

高产PSA的基因工程菌株构建

常化难¹, 甄庚尧¹, 王崇川¹, 李 宁², 周焕霞², 曹建帮², 高学秀², 徐艳秋¹, 李 昊¹, 朱德强¹, 刘新利¹

¹齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学部, 山东 济南

²山东星光首创生物科技有限公司, 山东 德州

收稿日期: 2024年7月1日; 录用日期: 2024年8月29日; 发布日期: 2024年9月9日

摘 要

聚唾液酸(PSA)是一种具有重要生物功能的高分子多糖, 广泛存在于自然界和人体中。由于其低免疫原性和良好的生物降解性, PSA被认为是一种理想的药物控释材料。本研究以大肠杆菌K87为出发菌株, 通过过表达Neu5AC合成路径中的关键基因 $neuD$, 构建了高效合成PSA的基因工程菌株。通过摇瓶发酵和发酵罐发酵实验, 验证了不同拷贝数 $neuD$ 基因对PSA产量的影响。结果表明, 高拷贝数表达载体能显著提高PSA的产量, 其中 $E. coli$ K87-6菌株在5 L发酵罐中PSA产量达8.4 g/L, 比出发菌株提高27%。本研究构建的高效合成PSA的基因工程菌株在工业生产中具有广泛的应用前景。

关键词

聚唾液酸, 基因工程大肠杆菌, $neuD$, 发酵

Construction of Genetically Engineered Strains for High-Yield Polysialic Acid (PSA) Production

Huanan Chang¹, Gengyao Zhen¹, Chongchuan Wang¹, Ning Li², Huanxia Zhou², Jianbang Cao², Xuexiu Gao², Yanqiu Xu¹, Hao Li¹, Deqiang Zhu¹, Xinli Liu¹

¹School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan Shandong

²Shandong Starlight So True Biological Technology Co., Ltd., Dezhou Shandong

Received: Jul. 1st, 2024; accepted: Aug. 29th, 2024; published: Sep. 9th, 2024

Abstract

Polysialic acid (PSA) is a high-molecular-weight polysaccharide with significant biological functions,

文章引用: 常化难, 甄庚尧, 王崇川, 李宁, 周焕霞, 曹建帮, 高学秀, 徐艳秋, 李昊, 朱德强, 刘新利. 高产 PSA 的基因工程菌株构建[J]. 生物过程, 2024, 14(3): 132-141. DOI: 10.12677/bp.2024.143017

widely found in nature and the human body. Due to its low immunogenicity and good biodegradability, PSA is considered an ideal material for drug delivery systems. In this study, *Escherichia coli* K87 was used as the starting strain to construct genetically engineered strains for efficient PSA production by overexpressing the key gene *neuD* in the Neu5Ac synthesis pathway. The effects of different copy numbers of the *neuD* gene on PSA yield were verified through shake flask and fermenter experiments. The results showed that high-copy-number expression vectors significantly increased PSA yield, with the *E. coli* K87-6 strain achieving a PSA yield of 8.4 g/L in a 5 L fermenter, which is 27% higher than the starting strain. The genetically engineered strains constructed in this study have broad application prospects in industrial production.

Keywords

PSA, Genetically Engineered *Escherichia coli*, *neuD*, Fermentation

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

聚唾液酸(Polysialic acid, PSA)是由唾液酸单体 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)以 α -2,8 或 α -2,9 糖苷键连接而成的[1], 含有 11 个碳原子, 是呈现线性聚合的阴离子多糖, 聚合度(DP)大多为 8~400 [2]。在自然界和人体中广泛存在, 作为糖蛋白的成分存在哺乳动物体内, 在细胞间信息传递、识别、细胞附着和细胞分化等生理过程中起重要作用[3]。在细菌中作为胞外多糖成分, 具有保护作用[4]。PSA 具有免疫原性较低, 生物降解性好的优点, 其生物降解生成的唾液酸单体 Neu5Ac 对人类健康起重要作用, 能有效地促进胚胎发育和婴儿神经发育[5]。PSA 广泛存在于大肠杆菌中, 也是最早在大肠杆菌中被发现, 是细菌表面荚膜的重要组成成分, 起到有效的保护作用。聚唾液酸是白色无固定形态的粉末状高聚合物, 极易在水中溶解且溶解度比较高, 粘度低[6]。PSA 的熔点可以达到 180°C 以上, 难溶于有机溶剂, 在甲醇中微溶, 在乙醚和乙醇中不溶解。遇酸会被降解, 酸性条件下稳定性降低, 不易储存[7]。其稳定性较差, 会生物降解生成单体唾液酸(Neu5Ac), 唾液酸单体也极易溶于水, 水溶液呈现无色, 非常稳定。Neu5Ac 可以在 4°C 环境中长时间保存不易变质[8]。正是因为 PSA 具有较低的免疫原性和较好的生物降解性, 所以被认为是一种理想的基础药控材料[9]。PSA 能有效地促进大脑中神经细胞发育, 可以调节大脑中枢神经系统 [10] [11]。早在高等脊椎动物胚胎时期, PSA 就发挥着至关重要的作用, 随着胚胎的发育[12], PSA 为神经细胞的生长、分化和连接提供动力。在婴儿时期, 大脑中的 PSA 含量会比其他年龄段的含量更高[5], 这是因为 PSA 是黏附分子(NCAM) [13] [14]的主要成分, 而随着年龄增长, 神经细胞上的黏附分子含量就会降低。PSA 具有提高大脑记忆力的功能, 在促进高等脊椎动物大脑和神经系统发育上起着积极的作用。PSA 和 Neu5Ac 的稳定高效制备正受到众多科学家的广泛关注[15]。

