

李慧凝, 张京良, 杨良, 等. 酶法制备透明质酸寡糖及其透皮吸收活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 77-82. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080002

LI Huining, ZHANG Jingliang, YANG Gen, et al. Preparation of Hyaluronic Acid Oligosaccharides by Enzymatic Method and Its Transdermal Absorption Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 77-82. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080002

· 研究与探讨 ·

酶法制备透明质酸寡糖及其透皮吸收活性研究

李慧凝¹, 张京良^{2,3}, 杨良⁴, 江晓路^{1,4,*}

- (1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003;
2. 中国海洋大学医药学院, 山东青岛 266003;
3. 青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266007;
4. 山东银河生物科技有限公司, 山东济宁 273200)

摘要: 为研究透明质酸寡糖的透皮吸收活性, 采用透明质酸裂解酶对透明质酸进行酶法降解, 制备透明质酸寡糖, 通过红外光谱与质谱对透明质酸寡糖进行分析, 并对其吸湿性能、体表保湿性能和透皮吸收性能进行评价。结果显示, 透明质酸裂解酶酶解制备透明质酸寡糖的最适底物浓度为 1%, 最适加酶量为 3.0 U/mg, 酶解制备透明质酸寡糖基本没有基团脱落, 酶解产物以不饱和透明质酸二糖为主。酶法制备的透明质酸寡糖具有优良的体表保湿与透皮吸收性能, 在生物化工领域具有广阔的应用前景。

关键词: 透明质酸寡糖, 透明质酸裂解酶, 结构分析, 透皮吸收活性

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)06-0077-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080002



本文网刊:

Preparation of Hyaluronic Acid Oligosaccharides by Enzymatic Method and Its Transdermal Absorption Activity

LI Huining¹, ZHANG Jingliang^{2,3}, YANG Gen⁴, JIANG Xiaolu^{1,4,*}

- (1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
3. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266007, China;
4. Shandong Galaxy Bio-Tech Co., Ltd., Jining 273200, China)

Abstract: To investigate the transdermal absorption activity of hyaluronic acid oligosaccharides, hyaluronic acid oligosaccharides were prepared by enzymatic degradation of hyaluronic acid using hyaluronic acid lyase, and the hyaluronic acid oligosaccharides were analyzed by infrared spectroscopy and mass spectrometry, and their hygroscopic properties, body surface moisturizing properties and transdermal absorption properties were evaluated. The results showed that the optimum substrate concentration for the enzymatic preparation of hyaluronan oligosaccharides by hyaluronan lysis enzyme was 1%, and the optimum enzyme addition was 3.0 U/mg. The enzymatic preparation of hyaluronan oligosaccharides was free of moieties, and the enzymatic products were mainly unsaturated hyaluronan disaccharides. The enzymatically prepared hyaluronan oligosaccharide had excellent surface moisturizing and transdermal absorption properties, and would have a broad application prospect in the field of biochemicals.

Key words: hyaluronan oligosaccharide; hyaluronic acid lyase; structural analysis; transdermal absorption activity

收稿日期: 2021-08-03

基金项目: 山东省重点扶持区域人才项目“基于在线控制的酶法制备透明质酸寡糖关键技术研究与产业化”(370831SD200417313802)。

作者简介: 李慧凝(1998-),女,硕士研究生,研究方向:水产品加工,E-mail: 942108765@qq.com。

* 通信作者: 江晓路(1959-),女,本科,教授,研究方向:应用微生物 E-mail: jiangxl@ouc.edu.cn。

透明质酸(Hyaluronic, HA)又称玻尿酸,是一种由 N-乙酰基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸双糖重复单元通过 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键构成的天然聚阴离子线性多糖^[1]。HA 具有独特的结构特性和生理功能,其生物活性与其分子量密切相关^[2],不同分子量 HA 具有不同生物活性。高分子 HA 具有优良的保湿性、润滑性和粘弹性等生物活性^[3-4],透明质酸寡糖(分子量<10 kDa)具有抗氧化、促进血管生成、促进伤口愈合、抗肿瘤和免疫调节等多种生物活性^[5-8],在化妆品、食品、医药保健领域具有显著的应用前景。

