叶子扬, 朱泰承, 李寅, 等. 利用甲醇合成透明质酸及其寡糖的毕赤酵母细胞工厂的构建与优化 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 217−226. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050171

YE Ziyang, ZHU Taicheng, LI Yin, et al. Construction and Optimization of *Pichia pastoris*-based Cell Factory for Production of Hyaluronic Acid and Its Oligosaccharides from Methanol[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 217−226. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050171

·生物工程·

利用甲醇合成透明质酸及其寡糖的毕赤酵母细胞工厂的构建与优化

叶子扬[1,2,3,4], 朱泰承[2,*], 李　寅[2], 毛相朝[1,3,4,5,*]

（1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室, 山东青岛 266404;
2.中国科学院微生物研究所, 微生物多样性与资源创新利用全国重点实验室, 微生物生理与代谢工程研究室, 北京 100101;
3.青岛海洋科技中心海洋药物与生物制品功能实验室, 山东青岛 266237;
4.青岛市食品生物技术重点实验室, 山东青岛 266404;
5.中国轻工业水产品生物加工重点实验室, 山东青岛 266404）

摘　要: 透明质酸是一种广泛用于食品、医药和化妆品领域的高价值糖胺聚糖。为探索更绿色、经济的透明质酸生产方式，本研究以毕赤酵母为细胞工厂，评估了利用一碳甲醇合成透明质酸的可行性。首先，在毕赤酵母中设计并构建了透明质酸合成途径，通过液相色谱和质谱分析对产物进行了定量和定性检测，验证了细胞工厂的成功构建。在此基础上，筛选了不同来源的透明质酸合酶以提升产量。结果显示，来源于兽疫链球菌的透明质酸合酶 seHAS 具有最高的合成效率，在摇瓶发酵条件下透明质酸产量达到 941 mg/L，分子量约 1100 kDa。此外，本研究还筛选了高活性表达的透明质酸降解酶，并通过外源添加或共表达的方式，探究了透明质酸生产效率的限制因素。结果表明，降解酶 FhChAC 能够在毕赤酵母中高效表达。通过外源添加或共表达 FhChAC 能有效释放积累在细胞表面的透明质酸多糖，并将其降解为寡糖，从而显著提升生产效率。通过以上优化，最终在摇瓶发酵中获得了 5.6 g/L 不饱和二糖形式的透明质酸寡糖产物。本研究为工程毕赤酵母利用一碳甲醇生产透明质酸提供了重要的理论和技术参考。

关键词: 透明质酸, 毕赤酵母, 代谢工程, 透明质酸降解酶, 透明质酸合酶, 甲醇

中图分类号: Q814　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0217−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050171　　本文网刊:

Construction and Optimization of *Pichia pastoris*-based Cell Factory for Production of Hyaluronic Acid and Its Oligosaccharides from Methanol

YE Ziyang[1,2,3,4], ZHU Taicheng[2,*], LI Yin[2], MAO Xiangzhao[1,3,4,5,*]

（1.State Key Laboratory of Marine Food Processing and Safety Control, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266404, China;
2.Department of Microbial Physiological & Metabolic Engineering, State Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3.Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China;

收稿日期: 2025−05−19

基金项目: 国家重点研发计划（2021YFC2103200）; 国家自然科学基金（32225039, 32270058, 31970039）。

作者简介: 叶子扬（2000−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: ziyangye00@126.com。

*** 通信作者:** 朱泰承（1980−）, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 甲基营养型酵母的系统生物学及合成生物学, E-mail: zhutc@im.ac.cn。
毛相朝（1981−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产资源生物加工与高效利用、食品生物技术, E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn。

4.Qingdao Key Laboratory of Food Biotechnology, Qingdao 266404, China;
5.Key Laboratory of Biological Processing of Aquatic Products, China National Light Industry, Qingdao 266404, China)

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is a high-value glycosaminoglycan that is extensively utilized in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. In this study, to establish greener and more cost-effective methods for HA production, *Pichia pastoris* was employed as a cell factory to evaluate the feasibility of synthesizing HA from methanol, a C1 substrate. Initially, an HA biosynthetic pathway was designed, which was subsequently incorporated into *P. pastoris*cells. The production of HA was quantified and confirmed using liquid chromatography and mass spectrometry, thereby verifying the successful establishment of an engineered cell factory. Using this system as a basis, with a view toward enhancing HA yield, hyaluronic acid synthases from different sources were screened. The results revealed that the hyaluronic acid synthase seHAS, derived from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, was characterized by the highest efficiency. Using this synthase, an HA titer of 941 mg/L with a molecular weight of approximately 1100 kDa was obtained under shake flask conditions. In addition, the efficacy of selected high-activity HA depolymerases was assessed, and both exogenous addition and co-expression approaches were employed to analyze potential bottlenecks in HA production. It was found that the depolymerase FhChAC was highly expressed in *P. pastoris*, and regardless of whether it was exogenously supplied or co-expressed, HA polysaccharides accumulated on the cell surface were efficiently released and degraded to oligosaccharides, thereby contributing to a significant increase in overall HA yield. Based on these optimization steps, a final shake flask fermentation yield of 5.6 g/L of unsaturated disaccharide-form HA oligosaccharides was obtained. The findings from this study are expected to provide important theoretical insights and technical guidance for the engineering of *P. pastoris* to produce HA from methanol.

Key words: hyaluronic acid; *Pichia pastoris*; metabolic engineering; hyaluronic acid depolymerase; hyaluronic acid synthase; methanol

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是由葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺经 β-1,3 和 β-1,4 糖苷键交替连接形成的一种糖胺聚糖。HA 因具有良好的生物相容性、保水性和黏弹性等理化性质[1],得到了广泛的应用。而 HA 的分子量是决定其功能与应用范围的主要因素[2]。高分子量 HA(1000 kDa 以上)常用于开发食品增稠剂[3]、生物支撑材料[4] 和化妆品保湿剂[5] 等;低分子量 HA(10~1000 kDa)可用作药物载体[6] 且具有抗炎、促进伤口愈合等生理功能[7];HA 寡糖(10 kDa 以下)具有抗氧化、抗炎、促进肠道健康等功能活性[8],且更容易被人体吸收,可应用于功能性食品[2]。传统 HA 生产方法主要为动物组织提取法或致病性链球菌发酵法[9],但这些方法存在病毒污染风险、动物源过敏原以及病原菌安全性等问题,限制了 HA 在医药和食品领域的应用。

