华東理工大學学报 自然科学版 Natural Science Edition
JOURNAL OF EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

重组蛋白SRT-ELP36在大肠杆菌中高效表达的工艺优化研究

马小雷 殷仁凯 栗波 王泽建 钱江潮

Optimization of the High-Level Expression Process of Recombinant Protein SRT-ELP36 in *Escherichia coli*

MA Xiaolei, YIN Renkai, LI Bo, WANG Zejian, QIAN Jiangchao

在线阅读 View online: http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20260227001

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大肠杆菌表达高性能融合鱿鱼环齿-类弹性蛋白的发酵优化

Optimization of Fermentation Process for Production of Elastin-Like and Squid Ring Teeth Fusion Proteins for the Construction of Robust Fibers in *Escherichia coli*

华东理工大学学报（自然科学版）. 2024, 50(1): 71-79 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20221030001

重组大肠杆菌表达豹蛙酶发酵培养基和发酵条件的优化

Optimization of Fermentation Medium and Conditions for Recombinant *E. coli* Expressing Onconase

华东理工大学学报（自然科学版）. 2021, 47(5): 592-597 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20200824001

理性设计提高末端脱氧核苷酸转移酶在大肠杆菌中的可溶性表达

Enhanced Soluble Expression of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in *Escherichia coli* via Rational Design

华东理工大学学报（自然科学版）. 2025, 51(6): 765-773 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20250308003

大肠杆菌HS27高效生产*L*-高丝氨酸培养基与补料优化

Strategies for High-Efficiency *L*-Homoserine Production by *Escherichia coli* HS27 Optimization of Medium and Feeding

华东理工大学学报（自然科学版）. 2026, 52(1): 99-108 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20250416001

赖氨酰内切酶在大肠杆菌中的重组表达、复性及纯化

Recombinant Expression, Refolding, and Purification of *Lysobacter enzymogenes* Lys-C in *Escherichia coli*

华东理工大学学报（自然科学版）. 2023, 49(5): 702-711 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20220607001

延长盐单胞菌生产依克多因高密度发酵工艺优化

High-Density Fermentation Process Optimization for Ectoine production by *Halomonas elongata* DSM 2581^{T}

华东理工大学学报（自然科学版）. 2025, 51(1): 50-59 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20240121001

扫码关注公众号，获取更多信息！

文章编号：1006-3080(2026)05-0628-10 DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20260227001

重组蛋白 SRT-ELP36 在大肠杆菌中高效表达的工艺优化研究

马小雷， 殷仁凯， 栗 波， 王泽建， 钱江潮
（华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程全国重点实验室, 上海 200237）

摘要: 类弹性 - 鱿鱼环齿重组蛋白 (SRT-ELP36) 融合了类弹性蛋白 (ELP) 与鱿鱼环齿蛋白 (SRT) 的序列优势，断裂强度 (630 MPa) 与韧性 (130 MJ/m³) 均优于蛛丝蛋白，在生物医学工程、高性能环保纤维、生物基结构材料等领域具有重要应用潜力。本研究以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为表达宿主，通过高密度发酵工艺优化提升 SRT-ELP36 的产量。经单因素实验及 Plackett-Burman (PB) 组合实验，筛选出影响发酵产量的关键因子为酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉；次要因子为甜菜碱和脯氨酸，一般因子为硫酸铵、硫酸镁、甘氨酸和氯化钾。结合中心复合设计 (CCD) 确定最优补料配方为：酵母提取物 6.8 g/L、蛋白胨 7.5 g/L、玉米浆干粉 8.0 g/L。最后，在 50 L 发酵罐中水平验证优化工艺，通过溶氧与残糖的精准调控实现菌体高密度培养，菌体 OD_{600} 可达 100.2，SRT-ELP36 蛋白的产量最高达到 2.52 g/L，较优化前提高了 33.3%。本研究明确了 SRT-ELP36 高密度发酵的关键营养调控因子及权重，建立了可放大的补料分批发酵工艺，为该重组蛋白的工业化生产提供了工艺支撑。

关键词: 大肠杆菌；类弹性-鱿鱼环齿重组蛋白；响应面法；工艺优化；高密度发酵

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

结构蛋白因机械强度高、生物可降解性能好、免疫原性低等特性，成为超分子化学、生物材料学、组织工程及再生医学领域的研究热点，天然来源的蛛丝蛋白、蚕丝蛋白等均表现出优异的应用潜力[1-2]。但通过天然采集或者人工饲养等方式所获取的结构蛋白存在产量小、生产成本高等问题，难以满足快速增长的市场需求。高密度发酵是微生物发酵工程中一种优化的培养技术，核心是通过精准调控发酵环境与工艺参数，使微生物（细菌、酵母、真菌等）在发酵液中达到远超常规培养的菌体浓度，同时实现目标产物的高效合成与积累的发酵方式。随着合成生物学的快速发展，高密度发酵已成为制备重组蛋白的主要工艺路线。补料培养基的组成和配比是影响微生物生长和蛋白合成的核心因素。Yoshida 等[3]使用深度学习和贝叶斯优化方法，对大肠杆菌蛋白表达的 31 种培养基成分进行优化，从而显著提升了大肠杆菌的蛋白表达量。

鱿鱼环齿蛋白（Squid-Ring-Teeth, SRT）是一类富含 β-折叠结构的天然热塑性结构蛋白，具有高拉伸强度与水下黏附性，类弹性蛋白（Elastin-Like Polypeptide, ELP）具有温度响应性和高弹性，文献 [4-5] 基于合成生物学理念对蛋白类材料进行理性设计和优化，首次构建了融合 SRT 和 ELP 序列的重组结构蛋白 SRT-ELP36，其分子质量为 192 kDa，基序为 $PAATAVSHTTHHAP\text{-}VPGVG(VPGKG)_5$，两种序列的融合赋予了蛋白优异的力学性能与结构可调控性，单丝纤维断裂强度达 630 MPa、韧性达 130 MJ/m³，优于重组蛛丝蛋白及化学再生蚕丝纤维，有望应用于生物医学工程、高性能环保纤维、生物基结构材料等领域。目前，针对该蛋白发酵生产的研究仍较为有限，姜正日等[6]通过优化宿主菌、培养基、诱导时机、供氧量等条件，以及通过重组大肠杆菌高密度发酵实现 SRT-ELP36 的初步生产，最高蛋白产量达到 2.22 g/L。

收稿日期: 2026-02-27

作者简介: 马小雷（1988—），男，安徽亳州人，博士生，研究方向为微生物发酵。E-mail: maxiaolei@ecust.edu.cn

引用本文: 马小雷, 殷仁凯, 栗 波, 等. 重组蛋白 SRT-ELP36 在大肠杆菌中高效表达的工艺优化研究 [J]. 华东理工大学学报（自然科学版）, 2026, 52(5): 628-637.

