全润, 吴晓龙, 刘容旭, 等. 高静水压对牛睾丸透明质酸酶水解高分子量透明质酸及水解产物结构的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(6): 131−140. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090163
QUAN Run, WU Xiaolong, LIU Rongxu, et al. Effects of High Hydrostatic Pressure on Hydrolysis of High Molecular Weight Hyaluronic Acid by Bovine Testicular Hyaluronidase and Structure of Hydrolysis Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(6): 131−140. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090163

·研究与探讨·

高静水压对牛睾丸透明质酸酶水解高分子量透明质酸及水解产物结构的影响

全　润[1], 吴晓龙[1], 刘容旭[2], 张俊杰[1], 韩建春[1,2,*], 刘丹怡[2,*]
（1.东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;
2.黑龙江省绿色食品科学研究院, 黑龙江哈尔滨 150028）

摘　要: 为探究高静水压对高分子量透明质酸（High molecular weight hyaluronic acid，HMW-HA）酶解的影响，本研究采用高静水压（0.1、50、100、150、200 MPa）辅助牛睾丸透明质酸酶水解 HMW-HA，并对水解产物的水解度和分子量进行测定，探讨压强、水解时间及酶浓度对水解效果的影响，以确定合适的反应条件。此外，采用傅里叶红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FT-IR）、X 射线衍射（X-ray diffraction，XRD）、核磁共振（Uclear magnetic resonance，NMR）、差示扫描量热法（Uclear magnetic resonance，DSC）等方法对水解产物的化学结构及热稳定性进行测定。结果表明，在 0.1、50、100、150、200 MPa 压强处理下，40000 U/g 酶浓度的牛睾丸透明质酸酶适合低分子量透明质酸（Low molecular weight hyaluronic acid，LMW-HA）的制备。50 MPa 及 100 MPa 压强可有效控制 HMW-HA 过度水解为 HA 寡聚糖，增加 LMW-HA 含量，100 MPa 处理的 LMW-HA 含量最高，达到 65.5%，比常压增加 19.9%。然而，过高压强（150、200 MPa）处理则会抑制牛睾丸透明质酸酶水解 HMW-HA。FT-IR 和 NMR 结果表明高静水压处理不会明显破坏水解产物的化学结构，但 XRD 表明高压显著破坏其晶体结构，结晶度随压强增加而减小。另外，DSC 结果表明，较低压强处理（50、100 MPa）对水解产物热稳定性影响较小，较高压强处理（150、200 MPa）则会显著（P<0.0.5）改变其热稳定性。综上所述，适当压强的高静水压处理可抑制 HMW-HA 水解为寡聚糖且对其化学结构影响小，增加低分子量透明质酸产量。

关键词: 高静水压, 透明质酸, 牛睾丸透明质酸酶, 酶解, 低分子量, 结构分析
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)06−0131−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090163
本文网刊:

Effects of High Hydrostatic Pressure on Hydrolysis of High Molecular Weight Hyaluronic Acid by Bovine Testicular Hyaluronidase and Structure of Hydrolysis Products

QUAN Run[1], WU Xiaolong[1], LIU Rongxu[2], ZHANG Junjie[1], HAN Jianchun[1,2,*], LIU Danyi[2,*]
（1.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2.Heilongjiang Institute of Green Food Science, Harbin 150028, China）

Abstract: To investigate the effect of high hydrostatic pressure on the enzymatic hydrolysis of high molecular weight hyaluronic acid (HMW-HA). This study adopted high hydrostatic pressure (0.1, 50, 100, 150 and 200 MPa) to assist bovine testicular hyaluronidase in hydrolyzing HMW-HA. Subsequently, the degree of hydrolysis and molecular weight of the hydrolysate were measured to investigate the effects of pressure, hydrolysis time, and enzyme concentration on the

收稿日期: 2025−09−05
基金项目: 黑龙江省博士后面上资助（LBH-Z24109）。
作者简介: 全润（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: quanrun321@126.com。
*** 通信作者:** 韩建春（1973−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 副产物综合利用, E-mail: hanjianchun@hotmail.com。
刘丹怡（1990−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 副产物综合利用, E-mail: liudanyi@126.com。

hydrolysis results, thereby determining optimal reaction conditions. Additionally, the chemical structure and thermal stability of the hydrolysis products were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), nuclear magnetic resonance (NMR), and differential scanning calorimetry (DSC). The results indicated that bovine testicular hyaluronidase at a concentration of 40000 U/g was suitable for the preparation of low molecular weight hyaluronic acid (LMW-HA) under pressure treatments ranging from 0.1, 50, 100, 150 and 200 MPa. Pressures of 50 MPa and 100 MPa effectively controlled the excessive hydrolysis of HMW-HA into HA oligosaccharides, increased the LMW-HA content. The 100 MPa treatment yielded the highest LMW-HA content at 65.5%, representing a 19.9% increase compared to atmospheric pressure. However, treatment with excessively high pressure (150, 200 MPa) inhibited bovine testicular hyaluronidase from hydrolyzing HMW-HA. FT-IR and NMR results indicated that high hydrostatic pressure treatment did not significantly disrupt the chemical structure of hydrolysates. However, XRD analysis revealed that high pressure markedly disrupted their crystalline structure, with crystallinity decreasing as pressure increases. Additionally, DSC results indicated that lower pressure treatments (50, 100 MPa) had a minor effect on the thermal stability of hydrolysate products, whereas higher pressure treatments (150, 200 MPa) significantly (P<0.05) altered their thermal stability. In summary, high hydrostatic pressure treatment at appropriate pressure can inhibit the hydrolysis of HMW-HA into oligosaccharides while minimally affecting its chemical structure, thereby increasing the yield of low molecular weight hyaluronic acid.

Key words: high hydrostatic pressure; hyaluronic acid; bovine testicular hyaluronidase; enzymatic hydrolysis; low molecular weight; structural analysis

透明质酸(Hyaluronan acid, HA)是一种由 N-乙酰氨基葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸通过 β-1,3 糖苷键组成二糖重复单元, 再通过 β-1,4 糖苷键连接重复单元构成的阴离子非硫酸化线性糖胺聚糖[1]。HA 在细胞外基质中含量丰富, 主要分布于皮肤组织、结缔组织、关节滑液及玻璃体周围[2], 具有多种生物功能。根据分子量(Molecular weight, MW)可将 HA 分为高分子量 HA、中分子量 HA、低分子量 HA(Low molecular weight hyaluronic acid, LMW-HA)和低分子量寡聚糖[3]。不同分子量 HA 具有不同生物功能, 甚至表现出相反作用。其中, LMW-HA(10 kDa≤MW<100 kDa)具有调节炎症、促进伤口愈合、促进血管生成及增强肠道上皮屏障等生物功能[4−6], 已广泛应用于食品、化妆品及生物医药行业。

