

全细胞催化生产 N-乙酰神经氨酸的条件优化

许杨^{1*} 陈芳¹ 林白雪² 陶勇^{2*}

(1. 南昌大学 中德联合研究院 江西 南昌 330047)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 【目的】N-乙酰神经氨酸有多种生物学功能, 其在治疗流感、神经性疾病、炎症和肿瘤等方面具有重要的医药价值。N-乙酰神经氨酸现有的生产方法产量低、成本高, 难以满足医药工业大规模的需求, 因而急需建立一种经济高效的生产方法。【方法】在前期研究中, 构建了一株产 N-乙酰神经氨酸的代谢工程菌(*Escherichia coli* Δ nanTEK/pNA), 本研究通过单因素试验对工程菌生物转化生产 N-乙酰神经氨酸的过程进行优化, 包括工程菌细胞培养条件(培养温度和时间)和全细胞生物转化的各种条件(转化温度、时间、表面活性剂等)。【结果】经过条件优化后, 建立了全细胞催化法生产 N-乙酰神经氨酸的工艺流程, 使 N-乙酰神经氨酸的产量提高到 294.39 mmol/L。【结论】该方法具有操作简便、高效和经济的优势, 为 N-乙酰神经氨酸的规模化生产奠定了基础。

关键词: N-乙酰神经氨酸, 全细胞催化, 大肠杆菌, 生物转化, 条件优化

Optimization of whole-cell biocatalytic process for N-acetylneuraminic acid production

XU Yang^{1*} CHEN Fang¹ LIN Bai-Xue² TAO Yong^{2*}

(1. Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) has important medical value in the

基金项目: 中国科学院院长基金项目(No. Y129011EE1); 中国博士后基金项目(No. 2011M500420)

*通讯作者: 陶勇: Tel: 86-10-64807419; Fax: 86-10-64807419; ✉: taoyong@im.ac.cn

许杨: Tel: 86-791-8329479; ✉: xuyang1951@163.com

收稿日期: 2013-03-06; 接受日期: 2013-04-01

treatment of influenza, the neurological disease. The conventional methods of production have some shortcomings, such as high cost and low yield. So the available resource of Neu5Ac can not meet the large-scale demand of medical industry. **[Methods]** In earlier research, a metabolic engineering bacteria (*Escherichia coli* Δ nanTEK/pNA) has been constructed for the production of Neu5Ac. Whole-cell catalysis was used for the production of Neu5Ac with GlcNAc and pyruvate as the substrate. Culture condition (temperature and time) of *E. coli* Δ nanTEK/ pNA and subsequent biological transformation (temperature, time, Triton X-100 and so on) were studied by single factor experiment. **[Results]** After conditions optimization, the production of Neu5Ac was improved and 294.39 mmol/L of Neu5Ac was obtained. **[Conclusion]** The process can be used for industrial large-scale production of Neu5Ac in terms of convenience, efficiency and economy.

Keywords: N-acetylneuraminic Acid, Whole-cell biocatalysis, *Escherichia coli*, Biotransformation, Conditions optimization

唾液酸, 是一类含有 9 个碳原子并具有吡喃糖结构的酸性氨基糖, 是细胞膜糖蛋白和糖脂的重要组成部分, 广泛存在于动物组织及微生物中^[1]。N-乙酰神经氨酸是唾液酸家族中最主要成员之一, 通常结合在细胞表面复合糖链的非还原端^[2]。N-乙酰神经氨酸具有多样的生物学功能^[3-5], 例如细胞信号传导、细菌和病毒感染及肿瘤转移等, 使其在医药和生物技术产业上的需求

日益增加。

N-乙酰神经氨酸传统的生产方法有天然产物抽提法、化学合成法等^[6-8], 因其产量太低或操作复杂而不适合进行工业化生产。近几年, 用 N-乙酰葡萄糖胺 2-差向异构酶(EC 5.1.3.8 AGE)和 N-乙酰神经氨酸醛缩酶(NanA)酶法合成 N-乙酰神经氨酸(图 1)引起了很大的关注^[9-10], 此法转化率很高, 但也有不足之处, 如复杂的制酶过程和

