

· 论 著 ·

Plackett-Burman 设计与响应面法优化毕赤酵母产重组 抗菌肽 LL-37 发酵培养基^{*}

杨 浩^{1,2}, 胡 华^{1,2}, 罗鹏程^{1,2}, 付靖瑜^{1,2}, 汪宏良^{1,2△}

(1. 湖北省黄石市中心医院/湖北理工学院附属医院医学检验科 435000;

2. 肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北黄石 435000)

摘 要:目的 通过优化毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 的培养基组成, 以最大程度提高重组蛋白产率。方法 采用 Plackett-Burman 设计法对培养基中相关影响因素的效应进行评价; 然后进行最陡爬坡实验逼近最佳响应面(RSM)区域; 最后通过中心组合设计 RSM 实验建立二次回归模型以确定最佳培养基配方。结果 经优化后的培养基发酵产重组蛋白水平相较于初始培养基提高了约 22%。结论 Plackett-Burman 设计和 RSM 可以很好地对毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 的发酵培养基进行优化。

关键词: 抗菌肽 LL-37; Plackett-Burman 设计; 响应面法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)19-2703-03

Optimization of fermentation medium for recombinant antibacterial peptide LL-37 from *Pichia pastoris* by Plackett-Burman design and response surface methodology^{*}

YANG Hao^{1,2}, HU Hua^{1,2}, LUO Pengcheng^{1,2}, FU Jingyu^{1,2}, WANG Hongliang^{1,2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Huangshi Central Hospital/the Affiliated Hospital of Hubei

Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435000, China; 2. Hubei Key Laboratory of

Kidney Disease Pathogenesis and Intervention, Huangshi, Hubei 435000, China)

Abstract: Objective Fermentation medium for recombinant antibacterial peptide LL-37 in *Pichia pastoris* was optimized to improve the yield of recombinant protein. **Methods** Plackett-Burman design was used to evaluate the factor of culture medium, then the steepest ascent experiment to approach the optimal response region of this factors. Finally, response surface experiments of central composite design was applied to establish the quadratic regression model to determine the formula for culture medium. **Results** After optimization, the content of recombinant protein was increased about 22% compared with the original medium. **Conclusion** It is very effective for optimization of fermentation medium for recombinant antibacterial peptide LL-37 from *pichia pastoris* by Plackett-Burman design and response surface methodology.

Key words: antibacterial peptide LL-37; Plackett-Burman design; response surface methodology

抗菌肽是天然免疫系统的重要效应分子^[1], 抗菌肽 LL-37 是存在于人体的阳离子抗菌肽, 具有抗菌, 结合内毒素, 促进创伤修复, 诱导血管生成, 以及抑制肿瘤细胞生长等生物学功能, 因而, 对其开发利用越来越受到人们的重视。毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 是通过对人源抗菌肽 LL-37 基因优化设计后得到的具有潜在抗菌活性的物质, 该分子经诱导后可稳定表达^[2]。基于已有的发酵条件资料, 采用 Plackett-Burman 设计和响应面(RSM)法对毕赤酵母发酵产重组抗菌肽 LL-37 的发酵培养基进行优化^[3-4], 以期通过合理的实验设计, 达到提高重组蛋白产率和降低发酵成本的目的。

1 材料与方法

1.1 菌种来源 重组抗菌肽 LL-37 表达毕赤酵母株: pPIC-ZoA-LL37 revised/GS115。

1.2 初始发酵培养基 葡萄糖 12 g/L, 硫酸铵 8 g/L, 无氨基酸酵母氮源 5 g/L, 硫酸镁 1 g/L, 乙二胺四乙酸(EDTA) 1 g/L, 磷酸盐缓冲液(KH₂PO₄ 2.4 g/L, K₂HPO₄ 12.5 g/L 溶于 100 mL 水中)6 mL/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钙 0.5 g/L, 微量元素(H₃BO₃ 2.85 g, MnSO₄ · H₂O 0.55 g, FeSO₄ · 7H₂O 1.362 g, 酒石酸钾钠 1.77 g, CuCl₂ · 2H₂O 0.026 5 g,

ZnSO₄ · 7H₂O 0.044 g, CoCl₂ · 6H₂O 0.040 5 g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.025 g), 0.02% 生物素、3% 甲醇。

