基于合成生物学策略实现糖胺聚糖的微生物合成

金学荣, 周正雄, 王阳, 李江华*, 康振*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

* 联系人, E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn; lijiahua@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-11-04; 接受日期: 2019-01-29; 网络版发表日期: 2019-05-14

国家自然科学基金(批准号: 31670092)和江南大学自主科研计划重点项目基金(批准号: 1012050205181370)资助

摘要 糖胺聚糖广泛应用于化妆品和保健品领域以及血栓、骨关节炎、癌症等临床医疗。目前, 商品化糖胺聚糖依赖于动物组织提取, 产品存在均一性差、有潜在致病因子等缺点。采用合成生物学策略合成糖胺聚糖及其寡糖可避免上述问题, 且可实现精准控制硫酸化程度及产品分子量分布。随着基因组学和合成生物学的发展, 透明质酸、软骨素、肝素前体、硫酸软骨素及肝素等的合成途径被阐释, 多种平台菌株的遗传操作体系不断完善。基于合成生物学策略构建微生物细胞工厂合成糖胺聚糖已成为未来发展趋势。本文主要综述了近年来生产糖胺聚糖及其寡聚糖的生物策略尤其是相关合成生物学手段, 以期对未来研究提供新思路。

关键词 合成生物学, 糖胺聚糖, 微生物合成, 透明质酸, 硫酸软骨素, 肝素

糖胺聚糖(glycosaminoglycans, GAGs)是一类带负电的直链酸性多糖, 分布于细胞表面及胞外基质。根据其单糖组成及硫酸化方式的不同分为四种类型, 分别为透明质酸(hyaluronan, HA)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)/硫酸皮肤素(dermatan sulfate, DS)、肝素(heparin, HP)/硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)及硫酸角质素(keratan sulfate, KS)(图1)^[1]。GAGs广泛用于临床治疗^[2~4]、保健品和化妆品领域^[5]。研究表明, GAGs的功能和用途与其分子量密切相关^[6,7]。例如, 中低分子量的HA常应用于化妆品^[8], 而高分子HA交联后用于生物支架^[9]。肝素多糖用于术后抗凝血, 肝素寡糖则具有抗炎、抗纤维化和抗转移活性^[10]。

目前, 除HA主要利用微生物生产, CS和HP主要依赖动物组织提取^[11]。组织提取法存在原料不足、产品

不均一、废液污染及潜在的致病因子等诸多弊端, 故开发新的糖胺聚糖生产方法显得尤为重要。近年来, 已有化学法合成GAGs的报道^[12,13], 但该方法操作步骤繁琐耗时^[14]、前体原料价格昂贵、难以实现大规模产业化^[15]。而微生物可以利用简单廉价的原料经过一系列酶催化精准合成目标产物。早期研究证实, *Escherichia coli* K4及*E. coli* K5的荚膜多糖含有软骨素和肝素前体^[16,17], 但是由于该菌株是潜在的致病菌, 产品的安全性无法得到保障。故通过基因工程、合成生物学及代谢工程手段进行基因的异源表达, 实现了在不同宿主中进行GAGs的体内合成^[18~22]。软骨素和肝素前体经过后修饰即可形成硫酸软骨素和肝素。近年来许多学者对GAGs后修饰相关的硫酸转移酶进行了异源表达和功能验证^[23~25], 这为GAGs酶法合成提供

引用格式: 金学荣, 周正雄, 王阳, 等. 基于合成生物学策略实现糖胺聚糖的微生物合成. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 553–562

Jin X R, Zhou Z X, Wang Y, et al. Microbial synthesis of glycosaminoglycans with synthetic biology strategies (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 553–562, doi: 10.1360/N052018-00249

图 1 糖胺聚糖结构示意图

Figure 1 Structure of GAGs

了基础。

GAGs相关寡糖由于其广泛的应用而得到研究者的关注。GAGs寡糖可以通过多种物理方法(如超声、加热)和化学方法(如酸碱水解、氧化断裂)获得,但是该方法得到的寡糖分子量不均一旦分布范围大,难以得到特定分子量大小的寡糖。目前已报道若干水解酶或者裂解酶可将高分子量的GAGs降解成特定分子量的寡糖^[26,27],通过控制加入酶量和反应时间可将寡糖分子量精准控制在某一个范围内,得到纯净均一的寡糖。

