

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-051

## 硫酸软骨素及其寡聚糖的生物合成进展

张瑾<sup>1,2,3</sup>, 张维娇<sup>1,2,3</sup>, 熊海波<sup>1,2,3</sup>, 谢专<sup>1,2,3</sup>, 胥睿睿<sup>1,2,3</sup>, 康振<sup>1,2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>江南大学, 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122; <sup>3</sup>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 2141223; <sup>4</sup>江苏省合成生物基础研究中心, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 是一类广泛存在于动物结缔组织中的糖胺聚糖, 具有良好的抗炎、保水、抗氧化等多种生物活性, 广泛应用于关节保健品、化妆品及医药等领域。然而, 传统的动物组织提取工艺面临分子量不均一、潜在病原体风险、工艺周期长、环境污染等问题, 难以满足高标准应用领域对产品纯度与安全性的要求。随着合成生物学的发展, 利用工程化微生物实现CS的绿色制造已经成为研究热点。通过在微生物细胞工厂中重构CS前体合成路径和构建高效硫酸化修饰体系, 已初步实现CS的可控生物合成, 并通过引入CS降解酶实现了CS寡聚糖的制备。本综述系统梳理了CS的生物合成研究进展, 重点讨论了前体软骨素合成途径优化及关键酶元件设计优化、CS的生物合成体系构建与优化及寡聚糖的精准制备技术。基于这些最新的研究进展, 本文深入分析了CS及其寡聚糖生物合成面临的主要挑战, 包括前体供应不足、硫酸基转移酶催化活性及稳定性差、软骨素糖链聚合与硫酸化修饰的时空协同调控不明确, 以及CS寡聚糖制备中水解酶催化效率低下等问题, 并对CS及其寡聚糖生物合成研究的未来发展方向进行了展望: 未来研究应着力通过动态代谢调控、人工智能辅助酶改造以及合成生物学与酶工程的深度融合, 实现CS绿色、高效的规模化生产及推进其在多领域的创新应用。

**关键词:** 硫酸软骨素; 软骨素; 硫酸基供体; 硫酸基转移酶; 代谢工程; 合成生物学

中图分类号: Q815 文献标志码: A

## Research advances in biosynthesis of chondroitin sulfate and its oligosaccharides

ZHANG Jin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Weijiao<sup>1,2,3</sup>, XIONG Haibo<sup>1,2,3</sup>, XIE Zhuan<sup>1,2,3</sup>, XU Ruirui<sup>1,2,3</sup>, KANG Zhen<sup>1,2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; <sup>2</sup>Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; <sup>4</sup>Jiangsu Province Basic Research Center for Synthetic Biology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Chondroitin sulfate (CS) is a type of glycosaminoglycan widely distributed in animal connective tissues,

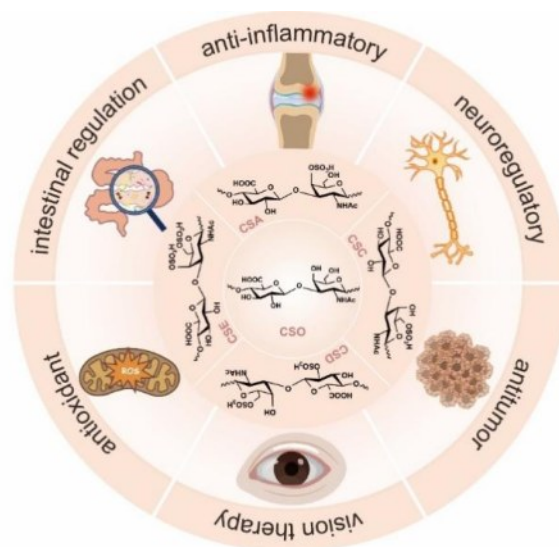
收稿日期: 2025-05-29 修回日期: 2025-08-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFF1106300); 国家自然科学基金项目 (32400056); 江苏省合成生物基础研究中心资助项目 (BK20233003); 江苏省基础研究计划自然科学基金-青年基金项目 (BK20241616); 国家资助博士后研究人员计划项目 (GZC20240607); 江南大学至善青年 (JUSRP622003)

引用本文: 张瑾, 张维娇, 熊海波, 谢专, 胥睿睿, 康振. 硫酸软骨素及其寡聚糖的生物合成进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-051

Citation: ZHANG Jin, ZHANG Weijiao, XIONG Haibo, XIE Zhuan, XU Ruirui, KANG Zhen. Research advances in biosynthesis of chondroitin sulfate and its oligosaccharides[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-051

characterized by diverse biological activities including anti-inflammatory, moisturizing, and antioxidant effects. Owing to these beneficial properties, CS has been extensively utilized in joint health supplements, cosmetics, and pharmaceuticals. Traditionally, CS is extracted from animal tissues. However, this conventional extraction process presents several significant challenges, including heterogeneity in molecular weight, potential risks of pathogen contamination, long production cycles, and environmental pollution caused by chemical reagents and waste disposal. Such issues limit the ability of animal-derived CS to meet the stringent purity, safety, and quality standards required in high-end applications, especially in precision medicine and advanced biomaterials. With the rapid advancement of synthetic biology, the green and sustainable production of CS using engineered microbial cell factories has emerged as a key area of research. By reconstructing the CS precursor synthesis pathway and constructing an efficient sulfation modification system in microbial cell factories, the controlled biological synthesis of CS has been initially achieved, and the preparation of CS oligosaccharides has been realized by introducing CS degrading enzymes. This microbial synthesis approach not only addresses safety and environmental concerns but also offers advantages in scalability, product consistency, and cost-effectiveness. This review article provides a comprehensive summary of recent progress in biosynthesis of CS. It focuses on analyzing the optimization strategies for the synthesis pathways of chondroitin precursors and the design and engineering of key enzyme components. It delves deeply into the construction of the CS biosynthetic system and the multi-level optimization approaches. Meanwhile, the paper also provides a detailed introduction to the precise preparation processes of CS oligosaccharides, laying a solid foundation for achieving biosynthesized CS with highly consistent structural and functional properties. Based on these latest research advancements, this paper thoroughly analyzes the main challenges faced in the biosynthesis of CS and its oligosaccharides, including inadequate supply of precursors, insufficient catalytic activity and stability of sulfotransferase, unclear spatiotemporal coordination regulation of chondroitin sulfate glycan chain polymerization and sulfation modification, as well as low catalytic efficiency of hydrolysis enzymes in oligosaccharide preparation. It also provides a perspective on the future development direction of CS biosynthesis research: future studies should focus on achieving green and efficient large-scale production of CS and promoting its innovative applications in multiple fields through dynamic metabolic regulation, artificial intelligence-assisted enzyme modification, and the deep integration of synthetic biology and enzyme engineering.



**Keywords:** chondroitin sulfate; chondroitin; sulfonate donor; sulfotransferases; metabolic engineering; synthetic biology

硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 是一种天然的硫酸化糖胺聚糖, 广泛分布于动物的骨骼、软骨、韧带和皮肤组织等部位, 在维持组织机械性能、调控细胞信号传导和促进细胞分化等方面发挥关键作用<sup>[1-3]</sup>。此外, CS 不仅具备良好的生物相容性和可降解性, 还具有抗炎、抗凝血、抗肿瘤等多种生物学活性<sup>[4]</sup>。目前, 其已被用于多种临床制剂中, 如抗骨关节炎制剂<sup>[5]</sup>、滴眼液<sup>[6]</sup>、调血脂药物及抗动脉粥样硬化药物等<sup>[7]</sup>。同时, CS 也因其理想的材料性质, 被广泛应用于组织工程支架、药物递送载体及医美填充材料等新兴领域<sup>[8]</sup>。CS 市场前景广阔, 2024 年全球市场规模达 13.10 亿美元, 预计到 2032 年硫酸软骨素市场规模将达到 16.50 亿美元 (<https://www.gonyn.com/industry/1838760.html>)。中国作为全球最大的 CS 原料生产和出口国, 在该领域占据重要地位<sup>[9]</sup>。

目前 CS 的工业化生产主要依赖于动物组织提取法, 但通过该方法生产动物源 CS 存在一些问题<sup>[10]</sup> (图 1), 包括: (i) 产物异质性显著, 原料的种类来源不同和提取工艺的差异会导致产物中含有不同分子量与不同亚型的 CS, 且易伴随其他糖胺聚糖 (如硫酸皮肤素) 的污染<sup>[11]</sup>; (ii) 生产工艺环境不友好, 目前工业生产中主要采用的生产方法有碱提醇沉法、酶解-超滤法、酶解-树脂法<sup>[12]</sup>, 这些方法大多需要高温或强酸和强碱处理条件, 能耗大, 污染重, 而其它提取方法提取率低、成本高, 并存在病毒污染和致敏蛋白残留风险; (iii) 原料来源受限, 受动物生长周期制约, 且不符合素食主义和伊斯兰教/犹太教饮食规范。

