DOI:10.12441/spyswjs.20240215001 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0068-09

代谢工程法改造大肠杆菌合成2’-岩藻糖基乳糖

邹宇欣[1] 张文池[2] 张荣珍[1*]

（1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 约翰·霍普金斯大学医学院,美国马里兰州 巴尔的摩 21205）

摘要:母乳寡糖对婴幼儿健康有促进作用,可保护新生儿免受感染和炎症,是婴幼儿最佳的天然食品。2’-岩藻糖基乳糖(2’-fucosyllactose,2’-FL)是母乳寡糖中特有的成分且含量较高,在婴幼儿配方奶粉以及医药产业中有广泛的应用前景。天然产物提取法和化学合成法是合成2’-FL的主要方法,但这两种方法难以大量提取2’-FL,且存在严重污染问题,因此,目前有关2’-FL生产的研究集中在温和环保的全细胞发酵方法上。以大肠杆菌为宿主细胞,在其内异源表达多聚磷酸盐依赖型甘露糖激酶*As*PPGMK和α-1,2-岩藻糖基转移酶,同时共表达合成路径关键酶。为了提高2’-FL的产量,采用抑制UDP-葡萄糖脂质载体转移酶基因*wcaJ*的方法,阻断中间产物的降解过程,并通过优化催化转化条件,在100 mL体系中添加200 mmol/L底物,进一步提高2’-FL产量。结果表明,反应8 h后,转化率为81%,产量为79 g/L。

关键词:2’-岩藻糖基乳糖;大肠杆菌;基因敲除;全细胞催化转化

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for 2’-fucosyllactose Synthesis

ZOU Yuxin[1] *ZHANG Wenchi*[2] *ZHANG Rongzhen*[1*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore 21205, USA)

Abstract: Human milk oligosaccharides play a crucial role in promoting infant health, safeguarding newborns against infection and inflammation, and serving as the optimal natural source of nutrition for infants. Among these oligosaccharides, 2’-fucosylactose (2’-FL) stands out as a prominent constituent with the highest content. Due to its significant application potential in medicine and infant formula production, 2’-FL has rapidly emerged as a focal point of research interest. Natural product extraction and chemical synthesis are the main methods of traditional synthesis of 2’-FL, but these two methods are difficult to extract 2’-FL in large quantities, and there is serious pollution. Consequently, there is growing attention towards employing whole cell fermentation as an environmentally friendly approach that offers mild reaction conditions for efficient 2’-FL production. By heterologously expressing polyphosphate-dependent mannose kinase *As*PPGMK and α-1,2-fucosyltransferase in *Escherichia coli* while co-expressing key enzymes involved in the synthesis pathway and knocking out the gene encoding UDP-glucose lipid carrier transferase *wcaJ* to prevent intermediate metabolite degradation, we successfully enhanced the yield of 2’-FL. Ultimately, through optimization of catalytic transformation conditions, the addition of 200 mmol/L substrate to the 100 mL system further enhanced the yield of 2’-FL to 79 g/L in a yield of 81% in 8 h.

Keywords: 2’-fucosylactose; *Escherichia coli*; gene knockout; whole cell catalytic transformation

基金项目:国家“十四五”重点研究计划项目(2023YFA0914500);国家自然科学基金项目(32271487);国家轻工技术与工程一级学科规划项目(LITE2018-12);高校学科人才引进计划项目(111-2-06)。

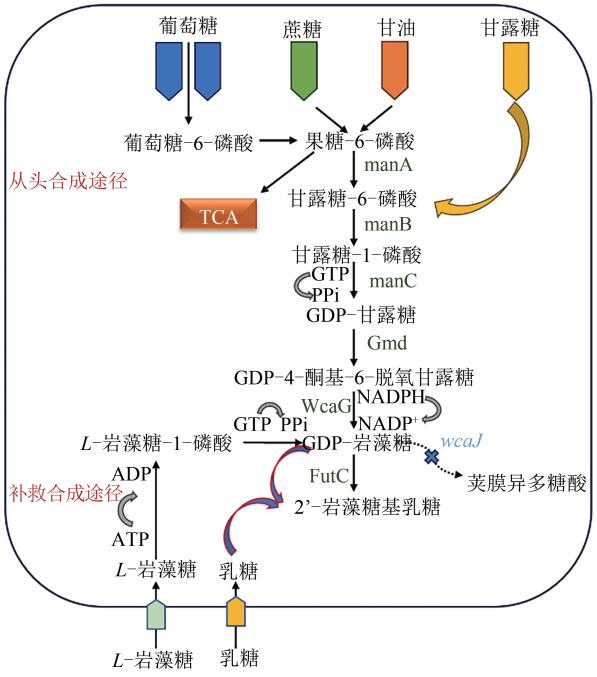
通信作者:张荣珍(1973—),女,博士,教授,博士研究生导师,从事氧化还原酶催化手性化合物和食品酶生物制备研究。E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-02-15 **修回日期:**2024-03-04

母乳富含人体必不可少的营养物质、多样的生物活性成分以及促进肠道菌群健康的刺激因子[1-2]，是婴儿的最佳天然食品为新生儿提供了对抗感染和炎症的保护，并有助于免疫系统的形成[3]。母乳寡糖在小肠中不容易被吸收[4]，而是通过对肠道中有益细菌提供能量来发挥作用。因此，母乳寡糖在促进双歧杆菌的生长、抑制病原体的感染和提高免疫应答等过程中发挥关键作用[5-6]。2’-岩藻糖基乳糖在人类乳汁中含量极高，欧盟委员会（CEC）要求欧洲食品安全局（EFSA）、新型食品和食品过敏原小组（NDA）依照2015/2283号法规，对2’-FL作为新食品的安全性进行评估，发现2’-FL在拟使用的条件下是安全的[7]。目前2’-FL已被大量应用于我国的婴幼儿营养补充剂中[8]，如何更好地实现其工业化生产是目前研究的热点。