Citation: MA Xiaolei, YIN Renkai, LI Bo, *et al*. Optimization of the High-Level Expression Process of Recombinant Protein SRT-ELP36 in *Escherichia coli*[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(5): 628-637.

针对 SRT-ELP36 高密度发酵产量低的核心问题, 本文通过单因素实验筛选了对 SRT-ELP36 表达有显著影响的营养组分, 结合 Plackett-Burman(PB) 实验与中心复合设计 (CCD) 实验明确关键营养因子的权重及最优配比, 最终在 50 L 发酵罐中验证了优化工艺, 实现了 SRT-ELP36 的高效合成。研究明确了 SRT-ELP36 高密度发酵的关键营养调控因子及权重关系, 并建立了可放大的补料发酵工艺, 为该重组蛋白的工业化应用奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　原料与试剂

1.1.1　菌株　本研究所用大肠杆菌 BL21(DE3) 来源于 Thermo Fisher Scientific 公司, 表达质粒 pET25b-SRT36 由中国科学院长春应用化学研究所提供。

1.1.2　试剂　酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉: 均购自北京拜尔迪生物技术有限公司。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 固体培养基添加 2%(质量分数)琼脂。SDS-PAGE 蛋白电泳: 参照文献 [6] 配制分离胶、浓缩胶、染色液、脱色液等。Precision Plus Protein™ 标准品: 购自 BIO-RAD(上海)有限公司, 包含 10 个高度纯化的重组蛋白(分子质量 10~250 kD), 用于蛋白产量计算。Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液: 购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 货号 LT101。抗生素与诱导剂: 氨苄西林(AMP, 100 mg/L)、异丙基-*β*-D -硫代半乳糖苷(IPTG, 238 mg/L), 均经 0.22 μm 过滤膜过滤除菌。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 13, 磷酸二氢钾 6.67, 一水合柠檬酸 3.25, 一水合氯化钙 0.05, 七水合硫酸镁 2.5, 另外加入 φ=0.02% 的消泡剂。

1.1.3　实验仪器　生物传感分析仪, SBA-40E 型, 山东省科学院生物研究所; 可见光分光光度计, UV-1200B 型, 上海棱光技术有限公司; 电子天平, PR42022ZH/E 型, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 SII, YXQ-LS-50 型, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 50 L 发酵罐, 上海国强生化工程装备有限公司; 发酵罐 pH 电极、溶氧电极, 梅特勒-托利多(常州)测量技术有限公司; 凝胶成像仪, 4600SF, 上海天能生命科学有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　一级种子培养　挑取 LB(Luria-Bertani)固体平板中的重组大肠杆菌单菌落, 接种至已装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 于 37 ℃、220 r/min 条件下振荡培养 6 h。

1.2.2　二级种子培养　按 10%(体积分数)的接种量, 将一级种子液接种至装有 500 mL 的 LB 培养基的 1 L 摇瓶中, 于 37 ℃、220 r/min 条件下振荡培养 6 h。

1.2.3　发酵罐补料培养　于 50 L 发酵罐中装入 25 L 发酵培养基, 121 ℃ 灭菌 30 min。氨水调节 pH 至 6.9, 控制温度为 37 ℃。通过火焰接种方式添加终质量浓度为 100 mg/L 的氨苄西林、5 g/L 的初始葡萄糖, 蒸汽灭菌后按 20%(体积分数)接种量接种种子液。初始转速设置为 100 r/min, 空气流量 3 L/min, 罐压 0.05 MPa。通过流加氨水控制发酵液 pH 为 6.9。当初始葡萄糖耗尽时, 开始流加补料培养基。发酵过程中通过调节空气流量、转速和补料培养基流加速率, 维持溶氧(DO)20%~40%。

1.2.4　诱导表达　当菌体浓度 OD_{600} 达到 35 时, 接入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 以启动蛋白表达。每小时取样, 检测 OD_{600} 及葡萄糖含量, 控制残糖质量浓度不大于 1.0 g/L。样品经离心后分离上清液与沉淀, SRT-ELP36 存在于沉淀中, 沉淀用于后续蛋白检测。

1.2.5　关键营养组分的单因素筛选　依次考察碳源、氮源、氨基酸、无机盐以及甜菜碱对大肠杆菌生长及 SRT-ELP36 表达的影响, 每个实验设置 3 次重复。碳源选用含碳量一致的甘油(10.0 g/L)和葡萄糖(5.0 g/L); 无机氮源选用硫酸铵(2.0 g/L)和氯化铵(4.0 g/L), 有机氮源选择酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉和尿素, 终质量浓度为 5.0 g/L; 氨基酸选用重组蛋白中含量较高的甘氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、组氨酸, 终质量浓度为 2.0 g/L; 无机盐选用磷酸氢二钾(0.25 g/L)、氯化钾(0.50 g/L)和硫酸镁(2.0 g/L)、硫酸锌(2.0 g/L), 此外增加甜菜碱(0.50 g/L)作为特殊营养成分。

1.2.6　关键营养因子筛选及配比优化

(1)PB 实验: 基于单因素实验结果, 选取玉米浆干粉、酵母提取物、蛋白胨、硫酸铵、硫酸镁、甘氨酸、脯氨酸、甜菜碱、氯化钾 9 个因素(依次命名为 *A*~*I*, 单位 g/L), 采用 Design-Expert13 软件设计 PB 实验, 每个因素设高/低 2 个水平(−1、1), 在 500 mL 摇瓶中开展此实验, 以 SRT-ELP36 产量为响应值, 筛选显著影响因子(P<0.05)。实验因素及水平见表 1。

