

重组大肠杆菌全细胞催化法生产 N-乙酰神经氨酸

郑 蝶^{1,2}, 杨海泉^{1,2}, 夏媛媛^{1,2}, 沈 微^{1,2}, 陈献忠^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: N-乙酰神经氨酸具有多种生物学功能, 在食品添加剂和药物合成等方面有着重要的应用。为了降低成本, 作者利用重组大肠杆菌, 并以含有N-乙酰葡萄糖胺的发酵液为底物进行全细胞催化生产N-乙酰神经氨酸。结果表明, 在温度为 30 °C、转化液初始 pH 为 6.5、底物丙酮酸浓度为 1.38 mol/L、Triton X-100 添加质量分数为 0.4%、菌体 OD₆₀₀ 为 30 的条件下在 5 L 发酵罐等条件下进行全细胞转化, 可以得到N-乙酰神经氨酸 180 mmol/L, 摩尔转化率为 65.45%。用阴离子树脂对产物进行初步分离纯化, 经高效液相色谱分析证实纯化后产品为高纯度N-乙酰神经氨酸, 其纯度为 98.3%, 结晶回收率为 42.5%。作者建立并优化了一种以含有N-乙酰葡萄糖胺的发酵液为底物直接进行全细胞催化生产 N-乙酰神经氨酸的工艺流程, 既节约了成本, 又具有可持续发展的优势。

关键词: N-乙酰神经氨酸; 发酵液; 全细胞催化

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2024)02-0038-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20220217002

Production of N-Acetylneuraminic Acid from Fermentation Broth Using Recombinant *Escherichia coli* Whole Cells Biotransformation

ZHENG Die^{1,2}, YANG Haiquan^{1,2}, XIA Yuanyuan^{1,2}, SHEN Wei^{1,2}, CHEN Xianzhong^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: N-acetylneuraminic acid has various biological functions and has important applications in food additives and pharmaceutical synthesis, etc. In order to reduce its production cost, in this study, N-acetylneuraminic acid was produced by recombinant *Escherichia coli* whole cells using the fermentation broth containing N-acetylglucosamine as the substrate. The catalytic conditions of N-acetylneuraminic acid production were optimized. The optimum result was achieved at 30 °C (the reaction temperature), initial pH 6.5, 1.38 mol/L pyruvate, 0.4% Triton X-100 added, and OD₆₀₀ 30, the highest yield of N-acetylneuraminic acid reached 180 mmol/L, and the molar conversion rate was 65.45% in 5 L fermentor. N-acetylneuraminic acid produced was separated and purified using anion

收稿日期: 2022-02-17 修回日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001064)。

* 通信作者: 陈献忠(1980—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物代谢工程育种与合成生物学研究。

E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

resin. It was confirmed by high performance liquid chromatography that the sample was high purity N-acetylneuraminic acid. Its purity reached 98.3%, and the recovery rate of crystallization was 42.5%. A method about N-acetylneuraminic acid produced from fermentation broth with N-acetylglucosamine using recombinant *E. coli* whole cells biotransformation was built and optimized, which not only saves costs but also has the advantage of sustainable development.

Keywords: N-acetylneuraminic acid, fermentation broth, whole-cell biotransformation

唾液酸是一系列 9-碳单糖及其衍生物的统称,最初从牛下颌唾液腺黏蛋白中分离得到^[1]。N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)是唾液酸的主要种类之一,主要以低聚糖、糖脂或者糖蛋白的形式存在^[2-5]。Neu5Ac 参与细胞识别、信号转导、肿瘤发生等多个生理过程^[6-8], Neu5Ac 还可以作为合成抗流感病毒药物的前体^[9-11], 由于其具有重要的生物学功能, Neu5Ac 在医药和生物技术产业上的需求不断增加^[12]。

Neu5Ac 可以通过天然产物中提取、化学合成、微生物发酵、酶法合成和全细胞生物催化来制备。Neu5Ac 传统的生产方法主要从天然原料中获得, 如燕窝、牛奶或鸡蛋等^[13], 由于这些天然产物中唾液酸含量低, 不适合进行大规模生产。化学合成法反应条件苛刻, 后期的分离纯化复杂, 无法满足工业化生产的要求^[14]。利用发酵法生产 Neu5Ac 成本较低, 但产量不高, 而且副产物较多, 还未见有工业化生产报道^[15]。酶法生产 Neu5Ac 具有转化率高、反应时间短的优点, 但由于酶法合成还需要进行细胞破碎和酶的纯化等操作, 且 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶需要 ATP 作为活化剂, 从而限制了生产规模的扩大^[16-20]。全细胞催化法是利用完整的细胞作为催化剂将底物转化成产物, 本质上也是利用生物体内酶的催化作用^[21]。全细胞催化法因其操作简便、经济高效、产物易分离提纯等优点, 是一种较好的生产 Neu5Ac 的方法^[22]。

2011 年, Tao 等采用一锅法将 AGE 和 NanA 两种酶在大肠杆菌内共表达, 以 GlcNAc 和丙酮酸为底物催化合成 Neu5Ac, 不仅提高了生产效率, 简化了工艺流程, 还具有一定的经济优势^[23]。2013 年, Lin 等构建了共表达基因 AGE 和 NanA 的重组大肠杆菌 *E. coli* ΔnanTEK/pNA, 催化 N-乙酰葡萄糖胺