直接提取法、化学合成法、生物法是工业生产2’-FL的主要方法[9-10]。2’-FL最初是在母乳中发现的，但因人类2’-FL来源稀少，提取困难，且价格昂贵，所以直接提取法存在成本高、操作复杂、提取效率低、纯度低且容易对其结构造成损害等问题。因此，采用直接提取法来制备2’-FL不具备可行性。化学制备2’-FL的过程相当复杂，反应环境严格，操作过程复杂，花费巨大，并且使用的试剂有很强的环境毒性，具有一定的风险[11]。此外，化学合成法生产的2’-FL中含有无法完全去除的杂质，特别是重金属。因此，目前化学合成方法主要用于临床前和临床试验阶段。由于这些限制条件，在人体营养品领域应用2’-FL受到了一定程度限制。近年来，国内外学者对2’-FL的合成方法进行了深入研究，主要是利用外源添加岩藻糖苷供体，引入岩藻糖苷使其2’-FL位具有较强的选择性，但其异位羟基易失活，且结构复杂，价格昂贵，难以大规模生产[12-13]。

生物法制备2’-FL克服了直接提取法和化学合成法的局限性，具有安全、无污染、应用泛围广等优点，已成为国内外研究的热点。已有研究发现，2’-FL在细胞质中存在2条合成路径，通过从头合成途径和补救合成途径生产GDP-*L*-岩藻糖，再进一步外源表达α-1，2-岩藻糖基转移酶合成2’-FL[14]。GDP-*L*-岩藻糖是岩藻糖基化寡糖生物合成途径的关键中间体，主要在岩藻糖基化反应中提供岩藻糖基[15-16]。其从头合成途径是利用GDP-*D*-甘露糖为原料，并通过Gmd和WcaG这2个酶催化反应来合成GDP-*L*-岩藻糖。补救合成途径在真核生物中普遍存在，是以*L*-岩藻糖（*L*-fucose）为底物，通过Fkp（*L*-岩藻糖激酶）催化生成GDP-*L*-岩藻糖[17]。2’-FL的代谢合成途径见图1。研究者对两种GDP-岩藻糖合成途径以及FutC进行了转录微调，以促进2’-FL的产生。最终代谢工程化大肠杆菌在摇瓶和分批补料培养中分别产生2.62、14.1 g/L的2’-FL[18]。



甘露糖-6-磷酸异构酶—manA；磷酸甘露糖变位酶—manB；α-*D*-甘露糖-磷酸鸟嘌呤基转移酶—manC；GDP-*L*-岩藻糖合酶—Gmd；GDP-岩藻糖合成酶—WcaG；α-1，2-岩藻糖基转移酶—FutC；UDP-葡萄糖脂质载体转移酶基因—*wcaJ*。

图1　2’-FL代谢合成途径概况

Fig. 1　Overview of the metabolic pathways for the biosynthesis of 2’-FL

采用大肠杆菌模式菌株*Escherichia coli* BL21（DE3）作为起始表达菌株，对其进行改良和优化。在大肠杆菌中异源表达多聚磷酸盐依赖型激酶（*As*PPGMK），为了减少转化体系的黏度，增加传质效率，以甘露糖为底物，通过共表达*manB*、*manC*、*gmd*、*wcaG*和*futC*基因，全细胞转化甘露糖生产2’-FL。通过使编码UDP-葡萄糖脂质载体转移酶基因*wcaJ*失活，限制GDP-*L*-岩藻糖的分解，改善了2’-FL合成能力。最后，通过全细胞转化条件的优化进一步提高2’-FL的产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

1）菌株：大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21（DE3）JM109 均为江南大学酿造微生物学与应用酶学研究室保藏菌株。

2）质粒：pET-28a（+）和 pET-21a（+）由作者所在研究室保藏。

1.1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶、单片段同源重组试剂盒、质粒提取试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；卡那霉素、氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、SDS-PAGE 免封闭变性丙烯酰胺彩色凝胶、双色预染蛋白质 Marker：生工生物工程（上海）股份有限公司；*D*-甘露糖、GDP-*L*-岩藻糖和 2'-岩藻糖基乳糖标准品：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；其他试剂：生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备

蛋白质电泳仪：ÄKTA-purify 型，美国颇尔公司。

1.1.4 引物

引物合成及测序均由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。试验所用引物序列见表 1。

表 1 试验引物列表

Table1 List of primers in this study

引物	序列（5′-3′）
manCB-F	CGCGGATCCGAATTCATGGCGCAGTCGAAA
manCB-R	TTGTCGACGGAGCTCTTACTCGTTCAGCAA
gmd-wcaG-F	GGAGATATACATATGATGTCAAAAGTCGCT
gmd-wcaG-R	TTGTCGACGGAGCTCTTACCCCCGAAAGCG
gRNA	GTCAGCACATTGATAAACTG
gRNA-F	CTGCGTTATCCCCTGATTCTG
gRNA-R	TCGATGACGCCAACTACCTCT
F-Δ*wcaJ*-F	GTCAGCACATTGATAAACTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
F-Δ*wcaJ*-R	CAGTTTATCAATGTGCTGACACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
F-Δ*wcaJ*-test	GTCAGCACATTGATAAACTG
wcaJ-up-F	GCCAGAAATGGGCGCTAACCA
wcaJ-up-R	GGGCTAATAACAGGAACAACGTATGAGCTTACGTGAAAAAAC
wcaJ-down-F	GTTTTTTCACGTAAGCTCATACGTTGTTCCTGTTATTAGCCC
wcaJ-down-R	CCGGACACGCCTTTATTAAAG

