酶解一膜分离耦合连续制备抗氧化性 小分子透明质酸

Continuous preparation of antioxidant low molecular weight hyaluronic acid by coupling of enzymolysis and membrane separation

滕 薇1 刘俊辉2 吴金鸿1 刘树滔2

TENG Wei¹ LIU Junhui² WU Jinhong¹ LIU Shutao²

(1. 上海交通大学农业与生物学院,上海 200240;2. 福州大学生物工程研究所,福建 福州 350002)

(1. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

摘要:目的:构建一种酶解-膜分离耦合的方法用来提高 小分子透明质酸的生产效率。方法:利用酶生物反应罐 与平板式聚醚砜超滤膜分离组件组成的连续式酶解-膜 分离耦合反应体系。以膜通量、膜污染、透过液透明质酸 质量浓度、产率为评价指标,系统地考察各因素对酶膜耦 合体系内两种不同相对分子质量透明质酸分离效果的影 响,并以产率为指标进一步通过正交试验优化酶膜耦合 反应的工艺参数。结果:酶膜耦合反应体系制备小分子 透明质酸的最优工艺参数为搅拌速度 200 r/min、跨膜压 力 0.15 mPa、酶解时间 4.0 h、加酶量 5 g/100 g。该条件 下可以快速制备并分离出两种不同相对分子质量(M_r)的 小分子透明质酸,实现一步法同时制备 M,在1万~5万 的低相对分子质量透明质酸(LMW-HA)和 $M_r < 3000$ 的透明质酸寡糖(O-HA),且这两种不同相对分子质量透 明质酸均具有清除 DPPH 自由基和羟自由基的能力。结 论:酶解-膜分离耦合法可以连续同步生产具有不同相 对分子质量和一定抗氧化性的 LMW-HA 和 O-HA。

关键词:酶膜耦合反应;透明质酸;工艺优化;抗氧化;连续制备

Abstract: Objective: This study aimed to construct an enzymolysis and membrane separation method to improve the production efficiency of low molecular hyaluronic acid (HA). Methods: A continuous enzymolysis and membrane separation

作者简介:滕薇,女,硕士。

通信作者:吴金鸿(1978—),女,上海交通大学研究员,博士。 E-mail:wujinhong@sjtu.edu.cn

收稿日期:2023-07-23 改回日期:2023-11-15

coupling reaction system was designed, which consisted of an enzyme biological reaction tank and a flat polyethersulfone ultrafiltration membrane separation module. By evaluating membrane flux, membrane contamination, hyaluronic acid concentration, and yield, the effects of various factors on the separation of low molecular HA in the enzyme-membrane coupling system were systematically investigated. The process parameters of the enzyme-membrane coupling reaction were further optimized through orthogonal experiments. Results: The optimal process parameters for the preparation of low molecular hyaluronic acid by enzyme-membrane coupling reaction system were a stirring speed of 200 r/min, transmembrane pressure of 0.15 mPa, enzymolysis time of 4.0 h, and enzyme dosage of 5 g/100 g. In this method, two low molecular hyaluronic acids with different molecular weights (M_r) can be quickly prepared and separated, the low molecular weight hyaluronic acid (LMW-HA) with Mw between 10 000 \sim 50 000 and the HA oligosaccharides (O-HA) with $M_r < 3~000$ can be prepared rapidly by one-step approach. Both of these different molecular weights hyaluronic acid could scavenge DPPH and hydroxyl free radicals. Conclusion: The enzymolysis and membrane separation coupling method provides an efficient method for simultaneous and continuous production of LMW-HA and O-HA with different molecular weights and certain antioxidant properties.

