

组织工程与细胞培养

海豚链球菌诱变发酵法制备透明质酸及其在动物皮肤修复中的应用

管峰¹, 金嘉长¹, 赵华国¹, 洪磊¹, 沈志森², 竺亚斌¹

1 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211

2 宁波大学 医学院附属李惠利医院, 浙江 宁波 315041

管峰, 金嘉长, 赵华国, 等. 海豚链球菌诱变发酵法制备透明质酸及其在动物皮肤修复中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1104–1114.

Guan F, Jin JC, Zhao HG, et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus iniae* and its application in rabbit skin's regeneration. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1104–1114.

摘 要: 透明质酸 (HA) 是一种非常重要的生物材料, 是体内广泛存在的细胞外基质成分之一。为了获得产量、分子量及纯度较高的透明质酸, 并研究透明质酸水凝胶在动物皮肤修复中的潜在作用。通过紫外诱变的方法对海豚链球菌进行诱变, 并对此突变菌发酵后产物的蛋白含量及 HA 分子量进行了测定, 通过 CTAB 法对发酵产物进行提纯, 运用物理冻融法将透明质酸制成水凝胶后, 用于兔背部全层皮肤修复的初探。结果表明通过诱变海豚链球菌产透明质酸的能力从 (82.3±3.3) mg/L 增加到 (120±10.6) mg/L, 增加了 46.4%; 产物经纯化后蛋白含量从 (0.178±0.011) mg/L 减少到 (0.032±0.017) mg/L, 减少了 82.02%; 所制得透明质酸的分子量约为 3.0×10^5 Da; 透明质酸水凝胶对兔全层皮肤缺损的修复有较明显的促进作用, 能减轻炎症和伤口瘢痕的形成。

关键词: 海豚链球菌, 发酵, 透明质酸, 皮肤修复

Received: December 9, 2015; **Accepted:** March 17, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81171476, 81471797), Project of Scientific Innovation Team of Ningbo (Nos. 2015B11050, 2012C5015).

Corresponding author: Yabin Zhu. Tel: +86-574-87609592; E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81171476, 81471797), 宁波科技创新团队项目 (Nos. 2015B11050, 2012C5015) 资助。

Hyaluronic acid production by *Streptococcus iniae* and its application in rabbit skin's regeneration

Feng Guan¹, Jiachang Jin¹, Huaguo Zhao¹, Lei Hong¹, Zhisen Shen², and Yabin Zhu¹

¹ The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

² The Lihuli Hospital Affiliated to the Medical School, Ningbo University, Ningbo 315041, Zhejiang, China

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is an important biomaterial as the extracellular matrix in human body. We produced HA by fermentation of *Streptococcus iniae* (*Strep.*). Production of HA by *Strep.* was evaluated and further improved by strain mutation by ultraviolet. One strain with higher HA yield and lower content of protein was obtained. Its HA yield increased from (82.3±3.3) mg/L to (120±10.6) mg/L, and protein decreased from (0.178±0.011) mg/L to (0.032±0.017) mg/L. The molecular weight (MW) of HA yield from *Strep.* is about 3.0×10^5 Da. Using the method of freezing and thawing, HA aqueous solution was transferred into hydrogel. This HA hydrogel, casted on sterilized non-woven fabric, was applied to repair rabbit skin with full-thickness defect. The preliminary results of the animal tests displayed that HA hydrogel obviously reduced the inflammation around the wound and promoted the skin regeneration comparing with the control tests.

Keywords: *Streptococcus iniae*, fermentation, hyaluronic acid, skin regeneration

透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 是一种非常重要的直链聚阴离子粘多糖, 由 (1→4)-β-D-葡萄糖醛酸及 (1→3)-β-D-N-乙酰氨基葡萄糖双糖重复单位组成^[1], 其结构式如图 1 所示^[2]。1934 年由美国哥伦比亚大学眼科教授 Meyer 和 Palmer 在牛眼晶状体中发现^[3]。HA 在体内分布广泛, 在关节滑液、皮肤、脐带、脑、软骨等组织中均有分布, 是大多数结缔组织中主要的细胞外基质成分。HA 除了具有生物可吸收性、生物相容性、黏稠性、保水性和促进创伤愈合

等重要特性, 更重要的是其无抗原性、无过敏性、通常不发生免疫反应, 因此, 在医药、食品、化妆品等领域得到广泛开发和应用。而随着对 HA 功能越来越深入的研究, 其在组织工程和再生医学方面的应用也越来越受到关注, 如在外科手术防黏剂、药物递送系统、癌症治疗、眼科、整容外科等领域已开始得到研究和开发^[4-11]。

透明质酸的生产方法有动物组织提取法和微生物发酵法, 前者由于效率低、成本高、原

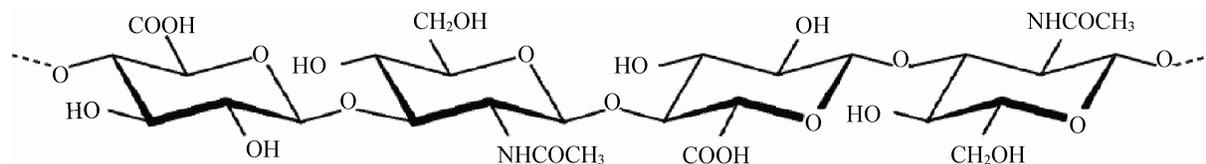


图 1 透明质酸的结构式^[2]

Fig. 1 The structure scheme of hyaluronic acid^[2].

