代谢工程组合策略优化益生菌Nissle 1917高效合成岩藻糖基乳糖

石雅南[1,2]，王晨舒[2]，易崇华[2]，许本宏[2]，李冰[1*]

（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）（2.汤臣倍健营养健康研究院，广东广州 510663）

摘要：2'-岩藻糖基乳糖是母乳低聚糖的主要成分之一，在人体中发挥免疫调节、促进大脑发育等重要作用。肠道益生菌大肠杆菌 Nissle 1917 是一种极具开发潜力的合成生物学底盘菌株。为进一步拓展 Nissle 1917 的应用场景，在 Nissle 1917 胞内构建了 2'-FL 的完整合成途径。通过启动子和 RBS 替换强化了内源途径基因的表达，通过抑制支路途径和竞争途径进一步提高了前体 GDP-L-岩藻糖的供应。针对 α-1,2-岩藻糖基转移酶的异源表达效率低的问题，采用多序列比对策略对 α-1,2-岩藻糖基转移酶 wcfB 定向进化，改善蛋白可溶性和催化效率。通过代谢工程组合策略得到的工程菌株 Nissle 1917 在摇瓶水平 2'-FL 产量达到 9.92 g·L^{-1}, 1.5 L 发酵罐中达到 58 g·L^{-1}。本研究成功开发了益生菌 Nissle 1917 作为合成 2'-FL 的微生物底盘细胞，并丰富了其分子生物学操作元件库，为推进该菌株在合成生物学领域的基础研究与生物应用提供了新思路。通过合成生物学策略直接增强益生菌 Nissle 1917 的益生元（2'-FL）合成能力，也为下一代益生菌与合成生物学相结合的创新研究方向提供了重要借鉴。

关键词：2'-岩藻糖基乳糖；α-1,2-岩藻糖基转移酶；代谢工程；定向进化；大肠杆菌 Nissle 1917

文章编号：1673-9078(2026)10-86-98 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1583

Optimization of Combined Metabolic Engineering Strategies for Efficient Synthesis of Fucosyllactose from Probiotic Nissle 1917

SHI Ya'nan[1,2], WANG Chenshu[2], YI Chonghua[2], XU Benhong[2], LI Bing[1*]

(1.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Byhealth Institute of Nutrition & Health, Guangzhou 510663, China)

Abstract: 2′-fucosyllactose (2′-FL), a major component of human milk oligosaccharides, plays important roles in immune regulation and brain development in humans. The probiotic gut bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 is a highly promising synthetic biology chassis strain for microbial production of 2′-FL. To further expand its application potential, a complete biosynthetic pathway for 2′-FL was constructed in Nissle 1917. The expression of endogenous pathway genes was enhanced by replacing promoters and ribosome-binding sites (RBSs), while the supply of the precursor GDP-L-fucose was increased by suppressing branch and competing pathways. To address the low heterologous expression efficiency of *α*-1,2-fucosyltransferase, a directed evolution strategy based on multiple sequence alignment was applied to improve the solubility and catalytic efficiency of wcfB. Application of these combined metabolic engineering strategies enabled the engineered *E. coli* Nissle 1917 strain to achieve 2′-FL titers of 9.92 g·L^{-1} in shake flasks and 58 g·L^{-1} in a 1.5 L bioreactor. This study successfully established *E. coli* Nissle 1917 as a microbial chassis for 2′-FL production and expanded its library of molecular biology operational elements, thereby providing new insights into advancing fundamental research and biotechnological applications of this strain in synthetic biology. Moreover, engineering the probiotic *E. coli* Nissle 1917 for 2′-FL production through synthetic biology provides valuable insights for integrating next-generation probiotics with synthetic biology.

Key words: 2′-fucosyllactose; α-1,2-fucosyltransferase; metabolic engineering; directed evolution; *Escherichia coli* Nissle 1917

收稿日期：2025-11-06；修回日期：2025-12-09；接受日期：2025-12-15

作者简介：石雅南（1995-），女，博士研究生，研究方向：大宗化学品的生物合成，E-mail：15061885753@163.com

通讯作者：李冰（1972-），女，博士，教授，研究方向：碳水化合物绿色加工、糖类药物制备食品工程，E-mail：bli@scut.edu.cn

引文格式：
石雅南,王晨舒,易崇华,等.代谢工程组合策略优化益生菌Nissle 1917高效合成岩藻糖基乳糖[J].现代食品科技,2026,42(10):86-98.
SHI Ya'nan, WANG Chenshu, YI Chonghua, et al. Optimization of combined metabolic engineering strategies for efficient synthesis of fucosyllactose from probiotic nissle 1917 [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 86-98.

母乳寡糖（Human Milk Oligosaccharides, HMOs）是母乳中第三大固体成分，含量仅次于乳糖和脂肪[1]。其中，2'-岩藻糖基乳糖（2'-FL）是母乳寡糖中丰度最高的成分，越来越多的功能研究表明2'-岩藻糖基乳糖在婴儿的生长发育中起着重要作用，包括促进益生菌生长、抑制病原体感染、调节免疫系统等[2]。2'-FL获批食品营养强化剂新品种进一步推动婴幼儿配方食品向母乳化升级，据北京博研智尚信息咨询有限公司发布的市场分析报告显示2024年中国市场规模已达14.3亿元且同比增长29.1%，成为高端婴配食品创新的关键抓手，同时应用场景正从婴配领域拓展至成人营养、特医食品等多元赛道。通过合成生物学和代谢工程策略改造工程微生物宿主的生物合成法是目前2'-FL是主流生产方法。2'-FL的常用生物合成途径中，需要GDP-L-岩藻糖作为供体底物，乳糖作为受体底物，通过α-1,2-糖苷键连接形成2'-FL。GDP-L-岩藻糖是大多数工业模式微生物宿主菌株的内源代谢过程的中间代谢产物，一般始于6-磷酸果糖，通过甘露糖6-磷酸异构酶（*ManA*）、磷酸甘露糖酶（*ManB*）、甘露糖1-磷酸鸟苷转移酶（*ManC*）、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶（*Gmd*）和GDP岩藻糖合酶（*WcaG*）等五步酶催化转化为GDP-L-岩藻糖[3]。α-1,2-岩藻糖基转移酶是催化2'-FL合成的关键酶，参与整个合成途径的最后一步。

α-1,2-岩藻糖基转移酶是2'-FL生物合成途径中的核心催化酶与关键限速酶，近年来已被广泛报道研究。如来源于*Azospirillum lipoferum*的*SAMT*[4]，来源于*Helicobacter pylori*的*FutC*[5]，来源于*Escherichia coli* O126的*WbgL*和*Bacteroides fragilis*的*WcfB*等[2]都已成功应用于2'-FL的生物合成。尽管上述α-1,2-岩藻糖基转移酶均属于糖基转移酶类11家族，但它们的酶学性质存在很大差异，例如底物偏好和岩藻糖化活性，导致最终产物结构和滴度存在差异[6]。目前报道的α-1,2-岩藻糖基转移酶存在溶解度较低，活性低，底物识别特异性不强等问题，直接限制了其对2'-FL合成限速步骤的突破能力，成为阻碍人乳寡糖工业化量产的关键技术瓶颈[7]。近年来常用的提高目标蛋白溶解度和稳定性的策略包括：（1）融合标签提高目标蛋白水溶性[8,9]；（2）通过共识查找，将非保守序列替换为保守序列，*Helicobacter pylori* 26695来源的α-1,2-岩藻糖基转移酶FutC通过替换四个非保守氨基酸残基，显著提高蛋白表达稳定性和可溶性[10]；（3）野生型氨基酸替换为遵守α螺旋规则和亲水矛盾法则的氨基酸[11]，Lee等[1]采用此策略挖掘了四个可以增加α-1,2-岩藻糖基转移酶溶解度的突变位点L80C/A121D/P124A/L125R，2'-FL产量提高3.4倍；（4）RISLNet热稳定性预测后进行氨基酸替换[12]，Liu等[13]利用计算机辅助热稳定性预测有效缩小了残基候选范围，提高筛选效率，并通过突变位点叠加，成功获得催化效率提高100倍的FutC。

