

# 多细胞耦合转化 N-乙酰氨基葡萄糖和乳糖生产唾液酸乳糖

周文<sup>1</sup>, 游星<sup>1</sup>, 张洪涛<sup>1\*</sup>, 李忠霞<sup>2</sup>, 邓超明<sup>2</sup>, 许淳<sup>1</sup>, 黎玉<sup>1</sup>

1 江南大学生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 汤臣倍健营养健康研究院, 广东 广州 510623

周文, 游星, 张洪涛, 李忠霞, 邓超明, 许淳, 黎玉. 多细胞耦合转化 N-乙酰氨基葡萄糖和乳糖生产唾液酸乳糖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4621-4634.

ZHOU Wen, YOU Xing, ZHANG Hongtao, LI Zhongxia, DENG Chaoming, XU Chun, LI Yu. Multicellular coupling fermentation for 3'-sialyllactose conversion using N-acetyl-glucosamine and lactose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4621-4634.

**摘 要:** 唾液酸乳糖是母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)中含量最丰富的唾液酸化低聚糖之一, 对婴幼儿的健康发育有重要作用, 但是其目前缺乏高效、廉价的生产工艺。针对该问题, 本研究建立了多菌株两步法耦合生物合成唾液酸乳糖方法。第一步构建 2 株工程菌, 大肠杆菌 JM109(DE3)/pET28a-BT0453 和 JM109(DE3)/pET28a-nanA, 用于耦合合成中间产物 N-乙酰神经氨酸, 在 2 株工程菌株细胞生物量比为 1:1, 反应时间为 32 h 的条件下, 得到的 N-乙酰神经氨酸最高产量为 20.4 g/L。第二步向上述发酵液中添加大肠杆菌 JM109(DE3)/pET28a-neuA、JM109(DE3)/pET28a-nst 和面包酵母, 通过三菌株耦合发酵合成 3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL)。在底物 N-乙酰氨基葡萄糖、乳糖浓度均为 200 mmol/L, 面包酵母细胞生物量为 150 g/L, 辅因子  $Mg^{2+}$  浓度为 20 mmol/L 的优化条件下, 发酵 24 h, 发酵液中 3'-唾液酸乳糖的最高产量达到 55.04 g/L, 底物 N-乙酰氨基葡萄糖的转化率为 43.47%。研究结果为低成本生产 3'-唾液酸乳糖提供了一条新的技术路线。

**关键词:** 3'-唾液酸乳糖; N-乙酰氨基葡萄糖; 耦合发酵; 两步法合成; 母乳寡糖

资助项目: 国家博士后特别资助项目(2014T70472); 中国博士后科学基金(2012M20996); 江苏省博士后基金(1301011B); 解放军后勤保障部开放课题(ZZCWS21J2001); 汤臣倍健营养科学研究基金开放课题(TY202101096)

This work was supported by the National Postdoctoral Special Funding Project (2014T70472), the China Postdoctoral Science Foundation (2012M20996), the Jiangsu Province Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (1301011B), the Open Project of the Logistics Support Department of the People's Liberation Army (ZZCWS21J2001), and the BYHEALTH Nutrition & Health Research Foundation (TY202101096).

\*Corresponding author. E-mail: htzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-03-01; Accepted: 2023-04-27; Published online: 2023-05-09

# Multicellular coupling fermentation for 3'-sialyllactose conversion using N-acetyl-glucosamine and lactose

ZHOU Wen<sup>1</sup>, YOU Xing<sup>1</sup>, ZHANG Hongtao<sup>1\*</sup>, LI Zhongxia<sup>2</sup>, DENG Chaoming<sup>2</sup>, XU Chun<sup>1</sup>, LI Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> BYHEALTH Institute of Nutrition & Health, Guangzhou 510623, Guangdong, China

**Abstract:** Sialyllactose is one of the most abundant sialylated oligosaccharides in human milk oligosaccharides (HMOs), which plays an important role in the healthy development of infants and young children. However, its efficient and cheap production technology is still lacking presently. This study developed a two-step process employing multiple-strains for the production of sialyllactose. In the first step, two engineered strains, *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 and JM109(DE3)/pET28a-nanA, were constructed to synthesize the intermediate N-acetylneuraminic acid. When the ratio of the biomass of the two engineered strains was 1:1 and the reaction time was 32 hours, the maximum yield of N-acetylneuraminic acid was 20.4 g/L. In the second step, *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-neuA, JM109(DE3)/pET28a-nst and Baker's yeast were added to the above fermentation broth to synthesize 3'-sialyllactose (3'-SL). Using optimal conditions including 200 mmol/L N-acetyl-glucosamine and lactose, 150 g/L Baker's yeast, 20 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, the maximum yield of 3'-SL in the fermentation broth reached 55.04 g/L after 24 hours of fermentation and the conversion rate of the substrate N-acetyl-glucosamine was 43.47%. This research provides an alternative technical route for economical production of 3'-SL.

**Keywords:** 3'-sialyllactose; N-acetyl-glucosamine; coupled fermentation; two-step synthesis; human milk oligosaccharides

母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是母乳中天然存在的复合碳水化合物<sup>[1]</sup>,对婴幼儿的健康发育有着重要作用。母乳寡糖主要由岩藻糖基化的中性寡糖、非岩藻糖基化的中性寡糖和唾液酸化的酸性寡糖组成<sup>[2]</sup>。唾液酸乳糖是结构最简单的唾液酸寡糖<sup>[3]</sup>,根据唾液酸与乳糖结合位置的不同可分为3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL)和6'-唾液酸乳糖<sup>[4]</sup>。3'-唾液酸乳糖具有抗菌和抗炎活性,促进胃肠道微生物群落形成,从而保护新生儿免受病原体感染,有助于婴儿免疫系统和大脑的发育成熟,

从而改善其学习能力<sup>[5-9]</sup>,展现了唾液酸乳糖在婴儿配方奶粉中进行商业使用的巨大价值<sup>[10]</sup>。

正是由于唾液酸乳糖的重要生物学活性与功能,唾液酸化低聚糖的合成引起了人们的广泛关注,并发展了化学法、酶法和生物法等方法来合成唾液酸化低聚糖。由于化学合成涉及多个保护和去保护步骤,导致生产成本昂贵,并存在食品安全隐患等问题,不符合临床反应和食品配方的要求;酶法由于需要酶的纯化与提取步骤,价格同样不菲,而生物法避开了化学法和酶法的缺陷,成为了最为经济的合成方

法,目前科研和产业界在生物技术方法上投入了大量精力<sup>[11-12]</sup>。

生物法合成唾液酸乳糖时需要将唾液酸活化为胞苷三磷酸-N-乙酰神经氨酸(cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid, CMP-Neu5Ac)<sup>[13]</sup>,该过程需要消耗大量三磷酸胞苷(cytidine triphosphate, CTP)和 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)。由于 CTP 和 Neu5Ac 价格昂贵,使得直接用 CTP 和 Neu5Ac 来合成食品辅料 3'-唾液酸乳糖失去市场价值。针对以上缺陷,Endo 等<sup>[14]</sup>建立了由重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)和产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)耦合合成 CMP-Neu5Ac 的系统,该策略通过 *C. ammoniagenes* 利用三磷酸尿苷(uridine triphosphate, UTP)实现了胞嘧啶核苷酸(cytidylic acid, CMP)到 CTP 的再生,但仍然以 Neu5Ac 作为底物,使得生产成本高的问题依然存在<sup>[15]</sup>。Drouillard 等<sup>[16]</sup>在 CMP-Neu5Ac 合成体系中使用尿苷二磷酸-N-乙酰基葡萄糖胺(uridine 5'-diphospho-N-acetyl-glucosamine sodium, UDP-GlcNAc)和 Neu5Ac 醛缩酶合成 Neu5Ac,通过增加 *neuA*、*neuB*、*neuC* 基因的表达水平,大幅度提高 CMP-Neu5Ac 的产量,但由于 UDP-GlcNAc 价格非常昂贵,此方案依旧无法实现唾液酸乳糖的大规模生产<sup>[17]</sup>。因此,如何利用廉价底物从头高效合成唾液酸乳糖成为亟需解决的问题。