目前, LMW-HA 主要通过物理降解法、化学降解法、生物合成法和酶水解法制备。物理降解包括微波降解、超声降解和 γ 射线降解等, 存在降解时间长、降解产物成分不均一、降解不彻底(难以获得小分子量 LMW-HA)等缺点[7]。酸处理、碱处理及氧化剂处理是常见的化学降解方法, 常与物理降解联用, 克服物理降解不彻底的缺点, 但此方法反应过快, 降解过程不易控制导致产物质量不可控, 还会破坏 LMW-HA 结构[8]。生物合成的反应条件复杂且严格, 成本高[9]。酶水解可特异性降解透明质酸, 其具有降解条件温和、降解效率高且易控制、降解副产物少和纯度高等优势, 弥补物理降解及化学降解的缺点。牛睾丸透明质酸酶可特异性水解 HA 链的 β-1,4 糖苷键, 生成还原端以乙酰氨基葡萄糖为主要产物的 LMW-HA。Čožíková等[10] 使用牛睾丸透明质酸酶将 1600 kDa HA 降解为 41.8、38.4 及 41.9 kDa 等分子量的 LMW-HA。但是, 牛睾丸透明质酸酶水解制备 LMW-HA 仍存在产率低、产物分子量范围大的问题[11]。因此, 探索一种增加酶水解制备 LMW-HA 产率的方法尤为重要。

高静水压(High hydrostatic pressure, HHP)是一种非热、清洁的加工技术, 也被称为冷巴氏杀菌技术[12], 被广泛应用于蛋白质及多糖的改性。HHP 可以改变多糖中较弱的化学键, 如氢键、离子键及范德华力等, 影响多糖的空间构型、螺旋结构及结晶度[13−14], 导致多糖分子变形、拉伸、折叠或膨胀, 可能暴露酶的作用位点, 增加酶解速率, 提升产率。另外, HHP 破坏蛋白质中较弱的化学键, 如氢键、疏水键和离子键等[15], 对其二级结构影响比较大, 进一步导致蛋白质去折叠, 这可能暴露更多酶的结合位点。Shin 等[16] 发现 50~200 MPa 压强处理可增加 Pluszyme 2000P 酶的活性, 且可促进难以水解的糖基结构水解。尽管 HHP 在辅助酶解方面具有巨大潜力, 但是目前针对 HHP 辅助透明质酸酶水解的研究较为匮乏。

鉴于此, 本研究采用高静水压辅助牛睾丸透明质酸酶水解高分子量透明质酸制备 LMW-HA, 探究酶浓度、压强及水解时间对水解产物分子量的影响, 并对其结构进行表征, 以期为 LMW-HA 的开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

透明质酸(MW 为 1240 kDa) 青岛惠诺德生物科技有限公司; 低分子量透明质酸标准样品(MW 分别为 35、60 kDa) 山东丽阳生物科技有限公司; 牛睾丸透明质酸酶(805 U/mg)、琼脂糖 北京索莱宝科技有限公司; 氯化镁、氯化钠、蔗糖、葡萄糖、苯酚 天津市天力化学试剂有限公司; N-乙酰-D-氨基葡萄糖、对二甲氨基苯甲醛、Stains-All 染色剂、溴酚蓝 上海麦克林生化科技股份有限公司; 冰

醋酸、硫酸　天津市科密欧化学试剂有限公司；3,5-二硝基水杨酸　上海展云化工有限公司；酒石酸钾钠、硫酸铜、浓盐酸　国药集团化学试剂有限公司；以上试剂均为分析纯。

L-539 超微分子压缩仪　沈阳人和机电工程设备有限公司；T6S 紫外可见光分光光度计　北京普析通用仪器有限公司；FD-1A-50 真空冷冻干燥机　长沙巴跃仪器有限公司；Power Pac HC 电泳仪　美国 Bio Rad 生命医学有限公司；PL-GPC50 凝胶渗透色谱仪　安捷伦科技（中国）有限公司；DSC25 差示扫描量热仪　美国 TA 仪器公司；AVANCE III 400MHz 液体核磁共振波谱仪　德国布鲁克仪器公司；Nicolet is50 傅里叶变换红外光谱仪　赛默飞世尔科技（中国）有限公司；XRD-6100 X 射线衍射仪　日本岛津公司；SU8010扫描电子显微镜　日本日立公司。

1.2　实验方法

1.2.1　高静水压对牛睾丸透明质酸酶活性的影响　使用混合溶液（含 1 mmol/L $MgCl_2$ 和 85 mmol/L NaCl）配制 10 mg/mL 牛睾丸透明质酸酶溶液，装入聚乙烯袋，密封后放入超微分子压缩仪，分别在 37 ℃，0.1、100、200、300、400、500 MPa 压力下处理 20 min。测定不同压强下牛睾丸透明质酸酶的酶活，筛选对牛睾丸透明质酸酶活力影响小的压力条件。

1.2.2　低分子量透明质酸的制备　依据郭田田等[17]的 HA35 制备方法并稍作修改，准确称取 15 份 200 mg HMW-HA（MW 为 1240 kDa）分别置于聚乙烯袋中，加入 10 mL 超纯水，混合均匀。当 HMW-HA 完全溶于超纯水后，加入 $MgCl_2$ 和 NaCl 溶液，使其终浓度分别为 1 mmol/L 和 85 mmol/L，振荡均匀。然后分别加入 20000、40000、80000 U/g 牛睾丸透明质酸酶，混合均匀。将混合溶液放入 37 ℃ 超微分子压缩仪中，在 0.1、50、100、150 及 200 MPa 压强下分别反应 1、3、5 h。水解结束后立即将其放入 85 ℃ 水浴锅加热 15 min。随后将水解液转入离心机，在 8000 r/min下离心 30 min，收集上清液，将其置于培养皿中冻干，于 4 ℃ 保存备用。

1.2.3　蛋白含量测定　依据张立娟等[18]的方法稍作修改，使用双缩脲法测定牛睾丸透明质酸酶的蛋白含量。取 1 mL 牛睾丸透明质酸酶溶液（10 mg/mL）置于试管中，向试管中加入 4 mL 双缩脲试剂，测定 540 nm 处吸光度。以牛血清蛋白为标准溶液（0~10 mg/mL）作标准曲线（y=0.0501x+0.007, R^2=0.991），根据标曲方程计算总蛋白含量。

1.2.4　牛睾丸透明质酸酶活力测定　牛睾丸透明质酸酶活力依据 Magalhães 等[19]的方法测定，略有修改。DMAB 显色剂由 10 g 对二甲氨基苯甲醛（DMAB）、12.5 mL 浓盐酸和 87.5 mL 冰醋酸制成。使用 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液（pH5.0，含 0.2 mol/L NaCl 溶液）配制 1.5 mg/mL 透明质酸标准溶液。准备 0.15 mL 牛睾丸透明质酸酶溶液，与 0.6 mL 透明质酸标准溶液混合均匀，37 ℃ 水浴 15 min。孵育结束后加入 0.165 mL 四硼酸钾溶液，混匀后沸水浴 4.5 min。冷却至室温，向混合液中加入 4.5 mL 稀释至 10 倍体积的 DMAB 显色剂（冰醋酸稀释），在 37 ℃ 水浴 20 min。冷却至室温后，在 4 ℃，10000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液在 585 nm 处测定吸光值，以灭活牛睾丸透明质酸酶为空白。以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖（0~0.75 mmol/mL）作标准曲线（y=0.4034x−0.0005, R^2=0.9991），计算总活力。酶的比活力根据下式计算：

$$\text{比活力(U/mg)}\frac{\text{总活力}}{\text{总蛋白含量}}$$

1.2.5　水解度测定　根据 Yang 等[20]的硫酸-苯酚法测定总糖含量。准备 2 mL 水解液（0.1 mg/mL）于具塞试管中，用蒸馏水补足至 2 mL，然后各加入 1 mL 5% 苯酚溶液，混匀后快速加入浓硫酸，于 100 ℃ 水浴 20 min，冷却至室温后在 490 nm 处测定吸光度。以葡萄糖（0~0.1 mg/mL）作标准曲线（y=5.2286x+0.0132, R^2=0.9935），根据标曲方程计算总糖含量。

