

重组大肠杆菌产角质酶-CBM 摇瓶发酵 优化及分泌表达研究^{*}

郭森^{1,2} 吴丹^{1,2} 陈晟^{1,2} 吴敬^{1,2**} 陈坚^{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 在TB培养基的基础上,通过单因素分析和正交设计对重组大肠杆菌产角质酶-CBM发酵进行优化,得到最适培养基的组分为:甘油 5 g/L,蛋白胨 16 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mmol/L, K_2HPO_4 13.7 g/L, KH_2PO_4 1.53 g/L,菌体生长至对数前中期时添加终浓度为1 g/L乳糖和0.75 g/L甘氨酸,30℃发酵48 h,角质酶-CBM产量可达63 U/ml,较TB培养(20 U/ml)提高了近3倍。考察了热激作用、渗透调节物质及温度两控制对角质酶-CBM分泌表达的影响,在添加Lactose和Glycine后,发现在添加终浓度为75 mmol/L的L-脯氨酸,37℃热激1 h或47℃热激0.5 h,变温至25℃发酵,角质酶-CBM产量可达90 U/ml,较TB恒温培养提高了近四倍。

关键词 角质酶-CBM 正交设计 热激作用 渗透调节物质 变温发酵

中图分类号 Q786

角质酶作为一种多功能解酯酶,可降解植物角质层,是棉纤维精练的关键酶制剂之一。角质酶与果胶裂解酶在棉纤维精练中具有较好的协同效应,在实现纺织工业的清洁生产发挥着重要的作用^[1-3]。然而,角质酶对棉纤维的亲合力较弱,大大降低了角质酶的催化效率,制约了其在纺织工业上的应用。有研究表明,如果角质酶能够与紧邻角质的纤维素特异性结合而又不影响其催化活性,角质周围角质酶的有效浓度会得到增加,进而会提高角质酶对棉纤维表面角质的水解效率^[4]。

纤维素酶是由催化结构域(catalytic domain, CD),纤维素结合结构域(cellulose-binding module, CBM)和连接两者的连接桥(linker)组成的多功能域结构。其中纤维素结合结构域能和纤维素特异结合,促进了纤维素酶与纤维素的结合。由于CBM在结构上和功能上都是独立的结构域,因此可以采用基因工程方法把

CBM与其他目的蛋白融合,构建易与底物结合催化活性得到提高的融合蛋白^[5-10]。

研究室曾成功构建了角质酶-CBM融合蛋白,该融合蛋白具有与天然角质酶相似的酶学特性,并且与果胶酶有更好的协同效应,对棉纤维表面角质层的水解效率远远高于天然角质酶与果胶酶的混合效果,更适于在棉纤维精练中应用^[4]。

以研究室前期构建的可表达角质酶-CBM的重组大肠杆菌Tfu_0883-CBM/pET20b(+)/*E. coli* BL21(DE3)为研究对象,优化了该重组菌生产角质酶-CBM的发酵培养基,并考察了热激作用、渗透调节物质及变温发酵对角质酶-CBM分泌表达的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

以重组大肠杆菌Tfu_0883/pET20b(+)/*E. coli* BL21(DE3)作为生产菌种。该菌株由江南大学食品科学与技术国家重点实验室构建及保藏。

1.2 培养基

种子培养基:工业级蛋白胨 10 g/L,工业级酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,氮苄青霉素 100 μg/ml,pH 7.1。

收稿日期:2011-05-26 修回日期:2011-06-13

^{*} 国家“863”计划(2009AA02Z204)、国家自然科学基金(30970057)、国家杰出青年基金(20625619)、江苏省六大人才高峰支持计划(08-B-吴敬)资助项目

^{**} 通讯作者,电子邮箱:jingwu@jiangnan.edu.cn

TB 发酵培养基: 甘油 5 g/L, 工业级蛋白胨 12 g/L, 工业级酵母粉 2.4 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 16.43 g/L, 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7.1。

1.3 试剂

工业级酵母粉购于宜昌安琪酵母有限公司; 工业级蛋白胨购于上海西王淀粉糖有限公司; 氨苄青霉素购于上海生工生物工程有限公司; 其他常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养 从 -80°C 甘油管保存的菌种中取 100 μl 菌液接于 50 ml (250 ml 锥形瓶) 含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素 (Amp) 的种子培养基中; 于 37°C 、200 r/min 在回转恒温调速摇床培养 8~10 h。

