

发酵透明质酸寡糖兽疫链球菌工程菌株的构建

韦朝宝^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 康振^{1,2}

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

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

韦朝宝, 堵国成, 陈坚, 等. 发酵透明质酸寡糖兽疫链球菌工程菌株的构建. 生物工程学报, 2019, 35(5): 805–815.

Wei CB, Du GC, Chen J, et al. Construction of engineered *Streptococcus zooepidemicus* for the production of hyaluronic acid ligosaccharide. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 805–815.

摘 要: 透明质酸 (HA) 广泛应用于医学、化妆品、食品等领域。HA 的生物活性取决于其分子量 (M_w)。透明质酸寡糖由于具有重要的生理活性与特殊生理功能, 在医药领域具有重要的应用前景。兽疫链球菌因其发酵周期短、生产强度较强的特点, 在商业生产 HA 上具有广泛的应用。为了高效发酵合成透明质酸寡糖和解决发酵过程的溶氧问题, 文中通过在兽疫链球菌 WSH-24 中过表达透明质酸合酶 HasA 以及优化表达水蛭来源的透明质酸酶 LHAase。重组菌株摇瓶发酵 24 h, 透明质酸寡糖积累至 0.97 g/L, 比野生菌提高了 182.0%。在 3 L 发酵罐中发酵 24 h, 透明质酸寡糖生产强度为 294.2 mg/(L·h), HA 积累至 7.06 g/L, 比野生菌的罐上水平提高了 112.4%。文中所构建的发酵合成透明质酸寡糖的兽疫链球菌重组菌株具有重要的应用前景。

关键词: 糖胺聚糖, 兽疫链球菌, 透明质酸寡糖, 水蛭透明质酸酶, 透明质酸分子量

Construction of engineered *Streptococcus zooepidemicus* for the production of hyaluronic acid ligosaccharide

Chaobao Wei^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, Jian Chen^{1,2}, and Zhen Kang^{1,2}

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

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

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is widely used in many fields, such as medicine, cosmetics and food. The bioactivity of HA depends on its molecular weight (M_w). Owing to the important physiological activities and special physiological functions, HA oligosaccharides have important application prospects in medicine fields. *Streptococcus zooepidemicus* has wide applications in commercial production of HA, due to its short fermentation cycle and strong production intensity. In order to efficiently synthesize

Received: October 1, 2018; **Accepted:** December 6, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670092), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51707A), the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-16).

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

Jian Chen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670092), 江南大学自主科研计划重点项目 (No. JUSRP51707A), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-16) 资助。

HA oligosaccharides and solve the dissolved oxygen in the fermentation process, in this study, we overexpressed HA synthase (HasA) and introduced and optimized the leech hyaluronidase LHAase in *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24. As a result, HA oligosaccharides were efficiently produced with improved dissolved oxygen. After 24 h, HA oligosaccharides production intensity reached to 294.2 mg/(L·h), and the concentration accumulated to 0.97 g/L in flask cultures, which was 1.82 times of the wild strain. Impressively, HA oligosaccharides were increased to 7.06 g/L in 3 L fermentor. The constructed *Streptococcus zooepidemicus* strain for producing HA oligosaccharides would have broad application prospects.

Keywords: glycosaminoglycan, *Streptococcus zooepidemicus*, hyaluronic acid oligosaccharide, leech hyaluronidase, molecular weight of hyaluronic acid

透明质酸 (Hyaluronic acid, 简称 HA), 又名玻璃酸, 是于 1934 年在牛眼玻璃体中检测到的线性大分子酸性黏多糖^[1], 其分子结构由 (1- β -4) D-葡萄糖醛酸 (1- β -3) N-乙酰基-D-氨基葡萄糖的双糖单位重复连接而成^[2]。HA 以其独特的分子结构和理化性质在机体内显示出多种重要的生理功能^[3-6], 广泛应用于医学、化妆品、食品等领域。HA 的市场需求日益增大^[7], 2012 年营销价值超过 50 亿美元, 预计 2019 年将达到 98.5 亿美元^[8]。

大分子 HA 传统生产方法是从动物组织 (如公鸡鸡冠或脐带等) 通过化学方法提取而得^[9], 受到原料少、工艺程序复杂、产品提取率极低、生产成本高等因素的影响, 动物组织提取法已经逐渐被通过 C 族链球菌等毒性减弱菌株进行微生物合成所取代^[10]。据文献报道, 市场上存在的 HA 超过 90% 是来自 C 群的兽疫链球菌以及来自最近应用的枯草芽孢杆菌所生产^[11]。研究表明 HA 的生物活性和使用效果由其相对分子量 (M_w) 直接决定^[12]。大分子 HA (分子量在 100 万 Da 以上) 具有较好的弹性与保湿性, 具有抑制炎症反应、润滑和药物缓释等功能^[12], 常用于眼科手术黏弹剂^[13-14]、关节腔内注射治疗^[15-16]、化妆品、皮肤烧伤愈合及术后防粘连等^[12]。

相比于大分子量的 HA, 透明质酸寡糖 (分子量低于 1 万 Da) 具有重要的生理活性与特殊生理功能, 透明质酸寡糖能渗入真皮, 具有轻微扩张毛细血管、增加血液循环、改善中间代谢、促进皮肤营养吸收作用; 具有较强的消皱功能, 可增加皮