(N-acetylglucosamine, GlcNAc) 和丙酮酸合成 240 mmol/L 的 Neu5Ac^[24]。许杨等对工程菌 *E. coli* ΔnanTEK/pNA 的细胞培养条件以及催化过程进行优化, 以 600 mmol/L GlcNAc 和 800 mmol/L 丙酮酸作为底物, 在 30 °C 下转化 16 h 得到 294.4 mmol/L Neu5Ac, GlcNAc 转化率可以达到 49.1%^[25]。Chen 等利用基因工程技术平衡了 AGE 和 NanA 两种酶的表达, 然后通过代谢工程改造底物和产物运输途径, 进一步利用生物信息学方法和蛋白质工程分别提高了两种酶的活性, 最终利用构建的新型生物催化剂得到 351.8 mmol/L 的 Neu5Ac, GlcNAc 转化率高达 58.6%^[26]。2019 年, Zhao 等在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中共表达基因 AGE 和 NanA, 通过启动子优化、关键酶筛选、N 端编码序列工程促进关键酶表达和阻断副产物途径, 开发了一种有效的食品级 Neu5Ac 生产方法, Neu5Ac 的产量达到 68.75 g/L, GlcNAc 转化率为 55.57%^[27]。

目前全细胞催化法生产 Neu5Ac 均以纯度较高的 GlcNAc 为底物, 考虑到 Neu5Ac 的生产成本和市场竞争性, 不利于规模化生产。作者探索了通过发酵法生产 GlcNAc 和生物催化法生产 Neu5Ac 工艺耦合的可行性。利用实验室前期构建的高产 GlcNAc 重组菌和全细胞催化剂 *E. coli* ΔNTE/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr) 进行工艺组合催化生产 Neu5Ac, 并进一步优化催化条件, 建立分离纯化工艺, 获得高纯度的 Neu5Ac, 为 Neu5Ac 工业化生物催化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高产 GlcNAc 的重组大肠杆菌 ATLWX、重组 *E. coli* ΔNTE/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr): 作者所在

实验室构建并保存;丙酮酸:上海麦克林生化科技有限公司;Neu5Ac、GlcNAc和N-乙酰甘露糖胺(ManNAc):Sigma公司;酵母粉和蛋白胨:英国OXOID公司;凝胶阴离子树脂HZ-201:上海华震科技有限公司;其他药品和生化试剂:国药化学试剂有限公司。

种子培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 5;pH 7.0。平板培养基加琼脂 20。

发酵培养基(组分 g/L):葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.17, KH_2PO_4 7, Na_2HPO_4 7, 柠檬酸 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3。

微量元素(组分 mg/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 硼酸 0.5。

LB 培养基(组分 g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10, NaCl 10。

1.2 仪器与设备

5 L 机械搅拌玻璃发酵罐:上海百仑生物科技有限公司;高效液相色谱安捷伦 1260:德国安捷伦公司;超净工作台(SW-CJ-2FD):苏州净化集团安泰公司;自动高压蒸汽灭菌锅(MLS-3750):日本SANYO公司;台式高速冷冻离心机(4K-15):德国Sigma公司;蛋白电泳仪:美国Bio-Rad公司;紫外可见分光光度计(UV-2000):尤尼柯(上海)仪器有限公司;pH计(FE28-Meter):梅特勒-托利多仪器有限公司;恒温振荡培养摇床(HYG-A):江苏太仓市实验设备厂;生物传感分析仪(SBA-40C):山东省生物研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 重组 *E. coli* ATLWX 发酵生产 N-乙酰葡萄糖胺

1)一级种子液培养 从平板挑取单菌落接种至含有对应抗性的 20 mL LB 培养基中,于 32 °C 摇床中 200 r/min 培养 12 h。

2)二级种子液培养 种子培养液培养后,以接种体积分数 1% 转接到含有对应抗性的 50 mL LB 培养基中,34 °C、200 r/min 培养 6 h 至 OD_{600} 为 2.5~3.3。

3)分批补料发酵培养 二级种子液以接种体积分数 16% 接入 5 L 发酵罐,装液量 2.5 L,发酵温度 34 °C,葡萄糖的初始添加量 10 g/L,发酵过程中待初始糖浓度低于 2 g/L 时,手动补加体积分数

70% 的葡萄糖,控制残糖在 2~5 g/L,当 OD_{600} 达到 55 后,升温至 37 °C,控制残糖在 0.2~0.5 g/L,发酵过程中通过自动补加氨水调节 pH 为 6.9,关联转速从 200 r/min 到 850 r/min。调节溶氧在体积分数 10% 左右,发酵过程中每隔一定时间取样测定葡萄糖质量浓度和细菌生长情况。

1.3.2 产物和中间产物的检测 GlcNAc、ManNAc 和 Neu5Ac 浓度的测定:采用高效液相色谱测定,样品前处理方法及检测方法参照文献[28]。

1.3.3 N-乙酰葡萄糖胺发酵液的处理 发酵得到的发酵液经过离心除菌后,于 -20 °C 冰箱保存,备用。

1.3.4 重组菌的培养及诱导 将 -80 °C 甘油管保存的大肠杆菌在卡那霉素(50 mg/L)抗性 LB 固体平板上划线,接种单菌落到 20 mL 含有对应抗性的培养基中,37 °C、200 r/min 培养 10 h。取 1 mL 种子液转接到 50 mL 含有对应抗性的培养基中,在 37 °C 摇床中继续培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时,加入 1 mmol/L IPTG,然后在 28 °C 低温诱导 8 h。

