

生物转化合成 N-乙酰神经氨酸的关键因素

朱德强, 詹晓北*, 吴剑荣, 郑志永, 赵忠胜, 王永远

(江南大学, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在前期工作中已构建了一株能以外源 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和胞内磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为底物, 生物转化合成 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)的重组大肠杆菌, 但其合成 Neu5Ac 的效率有待进一步提高。通过调整生物转化阶段培养基中氮源和碳源的组成, 探寻 Neu5Ac 合成过程中的关键限制性因素。结果表明, 增加唾液酸合成酶 NeuB 活性的措施没有提高 Neu5Ac 的产率, 而底物之一胞内 PEP 的供给不足是限制 Neu5Ac 合成的关键性因素。通过限制转化培养基中的氮源, 抑制重组大肠杆菌的生长, 避免了 PEP 被用于细胞自身生长而更多地流向 Neu5Ac 合成方向; 通过改用不依赖 PTS 跨膜转运系统的甘油作为碳源, 在甘油/无氮转化培养基中 Neu5Ac 合成量最终达到 (4.42 ± 0.08) g/L, 比初始合成条件高出 10.3 倍。

关键词: 唾液酸; N-乙酰神经氨酸; 磷酸烯醇式丙酮酸; N-乙酰氨基葡萄糖; 全细胞生物转化
中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)04-0064-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.010

Key Limiting Factors for the Whole-Cell Synthesis of N-Acetyl Neuraminic Acid by Recombinant *Escherichia coli*

ZHU Deqiang, ZHAN Xiaobei*, WU Jianrong, ZHENG Zhiyong, ZHAO Zhongsheng, WANG Yongyuan

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: We constructed a recombinant *Escherichia coli* which could synthesize Neu5Ac with exogenous GlcNAc as sole substrate in previous work. Various nitrogen and carbon sources were used to investigate their effects on the production of Neu5Ac, and the key limiting factors in influencing the whole process were revealed. It was shown that the increase of NeuB activity could not improve the Neu5Ac yield and the NeuB activity was not the limiting factor. The intracellular PEP was supposed to be the limiting factor for Neu5Ac production. The intracellular PEP was saved and shifted to the synthesis of Neu5Ac by adjusting the nitrogen source and restraining the cell growth. In addition, by using glycerol as sole carbon source which was PTS-independent, Neu5Ac synthesis in the glycerol/nitrogen-free medium reached (4.42 ± 0.08) g/L, 10.3 times higher than the initial synthesis conditions.

Keywords: sialic acid, Neu5Ac, phosphoenolpyruvate, GlcNAc, whole-cell catalysis

收稿日期: 2016-07-24

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA021505); 中国博士后科学基金项目(2012M520996)。

* 通信作者: 詹晓北(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物多糖和生物反应器研究。E-mail: xbzhan@yahoo.com

引用本文: 朱德强, 詹晓北, 吴剑荣, 等. 生物转化合成 N-乙酰神经氨酸的关键因素[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 64-70.

唾液酸(Sialic acid)是一类含有 9 个碳原子并具有吡喃糖结构的酸性氨基糖,又称为神经氨酸,系统名为 5-氨基-3,5-二脱氧-D-甘油-D-半乳壬酮糖。唾液酸最初是由 Blix 和 Klenk 从颌下腺粘蛋白和脑脂中提取出来的,随着 3-脱氧-D-甘油-D-半乳壬酮糖(KDN)的发现,唾液酸的定义得到拓展,迄今为止已经发现了 50 多种^[1]。唾液酸在自然界中分布广泛,多发现于后口动物及某些细菌中。唾液酸常常占据细胞膜表面糖链的末端,在细胞粘附、信号传导和细胞分化等生理活动中起到重要作用^[2]。N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)是最常见的一种唾液酸,也是多种唾液酸合成的前体物质,与人类健康关系密切^[3];Neu5Ac 还是抗病毒药物的潜在前体物质,用于治疗 H1N1 和 H5N1 流感。此外,Neu5Ac 也有很大的营养价值,它能促进婴儿的大脑发育,对维持早产儿脑功能和健康有积极作用^[4]。

