

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.03.014

合成软骨素的益生菌的构建

孙蓉, 周贤轩, 许文静

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)是一种具有多种临床治疗作用的糖胺聚糖。目前,软骨素主要是从能引起尿路感染的病原菌 *E. coli*O5:K4:H4(*E. coli* K4)中提取的,但该提取方式存在碳链骨架完整性受损和潜在的污染风险。为了解决该问题,文章以非致病性益生菌大肠杆菌 Nissle 1917(EcN)为出发菌株,将 UDP-葡萄糖胺异构酶基因(*kfoA*)和软骨素聚合酶基因(*kfoC*)转入至 EcN,并敲除了其 *kfiA* 和 *kfiC* 基因,从而获得工程益生菌 EcN-*kfoAC*。经过分批补料发酵后,对 EcN-*kfoAC* 发酵液上清使用化学酶法定量分析软骨素,结果显示其质量浓度达到 650 mg/L。该工程型菌株不仅成功实现了软骨素的合成与分泌,同时也为后续软骨素多糖的大规模纯化和硫酸化修饰奠定了基础。

关键词:软骨素;大肠杆菌 Nissle 1917;大肠杆菌 K4;软骨素聚合酶;发酵

中图分类号:Q943.2

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2026)03-0372-07

Construction of a probiotic that synthesizes chondroitin

SUN Rong, ZHOU Xianxuan, XU Wenjing

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Chondroitin sulfate (CS) is a glycosaminoglycan known for its diverse clinical therapeutic effects. Currently, chondroitin is primarily sourced from *E. coli*O5:K4:H4(*E. coli* K4), a pathogenic bacterium implicated in urinary tract infections. However, this extraction method is associated with damage to the carbon chain skeleton and potential contamination risks. To address these challenges, this study employs the non-pathogenic probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 (EcN) as the foundational organism. The UDP-glucosamine isomerase gene (*kfoA*) and chondroitin polymerase gene (*kfoC*) were introduced into EcN, while its *kfiA* and *kfiC* genes were knocked out, resulting in the creation of the engineered probiotic EcN-*kfoAC*. Following fed-batch fermentation, chondroitin was quantitatively assessed using a chemoenzymatic method applied to the supernatant of the EcN-*kfoAC* fermentation broth, revealing a concentration of 650 mg/L. This engineered strain not only successfully synthesizes and secretes chondroitin but also paves the way for subsequent large-scale purification and sulfation modification of chondroitin polysaccharides.

Key words: chondroitin; *E. coli* Nissle 1917; *E. coli* K4; chondroitin polymerase; fermentation

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)是一种糖胺聚糖(GAG),其主链由重复的二糖单元($\rightarrow 3$)GalNAc β (1 $\rightarrow 4$)GlcA β (1 \rightarrow)(GlcA表示葡萄糖醛酸, GalNAc表示N-乙酰半乳糖胺)聚合而成。

在聚合过程中,各种磺基转移酶在主链不同位置发生硫酸化^[1]。CS在治疗自身免疫性疾病、保护受损软骨、维持软骨基质的完整性以及治疗骨关节炎方面发挥着关键作用^[2]。

收稿日期:2024-03-01;修回日期:2024-04-29

基金项目:安徽省科技重大专项资助项目(202103a06020001)

作者简介:孙蓉(1999—),女,江苏盐城人,合肥工业大学硕士生;

周贤轩(1977—),男,湖南湘西人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail:zhoux@hfut.edu.cn.

目前,商业化的CS主要来源于鲨鱼软骨、气管、鼻中隔等,并采用碱法、酶法等提取方法进行工业化生产,但不同的原料、提取技术和纯化技术可能导致产品含量、纯度、生物效应和临床疗效的差异。此外,作为动物来源的生物聚合物用于人类治疗剂存在携带朊病毒的风险^[1,3]。因此,开发一种安全可靠的生物技术工艺,以替代传统的动物来源提取工艺,具有很大的潜在应用价值^[4]。