1.3 方法

1.3.1 培养方法 原始菌液与发酵培养基体积比为 1:25, 接种后 30 ℃ 旋转培养, 转速为 200 r/min, 培养时间为 24 h。

1.3.2 提取表达蛋白 将培养后的菌液经超声处理, 裂解细胞, 离心后洗涤、溶解, 保存在 4 ℃ 冰箱中待用。

1.3.3 检测方法 采用高效液相色谱法(HPLC)分析, 对重组蛋白水平进行定量, 液相系统采用日本岛津 LC-10A, 蛋白提取物通过 Hydrosphere C 18 分析柱(4.6 mm×250.0 mm)进行分析, 流动相为 0.1% 磷酸: 乙腈=32:68(体积比), 流速为 0.2 mL/min, 紫外检测波长 225 nm, 柱温为 25 ℃。

1.3.4 Plackett-Burman 设计实验 根据毕赤酵母生长所需条件, 结合培养基成分选择的单因素实验结果, 本研究的实验因素确定了 9 个影响重组蛋白产率的培养基成分, 选用 $n=12$ 的 Plackett-Burman 设计表^[5]。实验设计和数据分析皆采用 Minitab 软件, 评价指标(响应值)为重组蛋白水平(g/L)。

1.3.5 最陡爬坡实验 通过 Plackett-Burman 设计实验, 得到影响重组蛋白产率的重要因素, 以此为基础, 设计培养基组分,

^{*} 基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2015CFB627); 黄石市科技计划项目(2013A077-4)。

作者简介: 杨浩, 男, 主管技师, 主要从事抗菌肽作用机制及其在临床诊疗中的应用研究。△ 通讯作者, E-mail: jy69970@163.com。

安排实验分组,做最陡爬坡实验。

1.3.6 中心组合优化培养基 以最陡爬坡实验的结果为基础,应用 Box-Behnken 的中心组合实验(CCD),确定实验水平的中心点和步长,通过实验数据得到影响因素与响应值之间的函数关系。实验设计和数据分析皆采用 Minitab 软件进行,评价指标(响应值)为重组蛋白水平(g/L)。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件和 Minitab16 软件对数据进行统计分析,计量资料采用两独立样本 *t* 检验进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Plackett-Burman 实验设计处理及相应值 结合毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 培养基成分选择的单因素实验,设计实验因素和水平,培养后得重组蛋白量,见表 1。实验结果分析见表 2,葡萄糖、硫酸铵、蛋白胨、微量元素这 4 个因素的可信度都在 90%以上,其中葡萄糖、硫酸铵、蛋白胨为正效应,微量元素为负效应,确定这几个因素为主要影响因素。A 为葡萄糖;B 为硫酸铵;C 为无氨基酸酵母氮源;D 为生物素;E 为硫酸镁;F 为 EDTA;G 为磷酸盐缓冲液;H 为甲醇;I 为蛋白胨;J 为氯化钙;K 为微量元素;Y 为重组蛋白量。

表 1 Plackett-Burman 实验设计及响应值($n=12$)													
编号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Y(g/L)	
1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1.806	
2	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.327	
3	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1.639	
4	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1.481	
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1.329	
6	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1.242	
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.352	
8	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1.165	
9	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1.258	
10	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1.414	
11	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1.391	
12	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.672	

表 2 Plackett-Burman 实验因素水平及其主效应分析					
变量	水平(g/L)		<i>t</i>	<i>P</i>	重要性
	-1	1			
A	10.0	12.50	5.21	0.035	1
B	6.00	7.50	5.19	0.035	2
C	5.00	6.25	-0.56	0.631	7
E	1.20	1.50	-0.14	0.899	9
F	1.00	1.25	1.04	0.406	5
G	5.58	7.31	0.37	0.744	8
I	8.00	10.00	3.52	0.072	4
J	0.50	0.70	0.83	0.494	6
K	1.20	1.50	-4.01	0.055	3

2.2 最陡爬坡实验接近最大 RSM 区域 根据 Plackett-Burman 实验分析的结果确定的最陡爬坡路径,实验设计及结果见

表 3。

表 3 最陡爬坡实验设计及结果(g/L)				
A	B	I	K	Y
13.75	8.6	10.8	0.3	1.652
15.00	10.0	11.6	0.0	1.879
16.25	11.4	12.4	0.0	1.533
17.50	12.8	13.2	0.0	1.239
18.75	14.2	15.0	0.0	0.783