得益于合成生物学技术的迅猛发展^[28-30],一系列的基因工程技术、代谢工程手段及工程化拼接组装技术日益完善^[31],使得研究者可以根据所需设计代谢合成路径,在微生物细胞内实现目的产物的精确合成。由于原始菌株潜在的致病因子,且其研究背景不如模式菌株清晰,加之合成生物学技术近年来的发展成熟,应用合成生物学相关技术进行GAGs合成有着明显的

优势和必要性^[27,28]。本文围绕透明质酸、软骨素/硫酸软骨素、肝素前体/肝素及硫酸乙酰肝素综述了近年来基于合成生物学技术的糖胺聚糖及其寡糖的微生物生产,探讨与展望了糖胺聚糖及其寡糖的微生物合成中所存在问题和可能的研究方向。

1 透明质酸的微生物合成

由于动物组织提取糖胺聚糖固有的缺点,自20世纪80年代初以来,HA已主要利用兽疫链球菌(*Streptococcus zooepimicus*)发酵生产^[32,33]。由于链球菌属存在潜在的致病性以及缺乏相应的分子改造手段,故利用易于操作的安全菌株进行HA的合成生产显得尤为重要。目前研究者已通过毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、乳酸菌(*Lactococcus lactis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)及谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等安全菌株中重构生产途径进行HA的合

成^[34,35]

HA产量提高策略有以下三方面。(i) 提高透明质酸合酶(hyaluronan Synthase, HAS)的活性。HAS是HA合成中的关键酶之一,属于跨膜多功能蛋白,其可识别HA合成前体尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸(UDP-glucuronic acid, UDP-GlcA)与尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc),形成 β -1,3与 β -1,4糖苷键以及对HA链进行转运分泌。HAS对HA的合成及其分子量大小起着关键的作用。研究者通过表达不同来源的HAS进行评估HA产量。Hubbard等人^[36]将来自*S. zooepimicus*的HAS进行体外催化反应,实现了在体外合成HA。Jeong等人^[20]将来自非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的HAS整合至*K. pastoris*基因组,HA产量为0.8~1.7 g/L,分子量达到2 MD。通过对酶本身的改造可能会使产量得到提高。Jin等人^[37]利用RECODE蛋白进化技术对来自*S. zooepimicus*的HA合酶胞质结构域进行了修饰,使HA产量和分子量均得到了提高^[38]。(ii) 增加及平衡前体物质供应量与比例,同时抑制代谢支路途径。HA的产量与其前体UDP-GlcUA和UDP-GlcNAc的供应量及平衡关系密切^[39]。UDP-葡萄糖脱氢酶(*ugd*编码)是催化葡萄糖合成前体UDP-GlcA的主要限速酶。为强化这一步的合成,Sheng等人^[40]通过共表达*ugd*, *glmU* (UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase)提高前体的供应,在*L. lactis*中实现了HA的积累(图2)。为了抑制支路途经的碳代谢流,Cheng等人^[41]敲除了*C. glutamicum*中的乳酸脱氢酶基因*ldh*, HA产量提高到21.6 g/L。本课题组前期工作中调研了*B. subtilis*

*lis*合成HA途径中所有的内源性基因, 通过同时上调基因*tuaD*(UDP-glucose dehydrogenase), *gtaB*(UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase), *glmU*, *glmM*(phosphoglucosamine mutase)与*glmS*(L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase), 得到HA产量为2.72 g/L, 分子量为1.69 MD. 进一步增强6-磷酸葡萄糖往前体UDP-GlcNAc的合成代谢流, 抑制了6-磷酸果糖激酶的表达, 使糖酵解途径下调, 增强前体UDP-GlcNAc的供应. 最终在*B. subtilis*中得到HA产量为3.16 g/L(图2)^[42]. (iii) 通过调控HA的分子量提高其产量. 为了获得高附加值的HA寡糖, 通过透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)降解HA得到不同分子量的HA寡糖^[43-45].

