

doi:10.12301/spxb202300614

文章编号:2095-6002(2024)02-0075-09

引用格式:刘丹,梁山泉,闫巧娟,等.基于模块优化强化大肠杆菌合成乳糖-N-新四糖的研究[J].食品科学技术学报,2024,42(2):75-83.



LIU Dan, LIANG Shanquan, YAN Qiaojuan, et al. Study on enhancement of lacto-N-neotetraose synthesis in *Escherichia coli* based on module optimization[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(2):75-83.

基于模块优化强化大肠杆菌合成乳糖-N-新四糖的研究

刘丹^{1,2}, 梁山泉¹, 闫巧娟³, 杨绍青¹, 李树森^{1,4}, 江正强^{1,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中原食品实验室, 河南漯河 462300; 3. 中国农业大学工学院, 北京 100083;

4. 蒙牛高科乳制品(北京)有限责任公司, 北京 101100)

摘要:乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)作为人乳寡糖核心组分之一,在婴幼儿生长发育过程中发挥着重要作用。为寻找高效的LNnT生物合成方法,探究模块优化对大肠杆菌合成LNnT产量的影响,以大肠杆菌BL21(DE3) $\Delta lacZ$ 为出发菌株,根据合成路径中的关键代谢物质将LNnT合成路径划分为:外源酶所在路径的模块A,UDP-半乳糖合成路径的模块B和UDP-N-乙酰氨基葡萄糖合成路径的模块C。利用不同拷贝数质粒初步优化模块A、B和C的表达强度,当大肠杆菌BL21(DE3) $\Delta lacZ$ 共表达重组质粒pRSF-*lgtA-A. act*和pET-*galE*时,LNnT产量最高,达0.87 g/L。通过CRISPR/Cas9技术敲除*setA*和*ugd*强化模块A和模块B,获得的重组菌株E20合成LNnT产量达1.16 g/L。摇瓶发酵条件优化后,重组菌株E20合成LNnT产量达1.28 g/L。在5 L发酵罐中,LNnT分批补料发酵产量达15.53 g/L,发酵过程最高生产强度为0.43 g/(L·h)。模块优化强化大肠杆菌高效合成LNnT有望为人乳寡糖的高效生物合成提供理论基础,进而推进婴幼儿配方食品产业的革新。

关键词:大肠杆菌;乳糖-N-新四糖;模块优化;生物合成;CRISPR/Cas9

中图分类号:TS202.1

文献标志码:A

乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)是一种直链人乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs),由半乳糖、葡萄糖和N-乙酰氨基葡萄糖三种单糖组成,分子结构为Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc。正常母乳中HMOs含量为5~20 g/L,其中LNnT含量占6%^[1-2]。LNnT能够影响大脑皮层发育及海马体基因的表达,进而影响智力发育^[3]。LNnT可作为益生元促进肠道中双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等有益菌的增殖^[4]。LNnT还能够与肿瘤坏死因

子受体互作减弱肠上皮细胞炎症,在婴幼儿肠道发育与肠道稳态中发挥重要作用^[5]。近年来,美国、欧盟、澳大利亚、新西兰等国家和地区已批准了LNnT作为新食品原料添加到婴幼儿配方奶粉中^[6]。2023年10月,我国正式批准了LNnT为新营养强化剂,用于婴儿配方食品和儿童用乳粉。LNnT的合成方法主要有化学法、酶法以及微生物发酵法。化学法需要严格的控制条件,步骤冗长且繁琐;制备过程中需使用有毒试剂以消除保护基团,限制了

收稿日期:2023-10-08

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172159)。

Foundation: General Program of National Natural Science Foundation of China (32172159)。

第一作者:刘丹,女,博士研究生,研究方向为食品生物技术。

*通信作者:江正强,男,教授,博士,主要从事食品酶工程方面的研究。

LNT在食品领域中的应用^[7]。酶法常采用高活性半乳糖苷酶^[8]或半乳糖基转移酶^[9]。以半乳糖基转移酶为工具酶时,需要价格高昂的乳糖-*N*-三糖(lacto-*N*-triose II, LNT II)为底物。微生物发酵法具有操作方便、环境友好、反应条件温和等优点,近年来成为LNT合成的主流方法。

大肠杆菌生长周期短、遗传背景明确,是目前合成LNT使用最广泛的底盘细胞^[10]。大肠杆菌合成LNT的路径:以葡萄糖或甘油为碳源先合成尿苷二磷酸(UDP)-*N*-乙酰氨基葡萄糖和尿苷二磷酸(UDP)-半乳糖,随后利用外源 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶和 β -1,4-半乳糖基转移酶将*N*-乙酰氨基葡萄糖基和半乳糖基转移到乳糖上合成LNT^[11]。Priem等^[12]将脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)来源的 β -1,4-半乳糖基转移酶IgtB引入*E. coli* JM109中,首次实现LNT的胞内合成。为提高*E. coli* K12 MG1655对乳糖的利用率,Zhang等^[13]过表达了乳糖渗透酶基因,同时敲除了 β -半乳糖苷酶基因和乳糖操纵子,最终LNT摇瓶产量提高了9.3倍。迄今,已从睡眠嗜组织菌(*Histophilus somni*)、伴放线放线杆菌 NUM4039 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* NUM4039)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)中发掘了 β -1,4-半乳糖基转移酶基因用于大肠杆菌合成LNT^[14-16]。但引入外源 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶和 β -1,4-半乳糖基转移酶会导致底盘细胞代谢流失衡^[17],而模块优化能够调整合成路径各模块适配性,重置底盘细胞代谢流,有效提高目标产物的产量^[18]。Zhang等^[19]利用不同拷贝数质粒将LNT合成路径划分为LNT II合成模块(*lgtA-glmM-glmU-S**)、LNT下游合成模块(*lgtB-pgm-galE-galU*)以及底物-辅因子供应模块(*lacY-prs*)三个模块,其中外源酶 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶IgtA和IgtB被划分到不同模块中,模块优化后,LNT产量在3 L发酵罐中达19.4 g/L,但与摇瓶产量相比仅提高了3.2倍,菌株放大生产性能不佳。Hu等^[20]将外源酶IgtA和IgtB划分到同一模块中,通过模块优化提高了大肠杆菌合成LNT产量,在3 L发酵罐中LNT产量达13.2 g/L,但在发酵终点时,中间物质LNT II累积量达到5 g/L左右,不利于产物的后期纯化。因此使用模块优化策略提高大肠杆菌合成LNT产量时,模块划分情况以及模块表达强度均会影响产物合成^[19-20]。目前,尚未见将IgtA和*A. actinomycetemcomitans*来源

