

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2016.02.008

文章编号:2095-6002(2016)02-0051-05

引用格式:原攀红,康振,金鹏,等.体外酶法水解制备小分子透明质酸[J].食品科学技术学报,2016,34(2):51-55.

YUAN Panhong, KANG Zhen, JIN Peng, et al. Preparation of small molecular hyaluronan by enzymatic hydrolysis *in vitro*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016,34(2):51-55.

体外酶法水解制备小分子透明质酸

原攀红¹, 康振¹, 金鹏¹, 刘龙^{1,*}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122;

2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:为了制备分子量分布集中的小分子透明质酸,在6 g/L的高分子量透明质酸水溶液中加入一定梯度重组水蛭透明质酸酶,并控制水解时间。结果表明,通过控制加入重组水蛭 HAase 的量和水解时间,根据水解分子量下降规律,可以制备出分子量分布集中的小分子 HA,包括水解终产物透明质酸四糖和六糖。同时,通过高效体积排阻色谱和琼脂糖凝胶电泳,可以证明水解产物的分子量分布集中。

关键词:透明质酸;重组水蛭透明质酸酶;小分子透明质酸;高效体积排阻色谱;琼脂糖凝胶电泳
中图分类号: TS202.1 **文献标志码:** A

透明质酸(hyaluronan 或 hyaluronic acid, HA),俗称玻璃尿酸,是一种由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖为重复双糖单位,通过 $\beta(1-3)$ 和 $\beta(1-4)$ 糖苷键交替连接而成的大分子酸性黏多糖^[1-3],1934年由 Meyer 等人首次从牛玻璃球眼中提取获得,广泛应用于医药、化妆品、食品等领域。

HA 以其独特的分子结构和理化性质在机体内显示出多种重要的生理功能。由于 HA 具有良好的保湿性、黏弹性、渗透性和延展性,同时无任何免疫原性和毒性,被广泛地应用于化妆品、食品和医药等领域^[4]。分子量大小对 HA 的生物活性影响较大,不同分子量范围的 HA 表现出截然不同的生理学功能^[5-7]。高分子量的 HA(相对分子质量 $> 2 \times 10^6$ u)由于具有较好的润滑、抑制炎症反应、保湿等功能,可应用在眼科手术黏弹剂、关节腔内注射治疗药物和高端化妆品之中。中等分子量的 HA(介于 $1 \times 10^5 \sim 10^6$)具有良好的保湿性、润滑和药物缓释作用,可广泛用于滴眼液、皮肤烧伤愈合及术后防粘连等药物中。低分子量的 HA 和寡聚透明质酸,表现出非常强的生物活性,具有抑制肿瘤扩散、促进创伤

愈合、促进骨和血管生成、免疫调节等作用^[8-10],且易于渗透到真皮中,是免疫细胞、细胞因子的激活剂。因此,水解制备小分子 HA 在食品保健、化妆品以及临床医疗领域具有广阔的应用前景。

制备小分子 HA 的方法有物理降解法、化学降解法、酶解法^[11]。物理法主要为加热、机械剪切、紫外辐射、超声波破碎、⁶⁰Co 照射、 γ -射线辐射,可促使 HA 发生降解。物理降解法处理过程简单,产品易于回收。但是,这些方法都存在一定的缺陷,例如加热法易使 HA 变色,紫外和超声效率较低,且产生的小分子 HA 分子量范围较大,产品稳定性差。HA 的化学降解方法有水解法和氧化降解法,水解法包括酸水解(HCl)和碱水解(NaOH),氧化降解常用的氧化剂为次氯酸钠(NaClO)和过氧化氢(H₂O₂)。但是,化学降解法引入了化学试剂,反应条件复杂,易给 HA 性质带来影响和给产品的纯化带来困难,且产生大量的工业废水。酶解法是 HA 在酶的作用下,HA 链上的糖苷键发生断裂,产生小分子透明质酸。但是,多数酶解效率不高,在缓冲液中进行,水解产物含有较多杂质,且产生的小分子透明质酸分

收稿日期:2015-04-03

作者简介:原攀红,女,硕士研究生,研究方向为体外酶法水解制备小分子透明质酸;