1.2 试验方法

1.2.1 培养基和培养条件

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，NaCl 10 g，蒸馏水 1.0 L；LB 固体培养基：另添加 20 g 琼脂。

种子培养：从转化平板上挑取单克隆，并在 37 ℃、200 r/min 培养 8 h。

诱导培养：将培养基于 37 ℃、200 r/min 培养 1.5~2.0 h，待 OD_{600} 为 0.6~0.8 时，向菌液中加入适量 IPTG 诱导表达，于 25 ℃、200 r/min 过夜培养。

1.2.2 构建共表达质粒

E. coli BL21（DE3）全基因组 DNA 按照提取试剂盒操作说明书进行提取。引物根据 NCBI 官网公布的 *manB*、*manC*、*gmd* 和 *wcaG* 基因序列进行设计，随后进行引物合成和测序。以抽提的 *E. coli* BL21（DE3）全基因组为模板，PCR 反应条件：98 ℃ 30 s，98 °C 30 s，55 °C 30 s，72 ℃ 90 s，30 个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃保温。利用多片段同源重组试剂盒采用酶切位点双酶切、酶连的方法连接质粒载体，转化进感受态细胞大肠杆菌 JM109。DNA 测序成功后进行转化试验，构建重组表达菌株 *E. coli* BL21/pET-*CBGWF*。

1.2.3 敲除载体和基因同源修复臂的构建

模板使用 *E. coli* BL21 基因组，利用引物 *wcaJ*-up-F/R 和 *wcaJ*-down-F/R 扩增出 *wacJ* 基因簇的上下游片段，接着柱纯化得到目标产物。供体 DNA 模板是以 *wcaJ* 上下游片段为模板，通过引物 *wcaJ*-

up-F/*wacJ*-down-R将这些片段进行融合PCR所得，制备流程见图2。对供体DNA片段进行胶回收处理。进行敲除基因gRNA的设计，并在其中加入设计好的20 bp序列，以F-Δ*wcaJ*-F/F-Δ*wcaJ*-R作为上下游引物，利用pTargetF质粒为模板进行PCR扩增。将处理好的产物转化至*E. coli* BL21感受态细胞中，过夜培养后提取质粒并使用引物F-test/F-Δ*wcaJ*-R测序，敲除质粒鉴定构建成功后命名为pTF-Δ*wcaJ*。

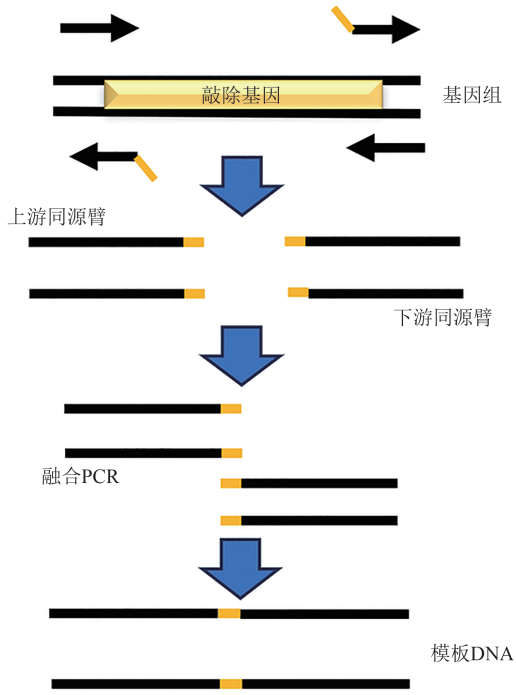


图2　用于基因敲除的DNA片段的制备

Fig. 2　Preparation of DNA fragment used for gene knockout

1.2.4　基因敲除菌株的构建

在*E. coli* BL21感受态细胞中转化入核酸内切酶pCas质粒，并涂布于含卡那霉素的LB固体平板上，在30 ℃下过夜培养后挑选单个克隆子*E. coli* BL21-Δ培养，并筛选阳性子代。最后利用含pCas质粒的*E. coli* BL21-Δ制备电转化感受态细胞，并通过电转化的方法（电压1.8 kV，时间5 ms）将上述成功制备的载体和同源修复臂转化进感受态细胞中，复苏1.5 h，于30 ℃恢复生长状态后低速离心并涂布于含有两种抗性的LB双抗固体平板上，在30 ℃条件下培养后获得同源重组菌株。对重组菌株进行培养并提取其质粒作为模版，使用针对*wcaJ*基因设计的验证PCR引物F-Δ*wcaJ*-test对转化子进行验证，筛选出成功敲除基因的菌株，并将PCR验证成功菌株命名为*E. coli* BL21-Δ*wcaJ*。最后加入0.5 mmol/L IPTG诱导并在42 ℃培养过夜，对pTargetF和pCas质粒抗性进行消除。CRISPR-Cas9技术敲除基因流程见图3。