肤弹性, 延缓皮肤衰老^[12,16]。透明质酸寡糖还具有促血管生成^[17]、促创伤愈合^[18]、免疫调节活性^[19]和抗肿瘤活性等作用^[20]。透明质酸寡糖在医药领域具有重要的应用前景^[21]。当前制备透明质酸寡糖的方法主要集中于物理法^[22-23]、化学法^[24-25]、酶解法^[26]。物理法操作过程简单, 但效率较低, 产品稳定性较差^[22-23]。化学法引入化学试剂, 造成污染, 反应条件复杂, 产生大量工业废水^[24-25]。酶解法所使用的透明质酸酶昂贵、步骤繁琐, 也不是大量合成透明质酸寡糖的高效方法^[26]。近年来, 不少研究者试图通过直接发酵生产低分子量 HA^[27-28]。随着合成生物学、代谢工程和分子生物学领域的重大进展, 通过合理设计来获得增强生产目标代谢物的工程菌株已变得越来越普遍^[29]。构建工程菌株实现从廉价碳源 (例如蔗糖或葡萄糖) 一步合成透明质酸寡糖是非常有前景和吸引力的选择。最近, Jin 等合理设计枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的 HA 合成途径进行发酵合成透明质酸寡糖: 一方面, 将枯草芽孢杆菌 HA 合成途径中的各种基因组合过表达; 另一方面, 通过用 TTG 替换天然 ATG 起始密码子下调 *pfkA* (6-磷酸果糖激酶, PfkA) 的表达, 然后将水蛭来源的透明质酸水解酶 *LHyal* 基因整合到基因组上, 通过 LHAase 的 RBS 序列优化和 N-端融合 His 标签策略, 合理调节 LHAase 的表达, 有效地生产特定分子量 HA, 最终获得一株在 3 L 发酵罐发酵 100 h 时 HA 累积至 19.38 g/L 的高产菌株^[30]。重组枯草芽孢杆菌发酵合成 HA 的生产周期过长,

生产强度较低,而商业生产 HA 最广泛使用的兽疫链球菌^[3,31],发酵周期短,生产强度较强。相比之下,兽疫链球菌是一个强大且具有高成本效益的 HA 生产平台^[32]。本研究在兽疫链球菌 WSH-24 中过表达 *nisA* 启动子控制下透明质酸合酶 HasA,优化在高葡萄糖浓度下的诱导剂乳酸链球菌素用量,然后进一步优化表达水蛭来源的透明质酸酶 LHAase,使重组菌在合成 HA 的同时也能对 HA 进行降解,有效缓解发酵过程的溶氧问题,提高透明质酸寡糖产量。具体研究内容如图 1 所示。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

所用菌株和质粒详见表 1。

1.1.2 酶、引物、DNA marker 及相关试剂盒

PCR 引物(表 2)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Primer star DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自宝赛生物(杭州)有限公司;DNA

marker 购自 TaKaRa(大连);质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、氯霉素和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;乳酸链球菌素购自 Sigma-Aldrich,考马斯亮蓝染色液购自碧云天生物技术研究;其他化学试剂购自国药的分析纯。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0;固体 LB 培养基需添加 20.0 g/L 琼脂粉。

THY 培养基(g/L):牛肉浸粉 10.0,胰蛋白胨 20.0,葡萄糖 2.0,碳酸氢钠 2.0,氯化钠 2.0,磷酸氢二钠 0.4,酵母粉 2.0, pH 7.2。

斜面培养基(g/L):心脑浸粉(BHI) 37.0,葡萄糖 10.0,酵母粉 10.0,琼脂粉 20.0, pH 7.2。

种子培养基(g/L):葡萄糖(蔗糖) 20.0,酵母粉 20.0,七水合硫酸镁 2.0,四水合硫酸锰 0.1,磷酸二氢钾 2.0,碳酸钙 20,微量元素 1 mL/L,缓冲液 40 mL/L, pH 7.2。

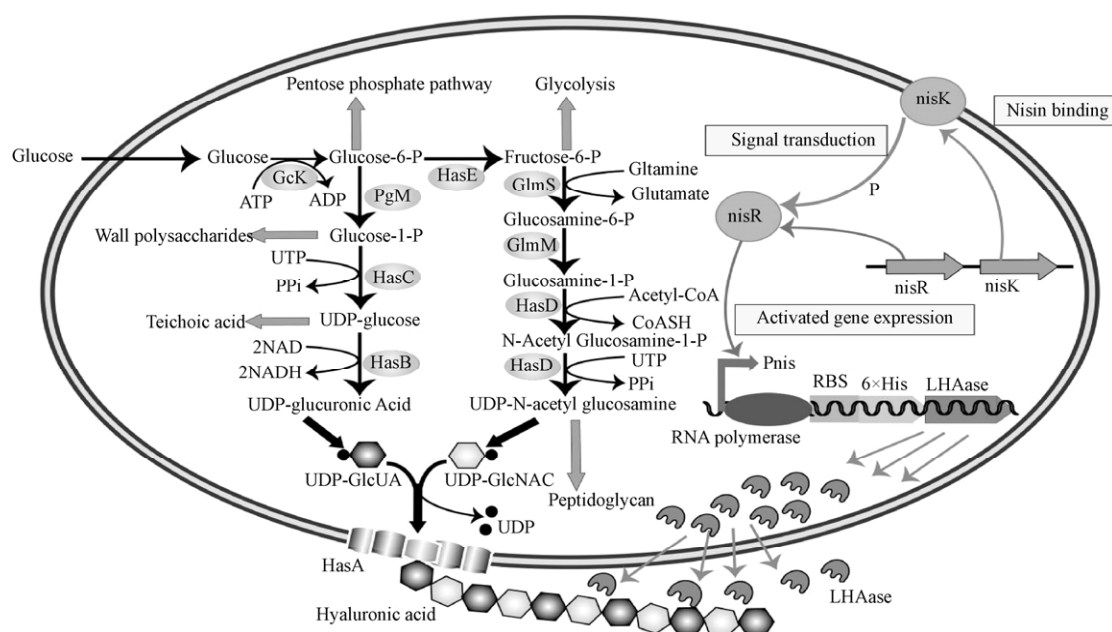


图 1 重组兽疫链球菌透明质酸寡糖合成路线示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the synthesis route of hyaluronan oligosaccharide in recombinant *Streptococcus zooepidemicus*.