E. coli K4的荚膜多糖(CPS)是由重复二糖单元($\rightarrow 3$)GalNAc β (1 \rightarrow 4)GlcA β (1 \rightarrow)聚合而成的GAG,与软骨素相比,其骨架相似,但在GlcA的C3位连接了果糖支链^[5]。这种相似性为利用微生物发酵生产CS提供了一种可能的途径,有研究也证明了可以用*E. coli* K4制备软骨素^[6-8]。大肠杆菌具有表达80多种荚膜多糖或K抗原的能力,根据遗传标准将其分为4组。*E. coli* K4和EcN的CPS均属于II组K抗原,第II组抗原基因簇由Region1、Region2和Region3组成^[9]。Region1和Region3在不同的第II组抗原之间保持一致,负责多糖的转运和定位^[10];而Region2具有血清型特异性,编码合成特定荚膜多糖所需的蛋白质^[9]。针对*E. coli* K4的Region2研究表明,其包含7个基因(*kfoA*、*kfoB*、*kfoC*、*kfoD*、*kfoE*、*kfoF*、*kfoG*)以及位于*kfoC*与*kfoD*之间的转座因子IS2,长度为14 kbp,这些基因可编码合成软骨素样多糖的酶^[11]。其中:*kfoA*基因编码UDP-GlcNAc差向异构酶,将UDP-GlcNAc差向异构化为UDP-GalNAc;*kfoB*基因编码与糖基转移酶相互作用的蛋白质^[12];*kfoC*基因编码软骨素聚合酶,将GlcA和GalNAc残基转移到寡糖的非还原端以合成软骨素的骨架^[13];*kfoE*基因编码果糖基转移酶,在GlcA残基的C3位添加果糖^[14];*kfoF*基因编码UDP-葡萄糖脱氢酶,与*kfiD*高度同源^[5]。

尽管*E. coli* K4 CPS的产量相当高,但以致病菌K4 CPS为软骨素碳链骨架合成CS时,需去除果糖分支,这会破坏碳链骨架结构,从而影响CS的功能^[11]。因此,利用基因工程方法对非致病性益生菌EcN进行改造以合成软骨素,为生物法合成软骨素提供了一种有益的替代方案。EcN对多种肠道致病菌具有拮抗作用,在治疗肠道疾病方面具有明显的益生菌特性,相对于*E. coli* K4具有较高的安全性^[15-16]。对EcN的Region2研究发现,其包含*kfiA*、*kfiB*、*kfiC*和*kfiD*共4个基因。*kfiA*和*kfiC*编码具有糖基转移酶活性的蛋白质,能够催

化GlcA和GlcNAc添加到多糖链的非还原端,从而延长多糖链,合成肝素前体多糖^[17];而*kfiD*则编码UDP-葡萄糖脱氢酶,其作用是催化UDP-Glc转化为UDP-GlcA^[18]。

本研究以EcN为出发菌株,通过同源重组,利用*E. coli* K4的*kfoA*、*kfoC*基因分别替换EcN的*kfiA*、*kfiC*基因,获得工程型益生菌EcN-*kfoAC*。该基因改变了出发菌株合成的多糖种类,即从合成肝素前体多糖变成合成软骨素多糖。利用硫酸软骨素裂解酶(AsChnAC),专一地断裂GalNAc与GlcA之间的 β -1,4糖苷键,产生不饱和寡糖^[19],结合超滤法对高密度发酵液中的软骨素多糖进行定量分析和核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究将*E. coli* β 2155作为接合实验的供体菌株,利用自杀质粒pCVD442Gm对受体菌株EcN的*kfiA*和*kfiC*基因进行替换。

1.2 培养条件

菌株在LB培养基(0.5%酵母粉、1%氯化钠和1%蛋白胨)或含有1.5%琼脂的LB固体培养基上生长。软骨素的发酵合成在5 L发酵罐(上海百伦生物有限公司)中进行。发酵培养基为M9C培养基,成分为1.36 g/L Na₂HPO₄、0.6 g/L KH₂PO₄、0.1 g/L NaCl、0.2 g/L NH₄Cl、2 mmol/L MgSO₄、0.1 mmol/L CaCl₂、0.4%葡萄糖和0.4%络蛋白氨基酸。

1.3 实验方法

1.3.1 重组质粒的构建

分别使用引物*kfiA*-5F、*kfiA*-5R和*kfiA*-3F、*kfiA*-3R从EcN基因组上扩增*kfiA*基因的上游同源臂和下游同源臂。使用引物*kfoA*-F和*kfoA*-R从*E. coli* K4基因组上扩增*kfoA*。利用DNA凝胶回收试剂盒对聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物进行回收纯化。随后,使用引物*kfiA*-5F和*kfiA*-3R对*kfiA*基因的上游和下游同源臂与*kfoA*进行融合PCR连接,得到完整的打靶片段 $\Delta kfiA::kfoA$ (上游同源臂-*kfoA*-下游同源臂)。通过T4连接酶,将打靶片段 $\Delta kfiA::kfoA$ 与Sma I酶切处理的pCVD442Gm连接,得到打靶质粒pCVD442Gm- $\Delta kfiA::kfoA$ 。将质粒电转化导入*E. coli* DH5 α pir,37 °C孵育1 h后,在含25 μ g/mL庆