大肠杆菌胞内 PSA 合成代谢途径已被深入研究, 如图 1 所示[16]。底物葡萄糖经过系列酶促反应合成 Neu5Ac [17], 其作为 PSA 的重要原材料, 增加 Neu5Ac 产物积累促进聚合反应进行变得尤为重要。ManNAc 经 Neu5Ac 醛缩酶[18] (NanA 基因编码)和 Neu5Ac 合成酶[19] [20] (NeuB 基因编码)催化合成 Neu5Ac, 而 NanA 的催化反应是一个双向可逆解的反应, NanA 同样会催化 Neu5Ac 进行可逆反应使其裂解为丙酮酸和 ManNAc [21] [22]。KPS 基因簇[20] [23]中第二个区域包含 6 个基因如 *neuA*、*neuS* 和 *neuD* 等推动了 PSA 合成。游离的唾液酸单体 Neu5Ac 被酶(NeuA 基因编码)催化生成唾液酸胞苷单磷酸

脂(CMP-Neu5Ac), NeuA 基因编码的酶[24]作为一种双功能酶还可以催化大多数乙酰化的唾液酸胞苷单磷酸脂(CMP-AcNeu5Ac)转化为唾液酸胞苷单磷酸脂(CMP-Neu5Ac)。NeuA 基因通过编码 CMP-Neu5Ac synthase 表达,为进一步聚合为 PSA 提供供体。NeuD 基因编码的转移酶[25]使 Neu5Ac 的残基乙酰化,催化 Neu5Ac 生成残基乙酰化唾液酸单体。PSA 是由 Neu5Ac 通过 α -2,8 或 α -2,9 糖苷键连接构成, NeuS 基因就是编码 α -2,8 唾液酸转移酶[16],把 CMP-Neu5Ac 形式的唾液酸单体转移到聚唾液酸分子的非还原端,聚合为 PSA。在 KPS 基因簇的其他保守区域中,主要参与 PSA 和底物的运输过程,各个区域相互作用共同推进 PSA 在胞内代谢反应[26]。

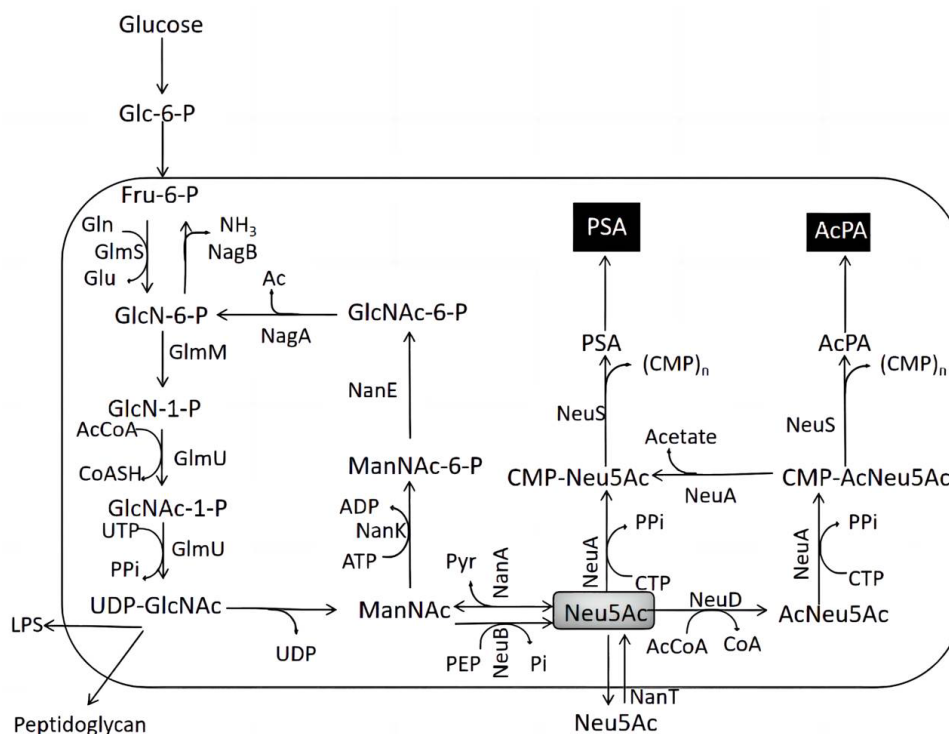


Figure 1. The pathway of PSA synthesis from glucose in *Escherichia coli*
图 1. 大肠杆菌中葡萄糖合成 PSA 的途径