近年来,代谢工程技术的迅速发展为 HA 的微生物合成提供了新的思路和手段。以谷氨酸棒状杆菌、枯草芽孢杆菌等 GRAS(generally regarded as safe)级模式菌为底盘,通过引入 UDP-GlcA/UDP-GlcNAc(尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸/尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺)供体途径及透明质酸合酶编码基因,已实现约 10~100 g/L 的 HA 产量[8,10]。例如,Hu 等[11] 通过应用透明质酸合酶改造策略扩展了产物分子量范围、适应性进化策略提升了工程菌株的稳定性与抗逆性,最终在工程谷氨酸棒状杆菌中取得了 45~105 g/L 的 HA 产量。Jin 等[12] 应用途径优化和共表达透明质酸酶等策略在工程枯草芽孢杆菌中取得了 5.96~19.4 g/L 的 HA 产量。然而,已报道的绝大多数研究仍依赖于葡萄糖这一传统碳源。相比之下,甲醇作为新一代生物制造关键原料,更加绿色、经济[13−14],可通过工业废气(如 CO_2 加氢)或生物质气化工艺进行规模化生产[15],能够缓解“与民争粮、与粮争地”的问题[16]。因此,基于甲醇的生物制造在近些年成为学术和产业界研究的热点和前沿[17]。以更为廉价的甲醇原料进行 HA 生产有望进一步降低生产成本,加快推动 HA 绿色生物制造的产业化进程。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为典型的甲基营养型宿主,具备高效的甲醇代谢能力、高密度发酵特性及强大的蛋白表达能力[18−19],目前已成功用于 HA[20] 以及其他复杂硫酸糖胺聚糖如硫酸软骨素 A[21] 和肝素[22] 的从头合成,展现出强大的应用潜力。但目前甲醇生物合成糖胺聚糖的研究尚处于起步阶段,生产效率普遍偏低,与产业化目标相去较远,亟需进一步优化提高。

本研究旨在以甲醇为唯一碳源,在毕赤酵母中构建 HA 合成途径,通过筛选最佳透明质酸合酶及辅助 HA 降解酶表达系统提升 HA 生产效率。该研究为毕赤酵母甲醇细胞工厂高效合成透明质酸提供了理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究中使用的质粒与菌株如表 1 所示;所有 pPICH、pPICZ 和 pPICZα 衍生质粒均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成基因合成和质粒组装;本研究所用主要引物如表 2 所示;引物合成以及 DNA 测序均由北京擎科生物科技有限公司完成;软骨素酶 ABC、透明质酸不饱和二糖标准品;美国 Sigma-

表 1　本研究所用质粒与菌株

Table 1　Plasmids and strains used in this study

质粒或菌株	相关信息	来源
质粒		
pPICH	AOX1启动子, Hyg^r	实验室保存
pPICZ	AOX1启动子, Zeo^r	实验室保存
pPICZ*α*	AOX1启动子, 含*α*交配因子信号肽的分泌表达载体, Zeo^r	实验室保存
pL3Hhis	*HIS4*, 用于Golden Gate Assembly的载体骨架, Hyg^r	实验室保存
pPICZ-*pmdcbC*	pPICZ衍生, 插入*pmdcbC*基因	本研究
pPICH-*pmHAS*	pPICH衍生, 插入*pmHAS*基因	本研究
pPICH-*xl2HAS*	pPICH衍生, 插入*xl1HAS*基因	本研究
pPICH-*xl1HAS*	pPICH衍生, 插入*xl2HAS*基因	本研究
pPICH-*cnHAS*	pPICH衍生, 插入*cnHAS*基因	本研究
pPICH-*cvHAS*	pPICH衍生, 插入*cvHAS*基因	本研究
pPICH-*seHAS*	pPICH衍生, 插入*seHAS*基因	本研究
pPICZ*α*-FhChAC	pPICZ*α*衍生, 插入HA降解酶FhChAC的编码基因	本研究
pPICZ*α*-CeChnase	pPICZ*α*衍生, 插入HA降解酶CeChnase的编码基因	本研究
pPICZ*α*-PvChABC	pPICZ*α*衍生, 插入HA降解酶PvChABC的编码基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-pmHAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*pmHAS*基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-xl2HAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*xl2HAS*基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-xl1HAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*xl1HAS*基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-cnHAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*cnHAS*基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-cvHAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*cvHAS*基因	本研究
pL3Hhis-*pmdcbC-seHAS*	pL3Hhis衍生, 插入*pmdcbC*和*seHAS*基因	本研究
菌株		
E. coli DH5*α*	用于表达载体的构建	Invitrogen
P. pastoris GS115(GS)	*HIS4*, 野生型毕赤酵母菌株	Invitrogen
GS-dcbC-xl2HAS(xl2HA)	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-xl2HAS*	本研究
GS-dcbC-pmHAS(pmHA)	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-pmHAS*	本研究
GS-dcbC-xl1HAS	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-xl1HAS*	本研究
GS-dcbC-cnHAS	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-cnHAS*	本研究
GS-dcbC-cvHAS	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-cvHAS*	本研究
GS-dcbC-seHAS	GS转入线性化载体pL3Hhis-*pmdcbC-seHAS*	本研究
GS-sec-FhChAC	GS转入线性化载体pPICZ*α*-FhChAC	本研究
GS-sec-CeChnase	GS转入线性化载体pPICZ*α*-CeChnase	本研究
GS-sec-PvChABC	GS转入线性化载体pPICZ*α*-PvChABC	本研究
GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC	GS-dcbC-seHAS转入线性化载体pPICZ*α*-FhChAC	本研究

表 2　本研究所用主要引物

Table 2　Main primers used in this study

引物	序列(5′-3′)
5′AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3′AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC
GGA-start-F	GGCTACGGTCTCACAGAAACATCCAA AGACGAAAGGT
GGA-1-R	GGCTACGGTCTCCTGTTATCTTCTGTACTCTGAAGAGG
GGA-2-F	GGCTACGGTCTCCAACATCCAAAGACGAAAGG
GGA-end-R	GGCTACGGTCTCCTCCTATCTTCTGTA CTCTGAAGAGG

Aldrich 公司; 分子量为 1000 kDa 的透明质酸、Stains-All 染料　上海麦克林生化科技有限公司; DNS 试剂　北京索莱宝科技有限公司; 限制性核酸内切酶、Golden Gate Assembly 试剂盒　美国 New England Biolabs 公司; LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、10 g/L NaCl(固体培养基需另加入 15 g/L 琼脂粉); YPD 培养基: 20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉(固体培养基需另加入 15 g/L 琼脂粉); BMGY 培养基: 20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、13.4 g/L 无氨基酵母氮源、100 mmol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液、0.4 mg/L 生物素、10 g/L 甘油; BMMY 培养基: 20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、13.4 g/L 无氨基酵母氮源、100 mmol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液、0.4 mg/L 生物素、10 g/L 甲醇。

ZQZY-CR8 摇床　上海知楚仪器有限公司; ETC811 PCR 仪　苏州东胜兴业科学仪器有限公司; Eporator 电转仪、Centrifuge 5420 台式离心机　德国 Eppendorf 公司; 3-18KS 高速冷冻离心机　美国 Sigma 公司; Infinite M200 酶标仪　瑞士 Tecan 公司; 1260 Infinity 液相色谱仪　美国 Agilent 公司; ACQUITY UPLC I-Class PLUS 系统配备 Xevo G2-XS Tof 的液相色谱-质谱联用仪　美国 Waters 公司; Optilab 示差折光检测器、DAWN 光散射检测器　美国 Wyatt 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒与菌株的构建 本研究所用 pL3Hhis 衍生的重组质粒均通过 Golden Gate Assembly 方法进行构建获得，具体为：用引物 GGA-start-F/GGA-1-R 扩增基因 *pmdcbC* 表达框，作为 DNA 片段 1；用引物 GGA-2-F/GGA-end-R 扩增各透明质酸合酶基因表达框，作为 DNA 片段 2。其反应体系为：1 μL Golden Gate Assembly Mix（*Bsa*I-HFv2）、2 μL T4 DNA 连接酶缓冲液、2 μL pL3Hhis 质粒、1 μL DNA 片段 1、1 μL DNA 片段 2 和 13 μL ddH_2O。Golden Gate Assembly 的反应程序为：37 ℃，1 min；16 ℃，1 min；循环 30 次；37 ℃，5 min；60 ℃，5 min；4 ℃，保存。将反应所得重组质粒经热激转化至 *E. coli* DH5*α* 后筛选获得阳性克隆用于 pL3Hhis 衍生重组质粒的提取。将直接合成的质粒和 pL3Hhis 衍生质粒分别用限制性核酸内切酶 *Pme* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ线性化，然后按表 1 描述通过电转化转入相应的毕赤酵母感受态细胞中，筛选获得酵母转化子。以引物 5′AOX/3′AOX 对转化子进行菌落 PCR 扩增，在扩增产物中同时检测到 *pmdcbC* 和透明质酸合酶基因的阳性转化子，即为成功构建的重组菌株。

