

· 合成生物技术 ·

## 基于工程化毕赤酵母一锅法合成硫酸软骨素 A

盛靖雨<sup>1,3</sup>, 金学荣<sup>1,3</sup>, 胥睿睿<sup>1,3</sup>, 王阳<sup>1,2,3</sup>, 康振<sup>1,2,3</sup>

1 江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 未来食品中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

盛靖雨, 金学荣, 胥睿睿, 王阳, 康振. 基于工程化毕赤酵母一锅法合成硫酸软骨素 A. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2594-2605.

SHENG JY, JIN XR, XU RR, WANG Y, KANG Z. One-pot synthesis of chondroitin sulfate A by engineered *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2594-2605.

**摘要:** 硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 是一种线性多糖, 广泛应用于医疗和保健等领域。相比于传统动物组织提取法, 微生物合成硫酸软骨素具有可控、易规模化放大等优势。为实现硫酸软骨素 A (CSA) 的高效合成, 本研究首先通过整合软骨素合酶编码基因 *kfoC*、*kfoA* 以及 UDP-葡萄糖脱氢酶编码基因 *tuaD* 至毕赤酵母 GS115 基因组中, 构建了以甘油为唯一碳源发酵生产软骨素的毕赤酵母工程菌株。通过进一步优化软骨素合成途径, 软骨素分批补料发酵水平达到 2.6 g/L。在进一步整合表达软骨素-4-O-磺基转移酶的基础上, 本研究通过向生产软骨素毕赤酵母工程菌株破碎液中添加 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸和软骨素-4-O-磺基转移酶, 成功建立了 CSA 的一锅法生物合成体系。通过优化, 最终实现 0-40% 不同磺酸化水平 CSA 的可控合成。本研究中 CSA 的一锅法生物合成体系操作简便、易放大, 更适用于工业化大规模生产。本研究结果也为肝素等其他糖胺聚糖的合成提供了思路。

**关键词:** 软骨素; 硫酸软骨素 A; 一锅法; 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸; 毕赤酵母; 生物合成体系

Received: February 28, 2022; Accepted: April 28, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103100); Jiangsu Province Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (BK20200025); Key Technologies Research and Development Program of Jiangsu Province, China (BE2019630)

Corresponding author: KANG Zhen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2103100); 江苏省杰出青年基金项目 (BK20200025); 江苏省科技支撑项目 (BE2019630)

# One-pot synthesis of chondroitin sulfate A by engineered *Pichia pastoris*

SHENG Jingyu<sup>1,3</sup>, JIN Xuerong<sup>1,3</sup>, XU Ruirui<sup>1,3</sup>, WANG Yang<sup>1,2,3</sup>, KANG Zhen<sup>1,2,3</sup>

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Chondroitin sulfate (CS) is a linear polysaccharide, which is widely used in medical, health care and other fields. Compared with the traditional animal tissue extraction method, microbial synthesis of CS has the advantages of controllability and easiness of scaling-up. In order to achieve an efficient synthesis of chondroitin sulfate A (CSA), we constructed a recombinant *Pichia pastoris* GS115 strain capable of synthesizing chondroitin (Ch) from glycerol by introducing the Ch synthase coding genes *kfoC*, *kfoA* and UDP-glucose dehydrogenase coding gene *tuaD* into the *P. pastoris* chromosome. The titer of Ch reached 2.6 g/L in fed-batch cultures upon optimizing the synthesis pathway of Ch. After further expressing the chondroitin-4-O-sulfotransferase (C4ST), we developed a one-pot biosynthesis system for CSA production by directly adding 3'-adenosine-5'-phosphoryl sulfate and C4ST into the high-pressure homogenized recombinant *P. pastoris* cells. Eventually, controllable synthesis of 0–40% CSA with different sulfation degrees were achieved by optimizing the catalytic conditions. The one-pot biosynthesis system constructed here is easy to operate and easy to scale up for industrial production of CSA. The idea of the present study may also facilitate the biosynthesis of other glycosaminoglycan, for instance, heparin.

**Keywords:** chondroitin; chondroitin sulfate A; one-pot; 3'-adenosine-5'-phosphoryl sulfate; *Pichia pastoris*; biosynthetic system

硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 是一种重要的糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG)<sup>[1]</sup>, 由二糖序列葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA) 和 N-乙酰氨基半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 交替组成。不同的 CS 磺基转移酶将磺基转移到二糖单元的不同羟基上, 从而形成不同的 CS 构型, 如 CSA、CSC、CSD 和 CSE<sup>[2-3]</sup>。基于 CS 的不同链长和磺化方式而产生其组织结构和功能的多样性。

CS 不仅可以通过刺激软骨细胞再生来治疗骨关节炎, 还可以与透明质酸钠组合制备可注射溶液用于白内障手术<sup>[4]</sup>。这些都对 CS 的生产提出了更高的安全性要求。目前, 商品化 CS 主要通过动物组织提取法和化学合成法获得。其中, 动物组织提取法是指从牛、猪、鸡、鲨鱼等动物软骨中提取, 此方法获得的 CS 不仅后续操作烦琐, 还可能引发免疫反应<sup>[5]</sup>; 化学合成法是指使用多种化学试剂来合成 CS, 这种

方法步骤多、污染大、成本高、安全性差。因此生物合成 CSA 更具有大规模生产的优势<sup>[6]</sup>。

如图 1 所示, 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中合成硫酸软骨素 A (chondroitin sulfate A, CSA) 需要引入 4 个外源基因 *kfoC*、*kfoA*、*tuaD* 和 *c4st*。由 *kfoC*、*kfoA* 和 *tuaD* 基因编码的酶用以合成前体物质软骨素 (chondroitin, Ch), 随后在软骨素-4-O-磺基转移酶 (chondroitin-4-O-sulfotransferase, C4ST) 的催化下发生磺酸转移反应而合成 CSA。

目前已有微生物-酶两步法与微生物一步法合成 CSA 的相关报道。微生物-酶两步法合成<sup>[7-8]</sup>是首先在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中引入软骨素合成途径, 并通过部分基因表达水平的上调实现了软骨素的高效合成, 随后在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中实现芳香基磺基转移酶 (aryl sulfotransferase, ASST IV) 的可溶性表达; ASST IV 可以在一定条件下将对硝基硫酸苯酯 (p-nitrosulfate, PNPS) 的磺基基团转移到 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸 (3'-