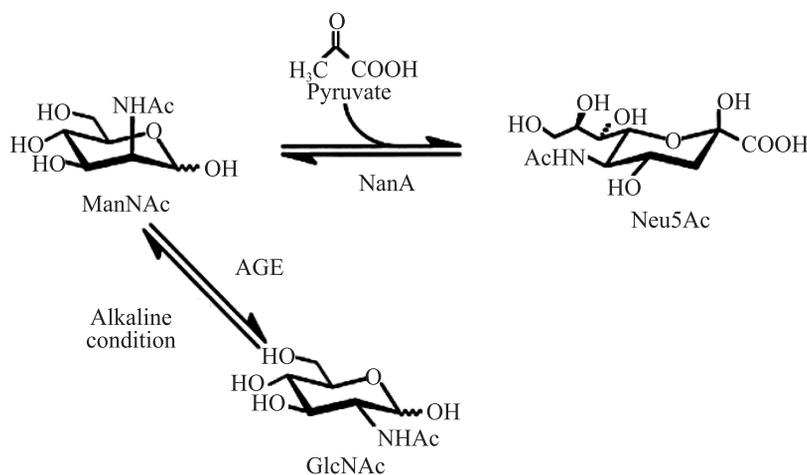


图 1 以 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸为底物合成 N-乙酰神经氨酸的示意图

Fig. 1 Schematic representation of Neu5Ac synthesis from GlcNAc and pyruvate

AGE 需要 ATP 作为活化剂^[11-12]。与分离酶法相比, 全细胞催化法更具有优势: 级联酶反应可同时进行, 催化剂可随时制备, 且由于细胞膜的保护作用而更加稳定。2011 年, Fei Tao 等^[13]用全细胞催化法生产 N-乙酰神经氨酸获得了 191 mmol/L 的产量, 但其生产率仍然偏低, 无法进行低成本高效率的工业化生产。

本文在 Lin B. X 等^[14]的前期工作基础上着重解决影响全细胞催化剂生产过程的关键性因素, 用 HPLC 对生物转化体系中的 N-乙酰神经氨酸进行定量分析, 对 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 的细胞培养和生物转化条件进行了优化研究, 为进一步开发该菌的工业化生产提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 工程菌 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 由本实验室保存^[14]。

1.1.2 主要试剂: 标准品 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸购自 Sigma 公司; 转化底物 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸为国产分析纯试剂, 购于上海晶纯生物有限公司。

1.1.3 自诱导培养基(100 mL): 95.6 mL 的 ZY (1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 高压灭菌); 2 mL 的 50×M (1.25 mol/L 磷酸氢二钠; 2.5 mol/L 氯化铵; 1.25 mol/L 磷酸二氢钾; 0.25 mol/L 硫酸钠, 抽滤后高压灭菌); 2 mL 的 50×5052 (25%甘油; 2.5%葡萄糖; 10%阿拉伯糖, 过滤除菌); 0.2 mL 的硫酸镁(1 mol/L, 高压灭菌); 0.1 mL 的 1 000×微量元素(50 mmol/L 氯化亚铁; 20 mmol/L 氯化钙; 10 mmol/L 氯化镁; 10 mmol/L 硫酸锌; 2 mmol/L 氯化钴、氯化铜、氯化镍、钼酸钠、亚硒酸钠和硼酸; 60 mmol/L 盐酸, 过滤除菌)^[15]。

1.2 方法

1.2.1 工程菌 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 表达条件的

优化: (1) 诱导温度: 将 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 接种于 250 mL 的摇瓶, 于 37 °C 培养至 OD_{600} 达到 0.5–0.6 后, 再分别在 16 °C、30 °C 和 37 °C 进行诱导培养, 离心后用生理盐水洗涤 2 次, 用转化底物重悬菌体(OD_{600} 为 20), 30 °C 转化 16 h (3 次平行)。转化底物为 N-乙酰葡萄糖胺 0.4 mol/L, 丙酮酸 0.8 mol/L, Triton X-100 1%。取样进行 SDS-PAGE 分析, 通过 HPLC 检测分析转化的底物、中间产物和终产物。(2) 诱导时间: 确定诱导温度为 37 °C, 对诱导时间进行优化(0、12、14、16、18、24 h), 其他条件同 1.2.1(1)。

