研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.09.015

N–乙酰–D–葡萄糖胺–2–差向异构酶基因的克隆及表达

卢利平[1,2]，陈献忠[*1,2]，周俊波[1,2]，沈 微[1,2]，杨海泉[1]，樊 游[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–D–葡萄糖胺–2–差向异构酶(AGE)是合成N–乙酰–D–神经氨酸(Neu5Ac)的关键酶。该酶的高效表达是提高全细胞细胞催化法合成Neu5Ac的有效途径。根据集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)AGE编码基因slr1975序列信息和大肠杆菌密码子偏好性，优化密码子并人工合成目的基因序列*slr975–co*。将该基因克隆到表达载体pET28a中，构建了重组大肠杆菌BL21(DE3)/pET28–*slr*并实现了目的基因的诱导表达。SDS–PAGE分析表明，重组蛋白质的相对分子质量在43 000左右，与预期大小一致，纯化产物蛋白质质量浓度约为1.7 g/L。重组AGE的最适反应温度为42 ℃，最适反应pH为6.0。AGE对GlcNAc、ManNAc的K_m值分别为39.0、46.5 mmol/L。以分别表达AGE和N–乙酰神经氨酸裂合酶(NanA)的重组大肠杆菌作为催化剂，以N–乙酰–D–葡萄糖胺为底物，实现了N–乙酰–D–神经氨酸的全细胞催化合成。结果表明，对AGE密码子进行优化实现了该基因在大肠杆菌中的高效表达，为全细胞催化法高效合成N–乙酰–D–神经氨酸奠定了坚实的基础。

关键词：N–乙酰–D–葡萄糖胺–2–差向异构酶；大肠杆菌；基因克隆；酶学性质；N–乙酰–D–神经氨酸

中图分类号：TQ 920.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)09—1000—08

Cloning, Expression and Enzymatic Properties of N–Acetyl–D–Glucosamine–2–Epimerase in *Escherichia coli* BL21(DE3)

LU Liping[1,2]，*CHEN Xianzhong*[*1,2]，*ZHOU Junbo*[1,2]，*SHEN Wei*[1,2]，*YANG Haiquan*[1]，*FAN You*[1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Overexpression of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (AGE), as a critical enzyme for N-acetyl-D-neuraminic acid(Neu5Ac) synthesis, is an efficient strategy for improvement of Neu5Ac production. Based on the information about the *slr1975* gene encoding *Synechocystis* sp. PCC6803 AGE and the codon bias of *Escherichia coli*, *slr1975–co* was synthesized and cloned into the pET28a expression vector. The recombinant plasmid pET28-slr was purified, and then transformed into

收稿日期：2015–10–22

基金项目：江苏省科技支撑计划社会发展项目(BE2012618)；江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室开放课题(KLCCB–KF201506)。

* **通信作者**：陈献忠(1980—)，男，安徽界首人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程方面的研究。E–mail：xzchen@jiangnan.edu.cn

引用本文：卢利平，陈献忠，周俊波，等. N–乙酰–D–葡萄糖胺–2–差向异构酶基因的克隆及表达[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(09)：1000–1007.

E. coli BL21（DE3）strain. The recombinant enzyme was overexpressed by induction of IPTG and SDS-PAGE showed that the molecular mass of the recombinant AGE protein is about 43 kDa，which was in agreement with their theoretical value. The recombinant enzyme was characterized and the reuslts showed that the optimal temperature is 42 ℃ and the optimal reaction pH was 6.0. Kinetic studies indicated that the K_m for N-acetyl-D-glucosamine（GlcNAc）and N-acetyl-D-mannosamine（ManNAc）was 39.0 mmol/L and 46.5 mmol/L，respectively. Moreover，Neu5Ac production was evaluated by the recombinant enzmye AGE and the results demonstrated that recombinant enzmye AGE coupled with Neu5Ac aldolase（NanA）could catalyze N-acetyl-D-glucosamine to produce Neu5Ac effectively. In summary，codon-optimization and overexpression of AGE provide paved a way for efficient Neu5Ac production by whole-cell catalysis.