目前,制备透明质酸寡糖的方法主要包括物理降解法、化学降解法、生物合成法和酶解法^[9],物理降解法包括超声波、机械剪切、热降解等,但此法生成的产物成分不均一,为后期产物分离纯化增加困难^[10];化学降解法包括酸解法、碱解法和氧化降解法,化学降解法需要强酸、强碱等剧烈反应条件,容易造成糖苷键断裂、基团脱落等现象,导致寡糖活性丧失^[11];生物合成法制备透明质酸寡糖需要严格的反应条件,需要多种反应酶,反应条件复杂,成本较高^[12]。以透明质酸裂解酶对透明质酸进行特异性降解,克服了物理化学方法的不足,酶解法制备透明质酸寡糖由于其反应条件温和,易于控制,产物结构均一,纯度高等优点越来越成为近年的热点^[13],李憬昱^[14]等通过酶解法制备了高纯度透明质酸寡糖,但目前透明质酸裂解酶产量低,价格高昂,严重限制酶法制备透明质酸寡糖的研究应用及产业化。

本课题组前期筛选获得一株高产透明质酸裂解酶的球形节杆菌,已对其发酵性能^[15]和酶学性质^[16]进行系统研究,研究表明该酶具有优异的发酵性能和酶学特性,具备进一步开发的潜力。本研究对该透明质酸裂解酶制备透明质酸寡糖的工艺进行研究,并对制备的透明质酸寡糖的透皮吸收等性能进行评价,以期透明质酸寡糖的开发应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

透明质酸(HA,分子量 1500 kDa) 山东众山生物科技有限公司;透明质酸裂解酶(10000 U/mL) 青岛海洋生物医药研究院;其他试剂如碳酸钠、硫酸铵等均为分析纯。

L5S 紫外可见分光光度计 上海仪电分析仪器有限公司;HES-24 型电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司;Thermo Nicole Is10 傅里叶变换红外光谱仪 赛默飞世尔科技公司;冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;Amazon SL 离子阱电喷雾质谱 德国布鲁克道尔顿公司;SK-IV 数字皮肤水分检测仪 深圳市凯尔电子厂;RYJ-6B 型药物透皮扩散试验仪 上海黄海药检;AL204 精密分析天平 梅特勒托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 底物浓度对 HA 酶解的影响 在加酶量 2 U/mg HA 的条件下,考察浓度为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%

(w/v)的 HA 对酶解的影响,以 232 nm 的紫外吸收值为指标,确定最适底物浓度。

1.2.2 加酶量对 HA 酶解的影响 在底物浓度 1.0% (w/v)的条件下,考察加酶量为 0.1、0.2、1.0、2.0、3.0、4.0 U/mg 对 HA 酶解的影响,以 232 nm 的紫外吸收值为指标,确定最适加酶量。

1.2.3 透明质酸寡糖的制备 在底物浓度 1.0% (w/v)、加酶量 3.0 U/mg HA 的条件下,37 °C 反应 12 h,沸水浴 5 min 灭酶,10000 r/min 离心 10 min,收集上清液,冷冻干燥得透明质酸寡糖(EO-HA),备用。

1.2.4 红外光谱分析 参考 Gao 等^[17]的方法利用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)对 EO-HA 进行红外扫描分析。将 500 mg 溴化钾烘干至恒重,加入 5 mg 酶解产物,以溴化钾粉末作空白对照,在 4000~400 cm^{-1} 的波数范围内进行扫描。

1.2.5 质谱分析 参考 Silvia 等^[18]的方法将 EO-HA 溶解于蒸馏水中,设置离子源温 100 °C,毛细管电压 3000 V,样品锥孔电压 40 V,在质核比(m/z)5~2000 amu 范围内进行 ESI-MS 扫描分析。

1.2.6 吸湿性能 参考陈晓磊等^[19]的方法并稍作修改测定样品的吸湿性能。以甘油为对照,在饱和硫酸铵水溶液(相对湿度 RH=81%)和饱和碳酸钠水溶液(相对湿度 RH=43%)环境中测定。

