

木聚糖酶重组毕赤酵母合成培养基的 Plackett – Burman 法优化

朱新术¹, 赵文慧^{2,*}, 张晓蕾², 林 波², 刘 超¹, 张 苗¹, 陈 菲¹

(1. 江苏护理职业学院医学技术学院, 江苏淮安 223005;

2. 江苏护理职业学院医学基础部, 江苏淮安 223005)

摘 要:目的: 筛选合成培养基中影响重组毕赤酵母高效表达木聚糖酶的关键成分。方法: 首先通过单因素实验和 t 检验筛选重组毕赤酵母表达木聚糖酶的最佳初始诱导培养基, 其次利用 Plackett–Burman 设计及逐步回归建立培养基成分和响应值间的多元线性回归模型, 并筛选出关键培养基成分, 最后利用相关系数分析, 对非关键成分含量的选取做出合理的取舍。结果: 筛选出甘油磷酸钠、硫酸钙、PTM1 和硫酸铵是影响重组酵母表达木聚糖酶的关键培养基成分, 且当培养基组合为甘油磷酸钠 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, K_2SO_4 20.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g/L, PTM1 8.0 mL/L, 甲醇 10.0 mL/L, 吐温 80 2.0 g/L 时, 木聚糖酶的酶活力和比酶活分别达到 2298.4 U/mL 和 9926.3 U/mg, 分别是优化前的 3.055 倍和 3.889 倍。结论: Plackett–Burman 设计不仅可以显著提升培养基优化目标, 还能筛选出关键培养基成分, 从而为进一步优化奠定了基础。

关键词: 重组毕赤酵母, 木聚糖酶, 诱导合成培养基, Plackett–Burman 设计

Optimization of Synthetic Induced Medium for Xylanase Expression in Recombinant *Pichia Pastoris* by Using Plackett–Burman Design

ZHU Xin-shu¹, ZHAO Wen-hui^{2,*}, ZHANG Xiao-lei², LIN Bo², LIU Chao¹, ZHANG Miao¹, CHEN Fei¹

(1. College of Medical Technology, Jiangsu College of Nursing, Huai'an 223005, China;

2. Department of Basic Medicine, Jiangsu College of nursing, Huai'an 223005, China)

Abstract: Objectives: The aim of this study was to screen the key components in synthetic medium that affect the efficient expression of xylanase in recombinant *Pichia pastoris*. Methods: Firstly, the best original defined medium was selected by employing single factor method and t-test. Secondly, the key components were screened via establishing the multivariate linear regression models between medium components and responses with Plackett–Burman design and stepwise regression. Finally, the concentration of non – critical medium components were determined with correlation coefficient analysis. Results: Glycerophosphate, calcium sulfate, PTM1 and ammonium sulphate were screened as key components. Furthermore, it was found that the enzyme activity and specific enzyme activity of xylanase reached maximum values of 2298.4 U/mL and 9926.3 U/mg in Plackett–Burman design, respectively (i.e. when glycerophosphate 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, K_2SO_4 20.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g/L, PTM1 8.0 mL/L, Methanol 10.0 mL/L, Tween 80 2.0 g/L), which were 3.055 and 3.889 times as many as before optimization, respectively. Conclusion: Plackett – Burman design not only significantly enhance the optimization objectives, but also screen the key components, and thus lay the foundation for further optimization.

Key words: recombinant *Pichia pastoris*; xylanase; synthetic induced medium; Plackett–Burman design

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002–0306(2020)07–0109–06

doi:10.13386/j.issn1002–0306.2020.07.019

引文格式: 朱新术, 赵文慧, 张晓蕾, 等. 木聚糖酶重组毕赤酵母合成培养基的 Plackett–Burman 法优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 109–114.