在前期的研究中,我们构建了一株重组大肠杆菌(*E. coli* SA-04/pDTrc-AB),通过将 GlcNAc-2-epimerase(bAGE)^[5-6]和 sialic acid synthase(cNeuB)^[7-8]的共表达、GlcNAc 跨膜运输系统的修饰以及 Neu5Ac 分解代谢途径的敲除,使得该重组大肠杆菌能够以胞内磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为能量来源,以 GlcNAc 为单一底物,生物转化合成 Neu5Ac;同时,避免了传统细胞催化合成 Neu5Ac 需要大量丙酮酸(pyruvate)的缺陷,具有很大经济和环境友好优势。

在该重组大肠杆菌的培养过程中,我们发现菌体大量生长,胞内酶活性保持较高水平,而 Neu5Ac 合成产率却较低。因此,本研究以重组大肠杆菌 *E. coli* SA-04/pDTrc-AB 为对象,考察生物转化环境中的碳源和氮源对重组大肠杆菌生理和 Neu5Ac 合成的影响,探讨 Neu5Ac 合成过程中的内在关键限制性因素,以期实现重组大肠杆菌高效快速合成 Neu5Ac。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

重组大肠杆菌 *E. coli* SA-04/pDTrc-AB 由本实验室在前期工作中构建:以 *E. coli* K-12 MG1655 为出发菌株,敲除其基因组中的 *nagE* 基因和 *manXYZ*、*nanATEK* 基因簇,并将来源于 *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 中的 *neuB* 基因

(*cneuB*) 和源于 *Anabaena* sp. CH1 的 AGE 基因(*bage*)克隆到 pTrc99a 载体,分别加上 *trc* 启动子实现了 2 个基因在大肠杆菌中的共表达。

Neu5Ac 标准品购自 Sigma-Aldrich 公司;其他试剂购自上海国药。

1.2 生物转化合成 Neu5Ac 流程

双阶段生物转化合成 Neu5Ac 流程见图 1。菌体生长阶段,待细胞浓度上升后添加诱导剂 IPTG,诱导胞内酶的表达;生物转化阶段,将菌体收集浓缩后悬浮于添加了底物 GlcNAc 的转化培养基,同时转化培养基中含有必要的营养物质以维持细胞活性。

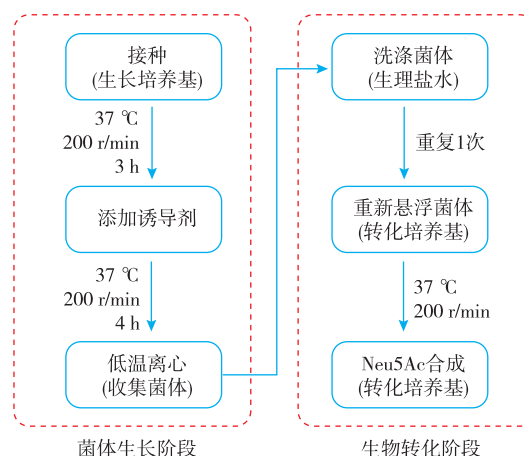


图 1 全细胞生物转化合成 Neu5Ac 流程图

Fig. 1 Flow chart of whole-cell synthesis of Neu5Ac

1.2.1 菌体生长阶段 在菌体生长阶段,所用培养基为 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L,酵母 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH 7.0),添加氨苄青霉素(终质量浓度 100 mg/L),接种于 500 mL 摇瓶中,置于 37 °C 摇床(200 r/min)中培养大约 3 h,当 OD₆₀₀ 达到 1.2 时,添加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.2 mmol/L。继续震荡培养 4 h 后,将菌液收集于冰浴中静置 10 min,然后低温(4 °C)8 000×g 离心 15 min,弃掉上清液,用预冷的生理盐水洗涤菌体 2 次,待用。

