

两种 UDP-葡萄糖脱氢酶对透明质酸生物转化的影响

郭东会¹, 韩剑², 刘伟丰², 傅震洲², 朱启忠¹, 陶勇²

1 山东大学海洋学院, 山东 威海 264209

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

郭东会, 韩剑, 刘伟丰, 等. 两种 UDP-葡萄糖脱氢酶对透明质酸生物转化的影响. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1691-1700.

Guo DH, Han J, Liu WF, et al. Effects of two UDP-glucose dehydrogenases on hyaluronic acid biotransformation. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1691-1700.

摘要: 分别从大肠杆菌和化脓链球菌中扩增出编码 UDP-葡萄糖脱氢酶基因 *ecohasB* 和 *spyhasB*, 并将其插入 T7 表达载体 pRX₂ 构建重组质粒 pRXEB 和 pRXSB。在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中重组表达, 并对经镍柱纯化后的 UDP-葡萄糖脱氢酶的酶学性质进行分析。酶学性质研究表明: *spyHasB* 的最适反应温度是 30 °C, 最适 pH 10, 最适条件下的比活力是 12.2 U/mg; *ecoHasB* 的最适反应温度是 30 °C, 最适 pH 9, 最适条件下的比活力是 5.55 U/mg。从多杀巴氏杆菌扩增出的透明质酸合成酶基因 *pmuhasA* 分别与 *ecohasB* 和 *spyhasB* 构建共表达载体 pBPAEB 和 pBPASB。将其转化到大肠杆菌 BW25113 中, 经生物转化生产透明质酸 (HA), 并对转化条件进行了优化。结果表明: 重组菌株进行透明质酸转化时, UDP-葡萄糖脱氢酶酶活力越高, 稳定性越好, HA 产量越高; 转化条件优化后, pBPAEB/BW25113 和 pBPASB/BW25113 在摇瓶中的产量分别是 1.52 和 1.70 g/L, 比之前报道的提高了 2-3 倍。

关键词: UDP-葡萄糖脱氢酶, 酶学性质, 透明质酸, 生物转化

Effects of two UDP-glucose dehydrogenases on hyaluronic acid biotransformation

Donghui Guo¹, Jian Han², Weifeng Liu², Zhenzhou Fu², Qizhong Zhu¹, and Yong Tao²

1 Marine College, Shandong University, Weihai 264209, Shandong, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: We amplified genes encoding UDP-glucose dehydrogenase, *ecohasB* from *Escherichia coli* and *spyhasB* from

Received: March 10, 2014; **Accepted:** May 5, 2014

Supported by: The Second Innovation Fund of "Industrial Microbial Genomics Modification and Application", Institute of Microbiology, CAS

Corresponding author: Qizhong Zhu. Tel: +86-631-5688660; E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn

Yong Tao. Tel: +86-10-64807419; E-mail: taoyong@im.ac.cn

中国科学院微生物研究所工业微生物组学改造及应用创新培育基金“第二批”资助。

Streptococcus pyogenes. Both *ecohasB* and *spyhasB* were inserted into T7 expression vector pRX₂ to construct recombinant plasmids pRXEB and pRXSB, and to express in *E. coli* BL21(DE3). After nickel column purification of UDP-glucose dehydrogenases, the enzymes were characterized. The optimum reaction condition of *spyHasB* was at 30 °C and pH 10. The specific activity reached 12.2 U/mg under optimum condition. The optimum reaction condition of *ecoHasB* was at 30 °C and pH 9. Its specific activity reached 5.55 U/mg under optimum condition. The *pmuhasA* gene encoding hyaluronic acid synthase was amplified from *Pasteurella multocida* and ligated with *ecohasB* and *spyhasB* to construct the coexpression vectors pBPAEB and pBPASB, respectively. The co-expression vectors were transformed into *E. coli* BW25113. Hyaluronic acid (HA) was produced by biotransformation and the conditions were optimized. When recombinant strains were used to produce hyaluronic acid, the higher the activity of UDP-glucose dehydrogenase was, the better its stability was, and the higher the HA production could reach. Under the optimal conditions, the yields of HA produced by pBPAEB/BW25113 and pBPASB/BW25113 in shake flasks were 1.52 and 1.70 g/L, respectively, and the production increased more than 2–3 folds as previously reported.