1.2.7 体表保湿性能 参考屈义等^[20]的方法测定样品的体表保湿性能。在底物浓度 1%(w/v),温度 20~25 °C,相对湿度 34%~70% 的条件下开展实验。随机挑选 22~30 岁年龄段的皮肤健康受试者 10 名,选取左前臂内侧相同区域 5 cm×5 cm 处为受试部位(受试部位在实验前 2~3 d 不能使用任何护肤品),清洁后,均匀涂抹样品 0.1 mL,用皮肤水分测试仪测定 0、10、30、60、120 min 皮肤的水分含量,在同一区域内选取不同点测定 3~4 次,以 10% 的甘油作为对照。以相对保湿率来评价样品的保湿效果,具体计算公式如下:

$$\text{相对保湿率}(\%) = \frac{P_{\text{样}t=x} - P_{\text{空白}}}{P_{\text{空白}}} \quad \text{式(1)}$$

式中: $P_{\text{样}t=x}$: 使用样品一段时间后皮肤的含水率(%); $P_{\text{空白}}$: 未涂样品皮肤的含水率(%)。

1.2.8 透皮吸收性能 参考唐泽严等^[1]的方法测定样品的透皮吸收性能,测定采用改良的 Franz 扩散池,将小鼠皮肤固定在供给池与接受池之间,皮肤表层向上,供给池中加入 1 mL 5 mg/mL 样品溶液,接收池中加入 6.5 mL 0.9% 的生理盐水,设置搅拌转速 400 r/min,温度(32±0.5)°C,于 1、2、4、8、10、12 h 取 1 mL 接受液,并补加等量的接受液。测定样品中糖醛酸含量,并以此计算单位面积累计透过量,具体计算公式如下:

$$Q_n = \frac{VC_n + V_o \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{A} \quad \text{式(2)}$$

$$J = \frac{dQ_n}{dt} \tag{3}$$

式中 Q_n : t 时间样品的单位面积累计透过量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); A : 透皮扩散面积 (2.8 cm^2); C_n : t 时间浓度测定值; C_i : t 时间之前浓度测定值; V : 接受池总体积 (6.5 mL); V_0 : 取样体积 (1 mL); J : 透皮速率常数, 作 Q_n 对 t 的曲线得回归方程, 斜率即为透皮速率常数。

1.3 数据处理

试验重复 3 次, 结果用平均值 \pm 标准差来表示; 采用软件 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0 对数据进行数据统计及显著性分析; 采用 Origin 9.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对 HA 酶解的影响

透明质酸裂解酶通过 β 消除机制作用于 β -1,4 糖苷键, 在葡萄糖醛酸残基 C4, C5 间形成不饱和双键, 在 232 nm 处有特征吸收, 可以通过 232 nm 的紫外吸收变化监控酶解反应进程^[21]。底物浓度对酶解度的影响如图 1 所示, 在底物浓度为 0.5%~4% 范围内, 随着底物浓度的增加, $A_{232 \text{ nm}}$ 先显著增加 ($P<0.05$), 当底物浓度为 1% 时, $A_{232 \text{ nm}}$ 达到最大, 降解效果较好, 后有所降低 ($P<0.05$)。这可能是由于随 HA 浓度增加, 黏度逐渐升高, 限制了透明质酸酶与 HA 的结合, 从而影响酶解效率。因此, 选择最适底物浓度为 1%(w/v)。

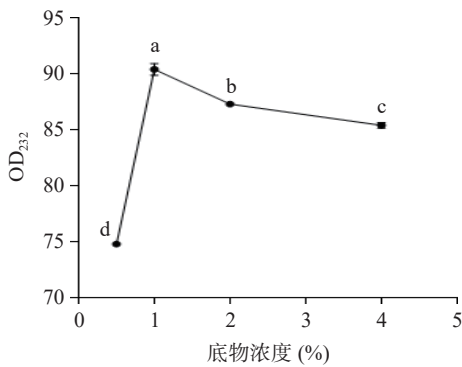


图 1 底物浓度对 HA 酶解的影响

Fig.1 Effect of substrate concentration on HA enzymatic hydrolysis

2.2 加酶量对 HA 酶解的影响

加酶量是影响酶解反应的重要因素之一, 适宜的加酶量有利于更快获得目标产物, 提高生产效率。加酶量对 HA 酶解的影响如图 2 所示, 在底物浓度为 1%(w/v) 条件下, 随着加酶量的增加, $A_{232 \text{ nm}}$ 呈先显著增加 ($P<0.05$) 后无显著变化 ($P>0.05$) 的趋势。当加酶量增加到 3 U/mg 时, $A_{232 \text{ nm}}$ 快速增加, 但当加酶量继续增加到 4 U/mg 时, $A_{232 \text{ nm}}$ 值增加趋势变缓, 表明酶与底物结合趋于饱和。综合考虑成本、酶解效率等, 选择 3 U/mg 为最适加酶量。