2.3 RSM 分析筛选重要因素的最优水平 进行 RSM 分析采用的重要因素水平及实验结果分别见表 4。以重组蛋白水平为响应值,根据表 4 中 Box-Behnken 设计的实验结果,进行二次回归分析,回归方程为: $Y=1.982\ 33-0.027\ 25A+0.052B+0.031I-0.168\ 54A^2-0.178\ 54B^2-0.1870\ 4I^2-0.071\ 25AB+0.093\ 75AI+0.160\ 25BI$ 。Y 的估计回归系数和回归方程的方差分析结果见表 5、6。根据回归分析结果,该模型的决定系数 $R^2=92.64\%$,说明模型可以解释 92.64%实验所得抗毕赤酵母产量的变化,表明方程拟合较好。表 6 中,失拟项 $F=0.10$,表明失拟不显著,回归显著。进一步绘制 RSM 图、等值线图,见图 1~3。通过优化响应分析得到主要因素(A、B、I)的编码值(14.89、10.33、11.72)及葡萄糖、硫酸铵、蛋白胨最佳水平(分别为 14.89、10.33、11.72 g/L),此时发酵液中重组蛋白量为 1.992 g/L。

表 4 Box-Behnken 实验设计表及实验结果			
A	B	I	Y(g/L)
1	0	1	1.754
-1	-1	0	1.542
0	1	-1	1.501
-1	0	1	1.612
0	1	1	1.833
0	-1	1	1.412
1	-1	0	1.621
0	0	0	1.895
1	1	0	1.586
1	0	-1	1.454
0	0	0	2.133
0	0	0	1.919
-1	0	-1	1.687
0	-1	-1	1.721
-1	1	0	1.792

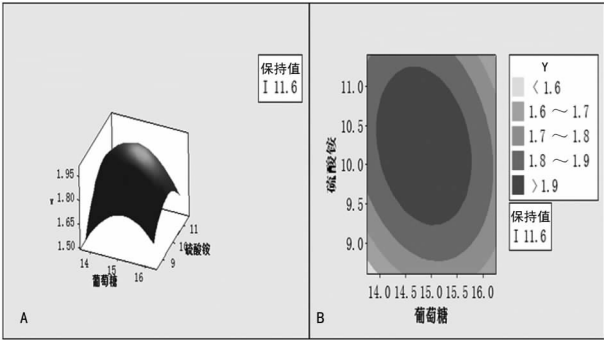
表 5 Y 的估计回归系数				
参数	系数	系数标准误	<i>t</i>	<i>P</i>
常量	1.982 33	0.051 40	38.569	0.000
A	-0.027 25	0.031 47	-0.866	0.426
B	0.052 00	0.031 47	1.652	0.159
I	0.031 00	0.031 47	0.985	0.370
A * A	-0.168 54	0.046 33	-3.638	0.015
B * B	-0.178 54	0.046 33	-3.854	0.012
I * I	-0.187 04	0.046 33	-4.037	0.010
A * B	-0.071 25	0.044 51	-1.601	0.170
A * I	0.093 75	0.044 51	2.106	0.089
B * I	0.160 25	0.044 51	3.600	0.016

注:R-Sq=92.64%;R-Sq(预测)=69.92%;R-Sq(调整)=79.38%。

表 6 对 Y 的方差分析

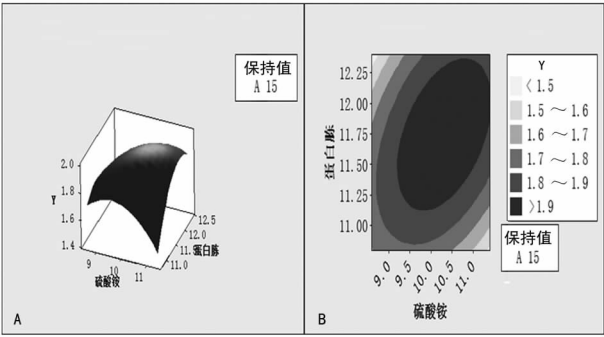
误差来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归	9	0.498 438	0.498 438	0.055 382	6.99	0.023
线性	3	0.035 260	0.035 261	0.011 754	1.48	0.326
平方	3	0.304 995	0.304 995	0.101 665	12.83	0.009
交互作用	3	0.158 183	0.158 183	0.052 728	6.65	0.034
残差误差	5	0.039 626	0.039 626	0.007 925	—	—
失拟	3	0.005 287	0.005 287	0.001 762	0.10	0.951
纯误差	2	0.034 339	0.034 339	0.017 000	169.00	—
合计	14	0.538 064	—	—	—	—