大霉素(Gm)的 LB 固体培养基上进行筛选。采用相同的方法构建打靶质粒 pCVD442Gm- $\Delta kfiC::kfoC$,并对构建的质粒进行测序以验证其完整性。

1.3.2 供体菌株的构建

将 *E. coli* β 2155 接种到 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 摇瓶培养,制备电感受态细胞。将打靶质粒 pCVD442Gm- $\Delta kfiA::kfoA$ 电击导入 *E. coli* β 2155,在含有 25 μ g/mL Gm 和 0.5 mmol/L 二氨基庚二酸(DAP)的 LB 固体培养基上培养至单克隆形成,即为用于接合实验的供体菌株。

1.3.3 接合实验

pCVD442Gm 质粒携带的 *sacB* 基因能编码左旋糖酶,这种酶能够在蔗糖存在时杀死大部分革兰氏阴性菌^[20-21]。因此,在含有蔗糖的培养基上进行培养,可筛选去除质粒的重组菌株。供体菌 *E. coli* β 2155/pCVD442Gm- $\Delta kfiA::kfoA$ 接种到 LB 培养基(含 25 μ g/mL 的 Gm 和 0.5 mmol/L DAP)中,37 °C、220 r/min 过夜振荡培养。受体菌 EcN 接种到 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 过夜振荡培养,供体菌和受体菌以 1:1 的体积比混合。将菌液涂布于 LB 固体培养基(25 μ g/mL Gm)上,得到的单克隆菌株接种到 LB 培养基中,涂布在含有 10% 蔗糖的 LB 固体培养基上,30 °C 培养至形成单克隆。使用 *kfiA* 基因的内部引物 *kfiA*-inF、*kfiA*-inR 和外部引物 *kfiA*-outF、*kfiA*-outR 进行菌落 PCR,验证工程型菌株 EcN-*kfoA*。使用相同方法,用 *kfoC* 基因替换 EcN-*kfoA* 中的 *kfiC* 基因,构建工程型菌株 EcN-*kfoAC*。

1.3.4 AsChnAC 的表达与纯化

将实验室保存的 *E. coli* BL21/pET28a(+)-AsChnAC 过夜培养,以 1:100 的体积比转接到 1 000 mL LB 培养基中,在 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.7;在 22 °C、250 r/min 条件下用 0.2 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行过夜诱导表达。以 6 000 r/min 的速度离心 15 min,收集菌体重悬于 30 mL 的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.6, 200 mmol/L NaCl)中。加入 100 μ mol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)后,用超声波裂解细胞,以 12 000g 的速度离心 20 min,收集裂解液,用镍柱进行酶的纯化。

1.3.5 软骨素多糖质量浓度的测定

1) 蒽酮-硫酸法测定多糖质量浓度根据文献

[22]进行。配制含 0.1% 蒽酮和 80% H₂SO₄ 的蒽酮试剂,样品与蒽酮试剂以 1:3 的体积比混合,100 °C 水浴 15 min,冰浴 15 min,读取 620 nm 波长下的吸光度值。

2) 为验证工程型菌株 EcN-*kfoAC* 能否合成分泌软骨素多糖,本研究进行了摇瓶培养实验。分别将 EcN-*kfoAC*、EcN $\Delta kfiA::Kan$ 、*E. coli* K4 $\Delta kfoE$ 菌株接种于 3 mL M9C 培养基中,37 °C 下培养 12 h 后,以 1:100 的比例转接到 50 mL M9C 培养基中,继续振荡培养 20 h,以 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。采用化学酶法测定上清液中的软骨素多糖质量浓度^[23]。将 CS 标准品溶解于 M9C 培养基中,配制成 1 mg/mL 的溶液作为外标;分别取 3 mL CS 溶液、EcN $\Delta kfiA::Kan$ 、*E. coli* K4 $\Delta kfoE$ 和 EcN-*kfoAC* 培养液上清,加入 10 kDa 的 Amicon Ultra-0.5 超滤管,14 000g 离心 20 min;使用 400 μ L Tris-HCl (pH 值 7.0),1 000g 离心 10 min 洗涤 3 次,收集截留液,用 Tris-HCl (pH 值 7.0) 调整最终体积至 300 μ L;将定容后的截留液与 300 μ L 2 mg/mL AsChnAC 混合,37 °C 孵育 12 h,100 °C 煮沸 2 min,离心收集上清;上清液加入 10 kDa Amicon Ultra-0.5 超滤管,14 000g 离心 30 min,回收 AsChnAC 酶解产物中的寡糖,用蒽酮-硫酸法测定软骨素多糖质量浓度。