1.2.2 毕赤酵母工程菌株的摇瓶发酵工艺 取保藏的菌液划线于 YPD 平板，在 30 ℃ 培养 48 h 后，挑取单菌落接种于液体 YPD 培养基，于 30 ℃，200 r/min 摇床中培养种子液 48 h。取 5 mL 种子液转接于 45 mL 的 BMGY 培养基后继续在 30 ℃，200 r/min 摇床中培养 24 h。在 4 ℃ 以 5000×g 离心 10 min 收集 BMGY 培养液中菌体并重悬于 50 mL 的 BMMY 培养基中，并在 30 ℃，200 r/min 摇床中培养 96 h。在甲醇诱导期间，每 12 h 补充 625 μL 的无水甲醇，每 24 h 取样用于测定发酵液细胞密度 OD_{600} 和制备样品。

1.2.3 发酵液样品的处理方法

1.2.3.1 产透明质酸毕赤酵母工程菌的发酵液样品 取适量按 1.2.2 方法所得发酵液，在 4 ℃ 以 5000×g 离心 10 min 后分别收集菌体和发酵液上清。加入适量 ddH_2O 重悬菌体以恢复至量取的发酵液体积，然后按体积比 1∶1∶2 将直径为 0.1 和 0.5 mm 的氧化锆颗粒与菌液混合，以 120 Hz 振荡破碎 120 s。随后以 10000×g 离心 15 min 收集破碎液上清。将发酵液上清与破碎液上清置于 65 ℃ 孵育 2 h 后以 10000×g 离心 15 min 去除沉淀，分别得到胞外来源和菌体来源的产物样品。

1.2.3.2 表达透明质酸降解酶毕赤酵母工程菌的发酵液样品 取适量按 1.2.2 方法所得的发酵液，在 4 ℃ 以 10000×g 离心 15 min 收集发酵上清液，然后经 0.22 μm 滤膜过滤去除残留的酵母细胞，获得粗酶液。

1.2.4 高效液相色谱法定量检测透明质酸 将 1.2.3.1 所得产物样品适量稀释后与终浓度为 0.05 U/mL 的软骨素酶 ABC 于 37 ℃ 过夜充分反应使酶解率达 95% 以上，经 0.22 μm 滤膜过滤后得到反应液，使用高效液相色谱（HPLC）测定其中 HA 不饱和二糖含量以表征 HA 含量[23]。产物样品中 HA 含量等于反应液样品中 HA 不饱和二糖含量与样品稀释倍数之积。色谱条件如下：色谱柱：BioRad Aminex HPX-87H Column，7.8 mm×300 mm；流动相：8 mmol/L H_2SO_4 水溶液；流速：0.6 mL/min；柱温：55 ℃；紫外检测器：232 nm；进样量：10 μL。

1.2.5 液相色谱-质谱联用鉴定透明质酸产物的合成方法参考已有文献 [21]。通过液相色谱-质谱联用（LC-MS）检测 1.2.4 方法所得反应液中 HA 不饱和二糖的生成，其理论质量数为 378.1036 Da。LC-MS 条件如下：色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 column，2.1 mm×100 mm；梯度洗脱：流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为乙腈，以 0.4 mL/min 的流速运行 10 min，流动相 B 从 0 升至 5%；柱温：室温；进样量：2 μL。质谱采用负离子模式对 100~800 m/z 进行扫描，扫描频率为 20 points/s，锥孔电压为 40 V，碰撞能量为 20 eV，毛细管电压为 2 kV，源温为 100 ℃，脱溶剂温度为 450 ℃。

1.2.6 排阻色谱法测定产物透明质酸的分子量 用配备示差折光检测器和光散射检测器的排阻色谱测定 1.2.3.1 所得产物样品中 HA 分子量。方法参考已有文献 [24]。色谱条件如下：色谱柱：Shodex SB-806M OHpak，8.0 mm×600 mm；流动相：0.1 mol/L NaCl 水溶液；流速：0.5 mL/min；柱温：室温；检测器：示差折光检测器与光散射检测器；进样量：50 μL。

1.2.7 琼脂糖凝胶电泳法分析透明质酸分子量 将 1.2.3.2 所得粗酶液与溶于 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH6.0）终浓度为 1 mg/mL 的 HA（分子量 1000 kDa）在 30 ℃ 孵育 15 min 后立即沸水浴 5 min 终止反应，获得反应液样品。使用经热变性处理后的粗酶液进行反应作为对照。电泳方法参考已有文献 [25]。用 1×TAE 缓冲液配制 0.5% 的琼脂糖凝胶，取反应液样品与 6×DNA 上样缓冲液混匀并上样后，在室温以 80 V 恒压电泳 1 h，电泳缓冲液为 1×TAE 缓冲液。完成后将凝胶用含 0.005% Stains-All 的 50% 乙醇溶液过夜避光染色。

1.2.8 透明质酸降解酶的酶活测定方法 测定方法参考已有文献 [26]。在 1.2.7 中所得反应液样品中加入等体积的 DNS 试剂并混匀，于沸水浴中孵育 5 min 后，立即冰水浴终止显色反应。用酶标仪测定显色反应液在 530 nm 处的吸光度值，用以葡萄糖为反应底物绘制的标准曲线计算酶活。单位酶活定义为在 30 ℃，pH6.0 的条件下，每小时释放出 1 μg 葡萄糖当量的还原糖所需的酶量。使用 1.2.7 中的对照反应液样品作为检测背景。

1.2.9　外源添加透明质酸降解酶对透明质酸产量的影响　按 1.2.2 方法发酵工程菌 pmHA，在发酵 36 h 时，添加终浓度为 0、400、10000 U/mL 的工程菌 GS-sec-FhChAC 发酵所得粗酶液（按 1.2.3.2 方法获得）。然后继续按 1.2.2 方法发酵工程菌 pmHA 至 96 h，通过 1.2.4 方法测定其 HA 产量。

1.3　数据处理

质谱数据使用 MassLynx 软件处理，排阻色谱数据使用 Astra 软件处理，其余实验数据使用 Excel 软件处理，每组实验均重复 3 次，用 *t*-test 统计分析，$P<0.05$ 认为具有显著差异，使用 Veusz 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　产透明质酸毕赤酵母细胞工厂的设计、构建与初步评价