的 β -1,4-半乳糖基转移酶组装到同一模块中,并进行模块组合优化合成LNT的相关报道。

为探究模块优化对大肠杆菌合成LNT产量的影响,基于LNT合成关键前体物质,本研究拟将外源酶所在路径划分为模块A,UDP-半乳糖合成路径和UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖合成路径划分为模块B和模块C。在大肠杆菌 BL21 (DE3) Δ *lacZ* 中利用不同拷贝数质粒优化LNT合成模块A、B和C的表达强度。为进一步强化各模块的表达强度,利用CRISPR/Cas9技术敲除模块A中糖转运体基因*setA*,敲除模块B中UDP-葡萄糖-6-脱氢酶基因*ugd*和甘露糖-6-磷酸异构酶基因*manA*,敲除模块C中UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖-2-差向异构酶基因*wecB*和氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因*nagB*。在获得合成LNT高产菌株的基础上,拟通过发酵条件优化以提高LNT产量。进一步在5 L发酵罐中进行放大发酵,希望为LNT工业化制备和LNT的生物合成提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与试剂

1.1.1 实验菌株

用于重组质粒构建的*E. coli* DH5 α 感受态细胞,北京博迈德基因技术有限公司。

以*E. coli* BL21 (DE3) Δ *lacZ* (E01,本实验室储藏)为出发菌株,用于LNT合成。

1.1.2 实验试剂

质粒中量提取试剂盒和细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;抗生素包括氨基青霉素、卡那霉素和壮观霉素,Merck-Sigma 中国公司;硫胺素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、限制性内切酶DpnI、胰蛋白酶、酵母提取物,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;LNT(95%)标准品,上海源叶生物科技有限公司。

LB培养基和甘油优化培养基参照文献^[15]的方法配制。

1.2 仪器与设备

ZQLY-180E型全温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;T100型PCR仪和MicroPulser型电穿孔仪,美国Bio-Rad公司;BG-subMIDI型多用途水平电泳仪,北京天诚沃德生物技术有限公司;3-30KS型台式高速低温制冷离心机,德国Sigma公司;BIO-TECH-5JG型5 L离位灭菌玻璃发酵系统,上海保

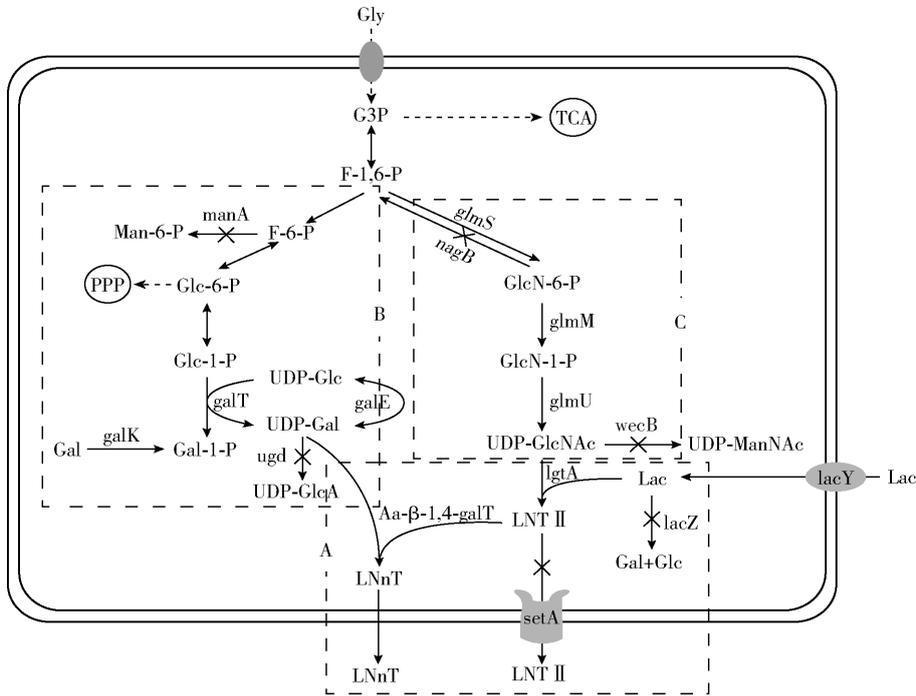
兴生物设备工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模块优化菌株的构建及发酵合成 LNT 产量的检测