料来源有限及来源组织的安全性等问题,已逐渐被微生物发酵法所取代。微生物发酵生产 HA 于 1983 年被首次报道后^[12],由于其克服了动物组织提取法所存在的缺点而得到广泛的关注和研究,目前发酵法已成为规模化生产 HA 的主要方法,文献所报道的发酵法中所采用的菌株主要为兽疫链球菌和马疫链球菌,缺乳链球菌、粪马链球菌及鸡霍乱杆菌等也有少量报道^[13-15]。

海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*, *Strep.*) 最初是从一例皮肤溃疡的亚马逊淡水河豚中分离得到的。它属兼性厌氧菌,大多呈 β 溶血活性,最佳生长温度为 37 °C, 10-45 °C 可生长^[16]。据文献^[12]报道,大多数链球菌在培养初期可见到微荚膜,内含有透明质酸,因为微荚膜对于细菌来说具有抗吞噬的作用,有利于细菌侵袭宿主。因此,本文对从海豚链球菌发酵产物中透明质酸的提取进行了研究,这在现有的文献上还未见过报道。另外,为了提高 HA 的产量,对海豚链球菌进行了紫外诱变及最佳培养基的筛选,在此基础上,对由 HA 做成的凝胶进行了动物全层皮肤缺损的修复初探。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

本实验所用海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*, *Strep.*) 由宁波大学海洋学院提供,从美国罗非鱼中分离得到,并进行了 16S rRNA 的 PCR 鉴定。购自山东福瑞达公司的透明质酸(分子量 1 800 000 Da) 作为对照。十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, aladdin), 脑-心浸出液肉汤 (BHI, 广州环凯), 葡萄糖、七水硫酸镁、NaCl、乙醇、醋酸钠、乙酸、磷酸二氢钾、琼脂糖 (国药), 酵母浸膏、牛肉浸膏、蛋白胨 (HANGWEI,

杭州), 十二烷基硫酸钠 (SDS, Solarbio)。

1.2 培养基

BHI 为粉末状,成分 (100 mL) 为胰蛋白胨 1 g、氯化钠 0.5 g、磷酸氢二钠 0.25 g、葡萄糖 0.2 g 和牛心浸出液 50 mL, pH 7.4。使用时称取 3.7 g 溶于 100 mL 超纯水, pH 7.4, 121 °C 高压灭菌 30 min。在上述 BHI 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂糖, 即得 BHI 固体培养基, 然后 121 °C 高压灭菌 30 min 备用。

葡萄糖培养基由葡萄糖 2 g、酵母浸膏 2 g、牛肉浸膏 2 g、蛋白胨 1 g、七水硫酸镁 0.2 g 和磷酸二氢钾 0.2 g 组成,加 100 mL 超纯水溶解,调 pH 至 7.4, 121 °C 高压灭菌 30 min 备用。

将上述液体 BHI 和葡萄糖培养基按一定比例混合即得混合培养基,本实验中 BHI 和葡萄糖培养基的比例设为 0 1, 1 0, 1 9, 3 7, 5 5, 7 3, 9 1 等 7 种。

1.3 海豚链球菌发酵产物的粗提和纯化

经 *Strep.* 菌发酵 15 h 后往发酵液中加入与发酵液等体积的 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS, *W/W*), 搅匀,室温静置 10 min,离心 10 min (7 000 r/min), 取上清,加入两倍体积的乙醇, 4 °C 过夜, 然后 4 °C 下离心 18 min (7 000 r/min), 得到的沉淀用乙醇盐溶液 (75%乙醇、25% 的 0.15 mol/L NaCl) 洗涤、离心 3 次, 每次 2 min (10 000 r/min), 最后将沉淀干燥, 即得发酵粗产物^[17]。

对发酵产物的纯化采用“CTAB 法”^[18-19]。在发酵初产物中加入 0.1% SDS, 静置 10 min 后离心, 取上清, 加入一定量的 CTAB (10%, *W/W*) 溶液, 搅拌, 静置 15 min, 离心得沉淀; 加入 NaCl 溶液 (0.2 mol/L) 搅拌, 然后离心得上清液, 在上清液中加入两倍体积乙醇, 离心得到沉淀, 最后, 用乙醇盐溶液洗涤、离心 3 次, 得到沉淀,

