

## 摘要

软骨素是一种重要的糖胺聚糖，被广泛应用于医药、饲料和食品等领域。微生物发酵法合成软骨素作为一种新兴的软骨素合成策略，具有绿色环保、经济高效等特点。目前，微生物法合成软骨素存在产量低下的问题，仅通过过表达路径酶及密码子优化异源基因表达的方法不足以提高代谢路径的碳通量和氮通量，进而高效提升软骨素产量。由于缺乏高效的代谢工程改造方法调控软骨素所需的碳供应和氮供应，因此需要设计精细化调控软骨素合成所需碳供应和氮供应的模式化策略，用于提高微生物发酵法合成软骨素的产量。本研究以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 STAR (DE3) 为宿主，通过引入 *E. coli* K4 来源的软骨素合成路径，优化碳代谢路径与氮代谢路径，显著提高了软骨素的产量，为软骨素的生产提供了新的策略。主要研究结果如下：

(1) 设计与构建软骨素合成路径。首先，由于野生型 *E. coli* BL21 STAR (DE3) 不能天然合成软骨素，通过引入 *E. coli* K4 来源的 UDP-葡萄糖脱氢酶 (KfoF)、UDP-氨基葡萄糖异构酶 (KfoA) 和软骨素聚合酶 (KfoC)，构建了软骨素合成路径，使得重组菌株 *E. coli* CL01 能够合成  $80.1 \text{ mg L}^{-1}$  软骨素。其次，通过质谱法，分析鉴定了软骨素，进而证明了软骨素路径的有效性。最后，通过分析软骨素合成路径中的关键代谢中间产物，确定了影响软骨素合成的关键瓶颈是碳氮路径供应不平衡。

(2) 优化软骨素合成的氮供应路径。首先，通过分析氮供应路径，表明谷氨酰胺是促进软骨素合成的关键前体。其次，通过过表达谷氨酰胺合成路径关键酶—谷氨酸脱氢酶 (GdhA) 和谷氨酰胺合成酶 (GlnA)，强化了氮供应路径，证明了谷氨酰胺的供应不足是限制软骨素合成的关键因素之一。再次，通过引入氨基葡萄糖合成酶 (GlmS) 突变体 ( $\text{GlmS}^{\text{E14K/D386V/S449P/E524G}}$ )，减缓了产物的反馈抑制，提高了谷氨酰胺的利用效率。最后，通过共表达基因 *gdhA*、*glnA* 和  $\text{glmS}^{\text{E14K/D386V/S449P/E524G}}$ ，强化了氮供应路径的效率，使得重组菌株 *E. coli* CL09 的软骨素产量达到了  $184.1 \text{ mg L}^{-1}$ ，与对照菌株 *E. coli* CL08 相比，提高了 39.4%。

(3) 优化软骨素合成的碳供应路径。首先，通过过表达软骨素前体 UDP-GlcA 合成路径关键酶—葡萄糖-6-磷酸异构酶 (Pgi)、葡萄糖磷酸变位酶 (Pgm)、葡萄糖-1-磷酸尿苷酸转移酶 (GalU) 和 UDP-葡萄糖脱氢酶 (KfoF)，强化了碳供应路径，其中 *kfoF* 为 UDP-GlcA 合成路径的关键基因。其次，通过过表达软骨素前体 UDP-GalNAc 合成路径关键酶—GlmS、磷酸葡萄糖胺变位酶 (GlmM)、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶 (GlmU) 和 UDP-氨基葡萄糖异构酶 (KfoA)，强化了碳供应路径，其中 *glmS* 和 *glmM* 为 UDP-GalNAc 合成路径的关键基因。最后，通过 RBS 工程，组合优化了关键基因 *kfoF*、*glmS* 和 *glmM*，进一步强化了碳供应路径，重组菌株 *E. coli* CL39 的软骨素产量达到了  $182.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，比对照菌株 *E. coli* CL15 提高了 49.1%。

(4) 平衡软骨素合成的碳供应和氮供应路径。借助具有不同拷贝数的表达载体，通过组合优化碳供应路径 (*glmS*、*glmM* 和 *kfoF* 基因) 与氮供应路径 (*gdhA* 和 *glnA* 基因)，改善软骨素合成所需要的碳供应和氮供应，重组菌株 *E. coli* CL46 的软骨素产量

达到了  $212.5 \text{ mg L}^{-1}$ 。最终，在 5 L 发酵罐中，重组菌株 *E. coli* CL46 的软骨素产量为  $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，比重组菌株 *E. coli* CL01 提高了 354.5%。

**关键词：**软骨素；代谢工程；大肠杆菌；RBS 调控

## Abstract

Chondroitin was an important glycosaminoglycan, which was widely used in medicine, feed, food and other fields. Microbial fermentation method for synthesizing chondroitin was an emerging strategy for chondroitin synthesis, which had the characteristics of green environmental protection, economic efficiency, and so on. At present, the main problem with microbial synthesis of chondroitin was low yield, and the methods of overexpressing pathway enzymes and optimizing heterologous gene expression with codons were not sufficient to efficiently increase metabolic pathway flux and chondroitin production. Due to the lack of efficient metabolic engineering methods to regulate the carbon and nitrogen supply required for chondroitin, it was necessary to design a model strategy for fine regulation of chondroitin synthesis to improve the production of chondroitin by microbial fermentation. In this study, *Escherichia coli* BL21 STAR (DE3) was used as the host, and chondroitin production was significantly increased by introducing chondroitin synthesis pathway from *E. coli* K4 through optimizing carbon metabolism pathway and nitrogen metabolism pathway, providing a new strategy for chondroitin production. The main findings are as follows:

(1) Designing and constructing the chondroitin synthesis pathway. Firstly, due to the wild-type *E. coli* BL21 STAR (DE3) cannot naturally synthesize chondroitin, by introducing UDP-glucose dehydrogenase (KfoF), UDP-glucosamine isomerase (KfoA) and chondroitin polymerase (KfoC) from *E. coli* K4, which constructed the chondroitin synthesis pathway, recombinant strain *E. coli* CL01 can synthesize 80.1 mg L<sup>-1</sup> chondroitin. Secondly, through mass spectrometry, chondroitin was analyzed and identified, thereby proving the effectiveness of the chondroitin pathway. Finally, by analyzing the key metabolic intermediates in the chondroitin synthesis pathway, it was determined that the key bottleneck of chondroitin synthesis was the imbalanced supply of carbon and nitrogen pathways.

(2) Optimizing the nitrogen supply pathway for chondroitin synthesis. Firstly, by analyzing the nitrogen supply pathway, it was indicated that glutamine was a key precursor for promoting chondroitin synthesis. Secondly, by overexpressing the key enzymes in the glutamine synthesis pathway—glutamate dehydrogenase (GdhA) and glutamine synthase (GlnA) to strengthen nitrogen supply pathway, proving that insufficient supply of glutamine was one of the key factors which limited chondroitin synthesis. Then, by introducing the mutant GlnS (GlnS E14K/D386V/S449P/E524G), the feedback inhibition of the product was slowed down and the utilization efficiency of glutamine was improved. Finally, by co-expressing genes *gdhA*, *glnA*, and *glnS* E14K/D386V/S449P/E524G, the efficiency of the nitrogen supply pathway was enhanced, the chondroitin production of the recombinant strain *E. coli* CL09 reached 184.1 mg L<sup>-1</sup>, higher 39.4% than control strain *E. coli* CL08.

(3) Optimizing the carbon supply pathway for chondroitin synthesis. First, the carbon supply pathway was strengthened by overexpressing the key enzymes of chondroitin precursor UDP-GlcA synthesis pathway—glucose-6-phosphate isomerase (Pgi), glucose phosphate mutase (Pgm), glucose-1-phosphate uridylyltransferase (GalU) and UDP glucose dehydrogenase (KfoF), and *kfoF* was the key gene of UDP GlcA synthesis pathway. Secondly, the carbon

supply pathway was strengthened by overexpressing the key enzymes of chondroitin precursor UDP-GalNAc synthesis pathway—GlmS, glucosamine phosphate mutase (GlmM), UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (GlmU) and UDP-glucosamine isomerase (KfoA), and *glmS* and *glmM* were the key genes of UDP GalNAc synthesis pathway. Finally, through RBS engineering, the key genes *kfoF*, *glmS* and *glmM* were combinatorial optimization, further strengthening the carbon supply pathway, and the chondroitin production of optimal recombinant strain *E. coli* CL39 reached 182.1 mg L<sup>-1</sup>, which was higher 49.1% than control strain *E. coli* CL15.