1.3.6 EcN-*kfoAC* 的分批补料发酵

采用 5 L 的发酵罐(上海百伦生物有限公司)对工程型菌株 EcN-*kfoAC* 进行分批补料发酵^[24]。通过火焰接种将 300 mL 菌体培养物转接到含有 2.2 L 新鲜 M9C 培养基的 5 L 发酵罐中进行 40 h 的发酵,发酵温度保持在 37 °C,搅拌器速度设置为 700 r/min,通过加入 5 mol/L HCl 和 25% 氨水使 pH 值保持在 7.0 左右。当泡沫超过发酵罐数字控制单元反馈回路控制的设定水平时,将消泡剂-204/水(体积分数 10%)溶液(Sigma-Aldrich)添加到发酵液中,在发酵过程中以 5 L/min 的速率向发酵液喷射空气,当溶氧值急剧上升时,进入补料分批生长阶段,以 7 L/min 的速率向发酵液喷射空气,并开始使用进料泵将补料溶液分批添加到发酵罐中;发酵结束后,以 6 000 r/min 的速度离心 15 min 收集上清,并使用化学酶法测定软骨素质量浓度。

1.3.7 软骨素多糖的纯化与鉴定

取 1 L 上清液旋蒸浓缩至 100 mL,加入终浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl,与等体积的酚-氯仿溶

液混合后,进行萃取以去除蛋白质。粗纯多糖溶液与 3 倍体积的无水乙醇混合, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀。离心收集多糖沉淀,用 50 mL Buffer A (50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 醋酸钠)重悬。经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,在 AKTA pure 纯化仪上使用 DEAE-Sepharose FF 层析柱进行纯化。粗糖溶液上柱流速为 1 mL/min;用 5 CV Buffer A 洗杂质,流速为 2 mL/min;用 5 CV Buffer B (1 mol/L NaCl, 20 mmol/L 醋酸钠)从 0~100% 进行线性梯度洗脱,流速为 2 mL/min。收集多糖样品,合并后用去离子水进行透析并冷冻干燥。取 2 mg 样品冷冻干燥后,溶解于 $400\text{ }\mu\text{L}$ D_2O 中,进行 ^1H NMR 分析。

2 结果与分析

2.1 质粒的构建结果分析

扩增 *kfiA* 的上游、下游同源臂以及 *kfoA* 后,进行融合 PCR 得到打靶片段 $\Delta kfiA::kfoA$,其电泳图如图 1a 所示。从图 1a 可以看出,泳道 1 在 2 000 bp 处出现明显条带,与预期大小(2 420 bp)相符。纯化后的打靶片段通过酶切酶连接到 pCVD442 上,形成了打靶质粒 pCVD442Gm- $\Delta kfiA::kfoA$ 。

同样地,扩增 *kfiC* 的上游、下游同源臂以及 *kfoC* 后,进行融合 PCR 得到打靶片段 $\Delta kfiC::kfoC$,其电泳图如图 1b 所示。从图 1b 可以看出,泳道 1 在 3 000 bp 处呈现明显条带,与预期大小(3 569 bp)相符。纯化后的打靶片段通过酶切酶连接到 pCVD442 上,形成了打靶质粒 pCVD442Gm- $\Delta kfiC::kfoC$ 。最后,通过 DNA 测序验证重组质粒序列的准确性。

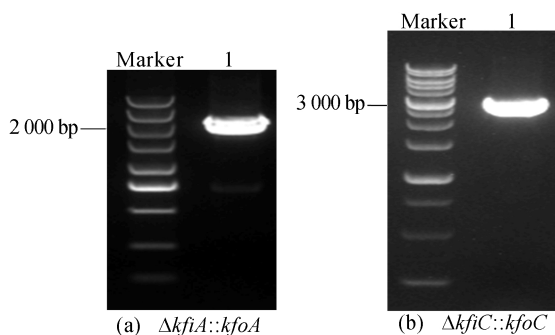


图 1 打靶片段的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 工程型菌株 EcN-*kfoAC* 的构建结果分析

将供体菌与受体菌接合后,使用 *kfiA* 基因内部引物 *kfiA*-inF 和 *kfiA*-inR 对单克隆进行

PCR 验证,结果如图 2a 所示。由图 2a 可知,泳道 1 所显示的 *kfiA* 基因成功被替换。

使用 *kfiA* 基因外部引物 *kfiA*-outF 和 *kfiA*-outR 对同一单克隆菌落进行二次 PCR 验证,验证结果如图 2b 所示,可以看出,条带大小与理论扩增大小(2 652 bp)相符。对 PCR 扩增产物进行测序验证,结果显示 *kfiA* 已被 *kfoA* 基因替代,标记为 EcN-*kfoA*。