Keywords: UDP-glucose dehydrogenase, enzyme characterization, hyaluronic acid, biotransformation

透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 是一种糖胺聚糖, 它是由 D-葡糖醛酸 (GlcA) 和 N-乙酰葡萄糖胺 (NAG) 以 β (1 \rightarrow 3) 和 β (1 \rightarrow 4) 糖苷键交替连接的二糖结构单位组成^[1], 在医药、食品、化妆品等领域有广泛的应用^[2-4]。目前, 全球市场对 HA 产品需求超过十亿美元^[5]。

HA 最早是从动物组织中提取, 但存在来源困难、价格昂贵、提取工艺复杂、HA 产量低、有跨种属病毒传染风险等诸多缺点。与动物组织提取相比, 微生物发酵生产 HA 具有原料充足、成本低、易于分离纯化、可以规模化生产等优点。发酵生产 HA 起始于 20 世纪 80 年代, 主要的生产菌株是兽疫链球菌, 目前发酵产量可以达到 6–7 g^[6], 近来研究者主要通过诱变、发酵条件优化^[7]等方式提高 HA 产量, 但兽疫链球菌是潜在的致病菌, 其生产的 HA 在医学上的应用受到了限制。因此, 重组菌生产 HA 已成为一个趋势。目前, 国内外已报道过的重组菌包括土壤农杆菌^[8]、乳酸菌^[9]、枯草芽胞杆菌^[10]、嗜热链球菌^[11]和大肠杆菌^[12-13]。与上述其他菌株相比, 大肠杆菌具有易于培养、发酵条件容易控制、遗传背景清晰、遗传操作成熟、有大量的

调控元件、调控模块可供选择等优势^[13-14], 因此重组的大肠杆菌可以成为 HA 生物转化的良好宿主。

UDP-葡萄糖脱氢酶 (UDP-glucose dehydrogenase, 简称 UGDH, EC 1.1.1.22) 催化 2 分子的 NAD 和 1 分子 UDP-葡萄糖 (UDP-Glc) 生成 2 分子的 NADH 和 1 分子 UDP-葡糖醛酸 (UDP-GlcA)^[15], 生成的 UDP-GlcA 是参与 HA 合成的前体物质之一。

目前, 国内外主要对来源于嗜嗜热古菌-冰岛热棒菌 *hyperthermophilic Archaeon Pyrobaculum islandicum*^[16]、海洋真菌草茎点霉 *Phoma herbarum YS4108*^[17]、鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas elodea*^[18]、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[19]和化脓链球菌 *Streptococcus pyogenes*^[20] UDP-葡萄糖脱氢酶的性质进行了相关报道。大肠杆菌 K5 来源的 *kfiD*^[13], 大肠杆菌 K12 来源的 *ugd*^[12], 枯草芽胞杆菌来源的 *tuaD*^[10]和链球菌来源的 *hasB*^[11]用于在重组菌中发酵生产 HA。2009 年, Sheng 等^[21]在重组乳酸菌合成 HA 的过程中发现, 高活性的 UDP-葡萄糖脱氢酶更有利于 HA 的生成。2005 年, Windner 等^[10]发现重组枯草芽胞杆菌中, UDP-GlcA 限制了 HA 的

合成。2008年, Yu等^[12]分析发现 *ecohasB* 基因的过表达能显著提高 HA 的产量。这些研究结果表明 UDP-葡萄糖脱氢酶是透明质酸合成过程中的关键酶, 因此有必要在 HA 生产菌株中筛选和优化 UDP-葡萄糖脱氢酶基因。

本研究对大肠杆菌 K12 来源的 *ecoHasB* 和化脓链球菌来源的 *spyHasB* 酶学性质进行比较分析。首次将多杀性巴氏杆菌的 *hasA* 基因分别与 *ecohasB* 和 *spyhasB* 基因在大肠杆菌 BW25113 中共表达, 采用生物转化的方法生产透明质酸, 并对转化条件进行了优化。通过 UGDH 酶学性质的比较和重组菌株 HA 产量的分析, 阐明其在 HA 生产中的作用, 这为后期大规模生产 HA 提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

pRX₂ 和 pBAD-HisB 质粒, 大肠杆菌 BW25113 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株均为本实验室保存; 多杀巴氏杆菌购自国家兽医微生物菌种保藏中心, 菌株编号 CVCC408; 化脓链球菌为中国科学院微生物研究所王北难课题组提供。

1.1.2 主要试剂

UDP-葡萄糖和 NAD 购于 Sigma 公司; N-乙酰葡萄糖胺购于阿拉丁试剂(上海)有限公司; DNA marker 和 Protein marker 购于 Fermentas 公司; TransStart Fast Pfu DNA Polymerase 购于北京全式金生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、普通 DNA 回收试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 主要培养基和溶液

自诱导培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 5 g/L 甘油, 0.5 g/L 葡萄糖, 2 g/L 阿拉伯糖或者 2 g/L 乳糖, 25 mmol/L 磷酸氢二钠, 50 mmol/L 氯化铵, 25 mmol/L 磷酸二氢钾, 5 mmol/L 硫酸钠, 2 mmol/L 的硫酸镁, 50 mmol/L 氯化亚铁, 0.02 mmol/L 氯化钙, 0.01 mmol/L 氯化镁, 0.01 mmol/L 硫酸锌, 0.002 mmol/L 氯化钴、氯化铜、氯化镍、钼酸钠、亚硒酸钠和硼酸, 0.06 mmol/L 盐酸和 0.1 g/L 氨苄青霉素钠^[22]。

