

γ -聚谷氨酸的降解优化和平均分子量的快速检测以及其应用

于林艳^{1,2}, 陈勉¹, 刘飞¹, 朱希强^{1,2*}

(1.山东省药学科学院, 山东 济南 250101; 2.山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要: 本文提供了一种酸性条件下进行自发热降解得到低分子量 γ -聚谷氨酸的制备方法, 实验证实酸条件下 γ -聚谷氨酸受热自发降解的最优条件是: 浓度 3%, 温度 80°C, pH 2.0。利用经典的 Gel Permeation Chromatography (GPC) 法监测降解产物的相对分子量, 利用改良和简化了的乌氏粘度计测定黏度, 同时提出了一个表征黏度的时间拟合相对平均分子量的方法, 并得到了拟合度良好的线性关系, 发现该法可用于快速有效跟踪检测 γ -PGA 的降解情况。最后对各种低分子量 γ -PGA 的保水性能进行了体外保水性测试, 筛选出保水性能最佳的 γ -PGA 分子量范围。

关键词: γ -聚谷氨酸; 降解; 分子量检测; 保水性测试

The degradation optimization of γ -PGA and rapid detection of the average molecular weight and its application

Yu Lin-yan¹, Chen Mian¹, Liu Fei¹, Zhu Xi-qiang^{1,2}

(1. Shandong Academy of Pharmaceutical Science, Jinan, Shandong 250101, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan, Shandong, 250012, China)

Abstract : This research provided a γ -PGA preparation method on the condition of acid and heating. The optimal preparation conditions are as follows: 3% concentration, 80°C and pH 2.0. We make use of the classic method of GPC to monitoring the molecular weight of the degradation products. To facilitate the selection and optimization conditions of degradation, as well as to control the degree of degradation in industrialized mass production timely, we modified and simplified the Ubbelohde Viscometer measured method. The characterization efflux time of viscosity and the relative average molecular weight of the GPC were fitting. We discovered that the method could be used to track the degradation degree of γ -PGA quickly and efficiently. At the last, we do the moisturizing testing in vitro in order to select the suitable molecular weight of γ -PGA, which poses the best moisturizing ability.

Key Word : γ -PGA; degradation; molecular weight detection; moisturizing testing

γ -聚谷氨酸 (poly (gamma-glutamic acid), γ -PGA) 是一种由 D-谷氨酸和 L-谷氨酸通过 γ -酰胺键结合而形成的聚氨基酸化合物^[1], 虽然它是氨基酸的聚合物, 但是由于连接方式不同于一般的多聚肽, 其在结构和功能上与蛋白质是不相同的。 γ -PGA 的结构式如:

作者简介: 于林艳 (1989-), 女, 山东临沂人, 实验员, 硕士, 电话: (0531)81213077, E-mail: yulimyan@126.com。通讯作者: 朱希强, 研究员, 博士, 电话: (0531)81213086, E-mail: xistrong@sina.com。

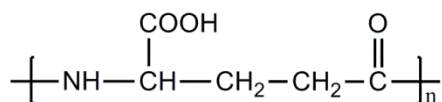


图 1 γ -PGA 的结构式

Fig. 1 The structure of γ -PGA

γ -PGA 作为一种具有应用前景的生物高分子，由微生物发酵法制备的 γ -PGA 的分子量一般在 100~10 000 kDa 之间，每个 γ -PGA 分子大约由 500~5 000 个单位的谷氨酸单体组成^[2]，不同分子量的 γ -PGA，有着其不同的应用。通常来说，随着分子量的增大，溶液黏度增大，因而其流变性就越难以控制，同时也越难被化学试剂修饰，最终限制了 γ -PGA 的生产及应用^[3]。

γ -PGA 水胶是一种无色、无味、透明且柔软的胶质，其独有的三维空间格子结构，使其拥有十分超强的吸水保湿性，十分适合在化妆品中提高保湿效果^[4]。但是，聚谷氨酸过强的吸水保湿性能，导致寒冷干燥环境下，容易发生争夺皮肤自身水分的情况，使皮肤表面出现干燥和皲裂的不适。调节 γ -PGA 吸水性的一个方法，就是适度降解获得低分子量 γ -PGA，因为降解完全而得到的谷氨酸未显现显著的保湿性能。