(2)CCD 实验: 根据 PB 实验结果, 对玉米浆干粉、酵母提取物和蛋白胨这 3 个显著影响因素(*A*、*B*、*C*)进行 CCD实验设计, 每个因素设−1、0、1 这 3 个水平, 结果见表 2; 在 500 mL 摇瓶中开展此实验, 以 SRT-ELP36 产量为响应值, 建立二次回归模型, 确定最优补料配方。

以上所有实验均设置 3 次重复, 实验数据以平

表1 PB实验设计的因素及水平

Table 1 Factors and levels of PB experimental design

Level	Factor								
	Corn steep liquor powder (*A*)	Yeast extract (*B*)	Tryptone (*C*)	Ammonium sulfate (*D*)	Magnesium sulfate (*E*)	Glycine (*F*)	Proline (*G*)	Betaine (*H*)	Potassium chloride (*I*)
−1	3.5	3.5	3.5	1.4	1.4	1.4	2.45	0.35	0.35
1	6.5	6.5	6.5	2.6	2.6	2.6	4.55	0.65	0.65

表2 CCD设计的因素及水平

Table 2 Factors and levels of CCD design

Level	Factor		
	A	*B*	*C*
−1	4.00	4.00	4.00
0	6.06	6.06	6.06
1	8.13	8.13	8.13

均值±标准差表示。采用Design-Expert 13软件进行回归分析与方差分析，$P<0.05$表示差异显著，$P<0.01$表示差异极显著。

1.3 检测方法

1.3.1 菌体浓度(OD_{600})测定 将发酵液用去离子水梯度稀释，使稀释后OD_{600}处于0.2~0.8，该范围内吸光度与菌体浓度呈良好线性关系；采用分光光度计在600 nm波长下测定吸光度，600 nm为微生物菌体浓度检测的特征波长，该波长可有效避免菌体色素与培养基成分的干扰，是大肠杆菌浓度检测的通用方法[4-5]；实际菌体浓度为OD_{600}测定值与稀释倍数的乘积。

1.3.2 葡萄糖质量浓度测定 取1 mL发酵液，12 000 r/min离心3 min，上清液适当稀释至葡萄糖质量浓度<1.0 g/L；采用生物传感分析仪测定葡萄糖质量浓度。

1.3.3 目标蛋白定量测定 姜正日等[6]的研究确定了SRT-ELP36存在于沉淀中，离心后的上清液未含有SRT-ELP36。采用SDS-PAGE半定量法测定蛋白浓度，具体步骤如下：

(1)菌体沉淀用PBS缓冲液重悬，调节OD_{600}=5；取100 μL重悬液，加入25 μL蛋白上样缓冲液，沸水浴15 min，12 000 r/min离心3 min，取上清液上样15 μL，蛋白标准品上样10 μL。

(2)进行SDS-PAGE电泳(分离胶质量浓度120 g/L，浓缩胶质量浓度50 g/L)，考马斯亮蓝R-250染色2 h，脱色至条带清晰。

(3)采用天能凝胶成像系统扫描电泳胶图，通过凝胶分析软件测定目标蛋白条带灰度值(G_t)与蛋白标准品中对应分子量的条带灰度值(G_m)；

蛋白浓度计算方法同文献[6]，计算公式如下：

$$C_t = C_m \times \frac{1.5G_t}{G_m} \times X$$

式中，C_t为SRT-ELP36蛋白质量浓度(g/L)；C_m为蛋白标准品质量浓度(g/L)；X为菌体上样稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 关键营养组分的单因素筛选

2.1.1 碳源对菌体生长和蛋白表达的影响 碳源是微生物生长的核心营养物质与能量来源，同时也是构成微生物细胞结构和目标蛋白的碳骨架供体[7]，其中葡萄糖容易被大肠杆菌利用，并且含量容易测定，所以葡萄糖是大肠杆菌高密度发酵的最常用碳源。甘油也是一种可以提供大量碳源的生物材料，发酵过程中可降低乙酸等代谢副产物的积累，更容易实现大肠杆菌的高密度生长及蛋白表达。因此，首先分别补加葡萄糖和甘油，考察它们对大肠杆菌生长和重组蛋白产量的影响(图1)，具体流加时间为大肠杆菌高密度培养6 h左右，此时初始葡萄糖已经耗尽。图1(a)显示葡萄糖组大肠杆菌的OD_{600}(10.65±0.05)高于甘油组大肠杆菌的OD_{600}(10.03±0.02)。图1(b)显示添加葡萄糖组重组蛋白SRT-ELP36的产量优于甘油组，前者产量可达(0.28±0.02)g/L，而后者产量为(0.19±0.02)g/L。因此，选用葡萄糖作为补料碳源进行后续实验。

2.1.2 氮源对菌体生长和蛋白表达的影响 氮源是微生物生长和蛋白表达的核心元素供体，直接决定细胞的生长速率与目标蛋白的合成效率[8]。基于此，在高密度发酵培养6 h左右时，分别补加硫酸铵、氯化铵2种无机氮源，以及酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉和尿素4种有机氮源，考察它们对大肠杆菌生长和重组蛋白产量的影响，结果如图2所示。图2(a)显示，相比于无机氮源，有机氮源更有利于菌体的生

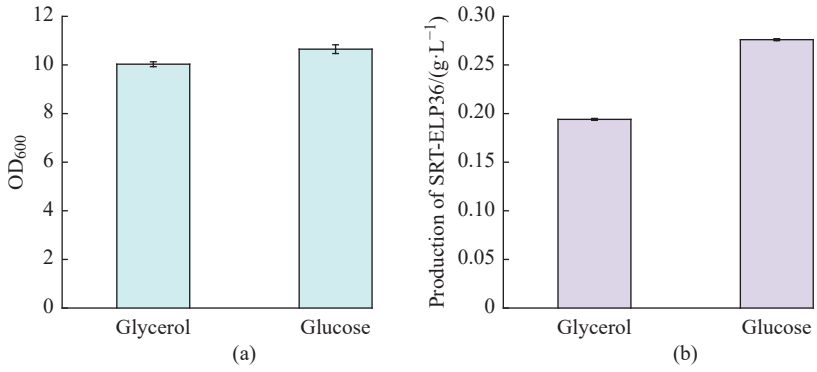


图 1　不同碳源对大肠杆菌 OD_{600}(a)和 SRT-ELP36 蛋白产量(b)的影响

Fig. 1　Effects of different carbon sources on the OD_{600} of *E. coli* (a) and the production of SRT-ELP36 (b)