Keywords: enzyme membrane reactors; hyaluronic acid; process optimization; antioxidation; continuous preparation

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是细胞外基质的主要 成分,广泛分布于人体组织和体液,具有免疫调节、抗炎 和抗氧化等多种生物活性^[1-2]。当前,透明质酸钠已被 批准为"新食品原料",可以添加到多种食品中^[3],并且口

基金项目:国家十三五重点研发计划项目(编号: 2019YFD0901902);国家自然科学基金项目(编号: 31972017)

服 HA 具有较高的食用安全性^[4-5]。透明质酸根据相对 分子质量的不同可分为 3 类:高相对分子质量透明质酸 (HMW-HA, $M_r \ge 10$ 万)、低相对分子质量透明质酸 (LMW-HA, $M_r \ge 10$ 万)、低相对分子质量透明质酸 (LMW-HA, $M_r \ge 10$ 万)和透明质酸寡糖(O-HA, $M_r < 1$ 万)^[6]。其中,小分子 HA(LMW-HA 和 O-HA) 具备比大分子 HA(HMW-HA)更高的免疫活性^[7]。酶 解法是制备小分子 HA 片段的高效方法,其反应条件温 和、重复性强和降解可控^[8-9]。然而,酶解过程会伴随不同相对分子质量分布的 HA 片段生成,导致产物的相对 分子质量分布较宽,同时可能包含 LMW-HA 与 O-HA 等不同相对分子质量的 HA 酶解产物,需要经二次分离 纯化,借助凝胶柱层析、离子交换层析、离子交换树脂等 纯化技术^[10-11],提高特定目标相对分子质量的小分子 HA 的生产效率。

目前,在功能性低聚糖的生产中,由酶促反应和膜分 离过程耦合组成的酶膜反应体系应用十分广泛^[12]。 Kuroiwa 等^[12]借助连续搅拌釜反应器与平板式超滤膜组 件的集成设备,实现生物活性壳寡糖的生产,提高目标的 寡糖(dp5~dp6)产量。Das 等^[13]利用酶膜生物反应体系 实现低聚半乳糖的连续化生产,与传统的间歇式水解体 系相比,连续化反应体系降低了副产物葡萄糖的抑制作 用并获得更高纯度和更高产量的低聚半乳糖。膜分离技 术已经运用于 HA 合成发酵,但在 HA 酶解体系仅作为 辅助分离纯化手段,用于浓缩或去除小分子量物质^[14]。 因此,将酶膜反应体系运用于生产 HA,可能在酶解过程 中分离出不同相对分子质量分布的 HA,实现小分子 HA 的连续化生产^[15-16]。

研究拟从 HA 水解过程的相对分子质量分级效果进行探究,构建连续式酶膜反应体系,以简化两种不同相对 分子质量的小分子 HA(LMW-HA 和 O-HA)制备工艺。 对酶膜体系工艺参数及反应条件进行优化,并利用液质 联用技术分析小分子 HA 的结构特征,探究不同相对分 子质量的 HA 抗氧化活性差异,旨在为开发小分子 HA 的工业化生产技术提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

透明质酸钠: $M_r \ge 1.2 \times 10^6$,山东丰泰生物科技有限 公司;

透明质酸酶:300~500 U/mg,化学纯,源叶生物科技 有限公司;

1,1-二苯基-2-苦味基肼(DPPH):96%,分析纯,罗恩 化学试剂有限公司;

1,10-菲啰啉(无水):99%,分析纯,阿拉丁生化科技 股份有限公司;

葡萄糖醛酸:99%,分析纯,德国默克公司;

超滤膜:改良聚醚砜(PES)膜,50 kDa,上海顾信生物 科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:AB104-N型,上海第二天平仪器厂;

磁力加热搅拌器:IKA-Color Squid 型,德国艾卡公司;

超纯水机:milli-Q synthesis型,美国默克密理博公司;

酶膜反应体系:GS-NF500型,上海顾信生物科技有限公司;

喷雾干燥机:BILON-6000Y型,上海比朗仪器制造 有限公司;

酶标仪:Multiskan SkyHigh-A51119600C型,美国赛 默飞世尔科技公司;

紫外可见分光光度计:UV-2450型,日本岛津公司;

高效液相色谱仪:Waters-ARC型,沃特世科技(上海)有限公司;

高效液相一离子肼一飞行时间质谱仪:LCMS-IT-TOF型,日本岛津公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酶膜耦合体系最优工艺条件的确定 连续式酶膜 耦合反应体系的构成主要分为生物反应罐和平板式聚醚 砜超滤膜分离装置两部分,如图1所示。超滤膜安装在 超滤膜分离装置上,将一定量的 HMW-HA 溶解于超纯 水中,加入反应罐中,设置反应温度为 37 ℃,pH 6.0,达 到设定条件后,加入透明质酸酶溶液,开启蠕动泵,调节 膜分离装置中跨膜压力。料液经膜分离装置过滤,寡聚 HA 从过滤端口滤出,底物溶液经蠕动泵回流至反应罐 内。反应结束后,加热使酶失活,用 0.22 μm 微孔滤膜抽 滤,除去杂质,进风温度 180 ℃条件下进行喷雾干燥得到 小分子 HA 干粉。