近年来, 合成生物学技术为 CS 生产提供了创新解决方案。通过重构 CS 合成途径、优化硫酸化修饰系统以及探索 CS 寡聚糖制备, 可实现分子量均一、硫酸化位点精确的 CS 合成。该技术生产的 CS 安全性高、纯度高, 且生产过程绿色环保, 无需高温或投入大量酸碱, 兼具生产周期短、规模化程度高及成本优势, 为医药级硫酸软骨素的标准化与绿色化生产奠定了坚实的技术基础。

本文系统综述了 CS 及其寡聚糖的生物合成机制与进展。首先, 解析了 CS 前体——软骨素的天然生物合成途径; 进而, 系统阐述了合成生物学技术在软骨素合成途径优化、硫酸化修饰设计及 CS 寡聚糖合成中的应用; 最后, 在总结 CS 生物合成研究进展的基础上, 分析了目前 CS 生物合成所面临的挑战并展望了未来研究的发展方向。

## 1 CS 的结构与性质

### 1.1 CS 的结构与分类

CS 是由软骨素 (chondroitin) 经硫酸化修饰形成的糖胺聚糖, 其结构由葡糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA) 和 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 经  $\beta$ -1,3 和  $\beta$ -1,4 糖苷键交替连接聚合而成。根据硫酸化位点的不同, CS 可分为五种主要类型: CSO (未硫酸化)、CSA (GalNAc-4-*O*-硫酸化)、CSC (GalNAc-6-*O*-硫酸化)、CSD (GalNAc-2,6-*O*-双硫酸化) 和 CSE (GalNAc-4,6-*O*-双硫酸化)<sup>[13]</sup> (图 2)。研究表明, 不同来源的

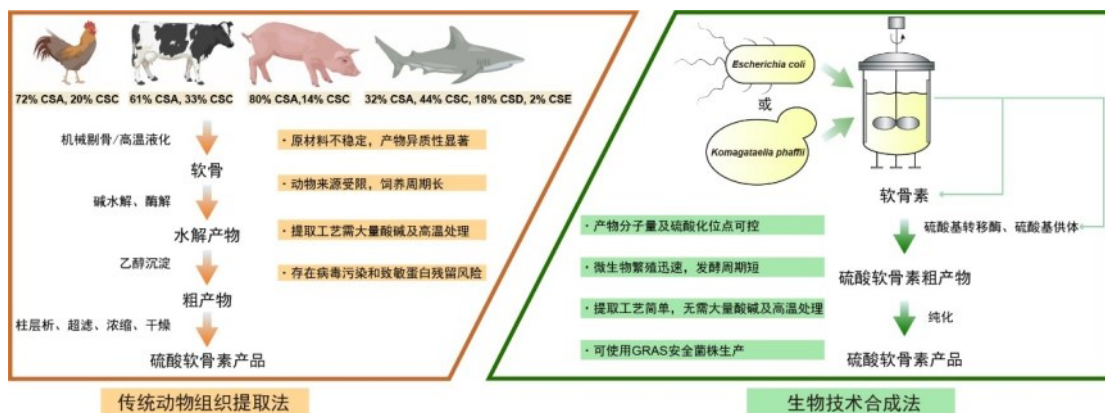


图 1 传统动物组织提取法与生物技术合成法

Fig. 1 Traditional animal tissue extraction method and biotechnological synthesis method

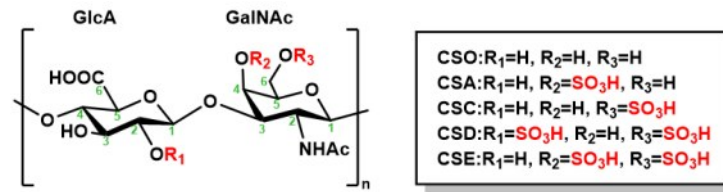


图2 CS的化学结构

Fig.2 Chemical structures of CS

CS具有显著分布特异性：CSA主要存在于陆地动物体内，如牛和猪的组织中富含CSA<sup>[14]</sup>。CSC、CSD和CSE则在海洋生物体内占有较高比例<sup>[15]</sup>，如鲨鱼和鱿鱼组织<sup>[16-17]</sup>。值得注意的是，在差向异构酶作用下，GlcA可转化为艾杜糖醛酸(DoUA)，经硫酸化修饰后形成结构类似的硫酸皮肤素(dermatan sulfate, DS)，其硫酸化位点主要位于DoUA的C-2位及GalNAc的C-4/6位。

## 1.2 CS的性质与应用

CS作为糖胺聚糖家族中的一员，分子中带有大量的羧基和硫酸盐基团，因此具有强阴离子电荷和亲水性。多阴离子特性使其能够与金属离子、细胞质基质中的蛋白质或其它带正电荷的底物相互作用，发挥各式各样的功能<sup>[18, 7]</sup>。CS的生物活性与功能受其分子量和硫酸化模式影响。天然中存在的CS分子量主要在50 kDa~100 kDa之间<sup>[19]</sup>，经过提取后的分子量范围一般为14 kDa~70 kDa<sup>[20]</sup>。高分子量CS(>50 kDa)因其高黏度和结构稳定性，在组织工程(如骨再生支架)中具有重要应用价值，例如制备成水凝胶的CS既具有抗炎特性也能促进细胞生长，还具有生物可降解性，在支持骨再生的生物材料应用上有着巨大的潜力<sup>[21]</sup>。相比之下，低分子量CS(<10 kDa)则表现出优异的组织渗透性和生物利用度，更容易被肠道或皮肤吸收，因此广泛应用于抗炎治疗、肠道菌群调节及化妆品制备等领域<sup>[5, 22-23]</sup>。在硫酸化模式多样的CS当中，由于硫酸盐基团数量和位置的差异，不同的CS具有不同程度的电荷密度，导致其生理功能也各有不同。CSA和CSC主要作为药物治疗骨关节炎并具有促进软骨再生的作用<sup>[5]</sup>，同时具备抗氧化和降脂活性，其中研究发现CSC的体外抗氧化与降脂活性显著优于

CSA<sup>[24]</sup>。CSD和CSE对于大脑的发育有着重要作用，能够促进神经元的生长<sup>[25-26]</sup>。此外，CSD在调节肝组织代谢方面起着重要作用<sup>[27]</sup>，CSE也被发现具有抑制肿瘤转移的活性<sup>[28]</sup>，并且还能作为血管稳态和血管生成的调节因子<sup>[29]</sup>。

## 2 软骨素微生物合成进展

天然微生物中几乎无法直接合成CS，但部分微生物能够合成其前体——未硫酸化的软骨素或相同碳骨架的多糖。然而，天然菌株中软骨素的生物合成主要依赖于病原性细菌的荚膜多糖(CPS)途径，导致这些菌株普遍存在致病性，并使其产生的软骨素存在易污染内毒素、产物额外修饰等问题，从而限制了其直接医药应用<sup>[30]</sup>。为克服天然菌株的缺陷，近年来快速发展的合成生物学技术促进了非致病微生物的软骨素合成，研究者们将软骨素合成的关键途径基因引入到多种细菌系统与真菌系统中，并通过一系列优化与改造策略来提高软骨素的合成效率<sup>[31]</sup>。

### 2.1 前体代谢途径优化

大肠杆菌K4(*Escherichia coli* K4)是目前研究最深入的CS前体生产菌株。自1988年被发现可合成果糖基化软骨素以来<sup>[32]</sup>，其完整基因组、生产果糖基化软骨素的合成途径(如图3)及相关基因与酶均已阐明<sup>[16]</sup>。软骨素是由两种不同的尿苷-5'-二磷酸(UDP)单糖前体经软骨素合酶的催化下脱去UDP交替聚合而成，因此将代谢流导向UDP-葡糖醛酸和UDP-N-乙酰半乳糖胺是提高软骨素合成效率的关键。软骨素合成后，*kfoE*编码的果糖转移酶会负责将果糖残基以 $\alpha$ -1,3键连接至GalNAc的C-3位，形成*E. coli* K4 CPS特征性侧链



素前体的碳通量减少<sup>[44]</sup>。通过抑制这些竞争途径和减少副产物生成,不仅可以增强代谢流导向软骨素前体合成,还能降低副产物对细胞的不利影响<sup>[45]</sup>。例如,敲除磷酸果糖激酶基因(*ApfkA*)能有效减少果糖-6-磷酸向糖酵解途径的分流,使UDP-*N*-乙酰半乳糖胺与UDP-葡萄糖醛酸的比例提升至0.26,经优化后,果糖软骨素产量最终达到8.43 g/L<sup>[46]</sup>。葡萄糖-6-磷酸和UDP-葡萄糖可作为海藻糖合成前体,而糖原合成也会加速葡萄糖-1-磷酸的消耗,Zhao等<sup>[47]</sup>通过阻断海藻糖和糖原的生物合成途径,成功使UDP-葡萄糖醛酸合成通量增加了14.20%,软骨素产量提升至254.30 mg/L。此外,构建乳酸脱氢酶缺陷菌株可减少乳酸生成,使软骨素产量从0.25 g/L提高到0.88 g/L<sup>[41]</sup>。