大肠杆菌Nissle 1917（EcN）是一种益生菌，自1917年鉴定以来，逐渐成为一种实验室模式菌株且在食品、药品领域具有广泛应用[14]。但与其它模式大肠杆菌相比，EcN在合成生物学领域的系统性研究仍较为有限，目前其工程化应用只有丙氨酸、肝素等少数化合物的生物合成报道[15,16]。这种局限性主要源于两方面原因：其一，EcN代谢背景复杂且认知不足，其特有代谢网络，如胞外多糖合成、微需氧代谢及独特的碳代谢流分配机制，为理性代谢工程带来了挑战；其二，针对EcN的标准化遗传工具不足、缺乏成熟的基因编辑和调控平台，限制了该底盘在复杂途径构建中的开发深度与效率。本研究选用EcN作为合成2'-FL的微生物底盘，正是基于其天然益生特性与良好食品安全记录所进行的一次前瞻性尝试，旨在探索其作为下一代低内毒素、高适应性合成生物学细胞工厂的应用潜力。

在本研究中，采用经典的代谢工程策略构建了能够合成2'-FL的工程大肠杆菌Nissle 1917，通过敲除*lacZ*、*wcaJ*、*lon*、*poxB*、*mtlD*、*nudD*等竞争途径基因，提高2'-FL合成途径的碳通量，基因组加强*manB*、*manC*、*Gmd*、*wcaG*进一步提高GDP-L-岩藻糖的前体供应量。通过质粒表达定向进化酶活提高的α-1,2-岩藻糖基转移酶进一步提高2'-FL产量。最佳工程菌株在摇瓶中2'-FL产量达9.92 $g \cdot L^{-1}$，1.5 L发酵罐中产量58 $g \cdot L^{-1}$。本研究为利用工程益生菌生产2'-FL等母乳寡糖提供了重要的理论和技术支持。随着合成生物学和酶工程技术的进步，利用α-1,2-岩藻糖基转移酶生产HMOs的前景广阔，有望在婴幼儿配方奶粉和功能性食品中得到广泛应用。

表 1 本研究所用质粒

Table 1 The plasmids used in this study

质粒名称	特征	来源
pCOLADuet-1	two T7 promoters, ColA ori, KanR	实验室保藏
pCDFDuet-1	two T7 promoters, CloDF13 ori, StrR	实验室保藏
pCas9	RepA101(Ts), KanR, Pcas-cas9, ParaBRed, lacIq Ptrc-sgRNA-pMB1	实验室保藏
pTarget	sgRNA pMB1, pBR322 ori, StrR	实验室保藏
pCOLADuet-CBGF	pCOLADuet-*manC-manB-gmd-wcaG*	本研究构建
pCDFDuet-BY	pCDFDuet-*wcfB-lacY-rcsAB*	本研究构建
pCDFDuet-BYA	pCDFDuet-*wcfB-lacY-rcsAB*-Plac-*setA*	本研究构建
pCOLADuet-*setA*	pCOLADuet-1 含 Plac 启动子及 *setA* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*tpyB*	pCOLADuet-1 含 Plac 启动子及 *tpyB* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*M2H*	pCOLADuet-1 表达 *M2H* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*zwf*	pCOLADuet-1 表达 *zwf* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*pntAB*	pCOLADuet-1 表达 *pntAB* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*pgi*	pCOLADuet-1 表达 *pgi* 基因	本研究构建
pCOLADuet-*manA*	pCOLADuet-1 表达 *manA* 基因	本研究构建
pTarget-N20(Δ*lacZ*)	含 *lacZ* 靶向序列，用于 *lacZ* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*wcaJ*)	含 *wcaJ* 靶向序列，用于 *wcaJ* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*lon*)	含 *lon* 靶向序列，用于 *lon* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*poxB*)	含 *poxB* 靶向序列，用于 *poxB* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*mtlD*)	含 *mtlD* 靶向序列，用于 *mtlD* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*nudD*)	含 *nudD* 靶向序列，用于 *nudD* 基因敲除	本研究构建
pTarget-N20(Δ*pta-ackA*)	含 *pta-ackA* 靶向序列，用于 *pta-ackA* 基因敲除	本研究构建

1 材料与方法

1.1 酶和生化试剂

本研究所用化学试剂均采购自国药集团化学试剂有限公司；DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 和限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ等，均购自宝日医生物技术（北京）有限公司；2’-FL、甘油、乳糖、乙酸等检测标准品，均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；硫酸卡那霉素、氨苄青霉素、硫酸链霉素等，购自上海麦克林生化科技有限公司；无缝克隆试剂盒 In-Fusion Snap Assembly Master Mix，购自宝日医生物技术（北京）有限公司；细菌质粒小提试剂盒 Plasmid DNA Mini Kit Ⅱ和琼脂糖凝胶回收试剂盒 Gel extraction Kit，购自 Omega Bio-Tek 公司。

1.2 仪器设备

Biometra TRIO 48 PCR 仪，广州东盛生物科技有限公司；WIX-EP300 电泳仪，韦克斯科技（北京）有限公司；Tanon 1600 凝胶成像系统，广州誉维生物科技有限公司；Biowave3 紫外分光光度计，北京斯达沃科技有限公司；苏净安泰 SW-CJ-1FD 超净工作台，苏州净化设备有限公司；HVA-110 立式高压灭菌锅，Wada Stainless Kogyo Co. LTD；ZQZY-108C 震荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；5910 Ri 台式低温离心机，Eppendorf 艾本德中国有限公司；Cloud Ready 1.5L*4 云平台生物反应器，迪必尔生物工程（上海）有限公司。

1.3 重组质粒和重组菌株构建

以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板，*manCB*-F/R 为引物克隆出 *manC-manB* 核酸序列并通过无缝克隆插入到 pCOLADuet-1 质粒的 *Nco* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ位点之间。以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板，GW-F/R 为引物克隆出 *gmd-wcaG* 核酸序列并通过无缝克隆插入到 pCOLADuet-1 质粒的 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ位点之间，得到构建好的质粒 pCOLADuet-CBGF。委托苏州泓迅生物科技有限公司对脆弱拟杆菌来源的 *wcfB* 基因进行密码优化及全基因合成并克隆至 pCDFDuet-1 质粒。以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板，*setA*-F/R、*zwf*-F/R、

pntAB-F/R、*lacY*-F/R、*rcsA*-F/R、*rcsB*-F/R 为引物分别克隆出相应基因，以大肠杆菌 Nissle 1917 基因组为模板，*manA*-F/R、*pgi*-F/R 为引物分别克隆出相应基因并通过无缝克隆插入到 pCOLADuet-1 质粒的 *Nco I* 和 *EcoR I* 位点之间，得到重组质粒 pCOLADuet-s*etA*、pCOLADuet-*zwf*、pCOLADuet-*pntAB*、pCOLADuet-*manA*、pCOLADuet-*pgi*。核酸序列片段 *setA*、*lacY*、*rcsA*、*rcsB* 通过同源重组整合至 pCDFDuet-*wcfB* 中，得到质粒 pCDFDuet-BYA。

本研究采用全质粒扩增法构建含有 *α*-1,2- 岩藻糖基转移酶突变基因的重组质粒。在所需突变位点设计上下游引物，以质粒 pCDFDuet-BYA 为模板，使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase（Takara 公司）进行全质粒扩增，得到含有 2.4 中所述 *α*-1,2-岩藻糖基转移酶基因突变位点的线性化质粒。PCR 原液经 *DpnI* 酶消化去除模板序列后，利用热激法转化到 DH5*α* 感受态细胞中，并涂布于含有链霉素（50 μg·mL^{-1}）的 LB 平板中，置于 37 ℃培养箱中倒置培养 12 h。挑取单克隆子进行测序验证，测序正确后用质粒小提试剂盒 OMEGA Plasmid Mini Kit I 提取出适量质粒备用。