生物转化培养基: 75 mmol/L N-乙酰葡萄糖胺 (NAG), 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 4 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 2 mmol/L 氯化锰, 25 g/L 葡萄糖 (Glc), 5 g/L 硫酸铵^[8]。

1.2 方法

1.2.1 基因组的提取

化脓链球菌、大肠杆菌和多杀巴氏杆菌 CVCC408 的基因组 DNA 采用细菌基因组提取试剂盒提取。

1.2.2 *hasA* 和 *hasB* 基因的克隆

根据多杀巴氏杆菌透明质酸合成酶 (*Pasteurella multocida* hyaluronan synthase) *pmuhasA* 序列 (GenBank Accession No. AF036004.2), 化脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 *spyhasB* 序列 (GenBank Accession No. CP000017.1) 和大肠杆菌 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 *ecohasB* 序列 (GenBank Accession No. U00096.3), 利用 Primer Premier 5.0 设计引物见表 1。

分别以多杀巴氏杆菌、化脓链球菌和大肠杆菌的基因组 DNA 为模板, 以表 1 对应的上下游引物扩增基因。PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min 共 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用普通 DNA 回收试剂盒回收。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Restriction site	Primer sequence (5'-3')
<i>Pmu</i> -F	<i>Nco</i> I	CATGCCATGGGCATGAATACATTATCACAAGCAAT
<i>Pmu</i> -R ₁	<i>Bam</i> H I	CGGGATCCTTATAGAGTTATACTATTAATAATGAACTTG
<i>Pmu</i> -R ₂	<i>Sac</i> I	CGAGCTCTTATAGAGTTATACTATTAATAATGAACTTG
<i>Eco</i> -F ₁	<i>Nde</i> I	GGAATTCCATATGAAAATCACCATTTCGGTACTG
<i>Eco</i> -R ₁	<i>Kpn</i> I	CGGGTACCTTAGTCGCTGCCAAAGAGATCG
<i>Eco</i> -F ₂	<i>Bam</i> H I	CGGGATCCAAGGAGATATAATGAAAATCACCATTTCGGTACTG
<i>Eco</i> -R ₂	<i>Sac</i> I	CGAGCTCTTAGTCGCTGCCAAAGAGATCG
<i>Spy</i> -F	<i>Bam</i> H I <i>Nde</i> I	CGGGATCCAAGGAGATATACATATGAAAATAGCAGTTGCTGGATC
<i>Spy</i> -R	<i>Sac</i> I	CGAGCTCTTAGTCTCTACCAAAAATATCTCTACTGTAAAC

The underlined bases represent restriction site.

1.2.3 工程菌的构建

质粒的提取、酶切、连接、转化等实验操作均按照《分子克隆实验指南》^[23]进行。*ecohasB*的PCR产物,质粒 pRX₂ *Nde* I / *Kpn* I 双酶切连接转化; *spyhasB*的PCR产物,质粒 pRX₂ *Nde* I / *Sac* I 双酶切连接转化,挑选阳性克隆测序,鉴定正确的重组载体分别命名为 pRXEB 和 pRXSB (图 1)。*pmuhasA*的PCR产物,质粒 pBAD *Nco* I / *Sac* I 双酶切连接转化; *pmuhasA*的PCR产物 *Nco* I / *Bam*H I 双酶切, *ecohasB*的PCR产物 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切, pBAD-HisB 质粒 *Nco* I / *Sac* I 双酶切,连接转化; *pmuhasA*的PCR产物 *Nco* I / *Bam*H I 双酶切, *spyhasB*的PCR产物 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切, pBAD-HisB 质粒 *Nco* I / *Sac* I 双酶切,连接转化;挑选阳性克隆测序,鉴定正确的重组载体分别命名为 pBPA、pBPAEB 和 pBPASB (图 1)。

1.2.4 UGDH 的表达纯化

将重组质粒 pRXEB 和 pRXSB 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,挑选单克隆,37 °C 培养过夜。按 1% 的接种量接种到自诱导培养基中 (诱导物终浓度为 2 g/L 乳糖),置于 16 °C,220 r/min 下振荡培养 24 h。4 °C、5 000 r/min,离心 10 min 收集菌体。

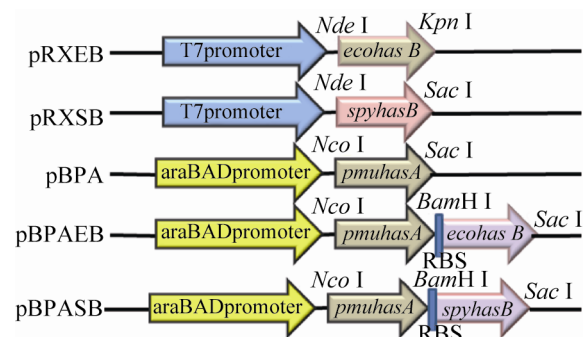


图 1 重组载体的示意图

Fig. 1 Schematic view of recombinant vector.