在目前工业化生产 PSA 的工程菌基本上都是以单糖为底物,经过复杂的酶代谢过程才合成 PSA。Glucose 进入胞内后,经过 6 步酶催化反应生成 Neu5Ac,此路径存在多条可逆降解反应从而增加了代谢流的阻力。基因控制合成的酶在催化 Neu5Ac 聚合为 PSA 的路径中起重要作用。考虑到增强聚合途径基因转录水平和酶表达水平从而可以强化聚合路径进一步提高 PSA 产量[24] [26],提高 Neu5Ac 消耗效率促进其合成反应加快正向进行。

本研究针对上述问题,以 *E. coli* K87 为出发菌株过表达 Neu5AC 合成关键路径基因 *neuD*,构建高效合成 PSA 基因工程菌。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料与试剂

2.1.1. 菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒见表 1。

Table 1. Plasmids and strains**表 1.** 质粒与菌株

	名称	来源	特征
质粒	pACYCDuet	实验室保藏	低拷贝数表达载体
	pETDuet	实验室保藏	中拷贝数表达载体
	pRSFDuet	实验室保藏	高拷贝数表达载体
	pTrc99A	淼灵生物购买	Trc 启动子表达载体
	pTrc99A-UD	实验构建	含 <i>neuD</i> 基因的 pTrc99A 重组质粒
	pACYCPtrc-UD	实验构建	含 Trc- <i>neuD</i> 基因的 pACYCDuet 重组质粒
	pETPtrc-UD	实验构建	含 Trc- <i>neuD</i> 基因的 pETDuet 重组质粒
菌株	pRSFPtrc-UD	实验构建	含 Trc- <i>neuD</i> 基因的 pRSFDuet 重组质粒
	<i>E. coli</i> DH5 α	实验室保藏	重组质粒克隆宿主菌
	<i>E. coli</i> K87	实验室保藏	出发菌株
	<i>E. coli</i> K87-4	实验构建	含 pACYCPtrc-UD 质粒的重组菌株
	<i>E. coli</i> K87-5	实验构建	含 pETPtrc-UD 质粒的重组菌株
	<i>E. coli</i> K87-6	实验构建	含 pRSFPtrc-UD 质粒的重组菌株

2.1.2. 培养基

LB 培养基: 氯化钠 10 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, pH 7.0, 固体培养基加入 2% 琼脂粉。
灭菌条件: 121 °C, 20 min。

PSA 发酵培养基: 山梨醇 40 g/L, 磷酸氢二钾 26.2 g/L, 胰蛋白胨 1.5 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 无水硫酸镁 0.9 g/L (单独灭菌), pH 7.0。灭菌条件: 121 °C, 20 min。

各重组工程菌在接种前加入相应种类的抗生素, 培养基中抗生素工作终浓度: Kan 50 mg/L、Amp 50 mg/L、Chl 25 mg/L。

2.1.3. 引物

利用 Oligo 7 设计引物, 将设计好的引物送至生物工程(上海)股份有限公司进行合成, 纯化方法为 HAP (……碱基以内)或 ultrapage (……碱基以上), 引物序列如表 2 所示。

Table 2. The primer of PCR**表 2.** PCR 引物

引物名称	序列(5'-3')
pTrc99A-UD-F	cagtcggtaccttttgcgccgacatcataa
pTrc99A-UD-R	cgactgtcgacaccaataatactctttgagcct

2.1.4. 试剂

如表 3 所示为本研究用到的药品试剂。常规试剂均为分析纯等级。

Table 3. Laboratory reagent**表 3.** 实验试剂

试剂名称	生产厂家
BamHI 内切酶、SalI 内切酶、T4 DNA 连接酶、10 × Single Buffer、绿如蓝核酸染料、氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Chl)、DNA Marker、Loading buffer、DNA 胶回收试剂盒	生工生物工程(上海)股份有限公司
DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒	北京诺贝莱生物科技有限公司

续表

2 × Taq Master Mix、2 × Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技有限公司
double distilled water (ddH ₂ O)	湖南艾科瑞生物工程有限公司
琼脂糖	安徽白鲨生物科技有限公司
TAE 溶液、硫酸卡那霉素(Kan)	北京索莱宝科技有限公司
酵母浸粉、胰蛋白胨	安琪酵母股份有限公司
浓盐酸	烟台远东精细化工有限公司

2.2. 仪器与设备

高效液相色谱仪, LC-20AT, 岛津公司; 5 L 发酵罐, Cla210-5L, 安徽霍尔斯工程技术有限公司; 生物传感分析仪; SBA-40E, 山东省生物传感器重点实验室。