图1 酶膜反应体系结构图

Figure 1 Structure diagram of the reaction system by coupling of enzymolysis and membrane separation

参照苏子然^{[17]25-26}的方法并适当修改,研究操作压力、搅拌速度、酶解时间、酶添加量对酶解产物的分离效率影响。试验过程中收集过滤液并测量体积,计算反应体系的渗透通量,反应结束后对比酶解前后的纯水通量计算酶膜耦合体系的膜污染,测定过滤液的 HA 浓度,并计算产率,综合各因素评判小分子 HA 的制备效果。

(1)单因素试验:在前期试验的基础上,分别在跨膜 压力 0.20 mPa,搅拌转速 200 r/min,酶解时间 4 h下考察 酶添加量(1,2,5,8 g/100 g)对 HA 酶解效果的影响;在 酶添加量 5 g/100 g,搅拌转速 200 r/min,酶解时间 4 h 下考察跨膜压力(0.05,0.10,0.15,0.20 mPa)对 HA 酶解 效果的影响;在酶添加量 5 g/100 g,跨膜压力0.15 mPa, 酶解时间 4 h下考察搅拌转速(200,400,600,800 r/min) 对 HA 酶解效果的影响;在酶添加量5 g/100 g,跨膜压力 0.15 mPa,搅拌转速 200 r/min下考察酶解时间(0.5,1.0, 2.0,4.0 h)对 HA 酶解效果的影响。

(2)正交试验优化:根据单因素试验结果,设计酶添加量、跨膜压力、酶解时间和搅拌速度的因素水平表,以测得过滤段的小分子 HA的产率作为评价指标,进行四因素三水平的正交试验设计,确定小分子 HA 的最佳酶膜耦合制备工艺。

1.2.2 各指标的测定

(1) 膜通量:参照文献[17]²⁷⁻²⁸,按式(1)、式(2)计算酶解前后的膜通量。

$$J_{\rm p} = \frac{V_{\rm p}}{A \times t},\tag{1}$$

$$L_{p} = \frac{J_{p}}{P}, \qquad (2)$$

(2) HA 质量浓度:参照李敏等^[18]的方法并适当修改,将装有样品的试管于冰水浴中加入 0.025 mol/L 四硼酸钠硫酸溶液 5.0 mL,混匀后沸水浴中加热 10 min,冰水 浴冷却后加入 0.125%咔唑—乙醇 0.2 mL,混匀后沸水浴 中加热 15 min,冰水浴中冷却,以蒸馏水对照,530 nm 下 测定吸光度。按式(3)计算各样品管的 HA 质量浓度。

$$C_{\rm HA} = c \times \left(\frac{401.30}{194.10}\right) \times n, \qquad (3)$$

式中:

C_{HA} —— HA 质量浓度,μg/mL;
 c —— 样品葡萄糖醛酸浓度,μg/mL;

401.30——透明质酸重复双糖的单元相对分子质量;

194.10——葡萄糖醛酸的相对分子质量;

n——样品稀释倍数。

(3) HA 过滤液产率:参照文献[17]²⁸,按式(4)计算 酶解反应的 HA 过滤液产率。

$$Y = \frac{M_p}{M_t} \times 100\%, \qquad (4)$$

式中:

Y----HA 过滤液产率,%;

*M*_p——过滤液中 HA 质量的加和,g;

*M*_t——加入反应器中 HA 的总质量,g。

(4) 膜分离产物的 HPGPC 分析:参照王凤等^[19]的 方法并适当修改,配制 2 mg/mL 的样品溶液,取 20 μ L 注入高效液相色谱仪(配二极管阵列和示差检测器),记 录色谱图,采用 GPC 专用软件处理试验数据,计算所得 样品的 M_r (均按重均 \overline{M}_r)和多分散系数(polydispersity index,PDI)。