1.4.2 摇瓶发酵 将种子液以 8% 的接种量接入 50 ml (250 ml 锥形瓶) 发酵培养基中, 30°C 、200 r/min 培养 12 h 至对数前中期, 添加终浓度为 1 g/L 的乳糖和 0.75 g/L 的甘氨酸, 继续培养。

1.4.3 热激实验和转温发酵 培养 12 h 至前中期, 将摇瓶转移至水浴摇床 (37°C 或 47°C), 待温度达到热激温度 (37°C 或 47°C) 后, 添加乳糖和甘氨酸, 再转入水浴摇床进行热激。热激 0.5 h 或 1.0 h 后, 转至回转恒温调速摇床进行培养, 培养温度设定在 25°C 或 30°C 。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体生物量的测定 利用分光光度计检测菌液在 600 nm 波长处的吸光度值, 即 OD_{600} , 根据 OD_{600} 与菌体干重之间的换算关系: $1\text{OD}_{600} = 0.578 \text{ g/L}$, 可以算出发酵过程中的菌体干重。

1.5.2 角质酶-CBM 酶活测定^[11-12] 利用分光光度法。反应液体积为 1 ml, 包括 20 μl 酶液和 980 μl 50 mmol/L 的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 、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 对硝基苯酚的酶量即为一个酶活力单位。

1.5.3 包涵体 SDS-PAGE 电泳 取 5 OD 菌体的发酵液于 4°C 、12 000 r/min 离心 2 min, 去掉上清, 沉淀用去离子水洗涤两遍, 再离心, 沉淀用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液悬浮, 在冰水浴中, 超声处理 10 min, 离心后沉淀为包涵体, 包涵体用 20 μl 上样缓冲液溶解, 于沸水浴中 5 min, 离心, 角质酶-CBM 包涵体存在于上层上样缓冲液中, 包涵体的上样量为 2 μl 。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基优化

2.1.1 碳源对角质酶-CBM 产量和菌体生长的影响

通过单因素试验确定了对菌体生长及产酶的最佳碳源。按照碳源质量分数相等的原则, 把 TB 培养基中的甘油分别替换为可溶性淀粉 (soluble starch), 葡萄糖 (glucose), 乳糖 (lactose), 蔗糖 (sucrose), 麦芽糖 (maltose)。结果如图 1 所示, 重组菌对五种碳源的利用情况不同, 可溶性淀粉和甘油均能促进菌体生长, 但甘油更有利于产酶, 因此选择甘油 (对照组) 为最佳碳源。最容易利用的是甘油, 而对乳糖和麦芽糖的利用程度较差。可能原因是工程菌分解利用乳糖和麦芽糖的酶系比分解利用甘油的酶系差。

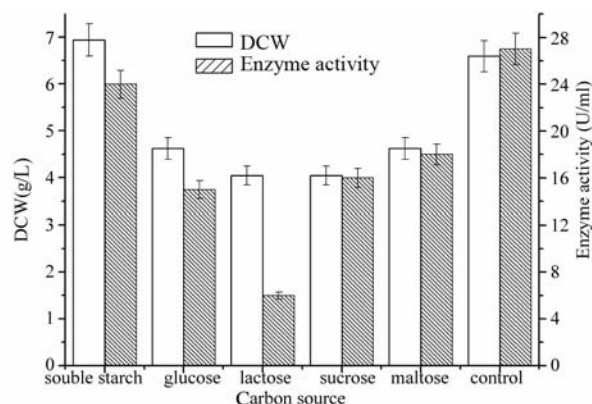


图 1 不同碳源对菌体生长和产酶的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources on cutinase-CBM production and *E. coli* growth