研究发现,使用全细胞催化可以实现由低值底物 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetyl-glucosamine, GlcNAc)到 Neu5Ac 的大规模合成<sup>[18-19]</sup>,酵母利用自身的酶系能有效地将 CMP 催化合成 CTP<sup>[20]</sup>,并且酵母具有来源广泛、生长周期短以及不能代谢 3'-SL 的底物乳糖的特点。因此,本研究将 GlcNAc 作为从头生产 3'-SL 的底物,加入酵母细胞实现 CMP 到 CTP 的循环再生,借鉴

两步酶法的合成概念<sup>[21]</sup>,提出了基于 5 菌株的两步法耦合发酵合成 3'-SL 的方案(图 1)。(1) 以 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 和 JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 中诱导表达的 N-乙酰-D-葡萄糖胺-2-差向异构酶(BT0453)和 N-乙酰神经氨酸裂解酶(*NanA*)催化实现 GlcNAc 向 Neu5Ac 的高效转化。(2) 通过基因工程菌株 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*neuA*、JM109(DE3)/pET28a-*nst* 和面包酵母以第一步的产物 Neu5Ac 为底物继续混菌耦合发酵,实现 3'-SL 的高效合成。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本实验中所用的菌株和质粒详见表 1。

#### 1.1.2 试剂和仪器

质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;限制性内切酶、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶,购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司;CMP、CTP、GlcNAc 和 ManNAc,购于杭州铠朋生物技术有限公司;Neu5Ac,本实验室合成;CMP-Neu5Ac、3'-SL,购于武汉糖智药业有限公司;其他为国产分析纯试剂。

PCR 仪、蛋白电泳仪,购于 Bio-Rad 公司;高效液相色谱仪,购于岛津公司;高速冷冻离心机,购于 Sigma 公司。

#### 1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母提取物 5, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。LB 琼脂平板(g/L):胰蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母提取物 5, 琼脂 20, pH 7.0。培养条件:将工程大肠杆菌接种到 LB 琼脂平板上,37 °C 培养 12 h。

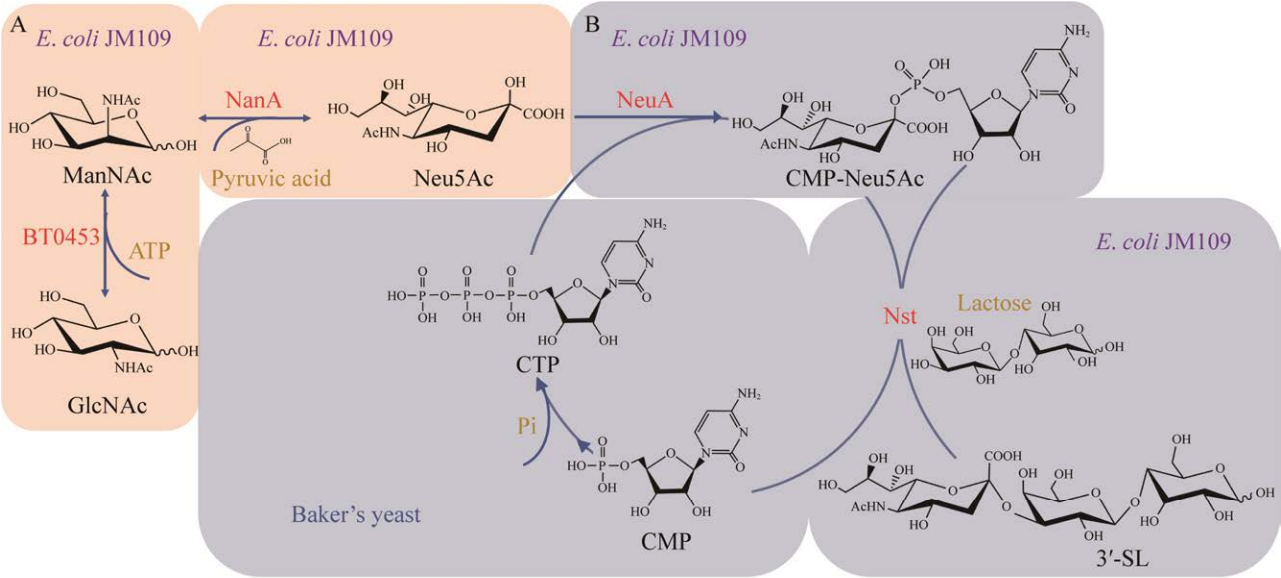


图 1 设计的多细胞两步法耦合合成唾液酸乳糖路线 A: 第一步以 GlcNAc 为底物, 利用 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 和 JM109(DE3)/pET28a-nanA 双菌耦合转化 Neu5Ac 的发酵途径(以橙色表示). B: 第二步以中间产物 Neu5Ac 为底物, 利用 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-neuA、JM109(DE3)/pET28a-nst 和面包酵母三菌耦合转化 3'-SL 的发酵途径(以灰色表示)

Figure 1 Designed strategy for sialyllactose synthesis. A: In the first step, GlcNAc is used as the substrate, and the fermentation pathway for the coupled transformation of Neu5Ac by *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 and JM109(DE3)/pET28a-nanA is shown in orange. B: In the second step, the intermediate product Neu5Ac is used as the substrate, and the fermentation pathway for the coupled transformation of 3'-SL by *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-neuA, JM109(DE3)/pET28a-nst and Baker's yeast is shown in grey.