室温下干燥。上述离心条件均为 2 min, 10 000 r/min。干燥后的 HA, 用于红外表征及分子量的测定^[18]。

1.4 发酵产物中 HA 浓度的测定

HA 浓度的测定采用改良的 CTAB 比浊法^[20], 以标准 HA 配制浓度分别为 0、20、40、60、80 及 100 mg/L 的标准溶液, 测定 400 nm 处的吸光度, 制作标准曲线。将上述纯化的发酵产物用超纯水溶解, 取 150 μ L 置于 2 mL EP 管, 加入 350 μ L 醋酸缓冲液 (0.2 mol/L 醋酸钠, 0.15 mol/L 氯化钠, 用乙酸调节 pH 至 6.0), 最后加入 1 mL CTAB 溶液, 混匀, 室温静置 10–15 min, 于 400 nm 波长下测定吸光度值。根据标准曲线推算出发酵产物中 HA 的浓度。

1.5 发酵产物中蛋白质含量的测定及蛋白去除率的计算

BCA 试剂盒由康为世纪公司 (Cat: CW0014) 提供, 根据试剂盒说明书进行操作, 先制作标准曲线, 得到标准方程, 根据样品的吸光度值计算出所测溶液的蛋白质浓度。

蛋白去除率为纯化前蛋白含量 (P_0) 与纯化后蛋白含量 (P_1) 的差值比上 P_0 , 即去除率 = $(P_0 - P_1) / P_0$ 。

1.6 HA 分子量测定

采用“乌氏粘度法”测定发酵产物中所提 HA 的分子量^[21]。具体地, 将样品配置成一定浓度的溶液, 取一定体积至乌氏粘度计中, 粘度计毛细管内径为 0.57 mm, 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中测定。主要记录样品溶液的流出时间, 通过稀释得到不同浓度的样品溶液, 分别记录不同浓度下样品溶液的流出时间, 每种浓度记录 3 次, 3 次间的偏差小于 0.4 s, 至少记录 5 种浓度, 然后计算 $\ln \eta_r$ 及 η_{sp} , 最后用 $\ln \eta_r / c$ 及 η_{sp} / c 对 c 作图,

外推至 $c=0$ 处, 得到的截距即为样品的特征粘度 $[\eta]$ 。根据 Mark-Houwink 经验方程式: $[\eta] = K \cdot \bar{M}_\eta^\alpha$, 求出样品的相对分子量。

\bar{M}_η 是粘均相对分子量, K 为比例常数, α 是与分子形状有关的经验参数。对于透明质酸, $K=3.6 \times 10^{-4}$, $\alpha=0.78$ 。相对粘度 $\eta_r = \eta / \eta_0$, 增比粘度 $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0) / \eta_0$, η 为溶液粘度, η_0 为参比溶液粘度, 参比溶液为 0.2 mol/L NaCl 溶液, c 为样品浓度。

1.7 海豚链球菌的紫外诱变

取少量处于对数生长期的海豚链球菌 *Strep.* 均匀涂布于固体培养基上, 紫外 (Ultraviolet, UV) 灯照射一定时间, 根据不同照射时间的致死率, 选择致死率在 90% 以上的照射时间作为紫外诱变的最佳时间, 然后挑取若干单菌落进行摇瓶培养, 再扩大培养, 然后对发酵液进行 HA 的提取、纯化、HA 含量和蛋白含量以及分子量测定, 与未诱变的菌株比较, 筛选产量明显提高的菌株。紫外灯的功率为 20 W, 照射距离为 30 cm, 致死率的计算为不同照射时间下的菌落数 (N_1) 与未照射下的菌落数 (N_0) 之差, 除以 N_0 所得, 即致死率 = $(N_1 - N_0) / N_0 \times 100\%$ 。

1.8 培养基的优化

将 BHI 培养基 (B) 与葡萄糖培养基 (G) 按不同的比例混合, 观察菌体的生长状况, 实验中按 B:G = 0:1, 1:0, 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1 共 7 种比例混合, 然后将活化后的菌种按 1:100 的接种量接种到上述培养基中, 28–30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 15 h 以上, 停止培养, 取 500 μ L 混匀后的菌液, 8 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清, 再加入 500 μ L PBS 重悬, 取 200 μ L 测吸光度 (波长 600 nm), 用于确定不

同培养基下菌体的生物量。每种比例培养基重复培养 3 次，得到平均结果。

1.9 透明质酸应用于兔子皮肤修复

运用物理冻法将透明质酸粉末制备成 HA 水凝胶^[22]。将上述制备的 HA 水凝胶承载于无菌无纺布上。HA 浓度为 16 mg/mL，每张无纺布上的水凝胶用量为 3 mL。以新西兰大白兔为实验动物，将兔子背部人为造成 3.5 cm×3.5 cm 的全层皮肤缺损，缺损皮厚度约为 1.5 mm。实验兔分为二组共 20 只，一组常规消毒，纱布覆盖（对照组）；另一组酒精消毒后以上述 HA 水凝胶覆盖伤口（HA 组），2 d 换一次凝胶，5 d 后拆掉覆盖层。观察伤口外观、伤口尺寸随时间变化、伤口周围炎症情况及血液中的白细胞（White blood cell, WBC）变化情况。