2.1.2 氮源对角质酶-CBM 产量和菌体生长的影响

氮源主要用于菌体合成细胞结构的原料和含氮代谢物。以上述碳源研究为基础, 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, 分别以氯化铵 (ammonium chloride), 硫酸铵 (ammonium sulphate), 硝酸钠 (sodium nitrate), 尿素 (carbamide urea), 蛋白胨 (peptone), 酵母粉 (yeast) 来替代 TB 培养基中的复合氮源。结果如图 2 所示, 菌体对氮源利用情况存在较大差异, 有机氮源普遍优于无机氮源, 可能原因是菌体利用无机氮源后, 培养基的 pH 下降过快, 超出了磷酸盐的缓冲范围, 培养基 pH 过低进而不适于菌体生长。对比蛋白胨与酵母粉的复配对菌体生长和产酶的影响,

单一氮源蛋白胨更利于菌体生长(6.5 g/L)和产酶(27 U/ml)。虽然对照组(TB)的酶产量也能达到27 U/ml,但相比单一氮源蛋白胨,从生产成本等方面来考虑,选择蛋白胨作为氮源。

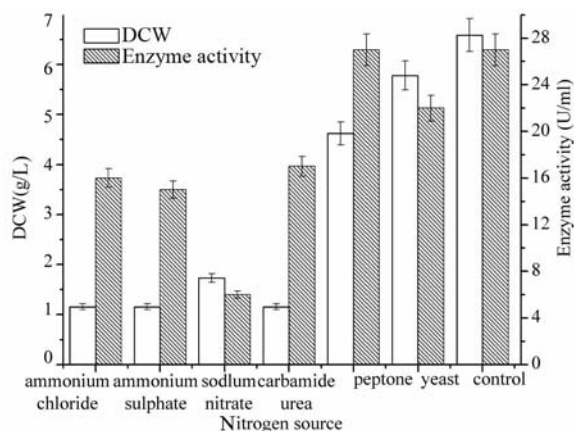


图2 不同氮源对菌体生长和产酶的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen source on *E. coli* growth and cutinase-CBM production

2.1.3 金属离子对角质酶-CBM 产量和菌体生长的影响 金属离子是维持细胞生长和酶活性构象的必要因素。实验室前期研究发现角质酶不是一种金属酶,金属离子的作用在于刺激菌体产生更多酶,对酶本身没有作用。为了确定对菌体生长和产酶最佳的金属离子,在发酵培养基中添加不同金属离子,结果如图3所示,不同金属离子对菌体生长和产酶的影响差异显著,锰离子(Mn^{2+})明显抑制了菌体生长和产酶,相反,镁离子(Mg^{2+})很大程度上促进了生长和产酶(48 U/ml),

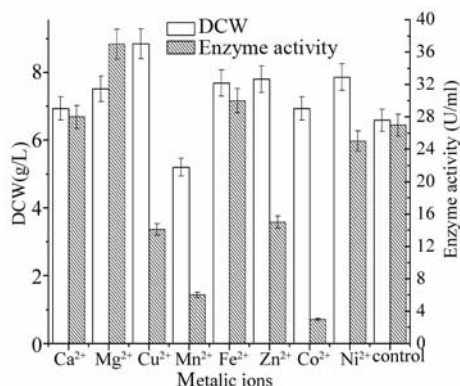


图3 不同金属离子对菌体生长和角质酶-CBM 产量的影响

Fig. 3 Effects of different metallic ions on *E. coli* growth and cutinase-CBM production

相比对照组提高了三分之一。镁离子提高菌体产酶能力的原因可能为其作为微生物代谢过程中许多酶的激活剂,与细胞产物合成的动力学有关。

2.1.4 甘氨酸添加时间对角质酶-CBM 产量和菌体生长的影响 细胞膜的流动性和透性是影响重组蛋白跨膜运输的重要因素。甘氨酸在促进重组大肠杆菌胞外分泌方面已经有很多报道^[13]。而这种促进作用的机理被认为是破坏了细胞壁结构的完整性,增大了外膜透性,有利于蛋白的胞外分泌。首先,通过单因素试验确定甘氨酸不同添加时间对菌体生长和产酶的影响。结果如图4所示,发酵12h菌体进入对数生长期时添加终浓度为0.35 g/L的甘氨酸,可获得较高的目的蛋白产量。