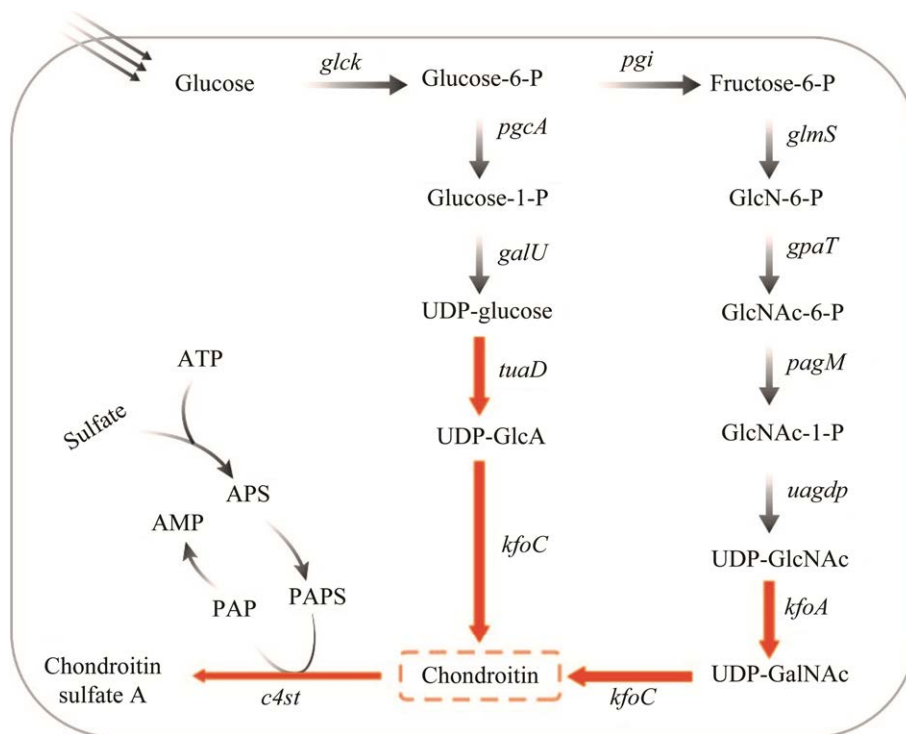


图 1 毕赤酵母中硫酸软骨素 A 生物合成途径 *kfoC*: 软骨素聚合酶; *kfoA*: UDP-氨基葡萄糖异构酶; *tuaD*: UDP-葡萄糖脱氢酶; *c4st*: 软骨素-4-O-磺基转移酶; *pgi*: 葡萄糖-6-磷酸异构酶; *glmS*: 氨基转移酶; *gpaT*: 乙酰转移酶; *pagM*: 乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶; *uagdp*: UDP-N-乙酰半乳糖胺二磷酸化酶; *pgcA*: 葡萄糖磷酸变位酶; *galU*: 葡萄糖-1-磷酸尿苷酸转移酶

Figure 1 Biosynthetic pathway of chondroitin sulfate A in *P. pastoris*. *kfoC*: chondroitin polymerase; *kfoA*: UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase; *tuaD*: UDP-glucose dehydrogenase; *c4st*: chondroitin-4-O-sulfotransferase; *pgi*: glucose-6-phosphate isomerase; *glmS*: L-glutamine-D-fructose-6-phosphate aminotransferase; *gpaT*: glucosamine-phosphate N-acetyltransferase; *pagM*: phosphoacetylglucosamine mutase; *uagdp*: UDP-N-acetylgalactosamine diphosphorylase; *pgcA*: phosphoglucomutase; *galU*: glucose-1-phosphate uridylyltransferase.

adenosine phosphate-5'-phosphate, PAP) 上而合成 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS), 接着以 *P. pastoris* 为宿主表达 C4ST, 最后构建了一套通过添加软骨素、C4ST、ASST IV、PAP 和 PNPS 合成 CSA 的磺基转移体系。该方法由于底物价格昂贵且副产物对硝基苯酚 (p-nitrophenol, PNP) 具有毒性, 因此不适合用于工业生产和食品、药品添加。微生物一步法合成<sup>[9]</sup>是代谢改造毕赤酵母, 利用诱导型启动子实现硫酸软骨素的从头合成, 但目前此种方法存在产量低 (2.1 g/L) 和磺酸化水平低 (4%) 等缺点, 且额外添加的诱导剂甲醇对生产和应用都会造成隐患。因此构建绿色和磺酸化水平可控的 CSA 生物合成体系十分重要。

本研究构建了无需甲醇诱导的工程化毕赤酵母菌株用以生产软骨素, 避免了甲醇污染; 在此基础上, 利用途径优化, 进一步提高软骨素的合成水平。其次, 通过构建体外磺酸化修饰体系, 毕赤酵母破壁后直接添加 C4ST 和磺酸供体 PAPS, 能够实现不同磺酸化水平 CSA 的高效合成。因此, 本研究通过工程化毕赤酵母合成软骨素, 并在体外构建磺酸化修饰体系, 实现一锅法可控、高效合成 CSA, 对硫酸软骨素 A 的产业化发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

所有质粒均在 *E. coli* JM109 菌株中构建, *P. pastoris* GS115 为软骨素合成菌株。*P. pastoris* GS115 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) S288C 基因组被用以扩增目的基因, 所有菌株均由本实验室保存。本实验所涉及的质粒及菌株均列于表 1。

### 1.2 培养基

LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母

粉, 10 g/L NaCl; YPD 培养基: 10 g/L 酵母粉, 20 g/L 胰蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖; 改良型 BMGY 培养基: 10 g/L 酵母粉, 20 g/L 胰蛋白胨, 40 g/L 甘油, 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 13.4 g/L YNB,  $4 \times 10^{-4}$  g/L 生物素; 发酵培养基 BSM: 40 g/L 甘油, 18 g/L  $K_2SO_4$ , 4.13 g/L KOH, 14.9 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 27 mL/L  $H_3PO_4$ , 0.93 g/L  $CaSO_4$ , 4.4 mL/L PTM1; PTM1: 6 g/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.09 g/L KI, 3 g/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.02 g/L  $H_3BO_3$ , 0.2 g/L  $MoNa_2O_4 \cdot 2H_2O$ , 0.92 g/L  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 20 g/L  $ZnCl_2$ , 65 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g/L 生物素, 5.0 mL  $H_2SO_4$ 。