为探究不同组合模块对 LNT 合成产量的影响,将 LNT 合成模块划分为 A、B、C 三个模块,其

中外源酶所在路径为模块 A,过表达模块 A 中的 *lgtA* 和 *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 来源的 β -1,4-半乳糖基转移酶基因;UDP-半乳糖合成路径为模块 B,过表达模块 B 中 *galE*、*galT* 和 *galK* 基因;UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖合成路径为模块 C,过表达模块 C 中 *glmM*、*glmU* 和 *glmS* 基因(图 1)。



galE:UDP-葡萄糖-4-差向异构酶;*galT*:半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶;*galK*:半乳糖激酶;*Aa-β-1,4-galT*:*A. actinomycetemcomitans* NUM4039 来源的 β -1,4-半乳糖基转移酶;*lacZ*: β -半乳糖苷酶;*glmM*:L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶;*glmU*:*N*-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸尿酸基转移酶/氨基葡萄糖-1-磷酸乙酰基转移酶;*glmS*:葡萄糖-6-磷酸合酶;*nagB*:氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;*wecB*:UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖-2-差向异构酶;*ugd*:UDP-葡萄糖-6-脱氢酶;*manA*:甘露糖-6-磷酸异构酶;*setA*:糖转运体;*lacY*:乳糖渗透酶。

图 1 大肠杆菌 LNT 合成路线及模块划分

Fig. 1 Synthetic pathway and module division of LNT in *E. coli*

1.3.1.1 模块优化用重组质粒的构建方法

为探究模块 A、B 和 C 的组合方式和表达强度对大肠杆菌合成 LNT 产量的影响,将低拷贝质粒(pCDFDuet-1)、中拷贝质粒(pETDuet-1)和高拷贝质粒(pRSFDuet-1)用于合成路径酶的表达及模块优化。参照文献[15]构建模块优化用质粒,以构建重组质粒 pCDF-*lgtA*-*A. act* 为例,分别用引物对 *lgtA*-F/R (5'-ATGCCGAGCGAAGCCTTT-3'/5'-CAT-TATGCGGCCGAAGCTTTTAACGATTTTCAGCAGACGATGC-3') 和 pCD-*lgtA*-F/R (5'-AAGCTTGCGGC-CGCATAATG-3'/5'-AAAGGCTTCGCTCGGCATG TC-GACCTGCAGGCGCG-3') 扩增 *lgtA* 基因片段和线性化载体,再利用无缝克隆试剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司)构建 pCDF-*lgtA* 重组质粒。以测

序正确的 pCDF-*lgtA* 为模板,用引物对 pCD-LA-F/R (5'-TAAACATTAAGCGATCGCTGACGTCGGTACCCTCGAGTCT-3'/5'-TGCTGTTTCATTTGATATCTCCTTCTATACTTAACATAATATACTAAGATGGGG-3') 扩增出线性载体,以合成基因为模板,用引物对 *A. act*-F/R (5'-GAGATATACAATGAACAGCACCAGAAAATAAAA ACTTTGTTATCAGC-3'/5'-CAGCGATCGCTTAATGT TTACGTTTTTCATATTTTCAGGTTAATTTTG-3') 扩增出 *Aa-β-1,4-galT* 基因片段。将片段与线性载体连接后转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,挑取转化子并测序验证阳性转化子。类似地,构建重组质粒 pCDF-*A. act*-*lgtA*、pET-*lgtA*-*A. act*、pRSF-*lgtA*-*A. act*、pET-*galE*、pRSF-*galE*、pET-*galE*-*galT*、pET-*galE*-*galT*-*galK*、pCDF-*glmM*、pCDF-*glmM*-*glmU*、pCDF-

glmM-glmU-glmS。

1.3.1.2 模块优化菌株的构建方法

为探究模块优化对大肠杆菌合成 LNT II 产量的影响,以 E01 为出发菌株,构建重组菌株: E02 含 pCDF-*lgtA-A. act*, E03 含 pCDF-*A. act-lgtA*, E04 含 pCDF-*lgtA-A. act* 和 pET-*galE*, E05 含 pCDF-*lgtA-A. act* 和 pET-*galE-galT*, E06 含 pCDF-*lgtA-A. act* 和 pET-*galE-galT-galK*, E07 含 pCDF-*lgtA-A. act* 和 pRSF-*galE*, E08 含 pET-*lgtA-A. act* 和 pCDF-*galE*, E09 含 pET-*lgtA-A. act* 和 pRSF-*galE*, E10 含 pRSF-*lgtA-A. act* 和 pET-*galE*, E11 含 pRSF-*lgtA-A. act* 和 pCDF-*galE*, E12 含 pRSF-*lgtA-A. act*、pET-*galE* 和 pCDF-*glmM*, E13 含 pRSF-*lgtA-A. act*、pET-*galE* 和 pCDF-*glmM-glmU*, E14 含 pRSF-*lgtA-A. act*、pET-*galE* 和 pCDF-*glmM-glmU-glmS*。其中, *lgtA* 和 *A. act* 分别来源于 *N. meningitidis* 和 *A. actinomycetemcomitans* NUM4039, 经过密码子优化后用于 LNT II 合成。以重组菌株 E02 构建为例: 将菌株 E01 制成电转感受态细胞, 利用电转仪 (1.8 kV、0.5 ~ 0.6 ms) 将质粒 pCDF-*lgtA-A. act* 导入, 孵育 1 h 后涂布于抗性平板, 挑取 4 ~ 5 个单菌落并电泳验证。类似地, 构建重组菌株 E03 至 E14。

1.3.1.3 模块优化菌株发酵合成 LNT II 产量的检测方法

待菌株 OD_{600} 达 0.6 ~ 0.8, 加入 IPTG 和乳糖并摇瓶发酵 72 h。发酵结束后煮沸发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液后过滤膜, 采用 HPLC 检测 LNT II 产量。HPLC 系统 (Waters e2695 型) 配备示差检测器, 色谱柱为 ROA-Organic Acid H + (8%) 液相色谱柱 (300 mm × 7.8 mm × 8 μm); 流动相为 0.5 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 60 °C, 样品进样量为 10 μL。