菌体重悬到 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,经超声波破碎,4 °C、10 000 r/min 离心 30 min,收集上清。上清用 0.22 μm 的滤膜过滤后通过 FPLC 用镍柱纯化。1 mL/min 流速上样,含 40 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱杂蛋白,含 250 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱目的蛋白。目的蛋白于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,4 °C 透析过夜。SDS-PAGE 电泳检测蛋白的纯度。

1.2.5 UGDH 的酶活测定^[18]

反应体系:100 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L DTT,10 mmol/L MgCl₂,2 mmol/L UDP-glucose 和 1.5 mmol/L NAD,在 340 nm 处测 OD 值的增

量。酶活定义：在一定的温度和 pH 条件下，每分钟反应生成 1 μmol NADH 所需酶量为 1 个酶活力单位 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)。酶活性计算公式： $A(U)=1/\varepsilon * V_{\text{总}}/V_{\text{酶}}*\Delta OD/\Delta t$ ； $V_{\text{总}}$ 和 $V_{\text{酶}}$ 分别代表酶活测定反应体系的体积及酶液体积； ε 为摩尔吸光系数 $6.22 \times 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。用 Bradford 法测蛋白含量，牛血清蛋白 BSA 为标准蛋白。

1.2.6 UGDH 的酶学性质分析

1) pH 对 UGDH 酶活力的影响及 UGDH 的 pH 稳定性

最适 pH：在室温下分别于 pH 7.0–11.0 缓冲体系中测定 UGDH 样品溶液的酶活力。pH 稳定性：UGDH 样品溶液分别在 pH 3.0–11.0 缓冲体系中，室温下放置 3 h，然后测定不同缓冲体系中剩余酶活力（其中 pH 3.0–6.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液；pH 6.0–9.0 为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液；pH 9.0–11.0 为 0.1 mol/L Gly-NaOH 缓冲液）。

2) 温度对 UGDH 酶活力的影响及 UGDH 的热稳定性

最适温度：在 UGDH 的最适反应 pH 下，分别于 16 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 UGDH 样品溶液的酶活力。热稳定性：UGDH 样品溶液分别于 16 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 3 h，在最适条件下测定样品的剩余酶活力。

1.2.7 生物转化法生产 HA

1) UGDH 和 HasA 的表达

重组质粒 pBPA，pBPAEB 和 pBPASB 转化到大肠杆菌 BW25113 中，挑选单克隆，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。按 1% 的接种量接种到自诱导培养基中（诱导物终浓度为 2 g/L 阿拉伯糖），37 $^{\circ}\text{C}$ ，220 r/min 振荡培养 13 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。SDS-PAGE 电泳检测 *pmuHasA*、*ecoHasB* 和

spyHasB 的蛋白表达情况。

2) HA 的转化

上述菌体 (OD_{600} 为 20) 重悬于转化培养基中，33 $^{\circ}\text{C}$ ，230 r/min 振荡培养 10 h，每隔 3 h 用氨水将转化液中 pH 调至 7.0。

3) HA 的提取与测定

HA 的提取采用 Chung 等^[24]的方法和 HA 产量的测定采用 Wen 等的 CTAB 法^[25]。

4) 转化条件的优化

pH：6.0，6.5，7.0，7.5，8.0；温度：24，29，33，37，42 $^{\circ}\text{C}$ ；NAG 浓度：0，5，10，15，20，25 mmol/L；Glc 浓度：0.5，1.0，1.5，2.0，2.5，3%；表面活性剂 0.05% CTAB，SDS，Tween80，Triton X-100。

2 结果

2.1 序列分析

测序结果显示：*pmuhasA* 基因与报道的多杀巴氏杆菌透明质酸合成酶 (*Pasteurella multocida* hyaluronan synthase) *pmhasA* 基因序列相似性 99%，蛋白序列存在 1 个氨基酸差异，725 位 G→S；*spyhasB* 基因与报道的化脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 *spyhasB* 基因序列相似性 99%，蛋白序列存在 1 个氨基酸差异，400 位 N→G；*ecoHasB* 基因与报道的 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 *ecoHasB* 基因序列相似性 100%。

2.2 UGDH 的表达及纯化

SDS-PAGE (图 2) 分析表明，16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导的 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 大部分以可溶形式存在于破碎后的上清中。*ecoHasB* 和 *spyHasB* 重组蛋白大小约为 45 kDa。通过凝胶扫描系统分析，经 Ni 柱纯化后的 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 的纯度在

90%以上。

2.3 UGDH 的酶学性质分析

2.3.1 pH 对 UGDH 酶活力的影响及 UGDH 的 pH 稳定性

图 3 表明 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 的最适 pH 分别是 9.0 和 10.0。UGDH 的 pH 的稳定性表明, *ecoHasB* 在 pH 6.0 最稳定, pH 6-7 下酶活力维持在 70%以上。*spyHasB* 在 pH 7.0 最稳定, pH 7-9 下酶活力能维持在 80%以上, pH 为 9 仍能维持 70%的酶活力;表明 *spyHasB* 在偏碱性条件下比 *ecoHasB* 更稳定。