(4) Balancing the carbon and nitrogen supply pathways for chondroitin synthesis. Firstly, with expression vectors with different copy numbers, carbon supply pathway (*glmS*, *glmM* and *kfoF* genes) and nitrogen supply pathway (*gdhA* and *glnA* genes) were combinatorially optimized to improve the carbon supply and nitrogen supply, which was required for chondroitin synthesis, and production of chondroitin in *E. coli* CL46 reached 212.5 mg L<sup>-1</sup>. Secondly, in 5-L fermenter, the chondroitin production of the recombinant strain *E. coli* CL46 reached 3.5 g L<sup>-1</sup>, which was higher 354.5% than control strain *E. coli* CL01.

**Keywords:** Metabolic engineering; chondroitin; *Escherichia coli*; RBS regulation

## 目 录

摘 要.....	I
Abstract .....	III
目 录.....	V
第一章 绪论.....	1
1.1 硫酸软骨素概述.....	1
1.1.1 硫酸软骨素简介.....	1
1.1.2 硫酸软骨素分类.....	2
1.2 软骨素合成方法研究进展.....	3
1.2.1 软骨素简介.....	3
1.2.2 软骨素合成方法.....	4
1.2.3 微生物法合成软骨素.....	6
1.3 代谢工程改造策略合成软骨素及多糖类似物.....	8
1.3.1 蛋白质工程.....	8
1.3.2 辅因子工程.....	8
1.3.3 转录因子工程.....	9
1.3.4 模块路径工程.....	10
1.4 本研究的目的与意义.....	10
1.5 本论文的主要研究内容.....	11
第二章 材料与方法.....	12
2.1 实验材料.....	12
2.1.1 菌株和质粒.....	12
2.1.2 主要试剂.....	14
2.1.3 培养基.....	15
2.1.4 菌株培养.....	15
2.1.5 主要实验仪器.....	15
2.2 分子生物学实验操作.....	16
2.2.1 引物设计.....	16
2.2.2 细菌基因组及质粒的获取.....	16
2.2.3 PCR 扩增产物的回收及验证.....	16
2.2.4 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化.....	16
2.2.5 表达载体的构建.....	17
2.2.6 蛋白凝胶电泳.....	18
2.3 分析测定方法.....	18
2.3.1 细胞浓度测定.....	18

2.3.2 软骨素的收集.....	18
2.3.3 软骨素含量检测.....	18
2.3.4 软骨素的液相质谱鉴定.....	18
2.3.5 甘油检测.....	19
2.3.6 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 含量检测.....	19
2.3.7 谷氨酰胺的含量检测.....	19
2.3.8 发酵副产物的测定.....	19
第三章 结果与讨论.....	20
3.1 软骨素合成路径的构建.....	20
3.1.1 软骨素合成路径构建.....	20
3.1.2 软骨素的鉴定.....	21
3.1.3 软骨素合成瓶颈分析.....	22
3.1.4 小结.....	23
3.2 氮供给路径的改造与优化.....	23
3.2.1 谷氨酰胺添加对软骨素合成的影响.....	23
3.2.2 谷氨酰胺合成路径的强化.....	24
3.2.3 氨基葡萄糖合成酶反馈抑制的弱化.....	25
3.2.4 氮供给路径的组合优化.....	27
3.2.5 小结.....	28
3.3 碳供给路径的改造与优化.....	28
3.3.1 UDP-GlcA 合成路径的强化.....	28
3.3.2 UDP-GalNAc 合成路径的强化.....	29
3.3.3 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 路径的组合优化.....	30
3.3.4 小结.....	33
3.4 碳氮供给路径的平衡优化.....	33
3.4.1 碳氮供给路径的组装.....	33
3.4.2 碳氮供给路径的优化.....	34
3.4.3 5 L 发酵罐生产软骨素.....	36
3.4.4 小结.....	37
主要结论与展望.....	38
主要结论.....	38
展望.....	38
致 谢.....	40
参考文献.....	41
附录一: 作者在攻读硕士学位期间发表的论文.....	45
附录二: 引物.....	46

# 第一章 绪论

## 1.1 硫酸软骨素概述

### 1.1.1 硫酸软骨素简介

硫酸软骨素 (Chondroitin sulfate, CS)、肝素 (Heparan sulfate, HS)、透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 和硫酸皮肤素 (Keratan sulfate, KS) 是动物细胞体内常见的糖胺聚糖, 具有促进细胞生长、信号传导及参与免疫反应等重要的生理功能<sup>[1]</sup>。从分子结构角度分析, CS 是一种酸性线性多糖, 碳骨架由交替的葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid, GlcA) 和 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 经过  $\beta$ -1, 3 和  $\beta$ -1, 4 糖苷键连接延伸而成<sup>[2]</sup>, 其聚合物多糖链的分子量通常不超过 50 kDa。不同的磺基转移酶特异性催化不同的磺酸化位点, 因此形成不同构型的 CS<sup>[3]</sup>。在实际应用过程中, 软骨素多糖中的二糖单位通常根据硫酸盐基团修饰的位置进行分类, 如图 1-1 所示, 可分为 CS-O (GlcA-GalNAc)、CS-A (GlcA-GalNAc (4S))、CS-C (GlcA-GalNAc (6S))、CS-D (GlcA (2S)-GalNAc (6S))、CS-B (GlcA (2S)-GalNAc (4S)) 及 CS-E (GlcA-GalNAc (4,6S))。CS 与其他天然存在的大分子一样, 具有复杂多样的结构, 且该结构因组织、器官、物种、甚至地域等条件的变化而改变。因此, CS 的材料来源至关重要<sup>[4]</sup>。其中, 来自陆地动物的软骨素多糖几乎完全由非磺酸化 (O) 和单磺酸化 (A 和 C) 单元组成<sup>[5]</sup>, 而在海洋物种中, 过磺酸化 (D、E 和 B) 单元的比例更高<sup>[6, 7]</sup>。

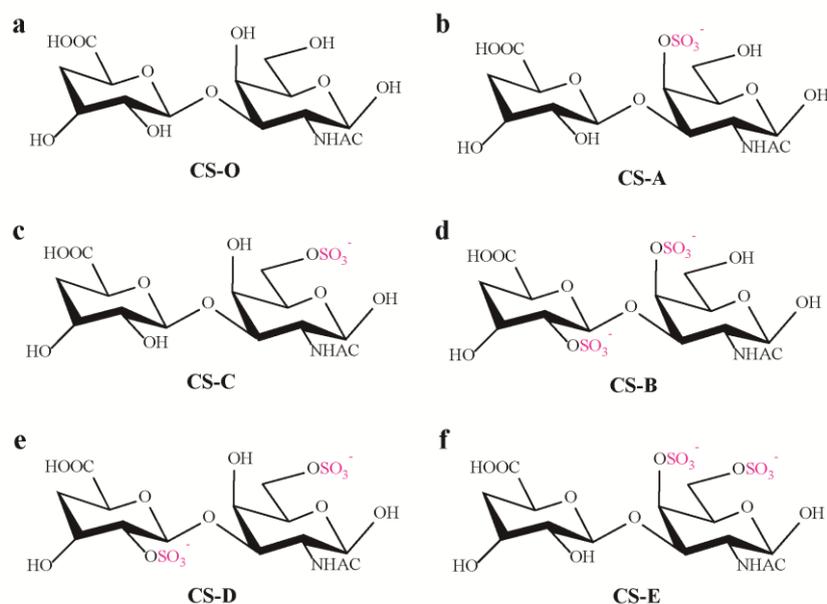


图 1-1 软骨素多糖结构

Fig. 1-1 The molecular structure of chondroitin sulfate

注: (a) CS-O 为软骨素; (b) CS-A 为硫酸软骨素 A; (c) CS-C 为硫酸软骨素 C; (d) CS-B 为硫酸软骨素 B; (e) CS-D 为硫酸软骨素 D; (f) CS-E 为硫酸软骨素 E。

### 1.1.2 硫酸软骨素分类

#### (1) 硫酸软骨素 A (CS-A)

硫酸软骨素最常见的磺酸化形式是软骨素-4-硫酸(CS-A)和软骨素-6-硫酸(CS-C),其中牛组织来源的CS富含CS-A<sup>[8]</sup>。CS-A是由GalNAc和GlcA组成,其中二糖单位在GalNAc位置的4位被磺酸化。

CS-A在生理医疗领域有广泛应用。研究发现,CS对炎症的治疗作用可能与细胞因子和相关调节因子的相互作用有关,而这些相互作用与CS二糖单位上的磺酸化模式有关。研究人员通过测试牛组织来源的CS-A和鲨鱼组织来源的CS-C的作用,结果发现两者均有效提高了对炎症的治疗作用。此外,研究发现CS-A多糖的特定磺酸化模式携带调节神经元功能,有助于促进神经损伤后再生修复,从而维持周围神经生长<sup>[9]</sup>。