1.3.5 SDS-PAGE 验证重组蛋白质表达 诱导结束后,离心收集菌体。加一定量的 H_2O 调节 OD_{600} 为 2.0,加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液后混匀,100 °C 加热 10 min,10 000 r/min 离心 3 min。取 10 μL 上清液电泳,考马斯亮蓝 R250 对样品染色,染色 50 min 后,脱色液脱色 3 h,用含有空载体 pET-28a 的 *E. coli* BL21(DE3)作为对照。

1.3.6 全细胞催化制备 Neu5Ac 重组菌经诱导后,用冷冻离心机在 4 °C、7 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 pH 7.5,100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,再次收集菌体。

将收集的菌体重悬于含有 0.28 mol/L GlcNAc、一定浓度的丙酮酸、一定浓度的表面活性剂、pH 为 6.5,100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液的转化体系中,转化温度为 30 °C,每隔一定时间取样并用 NaOH 调节 pH 为 7.5。

1.3.7 全细胞催化制备 Neu5Ac 的条件优化 分别在不同菌体, OD_{600} (10、20、30、40、50)、不同丙酮酸浓度(0.83、1.10、1.38、1.65、1.93、2.20 mol/L)、不同初始 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、不同 Triton X-100 的添加量(体积分数 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%) 和不同温度(20、30、37、40、50 °C) 条件下进行全细胞转化,通过高效液相色谱检测 Neu5Ac 的产量。

1.3.8 Neu5Ac 的分离纯化

1) Neu5Ac 溶液的制备 将反应转化液离心除菌后,先用活性炭进行脱色,然后用醋酸调节至 pH 4.5 左右,上清液过阴离子树脂柱。

2) 阴离子交换树脂处理步骤 分别用 1 mol/L NaOH 溶液和去离子水冲洗树脂,直至流出液 pH 值为 8~9,接着用 1 mol/L 的 HCl 溶液、去离子水冲洗树脂,直至流出液 pH 值为 5~7,继续用 1 mol/L 的 NaOH 溶液活化树脂层,将树脂转为氢氧根型,最后用去离子水洗至 pH 为 7~9。

3) 阴离子树脂对 Neu5Ac 溶液的动态吸附洗脱 将处理好的阴离子树脂 HZ-201 400 mL 以湿法装入层析柱,将待纯化的含 Neu5Ac 的样品溶液调节 pH 至 4.5 上样,上样后用 1 个柱体积的去离子水洗去无法结合的物质,然后用 0~0.65 mol/L 甲酸线性洗脱,洗脱液用 EP 管收集,每管 7 mL,用 HPLC 检测收集样品中 Neu5Ac 的浓度。

4) Neu5Ac 晶体的制备 洗脱液经旋转蒸发浓缩至 Neu5Ac 质量浓度为 150 g/L 左右,加入 7 倍体积的异丙醇,4 °C 放置 2 d,使 Neu5Ac 结晶。通过真空泵抽滤液体,得到的晶体用 60 °C 烘箱烘至质量恒定。

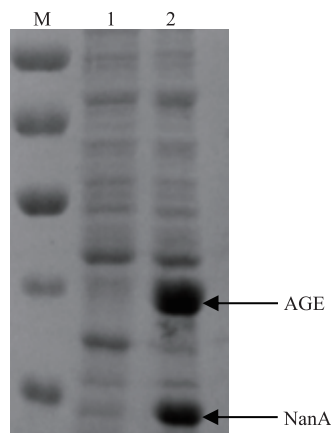
2 结果与分析

2.1 重组菌 *E. coli*/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr) 的诱导表达

诱导表达重组菌 *E. coli*/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr) 后,SDS-PAGE 电泳见图 1。相比对照菌株,重组菌在约 40 000、33 000 处有较粗的条带,说明两个重组蛋白 AGE 和 NanA 均成功表达。

2.2 制备 N-乙酰葡萄糖胺发酵液

以 *E. coli* ATLWX 作为出发菌株,在 5 L 发酵罐中补料分批发酵生产 N-乙酰葡萄糖胺。葡萄糖的初始质量浓度为 10 g/L,发酵温度为 34 °C 时,重组 *E. coli* 在 10 h 后葡萄糖几乎消耗完,之后开始补加葡萄糖,控制残糖质量浓度在 2~5 g/L。当发酵 16 h 时,OD₆₀₀ 达到 55,提高发酵温度至 37 °C,控制残糖质量浓度在 0.2~0.5 g/L;发酵 34 h 后菌体浓度趋于稳定,产量增长变缓;当发酵 45 h 时,菌体浓度 OD₆₀₀ 达到 135, GlcNAc 产量达到 61 g/L,发酵过程中 pH 随着时间缓慢增加,见图 2。



M. 蛋白质 marker; 1. *E. coli* 带有空质粒 pET28a; 2. *E. coli* 带有 pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr)。

图 1 重组菌 *E. coli*/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr) 表达 AGE 和 NanA 蛋白质电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expression of AGE and NanA by recombinant *E. coli*/pET28a-(T7-shnal)-(tac-slr)