1.2.5　全细胞转化条件优化

1）pH：研究不同pH（6.5、7.0、7.5、8.0、8.5）对转化甘露糖生产2’-FL转化率的影响。反应体系为1 mL，包含10 mmol/L甘露糖、10 mmol/L乳糖、10 mmol/L六偏磷酸钠、2 mmol/L $MgCl_2$、40 μmol/L NADP、2 mmol/L NADPH和20 mg/mL湿细胞，反应缓冲液为100 mmol/L Tris-HCl（pH 6.5~8.5）。

2）温度：研究不同反应温度（20、25、30、35、40 ℃）对转化甘露糖生产2’-FL转化率的影响。反应体系为1 mL，包含10 mmol/L甘露糖、10 mmol/L乳糖、10 mmol/L六偏磷酸钠、2 mmol/L $MgCl_2$、40 μmol/L NADP、2 mmol/L NADPH和30 mg/mL湿细胞。反应缓冲液为100 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）。

3）底物浓度：研究不同底物浓度（10、20、30、40、50 mmol/L）对转化甘露糖生产2’-FL转化率的影响。反应体系为1 mL，包含10~50 mmol/L甘露糖、10~50 mmol/L乳糖、10 mmol/L六偏磷酸钠、2 mmol/L $MgCl_2$、40 μmol/L NADP、2 mmol/L NADPH和30 mg/mL湿细胞，反应缓冲液为100 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）。

4）全细胞催化剂添加质量浓度优化：研究不同全细胞催化剂质量浓度（10、20、30、40、50 g/L）对转化甘露糖生产2’-FL转化率的影响。反应体系为1 mL，包含10 mmol/L甘露糖、10 mmol/L乳糖、10 mmol/L六偏磷酸钠、2 mmol/L $MgCl_2$、40 μmol/L NADP、2 mmol/L NADPH和10~50 mg/mL湿细胞，反应缓冲液为100 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）。

1.2.6　检测方法

1）甘露糖、2’-FL的测定：用高效液相色谱法（HPLC）测定甘露糖质量浓度以计算转化率。用示差法检测，色谱柱使用美国博乐有机酸柱Aminex（Hercules，美国）HPX-87H。5 mmol/L硫酸作为流动相，流量0.6 mL/min，柱温65 ℃。

2）GDP-*L*-岩藻糖的测定：发酵液在沸水中失活

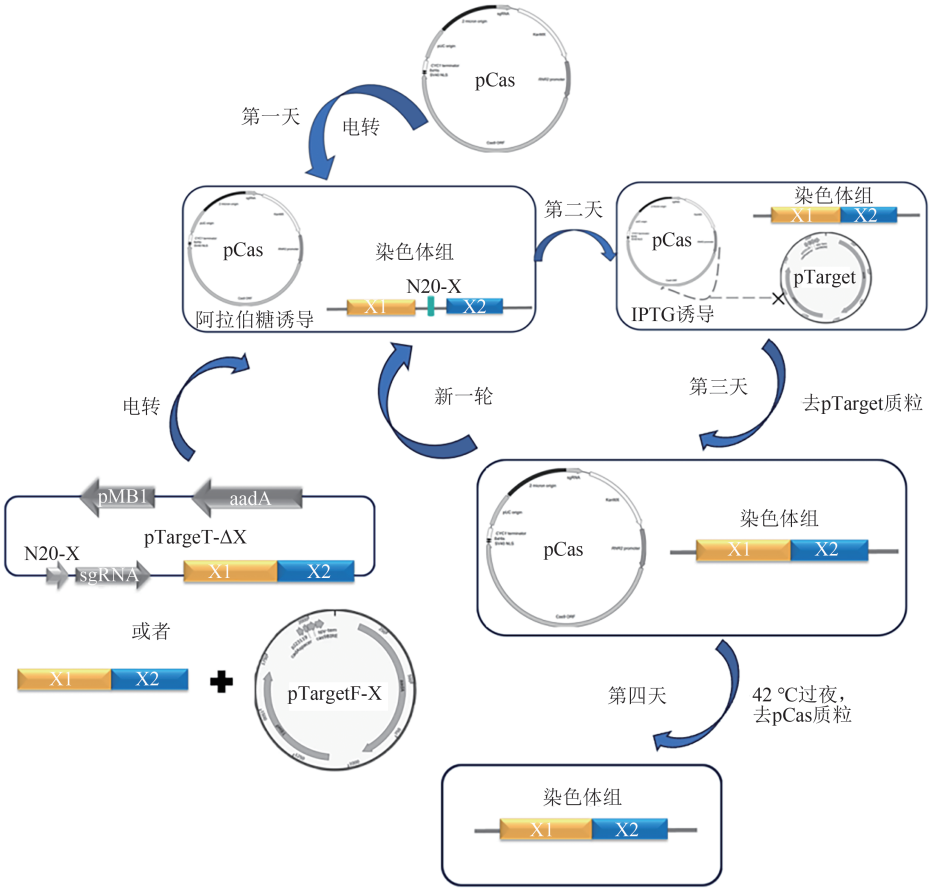


图 3　CRISPR-Cas9 技术敲除基因示意图

Fig. 3　Schematic diagram of knockout gene with CRISPR-Cas9 technique

后于 12 000 r/min 离心 10 min，过滤后利用 HPLC 进行检测。检测条件：选择有机酸柱，UV 检测器，其紫外波长 254 nm，柱温 30 ℃，使用 20 mmol/L 的醋酸三乙胺和体积分数 14 %的乙腈进行梯度洗脱，流量为 0.6 mL/min。