2.3 红外光谱分析

通过红外光谱对样品进行分析结果如图 3 所

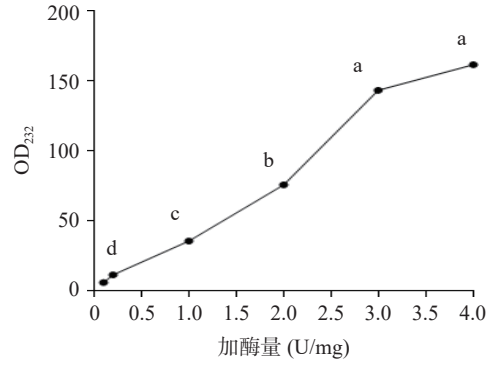


图 2 加酶量对 HA 酶解的影响

Fig.2 Effect of enzyme dosage on HA enzymatic hydrolysis

示, HA 和 EO-HA 都具有糖类特征吸收峰, 在 3600~3200 cm^{-1} 出现 O-H 键的伸缩振动, 在 3420.78 cm^{-1} 处有宽吸收峰, 表明其具有氢键^[22]。2899.10 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C-H 键的伸缩振动, 1616.68 cm^{-1} 处的吸收峰是由于乙酰氨基中 C=O 的伸缩振动, 1411.24 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C-O 的伸缩振动, 1377.70 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C=O 的对称伸缩振动^[23], 1206.41 cm^{-1} 和 1042.64 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 O-H 键的弯曲振动造成, 在 1150.99 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 C-O-C 键的存在^[24]。此外, 在 894.06 cm^{-1} 处的吸收是由于吡喃糖中 C-H 键的弯曲振动引起的^[25]。此结果表明, HA 和 EO-HA 的红外分析基本一致, 表明 EO-HA 在温和条件下被透明质酸裂解酶特异性地解聚, 没有基团脱落, 在一定程度上, 保留了结构的完整性。

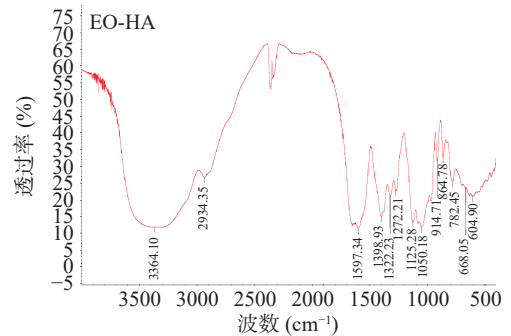
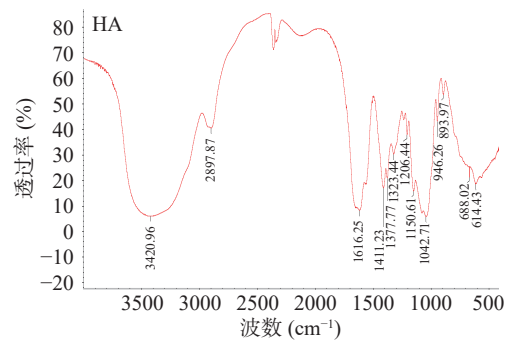