注：—为无数据。



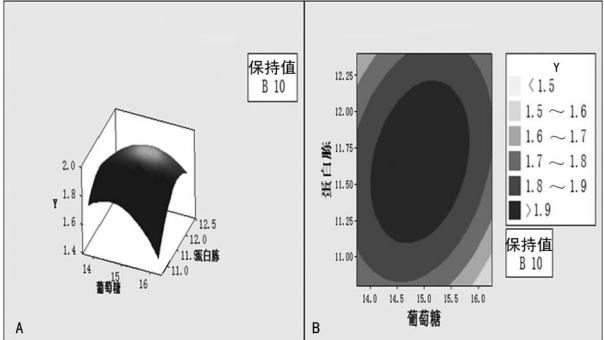
注：A 为曲面图；B 为等值线图。

图 1 Y 与硫酸铵、葡萄糖的曲面图和等值线



注：A 为曲面图；B 为等值线图。

图 2 Y 与硫酸铵、蛋白胨的曲面图和等值线



注：A 为曲面图；B 为等值线图。

图 3 Y 与葡萄糖、蛋白胨的曲面图和等值线

2.4 模型的验证 以优化条件得到的方案为基础,进行验证实验,分 3 批次发酵,重组蛋白水平分别为:1.839、1.903、1.754 g/L,与预测的 1.992 g/L 水平接近,与未优化的培养基所得重组蛋白平均水平为 1.423 g/L 相比,优化后的培养基其所得重组蛋白的水平提高了约 22%,提高幅度明显。

3 讨 论

Plackett-Burman 设计能有效地避免实验资源浪费,可用

于评估影响实验的重要因素及筛选实验的显著因素^[6],RSM 是通过合理实验,得到一定数据,然后拟合得到影响实验因素和响应值之间多元二次方程,通过对回归方程的分析,寻求最优方案。该方法实验次数少、周期短,求得的回归方程精确度一般较高,是解决多变量问题非常有效的一种统计学方法^[7-8]。

本研究采用 Plackett-Burman 设计和 RSM,优化毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 的发酵培养基。首先运用 Plackett-Burman 设计实验,筛选得到葡萄糖、硫酸铵、蛋白胨、微量元素为影响重组蛋白产率的重要因素;然后通过最陡爬坡实验逐步改变四者的水平,逼近最佳 RSM 区域;最后采用 Box-Behnken 设计和 Minitab 软件分析确定出主要因素的最优水平,得到优化的发酵培养基为:葡萄糖 14.89 g/L,硫酸铵 10.33 g/L,无氨基酸酵母氮源 5.00 g/L,硫酸镁 1.20 g/L,EDTA 1.00 g/L,磷酸盐缓冲液 5.58 mL/L,蛋白胨 11.72 g/L,氯化钙 0.70 g/L,微量元素 1.20 g/L。在此培养基中,发酵后获得的重组蛋白水平相较于初始培养基提高了约 22%,同时,回归方程所得到的最大预测值与验证值接近,说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响,建立的模型与实际情况是比较吻合,表明 Packett-Burman 设计和 RSM 可以很好地对毕赤酵母产重组抗菌肽 LL-37 发酵培养基进行优化,这为进一步的研究奠定了实验基础。

参考文献

[1] Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial peptides and their analogs; searching for new potential therapeutics[J]. Perspec Med Chem, 2014, 6(1): 73.

[2] 杨浩,姚海燕,陈圆圆,等. 人源抗菌肽 LL-37 及其改良体串联体的原核表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 25(5): 570-573.

[3] Chen H, Niu JF, Qin T, et al. Optimization of the medium for Lactobacillus acidophilus by Plackett-Burman and steepest ascent experiment[J]. Acta Sci Pol Technol Aliment, 2015, 14(3): 227-232.

[4] Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology[J]. Wiley Interdiscip Rev: Comput Mol Sci, 2010, 2(2): 128-149.

[5] Kumar V, Bhalla A, Rathore AS. Design of experiments applications in bioprocessing: Concepts and approach[J]. Biotechnol Progr, 2014, 30(1): 86-99.

[6] Salgueiro-González N, Turnes-Carou I, Muniategui-Lorenzo S, et al. Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry determination[J]. Anal Chim Acta, 2014, 852(1): 112-120.

[7] Wu J, Yu D, Sun H, et al. Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of Berberis amurensis by response surface methodology[J]. Ind Crop Prod, 2015, 69(1): 68-75.

[8] Öztürk T, Ustun G, Aksoy HA. Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil; Optimization by response surface methodology [J]. Bioresource Technol, 2016, 101(19): 7456-7461.