木聚糖酶是一类能够特异降解木聚糖的酶类, 在造纸、动物饲料、废水处理和食品工业等领域都有重要应用^[1–3]。在食品工业领域, 主要用于改善面包

品质、澄清果汁、液化蔬果。酶解产物木寡糖还能以益生元的形式作为食品添加剂使用^[3], 例如添加木聚糖酶酶解黑小麦不溶性膳食纤维的酶解产物, 可对

收稿日期: 2019–05–16

作者简介: 朱新术 (1980–), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物发酵工艺优化与代谢组学, E-mail: xinshu0518@163.com。

* 通讯作者: 赵文慧 (1980–), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 神经损伤与保护, E-mail: wenhui8088@gmail.com。

基金项目: 江苏护理职业学院高层次人才科研启动基金 (SHKYQD2018003); 淮安市科技局自然科学研究计划 (HAB201844)。

谷物挤压膨化产品品质提升具有较好的改善作用^[4]。

木聚糖酶已在毕赤酵母 GS115 中实现高效表达^[5-6],但是其常用的 BMGY 和 BMMY 等复合培养基含有昂贵的酵母粉和蛋白胨,成分复杂且不明确,目标蛋白纯化困难,不利于产业类似化生产^[6]。当前重组毕赤酵母最常用的合成培养基是基础盐培养基 BSM。FM22 是在 BSM 基础上改进后的另一种常用合成培养基,具有氮源丰富、适应性强^[7]、缩短发酵延迟期和发酵时间等优点^[8]。当 pH 高于 5.5 时,BSM 和 FM22 培养基就会出现乳白色浑浊,特别是添加微量元素溶液 PTM1/PTM4^[7-8]时,沉淀增加明显,原因是形成了不溶性的铜、钴、亚铁、锌等磷酸盐,而大部分毕赤酵母重组蛋白的发酵过程中 pH 在 5.5 和 7.0 之间变化^[9]。发酵过程大量生成金属盐类沉淀会严重阻碍细胞生长及增加下游蛋白分离纯化的难度^[9-11]。Zhang 等研究表明,甘油磷酸钠可以代替 BSM 和 FM22 培养基中的磷酸/磷酸盐,作为高效的磷源用于较高 pH 情况下细胞的生长和外源蛋白的表达(新型培养基命名为 FMG)^[11-13]。

本文首先通过单因素实验与 t 检验^[14]分析重组毕赤酵母在多种培养基中的生物量、酶活力与比酶活,并确定 FMG 为最适初始培养基。然后通过 Plackett-Burman 试验^[14-15]和逐步回归^[16-17],筛选出影响重组毕赤酵母表达木聚糖酶酶活力诱导培养基的关键培养基成分,并利用皮尔逊相关性分析^[18],对非关键培养基成分高低浓度做出合理取舍,从而为进一步的优化分析提供实践基础与理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

pET-28a-xynZF-2 重组载体 由新乡医学院微生物实验室馈赠;毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、GS115、pPIC9K 表达质粒 购自 Invitrogen 公司;桦木木聚糖

(Birch wood xylan) 分析纯, Sigma 公司;酵母粉 分析纯,英国 OXOID 公司;蛋白胨 分析纯,美国 BD 公司;甘油磷酸钠 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;甘油和甲醇 均为分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司;其他试剂 均为市售国产或进口分析纯级。

HZQ-F160A 恒温振荡器 上海一恒科学仪器有限公司;DC-0506 低温恒温槽 上海比朗仪器有限公司;Neofuge 23R 高速离心机 上海力申科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 YPD 种子培养基:酵母粉 10.0 g/L,蛋白胨 20.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,琼脂 20.0 g/L。摇瓶生长培养基和诱导培养基:见表 1 所示。其中 PTM1 微量元素溶液配方^[8]:CuSO₄·5H₂O 6.0 g, NaI 0.08 g, MnSO₄·H₂O 3.0 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g, H₃BO₃ 0.02 g, CoCl₂ 0.5 g, ZnCl₂ 20.0 g, FeSO₄·7H₂O 65.0 g, Biotin 0.2 g, H₂SO₄ 5.0 mL 和蒸馏水 1000 mL。PTM4 微量元素溶液配方^[5]:CuSO₄·5H₂O 2.0 g, NaI 0.08 g, MnSO₄·H₂O 3.0 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g, H₃BO₃ 0.02 g, CaSO₄·2H₂O 0.5 g, CoCl₂ 0.5 g, ZnCl₂ 7.0 g, FeSO₄·7H₂O 22.0 g, Biotin 0.2 g, H₂SO₄ 1.0 mL 和蒸馏水 1000 mL。