图 3 HA 和 EO-HA 的 FT-IR 图谱

Fig.3 FT-IR spectrum of HA and EO-HA

2.4 质谱分析

EO-HA 质谱结果如图 4 所示, 结果表明质谱图

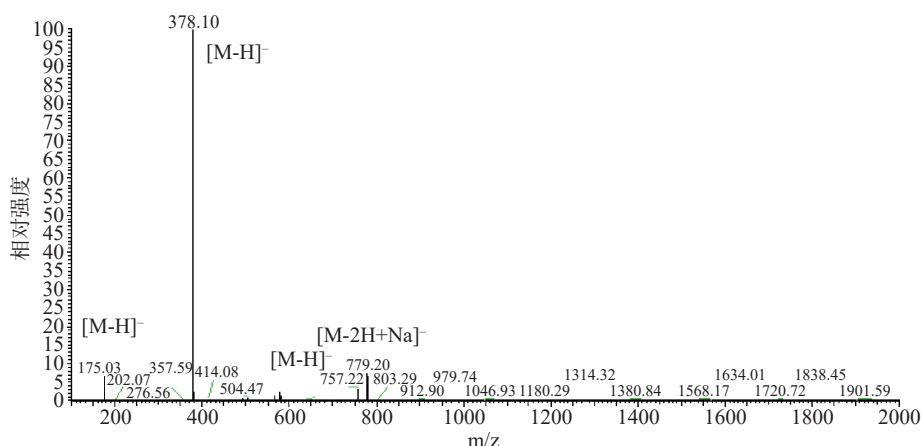


图4 EO-HA的质谱分析

Fig.4 Negative-ion electrospray mass spectra of EO-HA

中峰主要集中在 378.1([M-H]⁻), 由于透明质酸裂解酶酶解位点为 β-1,4 糖苷键, 酶解位点专一, 其酶解产物结构主要是不饱和 HA 二糖(ΔDiHA)。757.2([M-H]⁻)和 779.2([M-2H+Na]⁻)为单电荷峰及双电荷峰, 其结构为不饱和 HA 四糖(α-HA4)。175.0([M-H]⁻)为碎片峰, 其结构为不饱和糖醛酸(ΔUA)。透明质酸酶在降解 HA 的过程中首先进行随机内切, 将 HA 降解为低分子量片段, 然后再从头裂解 HA 持续产生以 ΔDiHA 为主要降解产物的透明质酸寡糖^[26]。此透明质酸裂解酶的作用模式与 S. zooepidemicus 的作用模式较为类似^[27]。

2.5 吸湿性能

HA、EO-HA 及甘油的吸湿性能如图 5 所示, 由图 5 可知, 在饱和硫酸铵和饱和碳酸钠环境下, 三者

吸湿率均在 0~12 h 迅速增加, 在 12 h 之后增加缓慢, HA 在初始阶段吸湿性能优于 EO-HA, 但后期两者的吸湿性能基本一致。此结果表明 HA 及 EO-HA 均具有良好的吸湿性能。

2.6 体表保湿性能

皮肤水分测试仪可根据角质层含水量的高低所引起电阻的变化, 从而反应出皮肤角质层含水率的变化, 这种方法是目前保湿护肤品保湿功效评价常用的方法之一, 皮肤角质层含水率可以用来反映 HA 和 EO-HA 的保湿效果, 角质层水分含量越高, 其保湿性能越好^[28]。HA、EO-HA 及甘油体表保湿性能如表 1 所示, 初始阶段, EO-HA 保湿性能较 HA 弱, 且显著低于甘油保湿性能($P<0.01$), 但随时间延长至 2 h 时, EO-HA 的保湿效果显著优于 HA 保湿效果($P<0.05$)。这可能是由于在初始阶段 HA 较 EO-HA 黏度大, 易成膜, 锁水性能好。但后期阶段, EO-HA 分子量小, 可以顺利通过 40~50 nm 的细胞间隙进入角质层, 进行深度保湿, HA 则无法通过^[29]。因此, EO-HA 的保湿效果较 HA 更优异。而甘油作为传统的保湿剂, 在体表保湿效果上, 表现出理想的保湿性能。

表1 HA 和 EO-HA 及甘油的体表保湿效果
Table 1 Moisture retention of HA, EO-HA and glycerin on the skin

时间(min)	EO-HA	HA	甘油
0	21.60±0.96 ^a	23.79±0.68 ^a	31.05±0.88
10	13.20±0.39 ^a	11.36±0.71 ^b	19.48±1.07
30	12.22±0.03 ^a	8.37±0.88 ^b	18.28±0.61
60	11.41±0.82 ^a	8.53±0.49 ^b	16.58±0.92
120	10.54±0.97 ^a	8.46±0.96 ^b	15.71±0.66