根据胡腾根[21]的实验方法，采用 DNS 法测定还原糖含量，略有改动。取 2 mL 水解液（水解 0 h 浓度为 5 mg/mL，水解 1、3、5 h 浓度为 1 mg/mL）于具塞试管中，加入 3 mL DNS 溶液混匀，100 ℃ 水浴 5 min。冷却至室温，再次加入蒸馏水补足至 15 mL，混匀后在 540 nm 处测定吸光度。以葡萄糖作标准曲线（y=0.7514x−0.106, R^2=0.998），根据标曲方程计算还原糖含量。HA 水解产物的水解度计算如下：

$$\text{水解度}(\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_2} \times 100$$

式中，m_0 为水解前还原糖含量，mg/mL；m_1 为水解后还原糖含量，mg/mL；m_2 为总糖含量，mg/mL。

1.2.6　琼脂糖凝胶电泳　根据郭田田等[22]的实验方法略有改动。准确称取 0.3 g 琼脂糖于锥形瓶中，加入 30 mL 1×TBE，使用微波炉加热至略微沸腾，混合均匀后再次加热至溶液沸腾。将溶液倒入插有梳子的制胶板中，待凝胶凝固后拔下梳子，然后加入 1×TBE 溶液，浸没至凝胶 2~3 mm。上样缓冲液由 2 mol/L 蔗糖和 0.02% 溴酚蓝溶液配制。将 35 kDa 和 60 kDa HA 标准品及样品分别与上样缓冲液以 4∶1 比例混匀，取一定量混合溶液加入凝胶孔。在电压 70 V 条件下，水平电泳 2~4 h。电泳结束后，使用 stains-all 染色液避光振荡染色 14 h。染色结束后立即用蒸馏水清洗琼脂糖凝胶，然后浸没在蒸馏水中日光下脱色，直至无背景色且条带清晰。

1.2.7　凝胶渗透色谱分析　使用凝胶渗透色谱（Gel permeation chromatography, GPC）联用示差检测器分析不同压强下酶解产物分子量及分子量分布，色谱柱为 Ultrahydrogel IMlinear（300 mm×7.8 mm），流

动相为 0.1 mol/L 硝酸钠，样品用流动相配制为 5 mg/mL 溶液，上样量为 20 μL，柱温为 40 ℃，以 0.5 mL/min 的流速洗脱。以标准品 Dextran T-300（300.60 kDa）、Dextran T-150（135.03 kDa）、Dextran T-10（9.75 kDa）、Dextran T-5（2.70 kDa）、葡萄糖（0.18 kDa）确定标准曲线（lg 分子量=13.0−0.474×$T_{保留时间}$，R^2=0.9945）。

1.2.8 高静水压对低分子量透明质酸结构的影响

1.2.8.1 傅里叶红外光谱分析 参考 Chen 等[23] 的实验方法，测定 0.1、50、100、150 及 200 MPa 酶解 5 h 产物的傅里叶红外光谱。称取 2 mg 样品和 200 mg 的 KBr 粉末，压成片状后进行干燥处理，然后在 400~4000 cm^{-1} 的波数范围内扫描，记录光谱数据。

1.2.8.2 X 射线衍射分析 参考 Wang 等[24] 的实验方法，略有改动，使用 X 射线衍射仪测定 0.1、50、100、150 及 200 MPa 酶解 5 h 产物的 XRD。扫描电压和电流为 40 kV 和 200 mA，扫描范围为 5°~90°，扫描速度为 0.5°/min。

1.2.8.3 一维核磁共振分析 参考 Xie 等[25] 的实验方法，略有改动。将不同压强下酶解 5 h 的产物分别溶解于 D_2O 中，使其浓度为 20 mg/mL。在 296.9 K、400 MHz 的条件下，检测酶解样品的 1D 碳谱和 1D 氢谱，使用 MestReNova 软件分析 ^{1}H-NMR 谱及 ^{13}C-NMR 谱。

1.2.8.4 扫描电子显微镜分析 使用 SEM 观察不同压强酶解 5 h 产物的微观结构。将适量酶解样品固定在金属板上，除去未固定样品，进行喷金处理，分别在 500 倍和 5000 倍下观察。

1.2.9 热稳定性分析 根据 Yang 等[20] 的实验方法，通过差示扫描量热（DSC）分析不同压强下酶解产物的热特性。将 2 mg 样品放入坩埚中，在氮气中以 50 mL/min 的流速从 25 ℃ 加热至 300 ℃，升温速率为 10 ℃/min。

1.3 数据处理

所有实验均重复三次。数据统计分析采用 Microsoft Office 软件，结果以平均值±标准差表示。采用 Prism 软件对数据进行差异显著性分析，组间及组内分析采用单因素方差（ANOVA）分析（P<0.05）。使用 Origin 2022 软件进行图像绘制。

2 结果与分析

2.1 高静水压对牛睾丸透明质酸酶活性的影响

为确定高静水压辅助水解的压强范围，在 0.1、100、200、300、400、500 MPa 压强下评估酶活性。如图 1 所示，随着压强增加，牛睾丸透明质酸酶活力逐渐下降。当压强增加到 300 MPa 时，酶活力显著降低（P<0.05），压强达到 500 MPa 时完全抑制酶活性。这可能是由于高静水压影响酶蛋白的三、四级结构，改变酶构象，这种影响随压强增加而增大，过高压强使酶结构发生不可逆破坏[26]，降低酶活力，甚至导致酶完全失活。Guan 等[27] 发现压强 300 MPa 下 Corolase PP 复合酶部分变性，导致水解度降低。压强过大引起酶蛋白结构剧烈破坏，导致酶活力下降。因此，为减小压强对牛睾丸透明质酸酶活力的影响，选择 0.1~200 MPa 压强辅助水解制备 LMW-HA。