1.2.2 菌种活化培养 将-80℃冻存的表达木聚糖酶的毕赤酵母甘油管划线接种到 YPD 活化平板培养基^[6]中,30℃静置培养 3 d。

1.2.3 种子摇瓶培养 从菌种活化平板中挑取生长良好的单菌落接种到装有 25 mL YPD 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30℃、250 r/min 培养 20 h。

1.2.4 摇瓶生长发酵 将种子液按 4%(V/V)的接种量接入装有 25 mL 摇瓶生长培养基的 250 mL 三角瓶中,30℃、250 r/min 培养 24 h。

表 1 摇瓶生长和诱导合成培养基成分

Table 1 Components of flask shaking growth and induced medium

成分	BSM 生长 培养基	BSM 诱导 培养基	FM22 生长 培养基 I	FM22 诱导 培养基 I	FM22 生长 培养基 II	FM22 诱导 培养基 II	FM22 生长 培养基 III	FM22 诱导 培养基 III	FMG 生长 培养基	FMG 诱导 培养基
85% H ₃ PO ₄ (mL/L)	26.7	26.7	-	-	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (g/L)	-	-	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	-	-
甘油磷酸钠 (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12
CaSO ₄ ·2H ₂ O (g/L)	0.93	0.93	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K ₂ SO ₄ (g/L)	18.2	18.2	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	14.9	14.9	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7
KOH (g/L)	4.13	4.13	-	-	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	-	-	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
甘油 (g/L)	20.0	-	20.0	-	20.0	-	20.0	-	20.0	-
甲醇 (mL/L)	-	5.0	-	5.0	-	5.0	-	5.0	-	5.0
PTM1 (mL/L)	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-	5.0	5.0	5.0	5.0
PTM4 (mL/L)	-	-	-	-	5.0	5.0	-	-	-	-
吐温 80 (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	2.0
pH	5.5 ^a	5.5 ^a	5.5 ^b	5.5 ^b	5.5 ^b	5.5 ^b	5.5 ^b	5.5 ^b	7.0 ^b	7.0 ^b

注:a,用浓氨水(25%,V/V)调 pH;b,用 KOH 调 pH。

1.2.5 摇瓶诱导发酵 将摇瓶生长培养基培养 24 h 所得发酵液置于 50 mL 无菌离心管中, 室温, 5000 r/min 离心 5.0 min, 去上清, 菌体用 0.01 mmol/L pH6.0 的无菌 PBS 缓冲液洗涤三次并重悬, 然后接种到装有 25 mL 摇瓶诱导培养基的 250 mL 三角瓶中, 加入 0.22 μm 滤膜过滤的微量元素溶液, 每 24 h 按 0.5% (V/V) 的比例加入甲醇诱导培养, 30 ℃、250 r/min 培养 5 d, 并取样分析。

1.2.6 测试方法

1.2.6.1 生物量检测 细胞浓度 (OD₆₀₀): 发酵液经适当稀释后于波长 600 nm 可见光波长下测定吸光度^[10]。OD₆₀₀ = 600 nm 吸光度值 × n (n 为稀释倍数)。且 1 OD₆₀₀ = 0.371 g/LDCW (细胞干重)。

1.2.6.2 木聚糖酶酶活力测定 采用改进的 DNS 法^[19-20]测定木聚糖酶酶活力 (U/mL)。酶活力单位的定义: 在 45 ℃ 和 pH4.6 条件下, 以 0.5% 桦木木聚糖作为底物, 以每分钟产生 1 μmol 木糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.6.3 木聚糖酶比酶活分析 用 Bradford 法^[21-22]测定蛋白质浓度 (mg/mL), 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。木聚糖酶的比活用下式计算:

酶的比活性 (U/mg) = 酶活力 (U/mL) / 蛋白质质量 (mg/mL)

1.2.7 试验设计

1.2.7.1 最适初始诱导培养基的单因素筛选 单因素实验逐次比较重组毕赤酵母在 BSM 诱导培养基 (PTM1) 与 FM22 诱导培养基 I (PTM1)、FM22 诱导培养基 I (PTM1) 与 FM22 诱导培养基 II (PTM4)、FM22 诱导培养基 I (PTM1) 与 FM22 诱导培养基 III (PTM1 + 吐温 80) 以及 FM22 诱导培养基 III (PTM1 + 吐温 80) 与 FMG 诱导培养基 (PTM1 + 吐温 80) 培养基中生物量、木聚糖酶酶活力与比酶活, 并以酶活力为主要指标, 通过 t 检验等统计学方法筛选最适初始培养基。

