optimization for cutinase production with a recombinant *Bacillus subtilis*. Wuxi: Jiangnan University, School of Biotechnology, 2008.

Optimization of Fermentation in Shake Flasks for the Xylanase in Recombinant *E. coli*

HE Jie^{1,2} SU Ling-qia^{1,2} WU Jing^{1,2}

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

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

Abstract In order to achieve high production of the xylanase, the optimization of culture medium was investigated in *E. coli* BL21(DE3) harboring the plasmid pET20b(+)/coexynA. The optimized medium and induction condition were as follows: 11 g/L glycerol, 24 g/L yeast extract, 8 g/L peptone, 89 mmol/L PO_4^{3-} , 4 mmol/L Mg^{2+} , induced by 0.4 mmol/L IPTG at 6h of culture. Under this condition, the enzyme activity increased from 346.8 U/ml to 780.2 U/ml, which was 2.2 times as high as that when it was not optimized.

Key words *Streptomyces* sp. FA1 Xylanase Recombinant *E. coli* Optimization