1.2.2 生物转化阶段 将收集到的菌体重新悬浮于 50 mL 转化培养基(OD₆₀₀=15),转移至 500 mL 挡板摇瓶,补加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,于 37 °C 摇床 200 r/min 培养。转化培养基成分为葡萄糖 70 g/L 或甘油 15 g/L,GlcNAc 80 g/L,MgSO₄ 1.2 g/L,K₂HPO₄·3H₂O 25.0 g/L,氮源见表 1,pH 7.0。

表 1 转化培养基名称与成分构成

Table 1 Nitrogen sources of catalysis medium

培养基	碳源成分	氮源成分	氮源质量浓度/(g/L)	GlcNAc 质量浓度/(g/L)
LB+培养基	同 LB 培养基	同 LB 培养基	同 LB 培养基	80
Typ 培养基	葡萄糖	胰蛋白胨	5	80
IS 培养基	葡萄糖	硫酸铵	4	80
无氮 Glc 培养基	葡萄糖	不含氮源	0	80
无氮甘油培养基	甘油	不含氮源	0	80

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定方法 通过测定 600 nm 波长下的吸光度值来测定生物量。重组大肠杆菌的干质量与吸光度值的换算关系是: $1.0 \text{ OD}_{600}=0.382 \text{ g/L}$ 细胞干质量。

1.3.2 蛋白质测定方法 采用考马斯亮蓝 G250 染色法^[9]测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白质绘制拟合曲线。

1.3.3 Neu5Ac 测定方法 Neu5Ac 通过高效液相色谱(岛津 LC2010a)测定。所用色谱柱为伯乐公司的 Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm),柱温为 35 °C,流动相为 5.0 mmol/L 硫酸溶液,流速为 0.6 mL/min,使用 UV 检测器,检测波长是 196 nm。

1.3.4 NeuB 活性测定方法 在前期的实验中,我们发现 AGE 的活性远高于 NeuB,因此 NeuB 的活性大小对 Neu5Ac 的合成具有更大的影响;于是在后续的实验中,我们重点关注 NeuB 的活性,其测定方法如下:将发酵液样品低温(4 °C)离心(10 000 g, 5 min),弃掉上清液后,用预冷的生理盐水洗涤 2 次,重新悬浮于生理盐水中,超声波破碎(破碎时间:4 s;暂停时间:10 s;共计时间:20 min),低温离心,收集上清作为粗酶液。

NeuB 活性以 ManNAc 向 Neu5Ac 的转化速率来定义。酶活测定体系(1.0 mL)为 Tris-HCl 0.1 mol/L pH 7.0, 10 mmol/L MnSO_4 , 50 mmol/L ManNAc, 50 mmol/L PEP, 添加 20 μL 酶液。将反应体系置于 37 °C 水浴 20 min 后,沸水浴 10 min 终止反应。1 min 内催化合成 1 nmol Neu5Ac 所需的酶量定义为 1 U。

2 结果与讨论

2.1 双阶段生物转化合成 Neu5Ac 过程

菌体生长阶段,在 IPTG 的诱导下,源于 *Anabaena* sp. CH1 的 AGE 基因 (*bage*) 和源于

C. jejuni NCTC 11168 中的 *neuB*(*cneuB*) 在重组大肠杆菌中共表达。在生物转化阶段,外源的 GlcNAc 在 bAGE 的催化下,异构化形成 ManNAc;继而在 cNeuB 的催化下,与胞内的 PEP 合成 Neu5Ac^[8,10]。在此生物转化过程中,不需过量的外源丙酮酸(pyruvate)供给;但需要消耗胞内的 PEP。为提高生物转化阶段的菌体活性,以 LB 培养基为基础添加 GlcNAc 作为生物转化阶段的培养基(标记为 LB+培养基,如表 1 所示),过程曲线见图 2(a)。