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Features	Sources
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	Expressed strain	In this lab
Baker's yeast (CICIM Y7123)	CTP donor strain	In this lab
Beer yeast (CICIM Y7124)	CTP donor strain	In this lab
pET28a-neuA	Express CMP-Neu5Ac synthetase	In this lab
pET28a-nst	Express α-2,3-sialyltransferase	In this lab
pET28a-BT0453	Express N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase	Constructed in this study
pET28a-nanA	Express N-acetylneuraminic acid lyase	Constructed in this study

YEPD 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 酵母提取物 10, pH 5.5, 115 °C灭菌 20 min。培养条件: 将酵母细胞接种至 YEPD 培养基中, 30 °C、150 r/min 条件下培养 24 h, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 蒸馏水重悬

洗涤后离心备用。

## 1.2 方法

1.2.1 工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 与 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-nanA 的构建  
以多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotamicron*)

中 *BT0453* 基因(GenBank 登录号为 AAO75560.1) 序列和 *E. coli* str. K-12 中 *nanA* 基因(GenBank 登录号为 NC\_000913.3)序列为模板, 设计相应引物如表 2 所示, 分别进行 PCR 扩增。使用胶回收试剂盒对 PCR 产物纯化回收, 将纯化后的 PCR 产物与 pET28a 空质粒载体用同种限制性内切酶消化后连接, 并将连接产物分别转化到 *E. coli* JM109(DE3)。2 份转化液各取 150  $\mu$ L 以 Kan 为筛选标记进行平板涂布, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 菌落 PCR 验证正确后, 挑取单菌落摇瓶培养。提取重组质粒 pET28a-*BT0453* 和 pET28a-*nanA* 进行酶切验证, 并将这 2 种重组质粒送至天霖生物科技有限公司进一步测序鉴定。

### 1.2.2 重组蛋白的表达与鉴定

将构建的工程菌株接种至含 20 mg/L Kan 的 10 mL LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇瓶培养 12 h, 再按 3% (体积分数)的接种量转接至含 20 mg/L Kan 的 200 mL LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇瓶培养至  $OD_{600}$  约为 0.6 后, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 进行诱导, 16  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇瓶培养 20 h。诱导结束后, 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。将诱导前、后的菌液与蛋白上样缓冲液混匀, 100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 得到诱导前、后样品, SDS-PAGE 检测蛋白表达。验证成功诱导的工程菌株菌体用蒸馏水重悬洗涤后, 离心备用。

### 1.2.3 唾液酸乳糖的合成

五菌混菌耦合合成 3'-SL 的转化条件: 以 100 mmol/L GlcNAc、80 mmol/L 乳糖为底物, 在 500 mmol/L 丙酮酸钠、70 mmol/L CMP、300 mmol/L 葡萄糖、20 mmol/L  $MgCl_2$ 、20 g/L 甘油、250 mmol/L  $KH_2PO_4$ 、4 g/L 无水乙醇、1 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、150 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(trishydroxymethylaminomethane, Tris)、100 g/L 面包酵母(湿重)、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*BT0453*、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA*、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*neuA* 和 50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nst* (以上大肠杆菌菌体重量均为湿重)溶液中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 反应 32 h。

唾液酸乳糖的五菌株两步法合成: 双菌耦合合成 Neu5Ac 的转化条件(参考 Gao 等<sup>[22]</sup>): 以 100 mmol/L GlcNAc、500 mmol/L 丙酮酸钠为底物, 在 20 mmol/L  $MgCl_2$ 、1 mmol/L DTT、250 mmol/L  $KH_2PO_4$ 、20 g/L 甘油、150 mmol/L Tris、4 g/L 无水乙醇、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*BT0453* 和 50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 的溶液中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 反应 24 h。

三菌耦合合成 3'-SL 的转化条件: 取上述双菌耦合反应液 2 mL, 8 000 r/min 离心 5 min。上清液中继续添加 80 mmol/L 乳糖、70 mmol/L

表 2 用于克隆和表达的引物序列

Table 2 Primer sequences for cloning and expression

Primer name	Sequences (5'→3')	Size (bp)
BT0453-F	ACGCGTCGACTTACAGCGGCTCCAGGACTTTC	32
BT0453-R	CATGCCATGGACTTCAAGAACTGGCTAACCAGTACC	37
nanA-F	CATGCCATGGCTAGCGCTACTTTTACGGGTGTTATTCC	38
nanA-R	CGCCATATGTTACGCGGTATACAGGAATTCATCAACAATC	40

The underlined sequences are restriction enzyme cutting sites.

CMP、20 g/L 甘油、6 g/L 乙醛、300 mmol/L 葡萄糖、100 g/L 面包酵母(湿重)、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*neuA* 和 50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nst* (以上大肠杆菌菌体重量均为湿重), 溶液在 30 °C、200 r/min 反应 28 h。

### 1.2.4 中间产物 Neu5Ac 和唾液酸乳糖的分析检测

#### (1) Neu5Ac 的分析检测

薄层层析(thin-layer chromatography, TLC)检测: 展开剂为正丙醇:水: 25%氨水=7.5:3:2 (体积比)<sup>[23]</sup>。显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸显色剂(8 mL 苯胺、8 g 二苯胺、40 mL 85%磷酸溶于400 mL 丙酮中)<sup>[24]</sup>, 105 °C加热 10 min 显色。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测: 参考 Sabine 等<sup>[25]</sup>方法略有改动。色谱柱为 Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column (7.8 mm×300 mm), 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 进样量为 10 μL, 紫外检测波长为 210 nm, 柱温为 60 °C。

#### (2) 唾液酸乳糖的分析检测以及分离纯化

TLC 检测、HPLC 检测: 均参照(1) Neu5Ac 的分析检测。

分离纯化方法: 使用 HyperSep Hypercarb 固相萃取小柱(solid phase extraction column), 纯化过程如表 3 所示。

**表 3 SPE 小柱分离纯化唾液酸乳糖步骤**  
Table 3 Steps of separation and purification of sialyllactose by SPE column

Step	Column passing solution	Volume (mL)
Activation	Carbinol	3.0
Balance	ddH <sub>2</sub> O	3.0
Sample loading	Catalytic supernatant	0.5
Washing	ddH <sub>2</sub> O	1.0×3
Elution	80% acetonitrile (volume fraction)	0.5

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)分析: 将 1 μL 纯化后的待测样品和 1 μL 点样基质 2,5-二羟基苯甲酸(dihydroxybenzoic acid, DHB)含 Na<sup>+</sup>, 分别点样在靶板的同一位置, 混合均匀后干燥上机处理。质谱条件: 使用反射阳离子模式; 扫描分子量范围: 0–2 000 Da。