1.2.2 工程菌 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 转化条件的

优化: (1) 转化温度: 诱导培养温度为 37 °C, 时间为 16 h, 优化转化温度(20 °C、25 °C、30 °C、35 °C), 转化底物为 N-乙酰葡萄糖胺 0.6 mol/L, 丙酮酸 0.8 mol/L, Triton X-100 1%, 其他条件同 1.2.1(1)。(2) 转化时间: 确定转化温度为 30 °C, 优化转化时间(0、12、14、16、18、24、36 h), 其他条件同 1.2.2(1)。(3) 表面活性剂 Triton X-100: 确定转化温度为 30 °C, 转化时间为 16 h, 优化表面活性剂的用量(0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%), 其他条件同 1.2.2(1)。(4) Triton X-100 预处理菌体: 在相同条件下培养后的菌液离心收集菌体, 先用 0.85% NaCl 将菌体洗涤 1 次, 再用含有 0.4% Triton X-100 的 0.85% NaCl 预处理菌体, 静置时间分别为 0、0.5、1.0 和 2.0 h, 所用的转化底物中不再添加 Triton X-100。其他转化条件同 1.2.2(3)。以转化底物中加入 0.4% 的 Triton X-100 为对照。(5) 转化体系中菌体浓度: 细菌经诱导离心后收集菌体, 用转化底物重悬菌体, 使得转化体系中最终 OD_{600} 分别为 5、10、20、30、50。转化底物中加入 0.4% Triton X-100, 其他转化条件同 1.2.2(3)。

1.2.3 蛋白电泳样品处理: 离心收集诱导表达的菌体(4 OD), 重悬于 400 μ L 磷酸盐缓冲液

(20 mmol/L, pH 7.2), 超声波破碎细胞。4 °C、8 500 r/min 离心 15 min, 收集上清。取 100 μ L 上清, 加入 2 \times 蛋白上样缓冲液 100 μ L, 沸水处理 5 min。沉淀用 400 μ L 去离子水重悬, 取 100 μ L 重悬液, 加入 2 \times 蛋白上样缓冲液 100 μ L, 沸水处理 5 min。上清和沉淀各上样 10 μ L, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 分析测定方法: 生物转化反应中转化底物 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸的量及转化产物 N-乙酰神经氨酸的含量采用 HPLC 的方法进行测定。转化反应液离心后收集上清, 用去离子水稀释 400 倍, 再用 0.22 μ m 的滤膜过滤后即可上样, 上样量为 10 μ L。色谱柱为 Aminox HPX-87H Lon Exclusion Column (300 mm \times 7.8 mm), 流动相为 6 mmol/L 的 H₂SO₄, 柱温为 65 °C, 流速为 0.55 mL/min, 紫外检测波长为 210 nm。采用外标法绘制标准曲线对转化体系中的底物、中间产物和终产物进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 诱导温度的影响

诱导温度对 AGE 和 NanA 表达的影响如图

2A 所示, 结果显示, *E. coli* Δ nanTEK/pNA 在 16 °C 诱导时, AGE 和 NanA 表达最弱, 在 37 °C 诱导时, AGE 和 NanA 的表达最强。从图 2B 的转化结果中发现, 16 °C 诱导的菌转化效果不好, 仍有大量的底物存在, N-乙酰甘露糖胺和 N-乙酰神经氨酸的产量低, 分别为 42.7 mmol/L 和 13.7 mmol/L。然而, 比较 30 °C 和 37 °C 诱导后菌的转化结果, 发现前者产生的 N-乙酰甘露糖胺比后者要多, 因此推测在 30 °C 诱导的菌, NanA 的表达量不够, 从而使得 N-乙酰神经氨酸的产量偏低; 在 37 °C 诱导的菌经过转化可得到 157.4 mmol/L 的 N-乙酰神经氨酸。

2.2 诱导时间的影响

不同诱导时间对 AGE 和 NanA 表达的影响如图 3A 所示, 工程菌 *E. coli* Δ nanTEK/pNA 在诱导不同时间取样, AGE 和 NanA 的表达量均没有显著影响, 然而对后期 N-乙酰神经氨酸的生物转化却影响颇大, 如图 3B 所示, 诱导 10 h 的菌 N-乙酰神经氨酸的产量只有 31.4 mmol/L, 而中间产物 N-乙酰甘露糖胺的产量已达到 150 mmol/L。在诱导 14 h 时, N-乙酰甘露糖胺的量大大下降, N-乙酰神经氨酸的量显著上升, 诱导 14 h 后, 两