表 1 本文所用的质粒与菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pNZ8148	Cm ^r , nisin promoter, <i>Streptococcus zooepidemicus</i> expression vector	Laboratory preservation
pAX01- <i>hasA</i>	Amp ^r , Em ^r , P _{xylA} - <i>hasA</i>	[30]
pMA05-sp- <i>H6LHyal</i>	pMA05 derivate, sp (<i>yweA</i>)- <i>H6LHyal</i>	[30]
pNZ8148- <i>hasA</i>	pNZ8148 derivate, P _{nis} - <i>hasA</i>	This study
pNZ8148- <i>H6LHyal</i>	pNZ8148 derivate, P _{nis} - <i>H6LHyal</i>	This study
pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i>	pNZ8148 derivate, P _{nis} - <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i>	This study
pNZ8148- <i>hasA</i> - <i>H6LHyal</i>	pNZ8148 derivate, P _{nis} - <i>hasA</i> - <i>H6LHyal</i>	This study
Strains		
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24	Industrial production strain of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Laboratory preservation
<i>E. coli</i> MC1061	The <i>E. coli</i> host of the NICE expression system	Laboratory preservation
SZha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>hasA</i> plasmid	This study
SZh6	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> plasmid	This study
SZh6(1)ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid	This study
SZhah6	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>hasA</i> - <i>H6LHyal</i> plasmid	This study
SZpnz	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ814 plasmid	This study
SZh6(2)ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid, Optimize RBS sequence of LHAaSA	This study
SZh6(3)ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid, Optimize RBS sequence of LHAaSA	This study
SZh6(4)ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid, Optimize RBS sequence of LHAaSA	This study
SZh6(5)ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid, Optimize RBS sequence of LHAaSA	This study
SZh6ha	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24 derivative, containing the pNZ8148- <i>H6LHyal</i> - <i>hasA</i> plasmid, Optimize RBS sequence of LHAaSA	This study

微量元素 (g/L): 氯化钙 2.0, 氯化锌 0.046, 五水合硫酸铜 0.019。

缓冲液 (g/L): 磷酸氢二钠 36.76, 磷酸二氢钠 15.98, 碳酸氢钠 12.5。

发酵培养基 (g/L): 酵母粉 20, 磷酸氢二钠 6.2, 硫酸钾 1.3, 葡萄糖 (蔗糖) 80, 七水合硫酸镁 2.0, 微量元素 1 mL/L, 谷氨酰胺 2.0, pH 7.2。

1.2.2 培养方法

种子培养: 将斜面种子接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 根据需要加入终

浓度为 5 μg/mL 氯霉素, 37 °C、200 r/min 培养 14–16 h。

摇瓶发酵: 将种子培养液按 10%的接种量转接至装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 根据需要加入终浓度为 5 μg/mL 氯霉素和 40 ng/mL 乳酸链球菌素, 37 °C、200 r/min 培养 24 h。

3 L 发酵罐发酵: 按 10%的接种量将种子液接入含 1.35 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中, 根据需要加入终浓度为 5 μg/mL 氯霉素和 40 ng/mL 乳酸链球菌素, 搅拌转速 300 r/min, 通气量 1.0 v/(v·min), 温度

表 2 本文所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
hasA-F	AAATTAT <u>AAAGGAGGCACTCACTGCAGATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTG</u>	54
hasA-R	CTTGAGCTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTATAATAATTTTTTACGTGTTCCCC	53
H6(1)LHyal-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6(1)LHyal-R	CTTGAGCTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTATTTTTTGCAGGCTTCAACGTTAGC	54
PNZ-F	GGTACCACTAGTTCTAGAGAGCTCAAG	27
PNZ-R	CTGCAGTGAGTGCCTCCTTATAATTT	26
H6(1)-ha-F	CAAAAAATAAGGTACCA <u>AAGGAGGCACTCACCATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTG</u>	59
H6(1)-ha-R	GTGCCTCCTTGGTACCTTATTTTTTGCAGGCTTCAACGTTAGC	43
Ha-h6(1)-F	AAAAAATTATTATAAGGTACCA <u>AAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
Ha-h6(1)-R	CCTCCTTGGTACCTTATAATAATTTTTTACGTGTTCCCC	39
H6(2)-ha-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AAGAAGAGAGTGGTACCATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6(2)-ha-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGGTACCACTCTCTTCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCT	59
H6(3)-ha-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AGGAGGAAAAGTGTACCATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6(3)-ha-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGGTAACACTTTCCTCCTATAATTTATTTTGTAGTTCCT	59
H6(4)-ha-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AGGAAGAGAGTGTACACATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6(4)-ha-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGTGTACACTCTCTTCCTATAATTTATTTTGTAGTTCCT	59
H6(5)-ha-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AAGAAGGAGATGGTACCATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6(5)-ha-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGGTACCATCTCCTTCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCT	59
H6-ha-F	AGGAACTACAAAATAAATTAT <u>AAGGAGGCACTCACTGCATGCACCACCACCACCACCAC</u>	59
H6-ha-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGCAGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCT	59

Note: the underlined nucleotide sequence is the RBS sequence.