HAase可以分为三大类：透明质酸裂解酶(EC 4.2.2.1)、透明质酸3-糖苷水解酶(EC 3.2.1.36, 主要存在于水蛭)和透明质酸4-糖苷水解酶(EC 3.2.1.35, 主要存在于哺乳动物)。裂解酶处理生成的产物中含有不饱和和双键的 $\Delta 4,5$ -葡萄糖醛酸残基, 影响酶解产物的活性和功能。鉴于此本课题组首次鉴定了水蛭透明质酸水解酶并在*K. pastoris*中实现了活性表达^[46]。结合N端工程及发酵优化, 水蛭透明质酸水解酶酶活达到 1.68×10^6 U/mL^[47]。在此基础上, 我们建立了酶法生产特定分子量HA寡糖的方法^[26]。

2 软骨素及肝素前体的微生物合成

软骨素(chondroitin, Ch)由GlcA和N-乙酰-半乳糖

图 2 HA合成途径
Figure 2 Synthesis pathway of HA

到前体的重要性, Cimini等人^[48]在*E. coli* K4中过表达基因*pgm*及*galU*增强前体供应量, 从而使果糖软骨素产量得到提高. 为了进一步优化Ch和肝素前体的合成, 一系列基因工程手段被用于宿主改造. Huang等人^[49]通过敲除*E. coli* K5中编码 α -1,2-糖基转移酶的*waaR*基因, 使合成的肝素前体分子量减小, 产量得到了提高. 这说明*waaR*基因在肝素前体合成中起着关键的作用.

尽管在出发菌基础上的改造可以得到提高Ch和肝素前体的产量,但*E. coli* K4和*E. coli* K5菌株潜在的致病性被人所担忧,从而激发研究人员寻找新的安全菌株.已有研究者将来自*E. coli* K4的三个关键基因*kfoC*, *kfoA*和*kfoF*克隆至*E. coli* 21(DE3)中组合表达,采用补料分批发酵得到Ch产量为2.4 g/L^[19].将来自多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)的肝素合酶基因在

*B. subtilis*中进行表达, 得到的产率及分子量均高于原始菌株表达^[21].

本课题组前期工作中将Ch合成相关基因*kfoC*, *kfoA*与肝素合成相关基因*kfiC*, *kfiA*分别整合至*B. subtilis*基因组中, 通过对前体合成途径基因的过表达及两个前体供应的平衡调控, 在3-L罐中Ch和肝素前体的产量分别为5.22, 5.82 g/L(图2)^[18]. 微生物发酵过程中, 细胞合成产物可能在胞内积累, 无法全部转运出来, 造成胞外产量不高. 为了进一步提高目标产物胞外的产量及后续产物的分离纯化, 可以考虑在重组菌株中过表达转运蛋白, 同时对于产物的转运机制进一步进行研究^[50].

综上, 已经报道了多种不同的宿主用于GAGs合成. HA已经实现了在*K. pastoris*, *E. coli*, *B. subtilis*, *L. lactis*等宿主中的生产, Ch和肝素前体也在*E. coli*, *B. subtilis*中成功合成. 不同的工程菌由于采用不同的策略造成了GAGs产量和分子量存在差异. Yu和Stephanopoulos^[51]以*E. coli* Top10作为宿主, 将HAS与前体合成关键途径基因分别组合构建不同表达载体, 得到HA产量可达48 mg/L. Widner等人^[52]在*B. subtilis* A164Δ5菌株中构建HA代谢通路, 将HAS和前体合成相关基因进行组合表达, 得到一株HA产量为0.8~1.0 g/L, 相对分子质量为 $1.1 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6$ 的工程菌株. 对于Ch和肝素前体的微生物合成的研究, 目前集中在*E. coli*和*B. subtilis*两种宿主中^[18,19,21], 暂时未见其他宿主的报道. 为扩展GAGs的来源, 提高产量及保证GAGs临床使用安全性, 对多种工业安全微生物进行比较研究是有必要的, 以期创造出一种安全性高及生产成本更具优势的GAGs生产方式.

3 硫酸软骨素的微生物合成

CS是广泛分布在软骨连结组织中的一种蛋白聚糖, 有着重要的生物学功能. CS是Ch的GalNAc的C-4或C-6号位羟基被硫酸化修饰所得到的糖胺聚糖(图4A). 根据硫酸化修饰位置的不同, CS可以被分为以下四种类型: CSA(4-O-硫酸化), CSC(6-O-硫酸化), CSD(2,6-di-O-硫酸化)和CSE(4,6-di-O-硫酸化)^[23]. 硫酸化的形式与其生物活性及应用领域息息相关, CSA和CSC常被用于治疗关节炎, CSE可促进原代神经元的神经突向外生长^[53,54].

目前商品化的CS主要依赖于动物组织提取, 但是组织提取的CS高度不均且含有过硫酸角质素降低医药活性甚至导致失活. 为了得到均一性较好、生物安全的CS, 研究者采用微生物法或者微生物-酶法合成CS. Bedini等人^[55]开发了一种利用微生物-化学法合成CSA和CSC.