考虑到糖酵解等途径对细胞正常生长的重要性,Wu等<sup>[44]</sup>开发了基于木糖诱导的CRISPRi系统,通过抑制EMP、HMP和PSP途径中的关键限速酶编码基因(*pfkA*、*zwf*、*glmM*),动态调控枯草芽孢杆菌中GlcNAc的生物合成,在3 L补料分批培养中,GlcNAc浓度高达103.10 g/L,显著提高了合成效率。

虽然抑制竞争途径能有效引导碳流至目标产物合成,但过度抑制或删除相关基因可能严重影响细胞生长。因此,必须谨慎权衡碳通量分配与细胞生长的平衡,才能实现产物产量最大化与宿主正常生长的最佳平衡。

### 2.3 软骨素合酶改造

天然菌株中的软骨素合酶除了大肠杆菌来源的KfoC,来自F型多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida* Type F)中的软骨素合酶PmCS实际上是第一个被鉴定的细菌软骨素合酶<sup>[30, 48]</sup>,其也具备同时催化UDP-葡萄糖醛酸和UDP-*N*-乙酰半乳糖胺聚合的功能。副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*)中的软骨素合酶ApCS在近期被报道<sup>[49]</sup>,研究发现这种新型细菌软骨素合酶在温度接近零的时候也能保持高活性。此外,Green和DeAngelis<sup>[50]</sup>首次在非致病的绿硫细菌*Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266中发现了与PmCS和KfoC高度相似的糖胺聚糖合酶CpCS,相较于PmCS,CpCS对非天然

底物(如透明质酸或肝素寡聚糖)的利用率更高,可合成嵌合型糖胺聚糖链。

软骨素合酶的表达是软骨素异源生物合成的核心。为了提高KfoC的酶活,常用的策略包括过表达*kfoC*基因以及对KfoC进行改造。Cimini等<sup>[51]</sup>利用内源性IS2转座子系统实现*kfoC*基因的染色体整合表达,避免了质粒系统不稳定的缺陷,使得*kfoC*基因拷贝数增加至野生型的1.76倍,从而荚膜多糖的产量得到了2.5倍的提高。Zhao等<sup>[47]</sup>则开发了一种动态-静态适配器调节*kfoC*基因的表达强度和前体的代谢平衡,使菌株在5-L生物反应器中的软骨素最终产量达到9.20 g/L,是目前报道的软骨素产量最高值。Anna等<sup>[52]</sup>使用化学诱变的方法获得一株*kfoC*基因发生R313Q错义突变的突变株,使得其软骨素产量较野生型提高82%。Zhang等<sup>[46]</sup>通过分子对接技术设计了一个KfoC的R268Q突变体,通过降低底物结合显著提高了软骨素的延伸效率,产量达356.47 mg/L。

作为催化软骨素骨架合成的关键酶,软骨素合酶的活性与底物适应性直接影响软骨素产量与分子量的均一性。目前研究主要聚焦于*E. coli* K4来源的软骨素合酶KfoC的改造,而相比之下,对PmCS与CpCS的研究多集中于天然功能解析与异源表达<sup>[53]</sup>,未来可加强对PmCS、CpCS等非KfoC合酶的改造,利用其底物特异性差异,设计模块化合成途径。对于软骨素合酶的改造可多借助计算模拟工具,预测突变对底物结合口袋的影响,指导理性设计,从而达到高效合成软骨素的目的。

## 3 硫酸软骨素生物合成方法进展

合成生物学的发展解决了CS生物合成的先决条件,即CS前体——软骨素的合成,然而硫酸化修饰模块是CS合成的另一大难点。在近年来,CS的硫酸化修饰过程取得了显著进展,主要包括有体外酶法、全细胞催化和微生物一步发酵法三大生物技术方法(如图4、表1)。

### 3.1 体外酶法合成CS

体外酶法合成CS是指通过将软骨素、硫酸基

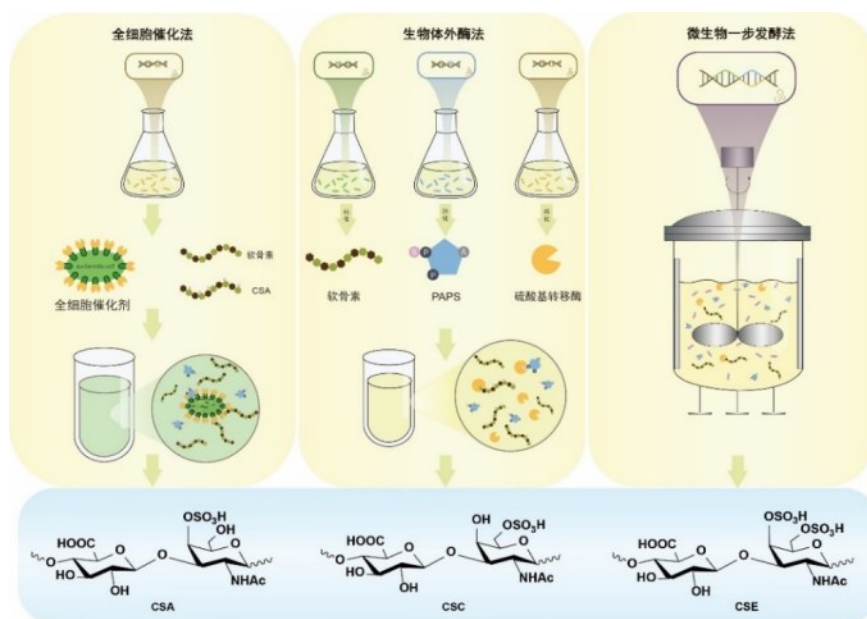


图4 CS的生物合成方法

Fig. 4 Biosynthesis method of CS

转移酶和硫酸基供体在体外组建成一个生物反应体系，在硫酸基转移酶的催化下，硫酸基团被转移到软骨素糖链的特定羟基位点，从而促进CS的形成。目前研究者通过体外酶法成功实现了CSA、CSC、CSE的生物合成<sup>[54-58]</sup>，在这一过程中，硫酸基供体的供应效率和硫酸基转移酶的催化性能是影响CS合成效率的两大关键因素，因此开发成本低、效率高的硫酸基供体供应方法与获得高催化效率的硫酸基转移酶是当前研究的热点。

3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)是生物合成CS最常用的硫酸基供体，其供应会直接影响CS的合成效率。PAPS的合成途径与利用途径天然存在于生物体中，然而想从生物体中提取和纯化PAPS却十分困难，这也导致其价格昂贵。为了能够获得PAPS用于CS的合成，目前主要有两种PAPS再生方法<sup>[66]</sup>。(i)使用芳基硫酸基转移酶IV(AST IV)将对硝基苯酚硫酸盐(p-nitrophenol sulfate, PNPS)中的硫酸基团转移至3'-磷酸腺苷-5'-磷酸(3'-adenosine phosphate 5'-phosphate, PAP)从而合成PAPS<sup>[67]</sup>[如图5(a)]。Zhou等<sup>[55]</sup>在通过体外酶法合成CS的研究当中，使用*E. coli* BL21异源表达AST IV，从而实现PAPS的再生。由于天然AST IV酶对PAP的催化效率较低，因此有研究通

过采用蛋白质工程策略或改变外部环境使AST IV酶对PAP具有更高的亲和力、催化效率和稳定性，从而提升了辅因子PAPS的再生能力<sup>[68, 56]</sup>。然而，依赖AST IV再生PAPS的方法会产生有毒物质对硝基苯酚(p-nitrophenol, PNP)，且间接硫酸基供体PNPS的售价也较昂贵，限制了CS的工业化生产。(ii)以三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和硫酸根( $\text{SO}_4^{2-}$ )作为底物合成PAPS，这种合成途径在生物体内普遍存在<sup>[69]</sup>[如图5(b)]。该过程具有两步催化反应，首先在ATP硫酸化酶(ATPS)的催化下，ATP与 $\text{SO}_4^{2-}$ 反应合成腺苷5'-磷酸硫酸(adenosine 5'-phosphosulfate, APS)，并伴有副产物焦磷酸PPi生成，随后APS被APS激酶(APSK)催化，消耗第二个ATP，在3'-OH处发生磷酸化形成PAPS并生成副产物ADP。该方法使用的底物ATP价格仅为PAPS价格的1/25<sup>[70]</sup>，具有较高的成本效益。但该过程也存在一些缺陷，如副产物PPi和ADP会对该途径酶产生抑制作用，从而降低PAPS的合成效率，不仅如此，一分子PAPS的合成需要两分子ATP的参与还会造成高能化合物的浪费。基于对低廉硫酸基来源以及磷酸供体的迫切需求，Xu等<sup>[71]</sup>利用廉价的硫酸盐和多聚磷酸盐作为初始底物，构建了双功能PAPS合成酶ASAK，并筛选出具有高ADP磷酸化酶活性的聚