37 ℃,使用 5 mol/L NaOH 溶液进行调节以控制 pH 为 7.0,在 8 h 期间开始流加速葡萄糖保持 5 g/(L·h) 的流速至发酵结束。

1.3 相关方法

1.3.1 制备兽疫链球菌感受态细胞

将优良单菌落接入 5 mL THY 液体培养基中,200 r/min、37 ℃下培养 10–14 h。按 1%的接种量接入新鲜的 40 mL 的 THY 液体培养基中,37 ℃下培养至 OD₅₃₀ 为 0.4 左右时加入无菌的 LHAase 溶液 10 mL (酶活 5×10⁵ U/mL),继续培养约 30 min 后将其冰浴 10 min。6 000 r/min、4 ℃离心 10 min,收集菌体,加入提前冰浴的 0.5 mol/L 的蔗糖溶液 20 mL 重悬菌体。重悬菌体和离心重复操作 2 次,加入 500 μL 15%甘油的 0.5 mol/L 的蔗糖溶液,重悬菌体后进行分装。

1.3.2 兽疫链球菌的电转化及重组子的鉴定

将 5 500 ng 质粒加入感受态细胞中,混匀,冰浴 10 min 后加入预冷的电转杯里进行电激,电

压为 2 500 V (2 mm 电转杯)。电激后将 900 μL 冷 THY 培养液加入电转杯中,混匀后吸出置于离心管中,冰浴 30 min。37 ℃静置培养 1.5–2.5 h 后涂布于带有氯霉素抗性的 THY 板。37 ℃培养 24–48 h,挑选转化子提取质粒,进行 PCR 验证及测序鉴定。

1.3.3 菌体生长密度测定

取 1 mL 发酵液加入适量稀 HCl 溶解 CaCO₃,10 000 r/min 离心 5 min。收集菌体,用蒸馏水重悬,适当稀释菌液后测定 600 nm 波长下的吸光值(用蒸馏水调零)。

1.3.4 透明质酸寡糖样品的分离纯化

取 5 mL 发酵液,加入终浓度为 0.1% (W/V) 的十二烷基硫酸钠 (SDS),颠倒混匀后室温下静置 10 min。10 000 r/min 离心 10 min,将收集的上清液加入 TCA 调 pH 值至 4.5,75 ℃水浴 20 min 后,10 000 r/min 离心 10 min,再将收集的上清液用 NaOH 调 pH 值至 7.0 后加入 7 倍体积的无水乙

醇,颠倒混匀后置于 4 ℃静置 6 h,使 HA 沉淀。10 000 r/min 离心 5 min,除去上清;加入与发酵液等体积的去离子水,充分溶解,将醇沉和溶解操作重复 2 遍。分离纯化得到的样品将用于测定 HA 的浓度和分子量。

1.3.5 透明质酸寡糖含量测定

采用 Bitter-Muir 氏法定量测定 HA 含量^[30]。

1.3.6 透明质酸寡糖的分子量

采用高效液相色谱-体积排阻色谱 (HPSEC-MALLS-RI) 测定透明质酸寡糖的质量平均分子量 (M_w)、数量平均分子量 (M_n) 和多分散性系数 I_p ($I_p=M_w/M_n$)^[30]。

1.3.7 水蛭透明质酸酶活力的测定方法

水蛭透明质酸酶的活力单位定义为:在 pH 5.5 和 38 ℃下,每小时从透明质酸中释放 1 μg 葡萄糖还原当量的还原糖所需的酶量^[30]。LHAase 的活力测定方法采用 DNS 法^[30]。

1.3.8 LHAase 的纯化及质谱检测 LHAase 水解液中的 HA 寡糖

LHAase 的 N 端带有 6 个 His 标签,纯化 LHAase 蛋白时使用 Ni-NTA 亲和柱富集高度浓缩发酵液上清,以灭活的 H6LHyal 纯化液为对照,在 38 ℃、pH 5.5 的柠檬酸盐缓冲液中,用 H6LHyal 纯化液水解上述 HA 纯化样品 15 h,水解液用含有 ESI 离子源 C_{18} 柱 (150 mm×2.0 mm; Shimadzu, Kyoto, Japan) 的质谱仪检测^[33]。流动相为水和乙醇,恒定流速 0.2 mL/min。质谱分析以负离子模式进行,扫描范围为 300–1 500 (m/z), 10 s/scan。

2 结果与分析

2.1 表达系统与重组兽疫链球菌的构建

以质粒 pAX01-*hasA* 和 pMA05-sp-*H6LHyal* 为模板,分别以引物 *hasA*-F/*hasA*-R、H6(1)LHyal-F/H6(1)LHyal-R 进行 PCR 扩增,将得到 *hasA*、*H6LHyal* 的线性 DNA 片段分别与骨架 pNZ8148 (以质粒 pNZ8148 为模板,使用引物 PNZ-F/PNZ-R

扩增) 进行组装获得重组质粒 pNZ8148-*hasA* 和 pNZ8148-*H6LHyal*。以引物 H6(1)-ha-F/*hasA*-R 对质粒 pAX01-*hasA* 进行 PCR 扩增,将得到的 *hasA* 线性 DNA 片段和骨架 pNZ8148-*H6LHyal* (以质粒 pNZ8148-*H6LHyal* 为模板,使用引物 PNZ-F/H6(1)-ha-R 扩增) 进行组装获得重组质粒 pNZ8148-*H6LHyal*-*hasA*。以引物 Ha-h6(1)-F/*hasA*-R 对质粒 pMA05-sp-*H6LHyal* 进行 PCR 扩增,将得到的 *H6LHyal* 线性 DNA 片段与骨架 pNZ8148-*hasA* (以质粒 pNZ8148-*hasA* 为模板,使用引物 PNZ-F/Ha-h6(1)-R 扩增) 进行组装获得重组质粒 pNZ8148-*hasA*-*H6LHyal*。将质粒 pNZ8148、pNZ8148-*hasA*、pNZ8148-*H6LHyal*、pNZ8148-*H6LHyal*-*hasA*、pNZ8148-*hasA*-*H6LHyal* 分别电转入兽疫链球菌感受态细胞,得到重组兽疫链球菌 SZpnz、SZha、SZh6、SZh6(1)ha、SZhah6 (重组菌的菌落 PCR 验证见图 2)。H6LHyal RBS 序列优化以重组质粒