*刘龙,男,教授,博士,主要从事发酵过程优化方面的研究。通信作者。

子量分布不集中^[12]。本研究中,重组水蛭透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)水解HA,反应条件温和、专一性强,不在缓冲溶液中溶解透明质酸,水解产生的小分子透明质酸不含无机盐等杂质。通过控制重组水蛭HAase的量和水解时间,可以成功获得分子量分布集中且纯度较高小分子HA。

1 材料与方法

1.1 实验材料

葡聚糖标准样品(180, 2 700, 9 750, 13 050, 36 800, 135 350, 2 000 000 u)购于中国食品药品检定研究院,用于制作标准曲线。

透明质酸酶 *P. pastoris* GS115-HAase 由本实验室构建,其特性以 *P. pastoris* GS115 为宿主,整合来自水蛭的透明质酸酶基因(GenBank 登录号 KJ026763),同时具有 His⁺ 和 Mut⁺ 表型,发酵产生重组水蛭透明质酸酶。取所需量的发酵液在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 30 min,上清液即为实验水解反应所需的重组水蛭 HAase,以 HA 为底物测定重组水蛭 HAase 活力,重组水蛭 HAase 活力测定方法采取 DNS 法^[13-16],最高酶活 8.42×10^5 U/mL^[17],根据所测酶活,计算出加入反应体系的重组水蛭 HAase 体积。

1.2 仪器和设备

DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;DKB-600A 型电热恒温水槽,上海森信实验仪器有限公司;台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司;GelDoc 凝胶成像系统,美国 BIO-RAD 公司;1260 型液相色谱,安捷伦科技有限公司;Ultrafle Xtreme 型基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪,美国布鲁克公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分析透明质酸水解过程

将 60 mg 大分子 HA 加入 10 mL 纯水中,配制成为反应底物溶液,加入重组水蛭 HAase (1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 U/mL),在 45 ℃ 最适条件下水解,每隔 1 h 取一次样,样品取出后立即水煮灭活,12 000 r/min 离心 5 min,上清液通过 0.22 μm 的滤膜除去杂质。

1.3.2 高效体积排阻色谱测分子量大小及分布

用高效体积排阻色谱系统(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)分析分子量分布^[18]。HPSEC 体系是一套安捷伦 1260 系统,由 G1310A 泵和 G1329B 针头和 G1362A 示差检测器

组成。分析条件为色谱柱 Ultrahydrogel™ Linear column 7.8 mm × 300 mm;流动相 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液;流速 0.9 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 40 μL。根据葡聚糖标准样品的洗脱体积,使用凝胶渗透色谱分析法(gel permeation chromatography, GPC)制作出分子量和洗脱体积之间的标准曲线。在相同的条件下,测出每个样品的洗脱体积,GPC 可计算出每个样品的重均分子量、数均分子量及分子量分布。

1.3.3 一定分子量透明质酸的制备

根据透明质酸水解规律曲线,在特定时间点高温将酶失活,终止反应,即可制备一定分子量的透明质酸,将样品在 -80 ℃ 冷冻,之后放入冷冻干燥机中冻干至粉末状。

1.3.4 MALDI-TOF MS 检测终产物

基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)用来检测水解产物^[19]。将样品和 2,5-二羟基苯甲酸各 1 μL 混匀点靶,吹干后,在氮气激光波长 337 nm 加速电压 20 kV 和负离子模式下进行质谱分析。使用 Flex Control 控制软件和 Flex Analysis version 3.3 分析软件。

1.3.5 琼脂糖电泳检测产物的分子量分布

称取 2 nmol 样品,加入 5 μL ANTS 溶液在室温下放置 15 min,再加入 5 μL 氰基硼氢化钠,在 37 ℃ 条件下放置 16 h^[20]。反应后,将样品在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min。取 5 μL 上清液点入 3% 的琼脂糖凝胶孔中,在 TBE 缓冲液中,80 V 电压下电泳 40 min。电泳后,琼脂糖胶在 365 nm 的紫外灯下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 HA 的水解过程分析