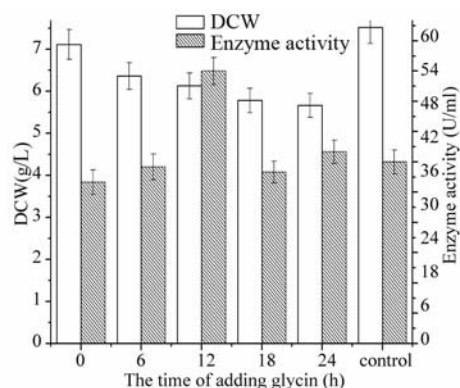


图4 甘氨酸添加时间对角质酶-CBM 产量和菌体生长的影响

Fig. 4 Effects of the time of adding glycine on *E. coli* growth and cutinase-CBM production

2.1.5 正交设计优化发酵培养基 以上述单因素试验为基础进行正交设计。磷酸盐浓度按照 $K_2HPO_4 : KH_2PO_4 = 7:1$ 进行优化。因素水平见表1,实验结果见表2。

根据以上实验结果,得到最优培养基为:甘油 5 g/L,工业级蛋白胨 16 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5 mmol/L, K_2HPO_4 13.7 g/L, KH_2PO_4 1.53 g/L,菌体生长至对数前中期时(发酵12h)添加终浓度为1 g/L乳糖和0.75 g/L甘氨酸。发酵48 h最终酶活为65 U/ml。优化前后,重组菌生长及产酶情况如图5所示。

2.2 热激实验对酶分泌的影响

基因工程菌发酵过程中,重组蛋白的不正确折叠,很容易形成包涵体(inclusion bodys)。Thomas等^[14]和Kusano等^[15]发现增加胞内渗透性物质及分子伴侣可

表 1 正交试验因素和水平
Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

Levels	Factors					
	Glycerol (g/L)	Peptone (g/L)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (mmol/L)	Phosphate (mmol/L)	Lactose (g/L)	Glycine (g/L)
1	2	8	2	90	1	0.3
2	5	12	2.5	110	2	0.75
3	8	16	3	130	3	1

表 2 正交试验结果与分析
Table 2 Analysis of the orthogonal experimental results

Numbers	Factors						
	Glycerol	Peptone	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Phosphate	Glycine	Lactose	Cutinase – CBM activity (U/ml)
1	1	1	1	1	1	1	35
2	1	2	2	2	2	2	45
3	1	3	3	3	3	3	50
4	2	1	1	2	2	3	65
5	2	2	2	3	3	1	60
6	2	3	3	1	1	2	59
7	3	1	2	1	3	2	50
8	3	2	3	2	1	3	10
9	3	3	1	3	2	1	60
10	1	1	3	3	2	2	45
11	1	2	1	1	3	3	53
12	1	3	2	2	1	1	40
13	2	1	2	3	1	3	44
14	2	2	3	1	2	1	35
15	2	3	1	2	3	2	51
16	3	1	3	2	3	1	61
17	3	2	1	3	1	2	20
18	3	3	2	1	2	3	55
K1	268	300	284	287	208	291	
K2	314	223	294	272	305	270	
K3	256	315	260	279	325	277	
k1	44.667	50.000	47.333	47.833	34.667	48.500	
k2	52.333	37.167	49.000	45.333	50.833	45.000	
k3	42.667	52.500	43.333	46.500	54.167	46.167	
R	9.666	15.333	5.667	2.500	19.500	3.500	
primary and secondary							
Glycine > Peptone > Glycerol > MgSO ₄ · 7H ₂ O > Lactose > Phosphate							
optimal level	Glycerol(2)	Peptone(3)	MgSO ₄ · 7H ₂ O(2)	Phosphate(1)	Glycine(3)	Lactose(1)	