## 2 结果与分析

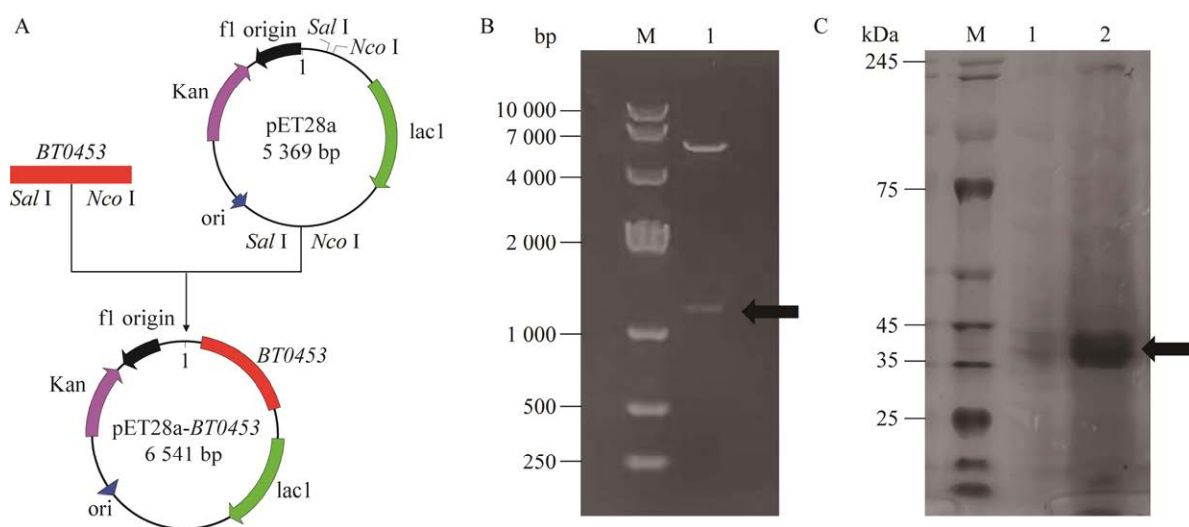
### 2.1 工程菌株的构建和蛋白的诱导表达

#### 2.1.1 工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 的构建及 BT0453 的诱导表达

以 *B. thetaiotamicron* 基因组为模板, 经 PCR 扩增后得到带有 *Sal* I 与 *Nco* I 酶切位点的 *BT0453* 基因, 将该基因片段与 pET28a 载体连接(图 2A)。重组质粒 pET28a-*BT0453* 经酶切验证, 在 1 100 bp 左右有明显条带(图 2B), 与基因大小为 1 172 bp 的 *BT0453* 相一致。进一步经测序验证后, 将重组质粒 pET28a-*BT0453* 转入 *E. coli* JM109(DE3)中得到工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*BT0453*, 用 IPTG 诱导 N-乙酰-D-葡萄糖胺-2-差向异构酶(BT0453)的表达, 诱导后的全细胞在 42 kDa 左右有明显的蛋白表达条带(图 2C), 大小与目标蛋白(41.8 kDa)一致, 说明 BT0453 在工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*BT0453* 中成功表达。

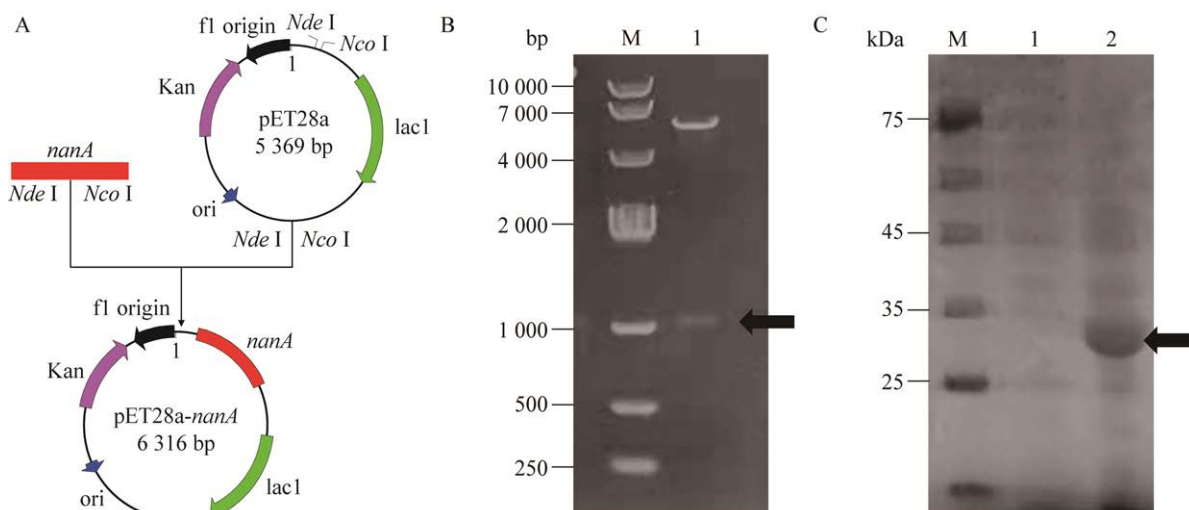
#### 2.1.2 工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 的构建及 NanA 的诱导表达

以 *E. coli* str.K-12 基因组为模板, 经 PCR 扩增后得到带有 *Nco* I 和 *Nde* I 酶切位点的 *nanA* 基因, 将该基因片段与 pET28a 载体连接(图 3A)。重组质粒 pET28a-*nanA* 经酶切验证, 在 1 000 bp 左右有明显条带(图 3B), 与基因大小为 947 bp 的 *nanA* 相吻合。经测序验证后, 将重组质粒



**图 2 重组质粒 pET28a-BT0453 的构建流程图和电泳图** A: 重组质粒 pET28a-BT0453 构建流程图. B: 重组质粒 pET28a-BT0453 双酶切图. M: 10 000 DNA 分子量标准; 1: 双酶切后重组质粒. C: 重组质粒 pET28a-BT0453 SDS-PAGE 图. M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前全细胞; 2: 诱导 20 h 全细胞

Figure 2 Construction flow chart and electrophoresis map of recombinant plasmid pET28a-BT0453. A: Flow chart of construction of recombinant plasmid pET28a-BT0453. B: Double-enzyme digestion diagram of recombinant plasmid pET28a-BT0453. M: 10 000 DNA marker; 1: Recombinant plasmid after double enzyme digestion. C: SDS-PAGE diagram of recombinant plasmid pET28a-BT0453. M: Protein marker; 1: Whole cells before induction; 2: Induce whole cells for 20 hours.



**图 3 重组质粒 pET28a-nanA 的构建流程图和电泳图** A: 重组质粒 pET28a-nanA 构建流程图. B: 重组质粒 pET28a-nanA 双酶切图. M: 10 000 DNA 分子量标准; 1: 双酶切后重组质粒. C: 重组质粒 pET28a-nanA SDS-PAGE 图. M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前全细胞; 2: 诱导 20 h 全细胞

Figure 3 Construction flow chart and electrophoresis map of recombinant plasmid pET28a-nanA. A: Flow chart of construction of recombinant plasmid pET28a-nanA. B: Double-enzyme digestion diagram of recombinant plasmid pET28a-nanA. M: 10 000 DNA marker; 1: Recombinant plasmid after double enzyme digestion. C: SDS-PAGE diagram of recombinant plasmid pET28a-nanA. M: Protein marker; 1: Whole cells before induction; 2: Induce whole cells for 20 hours.



pET28a-*nanA* 转入 *E. coli* JM109(DE3)中得到工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA*, 用 IPTG 诱导 N-乙酰神经氨酸裂解酶(NanA)的表达, 诱导后的全细胞在 33 kDa 左右有明显的蛋白表达条带(图 3C), 大小与目标蛋白(33.4 kDa)一致, 说明 NanA 在工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 中成功表达。

## 2.2 五菌株混菌发酵法合成唾液酸乳糖

为实现多细胞耦合转化唾液酸乳糖, 首先采用五菌株一步法合成策略, 将 4 株工程菌株按照 50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nanA*、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*neuA*、50 g/L *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*nst* 与面包酵母按照 100 g/L 浓度进行混菌耦合发酵, 并在不同时间段取样进行 TLC 检测, 发酵液组分中存在与标准品 3'-SL 的比移值(retention factor value,  $R_f$ )相同的条带(图 4A)。进一步通过 HPLC 进行定量, 当反应时间为 28 h 时, 3'-SL 产量最高, 为 4.69 g/L, 此时底物 GlcNAc 的摩尔转化率为 7.41% (图 4B)。

## 2.3 多细胞两步法耦合发酵合成唾液酸乳糖体系的建立

鉴于五菌一步法合成 3'-SL 产量仅有 4.69 g/L, 为充分利用底物 GlcNAc, 提高其转化率, 采用两步法合成唾液酸乳糖: 第一步, 双菌耦合发酵合成 Neu5Ac; 第二步, 三菌耦合发酵合成 3'-SL。