Keywords：N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase，*Escherichia coli*，gene cloning，enzymatic properties，N-acetyl-D-neuraminic acid

唾液酸在自然界中分布广泛，已经发现很多生物体内都含有唾液酸[1]。N-乙酰-D-神经氨酸（Neu5Ac）是唾液酸家族中最主要成员，占整个唾液酸家族的99%以上，是合成其他唾液酸物质的生物前体物质[2]。Neu5Ac主要以α-糖苷的形式位于非还原性寡聚糖如糖蛋白和糖脂类的末端[3]。随着对Neu5Ac生理功能的研究进一步加深，其在食品、医药、疾病诊断等领域的应用也越来越广泛，Neu5Ac的生产受到越来越多的关注。传统的天然产物提取和化学合成方法受到原材料不足、反应过程复杂等诸多限制[4-7]，酶催化法和全细胞催化法是非常具有工业应用潜力的Neu5Ac生产方法[8-10]。

酶法或全细胞合成N-乙酰神经氨酸的第一步是以N-乙酰-D-葡萄胺（GlcNAc）为底物通过N-乙酰-D-葡萄糖胺-2-差向异构酶（AGE）的作用异构化为N-乙酰甘露糖胺（ManNAc），接着N-乙酰甘露糖胺与丙酮酸在N-乙酰神经氨酸裂合酶的作用下缩合形成Neu5Ac。AGE是合成Neu5Ac的关键酶，对产物的合成效率起着决定性作用。Maru等[11]首次从猪的肾脏中分离纯化得到AGE，后通过cDNA克隆获得目的基因并实现了在大肠杆菌中的异源表达。双酶法制备Neu5Ac的方法需要添加ATP和$MgCl_2$，通过固定化酶法也可以获得Neu5Ac，且酶可以循环利用[12-14]。大肠杆菌具有遗传操作容易、生长迅速等优点，常常作为细胞催化剂或表达宿主的优先选择，但是由于物种间的差异，表达蛋白质在大肠杆菌中的异源表达大部分形成包涵体，AGE酶活普遍都不高。有报道指出，在大肠杆菌表达鱼腥藻*CH1* AGE获得的AGE酶活性是猪源AGE的46倍以上，且仅需要极少量的ATP就能达到最大酶活性，用该全细胞催化生产Neu5Ac的产率也高于酶法生产[15]。

Tabata等从集胞藻染色体上克隆得到*slr*1975基因，并实现了在大肠杆菌中的初步表达[16]。然而，由于重组蛋白质的表达水平较低，纯化方法较为繁琐，从而导致重组蛋白质得率较低。作者通过克隆集胞藻AGE基因序列，在根据大肠杆菌密码子偏好性对目的基因全序列进行优化的基础上，选择带有T7强启动子的pET系列表达载体，实现在大肠杆菌BL21（DE3）中高效异源表达，并对其酶学性质进行了研究，从而为酶催化法生产N-乙酰神经氨酸进行了探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 大肠杆菌*Escherichia coli* JM109与BL21（DE3）菌株以及所用表达载体pET28a质粒：江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心提供；表达N-乙酰神经氨酸裂合酶（NanA）的重组大肠杆菌*Escherichia coli* BL21/pET28a-nanA：由作者所在实验室前期构建。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶及蛋白质相对分子质量marker：购自TaKaRa生物技术公司；质粒提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒和牛血清蛋白：购自北京博大泰克生物基因技术有限公司；卡那霉素与异丙基硫代半

乳糖苷(IPTG):购自上海生工生物工程有限公司;GlcNAc、ManNAc 以及 Neu5Ac:购自上海西格玛公司;其他的分析纯级试剂:购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件 大肠杆菌培养在 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L),发酵培养基为 TB 培养基(胰蛋白胨 12 g/L、酵母提取物 24 g/L、甘油 4 mL,KH_2PO_4 2.31 g/L,K_2HPO_4 12.54 g/L),1×10^5 Pa 灭菌 20 min。抗性筛选抗生素为卡那霉素(添加质量浓度为 50 μg/mL)。

1.2.2 目的基因的克隆 根据 NCBI 公布的集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)AGE 编码基因 *slr*1975(GenBank ID:954945)序列,以及大肠杆菌密码子利用偏好性对该序列进行密码子分析、优化和人工合成。以优化后的 DNA 序列为模板设计一对引物,分别为 slrF:5'-CGC*CATATG*ATGATGATTGCCCATCGCCGTC-3'(下划线为 *Nde*I 酶切位点)和 *slrR*:5'-CG*GAATTC*TTAAGAAACC GGCAGTTGCAGA-3'(下划线为 *Eco*RI 酶切位点),引物由上海生工生物工程技术服务部合成。PCR 扩增参数:95 ℃变性 5 min,然后 94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1.5 min,30 个循环后 16 ℃保温 30 min,得到的目的基因命名为 *slr*1975-*co*。

1.2.3 重组表达载体的构建 将 *slr*1975-*co* 基因 PCR 产物与 pET28a 质粒同时用 *Nde*I 与 *Eco*RI 双酶切,纯化处理后用 T4 DNA 连接酶进行连接,16 ℃反应 12 h,连接产物命名为 pET28-*slr*,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,提质粒用相应的酶酶切鉴定。