2.1.1 水解过程中 pH 值的变化

为检测 pH 值的变化规律,每隔 1 h 使用 pH 计测量反应溶液中的 pH 值,如图 1。

由图 1,3 种酶活条件下 pH 值都没有发生太大变化,保持在 6.0 左右,且接近重组水蛭 HAase 的最适 pH 值 6.5。因此,重组水蛭 HAase 作用于 HA 无需在醋酸盐缓冲液、磷酸二氢钠缓冲液、柠檬酸缓冲液中进行。从而实现了反应操作简便化,达到产物纯净不含盐杂质的目的。

2.1.2 水解过程中酶活的变化

为了检测反应过程中酶在水中活性的变化,前

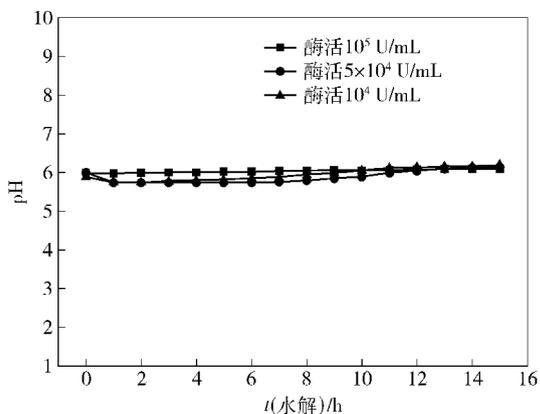


图1 不同酶活条件下 pH 值变化趋势

Fig. 1 pH changing trend under conditions of different HAase activity

2 个小时,每个半小时取一次样,之后每 2 个小时取一次样。使用 DNS 法测定酶活,绘制酶活变化曲线图 2。

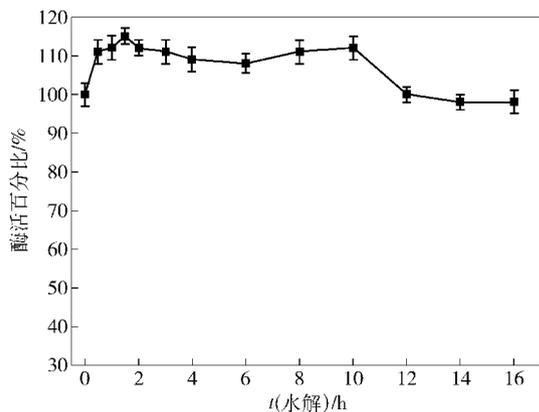


图2 水中酶活的变化趋势

Fig. 2 HAase activity changing trend in water

由图 2 发现酶活在一定范围内波动,直到 16 h,酶活仍然很高,为反应持续进行提供保障。

2.1.3 水解过程中分子量变化规律

使用 HPLC-SEC-RI 方法测定不同酶量 (1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 U/mL) 不同时间点水解产物的分子量,如图 3。

由图 3 可知,水解 15 h 的分子量变化曲线图。可以发现,初始反应速率极大,分子量迅速降低,且酶活越高,分子量降低速率越快,随后反应速率逐渐降低,直至分子量几乎不发生变化,且酶量越高,分子量越早不发生变化,分子量最终停滞在较低水平。可见,单位体积的酶量越高,链断裂的越快,且断裂的越彻底。因此,制备聚合度不同透明质酸,需要控制 HAase 的量和水解时间。

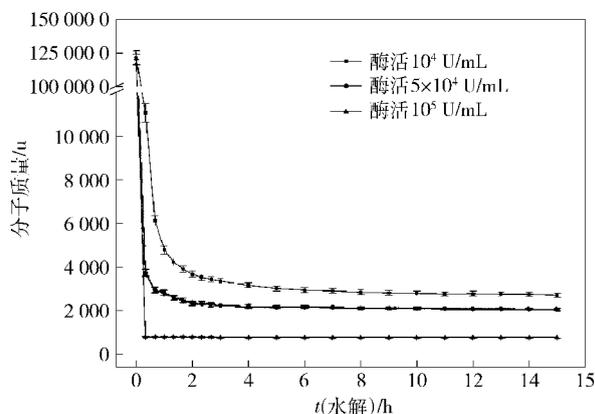


图3 不同酶活条件下分子量变化趋势

Fig. 3 Molecular weight changing trend under the conditions of different HAase activity