另外,CS-A近年来被用于人造干细胞领域。糖胺聚糖(Glycosaminoglycan, GAG)由于特殊的生物活性,被广泛应用于组织工程领域。研究人员发现固定在壳聚糖膜上的CS-A有利于促进间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)对软骨细胞损伤的修复,从而促进了MSC的生长<sup>[10]</sup>。

#### (2) 硫酸软骨素 C (CS-C)

软骨素-6-硫酸盐(CS-C)的磺酸化修饰位于GalNAc位置的6位,其中鲨鱼软骨CS富含C单位(6-磺酸化),同时CS-C是胚胎发育中硫酸软骨素存在的主要形式。

在人体相关研究中,CS-C主要被用于治疗骨关节炎,同时它在组织恢复中也具有治疗潜力。此外,CS-C也可用于抑制乳腺癌细胞的扩散。CS-C通过促进与各种宿主细胞(如成纤维细胞或白细胞)的粘附,从而用于预防癌细胞的侵袭。

CS-C也可以用于皮肤替代品领域<sup>[11]</sup>。双层明胶-软骨素-6-硫酸盐-透明质酸(明胶-CS-C-HA)生物材料作为皮肤替代品不仅有助于伤口愈合,而且提高了移植成功率。研究发现,与单独使用CS-C相比,使用不同磺酸化的CS多糖组合可能会更好地改善伤口愈合,富含CS-C的多糖更有利于促进细胞增殖<sup>[12]</sup>,而CS-A单元促进增殖但抑制粘附,因此依据不同的症状对应选择不同类型的硫酸软骨素是不可或缺的过程。

#### (3) 硫酸软骨素 E (CS-E)

研究表明,过磺酸化CS-E的CS多糖是预防病毒感染的有效抑制剂,特别是来自鱿鱼软骨的CS-E已被应用于对抗单纯疱疹病毒(*Herpes simplex virus*, HSV)<sup>[13]</sup>、T细胞白血病病毒I型<sup>[14]</sup>和黄病毒登革热<sup>[15]</sup>。以抗病毒活性为例,CS-E通过与病毒包膜附着蛋白的相互作用,进而抑制病毒进入宿主细胞。在HSV的研究中发现,包含多个连续E单位修饰的CS-E可以被病毒附着糖蛋白优先结合,从而提高病毒的抑制效率<sup>[16]</sup>。

另外,CS-E可以拓展用于信号传导领域。来自鱿鱼软骨的CS-E可以改善水凝胶的机械性能。含CS-E的水凝胶机械性能与天然软骨的机械性能非常相似,因此有潜力用于软骨的替代。

#### (4) 硫酸软骨素 D (CS-D)

鲨鱼软骨是CS-D的主要来源,主要用作膳食补充剂。鲨鱼软骨CS-D多糖具有超过20%的独特二硫酸二糖单元,该单元由GlcA(2位磺酸化)和GalNAc(6位磺酸

化) 残基组成。研究发现, CS-D 可以与肝细胞生长中起关键作用生长因子相结合, 从而有助于调节肝组织代谢, 进一步开发肝再生治疗方法。此外, CS-D 在大脑发育过程中也具有重要作用, 对神经元表现出强烈的生长促进活性<sup>[17]</sup>。

### (5) 硫酸软骨素 B (CS-B)

硫酸软骨素 B (CS-B), 也称为硫酸皮肤素, 是硫酸软骨素的一种异构形式, 特殊性在于包含一定比例的艾杜糖醛酸 (Iduronic acid, IdoA) 代替了主链中的 GlcA。磺基化修饰存在于 4 位的 GalNAc 和 2 位的 IdoA。CS-B 通常与蛋白质相互结合, 从而产生类似于蛋白多糖的大分子。CS-B 能够与白细胞和内皮组织细胞表面的粘蛋白激素 2 (EMR2) 的受体区域相互作用<sup>[18]</sup>。但与硫酸乙酰肝素和透明质酸等糖胺聚糖相比, CS-B 的研究比较少。最近研究表明, CS-B 除了具有常规的结构作用外, 在中枢神经系统发育、伤口修复、感染、信号传导和细胞分裂方面也具有潜在的功能<sup>[19]</sup>。

### (6) 岩藻糖基化硫酸软骨素 (FCS)

岩藻糖基化硫酸软骨素 (Fucosylated chondroitin sulfate, FCS) 最初是在海参中发现的一类软骨素多糖, 与 CS 密切相关<sup>[20]</sup>。FCS 修饰方式是以磺酸化的- $\beta$ -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalNAc-二糖重复单元为基础, 在 GlcA 的 3 位通过糖苷键连接额外的岩藻糖支链而成。由于不同地理区域的海参在岩藻糖基团与 GalNAc 的不同位点被修饰, 从而产生了具有不同磺酸化模式的 FCS。FCS 在血管生成、炎症、癌症转移、细胞生长、病毒感染和高血糖等相关生理疾病中, 具有很大的治疗潜力。

## 1.2 软骨素合成方法研究进展

### 1.2.1 软骨素简介

软骨素是 CS 未磺酸化形式的多糖, 由 GlcA 和 GalNAc 组成的重复二糖。软骨素是 CS 的起始原料, 可以由 F 型多杀假单胞菌和副加利纳曲霉产生。此外, *E. coli* K4 具备天然的果糖软骨素合成路径, 果糖软骨素经化学法处理可脱果糖基团获得软骨素。

在动物组织中, 软骨素是硫酸软骨素合成必不可少的碳链骨架, 在磺基转移酶及磺酸盐供体 PAPS 的修饰下, 软骨素被磺基化生成硫酸软骨素。软骨素多糖的合成在内质网或高尔基体中进行, 在特定糖胺聚糖蛋白连接区 GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-O-Ser 的引导下合成, 即分别通过木糖基转移酶 (XylT)、 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶 I (GalT-I)、 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶 II (GalT-II) 和  $\beta$ -1,3-葡萄糖醛酸转移酶 I (GlcAT-I) 的逐步修饰, 依次添加单个木糖, 两个半乳糖和单个葡萄糖醛酸残基, 进而组装成四糖结构。其次, GalNAc 转移酶 I (GalNAcT-I) 将 GalNAc 添加到四糖连接区域中的非还原末端 GlcA 残基上, 触发软骨素骨架的合成。紧接着, 在 GlcA 转移酶 II (GlcAT-II) 和 GalNAc 转移酶 II (GalNAcT-II) 的作用下依次交替添加 GlcA 和 GalNAc 残基, 从而实现软骨素多糖的延伸。

虽然目前尚未实现软骨素的工业化应用, 但是软骨素/硫酸软骨素的微生物合成是相对于动物提取加工过程更具有吸引力的替代方案。*E. coli* K4 和 F 型多杀性巴斯德杆菌可以天然产生一类荚膜多糖 (CPS), 与未磺酸化软骨素具备相同的碳骨架, 并且可

以采用化学法或酶法转化为 CS 的起始材料。因此,上述菌株具备以下的基因模块:(a) 合成模块,即 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 合成。(b) 组装模块,软骨素合成酶(KfoC)是一种糖基转移酶,可催化  $\beta 1, 3$ -GlcA 和  $\beta 1, 4$ -GalNAc 转移反应,将 GlcA 和 GalNAc 聚合成软骨素链  $[\text{GlcA-}\beta(1-3)\text{-GalNAc-}\beta(1-4)]_n$ 。*E. coli* K4 来源的 KfoC 由 686 个氨基酸残基组成,N 端和 C 端分别包含 GalNAc 与 GlcA 两个保守的糖基转移酶作用位点。(c) 转运模块:即将产生的软骨素多糖运输到细胞外的转运系统。

### 1.2.2 软骨素合成方法

软骨素的合成方法主要有酶解法、酶促合成法和微生物发酵法。

(1) 酶解法:借助透明质酸酶,随机裂解硫酸软骨素中的  $\beta$ -N-乙酰己糖胺-(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键获得软骨素<sup>[21]</sup>。例如,利用牛睾丸透明质酸酶(BTH)降解经过酸性甲醇脱盐处理的硫酸软骨素多糖链,获得了 38.0%的软骨素四糖和 35.0%的软骨素六糖(图 1-2)。然而,由于硫酸软骨素及透明质酸酶的价格昂贵,很难实现商业化应用。