表1 CS的生物合成  
Table 1 Biosynthesis of CS

底盘细胞	生物法合成方式	PAPS来源	产量/转化率/硫酸化度	来源
<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	体外酶法	直接添加	CSA产量:- CSE转化率:50.00%	[54]
<i>Bacillus subtilis</i> 168/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ <i>Komagataella phaffii</i> GS115	体外酶法	依赖AST IV再生	CSO产量:7.15 g/L CSA转化率:98.00% CSC转化率:96.00%	[55]
<i>Bacillus subtilis</i> 168/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ <i>Komagataella phaffii</i> GS115	体外酶法	依赖AST IV再生	CSO产量:- CSA转化率:98.00%	[56]
<i>Komagataella phaffii</i> GS115/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	体外酶法	基于ATP再生系统合成PAPS	CSO产量:2.60 g/L CSA硫酸化度:40.00%	[57]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> / <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ <i>Komagataella phaffii</i> GS115	体外酶法	基于ATP再生系统合成PAPS	CSO产量:- CSA硫酸化度:97.00%	[58]
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	全细胞催化法	基于ATP再生系统与依赖AST IV再生	CSO产量:- CSA转化率:89.50%	[59]
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	全细胞催化法	基于ATP再生系统与依赖AST IV再生	CSO产量:- CSE转化率:72.20%	[60]
<i>E. coli</i> MG1655	微生物一步发酵法	胞内PAPS天然合成	CSO产量:- CSA产量:27.00 μg/g DCW CSA硫酸化度:96.12%	[61]
<i>Komagataella phaffii</i> GS115	微生物一步发酵法	胞内PAPS天然合成	CSO产量:189.80 mg/L CSA产量:2.10 g/L CSA硫酸化度:4.00%	[62]
<i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3)	微生物一步发酵法	基于AMP-PAPS循环再生途径	CSO产量:2.95 g/L CSA产量:1.89 g/L CSA硫酸化度:76.00%	[63-64]
<i>Komagataella phaffii</i> GS115	微生物一步发酵法	基于ATP-PAPS循环再生途径	CSA产量:1.15 g/L CSA硫酸化度:96.00%	[65]

磷酸激酶 PPK2C<sup>paN</sup>, 成功设计了能同时回收两个副产物的闭合ATP循环再生系统 [如图5(c)], 将ATP转化为PAPS的转化率提高到92.30%, 大幅度提高了PAPS的合成效率。盛靖雨等<sup>[57]</sup>则利用该方法制备PAPS实现了CSA的体外合成。进一步, Xu等<sup>[72]</sup>还构建了一种PAPS的绿色再生系统, 即在ATP再生系统的基础上, 引入了可特异性水解PAP的PAP 3'-磷酸酶 (CysQ), 使其去磷酸化生成AMP进入到ATP再生的循环中 [如图5(d)], 该PAPS循环再生系统对CSA的活性硫酸基团当量值可高达4.76, 显著提高了ATP到PAPS的转化效率。不仅如此, 该研究还推翻了PAPS是活细胞中唯一的活性硫酸盐供体的这一长期以来的认知, 发现APS也能被硫酸基转移酶识别与应用, 因此构建更简短的APS再生系统有望进一步提升硫酸基供体的供应效率。近期, Gu等<sup>[63]</sup>又挖掘了一种

具有水解酶和转氨酶活性的双功能酶APSST, 能够直接将AMP转化为APS [如图5(d)], 并以核糖与腺嘌呤作为底物构建了AMP合成模块, 为PAPS的循环再生提供新的途径。

硫酸基转移酶是体外酶法合成CS的核心催化剂, 根据硫酸化位点的不同, 主要分为软骨素-4-O-硫酸基转移酶 (chondroitin 4-O-sulfotransferase, C4ST)、软骨素-6-O-硫酸基转移酶 (chondroitin 6-O-sulfotransferase, C6ST)、N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸基-6-硫酸基转移酶 (GalNAc 4-sulfate 6-O-sulfotransferase, GalNAc4S-6ST) 和尿苷-2-硫酸基转移酶 (uronyl 2-O-sulfotransferase, UST) 四种类型。C4ST和C6ST分别催化GalNAc残基的4-OH位或6-OH位硫酸化, 生成CSA或CSC。目前C4ST在哺乳动物中主要有三种亚型, 分别是C4ST-1、C4ST-2和C4ST-3<sup>[66, 73]</sup>, 其中C4ST-1是

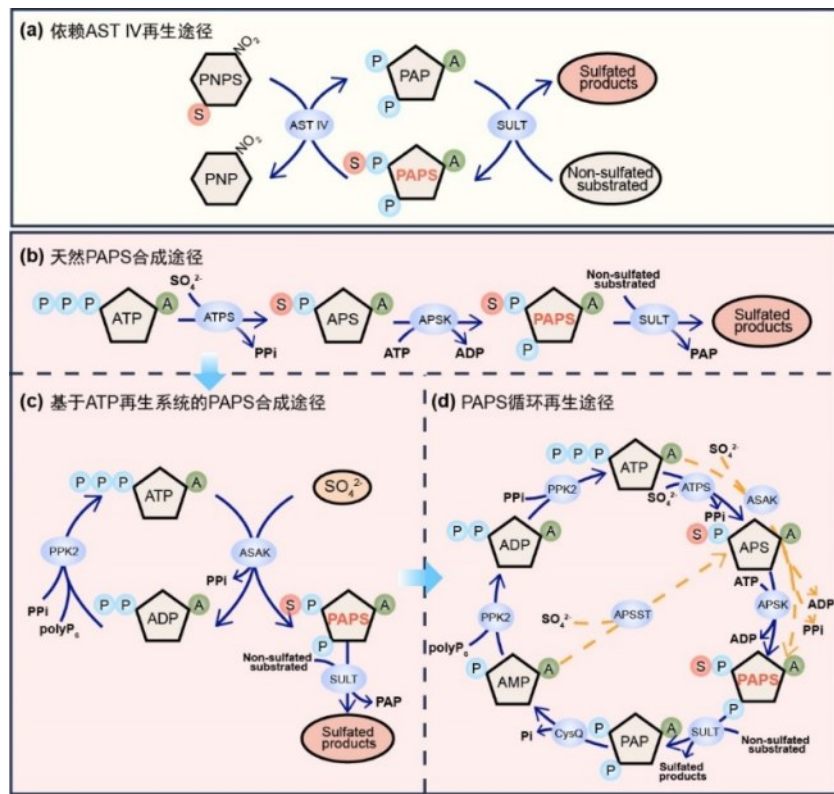


图5 PAPS合成与再生途径

Fig. 5 Synthesis and regeneration pathways of PAPS

研究最广泛的亚型，也是CSA生物合成的主要催化酶，具有较高的底物亲和力和催化效率。哺乳动物来源的C4ST需依赖真核细胞翻译后修饰功能以维持构象稳定，如C4ST-1中存在四个潜在糖基化位点<sup>[74]</sup>，而原核系统中缺乏相关机制，导致酶易错误折叠形成包涵体或丧失活性，C6ST也同样面临这个问题。因此有研究者选择真核生物作为宿主（如毕赤酵母）实现了C4ST和C6ST的成功表达<sup>[55, 58]</sup>。此外，硫酸基转移酶的天然催化过程是在高尔基体中进行的，其N端一般具有一段疏水的跨膜区域使其跨越高尔基体膜，该跨膜结构域可能干扰其可溶性表达<sup>[75]</sup>。因此，研究者采用共表达分子伴侣、改造信号肽和优化N端序列等策略对C4ST进行改造，使得C4ST活性大幅提升，从而实现CSA的高效合成<sup>[56, 58, 76]</sup>；GalNAc 4S-6ST以CSA为底物，进一步催化GalNAc残基的C-6羟基进行硫酸化修饰，生成双位点硫酸化的CSE，该酶对CSA和非还原末端GalNAc（4-S）残基有活性，但是对非硫酸化寡聚糖无反应<sup>[77]</sup>。在近期研究中，CSE的生物合成有了新的突破：Ad

等<sup>[54]</sup>通过截断GalNAc 4S-6ST的N端跨膜结构域并利用AlphaFold2结构模型与PROSS算法提升了酶的催化活性与溶解性，实现了CSE的体外催化合成；UST负责在GlcA残基中C-2羟基上添加硫酸基团，其可以硫酸化多种底物如CSA、CSC和DS<sup>[78]</sup>。研究者在宿主*E. coli* Origami B（DE3）对UST进行过异源表达，并研究其结构鉴定了结合辅因子PAPS的关键残基（Lys112、Cys113、Ser115等）、催化关键位点（His168）与底物结合残基（Thr321）<sup>[79]</sup>。