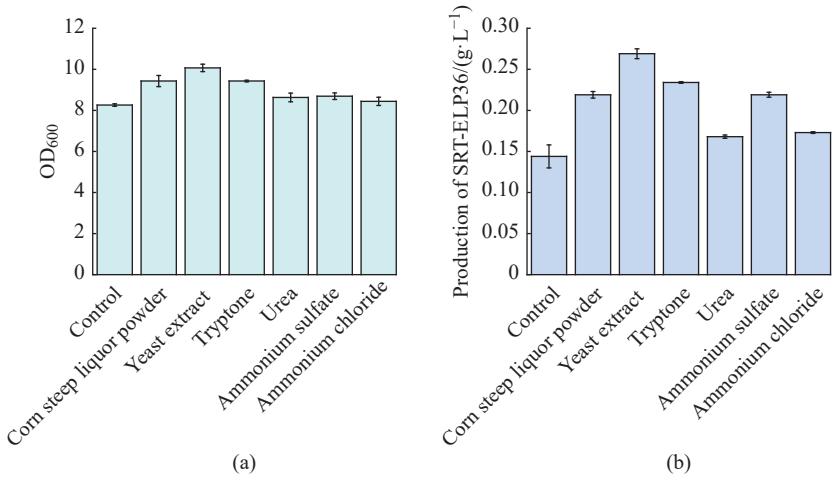


图 2　不同氮源对大肠杆菌 OD_{600}(a)和 SRT-ELP36 蛋白产量(b)的影响

Fig. 2　Effects of different nitrogen sources on the OD_{600} of *E. coli* (a)and the production of SRT-ELP36 (b)

长, 其中玉米浆干粉、酵母提取物和蛋白胨对菌体生长的促进作用较为明显, OD_{600} 值分别为 9.43±0.27、10.07±0.18、9.43±0.04。图 2(b)显示, 添加不同氮源的实验组中, 重组蛋白 SRT-ELP36 的产量均高于对照组, 有机氮源的增强效果优于无机氮源, 其中添加酵母提取物时效果最佳, SRT-ELP36蛋白的产量可达(0.27±0.01)g/L 左右, 较对照组提高 86.8%。这可能是因为酵母提取物中富含核苷酸、蛋白质、氨基酸、糖类及多种微量元素, 对菌体的表达具有良好的促进作用。无机氮源中使用硫酸铵作为氮源的效果明显好于氯化铵, 可能是因为氯化铵中的氯离子影响了菌体的生长代谢, 而硫酸铵中硫元素可能对菌体的生长和表达具有一定的促进作用。因此, 将酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉、硫酸铵作为后续 PB 实验的筛选因素。

2.1.3　*氨基酸对菌体生长和蛋白表达的影响*　大肠杆菌在表达重组蛋白时往往会给细胞带来代谢负担, 氨基酸匮乏是代谢负担的主要诱因, 外源补加关键氨基酸可以有效减轻重组蛋白表达过程中的细胞应激, 进而提升重组蛋白的生产效率[9]。基于此, 在高密度发酵培养 6 h 左右时, 分别补加重组蛋白中含量较高的甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His), 考察它们对大肠杆菌生长和重组蛋白产量的影响, 结果如图 3 所示。图 3(a)显示添加不同氨基酸的实验组中, 大肠杆菌的 OD_{600} 值均优于对照组, 且添加组氨酸(OD_{600}=11.76±0.14)、脯氨酸(OD_{600}=11.76±0.01)对大肠杆菌的生长促进更为显著。这可能是因为组氨酸可稳定胞内 pH, 同时为多种代谢酶(如三磷酸腺苷(ATP)酶、激酶)的活性中心组成部分; 脯氨酸可通过积累平衡胞内外渗透压, 抵御高糖、高盐等胁迫环境, 维持细胞形态与膜完整性。图 3(b)显示当补料培养基中加入甘氨酸和脯氨酸时, 对重组蛋白的促进效果较为明显, 产量分别可达(0.29±0.02)、(0.30±0.01)g/L。原因是 SRT-ELP36蛋白组成中甘氨酸质量分数 (27.27%)、脯氨酸质量分数 (18.18%) 较高, 外源补加可缓解氨基酸匮乏导致的代谢负担与核糖体停滞。因此, 将甘氨酸和脯氨酸作为后续 PB 实验的筛选因素。

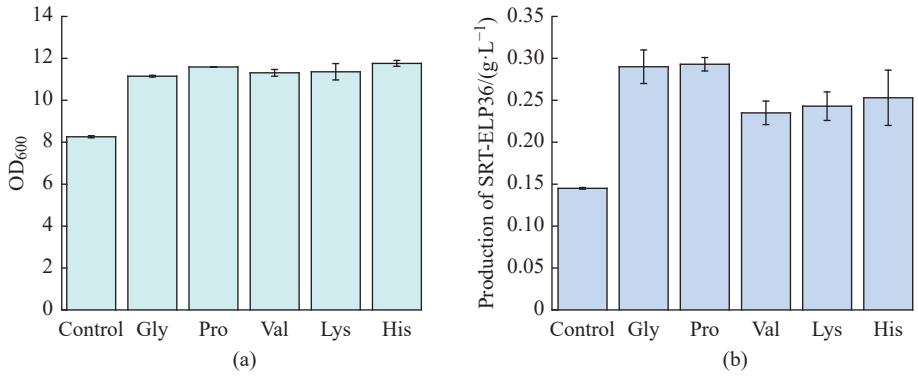


图 3 不同氨基酸对大肠杆菌 OD_{600}(a)和 SRT-ELP36 蛋白产量(b)的影响

Fig. 3 Effects of different amino acids on the OD_{600} of *E. coli* (a)and the production of SRT-ELP36 (b)