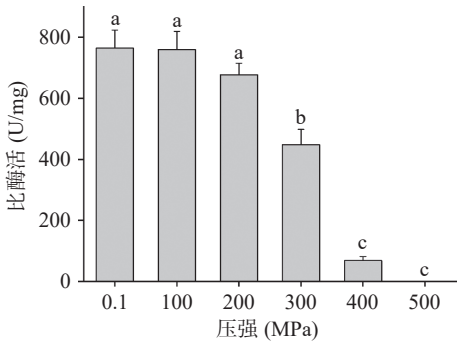


图 1 不同压强对牛睾丸透明质酸酶活性的影响

Fig.1 Effect of different pressures on hyaluronidase activity in bovine testes

注：不同小写字母表示存在显著差异（P<0.05）。

2.2 高静水压对 HMW-HA 水解过程的影响

HHP 辅助牛睾丸透明质酸酶水解 HMW-HA 的水解度如图 2 所示，在不同压强下水解 1 h，水解度随酶浓度增加显著升高（P<0.05）。当水解至 3 h 时，在 0.1、50、100、150 MPa 压强处理下，40000 U/g 和

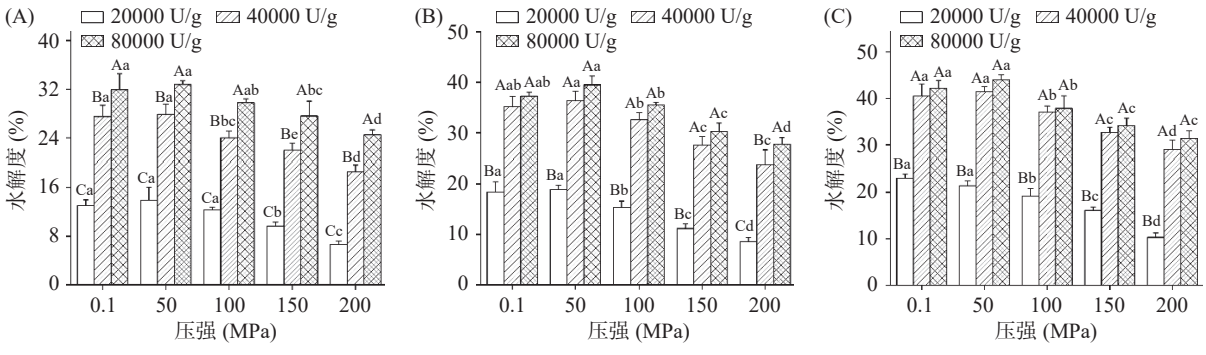


图 2 不同处理时间下 HHP 处理对 HMW-HA 水解产物水解度的影响

Fig.2 Effect of HHP treatment on the hydrolysis degree of HMW-HA hydrolysates under different processing times

注：(A)~(C)依次为水解 1、3、5 h；不同大写字母表示同一处理压强不同酶浓度间差异显著（P<0.05）；不同小写字母表示同一处理酶浓度不同压强间存在显著差异（P<0.05）。

80000 U/g 酶浓度的水解度无显著差异（P>0.05）。在不同压强下水解至 5 h 时，40000 U/g 和 80000 U/g 酶浓度的水解度无显著差异（P>0.05）。与水解 1 h 对比，水解 3 h 和 5 h 的水解度增加变缓。这些结果说明在 1 h 内水解反应迅速发生。随着水解时间的增加，HMW-HA 含量逐渐降低，导致酶和多糖的有效结合降低，LMW-HA 的增加也可抑制反应[28]。水解 3 h 以上制备 LMW-HA，最佳酶浓度为 40000 U/g。与在 40000 U/g 酶浓度和 0.1 MPa 处理下水解 1、3、5 h 的水解度对比，50 MPa 处理下水解 1、3、5 h 的水解度增加不显著（P>0.05），100~200 MPa 处理下水解 1、3、5 h 的水解度下降显著（P<0.05）。水解度越高水解越彻底，实验结果说明高压处理可减缓 HMW-HA 过度水解为 HA寡聚糖。然而 50、100、150、200 MPa 高压处理不会明显抑制牛睾丸透明质酸酶活性，说明高静水压抑制 HMW-HA 过度水解的原因不是酶活力下降而导致。

HA 分子量与其生物功能密切相关[29]。通过琼脂糖凝胶电泳分析 HMW-HA 在 HHP 处理 1、3、5 h 的水解产物分子量变化见图 3。如图 3 所示，随着压强的增加，条带均明显向上偏移，说明 HHP 处理抑制 HMW-HA 的酶解，压强增加导致抑制作用增强。

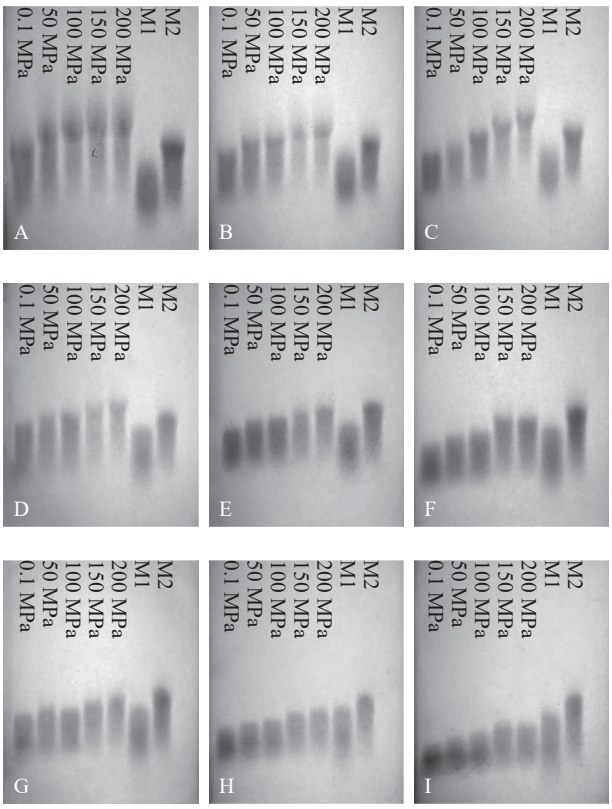


图 3　HHP 处理下 HMW-HA 水解产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3　Agarose gel electrophoresis of HMW-HA hydrolysis products under HHP treatment

注：A~C 依次为 20000 U/mg 酶浓度在不同压强下水解 1、3、5 h；D~F 依次为 40000 U/mg 酶浓度在不同压强下水解 1、3、5 h；G~I 依次为 80000 U/mg 酶浓度在不同压强下水解 1、3、5 h；其中，M1 为 35 kDa 透明质酸样品，M2 为 60 kDa 透明质酸样品。

在 20000 U/g 酶浓度、HHP 辅助水解 5 h 无法获得较低分子量 LMW-HA。40000、80000 U/g 酶浓度水解能获得 35 kDa 左右的低分子量 LMW-HA，但是 80000 U/g 酶浓度处理无法获得较大分子量 LMW-HA。综上，40000 U/g 酶浓度高静水压处理适用于制备 LMW-HA。