在高聚物的研究中，相对分子质量是一个不可缺少的重要数据，它不仅反映了高聚物分子的大小，而且还直接关系到高聚物的物理性能，从而决定了其应用范围^[5]。GPC 法是测定聚合物分子量以及分子量分布的一种相对方法^[6]。研究中采用了该法，但是发现存在不能方便的实时监测实验结果的不足。因此尝试使用改良的简易的乌氏粘度计流出时间法来部分替代 GPC 法，结果发现该法有效可行。

基于以上，本研究作了如下的实验设计。试验以 PGA 的钠盐为底物，通过经典的 GPC 法监测产物分子量，考察了 PGA 钠盐在不同 pH、温度及时间下的降解性能，找出了 PGA 钠盐降解的敏感条件，制备出不同相对分子质量的 γ -PGA。仪器测试法和称重法具有很好的相关性^[7]，考虑到本实验测试样品数量较多，因此选用体外测试法对各低分子 γ -PGA 的保水性能进行了测试，筛选出保水性能最佳的 γ -PGA 分子量，为低分子量的 γ -PGA 在化妆品中的应用做出探索。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

雷磁 PHS-3C 精密 pH 计；SHB-III 循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；科伟电热鼓风干燥箱 101 型，北京科伟永兴仪器有限公司；FA1004 型电子天平，上海良平仪器仪表有限公司；JULABO TW12 通用水浴槽，德国优莱博公司；蜀牛玻璃干燥器，内径 25 cm；示差检测器；日本岛津高效液相色谱仪；离心机，Thermo scientific，Sorvall LEGEND MICRO 21R；乌氏粘度计，上海良晶玻璃仪器制造厂，内径 0.53 mm；秒表，济南博尚生物技术有限公司；玻璃棒；250 mL 烧杯；10 mL 容量瓶，1 mL 一次性注射器。

相对分子质量窄分布的普鲁兰标准品（Shodex STANDARD P-82，日本 Shodex 公司），盐酸，叠氮钠，硝酸钠（以上各试剂均为分析纯）， γ -聚谷氨酸钠，批号 20130505（由山东福瑞达生物科技有限公司提供）。

1.2 实验方法

1.2.1 γ -PGA 酸性条件下的加热降解

将 γ -PGA 样品配制成 3% 浓度的水溶液，分别调节 pH 值为 1.0、2.0、3.0、4.0，将其置于不同温度（60℃、70℃、80℃、90℃）的恒温水浴锅中，每隔一定时间取出样品溶液，于冰上放置数分钟以迅速降至室温，并于室温下放置。 γ -PGA 降解产物的分离：采用醇沉法，加入样品溶液 2~3 倍体积的无水乙醇，具体加入量根据降解时间而定，混匀醇沉，室温静置 2 h；离心，倾倒上清液除去乙醇，所得沉淀于玻璃干燥器中进行干燥，以除去样品中残留的乙醇溶液，收集沉淀样品。

1.2.2 GPC 法对 γ -PGA 降解产物相对分子量的检测

色谱条件如下：

色谱柱：	TSK-GEL G4000WPXL
检测器	G11362A 示差折光检测器
流动相	0.1 mol/L NaNO ₃ - 0.05 % NaN ₃ (自然 pH)
柱温	35℃
池温	40℃
流速	0.8 mL/min
进样体积	20 μ L

岛津 Shimadzu LCsolution GPC Software, Version 5.73, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan 高效液相色谱化学工作站 GPC 分析软件进行色谱数据处理。用流动相将样品配制成约 5 mg/mL 的浓度的溶液，用 6N NaOH 水溶液调节 pH 至中性，用 0.22 μ L 微孔滤膜过滤除菌，使用岛津高效液相色谱仪进行分子量测定。