在毕赤酵母中构建的完整 HA 合成途径如图 1 所示。甲醇首先通过木酮糖单磷酸途径（XuMP）进行同化，碳流汇集至 6-磷酸果糖后，从两条途径分别合成 HA 合成所需的两种糖基供体 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc，随后在透明质酸合酶的作用下合成 HA 糖链。为在毕赤酵母中构建 HA 合成途径，需引入外源的 UDP-Glc 脱氢酶基因和透明质酸合酶基因。前人研究中，Jeong 等[20] 通过引入非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）来源的Ⅰ型透明质酸合酶编码基因 *xl2HAS*，在毕赤酵母中成功实现了 HA 合成途径的构建，但该菌株的 HA 产量较低。天然合成 HA 的多杀巴斯德杆菌 A 型（*Pasteurella multocida* type A）来源的 pmHAS 为唯一已报道的Ⅱ型透明质酸合酶[27]，具有独特的研究价值。本研究选择使用多杀巴斯德杆菌来源的 UDP-Glc 脱氢酶基因 *pmdcbC*，分别与已报道的Ⅰ型透明质酸合酶编码基因 *xl2HAS* 和具有独特性的Ⅱ型透明质酸合酶编码基因 *pmHAS* 进行组合，用于 HA 合成途径的初步构建。所有异源基因的表达均由甲醇诱导型强启动子 P_{AOX1} 驱动。*pmdcbC* 基因表达框分别与 *xl2HAS* 和 *pmHAS* 基因表达框通过 Golden Gate Assembly 策略按 1.2.1 方法组装至同一载体，然后转化至野生型菌 *P. pastoris* GS115（GS）中，并经菌落 PCR 验证，最终获得工程菌株 xl2HA（GS-dcbC-xl2HAS）和 pmHA（GS-dcbC-pmHAS）。为初步评估构建的毕赤酵母细胞工厂以甲醇生产 HA 的能力，本研究在摇瓶条件下对工程菌 xl2HA 和 pmHA 进行了 96 h 的甲醇诱导发酵，并对发酵 96 h 所得产物样品中 HA 进行定性和定量分析。

在透明质酸的常用定量检测方法中，HPLC 法[23,28] 通过检测多糖裂解酶消化 HA 多糖生成的不饱和二糖进行定量，借助酶反应的简便高效与 HPLC 系统的批量自动化检测能力，可大幅降低操作流程并节省人工成本，适合在工程毕赤酵母生产 HA 的场景下应用。因此，本研究选取 HPLC 法分析

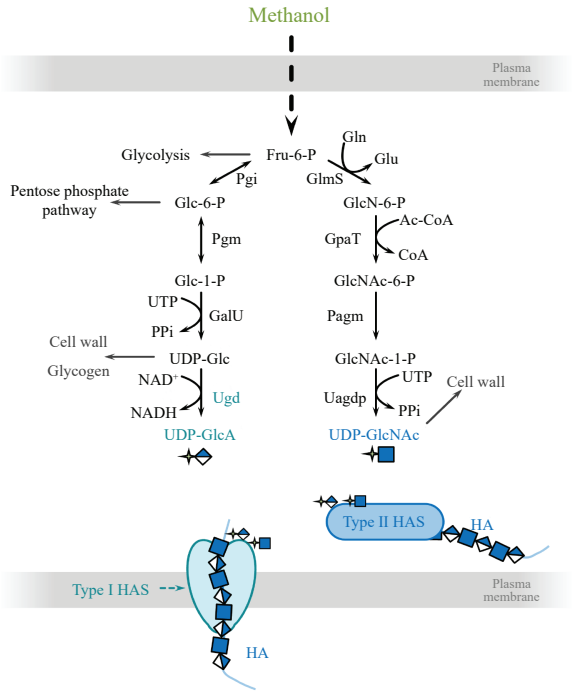


图 1　毕赤酵母细胞工厂中透明质酸合成途径的示意图

Fig.1　Schematic diagram of the hyaluronic acid biosynthesis pathway in *P. pastoris*-based cell factories

注：Fru-6-P：6-磷酸果糖；Glc-6-P：6-磷酸葡萄糖；Glc-1-P：1-磷酸葡萄糖；UDP-Glc：尿苷二磷酸-葡萄糖；UDP-GlcA：尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸；GlcN-6-P：6-磷酸葡萄糖胺；GlcNAc-6-P：6-磷酸乙酰葡萄糖胺；GlcNAc-1-P：1-磷酸 N-乙酰葡萄糖胺；UDP-GlcNAc：尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺；Pgi：磷酸葡糖异构酶；Pgm：磷酸葡糖变位酶；GalU：尿苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶；Ugd：尿苷二磷酸-葡萄糖脱氢酶；GlmS：磷酸葡糖胺合酶；GpaT：磷酸葡糖胺乙酰基转移酶；Pagm：磷酸乙酰葡糖胺变位酶；Uagdp：尿苷二磷酸-N-乙酰葡糖胺焦磷酸化酶；Type Ⅰ HAS：Ⅰ型透明质酸合酶；Type Ⅱ HAS：Ⅱ型透明质酸合酶；UTP：尿苷三磷酸；PPi：焦磷酸；NAD^+：氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；NADH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；Gln：谷氨酰胺；Glu：谷氨酸；Ac-CoA：乙酰辅酶 A；CoA：辅酶 A；HA：透明质酸。

工程菌株的 HA 产量。色谱分析结果如图 2A 所示，工程菌样品中存在与 HA 不饱和二糖标品保留时间（7.8 min）一致的产物峰。同时，野生菌（GS）样品中完全没有特征峰的出现，表明没有明显的背景干扰，说明了 HPLC 法在测定毕赤酵母发酵液样品中 HA 的适用性。HA 产量分析结果表明（图 2B），工程菌 xl2HA 的 HA 产量非常低，而工程菌 pmHA 的产量较高，可达 260 mg/L。

为进一步确认工程菌 pmHA 的产物为 HA，通过 LC-MS 对经软骨素酶处理后的产物样品进行分析。结果如图 3 所示，检测到与标准品保留时间（0.840 min）一致的产物峰以及质荷比同为 378.1031 的离子峰，且后者与理论值（378.1029）的相对误差在合理范围内（低于 5×10^{-6}）。这一结果证实了样品中存在 HA 不饱和二糖，进一步证明了 HA 的合成，表明产透明质酸的毕赤酵母细胞工厂得到成功构建。

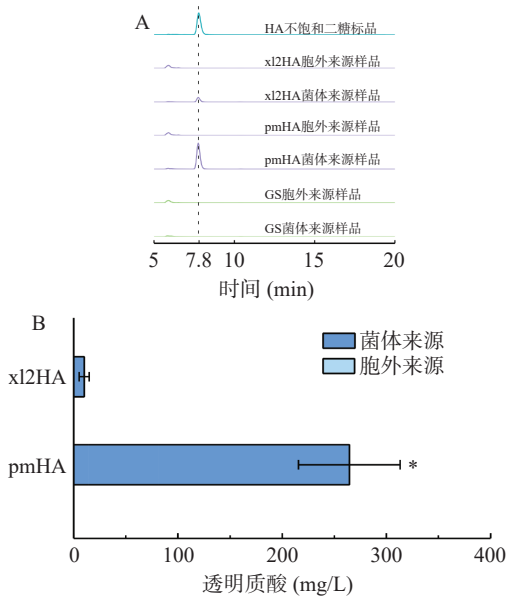


图 2 工程菌 xl2HA 和 pmHA 摇瓶发酵 96 h 生产透明质酸的检测结果

Fig.2 Determination of hyaluronic acid produced by the engineered strains xl2HA and pmHA after a 96-hour fermentation in shake flasks