2.3　高静水压对 HMW-HA 水解过程分子量的影响

图 4 展示了 40000 U/g 酶浓度牛睾丸透明质酸酶在高静水压下水解 HMW-HA 的水解产物分子量变化。如图 4A 所示，随着反应时间的增加，产物分子量呈下降趋势。而酶解时间固定，增加酶解压强，产物分子量则越大，与水解度及琼脂糖凝胶电泳结果相符合。150 MPa 及 200 MPa 处理的水解产物分子量与 0.1、50 及 100 MPa 处理的分子量差异大，这可能是由于高压抑制牛睾丸透明质酸酶活性，水解速率下降，导致平均分子量远大于低压处理（0.1、50、100 MPa）。由图 4B 所示，与 0.1 MPa 对比，随着压强增加，色谱峰明显向左偏移，分子量低于 10 kDa（HA 寡聚糖）面积明显减少。压强为 100 MPa 时，分子量在 35 kDa 左右达到最大值且 LMW-HA 含量最高，达到 65.5%，比 0.1 MPa 处理增加 19.9%。而继续增加压强，分子量高于 100 kDa 的面积增大。综上，一定强度压强（50、100 MPa）处理可抑制 LMW-HA 水解为 HA 寡聚糖，增加 LMW-HA 产量。压强高于 100 MPa 则会抑制牛睾丸透明质酸酶活性，降低其降解速率，不利于 LMW-HA 制备。

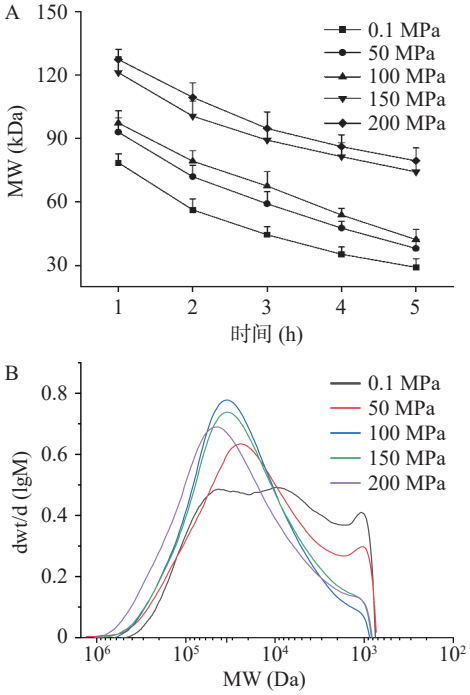


图 4　不同压强对 HMW-HA 水解产物分子量的影响

Fig.4　Effect of different pressures on the molecular weight of HMW-HA hydrolysis products

注：A 为反应压强和反应时间对 HMW-HA 水解产物分子量的影响；B 为反应压强对 HMW-HA 水解 5 h 的产物分子量分布的影响。

2.4　HHP 对 LMW-HA 结构的影响

2.4.1　傅里叶红外光谱分析　如图 5 所示，不同压强辅助水解制备的 LMW-HA 具有相似的 FT-IR 光谱，主要吸收峰分别为 3437.8、2831.7、1592.6、1360.4、1106.3、773.9、622.4 cm^{-1}，这些吸收峰符合多糖典型吸收峰。3437 cm^{-1} 处出现一个宽大吸收峰，是 O-H 伸缩振动引起，可形成糖分子内及分子间氢键[30]。2831.7 cm^{-1} 处的弱吸收峰是 C-H 的对称振动峰，这两种峰为多糖特征吸收峰[31]。1592.6 cm^{-1} 和 1360.4 cm^{-1} 处的较强吸收峰则是 C=O 及 C-H 的振动峰[32]。1106.3 cm^{-1} 处的吸收峰可能与吡喃糖环中 C-O 键有关[33]，900~500 cm^{-1} 处出现的两个弱吸收峰则是 HA 吡喃糖骨架引起[34]。与 0.1 MPa 处理对比，50、100、150、200 MPa 处理的 LMW-HA 主要吸收峰(官能团)几乎相同且无偏移，表明 HHP 条件下 LMW-HA 结构没有明显影响。Zhong 等[35] 发现果胶通过 200~600 MPa 压强处理后 FT-IR 光谱图几乎相同，HHP 处理后果胶化学结构保持不变，与本文结果相似。

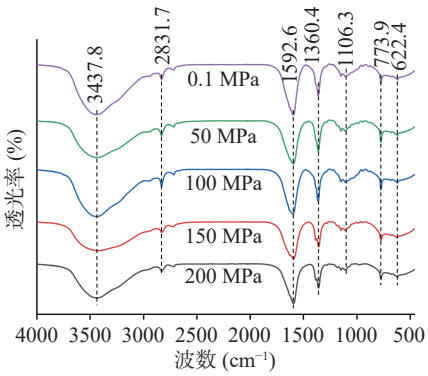


图 5　不同压强辅助酶解 5 h 水解产物的红外光谱图

Fig.5　Infrared spectra of hydrolysis products after 5 h of enzymatic hydrolysis under different pressures

2.4.2　X 射线衍射分析　多糖的结晶及非结晶结构与其衍射性质显著联系，使用 X 射线衍射可测量多糖的晶体结构。高结晶度多糖具有尖锐的衍射峰，低结晶度多糖具有较宽的衍射峰，弥散区域则代表非结晶区域[36]。如图 6 所示，0.1 MPa 处理组在 14°及 17°左右发现 2 个明显且尖锐的衍射峰，19°、26°、32°及 46°出现 4 个窄小的衍射峰。HHP 处理组只在 32°和 46°附近存在 2 个窄小的衍射峰，存在大量弥散区域，说明 0.1 MPa 处理组结晶度最高，HHP 处理会破坏 LMW-HA 的晶体结构。Wang 等[37] 通过 HHP 辅助支链淀粉酶制备去支莲子淀粉，发现 HHP 处理会破坏莲子淀粉的双螺旋结构，减弱其特征峰。所以，HHP 可能破坏 LMW-HA 的三、四级结构，导致其晶体结构发生变化。另外，通过 Jade 软件计算 0.1、50、100、150 及 200 MPa 的结晶度分别为 65.04%、37.05%、31.51%、24.51%、16.72%，结果显示结晶度随压强的增加而减小。

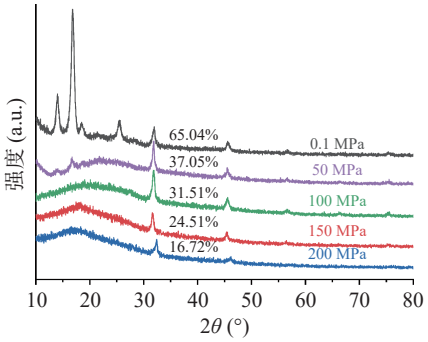
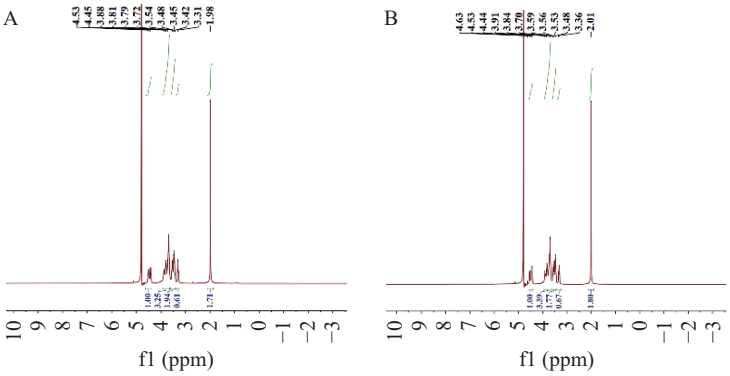