1.2.7.2 Plackett-Burman 试验设计 在筛选出最适初始诱导培养基 FMG 诱导培养基 III (PTM1) + 吐温 80 的基础上, 利用 MATLAB v8.3 软件包统计学工具箱中的 hadamard 函数实施 N = 12 的 Plackett-Burman 实验设计, 即对 FMG 诱导培养基中的 7 个成分 (甘油磷酸钠、(NH₄)₂SO₄、CaSO₄·2H₂O、K₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、PTM1 和甲醇) 实施高和低二水平的实验研究, 其中高水平用“+1”表示, 低水平用“-1”表示, 水平设置状况依据是根据单因素实验结果。实验设计因素水平及编码见表 2 与表 3 (其中 D1-D4 列为空列, 用于估计误差), 评价指标为毕赤酵母生物量、木聚糖酶酶活力及其比酶活。

1.3 数据处理

所有配方均进行三个平行实验, 结果以均值 ± 标准误为准。筛选最适初始诱导培养基涉及的单因素 t-检验利用 MATLAB v8.3 软件包 ttest 函数实施; Plackett-Burman 实验中培养基成分和生物量、木聚糖酶酶活力及比酶活间的多元线性模型通过 MATLAB v8.3 软件包逐步回归函数 stepwise 实施;

表 2 Plackett Burman 试验设计因素水平及编码
Table 2 Factors and levels as well as codes of Plackett-Burman design

变量及代码	编码	真实值	编码水平		
			-1	0	1
A: 甘油磷酸钠 (g/L)	X1	x1	4	12	20
B: (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X2	x2	2	7	12
C: CaSO ₄ ·2H ₂ O (g/L)	X3	x3	0.4	1.2	2
D: K ₂ SO ₄ (g/L)	X4	x4	8	14	20
E: MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	X5	x5	6	11	16
F: PTM1 (mL/L)	X6	x6	1	4.5	8
G: 甲醇 (mL/L)	X7	x7	2	6	10

注: 编码值与真实值之间的换算关系: X1 = (x1-12)/8; X2 = (x2-7)/5; X3 = (x3-1.2)/0.8; X4 = (x4-14)/6; X5 = (x5-11)/5; X6 = (x6-4.5)/3.5; X7 = (x7-6)/4。

表 3 Plackett-Burman 试验设计 (n=3)
Table 3 Design of Plackett-Burman design (n=3)

实验号	A	B	C	D	E	F	G	D1	D2	D3	D4
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Plackett-Burman 实验中培养基成分与三个响应之间及三个响应之间的相关系数通过 MATLAB v8.3 软件包 corrcoef 函数实施。

2 结果与分析

2.1 最适初始培养基的单因素筛选

2.1.1 BSM 诱导培养基与 FM22 诱导培养基 I 培养效果对比分析 重组毕赤酵母在两种最常见合成培养基的木聚糖酶表达结果见图 1。FM22 培养基产酶效果好于 BSM 培养基, 表现在前者木聚糖酶酶活力和比酶活极显著高于后者 (P < 0.01), 而生物量在两种培养基中没有显著差异 (P > 0.05), 这可能与 FM22 培养基氮源丰富、适应性强^[6]、发酵延迟期短等性状有关, 所以后续实验使用 FM22 培养基。

2.1.2 FM22 诱导培养基 I (PTM1) 与 FM22 诱导培养基 II (PTM4) 培养效果对比分析 FM22 诱导培养基添加微量元素溶液 PTM1/PTM4 时木聚糖酶的表达结果见图 2。FM22 培养基添加 PTM1 微量元素的产酶效果好于添加 PTM4 的结果, 表现在前者的三种测定指标均优于后者 (P = 0.0367、0.0368 和 0.0318, 均 < 0.05)。PTM1 和 PTM4 包含 Fe²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Na⁺、Co⁺ 等金属离子及生物素等, 主要用于提供毕赤酵母生长和外源蛋白表达所需的各种微量元