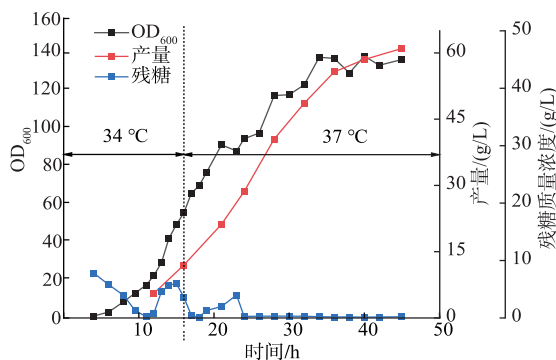


图 2 重组 *E. coli* ATLWX 发酵生产 GlcNAc

Fig. 2 Production of GlcNAc by fermentation of recombinant *E. coli* ATLWX

2.3 以 GlcNAc 发酵液为底物进行全细胞催化

重组菌 *E. coli* ATLWX 发酵得到的发酵液经过离心除菌后,于 -20 °C 冰箱保存备用。为进一步测定 *E. coli* 全细胞催化含有 GlcNAc 的发酵液合成 Neu5Ac 的能力,收集诱导后的菌体,以 0.28 mol/L (约 60 g/L) GlcNAc 为底物,加入 0.74 mol/L 丙酮酸钠和质量分数 0.2% Triton X-100 进行全细胞转化。由图 3 可以看出,当反应 36 h 时, Neu5Ac 产量达到 44.5 mmol/L,转化率为 16.18%,表明以含有 GlcNAc 的发酵液为底物进行全细胞转化是可行的。

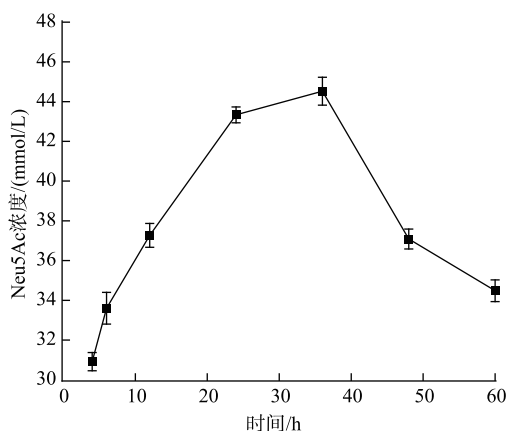


图3 重组 *E. coli* 全细胞催化 GlcNAc 发酵液合成 Neu5Ac
Fig. 3 Synthesis of Neu5Ac from GlcNAc using recombinant *E. coli* whole cells

2.4 以发酵液为底物进行全细胞催化的条件优化

2.4.1 细胞浓度对 Neu5Ac 的影响 在实际应用中为了保证一定的生产效率和经济效益,因此,需要控制菌体浓度在合适范围内^[29]。在转化液初始 pH 为 7.5, 反应温度为 30 °C, GlcNAc 浓度为 0.28 mol/L, 丙酮酸浓度为 0.74 mol/L, Triton X-100 的体积分数为 0.2%, 菌体 OD₆₀₀ 分别为 10、20、30、40、50 的条件下进行全细胞催化反应。从图 4 可以看出, 转化体系 OD₆₀₀ 在 10~30 时, Neu5Ac 产量随菌体浓度的增大而增加, 主要是因为菌体浓度越高, 酶量越多, 对应产量就会越高, 当菌体浓度大于 30 时, 产量反之减少, 主要是因为菌体浓度过高, 转化体系黏度增大, 影响了底物和产物的传质, 当转化体系菌体 OD₆₀₀ 为 30 时, Neu5Ac 产量最高, 达到 42.8 mmol/L, 转化率为 15.57%, 因此, 选择菌体浓度 OD₆₀₀ 为 30 进行后续实验。

2.4.2 丙酮酸浓度对 Neu5Ac 的影响 丙酮酸是全细胞催化的底物之一, 因此, 其浓度高低对 Neu5Ac 的合成有影响。保持其他条件不变的情况下, 控制丙酮酸浓度分别为 0.83、1.10、1.38、1.65、1.93、2.20 mol/L (GlcNAc 和丙酮酸浓度比分别为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8) 进行全细胞催化反应, 考察不同丙酮酸浓度对合成 Neu5Ac 的影响。从图 5 可以看出, 当丙酮酸浓度为 1.10 mol/L 时, Neu5Ac 的转化率仅有 17.27%; 当丙酮酸浓度增加到 1.65 mol/L 时, 产量为 75.9 mmol/L, 转化率提高到 27.6%; 继续增加丙酮酸浓度, 产量几乎不变, 这可能是因为高摩尔浓度的丙酮酸会抑制 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异

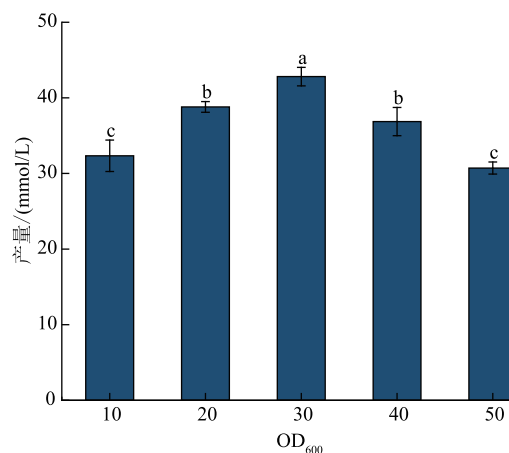


图4 菌体 OD₆₀₀ 对重组 *E. coli* 全细胞催化合成 Neu5Ac 的影响

Fig. 4 Effects of cell concentration on synthesis of Neu5Ac using recombinant *E. coli* whole cells