2　结果与讨论

2.1　级联反应生产 GDP-岩藻糖的路径设计和构建

在工业生产中，GDP-岩藻糖是一种重要的中间产物，用于合成母乳寡糖。它在母乳寡糖的合成过程中扮演着关键角色，市场发展前景非常广阔。多酶级联反应被广泛用于生产化合物，以满足绿色制造的发展。作者基于 GDP-岩藻糖从头合成途径的多酶级联生物合成路径（见图 4），成功构建了一种新型共表达基因工程菌。通过 PCR 扩增基因 *manC-manB*、*gmd-wcaG*，并利用同源重组法与目的基因连接，构建重组质粒 pET21-*CBGW*。

从 NCBI 中获取来自 *Arthrobacter* sp. I3 的多聚磷酸盐依赖型甘露糖激酶（WP_028275864.1）的氨基酸序列，根据大肠杆菌的密码子偏好性，对基因进行密码子优化，制备得到多聚磷酸盐依赖型甘露糖激酶质粒 pET28-*As*PPGMK。

2.2　基因敲除菌株的验证

将构建好的敲除载体和模板 DNA 电转到含有 pCas 质粒的大肠杆菌 BL21 中，并进行基因敲除试验。原始菌落的 PCR 扩增结果作为阴性对照。通过 GeneBank 可知，*wcaJ* 基因长度为 1 395 bp，敲除系统为 CRISPR/Cas9，随后通过同源重组并进行 PCR 验证得到正确敲除菌株，提取其基因组 DNA 并利用相应引物 *wcaJ*-up-F/*wcaJ*-down-R 验证，如图 5 所示，两个突变株基因敲除成功，*wcaJ* 基因长度恰为两片段之间长度差，再通过 PCR 测序确认纯化回收的这些敲除菌株所含碱基均无误，最终证明成功敲除 *wcaJ* 基因的 *E. coli* BL21-ΔWcaJ 菌株构建完成。

2.3　重组大肠杆菌的诱导表达

将构建好的共表达质粒 pET21-*CBGW* 转入

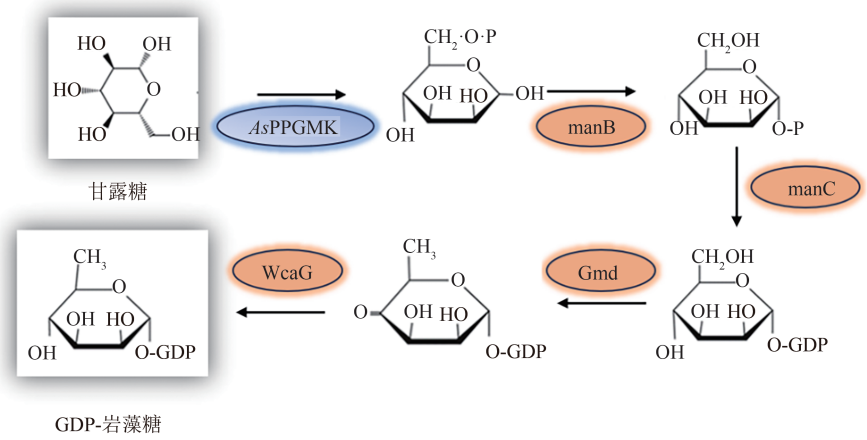
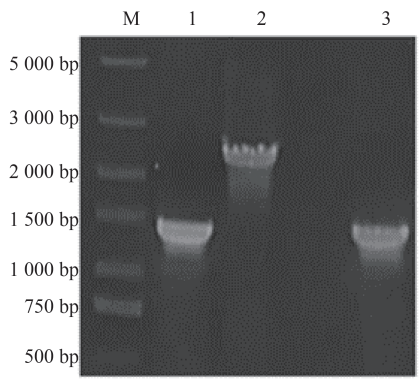


图4　5酶级联反应催化甘露糖生成GDP-岩藻糖的路径设计

Fig. 4　Design and reconstruction of GDP-fucose biosynthesis pathway from mannose by a five-enzyme system



M—DNA标准品；1、3—成功敲除*wcaJ*基因后的PCR产物；2—*wcaJ*基因未敲除的PCR产物。

图5　*WcaJ*基因敲除菌株的PCR验证

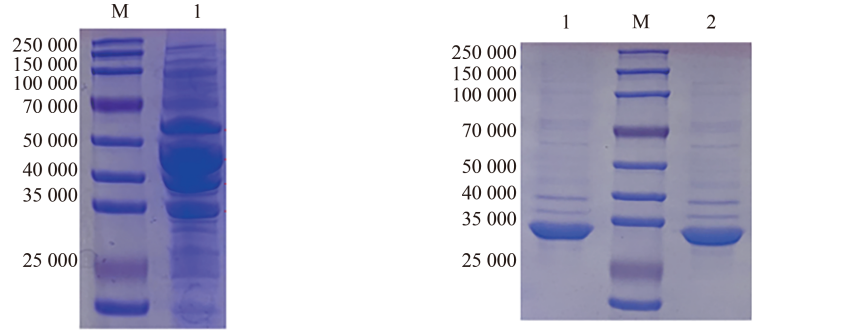
Fig. 5　PCR identification of *wcaJ* gene after knockout