注: a表示与同一时间甘油比, 差异极显著($P<0.01$); b差异显著($P<0.05$)。

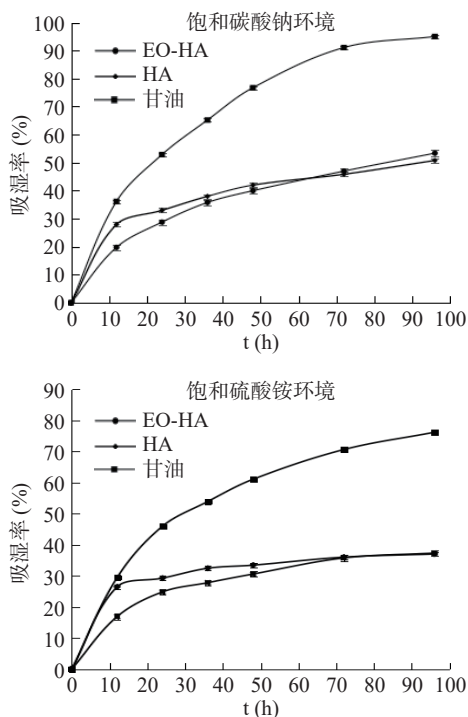


图5 HA 和 EO-HA 的吸湿性能分析

Fig.5 Moisture abilities of HA and EO-HA

2.7 透皮吸收性能

HA 及 EO-HA 的透皮吸收曲线均趋于直线, 作 Qn 对 t 的方程得到各样品的透皮动力学方程, 结果如表 2 所示: HA 及 EO-HA 的累计透过量如表 3 所示。由表 2 中各样品的动力学方程可以看出, HA

表 2 HA 和 EO-HA 的透皮动力学参数

Table 2 Penetration kinetic parameter of HA and EO-HA

样品	动力学方程	R ²	透皮吸收系数(J)
EO-HA	y=0.0464x+0.0957	0.9703	0.0464
HA	y=0.0035x+0.0004	0.8688	0.0035

表 3 HA 和 EO-HA 的累计透过量

Table 3 Cumulative penetration amount of HA and EO-HA

o-HA样品	12 h累计透过量(μg/cm ²)	24 h累计透过量(μg/cm ²)
EO-HA	0.715 ^a	1.133 ^a
HA	0.059	0.075

注: a表示与HA相比,差异极显著(P<0.01)。

及 EO-HA 的单位面积累计透过量随着时间的变化呈线性增长,符合零级动力学方程。透皮吸收系数 J 反应透皮吸收率,酶法制备的 EO-HA 的透皮吸收系数最大,表现了较好的透皮吸收性,透皮吸收性能优异,由表 3 可知,在 24 h,EO-HA 的累计透过量为 1.113 μg/cm²,而未降解的 HA 的累积透过量最低,仅为 0.075 μg/cm²,表明分子量越低,其透皮吸收效果越好。而透皮吸收性能越好,体表保湿性能越优异,两者结果一致。这可能是由于高分子 HA 流动性差,难以透过角质层,而经透明质酸裂解酶降解产生的 EO-HA,分子量小,黏度小,可以更好地进入角质层,达到深度保湿的效果。同时,EO-HA 可以增加皮肤内源性透明质酸含量,刺激胶原蛋白的生成^[30],延缓人体衰老。

3 结论

近年来,研究发现透明质酸及其寡糖具有多种生物功能,成为研究热点。本实验采用透明质酸裂解酶酶解制备透明质酸寡糖,对底物浓度及加酶量进行优化,并利用傅里叶红外变换光谱和质谱进行寡糖结构分析结果表明反应透明质酸裂解酶降解透明质酸的最适底物浓度为 1%,最适加酶量为 3.0 U/mg,红外光谱表明酶解过程基本没有基团脱落,保留了透明质酸的结构完整性,酶解产物 EO-HA 以不饱和透明质酸二糖为主,含有少量的不饱和糖醛酸和和不饱和透明质酸四糖。对 EO-HA 与 HA 的吸湿性能、体表保湿性能与透皮吸收性能进行研究,结果表明 EO-HA 吸湿性能与 HA 基本一致,EO-HA 在 120 min 时皮肤的含水率较 HA 提高 10% 左右,显示出良好的体表保湿性能,EO-HA 24 h 的累计皮肤透过量为 1.133 μg/cm²,显著(P<0.05)高于 HA,表明 EO-HA 具有优异的透皮吸收性能。上述研究表明,EO-HA 具有优良的体表保湿与透皮吸收性能,可以发挥深度保湿,补充内源性 HA,刺激胶原蛋白生产等生理功能,可以广泛应用于化妆品、外用制剂等产品开发,在生物化工领域具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 唐泽严,郭学平,温喜明,等.不同相对分子质量透明质酸对还原型谷胱甘肽透皮吸收的影响[J].中国药科大学学报,2021,