相较于全细胞催化法和微生物一步发酵法，体外酶法在过程控制方面具有显著优势。例如，通过调节底物软骨素的分子量，可实现目标分子量的CS定制化生产；更换不同的硫酸基转移酶，则能够调控CS的硫酸化模式。尽管体外酶法在大规模生产中表现出良好的可控性，但其在成本控制方面仍面临诸多挑战。一方面，若软骨素、硫酸基转移酶及硫酸基供体均依赖微生物发酵制备，将显著增加工艺流程的复杂性，提高生产管理难度和成本；另一方面，若直接采购上述原料，则

会进一步推高原料成本。此外,目前异源表达的硫酸基转移酶催化活性普遍偏低,且体外反应体系中酶的稳定性和可重复使用性问题尚未得到有效解决。综上所述,体外酶法在实现CS大规模工业化生产方面仍面临较大挑战。

### 3.2 全细胞催化法合成CS

全细胞催化是一种利用完整微生物细胞作为生物催化剂的策略,通过整合多种工程学手段实现复杂化合物的高效合成。在CS的全细胞催化法合成中,硫酸基转移酶通过表面展示技术被锚定在细胞表面,通过外源添加软骨素,并结合细胞内的辅因子循环再生系统,实现CS的高效生产。目前,已有研究者利用全细胞催化法实现了CSA与CSE的生物合成<sup>[59-60]</sup>。

在对CSA的生物合成方法的研究中,Liu等<sup>[59]</sup>通过整合蛋白质工程提高了C4ST的热稳定性( $T_m$ 值提升6.9°C)和催化效率(比活力提升2.1倍),设计了ATP和PAPS双循环再生策略并用表面展示系统将C4ST固定在大肠杆菌的外膜以解决底物穿透细胞膜难题,从而构建了高效全细胞催化体系,首先实现了大肠杆菌全细胞催化合成CSA,转化率达89.50%。

近期,有研究者对*Erpetoichthys calabaricus*来源的N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸基-6-硫酸基转移酶CHST15催化机理进行了深度的解析。针对PAPS结合腔空间位阻大的问题,Wang等<sup>[60]</sup>对CHST15进行了蛋白质工程改造,后通过量子力学/分子力学(QM/MM)模拟发现过渡态能量壁垒过高,因此针对关键残基进行突变,破坏不利氢键以促进底物结合,使CHST15的转化率提升至62.50%,较改造前提升3.45倍。该研究者继续将该突变体与ATP再生模块、PAPS循环模块结合,构建六酶级联全细胞催化剂,通过表面展示技术实现酶的膜定位,同时进行条件优化提高了底物渗透性,最终在24小时内将15.00 g/L CSA转化为CSE,产物转化率达72.20%,较单酶体外反应效率提升16.00%<sup>[60]</sup>。

全细胞催化法相较于传统的体外酶法催化,其核心优势在于能避免酶的纯化步骤,利用细胞

内代谢网络提供辅助因子,并优化催化反应的时空分布。此外,全细胞催化法能够有效规避微生物一步发酵法中因前体供应不平衡而导致CS生产或修饰受限的问题,同时解决了产物跨膜运输的瓶颈,为硫酸软骨素合成提供了高效集成的解决方案,展现出独特的技术优势。然而,细胞的生理状态和存活能力对酶催化活性影响显著,反应条件受限于维持细胞活性的范围,限制了反应条件的优化空间。因此规模放大时,细胞活性维持和工艺一致性挑战较大,增加了生产复杂性和成本。

### 3.3 微生物一步发酵法合成CS

微生物一步发酵法合成CS是近年来合成生物学与代谢工程交叉领域的重要突破,其核心在于通过理性设计在微生物底盘细胞中重构从软骨素前体合成、硫酸基供体再生至硫酸化修饰的全生物合成路径。

目前,微生物一步发酵法合成CS的研究主要集中在大肠杆菌与毕赤酵母两大底盘细胞中。最初,Badri等<sup>[61]</sup>在*E. coli* K4菌株中删除了导致软骨素果糖基化的*kfoE*基因,后阻断PAPS的竞争代谢途径使细胞内PAPS积累水平提高了54倍,并使用质粒表达硫酸基转移酶,促使软骨素转化为CSA,其产量较低,仅为27.00  $\mu\text{g/g}$  DCW,其中硫酸化率为96.00%。该研究首次在大肠杆菌中实现了CS的从头合成,证明了原核生物可完全合成硫酸化糖胺聚糖,为动物源CS的替代生产提供了可持续方案。Jin等<sup>[62]</sup>利用合成生物学技术开发了CS在毕赤酵母胞内的合成路径,并优化了C4ST的表达,强化了毕赤酵母中天然PAPS的合成途径,最后用甲醇作为碳源经分批补料培养获得了2.10 g/L的CSA。与之前在大肠杆菌中一步发酵法合成CSA的研究相比,其产量有了显著的提升,然而其整体硫酸化度却大幅下降,只有4.00%。为了获得一株兼具高产量与高硫酸化度的CS生产菌株,Gu等<sup>[63]</sup>从增强PAPS供应层面出发,设计了一种模块化PAPS合成路径(RPA路径),包括AMP供应模块、APS合成模块和AMP循环模块,研究者将该路径整合进可生产软骨素的工程菌株*E. coli*

GZ17中, 实现了微生物一步法合成CSA, 产量为1.89 g/L, 硫酸化度达76.00%。该研究结果证明了硫酸基的供应效率对CS硫酸化度的影响之大。进一步, Xiong等<sup>[65]</sup>在毕赤酵母中采取多种策略如强化硫酸盐转运、增强C4ST表达、引入PAPS循环再生系统等实现了1.15 g/L CSA的生物合成, 并成功将CSA的硫酸化度提升至96.00%。此外, 该研究还分析了软骨素合成与其硫酸化的动态关系, 表明软骨素硫酸化受软骨素合成率与硫酸基转移酶活性水平的共同调节。总而言之, 细胞内软骨素浓度、硫酸基供体和硫酸基转移酶都是影响CS高硫酸化程度的关键因素。

微生物细胞自身具备完善的代谢网络和辅因子循环系统, 可实现硫酸基供体的高效再生, 促进硫酸化修饰过程的持续进行, 提高产物的硫酸化度, 同时胞内环境也更利于提高酶的稳定性。由此微生物一步发酵法实现CS在单一细胞内的从头合成, 极大简化了生产工艺, 降低了生产成本。基于以上优势, 该技术已实现了非动物源CS的规模化生产。然而, 微生物一步发酵法也面临着诸多挑战。由于CS的合成涉及多个复杂酶催化步骤及辅因子循环, 底盘细胞难以协调各环节的高效协同, 容易导致代谢通量分配不均或前体物质供应不足<sup>[65]</sup>, 从而限制产量和硫酸化度的提升。因此, 如何优化代谢通路设计和增强细胞内各组分的协同作用, 仍是推动该技术产业化应用的关键课题。

## 4 硫酸软骨素寡聚糖生物合成进展

高分子量的CS在临床口服给药时难以被肠胃吸收, 限制了其在体内生物活性的发挥。相比之下, CS寡聚糖通常由2-10个二糖单元组成, 分子量较小, 在药物递送、抗炎治疗以及抗肿瘤作用<sup>[28]</sup>中具有独特优势, 因此CS寡聚糖的制备便受到了越来越多研究人员的关注。其生物合成主要包括体内从头合成和酶解聚法两种策略, 这些方法在结构可控性、生产效率和规模化应用方面各具特点。

### 4.1 从头合成CS寡聚糖

从头合成CS寡聚糖的过程与CS多聚糖的生物

合成类似, 即糖基供体UDP-葡糖醛酸和UDP-N-乙酰半乳糖胺在软骨素合酶的催化下形成软骨素寡聚糖, 然后在硫酸基转移酶的催化下进行硫酸化修饰形成CS寡聚糖。有研究者基于软骨素合酶的催化作用, 通过体外添加糖基供体逐步合成软骨素寡聚糖, 后经过硫酸化修饰合成了多种CS寡聚糖<sup>[80, 53]</sup>。然而, 糖链的长短难以控制, 有研究表明平衡UDP-葡糖醛酸和UDP-N-乙酰半乳糖胺两种前体的比例对控制软骨素的链长至关重要<sup>[39]</sup>, 但目前并未有明确的机理表明这两种前体是如何影响软骨素的分子量、如何调整其比例获得软骨素寡聚糖, 这些问题都是未来值得研究的方向。