2.3. 方法

2.3.1. PSA 聚合关键基因不同拷贝数载体的构建

本实验室之前已构建过重组表达载体 pTrc99A-UD, 以此为模板, 用 pTrc99A-UD-F/R 为引物做 PCR 扩增实验。上下游引物分别加入 BamHI 和 SalI 两个酶切位点并优化, 对 PCR 产物进行一系列双酶切、跑胶和纯化回收实验, 获得目的基因片段 Trc-neuD。Trc-neuD 基因片段和 Duet 系列表达载体用相同的内切酶 BamHI 和 SalI 双酶切, 纯化后使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转入到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 提取质粒单酶切验证, 选取验证成功的单菌落在 LB 液体培养基过夜培养, 从菌液中提取重组质粒使用化学转化法转入到工程菌 *E. coli* K87 中, 活化后从重组菌中提取质粒单酶切验证转化是否成功。将这三株重组菌株分别命名为 *E. coli* K87-4、*E. coli* K87-5 和 *E. coli* K87-6。

2.3.2. 发酵实验

(1) 摇瓶发酵

将适量经斜面培养基活化后的菌体细胞接种至含 30 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 35°C、220 r/min 振荡培养 10 h。以 4% 接种量接种至 50 mL 发酵培养基的 300 mL 摇瓶中, 37°C、200 r/min 振荡培养 48 h。

(2) 发酵罐发酵

发酵在 5 L 玻璃搅拌罐生物反应器中进行, 填充体积为 3.5 L。接种前, 将生物反应器温度、通气量灭菌。速率搅拌速度分别保持在 37°C、0.5 vvm 和 200 rpm。当系统稳定后, 将 140 mL 10 h 的种子培养物接种到生物反应器中。

2.3.3. 检测方法

发酵液检测: 取 1.5 mL 发酵液加入到离心管中, 在 10,000 rpm 的离心机中离心 2 min 后取上清, 稀释 10 倍后进行检测。

PSA 检测: 使用高效液相色谱(岛津, LC-20AT)进行测定, 采用 SCR101H 色谱柱(岛津); 流动相为 5 mM 硫酸; 流速为 0.6 mL/min; 柱温为 35°C; 紫外检测波长 196 nm; 进样量 10 μ L, 该检测条件下 9.5 min 左右出峰。

还原糖检测方法: 利用生物传感分析仪实时检测发酵液中葡萄糖的剩余量[27]。

铵根离子检测方法: 利用水杨酸钠-次氯酸钠法测定发酵液中的铵根离子[28]。

生物量检测方法: 取适量发酵液稀释一定的倍数, 利用紫外分光光度计在 600 nm 条件下的吸光度来代表发酵液中的生物量。以纯水为对照, 发酵液的稀释倍数要使分光光度计读数控制在 0.2~1.2 之间比较

准确。对于该发酵实验的大肠杆菌而言，1 单位的 OD600 大约为 0.45 g/L 的菌体量。

3. 结果与分析

3.1. 过表达关键基因 *neuD* 不同拷贝数载体构建

本实验室已经把 *neuD* 基因插入到了 pTrc99A 表达载体 Trc 启动子的下游，本研究把关键基因 *neuD* 分别插入到不同拷贝数 Duet 系列表达载体上(图 2(a))，该基因目的片段包含 Trc 启动子和 *neuD* 基因两部分，研究 *neuD* 在不同拷贝数的表达载体中对 PSA 末端聚合路径的影响强度。pACYCDuet、pETDuet 和 pRSFDuet 目的片段获取方法为提取质粒双酶切后跑胶纯化，琼脂糖凝胶电泳(图 2(b))，pACYCDuet、pETDuet 和 pRSFDuet 片段长度分别为 3983 bp、5395 bp 和 3804 bp，与实验设计结果相同。目的基因和载体片段使用相同的快切酶双酶切，双酶切后使用 T4 DNA 连接酶将包含 Trc 启动子的 *neuD* 基因片段插入到 Duet 系列表达载体中。把 pACYCPtrc-UD、pETPtrc-UD 和 pRSFPtrc-UD 重组表达载体转入到宿主菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中活化培养。提取重组质粒单酶切验证，长度符合预期设计，提取质粒转入 *E. coli* K87 感受态细胞中培养。从三株重组工程菌菌液中提取质粒后单酶切跑胶，琼脂糖凝胶电泳实验如图 2(c)所示，将这三株重组工程菌分别命名为 *E. coli* K87-4、*E. coli* K87-5 和 *E. coli* K87-6。