52(2):203-210. [TANG Zeyan, GUO Xueping, WEN Ximing, et al. Effects of hyaluronic acid with different molecular weight on the trans-dermal absorption of reduced glutathione[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(2): 203-210.]

[2] 瞿晓梅,国大亮,刘洋,等.透明质酸制备方法的研究进展[J].药学研究,2020,39(4):233-235. [ZHAI Xiaomei, GUO Daliang, LIU Yang, et al. Research progress on preparation of hyaluronic acid[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2020, 39(4): 233-235.]

[3] CUI Y L, WANG F, VOORHEES J J, et al. Rejuvenation of aged human skin by injection of cross-linked hyaluronic acid[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 2021, 147(1S-2): 43S-49S.

[4] 刘硕,王景召.透明质酸的特性及其在食品中的应用[J].化工设计通讯,2018,44(8):62. [LIU Shuo, WANG Jingzhao. Characteristics of hyaluronic acid and its application in food[J]. Chemical Engineering Design Communications, 2018, 44(8): 62.]

[5] SAFDAR M H, HUSSAIN Z, ABOUREHAB Mohammed A S, et al. New developments and clinical transition of hyaluronic acid-based nanotherapeutics for treatment of cancer: Reversing multidrug resistance, tumour-specific targetability and improved anticancer efficacy[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2018, 46(8): 1967-1980.

[6] LI J J, DU R, BIAN Q, et al. Topical application of HA-g-TEMPO accelerates the acute wound healing via reducing reactive oxygen species (ROS) and promoting angiogenesis[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 597: 120328.

[7] LIN Z F, WU T T, WANG W S, et al. Biofunctions of antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019: 140.

[8] CAI J, FU J R, LI R R, et al. A potential carrier for anti-tumor targeted delivery-hyaluronic acid nanoparticles[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 208: 356-364.

[9] 赖永勤,刘玉川,周正东,等.低分子量透明质酸功能与制备研究进展[J].食品与发酵科技,2015,51(6):77-80,99. [LAI Yongqin, LIU Yuchuan, ZHOU Zhengdong, et al. Research progress in function and production of low molecular weights of hyaluronic acid[J]. Food and Fermentation Technology, 2015, 51(6): 77-80,99.]

[10] 张文强,黄岳山.低相对分子质量透明质酸的超声降解制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(25):4883-4885. [ZHANG Wenqiang, HUANG Yueshan. Preparation of low molecular weight hyaluronan using ultrasonic degradation[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(25): 4883-4885.]

[11] 王鑫,郭瑞琳,王派丽,等.透明质酸降解工艺条件优化[J].食品与发酵工业,2014,40(1):130-135. [WANG Xin, GUO Ruilin, WANG Paili, et al. Optimization of the degradation conditions of hyaluronic acid by response surface methodology[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(1): 130-135.]

[12] 岑潇龙,雷曦,马诗云,等.金黄色葡萄球菌透明质酸裂解酶 HylS 的异源表达与特性研究[J/OL].生物技术通报:1-12 [2021-08-01]. https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0129. [CEN Xiaolong, LEI Xi, MA Shiyun, et al. Heterologous expression and characterization of the hyaluronic acid lyase HylS from *Staphylococcus aureus*[J]. Biotechnology Bulletin: 1-12