2.1.4 无机盐和甜菜碱对菌体生长和蛋白表达的影响 除氨基酸之外,无机盐也会影响大肠杆菌生长和表达蛋白。如 K^+是核糖体结构稳定与功能发挥的核心离子,其通过多维度调控核糖体的结构完整性、mRNA/tRNA 结合稳定性及翻译准确性,参与蛋白质合成的关键过程[10]。SO_4^{2-}参与大肠杆菌蛋白二硫键异构酶的活性维持,促进分泌型或胞内重组蛋白的二硫键正确折叠,降低包涵体形成概率,提升蛋白功能活性[11]。另外,甜菜碱不仅是传统的渗透保护剂,还可通过调控关键代谢基因表达优化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)供应,增强大肠杆菌 mRNA 的热稳定性与翻译模板活性,提升可溶性重组蛋白的表达水平[12]。因此,在高密度发酵培养 6 h 左右时,分别补加硫酸镁、硫酸锌、氯化钾、磷酸二氢钾以及甜菜碱,考察它们对大肠杆菌生长和重组蛋白产量的影响,结果如图 4 所示。图 4(a)显示实验组中大肠杆菌的 OD_{600} 值均高于对照组。图 4(b)显示当补料培养基中加入甜菜碱时,对重组蛋白的产量有明显促进作用,蛋白产量为(0.24±0.01)g/L,较对照组提高 71.4%。加入钾盐和硫酸盐后,氯化钾和硫酸镁使得重组蛋白产量比对照组分别提高 34.5% 和 29.6%。因此,将氯化钾、硫酸镁和甜菜碱作为后续 PB 实验的筛选因素。

2.2 关键因子筛选及配比优化

2.2.1 PB 实验设计 补料培养基中分别加入终质量浓度为 5 g/L 的葡萄糖和 5 g/L 的酵母提取物作为基础碳源和氮源,按照 1.2.6 节进行 PB 实验设计,共列出了 12 种实验方案。将每组的 SRT-ELP36 蛋白产量作为响应值,并对结果进行分析。如表 3 所示,SRT-ELP36 蛋白产量在 0.35~0.87 g/L 之间。PB 实验的回归分析结果见表 4。

由表 4 可知,PB 实验回归模型极显著(P=0.0470<0.05),因素对 SRT-ELP36 产量的影响权重从大到小依次为:酵母提取物 (*B*)、蛋白胨 (*C*)、玉米浆干粉 (*A*)、甜菜碱 (*H*)、脯氨酸 (*G*)、硫酸铵 (*D*)、硫酸镁 (*E*)、甘氨酸 (*F*)、氯化钾 (*I*)。其中,酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉为关键影响因子(P<0.05),甜菜碱、脯氨酸为次关键影响因子(0.05<P<0.25),硫酸铵、硫酸镁、甘氨酸、氯化钾为一般影响因子(P>0.25)。关键影响因子均为有机氮源,说明有机氮源的种类与浓度是 SRT-ELP36 补料发酵的核心调控因素,其可提供丰富的氨基酸、核苷酸及微量元素,缓

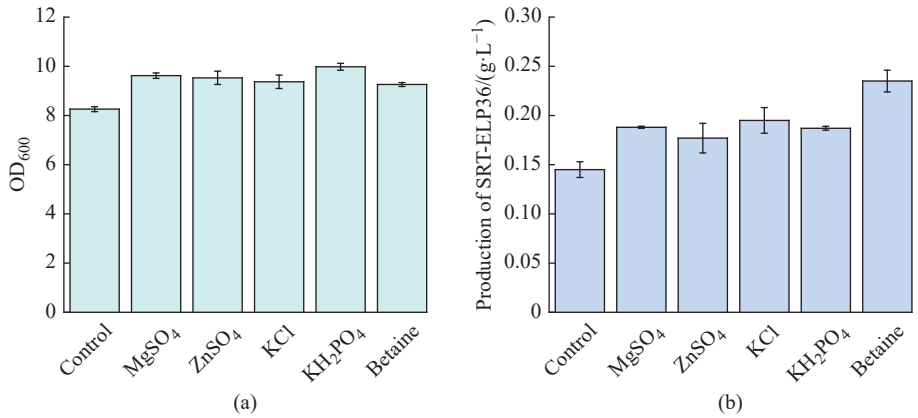


图 4 不同无机盐对大肠杆菌 OD_{600}(a)和 SRT-ELP36 蛋白产量(b)的影响

Fig. 4 Effects of different inorganic salts on the OD_{600} of *E. coli* (a) and the production of SRT-ELP36 (b)

表 3　PB 实验设计与结果

Table 3　Experimental design and results of PB

Group	Factor									Production of SRT-ELP36/(g·L^{-1})
	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*	
1	6.50	3.50	6.50	2.60	1.40	2.60	4.55	0.65	0.35	0.70
2	3.50	3.50	3.50	1.40	1.40	1.40	2.45	0.35	0.35	0.35
3	6.50	6.50	3.50	1.40	1.40	2.60	2.45	0.65	0.65	0.73
4	6.50	3.50	3.50	1.40	2.60	1.40	4.55	0.65	0.35	0.59
5	6.50	6.50	6.50	1.40	1.40	1.40	4.55	0.35	0.65	0.87
6	6.50	3.50	6.50	2.60	2.60	1.40	2.45	0.35	0.65	0.67
7	3.50	6.50	6.50	1.40	2.60	2.60	4.55	0.35	0.35	0.81
8	6.50	6.50	3.50	2.60	2.60	2.60	2.45	0.35	0.35	0.66
9	3.50	3.50	3.50	2.60	1.40	2.60	4.55	0.35	0.65	0.39
10	3.50	6.50	6.50	2.60	1.40	1.40	2.45	0.65	0.35	0.76
11	3.50	6.50	3.50	2.60	2.60	1.40	4.55	0.65	0.65	0.59
12	3.50	3.50	6.50	1.40	2.60	2.60	2.45	0.65	0.65	0.59