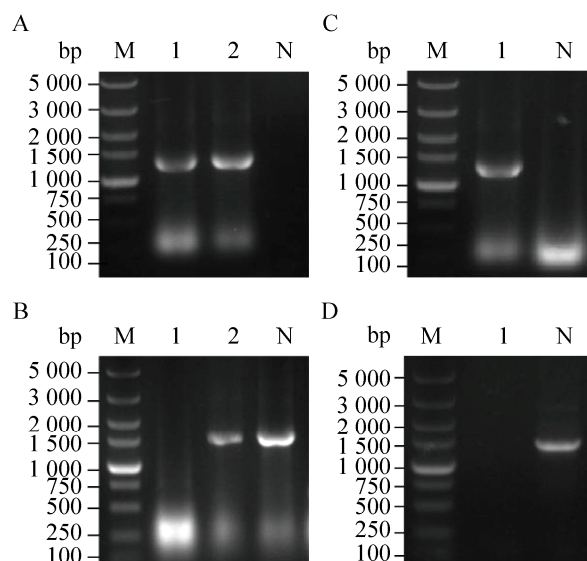


图 2 重组菌菌落 PCR 验证

Fig. 2 Colony PCR validation of recombinant strains. N: negative control; 1, 2: positive clone PCR amplification band (The size of *hasA* DNA fragment: 1 254 bp; the size of *H6LHyal* DNA fragment: 1 491 bp). (A) Recombinant strain SZha. (B) Recombinant strain SZh6. (C) Recombinant strain SZh6ha. (D) Recombinant strain SZhah6.

pNZ8148-*H6LHyal*-*hasA* 为模板, 使用引物 H6(2)-ha-F/H6(2)-ha-R、H6(3)-ha-F/H6(3)-ha-R、H6(4)-ha-F/H6(4)-ha-R、H6(5)-ha-F/H6(5)-ha-R、H6-ha-F/H6-ha-R 分别进行全质粒 PCR, 用 Dpn1 消化后获得 5 个 *H6LHyal* 基因 RBS 强度不同的重组质粒 pNZ8148-*H6LHyal*-*hasA*, 再将这 5 个重组质粒电转入兽疫链球菌感受态细胞, 得到重组兽疫链球菌 SZh6(2)ha、SZh6(3)ha、SZh6(4)ha、SZh6(5)ha 和 SZh6ha。

2.2 过表达 *hasA* 基因对 HA 产量的影响

将重组兽疫链球菌 SZha 在不同乳酸链球菌素终浓度下摇瓶发酵, 结果见图 3, 在乳酸链球菌素终浓度小于 40 ng/mL 时, 乳酸链球菌素诱导过表达 *HasA* 使 HA 产量提高, 同时乳酸链球菌素没有对菌体生长带来明显的负面影响, 菌体密度与对照 (乳酸链球菌素终浓度为 0) 比相差不大。乳酸链球菌素终浓度大于 40 ng/mL 时, 导致菌体密度与 HA 产量都减少了, 这可能是高乳酸链球菌素浓度对细胞有毒性和对细菌生长有抑制作用的结果。当乳酸链球菌素终浓度为 40 ng/mL 时, HA 产量达到最大, 比对照提高 64.9%。说明在适合乳酸链球菌素浓度下过表达 *HasA* 能显著提高 HA 产量。*HasA* 利用两种糖底物 (UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc) 合成 HA, 是 HA 生产中的关键

酶^[3]。Chen 等在兽疫链球菌中过表达 HA 合成操纵子的 5 个基因探究前体物浓度对 HA 产量及分子量影响, 其研究结果也表明 *HasA* 的过表达导致 HA 产量的显著增加和分子量的显著降低^[34]。

2.3 LHAase 的分泌表达及优化

水蛭型透明质酸酶 (LHAase; EC.3.2.1.36) 专一作用于 HA 的 β -1,3 糖苷键, 产生还原端为葡萄糖醛酸的四糖或者己糖。通过 DNS 法检测 LHyal 水解 HA 产生的还原糖含量可以计算出它的酶活。借鉴于 N-端融合 6 个 His 标签对 *LHyal* 基因在枯草芽孢杆菌 168 中的分泌表达有显著影响的成功案例^[30], 在 LHyal 的 N-端也融合了 6 个 His 标签。以 SZpnz 为对照菌株, 将重组菌 SZh6、SZh6(1)ha 和 SZhah6 进行摇瓶发酵。为避免培养基中还原糖的存在对实验结果的负面影响, 将发酵培养基中的碳源由葡萄糖换成蔗糖, 发酵 24 h 时将发酵液上清稀释适当倍数与 DNS 试剂反应, 结果见图 4A, 直观反映了 SZh6、SZhah6、SZh6(1)ha 发酵液上清有还原糖生产, 证明了 *H6LHyal* 在兽疫链球菌中能分泌表达, 并能在体外催化透明质酸水解而产生还原糖。酶活测定结果如图 4B 所示, SZh6 的酶活仅为 5 859.3 U/mL, SZhah6、SZh6(1)ha 的酶活比 SZh6 分别高 9%、37.96%。SDS-PAGE 分析重组菌的 LHAase 表达情况, 结果见图 4C。可以看出重组菌 SZh6(1)ha 表达的 LHAase 含量高一些, 这可能是在兽疫链球菌中 *H6LHyal* 的 C 端串联表达 *HasA* 更有助于 LHAase 表达的原因。SDS-PAGE 蛋白电泳进一步分析纯化的 LHAase, 结果见图 4D, 在分子量为 58 kDa 处有清晰条带, 进一步证明了 *H6LHyal* 分泌表达。质谱检测 LHAase 纯化液水解 HA 纯化样品的结果见图 4E 和图 4F, 检测到 HA2、HA4、HA6、HA10, 进一步证明了分泌表达的 *H6LHyal* 存在酶活。*H6LHyal* 的表达量比较低, 需进一步优化。核糖体结合位点 (RBS) 是蛋白表达的重要调控元件之一, RBS 强度显著影响蛋白的表达