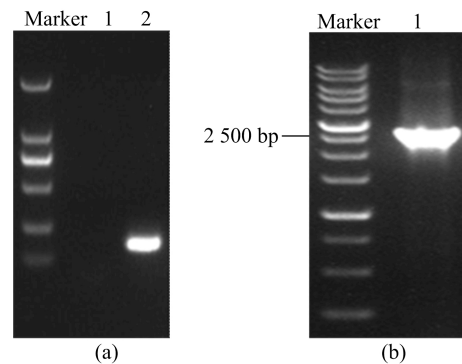


图 2 *kfiA* 基因敲除过程中的琼脂糖凝胶电泳图

以 EcN-*kfoA* 为出发菌株,使用相同的方法将 *kfoC* 基因转入 EcN-*kfoA* 并敲除 *kfiC* 基因,获得工程型菌株,标记为 EcN-*kfoAC*。使用 EcN-*kfoAC* 菌株中的 *kfoA* 上下游引物 *kfoA*-yanF 和 *kfoA*-yanR 以及 *kfoC* 上下游引物 *kfoC*-yanF 和 *kfoC*-yanR 进行菌落 PCR 检测验证,结果如图 3 所示。

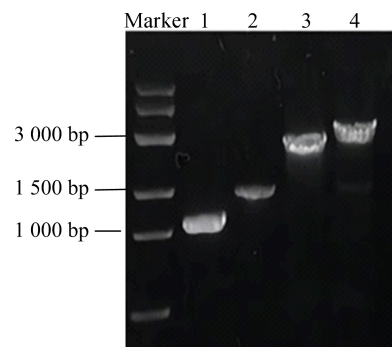


图 3 PCR 验证 EcN-*kfoAC* 的琼脂糖凝胶电泳图

从图 3 可以看出:泳道 1 为使用 *kfoA*-yanF 和 *kfoA*-yanR 验证 EcN 野生型菌株中 *kfiA* 的结果,条带大小与理论大小(1 150 bp)相符;泳道 2 为使用 *kfoA*-yanF 和 *kfoA*-yanR 验证 EcN-*kfoAC* 菌株中 *kfoA* 的结果,条带大小与理论大小(1 453 bp)相符,说明 *kfiA* 基因已经被替换为 *kfoA*;泳道 3 为使用 *kfoC*-yanF 和 *kfoC*-yanR

验证 EcN 野生株中 *kfiC* 的结果,条带大小与理论大小(2 765 bp)相符;泳道 4 为使用 *kfoC*-*yanF* 和 *kfoC*-*yanR* 验证 EcN-*kfoAC* 菌株中 *kfoC* 的结果,条带大小与理论大小(3 263 bp)相符,说明 *kfiC* 基因已经被替换为 *kfoC*。对此工程型菌株进行测序,结果显示重组菌株构建成功。

2.3 软骨素多糖质量浓度测定与¹H NMR 分析

为了确定培养液中软骨素多糖的质量浓度,菌株 EcN-*kfoAC* 经摇瓶培养后,采用 10 kDa 的 Amicon Ultra-0.5 超滤管去除小分子,用软骨素裂解酶 AsChnAC 进行酶切,收集寡糖并采用蒽酮-硫酸法测定其质量浓度,结果如图 4 所示。由图 4 可知:EcNΔ*kfiA*::Kan 因 *kfiA* 基因敲除而无法合成多糖;E. coli K4Δ*kfoE* 菌株在 *kfoE* 基因敲除后能合成软骨素多糖,产量为 30 mg/L; EcN-*kfoAC* 菌液上清液中的软骨素多糖产量为 21 mg/L。E. coli K4Δ*kfoE* 与 EcN-*kfoAC* 的摇瓶培养液中的多糖产量相似,证明了 EcN-*kfoAC* 能够合成并分泌软骨素多糖到培养基中。

在 5 L 的发酵罐中对 EcN-*kfoAC* 进行发酵,离心去除菌体,收集上清液,使用化学酶法测得 EcN-*kfoAC* 发酵液中的软骨素多糖产量为 650 mg/L,如图 5 所示。