表 4　PB 实验各因素水平及主效应分析

Table 4　Analysis of the levels and main effects of each factor in PB experiments

Factor	Variable	DF	*F*-value	*P*-value	Significance	Important ranking
—	PB model	9	20.65	0.047 0	Significant	—
A	Corn steep liquor powder	1	33.07	0.028 9	Significant	3
B	Yeast extract	1	75.48	0.013 0	Significant	1
C	Tryptone	1	69.06	0.014 2	Significant	2
D	Ammonium sulfate	1	1.74	0.317 9	Not significant	6
E	Magnesium sulfate	1	0.70	0.492 2	Not significant	7
F	Glycine	1	0.21	0.689 9	Not significant	8
G	Proline	1	2.51	0.254 1	Not significant	5
H	Betaine	1	3.09	0.220 7	Not significant	4
I	Potassium chloride	1	0.02	0.899 7	Not significant	9

DF—Degrees of freedom

解重组蛋白表达导致的菌体代谢负担。

2.2.2　基于 PB 实验的关键营养因子筛选　通过 PB 实验, 可快速评估多变量中显著影响因素, 继而可通过 CCD 实验, 在关键因素的特定区域内, 建立二次回归模型, 分析因素间的相互作用, 并找到精确的最佳值。因此, 针对 PB 实验筛选的酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉这 3 个关键因子进行 CCD 实验, 实验设计与结果如表 5 所示, 方差分析结果见表 6。

通过 Design-Expert 13 软件对表 5 数据进行多元线性分析, 得到拟合实验因素的回归方程:$R1=0.30+0.035A+0.011B+0.007\,881C-0.005\,072AB-0.005\,072AC+0.007\,505BC-0.02A^2-0.009\,575B^2-0.005\,218C^2$。

CCD 实验回归模型极显著($P<0.000\,1$), 失拟项不显著($P=0.463\,6>0.05$), 模型 $R^2=0.963\,0$, 拟合度良好, 可有效预测实验结果。

蛋白胨、酵母提取物、玉米浆干粉的因子交互作用(图 5)分析显示, 蛋白胨与玉米浆干粉的交互作用接近显著($P=0.062\,1$), 其余因子间交互作用不显著($P>0.05$); 3 个关键因子对蛋白产量的影响均极显著($P<0.01$), 影响程度为: 酵母提取物>蛋白胨>玉米浆

表5 CCD实验设计与结果

Table 5 CCD experimental design and results

Group	Factor			Production of SRT-ELP36/(g·L^{-1})
	A	*B*	*C*	
1	8.13	8.13	4.00	0.30
2	8.13	4.00	4.00	0.29
3	4.00	4.00	8.13	0.22
4	2.59	6.06	6.06	0.19
5	6.06	6.06	2.59	0.28
6	6.06	2.59	6.06	0.26
7	4.00	8.13	8.13	0.28
8	6.06	6.06	6.06	0.32
9	8.13	4.00	8.13	0.30
10	4.00	4.00	4.00	0.21
11	6.06	6.06	6.06	0.31
12	6.06	6.06	6.06	0.29
13	6.06	6.06	6.06	0.30
14	4.00	8.13	4.00	0.22
15	6.06	6.06	6.06	0.30
16	6.06	6.06	6.06	0.29
17	6.06	6.06	6.06	0.30
18	6.06	6.06	6.06	0.29
19	8.13	8.13	8.13	0.32
20	6.06	6.06	6.06	0.31

干粉。

根据Design-Expert 13软件所预测的最优补料配方，补料培养基中添加酵母提取物6.8 g/L，蛋白胨7.5 g/L，玉米浆干粉8.0 g/L，SRT-ELP36蛋白的产量可达0.32 g/L。在此最优条件下在摇瓶中进行实验验证，SRT-ELP36蛋白的产量达到(0.32±0.02)g/L，与理论预测值一致，验证了模型的可靠性。

PB实验中最高产量达到0.87 g/L，而CCD实验最优产量为0.32 g/L，该差异是由实验分批次开展导致。两组实验独立进行，培养环境、菌体活力等客观条件存在批次波动，但PB实验内部、CCD实验内部均为同批次同条件培养，影响因素一致，组间对比有效，可分别完成关键因子筛选与最优配比优化。

2.3 50 L发酵罐高密度发酵工艺验证

细胞高密度发酵通常指菌体浓度高于20 g/L(干重)或OD_{600}>100的情况。以优化后的补料配方为基础，进一步在50 L发酵罐中进行高密度发酵放大验证，对照组和实验组采用相同的初始发酵培养基、相同的控制策略，对照组使用650 g/L葡萄糖、25%~28%(质量分数)的氨水进行恒速流加补料，实验组在已有补料的基础上增加酵母提取物6.8 g/L，蛋白胨7.5 g/L，玉米浆干粉8.0 g/L。发酵过程中大肠杆菌的耗氧速率(Oxygen Uptake Rate, OUR)如图6(a)所示，发酵达到5 h左右时，初始基础葡萄糖耗尽，此时开始使用不同的补料培养基进行补料。实验组中大肠杆菌OUR水平明显高于对照组，实验组OUR最高

表6 回归方程方差分析

Table 6 Regression equation analysis of variance

Source	Sum of square	Mean square	*F*-value	*P*-value	Significance
Model	0.027	2.960×10^{-3}	28.96	<0.0001	Significance
A	0.017	0.017	163.88	<0.0001	Significance
B	1.631×10^{-3}	1.631×10^{-3}	15.95	0.0025	Significance
C	8.481×10^{-4}	8.481×10^{-4}	8.30	0.0164	Significance
AB	2.058×10^{-4}	2.058×10^{-4}	2.01	0.1864	Not significant
AC	2.060×10^{-4}	2.060×10^{-4}	2.02	0.1861	Not significant
BC	4.506×10^{-4}	4.506×10^{-4}	4.41	0.0621	Not significant
A^2	5.607×10^{-3}	5.607×10^{-3}	54.85	<0.0001	Significance
B^2	1.321×10^{-3}	1.321×10^{-3}	12.93	0.0049	Significance
C^2	3.923×10^{-4}	3.923×10^{-4}	3.84	0.0786	Not significant
Residual	1.022×10^{-3}	1.022×10^{-3}	—	—	—
Lack of fit	5.330×10^{-4}	1.066×10^{-4}	1.09	0.4636	Not significant
Pure error	4.892×10^{-4}	9.783×10^{-5}	—	—	—
Corrected total	0.028	—	—	—	—