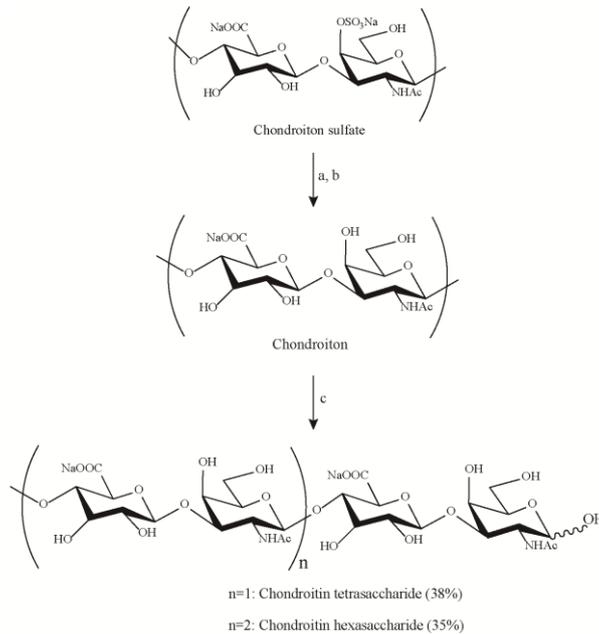


图 1-2 透明质酸酶法裂解硫酸软骨素获得软骨素多糖流程

Fig. 1-2 Hyaluronic acid enzymatic decomposition of chondroitin sulfate to obtain chondroitin polysaccharide process

注:试剂和条件:a. 盐酸/甲醇,室温,7天;b. 0.1 M NaOH(水溶液),室温,24 h, 77.0%; c. 2.5% 透明质酸酶, NaOAc/NaCl 缓冲液, pH 5.0, 37°C, 7天。

(2) 酶促合成法:采用源自 *E. coli* K4 的糖基转移酶完成软骨素的合成。例如,借助软骨素聚合酶(KfoC)将 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 依次连接到单糖对硝基苯基葡糖苷酸(GlcA-pNP)<sup>[22-24]</sup>,从而延伸获得了软骨素寡糖骨架(图 1-3)。然而,由于单糖 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 成本过高,难于进行大规模商业化生产<sup>[25]</sup>。

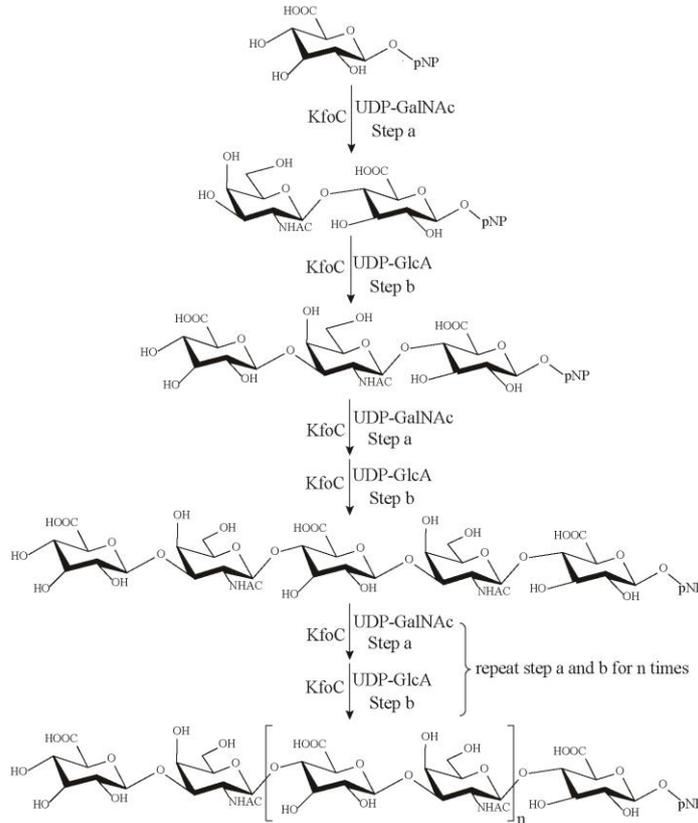


图 1-3 酶法合成软骨素流程

Fig. 1-3 Process of enzymatic synthesis of chondroitin

(3) 微生物发酵法：通过代谢工程策略强化软骨素合成路径关键酶，从而提高软骨素的合成效率。例如，通过平衡前体 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 的供给效率，在 30 L 发酵罐上果糖软骨素的产量达到了  $8.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [26]。在此基础上，将果糖软骨素经过酸水解处理（图 1-4），可以获得纯度为 89.0-94.0%的软骨素[27]。然而，果糖软骨素的处理过程繁琐且需要消耗大量化学试剂，会对环境造成污染[28,29]，不利于绿色经济的发展理念。

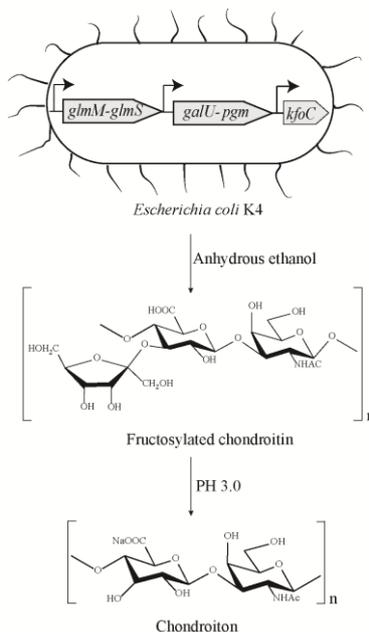


图 1-4 微生物发酵法合成软骨素流程

Fig. 1-4 Process of chondroitin synthesis by microbial fermentation

### 1.2.3 微生物法合成软骨素

为了进一步提高微生物法合成软骨素在工业化生产上的可能性,开发直接合成软骨素的高效微生物细胞工厂迫在眉睫。*E. coli* K5、兽疫链球菌 (*Streptococcus zoonoticus*) 分别具备天然合成肝素前体、透明质酸路径,是糖胺聚糖合成的常见宿主。研究人员分别通过代谢工程方法,将 *E. coli* K4 来源 *kfoA*、*kfoC* 引入 *E. coli* K5、*S. zooepidemicus*, 构建完整的软骨素合成路径(图 1-5)。最终,重组 *E. coli* K5、*S. zooepidemicus* 分别产生了  $52.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $300.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的软骨素<sup>[30, 31]</sup>。然而,软骨素产量不足限制了其应用前景。为了解决上述问题,分别采取了优化关键酶活性、强化代谢路径前体供应和敲除副产物等策略(表 1-1)。(1) 通过优化关键酶活性有助于提高其在异源宿主中的催化效率。研究人员将 *E. coli* K4 来源 *kfoA*、*kfoC* 和枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168) 来源 UDP-葡萄糖脱氢酶(编码基因 *tuaD*) 引入毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 构建软骨素合成路径,仅产生了  $5.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的软骨素。为了提高软骨素的合成,通过密码子优化基因 *kfoA*、*kfoC* 和 *tuaD*, 最终软骨素产量达到了  $102.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[32]</sup>。(2) 通过优化关键酶活性与敲除副产物结合的策略有助于提高前体软骨素的合成效率。通过密码子优化表达基因 *kfoA*、*kfoC* 并引入谷氨酸棒状杆菌构建软骨素合成路径,产生了  $250.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的软骨素。为了抑制副产物乳酸的积累,敲除乳酸脱氢酶(LdhA),最终软骨素产量达到了  $880.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[33]</sup>。(3) 通过强化代谢路径关键基因表达有利于提高前体供应。研究人员将 *E. coli* K4 来源 *kfoA*、*kfoC* 和 *kfoF* 引入 *E. coli* BL21 STAR (DE3), 构建了软骨素合成路径,产生了  $98.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的软骨素。为了优化关键基因 *kfoA*、*kfoF* 和 *kfoC* 表达,通过以假操纵子的形式微调基因的表达,最终软骨素产量达到了  $213.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了更加精细化调控前体供应,在 *B. subtilis* 168 的相关研究中,通过引入 *kfoA*、*kfoC* 构建软骨素合成路径,产生了  $1830.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的软骨素<sup>[34]</sup>。通过进一步强化关键基因 *tuaD* 的表达,软骨素产量达到了  $2540.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[35]</sup>。为了平衡前体供给,通过共表达基因 *tuaD*、*glmM* 和 *kfoA*, 最终软骨素产量达到了  $7150.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[36]</sup>。