相对分子质量的计算：由一组为 8 个的相对分子质量窄分布的普鲁兰标准品（相对分子质量分别为 5900, 11800, 22800, 47000, 112000, 212000, 404000, 788000）在示差折光检测器上的保留时间，得到普鲁兰多糖标准品线性方程，拟合出相对分子质量的计算方程为：三次方程， $\log M = aX^3 + bX^2 + cX + d$ ($X = x - T.LIMIT$, $a = -0.05568536$, $b = 1.641168$, $c = -16.84963$, $d = 64.81512$, $T.LIMIT = 0 \text{ min}$, $R^2 = 0.9999456$)。由保留时间经拟合相对分子质量标准方程计算得到 γ -PGA 的相对分子质量。

实验所得相对平均分子量仅用于本研究各批次样品相互比较，可有效识别同一 γ -PGA 样品在不同条件下的不同降解程度。

1.2.3 改良乌氏粘度计对 γ -PGA 降解产物黏度的测量

γ -PGA 溶液属于非牛顿流体，采用传统的乌氏粘度计方法进行测量时，不仅每个样品测量需要较长的时间，润洗毛细血管后干燥还需要耗时。考虑到本实验待测样品数量较多，为了减少时间差带来的误差，我们对传统的乌氏粘度计进行了改进，改良后的乌氏粘度计使用十分简单方便，只需要用注射器直接将适宜温度的样品溶液从上方注入 C 球，这样操作后，不用添加橡皮管和夹子来密闭上方，降低操作难度；而且，不需吸耳球缓慢抽 B 球吸样液充盈 C 球，缩短了检测时间；另外，通过少量样液预润洗的环节，逐一检测样品，减少乌氏粘度计换液清洗干燥耗时，提高检测效率。

测量装置：将恒温槽温度调节至 $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$ ，于恒温槽中放置 1 L 的量筒，量筒内装入温度为 $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$

的蒸馏水，将乌氏粘度计放置于该量筒内；待测样品溶液：即上述 5 mg/mL 的 GPC 法检测所用样品溶液，待测样品溶液也于 25°C 水中恒温；样品溶液流出时间的测定：用长嘴注射器吸取约 5 mL 左右的样品溶液加入到乌氏粘度计的装样球 A 中，使得装样溶液体积在上刻度线以上，于 25°C 水中恒温 2 min，测定流出时间三次，取均值。