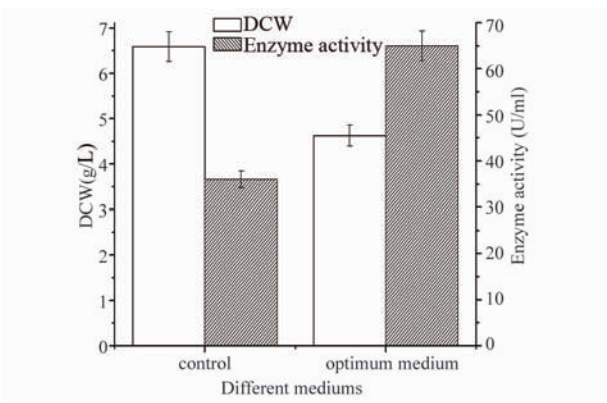


图 5 最优培养基与 TB 的对比
Fig. 5 comparison of the TB medium and the optimum medium

以减少包涵体的形成,从而促进重组蛋白的表达。具体的可以在高盐环境中培养细胞或者(和)热激作用(heat shock)来增加目的蛋白的可溶性表达^[16]。在前期培养基优化的基础上,首先考察热激作用对重组菌生长及产酶的影响。热激操作见表3,作用结果见图6。由图6可知,添加甘氨酸和乳糖,37℃热激1h和47℃热激0.5h后,转至25℃发酵,酶产量明显提高,分别达到76 U/ml和72 U/ml。进一步的SDS-PAGE电泳显示,由图7可知,37℃热激1h和47℃热激0.5h与热激作用前相比,包涵体的形成明显减少;由图8可知,发酵7h后包涵体的形成(line-4和line-6)同样比空白少。

表 3 热激实验			
Table 3 Heat shock experiments			
操作编号	热激温度	热激时间	热激后培养温度
1	37 ℃	0.5 h	30 ℃
2	37 ℃	0.5 h	25 ℃
3	37 ℃	1 h	30 ℃
4	37 ℃	1 h	25 ℃
5	47 ℃	0.5 h	30 ℃
6	47 ℃	0.5 h	25 ℃
7	47 ℃	1 h	30 ℃
8	47 ℃	1 h	25 ℃
Control - 1 (9)	不处理	-	30 ℃
Control - 2 (10)	不处理	-	25 ℃

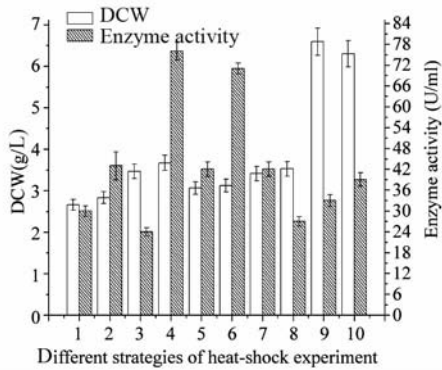


图 6 热激实验结果

Fig. 6 Results of heat-shock experiment

2.3 热激作用与渗透调节物质的协同作用

渗透调节物质 (osmolytes) 被认为在稳定蛋白质形态及促进蛋白正确折叠方面起到作用^[17-21]。此类物质可以有细胞自身合成 (渗透胁迫或者热激作用) 或者外界摄取。通过在培养基中添加渗透调节物质可以促进某些蛋白的水溶性^[22-24]。Diamant 等^[25]认为在高盐环境中进行热激作用,可以增大蛋白的溶解性。为此,考察了在培养基中添加渗透调节物质 (表 4) 进行热激对重组菌生长及产酶的影响。结果如图 9 所示,添加 75 mmol/L 的 L-脯氨酸后,菌体生长和产酶都得到了很好

表 4 不同的渗透调节物质及浓度						
Table 4 Different osmolytes and levels						
Osmolytes	Sorbierite	Mannite	Ethanol	L - proline	NaCL	Control
Concentration	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L	217 mmol/L	75 mmol/L	500 mmol/L	-

3 结论

研究优化了大肠杆菌 Tfu_0883-CBM/pET20b (+)/*E. coli* BL21 (DE3) 生产角质酶-CBM 的培养基,并考察了热激作用,转温发酵及渗透调节物质对产酶

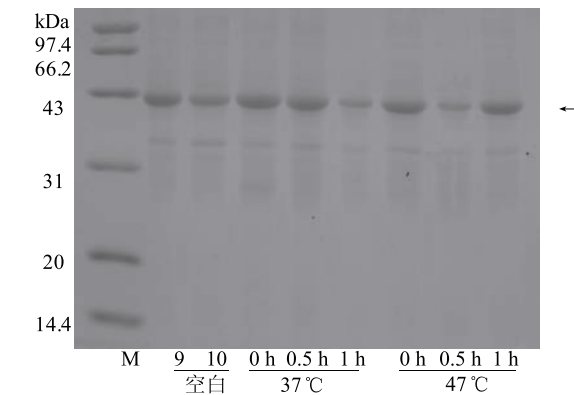


图 7 热激作用前后包涵体生成对比

Fig. 7 Comparison of inclusion bodys information before and after heat-shock

M: The protein marker; 9, 10: The samples without heat-shock; 0h: The samples whose temperature has reached to the heat-shock temperature but prior to heat-shock; 0.5h, 1h: The samples after the heat-shock