E. coli BL21-ΔW*cal*菌株中，并通过SDS-PAGE分析IPTG诱导后得到的重组酶，见图6(a)。

在相对分子质量为53 000、50 000、42 000、36 000处可观察到明显的蛋白质条带，共表达质粒pET21-*CBGW*实现成功诱导表达。同时也将构建好的质粒pET28-*As*PPGMK转入*E. coli* BL21-ΔW菌株中，并经过0.2 mmol/L的IPTG诱导培养后再次进行SDS-PAGE分析。在SDS-PAGE凝胶中观察到相对分子质量为30 000的强条带，对应目标酶的相对分子质量，见图6(b)。

2.4　基因敲除后对GDP-岩藻糖产量的影响

以*E. coli* BL21（DE3）、*E. coli* BL21-ΔW*caJ*这2株菌株为表达宿主菌，共转化重组质粒pET21a-*CBGW*和pET28a-*As*PPGMK，得到2株GDP-岩藻糖生产菌株E01和E02。进行全细胞转化反应探究*wcaJ*基因敲除后对GDP-岩藻糖产量的影响。如图7所示，与原始菌株E01相比，在转



M—蛋白质Marker；1—重组菌蛋白质。　M—蛋白质Marker；1、2—pET28-*As*PPGMK蛋白。

(a) 共表达质粒pET21-*CBGW*蛋白验证　　(b) 质粒pET28-*As*PPGMK蛋白验证

图6　重组菌株蛋白质验证

Fig. 6　Recombinant strain protein verification

化反应 12 h 时，GDP-岩藻糖的转化率达到 67%，说明敲除 *wcaJ* 基因有效阻止了 GDP-岩藻糖向可拉酸的通量，在一定程度上增加了目标产物的积累。

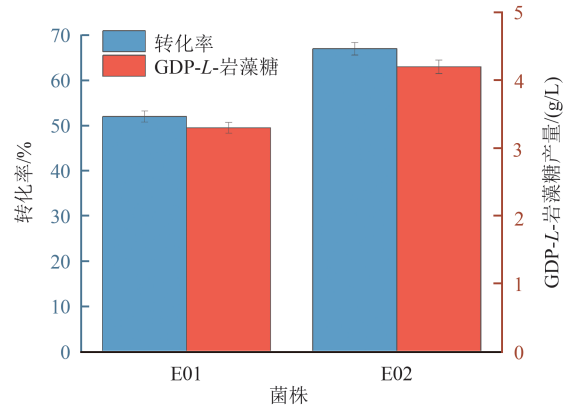


图 7　基因敲除对 GDP-岩藻糖产量的影响

Fig. 7　Effect of gene knockout on GDP-fucose production

2.5　产物 2'-FL 的分析及鉴定

从 NCBI 中获取来自 *Helicobacter pylori* 的 1，2-岩藻糖基转移酶（WP_000874818.1）的氨基酸序列，根据大肠杆菌的密码子偏好性，对基因进行密码子优化，使用 SD-AS（序列为：GAAGGAGATATACC）作为 linker，将其插入质粒 pET21a-*CBGW* 中以构建重组质粒 pET21a-*CBGWF*，并与质粒 pET28a-*As*PPGMK 共同转化至 *E. coli* BL21-ΔW*cal* 细胞内构建 2'-FL 生产菌株 E03。作者采用高效液相色谱（HPLC）对大肠杆菌工程菌株生成的 2'-FL 进行定量分析，以确定发酵产物中目标产物 2'-FL 的存在。2'-FL 标样和反应液分别在保留时间 8.04 min 和 8.09 min 处存在一个明显的峰，说明产物中含有 2'-FL。最后，对反应产物进行处理，纯化并使用 NMR 结构鉴定方法来进一步验证和分析反应液中的 2'-FL 是否与标准品相符。^{13}C-NMR（151 MHz，D_2O）的化学位移 δ 为：100.30（26-C）、99.36（8-C）、95.92（3-C）、91.85（25-C）、76.31（4-C），75.97（1-C），75.33（23-C），74.32（5-C），73.96（9-C），73.63（12-C），71.70（10-C），71.32（6-C），70.41（28-C），69.69（11-C），69.20（24-C），68.20（29-C），66.96（20-C）、15.30（17-C），该结果证明生成的物质为 2'-FL。

2.6　全细胞转化 *D*-甘露糖生产 2'-FL 的反应条件优化

探讨了反应条件对转化反应的影响，通过调整 pH、反应温度、底物浓度和催化剂质量浓度优化 *D*-甘露糖生产 2'-FL 的发酵条件。将 pH 分别调整为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5，试验结果表明，在 pH 为 7.5 时，2'-FL 的产量达到最高，见图 8（a），这为优化生产工艺提供了重要的依据。同时，温度对于酶的催化反应也有显著影响，因此，在全细胞催化反应中，分别在 20、25、30、35、40 ℃下进行催化，温度过高或过低都可能导致酶失活，30 ℃是最适宜的温度条件，2'-FL 的产量和转化率分别为 3.3 g/L 和 71%，见图 8（b）。在底物浓度方面，当底物浓度为 10 mmol/L 时，转化率可以达到 72%，而底物浓度为 20 mmol/L 时，转化率为 70%，见图 8（c），二者差别不大。对于工业化生产来说，在保证转化率的同时要尽可能提高产量，所以最佳反应底物浓度选择 20 mmol/L。此外，还研究了不同全细胞催化剂添加量对 2'-FL 产量的影响。结果表明，当全细胞催化剂质量浓度低于 30 g/L 时，2'-FL 产量随着质量浓度的增加而提高，进一步提高全细胞催化剂质量浓度反而没有显著增加，因此，选择 30 g/L 为最佳全细胞催化剂质量浓度，见图 8（d）。