CS合成过程中的途径酶已经都被成功地表达和研究过. 在Ch硫酸化过程中, 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS)作为硫酸基供体, Ch经过软骨素4-O-硫酸转移酶(C4ST)或6-O-硫酸转移酶(C6ST)修饰后形成CSA和CSC. 由于PAPS价格昂贵, 为了降低成本, 人工构建PAPS再生系统为硫酸转移酶提供硫酸基团(图4D). 目前, C4ST已经成功地在*E. coli*和*K. pastoris*中表达^[25], 为微生物酶法合成均一的CS提供了基础. Zhou等人^[23]采用微生物酶法两步合成均一性的CSA或CSC. 首先构建重组*B. subtilis*实现了软骨素的微生物合成, 然后利用C4ST, C6ST及芳基硫酸转移酶(aryl sulfotransferase IV, AST IV)构建了硫酸转移系统, 通过体外酶法催化使Ch的C-4或C-6号位羟基硫酸化形成CSA或CSC. 与此类似, DS也可以通过类似的微生物酶法策略进行合成(图4B).

4 肝素的微生物合成

HP是由肝素前体经过一系列的后修饰过程形成的带有多个硫酸基团的糖链, 是临床上治疗抗凝血的常用药物^[56]. 根据分子量的大小一般将HP分为三类: 普通肝素(UFH, 平均分子量=13000)、低分子量肝素(LMWH, 平均分子量=5000)及超低分子量肝素(ULMWH, 平均分子量=2000). 目前HP主要经过酸水解、碱水解、乙醇沉淀等方式从猪的肠黏膜中提取^[11]. 但是由于动物组织中混杂有CS, DS, KS等其他GAGs, 使得产品均一性较差^[57], 急需新的方法取代动物组织提取法. 目前化学合成法成功合成有抗凝血功能的低分子量肝素(磺达肝素)并用于临床治疗^[58]. 但化学合成步骤繁琐且得率低, 特别是对超过十糖的寡糖及后续的硫酸化修饰步骤更困难, 难以大量生产^[59]. 故近年来, 许多研究围绕在如何利用微生物进行HP的生产.

HP合成过程涉及N-脱乙酰/硫酸化、异构化、N-硫酸化及O-硫酸化一系列步骤. 合成途径中所涉及的

图4 硫酸化系统及其在GAGs的硫酸化中的应用。A: 硫酸软骨素的酶法合成; B: 硫酸皮肤素的酶法合成; C: 肝素的酶法合成; D: PAPS再生系统

Figure 4 Sulfation system and its application in the sulfation of GAGs. A: Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate. B: Enzymatic synthesis of dermatan sulfate. C: Enzymatic synthesis of heparin. D: PAPS regeneration system

酶除了N-脱乙酰/N-硫酸化酶(NDST)未能实现双功能活性, 其他酶均在*E. coli*和*K. pastoris*中实现了活性表达^[60-62]。在生物体肝素合成中, N-脱乙酰/N-硫酸化步骤是由NDST来催化的。NDST为双功能酶, 同时具有脱乙酰和硫酸化两种功能。但是在多数微生物中NDST的表达无法同时实现两种活性(存在单一活性), 故提出更易于实现的化学-酶法合成肝素。所谓的化学酶法就是不依赖于微生物难以表达的NDST, 利用常规的化学试剂对肝素前体进行脱乙酰修饰, 再利用微生物表达的酶催化后续一系列的步骤得到有抗凝血活性的肝素。近年来化学酶法合成肝素及其寡糖的发展已经得到了很好的综述^[57,59,63]。

化学酶法其缺点为在脱乙酰过程使用大量有机试剂造成一定的污染及给生产安全带来隐患。从21世纪起, 研究者开始尝试利用酶法合成特定成分的肝素(图4C)。催化肝素前体合成肝素过程所涉及的酶大多数存在多种同工酶, 每种同工酶的酶学性质和底物特异性均有所区别。故挑选表达活性较高的同工酶与协调表达组装HP合成过程相关的途径酶显得至关重要^[64]。

本课题组将HP合成过程中后修饰相关的酶均在微生物体内实现了活性表达。由于HP合成酶均来源于哺乳动物, 在微生物体内表达酶活性较低且酶的稳定性不高, 故对于HP合成相关酶的相关性质需要得到进