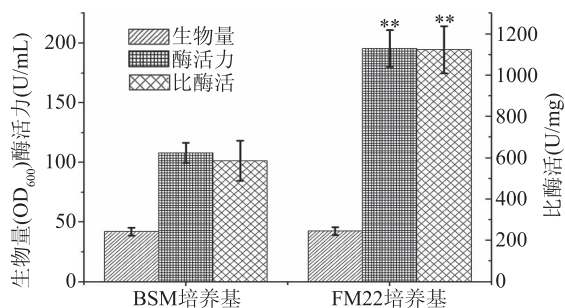


图1 BSM和FM22培养基对菌体生长和产木聚糖酶的影响

Fig.1 Effect of BSM and FM22 medium on cell growth and expression of xylanase

注: *表示差异显著($P < 0.05$);**表示差异极显著($P < 0.01$);

且均为两种培养基相同优化指标间的比较;图2~图4,同。

素^[23]。PTM1与PTM4的最大区别是前者 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 含量明显高于后者,这与文献报道这两种离子对BMMY培养基情况下木聚糖酶酶活力有激活作用相一致^[6],所以后续实验使用PTM1微量元素展开研究。

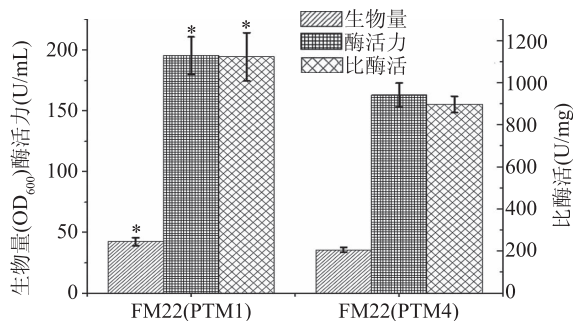


图2 微量元素溶液PTM1和PTM4

对菌体生长和产木聚糖酶的影响

Fig.2 Effect of PTM1 and PTM4

on cell growth and expression of xylanase

2.1.3 FM22诱导培养基I(PTM1)与FM22诱导培养基III(PTM1+吐温80)培养效果对比分析 FM22(PTM1)诱导培养基添加表面活性剂吐温80对木聚糖酶的表达见图3。FM22诱导培养基添加吐温80的木聚糖酶酶活力显著高于未添加($P = 0.0123 < 0.05$),但是生物量和比酶活没有显著差异($P > 0.05$),这应该与吐温80等表面活性剂能够改善细胞膜的通透性、提高酶的稳定性和催化能力有关联^[24-25]。所以在后续培养基中添加吐温80进行研究。

2.1.4 FM22诱导培养基III(PTM1+吐温80)与FMG诱导培养基(PTM1+吐温80)培养效果对比分析 FM22和FMG两种诱导培养基的主要差别是FMG利用甘油磷酸钠代替FM22中的 KH_2PO_4 ^[8](表1)。由图4可知,重组毕赤酵母在FMG诱导培养基中木聚糖酶酶活力和比酶活极显著高于FM22诱导培养基III(P 分别为 $3.81\text{e}-05$ 和 $5.952\text{e}-04$,均 < 0.01),且前者分别是后者的2.126倍和3.114倍,而生物量大小并没有显著差异($P > 0.05$)。这可能与FMG诱导培养基培养初始pH较高,及文献报道的大部分毕赤