1.3.2 模块强化菌株的构建

糖转运体 A (*setA*) 转运底物广泛, 对 LNT II 具有一定转运能力^[21], UDP-葡萄糖-6-脱氢酶和甘露糖-6-磷酸异构酶能够降解模块 B 中的 UDP-半乳糖和果糖-6-磷酸, UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖-2-差向异构酶和氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶能够降解模块 C 中氨基葡萄糖-6-磷酸和 UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖。为减少各模块中关键物质的流失, 在起始菌株 E01 的基础上通过 CRISPR/Cas9 技术^[22] 敲除模块 A 中 *setA* 基因, 模块 B 中 *ugd* 和 *manA* 基因以及模块 C 中 *wecB* 和 *nagB* 基因。构建底盘细胞 *E. coli* BL21

(DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd$ (ZU)、*E. coli* BL21 (DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd\Delta wecB$ (ZUW)、*E. coli* BL21 (DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd\Delta wecB\Delta nagB$ (ZUWN)、*E. coli* BL21 (DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd\Delta wecB\Delta nagB\Delta manA$ (ZUWNM)、*E. coli* BL21 (DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd\Delta setA$ (ZUA)、*E. coli* BL21 (DE3) $\Delta lacZ\Delta ugd\Delta wecB\Delta setA$ (ZUWA)。

重组质粒 pRSF-*lgtA-A. act* 和 pET-*galE* 电转入 ZU、ZUW、ZUWN、ZUWNM、ZUA 和 ZUWA 感受态细胞后构建重组菌株 E15 至 E20。*SetA* 为 LNT II 转运体, 过表达模块 C 能够提高 LNT II 产量, 便于观察 *setA* 敲除后 LNT II 产量变化。因此将重组质粒 pCDF-*glmM*、pCDF-*glmM-glmU* 和 pCDF-*glmM-glmU-glmS* 电转入重组菌株 E15 分别构建重组菌株 E21 至 E23。将重组质粒 pCDF-*glmM*、pCDF-*glmM-glmU* 和 pCDF-*glmM-glmU-glmS* 电转入 E20 分别构建重组菌株 E24 至 E26。摇瓶发酵 72 h 后采用 HPLC 测定 LNT II 和 LNT II 产量。

1.3.3 LNT II 合成的发酵条件优化

为探究培养温度、甘油添加量、细胞密度对 LNT II 合成产量的影响, 以 OD_{600} 与 LNT II 产量为指标, 依次以培养温度、甘油添加量及细胞密度为影响因素进行单因素实验。确定最适单因素后, 组合优化各摇瓶发酵条件, 并确定最适发酵条件。

为评估重组菌株 E20 的放大生产性能, 将 150 mL 培养液转接到含 1.35 L 甘油优化培养基的 5 L 发酵罐中, 甘油初始质量浓度为 15 g/L。菌体 OD_{600} 达到 17 时, 温度降低至 25 °C, 加入乳糖和 IPTG 诱导发酵。调节转速使溶氧维持在 30%, 空气通气量为 1 m³/h, 及时补料使甘油和乳糖质量浓度不低于 5 g/L。

2 结果与分析

2.1 模块优化对合成 LNT II 产量的影响

模块优化对大肠杆菌生长及其合成 LNT II 产量的影响, 实验结果见图 2。由图 2(a) 可知, 模块 A 初步实现了 LNT II 合成, 其中重组菌株 E02 合成 LNT II 产量高于 E03。由图 2(b) 可知, 引入模块 B 并优化模块 A 和 B 表达强度构建的重组菌株 (E04 至 E11) 中重组菌株 E10 合成 LNT II 产量最高 (0.87 g/L), 且 OD_{600} 大于重组菌株 E07 至 E09。由图 2(c) 可知, 在重组菌株 E10 中引入模块 C 构建重组菌株 E12 至 E14。当模块 C 中过表达基因数量

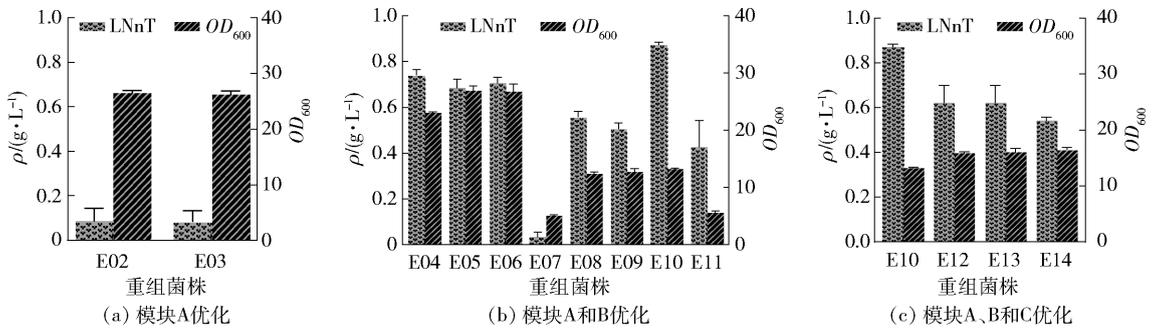


图2 模块优化对合成LNnT产量及细胞生长的影响

Fig. 2 Influence of module optimization on LNnT synthesis and cell growth

增加时,重组菌株 E12 至 E14 产量反而下降。结果表明,重组菌株 E10 合成 LNnT 产量最高,模块 C 过表达不利于 LNnT 合成。

基因在质粒载体中的排列会影响基因的表达以及表达后的蛋白空间折叠^[23]。比较重组菌株 E02 和 E03 合成 LNnT 产量,发现 *Aa-β-1, 4-galT* 位于 *lgtA* 后表达有利于 LNnT 的合成[图 2(a)]。*galE*、*galT*、*galK* 是大肠杆菌合成 UDP-半乳糖关键酶^[20]。本研究尝试提高 *galE*、*galT* 和 *galK* 表达水平以增加 LNnT 产量,但过表达 *galT* 和 *galK* 不利于产物合成[E05 和 E06,图 2(b)]。Hu 等^[20]过表达 *galE*、*galT* 和 *galK* 三种酶基因提高了 LNT 产量,其可能原因是 β-1, 4-半乳糖基转移酶 *Aa-β-1, 4-galT* 利用