1.2.4 AGE 的诱导表达 挑取重组菌单菌落接种于含有卡那霉素的 20 mL 液体 LB 培养基中,于 37 ℃、200 r/min 摇瓶培养过夜,次日以体积分数 0.5%转接到 50 mL 含有卡那霉素的新鲜 TB 液体培养基中继续培养。37 ℃培养至 600 nm 吸光值(OD_{600})为 0.6 左右,加入 500 μL 母液浓度为 100 mmol/L 的 IPTG(终浓度为 1 mmol/L),转到 28 ℃培养诱导 4 h 后,4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体[17]。

1.2.5 重组酶的分离纯化 收集到的诱导细胞浓缩 10 倍,用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液重悬后,超声波破碎处理,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液得到粗酶液。将粗酶液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后,上 1 mL HisTrap FF 亲和层析柱(Noveagen),蛋白质纯化系统采用 AKTA 全自动蛋白质分离纯化系统,先用上样缓冲液 A 液(8×磷酸缓冲液,20 mmol/L 的咪唑,pH 7.4)洗涤,最后用洗脱缓冲液 B 液(8×磷酸缓冲液,50 mmol/L 的咪唑,pH 7.4)洗脱,流速为 0.5 mL/min。每管收集量 1 mL,收集峰值部分为纯化酶[18]。

1.2.6 SDS-PAGE 分析蛋白质相对分子质量以及蛋白质质量浓度的测定 取 10 μL 点样,12%SDS-PAGE 电泳检测,考马斯亮蓝 R250 染色,用电子扫描系统分析蛋白质相对含量。以牛血清蛋白作为标准蛋白质,考马斯亮兰(Bradford 法)测蛋白质质量浓度[19]。

1.2.7 重组酶酶活的测定 以 GlcNAc 为底物,利用 AGE 转化生成 ManNAc 的酶促反应测定转化率确定该酶活性[20]。酶活测定反应体系:200 μL 酶液加到 200 μL 新配制的底物混合物(500 mmol/L GlcNAc,2 mmol/L ATP,含终浓度为 20 mmol/L $MgCl_2$ 的 100 mmol/L Tris-HCl,pH 7.0)中,37 ℃金属浴反应 30 min,沸水浴煮 5 min 终止反应。4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 去除变性蛋白质,上清液中的 GlcNAc 与 ManNAc 通过高效液相色谱法(HLPC)测定,检测使用 Dionex Ultimate3000 系统,色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱(300 mm×7.8 mm)有机酸离子层析柱,检测器为示差检测器,流动相为 10 mmol/L H_2SO_4,流速为 0.5 mL/min,柱温 65 ℃[15]。其中,一个酶活单位(U)为每分钟催化 1 μmoL 的 GlcNAc 转化生成 ManNAc 所需的酶量。

1.2.8 酶学性质分析及米氏常数(K_m)的测定 测定对 GlcNAc、ManNAc 的 K_m 值时,分别以 GlcNAc 或者 ManNAc 为底物,在 pH 6.0、42 ℃下,测定该酶对底物的反应速度[11,21]。按 Lineweaver-Burk 法作图。在 pH 7.0 条件下,将等量的底物混合物与酶液混合后置于不同温度下(25、30、37、40、42、45、50、55 ℃)进行酶促反应,反应时间均为 30 min,以此确定该酶的最适温度。将适量的粗酶液分别在 20、30、40 ℃保温不同时间(30、60、90 min)后,与底物混合物在 37 ℃进行酶促反应测定重组酶活性来确定温度稳定性。

配制两种不同 pH 缓冲范围的缓冲液,0.5 mol/L 磷酸缓冲液(pH 为 5.0、6.0、7.0)以及 0.5 mol/L Tris buffer 缓冲液(pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0),配制相对应的底物混合物与酶液混合,在 37 ℃下进行酶

促反应测定酶活,确定其最适反应 pH。调节缓冲液 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0，用不同 pH 值 A 液回溶菌体破碎离心，取上清液得到不同 pH 的粗酶液。然后再调回到 pH 7.0 的酶液与 pH 7.0 底物混合物混匀,37 ℃反应 30 min 以确定其 pH 的稳定性。

调整底物混合物中不同浓度 Mg^{2+},与粗酶液反应，测定不同浓度 Mg^{2+}对酶活性的影响；分别用 Ca^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}等不同金属离子代替 Mg^{2+}加入到底物混合物中,以确定不同金属离子对酶活性的影响。