构酶的活性^[30], 从而导致产量不再增加。由于添加过量的丙酮酸不仅会发生底物抑制作用, 还会增加后期的分离纯化难度, 因此, 选择 1.65 mol/L 的丙酮酸进行后续实验。

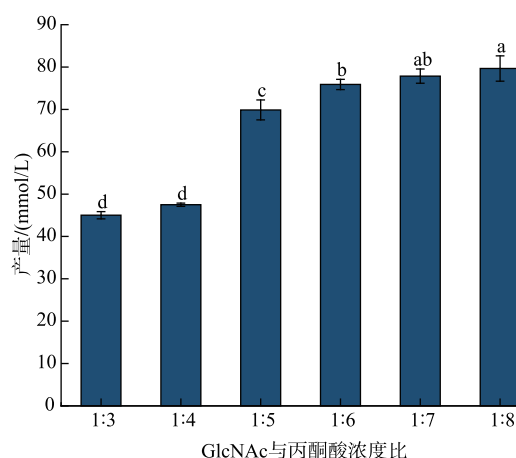
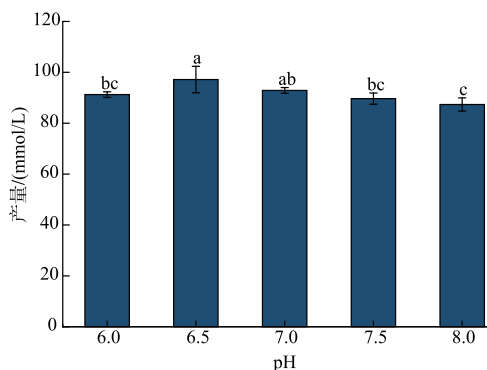


图5 丙酮酸摩尔浓度对重组 *E. coli* 全细胞催化合成 Neu5Ac 的影响

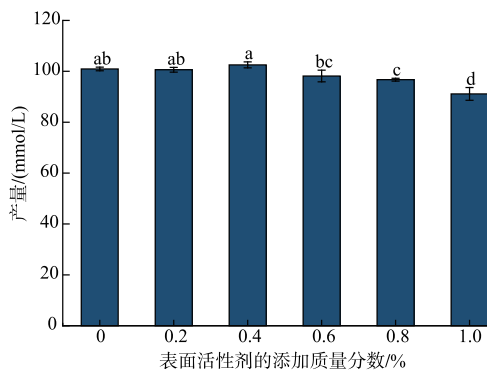
Fig. 5 Effects of pyruvate concentrations on synthesis of Neu5Ac using *E. coli* whole cells

2.4.3 转化液起始 pH、表面活性剂添加量对 Neu5Ac 的影响 pH 可以通过影响酶的活性来影响 Neu5Ac 的合成, 因此, 作者考察了不同转化液起始 pH 对合成 Neu5Ac 的影响。保持其他条件不变, 在转化液初始 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的条件下进行全细胞催化反应, 结果见图 6(a)。随着 pH 的升高, Neu5Ac 的产量先增加后减少, 当 pH 为 6.5 时, 产量最高, 达到 97.16 mmol/L, 转化率为

35.33%,说明偏酸性的条件更有利于 Neu5Ac 的合成。原因可能是细胞质的 pH 为中性,在微酸性条件下,由于细胞膜内外 pH 不同产生的电位差,促进了 ATP 合成^[31],ATP 又可以作为 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶的活化剂进一步促进 Neu5Ac 的合成,因此,后续选择转化液起始 pH 为 6.5 进行实验。表面活性剂可以改变细胞膜的通透性从而有利于底物的进入和产物的流出,因此研究了不同表面活性剂的添加量对全细胞催化合成 Neu5Ac 的影响,结果如图 6 (b)。当 Triton X-100 添加质量分数小于 0.4%时,对 Neu5Ac 的合成影响不大;当 Triton X-100 添加质量分数 0.4%时,产量最高,达到 102.5 mmol/L,转化率为 37.3%;继续提高 Triton X-100 添加量,Neu5Ac 的产量略微有所下降,可能是由于 Triton X-100 质量分数的增加导致转化体系中的含氧量降低,从而降低了重组大肠杆菌的生理活性^[32],因此,选择表面活性剂添加质量分数 0.4%进行后续实验。



(a) 转化液起始pH



(b) 表面活性剂添加质量分数

图 6 转化液起始 pH、表面活性剂添加量对重组 *E. coli* 全细胞催化合成 Neu5Ac 的影响

Fig. 6 Effects of initial pH, concentrations of surfactant added on synthesis of Neu5Ac using *E. coli* whole cells

2.4.4 温度对生产 Neu5Ac 的影响 温度对酶活也有一定的影响,因此作者考察了不同温度对全细胞合成 Neu5Ac 的影响。保持其他条件不变,分别在 20、30、37、40、50 °C 下进行全细胞催化反应。从图 7 可以看出,在温度低于 30 °C 时,Neu5Ac 的产量随温度的升高而上升,温度为 30 °C 时产量最高,为 103.4 mmol/L,转化率为 37.6%。温度超过 30 °C 时,产量随温度的上升而下降。当反应温度为 50 °C 时,产量只有 27.3 mmol/L。由此可见,反应温度对 Neu5Ac 的合成影响较大。这可能是由于温度过高,酶的空间结构发生改变,导致酶活力下降。因此,后续采用 30 °C 进行全细胞催化。