表 1-1 软骨素多糖的微生物法生产

Table 1-1 Microbial production of chondroitin polysaccharide

软骨素类型	菌株	代谢改造策略	发酵周期(h)	产量( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	文献
果糖软骨素	<i>E. coli</i> K4	过表达转录调节因子 <i>rfaH</i>	50	5300.0	[37]
	<i>E. coli</i> K4	过表达转录调节因子 <i>slyA</i>	48	2600.0	[38]
	<i>E. coli</i> K4	过表达 <i>kfoC</i>	36	3470.0	[39]
	<i>E. coli</i> K4	过表达 <i>rfaH</i> 、 <i>pgm</i> 和 <i>galU</i>	-	592.0	[40]
	<i>E. coli</i> K4	敲除 <i>pfkA</i> 、组合优化表达 <i>pgm</i> 、 <i>galU</i> 、 <i>glmS</i> 、 <i>glmM</i> 和 <i>kfoC</i> 基因	40	8430.0	[26]
	<i>E. coli</i> K4	过表达 <i>kfoA</i> 和 <i>kfoF</i>	-	1739.0	[41]



## 1.3 代谢工程改造策略合成软骨素及多糖类似物

### 1.3.1 蛋白质工程

蛋白质工程主要是通过改变酶的活性、稳定性、底物特异性及对映选择性等方式以改善酶的催化特性。通过随机突变提高酶的催化活性是蛋白质工程中的典型策略。例如，通过以 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍作为诱变剂进行对 *E. coli* K4 随机诱变，以细胞膜外形成的糖胺聚糖变色圈大小为果糖软骨素的定量依据，发现突变体 KfoC<sup>R313Q</sup> 提高了对 UDP-GlcA 的亲和力，使果糖软骨素产量提高了 80.0%。尽管在特定情况下通过随机诱变获得了所需的突变体，但是该策略产生的大多数突变体可能会降低活性甚至出现负结果，并且随机诱变产生的酶突变体库通常是非常大的，通常需要高通量筛选方法。因此，优选的方法是在分析酶结构的基础上针对结合位点或活性口袋附近设计定点突变，从而提高酶的催化活性。例如，利用分子对接发现突变体 KfoC<sup>R268Q</sup> 与 UDP-GlcA 和 UDP-GalNAc 的相互作用能低于野生型 KfoC，突变体 KfoC<sup>R268Q</sup> 的表达使果糖软骨素产量提高了 18.7%。

当天然酶被引入生物合成途径时，可能会受到酶活性低、表达量少、稳定性差、功能丧失等问题的限制，从而降低了使用天然酶构建微生物细胞工厂的能力。因此，通过蛋白质工程改造获得所需的突变体对于异源产物的从头合成至关重要。例如，通过截短 KfoC 的 N 末端 57 个氨基酸 (KfoC57)，突变体 KfoC57 的表达量和酶活性分别比野生型 KfoC 提高了 10.0 倍和 2.1 倍。上述研究表明，通过截短策略改造 KfoC，有助于提高 KfoC 的表达量，进而提高合成果糖软骨素的能力。另外，天然产物生物合成的另一主要瓶颈是酶活性有限。对于代谢工程中的异源路径构建，蛋白质工程是提高产物合成效率的有效方法之一。例如，以毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 为底盘，通过密码子优化异源基因 *tuaD*、*kfoA* 和 *kfoC*，使软骨素产量提升了 16.3 倍。

### 1.3.2 辅因子工程

辅因子通常是很多酶充分发挥生物学功能和催化活性的关键因素，一般包括非蛋白质化合物和金属离子。辅因子为生物合成反应、分解代谢反应提供氧化还原载体，也是作为细胞能量转移的重要组分，可以有效地促进物质转化，甚至促进许多热力学上不利的酶催化反应。微生物中超过 1500 种酶促反应需要辅因子的参与<sup>[49, 50]</sup>，因此辅因子的不平衡会影响细胞生长并造成能量浪费。为此，已经开发了各种辅因子平衡调控策略，以实现化学品的有效生产<sup>[51]</sup>。主要包括：调节内源辅因子系统、异源辅因子再生系统和修改辅因子偏好性。

#### (a) 调节内源辅因子系统

维持胞内辅因子平衡是实现化学品生产的基本要求，这种平衡需要辅因子的适当消耗和再生<sup>[52]</sup>。糖胺聚糖(如软骨素和透明质酸)的合成途径涉及不同辅因子,包括 NAD<sup>+</sup>、UTP 和乙酰辅酶 A。多种辅因子的参与使得调控糖胺聚糖的合成过程更为复杂,而且辅因子的不足也会抑制糖胺聚糖的前体合成及聚合效率。为了解决上述问题,通过强化 NAD<sup>+</sup>的积累提高了透明质酸的产量。在乳酸乳球菌合成透明质酸的过程中,消耗大量

的  $\text{NAD}^+$  会破坏原有的氧化还原状态。通过敲除基因 *ldhA*，使得碳流导向乙醇和乙偶姻的合成，在此过程中生成了更多的  $\text{NAD}^+$ ，这为 UDP-葡萄糖脱氢酶编码基因 *ugd* 的催化提供了充足的辅因子  $\text{NAD}^+$ 。最终，重组菌株 *L. lactis* MKG6 合成透明质酸的产量比对照菌株 *L. lactis* SJR3 提高了 3 倍<sup>[53, 54]</sup>。

### (b) 异源辅因子再生系统

异源辅因子再生系统是提高辅因子平衡能力的有效方式。糖胺聚糖的合成较为复杂，涉及众多辅因子的参与。为了提高辅因子含量，通过引入多磷酸激酶构建辅因子再生系统提高了透明质酸产量。在一锅法合成透明质酸的研究中，以 GlcA 和 GlcNAc 为底物合成 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 需要辅因子 ATP 和 UTP 参与。通过筛选 *Ruegeria pomeroyi* 来源的多磷酸激酶 (PPK2-3)，用于 ATP 和 UTP 的再生。最终，透明质酸的产量达到了  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[55]</sup>。

### (c) 修改辅因子偏好性

辅因子偏好性对于代谢途径的设计至关重要，通过高通量筛选及理性改造策略均可改变辅因子的偏好性。N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 是一种重要的氨基糖，GlcNAc 的合成需要消耗 NADPH，同时会生成大量的 NADH，导致了细胞内氧化还原不平衡。为了解决辅因子不平衡的问题，通过定点突变修改关键酶的辅因子偏好性，实现了辅因子的高效循环。通过将谷氨酸棒状杆菌本源  $\text{NAD}^+$  偏好性的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 进行理性改造，获得了突变体  $\text{GAPDH}^{\text{N208R/F323S}}$  和  $\text{MDH}^{\text{E47G/A51S}}$ ，两者均提高了对  $\text{NADP}^+$  的亲合力。最后，重组菌株 CGGN3mdhM7 的 GlcNAc 产量比对照菌株 CGGN2 提高了 34.2%<sup>[56]</sup>。

## 1.3.3 转录因子工程

转录因子调控是调节基因表达的基本方式，是微生物代谢的关键调控步骤之一。转录因子的调控主要是通过与特定启动子区域序列相结合，从而调节目的基因的转录水平。在微生物生产多糖的研究中，常见的调节细胞多糖合成的转录因子为 RfaH 和 SlyA。(1) 转录因子 RfaH 正向调节多糖合成基因簇的表达。在革兰氏阴性菌中，转录因子 RfaH 主要用于调节细胞表面成分（包括胞外多糖、生物膜和脂多糖）以及荚膜多糖的产生。在 *E. coli* K92 合成多糖的过程中，通过敲除转录因子 RfaH，多糖转运基因 *kpsM* 的表达减少了十倍。通过进一步分析，多糖合成基因簇 *neuBCDES* 的所有基因表达水平均出现不同程度的降低，从而降低多糖的合成<sup>[57]</sup>。此外，在 *E. coli* K4 合成果糖软骨素的过程中，为了提高多糖的产量，强化转录因子 RfaH 的表达，提高了果糖软骨素生物合成途径 (*kfoC* 和 *kfoA*) 基因的表达，进而提高了多糖生物合成前体 UDP-GlcA 的积累，最终重组菌株 EcK4r3 果糖软骨素的产量比对照菌株 K4 提高了 140.0%<sup>[37]</sup>。(2) 转录因子 SlyA 正向调节多糖转运基因簇的表达。SlyA 是 MarR 家族细菌转录调节的成员，已被证实有助于增强生物膜形成的相关基因表达<sup>[58]</sup>。*E. coli* K5 可以天然合成荚膜多糖，通过强化转录因子 SlyA 的表达，提高了 region 1 启动子 (PR1) 的强度，从而提高了多糖转运基因簇基因 *kpsE* 和 *kpsF* 的表达<sup>[59]</sup>。此外，通过在 *E. coli* K4 中强化转录因子 SlyA 的表达，提高了果糖软骨素转运基因簇基因 *kpsE* 和 *kpsM* 的表达，进而提高了软骨素聚合酶