### 4.2 酶解聚法合成CS寡聚糖

CS寡聚糖除了从头合成的方法以外, 其主要制备方法还是依赖高分子量CS降解而来。CS的降解方法有很多, 如物理法(超声降解、<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐照降解)、化学法(酸碱水解、氧化降解)和生物酶解聚法<sup>[14]</sup>。相较于物理化学方法, 酶解聚法的反应条件更加温和, 且特异性高、对环境友好, 因此逐渐成为CS寡聚糖制备的首选方法。可降解硫酸软骨素的酶主要有裂解酶和水解酶两种<sup>[14, 81-82]</sup>(图6)。裂解酶具有更高的酶解效率, 但在降解过程中会产生不饱和键, 生产的CS寡聚糖存在稳定性差的问题; 使用水解酶降解CS可得到饱和糖链, 但其酶解效率远低于裂解酶。

CS裂解酶能够特异性识别CS链中的 $\beta$ -1,4糖苷键, 并通过 $\beta$ -消除反应机制将其切断, 生成非还原端含有4,5-不饱和糖醛酸的寡聚糖产物。该类酶微生物来源广泛, 如变形杆菌属、黄杆菌属、粪便拟杆菌、变型拟杆菌、弧菌属、嗜水气单胞菌属、微球菌属等都被报道可以分泌CS裂解酶<sup>[66]</sup>, 而不同的菌会产生不同类型的CS裂解酶。根据底物谱的差异, CS裂解酶主要分为CS裂解酶ABC、CS裂解酶AC和CS裂解酶B三大类。其中CS裂解酶ABC的底物谱最宽, 能够降解CSO、CSA、CSC、CSD、CSE以及透明质酸和硫酸皮肤素<sup>[83]</sup>。根据裂解机制的不同, CS裂解酶ABC又分为CS裂解酶ABC I和CS裂解酶ABC II<sup>[84]</sup>。CS裂解酶ABC I作用机制为内切模式, 能够随机断裂

CS结构，最终产生不饱和二糖和不饱和四糖混合物；CS裂解酶ABC II则具有外切的作用机制，从非还原端开始切割CS结构，分离出二糖残基，最终产物不含四糖单位。CS裂解酶AC能够特异性作用于CSO、CSA、CSC，CS裂解酶AC也分为具有内切酶活性的CS裂解酶AC I与具有外切酶活性的CSase AC II，与CS裂解酶ABC II不同的是，CSase AC II是从还原端向非还原端进行切割<sup>[85]</sup>；CS裂解酶B在裂解酶当中具有最强的底物特异性，然而CS裂解酶B并不能降解CS，而是专一地降解硫酸皮肤素。

与CS裂解酶不同，CS水解酶的作用机理是通过经典的水解反应切断 $\beta$ -1,4糖苷键，完整保留糖环结构，维持天然的空间构象，避免了不饱和键的引入。此外，CS裂解酶能够特异性降解CS，而CS水解酶大部分是透明质酸酶，由于CS和透明质酸之间具有结构相似性，因此透明质酸酶对CS链通常也表现出水解活性，并将其降解为寡聚糖。目前睾丸透明质酸酶（SPAM1）、透明质酸酶-1（HYAL1）和透明质酸酶4（HYAL4）都能够降解CS<sup>[86, 82]</sup>，有趣的是，其中HYAL4被证明不能作用于透明质酸，而对CS具有降解能力，因此也被称为CS水解酶<sup>[87]</sup>。

## 5 总结与展望

CS作为一种具有广泛应用前景的天然多糖，

其商业化产品仍主要依赖于从动物软骨组织中提取，然而这一生产方法存在着许多弊病与风险，研究者一直在寻找替代方法和来源获得CS。近年来，随着合成生物学技术的发展，CS的生物合成研究取得了显著进展，为CS的绿色生产带来了革命性突破。CS的来源从生产周期长、质量不稳定且污染严重的动物组织提取法转向了生产周期短、产品结构均一且环境友好的生物合成法。研究者们围绕前体软骨素的高效合成和CS硫酸化修饰过程的开发与优化，系统性地提升了CS的合成效率。经过一系列策略的实施，不仅加速了微生物细胞工厂的构建进程，也为CS的绿色、规模化生产奠定了坚实的技术基础。与此同时，针对CS寡聚糖的需求增长，研究者还致力于发展温和、高效的酶解聚策略，显著提高了CS在保健品、医药和功能材料等领域的应用潜力。

本文对CS前体软骨素细胞工厂的优化策略、CS硫酸化修饰的生物技术方法以及CS寡聚糖的制备方法进行了研究进展方面的总结。研究者在天然菌株以及工程菌株中对软骨素合成途径进行改造和优化，结合代谢工程、蛋白质工程以及合成生物学技术等提高了前体代谢途径酶的表达，抑制了竞争途径以优化代谢网络，并提升了软骨素合酶的催化效率，结合动态调控策略将前体软骨素产量提升至克级水平。其次，硫酸化修饰作为CS生物合成的核心步骤，目前开发了三种方式对软骨素进行硫酸化修饰。在体外酶法中，提高硫酸基供给效率与硫酸基转移酶的催化性能是CS

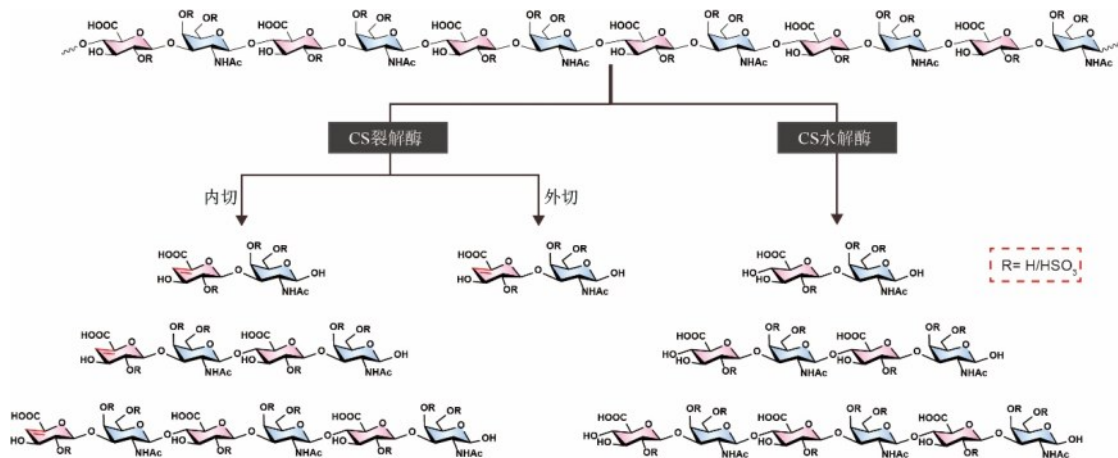


图6 酶解聚法降解CS的模式图

Fig. 6 Pattern diagram of degradation of CS by enzymatic depolymerization

合成的关键,通过对AST IV酶的蛋白质工程改造、ATP循环再生系统的设计以及PAPS绿色再生系统的构建,实现了PAPS的高效合成与再生,显著提高CS的硫酸化效率。针对CS大分子难以穿透细胞膜的问题,全细胞催化法在近几年被应用到CS的生物合成当中,通过将细胞产生的硫酸基转移酶展示在细胞表面,并结合细胞内辅因子合成系统,实现了CS的高效合成与转化。微生物一步发酵法更在原核或真核底盘细胞中整合前体合成、硫酸基供体再生与修饰全路径,为一步法规规模化生产奠定技术基础。与此同时,CS寡聚糖的制备也获得了一些进展,由于目前对从头合成CS寡聚糖的调控机制并不明确,使用酶解聚法获得CS寡聚糖是目前的主流方法。酶解聚技术通过对裂解酶与水解酶的理性设计,实现了CS寡聚糖的温和制备<sup>[88]</sup>,拓展了其在口服制剂与靶向治疗中的应用场景。

尽管近年来硫酸软骨素(CS)的生物合成取得了显著进展,且工业化生产已初见成效,但其进一步规模化发展仍面临诸多挑战:第一,前体供应不足及碳通量分配失衡限制了软骨素的产量。目前大部分研究多采用静态策略提升UDP-GlcA和UDP-GlcNAc等前体的合成,往往忽视了整体代谢通量的动态变化。未来应着力开发生态调控工具,以合理平衡软骨素合成途径与糖酵解、磷酸戊糖途径及细胞壁生物合成等相关碳通量,实现代谢网络的整体优化;第二,硫酸基转移酶催化活性与稳定性低是CS硫酸化过程中的关键限制性因素,借助人工智能和深度学习技术辅助酶的改造<sup>[89-90]</sup>、结合蛋白质语言模型来挖掘与设计新型的更高效稳定的硫酸基转移酶<sup>[91]</sup>以及开发高表达和高稳定性的酶表达系统,将是突破当前酶表达及活性的重要方向;第三,CS合成与硫酸化度受软骨素糖链聚合与硫酸化修饰两个过程的协同调控影响,但其时空关系尚不明确,需进一步解析,未来可构建更高效的代谢工程菌株,优化PAPS再生系统与碳流分配,实现前体供应和硫酸化修饰的协同调控;第四,CS寡聚糖的制备中受限于裂解酶生产不饱和产物与水解酶催化效率低下的问题,未来可基于人工智能技术与蛋白质工程对已有水解酶进行改造,或通过从头设计蛋白获得具