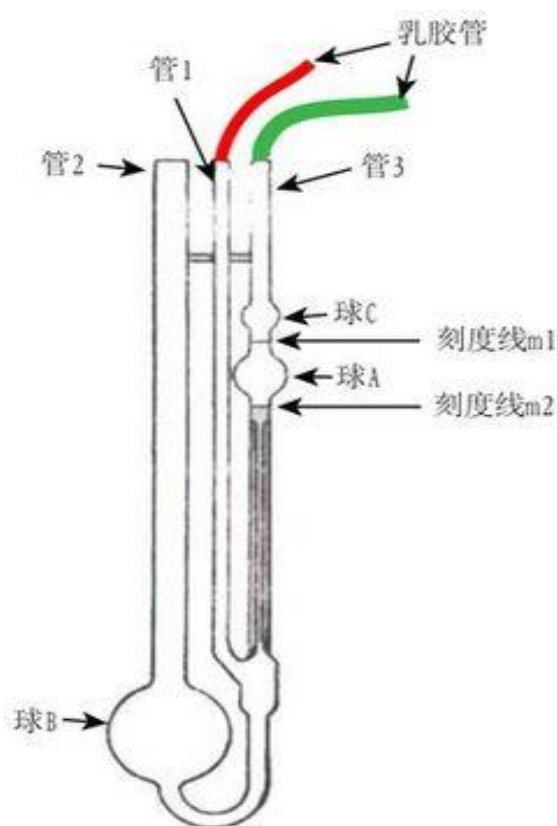


图 2 乌氏粘度计

Fig. 2 The Ubbelohde Viscometer

注明：此图片来源于 360 图片

1.2.4 改良乌氏粘度计法与 GPC 法的相关性研究

选取同一待测样品用乌氏粘度计测定的流出时间及 GPC 法测定的重均分子量，对这两组测量值进行散点图的统计，比较两者之间的相关性。

1.2.5 低分子量 γ -PGA 的保水性能的体外测试

即采用称重法，测试环境：实验室配备冷暖空调保证室温恒定 24°C，湿度的控制是通过在密闭干燥器中放置饱和硫酸铵溶液控制，达到平衡后的湿度为 81%。

将适当大小的医用胶带贴在玻璃板上以模拟人体皮肤，并称重 (W_0)。我们选取分子量约为 20、100、210、310、1 023 kDa 的样品作为测试样品，将受试样品配成浓度 0.20% 的溶液，以同样浓度的甘油作为阳性对照，甘油是化妆品行业最常用的保湿剂，它与水有良好的相容性^[8]。吸取 150 μ L 样品溶液涂敷在贴于玻璃板的医用胶带，每个样品设置 3 个平行组，随后放进平衡好的恒湿干燥器一定时间 (t) 后称重 (W_t)，计算保水值：

$$\text{保水值}_t = W_t - W_0$$

为减少试验误差，统一医用胶带的尺寸为长 6 cm 宽 1 cm，玻璃板为同一批次的载玻片，并设置恒温恒湿测试环境。

2 结果

2.1 温度对 γ -PGA 降解的影响

考察 pH 3.0，浓度 3% γ -PGA 样品溶液在不同降解温度下相对分子质量的变化（见图 3a）。对比图 3a 中的 4 条曲线，可以看出 90℃ 下 γ -PGA 的降解速率要明显高于 60℃、70℃ 和 80℃ 下的降解速率，但是与 80℃ 差别不是特别明显；对于 60℃ 和 70℃ 下的降解，在实验时间内降解速率呈相对稳定状态；对于 80℃ 和 90℃ 下的降解，在实验的第一个取样点 15 min 内，降解率较大，之后降解速率也呈稳定状态；这说明实验过程中相同条件的变化较小，实验数据具有应用价值。

图 3b 表示的是不同降解温度对降解产物多分散性的影响，多分散性也称非均匀指数或多分散度，每个聚合物分子由不同数目的单体分子聚合而成，但是单体分子的数目不是完全相同的，因此聚合物的分子量是不均一的，分散系数值在一定程度上反映了基本化学结构相同而聚合度不同的高分子聚合物间的差异^[9]。从图 3b 的 4 条曲线可以看出，随着温度的升高，降解产物的多分散系数变小，这说明高温下的降解产物均一性越好；同一降解温度下，降解时间越长，降解产物的多分散系数越小，其应用价值也就越高。综合以上温度对降解产物分子量及多分散性的分析，虽然显示 90℃ 为最佳降解温度，但考虑到 80℃ 与 90℃ 差别不大，也为了减少能耗，认为降解温度选择 80℃ 较为适宜。