图 6　不同压强辅助水解 5 h 水解产物的 XRD 衍射图

Fig.6　XRD diffraction patterns of hydrolysis products after 5 h of hydrolysis under different pressures

2.4.3　核磁共振分析　通过一维 NMR 的碳谱和氢谱分析 HHP 辅助水解对 LMW-HA 化学结构的影响。水解产物的 ^{1}H-NMR 如图 7 所示，在 δ4.6~δ1.9 间出现主要化学位移。一般来说，化学位移值大于 5.0 ppm 的峰对应 α-异头氢，而小于 5.0 ppm 的峰对应 β-异头氢[38]，LMW-HA 化学位移都小于 5.0 ppm，是由其 β 构型糖基引起。2 ppm 左右的化学位移是 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的甲基质子，3.25 ppm 和 4.55 ppm 间的这些化学位移为葡萄糖醛酸及 N-乙酰-D-氨基葡萄糖胺的异构质子，与先前的研究基本一致[39]。不同压强辅助酶解的 LMW-HA 化学位移与未高压处理的 LMW-HA 相似，说明 HHP 未明显改变 LMW-HA 的功能基团结构。但是，HHP 处理下在 4.5 ppm 附近产生更多信号，这可能是高压下改变酶解方式，导致结构发生轻微变化。如图 8 所示，68~104 ppm 之间及 54 ppm 附近的化学位移是葡萄糖醛酸异头碳信号，其余化学位移则是 N-乙酰-D-氨



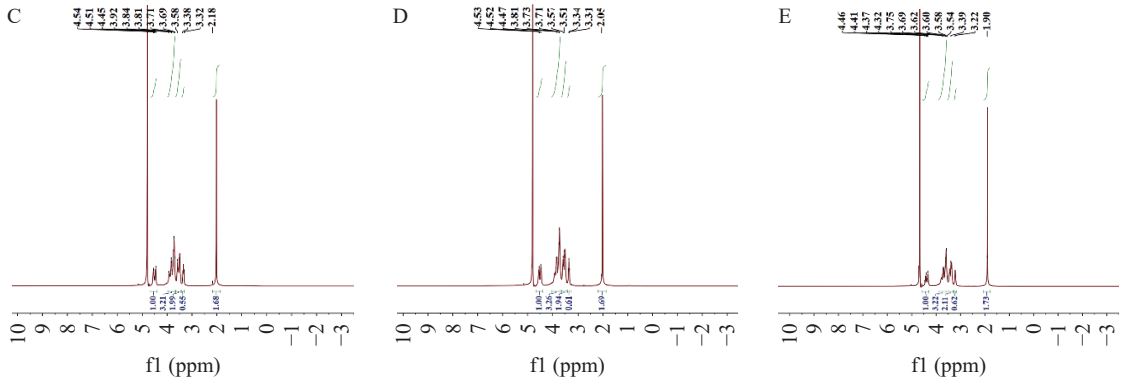


图 7　不同压强辅助水解 5 h 水解产物的^{1}H-NMR 谱图

Fig.7　^{1}H-NMR spectra of hydrolysis products after 5 h of hydrolysis under different pressures

注：A~E 依次为 0.1、50、100、150、200 MPa 压强处理。

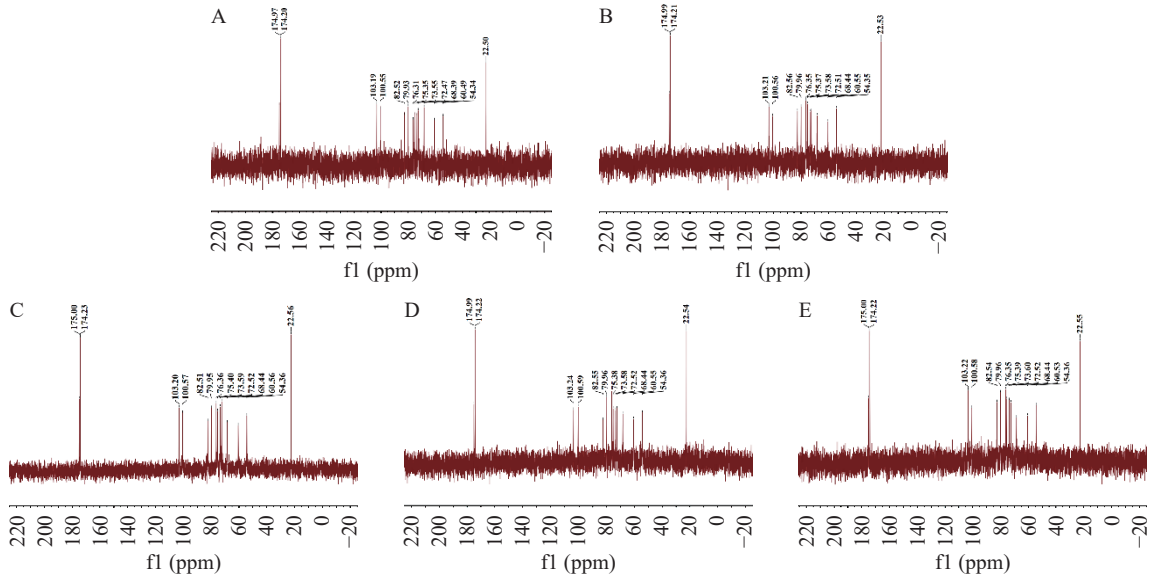


图 8　不同压强辅助水解 5 h 水解产物的^{13}C-NMR 谱图

Fig.8　^{13}C-NMR spectra of hydrolysis products after 5 h of hydrolysis under different pressures

注：A~E 依次为 0.1、50、100、150、200 MPa 压强处理。

基葡萄糖的异头碳信号[40]。与 0.1 MPa 对比，HHP 辅助酶解的水解产物的碳谱化学位移基本一致。NMR 结果与傅里叶红外光谱结果对应，HHP 辅助酶解不会对水解产物结构产生明显破坏。

2.4.4　SEM 分析　HHP 辅助水解对 LMW-HA 微观结构的影响如图 9 所示。0.1 MPa 处理时，500 倍下观察到水解产物表面光滑，5000 倍下其呈现片状结构，表面规则，没有结构碎片。HHP 处理的水解产

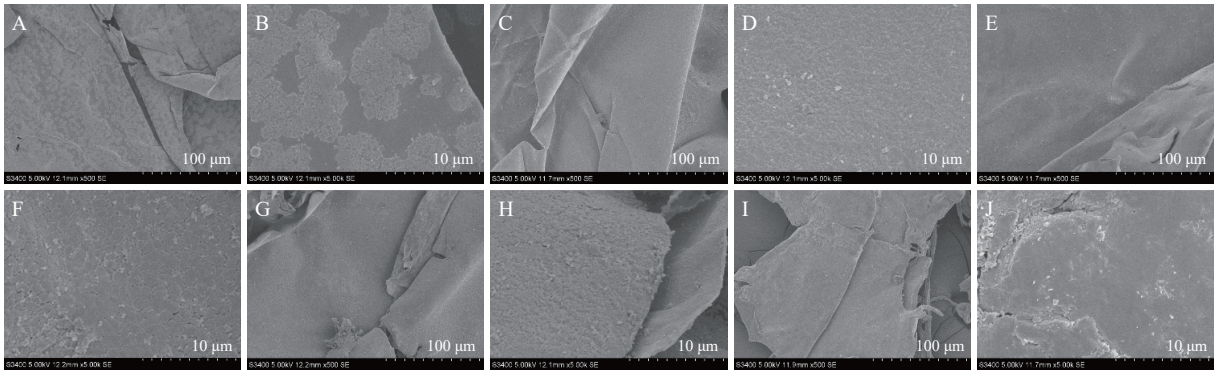


图 9　不同压强辅助水解 5 h 水解产物的扫描电镜图

Fig.9　SEM images of hydrolysis products after 5 h of hydrolysis under different pressures