表 2 本研究所用菌株

Table 2 The engineered strains used in this study

菌株名称	基因型	来源
Escherichia coli DH5*α*	K-12, F-, *φ*80, *λ*-, Δ(argF-lac)169, ΔlacZ58(M15), ΔphoA8, glnX44(AS), deoR481, rfbC1, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17	赛默飞
Escherichia coli Nissle 1917		实验室保藏
TCBJ117	*Escherichia coli* Nissle 1917ΔpMUT1ΔpMUT2Δ*attB*::*T7RNAp*Δ*ompT*Δ*endA*	实验室保藏
TCBJ117FL	TCBJ117:pCOLADuet-CBGF+pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL01	TCBJ117Δ*lacZ*:pCOLADuet-CBGF+pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL02	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*:pCOLADuet-CBGF+pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL03	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*:pCOLADuet-CBGF+pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL04	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL05	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS1-*manCB*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL06	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS2-*manCB*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL07	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS3-*manCB*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL08	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL09	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL10	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*mtlD*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL11	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL12	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*pta-ackA*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL13	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL14	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL15	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*pta-ackA*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL16	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY	本研究构建
TCBJ117FL17	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP_{wt}::P_{119}-BOX2-*gmd-wcaG*ΔP_{wt}::P_{119}-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet	本研究构建

续表 2

菌株名称	基因型	来源
TCBJ117FL18	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*setA*	本研究构建
TCCBJ117FL19	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*tpyB*	本研究构建
TCBJ117FL20	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*M2H*	本研究构建
TCBJ117FL21	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*zwf*	本研究构建
TCBJ117FL22	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*pntAB*	本研究构建
TCBJ117FL23	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*zwf*-*pntAB*	本研究构建
TCBJ117FL24	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*pgi*	本研究构建
TCBJ117FL25	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*manA*	本研究构建
TCBJ117FL26	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BY+pCOLADuet-*pgi*-*manA*	本研究构建
TCBJ117FL27	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-BYA	本研究构建
TCBJ117FL28	TCBJ117Δ*lacZ*Δ*wcaJ*Δ*lon*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-BOX2-*gmd*-*wcaG*ΔP$_{wt}$::P$_{119}$-RBS4-*manCB*Δ*poxB*Δ*mtlD*Δ*nudD*: pCDFDuet-B^{S236A}YA	本研究构建

表 3 本研究所用引物

Table 3 The primer used in this study

引物名称	序列（5’-3’）
manCB-F	taattttgtttaactttaataaggagatataccatggcgcagtcgaaactctatcc
manCB-R	gcaggcgcgccgagctcgaattcggatccttactcgttcagcaacgtcagcag
GF-F	attagttaagtataagaaggagatatacatatgtcaaaagtcgctctcatcacc
GF-R	cagcagcggtttctttaccagactcgagttacccccgaaagcggtcttg
setA-F	tttgtttaactttaataaggagatataccatgggcatgatctggataatgacgatggctc
setA-R	gacctgcaggcgcgccgagctcgaattctcaaacgtctttaacctttgcgg
zwf-F	tttgtttaactttaataaggagatataccatgggcatggcggtaacgcaaacagcc
zwf-R	gacctgcaggcgcgccgagctcgaattcttactcaaactcattccaggaacgacc
pntAB-F	agttaagtataagaaggagatatacatatgatgcgaattggcataccaagag
pntAB-R	cgcagcagcggtttctttaccagactcgagttacagagccttcaggattgcatcc
manA-F	tgtttaactttaataaggagatataccatgggcatgcaaaaactcattaactcagtgc
manA-R	gacctgcaggcgcgccgagctcgaattcttacagcttgttgtaaacacgcg
pgi-F	gtatattagttaagtataagaaggagatatacatatgatgaaaaacatcaatccaacgcag
pgi-R	cgcagcagcggtttctttaccagactcgagttaaccgcgccacgctttatag
lacY-F	gtatattagttaagtataagaaggagatatacatatgtactatttaaaaaacacaaacttttggatg
lacY-R	cataaatccataataatcgttgacatgatatacgctccttttaagcgacttcattcacctgac
rcsA-F	aaaaggagcgtatatcatgtcaacgattattatggatttatg
rcsA-R	tattgttcatttttatcacctccttttagcgcatgttgacaaaaatac
rcsB-F	gctaaaaaggaggtgataaaaatgaacaatatgaacgtaattattgccg
rcsB-R	cgtattagatatccaattgagatctttagtctttatctgccggacttaagg

续表 3

引物名称	序列（5’-3’）
W114H-F	ctgcgcaaaaagatacacaacatatgtggtaatatccttg
W114H-R	tatctttttgcgcagttcatcggttatgcggtacag
N115R-F	cgcaaaaagatatggcgtatatgtggtaatatccttg
N115R-R	ccatatctttttgcgcagttcatcggttatgcggtac
W114H/N115R-F	ctgcgcaaaaagatacaccgtatatgtggtaatatccttg
W114H/N115R-R	ccatatctttttgcgcagttcatcggttatgcggtac
Q198S-F	ctggacttatatatttctagcctgtgcacccataatattatttc
Q198S-R	aatatataagtccagcagcggggtggtattttcg
K80T-F	ccttatgaggaaggtaccgatctgatcattgatggttattttc
K80T-R	accttcctcataaggaattctgctaaattcatgaaac
K80P-F	ccttatgaggaaggtccggatctgatcattgatggttattttc
K80P-R	accttcctcataaggaattctgctaaattcatgaaac
K80I-F	ccttatgaggaaggtatcgatctgatcattgatggttattttc
K80I-R	accttcctcataaggaattctgctaaattcatgaaac
K80N-F	ccttatgaggaaggtaacgatctgatcattgatggttattttc
K80N-R	accttcctcataaggaattctgctaaattcatgaaac
K80V-F	ccttatgaggaaggtgtggatctgatcattgatggttattttc
K80V-R	accttcctcataaggaattctgctaaattcatgaaac
E91C-F	ggttattttcagagctgcaaatacttcaaacgtagcgtg
E91C-R	gctctgaaaataaccatcaatgatcagatctttac
E91C/K92R-F	ggttattttcagagctgccgttacttcaaacgtagcgtgg
E91C/K92R-R	gctctgaaaataaccatcaatgatcagatctttac
V250F-F	ttacctgtgagctggttcagactgccgaataattatac
V250F-R	ccagctcacaggtaacagatcagaaacaccaag
R96S/V99A/L100M-F	gaaaaatacttcaaatctagcgtggcgatggacctgtaccgcataaccgatg
R96S/V99A/L100M-R	tttgaagtatttttcgctctgaaaataaccatcaatg
R96D/S97I/V98S/V99A/L100R-F	gaaaaatacttcaaagacatctctgcgcgtgacctgtaccgcataaccgatg
R96D/S97I/V98S/V99A/L100R-R	tttgaagtatttttcgctctgaaaataaccatcaatg
V99G/L100V-F	ttcaaacgtagcgtgggtgtggacctgtaccgcataaccgatg
V99G/L100V-R	cacgctacgtttgaagtatttttcgctctgaaaataac
V99T/L100P-F	ttcaaacgtagcgtgaccccggacctgtaccgcataaccgatg
V99T/L100P-R	cacgctacgtttgaagtatttttcgctctgaaaataac
M231W-F	gtgatcgccccacaatggtggtttggtattagtgttaaac
M231W-R	ttgtggggcgatcacaatcttattagaattttcattc
S90F-F	gatggttatttttcagttcgaaaaatacttcaaacgtag
S90F-R	ctgaaaataaccatcaatgatcagatctttaccttc
P140A-F	gactatttaaagctggcgcatgccttaccgttttgtgg
P140A-R	cagctttaaatagtcgccacgccgcacatgaatgc
L139I/P140A-F	ggcgactatttaaagatcgcgcatgccttaccgttttgtgg
L139I/P140A-R	ctttaaatagtcgccacgccgcacatgaatgctaac
K148Y-F	ttaccgttttgtggttacagctattataagaacgcaatc