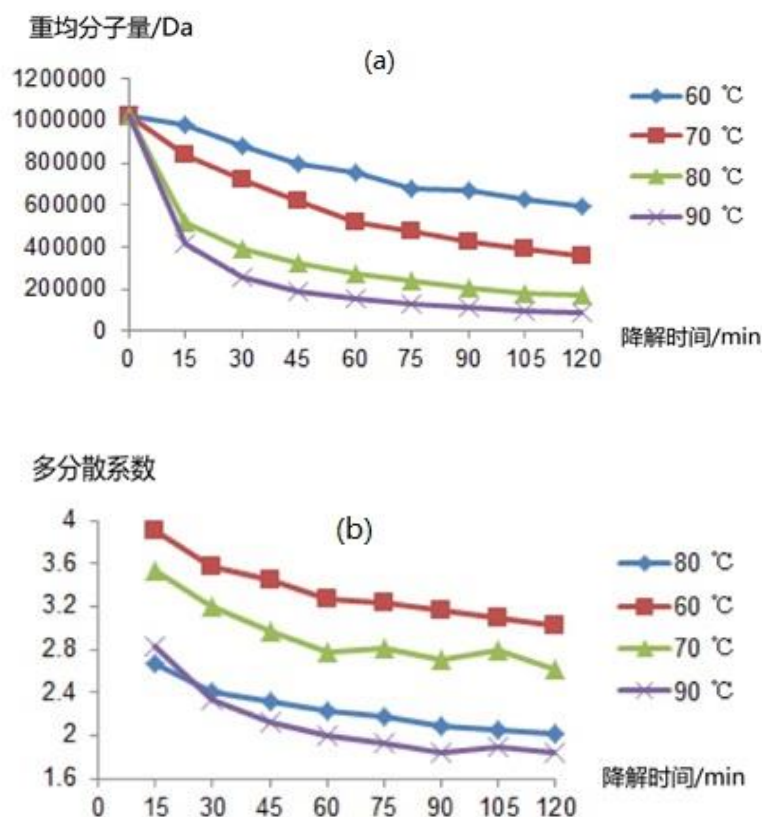


图 3 温度对 γ -PGA 降解的影响

(a) 温度对分子量的影响 (b) 温度对多分散性的影响

Fig. 3 The temperature effect on γ -PGA degradation

(a) The temperature effect on molecular weight (b) The temperature effect on polydispersity

2.2 pH 值 γ -PGA 降解的影响

考察 80°C 时, 浓度为 3% γ -PGA 样品溶液在不同酸性条件下相对分子质量的变化, 见图 4a, 对比图 4a 中的 3 条曲线可以看出, 在 pH 2.0 时, γ -PGA 降解速率高于 pH 3.0 及 pH 4.0,

图 4b 表示的是 pH 值对降解产物多分散性的影响, 从图 4b 中的 4 条曲线可以看出, 在 pH 4.0, 多分散系数在开始 75 min 之前一直处于平稳降低的趋势, 在 75 ~ 120 min 内变化较大; 在 pH 2.0 和 pH 3.0 条件下, 多分散系数随降解时间的增加呈平稳降低, 在 120 min 时能达到 2.0 以下, 这说明降解产物的均一性随着时间的增长变得越好, 其应用价值也就越高。综合以上 pH 对降解产物分子量及多分散性的分析, 认为降解 pH 选择 2.0 较为适宜。

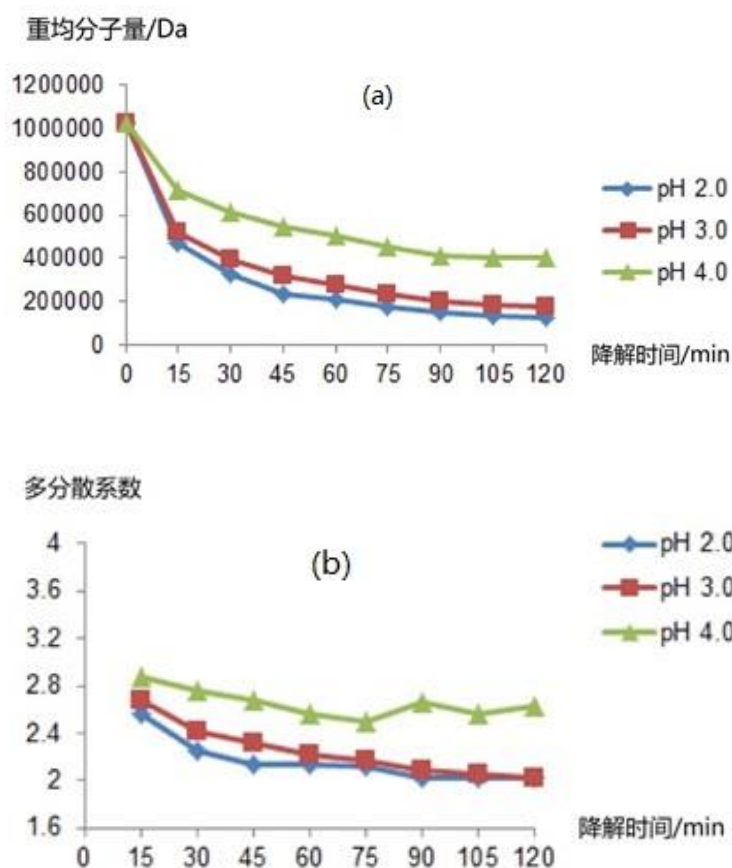


图 4 pH 对 γ -PGA 多分散性的影响

(a) 温度对分子量的影响 (b) 温度对多分散性的影响

Fig. 4 The pH effect on γ -PGA degradation

(a) The temperature effect on molecular weight (b) The temperature effect on polydispersity