在生物转化阶段的初始阶段,生物量和胞内 NeuB 活性经历一个短暂且迅速的下降。这可能是由于在菌体收集与洗涤过程中,在剪切力的影响下,部分细胞的细胞壁受到损伤,同时也伴随着细胞的自然死亡;同时在经历冰浴和低温离心之后,细胞的活性没有完全复苏,因此在转化过程的初期出现生物量下降的现象;而同时,Neu5Ac 却迅速合成。在经历 4 h 的适应期后,生物量和胞内 NeuB 活性迅速上升;但在此时期内,Neu5Ac 的合成速率较低,其积累基本停滞,在生物转化过程结束后,产量仅为 $(0.38 \pm 0.08) \text{ g/L}$ 。胞内 NeuB 活性在 4 h 后显著上升,但 Neu5Ac 的合成速率不升反降,且其下降的时间节点与生物量开始增加的时间节点一致。因此推测,胞内 NeuB 活性不是 Neu5Ac 合成的瓶颈,而在于底物或能量的供给,而此供给受到了细胞自身生长的抑制。

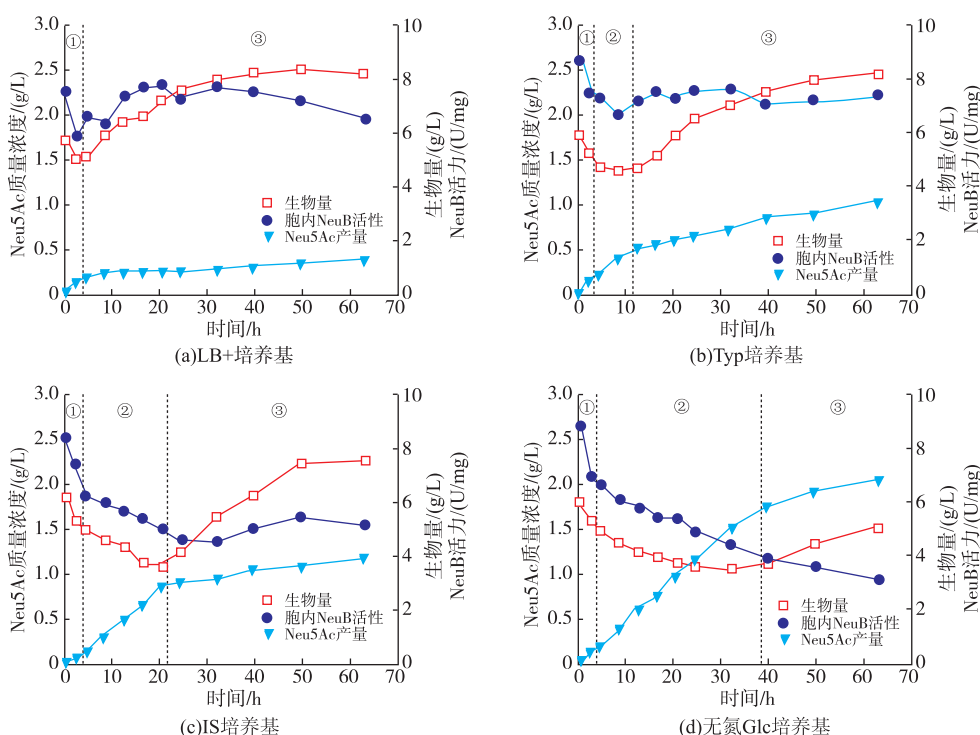
2.2 氮源对全细胞生物转化合成 Neu5Ac 的影响

氮源是大肠杆菌生长不可或缺的营养物质,为探究 Neu5Ac 合成速率下降与细胞生长之间的内在联系,我们通过调整转化培养基中的氮源种类来控制菌株的生长状态,分别考察有机氮(胰蛋白胨)和无机氮(硫酸铵)为氮源时细胞的生长和 Neu5Ac 的合成。转化培养基的成分如表 1 所示。