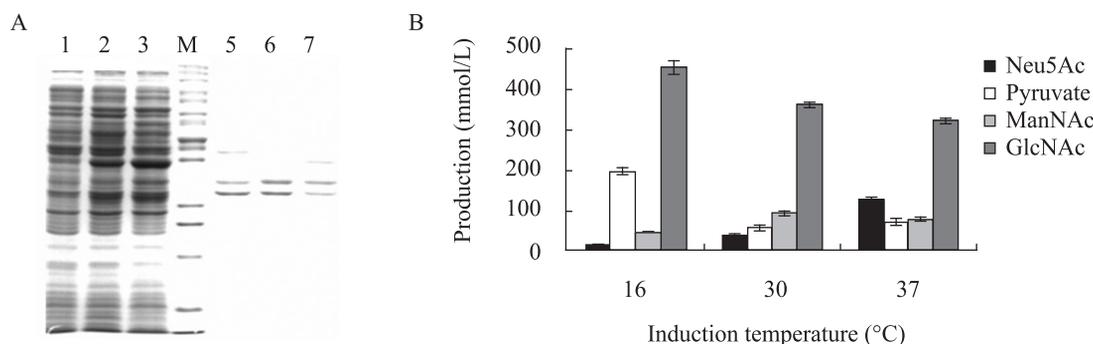


图 2 *E. coli* Δ nanTEK/pNA 不同诱导温度的 SDS-PAGE 分析(A)及其对 N-乙酰神经氨酸生产的影响(B)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of *E. coli* Δ nanTEK/pNA induced by various temperature (A) and effects of the temperature of induction on the production of Neu5Ac (B)

注: A: M: 蛋白 Marker; 1、5: 16 °C 诱导的上清与沉淀蛋白; 2、6: 30 °C 诱导的上清与沉淀蛋白; 3、7: 37 °C 诱导的上清与沉淀蛋白。

Note: A: M: Molecular mass standard; 1, 5: The supernatant and precipitation protein induced at 16 °C; 2, 6: The supernatant and precipitation protein induced at 30 °C; 3, 7: The supernatant and precipitation protein induced at 37 °C.

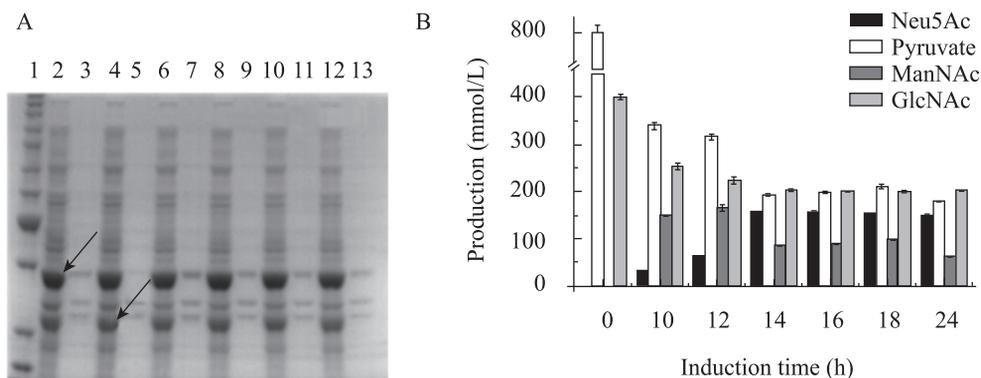


图3 *E. coli* Δ nanTEK/pNA 不同诱导时间的 SDS-PAGE 分析(A)及其对 N-乙酰神经氨酸生产的影响(B)
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *E. coli* Δ nanTEK/pNA induced by various hours (A) and effects of the time of induction on the production of Neu5Ac (B)

注: A: 1: 蛋白 Marker; 2, 3: 诱导 10 h 的上清与沉淀蛋白; 4, 5: 诱导 12 h 的上清与沉淀蛋白; 6, 7: 诱导 14 h 的上清与沉淀蛋白; 8, 9: 诱导 16 h 的上清与沉淀蛋白; 10, 11: 诱导 18 h 的上清与沉淀蛋白; 12, 13: 诱导 24 h 的上清与沉淀蛋白。

Note: A: 1: Molecular mass standard; 2, 3: The supernatant and precipitation protein induced by 10 h; 4, 5: The supernatant and precipitation protein induced by 12 h; 6, 7: The supernatant and precipitation protein induced by 14 h; 8, 9: The supernatant and precipitation protein induced by 16 h; 10, 11: The supernatant and precipitation protein induced by 18 h; 12, 13: The supernatant and precipitation protein induced by 24 h.