UDP-半乳糖能力低于 β-1,3-半乳糖基转移酶 *wbgO*。重组菌株 E12 至 E14 过表达模块 C 后菌株 *OD₆₀₀* 均有所提升,但 LNnT 产量逐渐降低,因此仅需过表达模块 B 中的 *galE* 即可提高 LNnT 产量[图 2(c)]。

2.2 基因敲除强化模块表达对合成 LNnT 产量的影响

敲除竞争路径基因能够减少中间物质流失,提高目标产物合成代谢流^[11]。敲除各模块中竞争路径酶基因对大肠杆菌生长及其合成 LNnT 产量的影响见图 3。由图 3(a)可知,组合敲除了模块 A 中的 *setA*、模块 B 中的 *ugd* 和 *manA*、模块 C 中的 *nagB* 和 *wecB* 以提高模块表达强度。敲除 *ugd* 后,重组菌株 E15 合成 LNnT 产量为 1.08 g/L。重组菌株 E17 合

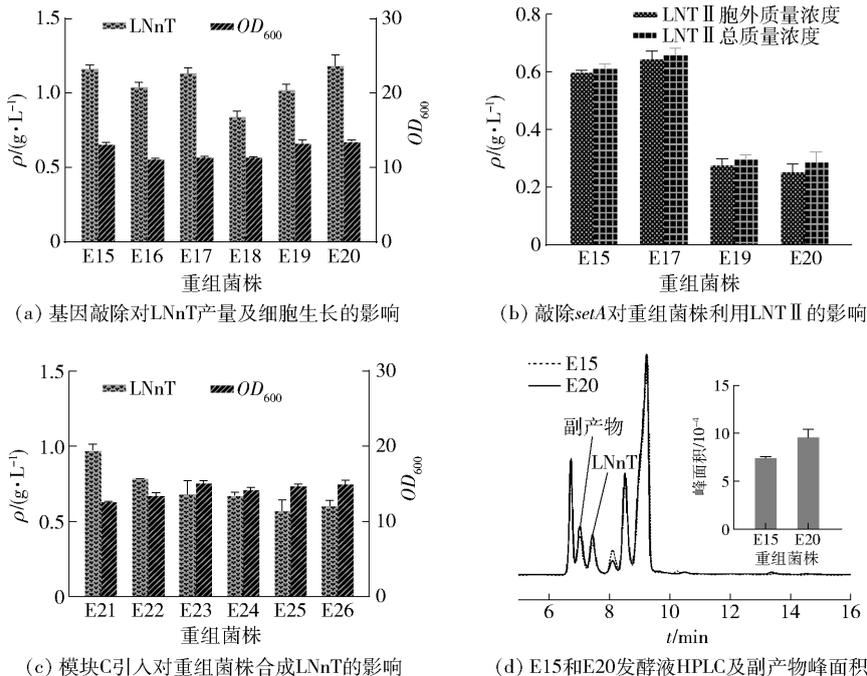


图3 敲除不同基因对合成LNnT产量及细胞生长的影响

Fig. 3 Effects of different genes knock-out on LNnT synthesis and cell growth

成 LNNt 产量接近重组菌株 E15, 敲除 *manA* 后 LNNt 产量降低。与重组菌株 E17 相比, 重组菌株 E19 合成 LNNt 产量降低了 9.98%, E20 合成 LNNt 产量最高, 为 1.16 g/L。由图 3(b) 可知, 敲除 *setA* 后, 重组菌株 E19 和 E20 的胞外 LNT II 含量和全细胞 LNT II 含量均减少 50% 以上。由图 3(c) 可知, 引入模块 C 的重组菌株合成 LNNt 产量有所降低, 但敲除 *setA* 的重组菌株 (E21 至 E23) 合成 LNNt 产量明显高于未敲除 *setA* 的菌株 (E24 至 E26)。由图 3(d) 的 HPLC 检测结果发现, 发酵过程有副产物产生, 重组菌株 E20 副产物的峰面积明显高于重组菌株 E15。

UDP-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (*ugd*) 能够转化 UDP-半乳糖为 UDP-葡萄糖醛酸, 敲除 *ugd* 能够阻断 UDP-半乳糖的降解, LNNt 产量由 0.87 g/L 提高到 1.16 g/L [图 3(a)]。Zhu 等^[24] 的研究表明, 敲除 *wecB* 和 *nagB* 能够提高 LNT II 的产量, 而本研究敲除了重组菌株 E15 中模块 C 的 *wecB* 和 *nagB* 后, LNT II 及 LNNt 产量未发生明显变化, 同时限制了细胞生长, OD_{600} 由 13.1 降低到 11.5 [图 3(a) 和 (b)], 因此模块 C 的强化不利于 LNNt 合成。此外, 敲除了 *manA* 强化模块 B, 但 LNNt 产量呈下降趋势 [图 3(a)], 因此敲除 *manA* 也不利于 LNNt 合

成。敲除重组菌株 E15 中 *setA* 后, LNNt 产量增加 [图 3(a) 和 (c)], 同时提高了 LNT II 的利用率, 减少了 LNT II 胞内积累, 便于后期纯化 [图 3(b)]。Liao 等^[16] 为提高 UDP-半乳糖含量, 敲除了大肠杆菌中 *ugd*、*wcaC*、*wcaJ*、*otsA*、*ushA* 和 *agp* 基因, LNNt 产量较敲除前提高了 46%, 但 LNT II 产量也随之提高, 不利于 LNNt 的纯化。HPLC 分析结果表明, LNNt 合成过程伴随副产物的产生, 该副产物出峰时间早于 LNNt, 推测该副产物是在 LNNt 的基础上额外产生的, 对比分析重组菌株 E15 和 E20 副产物峰面积, 发现 E20 峰面积明显高于重组菌株 E15 [图 3(d)], 因此副产物的产生是重组菌株 E15 和 E20 发酵合成 LNNt 差异不显著的主要原因。