### 2.3.1 以 N-乙酰氨基葡萄糖为底物双菌耦合合成唾液酸体系的建立

首先以 GlcNAc 为底物, *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 和 JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 双菌耦合合成中间产物 Neu5Ac, 对发酵液进行 HPLC 分析, 可以看出产物的出峰时间与 Neu5Ac 标品相同(图 5A), 表明两菌株耦合发酵合成唾液酸。为进一步提高 Neu5Ac 的产量, 对反应时间以及添加的双工程菌株的细胞生物量进行优化, 在 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-BT0453 和 JM109(DE3)/pET28a-*nanA* 细胞生物量比为 1:1, 反应 32 h 时, 得到 Neu5Ac 最高产量为 20.4 g/L, 底物 GlcNAc 转化率为 65.98% (图 5B)。

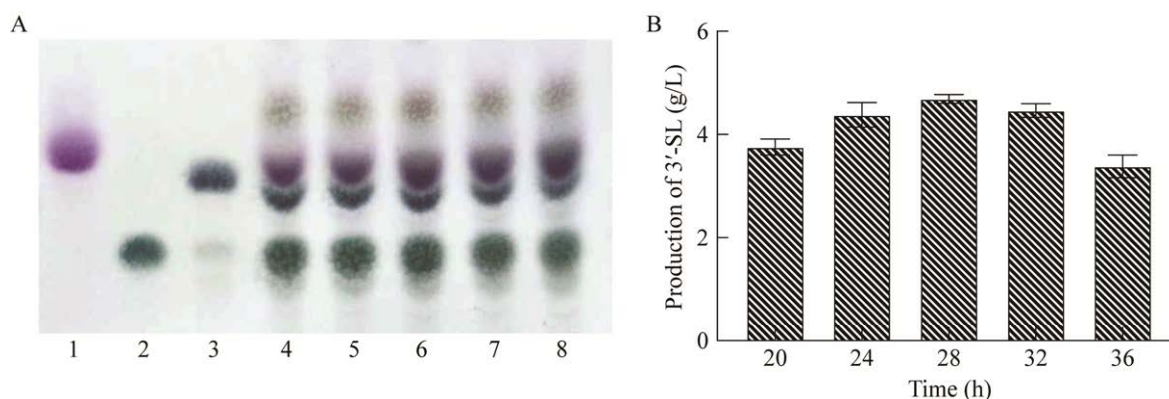


图 4 不同反应时间对五菌一步法耦合合成 3'-SL 的影响 A: 五菌株一步法耦合发酵产物的 TLC 分析图. 1: Neu5Ac 标品; 2: 乳糖标品; 3: 3'-SL 标品; 4-8: 五菌耦合 20、24、28、32、36 h 发酵产物. B: 3'-SL 产量图

Figure 4 Effect of different reaction time on the synthesis of 3'-SL by one-step coupling method of five strains. A: TLC analysis diagram of the fermentation products of five strains coupled in one-step. 1: Neu5Ac standard; 2: Lactose standard; 3: 3'-SL standard; 4-8: Fermentation products (at 20, 24, 28, 32, 36 h, respectively) of five strains coupled in one-step. B: Production of 3'-SL.



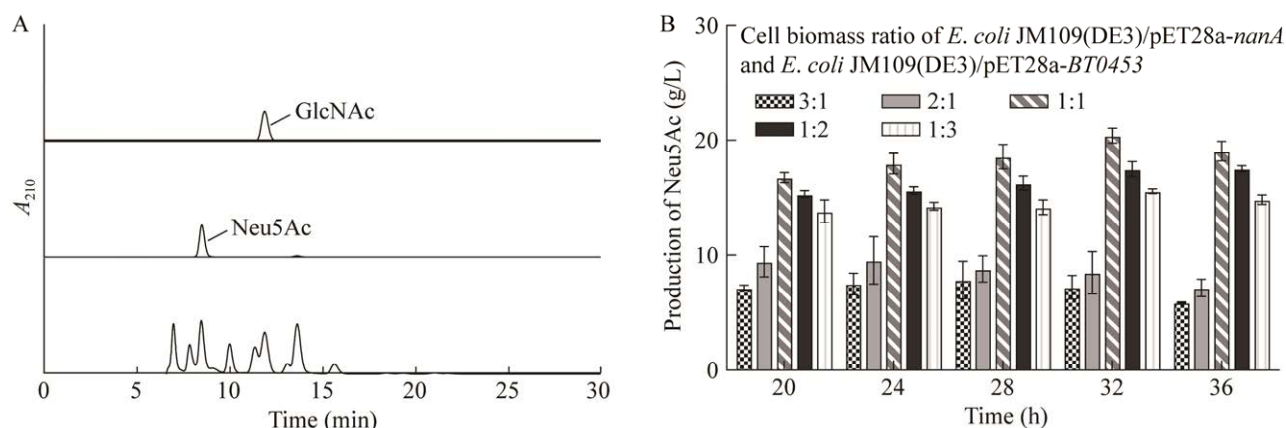


图 5 Neu5Ac 的检测及合成影响因素优化 A: 从上到下依次为标品 GlcNAc 液相图、标品 Neu5Ac 液相图、双菌耦合发酵产物液相图. B: 双菌耦合合成 Neu5Ac 的条件优化

Figure 5 Detection and optimization of influencing factors for synthesis of Neu5Ac. A: From top to bottom, HPLC fingerprint spectrums of GlcNAc standard sample, Neu5Ac standard sample and two-strain coupled fermentation product are listed. B: Optimization of Neu5Ac synthesis by two-strain coupled fermentation.

### 2.3.2 三菌耦合发酵合成 3'-SL

在两工程菌株耦合合成唾液酸的基础上, 进行第二步混菌耦合发酵。在第二步反应中添加了 2 株工程菌株 *E. coli* JM109(DE3)/pET28a-*neuA*、JM109(DE3)/pET28a-*nst* 和面包酵母, 以及合成 3'-SL 的另一底物乳糖继续进行耦合发酵, 辅因子用廉价的 CMP 代替昂贵的 CTP 实现再生循环。经 28 h 的耦合发酵后, 用 SPE 小柱对 28 h 发酵产物进行纯化, 可以看出发酵液中 Neu5Ac 和乳糖没有被利用完全, 纯化后的组分(图 6A, 第 8 泳道)与标准品 3'-SL 的  $R_f$  相同(图 6A), 但其中仍存在乳糖, 因为 80% 乙腈既可以洗脱酸性寡糖也可以洗脱中性寡糖, 这与 Packer 等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。然后采用 HPLC 对发酵上清液进行分析, 多细胞耦合发酵液中存在与标准 3'-SL 出峰时间相同的产物, 发酵液中 3'-SL 的浓度为 10.59 g/L (图 6B)。

纯化后的产物继续采用 MALDI-TOF-MS 分析检测, 所得的质谱谱图如图 7 所示, 对应产物 3'-SL 的分子离子峰在  $m/z=656.236$   $[M+Na]^+$ ,