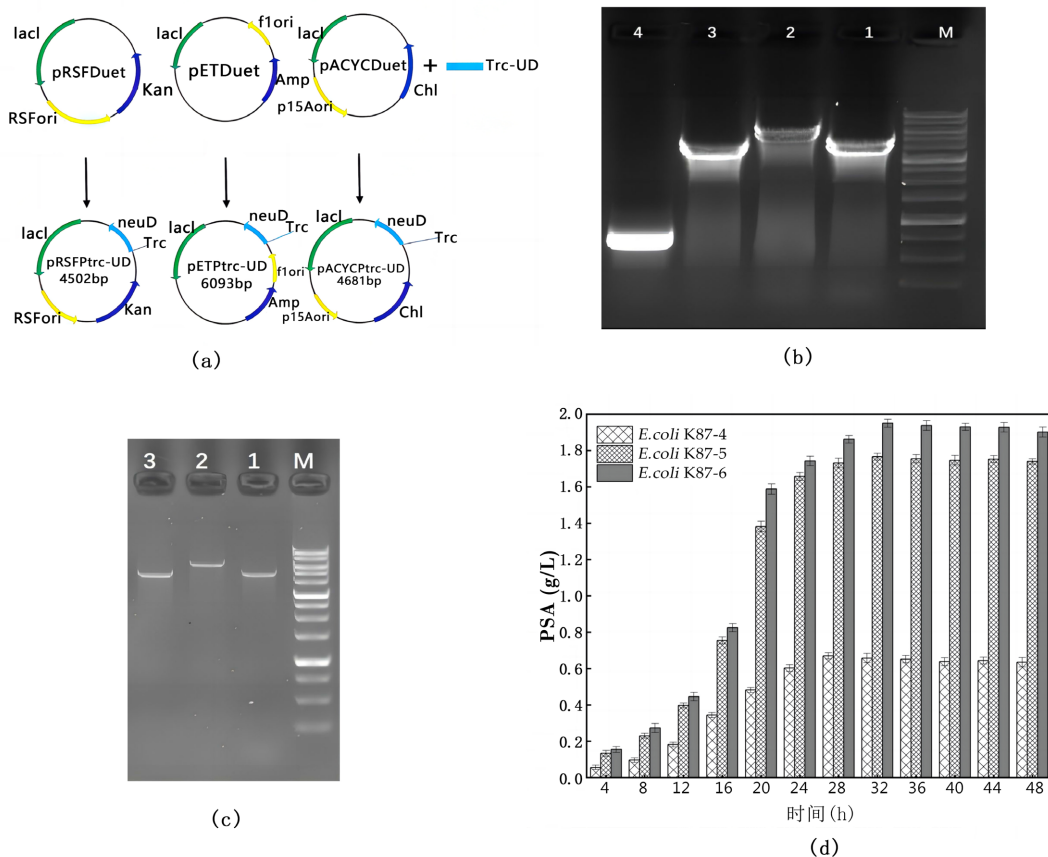


Figure 2. (a) Construction of expression vectors with different copy numbers of the *neuD* series; (b) Amplification of target fragments pACYCDuet, pETDuet, pRSFDuet, and Trc-*neuD*; (c) Single enzyme digestion verification of extracted expression vectors from recombinant engineered bacteria; (d) PSA yield detection in recombinant bacteria from the Duet series

图 2. (a) 不同拷贝数 *neuD* 系列表达载体构建; (b) 扩增目的片段 pACYCDuet、pETDuet、pRSFDuet 和 Trc-*neuD*; (c) 重组工程菌提取表达载体单酶切验证; (d) Duet 系列重组菌 PSA 产量检测

3.2. *neuD* 不同拷贝数载体发酵 PSA 水平验证

不同拷贝数的 Duet 系列表达载体在工程菌中成功表达。将含有 Trc 启动子的 *neuD* 基因片段插入到不同拷贝数的 Duet 系列表达载体中对合成 PSA 具有较大差异。菌株 *E. coli* K87-4 发酵液中 PSA 产量明显低于其他两株, PSA 产量在第 28 h 时达到 0.67 g/L, 与菌株 *E. coli* K87 相比下降 59%。菌株 *E. coli* K87-5 发酵液中 PSA 产量在第 32 h 时达到最大值为 1.77 g/L, 相对于出发菌株 *E. coli* K87 产量提高 9%, 但略低于 *E. coli* K87-2。菌株 *E. coli* K87-6 发酵液中 PSA 产量明显提升, 在第 32 h 时 PSA 产量达 1.95 g/L, 比工程菌 *E. coli* K87 提高 20%, 比重组菌株 *E. coli* K87-2 提高 7% (图 2(d))。

neuD 作为聚合路径中最为关键基因, 由实验结果可知不同拷贝数的 *neuD* 基因对 PSA 聚合路径影响结果不同。*neuD* 基因由低拷贝表达载体 pACYCDuet 表达严重限制了残基乙酰化转移酶的活性, PSA 聚合受到抑制。*E. coli* K87-4 菌株的菌体生长量也明显低于其他菌株, 可能是重组表达载体 pACYCPtrc-UD 的转入影响了菌体的生长, 菌体量比较低也是导致 *E. coli* K87-4 菌株 PSA 合成量受到限制的一个重要原因。而高拷贝数的 *neuD* 基因有效地提高转移酶的表达水平并促进 PSA 的聚合, 高拷贝数表达体的转入也不会对菌株自身代谢造成负担。*neuD* 基因由中拷贝数表达载体 pETDuet 表达造成了 PSA 聚合的瓶颈期, 这也是 *E. coli* K87-5 发酵液中 PSA 合成量略低于菌株 *E. coli* K87-2 的原因。