2.2 特定分子量透明质酸的质量分布

根据水解过程中分子量变化曲线图,通过控制加入的酶量和水解时间,可以制备出一定分子量的透明质酸。加入酶量 10^4 U/mL 的条件下,水解 40 min 后高温煮沸将酶灭活,终止整个反应,样品冻干后使用 HPLC-SEC-RI 方法测得透明质酸分子量,见图 4,由图 4 可知,透明质酸分子质量大小为 6000 u,分子量分布系数为 1.45。

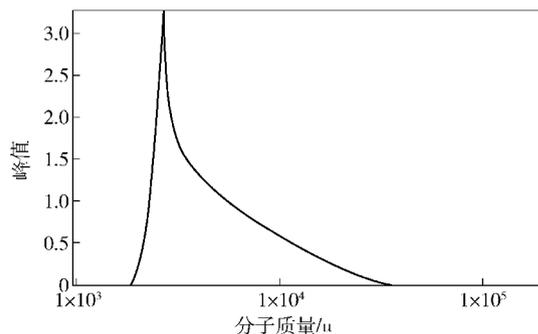


图4 分子质量为 6000 u 的质量分布图

Fig. 4 Mass distribution of molecular mass 6000 u

酶量 5×10^4 U/mL 的条件下,在 40 min 终止反应,使用 HPLC-SEC-RI 方法测得分子量,见图 5。

由图 5 可知,分子质量大小为 3000 u 的小分子透明质酸,分子量分布系数 1.09。根据水解产物的分布系数可以看出,通过这种方法可以制备出分子量分布集中的小分子透明质酸。

2.3 水解终产物的鉴定

MALDI-TOF MS 可以准确灵敏的检测出糖类样品的分子量信息。反应体系中加入酶量 1×10^5 U/mL,水解 10 min 终止反应,样品冻干后使用 MALDI-TOF MS 检测,发现水解产物分子质量有 797.192 0,

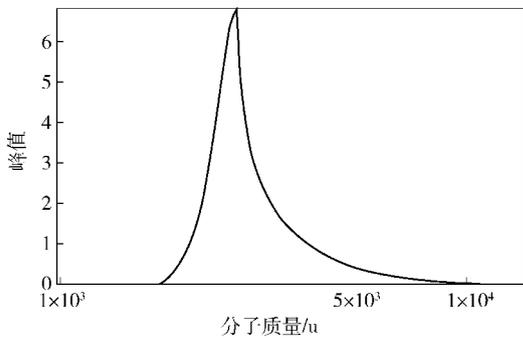


图5 分子质量为3000 u的质量分布图

Fig. 5 Mass distribution of molecular mass 3000 u

1 176.282 0, 1 555.389 0, 1 934.515 2 u, 分别是 HA4, HA6, HA8, HA10 的带电粒子, 如图6; 水解1 h 终止反应, 检测发现水解产物分子质量有 797.192 0 u 和 1 176.282 0 u, 是 HA4, HA6 带电粒子。除基质(基质 DHB 中含 NaCl)产生的峰外, 不含其他大分子透明质酸, 如图7。随着水解时间延长, 分子质量不再发生变化(如图3), 经检测, 15 h 产物仍由透明质酸四糖 HA4 和透明质酸六糖 HA6 组成(如图8), 说明透明质酸四糖 HA4 和透明质酸六糖 HA6 是水解终产物。相比于其他水解酶, 终产物仅有两种, 有利于实现 HA4 和 HA6 的大量生产和制备。