1.10 统计分析

数据的分析采用 *t* 检验， $P < 0.05$ 时，差异具有显著性。应用 Graphpad Prism 6.0 及 SPSS 22.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 海豚链球菌的生长曲线

Strep. 在 14 h 的培养周期中其生长曲线如图 2 所示，从图中可以看出，0–6 h 为该菌的生长适应期，6–10 h 为该菌的对数生长期，10 h 以后该菌即进入稳定期。对于发酵产物的提取，在链球菌进入稳定期后其自身的透明质酸酶会分解透明质酸，而且进入稳定期后其产透明质酸的能力也有所减弱，因此，我们在发酵培养 11–13 h 后，即进行透明质酸的提取；对于链球菌的紫外诱变，一般在对数生长的后期比较适宜，因此，我们选择在发酵培养 9–10 h 后进行

紫外诱变。

2.2 海豚链球菌的紫外诱变及培养基优化

2.2.1 紫外诱变

海豚链球菌在相同紫外灯功率下，照射不同时间后的致死率如图 3 所示，在 0、5、30、60 和 120 s 共 5 个时间点内，在照射时间为 5 s 时，已有近 50% 以上的链球菌死亡，30 s 时，死亡率已达到 90% 以上，60 s 以上，链球菌的死亡率已接近 100%。因此，实验中我们采用紫外照射时间 35 s 作为紫外诱变时间。

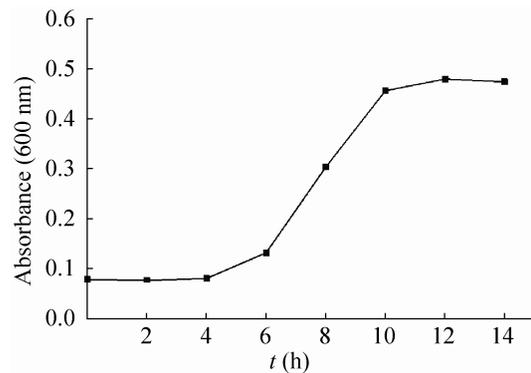


图 2 海豚链球菌的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *Streptococcus iniae* as a function of time.

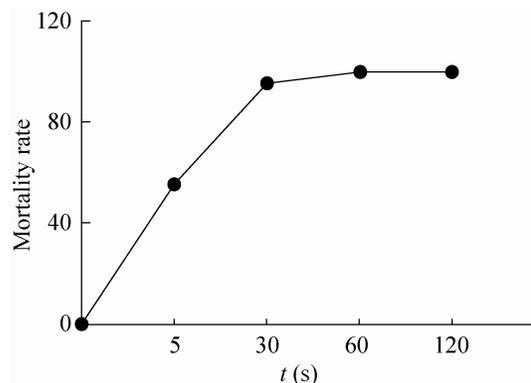


图 3 海豚链球菌的紫外诱变致死率曲线

Fig. 3 The mortality of *Streptococcus iniae* under UV treatment as a function of time.

对第一次紫外诱变后的菌株进行筛选,得到透明质酸产量略高的菌株,将该菌株再重复诱变一次,得到的菌株其产量比未诱变的 *Strep.* 提高达 46.4% (从 (82.3 ± 3.3) mg/L 增加到 (120 ± 10.6) mg/L), 结果如图 4 所示。

2.2.2 培养基的优化

在 7 种不同的培养基中, BHI 培养基中培养的链球菌其吸光度值比在葡萄糖培养基中培养的链球菌高很多, 说明链球菌在普通葡萄糖培养基中很难生长, 或生长缓慢, 甚至不生长, 而当在葡萄糖培养基中加入 BHI 后其生长明显加快, 菌体量明显增多, 且随着 BHI 比例的增加, 其菌体量随之增高, 在 BG5.5 (即 BHI 葡萄糖培养基=5:3) 之前, 混合培养基中的菌体量少于 BHI 培养基中的菌体量, 而在 BG7.3 之后 (包括 BG7.3) 混合培养基中菌体量则比纯 BHI 培养基中的菌体量多, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$), 如图 5 所示。说明 BHI 中一定量的葡萄糖培养基有助于链球菌的生长。

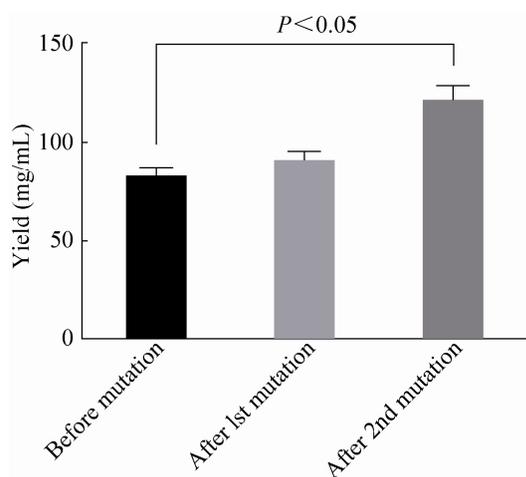


图 4 海豚链球菌 2 次紫外诱变后的 HA 产量变化
Fig. 4 The variation of HA's yield of *Streptococcus iniae* after two times of UV mutation.