续表 3

引物名称	序列（5’-3’）
K148Y-R	accacaaaacggtaaggcatgcggcagctttaaatag
K148Y/S149D-F	ttaccgttttgtggttacgactattataagaacgcaatc
K148Y/S149D-R	accacaaaacggtaaggcatgcggcagctttaaatag
G147H-F	gccttaccgttttgtcacaaaagctattataagaacgc
G147H-R	acaaaacggtaaggcatgcggcagctttaaatagtc
G147H/K148Y/S149D-F	gccttaccgttttgtcactacgactattataagaacgcaatccag
G147H/K148Y/S149D-R	acaaaacggtaaggcatgcggcagctttaaatagtc
F145L-F	ccgcatgccttaccgctgtgtggtaaaagctattataag
F145L-R	cggtaaggcatgcggcagctttaaatagtcgccac
F145V-F	ccgcatgccttaccggtgtgtggtaaaagctattataag
F145V-R	cggtaaggcatgcggcagctttaaatagtcgccac
L239G-F	ggtattagtgttaaaggtggtgtttctgatctgttacc
L239G-R	tttaacactaataccaaaccacatttgtggggcg
I235A-F	caaatgtggtttggtgcgagtgttaaacttggtgtttc
I235A-R	accaaaccacatttgtggggcgatcacaatcttattag
S236A-F	atgtggtttggtattgcggttaaacttggtgtttctg
S236A-R	aataccaaaccacatttgtggggcgatcacaatc
V237A-F	tggtttggtattagtgcgaaacttggtgtttctgatctg
V237A-R	actaataccaaaccacatttgtggggcgatcacaatc
K238A-F	tttggtattagtgttgcgcttggtgtttctgatctgttac
K238A-R	aacactaataccaaaccacatttgtggggcgatcac
L239A-F	ggtattagtgttaaagcgggtgtttctgatctgttacc
L239A-R	tttaacactaataccaaaccacatttgtggggcg

1.4 大肠杆菌Nissle 1917基因编辑

本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统对 *E. coli* Nissle 1917 基因组中 *lacZ*、*wcaJ*、*lon*、*poxB*、*mtlD*、*nudD*、*pta-ackA* 等基因进行敲除。根据 CRISPy-web（https://crispy.secondarymetabolites.org）网站的推荐选择合适的 PAM 序列，构建对应的靶向质粒 pTarget-N20（Δ*lacZ*、Δ*wcaJ*、Δ*lon*、Δ*poxB*、Δ*mtlD*、Δ*nudD*、Δ*pta-ackA*）。以 *E. coli* Nissle 1917 基因组为模板扩增每个基因的上下游各 500 bp 长度的同源臂序列，通过 overlap 技术组合成基因修复模板。将模板序列与靶向质粒同时转化含有 pCas9 质粒的底盘菌株，涂布卡那霉素 + 链霉素 + 阿拉伯糖抗性平板。挑取平板单克隆进行 PCR 和测序验证。测序正确的菌株经 IPTG 诱导消除 pTarget 质粒，然后 42 ℃培养消除 pCas 质粒。pTarget 和 pCas9 质粒完全消除的菌株可用于其它基因编辑或转化 pCDFDuet-BYA 用于 2’-FL 合成。

1.5 重组菌株培养

LB 培养基：5 g·L^{-1} 酵母粉，10 g·L^{-1} 胰蛋白胨，10 g·L^{-1} NaCl。

DM 培养基：20 g·L^{-1} 葡萄糖，5 g·L^{-1} 酵母粉，13.5 g·L^{-1} 磷酸二氢钾，4 g·L^{-1} 磷酸氢二铵，1.7 g·L^{-1} 一水柠檬酸，1.4 g·L^{-1} 七水硫酸镁，10 mL·L^{-1} 离子液。

离子液：10 g·L^{-1} 柠檬酸铁，2.25 g·L^{-1} 七水硫酸锌，1 g·L^{-1} 五水硫酸铜，0.35 g·L^{-1} 一水硫酸锰，0.23 g·L^{-1} 十水硼酸钠，0.11 g·L^{-1} 四水钼酸铵，2 g·L^{-1} 二水氯化钙。

重组菌株分别挑取单克隆接种至 5 mL 新鲜 LB 培养基（链霉素 50 μg·mL^{-1}，卡那霉素 50 μg·mL^{-1}），置于 37 ℃摇床震荡（220 r·min^{-1}）培养 12 h。种子液以 2%（φ）接种量转接至 25 mL DM 培养基中（链霉素 50 μg·mL^{-1}，卡那霉素 50 μg·mL^{-1}），置于 37 ℃摇床震荡（220 r·min^{-1}）培养至 OD_{600}=0.6−0.8，加入终浓度 0.3 mmol·L^{-1} IPTG 和 12 g·L^{-1} 乳糖诱导，然后放入 25 ℃摇床震荡（220 r·min^{-1}）培养 72 h。吸取 1 mL 发酵液样品，12 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清用 0.22 μm 滤膜过滤至液相样品瓶中用于检测产物产量。含突变体的工程菌株的筛选和培养方法同上。

所有样品检测所用仪器为安捷伦 Agilent HPLC 1260 高效液相色谱仪，配备视差折光检测器（RID）。分离色谱柱选择伯乐 BIO-RAD Aminex HPX-87H（300×7.8 mm，9 μm，货号 #1250140），柱温 40 ℃，流动相为 5 mmol·L^{-1} 硫酸水溶液，流动相流量 0.5 mL·min^{-1}。此方法对葡萄糖、乳糖、2'-FL 均可进行定量检测，使用外标法进行定量。2'-FL 标准品出锋时间为 7.89 min，标准曲线线性范围为 0~10 g·L^{-1}，线性方程 y=153 990x（y 代表 2'-FL 色谱峰面积，x 代表 2'-FL 标准品质量浓度 x g·L^{-1}，R^2=0.999 9）。

甘油菌 TCBJ117FL28 接种至新鲜 LB 培养基过夜活化培养，1%（φ）接种量转接至 25 mL LB 中继续培养 5 h 作为种子液全部接种至 500 mL DM 培养基中（1.5 L 发酵罐）。初始培养温度为 37 ℃，通气量 1 vvm，搅拌转速关联溶氧，维持溶氧水平约 30%（φ），通过流加氨水调控 pH 值在 6.8 左右。培养至菌体密度 OD_{600}=15，加入 0.3 mmol·L^{-1} IPTG 和 10 g·L^{-1} 乳糖，温度降至 25 ℃培养。当初始培养基中底物耗尽开始流加葡萄糖，维持罐中葡萄糖质量浓度在 5~10 g·L^{-1}。流加乳糖维持罐中乳糖质量浓度在 5~10 g·L^{-1}。

1.6 数据分析

本研究中的所有数据均来源于三次平行实验的重复测定，并利用 GraphPad Prism 9.3 进行统计处理，最终以均值 ± 标准差的形式展示。

2 结果与讨论

2.1 *E.coli* Nissle 1917合成2'-FL基础底盘设计与构建

E. coli Nissle 1917（EcN，血清型 O6:K5:H1）作为益生菌补剂或药物使用历史已有百年，是目前已知的唯一无致病性大肠杆菌。随着大肠杆菌分子生物学工具的开发和基因编辑工具的多样化，EcN 也被开发为实验室模式菌株，逐渐成为合成生物学和代谢工程领域的热门微生物底盘菌株之一[17,18]。EcN 野生型菌株含两个内源质粒 pMUT1 和 pMUT2，且胞内无 T7RNA 聚合酶表达，不适用 T7 启动子启使外源基因转录和表达。为了进一步扩展 EcN 的遗传操作工具和基因编辑工具，提高外源基因的表达效率，本研究首先敲除了 EcN 的内源质粒 pMUT1 和 pMUT2，然后在基因组 *attB* 位点整合了 T7RNA 聚合酶基因[19]，同时敲除了 *ompT* 和 *endA* 基因[20]，得到可用于外源蛋白稳定表达和代谢工程调控的基础底盘菌株 *E. coli* Nissle 1917ΔpMUT1ΔpMUT2Δ*attB::T7RNAP*Δ*ompT*Δ*endA*，命名为 TCBJ117。