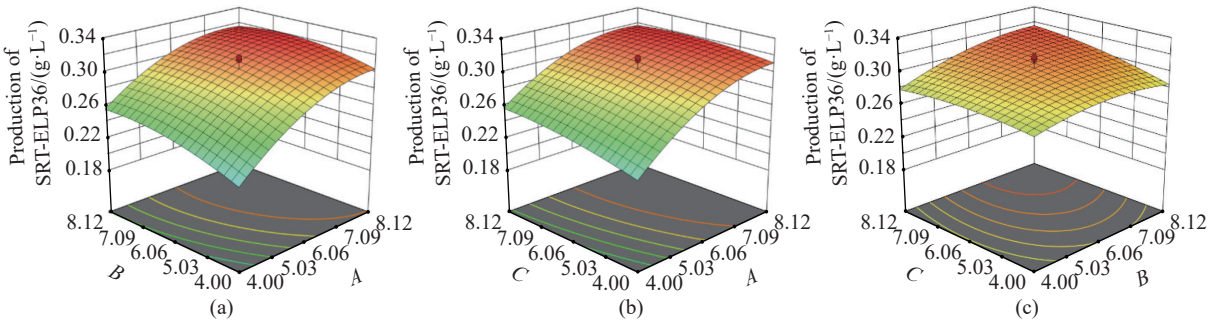
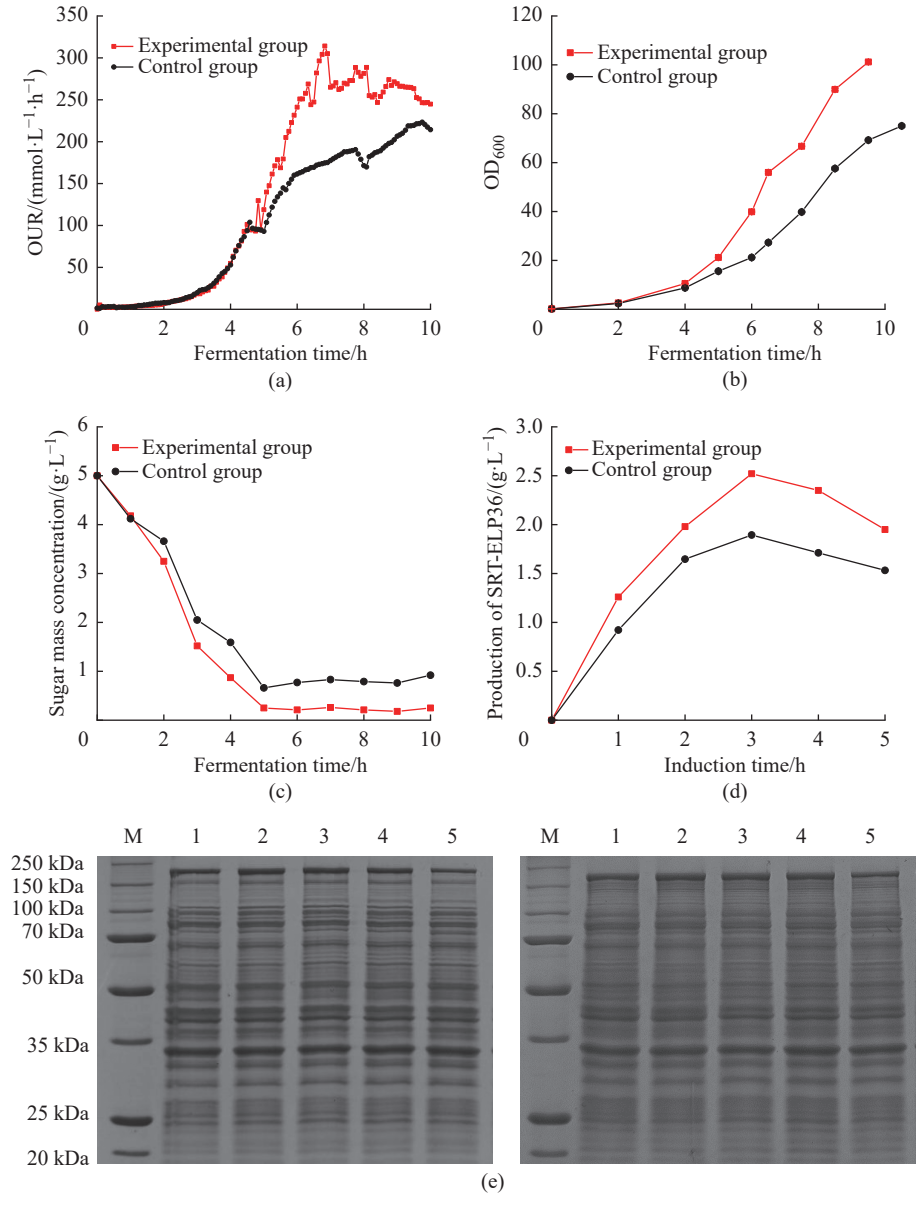


图 5　蛋白胨、酵母提取物、玉米浆干粉的交互影响

Fig. 5　Interaction effects of tryptone, yeast extract and corn steep liquor powder



M—Marker; Lane 1~5: Samples induced for 1–5 h

图 6　补料培养基优化对大肠杆菌氧气消耗速率 OUR(a)、大肠杆菌浓度 OD_{600}(b)、葡萄糖质量浓度(c)、SRT-ELP36 蛋白产量(d)的影响; SRT-ELP36 蛋白电泳图(e)

Fig. 6　Effect of optimization of feeding medium on (a)OUR, (b)OD_{600}, (c)Sugar mass concentration and (d) production of SRT-ELP36; (e) SRT-ELP36 蛋白电泳图

达到 314.12 mmol/(L·h), 而对照组中 OUR 最高仅为 223.21 mmol/(L·h), 这是因为实验组提供了丰富的氨基酸、维生素、核苷酸及微量元素等, 显著提升了细胞代谢活性。由于呼吸代谢的增强, 实验组菌体