3.3. 5 L 发酵罐放大实验

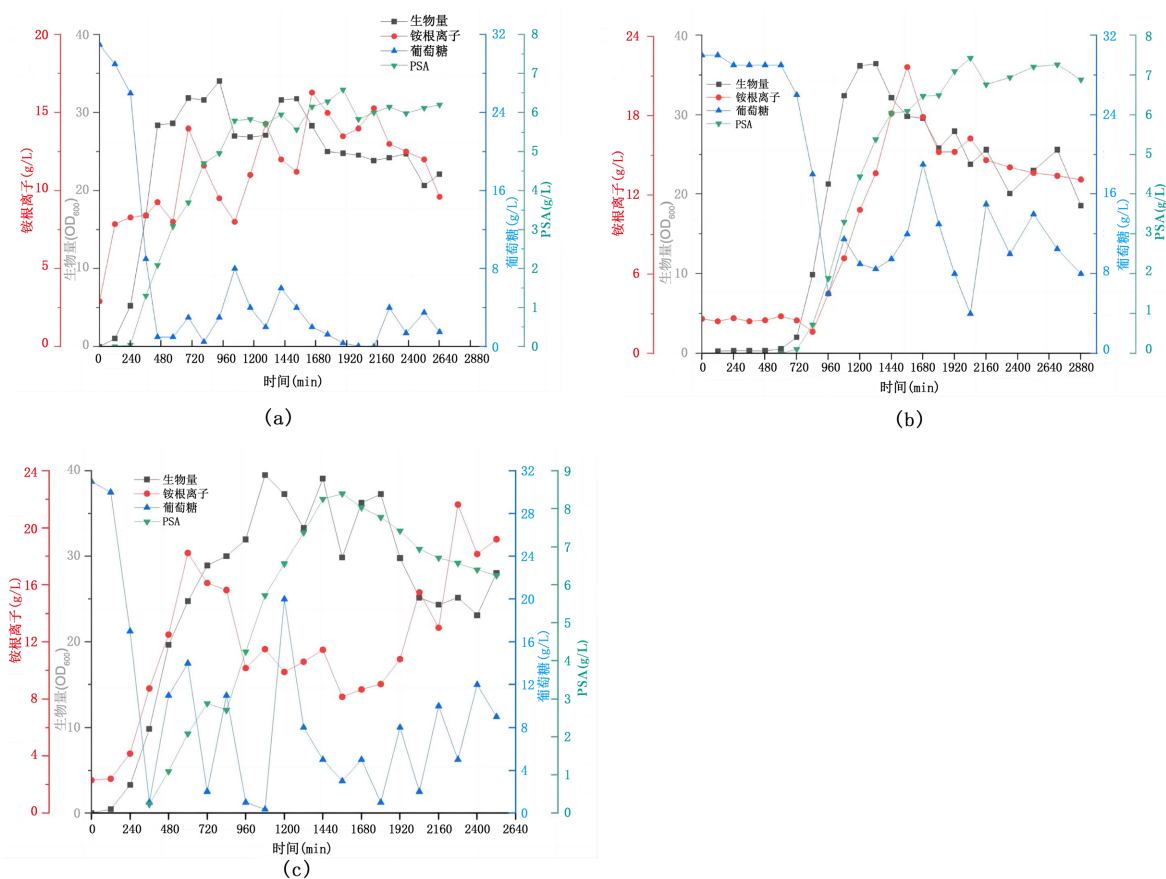


Figure 3. (a) Experimental data of strain *E. coli* K87 in a 5 L fermenter; (b) Experimental data of strain *E. coli* K87-5 in a 5 L fermenter; (c) Experimental data of strain *E. coli* K87-6 in a 5 L fermenter

图 3. (a) 菌株 *E. coli* K87 在 5 L 发酵罐中的实验数据; (b) 菌株 *E. coli* K87-5 在 5 L 发酵罐中的实验数据; (c) 菌株 *E. coli* K87-6 在 5 L 发酵罐中的实验数据

对 *E. coli* K87、*E. coli* K87-5 和 *E. coli* K87-6 这 3 株菌株进行初步验证, 醇罐通过转速、通气量和罐压共同调控发酵液中的氧气含量, 相比摇瓶发酵其溶氧量更高, 且补料和 pH 控制更加稳定, 因此目标产物的合成量会大幅度上升。菌株 *E. coli* K87-5 在发酵过程中在第 10 h 时才开始生长, 猜测对菌株改造后培养基中抗生素对菌株生长带来了负担。其他三株菌株表现正常, 发酵至 6.5 h 左右罐内碳源消耗殆尽开始补加葡萄糖溶液, 在生长指数期时对碳源消耗量比较大, 生物量生长较快, 此阶段约 30 min 手动补一次葡萄糖溶液至罐内浓度为 20 g/L。菌株完成指数生长期后生物量较多, 此阶段是大量合成 PSA 的关键时期, 葡萄糖作为合成 PSA 的最初底物, 因此要确保发酵罐内的碳源氮源充足。然而发酵至 30 h 左右时菌株开始出现裂解现象, 生物量持续降低。