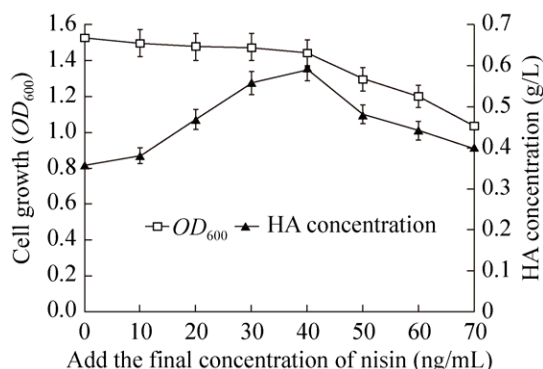


图 3 乳酸链球菌素添加量对菌体密度、透明质酸产量的影响

Fig. 3 Effects of nisin addition on strain density and hyaluronic acid production.

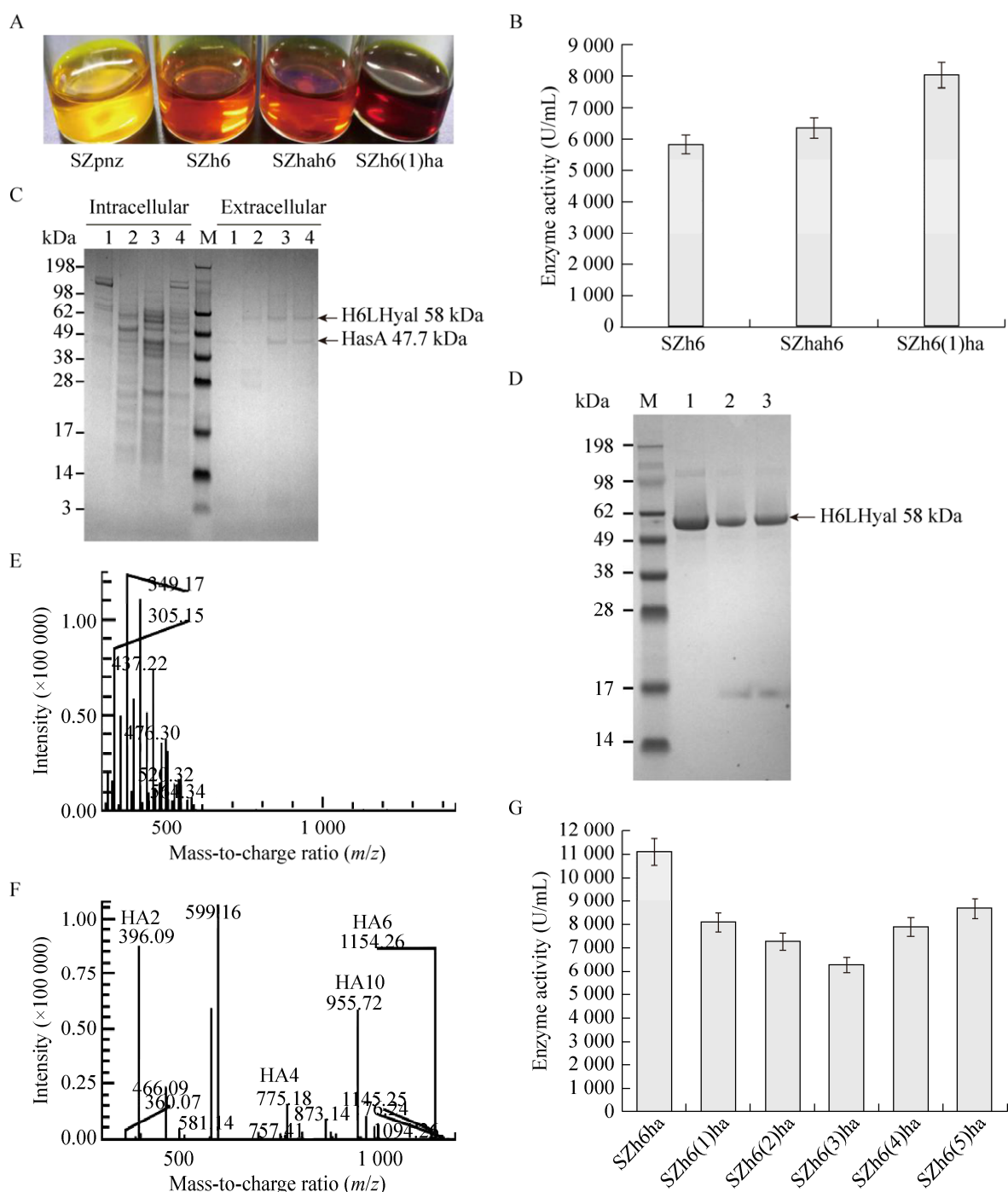


图 4 LHAase 的分泌表达及优化

Fig. 4 Secretory expression and optimization of LHAase. (A) The LHAase activity of the recombinant strain by DNS method in the fermentation broth. (B) Recombinant LHAase activity detection. (C) SDS-PAGE analysis of LHAase by recombinant strains. 1: SZpnz; 2: SZh6; 3: SZh6(1)ha; 4: SZhah6; M: protein marker. (D) SDS-PAGE analysis of purified H6LHyal. 1: SZh6(1)ha; 2: SZh6; 3: SZhah6. (E) Mass spectrometric analysis of H6LHyal (inactivated) hydrolysate. (F) Mass spectrometry analysis of H6LHyal hydrolysate. {The anion m/z of 396.11 $[M]^-$ (HA2), 775.22 $[M]^-$ (HA4), 1154.33 $[M]^-$ (HA6), 576.66 $[M]^{2-}$ (HA6), 766.22 $[M]^{2-}$ (HA8) and 955.77 $[M]^{2-}$ (HA10)}. (G) The enzyme activity analysis of LHAase by RBS sequence optimization.