2.3.2 温度对 UDPG 酶活力的影响及 UDPG 的热稳定性

图 4 表明 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 的最适反应温度均为 30 °C, UGDH 的热稳定性实验表明, 随着温度的升高, UGDH 的活性缓慢下降, *ecoHasB* 和 *spyHasB* 在 37 °C 以下温育 3 h 后, 酶活力均能维持在 70%以上, 而在 45 °C 以上温育 3 h, 酶活力几乎全部消失。

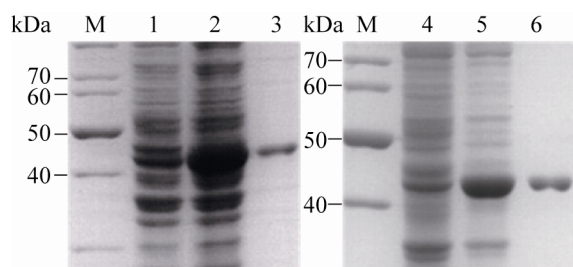


图 2 重组 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pRXEB/ BL21 (DE3) and pRXSB/BL21 (DE3). M: size markers (from top to bottom: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, and 10 kDa); 1: supernatant non-induced pRXEB/ BL21 (DE3); 2: supernatant induced pRXEB/BL21 (DE3); 3: purified fusion *ecoHasB* about 45 kDa; 4: supernatant non-induced pRXSB/BL21 (DE3); 5: supernatant induced pRXSB/BL21 (DE3); 6: purified fusion *spyHasB* about 45 kDa.

2.4 UGDH 和 HasA 的表达

SDS-PAGE (图 5) 分析表明, 泳道 2, 3, 4 中 *pmuHasA* 均得到了蛋白表达大小约为 106 kDa。泳道 3, 4 中 *ecoHasB* 和 *spyHasB* 均得到蛋白表达大小约为 45 kDa, *ecoHasB* 比 *spyHasB* 蛋白表达量大。

2.5 生物转化条件的优化

在不同条件下, 对 pBPAEB / BW25113 和 pBPASB/ BW25113 的 HA 产量进行分析。如图 6A 所示: pH 7.5 时, HA 的产量最高, 生物转

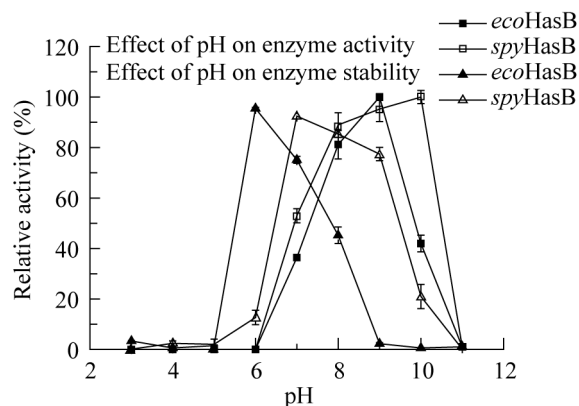


图 3 pH 对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity.

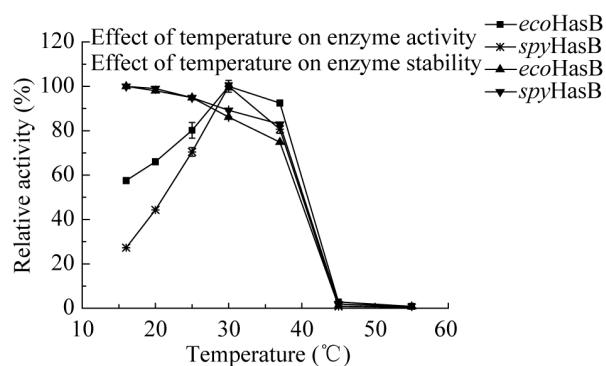


图 4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity.

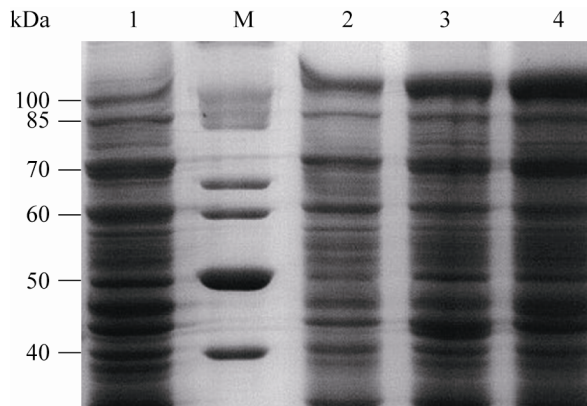


图5 HasA 和 HasB 的共表达 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of co-expression HasA and HasB. M: size markers (from top to bottom: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 and 10 kDa); 1: induced pBAD-HisB/BW25113; 2: induced pBPA/BW25113; 3: induced pBPAEB/BW25113; 4: induced pBPASB/BW25113.