(5) 膜分离产物的 LC/MS-IT-TOF 分析: 参照 Takagaki 等^[20]的方法并适当修改,将 O-HA 样品溶解至 10%乙腈中,以 0.2 mL/min 的流速注入质谱仪,设置质 谱系统自动选择强度高于 10⁵的产物离子作为 MS²分析 的母离子,并根据 Domon 等^[21]提出的规则对寡糖中的碎 片离子进行命名。

1.2.3 3种不同相对分子质量的 HA 的抗氧化性

(1) DPPH 自由基清除率:参照 Qiao 等^[22]的方法并 适当修改,0.5 mL 样品溶液中加入 0.1 mL(400 μmol/L) DPPH 溶液,再加入 1.0 mL 蒸馏水,混匀,避光静置 30 min,使用紫外分光光度计在 517 nm 检测吸光度。按 式(5)计算各样品的 DPPH 自由基清除率。

$$R_{\rm DPPH} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%,$$
(5)
 $\vec{x} \neq :$

A₀——代替样品时的吸光度;

A1---样品试验吸光度;

A2----样品空白试验的吸光度。

(2) 羟自由基清除率:参照 Ke 等^[23]的方法并适当修 改,分别加入 300 µL 邻二氮菲乙醇溶液、300 µL 磷酸钠 缓冲液、200 µL FeSO₄溶液于 EP 管中,充分混匀后加入 不同浓度的样品溶液 200 µL。同时设阴性对照管和正常 管,不加样品溶液,然后再分别加入 200 µL H₂O₂溶液, 正常管不加 H₂O₂溶液,以等体积蒸馏水补充,37 ℃水浴 30 min,于紫外分光光度计测定 536 nm 处吸光度。按 式(6)计算各样品的羟自由基清除率。

$$R = \left(\frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1}\right) \times 100\%, \qquad (6)$$

式中:

- R----羟自由基清除率,%;
- A₀——正常管的吸光度;
- A1——阴性对照管的吸光度;

A2——样品管的吸光度。

1.2.4 数据处理 采用 Excel 2016、IBM SPSS Statistics 27 软件对数据进行处理分析,做标准差值及显著性分析,数值由平均数±标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 酶膜耦合工艺构建

2.1.1 酶添加量对 HA 酶解效果的影响 由图 2 可知, 随着反应时间增加和酶添加量的提高,渗透通量逐渐下 降,最后趋于平稳,表明酶添加量过高可能对反应体系造 成负面影响,造成膜表面的溶质堆积而出现浓差极化现 象,导致膜污染加剧。随着酶添加量的提高,HA 过滤液 质量浓度呈升高趋势,当酶添加量达到 5 g/100 g 时,HA 过滤液产率达到 6.35%。然而,酶添加量进一步提高至 8 g/100 g,产率却下降至 3.86%,可能是因为过量的酶使 HA 的酶解速度太快,而膜分离装置无法将大量寡聚 HA 快速过滤,造成 HA 过滤液浓度的下降。因此,选择酶添 加量 5 g/100 g 进行后期酶膜耦合试验。

2.1.2 跨膜压力对 HA 酶解效果的影响 由图 3 可知, 跨膜压力为 0.05 mPa 时酶膜耦合体系的通量较低,所造 成的膜污染程度最轻,尽管过滤液中 HA 质量浓度较高, 但渗透通量低,HA 过滤液的产率低。随着跨膜压力的增 加,渗透通量也在增加,HA 过滤液产率提升,当跨膜压力 为 0.15 mPa 时,产率可达到 10.16%。但跨膜压力达到 0.20 mPa 后,过高的渗透通量可能会促进寡聚 HA 的持 续跨膜运输,产生更强烈的对流作用导致更高的溶质截 留率,造成更严重的膜污染现象^[24-25]。另外,0.20 mPa 的膜压还会造成 2~4 h内 HA 过滤液质量浓度降低及渗 透通量下降,导致酶膜耦合工艺的 HA 产率减少。因此, 选择跨膜压力 0.15 mPa 进行后期酶膜耦合试验。