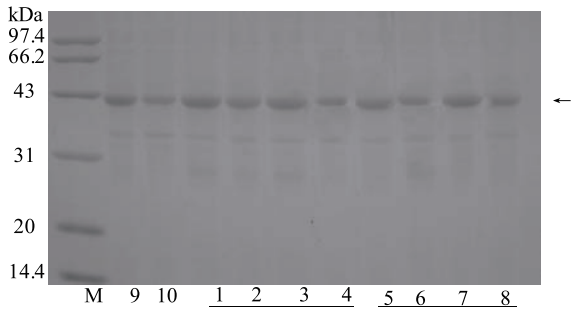


图 8 热激作用后发酵 7h 包涵体生成对比

Fig. 8 Comparison of inclusion bodys information after fermentation for 7 hours after heat-shock

M: The protein marker; 1 ~ 10: Showed in Table 3

的促进作用,生长方面可能是 L-脯氨酸起到了补偿氨基酸的作用,对产酶的影响可能是 L-脯氨酸增大了目的蛋白的可溶性同时改善了膜透性。

的影响。结论为:最优发酵培养基:甘油 5 g/L,工业级蛋白胨 16 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 2.5 mmol/L, K₂HPO₄ 13.7 g/L, KH₂PO₄ 1.53 g/L,待菌体生长至对数前中期时添加终浓度为 1 g/L 乳糖 和 0.75 g/L 甘氨酸,发酵 48 h 最终酶活为 65 U/ml。37℃热激 1 h 或 47℃热激

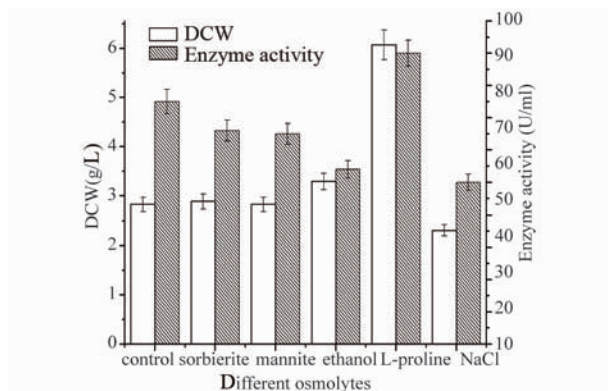


图9 渗透调节物质及热激作用对重组菌生长和产酶的影响

Fig. 9 Effects of osmolytes and hot-shock on *E. coli* growth and cutinase-CBM production

0.5 h,然后转至 25℃ 发酵至 48 h 产酶量达 76 U/ml 和 72 U/ml。在以上基础上,在最优培养基中添加终浓度为 75 mmol/L 的 L-脯氨酸,再进行热激,发酵 48h 最高酶产量可达 90 U/ml,较 TB 恒温发酵提高了近四倍。