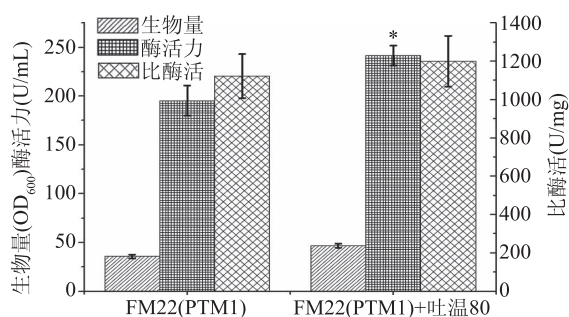


图3 吐温80对菌体生长和产木聚糖酶的影响

Fig.3 Effect of Tween 80 on cell growth and expression of xylanase

酵母重组蛋白的发酵过程中pH在5.5和7.0之间变化有直接关系^[11]。此外,也说明甘油磷酸钠可以作为更好的磷源及缓冲剂用于重组毕赤酵母表达木聚糖酶研究。

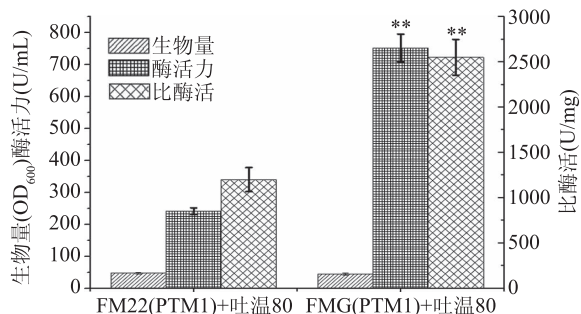


图4 FM22和FMG培养基对菌体生长和产木聚糖酶的影响

Fig.4 Effect of FM22 and FMG

on cell growth and expression of xylanase

经过以上单因素分析,最终筛选出生物量、酶活力和比酶活分别为43.9、(752.4 ± 43.4) U/mL和(2552.4 ± 197.2) U/mg的FMG诱导培养基作为培养基优化的最适初始诱导培养基。

2.2 Plackett-Burman 试验结果分析

Plackett-Burman设计实验结果见表4,可知酶活力与比酶活的最高值均由3号实验(其培养基配方为甘油磷酸钠20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, K_2SO_4 20 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g/L, PTM1 8.0 mL/L, 甲醇10 mL/L, 吐温80 2.0 g/L)获得,酶活力和酶比活分别为(2298.4 ± 77.8) U/mL和(9926.3 ± 312.2) U/mg,比优化前的(752.4 ± 43.4) U/mL和(2552.4 ± 197.2) U/mg(FMG诱导培养基),分别提高了2.055倍和2.889倍。

利用MATLAB v8.3软件包逐步回归函数stepwise建立培养基成分与生物量、木聚糖酶酶活力及比酶活的多元线性回归模型(表5)。

由表5知,所得三个回归模型均达到极显著($P < 0.01$),修正后的决定系数 R^2 分别为0.724、0.9727和0.9515。这表明木聚糖酶酶活力和比酶活的实验值和预测值之间具有较好的拟合度,95%以上的实验数据变异均可通过回归模型来解释。而回归方程系数的显著性检验表明,这两种响应值均包含多个显著因子,其中相同的极显著因子为甘油磷酸钠(A)、硫酸铵(B)、二水硫酸钙(C)和PTM1(F)

表5 逐步回归模型分析
Table 5 Analysis of the stepwise regressions

模型项	生物量			酶活力			比酶活		
	回归系数	t 值	P 值	回归系数	t 值	P 值	回归系数	t 值	P 值
截距	32.95			1067.85			5516.57		
A	1.504	1.715	0.125	675.77	15.016	<0.001 **	3177.92	12.914	<0.001 **
B	-0.724	-0.80	0.449	-373.52	-8.04	<0.001 **	-1392.87	-5.662	0.0024 **
C	-0.099	-0.11	0.92	298.57	6.634	0.0012 **	1380.18	5.61	0.0025 **
D	0.309	0.330	0.751	49.16	1.074	0.343	-49.068	-0.177	0.8684
E	0.506	0.548	0.601	3.48	0.067	0.95	-309.942	-1.336	0.2524
F	-1.156	-1.38	0.209	-300.14	-6.46	0.0013 **	-1343.57	-5.461	0.0028 **
G	4.237	4.834	0.0013 **	18.85	0.347	0.746	-676.904	-2.751	0.0402 *
R ²		0.779			0.9848			0.9757	
修正的 R ²		0.724			0.9727			0.9515	
F		14.12			81.23			40.21	
方程 P 值		0.00237 **			<0.001 **			<0.001 **	

注:回归系数为直接利用“+1”和“-1”代码回归所得结果;模型项代码 A-G 的对应表 2 相应的培养基成分; * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