水平^[30]。根据金鹏等^[30]具有正结果的 RBS 序列及表达载体 pNZ8148、pNZ8149、pNZ8150 所用的 RBS 序列进行 H6LHyal RBS 序列优化,结果见表 2(带有下划线的核苷酸序列为 RBS 序列)。优化 H6LHyal RBS 序列的结果如图 4G 所示。SZh6ha 的酶活高达 11 113.2 U/mL,比 SZh6 的酶活提高了 89.67%。

2.4 透明质酸寡糖一步发酵合成

将兽疫链球菌重组菌株 SZpnz、SZha、SZh6、SZhah6、SZh6ha 与野生菌株 WT 进行摇瓶发酵,第 24 小时的 HA 产量结果如图 5 所示,带有空载体 pNZ8148 的重组菌 SZpnz 的 HA 产量略微高于野生菌。其原因是外源质粒带来的应激效应有利于 HA 产量提高,但不显著^[34]。相对于野生菌株,重组菌 SZha、SZh6 的 HA 产量明显提高,分别提高了 72.0% 和 83.4%。*hasA* 的过表达,导致更多透明质酸合酶竞争前体 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAcHA,使 HA 分子量显著降低,进而导致 HA 产量的显著增加^[34]。摇瓶发酵过程中,随着发酵液粘稠度上升导致溶氧降低,严重影响细胞的正常代谢和 HA 产量的提高^[30],而 LHAase 的分泌表达使得重组菌在产 HA 的同时也能对 HA 进行降解,有效缓解发酵过程的溶氧问题,有益于 HA 产量提高。相比于野生菌,重组菌 SZhah6、SZh6ha 的

HA 产量分别提高了 94.8% 和 182.0%。由于摇瓶发酵不能对 pH 值、溶氧、碳源浓度等发酵条件进行有效控制,导致菌体密度低,HA 产量低。因此,根据摇瓶发酵的结果,以野生菌株作为对照,将重组菌 SZh6ha 在 3 L 发酵罐中进行放大发酵,结果如图 6 所示。重组菌 SZh6ha 培养 12 h 就开始进入稳定期,野生菌培养 16 h 才进入稳定期,重组菌的菌体浓度一直低于野生菌,这可能与重组菌表达 LHAase 和过表达 *HasA* 对细胞生长造成压力有关。发酵培养前 8 h,HA 积累量少,生长对数期的中后期,HA 开始快速积累,细菌生长的稳定期 HA 依然在积累。发酵 24 h 时重组菌 SZh6ha 的 HA 积累量约为 7.06 g/L,是摇瓶发酵水平的 7.25 倍,相比于野生菌的 3 L 发酵罐水平提高了 112.4%;生产强度为 294.2 mg/(L·h),比已报道的重组枯草芽孢杆菌^[30]的生产强度大;HA M_w 约为 7.22×10^4 Da (表 3),相对于野生菌的 HA M_w ,有了大幅度的下降; I_p 值约为 1.31,说明重组菌 SZh6ha 在发酵时较好地保持了相对集中的分子量。在兽疫链球菌中表达 LHAase 和过表达 *HasA* 能提高碳通量流向透明质酸合成途径,最终达到提高透明质酸寡糖产量的目的,在透明质酸寡糖生产方面具有明显的优势。

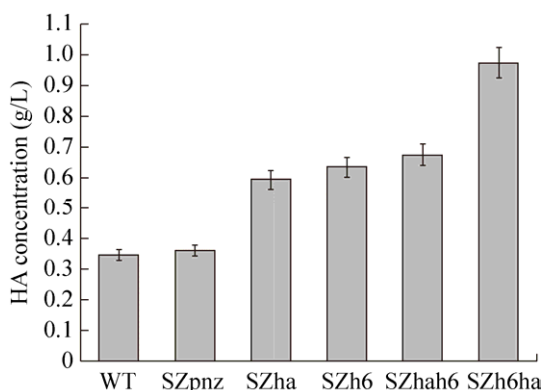


图 5 摇瓶培养比较分析重组菌株和野生兽疫链球菌株
Fig. 5 The comparison of shake flask cultures of recombinant *Streptococcus zooepidemicus* and the wild-type strain.

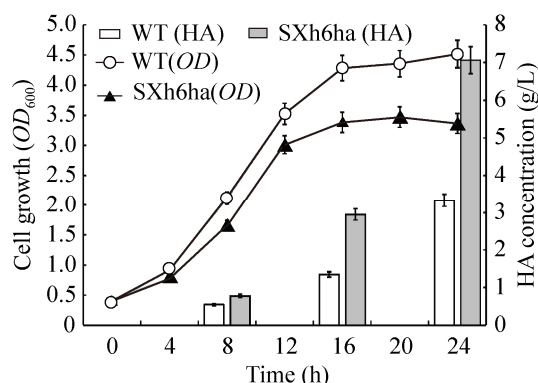


图 6 3 L 发酵罐分批发酵比较分析重组菌株和野生兽疫链球菌株

Fig. 6 The comparison of batch fermentation of recombinant *Streptococcus zooepidemicus* and the wild-type strain.