### 1.3 重组质粒的构建

质粒 pGAPZB-*kfoC*-T2A-*kfoA*-T2A2-*tuaD* 和 pPIC3.5KHy-*c4st* 为本实验室保存。利用融合 PCR 将 *c4st* 基因序列整合到 pGAPZB-*kfoC*-T2A-*kfoA*-T2A2-*tuaD* 质粒中。引入在质粒中起连接作用的短肽 P2A, 构建质粒 pGAPZB-*c4st*-P2A-*kfoC*-T2A-*kfoA*-T2A2-*tuaD*。

病毒来源的 2A 肽序列的工作原理: 在真核生物中模拟“多顺反子”的翻译方式, 将多个基因串联形成一个表达框, 翻译得到的多基因融合产物再进行自切割, 从而得到多个独立的蛋白。T2A 系列短肽序列为 EGRGSLLTCDVESNPGP, P2A 系列短肽序列为 ATNFSLLKQAGDVEENPGP。

扩增 pGAPZB 质粒的  $P_{GAP}$  启动子替换 pAO815 质粒的  $P_{AOX1}$  启动子, 构建组成型质粒 pGAP815 作为基因表达载体。*glmS*、*gpaT*、*pagM*、*galU* 和 *tuaD* 基因分别通过 T2A6 和 T2A8 短肽段连接至载体 pGAP815 上, 基因 *pglmS*、*pgpaT*、*ppagM* 和 *pgalU* 从毕赤酵母基因组中扩增得到, *sglmS*、*sgpaT*、*spagM* 和 *sgalU* 从酿酒酵母菌株基因组中扩增得到, *tuaD* 从质粒 pGAPZB-*kfoC*-T2A-*kfoA*-T2A2-*tuaD* 中扩增得到。所有质粒均通过一步克隆方法构建。

表 1 本文所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Sources
<b>Plasmids</b>		
pAO815	<i>P. pastoris</i> expression vector, AOX1 promoter, Amp <sup>r</sup>	Lab stock
pPIC3.5KHy	<i>P. pastoris</i> expression vector, AOX1 promoter, Hyg <sup>r</sup>	Lab stock
pGAPZB	<i>P. pastoris</i> expression vector, GAP promoter, Zeo <sup>r</sup>	Lab stock
pPIC3.5KHy- <i>c4st</i>	pPIC3.5KHy plasmid carrying the <i>c4st</i> gene	Lab stock
pGAPZB- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i>	<i>P. pastoris</i> expression vector, carrying the <i>kfoC</i> , <i>kfoA</i> and <i>tuaD</i> gene which were connected by T2A and T2A2 peptides	Lab stock
pGAPZB- <i>c4st</i> -P2A- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i>	<i>c4st</i> gene from pPIC3.5KHy- <i>c4st</i> cloned into pGAPZB- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i> plasmid	This work
pGAP815	<i>P. pastoris</i> expression vector, GAP promoter, Amp <sup>r</sup>	This work
pGAP815- <i>ppagM</i>	<i>ppagM</i> gene from <i>P. pastoris</i> GS115 cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>pglmS</i>	<i>pglmS</i> gene from <i>P. pastoris</i> GS115 cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>pgpaT</i>	<i>pgpaT</i> gene from <i>P. pastoris</i> GS115 cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>pgalU</i>	<i>pgalU</i> gene from <i>P. pastoris</i> GS115 cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>spagM</i>	<i>spagM</i> gene from <i>S. cerevisiae</i> S288C cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>tuaD</i>	<i>tuaD</i> gene from pGAPZB- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i> cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>sglmS</i>	<i>sglmS</i> gene from <i>S. cerevisiae</i> S288C cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>sgpaT</i>	<i>sgpaT</i> gene from <i>S. cerevisiae</i> S288C cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>sgalU</i>	<i>sgalU</i> gene from <i>S. cerevisiae</i> S288C cloned into pGAP815 plasmid	This work
pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>sglmS</i>	<i>sglmS</i> linked to pGAP815- <i>pgalU</i> with T2A8 peptide	This work
pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i>	<i>spagM</i> linked to pGAP815- <i>pgalU</i> with T2A8 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i>	<i>sglmS</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> with T2A8 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>spagM</i>	<i>spagM</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> with T2A8 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>pgpaT</i>	<i>pgpaT</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> with T2A8 peptide	This work
pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i> -T2A6- <i>sglmS</i>	<i>sglmS</i> linked to pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i> with T2A6 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A6- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i>	<i>tuaD</i> linked to pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i> with T2A6 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>spagM</i>	<i>spagM</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> with T2A6 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>pgalU</i>	<i>pgalU</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> with T2A6 peptide	This work
pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>pgpaT</i>	<i>pgpaT</i> linked to pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> with T2A6 peptide	This work
<b>Strains</b>		
Pp00	<i>P. pastoris</i> harboring pGAPZB- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i>	This work
PpC00	<i>P. pastoris</i> harboring pGAPZB- <i>c4st</i> -P2A- <i>kfoC</i> -T2A- <i>kfoA</i> -T2A2- <i>tuaD</i>	This work
Pp00- <i>pgalU</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>pgalU</i>	This work
Pp00- <i>sgalU</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>sgalU</i>	This work
Pp00- <i>pgpaT</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>pgpaT</i>	This work
Pp00- <i>sgpaT</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>sgpaT</i>	This work
Pp00- <i>pglmS</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>pglmS</i>	This work
Pp00- <i>sglmS</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>sglmS</i>	This work
Pp00- <i>ppagM</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>ppagM</i>	This work
Pp00- <i>spagM</i>	Pp00 harboring pGAP815- <i>spagM</i>	This work
Pp00-DT	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>pgpaT</i>	This work
Pp00-DM	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>spagM</i>	This work
Pp00-DS	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i>	This work
Pp00-UM	Pp00 harboring pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i>	This work
Pp00-US	Pp00 harboring pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>sglmS</i>	This work
Pp00-DST	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>pgpaT</i>	This work
Pp00-DSU	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>pgalU</i>	This work
Pp00-DSM	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>spagM</i>	This work
Pp00-DUM	Pp00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A6- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i>	This work
Pp00-UMS	Pp00 harboring pGAP815- <i>pgalU</i> -T2A8- <i>spagM</i> -T2A6- <i>sglmS</i>	This work
PpC00-DSM	PpC00 harboring pGAP815- <i>tuaD</i> -T2A8- <i>sglmS</i> -T2A6- <i>spagM</i>	This work