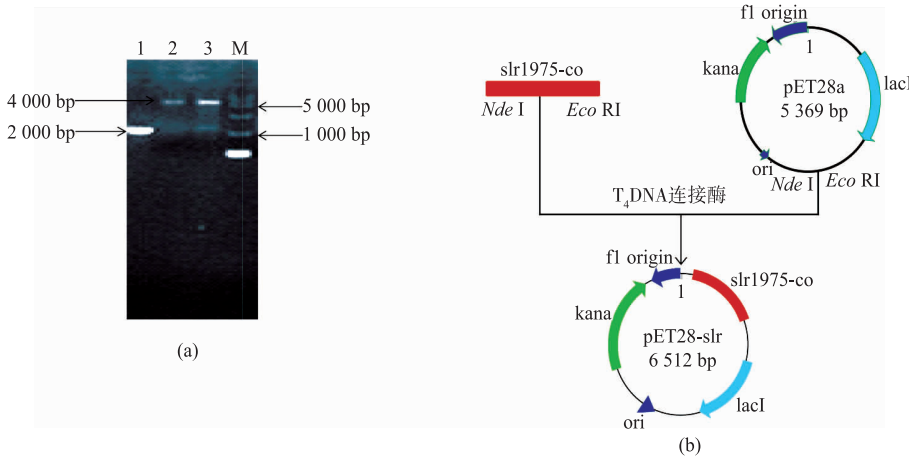
在确定 AGE 酶的最适反应温度和最适 pH 后，在该条件下以不同浓度的底物测定比酶活，采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法，计算 AGE 对 GlcNAc/ManNA 的 K_m 值[17]。

1.2.9 全细胞催化法合成　将 *E. coli*/pET28-*nanA* 和 *E. coli*/pET28-*slr* 分别接种于 250 mL 的摇瓶,按照 1.2.4 方法诱导培养，离心收集细胞后用 pH 7.5 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,用相同的缓冲液重悬菌体(OD_{600} 为 20),30 ℃转化 24 h(3 次平行)。转化底物为 N-乙酰葡萄糖胺 0.6 mol/L、丙酮酸 1.2 mol/L、Triton X-100 1%，通过 HPLC 检测分析转化的底物、中间产物和终产物。

2 结与分析

2.1 重组质粒 pET28-*slr* 的构建

以合成的 *slr1975-co* 基因为模板,slrF 与 slrR 为上下游引物 PCR 扩增得到带有 *Nde*I 与 *Eco*RI 酶切位点的目的基因片段，重组质粒 pET28-*slr* 酶切验证,见图 1(a),*slr1975-co* 片段大小为 1 176 bp。载体构建流程,见图 1(b),证明重组质粒 pET28-*slr* 已经构建成功并导入到大肠杆菌 BL21(DE3)中。



M:DNA Marker,1:*slr1975-co* product;2:pET28a(*Nde*I/*Eco*RI);3:pET28-*slr*(*Nde*I/*Eco*RI)

图 1　酶切产物电泳检测图和重组载体的构建流程图

Fig. 1　Electrophoresis detection of enzyme-digested product and construction of the recombinant plasmid

2.2 重组酶的诱导表达及纯化

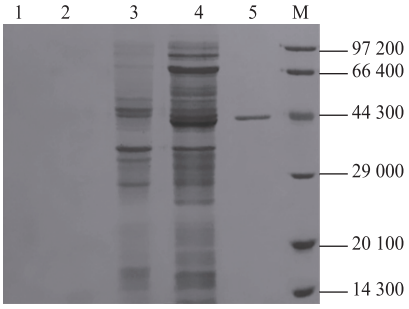
将携带有 pET28-*slr* 质粒的重组大肠杆菌进行诱导表达,利用载体自身含有的 His 标签进行纯化,SDS-PAGE 结果见图 2。发酵上清液中不含目的蛋白质，粗酶液经纯化得到了单一条带的目的产物,其相对分子质量大小约为 43 000,与预期蛋白质相对分子质量相符，而对照菌株没有相应的基因表达。结果表明,*slr1975-co* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中成功异源表达,纯化后的可溶性蛋白质质量浓度约为 1.7 g/L。

2.3 诱导条件对产物表达量的影响

2.3.1 诱导时间对产物表达量的影响　考察了诱导时间对 AGE 重组蛋白质表达的影响。分别取诱导 2、4、6、8 h 的培养液,离心收集菌体并破碎,取等量上清液进行 SDS-PAGE 分析，同时以携带 pET28a 质粒的重组大肠杆菌作为对照。由图 3(a)可以看出,诱导时间与产物表达量关系密切,随着诱导培养时间的延长,产物表达量也随之增加。