2.2.1 胰蛋白胨作为氮源对重组大肠杆菌合成 Neu5Ac 的影响 以 Typ 培养基作为转化培养基时的转化过程曲线见图 2(b)。与 LB+培养基作为转化培养基时类似:生物转化过程的前 4 h,生物量与胞内 NeuB 活性迅速下降,而 Neu5Ac 迅速合成,将此阶段命名为生物量迅速下降期。4 h 后,生物量和胞内 NeuB 活性停止迅速下降,转而趋于稳定,同时 Neu5Ac 依然维持较高的合成速率,至 12.5 h 时, Neu5Ac 合成量为 (0.51 ± 0.07) g/L,将此阶段命名为 Neu5Ac 快速合成期。12.5 h 后,重组大肠杆菌构建起了在转化培养基中生长所需要的酶系,生物量开始迅速上升,到生物转化阶段结束时,生物量达到 (8.17 ± 0.18) g/L,高出初始值 40%;由于转化培养基中添加了诱导剂 IPTG,因此重组大肠杆菌能够重新合成 NeuB,使得胞内 NeuB 活性维持在较高水平。然而,12.5 h 后, Neu5Ac 的合成速率没有随胞内 NeuB 活性升高而升高,却维持在较低水平,至生物转化阶段结束时,终质量浓度仅为 (1.01 ± 0.06) g/L。此阶段时间占总转化合成过程的 80%,而 Neu5Ac 合成量却仅占总量的 49.5%,将此阶段命名为

Neu5Ac 慢速合成期。

2.2.2 硫酸铵作为氮源对重组大肠杆菌合成 Neu5Ac 的影响 以 IS 培养基为转化培养基时的合成过程曲线如图 2(c)所示。生物转化合成 Neu5Ac 过程经历了明显的生物量迅速下降期、Neu5Ac 快速合成期和 Neu5Ac 慢速合成期。而进入 Neu5Ac 快速合成期后,与有机氮作为氮源不同的是,生物量的下降趋势虽有减弱但依然处于下降趋势,在此阶段的 16 h 内,生物量下降了 1.30 g/L,胞内 NeuB 活性也同步下降。Neu5Ac 以较高速率合成,在 16.5 h 内积累量达 (0.88 ± 0.07) g/L。相较 Typ 培养基,IS 培养基中重组大肠杆菌需要更长的时间构建细胞生长所需要的酶系,生物量开始回升的节点比 Typ 培养基中更迟,在 20.5 h 后,合成过程进入 Neu5Ac 慢速合成期:生物量停止下降,迅速回升,到生物转化阶段结束,生物量达到 (7.63 ± 0.19) g/L,高出初始值达 22.9%;而 Neu5Ac 的积累速度迅速下降,并维持较低的合成速率直至生物转化过程结束, Neu5Ac 的终质量浓度为 (1.20 ± 0.04) g/L。



①:生物量迅速下降期;②:Neu5Ac 快速合成期;③:Neu5Ac 慢速合成期

图 2 在不同转化培养基中重组大肠杆菌生物转化合成唾液酸

Fig. 2 Fermentation curve of Neu5Ac production in medium with different nitrogen sources for recombination *E. coli*

2.2.3 重组大肠杆菌在无氮培养基中合成 Neu5Ac

Neu5Ac 分子中的氨基,来源于转化底物 GlcNAc,本文所述的无氮源条件是指不添加除 GlcNAc 之外的氮源。无氮源条件下的 Neu5Ac 生物转化合成过程也可以分成 3 个阶段:生物量迅速下降期、Neu5Ac 快速合成期和 Neu5Ac 慢速合成期。在 3 种不同氮源的转化培养基中,无氮培养基中的 Neu5Ac 快速合成期持续时间更长,达到 35 h,占总转化过程时间的 55.6%,分别是 Typ 培养基和 IS 培养基的 8.75 和 2.19 倍,此阶段结束时,Neu5Ac 质量浓度达到为 (1.79 ± 0.11) g/L。虽然不同条件下 Neu5Ac 快速合成期持续的时间不一致,但此时期 Neu5Ac 的合成速率基本一致(如表 2 所示),说明即使在不同的转化条件中,处于 Neu5Ac 快速合成期的重组大肠杆菌的生理状态基本一致,处于有利于 Neu5Ac 合成的状态。而进入 Neu5Ac 慢速合成期后,重组大肠杆菌生理状态发生的改变,成为 Neu5Ac 合成的关键限制性因素。除 Neu5Ac 快速合成之外,此时期的另外一个特征便是前一时期生物量迅速下降的趋势得到缓解甚至维持相对稳定。