表4 Plackett-Burman 设计实验结果
Table 4 Result of Plackett-Burman design

实验号	生物量 (OD ₆₀₀)	酶活力 (U/mL)	比酶活 (U/mg)
1	29.2 ± 1.2	741.3 ± 53.5	5027.7 ± 392.8
2	34.7 ± 2.6	53.8 ± 15.5	196.7 ± 21.0
3	41.1 ± 1.7	2298.4 ± 77.8	9926.3 ± 312.2
4	37.0 ± 3.6	122.87 ± 19.3	385.6 ± 25.0
5	26.3 ± 1.5	658.7 ± 18.2	4119.1 ± 344.5
6	32.1 ± 2.0	77.7 ± 8.4	286.4 ± 35.9
7	42.9 ± 2.5	2130.4 ± 126.8	8332.8 ± 3616
8	28.0 ± 0.3	776.4 ± 52.9	5481.9 ± 383.9
9	35.2 ± 1.2	1799.4 ± 32.0	9910.3 ± 813.9
10	29.6 ± 2.2	672.4 ± 29.4	3740.1 ± 176.5
11	29.9 ± 3.0	787.9 ± 63.6	6626.0 ± 319.3
12	28.9 ± 1.3	577.2 ± 50.6	5304.1 ± 644.9

($P < 0.01$), 且由其回归系数的符号, 进一步优化需要在高水平(+1)的基础上提高甘油磷酸钠和硫酸钙的浓度, 在低水平(-1)的基础上降低硫酸铵和 PTM1 的含量, 这与文献报道相一致^[7]。甲醇作为诱导培养阶段的诱导剂和重要碳源及能量来源, 对于比酶活有显著作用($P < 0.05$)。但生物量的修正回归系数则偏低, 仅为 0.724, 这与其回归模型显著性系数偏少相关联, 也与前述筛选最适初始诱导培养基的单因素优化分析中生物量的差异总是不显著有关。综上所述, 通过 Plackett-Burman 设计筛选的显著因子作为进一步实验的优化目标。

利用 MATLAB 软件包的 corrcoef 函数分析培养基成分与响应及响应之间的相关系数 r, 结果如表 6 所示。可知相关系数的正负号大致与表 5 中回归方程系数的正负号相同, 仅酶活力与 K₂SO₄ (D) 和 MgSO₄·7H₂O (E) 的正负号相反, 但这两种成分对酶活力影响均不显著($P > 0.05$)。综合考虑后, 后续实验将把它们的水平设置为中间值。此外, 对于生物

量来说, 仅甘油 (G) 和甘油磷酸钠 (A) 的相关系数绝对值较大 (分别为 0.838 和 0.291), 而表 5 中仅有甘油 (G) 通过显著性检验 ($P < 0.01$)。并且生物量与酶活力和比酶活的相关系数都很高, 分别为 0.597 和 0.309, 所以后续实验甲醇含量处于高水平 (即 10 mL/L) 有利于提高木聚糖酶的酶活力和比酶活。

表6 Plackett-burman 设计相关系数表
Table 6 Correlation coefficients table
of Plackett-Burman design

r	生物量	酶活力	比酶活
A	0.291	0.719	0.788
B	-0.122	-0.267	-0.248
C	-0.022	0.208	0.244
D	0.049	-0.146	-0.185
E	0.084	-0.193	-0.251
F	-0.197	-0.167	-0.233
G	0.838	0.256	-0.032
生物量	1	0.597	0.309
酶活力	0.597	1	0.924
比酶活	0.309	0.924	1

3 结论

本文通过单因素分析、Plackett-Burman 实验设计、基于逐步回归的多元线性模型和相关系数分析, 初步优化了重组毕赤酵母表达木聚糖酶的诱导合成培养基。通过单因素实验发现甘油磷酸钠、硫酸铵、硫酸钙和 PTM1 是影响木聚糖酶表达的关键培养基成分其中甘油磷酸钠是比 KH₂PO₄ 更适于作为重组毕赤酵母表达木聚糖酶的磷源, 并得到 FMG 诱导培养基是最佳初始诱导合成培养基; 通过 Plackett-Burman 实验得到诱导合成培养基的最佳配方为甘油磷酸钠 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, CaSO₄·2H₂O 2.0 g/L, K₂SO₄ 20.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 6.0 g/L, PTM1 8.0 mL/L, 甲醇 10.0 mL/L, 吐温 80 2.0 g/L。在此条

件下木聚糖酶的酶活力和比酶活有了大幅度的提高,分别达到 (2298.4 ± 77.8) U/mL 和 (9926.3 ± 312.2) U/mg。通过相关系数分析可以对非显著成分的浓度取值做出合理取舍。该研究为进一步优化发酵培养基成分提供了重要的理论依据与实践基础。