2.3.2 诱导物浓度对产物表达量的影响　进一步考察了不同浓度的 IPTG 对重组蛋白质表达的影响。由图 3(a)可以看出,IPTG 终浓度在 0~0.8 mmol/L 范围内,重组酶表达量随 IPTG 浓度的增大而增加;IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L 时,重组酶表达量达到最大，而终浓度为 1.0 mmol/L 时表达量略有下降;未

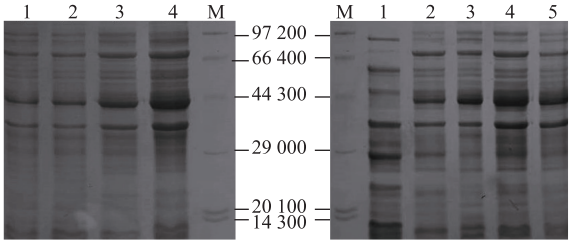
添加诱导物的菌体不表达重组酶。



1:*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a 发酵液上清液;2:*E. coli* BL21 (DE3)/pET28-*slr* 发酵液上清液;3:*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a 粗酶液;4:*E. coli* BL21 (DE3)/pET28-*slr* 粗酶液;5:纯化后酶液;M:蛋白质相对分子质量标准。

图 2 SDS-PAGE 分析 AGE 重组蛋白质的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant enzyme AGE expression



a:诱导时间对 AGE 重组蛋白表达的影响,1、2、3、4 分别表示诱导时间为 2、4、6、8 h;b:*E. coli* BL21 (DE3)/pET28-*slr* 不同诱导物浓度下产物表达量,1、2、3、4、5 分别表示 IPTG 终浓度为 0、0.2、0.5、0.8、1.0 mmol/L;M:蛋白质相对分子质量标准。

图 3 不同诱导时间和诱导剂 IPTG 浓度对 AGE 重组蛋白质表达的影响

Fig. 3 Effects of induction time and IPTG concentrations on the AGE expression in *E. coli* BL21 (DE3)/pET28-*slr*

2.4 重组酶酶学性质研究

2.4.1 最适反应温度及温度稳定性 考察了重组 AGE 的最适反应温度。结果见图 4(a)。可以看出,在 pH 7.0 条件下,重组酶的最适反应温度为 42 ℃;在 25~42 ℃范围内重组酶活性随着反应温度升高而增加,当反应温度超过 45 ℃时,酶活力迅速下降,在 55 ℃相对酶活仅为 62.5%。

适量的粗酶液分别在不同温度不同保温时间测定酶活力,结果见图 4(b)。重组酶在低温(20 ℃)保温后反应稳定性最差,保温在 30 ℃时稳定性最好,保温时间越长酶活性越低。

2.4.2 最适反应 pH 及 pH 的稳定性 考察了 pH 对重组酶 AGE 的影响,结果见图 5(a)。重组酶的最适反应 pH 为 6.0,当 pH 超过 6.0 时酶活性开始下降,在 pH 6.0~8.0 范围内重组酶能够维持 85%以上的酶活性,pH 为 10.0 时相对酶活为 75%,在 pH 5.0 条件下相对酶活只有 72%。

重组酶 AGE 在不同 pH 缓冲体系的稳定性见图 5(b)。在 pH 6.0 条件下重组酶保留活性最高;在 pH 4.0~7.0 范围内相对酶活性能够维持在 80%以上并随 pH 升高而增加;当 pH 超过 7.0 时相对酶活迅速下降,pH 为 9.0 时相对酶活仅为 17%。由此可知重组酶在酸性条件下能够保持较高的酶活性,而在碱性条件下比较容易失活。

2.4.3 金属离子对酶活性的影响 在胞外由 AGE 催化 GlcNAc 异构化生成 ManNAc 的反应中,需要外源添加 ATP 提供能量,也需要添加 Mg^{2+}作为 ATP 酶的激活剂。首先考察了不同浓度 Mg^{2+}对酶活性的影响,以不同浓度的 $MgCl_2$ 加入到底物混合物中,结果见图 6(a)。Mg^{2+}浓度在 0~10 mmol/L 范围内时重组酶活性随着 Mg^{2+}浓度升高而提高;当 Mg^{2+}浓度为