## 1.4 菌株的发酵条件

### 1.4.1 摇瓶培养

将-80 °C保藏的毕赤酵母甘油液体在 YPD 平板上划线后置于 30 °C 培养活化 60 h; 挑取单菌落于 YPD 液体培养基中, 于 30 °C、220 r/min 条件培养种子液 16-20 h; 以 10%接种量转接至 500 mL 三角瓶中, 于 30 °C、220 r/min 条件培养菌体浓度  $OD_{600}$  约为 60。

### 1.4.2 3 L 发酵罐分批补料发酵

将活化好的菌株接种在含有 50 mL YPD 培养基的 500 mL 摇瓶中, 置于 30 °C、220 r/min 的摇床中培养 24 h, 菌体浓度  $OD_{600}$  约为 20。按 10%接种量转接 YPD 培养基 100 mL 菌液至含有 900 mL BSM 培养基的 3 L 发酵罐中。

整个发酵过程温度控制在 30 °C, 用氨水控制 pH 为 5.0。为了控制溶解氧在 20%以上, 通风速率和搅拌速率分别设置在 2-5 vvm 和 200-900 r/min 范围内。接种 24 h 后, 以 7 mL/(L·h) 的速度添加 70%的甘油 (含 12 mL/L PTM1)。每 12 h 取样一次, 分析菌体干重和软骨素产量。

## 1.5 方法

### 1.5.1 体外磺酸化修饰

体外磺酸化修饰体系中使用 20 mmol/L Tris-HCl 作为反应缓冲液, pH 为 7.4。首先将毕赤酵母发酵后收集的细胞用缓冲液悬浮, 高压均质器破壁, 离心后的上清液作为催化底物。PAPS 是由 *E. coli* BL21(DE3) 工程菌株 (本实验室保存) 发酵生产的酶 ASAK<sup>S5</sup> 与 ATP 反应合成<sup>[10]</sup>。C4ST 是由本实验室保存毕赤酵母工程菌株发酵后获得的发酵液上清<sup>[8]</sup>。C4ST 酶活表征: 一定浓度内, PNP 随着浓度的增加在 400 nm 处吸光值呈线性增加。C4ST 酶活定义: 在最适反应条件 (37 °C、pH 7.4) 下, 1 min 内催化生成 1  $\mu$ mol PNP 所需要的酶量为一个酶活力单位。

### 1.5.2 软骨素含量测定

将细胞破碎液离心得到上清, 在加入 2.5% NaCl 的细胞破碎液上清中加入 4 倍体积的无水乙醇, 4 °C 放置 12 h。将沉淀物离心, 置于 65 °C 烘箱中充分除去乙醇, 再次重复以上步骤后加入缓冲液溶解。

用硫酸-咪唑法测定软骨素产量<sup>[11]</sup>。测定原理为软骨素中所含葡萄糖醛酸在硫酸作用下生成的糠醛在咪唑溶液中呈红色。在 530 nm 波长处测定吸光度, 通过制作标准曲线计算葡萄糖醛酸浓度, 然后按如下公式换算成软骨素含量: 软骨素含量 (mg/L)=葡萄糖醛酸浓度×稀释倍数×2.067。

### 1.5.3 硫酸软骨素 A 的磺酸化水平测定

将纯化后的样品冻干 (纯化步骤同上述软骨素的纯化方式), 用 pH 为 7.4, 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解。加入制备的硫酸软骨素裂解酶 ABC, 在 37 °C 下孵育 12 h, 使样品中的软骨素和 CSA 完全解聚。采用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 测定磺酸化水平。洗脱液 A 和 B 分别为: 10 mmol/L 乙酸铵和乙腈, 1  $\mu$ L 进样量, 0.2 mL/min 洗脱速度, 0-65%洗脱梯度, 10 min 洗脱时间。在负离子模式下, 测定在 100-600  $m/z$  范围内的总离子浓度。使用购买自英国 Iduron 公司的 Di-4S 和 Di-0S 标准品, 配制 (0、10、50、100、200 mg/L) 不同浓度的 Di-4S 和 Di-0S 在相同条件下检测, 提取 Di-4S ( $m/z$  458.01) 和 Di-0S ( $m/z$  378.02) 离子峰的积分面积与标准样品浓度绘制标准曲线, 通过标准曲线计算磺酸化水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 软骨素合成途径的构建

为了避免甲醇代谢有毒副产物的残留问题<sup>[12]</sup>, 本研究实现了软骨素在毕赤酵母菌株中

的组成型合成。据报道,组成型启动子中的  $P_{GAP}$  启动子更有利于蛋白的表达<sup>[13]</sup>,因此本研究使用  $P_{GAP}$  启动子构建“多顺反子”表达盒<sup>[14]</sup>。在前期研究的基础上<sup>[9]</sup>,将质粒 pGAPZB-*kfoC*-T2A-*kfoA*-T2A2-*tuaD* 通过电转化法整合毕赤酵母基因组,获得重组毕赤酵母菌株 Pp00。菌株 Pp00 摇瓶发酵后的胞内产物经提取纯化后,用硫酸软骨素裂解酶 ABC 完全消化,通过 LC-MS 验证,结果如图 2 所示。可以清晰看到所检测样品的质荷比  $m/z=378.02$ ,这表明重组毕赤酵母菌株能够成功合成软骨素,通过硫酸-咪唑法检测,软骨素含量为 105 mg/L。

## 2.2 软骨素合成途径的优化

本研究尝试过表达软骨素合成途径基因<sup>[15]</sup>来增强 Pp00 菌株生产软骨素的能力。分别扩增来自毕赤酵母和酿酒酵母基因组的 *glmS* (催化氨基转移)、*gpaT* (催化乙酰基转移)、*pagM* (催化 GlcNAc-6-P 转化为 GlcNAc-1-P) 和 *galU* (催化形成 UDP-Glc) 基因,构建到质粒 pGAP815 上,通过电击转化法插入到 Pp00 菌株的基因组