注: A: HPLC 法检测工程菌 xl2HA 和 pmHA 摇瓶发酵 96 h 所得透明质酸产物的色谱图; B: 工程菌 xl2HA 和 pmHA 摇瓶发酵 96 h 的透明质酸产量; 图中*表示与其他组相比差异显著(P<0.05), 图 4、图 6 同。

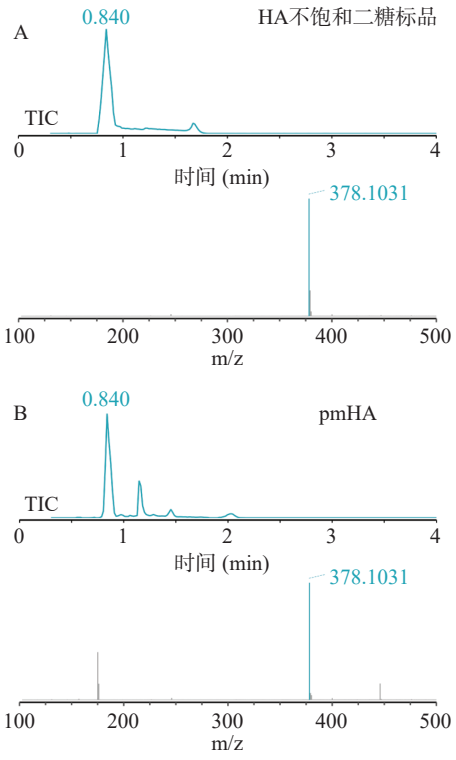


图 3 工程菌 pmHA 合成透明质酸的 LC-MS 鉴定

Fig.3 Confirmation of hyaluronic acid synthesis by the engineered strain pmHA using LC-MS

注: A: 透明质酸不饱和二糖标品; B: 工程菌 pmHA 摇瓶发酵 96 h 产物经软骨素酶 ABC 处理后的反应液; 上图为总离子流色谱图(TIC), 下图为保留时间 0.840 min 特征峰的质谱图。

2.2 不同透明质酸合酶对透明质酸合成效率的影响

由于工程菌 xl2HA 与 pmHA 的基因型差异仅在于透明质酸合酶基因的不同, 故推断不同来源的透明质酸合酶可能对 HA 的合成效率具有重要影响。为深入探究不同来源透明质酸合酶对毕赤酵母 HA 合成效率的影响, 本研究进一步选择了多种不同来源的透明质酸合酶基因, 包括革兰氏阳性菌兽疫链球菌(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)来源的 *seHAS*、真菌新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)来源的 *cnHAS*、小球藻病毒(*Paramecium bursaria* chlorella virus)来源的 *cvHAS* 和脊椎动物非洲爪蟾

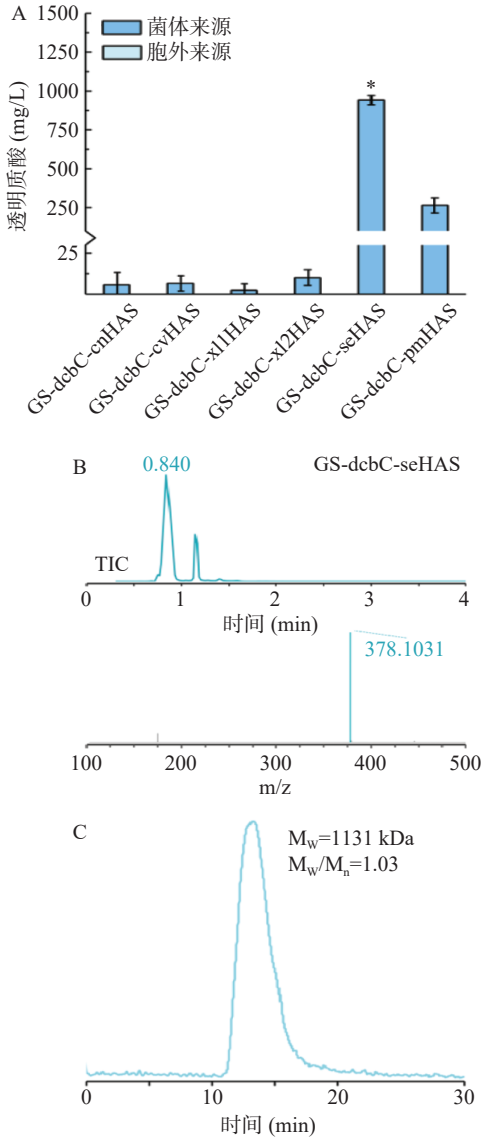


图 4 透明质酸合酶的筛选及工程菌 GS-dcbC-seHAS 透明质酸产物的检测分析

Fig.4 Screening of hyaluronic acid synthases and analysis of hyaluronic acid produced by the engineered strain GS-dcbC-seHAS

注: A: 整合不同透明质酸合酶基因的工程菌摇瓶发酵 96 h 的透明质酸产量; B: 工程菌 GS-dcbC-seHAS 合成透明质酸的 LC-MS 鉴定, 上图为总离子流色谱图(TIC), 下图为保留时间为 0.840 min 特征峰的质谱图; C: 工程菌 GS-dcbC-seHAS 合成透明质酸的分子量测定。

来源的 *xl1HAS*，用于 HA 合成途径的构建，菌株的构建策略与方法同 1.2.1。经过 96 h 的摇瓶发酵，结果显示，工程菌 GS-dcbC-seHAS 的 HA 产量最高，达到 941 mg/L（图 4A），表明兽疫链球菌来源的 *seHAS* 在毕赤酵母中有最高的 HA 合成效率。同时，其产物经 LC-MS 检测得到了与标准品（图 3A）一致的产物峰与母离子，由此确定了 HA 产物的合成（图 4B）。通过排阻色谱测定产物 HA 的分子量为 1131 kDa，多分散系数为 1.03（图 4C），表明工程菌 GS-dcbC-seHAS 可生产高分子量 HA（大于 1000 kDa），且分子量分布较为均一。

此外，工程菌 GS-dcbC-seHAS 的 HA 产物仅在菌体来源产物样品中检测到，而发酵上清液中未能检测到 HA。结合 I 型透明质酸合酶“边合成边分泌”的分子机制[29−30]，可以推测，虽然 HA 被分泌到酵母细胞膜的外侧，但可能滞留于细胞膜与酵母细胞壁复杂结构之间的间隙内或包裹在细胞外，导致 HA 无法进一步扩散到发酵液中，同时也限制了其有效的分泌和合成（图 5）。为验证这一推测，通过外源添加 HA 降解酶修剪阻滞的 HA 多糖，同时检测胞外 HA 的释放情况并分析其对 HA 总体产量的影响。