一步的研究。

5 硫酸角质素的微生物合成

硫酸角质素(keratan sulfate, KS)是由半乳糖和6位O-硫酸化的N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,3及 β -1,4糖苷键组成的直链多糖。N-乙酰氨基葡萄糖硫酸化程度接近100%, 半乳糖6位也可以发生O-硫酸化, 但是硫酸化程度相对较低。KS结构复杂, 具有多种生物学功能, 可分为KS I, KS II, KSIII三种类型。临床上主要用于治疗偏头痛、腹腔术后疼痛等^[65,66]。

KS-I和II与其他GAGs的不同之处在于, 它们的生物合成是通过GlcNAc与天冬酰胺之间的N-键或GalNAc与丝氨酸/苏氨酸之间的O-键开始的。KS糖链通过糖苷转移酶作用将Gal和GlcNAc交替连接到聚合物上进行糖链的延伸。近年来, 几个家族的半乳糖基转移酶(Gal-T)已经被确定。KS生物合成过程涉及 β -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(β 3GnT)、N-乙酰葡萄糖胺基-6-磺基转移酶(GlcNAc6ST)、 β 1,4-半乳糖基转移酶(β 4GalT-1)和KS半乳糖基硫酸转移酶(KSGalST)的连续作用^[67]。 β 4GalT-1酶通过 β 1-4糖苷键催化UDP-Gal加入非还原末端GlcNAc受体上, 产生非硫酸化聚-N-乙酰乳糖胺结构域, 从而组成KS分子的基本单元。另一

种半乳糖基转移酶, β 4GalT-4, 是唯一催化Gal转移到非还原性末端GlcNAc-6-硫酸盐受体残基的半乳糖基转移酶, 对KS糖链进行单硫酸化和二硫酸化是必需的. 另外目前报道了7种N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(β 3GnT-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)可以通过 β 1-3键催化GlcNAc加到Gal或者GalNAc非还原末端. 对KS进行硫酸化修饰的硫酸转移酶可以将PAPS供体上的硫酸基团转移到Gal或者GlcNAc的C6上. KSGal6ST可以将硫酸基团转移到Gal的C6位上, N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸转移酶(GlcNAc6ST)将硫酸基团转移到GlcNAc的C6位上^[66,67].

由于KS主要应用于临床医学上的特点, 其合成研究目前主要集中在哺乳动物组织中, 暂时没有在微生物中进行KS的合成报道. 目前硫酸角质素合成相关的基因已经得到了阐述, 这也为后面研究者在微生物中实现KS的合成提供良好的契机.

6 总结与展望

相较于传统的动物组织提取法, 通过微生物及酶法合成GAGs得到的产物均一性好、无潜在致病原、无大量酸碱废液的产生等, 该方法有着很大的发展与应用前景. 目前, 利用微生物及酶法生产GAGs的主要合成途径基本打通, 所涉及的相关酶均已经得到了活性表达, 但是依赖于微生物进行GAGs的生产依然存在许多瓶颈, 例如前体供应不足、相关酶活性不高、酶稳定性不强、酶的纯化较难等. 为了克服上述问题, 在后续的研究中, 我们需要集中在以下四个方面进行研究. (i) 通过代谢改造提高前体的供应. 目前软骨素及肝素前体合成的产量不高, 无法达到工业

化的标准. 通过代谢工程改造生产菌株, 控制代谢流, 加强细胞转运, 实现产物的积累. (ii) GAGs合成相关酶的改造. GAGs合成过程中涉及多个酶反应, 且大部分基因来源于哺乳动物, 在微生物中异源表达可能造成酶活性较低、产量不高、稳定性不强等问题. 通过酶工程与定向进化等手段进行酶改造, 提高酶的稳定性及表达量等. (iii) GAGs的体外酶法合成. 目前软骨素和肝素前体都已经实现了微生物合成, 在后期研究中可以通过优化硫酸化修饰系统, 将软骨素和肝素前体在体外通过加入相应的硫酸转移酶实现高效的硫酸化修饰, 生成结构均一的硫酸软骨素和肝素. (iv) GAGs一步合成法. 目前除了HA可以直接在微生物中实现一步合成, CS和HP的合成依赖于体外酶法催化. 由于酶的纯化较困难且成本较高, 在将来的研究中希望将CS和HP后修饰相关酶全部整合到微生物菌株中, 通过调控组装酶之间的协调作用, 实现一步法合成所需要的产物. 除此之外, 由于GAGs特有的结构和性质, 近年来其应用范围在不断扩大. 以往的研究往往集中于常规分子量的GAGs. 目前发现高分子量GAGs或低分子量寡糖有着独特的性质, 可以对其开发寻找新的应用领域. HA寡糖的制备现可以通过酶法实现, 为了简化工艺和降低酶的纯化成本, 在后续的研究中, 可以将HAase基因与HA合成途径整合, 实现HA寡糖的一步发酵生产. CS和HP其相应的裂解酶都在微生物中得到了活性表达, 也可以采用类似HA寡糖获取的手段制备CS寡糖和HP寡糖. 与制备寡糖相反, GAGs分子间由于存在大量的羧基和羟基, 可以利用它们之间的相互作用使其交联形成水凝胶. GAGs具有良好的生物相容性, 交联形成的大分子被用于体内药物靶向输送及组织工程等领域.