注：A、C、E、G、I 分别为 0.1、50、100、150、200 MPa 水解产物 500×电镜图；B、D、F、H、J 分别为0.1、50、100、150、200 MPa 水解产物 5000×电镜图。

物在 500 倍下表面结构变化不大，但是表面可观察到结构碎片；在 5000 倍下表面变得粗糙，凹凸不平，尤其是 200 MPa 处理下观察到明显的孔洞。研究结果表明，HHP 处理会破坏 LMW-HA 颗粒的结构并改变其表面形态，这种影响随压强的增加而加强。这一结论与 Zheng 等[41] 的研究一致，观察到 100~300 MPa 超高压辅助提取多糖时，其对表面形貌的破坏随压强增大而增大。

2.5 热稳定性分析

图 10 展示了通过 DSC 法分析 0.1~200 MPa 压强处理 5 h 水解产物的热稳定性特征。整体而言，这些水解产物只出现一个吸收峰，主要是固态构型崩解及突变造成，继续增加温度没有出现放热峰，说明常压处理及 HHP 处理的 LMW-HA 都具有较好的热稳定性[42]。与 0.1 MPa 处理对比，50 MPa 和 100 MPa 处理的吸收峰略微向左偏移，而 150 MPa 和 200 MPa 处理的吸收峰则明显向右偏移，峰值温度从 93.4 ℃ 升至 112.9 ℃ 和 122.5 ℃。这些结果表明，50 MPa 和 100 MPa 压强辅助牛睾丸透明质酸酶水解对 LMW-HA 热稳定性影响不大，150MPa、200 MPa 压强处理下则会提升 LMW-HA 的热稳定性。

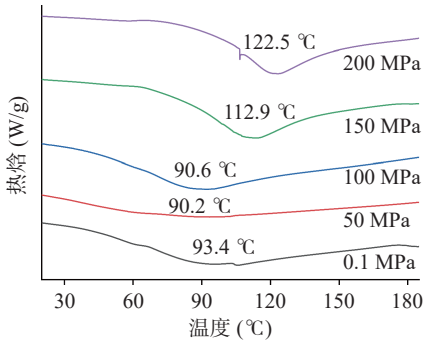


图 10 不同压强辅助酶解 5 h 水解产物的 DSC 图

Fig.10 DSC curves of hydrolysate products after 5 h of enzymatic hydrolysis under different pressures

3 结论

本研究在不同压强下对高分子量透明质酸进行水解，发现在 40000 U/g 的酶浓度下进行水解适合低分子量透明质酸的制备，高静水压辅助水解能有效减缓透明质酸水解为寡聚糖，100 MPa 压强处理的低分子量透明质酸含量最高。但是，150 MPa 及 200 MPa 压强处理会降低透明质酸降解速率。此外，傅里叶红外光谱、核磁共振及 X 射线衍射分析表明高压处理不会显著影响水解产物的化学结构，但会降低其结晶度。150 MPa 及 200 MPa 高静水压处理可提升水解产物的热稳定性。本研究建立高静水压辅助牛睾丸透明质酸酶水解高分子量透明质酸的方法，不仅为低分子量透明质酸的制备提供理论支撑，同时为其生物功能活性机制研究奠定重要实验基础。

© 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] PANG B, WANG H, HUANG H, et al. Enzymatic production of low-molecular-weight hyaluronan and its oligosaccharides: A review and prospects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(44): 14129−14139.

[2] SKANDALIS S S, KARALIS T, HELDIN P. Intracellular hyaluronan: Importance for cellular functions[J]. Seminars in Cancer Biology, 2020, 62: 20−30.

[3] 肖森, 胡立涛, 石智诚, 等. 可控分子量透明质酸的生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(2): 445−460. [XIAO S, HU L T, SHI Z C, et al. Research advances in biosynthesis of hyaluronic acid with controlledled molecular weights[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(2): 445−460.]

[4] LITWINIUK M, KREJNER A, GRZELA T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration[J]. Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice, 2016, 28(3): 78−88.

[5] 李兢思, 甘秋云, 朱琳艳, 等. 透明质酸用于伤口敷料的研究进展[J]. 化纤与纺织技术, 2022, 51(7): 18−21. [LI J S, GAN Q Y, ZHU L Y, et al. Research progress on hyaluronic acid for wound dressings[J]. Chemical Fiber & Textile Technology, 2022, 51(7): 18−21.]

[6] GUNASEKARAN A, ECKERT J, BURGE K, et al. Hyaluronan 35 kDa enhances epithelial barrier function and protects against the development of murine necrotizing enterocolitis[J]. Pediatric Research, 2020, 87(7): 1177−1184.

[7] 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 J Y, PEI X J, LIU H, et al. Progress in the synthesis of low molecular weight hyaluronic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1789−1801.]

[8] 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 X, GUO R L, WANG P L, et al. Optimization of the degradation conditions of hyaluronic acid by response surface methodology[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(1): 130−135.]

[9] 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]. 生物技术通报, 2022, 38(1): 157−167. [CEN X L, LEI X, MA S Y, et al. Heterologous expression and characterization of the hyaluronic acid lyase hyls from *Staphylococcus aureus*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(1): 157−167.]

[10] COZÍKOVÁ D, SÍLOVÁ T, MORAVCOVÁ V, et al. Preparation and extensive characterization of hyaluronan with narrow molecular weight distribution[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 160: 134−142.

[11] 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: 4471.

[12] MARCINIAK A, SUWAL S, NADERI N, et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 80: 187−198.