出发菌株 *E. coli* K87 在发酵第 31.5 h 时 PSA 产量达到 6.59 g/L, 比在摇瓶实验中产量提升 4 倍以上, 指数生长期结束后菌体量最高达 15.3 g/L, 共消耗葡萄糖 588 g, 氨水 382 mL (图 3(a))。该诱变菌株经过多次传代培养, 在扩大培养后 PSA 聚合性能稳定未出现退化现象, 所以对该菌从基因层面入手进行改造非常具有可靠性。

E. coli K87-5 在第 10 h 才开始生长, 前期生长速度缓慢。但培养至 22 h 时 OD₆₀₀ = 36.41 仍然大于菌株 *E. coli* K87 的最高生物量, 当发酵至 32 h 时 PSA 产量达 7.43 g/L, 比工程菌 *E. coli* K87 提高 13%。*E. coli* K87-5 在整个发酵过程中共消耗葡萄糖 380 g, 消耗氨水 151 mL, 其 PSA 达到最高点时 PSA/OD = 0.31, 当 *E. coli* K87 菌株 PSA 达到最高点时 PSA/OD = 0.266, 从碳氮源的消耗和 PSA/OD 分析可以看出重组菌 *E. coli* K87-5 比工程菌 *E. coli* K87 更占据优势(图 3(b))。但重组菌 *E. coli* K87-5 前期菌体生长受到抑制是弊端, 猜测导入重组质粒带来生长负担或是因为抗生素压力抑制菌体生长。

重组菌株 *E. coli* K87-6 发酵至 26 h 时 PSA 产量达 8.4 g/L, 生物量在第 18 h 时达到最大值。相比工程菌 *E. coli* K87 产量提高 27%, 且提前 5 h 达到产量最大值。当 *E. coli* K87-6 菌株 PSA 产量达到最大值时 PSA/OD = 0.281 而 *E. coli* K87 菌株 PSA/OD = 0.266(图 3(c)), 可以看出对菌株末端聚合路径增强后提高单位细胞的产率。从营养物质消耗量来看共消耗葡萄糖 680 g 消耗氨水 232 mL, PSA/消耗碳源和 PSA/消耗氮源都比工程菌 *E. coli* K87 占据优势。

通过对比 3 株菌株 5 L 发酵罐扩大发酵实验, 重组菌株 *E. coli* K87-6 相比其他 2 株菌株产量更高且营养物质的消耗量也较有优势, 重组菌株 *E. coli* K87-5 存在生长受到抑制的缺陷。综合考虑选取重组菌株 *E. coli* K87-6 是理想菌株, 可以用于工业大规模生产。

4. 结论

本研究成功构建了高效合成聚唾液酸(PSA)的基因工程大肠杆菌株。通过对关键基因 *neuD* 进行不同拷贝数的过表达, 验证了其对 PSA 合成的影响。结果表明, 高拷贝数的 *neuD* 基因能显著提高 PSA 的产量, 其中 *E. coli* K87-6 菌株在发酵罐中 PSA 产量最高, 达到了 8.4 g/L, 比出发菌株 *E. coli* K87 提高了 27%。此外, *E. coli* K87-6 菌株在单位细胞的产率和营养物质的利用效率方面也表现出显著优势, 表明其在工业大规模生产中的应用潜力。

基金项目

本研究受到了齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合试点工程基础研究类项目(2023PY007)、山东省科技型中小企业创新能力提升工程(2023TSGC0525)、德州市重大科技创新工程项目(2023ZDYF010140)的资助。

参考文献

- [1] McGowen, M.M., Vionnet, J. and Vann, W.F. (2001) Elongation of Alternating α 2,8/2,9 Polysialic Acid by the