参考文献

- da Costa D S, Reis R L, Pashkuleva I. Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 1–26
- Vaidyanathan D, Williams A, Dordick J S, et al. Engineered heparins as new anticoagulant drugs. *Bioeng Transl Med*, 2017, 2: 17–30
- Chen Q, Shao X, Ling P, et al. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy. *Eur J Med Chem*, 2017, 139: 926–935
- Ruffell B, Poon G F T, Lee S S M, et al. Differential use of chondroitin sulfate to regulate hyaluronan binding by receptor CD44 in inflammatory and interleukin 4-activated macrophages. *J Biol Chem*, 2011, 286: 19179–19190
- Salwowska N M, Bebenek K A, Źądło D A, et al. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: A systematic review. *J Cosmet Dermatol*, 2016, 15: 520–526
- Yan Y, Ji Y, Su N, et al. Non-anticoagulant effects of low molecular weight heparins in inflammatory disorders: A review. *Carbohydr Polym*,

- 2017, 160: 71–81
- 7 Stern R, Asari A A, Sugahara K N. Hyaluronan fragments: An information-rich system. [Eur J Cell Biol](#), 2006, 85: 699–715
- 8 Soltés L, Kogan G, Stankovska M, et al. Degradation of high-molar-mass hyaluronan and characterization of fragments. [Biomacromolecules](#), 2007, 8: 2697–2705
- 9 Collins M N, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. [Carbohydr Polym](#), 2013, 92: 1262–1279
- 10 Bârză T, Lormeau J C, Petitou M, et al. Heparin-derived oligosaccharides: Affinity for acidic fibroblast growth factor and effect on its growth-promoting activity for human endothelial cells. [J Cell Physiol](#), 1989, 140: 538–548
- 11 Pan J, Qian Y, Zhou X, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is not the sole contaminant in heparin. [Nat Biotechnol](#), 2010, 28: 203–207
- 12 Shi Y, Meng Y, Li J, et al. Chondroitin sulfate: Extraction, purification, microbial and chemical synthesis. [J Chem Technol Biotechnol](#), 2014, 89: 1445–1465
- 13 Bedini E, Parrilli M. Synthetic and semi-synthetic chondroitin sulfate oligosaccharides, polysaccharides, and glycomimetics. [Carbohydr Res](#), 2012, 356: 75–85
- 14 Mende M, Bednarek C, Wawryszyn M, et al. Chemical synthesis of glycosaminoglycans. [Chem Rev](#), 2016, 116: 8193–8255
- 15 Boltje T J, Buskas T, Boons G J. Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research. [Nat Chem](#), 2009, 1: 611–622
- 16 Chavarroche A A E, van den Broek L A M, Eggink G. Production methods for heparosan, a precursor of heparin and heparan sulfate. [Carbohydr Polym](#), 2013, 93: 38–47
- 17 Cimini D, De Rosa M, Carlino E, et al. Homologous overexpression of rfaH in *E. coli* K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide. [Microb Cell Fact](#), 2013, 12: 46
- 18 Jin P, Zhang L, Yuan P, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. [Carbohydr Polym](#), 2016, 140: 424–432
- 19 He W, Fu L, Li G, et al. Production of chondroitin in metabolically engineered *E. coli*. [Metabo Eng](#), 2015, 27: 92–100
- 20 Jeong E, Shim W Y, Kim J H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. [J Biotech](#), 2014, 185: 28–36
- 21 Chen X, Chen R, Yu X, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for biosynthesis of heparosan using heparosan synthase from *Pasteurella multocida*, PmHS1. [Bioproc Biosyst Eng](#), 2017, 40: 675–681
- 22 Zhang Q, Yao R, Chen X, et al. Enhancing fructosylated chondroitin production in *Escherichia coli* K4 by balancing the UDP-precursors. [Metabol Eng](#), 2018, 47: 314–322
- 23 Zhou Z, Li Q, Huang H, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. [Biotechnol Bioeng](#), 2018, 115: 1561–1570
- 24 Li Y J, Yin F X, Zhang X K, et al. Characterization of heparan sulfate *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase isoform 4 using synthetic oligosaccharide substrates. [Biochim Biophys Acta](#), 2018, 1862: 547–556
- 25 He W, Zhu Y, Shirke A, et al. Expression of chondroitin-4-*O*-sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. [Appl Microbiol Biotech](#), 2017, 101: 6919–6928
- 26 Yuan P, Lv M, Jin P, et al. Enzymatic production of specifically distributed hyaluronan oligosaccharides. [Carbohydr Polym](#), 2015, 129: 194–200
- 27 Su G, Li L, Huang H, et al. Production of a low molecular weight heparin production using recombinant glycuronidase. [Carbohydr Polym](#), 2015, 134: 151–157
- 28 Gibson D G, Young L, Chuang R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. [Nat Methods](#), 2009, 6: 343–345
- 29 Mercy G, Mozziconacci J, Scolari V F, et al. 3D organization of synthetic and scrambled chromosomes. [Science](#), 2017, 355: eaaf4597
- 30 Jin P, Ding W, Du G, et al. DATEL: A scarless and sequence-independent DNA assembly method using thermostable exonucleases and ligase. [ACS Synth Biol](#), 2016, 5: 1028–1032
- 31 Cameron D E, Bashor C J, Collins J J. A brief history of synthetic biology. [Nat Rev Micro](#), 2014, 12: 381–390
- 32 Liu L, Liu Y, Li J, et al. Microbial production of hyaluronic acid: Current state, challenges, and perspectives. [Microb Cell Fact](#), 2011, 10: 99
- 33 de Oliveira J D, Carvalho L S, Gomes A M V, et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. [Microb Cell Fact](#), 2016, 15: 119