编码基因 *kfoC* 的表达, 最终重组菌株 K402 果糖软骨素的产量比对照菌株 K4 提高了 185.0%<sup>[60]</sup>。

### 1.3.4 模块路径工程

模块化工程可以将复杂的代谢网络划分为多个模块, 通过对代谢路径模块优化从而实现代谢流的重分配。常见的模块化策略主要包括三个水平: DNA 水平模块化、RNA 水平模块化和蛋白质水平模块化。(a) DNA 水平模块化的常用方法为调节基因拷贝数。在乳-N-四糖 (LNT) 的合成路径中, UDP-GlcNAc 和乳糖在  $\beta$ -1, 3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (LgtA) 的作用下合成乳酸-N-三糖 II (LNT II)<sup>[61]</sup>, LNT II 进一步与 UDP-Gal 在  $\beta$ -1, 3-半乳糖基转移酶 (WbgO) 的作用下合成 LNT。为了高效优化复杂代谢路径的代谢流, 将 UDP-Gal 合成路径与 LNT II 聚合路径作为两个模块, 通过使用不同拷贝数的质粒调节两个模块的关键基因表达强度, 最终获得了 3.42 g/L LNT<sup>[62]</sup>。(b) RNA 水平模块化的常用方法为利用启动子工程调节转录水平。在软骨素的合成路径中, 软骨素合成模块关键基因 *kfoA*、*kfoC* 和 *ugdA* 的表达强度对产物的合成效率至关重要。为了获得最优的表达强度, 通过筛选不同强度的启动子, 优化软骨素聚合模块的基因表达, 最终重组菌株 CgCAU 软骨素的产量比对照菌株 CgCA 提高了 283.3%<sup>[33]</sup>。(c) 蛋白质水平的模块化常用方法为设计核糖体结合位点 (Ribosome binding site, RBS)。在果糖软骨素的合成路径中, 为了精细化调控 5 个关键基因 *pgm*、*galU*、*glmS*、*glmM* 和 *kfoC* 的表达强度, 通过将果糖软骨素的合成路径划分为 3 个模块, 使用 RBS 工程优化 UDP-GalNAc 模块、UDP-GlcA 模块和聚合模块的关键酶表达, 最优重组菌株 ZQ25 的果糖软骨素产量比对照菌株 ZQ14 提高了 46.3%<sup>[26]</sup>。

## 1.4 本研究的目的是与意义

### (1) 立题依据

硫酸软骨素作为一种糖胺聚糖有着广泛的应用前景, 在医药行业可用于抗炎及癌症治疗, 在食品行业可用于食品添加剂, 这使得硫酸软骨素的市场需求逐年递增。目前, 微生物法-酶法结合是合成硫酸软骨素最有前景的方式。硫酸软骨素的多糖骨架是软骨素, 然而软骨素的合成方法并不成熟, 主要依赖于化学法提取。此外, 越来越多的宿主被开发用于软骨素的微生物法合成, 由于 *E. coli* 的遗传背景清晰、分子改造工具丰富、培养周期短和培养成本低廉等优势, 因此 *E. coli* 更适合作为代谢工程改造软骨素合成的宿主。

### (2) 研究意义

本研究借助代谢工程策略, 设计并构建了软骨素生产菌株, 为软骨素的生物法合成提供了新的策略。该合成路径以甘油为底物, 降低了生产成本, 实现了低价值底物向高附加值化合物的转化。其次, 微生物法直接合成软骨素, 与化学提取法相比, 更符合绿色、可持续发展的要求。此外, 本文涉及的代谢工程改造 *E. coli* 合成软骨素的相关策略也可以应用于其它糖胺聚糖的生产, 为微生物法生产糖胺聚糖提供了借鉴和参考。

## 1.5 本论文的主要研究内容

本论文以 *E. coli* BL21 STAR (DE3) 为宿主，设计并构建软骨素合成路径，并通过基因表达水平优化等策略，有效平衡软骨素合成过程中碳氮元素的供给效率，最终实现软骨素的高效合成。主要研究内容如下：

(1) 软骨素合成路径的设计与构建。首先，通过引入软骨素合成路径，获得软骨素生产菌株；其次，通过摇瓶发酵与产物鉴定，确定软骨素的合成；最后，通过分析路径代谢中间产物，鉴定软骨素合成的关键瓶颈。

(2) 软骨素合成氮供应路径的优化。首先，通过评估谷氨酰胺浓度对软骨素合成的影响，确定氮供应路径的关键瓶颈；其次，通过引入 *GlmS* 突变体，解除 *GlcN-6P* 的反馈抑制；最后，协同优化氮供应路径，提高软骨素氮供应路径的效率。

(3) 软骨素合成碳供应路径的优化。首先，通过评估单个路径酶对软骨素合成的影响，确定影响软骨素碳供应路径的关键酶；其次，借助 RBS 调控策略组合优化路径酶 *glmS*、*glmM* 和 *kfoF* 的表达水平，优化软骨素碳供应路径效率。

(4) 软骨素合成碳供应和氮供应路径的平衡。首先，在 *E. coli* 中组装软骨素碳供应路径和氮供应路径，获得软骨素生产菌株；其次，通过平衡碳供应路径模块与碳供应路径模块，筛选软骨素合成的最优重组菌株；最后，在 5 L 发酵罐水平上，评估重组菌株生产软骨素的能力。

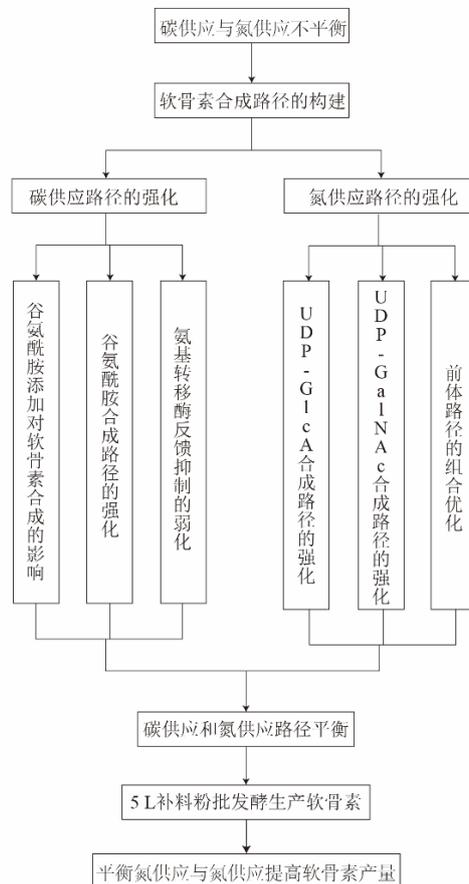


图 1-6 技术路线示意图

Fig. 1-6 Schematic diagram of technical route

## 第二章 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌株和质粒

研究中构建的菌株及表达载体见表 2-1。

表 2-1 本研究使用的菌株和质粒  
Table 2-1 Strains and plasmids used in this study

菌株	特性	来源
<i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3)	用于构建软骨素合成路径	实验室保藏
<i>E. coli</i> K4	具备果糖软骨素的合成路径	实验室保藏
<i>E. coli</i> CL01	菌株 <i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3) 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA-kfoF-kfoC</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL02	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glnA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL03	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>gdhA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL04	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glnA-gdhA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL05	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glnA-gdhA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL06	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL07	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL08	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL09	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glmS</i> *	本研究构建
<i>E. coli</i> CL10	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glnA-gdhA-glmS</i> *	本研究构建
<i>E. coli</i> CL11	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>pgi</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL12	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>pgm</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL13	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>galU</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL14	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL15	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glmS</i> *	本研究构建
<i>E. coli</i> CL16	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glmM</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL17	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>glmU</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL18	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM- <i>kfoA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL19	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL20	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL21	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL22	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建

表 2-1 本研究所用菌株和质粒 (续表)

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study (continued)

菌株	特性	来源
<i>E. coli</i> CL23	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL24	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL25	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL26	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL27	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>L</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL28	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL29	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL30	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL31	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL32	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL33	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL34	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL35	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL36	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>M</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL37	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL38	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL39	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL40	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL41	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL42	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建

表 2-1 本研究所用菌株和质粒 (续表)

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study (continued)

菌株	特性	来源
<i>E. coli</i> CL43	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>L</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL44	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>M</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL45	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pEM-RBS <sub>H</sub> - <i>glmS</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>glmM</i> -RBS <sub>H</sub> - <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL46	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pTet- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> -H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL47	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pTet- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pEM-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL48	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pTet- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pRSF-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL49	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pEM- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pTet-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL50	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pEM- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> - H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL51	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pEM- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pRSF-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL52	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pRSF- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pTet-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL53	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pRSF- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> 和 pEM-H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> CL54	重组菌株 <i>E. coli</i> CL01 中携带表达载体 pCDR- <i>kfoA</i> - <i>kfoF</i> - <i>kfoC</i> 和 pRSF- <i>glnA</i> - <i>gdhA</i> - H <i>glmS</i> -L <i>glmM</i> -L <i>kfoF</i>	本研究构建