2.1.3 搅拌转速 HA 酶解效果影响 由图 4 可知,低搅 拌速度能够促进酶膜体系内渗透通量的提高,减少膜表 面大分子多糖的累积所造成的浓差极化现象,使膜污染 程度下降,因此酶解 4 h 后膜的渗透通量下降较低。同 时,由于更高的渗透通量带来的"稀释效应",使更多的溶 剂透过膜装置,间接影响对小分子物质的截留率和浓 度^[25]。随着搅拌速度的增加,HA 过滤液产率不断降低 及渗透通量下降,因此,选择搅拌速度 200 r/min 进行后 期酶膜耦合试验。

2.1.4 酶解时间对 HA 酶解效果的影响 如图 5 所示, 随着反应时间延长,超滤膜对较高相对分子质量 HA 的 截留率增加,造成对膜分离装置的污染程度逐渐加剧。 与此同时,随着反应时间持续,过滤液中 HA 质量浓度增 长速率加快,这是由于酶解时间的延长促进了酶与底物 的充分反应,并借助较高的跨膜压力驱动反应体系内寡 聚 HA 的原位分离,使过滤液产率可达到 10.16%。因 此,选择酶解时间 4 h进行后期酶膜耦合试验。



图 2 酶添加量对 HA 酶解效果的影响

Figure 2 Effects of enzyme addition on the enzymatic hydrolysis of HA

前期试验发现,底物与酶的反应时间是主要影响寡 聚 HA 相对分子质量分布的重要因素,所以通过控制酶 解时间,来控制 HA 的相对分子质量,从而实现通过酶解 聚法生产特定相对分子质量的HA^[26-27]。如图6(a)所



图 4 搅拌速度对 HA 酶解效果的影响

Figure 4 Effects of stirring rate on the enzymatic hydrolysis of HA



图 5 酶解时间对 HA 酶解效果的影响

Figure 5 Effects of hydrolysis time on the enzymatic hydrolysis of HA



Figure 6 Effects of enzymatic hydrolysis time on HA molecular weight and polydispersity index

示,随着反应时间的增加,HMW-HA的相对分子质量快速下降,酶解2h后HMW-HA的相对分子质量降解至 1万~5万,且酶解时间为4h时,截留端HA相对分子质 量为14580,说明利用酶膜耦合体系能够更有效地加快 酶解过程HA相对分子质量下降,可能是由于酶膜耦合 体系能够将水解过程的寡聚HA片段分离,降低酶解反 应的产物抑制现象^[28]。利用过滤液HA的产率判断膜分 离装置的原位分离效率,来探究酶膜耦合体系制备小分 子透明质酸的最优工艺。HA寡糖透过膜被分离出来, 图 6(b)表明,分离的寡糖片段相对分子质量为1970。

2.2 正交试验优化

选用酶添加量、酶解时间、跨膜压力、搅拌速度为试 验因素,以测得的 HA 过滤液的产率为评价指标,选用 L₉(3⁴)正交表试验(表 1),所获得试验数据如表 2 所示。 由表 2 可知,4 种因素对酶解产率影响显著性由大到 小依次是酶解时间>跨膜压力>酶添加量>搅拌速度, 酶解一膜分离耦合连续制备小分子HA的最佳工艺为酶

表 1 酶膜耦合反应参数的因素水平表

 Table 1
 Factors and levels of the enzyme membrane

 coupling reaction parameters

→L T	A酶添加量/	B酶解时	C跨膜压	D搅拌速度/
小十	$(10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1})$	间/h	力/mPa	$(r \cdot min^{-1})$
1	1	1	0.05	200
2	2	2	0.10	400
3	5	4	0.15	600

表 2 L₉(3⁴)正交试验结果

 Table 2
 Results of four factors and three levels of orthogonal experiment

编号	А	В	С	D	产率/%
1	1	1	1	1	0.53 ± 0.05
2	1	2	3	2	2.58 ± 0.12
3	1	3	2	3	6.07 ± 0.07
4	2	1	3	3	1.39 ± 0.10
5	2	2	2	1	2.70 ± 0.11
6	2	3	1	2	6.58 ± 0.34
7	3	1	2	2	0.79 ± 0.08
8	3	2	1	3	2.68 ± 0.23
9	3	3	3	1	10.16 ± 0.36
k_1	3.06	0.90	3.26	4.46	
k_2	3.56	2.65	3.19	3.32	
k 3	4.54	7.60	4.70	3.38	
R	1.48	6.69	1.52	1.14	