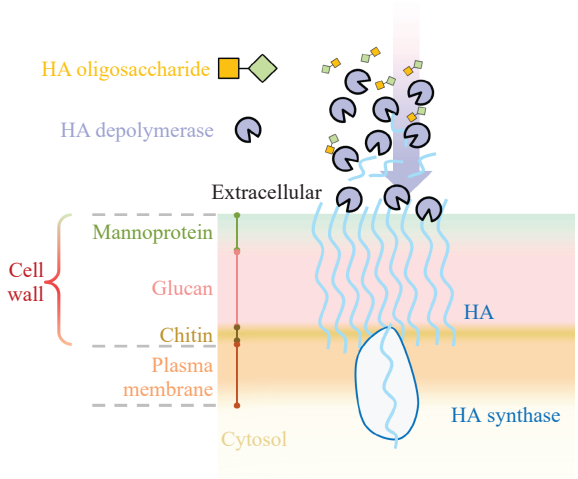


图 5　工程毕赤酵母中透明质酸细胞定位的推测示意图

Fig.5　Schematic representation of the presumed location of synthesized hyaluronic acid in engineered *P. pastoris*

注：HA oligosaccharide：透明质酸寡糖；HA depolymerase：透明质酸降解酶；Extracellular：胞外环境；Cell wall：细胞壁；Mannoprotein：甘露糖蛋白层；Glucan：葡聚糖层；Chitin：几丁质层；Plasma membrane：细胞膜；Cytosol：细胞质；HA：透明质酸；HA synthase：透明质酸合酶。

2.3　透明质酸降解酶的筛选

目前，已在毕赤酵母中表达的 HA 降解酶较少，且市售酶价格较高。为进一步提升毕赤酵母在 HA 生物合成中的应用潜力，本研究筛选了具有高活性且能在毕赤酵母中高效表达的 HA 降解酶。普通变形杆菌（*Proteus vulgaris*）来源的 PvChABC[31] 和肝素黄杆菌（*Flavobacterium heparinum*）来源的 FhChAC[32] 均已报道具有较强的 HA 反应活性，但尚未在毕赤酵母中实现表达。秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）来源的 CeChnase[33] 被报道为软骨素水解酶，但也具有一定的 HA 水解活性。因此，将上述三个 HA 降解酶编码基因整合至分泌表达载体 pPICZ*α* 并转入野生菌（GS）中，获得工程毕赤酵母 GS-sec-CeChnase、GS-sec-FhChAC 和 GS-sec-PvChABC。通过 96 h 甲醇诱导摇瓶发酵，收集粗酶液与 HA（1000 kDa）反应后利用 DNS 法检测 HA 降解酶活性。结果如图 6A 所示，工程菌 GS-sec-FhChAC 产生的 HA 降解活性远高于其他两者，可达 7.37×10^5 U/mL。工程菌 GS-sec-CeChnase 发酵所得粗酶液中酶活力较低，约 1290 U/mL，而 GS-sec-PvChABC 产生的 HA 降解活性极低，仅 130 U/mL。同时，使用琼脂糖凝胶电泳分析上述反应液中 HA 的分子量，结果如图 6B 所示，经工程菌 GS-sec-CeChnase 粗酶液处理后，HA 条带出现下移，表明其具有一定的 HA 降解能力，但降解效果较为有限。而采用工程菌 GS-sec-PvChABC 粗酶液处理后，HA 条带位置与对照相比无显著差异，说明其无法有效降

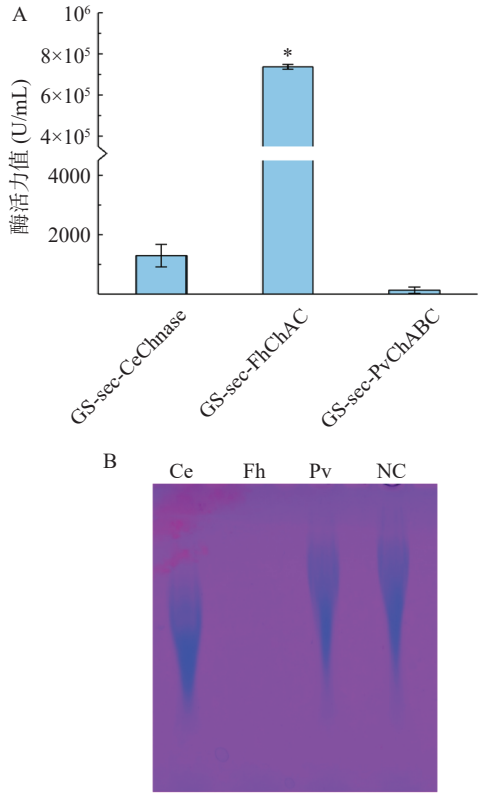


图 6　工程菌经 96 h 摇瓶发酵所得粗酶液中 HA 降解酶活力及其用于降低 HA 分子量的效果

Fig.6　Hyaluronic acid depolymerizing activity in a crude enzyme solution from engineered strains after a 96-hour fermentation in shake flasks and its effects on hyaluronic acid molecular weight

注：A：工程菌经 96 h 摇瓶发酵所得粗酶液中 HA 降解酶活力；B：琼脂糖凝胶电泳分析不同工程菌发酵所得粗酶液与 HA（1000 kDa）反应后的产物分子量；Ce：添加菌株 GS-sec-CeChnase 发酵所得粗酶液进行反应；Fh：添加菌株 GS-sec-FhChAC 发酵所得粗酶液进行反应；Pv：添加菌株 GS-sec-PvChABC 发酵所得粗酶液进行反应；NC：添加经热变性处理后的粗酶液进行反应作为对照。

低 HA 分子量。相比之下，工程菌 GS-sec-FhChAC 粗酶液因含有较强的 HA 降解活性，其反应产物分子量已超出琼脂糖凝胶电泳分析下限（约 10 kDa[25]），导致条带不可见。以上结果表明，工程菌 GS-sec-CeChnase 和 GS-sec-PvChABC 粗酶液的 HA 降解能力较弱，而工程菌 GS-sec-FhChAC 能够表达高活性的 HA 降解酶，展现出较强的应用潜力。因此，选择在菌株 GS-dcbC-seHAS 的发酵过程中添加工程菌 GS-sec-FhChAC 发酵所得粗酶液，考察其对 HA 释放和产量的影响。

2.4 外源添加或共表达透明质酸降解酶 FhChAC 对透明质酸释放和产量的影响

为考察外源添加 HA 降解酶对 HA 细胞定位和生产效率的影响，添加时机的选择至关重要。考虑到外加酶的稳定性有限，不宜在酵母细胞积累足量 HA 之前过早添加；而若在发酵后期添加，则可能因催化时间不足导致 HA 切割不充分。因此，选择在工程菌 GS-dcbC-seHAS 摇瓶发酵的中期（36 h），添加终浓度为 0、400 或 10000 U/mL 菌株 GS-sec-FhChAC 发酵所得粗酶液，并测定发酵 96 h 时的 HA 产量。结果如图 7 所示，随着 HA 降解酶添加量的升高，HA 的产量以及胞外来源 HA 的比例均逐渐升高。当添加量为 10000 U/mL 时，HA 产量达到约 2.4 g/L，且胞外来源 HA 约占 50%。这一结果表明外源添加的 HA 降解酶可有效切割积累于工程毕赤酵母细胞表面的 HA 并将其部分释放至发酵液中。