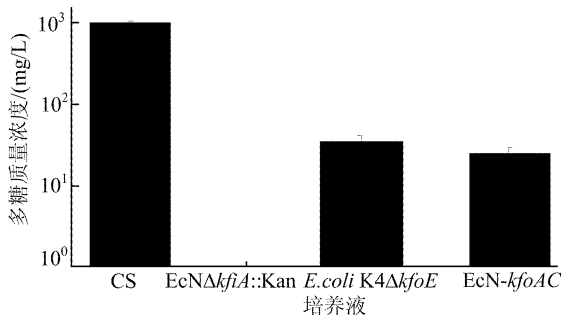


图 4 摇瓶培养液中软骨素多糖的质量浓度

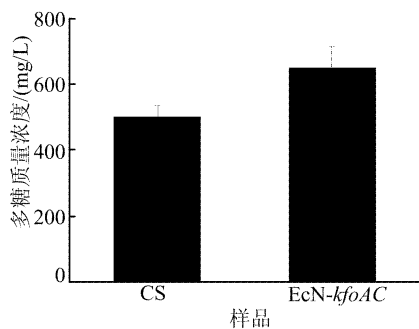


图 5 EcN-*kfoAC* 发酵液上清中软骨素多糖的质量浓度

发酵液上清经初步纯化后,将 DEAE Sepharose FF 层析柱连接到 AkTA-prime 蛋白纯化仪上进一步纯化。色谱分离洗脱曲线如图 6 所示,

可以看出,多糖洗脱峰对应的 BufferB 体积分数在 50%~75%之间。

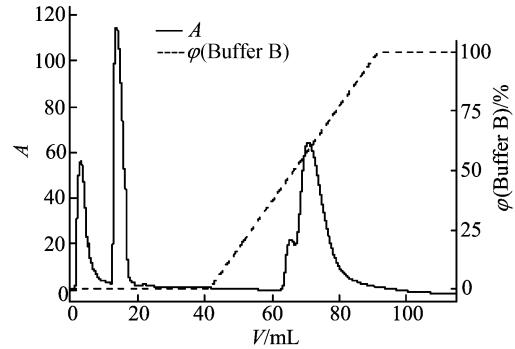


图 6 纯化软骨素时吸光度值和洗脱液曲线

收集洗脱峰样品,透析除盐,冷冻干燥,并进行核磁共振氢谱分析,结果如图 7 所示。

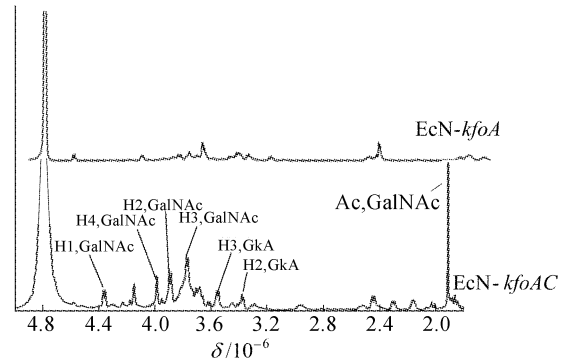


图 7 EcN-*kfoA*, EcN-*kfoAC* 荚膜多糖的¹H NMR 谱图

从图 7 可以看出, EcN-*kfoA* 无法表达 *kfoC* 基因编码的软骨素合成酶,无法合成软骨素,没有出现 GlcNAc 的氮乙酰甲基 H 原子($\delta=1.97 \times 10^{-6}$)特征峰。菌株 EcN-*kfoAC* 多糖样品出现了如下¹H NMR 特征峰,即 GlcA 的 H1 原子($\delta=4.37 \times 10^{-6}$)、GlcA 的 H2 原子($\delta=3.38 \times 10^{-6}$)、GlcA 的 H3 原子($\delta=3.56 \times 10^{-6}$)、GalNAc 的 H1、H2、H3 和 H4 原子(δ 为 $3.78 \times 10^{-6} \sim 4.15 \times 10^{-6}$)和 GlcNAc 的氮乙酰甲基 H 原子($\delta=1.97 \times 10^{-6}$)。这些信号峰说明 EcN-*kfoAC* 菌株合成了软骨素多糖。

3 讨 论

CS 在治疗风湿病、骨质疏松症、关节炎等疾病方面具有重要作用^[25]。目前,国内外使用微生物法制备软骨素主要依赖于大肠杆菌 K4,但这种方法需要去除果糖分支,而且大肠杆菌 K4 是致病菌,可能导致感染^[26]。相比之下, EcN 是一种广泛认可的不含任何已知毒素益生菌,为制备

软骨素提供了一种安全的方法。

本研究以 EcN 为出发菌株,引入供体菌 *E. coli*β2155,通过自杀质粒 pCVD442Gm 将 K4 CPS 生物合成途径中的 2 个必需基因 *kfoA* 和 *kfoC* 插入替换 EcN 上的 *kfiA* 和 *kfiC* 基因片段,同时实现了 *kfoA* 和 *kfoC* 的转入以及 *kfiA* 和 *kfiC* 的敲除,从而构建了工程型菌株 EcN-*kfoAC*。摇瓶培养条件下,化学酶法测得 EcN-*kfoA*、EcN-*kfoAC* 的软骨素多糖产量较低。研究表明,软骨素的高效大规模合成依赖于高细胞密度培养,同时还受到氧供应和碳源补给的影响^[27]。为此,本研究采用 5 L 发酵罐进行补料分批发酵,通过持续供氧与碳源补加实现高密度培养,最终使软骨素多糖产量较摇瓶提升约 30 倍。