据报道，野生型大肠杆菌吸收代谢乳糖用于细胞增殖，导致岩藻糖基乳糖产量不高[21]；UDP-葡萄糖-脂质载体转移蛋白 *wcaJ* 负责催化 GDP-L-岩藻糖合成胞外多糖可拉酸；同时，ATP 依赖性蛋白酶 *lon* 间接抑制 GDP-L-岩藻糖合成相关基因的转录[6]。为了减少竞争途径对底物和中间代谢产物的消耗，依次敲除了 *lacZ*、*wcaJ* 和 *lon* 基因。将携带 GDP-L-岩藻糖合成途径关键基因的质粒 pCOLADuet-CBGF 和表达 β-半乳糖苷透性酶和 α-1,2-岩藻糖基转移酶基因的质粒 pCDFDuet-BY 一起转化进上述菌株，分别得到工程菌 TCBJ117FL，TCBJ17FL01，TCBJ117FL02 和 TCBJ117FL03。工程菌株经 72 h 摇瓶发酵后，2'-FL 产量分别为 1.87、5.87、5.26、6.64 g·L^{-1}（图 1）。β-半乳糖苷酶基因 *lacZ* 敲除后，底物乳糖的竞争途径完全被阻断，所有乳糖用于 2'-FL 合成，2'-FL 合成量提高了 213.9 wt.%。虽然 *wcaJ* 和 *lon* 基因敲除后菌株产量提升不太明显，但也并未造成负面影响。

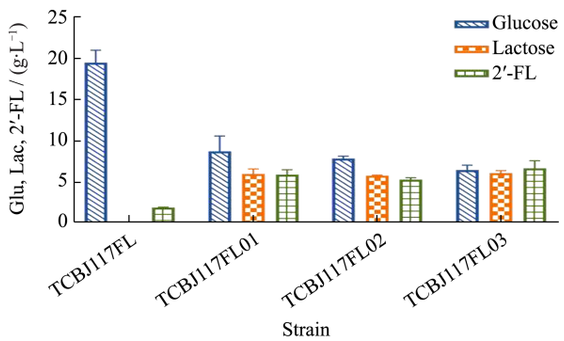


图 1 阻断 *lacZ*、*wcaJ*、*lon* 基因表达对乳糖降解及 2'-FL 合成的影响

Fig.1 Effects of blocking the expression of *lacZ*, *wcaJ*, and *lon* genes on lactose degradation and 2′-FL synthesis

2.2 RBS筛选与调低竞争途径持续提高GDP-L-岩藻糖前体供应

与其他大肠杆菌基因组类似，EcN 内源表达 *manC*、*manB*、*gmd*、*wcaG* 等基因，将葡萄糖代谢产生GDP-L-岩藻糖，从而实现与其他功能糖的相互转化。如图 2 所示，在单独质粒过表达糖基转移酶 *wcfB* 和 β-半乳糖苷透性酶 *lacY* 的情况下，菌株 TCBJ117FL04 无法合成 2'-FL，说明上游途径基因在基因组中表达强度不够。EcN 基因组中，*manC* 和 *manB* 基因位于同一基因簇，*gmd* 和 *wcaG* 基因属于同一基因簇，为了进一步提高这 4 个关键基因的原位表达水平，本研究首先尝试将 *gmd-wcaG* 基因的上游表达元件替换为更强的 P_{119} 启动子和核糖体结合位点 BOX2。而 *manC-manB* 在原位替换过程中屡次缺失或突变，猜测

manC-manB 表达不宜过强，所以随后测试了 P_{119} 启动子与不同强度的 RBS 组合对 *manC-manB* 的表达效果与 2'-FL 产量的影响。强启动子 P_{119} 分别与 4 个不同强度的 RBS 组合对调控蛋白表达表现出不同的效果。P_{119}-RBS4 表达效果最差，工程菌株 TCBJ117FL08 无法合成 2'-FL；P_{119}-RBS1 表达效果最佳，工程菌株 TCBJ117FL05 产生 2.36 $g·L^{-1}$ 2'-FL。本研究亦尝试通过将糖基转移酶基因 *wcfB* 与 *β*-半乳糖苷透性酶基因 *lacY* 的单拷贝或双拷贝表达框整合至基因组，以期构建无需依赖抗生素维持的整合型菌株。然而，所构建的整合菌株在 2'-FL 产量上均未达到理想水平（数据未展示）。分析认为，这很可能是因为质粒系统所具有的高拷贝数特性，在 *α*-1,2-岩藻糖基转移酶 WcfB 本身可溶性表达较低的背景下，能够提供远高于基因组整合的基因数量，从而显著提升其蛋白表达水平。综合当前 2'-FL 生物合成领域的相关报道，无质粒的整合型工程菌在产量上通常与质粒型菌株存在一定差距。因此，为保障后续研究具有更高的产量基准与改造空间，本研究最终决定保留质粒 pCDFDuet-BY 表达系统，并基于菌株 TCBJ117FL05 开展进一步提高 2'-FL 产量的代谢工程与工艺优化研究。

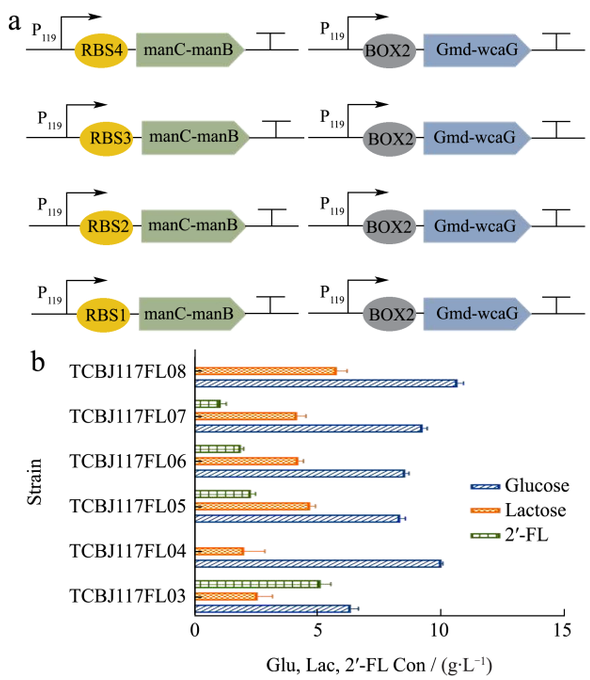


图 2 不同强度 RBS 对 *manCB* 基因表达强度和 2'-FL 合成的影响

Fig.2 The effect of different intensities of RBS on the expression of gene *manCB* and 2′- FL synthesis