参考文献

- [1] Araujo R, Casal M, Cavaco-Paulo A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatal Biotransfor*, 2008, 26(5):332-349.
- [2] Sae-be P, Sangwatanaroj U, Punnapayak H. Analysis of the products from enzymatic scouring of cotton. *Biotechnol J*, 2007, 2(3):316-325.
- [3] Tomme P, Boraston A, McLean B, et al. Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 715(1):283-296.
- [4] Zhang Y, Chen S, Xu M, et al. Characterization of *Thermobifida fusca* Cutinase Carbohydrate-Binding-Module Fusion Proteins and Their Potential Application in Bioscouring. *Appl. Environ. Microbiol*, 2010, 76(20):6870-6876.
- [5] Linder M, Winiacka-Krusnell J, Linder E. Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl. Environ. Microbiol*, 2002, 68(5):2503-2508.
- [6] Sakka K, Takada G, Karita S, et al. Identification and characterization of cellulose-binding domains in xylanase A of *Clostridium stercorarium*. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 782:241-251.
- [7] Ciolacu D, Kovac J, Kokol V. The effect of the cellulose-binding domain from *Clostridium cellulovorans* on the supramolecular structure of cellulose fibers. *Carbohydr Res*, 2010, 345(5):621-630.
- [8] Black G W, Rixon J E, Clarke J H, et al. Cellulose-binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *J Biotechnol*, 1997, 57(1-3):59-69.
- [9] Gilkes N R, Henrissat B, Kilburn D G, et al. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev*, 1991, 55(2):303-315.
- [10] Quentin M, Ebbelaar M, Derksen J, et al. Description of a cellulose-binding domain and a linker sequence from *Aspergillus* fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2002, 58(2):658-662.
- [11] Egmond M R, De V. *Fusarium solani* pisi cutinase. *Biochimie*, 2000, 82(11):1015-1021.
- [12] Martinez C, De Geus P, Lauwereys M, et al. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 1992, 356:615-618.
- [13] Li Z F, Li B, Liu Z G, et al. Calcium Leads to Further Increase in Glycine-Enhanced Extracellular Secretion of Recombinant α -Cyclodextrin Glycosyltransferase in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(14):6231-6237.
- [14] Thomas J G, Baneyx F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *J Biol Chem*, 1996, 271(19):11141-11147.
- [15] Kusano K, Waterman M R, Sakaguchi M, et al. Protein synthesis inhibitors and ethanol selectively enhance heterologous expression of P450s and related proteins in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 367(1):129-136.
- [16] Oganessian N, Ankoudinova I, Kim S H, et al. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52(2):280-285.
- [17] Samuel D, Kumar T K, Ganesh G, et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci*, 2000, 9(2):344-352.
- [18] Yang D S, Yip C M, Huang T H J, et al. Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem*, 1999, 274:32970-32974.
- [19] Voziyan P A, Fisher M T. Chaperonin-assisted folding of glutamine synthetase under nonpermissive conditions: oV-pathway aggregation propensity does not determine the co-chaperonin requirement. *Protein Sci*, 2000, 9(12):2405-2412.
- [20] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, 1998, 170(5):319-330.
- [21] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, 92:351-366.
- [22] Blakwell J R, Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS*,

- 1991, 295(1-3): 10-12.
- [23] Schlicke M, Brakmann S. Expression and purification of histidinetagged bacteriophage T7 DNA polymerase. *Protein Expr Purif*, 2005, 39:247-253.
- [24] de Marco A, Vigh L, Diamant S, et al. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones, *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10(4):329-339.
- [25] Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D, et al. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem*, 2001, 276(2001):39586-39591.

Fermentation Optimization on Flask-scale and Secretional Expression of Recombinant Cutinase-CBM in *E. coli*

GUO Sen^{1,2} WU Dan^{1,2} CHEN Sheng^{1,2} WU Jing^{1,2} CHEN Jian^{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 2141221, China)

Abstract On the basis of TB fermentation medium, an optimized fermentation strategy of cutinase-CBM by *E. coli* was developed through single factor analyzing and orthogonal design, which can be illustrated as follows: glycerol 5g/L, peptone 16 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mmol/L, K_2HPO_4 13.7 g/L, KH_2PO_4 1.53 g/L, 1 g/L lactose and 0.75 g/L glycine (final concentration) were added in the prometaphase of logarithmic phase of growth curve, and the fermentation period lasted 48h under 30°C. An extracellular enzyme activity of 63 U/ml was reached, about 3 times that of the control (20 U/ml). Further efforts were made to investigate the influence of other factors, such as heat-shock, osmotic agent, and temperature, on the secretional expression of cutinase-CBM. It is found that with the addition of 75 mmol/L L-proline, heat shocked for 1h at 37°C or 0.5h at 47°C, then shifted to 25°C, the final extracellular production of cutinase-CBM can reach 90U/ml, 4 times that of the control cultivated at constant temperature.

Key words Cutinase-CBM Orthogonal design Heat-shock Osmotic agent Temperature-shifted fermentation