作为阴性对照的 EcNΔ*kfiA*:Kan 菌株,因敲除了多糖合成关键基因 *kfiA* 而无法合成多糖,在化学酶法测定中,620 nm 波长处未出现特征性光吸收。经 DEAE 离子交换层析纯化后,对 EcN-*kfoA*、EcN-*kfoAC* 菌株合成的软骨素多糖进行¹H NMR 分析,氢谱特征峰进一步证实了该菌株合成了软骨素多糖。相比之下,仅携带 *kfoA* 而缺失 *kfoC* 的 EcN-*kfoA* 菌株无法合成软骨素,其¹H NMR 谱图中未检测到相应特征峰。

通过对发酵所得软骨素进行硫酸化修饰,可以制备硫酸软骨素。相较于其他生产工艺,这种方法具有较大的经济效益和开发潜力,拥有广阔的应用前景。另外,EcN 菌株有利于维持肠道健康状态^[15],因此,作为 EcN 衍生菌株,EcN-*kfoAC* 可以作为潜在的食品添加剂,除了给予受体更多的防护外,还能够给受体补充软骨素,促进受体维持更健康的肠道微生态环境。

参 考 文 献

- [1] SCHIRALDI C, CIMINI D, DE ROSA M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1209-1220.
- [2] VOLPI N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule [J]. Inflammopharmacology, 2011, 19(6): 299-306.
- [3] VOLPI N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 96(12): 3168-3180.
- [4] 唐东洋,虞菊萍,陈荣,等.合成生物学技术在糖胺聚糖生产中的应用[J].药学进展,2015,39(5):376-383.
- [5] NINOMIYA T, SUGIURA N, TAWADA A, et al. Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(24): 21567-21575.
- [6] CIMINI D, DE ROSA M, CARLINO E, et al. Homologous overexpression of *rfaH* in *E. coli* K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 46.
- [7] CIMINI D, FANTACCIONE S, VOLPE F, et al. IS2-mediated overexpression of *kfoC* in *E. coli* K4 increases chondroitin-like capsular polysaccharide production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3955-3964.
- [8] CIMINI D, RESTAINO O F, CATAPANO A, et al. Production of capsular polysaccharide from *Escherichia coli* K4 for biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(6): 1779-1787.
- [9] WHITFIELD C, ROBERTS I S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli* [J]. Molecular Microbiology, 2002, 31(5): 1307-1319.
- [10] BRONNER D, SIEBERTH V, PAZZANI C, et al. Expression of the capsular K5 polysaccharide of *Escherichia coli*: biochemical and electron microscopic analyses of mutants with defects in region 1 of the K5 gene cluster[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(18): 5984-5992.
- [11] RODRIGUEZ M L, JANN B, JANN K. Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5: K4: H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone [J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 177(1): 117-124.
- [12] ZHU H M, SUN B, LI Y J, et al. KfoA, the UDP-glucose-4-epimerase of *Escherichia coli* strain O5: K4: H4, shows preference for acetylated substrates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 751-761.
- [13] SOBHANY M, KAKUTA Y, SUGIURA N, et al. The chondroitin polymerase K4CP and the molecular mechanism of selective bindings of donor substrates to two active sites[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(47): 32328-32333.
- [14] LIU J, YANG A, LIU J, et al. KfoE encodes a fructosyltransferase involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* K4 [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(7): 1469-1477.
- [15] ZHAO Z, XU S, ZHANG W, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for inflammatory bowel disease applications[J]. Food & Function, 2022, 13(11): 5914-5924.
- [16] ARRIBAS B, RODRÍGUEZ-CABEZAS M E, CAMUESCO D, et al. A probiotic strain of *Escherichia coli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice[J]. British Journal of Pharmacology, 2009, 157(6): 1024-1033.
- [17] PETIT C, RIGG G P, PAZZANI C, et al. Region 2 of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster encoding proteins for the biosynthesis of the K5 polysaccharide[J]. Molecular Microbiology, 2004, 17(4): 611-620.