者的量无明显变化, 整个转化反应趋于平衡。经自诱导 16 h 的菌生物转化所得到的 N-乙酰神经氨酸产量最高, 达 157.4 mmol/L。

结果表明, 自诱导 10 h 后 NanA 的表达量已经平衡, 但活性不够, 使 N-乙酰甘露糖胺无法及时向 N-乙酰神经氨酸转化; 到 14 h 后 NanA 的活性有所提高, 转化反应正常进行。推测 NanA 表达后还需要一定的折叠过程才能进行正常的催化反应。

2.3 转化温度的影响

酶催化反应对温度比较敏感, 由图 4 可以看出, 在 30 °C 的转化, N-乙酰神经氨酸的产量达到 226.2 mmol/L。当转化温度为 25 °C 时, N-乙酰神经氨酸的产量略高。考虑到 25 °C 需要制冷, 会增加 N-乙酰神经氨酸的生产成本, 而 30 °C 与 25 °C 时, 产量差异较小, 因此, 选择 30 °C 为 N-乙酰神经氨酸生物转化的温度。

2.4 转化时间的影响

在转化不同的时间取样, 结果如图 5 所示, 在转化 10 h 后, N-乙酰神经氨酸的产量已达到了

233 mmol/L, N-乙酰甘露糖胺的量为 50 mmol/L 左右, 在之后的 8 h 里产量几乎保持不变, 即转化反应处于平衡状态, 最高产量达到 238.1 mmol/L。然后在转化 24 h 后, N-乙酰神经氨酸的产量有所下降, 而转化底物 N-乙酰葡萄糖胺的量稍微有所上升, 推测其原因可能是随着转化时间的延长, 菌体消耗丙酮酸的量变大, 反应体系中丙酮酸的总量减少后, 导致整个转化向逆向进行, 即 N-乙酰神经氨酸部分分解为转化底物 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸。

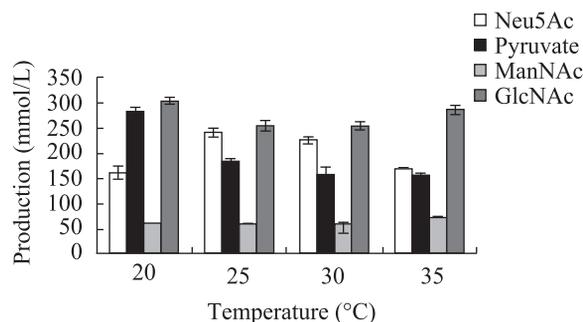


图4 生物转化温度对 N-乙酰神经氨酸生产的影响
Fig. 4 Effects of the temperature of bioconversion on the production of Neu5Ac

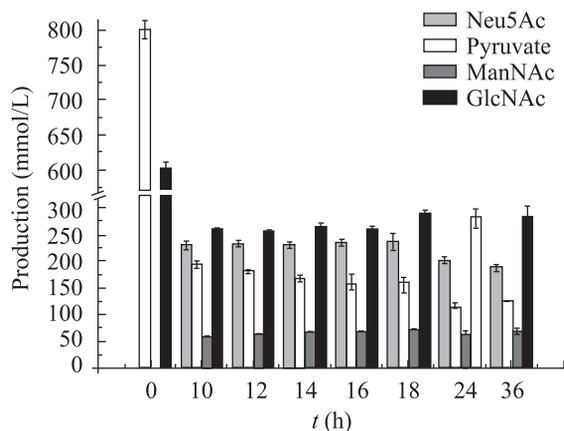


图5 生物转化时间对 N-乙酰神经氨酸生产的影响

Fig. 5 Effects of the time of bioconversion on the production of Neu5Ac

2.5 表面活性剂 Triton X-100 对生物转化的影响

对于小的亲水性分子(分子质量<600 Da), 如丙酮酸和 N-乙酰甘露糖胺, 细胞内膜是渗透的主要障碍^[16]。据报道, 用表面活性剂和有机溶剂等某些化合物对膜进行透化, 能够提高 N-乙酰神经氨酸的产量^[17-18]。表面活性剂的浓度在低于临界胶束浓度的情况下可以提高细胞膜的通透性而不破坏细胞膜^[19]。为提高转化底物进入细胞的能力, 在转化底物中加入表面活性剂 Triton X-100, 并对 Triton X-100 的量进行了优化。从图 6 中可以看出, 当 Triton X-100 的用量为 0.4% 时, 转化效果较好, N-乙酰神经氨酸的产量达到了 235.1 mmol/L。