化液在 pH 7.0–8.0 之间, HA 的产量均能达到 1 g/L 以上。当 pH < 7 时, HA 的产量明显下降; 如图 6B 所示, 在 33 °C, HA 的产量最高; 如图 6C 所示, NAG 的浓度为 20 mmol/L HA 产量最高, 通过 HPLC 测定分析发现生物转化 10 h 后, NAG 依然有剩余; 如图 6D 所示, 在 NAG 浓度为 0 时, Glc 的浓度为 2% HA 产量最高, 通过 SBA 生物传感分析仪测定生物转化 10 h 后, Glc 仍然过剩; 表面活性剂对生物转化的影响: 0.05% Tween80 对 HA 的生产有促进作用, 而 0.05% TritonX-100、0.05% SDS、0.05% CTAB 对 HA 的生产有抑制作用; 优化后 HA 转化的条件为 20 mmol/L NAG, 2% Glc, 0.05% Tween 80, pH 7.5, 33 °C。

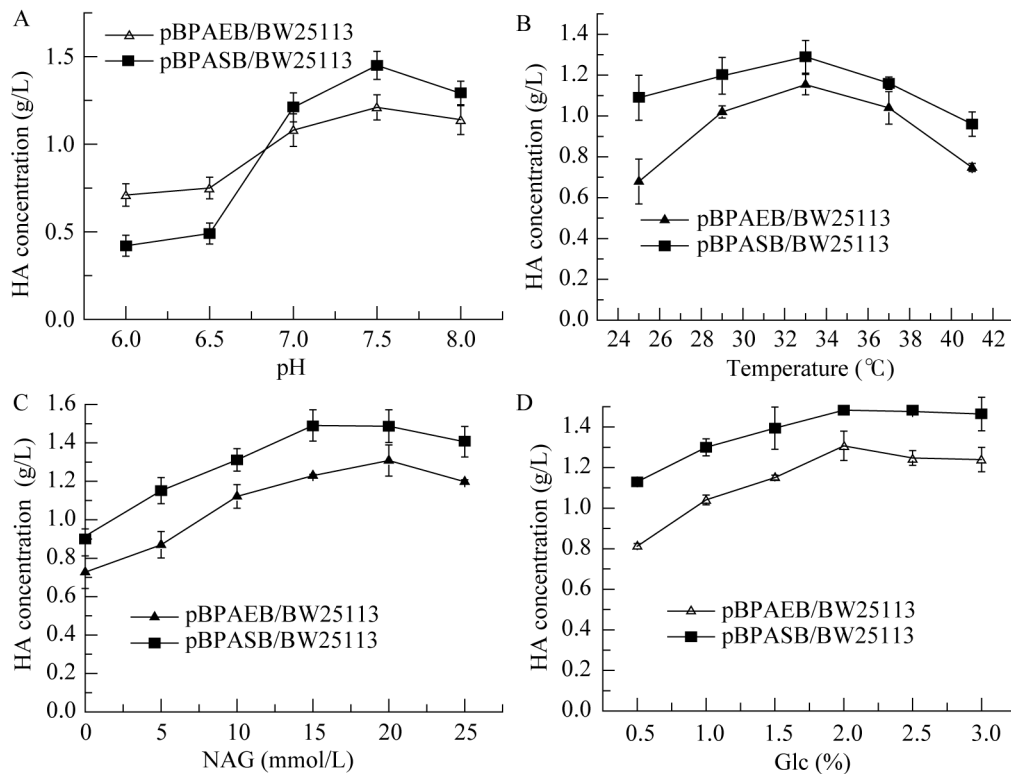


图6 不同条件对 HA 产量的影响 (A: pH; B: 温度; C: NAG; D: Glc)
Fig. 6 Effect of different conditions on HA production. (A) pH. (B) Temperature. (C) NAG. (D) Glc.

2.6 UDP-葡萄糖脱氢酶的酶学性质对透明质酸产量的影响

ecoHasB 和 *spyHasB* 酶学性质比较发现 *spyHasB* 比 *ecoHasB* 酶比活力更高,更稳定。*ecoHasB* 在 25 °C, pH 9.0 条件下,粗酶比活力是 0.32 U/mg,在 30 °C, pH 9.0 条件下,纯酶比活力是 5.55 U/mg; *spyHasB* 在 25 °C, pH 10.0 条件下粗酶比活力是 0.44 U/mg,在 30 °C, pH 10.0 条件下,纯酶比活力是 12.2 U/mg。在初始生物转化条件下,重组菌 pBAD-HisB/BW25113 和 pBPA/BW25113 没有检测到 HA; 重组菌 pBPAEB/BW25113 和 pBPASB/BW25113 HA 产量分别为 1.15 和 1.29 g/L。生物转化条件优化后,菌株 pBPAEB/BW25113 和 pBPASB/BW25113 HA 产量提高到了 1.52 和 1.7 g/L,两株重组菌 HA 的产量均提高了 30%以上。研究表明:HasB 越稳定,比活力越高,生物转化生成的 HA 产量越高。