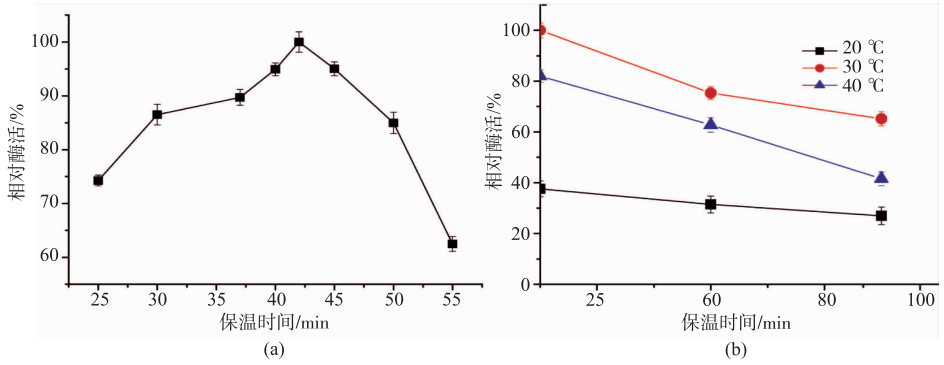


图 4 不同温度下反应重组酶的相对活性和重组酶温度稳定性的测定

Fig. 4 Optimal temperature and thermostability of the recombinant enzyme AGE

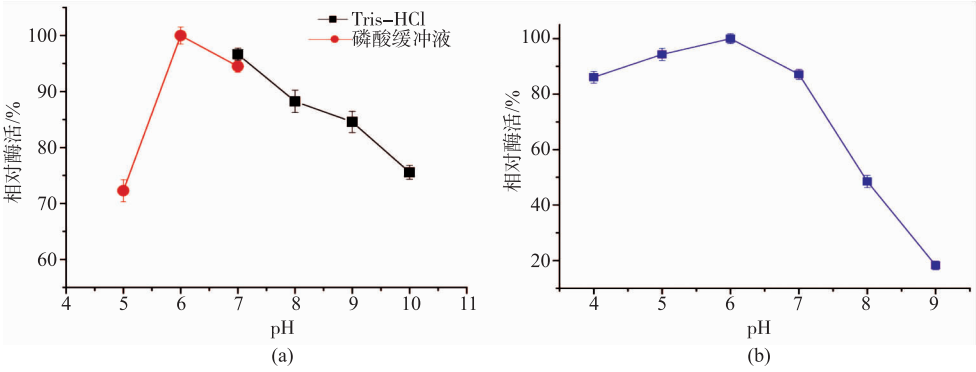


图 5　不同 pH 下重组酶的相对活性和重组酶 pH 稳定性的测定

Fig. 5　Optimal pH of the recombinant enzyme AGE and pH stability of the recombinant enzyme AGE

15 mmol/L 时重组酶活性最高，超过 15 mmol/L 时酶活开始下降。

进一步考察了不同金属离子对重组酶酶活性的影响，在底物混合物中加入 15 mmol/L 的金属离子溶液，结果见图 6(b)。Zn^{2+}、Mn^{2+}对重组酶活性均有抑制作用，其中 Zn^{2+}的抑制作用最为明显；加入 Fe^{2+}后重组酶活性略有增加，而 Mg^{2+}和 Ca^{2+}对重组酶活性的促进作用不是很明显。

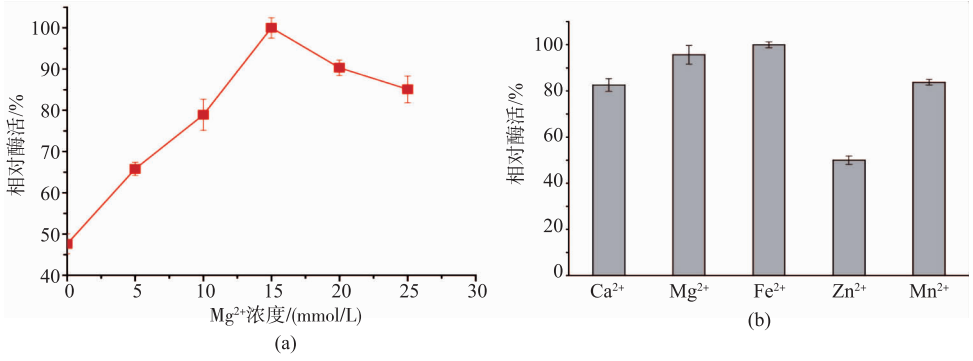


图 6　不同 Mg^{2+}浓度对重组酶活性的影响和不同金属离子对重组酶活性的影响

Fig. 6　Effects of different Mg^{2+} concentration on the recombinant enzyme activitiy and effects of different metal ion on the recombinant enzyme activities