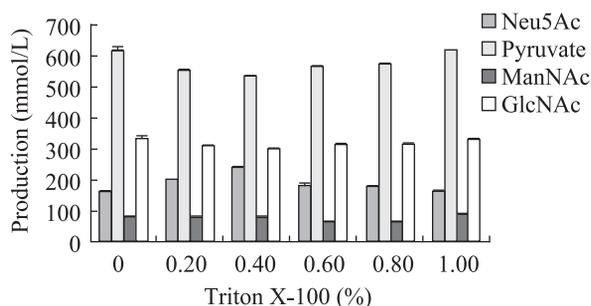


图6 表面活性剂 Triton X-100 的量对 N-乙酰神经氨酸生产的影响

Fig. 6 Effects of the amount of Triton X-100 on the production of Neu5Ac

Triton X-100 对菌体的作用时间过长, 细胞的通透性太大可能使胞内的酶渗漏出细胞, 既对菌体细胞伤害较大, 又不利于反应的正向进行。因此用 Triton X-100 对菌进行预处理, 再用底物重悬进行生物转化以减少其对菌体的伤害。Triton X-100 的预处理时间对生物转化的影响如图 7 所示, 从图 7 中可以看出, 用 Triton X-100 预处理菌 0.5 h 时, 菌的生物转化效果最好, N-乙酰神经氨酸的产量达到了 237.6 mmol/L, 与直接在转化底物中加 Triton X-100 的转化效果 (235.1 mmol/L) 接近。考虑到生产的便利性, 可选择直接在转化底物中加 Triton X-100 的转化方法。

2.6 转化体系中菌体 OD_{600} 对生物转化的影响

并非菌体量越大对生物转化就越有利, 因为菌体量越大, 底物丙酮酸被菌体代谢消耗的量就越多。图 8 为底物重悬菌体 OD_{600} 对转化效率的影响。从图 8 中可以看出, OD_{600} 为 30 时, N-乙酰神经氨酸的产量最高, 达 294.39 mmol/L。

3 结论

针对目前 N-乙酰神经氨酸生产的高成本、低效率问题, 采用全细胞催化的生物转化法将廉价的底物转化为 N-乙酰神经氨酸。与耦联的全细胞

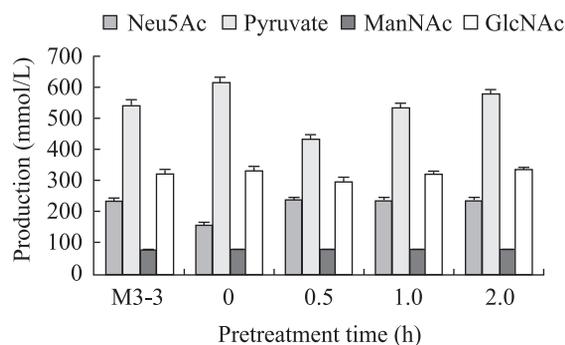


图7 表面活性剂 Triton X-100 预处理菌体时间对 N-乙酰神经氨酸生产的影响

Fig. 7 Effects of the time of pretreatment by Triton X-100 on the production of Neu5Ac

注: M3-3: 转化底物中加入 0.4% 的 Triton X-100。

Note: M3-3: The substrate containing 0.4% Triton X-100.

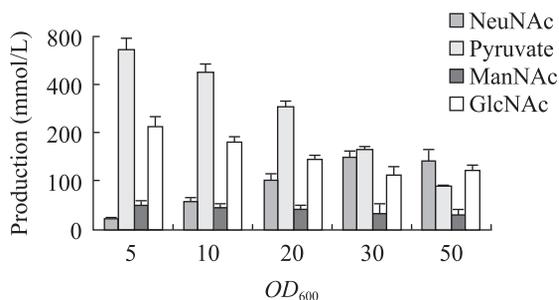


图 8 转化体系中菌体 OD_{600} 对 N-乙酰神经氨酸生产的影响

Fig. 8 The yield of Neu5Ac in different cell density

催化法相比, 大大降低了由细胞膜引起的传质阻力, 并防止了 N-乙酰甘露糖胺的渗漏。突变株 *E. coli* $\Delta nanTEK$ 有利于减少 N-乙酰甘露糖胺的副反应并防止细胞外的 N-乙酰神经氨酸重新进入细胞内, 从而促进 N-乙酰甘露糖胺向 N-乙酰神经氨酸转化。