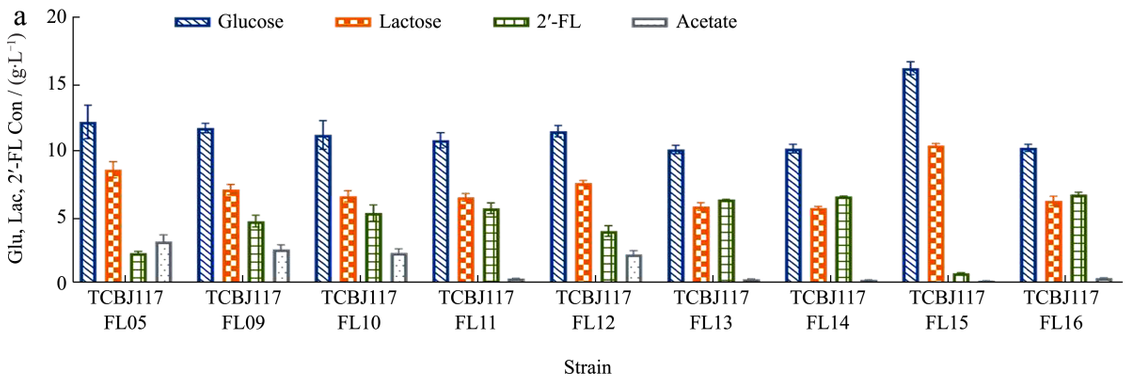
尽管通过加强 2'-FL 合成关键基因成功提高了 GDP-L-岩藻糖合成的碳通量，但竞争途径的存在导致岩藻糖基乳糖合成途径的中间代谢物被分流消耗，6-磷酸果糖通过甘露醇-1-磷酸 5-脱氢酶 *mtlD* 流向甘露糖和果糖途径，参与细胞壁合成的甘露糖水解酶 *NudD* 会水解 GDP-甘露糖。此外，糖酵解副产物乙酸的积累不仅对细胞生长有害，同时也会与 GDP-L-岩藻糖合成竞争碳源。大肠杆菌中主要有两条乙酸合成途径：丙酮酸通过丙酮酸氧化酶 *poxB* 转化为乙酸，乙酰辅酶 A 通过乙酸激酶系统 *pta-ackA* 转化为乙酸[5,22]。本研究进一步验证了这些竞争途径对 2'-FL 发酵合成的影响，如图 3a，分别敲除基因 *nudD*、*mtlD*、*poxB* 和 *pta-ackA*，得到的工程菌株 TCBJ117FL09-TCBJ117FL12 在摇瓶水平产量提高了 1.7~2.4 倍，其中敲除 *poxB* 后产量提升最为明显，2'-FL 可达 5.73 $g·L^{-1}$，且与对照菌株相比，乙酸含量显著下降至 0.45 $g·L^{-1}$，说明丙酮酸氧化酶基因在 EcN 乙酸合成代谢中起关键作用，抑制该途径不仅能减少乙酸积累、降低其对细胞的毒性，同时也有助于将更多碳通量导向 2'-FL 的生物合成。为进一步验证多个竞争途径共同敲除的叠加效应，本研究在 TCBJ117FL11 的基础上，又陆续敲除了 *nudD*、*mtlD* 及 *pta-ackA* 等基因。结果分析表明，同时阻断 EcN 中两条乙酸合成途径后，菌株的葡萄糖代谢紊乱，生长缓慢，2'-FL 产量显著降低，而 *nudD*、*mtlD*、*poxB* 同时敲除不会对菌株生长造成任何负面影响，2'-FL 产量也显著提升至 6.75 $g·L^{-1}$，是 TCBJ117FL05 的 2.85 倍，说明阻断竞争途径能有效提高葡萄糖向 GDP-L-岩藻糖的转化率，从而进一步提高 2'-FL 转化率。

2.3 加强产物外排，促进产物合成

细胞内产物浓度过高往往会表现出生长毒性，产物反馈抑制等问题，从而限制产量进一步提高，是微生物细胞工厂构建中不可忽视的瓶颈。糖类外排蛋白的过表达是促进 2'-FL 分泌至胞外的有效手段，同时还能提高下游产物分离纯化效率，降低成本[2]。大部分外排蛋白属于膜蛋白，表达强度过高会导致细胞膜通透性过高，胞内物质泄漏，不利于菌体生长与产物合成[23]。首先将低拷贝质粒 pCOLADuet 第一个多克隆位点的强启动子 P_{T7} 替换为弱启动子 P_{lac}，然后分别过表达 3 个外排蛋白基因 *setA*、*tpyB*、*M2H*，测试他们对产物合成的影响。另外有研究报道胞内辅因子供给不足是限制酶活和产量的重要原因，过表达 *zwf*、*pntAB* 等基因能有效提高 NADPH 含量，提高产物合成途径通量[24,25]。*Pgi* 基因编码磷酸葡萄糖异构酶，*manA* 基因编码 6-磷酸甘露糖异构酶，它们都是 2'-FL 从头合成途径中的重要基因。为了验证上述因素对工程菌合成 2'-FL 的影响，分别构建了过表达质粒转化

进 TCBJFL16 中，发酵 72 h。摇瓶发酵产量如图 3b，过表达外排蛋白 *setA* 基因对 2'-FL 合成和分泌具有促进作用，TCBJ117FL18 的产量提高了 14.4 wt.%。岩藻糖基乳糖合成代谢的上游途径中由 *pgi* 和 *manA* 催化的反应可能并非限速步骤，这在其他研究者报道中也有相关证据[22,26]，本研究过表达后同样无正向作用。而在 Nissle 1917 中过表达 *zwf*、*pntAB* 的效果与 BL21（DE3）显著不同[2,27]，TCBJ117FL21、TCBJ117FL22、TCBJ117FL23 的产量分别下降了 31.7 wt.%、36.5 wt.%、51.9 wt.%，这可能是由不同种大肠杆菌复杂的葡萄糖代谢调控差异导致的[28]。

工程菌中双表达载体的使用提高了抗生素的添加成本和菌株的代谢压力，所以将糖外排蛋白基因的完整表达框插入 pCDFDuet-BY 中，构建成新的质粒 pCDFDuet-BYA 并转入上文改造的底盘菌株中。对新工程菌株 TCBJ117FL27 的发酵水平进行验证，2'-FL 产量与双质粒工程菌株 TCBJ117FL18 基本持平，测得为 8.02 g·L^{-1}。



Δ*nudD*	−	+	−	−	−	+	−	−	+
Δ*mtlD*	−	−	+	−	−	−	+	−	+
Δ*poxB*	−	−	−	+	−	+	+	+	+
Δ*pta-ackA*	−	−	−	−	+	−	−	+	−

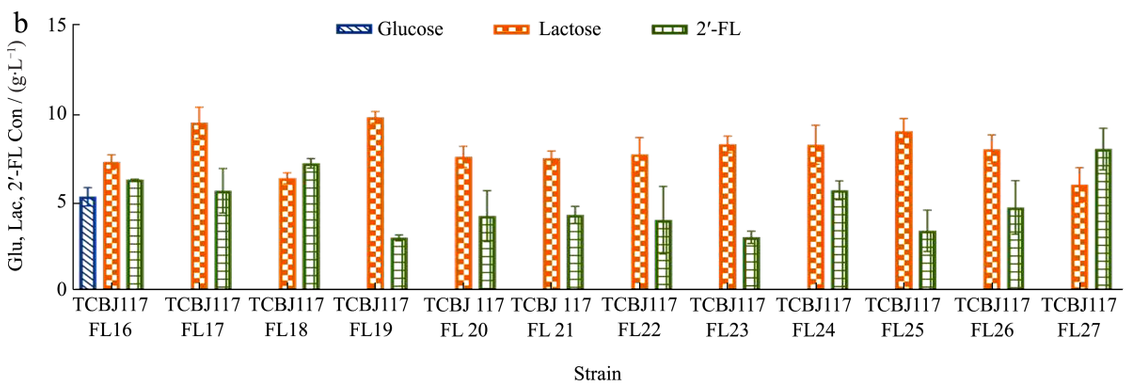


图 3 工程菌株 TCBJ117FL09-TCBJ117FL27 摇瓶发酵水平

Fig.3 The production of engineered strain TCBJ117FL09-TCBJ117FL27 in shaking flask

注：a-TCBJ117FL09-TCBJ117FL12 表示分别表示 *nudD*、*mtlD*、*poxB*、*pta-ackA* 等基因单独敲除对 2'-FL 合成的影响，TCBJ117FL13-TCBJ117FL16 分别表示 *poxB* 与其它基因叠加敲除对 2'-FL 合成的影响；b- 过表达产物外排基因 *setA\tpyB\M2H*、辅因子供给基因 *zwf\pntAB* 或合成途径基因 *pgi\manA* 对 2'-FL 合成的影响。