有高底物特异性与高催化活性的CS水解酶<sup>[92]</sup>。通过合成生物学、酶工程和人工智能的深度融合,绿色、高效的CS生物合成技术有望快速实现不同构型CS的规模化生产,不仅可完全替代传统动物提取法,还将拓展CS在组织工程、靶向给药等创新领域的应用,为生物医药产业带来革命性突破。

## 参 考 文 献

- [1] 张茜,王畅,梁琛,等.硫酸软骨素应用于骨修复材料中的研究进展[J].口腔医学,2023,43(1):88-91.
- [2] ANDREWS S, CHENG A, STEVENS H, et al. Chondroitin sulfate glycosaminoglycan scaffolds for cell and recombinant protein-based bone regeneration[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2019, 8(6): 575-585.
- [3] SIRKO S, VON HOLST A, WIZENMANN A, et al. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells[J]. Development, 2007, 134(15): 2727-2738.
- [4] 蓝伟,陈建平.硫酸软骨素的生物活性及其构效关系研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(15):4924-4932.
- [5] BISHNOI M, JAIN A, HURKAT P, et al. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis[J]. Glycoconjugate Journal, 2016, 33(5): 693-705.
- [6] 田雪.硫酸软骨素及衍生物在医药领域中的研究进展[J].Advances in Clinical Medicine, 2020, 10(12): 2960-2973.
- [7] 付常芳,周伟,高奇,等.硫酸软骨素及其衍生物研究进展[J].医药导报,2023,42(5):688-691.
- [8] SAHA S K, ZHU Y, MURRAY P, et al. Future proofing of chondroitin sulphate production: importance of sustainability and quality for the end-applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267(Pt 2): 131577.
- [9] LI J, ZHANG J, TAN H. Microbial production of chondroitin sulfate and its derivatives[J]. Science China Life Sciences, 2025, 68(3): 871-873.
- [10] VOLPI N. Chondroitin sulfate safety and quality[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1447.
- [11] STELLAVATO A, RESTAINO O F, VASSALLO V, et al. Comparative analyses of pharmaceuticals or food supplements containing chondroitin sulfate: Are their bioactivities equivalent?[J]. Advances in Therapy, 2019, 36(11): 3221-3237.
- [12] 邹德生.硫酸软骨素的生产工艺研究进展[J].现代食品,2018(22):22-24.
- [13] WANG W, SHI L, QIN Y, et al. Research and application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate-degrading enzymes[J].

- Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 560442.
- [14] WANG K, QI L, ZHAO L, et al. Degradation of chondroitin sulfate: Mechanism of degradation, influence factors, structure-bioactivity relationship and application[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 301(Pt B): 120361.
- [15] VALCARCEL J, NOVOA-CARBALLAL R, PÉREZ-MARTÍN R I, et al. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(6): 711-725.
- [16] CRESS B F, GREENE Z R, LINHARDT R J, et al. Draft genome sequence of *Escherichia coli* strain ATCC 23502 (serovar O5:K4:H4)[J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e00046-13.
- [17] SHEN Q, GUO Y, WANG K, et al. A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications[J]. Molecules, 2023, 28(20): 7093.
- [18] ZHOU C, MI S, LI J, et al. Purification, characterisation and antioxidant activities of chondroitin sulphate extracted from raja porosa cartilage[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 241: 116306.
- [19] TAT S K, PELLETIER J P, MINEAU F, et al. Variable effects of 3 different chondroitin sulfate compounds on human osteoarthritic cartilage/chondrocytes: Relevance of purity and production process[J]. The Journal of Rheumatology, 2010, 37(3): 656-664.
- [20] CIMINI D, RESTAINO O F, SCHIRALDI C. Microbial production and metabolic engineering of chondroitin and chondroitin sulfate[J]. Emerging Topics in Life Sciences, 2018, 2(3): 349-361.
- [21] YANG F, LI Y, WANG L, et al. Full-thickness osteochondral defect repair using a biodegradable bilayered scaffold of porous zinc and chondroitin sulfate hydrogel[J]. Bioactive Materials, 2024, 32: 400-414.
- [22] 田伟功, 王琳琳, 杜茜茜, 等. 低分子量硫酸软骨素体外酵解特征及其对肠道菌群的调节作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 59-68.
- [23] MIN D, PARK S, KIM H, et al. Potential anti-ageing effect of chondroitin sulphate through skin regeneration[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2020, 42(5): 520-527.
- [24] 袁媛, 宋兵兵, 陈菁, 等. 不同来源硫酸软骨素的结构特征及抗氧化活性与降脂活性比较[J]. 食品工业科技, 2025: 1-17.
- [25] SHIDA M, MIKAMI T, TAMURA J ICHI, et al. Chondroitin sulfate-D promotes neurite outgrowth by acting as an extracellular ligand for neuronal integrin  $\alpha V\beta 3$ [J]. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2019, 1863(9): 1319-1331.
- [26] SWARUP V P, HSIAO T W, ZHANG J, et al. Exploiting differential surface display of chondroitin sulfate variants for directing neuronal outgrowth[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(36): 13488-13494.
- [27] FAHEEM S, HAMEED H, PAIVA-SANTOS A C, et al. The role of chondroitin sulphate as a potential biomaterial for hepatic tissue regeneration: A comprehensive review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 136332.
- [28] PENG C, WANG Q, JIAO R, et al. A novel chondroitin sulfate E from *Suidae* cartilage and its antitumor metastatic activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117971.
- [29] KASTANA P, CHOLEVA E, POIMENIDI E, et al. Insight into the role of chondroitin sulfate E in angiogenesis[J]. The FEBS journal, 2019, 286(15): 2921-2936.
- [30] DEANGELIS P L, PADGETT-MCCUE A J. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(31): 24124-24129.
- [31] COUTO M R, RODRIGUES J L, RODRIGUES L R. Heterologous production of chondroitin[J]. Biotechnology Reports, 2022, 33: e00710.
- [32] RODRIGUEZ M, 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.
- [33] 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.
- [34] CIMINI D, CARLINO E, GIOVANE A, et al. Engineering a branch of the UDP - precursor biosynthesis pathway enhances the production of capsular polysaccharide in *Escherichia coli* O5:K4:H4[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(8): 1307-1315.
- [35] VENTURA C L, CARTEE R T, FORSEE W T, et al. Control of capsular polysaccharide chain length by UDP - sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Molecular Microbiology, 2006.
- [36] V. GOMES A M, C. M. NETTO J H, CARVALHO L S, et al. Heterologous hyaluronic acid production in *Kluyveromyces lactis*[J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 294.
- [37] CIMINI D, RUSSO R, D'AMBROSIO S, et al. Physiological characterization and quantitative proteomic analyses of