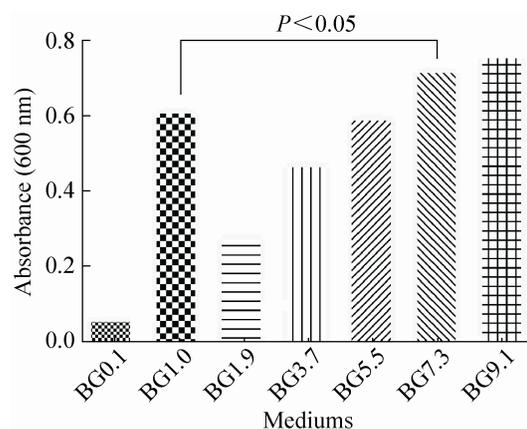


图 5 海豚链球菌在不同培养基配比下的吸光度
Fig. 5 Absorbance of *Streptococcus iniae* (at 600 nm) with a variety of culture media of different ratio of BHI to glucose medium. In picture, BG0.1 stands for the ratio of BHI medium to glucose medium (B:G)=0:1; so are others.

发酵产物纯化的目的主要是去除产物中的蛋白质成分, 本文采用 CTAB 法^[18-19]纯化 HA, 纯化后产物的蛋白含量从 (0.178 ± 0.011) mg/L 降低到 (0.032 ± 0.017) mg/L, 如图 6 所示 ($P<0.05$), 蛋白去除率达 82.02%, 纯化的效率为 88.32%, 比文献[19]报道的略低。对纯化后的 HA 采用乌氏粘度法进行分子量的测定, 得到其分子量约为 3×10^5 Da。

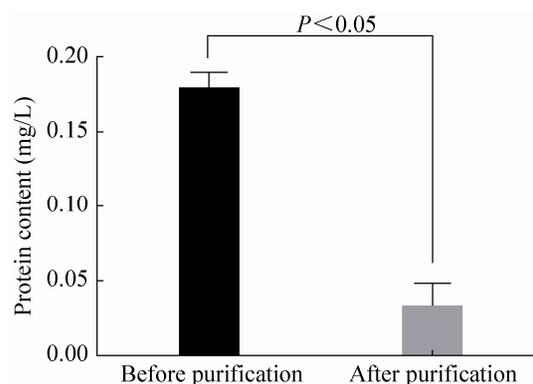


图 6 HA 纯化前后蛋白含量的变化
Fig. 6 The variation of protein content before and after HA purification.

2.3 FTIR 表征

海豚链球菌发酵产物经纯化后,充分干燥,以溴化钾压片,利用红外光谱仪(Thermo,美国)进行FTIR吸收光谱测试(扫描范围 $4\ 000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)。得到的红外吸收光谱与HA标准品进行比较,从图7可以看出,海豚链球菌发酵产物中HA的吸收峰(A)与HA标准品的吸收峰(B)基本一致,在 $3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 附近有很强的O-H伸缩振动的特征吸收,说明存在多羟基结构;在 $2\ 920\text{ cm}^{-1}$ 附近有 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动;在 $1\ 560\text{--}1\ 620\text{ cm}^{-1}$ 附近有CO-、CN-的伸缩振动,说明存在酰胺基结构; $1\ 420\text{ cm}^{-1}$ 处为羧基中O-H的伸缩振动,以上的特征吸收峰可以表明 *Streptococcus iniae* 发酵产物经纯化后得到的主要为HA,其含有的多糖羟基、乙酰氨基及羟羧基结构,与HA重复单位中的乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸一致。综上所述,采用 *Streptococcus iniae* 诱变发酵法可以作为HA的微生物发酵制备的菌株。

2.4 HA水凝胶在皮肤修复中的作用初探

兔子背部伤口分别经临床上常规纱布包覆和采用HA水凝胶包覆后伤口修复的外观观察情况如图6所示,18 d和27 d时其伤口的修复

情况均明显好于对照(无凝胶)组。HA组与对照组的伤口在手术后2 d均是湿润的,凝胶及无纺布上都有血迹,伤口有红肿,HA组比对照组略轻;在术后5 d左右二组均有一定程度的化脓,伤口周围红肿但比2 d时减轻,相对而言HA组化脓情况轻微,红肿不如对照组明显,伤口周围已部分结痂;5 d后伤口均慢慢缩小,整个伤口部分均结痂变硬;到18 d和27 d时,二组的伤口情况已发生明显差异(图8和图9),结

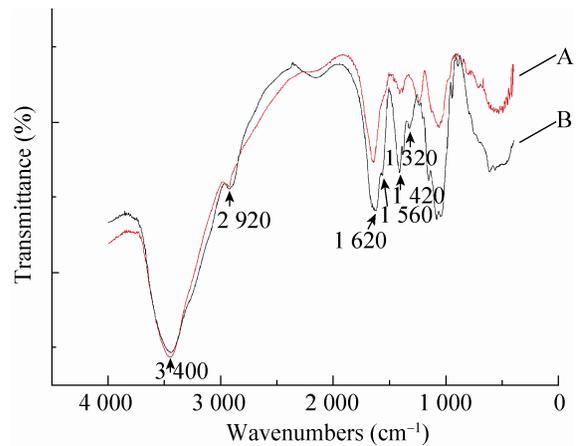


图7 透明质酸的FTIR曲线

Fig. 7 FTIR curve of hyaluronic acid. A: HA fabricated from *Strep.* Fermentation; B: standard HA.