在无氮培养基中,Neu5Ac 合成速率下降拐点出现在 39 h,转化过程进入 Neu5Ac 慢速合成期,生物量开始缓慢上升,转化过程结束时生物量仅为 (4.96 ± 0.28) g/L,比初始值 (5.93 ± 0.08) g/L 略低;Neu5Ac 合成速率的下降幅度远小于氮源存在时的下降幅度,在生物转化过程结束时,Neu5Ac 终质量浓度达到 (2.04 ± 0.08) g/L。由于转化培养基中除 GlcNAc 外不含其他氮源,而重组大肠杆菌的 GlcNAc-PTS 已被敲除而无法利用 GlcNAc 进行细

胞生长^[11],因此重组大肠杆菌只能依赖前期细胞衰亡破裂后释放出的少量氮源进行微弱的生长。综合 LB+培养基、Typ 培养和 IS 培养基中 Neu5Ac 合成过程曲线,可以看到,细胞的生长与 Neu5Ac 的合成存在紧密的负相关关系:Neu5Ac 合成速率下降的拐点与生物量上升的拐点吻合;细胞生长越快,对 Neu5Ac 合成的抑制作用越早越明显。在生物转化和发酵过程中,尤其对于产物合成过程需要消耗大量能量时,细胞的生长常与产物的合成互相抑制,胞内能量供应相对不足。李晶等^[12]在土壤杆菌 ATCC 31749 发酵产热凝胶过程中采用了氮源限制的双阶段发酵法,在菌体生长阶段提供充足的氮源,生物量迅速增加但产胶量极低;待氮源耗尽后不再流加氮源,菌体停止生长,转而开始大量合成热凝胶。代谢流分析实验表明,当碳限制条件转为氮限制后,由于碳源的补充而使得细胞经历了短暂的快速生长期,在此时期胞内的 pyruvate 含量大幅增加,PEP 相应减少;此后由于氮源的限制,细胞停止生长,胞内的 pyruvate 含量减少,PEP 相应增加^[13]。具体到 Neu5Ac 的合成过程中,细胞的生长消耗胞内 PEP^[14],细胞的快速生长会导致胞内 PEP 相对不足,流向 Neu5Ac 合成的 PEP 减少,抑制 Neu5Ac 的合成。因此,我们可以得出结论:氮源本身不是 Neu5Ac 合成的关键因素,通过限制生物转化阶段的氮源抑制细胞自身的生长,减少了胞内 PEP 的消耗使得更多的 PEP 流向 Neu5Ac 合成,促进了 Neu5Ac 的合成。

表 2 重组大肠杆菌在不同转化培养基中合成 Neu5Ac 的对比

Table 2 Comparison of different medium for Neu5Ac production in recombination *E. coli*

培养基	Neu5Ac 快速合成期		生物转化全过程		
	持续时间/h	Neu5Ac 积累质量浓度/(g/L)	Neu5Ac 产量/(g/L)	最终生物量/(g/L)	YP/X(g/g)
LB+培养基	0	—	0.38 ± 0.05	8.19 ± 0.21	0.046
Typ 培养基	8	0.29	1.01 ± 0.06	8.17 ± 0.17	0.124
IS 培养基	16	0.77	1.20 ± 0.04	7.63 ± 0.18	0.157
无氮 Glc 培养基	36	1.61	2.04 ± 0.08	4.96 ± 0.27	0.411
无氮甘油培养基	36	3.41	4.31 ± 0.08	4.87 ± 0.31	0.885