- [2021-08-01].<https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0129>.]
- [13] 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/OL]. 食品工业科技: 1-13 [2021-08-25]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030186>. [LU Fangyun, WU Yujie, HUANG Jin, et al. Research progress on preparation and application of hyaluronic acid[J/OL]. Science and Technology of Food Industry:1-13[2021-08-25].<https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030186>.]
- [14] 李憬昱. 基于NIRS技术进行分子量监测的酶解法制备LMW-HA的工艺研究[D]. 济南: 山东大学, 2019. [LI Jingyu. Study on preparation procedure of LMW-HA by enzymatic hydrolysis based on the molecular weight monitoring with NIRS[D]. Jinan: Shandong University, 2019.]
- [15] ZHU C L, ZHANG J L, LI L Y, et al. Purification and characterization of hyaluronate lyase from *arthrobacter globiformis* A152[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182(1): 216-228.
- [16] 姜言晖, 张京良, 江晓路. 球形节杆菌 A152 产透明质酸酶的发酵优化及动力学模型的建立[J]. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1883-1888. [JIANG Yanhui, ZHANG Jingliang, JIANG Xiaolu. Establishment of kinetics digital model for hyaluronate lyase production based on fermentation optimization of *Arthrobacter globiformis* A152[J]. *Chin J Biotech*, 2017, 33(11): 1883-1888.]
- [17] GAO Z, CHEN J, QIU S, et al. Optimization of selenylation modification for garlic polysaccharide based on immune-enhancing activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 560-569.
- [18] SILVIA R, GIOVANNA B, SARATH B N, et al. Advanced quantitative proteomics to evaluate molecular effects of low-molecular-weight hyaluronic acid in human dermal fibroblasts[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 185(5): 113199.
- [19] 陈晓磊, 刘盼, 陈夫山. 麦麸多肽抗氧化及吸湿保湿性能的测定[J]. 齐鲁工业大学学报, 2018, 32(2): 8-12. [CHEN Xiaolei, LIU Pan, CHEN Fushan. Determination of antioxidative and moisture absorption and moisture retention properties of wheat bran peptides[J]. *Journal of Qilu University of Technology*, 2018, 32(2): 8-12.]
- [20] 屈义, 周斯仪, 冯陶, 等. 鱼鳔糖胺聚糖的提取及其吸湿保湿性能评价[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 118-125. [QU Yi, ZHOU Siyi, FENG Tao, et al. Extraction of glycosaminoglycans from swim bladder and evaluation of the capacities of its hygroscopicity and moisture retention[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(16): 118-125.]
- [21] LUDOWIEHG J, VENNESLAND B, DORFMAN A. The mechanism of action of hyaluronidase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236: 333-339.
- [22] SATISH L, SANTRA S, TSURKAN M V, et al. Conformational changes of GDNF-derived peptide induced by heparin, heparan sulfate, and sulfated hyaluronic acid—analysis by circular dichroism spectroscopy and molecular dynamics simulation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182: 2144-2150.
- [23] ZHA S, ZHAO Q, CHEN J, et al. Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*)[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 111: 584-587.
- [24] GUO S, MAO W, LI Y, et al. Preparation, structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW[J]. *Process Biochem*, 2013, 48: 539-544.
- [25] HAO L, SHENG Z, LU J, et al. Characterization and antioxidant activities of extracellular and intracellular polysaccharides from *Fomitopsis pinicola*[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 141: 54-59.
- [26] JESUS V, MIRIAM R G, UXIA R V, et al. Hyaluronic acid of tailored molecular weight by enzymatic and acid depolymerization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 788-794.
- [27] GUO X, LIU F, ZHU X, et al. Expression of a novel hyaluronidase from *Streptococcus zooepidemicus* in *Escherichia coli* and its application for the preparation of HA oligosaccharides[J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 77: 254-260.
- [28] KAKIZAKI I, IBORI N, KOJIMA K, et al. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase[J]. *FEBS J*, 2010, 277: 1025-1033.
- [29] 刘坤, 白阳, 杨靖, 等. 基于透明质酸构筑的药物递送载体及其应用[J]. 化学通报, 2021, 84(3): 225-231. [LIU Kun, BAI Yang, YANG Jing, et al. Hyaluronic acid-based drug delivery carriers and their applications[J]. *Chemistry Bulletin*, 2021, 84(3): 225-231.]
- [30] 郭丽, 胡欣月, 马松艳, 等. 透明质酸对胶原蛋白复合物抗氧化增效作用及应用[J]. 食品科技, 2020, 45(12): 258-264. [GUO Li, HU Xinyue, MA Songyan, et al. Synergistic effect and application of hyaluronic acid on antioxidant activity of collagen complex[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(12): 258-264.]