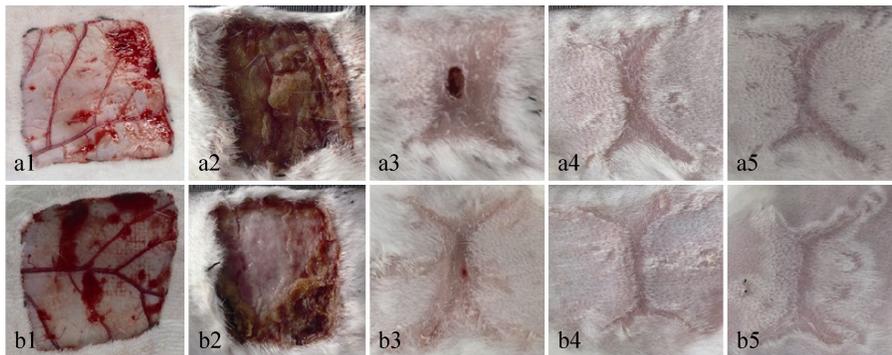


图8 兔子背部全层皮肤修复观察

Fig. 8 Overview of wound skin repairing on rabbit's back. a: control group; b: HA group. 1: day 0 post-operation; 2: day 5 post-operation; 3: day 18 post-operation; 4: day 27 post-operation; 5: day 40 post-operation.

痂变硬的部分有所脱落,但瘢痕仍明显,至40 d时伤口几乎完全愈合,留下一个很小的无毛发区。

对实验兔进行血液白细胞检查,结果如图10所示。术后6 d前,白细胞值总体呈上升趋势,对照组(Ctrl)的白细胞上升趋势尤其明显,而HA组变化不明显。通常手术一周内伤口易发生炎症,体现在血液中白细胞量增加,这也

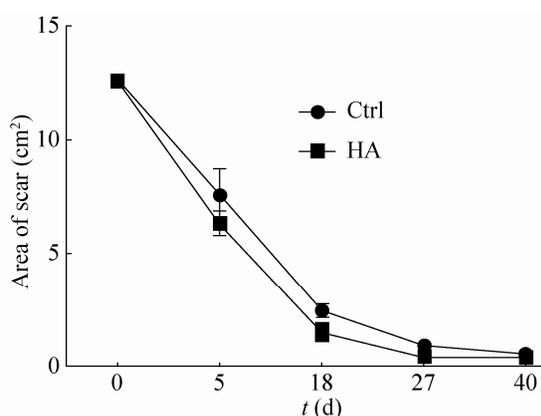


图9 伤口面积的大小变化 (cm²),第18及27天时, Ctrl及HA组的伤口面积差异有显著性 ($P<0.05$)

Fig. 9 The variation of area of scars (cm²), the area of scars of Ctrl and HA groups are different significantly at the 18th and 27th days ($P<0.05$).

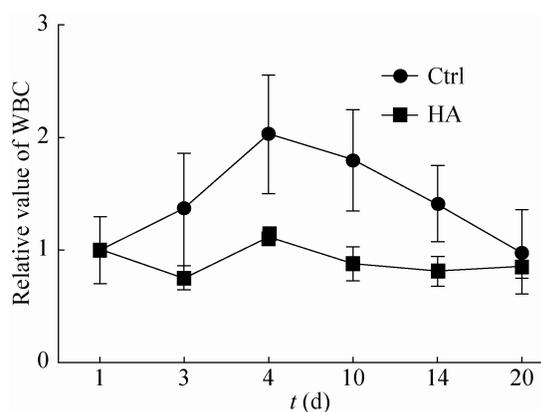


图10 术后20 d内对照组与HA组血液中白细胞相对含量的变化

Fig. 10 Relative values of WBC in blood of Ctrl and HA groups in 20 days post-operation.