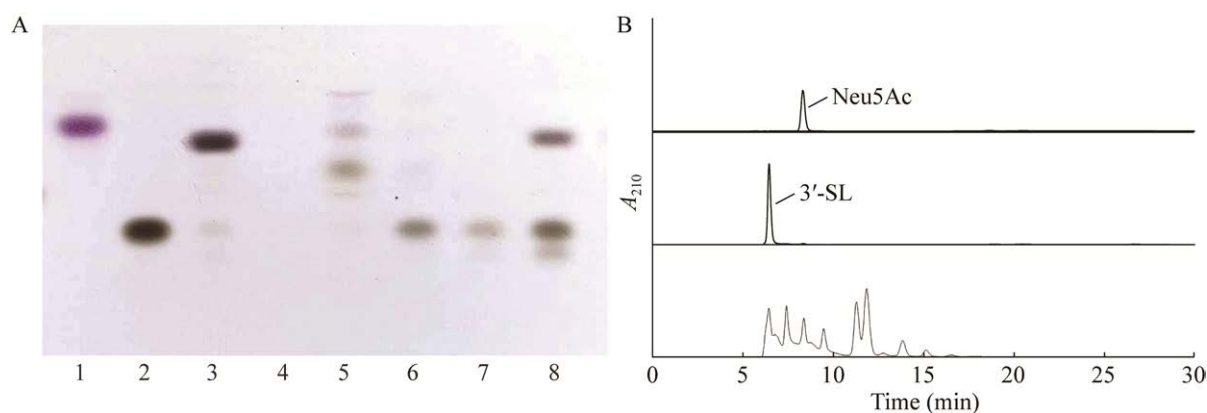
$m/z=678.223$   $[M+2Na-H]^+$ 。表明以 GlcNAc、CMP 和乳糖为底物, 在五菌株两步法耦合发酵条件下成功合成 3'-SL。

### 2.4 两步法耦合发酵合成唾液酸乳糖的发酵体系优化

为实现 3'-SL 高效合成, 对耦合发酵中参与反应的酵母种类、底物 GlcNAc 和乳糖浓度、酵母细胞生物量以及辅因子  $Mg^{2+}$  的浓度进行单因素催化条件优化(图 8)。

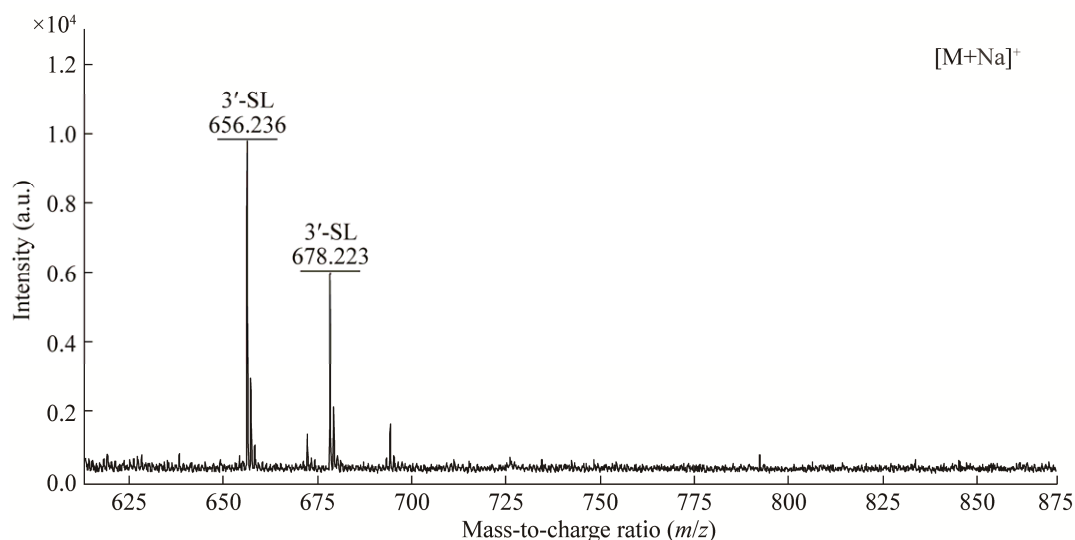
不同种类酵母对 CTP 的再生合成能力直接影响了 3'-SL 的产率。在不同反应时间下, 面包酵母参与反应时 3'-SL 的产量均优于啤酒酵母参与反应时 3'-SL 的产量。第二步发酵时间为 24 h 时, 采用面包酵母的实验组得到最大的 3'-SL 产量, 为 13.58 g/L (图 8A)。因此选择面包酵母(CICIM Y7123)参与 3'-SL 的合成体系。

在确定酵母菌株后, 以上述发酵体系为基础, 进一步探索底物 GlcNAc 和乳糖浓度对 3'-SL 合成的影响, 底物 GlcNAc 的浓度为 250 mmol/L 时, 3'-SL 的产量最高, 但底物转化率骤然降低,



**图 6 3'-SL 的检测** A: 发酵产物纯化后的 TLC 分析图. 1: Neu5Ac 标品; 2: 乳糖标品; 3: 3'-SL 标品; 4: 流穿; 5-7: 水洗 3 次; 8: 纯化后. B: 从上到下依次为标品 Neu5Ac 液相图、标品 3'-SL 液相图、五菌株两步法耦合发酵产物液相图

Figure 6 Detection of 3'-SL. A: TLC analysis diagram of purified fermentation product. 1: Neu5Ac standard; 2: Lactose standard; 3: 3'-SL standard; 4: Flow through; 5-7: Wash three times; 8: After purification. B: From top to bottom are HPLC fingerprint spectrums of Neu5Ac standard sample, 3'-SL standard sample and the fermentation product of five strains coupled in two-step are listed.



**图 7 3'-SL 的 MALDI-TOF-MS 分析**

Figure 7 Analysis of 3'-SL by MALDI-TOF-MS.

为提高底物利用率,选取 200 mmol/L 为 GlcNAc 的最佳反应浓度(图 8B)。以此为基础,研究了乳糖添加量对 3'-SL 产量的影响,在反应体系中添加的乳糖浓度从 80 mmol/L 增加到 280 mmol/L 过程中,3'-SL 的最高产量达到 45.4 g/L,最高