添加量 5 g/100 g、酶解时间 4 h、跨膜压力 0.15 mPa、搅拌 速度 200 r/min。该条件下能够制备得到 10.16%的 O-HA 过滤液。

由表 3 可知,4 种影响因素对小分子 HA 产率均达到 极显著水平(P<0.01),4 个因素的主次关系为:酶解时 间>跨膜压力>酶添加量>搅拌速度,与直观分析结果 一致,表明优选的工艺稳定可行。

2.3 不同相对分子质量的透明质酸性质表征及活性

2.3.1 HA理化性质表征 在操作压力 0.15 mPa、搅拌 速度 200 r/min、酶添加量 5%、酶解时间 4 h条件下,可通 过膜分离装置一步法得到两种不同相对分子质量的小分 子 HA。通过 HPGPC 分析其相对分子质量,由表 4 可 知,采用酶膜生物反应器工艺能够加速降低 HA 的相对 分子质量分布,控制酶解时间使 HMW-HA 相对分子质 量降低至 1 万~5 万。相对分子质量在 3.5 万的 LMW-HA 是具有较强生物活性的 HA,能够有效地促进细胞紧 密连接蛋白和抗菌肽表达,起到预防肠道细菌感染和改

表 3 方差分析结果[†]

Table 3 Results of variance analysis

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	显著性
А	10.22	2	5.111	112.983	* *
В	216.90	2	108.450	2 397.364	* *
С	13.17	2	6.584	145.545	* *
D	7.39	2	3.694	81.650	* *
误差	0.81	2	0.045		
总变异	246.87	2			

† "**"表示在 α=0.01 时差异极显著。

善肠道炎症作用^[29]。基于 HA 在肠道中可能被降解的特性, 口服该相对分子质量范围的小分子 HA 在调节肠道 免疫功效可发挥重要的角色^[2], 在体内起到抗氧化和抗 炎作用从而维持机体健康。因此, 在最优酶膜耦合技术 下, 通过控制酶解时间, 能够在截留端得到 1 万~5 万的 LMW-HA, 并借助膜分离装置同时过滤出少量窄分布且 相对分子质量 <3 000 寡聚 HA。另外, 采用 LC/MS-IT-TOF 能够更清楚分析聚合度为 dp2~dp28 的小分子 HA^[30], 图 7 表明, 截留端 LMW-HA 主要为 dp28 的 LMW-HA, 而图 8 则显示 O-HA 为 dp4~dp12 的O-HA, 且 dp8、dp10 的含量较高, 由此可猜测, 当 HA 的相对分子质量较高时,透明质酸酶水解过程的酶切位点可能为 HA₈处的糖苷键发生断裂获得寡聚 HA。

2.3.2 体外抗氧化活性 由图 9(a)可知,小分子 HA 对 DPPH 自由基清除率随质量浓度增加而提升,质量浓度 达到 1.8 mg/mL 时,LMW-HA 对 DPPH 自由基清除率 可达 48.88%,O-HA 对 DPPH 自由基清除率达到 46.07%,均显著高于 HMW-HA 的(18.91%),说明小分 子 HA 均对 DPPH 自由基具有一定清除效率(P<0.01)。

表 4 酶膜耦合分离前后 HA 相对分子质量

 Table 4
 Comparison of molecular weight of HA before and after enzyme membrane coupled method

样品	重均分子量(M _r)	多分散系数(PDI)
HMW-HA	$2\ 426\ 670\!\pm\!25\ 160$	3.37 ± 0.02
LMW-HA	$34\ 960 \pm 9\ 750$	2.59 ± 0.24
O-HA	1750 ± 110	1.14 ± 0.05





Figure 7 LC/MS-IT-TOF analysis of LMW-HA





Figure 9 Effects of HA with different molecular weights on the scavenging rates of two free radicals

然而,3种不同相对分子质量的 HA 样品均显著低于阳性 对照维生素 C 的(P<0.01)。同理,由图 9(b)可知,小分 子 HA 对羟自由基清除力表现出浓度依赖现象,且 LMW-HA 和 O-HA 对羟自由基的清除率均显著高于 HMW-HA 的(P<0.05),但均低于阳性对照维生素 C 的 (P<0.05)。