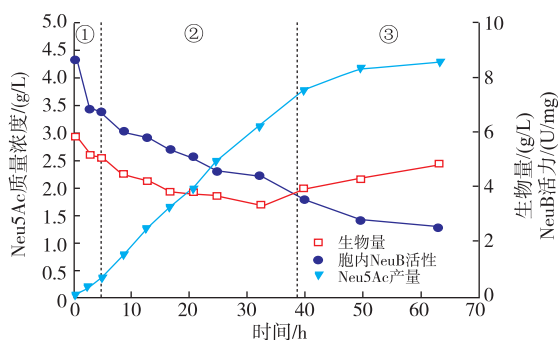
2.3 不同类型碳源对全细胞生物转化合成 Neu5Ac 的影响

从第 2.2 节和第 2.3 节可以得出结论,胞内 PEP 供给不足是 Neu5Ac 高效快速合成的瓶颈,增

加 PEP 的供给对于 Neu5Ac 产量的提高有重要意义。在大肠杆菌中,通过代谢转化培养基中的葡萄糖,糖酵解和糖异生途径产生 PEP^[15]。而葡萄糖的跨膜运输主要依赖于磷酸转运系统(PTS),在跨膜的

同时会消耗 PEP 从而磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸。这对于大肠杆菌的生长具有重要意义;然而由于该过程会与 Neu5Ac 的合成竞争胞内的 PEP,因而可能对于 Neu5Ac 的合成具有不利影响。因此,我们选择不依赖于 PTS 系统的甘油为碳源,对比分析两种碳源对重组大肠杆菌全细胞生物转化合成 Neu5Ac 的影响。

甘油培养基中生物转化合成 Neu5Ac 过程曲线如图 3 所示。与上述几种条件类似,转化过程可以分为 3 个不同阶段。在生物量迅速下降期和 Neu5Ac 快速合成期,Neu5Ac 比合成速率达到 0.030 h^{-1} ,是其他条件的 2~3 倍。39 h 后,重组大肠杆菌适应了转化培养基环境后开始生长,加之胞内 NeuB 活性下降,导致转化过程进入 Neu5Ac 慢速合成期,Neu5Ac 比合成速率下降(如图 4 所示)。到转化过程结束,Neu5Ac 质量浓度达到 $(4.42 \pm 0.08) \text{ g/L}$ 。甘油为碳源时,其跨膜运输不依赖于 PTS,因此不消耗胞内的 PEP,从而使得更多的 PEP 流向 Neu5Ac 合成的方向,从而在生物量相同的条件下,提高了 Neu5Ac 的比合成速率,最终 Neu5Ac 合成量比无氮培养基中高出 111.3%,比初始条件(LB+培养基)高出 10.3 倍。此外,培养基中甘油的存在对增强细胞膜的流动性和通透性也有促进作用,有利于底物 GlcNAc 进入胞内和产物 Neu5Ac 向胞外分泌。



①:生物量迅速下降期;②:Neu5Ac 快速合成期;③:Neu5Ac 慢速合成期

图 3 甘油培养基对重组大肠杆菌合成唾液酸的影响

Fig. 3 Effects of glycerol medium on Neu5Ac production in recombination *E. coli*

参考文献:

- [1] INOUE S, KITAJIMA K, KDN (deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2006, 23(5/6): 277-290.