3 讨论

UGDH 在生物体许多过程中是必需的。UGDH 催化的产物 UDP-GlcA 是形成结构多糖和细胞生长代谢必不可少的前体物质^[26-27]。2013 年,陈奕涵等^[19]用严格控制的温敏型转录强启动子 P_L 诱导 *ecoHasB* 的表达,38 °C 下诱导 6 h 后酶活力达到了 14 U/mg,但 10 h 后降低到 4 U/mg。表明 *ecoHasB* 很难长时间在细胞内保持较高的活性,而本研究重组表达的 *ecoHasB* 37 °C 以下, pH 为 6 的缓冲液中比较稳定。1993 年, Dougherty 等^[20], 37 °C 下,在大肠杆菌 JM109 (DE3) 中表达了 *spyHasB*。在 30 °C 下测定的酶比活分别是 1.51 和 3.71 U/mg (两次平行实验)。而本文重组表达的 *spyHasB* 比活力是 Dougherty 等表达的 *spyHasB* 的 3 倍。*ecoHasB* 和 *spyHasB*

的比活力高于海洋真菌草茎点霉 YS4108^[17],鞘氨醇单胞菌^[18]和嗜嗜热古菌-冰岛热棒菌^[16]的 UDP-葡萄糖脱氢酶的比活力。两者的酶学性质比较分析表明, *spyHasB* 粗酶和纯酶的比活力远远高于 *ecoHasB* (图 2),但是在大肠杆菌中的表达量不如 *ecoHasB*。通过大肠杆菌的稀有密码子分析发现, *spyhasB* 基因中含有大量的稀有密码子,可以通过密码子优化提高 *spyHasB* 的表达量,提高 *spyHasB* 的胞内比活。

UGDH 是 HA 合成的关键酶,对 HA 的生产有重要影响。在 HA 生产的过程中,稳定性好、酶活力高的 UGDH 能提高 HA 的产量。HA 生物转化过程中, Glc 和 NAG 是 HA 积累的原料,当 NAG 浓度为 0 时, pBPAEB/BW25113 和 pBPASB/BW25113 HA 的产量分别为 0.7 和 0.9 g/L,添加 20 mmol/L NAG 之后产量提高到 1.2 和 1.5 g/L (图 6C),这是因为在大肠杆菌中,通过 Glc 合成 UDP-NAG 需要经过复杂的过程,同时与 HA 的另一个前体物质 UDP-GlcA 的合成存在竞争关系^[12]。当 Glc、NAG 过量时,大肠杆菌转化液中会大量产酸,从而导致环境中 pH 降低,抑制 HA 的积累 (图 6D), pH 对 HA 的转化表明:在 pH 7-8 时, HA 产量高,在 pH < 7 时, HA 可能降解。温度对 HA 的转化表明:在 33 °C, HA 的产量最高。这是因为 pBPAEB/BW25113、pBPASB/BW25113 的生长和 UDPG 的酶活性对 HA 产量均有影响,并且大肠杆菌的最适生长温度是 37 °C, UDPG 的最适反应温度是 30 °C,且在 37 °C 以下更稳定 (图 4)。有关研究表明不同的表面活性剂对 HA 转化有不同的影响^[28]。表面活性剂对 HA 的转化表明:高浓度离子型的 CTAB、SDS 对 HA 的积累起到抑制作用,这和温琦等^[29]的结果是一致的。Tween80 对 HA

的积累有促进作用,这可能是因为改变了细胞外基质的状态,细胞表面结合的 HA 降解^[29]。

本文通过生物转化重组菌株 pBPAEB/BW2513 和 pBPASB/BW25113 HA 产量达到了 1.5 和 1.7g/L。与 Mao 等^[13]在大肠杆菌 JM109 中摇瓶发酵生产的 HA (0.5 g/L) 相比提高了 3 倍;与 Yu 等^[12]在大肠杆菌中发酵生产的 HA (0.19g/L) 相比提高了近 7 倍;与 Prasad 等^[9]在重组乳酸菌中发酵生产的 HA (1.8g/L) 相差不大;与 Widner 等^[10]在重组枯草芽胞杆菌 (1 g/L), Kotra 等^[7]在兽医链球菌 (1.38g/L), Naoki 等^[11]在嗜热链球菌 (1.2 g/L) 产生的 HA 相比,产量有不同程度的提高。在 HasA 和 HasB 共表达蛋白过程中采用了阿拉伯糖诱导的弱启动子,避免 UGDH 表达过快形成包涵体;通过采用生物转化的方法生产 HA,将细菌培养、蛋白表达和 HA 转化分步进行,以降低对菌体生长的抑制。本研究表明利用大肠杆菌作为宿主菌生产 HA 具有一定的优势,并且为运用生物转化工艺大规模生产 HA 提供了帮助。