- Escherichia coli* K92 Polysialyltransferase. *Glycobiology*, **11**, 613-620. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.8.613>
- [2] Azurmendi, H.F., Vionnet, J., Wrightson, L., Trinh, L.B., Shiloach, J. and Freedberg, D.I. (2007) Extracellular Structure of Polysialic Acid Explored by on Cell Solution NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 11557-11561. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704404104>
- [3] El Maarouf, A., Petridis, A.K. and Rutishauser, U. (2006) Use of Polysialic Acid in Repair of the Central Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 16989-16994. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608036103>
- [4] Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J. and Ivanova, E.P. (2009) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*, **14**, 2535-2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- [5] Kleene, R. and Schachner, M. (2004) Glycans and Neural Cell Interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**, 195-208. <https://doi.org/10.1038/nrn1349>
- [6] 金城, 张树政. 糖生物学与糖工程的兴起与前景[J]. 生物工程进展, 1995(3): 12-17.
- [7] 吴剑荣, 詹晓北, 郑志永, 等. 聚唾液酸与唾液酸的研究进展[J]. 生物加工过程, 2007, 5(1): 20-26.
- [8] 张世民. 复合糖末端唾液酸功能的双重性——受体作用和掩蔽作用[J]. 生命的化学(中国生物化学会通讯), 1991(5): 17-19.
- [9] Qiu, A., Wang, Y., Zhang, G. and Wang, H. (2022) Natural Polysaccharide-Based Nanodrug Delivery Systems for Treatment of Diabetes. *Polymers*, **14**, Article 3217. <https://doi.org/10.3390/polym14153217>
- [10] Wang, B., McVeagh, P., Petocz, P. and Brand-Miller, J. (2003) Brain Ganglioside and Glycoprotein Sialic Acid in Breastfed Compared with Formula-Fed Infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 1024-1029. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.5.1024>
- [11] 许杨, 陈芳, 林白雪, 陶勇, 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.
- [12] 乔阳. 唾液酸与婴儿生长发育的研究[D]: [博士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [13] Sapoń, K., Janas, T., Sikorski, A.F. and Janas, T. (2019) Polysialic Acid Chains Exhibit Enhanced Affinity for Ordered Regions of Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1861**, 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.07.008>
- [14] Iqbal, S., Walsh, T.R., Rodger, A. and Packer, N.H. (2020) Interaction between Polysialic Acid and the MARCKS-ED Peptide at the Molecular Level. *ACS Chemical Neuroscience*, **11**, 1944-1954. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00139>
- [15] 李国顺. 大肠杆菌生物合成长链聚唾液酸的工艺研究[D]. [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [16] Wang, C., Chang, H., Liu, X., Zhao, H., Guo, J., Peng, S., *et al.* (2024) Terminal-Enhanced Polymerization in the Biosynthesis of Polysialic Acid. *Fermentation*, **10**, Article 64. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010064>
- [17] Kim, M.J., Hennen, W.J., Sweers, H.M. and Wong, C.H. (1988) Enzymes in Carbohydrate Synthesis: N-Acetylneuraminic Acid Aldolase Catalyzed Reactions and Preparation of N-Acetyl-2-Deoxy-D-Neuraminic Acid Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 6481-6486. <https://doi.org/10.1021/ja00227a031>
- [18] Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L. and Steenbergen, S.M. (2004) Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**, 132-153. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.1.132-153.2004>
- [19] Zhao, L., Tian, R., Shen, Q., Liu, Y., Liu, L., Li, J., *et al.* (2019) Pathway Engineering of *Bacillus subtilis* for Enhanced N-Acetylneuraminic Acid Production via Whole-Cell Biocatalysis. *Biotechnology Journal*, **14**, Article 1800682. <https://doi.org/10.1002/biot.201800682>
- [20] Ishikawa, M. and Koizumi, S. (2010) Microbial Production of N-Acetylneuraminic Acid by Genetically Engineered *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research*, **345**, 2605-2609. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.09.034>
- [21] Kang, J., Gu, P., Wang, Y., Li, Y., Yang, F., Wang, Q., *et al.* (2012) Engineering of an N-Acetylneuraminic Acid Synthetic Pathway in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, **14**, 623-629. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.002>
- [22] Lin, B., Zhang, Z., Liu, W., Dong, Z. and Tao, Y. (2013) Enhanced Production of N-Acetyl-D-Neuraminic Acid by Multi-Approach Whole-Cell Biocatalyst. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 4775-4784. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4754-8>
- [23] Barrett, B., Ebah, L. and Roberts, I.S. (2002) Genomic Structure of Capsular Determinants. In: Hacker, J. and Kaper, J.B., Eds., *Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes*, Springer, 137-155. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09217-0_8
- [24] Song, L., Zhou, H., Cai, X., Li, C., Liang, J. and Jin, C. (2011) NeuA O-Acetyltransferase Activity Is Specific for Cmp-Activated O-Acetyl Sialic Acid in *Streptococcus suis* Serotype 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **410**, 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.092>
- [25] Steenbergen, S.M., Lee, Y., Vann, W.F., Vionnet, J., Wright, L.F. and Vimr, E.R. (2006) Separate Pathways for O

Acetylation of Polymeric and Monomeric Sialic Acids and Identification of Sialyl *O*-Acetyl Esterase in *Escherichia coli* K1. *Journal of Bacteriology*, **188**, 6195-6206. <https://doi.org/10.1128/jb.00466-06>

- [26] Ferrero, M.Á. and Aparicio, L.R. (2010) Biosynthesis and Production of Polysialic Acids in Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**, 1621-1635. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2531-5>
- [27] 高学金, 刘广生, 程丽, 等. 发酵过程葡萄糖在线检测系统的研制[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1945-1949.
- [28] 孟根达来, 张娜, 解红霞. 水杨酸-次氯酸钠分光光度法测定露蜂房总氮含量[J]. 中国药师, 2017, 20(2): 277-280, 286.