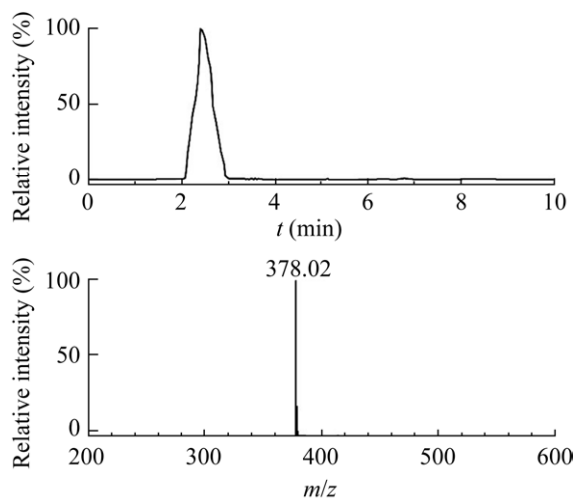


图 2 高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 分析结果

Figure 2 Disaccharides analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS).

中,成功构建 8 株重组毕赤酵母菌株。经摇瓶培养后,检测软骨素含量如图 3 所示。与对照组相比,过表达 *pgalU*、*pgpaT*、*pglmS* 和 *sglmS* 基因能够不同程度地促进软骨素的合成,过表达 *spagM* 和 *ppagM* 基因对促进软骨素合成的效果不佳,这也为后续研究提供思路,即增加 Pp00 菌株的代谢中间产物 UDP-glucose、GlcN-6-P、GlcNAc-6-P 和 GlcNAc-1-P 的合成通量。而当过表达酿酒酵母来源的 *sgalU* 和 *sgpaT* 基因后,软骨素产量下降较大,这与过表达毕赤酵母内源的 *pgalU* 和 *pgpaT* 基因的结果完全相反。分析原因可能是外源基因的引入抑制了毕赤酵母本身乙酰转移酶和葡萄糖-1-磷酸尿苷酸转移酶的表达活性,而导致软骨素产量降低。最终,在单独过表达毕赤酵母内源 *pgalU* 基因后,获得了一株软骨素产量为 170 mg/L 的毕赤酵母重组菌株 Pp00-*pgalU*。

为了获得更高的软骨素产量,本研究继续进行代谢途径的双基因组合强化。根据之前的报道,UDP-葡萄糖脱氢酶基因 *tuaD* 是影响软骨素产量的关键因素之一<sup>[16]</sup>。因此,先分别将 *pgalU* 和 *tuaD* 基因整合到质粒 pGAP815 上,构建质粒 pGAP815-*pgalU* 和 pGAP815-*tuaD*。

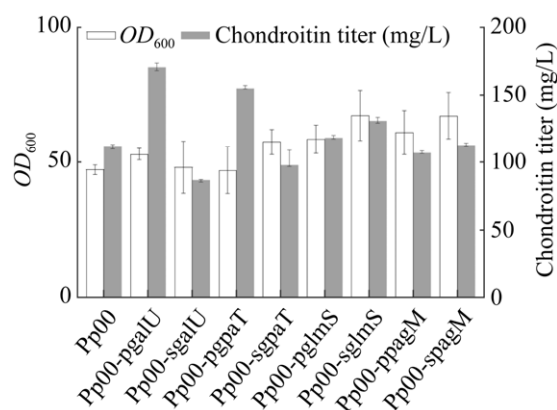


图 3 工程菌株的生长情况及软骨素产量

Figure 3 Growth and chondroitin titers of recombinant strains.

再使用一步克隆的方法, 将 *sglmS*、*spagM* 和 *pgpaT* 基因用 T2A8<sup>[17-18]</sup> 短肽与质粒 pGAP815-*pgalU* 和 pGAP815-*tuaD* 进行组合连接, 组合方式如图 4A 所示。将构建好的质粒整合至 Pp00 菌株基因组构建重组毕赤酵母菌株。摇瓶培养后, 测得的  $OD_{600}$  及软骨素产量如图 4B 所示。从菌体的生长情况来看, 当过表达 *spagM* 基因后, 菌株的生长受到明显抑制, 推测原因可能是 *spagM* 基因的过表达导致了乙酰辅酶 A 的过

度消耗, 从而影响了线粒体的正常工作, 进而抑制菌体生长<sup>[19]</sup>。此外, 所有菌株生产软骨素的能力均有提高, 其中同时过表达 *tuaD* 和 *sglmS* 基因的菌株 Pp00-DS 产量提高最为明显, 实现了 260 mg/L 的软骨素产量, 是对照组的 2.47 倍。

将途径单基因强化与双基因组合强化结果整合后, 本研究继续尝试同时过表达软骨素合成途径中的 3 个基因, 以获得更高的软骨素产量。三基因组合方式如图 5A 所示, 表达框构

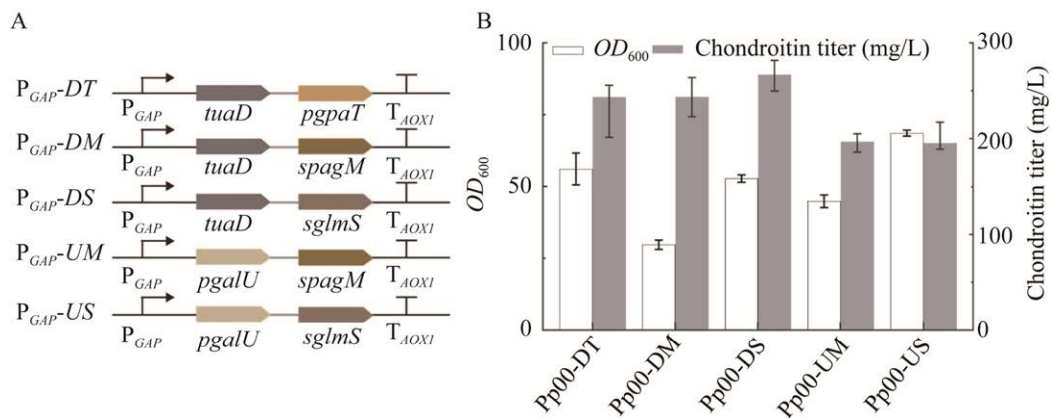


图 4 途径双基因组合强化 A: 双基因组合表达框。B: 工程菌株的生长情况及软骨素产量

Figure 4 Pathway gene enhancement through a combination of two genes. (A) Double gene combinatory expression frame. (B) Growth and chondroitin titers of recombinant strains.