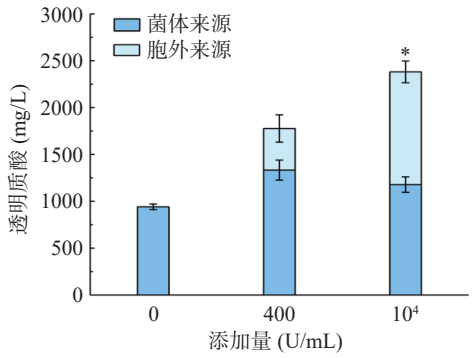


图 7 添加 FhChAC 对透明质酸的释放和产量的影响

Fig.7 Effects of FhChAC addition on hyaluronic acid release and production

注：图中*表示透明质酸总量与其他组相比差异显著（P<0.05）。

由于外源添加 HA 降解酶可显著提升 HA 生产效率，因此本研究进一步在 HA 生产菌株 GS-dcbC-seHAS 中引入整合 FhChAC 编码基因的分泌表达载体，得到共表达 FhChAC 菌株 GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC，并在摇瓶水平对其进行 96 h 甲醇诱导发酵以评价生产性能。鉴于 FhChAC 的高降解活力，推测其可能使原 HA 多糖产物的分子量大幅下降，甚至降解产生聚合度最低的 HA 不饱和二糖。为验证该假设，采用 HPLC 法比较分析了工程菌发酵 96 h 所得产物样品经软骨素酶 ABC 处理前后的 HA 不饱和二糖含量。结果显示（图 8A），产物样品中 HA 不饱和二糖含量在酶处理前后无显著差异，表明 HA 多糖产物已被高活性的 FhChAC 完全消化为 HA 不饱和二糖。同时，工程菌 GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC 经 96 h 甲醇诱导摇瓶发酵，最终获得了 5.6 g/L 不饱和二糖形式的 HA 寡糖，表明通过共表达高效的 HA 降解酶不仅能够显著降低产物分子量，还能进一步提高 HA 的生产效率。此外，这一摇瓶水平的产量结果远高于已报道的工程毕赤酵母在 2.5-L 发酵罐水平中取得的 1.7 g/L HA 产量[20]。

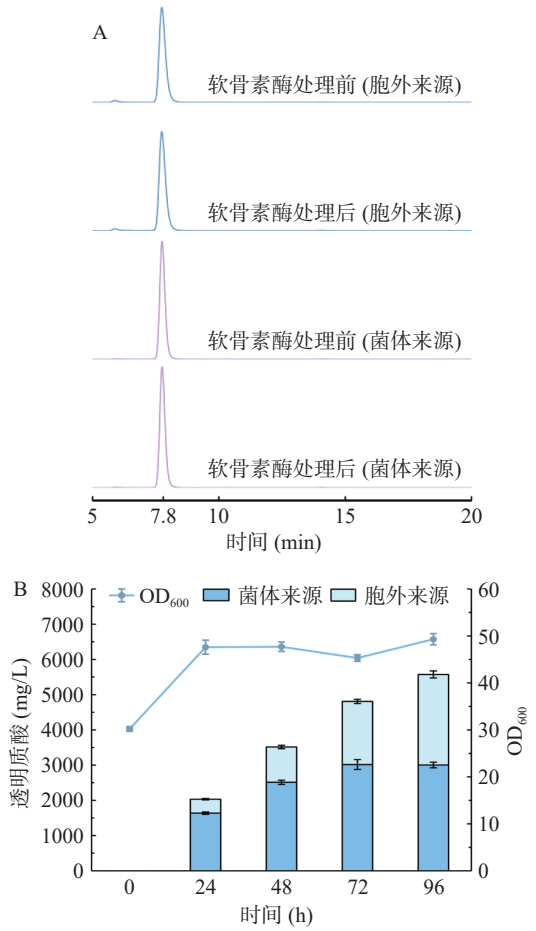


图 8 工程菌 GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC 的产物分析及在 96 h 摇瓶发酵中的生产性能

Fig.8 Analysis of the product of the engineered strain GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC and its productivity following a 96-hour fermentation in shake flasks

注：A：工程菌 GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC 摇瓶发酵 96 h 所得产物样品经软骨素酶 ABC 处理前后的色谱分析；B：工程菌 GS-dcbC-seHAS-sec-FhChAC 摇瓶发酵 96 h 的生产性能。

通过降低产物 HA 多糖的分子量，从而提升 HA 生产效率的类似发现在其他研究中也有所报道。例如，Wang 等[34] 通过外源添加 HA 降解酶，大量释放包裹在工程谷氨酸棒状杆菌细胞表面的 HA，不仅显著降低了 HA 分子量，还使 HA 产量最高提升了约 117%。因此，HA 多糖在细胞表面的过度累积现象可能是普遍存在的，这导致了 HA 分泌效率受限进而影响合成效率。而通过引入 HA 降解酶，

及时释放积累在细胞表面的 HA 多糖缓解分泌阻滞，无疑是一种有效提升 HA 生产效率的重要策略。

本研究通过共表达 HA 降解酶显著提高了 HA 产量，但由于 FhChAC 的表达水平和酶活力较高，HA 多糖分子量在发酵周期内急剧下降，最终获得了不饱和二糖形式的 HA 寡糖产物。研究报道显示，HA 寡糖在胃肠道中的吸收率较高，口服 HA 寡糖不仅具有抗氧化和美容作用[35]，还可促进肠道益生菌产生有益代谢物，有助于肠道健康[36]，适用于保健食品的开发。为进一步满足市场对不同分子量 HA 产品的需求，未来可通过精细调控 HA 降解酶的表达强度或控制添加时机，实现对 HA 产物分子量的精准控制。

3　结论

本研究成功在毕赤酵母中构建了以甲醇为碳源的 HA 合成途径。通过筛选不同来源的透明质酸合酶，确定了来自兽疫链球菌的 seHAS 最适合用于毕赤酵母合成 HA。该酶的性能显著优于其他来源的透明质酸合酶，摇瓶发酵水平的 HA 产量达到 941 mg/L，产物分子量较高（约 1100 kDa）且分布较为均一。进一步研究表明，大量 HA 可能被限制在细胞膜与细胞壁复杂结构之间的间隙中或困滞于细胞表面，无法有效扩散到胞外，这严重限制了 HA 的高效生产。为解决此问题，本研究进一步筛选得到了适合在毕赤酵母中高效表达且具备较强 HA 降解能力的 HA 降解酶 FhChAC。通过外源添加或共表达 FhChAC 的方式，大量积累于工程酵母表面的 HA 多糖被降解为寡糖并释放至胞外环境中。同时，HA 总产量也得到了显著提升，共表达降解酶的 HA 生产菌株经 96 h 甲醇诱导摇瓶发酵获得了 5.6 g/L 不饱和二糖形式的 HA 寡糖产物。本研究不仅验证了以甲醇为唯一碳源的毕赤酵母作为 HA 生产宿主的巨大潜力，也提出了一个通用的降解酶共表达策略，为推动基于毕赤酵母甲醇细胞工厂的透明质酸工业化生产提供了理论基础和技术参考。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] IACONISI G N, LUNETTI P, GALLO N, et al. Hyaluronic acid: A powerful biomolecule with wide-ranging applications: A comprehensive review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(12): 10296.