2.7　扩大反应体系

为了证明扩大 2'-FL 生产规模的可行性，底物甘露糖的浓度增加到 200 mmol/L，反应体系扩大到 100 mL。在最优条件下对甘露糖从头合成 2'-FL 的时间过程进行了监测，结果见图 9。在前 6 h 内连续将甘露糖转化为 2'-FL，表明在该反应条件下具有很好的操作稳定性。在最初的 6 h 内转化率达到 78% 左右，表明具有较高的初始催化性能。2'-FL 在反应 8 h 后转化率为 81%，产量达到了 79 g/L。

全细胞催化法合成 2'-FL 具有经济性和高效性，是目前合成 2'-FL 最具有潜力的方法[19]。Parschat 等[20]利用蔗糖作为底物，额外添加反应所需底物乳糖，并将从头合成途径中的基因整合到 *E.coli*BL21（DE3）的基因组上，2'-FL 的产量达到了 64 g/L。Ni 等[21]以 *E.coli* C41（DE3）作为宿主细胞，敲除了产物中间体降解的 *wcaJ*、*nudK*、*nudD* 基因以及半乳糖苷酶基因 *lacZ*，将获得的重组工程菌以甘油作为碳源进行反应，获得了 66.8 g/L 的 2'-FL，为实现 2'-FL 的工业化生产提供了参考。