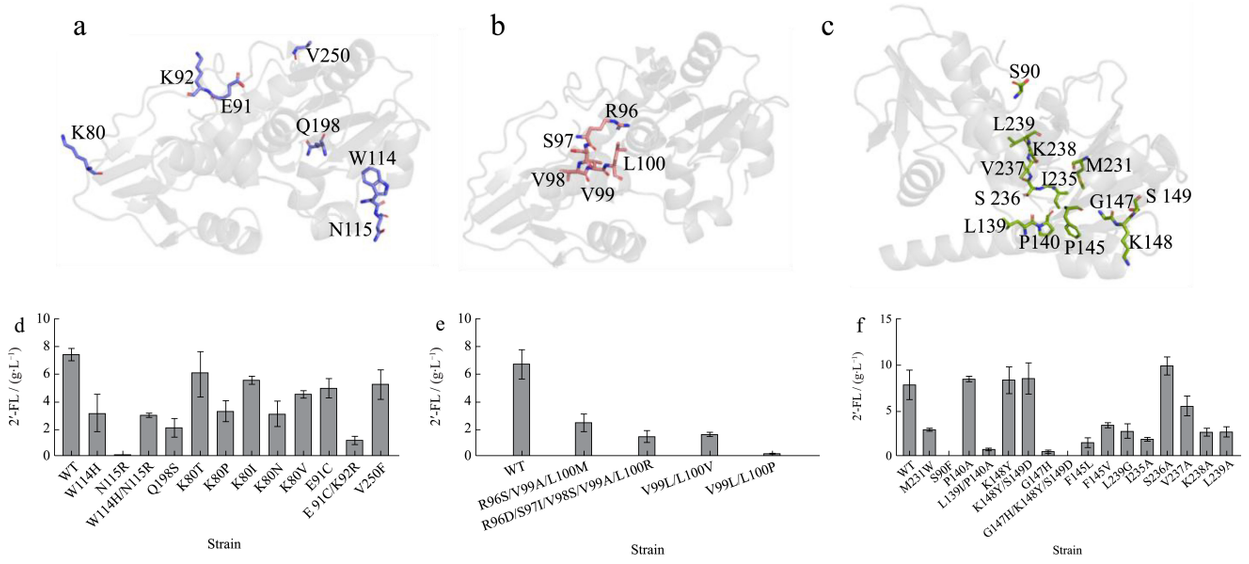


图 4 *wcfB* 突变位点及相应工程菌株的摇瓶发酵水平

Fig.4 The mutants of *wcfB* and the production of the corresponding engineered strain

注：a-非保守氨基酸恢复策略设计的 12 个突变位点及相应的工程菌摇瓶产量；b-针对提高 α 螺旋结构域亲水性设计的 4 组突变位点及相应的工程菌摇瓶产量；c-通过模拟重塑底物结合区域设计的 16 个突变位点及相应的工程菌摇瓶产量。

2.4 基于多序列比对的α-1,2-岩藻糖基转移酶的定向进化

基于计算机筛选和序列分析合理选择突变“热点”氨基酸已普遍成为改进酶催化性能的良好策略[10,29]。脆弱拟杆菌来源的 *wcfB* 包含 864 bp 并编码 287 个氨基酸。迄今为止，未见有和 *wcfB* 同源性较高的 *α*-1,2-FucT 的晶体结构报道。*α*-1,2-岩藻糖基转移酶的酶活不高和在大肠杆菌中可溶性表达不佳是限制 2’-FL 产量进一步提高的关键，而密码子优化只能提高 *wcfB* 在大肠杆菌中的转录效率，无法提高蛋白表达的可溶性。所以为进一步促进 *wcfB* 在大肠杆菌中的正确折叠，首先尝试将 *wcfB* 中的非保守氨基酸恢复为保守氨基酸以促进蛋白可溶性。根据 EVcouplings（https://evcouplings.org/）的识别和推荐，确定了 W114H、N115R、W114H/N115R、Q198S、K80T、K80P、K80I、K80N、K80V、E91C、E91C/K92R、V250F 等 12 种突变体。所有突变体菌株的 2’-FL 产量变化显示在图 4a，与野生型相比均无明显提升，其中 N115R 和 E91/K92R 位点突变甚至导致 *wcfB* 酶活几乎丧失，产量显著下降。

将野生型氨基酸残基替换为遵循 *α*- 螺旋规则和亲水矛盾规则的氨基酸残基是蛋白质工程中用来提高蛋白稳定性和可溶性的常用策略之一[1]。利用 *α*-螺旋规则首先分析了 *wcfB* 中 9 个 *α*-螺旋的氨基酸螺旋轮，通过序列比对鉴定了 *wcfB* 氨基酸序列中的聚合热点是位于 R96-Y103 的 *α*-螺旋结构域。对此 *α*-螺旋结构域进行位点饱和突变计算机模拟及组合突变模拟，筛选出对提高 *α*-螺旋结构域亲水性潜力最高的 4 个突变组合 R96S/V99A/L100M、R96D/S97I/V98S/V99A/L100R、V99G/L100V、V99T/L100P。根据突变结果（图 4b），此 *α*-螺旋结构域的氨基酸残基对 *wcfB* 活性影响较大，突变后可能影响底物结合，产量急剧下降，不适合 2’-FL 的合成和生产。

酶活性中心的氨基酸深度干预底物招募和结合过程，进而影响酶的催化性能[13]。因此，有针对性地设计关键氨基酸来驱动活性中心微环境的改变是功能定制的关键。确定活性中心的范围并重塑底物结合区域可能是提高其催化能力的可行方法。根据 *wcfB* 预测结构与底物模拟结合模型，确定底物结合口袋相关氨基酸残基，利用计算机模拟饱和突变和热力学计算缩小残基候选范围，确定了 M231W、S90F、P140A、L139I/P140A、K148Y、K148Y/S149D、G147H、G147H/K148Y/S149D、F145F、F145V、L239G、I235A、S236A、V237A、K238A、L239A 等 16 个突变体（图 4c）。其中 S236A 突变体在摇瓶测试中表现出较高的 2’-FL 合成能力，产量为 9.92 g·L^{-1}，是野生型的 1.26 倍，基于 wcfB 与底物 GDP-L- 岩藻糖的分子对接分析显示，Ser236 位于底物通道入口处的 loop 区域。根据对接结果推测，将 Ser236 突变为 Ala 可能通过以下两方面机制促进底物结合，从而提升 2’-FL 产量：其一，Ala 较小的侧链能有效降低该位置的空间位阻，拓宽通道入口，有利于底物进入；其二，突变

后消除了 Ser236 原有羟基与相邻残基 His141 之间的氢键，不仅增强了局部疏水性，也提高了 loop 区域的构象柔性，进而形成更利于底物结合的空间构象。该结果一定程度上证实了通道入口 loop 区在底物与酶结合过程中的关键作用，对同类糖基转移酶的理性改造具有借鉴意义，也为后续针对催化效率与底物特异性的酶工程提供了结构基础。

2.5 工程菌在1.5 L发酵罐生产2'-FL

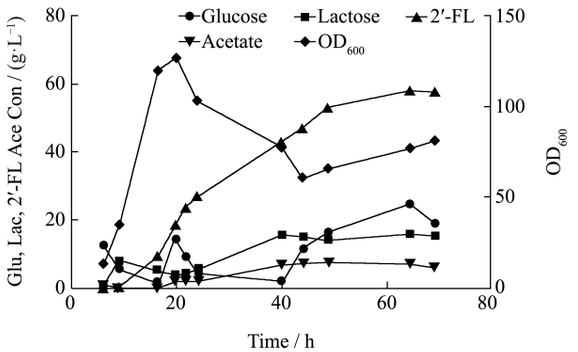


图 5 工程菌 TCBJ117FL28 在 1.5 L 反应器中分批补料发酵水平

Fig.5 The production of the engineered strain TCBJ117FL28 in 1.5 L fed-batch fermentation