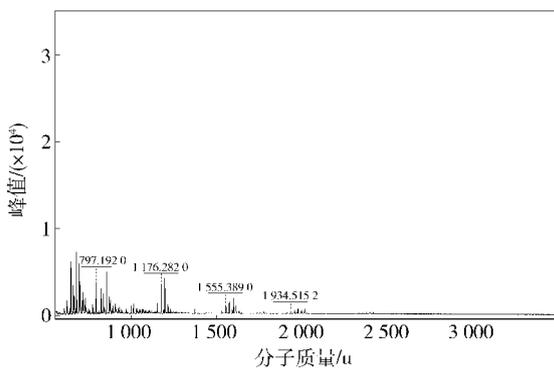


图6 水解中间产物的 MALDI-TOF MS 分析

Fig. 6 MALDI-TOF MS analysis of hydrolysis of intermediate product

2.4 琼脂糖凝胶电泳检测产物

为了直观显示水解产物分子量分布情况, 使用琼脂糖凝胶电泳的方法对水解产物进行分析, 将制备出的分子质量大小为 6 000, 4 000, 3 000 u HA 片段及终产物染色后, 在 3% 的琼脂糖凝胶中电泳, 结果如图9。1 代表分子质量大小 6 000 u, 2 代表分子质量大小 4 000 u, 3 代表分子质量大小 3 000 u, 4 代表终产物。可见, 每种样品的电泳结果仅有一个条带, 说明水解产物分子量分布相对集中。与其他透明质

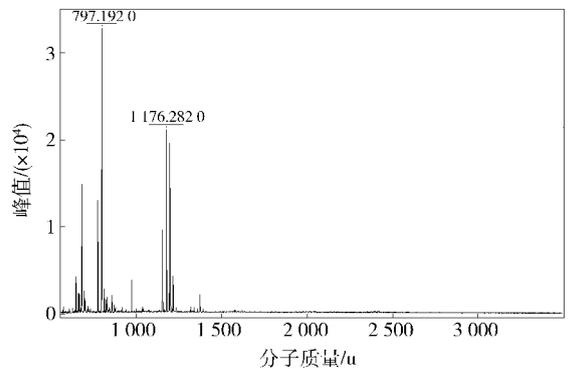


图7 水解终产物的 MALDI-TOF MS 分析

Fig. 7 MALDI-TOF MS analysis of hydrolysis of end product

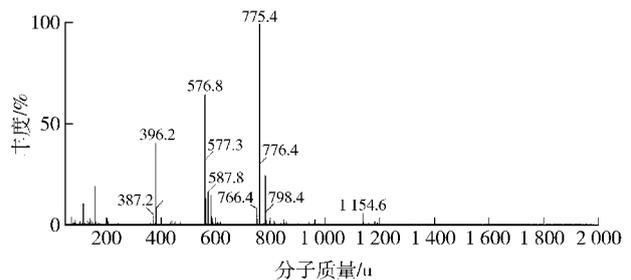


图8 水解终产物的 ESI-MS 分析

Fig. 8 ESI-MS analysis of hydrolysis of end product

酸酶的水解产物相比, 具有一定的优势, 且带不宽。说明重组水蛭 HAase 专一性强, 可使用重组水蛭 HAase 水解 HA 制备分子量分布集中的 HA 片段。



图9 不同分子质量 HA 片段的琼脂糖电泳分析

Fig. 9 Agarose electrophoresis analysis of different molecular weight hyaluronan

3 结论

本研究发现重组水蛭 HAase 降解高分子 HA 可以在水溶液中进行。水解结果显示单位质量的 HA

对应的 HAase 的量、水解时间对水解产物具有重要的影响。通过控制 HAase 的量、水解时间来获得分子量分布集中的小分子 HA。与动物体内提取的透明质酸酶降解产物相比,本研究结果水解产物种类少,分子量分布集中,且不含无机盐等杂质。因此,对于制备分子量分布集中的小分子 HA 和终产物 HA4 和 HA6 具有重要的意义,将会促进相关领域的研究。对于潜在应用领域,包括化学合成、药物治疗、化妆品和保健食品领域等,将会产生重大的影响。为了实现研究的价值,实现工业化生产和得到更广泛的应用,将进一步扩大反应体系和优化水解过程,制备出高纯度的小分子透明质酸。

参考文献:

- [1] LIU L, LIU Y F, LI J H, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 1-9.
- [2] LIU X H, SUN J Q, HEGGENESS M H, et al. Direct quantification of the rupture force of single hyaluronan/hyaluronan binding protein bonds [J]. *Febs Letters*, 2004, 563(1): 23-27.
- [3] VIGETTI D, KAROUSOU E, VIOLA M, et al. Hyaluronan: biosynthesis and signaling[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(8): 2452-2459.
- [4] STERN R, ASARI A A, SUGAHARA K N. Hyaluronan fragments: an information-rich system [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2006, 85(8): 699-715.
- [5] CHANG C C, HSIEH M S, LIAO S T, et al. Hyaluronan regulates PPAR α and inflammatory responses in IL-1 β -stimulated human chondrosarcoma cells, a model for osteoarthritis[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(2): 1168-1175.
- [6] HOLUBOVA L, KORECKA L, PODZIMEK S, et al. Enhanced multiparametric hyaluronan degradation for production of molar-mass-defined fragments [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 112: 271-276.
- [7] KOGAN G, SOLTES L, STERN R, et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(1): 17-25.
- [8] FERGUSON E L, ROBERTS J L, MOSELEY R, et al. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 420(1): 84-92.
- [9] TOOLE B P, GHATAK S, MISRA S. Hyaluronan oligo-saccharides as a potential anticancer therapeutic [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 9(4): 249-252.
- [10] ZENG C X, TOOLE B P, KINNEY S D, et al. Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers [J]. *International Journal of Cancer*, 1998, 77(3): 396-401.
- [11] STERN R, KOGAN G, JEDRZEJAS M J, et al. The many ways to cleave hyaluronan[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(6): 537-557.
- [12] KAKIZAKI I, IBORI N, KOJIMA K, et al. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase [J]. *Febs Journal*, 2010, 277(7): 1776-1786.
- [13] GHOSE T. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.
- [14] LINKER A, HOFFMAN P, MEYER K. The hyaluronidase of the leech; an endoglucuronidase [J]. *Nature*, 1957, 180: 810-811.
- [15] SILVEIRA M H, AGUIAR R S, SIIKA-AHO M, et al. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 151: 392-396.
- [16] YUKI H, FISHMAN, W H. Purification and characterization of leech hyaluronic acid-endo- β -glucuronidase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238(5): 1877-1879.
- [17] JIN P, KANG Z, ZHANG N, et al. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers [J]. *Scientific Reports*, 2014(4): 1-8.
- [18] TRANCHEPAIN F, DESCHREVEL B, COUREL M N, et al. A complete set of hyaluronan fragments obtained from hydrolysis catalyzed by hyaluronidase; application to studies of hyaluronan mass distribution by simple HPLC devices[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 348(2): 232-242.
- [19] MAHONEY D J, APLIN R T, CALABRO A, et al. Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length [J]. *Glycobiology*, 2001, 11(12): 1025-1033.
- [20] TAWADA A, MASA T, OONUKI Y, et al. Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers [J]. *Glycobiology*, 2002, 12(7): 421-426.

Analysis on Public Opinion Risks of Edible Agro-products Quality and Safety Incidents in China

LI Xiangzhou, DENG Yu, LIAN Yali, QI Yamei, GUO Linyu

(*Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory for Agro-product Quality and Safety, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China*)

Abstract: Based on the analysis of edible agro-products quality and safety incidents exposed by the media between 2012 and 2014, this paper describes the inner trends and regularity from six aspects, such as times, regions, types of edible agro-products, the nature of reason, industry links, and communication channels. At last, the general characteristics of the media exposure of edible agro-products quality and safety incidents in China are put forward.

Key words: edible agro-product; quality and safety; public opinion monitoring; public opinion features

(责任编辑:檀彩莲)

(上接第 55 页)

Preparation of Small Molecular Hyaluronan by Enzymatic Hydrolysis *in Vitro*

YUAN Panhong¹, KANG Zhen¹, JIN Peng¹, LIU Long^{1,*}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. *School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*;
2. *State Key Laboratory of Food Science and Technology of Ministry of Education,
Jiangnan University, Wuxi 214122, China*)

Abstract: In order to get concentrated distribution of small molecular hyaluronan, 6 g/L of high molecular hyaluronic acid aqueous solution was prepared, added with a certain gradient of hyaluronidase, and controlling the hydrolysis time. The results showed that controlling the amount of hyaluronidase and hydrolysis time, particular molecular weight hyaluronic acid could be prepared according to the law of the hyaluronan molecular weight decreased, which included tetrasaccharide and hexasaccharide. Furthermore, through high performance size exclusion chromatography and agarose gel electrophoresis, we could prove that the molecular weight distribution of hydrolysate was concentrated.

Key words: hyaluronan; recombinant leech hyaluronidase; small molecular hyaluronan; high performance size exclusion chromatography; agarose gel electrophoresis

(责任编辑:李 宁)