- 学进展,2012,42(5):634-643.
- [5] 杨建荣. 车桥耦合作用下公路桥梁局部振动研究[D]. 上海:同济大学,2008.
- [6] 李小珍,张黎明,张洁. 公路桥梁与车辆耦合振动研究现状与发展趋势[J]. 工程力学,2008,25(3):230-240.
- [7] YANG Y B, LIN C W. Vehicle-bridge interaction dynamics and potential applications[J]. Journal of Sound & Vibration, 2007, 284(1/2):205-226.
- [8] KIM C W, KAWATANI M, KIM K B. Three-dimensional dynamic analysis for bridge-vehicle interaction with roadway roughness[J]. Computers & Structures, 2005, 83(19/20):1627-1645.
- [9] 常志权,罗虹,褚志刚,等. 谐波叠加路面输入模型的建立及数字模拟[J]. 重庆大学学报(自然科学版),2004,27(12):5-8.
- [10] 韩万水,马麟,院素净,等. 路面粗糙度非一致激励对车桥耦合振动系统响应影响分析[J]. 土木工程学报,2011,44(10):81-90.
- [11] OLIVA J, GOICOLEA J M, ANTOLÍN P, et al. Relevance of a complete road surface description in vehicle-bridge interaction dynamics[J]. Engineering Structures, 2013, 56:466-476.
- [12] CHU K H, DHAR C L, GARG V K. Railway-bridge impact; simplified train and bridge model[J]. Journal of the Structural Division, 1979, 105(9):1823-1844.
- [13] 邓露,段林利,何维,等. 用于我国车桥耦合振动研究的车桥动力分析模型[J]. 中国公路学报,2018,31(7):92-100.
- [14] 邓露,凌天洋,何维,等. 用于公路车桥系统振动分析的精细化轮胎模型[J]. 中国公路学报,2022,35(4):108-116.
- [15] 李小珍,强士中,沈锐. 利高速列车大跨度钢斜拉桥空间耦合振动响应研究[J]. 桥梁建设,1998(4):65-68.
- [16] 李小珍,王应良,强士中. 大跨度连续拱桁组合钢桥空间振动分析[J]. 振动与冲击,1999,18(4):35-39.
- [17] 李小珍,喻璐,强士中. 不同主梁竖曲线下大跨度斜拉桥的车桥耦合振动分析[J]. 振动与冲击,2003,22(2):43-46.
- [18] CAI C S, SHI X M, ARAUJO M, et al. Effect of approach span condition on vehicle-induced dynamic response of slab-on-girder road bridges[J]. Engineering Structures, 2007, 29(12):3210-3226.
- [19] 何维. 中小跨径梁桥动力冲击系数研究[D]. 长沙:湖南大学,2015.
- [20] LAW S S, ZHU X Q. Bridge dynamic responses due to road surface roughness and braking of vehicle[J]. Journal of Sound & Vibration, 2005, 282(3/4/5):805-830.
- [21] 陈卓. 基于 ANSYS 二次开发的车桥动力响应方法研究[J]. 铁路计算机应用,2007(6):8-10.
- [22] 李帅. 鄱阳湖二桥结构动力特性及车致振动响应分析[D]. 南昌:华东交通大学,2020.
- [23] 张楠,夏禾. 基于全过程迭代的车桥耦合动力系统分析方法[J]. 中国铁道科学,2013,34(5):32-38.

(责任编辑 吴亮)

(上接第 377 页)

- [18] ROMAN E, ROBERTS I, LIDHOLT K, et al. Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* results in decreased biosynthesis of K5 polysaccharide[J]. Biochemical Journal, 2003, 374:767-772.
- [19] GUO L B, ZHU C Y, WU Y B, et al. A novel chondroitin AC lyase from *Pedobacter xixiisoli*: cloning, expression, characterization and the application in the preparation of oligosaccharides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 146:109765.
- [20] DONNENBERG M S, KAPER J B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(12):4310-4317.
- [21] 李文静,杨桂霞,周贤轩,等. 改造细菌基因组的双重选择系统的构建[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2022,45(12):1699-1704.
- [22] YU Y, YE H, WU D, et al. Chemoenzymatic quantification for monitoring unpurified polysaccharide in rich medium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(18):7635-7645.
- [23] 陈婷婷,李文静,杨桂霞,等. 化学酶法对硫酸软骨素类多糖的定量分析[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2023, 46(7):991-996.
- [24] WANG Z Y, LY M, ZHANG F M, et al. *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(6):964-973.
- [25] RAINSFORD K D. Importance of pharmaceutical composition and evidence from clinical trials and pharmacological studies in determining effectiveness of chondroitin sulphate and other glycosaminoglycans; a critique[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61(10):1263-1270.
- [26] ARREDONDO-ALONSO S, BLUNDELL-HUNTER G, FU Z, et al. Evolutionary and functional history of the *Escherichia coli* K1 capsule[J]. Nature Communications, 2023, 14(1):32328-32333.
- [27] YU Y, GONG B, WANG H, et al. Chromosome evolution of *Escherichia coli* Nissle 1917 for high-level production of heparosan[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023, 120(4):1081-1096.

(责任编辑 闫杏丽)