底物转化率为 35.66% (图 8C),因此确定底物 GlcNAc 和乳糖的最优添加量均为 200 mmol/L。

在确定酵母种类、GlcNAc 和乳糖最优底物浓度后,进一步研究了酵母菌体浓度对反应体系中 3'-SL 产量的影响,3'-SL 产量随着酵母菌

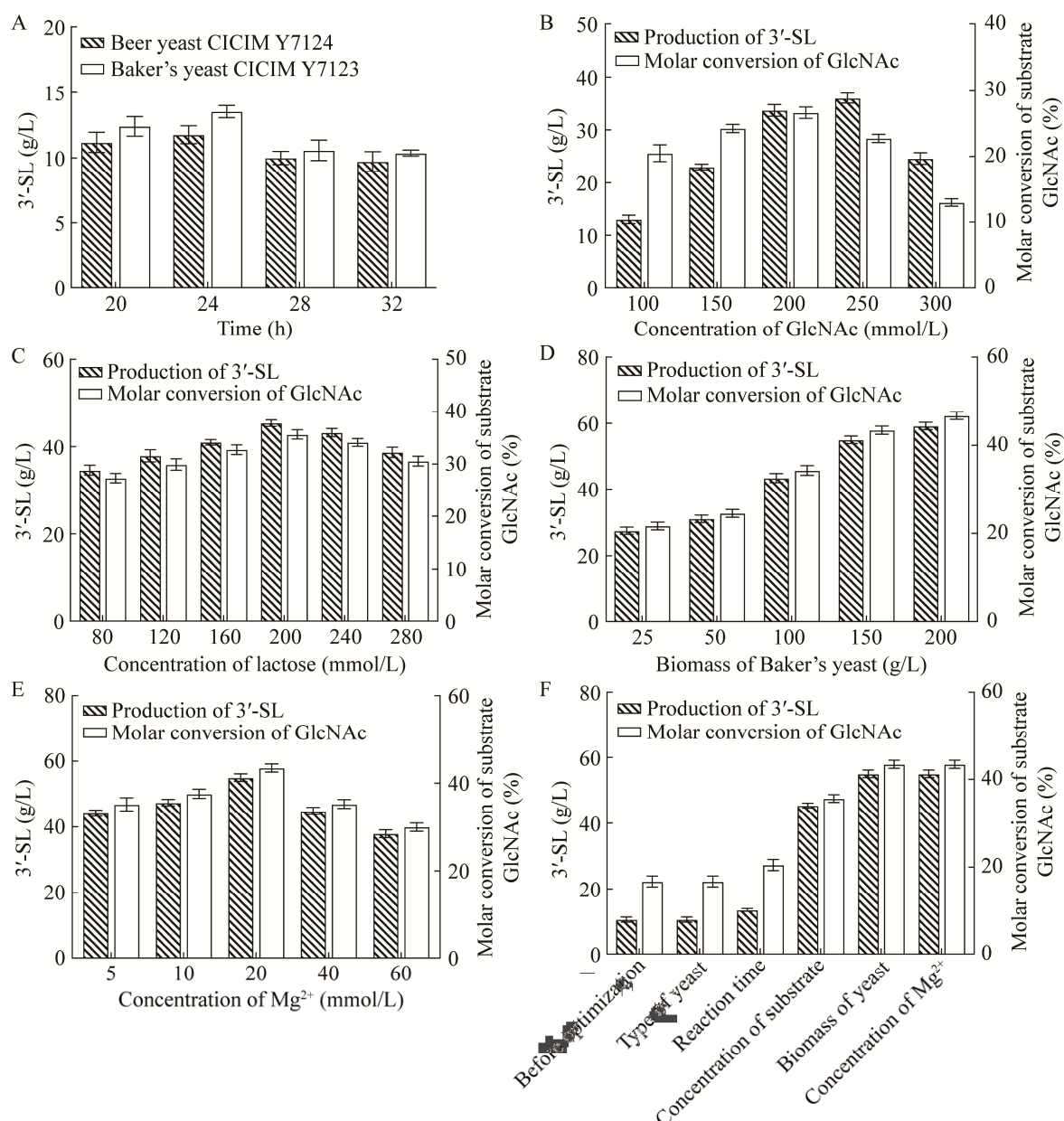


图 8 不同因素对五菌株两步法耦合合成 3'-SL 的影响 A: 酵母种类. B: 底物 GlcNAc 浓度. C: 底物乳糖浓度. D: 酵母菌体浓度. E:  $Mg^{2+}$  浓度. F: 优化前后 3'-SL 产率对比

Figure 8 Effects of different factors on the coupled synthesis of 3'-SL by five strains in two steps. A: Yeast species. B: Concentration of substrate GlcNAc. C: Concentration of substrate lactose. D: Biomass of Baker's yeast. E: Concentration of  $Mg^{2+}$ . F: Comparison of 3'-SL yield before and after optimization.

株浓度增加而增加, 体系中面包酵母添加量达到 150 g/L 时, 3'-SL 产量不再明显增加(图 8D), 为降低发酵系统负荷, 实现 3'-SL 经济生产, 选用 150 g/L 面包酵母添加量, 此时 3'-SL 最高产量

达到 55.04 g/L, 底物 GlcNAc 转化率为 43.47%。

研究表明金属离子对酶的活性有着明显的影响。N-乙酰-D-葡萄糖胺-2-差向异构酶(BT0453)与 CMP-Neu5Ac 合成酶(NeuA)发挥其催化活性

需要金属离子的参与,尤其是  $Mg^{2+}$  [27-28],因此,在上述优化条件基础上,进一步考察了不同浓度  $Mg^{2+}$  对工程菌株合成 3'-SL 的影响。在  $Mg^{2+}$  浓度低于 20 mmol/L 时,3'-SL 的产量随之升高,当  $Mg^{2+}$  浓度为 20 mmol/L 时,发酵液中 3'-SL 的浓度达到最高为 55.04 g/L,底物转化率为 43.47%。 $Mg^{2+}$  超过此浓度,3'-SL 的产量逐渐降低(图 8E)。故选择 20 mmol/L 为最佳  $Mg^{2+}$  浓度。

经过发酵条件优化,3'-SL 的产量由优化前的 10.59 g/L 增加到 55.04 g/L,底物转化率由 16.73% 升高至 43.47% (图 8F)。

### 3 讨论与结论

近年来,3'-SL 作为具有重要生物学功能的 HMOs 之一,其合成工艺成为合成生物学领域的研究热点。目前,3'-SL 虽然可以通过不同的途径和底物转化而成,但其产率和生产成本仍有改善空间。在单工程菌合成 3'-SL 方面,2021 年, Li 等 [29] 开发了一种单工程菌全细胞多酶系统,包含来自 *N. gonorrhoeae* 的  $\alpha$ -2,3 唾液酸转移酶、来自 *N. meningitides* 的 N-酰基神经氨酸胞苷基转移酶以及来自 *E. coli* 的聚磷酸激酶和胞苷酸激酶。以 Neu5Ac、乳糖作为底物,3'-SL 的最终产量达到 33.5 g/L。2022 年, Zhang 等 [30] 通过基于质粒的代谢途径优化和基因组整合策略,将  $\alpha$ -2,3 唾液酸转移酶的编码基因与 CMP-Neu5Ac 合成途径基因导入 *E. coli* BL21(DE3) 中,以甘油和乳糖为底物,在摇瓶和 5 L 生物反应器中分别获得 4.5 g/L 和 23.1 g/L 的 3'-SL。目前 Neu5Ac 价格昂贵(3 800 元/kg),而国外商业化的 3'-SL 价格达到 100 美元/kg,因此,将 Neu5Ac 作为发酵底物用于食品添加剂 3'-SL 的发酵合成是极其不经济的,在此背景下,提出以 GlcNAc 和乳糖为底物合成 3'-SL 的方案。考虑到这是一个多酶协同催化的过程,

在单一细胞内,如何实现多酶表达的最优比是一个挑战性难题,因此,本研究通过在单一细胞内表达单酶的方式将酶“固定化”(共计 4 个酶),结合 CTP 再生的酵母细胞,共计 5 个细胞来实现最优的 3'-SL 合成。五菌混合催化时,产量仅为 4.69 g/L,这可能是由于五菌混合发酵时菌浓过高,造成溶氧等供给不足。因此,采用双菌+三菌的两步法发酵策略:第一步双菌发酵主要以 GlcNAc 为底物实现 Neu5Ac 的高效合成;第二步将第一步获得的 Neu5Ac 作为底物,供三菌耦合发酵获得 3'-SL,在此策略下 3'-SL 的产量达到 55.04 g/L,这是目前已知的 3'-SL 最高产量报道。