说明HA有助于降低伤口炎症的发生。6 d后,两组白细胞值总体呈下降趋势,说明此时兔子伤口炎症已较轻微;到20 d左右,基本与术前一致,也即在伤口处基本已无炎症。相比而言,HA组的总体炎症情况明显低于对照组,这对伤口的修复是非常有利的。

3 讨论

早在1937年Kendall等^[23]就在溶血性链球菌中发现并提取了透明质酸,之后许多科学家及研究者对菌种及发酵提取方法做了众多改进,获得了无溶血性、透明质酸酶缺陷及透明质酸产量较高的菌株,形成了多种较好的发酵及分离纯化方法,使产物提取效率增大、杂质含量减少以及分子量提高。但这些研究所使用的菌株主要为兽疫链球菌或马疫链球菌等,本实验室所用的海豚链球菌是从美国罗非鱼中分离得到的,为革兰氏阳性球菌,兼性厌氧,呈 β 溶血。其荚膜主要是由透明质酸组成,并且能一定程度地向培养基中分泌透明质酸,目前还未有从海豚链球菌中提取透明质酸的报道,我们的研究表明该海豚链球菌 *Streptococcus iniae*,尤其在紫外诱变后可以作为透明质酸的发酵菌株。

国内外报道的关于HA菌株的诱变剂主要有紫外线、 γ 射线、亚硝基胍等^[24],它们对菌株产生突变的作用方式有所不同,亚硝基胍等主要是引起碱基对置换,得到的突变株回复突变率较高,而紫外线、 γ 射线等则引起碱基对缺失、编码框移位等较大的遗传物质损伤,使回复突变率较低^[25]。除了能产生相对稳定的突变株,紫外线和 γ 射线还具有相对安全、无毒及无污染等优点。因此在海豚链球菌的筛选中,我们

使用更方便、设备要求更低的紫外诱变方法，通过紫外诱变，我们得到了产量比未突变株有所提高的菌株。但是与兽疫链球等成熟的发酵菌株相比，海豚链球菌发酵的 HA 在产量、分子量及纯度方面还是有很大不足^[26-30]。不过，目前我们对于海豚链球菌发酵生产 HA 的研究才刚刚开始，今后将在提高 HA 产量、分子量及纯度上进行更深入的研究。

海豚链球菌对于培养基的要求非常高，基本上只在 BHI 培养基或含有脑心浸出液的培养基中能较好生长。在相同的培养条件下，海豚链球菌的生长速度比兽疫链球菌慢，尤其是在有氧条件下。但是从我们的实验结果看在 BHI 培养基中加入一定量的葡萄糖培养基有助于海豚链球菌的生长，比在单独 BHI 培养基的生长情况要好。说明葡萄糖培养基或葡萄糖培养基中的某些成分在 BHI 培养基中的含量对海豚链球菌的生长有促进作用。这个问题还将在今后的研究中逐步深入。

透明质酸应用于皮肤修复的研究已有报道，如直接将 HA 粉末应用于伤口^[31-32]，或者将 HA 与其他成分如生长因子等混合应用于伤口^[31,33]。我们采用将透明质酸制成水凝胶，在未加任何生长因子的情况下用于动物全层皮肤缺损的修复，初步研究已发现其明显的降低炎症、提高伤口收口速度、以及疤痕程度减轻等优点。这些优点可能跟 HA 水凝胶在动物体内的降解有关。HA 在体内的降解吸收速度决定于其分子量的大小，分子量大降解吸收慢，相反分子量小降解吸收快，当小分子量的 HA 形成三维网络结构的凝胶后，其在体内的降解吸收速度也会变慢，因此等量的 HA 在凝胶状态比在单体状态（如 HA 粉末）在体内存在时间更长，发挥效用的时间也因此延长，这也是为什

么我们要将 HA 单体制成凝胶后应用于动物皮肤修复的原因。

4 结论

我们发现了一种新的有望作为透明质酸生产菌的链球菌——海豚链球菌 *Streptococcus iniae*，经过紫外诱变后获得了一株产量较高的突变株，相比原始菌株其产量提高达 46%，该海豚链球菌在有氧和无氧条件下均能产生透明质酸，但在无氧条件下略高。另一方面，*Streptococcus iniae* 对培养基的要求比较高，需要牛心浸出液等成分才能很好的生长，在一般葡萄糖、蛋白胨培养基中生长非常缓慢，我们经过筛选发现在 BHI 培养基中混合少量葡萄糖培养基，有利于其生长。

将透明质酸采用物理方法（即不加其他成分）制成水凝胶后对兔子背部全层皮肤的修复具有明显的促进作用，表现在减轻伤口及全身的炎症反应、减少疤痕的形成等。对于 HA 用于皮肤修复更详细的研究仍在进行中，将会在后续工作中报道。由于在 HA 转变成水凝胶的过程中没有添加其他成分，保证了其应用的安全性，也有助于今后在临床上进行推广。

REFERENCES

- [1] Weissman B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc*, 1954, 76(7): 1753-1757.
- [2] Luan T. Study on the molecular characterization, rheological properties and physical cryogel of mucopolysaccharide hyaluronan [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2011 (in Chinese). 栾途. 透明质酸粘多糖的分子表征、流变学性质及其物理凝胶的研究 [D]. 上海: 上海交通大