2.3 发酵条件优化对合成 LNNt 产量的影响

经模块优化构建的重组菌株 E20 合成 LNNt 产量最高, 在此基础上探究发酵条件对重组菌株 E20 合成 LNNt 产量的影响。发酵温度、甘油添加量及初始诱导 OD_{600} 对菌株生长及合成 LNNt 产量的影响见图 4。由图 4(a) 可知, 25 °C 发酵, LNNt 产量最高, 22 °C 和 28 °C 时 LNNt 产量降低, 28 °C 时菌体 OD_{600} 最高, 为 15.8。由图 4(b) 可知, 甘油添加量为 15 g/L 时, LNNt 产量比添加 20 g/L 甘油的产量高,

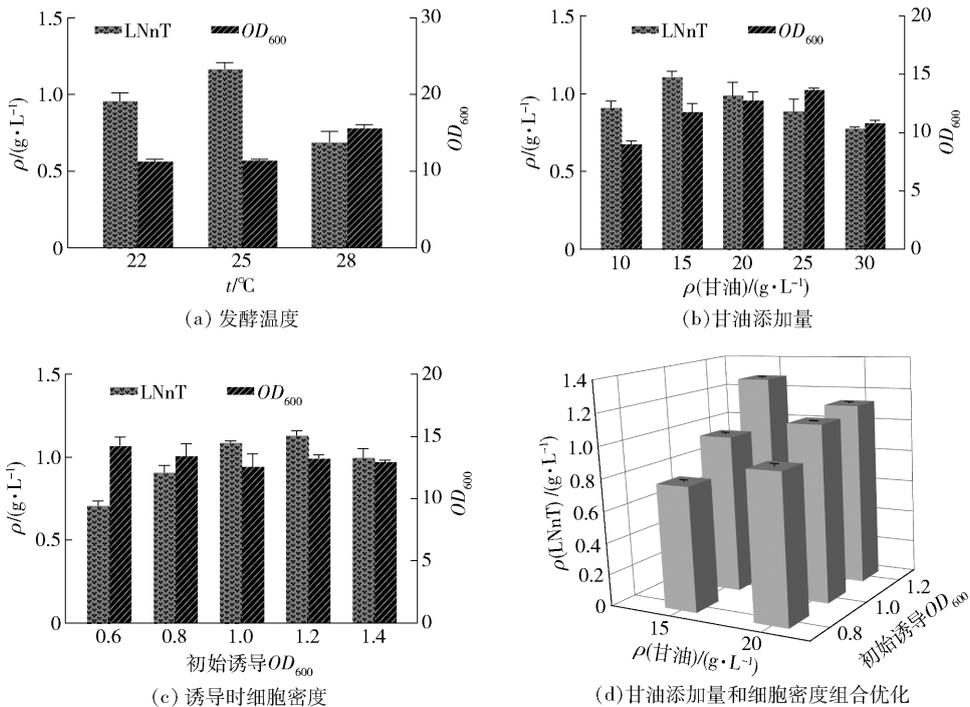


图 4 不同发酵条件对合成 LNNt 产量和重组菌株 E20 生长的影响

Fig. 4 Effects of different fermentation conditions on LNNt synthesis and growth of recombinant strain E20

甘油添加量为 25 g/L 时菌株 OD_{600} 最高,为 13.6。由图 4(c)可知,当初始诱导 OD_{600} 达到 1.2 时,LNnT 产量最高,为 1.18 g/L,当初始诱导 OD_{600} 达到 1.4 时,LNnT 产量呈下降趋势。由图 4(d)可知,经多因素组合优化,甘油添加量为 15 g/L、 OD_{600} 达 1.2 时诱导,LNnT 产量最高,为 1.28 g/L,比优化前提高了 10.34%。

培养温度、诱导条件、底物浓度等发酵条件在微生物发酵合成中具有重要作用。经单因素条件优化,发现最适培养温度[图 4(a)]与含有 *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 来源 β -1,4-半乳糖基转移酶的重组菌株培养温度一致^[15],表明 25 °C 培养更有利于外源酶 Aa- β -1,4-galT 的表达。与甘油添加量为 10 g/L 的菌株相比,甘油添加量为 15 g/L 时菌株合成 LNnT 产量更高[图 4(b)],表明底物添加量少不能满足产物的大量合成,同时不利于菌株的生长。Zhang 等^[15]在大肠杆菌细胞密度达 0.6 时开始诱导发酵,且未优化诱导时细胞密度。本研究在 OD_{600} 达 1.2 时诱导,LNnT 产量最高[图 4(c)]。因此,培养温度为 25 °C、甘油添加量为 15 g/L 以及 OD_{600} 达 1.2 时诱导是重组菌株 E20 高效合成 LNnT 的最适发酵条件[图 4(d)]。

2.4 分批补料发酵合成 LNnT 分析

为评估重组菌株 E20 的放大生产性能,重组菌株 E20 在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵情况见图 5。由图 5(a)可知:诱导发酵 10 ~ 15 h,菌体 OD_{600} 从 22.3 迅速增长到 85;72 h 后,菌体量呈下降趋势;LNnT 产量在发酵 69 h 时达到最高,为 15.53 g/L。由