REFERENCES

- [1] Prasad SB, Ramachandran KB, Jayaraman G. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 94(6): 1593–1607.
- [2] Volpi N, Schiller J, Stern R, et al. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 1718–1745.
- [3] Necas J, Bartosikova L, Brauner P, et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med*, 2008, 53: 397–411.
- [4] Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, et al. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biot*, 2005, 66: 341–351.
- [5] Widner B, Behr R, Dollen SV, et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 77: 3747–3752.
- [6] Liu LY, Liu YF, Li JH, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 99.
- [7] Kotra SR, Venkateswarulu TC, John BD. Cost effective media optimization for the enhanced production of hyaluronic acid using a mutant strain *Streptococcus zooepidemicus* 3523–7: a statistical approach. *Int J Adv Sci Technol*, 2013, 60: 83–96.
- [8] Mao ZC, Chen RRZ. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp.. *Biotechnol Progr*, 2007, 23(5): 1038–1042.
- [9] Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biot*. 2010, 86: 273–283.
- [10] Widner B, Behr R, Von Dollen S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 3747–3752.
- [11] Naoki I, Masaki S, Toshiro S, et al. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(6): 665–670.
- [12] Yu HM, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng*, 2008, 10: 24–32.
- [13] Mao ZC, Shin HD, Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl Microbiol Biot*, 2009 (84): 63–69.
- [14] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech*, 1999, 10: 411–421.
- [15] Campbell RE, Mosimann SC, De Rijn I van, et al. The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry*, 2000, 39: 7012–7023.
- [16] Satomura TK, Kusumi K, Ohshima T, et al. Identification and characterization of UDP-glucose

- dehydrogenase from the hyperthermophilic archaon, *Pyrobaculum islandicum*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(10): 2049–2051.
- [17] Zhou T, Song Y, Feng MQ, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of UDP-glucose 6-dehydrogenase, a key enzyme in the biosynthesis of an antitumor polysaccharide from the marine fungus *Phoma herbarum* YS4108. Process Biochem, 2011, 46: 2263–2268.
- [18] Granja AT, Popescu A, Marques AR, et al. Biochemical characterization and phylogenetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from the gellan gum producer *Sphingomonas elodea* ATCC 31461. Appl Microbiol Biot, 2007, 76(6): 1319–1327.
- [19] Chen YH, Qian Y, Hou YG, et al. Cloning, expression and enzyme activity assay of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*. Biot Bull, 2013 (7): 136–143 (in Chinese).
陈奕涵, 钱悦, 侯永泰, 等. 大肠杆菌 UDP-葡萄糖脱氢酶基因的克隆、表达及酶活性测定. 生物技术通报, 2013(7): 136–143.
- [20] Dougherty BA, van de Rijn I. Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. J Biol Chem, 1993, 268(10): 7118–7124.
- [21] Sheng JZ, Ling PX, Zhu XQ, et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. J Appl Microbiol, 2009, 107(1): 136–144.
- [22] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Express Purif, 2005, 41: 207–234.
- [23] Sambrook J, William D, Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 99–125.
- [24] Chung, JY, Zhang, Y, Adler, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A. FEMS Microbiol Lett, 1996, 166: 289–296.
- [25] Wen C, Yu HM, Sun YP, et al. Efficient quantification of hyaluronic acid in fermentation broth by modified CTAB method. Chin Biotechnol, 2010, 30(2): 89–93 (in Chinese).
文程, 于慧敏, 孙云鹏, 等. 高效测定发酵液中透明质酸含量的改良 CTAB 浊度法. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 89–93.
- [26] Blanch M, Vicente IC, Piñón D. Sugarcane glycoproteins are required to the production of an active UDP-glucose dehydrogenase by *Xanthomonas albilineans*. Ann Microbiol, 2007, 57(2): 217–221.
- [27] Clarkin CE, Allen S, Wheeler-Jones CP, et al. Reduced chondrogenic matrix accumulation by 4-methylumbelliferone reveals the potential for selective targeting of UDP-glucose dehydrogenase. Matrix Biol, 2011, 30 (3): 163–168.
- [28] Chen RX. Chemistry and Applied of Surfactant. Beijing: Textile Industry Press, 1990: 41 (in Chinese).
陈荣圻. 表面活性剂化学与应用. 北京: 纺织工业出版社, 1990: 41.
- [29] Wen Q, Liu DR, Chen J, et al. Enhancement of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* H24 through supplement of CTAB. Chem Ind Eng Prog, 2006, 25(9): 1089–1094 (in Chinese).
温琦, 刘登如, 陈坚, 等. 添加表面活性剂促进兽疫链球菌高产透明质酸. 化工进展, 2006, 25(9): 1089–1094.

(本文责编 郝丽芳)