由此说明,与大分子 HA 相比,小分子 HA 具有更强 的自由基清除能力,可以缓解组织氧化应激损伤,对机体 起到抗炎作用。但随着相对分子质量进一步下降,O-HA 对羟自由基的清除能力反而比 LMW-HA 的有所下降,可 能是因为 LMW-HA 更易被羟自由基降解,依赖于 LMW-HA 链上羟基的数量以及螯合过渡金属离子的能力^[8]。 并且酶解法未对 HA 结构上的相关残基进行修饰,因此 小分子 HA 无法展现出抗坏血酸清除机体内多余自由基 的强抗氧化能力。通过对不同相对分子质量 HA 的抗氧 化活性差异分析,有望对未来探究小分子 HA 对炎症作 用及其机制提供一定的理论依据。

3 结论

对酶膜体系工艺参数及反应条件进行优化,构建了 一种连续式酶膜反应体系,实现了一步法同时制备两种 不同相对分子质量的透明质酸。膜分离技术操作简单, 结合酶水解反应可更有效地得到两种不同相对分子质量 和抗氧化活性的小分子透明质酸。不同于传统酶解法制 备单一分子量透明质酸,连续式酶膜反应体系简化了两 种不同相对分子质量的小分子透明质酸(低相对分子质 量透明质酸和透明质酸寡糖)制备工艺。将酶膜反应体 系运用于生产透明质酸,可能在酶解过程中分离出不同 相对分子质量分布的透明质酸,实现小分子透明质酸的 连续化生产。

参考文献

 FALLACARA A, BALDINI E, MANFREDINI S, et al. Hyaluronic acid in the third millennium[J]. Polymers, 2018, 10(7): 701-736. [2] 王钊, 徐康, 王方, 等. 经口给予透明质酸的生理功能及其作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 1-10.
 WANG Z, XU K, WANG F, et al. Progress in research on

physiological function and mechanism of oral hyaluronic acid[J]. Food Science, 2021, 42(23): 1-10.

- [3] 卢方云, 吴瑀婕, 黄瑾, 等. 透明质酸的制备及其应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 440-447.
 LUF Y, WU Y J, HUANG J, et al. Research progress on preparation and application of hyaluronic acid[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 440-447.
- [4] 郭风仙,高芃,耿桂英,等.透明质酸钠的毒理学研究[J].中国生化药物杂志,2010,31(5):316-319.
 GUO F X, GAO P, GENG G Y, et al. Study on toxicology of sodium
- hyaluronate [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2010, 31(5): 316-319.
- [5] BECKER L C, BERGFELD W F, BELSITO D V, et al. Final report of the safety assessment of hyaluronic acid, potassium hyaluronate, and sodium hyaluronate [J]. International Journal of Toxicology, 2009, 28(4): 5-67.
- [6] 张子辉. 透明质酸的制备及其对人结肠癌细胞 TNF-α 表达、迁移和转录组的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2021: 1-2. ZHANG Z H. Preparation of hyaluronic acid and its effect on TNF-α expression, migration and transcriptome of human colon cancer cells[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021: 1-2.
- [7] 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.
- [8] 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 J Y, WANG F S. Research progress in the preparation methods, bioactivities and application of low molecular weight andoligomeric hyaluronic acid [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 26(1): 64-68.
- [9] 雷曦, 张蕊, 黄遵锡, 等. 透明质酸酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 882-895.

LEI X, ZHANG R, HUANG Z X, et al. Research progress of hyaluronidases[J]. Microbiology China, 2021, 48(3): 882-895.