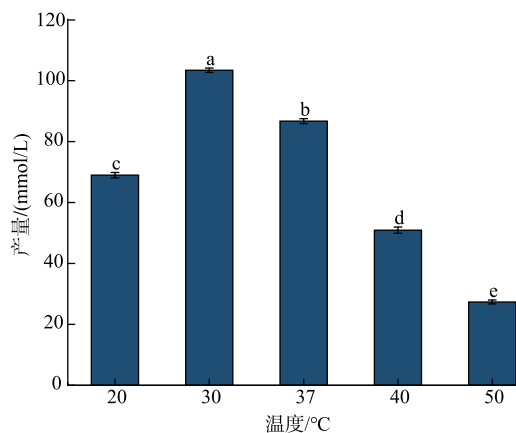


图 7 温度对重组 *E. coli* 全细胞催化合成 Neu5Ac 的影响

Fig. 7 Effects of temperature on synthesis of Neu5Ac using *E. coli* whole cells

2.5 正交实验优化全细胞催化生产 Neu5Ac 条件

在单因素实验基础上,综合考察各种因素对生产 Neu5Ac 的影响,选择菌体 OD₆₀₀、丙酮酸浓度、表面活性剂添加质量分数 3 个因素进行三因素三水平正交实验,各因素水平安排见表 1。

表 1 全细胞催化条件优化正交实验因素水平

Table 1 Factor levels of whole cell catalytic conditions optimized orthogonal test

水平	因素		
	A 菌体 OD ₆₀₀	B 丙酮酸浓度/(mol/L)	C 表面活性剂添加质量分数/%
1	20	1.38	0
2	30	1.65	0.2
3	40	1.93	0.4

对正交实验结果进行极差分析,通过极值的大小可以反映出各因素对 Neu5Ac 产量的影响程度。通过表 2 可知,菌体浓度对 Neu5Ac 产量的影响最大,其次为表面活性剂的添加量,丙酮酸浓度对产量影响最小,结合表 3 的方差分析结果,确定三因素的最佳组合为 $A_2B_1C_3$,即菌体浓度为 30,丙酮酸浓度为 1.38 mol/L,表面活性剂添加质量分数 0.4%。采用此条件进行全细胞催化实验,反应 48 h 后, Neu5Ac 产量为 (141 ± 3) mmol/L,转化率为 $(51.27\pm 1.09)\%$ 。

表 2 直观分析结果

Table 2 Intuitive analysis results

序号	因素				Neu5Ac 产量/ (mmol/L)
	A	B	C	空列	
1	1	1	1	1	103
2	1	2	2	2	97
3	1	3	3	3	107
4	2	1	2	3	125
5	2	2	3	1	135
6	2	3	1	2	108
7	3	1	3	2	129
8	3	2	1	3	110
9	3	3	2	1	107
k_1	102.33	119	107	115	
k_2	122.67	114	109.67	111.33	
k_3	115.33	107.33	123.67	114	
R	20.33	11.67	16.67	3.67	

表 3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis results

因素	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
菌体浓度	636.222	2	318.111	29.515	*
丙酮酸浓度	205.556	2	102.778	9.536	
表面活性剂 添加质量 分数	480.889	2	240.444	22.309	*
误差	21.556	2	10.778		

2.6 全细胞催化在发酵罐上进行放大

为高效利用重组 *E. coli*/pET28a-(T7-*shnal*)-(tac-*slr*)全细胞催化生产 Neu5Ac,按照正交实验优化后的条件,在发酵罐中进行全细胞催化反应的放大。在 5 L 发酵罐中,催化条件为:反应温度为 30 ℃,初始 pH 为 6.5,GlcNAc 浓度为 0.28 mol/L,丙酮酸

浓度为 1.38 mol/L,Triton X-100 添加质量分数 0.4%,菌体 OD₆₀₀ 为 30,进行全细胞转化,并用高效液相色谱检测转化液中各组分浓度。从图 8 可以看出,在反应前期,随着反应的进行,底物 GlcNAc 浓度不断下降,产物 Neu5Ac 浓度逐渐上升;反应 70 h 时,Neu5Ac 产量最高,为 180 mmol/L,转化率为 65.45%,比优化前提高了 49.27%。

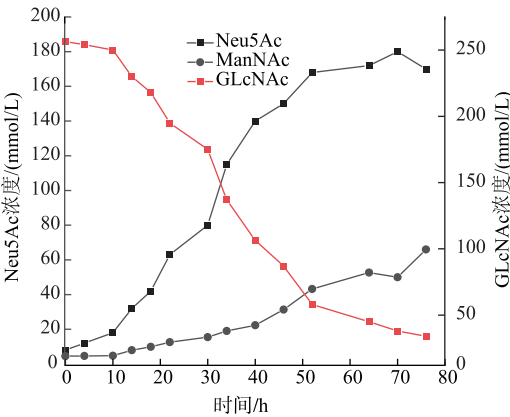


图 8 在 5 L 发酵罐中重组 *E. coli* 全细胞催化合成 Neu5Ac
Fig. 8 Synthesis of Neu5Ac using *E. coli* whole cells in 5 L fermentor