- 34 Chong B F, Blank L M, McLaughlin R, et al. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotech*, 2005, 66: 341–351
- 35 Weigel P H, DeAngelis P L. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 2007, 282: 36777–36781
- 36 Hubbard C, McNamara J T, Azumaya C, et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol*, 2012, 418: 21–31
- 37 Jin P, Kang Z, Zhang J, et al. Combinatorial evolution of enzymes and synthetic pathways using one-step PCR. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 259–268
- 38 Zhang L, Huang H, Wang H, et al. Rapid evolution of hyaluronan synthase to improve hyaluronan production and molecular mass in *Bacillus subtilis*. *Biotech Lett*, 2016, 38: 2103–2108
- 39 Badle S S, Jayaraman G, Ramachandran K B. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. *Bioresour Tech*, 2014, 163: 222–227
- 40 Sheng J, Ling P, Wang F. Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in *Lactococcus lactis*. *J Ind Microbiol Biotech*, 2015, 42: 197–206
- 41 Cheng F, Luozhong S, Guo Z, et al. Enhanced biosynthesis of hyaluronic acid using engineered *Corynebacterium glutamicum* via metabolic pathway regulation. *Biotech J*, 2017, 12: 1700191
- 42 Jin P, Kang Z, Yuan P, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metabol Eng*, 2016, 35: 21–30
- 43 Smirnou D, Krčmář M, Kulháněk J, et al. Characterization of hyaluronan-degrading enzymes from yeasts. *Appl Biochem Biotech*, 2015, 177: 700–712
- 44 Bakke M, Kamei J, Obata A. Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from *Penicillium* spp. *FEBS Lett*, 2011, 585: 115–120
- 45 Guo X, Shi Y, Sheng J, et al. A novel hyaluronidase produced by *Bacillus* sp. A50. *PLoS ONE*, 2014, 9: e94156
- 46 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
- 47 Kang Z, Zhang N, Zhang Y. Enhanced production of leech hyaluronidase by optimizing secretion and cultivation in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotech*, 2016, 100: 707–717
- 48 Cimini D, Carlino E, Giovane A, et al. Engineering a branch of the UDP-precursor biosynthesis pathway enhances the production of capsular polysaccharide in *Escherichia coli* O5:K4:H4. *Biotech J*, 2015, 10: 1307–1315
- 49 Huang H, Liu X, Lv S, et al. Recombinant *Escherichia coli* K5 strain with the deletion of *waaR* gene decreases the molecular weight of the heparosan capsular polysaccharide. *Appl Microbiol Biotech*, 2016, 100: 7877–7885
- 50 Hickey A M, Bhaskar U, Linhardt R J, et al. Effect of eliminase gene (*elmA*) deletion on heparosan production and shedding in *Escherichia coli* K5. *J Biotech*, 2013, 165: 175–177
- 51 Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabol Eng*, 2008, 10: 24–32
- 52 Widner B, Behr R, Von Dollen S, et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 3747–3752
- 53 Douglas T, Heinemann S, Mietrach C, et al. Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates A–C and their effect on osteoblast adhesion. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1085–1092
- 54 McAlindon T E, LaValley M P, Gulin J P, et al. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis. *JAMA*, 2000, 283: 1469–1475
- 55 Bedini E, De Castro C, De Rosa M, et al. A microbiological-chemical strategy to produce chondroitin sulfate A, C. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6160–6163
- 56 Hemker H C. A century of heparin: Past, present and future. *J Thromb Haemost*, 2016, 14: 2329–2338
- 57 Oduah E I, Linhardt R J, Sharfstein S T. Heparin: Past, present, and future. *Pharmaceuticals*, 2016, 9: 38
- 58 Suflita M, Fu L, He W, et al. Heparin and related polysaccharides: Synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotech*, 2015, 99: 7465–7479
- 59 Fu L, Suflita M, Linhardt R J. Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 237–249
- 60 Saribaş A S, Mobasser A, Pristatsky P, et al. Production of *N*-sulfated polysaccharides using yeast-expressed *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1 (NDST-1). *Glycobiology*, 2004, 14: 1217–1228
- 61 Englaender J A, Zhu Y, Shirke A N, et al. Expression and secretion of glycosylated heparin biosynthetic enzymes using *Komagataella pastoris*.