2.4.4　*最适反应条件下酶活测定*　在最适反应条件即 42 ℃、pH 6.0 下，以 N-乙酰-D-葡萄糖胺(GlcNAc)为底物经酶促反应测定粗酶液的比酶活为 3.36 U/mg，纯化酶的比酶活为 12.91 U/mg。

2.5　反应动力学的测定

Klermund 等[17]研究表明，来自 *Anabaena variabilis* ATCC 29413 的 AGE 的 K_m/GlcNAc 为 16.3 mmol/L，K_m/ManNAc 为 16.7 mmol/L。本研究分别以 GlcNAc 和 ManNAc 为底物，测定了该酶的反应动力学参数。结果表明，AGE 对 GlcNAc 的 K_m 值(39.0)低于对 ManNAc(46.5)，对 GlcNAc 的催化效率 k_{cat}/K_m 为 1.04×10^3 L/(mol·s)高于对 ManNAc 的催化效率，其 k_{cat}/K_m 为 0.84×10^3 L/(mol·s)。相比较而言，尽管该酶是可逆催化的，但本实验优化合成的 *slr*975-*co* 催化方向有利于向 N-乙酰甘露糖胺合成方向进行的，这对于构建双酶法催化合成 NeuAc 的生物催化剂是有益的。

2.6　全细胞催化法合成 NeuAc

分别收集诱导表达后的 *E. coli*/pET28-*nanA* 和 *E. coli*/pET28-*slr* 细胞，按照 1:3 细胞量混合于催化缓冲液中，加入 0.6 mol/L GlcNAc 和 1.2 mol/L 丙酮酸作为底物，检测反应体系中底物和产物，结果如图 7。由图 7 可以看出，重组细胞能够有效的将底物转化为产物 NeuAc。48 h 时产物浓度达最高，为 0.26 mol/L，此时的转化率达到 43.30%。随着反应继续进行，NeuAc 浓度开始下降而中间产物 ManNAc 则相对维持在较高水平。由此可见，重组酶的特性决定了在本反应体系中底物浓度和中间产物以及

产物浓度达到相对平衡时，剩余了较多的底物和中间产物，从而导致转化效率低于 50%。其他研究者在进行全细胞催化合成 NeuAc 时也出现相似的结果[10]。因此，通过蛋白质工程等手段改进酶的反应动力学特性，优化反应条件从而提高由 GlcNAc 向 NeuAc 合成速率是我们接下来要做的工作。

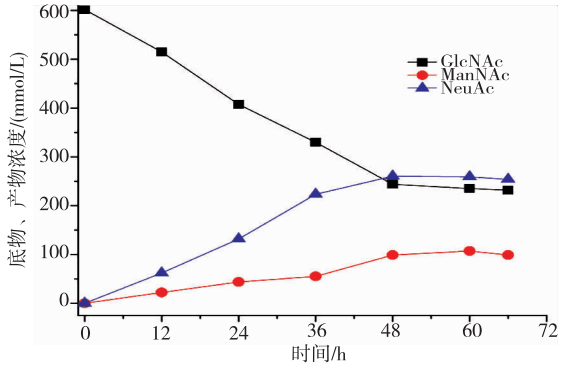


图 7　全细胞催化法合成 NeuAc 的过程曲线

Fig. 7　Time course of NeuAc production and substrate consumption

3 结　语

根据集胞藻 PCC6803 来源的 N-乙酰-D-葡萄糖胺-2-差向异构酶基因(*slr*1975)序列，经密码子分析和优化合成 *slr*1975-*co* 基因序列，测序成功后构建重组质粒进行诱导表达和蛋白质纯化，纯化产物 SDS-PAGE 分析结果显示为大小约 43 000 的单一条带。

重组 AGE 的最适反应温度为 42 ℃，最适反应 pH 为 6.0，在 pH 为 4.0~7.0 范围内保温 30 min 后能保留 85%以上的酶活性，在碱性条件下较容易失活；由于物种间的差异，这与鱼腥草 7120 AGE 温度为 40 ℃，最适 pH 为 8.0 时酶活最高，且碱性条件下活性较好的报道有一定差别[22]。此外，在进行不同金属离子对酶活性影响的实验，都采用 Mg^{2+}作为 ATP 的激活剂，但结果显示 Fe^{2+}对重组酶催化活性也有一定的促进作用。本研究中用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质质量浓度为 1.7 g/L，这是由于携带重组质粒的菌株诱导表达后需要经过超声破碎和过滤才能得到粗产物，在这一过程中重组酶丢失较严重；冷冻保存之后的产物再用于酶促反应，在冻融过程中重组酶活性进一步损失，固定化酶法生产 N-乙酰神经氨酸可以循环利用酶[23]。