2.3 乌氏粘度计法测量降解样品的流出时间与 GPC 法测定降解样品的相对分子质量的拟合

降解样品的分子量检测结果及其用改良的乌氏粘度计测量的流出时间如下表 1, 从表 1 中可以看到, 不同的降解条件得到的降解样品的相对分子质量是不同的, 但是相对分子质量越大, 其流出时间越长的趋势是存在的, 当分子量增加 2 倍, 流出时间增加 1.3 倍。为了探索两者之间的关系, 本文对同一降解样品

溶液的流出时间及相对分子质量的拟合关系进行比较，得到关系如下图 7，可以看出，两者之间具有很好的线性关系，这种良好的线性关系为实验过程中测定方法的选择提供了有力的依据。

表 1 粘度法测量降解样品的流出时间与 GPC 法测定降解样品的相对分子质量

Tab. 1 The efflux time and the relative molecular weight

编号	降解条件				相对分子质量 (kDa)	流出时间(sec)	多分散系数
	浓度(%)	温度(°C)	pH	时间(min)			
1	3	90	3	105	95.832	238	1.90
2	3	90	3	100	104.95	245	1.92
3	3	80	2	120	131.93	257	1.95
4	3	90	3	90	112.603	260	1.86
5	3	80	2	90	147.864	268	2.03
6	3	90	3	60	154.4	282	2.00
7	3	80	2	75	169.512	282	2.12
8	3	80	3	120	179.352	294	2.03
9	3	80	3	105	182.022	301	2.05
10	3	80	2	60	205.815	302	2.15
11	3	80	2	60	194.297	303	2.18
12	3	80	3	90	203.671	305	2.06
13	3	80	2	45	232.965	329	2.22

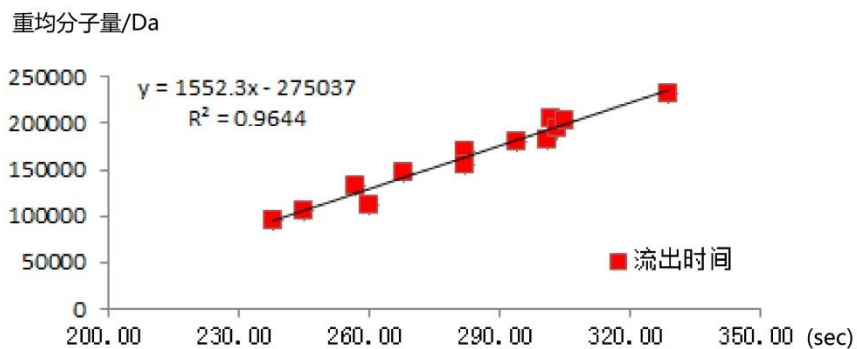


图 5 流出时间与重均分子量的关系

Fig. 5 The relationship between efflux time and molecular weight

2.4 不同分子量 γ -PGA 的保水性能的体外测试

不同分子量 γ -PGA 的保水性能的体外测试，实验测试样品来源均为上述降解条件下制备所得，具体降解条件及所得样品的参数如表 2：在浓度为 0.20% 时，五种不同低分子量的 γ -PGA 的保水值如下图 6 所示：

表 2 测试样品

Tab. 2 test samples

样品	降解条件				相对分子质量 (kDa)	多分散系数
	浓度(%)	温度(°C)	pH	时间(min)		
甘油	/	/	/	/	0.092	/

γ -PGA _L 1	3	80	2	480	20.548	1.92
γ -PGA _L 2	3	80	2	180	99.710	1.95
γ -PGA _L 3	3	80	2	60	209.552	2.15
γ -PGA _L 4	3	80	3	45	313.268	2.33
γ -PGA _L 5	3	60	3	15	1 023.031	2.00