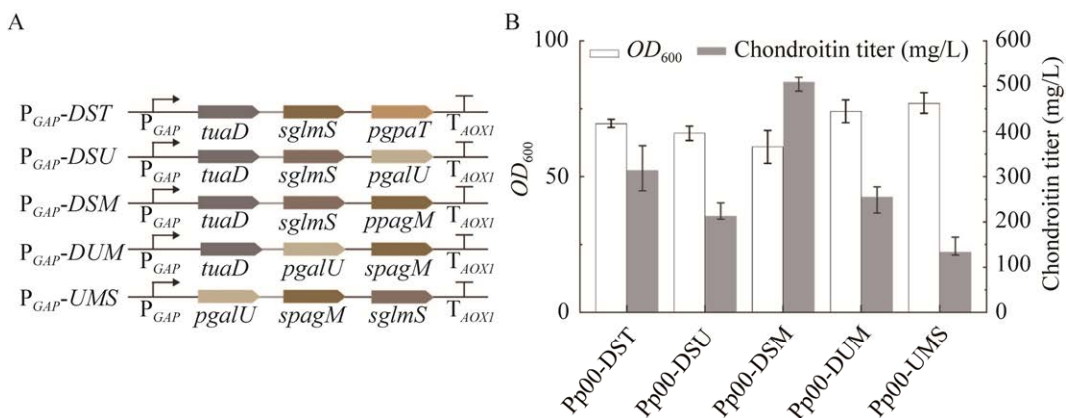


图 5 途径三基因组合强化 A: 三基因组合表达框。B: 工程菌株的生长情况及软骨素产量

Figure 5 Pathway gene enhancement through a combination of three genes. (A) Three gene combinatory expression frame. (B) Growth and chondroitin titers of recombinant strains.



建在 pGAP815 质粒上, 经线性化后整合至 Pp00 菌株基因组, 构建毕赤酵母工程菌株。摇瓶培养后, 测量结果如图 5B 所示。结果表明, 当同时提高中间代谢产物 UDP-glucose、GlcN-6-P 和 GlcNAc-1-P 的合成通量时, 软骨素产量会进一步提升至 495 mg/L, 约是对照组的 4.7 倍。

### 2.3 3 L 发酵罐分批补料发酵

在 3 L 发酵罐中考察重组毕赤酵母菌株 Pp00-DSM 合成软骨素的能力, 采用分批补料的发酵方式。前 24 h 为分批发酵阶段, 菌体充分利用培养基中的甘油, 24 h 后开始持续补加甘油。

从图 6 中可以看出, 0-24 h 菌体生长缓慢且有少量软骨素合成, 分析原因主要是组成型启动子使得菌体的生长过程中始终伴随着外源蛋白的表达, 持续的代谢压力导致 Pp00-DSM 菌株出现生长周期后延的现象。在发酵培养 24 h 后菌体浓度开始持续增加, 24-120 h 是菌体的对数生长期, 这时软骨素的合成与细胞生长呈正相关。发酵培养至 132 h 进入稳定期, 在 144 h 时产量达到最高 (2.6 g/L), 是摇瓶产量的 5.25 倍。

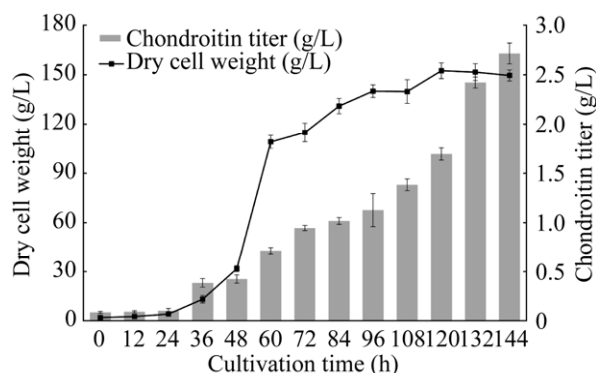


图 6 3 L 罐分批补料发酵生产软骨素

Figure 6 Fed-batch fermentation in a 3 L bioreactor to produce chondroitin.

### 2.4 一锅法合成硫酸软骨素 A 体系的建立

本实验室前期的研究表明, P<sub>GAP</sub> 启动子对磺基转移酶基因 *c4st* 的表达强度仅次于强诱导型启动子 P<sub>AOX1</sub><sup>[9]</sup>, 因此构建菌株 PpC00-DSM。经培养后发现, PpC00-DSM 菌株合成软骨素的能力与 Pp00-DSM 菌株相当, 但是未能检测到硫酸软骨素 A 的合成。而体外建立磺酸化修饰系统可以通过物料的改变控制磺酸化修饰进程, 具有产物磺酸化可控和易规模化的优势。因此后续本研究中硫酸软骨素 A 的合成主要围绕建立体外磺酸化修饰体系。

将上述研究中发酵获得的 PpC00-DSM 菌体用高压匀浆法破碎经离心获得上清 (软骨素含量为 250 mg/L), 向其中投入 400 U/L C4ST 和 2 g/L PAPS, 置于 30 °C 反应 12 h 后, 经 LC-MS 检测有 CSA 产生, 转化率为 5% (图 7)。

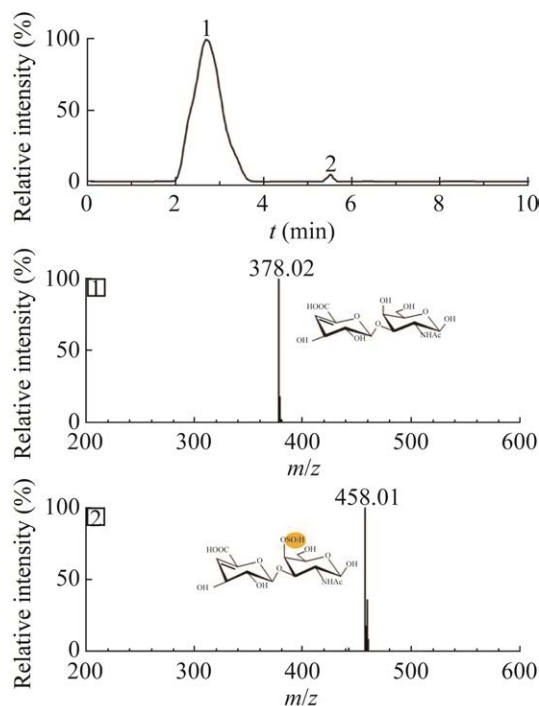


图 7 高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 分析

Figure 7 Disaccharides analyzed by HPLC-MS.