2.7 Neu5Ac 的分离纯化

全细胞转化后的转化液经过脱色处理后,将浓度为 42 mmol/L 的 Neu5Ac 溶液在阴离子树脂上进行上样,先经过水洗脱,然后用 0~0.65 mol/L 的甲酸线性洗脱,洗脱曲线见图 9(a)。随着甲酸浓度的增加,洗脱液中 Neu5Ac 的浓度也不断增加,含有 Neu5Ac 的洗脱液主要集中在 0.8~1.1 L,甲酸摩尔浓度在 0.1~0.6 mol/L 时,洗脱液中 Neu5Ac 浓度较高。因此,后续实验选择 0.6 mol/L 的甲酸作为洗脱液。

将含有 Neu5Ac 的洗脱液进行浓缩和结晶处理后,得到 Neu5Ac 晶体 0.44 g,结晶回收率为 42.5%,将纯化得到的 Neu5Ac 样品和 Sigma 公司的 Neu5Ac 标品用 HPLC 分析,Neu5Ac 标样和样品出峰时间一致,纯度为 98.3%,见图 9(b)。

3 结 语

全细胞催化法作为一种操作简单、副产物少,且反应条件温和、污染低的生产方法,相比其他生产工艺具有明显优势,更适合大规模生产。现阶段,全细胞生物催化法生产 N-乙酰神经氨酸需要添加

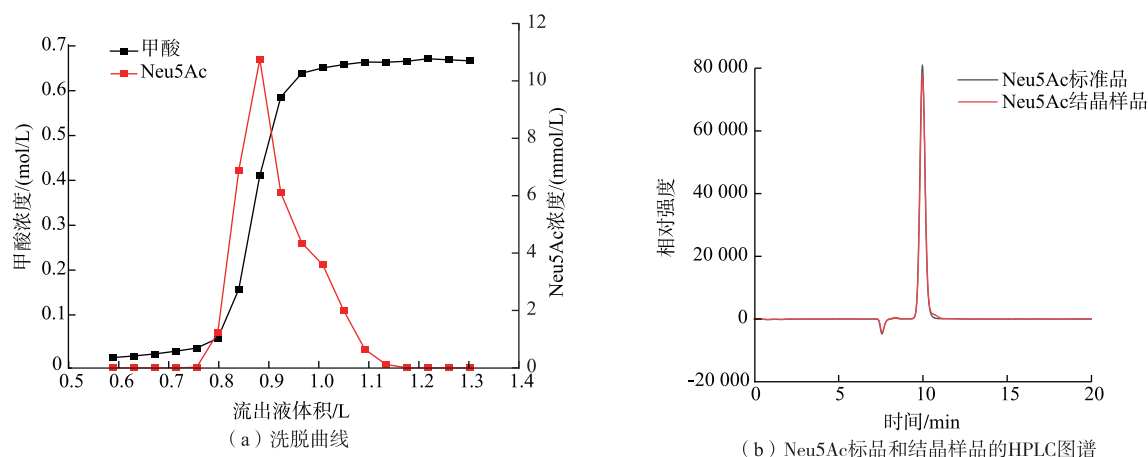


图 9 Neu5Ac 的洗脱曲线及 Neu5Ac 标品和结晶样品的 HPLC 图谱

Fig. 9 Elution curve of Neu5Ac and HPLC chromatogram of Neu5Ac standard and crystal sample

昂贵的 N-乙酰葡萄糖胺作为前体物,为了降低成本,作者以含有 N-乙酰葡萄糖胺的发酵液为底物进行全细胞催化,通过对催化条件进行优化,在菌体 OD₆₀₀ 为 30、丙酮酸添加量为浓度 1.38 mol/L、转化液起始 pH 为 6.5、Triton X-100 的添加质量分数为 0.4%、反应温度为 30 ℃ 的条件下,Neu5Ac 的产量可以达到 180 mmol/L,转化率达 65.45%,比优化前提高了 49.27%。反应后的转化液经脱色后过阴离

子树脂,洗脱液经浓缩、结晶后得到了较为纯净的 Neu5Ac,HPLC 检测分析其纯度为 98.3%,该生产工艺经济、高效,为 Neu5Ac 连续工业化生产提供了参考。本研究中全细胞催化生产 Neu5Ac 在 70 h 产量达到最高,转化过程中随着时间的延长,细胞的活性和理状态也会发生改变。因此,可以通过优化转化液的组成提高细胞的生理活性来进一步提高 Neu5Ac 的产量。

参考文献:

- [1] 杨鹏. N-乙酰神经氨酸特异性生物传感器的构建及生产菌株优化[D]. 济南:山东大学,2017.
- [2] 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.
- [3] SCHAUER R,KAMERLING J P. Exploration of the sialic acid world[J]. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*,2018,75:1-213.
- [4] 李宏越,柳鹏福,史吉平,等. 唾液酸的生理功能、应用及其生产方法[J]. *食品工业科技*,2014,35(3):363-368.
LI H Y,LIU P F,SHI J P,et al. Physiological function,application and manufacturing method of sialic acid[J]. *Science and Technology of Food Industry*,2014,35(3):363-368. (in Chinese)
- [5] CHEN X,VARKI A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids[J]. *ACS Chemical Biology*,2010,5(2):163-176.
- [6] SCHAUER R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions[J]. *Current Opinion in Structural Biology*,2009,19(5):507-514.
- [7] VISSER E A,MOONS S J,TIMMERMAN S B P E,et al. Sialic acid O-acetylation;from biosynthesis to roles in health and disease[J]. *The Journal of Biological Chemistry*,2021,297(2):100906.
- [8] HU S Y,CHEN J,YANG Z Y,et al. Coupled bioconversion for preparation of N-acetyl-D-neuraminic acid using immobilized N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid lyase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2010,85(5):1383-1391.
- [9] LIU X,LUO W C,ZHANG B N,et al. Design of neuraminidase-targeted imaging and therapeutic agents for the diagnosis and treatment of influenza virus infections[J]. *Bioconjugate Chemistry*,2021,32(8):1548-1553.
- [10] KAWAI N,IKEMATSU H,IWAKI N,et al. Comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir against influenza A/H1N1,A/H3N2,and B[J]. *Clinical Infectious Diseases*,2009,48(7):996-997.
- [11] GUIN S K,VELASCO-TORRIJOS T,DEMPSEY E. Explorations in a galaxy of sialic acids;a review of sensing horizons,