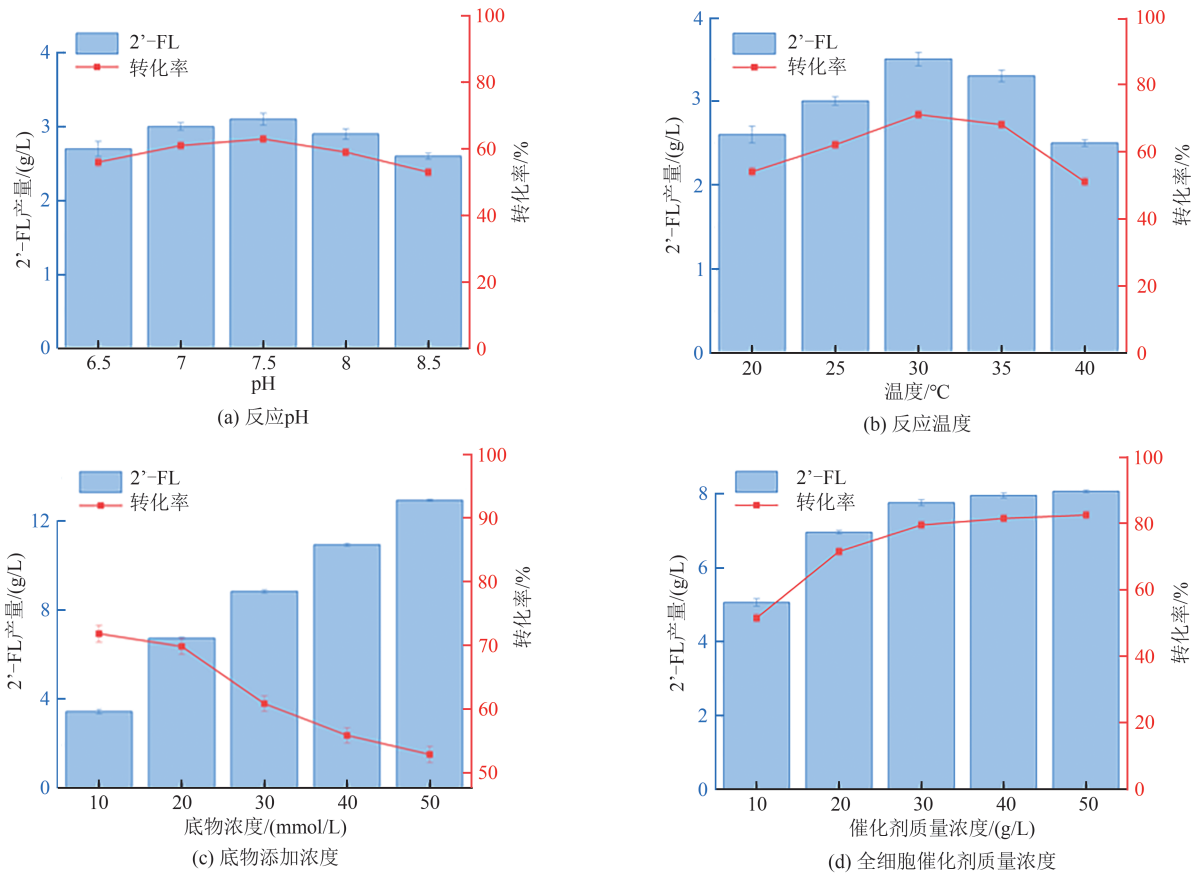


图 8　全细胞反应不同转化条件优化

Fig. 8　Transformation condition optimization by the whole-cells

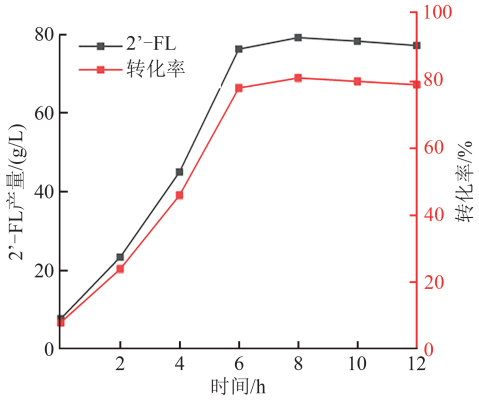


图 9　100 mL 体系下合成 2’-FL

Fig. 9　Synthesis of 2’-FL in 100 mL scale

3　结论

已有研究表明，通过改变细胞内乳糖含量、GDP-*L*-岩藻糖的可利用性、降低中间产物代谢、促进细胞内 GTP、NADPH 等途径相关基因的表达，能够提高 2’-FL 的产率[9,22]。为了实现 2’-FL 的高效生产，作者构建了多个质粒，通过重组菌进行六酶级联反应来催化 *D*-甘露糖生产 2’-FL。通过代谢工程改造，以价格相对便宜的化合物甘露糖作为底物实现了化合物 2’-FL 的高效制备。通过强化与 2’-FL 合成相关基因的表达，敲除大肠杆菌内与关键中间产物 GDP-*L*-岩藻糖分解代谢相关的基因，使得不同代谢流达到平衡，为工业化生产提供了依据。然而，由于在重组菌中构建了多个质粒，质粒稳定性可能会影响目标基因的稳定表达，同时必须加入相应的抗生素提高重组质粒的稳定性，但这不利于细胞的正常生长和后续的分离纯化。因此，未来的研究将重点关注如何提高质粒的稳定性，以保证目标基因的稳定表达，从而提高 2’-FL 的产量。

参考文献

[1] ASAKUMA S, HATAKEYAMA E, URASHIMA T, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(40): 34583-34592.

[2] MARRIAGE B J, BUCK R H, GOEHRING K C, et al. Infants fed a lower calorie formula with 2’-FL show growth

and 2’-FL uptake like breast-fed infants [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2015, 61(6): 649-658.

[3] MONDAL B, DUTTA T, GUPTA S S. Dual enzyme responsive mannose-6-phosphate based vesicle for controlled lysosomal delivery[J]. Chemical Communications, 2021, 57(1):109-112.

[4] REID G. Probiotics and prebiotics-Progress and challenges[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(10/11):969-975.

[5] HORTA B L. Breastfeeding: investing in the future[J]. Breastfeeding Medicine, 2019, 14(S1):S11-S12.

[6] JACOBI S K, YATSUNENKO T, LI D P, et al. Dietary isomers of sialyllactose increase ganglioside sialic acid concentrations in the corpus callosum and cerebellum and modulate the colonic microbiota of formula-fed piglets[J]. The Journal of Nutrition, 2016, 146(2):200-208.

[7] TURCK D, BOHN T, CASTENMILLER J, et al. Safety of the extension of use of 2’-fucosyllactose (2’-FL) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283[J]. EFSA Journal, 2023, 21(11):1-13.

[8] 刘爽, 王津, 邹妍, 等. 2’-岩藻糖基乳糖的功能及其应用现状[J]. 营养学报, 2020, 6(2):187-192.
LIU S, WANG J, ZOU Y, et al. The health benefits of 2’-fucosyllactose and its application in infant formula products[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2020, 6(2): 187-192.(in Chinese)

[9] LEE W H, PATHANIBUL P, QUARTERMAN J, et al. Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2’-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11:48.

[10] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 母乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9):284-292.
LI C C, LI M L, ZHANG T. Research progress of human milk oligosaccharides [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9):284-292.(in Chinese)

[11] 曾伟主, 石选平, 黄忠实, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成NMN[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(9):28-35.
ZENG W Z, SHI X P, HUANG Z S, et al. NMN production by whole-cell catalysis of recombinant *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(9):28-35.(in Chinese)

[12] BERGER P K, PLOWS J F, JONES R B, et al. Human milk oligosaccharide 2’-fucosyllactose links feedings at 1 month to cognitive development at 24 months in infants of normal and overweight mothers[J]. PLoS ONE, 2020, 15(2):e0228323.

[13] JUNG S M, CHIN Y W, LEE Y G, et al. Enhanced production of 2’-fucosyllactose from fucose by elimination of rhamnose isomerase and Arabinose isomerase in engineered *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(9): 2412-2417.

[14] HUANG D, YANG K X, LIU J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2’-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41:23-38.

[15] LEE W H, CHIN *Y* W, HAN N S, et al. Enhanced production of GDP-*L*-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(4):967-976.

[16] KOIZUMI S, ENDO T, TABATA K, et al. Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(4):213-217.

[17] SPRENGER G A, BAUMGÄRTNER F, ALBERMANN C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 258:79-91.

[18] LI W, ZHU Y Y, WAN L, et al. Pathway optimization of 2’-fucosyllactose production in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(5):1567-1577.

[19] FAIJES M, CASTEJÓN-VILATERSANA M, VAL-CID C, et al. Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides [J] . Biotechnology Advances, 2019, 37(5):667-697.

[20] PARSCHAT K, SCHREIBER S, WARTENBERG D, et al. High-titer *de novo* biosynthesis of the predominant human milk oligosaccharide 2’-fucosyllactose from sucrose in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(10):2784-2796.

[21] NI Z J, LI Z K, WU J Y, et al. Multi-path optimization for efficient production of 2’-fucosyllactose in an engineered *Escherichia coli* C41 (DE3) derivative[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8:611900.

[22] PARK B S, CHOI Y H, KIM M W, et al. Enhancing biosynthesis of 2’-Fucosyllactose in *Escherichia coli* through engineering lactose operon for lactose transport and α-1, 2-Fucosyltransferase for solubility[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(5):1264-1277.

（责任编辑：龚梦月）