- [Appl Microbiol Biotech](#), 2017, 101: 2843–2851
- 62 Zhang J, Suflita M, Li G, et al. High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* strains expressing 2-*O*-sulfotransferase and C5-epimerase for the production of bioengineered heparin. [Appl Biochem Biotech](#), 2015, 175: 2986–2995
- 63 Zhou X, O’Leary T R, Xu Y, et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. [Biocatal Biotransform](#), 2012, 30: 296–308
- 64 Kang Z, Zhou Z, Wang Y, et al. Bio-based strategies for producing glycosaminoglycans and their oligosaccharides. [Trends Biotech](#), 2018, 36: 806–818
- 65 Funderburgh J L. MINI REVIEW Keratan sulfate: Structure, biosynthesis, and function. [Glycobiology](#), 2000, 10: 951–958
- 66 Caterson B, Melrose J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. [Glycobiology](#), 2018, 28: 182–206
- 67 Pomin V H. Keratan sulfate: An up-to-date review. [Int J Biol Macromolecules](#), 2015, 72: 282–289

Microbial synthesis of glycosaminoglycans with synthetic biology strategies

JIN XueRong, ZHOU ZhengXiong, WANG Yang, LI JiangHua & KANG Zhen

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

Glycosaminoglycans (GAGs) are widely used in cosmetics, health care and clinical treatments of thrombosis, osteoarthritis and cancer. Commercial GAGs largely depend on extraction from animal tissues. However, the products have poor homogeneity and carry potential pathogenic factors. Synthetic biology strategies for production GAGs and its oligosaccharides can avoid the above problems, and achieve precise control of the sulfation degree and molecular weights of GAG. With the development of genomics and synthetic biology, the biosynthesis pathways of hyaluronan, chondroitin, heparin, chondroitin sulfate and heparin have been elucidated, and many genetic operation systems for platform strains have also been continuously improved. Construction of microbial cell factories for producing GAGs has been considered as main development trends. This review summarized and discussed the recent biological strategies for the production of GAGs and their oligosaccharides, and provided new ideas for near future studies.

synthetic biology, GAGs, microbial synthesis, hyaluronan, chondroitin sulfate, heparin

doi: [10.1360/N052018-00249](https://doi.org/10.1360/N052018-00249)