- motivated by emerging biomedical and nutritional relevance[J]. **Sensors & Diagnostics**, 2022, 1(1): 10-70.
- [12] YANG H Q, LU L P, CHEN X Z. An overview and future prospects of sialic acids[J]. **Biotechnology Advances**, 2021, 46: 107678.
- [13] LING A J W, CHANG L S, BABJI A S, et al. Review of sialic acid's biochemistry, sources, extraction and functions with special reference to edible bird's nest[J]. **Food Chemistry**, 2022, 367: 130755.
- [14] KAO C H, CHEN Y Y, WANG L R, et al. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant single whole cells co-expressing N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid aldolase [J]. **Molecular Biotechnology**, 2018, 60(6): 427-434.
- [15] ZHANG X L, LIU Y F, LIU L, et al. Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: advances and perspectives[J]. **Biotechnology Advances**, 2019, 37(5): 787-800.
- [16] TAO F, ZHANG Y N, MA C Q, et al. Biotechnological production and applications of N-acetyl-d-neuraminic acid: current state and perspectives[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 87(4): 1281-1289.
- [17] 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.
- [18] ZHOU J B, CHEN X Z, LU L P, et al. Enhanced production of D-acetyl-d-neuraminic acid by whole-cell bio-catalysis of *Escherichia coli*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016, 125: 42-48.
- [19] GAO C, XU X M, ZHANG X F, et al. Chemoenzymatic synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine by using the spore surface-displayed N-acetyl-D-neuraminic acid aldolase[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77(19): 7080-7083.
- [20] 陈芳. 全细胞催化生产 N-乙酰神经氨酸的条件优化及微生物发酵生产聚唾液酸的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [21] 桥本正道, 架间晃明, 藤井健治, 等. 透明质酸的制备方法, 中国: CN102124120A[P]. 2011-07-13.
- [22] 张丛丛, 陈彩霞, 陈笑, 等. 全细胞催化法生产 N-乙酰神经氨酸的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(4): 175-183.
- ZHANG C C, CHEN C X, CHEN X, et al. Advances in production of N-acetyl-D-neuraminic acid by whole-cell biocatalysis[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2015, 31(4): 175-183. (in Chinese)
- [23] TAO F, ZHANG Y N, MA C Q, et al. One-pot bio-synthesis: N-acetyl-D-neuraminic acid production by a powerful engineered whole-cell catalyst[J]. **Scientific Reports**, 2011, 1: 142.
- [24] 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.
- [25] 许杨, 陈芳, 林白雪, 等. 全细胞催化生产 N-乙酰神经氨酸的条件优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(8): 1331-1338.
- XU Y, CHEN F, LIN B X, et al. Optimization of whole-cell biocatalytic process for N-acetylneuraminic acid production [J]. **Microbiology China**, 2013, 40(8): 1331-1338. (in Chinese)
- [26] CHEN X Z, ZHOU J B, ZHANG L H, et al. Development of an *Escherichia coli*-based biocatalytic system for the efficient synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid[J]. **Metabolic Engineering**, 2018, 47: 374-382.
- [27] ZHAO L, TIAN R Z, SHEN Q Y, et al. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced N-acetylneuraminic acid production via whole-cell biocatalysis[J]. **Biotechnology Journal**, 2019, 14(7): e1800682.
- [28] 周俊波. 全细胞催化生产 N-乙酰神经氨酸的重组大肠杆菌构建[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [29] 邵宇, 张显, 胡孟凯, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 L-苯乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 1-8.
- SHAO Y, ZHANG X, HU M K, et al. Synthesis of L-phenyllactic acid catalyzed by recombinant *Escherichia coli* whole cell biotransformation[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2021, 47(14): 1-8. (in Chinese)
- [30] KLERMUND L, GROHER A, CASTIGLIONE K. New N-acyl-D-glucosamine 2-epimerases from cyanobacteria with high activity in the absence of ATP and low inhibition by pyruvate[J]. **Journal of Biotechnology**, 2013, 168(3): 256-263.
- [31] ZHU D Q, WU J R, ZHAN X B, et al. Enhanced N-acetyl-D-neuraminic production from glycerol and N-acetyl-D-glucosamine by metabolically engineered *Escherichia coli* with a two-stage pH-shift control strategy[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2019, 46(2): 125-132.
- [32] 朱德强. 产 N 乙酰神经氨酸重组大肠杆菌的构建及其生物转化合成[D]. 无锡: 江南大学, 2017.