接着对反应时间进行优化,结果如图 8A 所示。反应持续到 48 h 后趋于稳定,此时 CSA 的转化率提高至 12%,因此 48 h 被设定为后续反应时间。随后,本研究继续探究温度对磺酸转移反应的影响。设置了 4 个反应温度分别为 26 °C、30 °C、37 °C 和 45 °C (图 8B),发现 37 °C 为最适反应温度,此时 CSA 的转化率进一步提升至 15%。同样,后续实验均以 37 °C 为反应温度。

除反应时间及温度的优化外,本研究继续尝试改变一锅法体系中 C4ST 与 PAPS 的比例,以提高 CSA 的转化率。向等量的细胞破碎上清中添加不同量的 PAPS,没有发现软骨素向 CSA 的转化;然而,当向等量的细胞破碎上清中添

加不同量的 C4ST 时,检测到有不同磺酸化水平的 CSA 产生 (图 9A)。这表明目前在重组毕赤酵母细胞内产生的 PAPS 对于合成 CSA 的供给是充足的<sup>[20]</sup>,而毕赤酵母细胞内 C4ST 的表达是限制 CSA 磺酸化修饰的关键因素。因此,增强 C4ST 的表达和催化活力对提高 CSA 的磺酸化修饰效率十分关键<sup>[21]</sup>。为进一步提高软骨素向 CSA 的转化率,在以上最优反应体系的基础上继续添加 PAPS (图 9B),结果表明,在 C4ST 过量的情况下,随着 PAPS 投入量的增加 CSA 的转化率呈现出先增加后稳定的趋势。当将 250 mg/L 软骨素的酵母破壁液上清、1 000 U/L 的 C4ST 和 15 g/L PAPS 混合,在 37 °C 反应 48 h 后,CSA 的转化率达到 40%。

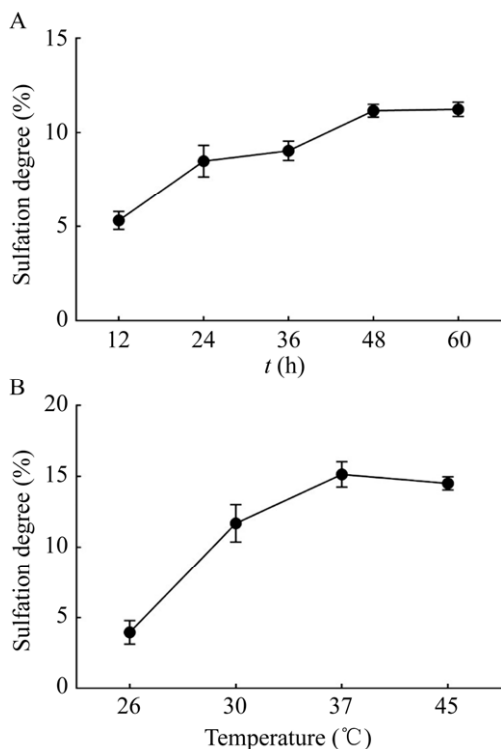


图 8 磺酸化修饰条件优化 A: 不同反应时间的影响。B: 不同温度的影响

Figure 8 Optimization of sulfonic modification conditions. Effect of different reaction time (A) and different temperature (B).

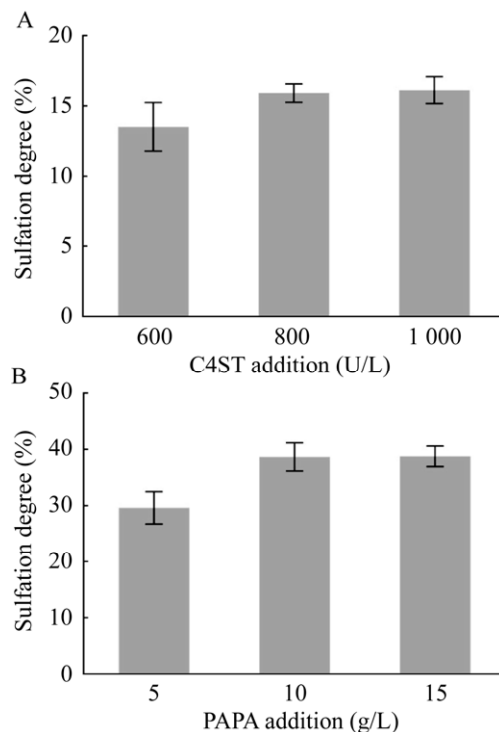


图 9 磺酸化修饰体系优化 A: 添加不同量的 C4ST。B: 在添加 C4ST 的基础上添加不同量的 PAPS  
Figure 9 Optimization of sulfonic modification system. (A) Adding different amounts of C4ST. (B) Different amounts of PAPS added on the basis of C4ST.

### 3 讨论

硫酸软骨素具有保湿、抗衰老、治疗关节炎等作用,广泛应用于化妆品、医药等领域,因此开发一种高效、绿色的合成硫酸软骨素的方法具有重要意义。目前微生物法合成 CSA 的主要研究成果如表 2 所示。

本研究首先在毕赤酵母 GS115 中组成型表达软骨素合酶编码基因 *kfoC*、*kfoA* 以及 UDP-葡萄糖脱氢酶编码基因 *tuaD*, 获得重组菌株 Pp00, 实现了软骨素在毕赤酵母中的合成。通过在 Pp00 菌株的基础上分别整合毕赤酵母和酿酒酵母来源的 *glmS*、*gpaT*、*pagM* 和 *galU* 基因, 获得了 Pp00-pgalU 菌株, 将软骨素产量提高至 170 mg/L。以上结果表明, 增加中间代谢产物 UDP-glucose、GlcN-6-P、GlcNAc-6-P 和 GlcNAc-1-P 的合成通量可以有效促进软骨素的产生, 为后续多基因组合强化提供基础。有研究表明, 在过表达途径酶基因增加碳通量的同时, 还需要平衡代谢途径的基因表达, 这可以实现产量和生产力的提高<sup>[24-25]</sup>。因此本研究在双基因和三基因组合强化时, 保证了从 Glc-6-P