Neu5Ac 是唾液酸(Sialic acid)家族中最重要的成员，其家族 99%以上都是由 Neu5Ac 组成[24-25]。AGE 酶可以高效催化 N-乙酰-D-葡萄糖胺为底物得到 N-乙酰神经氨酸。全细胞催化法合成 Neu5Ac 既减少了酶纯化的繁琐步骤也降低了生产成本，已成为研究热点。本研究实现了 AGE 在大肠杆菌中高效表达，为全细胞催化法高效合成 N-乙酰-D-神经氨酸奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] VIMR E, STEENBERGEN S, CIESLEWICZ M. Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1[J]. **Journal of Industrial Microbiology**, 1995, 15(4): 352-360.

[2] ROSEMAN S. The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion[J]. **Chem Phys Lipids**, 1970: 5270-297.

[3] LI Hongyue, LIU Pengfu, SHI Jiping, et al. Physiological function, application and manufacturing method of sialic acid [J]. **The Food Industry Science and Technology**, 2014, 35(3): 363-368.(in Chinese)

[4] JUNEJA L R, KOKETSU M, NISHIMOTO K, et al. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane [J]. **Carbohydrate Research**, 1991, 214(1): 179-186.

[5] GAO Jianfeng, FEN Wanxiang. Isolation and crystallization of sialic acid from pig blood [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 1996, 27(6): 246-247.(in Chinese)

[6] MARU I, OHNISHI J, OHTA Y, et al. Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, 93(3): 258-265.

[7] TSUKADA Y, OHTA Y. Method for preparing N-acetylneuraminic acid by N-acetylneuraminic acid lysase at a pH of 10-12[P]: United States Patent: 5472860, 1995-12-05.

[8] 胡世元. N- 乙酰 -D- 神经氨酸的酶法制备[D]. 兰州：兰州大学，2006.

[9] XU X, GAO C, ZHANG X, et al. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by use of an efficient spore surface display system[J].

Applied and Environmental Microbiology，2011，77(10)：3197-3201.

[10] XU P，QIU J H，ZHANG Y N，et al. Efficient whole-cell biocatalytic synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid [J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**，2007，349(10)：1614-1618.

[11] MARU I，OHTA Y，MURATA K，et al. Molecular cloning and identification of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as a renin-binding protein[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1996，271(27)：16294-16299.

[12] GHOSH S，ROSEMAN S. The sialic acids V. N-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1965，240(4)：1531-1536.

[13] HU S，CHEN J，YANG Z，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.

[14] ZIMMERMANN V，HENNEMANN H G，Dau?mann T，et al. Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine-new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2007，76(3)：597-605.

[15] 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]. **Biotechnology**，2007，129：453-460.

[16] KAZUHIKO T，SATOSHI K，TETSUO E，et al. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by coupling bacteria expressing N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid synthetase [J]. **Enzyme and Microbial Technology**，2002，30(3)：327-333.

[17] LUDWIG K，ANNA G，KATHRIN C. 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**，2013，168：256-263.

[18] GROHER A，HOELSCH K. Mechanistic model for the synthesis of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli* K12[J]. **Journal of Molecular Catalysis B–Enzymatic**，2012，83：1-7.

[19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**，1976，72：48-54.

[20] LEE Y C，WU H M，CHANG Y N，et al. The Central Cavity from the （Alpha/Alpha）6 barrel structure of *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase contains two key histidine residues for reversible conversion [J]. **Journal of Molecular Biology**，2006，(367)：895-908.

[21] TAKAHASHI S，TAKAHASHI K，KANEKO T，et al. Human renin-binding protein is the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase[J]. **Journal of Biochemistry**，1999，125(2)：348-353.

[22] WANG Lijun，ZHU Li，ZHANG Yixuan，et al. Cloning and high expression of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase gene from *Anabaena* sp. in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**，2008，25(12)：1007-1010.(in Chinese)

[23] 饶娆. N- 乙酰 -D- 神经氨酸的酶法制备[D]. 上海：中国科学院研究生院（上海生命科学研究院），2004.

[24] ZHAN Xiaobei，ZHENG Zhiyong，JIA Wei，et al. The breeding of *Escherichia coli* ^{60}Co mutagensis strains and the conditions on the production of polysialic acid[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**，2000，19(4)：315-318.(in Chinese)

[25] ZHAO Hui，ZHAN Xiaobei，ZHU Yihui，et al. Hydrolyzation of polysialic acid and sialic acid[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**，2004，23(4)：16-19.(in Chinese)