## 2.1.2 主要试剂

本研究中使用的试剂如表 2-2 所示。

表 2-2 本研究所用试剂

Table 2-2 Reagents used in this study

公司	试剂
大连 TaKaRa 公司	DNA marker、蛋白质 Marker、限制性核酸内切酶( <i>Xho</i> I、 <i>Bam</i> HI、 <i>Hind</i> III、 <i>Bgl</i> II 等)、T4 DNA 连接酶、高保真酶等
北京天根生化科技有限公司	细菌质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒
南京诺唯赞生物科技有限公司	同源重组克隆试剂盒
英国 OXIOD 公司	酵母抽提物、蛋白胨
上海生工生物工程股份有限公司	DNA 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、IPTG 诱导剂、抗生素、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、维生素 B1 等

表 2-2 本研究所用试剂 (续表)

Table 2-2 Reagents used in this study (continued)

公司	试剂
国药集团药业股份有限公司	甘油、柠檬酸、琼脂粉、NaCl、CaCl <sub>2</sub> 、MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O、FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O、(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O、CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O、ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 等
上海阿拉丁生化科技股份有限公司	L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、十水四硼酸钠、咪唑等
北京百灵威科技有限公司	葡萄糖醛酸

### 2.1.3 培养基

LB 培养基 (g·L<sup>-1</sup>) : 氯化钠 10、蛋白胨 10、酵母提取物 5。LB 固体培养基的配制则需额外添加 2.0%的琼脂粉。

TB 培养基 (g·L<sup>-1</sup>) : 酵母粉 24、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O 16.42、胰蛋白胨 12、甘油 4、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.31。

甘油发酵培养基 (g·L<sup>-1</sup>) : 甘油 20、柠檬酸 1.7、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31、MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 1.4。需额外添加维生素 B1 4.5 mg·L<sup>-1</sup>、金属离子液 10 mL·L<sup>-1</sup>。

金属离子液 (g·L<sup>-1</sup>) : FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 10.0、CaCl<sub>2</sub> 2.0、ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 2.2、CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O 1.0、MnSO<sub>4</sub>·4 H<sub>2</sub>O 0.5、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O 0.02、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4 H<sub>2</sub>O 0.1。

补料培养基 (g·L<sup>-1</sup>) : 甘油 500、MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 10、维生素 B1 0.2。

以上培养基均需要在 121°C 条件下灭菌 15 min，维生素 B1 则需要过滤除菌。

### 2.1.4 菌株培养

种子活化方法: 从甘油管中吸取 200 μL 菌液并接种于含 LB 培养基的摇瓶中，于 37°C，200 r·min<sup>-1</sup> 条件下，将菌株摇瓶活化 12 h。

摇瓶培养方法: 将活化的种子液以 1%的接种量接种于发酵培养基中，必要条件下添加一定浓度的抗生素，于 37°C，200 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养。当 OD<sub>600</sub> 达到 0.6-0.8 时，添加终浓度为 0.4 mM 的 IPTG 进行诱导，诱导温度设置为 37°C。

5 L 发酵罐发酵测试: 采用 5 L 迪必尔发酵罐进行软骨素发酵的补料分批发酵实验。发酵罐的初始装液体积为 2.5 L。将种子液按发酵液总体积 10%的接种量，接种至发酵罐中。当菌体浓度 OD<sub>600</sub> 达到 13.0 左右时，添加终浓度为 0.4 mM 的 IPTG 进行诱导。发酵初始条件: 转速控制为 400 r·min<sup>-1</sup>，通气量设定为 1.0 vvm，pH 调节为 7.0，发酵温度控制为 37°C。整个发酵过程，需进行流加氨水控制发酵液 pH 为 7.0。

甘油补料培养基的补料方法: 发酵时间约 13 h，当发酵液的溶氧值 (DO) 开始明显上升，表明此时 20.0 g·L<sup>-1</sup> 的初始甘油完全消耗。采用流加发酵的方式，开始全程流加甘油补料培养基并控制甘油浓度在 5.0 g·L<sup>-1</sup> 以内，整个发酵周期为 50 h。

### 2.1.5 主要实验仪器

本研究中使用的仪器如表 2-3 所示。

表 2-3 本研究所用仪器

Table 2-3 Instruments used in this study

仪器名称	公司名称
超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
真空抽滤机	上海领德仪器有限公司
pH 计	梅特勒-托利多国际贸易（上海）有限公司
生物传感器分析仪 M-100	深圳西尔曼科技有限公司
鼓风干燥箱 DHG-9140A	常州诺基仪器有限公司
电子天平	广州市怡华新电子仪器有限公司
恒温培养箱	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司
高压蒸汽灭菌锅	德州高通实验仪器有限公司
UltiMate 3000 HPLC	赛默飞世尔科技有限公司
Invitrogen iBright 智能成像系统	赛默飞世尔科技有限公司
超净工作台	济南欧莱博科学仪器有限公司
恒温水浴	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司
5910Ri 型离心机	德国艾本德公司
5 L 发酵罐	迪必尔生物工程（上海）有限公司
ProFlex PCR 系统	赛默飞世尔科技有限公司
凝胶成像仪	美国 Bio-rad 公司产品
核酸胶电泳仪	北京龙方科技有限公司
紫外可见分光光度计	日本岛津公司产品

## 2.2 分子生物学实验操作

### 2.2.1 引物设计

本研究中使用的引物如附录二所示。

### 2.2.2 细菌基因组及质粒的获取

以大肠杆菌作为宿主，为了高效获取基因组和构建表达载体，通过参考天根试剂盒的相关实验步骤进行规范操作。

### 2.2.3 PCR 扩增产物的回收及验证

琼脂糖凝胶电泳实验中，产物回收所用琼脂糖含量为 1.5% (m/v)，条带验证所用琼脂糖含量为 1.0% (m/v)。首先，产物回收的电泳所用胶：通过称取 1.5 g 琼脂糖粉末于 50 mL 的 1×TAE 溶液中并加热充分混匀；其次，通过滴加约 5.0  $\mu$ L 核酸染料，充分摇匀并静置 30 min；最后，进行点样电泳实验，验证并回收目的条带，最后转移至 1.5 mL 离心管中，纯化回收并测试回收浓度。

### 2.2.4 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化

首先，使用接种环从甘油管中接取菌液，划线于 LB 固体培养基上，在 37°C 活化至长出大小均匀的单菌落。其次，挑取大小合适的单菌落于 30 mL/100 mL LB 摇瓶培养基

中，于 37°C 恒温培养 12 h。最后，进行转接 500  $\mu\text{L}$  菌液至 50 mL/250 mL LB 摇瓶培养基中，继续培养至  $\text{OD}_{600}$  达到 0.6。此时将摇瓶置于冰中，冰浴 20 min。菌液移入 50 mL 尖底离心管中，4°C，4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 并收集菌体，加入 25 mL 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  洗涤细胞并再次将菌液冰浴 20 min。再次以上述条件离心并弃上清，分别加入 900  $\mu\text{L}$  4°C 的 30% 甘油和 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ ，充分悬浮并分装 100  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管，-80°C 冰箱保存即制备获得大肠杆菌感受态细胞。

将大肠杆菌感受态从 -80°C 冰箱取出放于冰中静置 5 分钟使其充分融化，加入 10  $\mu\text{L}$  连接反应液充分混匀并冰浴 15 min，于 42°C 热激 90 s 并再次于冰中静置 5 min，加入 800  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基，于 37°C 孵育 1 h。5000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min，仅保留约 100  $\mu\text{L}$  上清，轻微吹吸混匀并涂布于 LB 平板，37°C 培养 12 h。