[13] DOMINGUEZ-AYALA J E, SOLER A, MENDEZ-MONTEALVO G, et al. Supramolecular structure and technofunctional

properties of starch modified by high hydrostatic pressure (HHP): A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119609.
[14] AHMADI S, YU C X, ZAEIM D, et al. increased RG-I content and lipase inhibitory activity of pectic polysaccharides extracted from goji berry and raspberry by high-pressure processing[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 126: 107477.
[15] RIVALAIN N, ROQUAIN J, DEMAZEAU G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 659−672.
[16] SHIN K C, KIM D W, OH Y J, et al. Improved production of deglucosylated platycodin D from saponins from balloon flower leaf by a food-grade enzyme using high hydrostatic pressure[J]. Heliyon, 2021, 7(10): e08104.
[17] 郭田田, 王家麒, 贾潇潇, 等. 35 kDa 透明质酸片段 B-HA 对白细胞移走与活性氧水平的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2023, 40(2): 104−111. [GUO T T, WANG J Q, JIA X X, et al. Effects of 35 kDa hyaluronic acid fragment b-ha on leukocyte migration and reactive oxygen species levels[J]. Journal of Qingdao Agricultural University(Natural Science), 2023, 40(2): 104−111.]
[18] 张立娟, 姜瞻梅, 姚雪琳, 等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技, 2008(7): 241−242. [ZHANG L J, JIANG Z M, YAO X L, et al. Detecting of protein in soybean isolated protein by Biure method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008(7): 241−242.]
[19] MAGALHÃES M R, DA SILVA N J, ULHOA C J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization[J]. Toxicon, 2008, 51(6): 1060−1067.
[20] YANG B, WU Q J, LUO Y X, et al. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis*: Extraction, structure, antioxidant activity and hypoglycemic[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 137: 676−687.
[21] 胡腾根. 桑叶低聚糖的酶法制备及其通过肠道微生物介导调控糖脂代谢的作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021. [HU T G. Enzymatic preparation of mulberry leaf oligosaccharide-and its regulatory mechanism of glucose and lipidmetabolism mediated by gut microbiota[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.]
[22] 郭田田, 王家麒, 贾潇潇, 等. 低分子透明质酸片段对红细胞聚集诱发作用及其种属特异性[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2022, 39(2): 96−108. [GUO T T, WANG J Q, JIA X X, et al. The inducing effect of low molecular hyaluronic acid fragments on erythrocyte aggregation and its species specificity[J]. Journal of Qingdao Agricultural University(Natural Science), 2022, 39(2): 96−108.]
[23] CHEN H, HUANG Y Z, ZHOU C C, et al. Effects of ultrahigh pressure treatment on structure and bioactivity of polysaccharides from large leaf yellow tea [J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132862.
[24] WANG L B, LI L Y, GAO J Y, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory effects of selenized polysaccharides from dandelion roots[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 260: 117796.
[25] XIE F, ZHANG H, NIE C Q, et al. Structural characteristics of tamarind seed polysaccharides treated by high-pressure homogenization and their effects on physicochemical properties of corn starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262.
[26] 刘凤松, 李亚杰, 李亚贤, 等. 酶在高静水压食品加工中的应用[J]. 中国食品工业, 2023(22): 78−81. [LIU F S, LI Y J, LI Y X, et al. Application of enzymes in high hydrostatic pressure food processing[J]. China Food Industry, 2023(22): 78−81.]
[27] GUAN H N, DIAO X Q, JIANG F, et al. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 89−96.
[28] 谭凤翔, 余元善, 邹宇晓, 等. 酶法水解桑叶多糖制备低聚糖及其抑菌活性研究[J]. 蚕业科学, 2024, 50(2): 127−138. [TAN F X, YU Y S, ZOU Y X, et al. Study on preparation of oligosaccharide from mulberry leaf polysaccharides by enzymatic hydrolysis and its antibacterial activity[J]. Acta Sericologica Sinica, 2024, 50(2): 127−138.]
[29] QIU Y B, MA Y Q, HUANG Y Y, et al. Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 269: 118320.
[30] 宋鸿杰, 高琦洲, 闫新旭, 等. 九蒸九制黄精多糖的结构表征及降血糖活性分析[J]. 食品科学, 2025, 46(15): 47−59. [SONG H J, GAO Q Z, YAN X X, et al. Structural characterization and hypoglycemic activity of polysaccharides from polygonatum sibiricum subjected to nine steaming-drying cycles[J]. Food Science, 2025, 46(15): 47−59.]
[31] 张京良, 孙彦庆, 江晓路, 等. 灵芝菌丝体多糖提取工艺优化及其对 HSF 细胞氧化损伤的保护作用[J/OL]. 食品工业科技, 1−19[2026-01-05]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025040366. [ZHANG J L, SUN Y Q, JIANG X L, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from ganoderma lucidum mycelium and its protective effect against oxidative damage in HSF cells [J]. Science and Technology of Food Industry, 1−19[2026-01-05]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025040366.]
[32] 焦雪, 张敏, 徐步青, 等. 刺梨干果多糖的提取、结构表征及生物活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(21): 104−111. [JIAO X, ZHANG M, XU B Q, et al. Structural characterization and bioactivity of polysaccharides extracted from dried fruits of *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(21): 104−111.]
[33] 邹光铭, 郭亦佳, 崔林晔, 等. 电子束辐照预处理核桃青皮对其多糖性质的影响[J/OL]. 食品工业科技, 1−21[2026-01-05]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025040055. [ZOU G M, GUO Y J,CUI L Y, et al. The effect of electron beam irradiation pretreatment of walnut green husk on the properties of its polysaccharides[J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1−21. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2025040055.]
[34] 任洪飞. 灵芝多糖提取纯化、结构解析及抗氧化活性研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2024. [REN H F. Study on extraction, purification, structure elucidation andantioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2024.]
[35] ZHONG L J, LI X, DUAN M W, et al. Impacts of high hydrostatic pressure processing on the structure and properties of pectin[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2021, 148: 111793.
[36] 张玉梅, 邢慧珍, 刘会平, 等. 槐花多糖的提取、纯化和抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 207−215. [ZHANG Y M, XING H Z, LIU H P, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Sophora japonica* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 207−215.]
[37] WANG B L, CHEN W J, JIA R, et al. Structural and physico-

chemical properties of debranched lotus seed starch treated with high hydrostatic pressure[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 293(58): 4157−4166.

[38] 姚艳婷, 杨小兵, 陈旭洁, 等. 富硒蛹虫草多糖的结构表征及体外免疫调节活性[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 39−48. [YAO Y T, YANG X B, CHEN X J, et al. Structural characterization and *in vitro* immunomodulatory activity of polysaccharides from selenium-enriched *Cordyceps militaris*[J]. Food Science, 2023, 44(22): 39−48.]

[39] 周宥先. 光电催化降解透明质酸及产物的吸收代谢与肠道菌群调控作用研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2023. [ZHOU Y X. Study on photoelectrocatalytic degradation of hyaluronic acid and absorption, metabolism andintestinal microbiota regulation of its products[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2023.]

[40] 贺芸. 透明质酸的降解研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2010. [HE Y. Study on the degradation of hyaluronic acid[D]. Nanjing: Nanjing University Of Science And Technology, 2010.]

[41] ZHENG M J, OUYANG H, LI Z P, et al. Ultra-high pressure assisted extraction of polysaccharide from *Bangia fusco-purpurea*: Structure and *in vitro* hypolipidemic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135687.

[42] 邢慧珍, 张玉梅, 刘会平, 等. 淡竹叶多糖的制备、热稳定性及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(19): 86−96. [XIN H Z, ZHANG Y M, LIU H P, et al. Preparation, thermal stability and antioxidant activity of polysaccharide from *Lophatherum gracile* Brongn[J]. Food Research and Development, 2023, 44(19): 86−96.]