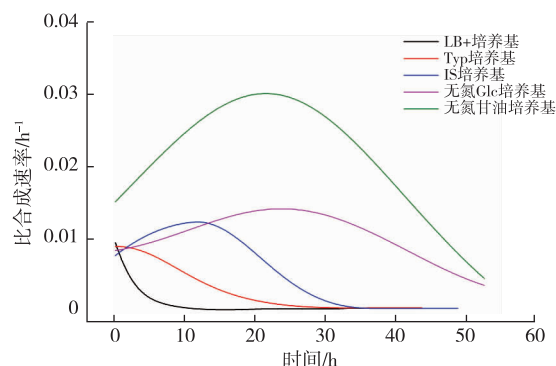


图 4 不同转化培养基中的 Neu5Ac 比合成速率

Fig. 4 Specific production rates of Neu5Ac in different medium

目前,有多种合成 Neu5Ac 的方法,其中产量最高的方法,首先底物 GlcNAc 在 GlcNAc 异构酶催化下生成生成 ManNAc,而后 ManNAc 和 pyruvate 在 Neu5Ac 醛缩酶的催化下合成 Neu5Ac,该方法 16 h 合成 Neu5Ac 产量可达 74.2 g/L ^[6]。由于 Neu5Ac 醛缩酶催化的可逆反应的反应平衡偏向于 Neu5Ac 裂解成 ManNAc 和 pyruvate,因此在上述方法中需要添加过量的 pyruvate(通常至少 5 倍),这也导致了 pyruvate 的浪费和额外的环境压力。本研究中所用的方法虽然产量不如上述方法,但由于 Neu5Ac 合成酶催化合成 Neu5Ac 时以胞内 PEP 为底物,以高能磷酸键为推动反应进行的动力,不需要额外过量的 pyruvate。该方法经过优化后,可作为一种环境友好且高效的 Neu5Ac 合成方法。

3 结语

我们发现,在全细胞生物转化合成 Neu5Ac 过程中,胞内 PEP 的供给是 Neu5Ac 高效快速合成的瓶颈。当重组大肠杆菌自身生长时,会消耗胞内大量的 PEP 从而竞争性抑制 Neu5Ac 的合成。改用不含氮源的转化培养基,提高了 Neu5Ac 的合成效率。此外,通过改用不依赖 PTS 转运系统的甘油作为碳源,避免了碳源物质跨膜运输过程中 PEP 的消耗,大幅提高了 Neu5Ac 的比合成速率,终质量浓度达到 $(4.42 \pm 0.08) \text{ g/L}$ 。

- [2] VARKIA. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins[J]. **Nature**,2007,446(7139):1023-1029.
- [3] ZHENG Zhiyong,ZHAN Xiaobei,WU Jianrong,et al. Structure analysis of polysialic acid in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2005,24(5):38-41.(in Chinese)
- [4] 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.
- [5] LEE Y C,WU H M,CHANG Y N,et al. The central cavity from the (Alpha/Alpha)₆ barrel structure of *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerase contains two key histidine residues for reversible conversion[J]. **Journal of Molecular Biology**,2007,367(3):895-908.
- [6] LEE Y C,CHIEN H C R,HSU W H. 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.
- [7] LINTON D,KARLYSHEV A V,HITCHEN P G,et al. Multiple N-acetyl neuraminic acid synthetase (neuB) genes in *Campylobacter jejuni*:identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide[J]. **Molecular Microbiology**,2000,35(5):1120-1134.
- [8] SUNDARAM A K,PITTS L,MUHAMMAD K,et al. Characterization of N-acetylneuraminic acid synthase isoenzyme 1 from *Campylobacter jejuni*[J]. **Biochemical Journal**,2004,383:83-89.
- [9] BARDFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248-254.
- [10] BENNETT B D,KIMBALL E H,GAO M,et al. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*[J]. **Nature Chemical Biology**,2009,5(8):593-599.
- [11] UEHARA T,PARK J T. The N-acetyl-D-glucosamine kinase of *Escherichia coli* and its role in murein recycling[J]. **Journal of Bacteriology**,2004,186(21):7273-7279.
- [12] LI Jing,XU Min,ZHU Li,et al. Effect of dissolved oxygen level on the rheological properties of curdlan fermented by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(12):1253-1260.(in Chinese)
- [13] LEQUEUX G,BEAUPREZ J,MAERTENS J,et al. Dynamic metabolic flux analysis demonstrated on cultures where the limiting substrate is changed from carbon to nitrogen and vice versa[J]. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**,2010(10):103-105.
- [14] JIANG L,LI S,HU Y,et al. Adaptive evolution for fast growth on glucose and the effects on the regulation of glucose transport system in *Clostridium tyrobutyricum*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2012,109(3):708-718.
- [15] CLOMBURG J M,GONZALEZ R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2011,108(4):867-879.
- [16] LIN B X,ZHANG Z J,LIU W F,et al. Enhanced production of N-acetyl-D-neuraminic acid by multi-approach whole-cell biocatalyst[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(11):4775-4784.