- 学, 2011.
- [3] Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*, 1934, 107(3): 629–634.
- [4] Almeida PV, Shahbazi MA, Mäkilä E, et al. Amine-modified hyaluronic acid-functionalized porous silicon nanoparticles for targeting breast cancer tumors. *Nanoscale*, 2014, 6(17): 10377–10387.
- [5] Back JH, Cho WJ, Kim JH, et al. Application of hyaluronic acid/sodium alginate-based microparticles to prevent tissue adhesion in a rabbit model. *Surg Today*, 2016, 46(4): 501–508.
- [6] Laffleur F, Dachs S. Development of novel mucoadhesive hyaluronic acid derivate as lubricant for the treatment of dry eye syndrome. *Ther Deliv*, 2015, 6(10): 1211–1219.
- [7] Li L, Wang N, Jin X, et al. Biodegradable and injectable *in situ* cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. *Biomaterials*, 2014, 35(12): 3903–3917.
- [8] Park JH, Cho HJ, Yoon HY, et al. Hyaluronic acid derivative-coated nanohybrid liposomes for cancer imaging and drug delivery. *J Control Release*, 2014, 174: 98–108.
- [9] Shen J, Xu ZW. Combined application of acellular bovine pericardium and hyaluronic acid in prevention of postoperative pericardial adhesion. *Artif Organs*, 2014, 38(3): 224–230.
- [10] Taub AF. Cheek augmentation improves feelings of facial attractiveness. *J Drugs Dermatol*, 2012, 11(9): 1077–1080.
- [11] Vasi AM, Popa MI, Butnaru M, et al. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 38: 177–185.
- [12] Guo XP, Ling PX, Wang CX, et al. Production of hyaluronic acid. *Pharm Biotechnol*, 2000, 7(1): 61–64 (in Chinese).
郭学平, 凌沛学, 王春喜, 等. 透明质酸的生产. *药物生物技术*, 2000, 7(1): 61–64.
- [13] Blank LM, McLaughlin RL, Nielsen LK. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90(6): 685–693.
- [14] Don MM, Shoparwe NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochem Eng J*, 2010, 49(1): 95–103.
- [15] Sae-Jin K, Sung-Yurb P, Chan-Wha K. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16(12): 1849–1855.
- [16] Shen ZH. Isolation, identification, pathogenicity and detection of *streptococcus iniae* isolated from red drum *sciaenops ocellatus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005 (in Chinese).
沈智华. 美国红鱼海豚链球菌分离、鉴定、致病性及检测技术研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [17] Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J Biotechnol*, 2014, 185: 28–36.
- [18] Chen YH. Study on preparation of hyaluronic acid by fermentation and its composite modification [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
陈永浩. 透明质酸发酵法制备及其复合改性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [19] Sheng RT, Tan TW. Separating hyaluronic acid from fermentation broth with CTAB. *J Beijing Univ Chem Technol*, 2006, 33(3): 33–36 (in Chinese).
盛瑞堂, 谭天伟. 用十六烷基三甲基溴化铵从发酵液中提取透明质酸. *北京化工大学学报*, 2006, 33(3): 33–36.
- [20] Wen C, Yu HM, Sun YP, et al. Efficient quantification of hyaluronic acid in fermentation broth by modified CTAB method. *China 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.
- [21] Young RJ, Lovell PA. *Introduction to Polymers*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2011.

- [22] Okamoto A, Miyoshi T. A biocompatible gel of hyaluronan//Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA, Eds. Hyaluronan. Cambridge: Woodhead Publishing, 2002.
- [23] Kendall FE, Heidelberger M, Dason MH. A serologically inactive polysaccharide streptococcus. J Biological Chem, 1937, 118(1): 61-69.
- [24] Shi YL, Guo XP, Luan YH. Survey on mutation breeding of HA-producing strains. Food Drug, 2006, 8(10A): 22-24 (in Chinese).
石艳丽, 郭学平, 栾贻宏. 产透明质酸菌的育种概况. 食品与药品, 2006, 8(10A): 22-24.
- [25] Zhuge J, Li HZ. Microbiology. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2009: 297-409 (in Chinese).
诸葛健, 李华钟. 微生物学. 2版. 北京: 科学出版社, 2009: 297-409.
- [26] 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.
- [27] Duan XJ, Yang L, Zhang X, et al. Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(4): 718-724.
- [28] Liu L, Sun J, Xu WB, et al. Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. Biotechnol Prog, 2009, 25(6): 1819-1825.
- [29] Pires AMB, Eguchi SY, Santana MHA. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162(8): 2125-2135.
- [30] Zhang JF, Ding X, Yang LY, et al. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(1): 168-172.
- [31] Wu ZZ, Tang Y, Fang HD, et al. Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds. J Mater Sci Mater Med, 2015, 26(1): 5322.
- [32] Sabadotto M, Theunis J, Black D, et al. *In vivo* assessment of the effect of a cream containing *Avena Rhealba*[®] extract and hyaluronic acid on the restoration of the skin barrier in de-epidermised skin produced with an erbium-YAG laser. Eur J Dermatol, 2014, 24(5): 583-588.
- [33] Shimizu N, Ishida D, Yamamoto A, et al. Development of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing bioactive components: evaluation of wound healing potential in animal tests. J Biomater Sci Polym Ed, 2014, 25(12): 1278-1291.

(本文责编 陈宏宇)