[2] 狄靖宜, 裴旭娟, 刘浩, 等. 低分子量透明质酸合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1789−1801. [DI Jingyi, PEI Xujuan, LIU Hao, et al. Progress in the synthesis of low molecular weight hyaluronic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1789−1801.]

[3] LIU Sinong, XIANG Yanpeng, XU Chang, et al. Systematic preparation of animal-derived glycosaminoglycans: Research progress and industrial significance[J]. Food Chemistry, 2025, 464: 141565.

[4] RNJAK-KOVACINA J, TANG F Y, WHITELOCK J M, et al. Glycosaminoglycan and proteoglycan-based biomaterials: Current trends and future perspectives[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(6): e1701042.

[5] BUKHARI S N A, ROSWANDI N L, WAQAS M, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1682−1695.

[6] VASVANI S, KULKARNI P, RAWTANI D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 1012−1029.

[7] LIN C Y, KUO P J, LIN Y H, et al. Fabrication of low-molecular-weight hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose hybrid to promote bone growth in guided bone regeneration surgery: An animal study[J]. Polymers, 2022, 14(15): 3211.

[8] QIU Yibin, MA Yanqin, HUANG Yanyan, et al. Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118320.

[9] YAO Zhiyuan, QIN Jiufu, GONG Jinsong, et al. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 264: 118015.

[10] 马艳琴, 邱益彬, 李莎, 等. 透明质酸的生物合成及其代谢工程的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 252−262. [MA Yanqin, QIU Yibin, LI Sha, et al. Research progress in the biosynthesis and metabolic engineering of hyaluronic acid[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(2): 252−262.]

[11] HU Litao, XIAO Sen, SUN Jieyu, et al. Regulating cellular metabolism and morphology to achieve high-yield synthesis of hyaluronan with controllable molecular weights[J]. Nature Communications, 2025, 16: 2076.

[12] JIN Peng, KANG Zhen, YUAN Panhong, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 21−30.

[13] LIU Zihe, WANG Kai, CHEN Yun, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO_2[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 274−288.

[14] 谭天伟, 陈必强, 张会丽, 等. 加快推进绿色生物制造 助力实现“碳中和”[J]. 化工进展, 2021, 40(3): 1137−1141. [TAN Tianwei, CHEN Biqiang, ZHANG Huili, et al. Accelerate promotion of green bio-manufacturing to help achieve "arbon neutrality"[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 40(3): 1137−1141.]

[15] ZHOU Y J, KERKHOVEN E J, NIELSEN J. Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons[J]. Nature Energy, 2018, 3(11): 925−935.

[16] 刘康, 乔杨怡, 张尚杰, 等. 甲醇生物转化合成化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2430−2448. [LIU Kang, QIAO Yangyi, ZHANG Shangjie, et al. Advances in biotransformation of methanol into chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2430−2448.]

[17] 汪淑贤, 方嘉煜, 张延平, 等. 天然甲醇化学品细胞工厂改造进展与展望[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2747−2760. [WANG Shuxian, FANG Jiayu, ZHANG Yanping, et al. Progress and perspectives of natural cell factories for chemical production from

methanol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2747−2760.]

[18] GUO Feng, QIAO Yangyi, XIN Fengxue, et al. Bioconversion of C1 feedstocks for chemical production using *Pichia pastoris*[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(8): 1066−1079.

[19] de BRABANDER P, UITTERHAEGEN E, DELMULLE T, et al. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review[J]. Biotechnology Advances, 2023, 64: 108121.

[20] JEONG E, SHIM W Y, KIM J H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 185: 28−36.

[21] JIN Xuerong, ZHANG Weijiao, WANG Yang, et al. Biosynthesis of non-animal chondroitin sulfate from methanol using genetically engineered *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry, 2021, 23(12): 4365−4374.

[22] ZHANG Yonglin, WANG Yang, ZHOU Zhengxiong, et al. Synthesis of bioengineered heparin by recombinant yeast *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry, 2022, 24(8): 3180−3192.

[23] 陈楠楠, 王弈忻, 陈玉娟, 等. 透明质酸酶-高效液相色谱法测定食品中透明质酸钠的含量[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(2): 154−159. [CHEN Nannan, WANG Yixin, CHEN Yujuan, et al. Determination of sodium hyaluronate in food by hyaluronidase-HPLC method[J]. China Food Additives, 2025, 36(2): 154−159.]

[24] CHENG Fangyu, GONG Qianying, YU Huimin, et al. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(4): 574−584.

[25] BHILOCHA S, AMIN R, PANDYA M, et al. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5- to 500-kDa hyaluronan[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 417(1): 41−49.

[26] HUANG Hao, HOU Xiaodong, XU Ruirui, et al. Structure and cleavage pattern of a hyaluronate 3-glycanohydrolase in the glycoside hydrolase 79 family[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 277: 118838.

[27] DEANGELIS P L. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(37): 26557−26562.

[28] 杨静, 刘春丽, 黎俊威, 等. 高效液相色谱法测定食品中透明质酸钠的含量[J]. 饮料工业, 2024, 27(6): 36−40,47. [YANG Jing, LIU Chunli, LI Junwei, et al. Determination of sodium hyaluronate content in food by high performance liquid chromatography[J]. Beverage Industry, 2024, 27(6): 36−40,47.]

[29] GÓRNIAK I, STEPHENS Z, ERRAMILLI S K, et al. Structural insights into translocation and tailored synthesis of hyaluronan[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2025, 32(1): 161−171.

[30] MALONEY F P, KUKLEWICZ J, COREY R A, et al. Structure, substrate recognition and initiation of hyaluronan synthase[J]. Nature, 2022, 604(7904): 195−201.

[31] HAMAI A, HASHIMOTO N, MOCHIZUKI H, et al. Two distinct chondroitin sulfate ABC lyases[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(14): 9123−9130.

[32] GU K, LINHARDT R J, LALIBERTÉ M, et al. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*[J]. The Biochemical Journal, 1995, 312(Pt2): 569−577.

[33] KANEIWA T, YAMADA S, MIZUMOTO S, et al. Identification of a novel chondroitin hydrolase in *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(22): 14971−14979.

[34] WANG Yang, HU Litao, HUANG Hao, et al. Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Nature Communications, 2020, 11: 3120.

[35] 李憬昱, 王凤山. 低分子质量和寡聚透明质酸制备、活性与应用研究进展[J]. 药物生物技术, 2019, 26(1): 64−68. [LI Jingyu, WANG Fengshan. Research progress in the preparation methods, bioactivities and applications of low molecular weight and oligomeric hyaluronic acid[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 26(1): 64−68.]

[36] 滕薇, 刘树滔, 吴金鸿, 等. 透明质酸的制备、功能特性及其调节肠道健康的研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 401−413. [TENG Wei, LIU Shutao, WU Jinhong, et al. Recent advances on the preparation, cell functions and absorption of hyaluronic acid and its regulatory effect on intestinal homeostasis and inflammation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 401−413.]