以 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 作为全细胞催化剂, 以 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸作为转化底物生产 N-乙酰神经氨酸, 对 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 的培养条件及生物转化条件进行了优化, 使底物 N-乙酰葡萄糖胺和丙酮酸尽可能向 N-乙酰神经氨酸转化。经结果分析, 较优的生产体系为 *E. coli* $\Delta nanTEK/pNA$ 在 37 °C 诱导发酵 16 h 后收集菌体, 用 0.6 mol/L N-乙酰葡萄糖胺, 0.8 mol/L 丙酮酸的转化底物^[14]重悬, 加入 0.4% 表面活性剂 Triton X-100, 菌体最终 OD_{600} 为 30, 在 30 °C 转化 16 h。

经过条件优化, 建立了全细胞催化法生产 N-乙酰神经氨酸的工艺流程, N-乙酰神经氨酸的产量为 294.39 mmol/L, 较 Mari Ishikawa 等^[20] (171.37 mmol/L) 和 Fei Tao 等^[13] (191 mmol/L) 分别提高了 71.79% 和 54.14%, 比优化前的产量 (240 mmol/L) 提高了 23.3%。该方法具有操作简便、高效和经济的优势, 为 N-乙酰神经氨酸的规模化生产奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Iijima R, Takahashi H, Namme R, et al. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger[J]. FEBS Letters, 2004, 561: 163–166.
- [2] Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research[J]. Glycoconjugate Journal, 2000, 17: 485–499.
- [3] Chen X, Varki A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids[J]. ACS Chemical Biology, 2010, 5(2): 163–176.
- [4] Kawai N. Comparison of the effectiveness of Zanamivir and Oseltamivir against influenza A/H1N1, A/H3N2, and B[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 48: 996–997.
- [5] Bing W. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 74(4): 510–515.
- [6] Koketsu M, Juneja LR, Kawanami H, et al. Preparation of N-acetylneuraminic acid form delipidated egg yolk[J]. Glycoconjugate Journal, 1992, 9: 70–74.
- [7] Zhan X, Zhu L, Wu J, et al. Production of polysialic acid from fed-batch fermentation with pH control[J]. Biochemical Engineering, 2002, 11(2): 201–204.
- [8] Maru I, Ohnishi J, Ohta Y, et al. Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase[J]. Bioscience Bioengineering, 2002, 93: 258–265.
- [9] Wang TH, Chen YY, Pan HH, et al. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid using two sequential enzymes overexpressed as double-tagged fusion proteins[J]. BMC Biotechnology, 2009, 9: 63.
- [10] Hu S, Chen J, Yang Z, et al. Coupled bioconversion for preparation of N-acetyl-D-neuraminic acid using immobilized N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid lyase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(5): 1383–1391.
- [11] Lee YC, Chien HC, Hsu WH. Production of

- N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant whole cells expressing *Anabaena coli* N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid lyase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129: 453-460.
- [12] Tao F, Zhang Y, Ma C, et al. Biotechnological production and applications of N-acetyl-D-neuraminic acid: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1281-1289.
- [13] Tao F, Zhang YN, Xu P, et al. One-pot bio-synthesis: N-acetyl-D-neuraminic acid production by a powerful engineered whole-cell catalyst[J]. *Scientific Reports*, 2011, 142: 1-7.
- [14] Lin BX, Zhang ZJ, Tao Y, et al. Enhanced production of N-acetyl-D-neuraminic acid by multi-approach whole-cell biocatalyst[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013.
- [15] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. *Protein Expression and Purification*, 41: 207-234.
- [16] Chen RR. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74: 730-738.
- [17] Tabata K, Koizumi S, Endo T. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by coupling bacteria expressing N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid synthetase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30: 327-333.
- [18] Xu P, Qiu JH, Zhang YN, et al. Efficient whole-cell biocatalytic synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 349: 1614-1618.
- [19] Le Maire M, Champeil P. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1508: 86-111.
- [20] Ishikawa M, Koizumi S. Microbial production of N-acetylneuraminic acid by genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(18): 2605-2609.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行人,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2013 年每册定价 58 元,全年 696 元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413