图 5(b)可知,LNnT 生产强度则在发酵 29 h 时达到最高[0.43 g/(L·h)],随后逐渐降低。

分批补料发酵能更好地比较重组菌株 E20 与已报道菌株合成 LNnT 的差异。重组菌株 E20 在 5 L 发酵罐中合成 LNnT 情况、细胞生长情况以及底物消耗情况见图 5。经分批补料发酵,重组菌株 E20 合成 LNnT 产量仅低于目前已报道的最高水平(22.07 g/L)^[16]。诱导前重组菌株 E20 快速消耗甘油用于菌体生长,细胞生长量达到峰值后处于稳定状态[图 5(a)],说明菌体在发酵过程中生长状况较好。Zhang 等^[15]使用 Aa- β -1,4-galT 构建了重组菌株,分批补料发酵 47.5 h 后,LNnT 产量达 12.1 g/L。而重组菌株 E20 在更短的发酵时间(28.5 h)内 LNnT 产量达 12.15 g/L[图 5(a)],可能原因是本研究优化了 LNnT 合成模块,提高了 LNnT 合成效率。Hu 等^[20]同样采用模块优化策略优化大肠杆菌合成 LNnT,但分批补料发酵产量为 13.25 g/L,表明将 Aa- β -1,4-galT 与 *lgtA* 构建到同一模块中更有利于 LNnT 合成。此外,LNnT 生产强度在发酵 29 h 时达 0.43 g/(L·h)[图 5(b)],与目前报道最高产重组菌株 L1315(含 pRSF-AE 和 pET-HpgalT 质粒,敲除 *lacZ*、*ugd*、*ushA* 和 *wcaC* 基因,基因组整合 *galETKM*)发酵 54 h 时相近,但重组菌株 E20 的 LNnT 发酵终点产量低于重组菌株 L1315[图 5(a)],原因可能是:1)所使用的外源酶 β -1,4-半乳糖基转移酶不同;2)敲除基因策略不同;3)发酵条件不同。因此重组菌株的构建及发酵条件在大肠杆菌合成 LNnT 中占据重要地位。

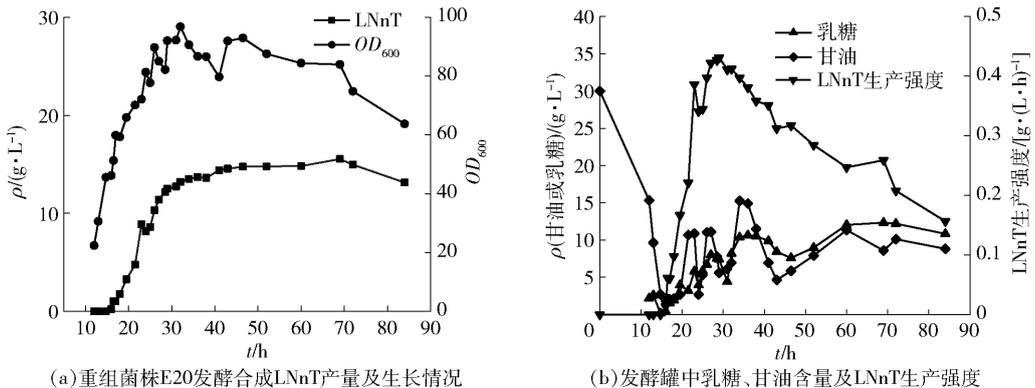


图 5 分批补料发酵合成 LNnT

Fig. 5 Synthesis of LNnT via fed-batch fermentation

3 结论

为提高大肠杆菌合成 LNnT 产量,本研究对

LNnT 合成模块进行了优化,利用 pRSFDuet-1 质粒和 pETDuet-1 质粒分别实现了 UDP-半乳糖合成模块 A 和 LNnT 合成模块 B 在大肠杆菌中的表达平

衡,此时重组菌株合成 LNnT 产量最高达 0.87 g/L。为强化模块 A、B 和 C 的表达强度,敲除模块 A 中糖转运基因 *setA*、模块 B 中 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ* 和 UDP-葡萄糖-6-脱氢酶基因 *ugd*,成功构建了高产 LNnT 重组菌株 E20, LNnT 产量达 1.16 g/L。为进一步提高 LNnT 产量,对重组菌株 E20 的摇瓶发酵条件进行了优化,培养温度为 25 °C,甘油添加量为 15 g/L, OD_{600} 达 1.2 时, LNnT 摇瓶产量最高,达 1.28 g/L。在 5 L 发酵罐中,分批补料发酵, LNnT 产量为 15.53 g/L,最高生产强度为 0.43 g/(L·h),达目前制备较高水平。本研究表明,将外源 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶和 *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 来源的 β -1,4-半乳糖基转移酶组装到同一模块中能够提高大肠杆菌合成 LNnT 产量。本研究旨在为采用模块优化策略改造其他底盘细胞提高人乳寡糖产量的相关研究提供参考。由于 LNnT 的合成伴随着副产物的产生,后续实验将明确副产物结构并通过基因敲除等手段减少副产物的产生。

参考文献:

- [1] 史然,江正强. 2'-岩藻糖基乳糖的酶法合成研究进展和展望[J]. 合成生物学,2020,1(4):481-494.
SHI R, JIANG Z Q. Enzymatic synthesis of 2'-fucosyllactose: advances and perspectives[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(4): 481-494.
- [2] OKBURAN G, KIZILER S. Human milk oligosaccharides as prebiotics [J]. Pediatrics and Neonatology, 2023, 64(3):231-238.
- [3] FLEMING S A, MUDDA T, HAUSER J, et al. Human and bovine milk oligosaccharides elicit improved recognition memory concurrent with alterations in regional brain volumes and hippocampal mRNA expression[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 770.
- [4] THONGARAM T, HOEFLINGER J L, CHOW J, et al. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7825-7833.
- [5] CHENG L H, KONG C L, WANG W J, et al. The human milk oligosaccharides 3-FL, lacto-*N*-neotetraose, and LDFT attenuate tumor necrosis factor- α induced inflammation in fetal intestinal epithelial cells *in vitro* through shedding or interacting with tumor necrosis factor receptor 1[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2021, 65(7): e2000425.
- [6] BYCH K, MIKS M H, JOHANSON T, et al. Production of HMOs using microbial hosts: from cell engineering to large scale production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 130-137.
- [7] BANDARA M D, STINE K J, DEMCHENKO A V, et al. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc)[J]. Carbohydrate Research, 2019, 483: 107743.
- [8] LIU Y H, WANG L, HUANG P, et al. Efficient sequential synthesis of lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-neotetraose by a novel β -*N*-acetylhexosaminidase from *Tyzzarella nexilis*[J]. Food Chemistry, 2020, 332: 127438.
- [9] CHEN C C, ZHANG Y, XUE M Y, et al. Sequential one-pot multienzyme (OPME) synthesis of lacto-*N*-neotetraose and its sialyl and fucosyl derivatives[J]. Chemical Communications, 2019, 51(36): 7689-7692.
- [10] LU M Y, MOSLEH I, ABBASPOURRAD A. Engineered microbial routes for human milk oligosaccharides synthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(5): 923-938.
- [11] ZHU Y Y, LUO G C, WAN L, et al. Physiological effects, biosynthesis, and derivatization of key human milk tetrasaccharides, lacto-*N*-tetraose, and lacto-*N*-neotetraose [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42(4): 578-596.
- [12] PRIEM B, GILBERT M, WAKARCHUK W W, et al. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria[J]. Glycobiology, 2022, 12(4): 235-240.
- [13] ZHANG W, LIU Z M, GONG M Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of lacto-*N*-neotetraose (LNnT) [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 1(3): 291-301.
- [14] LUO G C, ZHU Y Y, MENG J W, et al. A novel β -1,4-galactosyltransferase from *Histophilus somni* enables efficient biosynthesis of lacto-*N*-neotetraose via both enzymatic and cell factory approaches[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(20): 5683-5690.
- [15] ZHANG P, ZHU Y Y, LI Z Y, et al. Designing a highly efficient biosynthetic route for lacto-*N*-neotetraose production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(32): 9961-9968.
- [16] LIAO Y X, WU J Y, LI Z K, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level production of lacto-*N*-neotetraose and lacto-*N*-tetraose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(30): 11555-11566.
- [17] DONG X M, LI N, LIU Z M, et al. CRISPRi-guided multiplexed fine-tuning of metabolic flux for enhanced

- lacto-*N*-neotetraose production in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2477–2484.
- [18] QIN J F, ZHOU Y J, KRIVORUCHKO A, et al. Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8224–8235.
- [19] ZHANG M W, ZHANG K, LIU T L, et al. High-level production of lacto-*N*-neotetraose in *Escherichia coli* by stepwise optimization of the biosynthetic pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(43): 16212–16220.
- [20] HU M M, LI M L, MIAO M, et al. Engineering *Escherichia coli* for the high-titer biosynthesis of lacto-*N*-tetraose [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(28): 8704–8712.
- [21] SUGITA T, KOKETSU K. Transporter engineering enables the efficient production of lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-tetraose in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(16): 5106–5114.
- [22] JIANG Y, CHEN B, DUAN C L, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506–2514.
- [23] ZHU F Y, PENA M, BENNETT G N. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for quinolinic acid production by assembling L-aspartate oxidase and quinolinate synthase as an enzyme complex [J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 164–172.
- [24] ZHU Y Y, WAN L, MENG J W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for lacto-*N*-triose II production with high productivity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(12): 3702–3711.

Study on Enhancement of Lacto-*N*-Neotetraose Synthesis in *Escherichia coli* Based on Module Optimization

LIU Dan^{1,2}, LIANG Shanquan¹, YAN Qiaojuan³, YANG Shaoqing¹, LI Shusen^{1,4}, JIANG Zhengqiang^{1,*}
(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China;
3. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
4. Mengniu Gaoke Dairy (Beijing) Co. Ltd., Beijing 101100, China)

Abstract: As one key component of human milk oligosaccharides, lacto-*N*-neotetraose (LNnT) plays an important role in the growth and development of infants. In order to explore the efficient method for biosynthetic of LNnT and to investigate the influence of module optimization on LNnT synthesis of *Escherichia coli*, *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lacZ$ was used as the initial strain. And the synthetic pathway of LNnT was divided into the following three modules based on the key metabolites in synthetic pathway, module A for the exogenous enzymatic pathway, module B for the synthetic pathway of UDP-galactose, and module C for the synthetic pathway of UDP-*N*-acetylglucosamine. After preliminarily optimizing the expressions of modules A, B, and C via the plasmids with different copy number, the *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lacZ$ harboring the recombinant plasmids pRSF-*lgtA-A. act* and pET-*galE* produced the highest LNnT titer of 0.87 g/L. Modules A and B were enhanced owing to knocking *setA* and *ugd* via CRISPR/Cas9 technique, and the titer of LNnT produced by the recombinant strain E20 was up to 1.16 g/L. After optimizing the fermentation conditions of strain E20, the titer of LNnT in shake-flask cultivation was up to 1.28 g/L and further was up to 15.53 g/L by fed-batch fermentation in a 5 L bioreactor. The highest productivity of LNnT was up to 0.43 g/(L·h) during fermentation. The enhancement of LNnT synthesis in *E. coli* with module optimization was expected to provide theoretical basis for efficient biosynthesis of human milk oligosaccharides and to drive innovation in food industry of infant formula.

Keywords: *Escherichia coli*; lacto-*N*-neotetraose; module optimization; biosynthesis; CRISPR/Cas9

(责任编辑:叶红波)