- [10] 李正阳, 卢智泉, 许芬, 等. 透明质酸纯化技术研究进展[J]. 轻 工科技, 2016, 32(12): 31-39.
 LI Z Y, LU Z Q, XU F, et al. Research progress of hyaluronic acid purification technology[J]. Light Industry Science and Technology, 2016, 32(12): 31-39.
- [11] SU Z, LUO J, LI X, et al. Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 243: 116840.
- [12] KUROIWA T, IZUTA H, NABETANI H, et al. Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 283-287.
- [13] DAS R, SEN D, SARKAR A, et al. A comparative study on the production of galacto-oligosaccharide from whey permeate in recycle membrane reactor and in enzymatic batch reactor [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2011, 50 (2): 806-816.
- [14] 周海东, 倪晋仁, 黄文, 等. 膜技术分离透明质酸发酵液可行性研究[J]. 食品与发酵工业, 2005(11): 46-51.
 ZHOU H D, NI J R, HUANG W, et al. Feasibility of separation of hyaluronic acid from fermentation broth of membrane technology
 [J]. Food and Fermentation Industries, 2005(11): 46-51.
- [15] 陈万河, 储消和, 沈建, 等. 一种连续化生产低分子量透明质酸的方法及所得低分子量透明质酸和应用: CN111893151A
 [P]. 2020-11-06.
 CHEN W H, CHU X H, SHEN J, et al. Method and application for

continuous production of low molecular weight hyaluronic acid: CN111893151A[P]. 2020-11-06.

- [16] 吴凌天, 卢成慧, 高华, 等. 一步法高效制备小分子硫酸软骨 素和小分子透明质酸的方法: CN109988739B[P]. 2021-10-19.
 WU L T, LU C H, GAO H, et al. One-step method for efficient preparation of low molecular weight chondroitin sulfate and hyaluronic acid: CN109988739B[P]. 2021-10-19.
- [17] 苏子然. 酶膜反应器生产均一分子量的寡聚右旋糖酐[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.

SU Z R. Production of oligodextran by using an enzymatic membrane reactor[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019.

[18] 李敏, 侯增森, 李晓颖, 等. 改良咔唑法测定重组人溶菌酶滴 眼液中透明质酸钠的含量[J]. 化学分析计量, 2019, 28(1): 95-98.

LI M, HOU Z M, LI X Y, et al. Determination of sodiumhyaluronate in recombinant human lysozyme eye drops by modified carbazole method[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2019, 28(1): 95-98.

[19] 王凤, 王凤舞, 崔加友, 等. 小分子量透明质酸片段的 4 种分子

量检测方法的对比研究[J]. 海峡药学, 2019, 31(12): 89-93. WANG F, WANG F W, CUI J Y, et al. A study of measurement of hyaluronic acid at low molecular range[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2019, 31(12): 89-93.

- [20] TAKAGAKI K, MUNAKATA H, NAKAMURA W, et al. Ion-spray mass spectrometry for identification of the nonreducing terminal sugar of glycosaminoglycan[J]. Glycobiology, 1998, 8(7): 719-724.
- [21] DOMON B, COSTELLO C E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates[J]. Glycoconjugate Journal, 1988, 5: 397-409.
- [22] QIAO D, KE C, HU B, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from Hyriopsiscumingii [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(2): 199-204.
- [23] KE C, SUN L, QIAO D, et al. Antioxidant acitivity of low molecular weight hyaluronic acid [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2 670-2 675.
- [24] LUO J, MORTHENSEN S T, MEYER A S, et al. Filtration behavior of caseinglycomacropeptide (CGMP) in an enzymatic membrane reactor: Fouling control by membrane selection and threshold flux operation[J]. Journal of Membrane Science, 2014, 469: 127-139.
- [25] LUO J, ZHU Z Z, DING L H, et al. Flux behavior in clarification of chicory juice by high-shear membrane filtration: Evidence for threshold flux [J]. Journal of Membrane Science, 2013, 435: 120-129.
- [26] PLESZCZYNSKA M, SZCZODRAK J, ROGALSKI J, et al. Hydrolysis of dextran by Penicillium notatum dextranase and identification of final digestion products[J]. Mycological Research, 1997, 101(1): 69-72.
- [27] BROWN S, KUBERAN B. Production of size-defined heparosan, heparan sulfate, and heparin oligosaccharides by enzymatic depolymerization[J]. Glycosaminoglycans: Chemistry and Biology, 2015, 1 229: 21-29.
- [28] KAKIZAKI I, IBORI N, KOJIMA K, et al. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase[J]. The FEBS Journal, 2010, 277(7): 1 776-1 786.
- [29] KIM Y, MOTTE C A. The role of hyaluronan treatment in intestinal innate host defense[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 569.
- [30] 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): 1 025-1 033.