参考文献

- [1] Thomas L, Joseph A, Gottumukkala L D. Xylanase and cellulase systems of *clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement[J]. Bioresource Technology, 2014, 158(31): 343–350.
- [2] Walia A, Guleria S, Mehta P, et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: A review[J]. 3 Biotech, 2017, 7(1): 1–11.
- [3] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(3–4): 326–338.
- [4] 孙元琳, 仪鑫, 李云龙, 等. 黑小麦不溶性膳食纤维酶解产物组成分析及其对全谷物挤压膨化产品品质的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 14–18.
- [5] 付冠华, 刘振华, 王丹丹, 等. 黑曲霉木聚糖酶 XynZF-2 基因克隆、表达及酶学性质分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(11): 78–82.
- [6] 王丹丹, 周晨妍, 李同彪, 等. 黑曲霉 XZ-3S 木聚糖酶基因 xynZF-2 在毕赤酵母中的高效表达[J]. 食品工业科技, 2015, 36(7): 200–204.
- [7] 陈明祥, 谢万勇, 廖锡豪, 等. 表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母 FM22 发酵培养基响应面优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(10): 52–56.
- [8] Charoenrat T, Khumruangsri N, Promdonkoy P, et al. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(2): 193–198.
- [9] Ghosalkar A, Sahai V, Srivastava A. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16): 7906–7910.
- [10] Tavasoli T, Arjmand S, Siadat S O R, et al. Enhancement of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris* by designing and optimizing medium using elemental analysis[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2017, 15(4): 224–231.
- [11] Zhang W H, Sinha J, Meagher M M. Glycerophosphate as a phosphorus source in a defined medium *Pichia pastoris* fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(1): 139–144.
- [12] Huang J J, Yang Z, Guan F F, et al. A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its

application for food emulsifier preparation[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(12): 1899–1904.

[13] Rodrigues D, Pillaca-Pullo O, Karin Torres-Obreque K M, et al. Fed-batch production of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase II by recombinant *Pichia pastoris* MUT^s strain[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7(2): article 16.

[14] Brzozowski B, Lewandowska M. Prolyl endopeptidase – optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2014, 17(5): 204–210.

[15] Anand Prabhu A A, Mandal B, Dasu V V. Medium optimization for high yield production of extracellular human interferon- γ from *Pichia pastoris*: A statistical optimization and neural network-based approach[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2017, 34(4): 1109–1121.

[16] 谢中华. MATLAB 统计分析与应用: 40 个案例分析(第 2 版)[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2015.

[17] 刘楠, 刘迪. 数码比色法测定二氧化硫浓度的多元非线性回归模型[J]. 甘肃科学学报, 2018, 30(2): 40–44.

[18] Bayly P V, Wilson K S. Analysis of unstable modes distinguishes mathematical models of flagellar motion[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2015, 12(106): 20150124.

[19] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. Journal of Biotechnology, 1992, 23(3): 257–270.

[20] Yang Z L, Zhang Z S. Codon-optimized expression and characterization of a pH stable fungal xylanase in *Pichia pastoris* [J]. Process Biochemistry, 2017, 53(2): 80–87.

[21] Wang S Y, Hu W, Lin X Y, et al. A novel cold-active xylanase from the cellulolytic myxobacterium *Sorangium cellulosum* So9733-1: gene cloning, expression, and enzymatic characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1503–1512.

[22] 周燕燕, 刘新利, 陈静, 等. 黑曲霉 h408 阿魏酸酯酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2014, 54(8): 876–881.

[23] Wanderley M S O, Oliveira C, Bruneska D, et al. Influence of trace elements supplementation on the production of recombinant frutalin by *Pichia pastoris* KM71H in fed-batch process[J]. Chemical Papers, 2013, 67(7): 682–687.

[24] 刘明启, 孙建义, 翁晓燕, 等. 重组毕赤酵母产木聚糖酶条件的优化[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(2): 222–226.

[25] Apte-Deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, et al. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Potential applications for other proteins[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2011, 54(4): 197–205.

权威 · 高效 · 核心 · 领先 · 精湛 · 实用