目前欧美公司的专利主要集中于单菌发酵合成 3'-SL,我国科研和产业界为避开欧美公司的专利壁垒,有必要开展非单菌发酵合成 3'-SL 的研究。此外,单工程菌多酶系合成 3'-SL 时,无法使每个酶的活性和表达量达到最优,而单一细胞表达单酶,可以通过控制细胞的添加量来实现酶的最优添加。基于以上产业背景,本研究开启对非单菌发酵合成 3'-SL 的探索。但是目前的混菌发酵系统存在工程菌株的数量相对较多、控制压力大的问题,因此,后续考虑通过引入共表达质粒实现多个基因在工程菌中共表达的策略,达到减少菌株数量的目的。

本研究建立的“五菌株两步法耦合发酵”合成 3'-SL 体系,实现了以低值 GlcNAc 和乳糖为底物高效转化高值唾液酸乳糖的目的,为 3'-SL 的廉价、大规模合成提供新的思路。

### REFERENCES

- [1] CSERNAK O, RACZ B, ALBERTI A, BENI S. Quantitative analysis of 3'- and 6'-sialyllactose in human milk samples by HPLC-MS/MS: a validated method for the comparison of two consecutive lactation periods in the same woman[J]. Journal of

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 184: 113184.
- [2] ASAKUMA S, AKAHORI M, KIMURA K, WATANABE Y, NAKAMURA T, TSUNEMI M, ARAI I, SANAI Y, URASHIMA T. Sialyl oligosaccharides of human colostrum: changes in concentration during the first three days of lactation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(6): 1447-1451.
  - [3] FUHRER A, SPRENGER N, KURAKEVICH E, BORSIG L, CHASSARD C, HENNET T. Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(13): 2843-2854.
  - [4] LI ZK, NI ZJ, CHEN XS, WANG G, WU JY, YAO JM. Multi-enzymatic cascade one-pot biosynthesis of 3'-sialyllactose using engineered *Escherichia coli*[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(16): 3567.
  - [5] KELLY V, DAVIS S, BERRY S, MELIS J, SPELMAN R, SNELL R, LEHNERT K, PALMER D. Rapid, quantitative analysis of 3'- and 6'-sialyllactose in milk by flow-injection analysis-mass spectrometry: screening of milks for naturally elevated sialyllactose concentration[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(12): 7684-7691.
  - [6] DVORAK B. Milk epidermal growth factor and gut protection[J]. The Journal of Pediatrics, 2010, 156(2): S31-S35.
  - [7] GUARALDI F, SALVATORI G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012, 2: 94.
  - [8] TEN BRUGGENCATE SJ, BOVEE-OUDEHOFEN IM, FEITSMA AL, van HOFFEN E, SCHOTERMAN MH. Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides[J]. Nutrition Reviews, 2014, 72(6): 377-389.
  - [9] WANG B, BRAND-MILLER J. The role and potential of sialic acid in human nutrition[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2003, 57(11): 1351-1369.
  - [10] BYCH K, MIKŠ MH, JOHANSON T, HEDEROS MJ, VIGSNÆS LK, BECHER P. Production of HMOs using microbial hosts—from cell engineering to large scale production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 130-137.
  - [11] FIERFORT N, SAMAIN E. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 134(3/4): 261-265.
  - [12] ALATORRE-SANTAMARÍA S, CRUZ A, GONZÁLEZ-OLIVARES L, BAUTISTA M, CASTAÑEDA A, PÉREZ-ESCALANTE E. Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: recent advances and trends in synthetic methods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 62(1): 181-214.
  - [13] KNORST M, FESSNER WD. CMP-sialate synthetase from *Neisseria meningitidis*-overexpression and application to the synthesis of oligosaccharides containing modified sialic acids[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2001, 343(6/7): 698-710.
  - [14] ENDO T, KOIZUMI S, TABATA K, OZAKI A. Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(3): 257-261.
  - [15] LEE SG, LEE JO, YI JK, KIM BG. Production of cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid using recombinant *Escherichia coli* as a biocatalyst[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 80(5): 516-524.
  - [16] DROUILLARD S, MINE T, KAJIWARA H, YAMAMOTO T, SAMAIN E. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(10): 1394-1399.
  - [17] LU MY, MOSLEH I, ABBASPOURRAD A. Engineered microbial routes for human milk oligosaccharides synthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(5): 923-938.
  - [18] TAO F, ZHANG YN, MA CQ, XU P. One-pot bio-synthesis: N-acetyl-D-neuraminic acid production by a powerful engineered whole-cell catalyst[J]. Scientific Reports, 2011, 1: 142.
  - [19] ZHANG XL, WANG CY, LV XQ, LIU L, LI JH, DU GC, WANG M, LIU YF. Engineering of synthetic multiplexed pathways for high-level N-acetylneuraminic acid bioproduction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(49): 14868-14877.
  - [20] MCDONOUGH VM, BUXEDA RJ, BRUNO ME, OZIER-KALOGEROPOULOS O, ADELINE MT, MCMASTER CR, BELL RM, CARMAN GM.

- Regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by CTP[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(32): 18774-18780.
- [21] REN Y, WU H, LI XF, LAI FR, ZHAO GL, XIAO XL. A two-step, one-pot enzymatic method for preparation of duck egg white protein hydrolysates with high antioxidant activity[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1227-1240.
- [22] GAO XY, ZHANG FF, WU M, WU M, WU ZX, SHANG GD. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by whole cells expressing *Bacteroides thetaiotaomicron* N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid aldolase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(22): 6285-6291.
- [23] GUO Y, JERS C, MEYER AS, ARNOUS A, LI HY, KIRPEKAR F, MIKKELSEN JD. A *Pasteurella multocida* sialyltransferase displaying dual trans-sialidase activities for production of 3'-sialyl and 6'-sialyl glycans[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 170: 60-67.
- [24] 张瑞英, 胡岚岚, 武金霞. 单糖薄层层析实验的改进[J]. 实验室科学, 2012, 15(5): 45-46, 49.  
ZHANG RY, HU LL, WU JX. Improvement of the thin layer chromatography of monosaccharide[J]. Laboratory Science, 2012, 15(5): 45-46, 49 (in Chinese).
- [25] SABINE S, MANUEL E, GROSS BS, BARBARA P, JÜRGEN K, BERND N. Engineering analysis of multienzyme cascade reactions for 3'-sialyllactose synthesis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(11): 4290-4304.
- [26] PACKER NH, LAWSON MA, JARDINE DR, REDMOND JW. A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins[J]. Glycoconjugate Journal, 1998, 15(8): 737-47.
- [27] MARU I, OHNISHI J, OHTA Y, TSUKADA Y. Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetylneuraminic acid lyase[J]. Carbohydrate Research, 1998, 306(4): 575-578.
- [28] LEE YC, CHIEN HC R, HSU WH. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant whole cells expressing *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid lyase[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(3): 453-460.
- [29] LI ZK, CHEN XS, NI ZJ, YUAN LX, SUN LJ, WANG Y, WU JY, YAO JM. Efficient production of 3'-sialyllactose by single whole-cell in one-pot biosynthesis[J]. Processes, 2021, 9(6): 932.
- [30] ZHANG JM, ZHU YY, ZHANG WL, MU W. Efficient production of a functional human milk oligosaccharide 3'-sialyllactose in genetically engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2837-2845.

(本文责编 郝丽芳)