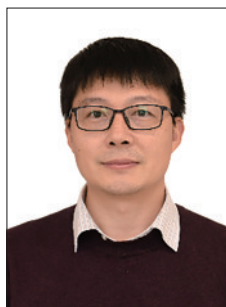
- metabolically engineered *E. coli* K4 strains with improved pathways for capsular polysaccharide biosynthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(7): 1801-1814.
- [38] JIN P, ZHANG L, YUAN P, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 140: 424-432.
- [39] D'AMBROSIO S, ALFANO A, CASSESE E, et al. Production and purification of higher molecular weight chondroitin by metabolically engineered *Escherichia coli* K4 strains[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13200.
- [40] 张权, 酉相成, 陈修来, 等. 强化前体(UDP-GalNAc)合成路径提高果糖软骨素的生产[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(3): 71-80.
- [41] CHENG F, LUOZHONG S, YU H, et al. Biosynthesis of chondroitin in engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(3): 392-400.
- [42] 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(1): 46.
- [43] WU Q, YANG A, ZOU W, et al. Transcriptional engineering of *Escherichia coli* K4 for fructosylated chondroitin production [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(5): 1140-1149.
- [44] WU Y, CHEN T, LIU Y, et al. CRISPRi allows optimal temporal control of *N*-acetylglucosamine bioproduction by a dynamic coordination of glucose and xylose metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 232-241.
- [45] PEETERMANS A, FOULQUIÉ -MORENO M R, THEVELEIN J M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell*, 2021, 8(6): 111-130.
- [46] ZHANG Q, YAO R, CHEN X, et al. Enhancing fructosylated chondroitin production in *Escherichia coli* K4 by balancing the UDP-precursors[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 314-322.
- [47] ZHAO C, LI X, GUO L, et al. Reprogramming metabolic flux in *Escherichia coli* to enhance chondroitin production[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(10): 2307351.
- [48] DEANGELIS P L, GUNAY N S, TOIDA T, et al. Identification of the capsular polysaccharides of type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively [J]. *Carbohydrate Research*, 2002, 337(17): 1547-1552.
- [49] WANG T T, ZHU C Y, ZHENG S, et al. Identification and characterization of a chondroitin synthase from *Avibacterium paragallinarum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(11): 4785-4797.
- [50] GREEN D E, DEANGELIS P L. Identification of a chondroitin synthase from an unexpected source, the green sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides*[J]. *Glycobiology*, 2017, 27(5): 469-476.
- [51] 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.
- [52] ZANFARDINO A, RESTAINO O F, NOTOMISTA E, et al. Isolation of an *Escherichia coli* K4 *kfoC* mutant overproducing capsular chondroitin[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 34.
- [53] WANG Y, LI S, XU X, et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous chondroitin polymers and its derivatives[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 232: 115822.
- [54] AD T, Y S, E P, et al. Biosynthesis of animal-free recombinant chondroitin sulfate E using a functional chondroitin sulfotransferase in *E. coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 1-12.
- [55] ZHOU Z, LI Q, HUANG H, et al. A microbial - enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(6): 1561-1570.
- [56] JIN X, LI Q, WANG Y, et al. Optimizing the sulfation-modification system for scale preparation of chondroitin sulfate A[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 246: 116570.
- [57] 盛靖雨, 金学荣, 胥睿睿, 等. 基于工程化毕赤酵母一锅法合成硫酸软骨素a[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2594-2605.
- [58] ZHANG W, ZHANG P, WANG H, et al. Enhancing the expression of chondroitin 4-*O*-sulfotransferase for one-pot enzymatic synthesis of chondroitin sulfate A[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 337: 122158.
- [59] LIU H, WEI W, PANG Z, et al. Protein engineering, cofactor engineering, and surface display engineering to achieve whole-cell catalytic production of chondroitin sulfate A[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(7): 1784-1796.
- [60] WANG Z, SONG W, WEI W, et al. Structural and mechanism-based engineering of sulfotransferase CHST15 for the efficient synthesis of chondroitin sulfate E[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2025, 91(1): e01573-24.
- [61] BADRI A, WILLIAMS A, AWOFIRANYE A, et al. Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*[J].

- Nature Communications, 2021, 12(1): 1389.
- [62] JIN X, ZHANG W, WANG Y, et al. Biosynthesis of non-animal chondroitin sulfate from methanol using genetically engineered *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry, 2021, 23(12): 4365-4374.
- [63] GU S, ZHANG F, LI Z, et al. Engineering a novel adenine-sulfotransferase for efficient synthesis of PAPS and chondroitin sulfate in microbial cells[J]. Trends in Biotechnology, 2025.
- [64] 赵春雷, 郭亮, 高聪, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产软骨素[J]. 化工学报, 2023, 74(5): 2111.
- [65] XIONG H, YANG X, ZHANG W, et al. Engineering *Komagataella phaffii* cell factories for the production of chondroitin sulfate with high sulfation degree[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 520: 165780.
- [66] ZHANG W, XU R, CHEN J, et al. Advances and challenges in biotechnological production of chondroitin sulfate and its oligosaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126551.
- [67] BURKART M D, IZUMI M, WONG C H. Enzymatic regeneration of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate using aryl sulfotransferase for the preparative enzymatic synthesis of sulfated carbohydrates[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1999, 38(18): 2747-2750.
- [68] ZHOU Z, LI Q, XU R, et al. Secretary expression of the rat aryl sulfotransferases IV with improved catalytic efficiency by molecular engineering[J]. 3 Biotech, 2019, 9(6): 246.
- [69] BURKART M D, IZUMI M, CHAPMAN E, et al. Regeneration of PAPS for the enzymatic synthesis of sulfated oligosaccharides[J]. Journal of Organic Chemistry, 2000, 65(18): 5565-5574.
- [70] LIU K, CHEN X, ZHONG Y, et al. Rational design of a highly efficient catalytic system for the production of PAPS from ATP and its application in the synthesis of chondroitin sulfate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(11): 4503-4515.
- [71] XU R, 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[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(16): 10405-10415.
- [72] XU R, ZHANG W, XI X, et al. Engineering sulfonate group donor regeneration systems to boost biosynthesis of sulfated compounds[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 7297.
- [73] KANG H G, EVERS M R, XIA G, et al. Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3: A NOVEL MEMBER OF THE HNK-1 FAMILY OF SULFOTRANSFERASES[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(38): 34766-34772.
- [74] HE W, ZHU Y, SHIRKE A, et al. Expression of chondroitin-4-O-sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(18): 6919-6928.
- [75] YUSA A, KITAJIMA K, HABUCHI O. N-linked oligosaccharides are required to produce and stabilize the active form of chondroitin 4-sulfotransferase-1[J]. Biochemical Journal, 2005, 388(1): 115-121.
- [76] 谢专, 张维娇, 熊海波, 等. 毕赤酵母高效表达软骨素 4-O-磺基转移酶[J]. 食品与发酵工业, 2025: 1-12.
- [77] OHTAKE S, ITO Y, FUKUTA M, et al. Human *N*-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase cDNA is related to human B cell recombination activating gene-associated gene[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(47): 43894-43900.
- [78] OHTAKE S, KIMATA K, HABUCHI O. Recognition of sulfation pattern of chondroitin sulfate by uronosyl 2-O-sulfotransferase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(47): 39115-39123.
- [79] XU D, SONG D, PEDERSEN L C, et al. Mutational study of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-O-sulfotransferase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(11): 8356-8367.
- [80] LI J, SU G, LIU J. Enzymatic Synthesis of Homogeneous Chondroitin Sulfate Oligosaccharides[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(39): 11784-11787.
- [81] JU R, HAN B, HAN F, et al. Efficient expression and characterization of an endo-type lyase HCLase\_M28 and its gradual scale-up fermentation for the preparation of chondroitin sulfate oligosaccharides[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(9): 6526-6555.
- [82] HONDA T, KANEIWA T, MIZUMOTO S, et al. Hyaluronidases have strong hydrolytic activity toward chondroitin 4-sulfate comparable to that for hyaluronan[J]. Biomolecules, 2012, 2(4): 549-563.
- [83] FAN X M, ZHOU L J, HUANG J Y, et al. The structures and applications of microbial chondroitin AC lyase[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(11): 199.
- [84] HAMAI A, HASHIMOTO N, MOCHIZUKI H, et al. Two distinct chondroitin sulfate ABC lyases: AN ENDOELIMINASE YIELDING TETRASACCHARIDES AND AN EXOELIMINASE PREFERENTIALLY ACTING ON OLIGOSACCHARIDES[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(14): 9123-9130.

- [85] YIN F X, WANG F S, SHENG J Z. Uncovering the catalytic direction of chondroitin AC exolyase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(9): 4399-4406.
- [86] SUGAHARA K, TANAKA Y, YAMADA S. Preparation of a series of sulfated tetrasaccharides from shark cartilage chondroitin sulfate D using testicular hyaluronidase and structure determination by 500 MHz<sup>1</sup>H NMR spectroscopy[J]. *Glycoconjugate Journal*, 1996, 13(4): 609-619.
- [87] KANEIWA T, MIZUMOTO S, SUGAHARA K, et al. Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence[J]. *Glycobiology*, 2010, 20(3): 300-309.
- [88] WANG H, ZHANG L, ZHANG W, et al. Secretory expression of biologically active chondroitinase ABC I for production of chondroitin sulfate oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 224: 115135.
- [89] CALLAWAY E. AI protein-prediction tool AlphaFold3 is now more open[J]. *Nature*, 2024, 635(8039): 531-532.
- [90] CHEN L, LI Q, NASIF K F A, et al. AI-driven deep learning techniques in protein structure prediction[J]. *International journal of molecular sciences*, 2024, 25(15): 8426.
- [91] Wu B, Zhong B, Zheng L, et al. Harnessing protein language

model for structure-based discovery of highly efficient and robust PET hydrolases[J]. *Nature Communications*, 2025, 16 (1): 6211.

- [92] Albanese K I, Petrenas R, Pirro F, et al. Rationally seeded computational protein design of  $\alpha$ -helical barrels[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(8): 991-999.



**通讯作者：**康振(1982—)，男，博士，教授，博士生导师，研究方向为微生物合成生物学与生物制造研究。  
E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn



**第一作者：**张瑾(2002—)，女，硕士研究生。研究方向为硫酸软骨素的生物合成与酶工程改造应用。  
E-mail: 6240201068@stu.jiangnan.edu.cn