表 3 重组兽疫链球菌株的透明质酸分子量分析

Table 3 The analysis of hyaluronan molecular weights of recombinant *Streptococcus zooepidemicus* strains

	$M_w (\times 10^4 \text{ Da})$	$M_n (\times 10^4 \text{ Da})$	I_p
WT (shake flask)	174.91±1.25	80.46±0.94	2.17±0.06
SZh6ha (shake flask)	7.52±0.94	3.83±0.91	1.97±0.08
WT (3 L fermentor)	163.48±1.17	94.27±0.83	1.73±0.10
SZh6ha (3 L fermentor)	7.22±1.24	5.50±0.65	1.31±0.11

3 结论

透明质酸寡糖在医药领域具有重要的应用前景, 构建重组兽疫链球菌发酵合成透明质酸寡糖具有重要意义。通过在兽疫链球菌 WSH-24 中过表达 nisA 启动子控制下的 HasA, 并优化在 80 g/L 葡萄糖浓度下诱导剂乳酸链球菌素的用量, 确定乳酸链球菌素终浓度为 40 ng/mL 时, 乳酸链球菌素对细胞生长副作用较低, 同时 HA 积累量达到最大, 比对照提高 64.9%。通过 LHAase 的 N-端融合 6 个 His 标签和 RBS 序列优化策略, 实现 LHAase 在兽疫链球菌中分泌表达, 重组菌的 LHAase 最高酶活高达 11 113.2 U/mL。通过同时过表达 HasA 和优化表达水蛭来源的 LHAase, 解决了发酵过程的溶氧问题并实现了透明质酸寡糖的高效发酵合成。重组菌株摇瓶发酵 24 h, HA 积累至 0.97 g/L, 比野生菌提高了 182.0%。在 3 L 发酵罐中发酵 24 h, HA 积累至 7.06 g/L, 比野生菌的罐上水平提高了 112.4%; 生产强度为 294.2 mg/(L·h), 与已报道的重组枯草芽孢杆菌相比^[30], 本研究所构建的重组兽疫链球菌具有更大的生产强度。本研究为透明质酸寡糖生物合成提供了新策略, 在 HA 寡糖生产方面具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*, 1934, 107(3): 629–634.
- [2] Weissmann B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc*, 1954, 76(7): 1753–1757.
- [3] Kang Z, Zhou ZX, Wang Y, et al. Bio-based strategies for producing glycosaminoglycans and their oligosaccharides. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(8): 806–818.
- [4] Cheng FY, Gong QY, Yu HM, et al. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol J*, 2016, 11(4): 574–584.
- [5] Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J*, 1993, 7(13): 1233–1241.
- [6] Toole BP. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation//Hay ED, Ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd ed. Boston, MA: Springer, 1991: 305–341.
- [7] Zakeri A, Rasaee MJ, Pourzardosht N. Enhanced hyaluronic acid production in *Streptococcus Zooepidemicus* by over expressing HasA and molecular weight control with Niscin and glucose. *Biotechnol Rep*, 2017, 16: 65–70.
- [8] De Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV, et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 119.
- [9] Yamada T, Kawasaki T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(6): 521–528.
- [10] Liu L, Liu YF, Li JH, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact*, 2011, 10(1): 99.
- [11] Cimini D, Iacono ID, Carlino E, et al. Engineering *S. equi* subsp. *zooepidemicus* towards concurrent production of hyaluronic acid and chondroitin biopolymers of biomedical interest. *AMB Express*, 2017, 7(1): 61.
- [12] Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(8): 699–715.
- [13] Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244(1): 109–112.
- [14] Sand BB, Marner K, Norn MS. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. A double masked clinical trial. *Acta Ophthalmol*, 1989, 67(2): 109–112.

- 181–183.
- [15] Patel, Sanjay R, Malhotra, et al. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *Bmc Musculoskel Dis*, 2015, 16(1): 321.
- [16] Chen LH, Xue JF, Zheng ZY, et al. Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: a review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. *Int J Biol Macromo*, 2018: 572–584.
- [17] West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res*, 1989, 183(1): 179–196.
- [18] Trabucchi E, Pallotta S, Morini M, et al. Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *Int J Tissue React*, 2002, 24(2): 65–71.
- [19] Termeer C, Sleeman JP, Simon JC. Hyaluronan – magic glue for the regulation of the immune response? *Trends Immunol*, 2003, 24(3): 112–114.
- [20] Benitez A, Yates TJ, Lopez LE, et al. Targeting hyaluronidase for cancer therapy: antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2011, 71(12): 4085–4095.
- [21] Karbownik MS, Nowak JZ. Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(5): 1056–1074.
- [22] Miyazaki T, Yomota C, Okada S. Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid. *Polym Degrad Stab*, 2001, 74(1): 77–85.
- [23] Reháková M, Bakoš D, Soldán M, et al. Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16(3): 121–124.
- [24] Tokita Y, Okamoto A. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polym Degrad Stab*, 1995, 48(2): 269–273.
- [25] Hawkins CL, Davies MJ. Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24(9): 1396–1410.
- [26] Tawada A, Masa T, Oonuki Y, et al. Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers. *Glycobiology*, 2002, 12(7): 421–426.
- [27] Armstrong DC, Johns MR. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2759–2764.
- [28] Pummill PE, DeAngelis PL. Alteration of polysaccharide size distribution of a vertebrate hyaluronan synthase by mutation. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 19808–19814.
- [29] Keasling JD. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 2010, 330(6009): 1355–1358.
- [30] Jin P, Kang Z, Yuan PH, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metab Eng*, 2016, 35: 21–30.
- [31] Zhang YL, Luo KL, Zhao QS, et al. Genetic and biochemical characterization of genes involved in hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(8): 3611–3620.
- [32] Tlustá M, Krahulec J, Pepeliaev S, et al. Production of hyaluronic acid by mutant strains of group C *Streptococcus*. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(3): 747–755.
- [33] Jin P, Kang Z, Zhang N, et al. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers. *Sci Rep*, 2014, 4: 4471.
- [34] Chen WY, Marcellin E, Hung J, et al. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-*N*-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *J Biol Chem*, 2009, 284(27): 18007–18014.

(本文责编 陈宏宇)