生长速度高于对照组(图 6(b)),发酵 9.5 h 左右时,实验组大肠杆菌的 OD_{600} 值为 100.2,实现了高密度培养,而此时对照组中大肠杆菌的 OD_{600} 值只有 75 左右,实验组比对照组提高了约 33.6%。此外,实验组重组蛋白 SRT-ELP36 的产量(图 6(d))达到 2.52 g/L,较对照组的 1.89 g/L 提高了 33.3% 左右。这一方面是因为呼吸代谢增强提供了充足能量和高细胞密度,构建了高效的生产平台;另一方面,是因为复合营养补加直接供给合成原料并优化细胞生理状态,提升了单位产量。可见,优化得到的补料培养基对大肠杆菌的生长及表达均具有促进作用。

3 结束语

本文针对 SRT-ELP36 重组蛋白高密度发酵产量低的核心问题,通过系统的工艺优化与因子分析,明确了 SRT-ELP36 补料发酵的营养因子权重,即:关键影响因子为酵母提取物、蛋白胨、玉米浆干粉(均为有机氮源),次关键影响因子为甜菜碱、脯氨酸,一般影响因子为硫酸铵、硫酸镁、甘氨酸、氯化钾。有机氮源是调控 SRT-ELP36 产量的核心因素,其可缓解重组蛋白表达导致的代谢负担与氨基酸库失衡问题。建立了 SRT-ELP36 补料培养基的最优配方:酵母提取物 6.8 g/L、蛋白胨 7.5 g/L、玉米浆干粉 8.0 g/L,SRT-ELP36 产量可达 0.32 g/L,与模型预测值几乎相同,发酵稳定性与可重复性显著优于 PB 实验的高浓度因子组合。建立了 SRT-ELP36 的 50 L 发酵罐高密度发酵调控策略,优化补料培养基,在溶氧 20%~40%、残糖质量浓度≤1.0 g/L、OD_{600}=35 时进行 IPTG 诱导,实现了菌体高密度培养(OD_{600}=100.2),SRT-ELP36 蛋白产量最高可达 2.52 g/L,较优化前提高了 33.3%。

本研究建立的补料发酵工艺为 SRT-ELP36 的工业化生产提供了技术支撑,后续可进一步开展包涵体复性、发酵过程连续调控、更大体积发酵罐放大、密码子优化缓解核糖体停滞等研究,进一步提升该重组蛋白的产量与应用价值。

参考文献:

[1] LUO X, MA Y, XIANG Q. New frontiers in the production of functional recombinant proteins[J]. Bioengineering, 2025, 12(4): 351.

[2] SUN D, ZHENG Y, ZHANG A, *et al*. Design of strong and tough biofibers and their biomedical applications [J]. MedComm-Biomaterials and Applications, 2025, 4(1): e70005.

[3] YOSHIDA K, WATANABE K, CHIOU T Y, *et al*. High throughput optimization of medium composition for *Escherichia coli* protein expression using deep learning and Bayesian optimization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2023, 135(2): 127-133.

[4] LI Y, LI J, SUN J, *et al*. Bioinspired and mechanically strong fibers based on engineered non-spider chimeric proteins[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(21): 8148-8152.

[5] SUN J, SU J, MA C, *et al*. Fabrication and mechanical properties of engineered protein-based adhesives and fibers[J]. Advanced Materials, 2020, 32(6): e1906360.

[6] 姜正日, 殷仁凯, 王泽建, 等. 大肠杆菌表达高性能融合鱿鱼环齿-类弹性蛋白的发酵优化 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2024, 50(1): 71-79.

[7] WANG J, WEN B, XU Q, *et al*. Optimization of carbon source and glucose feeding strategy for improvement of L-isoleucine production by *Escherichia coli*[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 374-380.

[8] KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 803-822.

[9] KUMAR J, CHAUHAN A S, SHAH R L, *et al*. Amino acid supplementation for enhancing recombinant protein production in *E. coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(8): 2420-2433.

[10] ROZOV A, KHUSAINOV I, EL OMARI K, *et al*. Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2519.

[11] VAN DER PLOEG J R, EICHHORN E, LEISINGER T. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli* [J]. Archives of Microbiology 2001, 176(1/2): 1-8.

[12] LI Y, ZHANG D, CAI N, *et al*. Betaine supplementation improved l-threonine fermentation of *Escherichia coli* THRD by upregulating zwf (glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2019, 39: 67-73.

Optimization of the High-Level Expression Process of Recombinant Protein SRT-ELP36 in *Escherichia coli*

MA Xiaolei, YIN Renkai, LI Bo, WANG Zejian, QIAN Jiangchao
(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The recombinant elastin-like/squid ring tooth protein SRT-ELP36 integrates the sequence advantages of elastin-like polypeptides and squid ring tooth proteins, exhibiting superior breaking strength and toughness compared to spider silk proteins, and holds great application potential in the field of biomaterials. In this study, *Escherichia coli* BL21(DE3) was used as the expression host to improve the production of SRT-ELP36 through the optimization of high-density fermentation process. Firstly, single-factor experiments were conducted to screen the nutritional components affecting the expression of SRT-ELP36, and then Plackett-Burman (PB) experiment was used to identify yeast extract, peptone and corn steep liquor powder as the key factors affecting fermentation yield. The weight of each factor was clarified by principal component analysis: the key factors were yeast extract, tryptone and corn steep liquor powder, the secondary key factors were betaine and proline, and the general factors were ammonium sulfate, magnesium sulfate, glycine and potassium chloride. Furthermore, the central composite design (CCD) was utilized to determine the optimal fed-batch medium formulation: 6.8 g/L yeast extract, 7.5 g/L tryptone and 8.0 g/L corn steep liquor powder. Finally, the optimized process was verified in a 50 L bioreactor with the core regulation strategy of optimized fed-batch medium combined with precise control of dissolved oxygen and residual sugar. The results showed that the high-density culture of *E. coli* was achieved with OD_{600} reaching 100.2, and the volumetric production of SRT-ELP36 reached 2.52 g/L, which was a 33.3% increase compared with that before optimization. SRT-ELP36 existed as inclusion bodies in the bacterial precipitate, and a standardized SDS-PAGE semi-quantitative detection method was established. This study clarified the key nutritional regulation factors and their weight relationship for the high-density fermentation of SRT-ELP36, and established a scalable fed-batch fermentation process, which laid a technical foundation for the industrial production of SRT-ELP36 recombinant protein.

Key words: *Escherichia coli*; recombinant protein; response surface methodology; process optimization; high-density fermentation

（责任编辑：张欣）