到 UDP-GalNAc 与 Glc-6-P 到 UDP-GlcA 这两条代谢通路的平衡, 获得了一株软骨素产量为 495 mg/L 的毕赤酵母菌株 Pp00-DSM。随后, 本研究继续考察了菌株 Pp00-DSM 规模化生产软骨素的能力, 采用 3 L 罐分批补料发酵<sup>[26]</sup>, 在 BSM 培养基中发酵 144 h 获得的最高软骨素产量为 2.6 g/L。然而, 在发酵 132 h 后菌体量出现下降趋势, 这主要是由于酵母发酵后期细胞老化、裂解, 因此在后续发酵中可以通过进一步优化发酵条件, 获得更高的软骨素产量。最后, 本研究开发了一种生物合成 CSA 的一锅法体系, 使用未纯化的细胞破碎液上清、C4ST 和 PAPS<sup>[27]</sup>在 37 °C 下反应 48 h, 可以实现从软骨素到 CSA 的可控及高效转化。相比于目前报道微生物合成 CSA 的方法, 本研究所开发的一锅法体系, 不仅操作简便耗时短, 更绿色环保无污染。

综上, 本研究首先通过代谢工程改造毕赤酵母, 获得了一株以甘油为唯一碳源的高产软骨素毕赤酵母菌株, 随后通过建立一锅法生物合成体系实现了 0-40% 不同磺酸化水平 CSA 的可控合成, 这为工业化大规模生产创造了有利条件。

表 2 微生物法合成硫酸软骨素 A

Table 2 Microbial synthesis of chondroitin sulfate A

Microorganism (enzymes added)	Process	Sulfation degree (%)	References
Microbial-enzymatic process			
<i>B. subtilis</i> (Ch), <i>E. coli</i> BL21 (ASST IV), <i>P. pastoris</i> (C4ST)	Two steps	98.0	[7]
<i>E. coli</i> BL21 (AST IV <sub>SH3</sub> ), <i>P. pastoris</i> (C4ST <sub>PDZ</sub> )	Two steps	98.0	[8]
<i>E. coli</i> MG1655 (Ch, PAPS), <i>E. coli</i> BL21 (C4ST)	Two steps	36.9	[22]
<i>P. pastoris</i> (Ch, C4ST)	One-pot	40.0	This study
Fermentation			
<i>E. coli</i> K4	<i>De novo</i>	97.0 (0.027 mg/g DCW)	[23]
<i>P. pastoris</i>	<i>De novo</i>	4.0 (13.9 mg/g DCW)	[9]

### REFERENCES

[1] Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta*, 2013,

1830(10): 4719-4733.

[2] Volpi N. Chondroitin sulfate safety and quality. *Molecules*, 2019, 24(8): 1447.

[3] Schiraldi C, Cimini D, De Rosa M. Production of

- chondroitin sulfate and chondroitin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1209-1220.
- [4] Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum*, 2001, 31(1): 58-68.
- [5] Martel-Pelletier J, Farran A, Montell E, et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules*, 2015, 20(3): 4277-4289.
- [6] 吴秋林, 刘立明, 陈坚. 发酵法生产硫酸软骨素的研究进展. *生物工程学报*, 2012, 28(11): 1281-1293.  
Wu QL, Liu LM, Chen J. Microbial production of chondroitin sulfate: a review. *Chin J Biotech*, 2012, 28(11): 1281-1293 (in Chinese).
- [7] Zhou ZX, Li Q, Huang H, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(6): 1561-1570.
- [8] Jin XR, Li Q, Wang Y, et al. Optimizing the sulfation-modification system for scale preparation of chondroitin sulfate A. *Carbohydr Polym*, 2020, 246: 116570.
- [9] Jin XR, Zhang WJ, Wang Y, et al. Biosynthesis of non-animal chondroitin sulfate from methanol using genetically engineered *Pichia pastoris*. *Green Chem*, 2021, 23(12): 4365-4374.
- [10] Xu RR, Wang Y, Huang H, et al. Closed-loop system driven by ADP phosphorylation from pyrophosphate affords equimolar transformation of ATP to 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *ACS Catal*, 2021, 11(16): 10405-10415.
- [11] Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-334.
- [12] Zhao W, Wang JW, Deng RQ, et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(3): 189-195.
- [13] Potvin G, Ahmad A, Zhang ZS. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochem Eng J*, 2012, 64: 91-105.
- [14] Cos O, Ramón R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 17.
- [15] Blumenthal T. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays*, 1998, 20(6): 480-487.
- [16] Jin P, Zhang LP, Yuan PH, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. *Carbohydr Polym*, 2016, 140: 424-432.
- [17] Müntjes K, Philipp M, Hüsemann L, et al. Establishing polycistronic expression in the model microorganism *Ustilago maydis*. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1384.
- [18] Wälchli S, Løset GÅ, Kumari S, et al. A practical approach to T-cell receptor cloning and expression. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27930.
- [19] Shi L, Tu BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 125-131.
- [20] Mueller JW, Shafiqat N. Adenosine-5'-phosphosulfate - a multifaceted modulator of bifunctional 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate synthases and related enzymes. *FEBS J*, 2013, 280(13): 3050-3057.
- [21] He WQ, Zhu YY, Shirke A, et al. Expression of chondroitin-4-O-sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(18): 6919-6928.
- [22] Badri A, Williams A, Xia K, et al. Increased 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate levels in engineered *Escherichia coli* cell lysate facilitate the *in vitro* synthesis of chondroitin sulfate A. *Biotechnol J*, 2019, 14(9): e1800436.
- [23] Badri A, Williams A, Awofiranye A, et al. Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1389.
- [24] Xu P, Gu Q, Wang WY, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1409.
- [25] Jones JA, Toparlak ÖD, Koffas MAG. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 33: 52-59.
- [26] Pepeliaev S, Krahulec J, Černý Z, et al. High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2011, 156(1): 67-75.
- [27] 周正雄, 堵国成, 康振. 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸的高效合成及其应用. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1222-1233.  
Zhou ZX, Du GC, Kang Z. Production and application of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1222-1233 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)