### 2.2.5 表达载体的构建

所有表达载体的构建均借助一步同源重组法试剂盒，其主要是依据目的片段与线性表达载体之间具有 20-30 bp 的同源臂序列相连接的方法。

软骨素合成路径表达载体 pCDR-*kfoF*-*kfoC*-*kfoA* 的构建。首先，以野生型 *E. coli* K4 的基因组作为模板，以 KZ-*kfoF*-S/A 为引物对，扩增基因 *kfoF*；通过使用限制性内切酶 *Bgl*III 和 *Xho*I 对表达载体 pCDR 进行 37°C 双酶切处理 3 h。酶切后的线性化表达载体和扩增目的片段均经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后借助同源重组法连接，37°C 反应 30 min，导入 *E. coli* JM109 中，待长出单菌落进行菌落 PCR 及测序验证，获得表达载体 pCDR-*kfoF*。其次，以相同的方法构建表达载体 pCDR-*kfoC* 和 pEM-*kfoA*。以 pCDR-*kfoC* 为模板，以 KZ-*kfoC*-S/A 为引物对，扩增 *kfoC* 表达框；使用限制性内切酶 *Spe*I、*Xho*I 对表达载体 pCDR-*kfoF* 进行双酶切，于 37°C 处理 3 h。酶切的线性载体和扩增目的片段均经琼脂糖凝胶回收后借助同源重组法连接，37°C 反应 30 min，转化至 *E. coli* JM109 中，待长出单菌落进行菌落 PCR 及测序验证，获得表达载体 pCDR-*kfoF*-*kfoC*。最后，以 pCDR-*kfoA* 为模板，以 KZ-*kfoA*-S/A 为引物对，扩增 *kfoA* 表达框；使用限制性内切酶 *Spe*I、*Pst*I 对表达载体 pCDR-*kfoF*-*kfoC* 进行双酶切，于 37°C 处理 3 h。酶切的线性载体和扩增目的片段均经琼脂糖凝胶回收后借助同源重组法连接，37°C 反应 30 min，转化至 *E. coli* JM109 中，待长出单菌落进行菌落 PCR 及测序验证，获得表达载体 pCDR-*kfoF*-*kfoC*-*kfoA*。

RBS 强度评估的表达载体构建：以 KZ-RBS<sub>L</sub>-S/A、KZ-RBS<sub>M</sub>-S/A、KZ-RBS<sub>H</sub>-S/A 为引物对，pEM 为模板，进行全质粒 PCR 并胶回收线性载体，再经过同源重组连接并转化至 *E. coli* JM109 中获得表达载体 pEM-RBSL、pEM-RBSM、pEM-RBSH。接着以限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切 pEM-RBSL、pEM-RBSM、pEM-RBSH，于 37°C 处理 3 h，胶回收线性载体。以 KZ-GFP-S/A 为引物对，基因 *gfp* 为模板，扩增片段并胶回收。最后将线性载体 pEM-RBSL、pEM-RBSM、pEM-RBSH 分别与 *gfp* 片段进行同源重组连接，37°C 反应 30 min。进行化转法导入大肠杆菌 JM109 感受态，待长出单菌落进行菌落 PCR 及测序验证，即成功构建表达载体 pEM-RBSL-*gfp*、pEM-RBSM-*gfp* 和 pEM-RBSH-*gfp*。

不同 RBS 强度连接 *glmS* 的表达载体构建。以 *E. coli* BL21 STAR (DE3) 为模板, 以 KZ-*glmS*-S/A 为引物对扩增基因 *glmS*; 接着以限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切 pEM-RBSL、pEM-RBSM、pEM-RBSH, 于 37°C 处理 3 h, 胶回收线性载体。最后将线性载体 pEM-RBSL、pEM-RBSM、pEM-RBSH 分别与 *glmS* 片段进行同源重组连接, 37°C 反应 30 min。进行化转法导入大肠杆菌 JM109 感受态, 待长出单菌落进行菌落 PCR 及测序验证, 即成功构建表达载体 pEM-RBSL-*glmS*、pEM-RBSM-*glmS* 和 pEM-RBSH-*glmS*。

### 2.2.6 蛋白凝胶电泳

重组菌株在 LB 培养基中活化培养后, 转接 1 mL 菌液至 TB 培养基培养并诱导 16 h 使目的蛋白充分表达。取 50 mL 培养液于 7000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 15 min 去除上清, 用 1.5 mL 离心管精密称量 0.01 g 菌体, 用 800 μL PBS 缓冲液重悬菌体后, 超声破碎处理 10 min, 离心分离上清液和沉淀。随后, 按样品:试剂=3:1 的方式, 向 30 μL 样品(上清液和沉淀)中加入 10 μL 4×SDS PAGE Loading Buffer, 沸水浴 10 min, 使目的蛋白变性。用移液枪吸取 15 μL 样品上样至浓缩胶中, 进行蛋白电泳。最后, 经 30 min 染色、过夜脱色, 直至蛋白条带清晰可见且背景清晰时, 将蛋白胶进行拍照保存分析。

## 2.3 分析测定方法

### 2.3.1 细胞浓度测定

取 1 mL 菌液, 用去离子水稀释至 OD<sub>600</sub> 为 0.2-0.8 范围内并装入比色皿中, 使用紫外分光光度计测量其在 600 nm 处的吸光值。

### 2.3.2 软骨素的收集

为了收集发酵液中的产物软骨素, 首先取一定量的发酵液, 于 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集发酵上清液。其次, 向发酵上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇并缓慢混匀, 置于 4°C 醇沉过夜使产物软骨素充分析出。再次, 于 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集沉淀并充分烘干。最后, 再次加入适量的超纯水充分溶解沉淀, 并于 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集沉淀并充分烘干, 用适量的超纯水充分溶解沉淀, 将样品储存备用。

### 2.3.3 软骨素含量检测

为了测定软骨素的产量, 我们改良了硫酸-吡啶比色法测定软骨素的方法<sup>[63]</sup>。首先, 配制浓度为 25mM 四硼酸钠的硫酸溶液, 并精密移取 5 mL 硼酸-硫酸溶液于 25 mL 具塞试管中; 其次, 吸取 1 mL 样品溶液并充分混匀; 最后, 将具塞试管于沸水中处理 10 min 后立刻冰浴冷却。接着, 配制一定浓度的吡啶-乙醇试剂 (0.125%, m/v), 并吸取 100 μL 试剂于具塞试管中, 充分混匀并于沸水处理 15 min 后冰浴冷却, 测量在 530 nm 处的吸光值。最后, 根据相关公式即可测试出软骨素的产量 (mg·L<sup>-1</sup>): 葡萄糖醛酸浓度×稀释倍数×2.067。

### 2.3.4 软骨素的液相质谱鉴定

为了鉴定软骨素的合成, 首先将 2.3.5 中所纯化得到的产物, 向其中加入终浓度为

10 U·mL<sup>-1</sup> 软骨素酶 ABC，并将其处在 37°C 恒温条件下反应 24 h，使得产物软骨素被充分切割成二糖单位；其次，将样品反应液于沸水中处理 30 min；最后，将样品反应液于 0.22 μm 滤膜进行过滤处理后，通过 LCMS-IT-TOF 鉴定软骨素的合成。

### 2.3.5 甘油检测

为了测量发酵期间重组菌株的残留甘油含量，通过使用生物传感器分析仪 M-100 分析，操作步骤为：将发酵液于 12000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min，收集上清液并进行一定倍数的稀释。

### 2.3.6 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcA 含量检测

收集菌液，将约 0.01 g<sub>DCW</sub> 菌体在冰水浴中冷却后，以 16000 r·min<sup>-1</sup> 和 0°C 高速离心 5 min。将沉淀重悬于 1 mL 50% v/v 甲醇中并在 70°C 下温育处理 30 min。通过阴离子交换色谱（HPAEC-PAD；型号 ICS-3000, Dionex, CA, USA）分析回收的上清液。将样品以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速注入装有保护柱（4×50 mm）（Dionex, CA）的 CarboPac PA10 色谱柱（4×250 mm）中。用于梯度的溶液如下：（i）1 mM NaOH 和 1 M NaAcOH，（ii）1 mM NaOH，最后洗脱 10 min。

### 2.3.7 谷氨酰胺的含量检测

为了测量谷氨酰胺的含量，利用高效液相色谱测定，使用色谱柱为 Aglient ZORBAX SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5μm)，流动相按照相关文献的方法配置<sup>[56]</sup>。

### 2.3.8 发酵副产物的测定

发酵 50 h，将发酵液于 12000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min，收集上清液并进行一定倍数的稀释。将乳酸、乙酸、琥珀酸的标准品按照一定比例配置成梯度浓度的标准溶液（0 g·L<sup>-1</sup>、0.2 g·L<sup>-1</sup>、0.4 g·L<sup>-1</sup>、0.6 g·L<sup>-1</sup>、0.8 g·L<sup>-1</sup>、1.0 g·L<sup>-1</sup>）。最后，将样品与标准溶液用 0.22 μm 滤膜过滤后，用高效液相色谱（HPLC）测定乳酸、乙酸和琥珀酸的含量。HPLC 检测条件为，色谱柱为 Aminex HPX-87H（300 mm×7.8 mm），流动相为 5 mM 稀硫酸，柱温 52°C，检测器为紫外检测器，波长为 210 nm，进样量 10 μL，流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/588037046003006042>