将含有 S236A 突变体的工程菌株命名为 TCBJ117FL28 并对其进行 1.5 L 发酵罐小试测试其是否具有大规模生产的潜力。1.5 L 发酵罐预装 500 mL DM 培养基，将培养 6 h 的种子液按 5%（φ）比例接种，此时种子液菌体密度为 5 OD·mL^{-1}。采用对数前期的诱导方式，当菌株培养至 OD_{600}=10~15，加入 0.3 mmol·L^{-1} IPTG 并降温至 25 ℃诱导，发酵过程流加葡萄糖和乳糖，质量浓度都维持在 20 g·L^{-1} 以下。如图 5，诱导后 30 h 内产物快速积累，2'-FL 在发酵 64.3 h 达到最高产量 58 g·L^{-1}。在分批补料发酵过程中，Nissle 1917 工程菌于发酵初期表现出较高的生长速率，菌体密度在 20 h 左右达到峰值，此后呈逐渐下降趋势。分析表明，在以葡萄糖为唯一碳源的该发酵体系中，葡萄糖消耗速率较快，补料量持续累积，这可能是导致菌体密度显著下降的原因之一。此外，诱导剂本身可能具有一定的细胞毒性，且外源蛋白的快速大量表达会给细胞带来较强的代谢负担，两者均可能引起菌体活力下降甚至死亡。目前，发酵工艺尚未充分优化，尤其是诱导剂添加时机与浓度尚未实现菌体生长、蛋白表达与产物合成之间的最佳平衡，这成为限制 2'-FL 产量进一步提升的关键因素。由于 EcN 在葡萄糖为碳源的分批补料发酵方面的研究仍较为有限，其糖代谢分流机制与调控网络尚未明晰，未来研究需进一步解析 EcN 的糖代谢特性，以增强其作为合成生物学底盘的开发深度与应用潜力。

3 结论

本研究首次在大肠杆菌 Nissle 1917 这一非典型模式菌株中成功构建了 2'-岩藻糖基乳糖的完整合成途径。研究发现，途径中各基因的表达需精细协调，而非简单追求高强度表达。通过调控 *manC-manB* 的表达水平，不仅有效增强了前体供应，也为核糖体结合位点（RBS）强度在 Nissle 1917 中的应用提供了参考依据。在合成代谢过程中，支路途径和竞争途径的存在显著分流底物通量，制约主产物的合成效率。为此，本研究通过阻断可拉酸途径与乳糖分解途径，并下调甘露糖和乙酸的合成通路，显著提升了 2'-FL 的合成能力。此外，糖外排蛋白在质粒多拷贝表达后，有效增强了产物分泌能力。

α-1,2- 岩藻糖基转移酶是催化 GDP-L-岩藻糖与乳糖反应生成 2'-FL 的关键酶，其活性对产物产量具有决定性影响。近年来，随着更多来源的该酶被鉴定与应用，相关结构与功能研究日益深入。本研究聚焦该酶的活性中心底物结合区域，通过理性设计筛选获得酶活提升的 S236A 突变体，不仅提高了摇瓶水平下的产量，也为同类酶的分子改造提供了新思路。

最终构建的工程菌株 TCBJ117FL28 在 1.5 L 发酵罐中进行分批补料发酵，64 h 内 2'-FL 产量最高达 58 g·L^{-1}，为目前利用益生大肠杆菌合成人乳寡糖报道中的最高水平，体现了合成生物学在益生菌与益生元融合应用中的新范式。

参考文献

[1] LEE J M, KIM J H, KIM J Y, et al. Enhancing the soluble expression of α-1,2-fucosyltransferase in *E. coli* using high-throughput flow cytometry screening coupled with a split-GFP [J]. Journal of Biotechnology, 2024, 387: 49-57.

[2] HUANG D, YANG K, 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.

[3] DU Z, ZHU Y, LU Z, et al. Combinatorial optimization strategies for 3-fucosyllactose hyperproduction in *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72: 14191-14198.

[4] CHEN Y, ZHU Y, WANG H, et al. De novo biosynthesis of 2'-fucosyllactose in a metabolically engineered *Escherichia coli* using a novel α-1,2-fucosyltransferase from *Azospirillum lipoferum* [J]. Bioresource Technology, 2023, 374: 128818.

[5] LI M, LUO Y, HU M, et al. Module-guided metabolic rewiring for

fucosyllactose biosynthesis in engineered *Escherichia coli* with lactose de novo pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 14761-14770.

[6] ZHU Y Y, CAO H Z, WANG H, et al. Biosynthesis of human milk oligosaccharides via metabolic engineering approaches: current advances and challenges [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78, 102841.

[7] YU J, SHIN J, PARK M, et al. Engineering of *alpha*-1,3-fucosyltransferases for production of 3-fucosyllactose in *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 269-278.

[8] ZHAO C, WU Y, YU H, et al. The one-pot multienzyme (OPME) synthesis of human blood group H antigens and a human milk oligosaccharide (HMOS) with highly active *Thermosynechococcus* elongates *alpha*1-2-fucosyltransferase [J]. Chemical Communications, 2016, 52: 3899-3902.

[9] ZHONG R, GAO L, CHEN Z, et al. Chemoenzymatic synthesis of fucosylated oligosaccharides using *Thermosynechococcus alpha*1-2-fucosyltransferase and their application in the regulation of intestinal microbiota [J]. Food Chemmistry, 2021, X12: 100152.

[10] 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 *alpha* -1,2-Fucosyltransferase for solubility [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119: 1264-1277.

[11] SHINODA S, ITAKURA A, SASANO H, et al. Rational design of the soluble variant of l-pipecolic acid hydroxylase using the *alpha*-helix rule and the hydropathy contradiction rule [J]. ACS Omega, 2022, 7: 29508-29516.

[12] UPADHYAY R, KIM J Y, HONG E Y, et al. RiSLnet: Rapid identification of smart mutant libraries using protein structure network. Application to thermal stability enhancement [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116: 250-259.

[13] LIU W, TANG S, PENG J, et al. Enhancing lactose recognition of a key enzyme in 2′-fucosyllactose synthesis: *α*-1,2-fucosyltransferase [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 103: 1303-1314.

[14] SONNENBORN U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: History of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363: fnw212.

[15] HU S, FEI M, FU B, et al. Development of probiotic *E. coli* Nissle 1917 for *β*-alanine production by using protein and metabolic engineering [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(7): 2277-2288.

[16] HU S, ZHOU S, WANG Y, et al. Coordinated optimization of the polymerization and transportation processes to enhance the yield of exopolysaccharide heparosan [J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 333: 121983.

[17] CHEN H, LEI P, JI H, et al. Advances in *Escherichia coli* Nissle 1917 as a customizable drug delivery system for disease treatment and diagnosis strategies [J]. Materials Today Bio, 2023, 18, Article 100543.

[18] HU S, ZHAO L, HU L, et al. Engineering the probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 as an efficient cell factory for heparosan biosynthesis [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 158: 110038.

[19] 许本宏,王晨舒,连晓雷.基于T7表达系统的Nissle 1917工程菌、其制备方法及应用:202310516515.6[P].2024-11-12.

[20] JIA B L, JEON C O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives [J]. Open Biology, 2016, 6: 160196.

[21] LI M, LI C, LUO Y, et al. Multi-level metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-titer biosynthesis of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose [J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(12): 2970-2981.

[22] TAO Y, CHENG Q, KOPATSIS A D. Metabolic engineering for acetate control in large scale fermentation [J]. Microbial Metabolic Engineering, 2012: 283-303.

[23] LI N, YAN S, XIA H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21(DE3) for 2'-Fucosyllactose synthesis in a higher productivity [J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(2): 441-452.

[24] ZHANG K, GAO M, CAO C, et al. Intensification of 2'-Fucosyllactose biosynthesis pathway by using a novel fucosyltransferase from *Bacillus cereus* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2025, 13: 1569597.

[25] 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: 2784-2796.

[26] HUANG H, YU W, XU X, et al. Combinatorial engineering of *Escherichia coli* for enhancing 3-Fucosyllactose production [J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13: 1866-1878.

[27] WANG L, ZHANG K, GAO S, et al. High-yield synthesis of 2′-Fucosyllactose from glycerol and glucose in engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71: 15237-15248.

[28] REVELLES O, MILLARD P, NOUGAYREDE JP, et al. The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917 [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66386.

[29] 刘梦丽.岩藻糖基乳糖的高效生物合成及限速酶的分子改造研究[D].无锡:江南大学,2023.