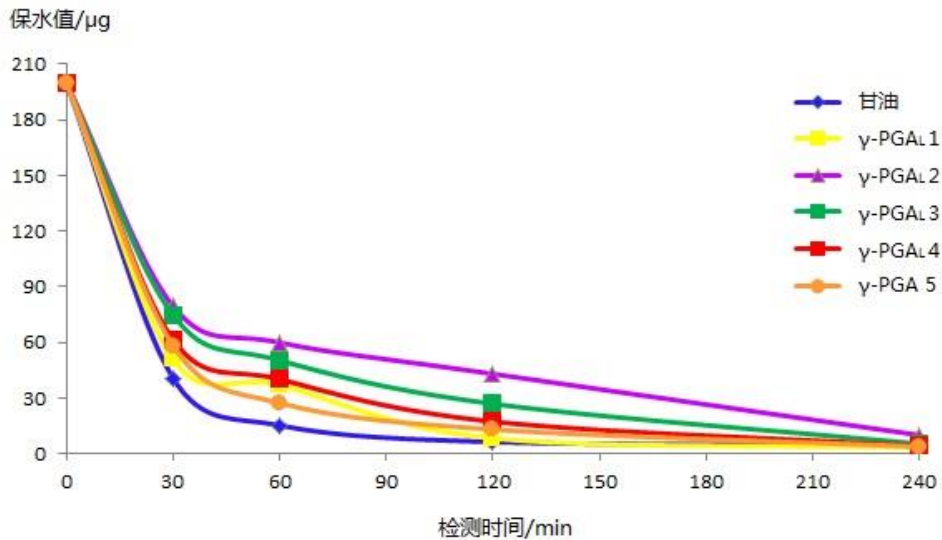


图 6 体外保湿性测试结果

Fig. 6 The results of moisture test in vitro

化妆品中常见的保湿剂是甘油，因此本次实验设置了甘油阳性对照组。如图 6 所示，5 种不同分子量的 γ -PGA 测试样品的同阳性对照组一样，保水值在 30 min 内减少了 2/3 甚至更多；但是未降解的高分子量原料 γ -PGA 5 (Mw ~ 1 023 kDa) 的保水值，在 0 min ~ 120 min 内均高于阳性对照组，可见原料 γ -PGA5 具有良好保湿性能；4 组低分子量的 γ -PGA 在测试时间 0 min ~ 120 min 内的保水值均高于阳性对照甘油保水值，其中 γ -PGA_L 2, γ -PGA_L 3, γ -PGA_L 4 这 3 组低分子量样品保水值，在 0 min ~ 120 min 内均高于高分子量原料 γ -PGA 5 组，可见某些低分子量 γ -PGA 的保湿性优于高分子量原料组； γ -PGA_L 2 组 (Mw ~ 10 kDa) 在 0 min ~ 240 min 测试时间段内不仅高于阳性对照甘油保水值，还高于未降解的高分子量原料 γ -PGA (Mw ~ 1 023 kDa) 的保水值， γ -PGA_L 2 组 (Mw ~ 10 kDa) 在 30 min ~ 120 min 时间段内保水效果明显。

3 结论和讨论

关于 γ -PGA 的降解，已有研究人员对其进行了研究，但其控制降解的目的和用途，均与开发化妆品用低分子量 γ -PGA 保湿剂无关。 γ -PGA 在酸性条件下受热发生降解，是因为在酸性条件下，酯键对酸性条件相较于肽键比较敏感。本实验采用酸性条件下热降解，只需要控制好降解反应的 pH 值、温度和时间，就可以得到不同分子量的降解产物，在温度 80℃，pH 2 的情况下，在短短 3 h 内就可以从 1 023 kDa 降解到 99 kDa，既加快了降解速率，又节省了时间，并且该实验条件下分散度相对较小，均在 2.0 左右，其中 99

kDa ~210 kDa 段分子量范围的低分子量 γ -PGA, 显现出较好的保湿性能, 可直接应用于舒适保湿类护肤类化妆品, 是有应用价值的产物。

在本实验中, GPC 法检测 γ -PGA 的相对分子量不仅需要精密昂贵的高效液相色谱仪、普鲁兰标准品, 还需要足够的测样时间, 在待测样品多的情况下, 会出现样品测样时间相差 24 h 甚至更长的情况, 这种测定时间的间隔差异不仅会给后续的实验分析增加难度, 更严重的是系统误差造成实验结果的不可靠。本实验所使用的改良的乌氏粘度计在 γ -PGA 黏度的测量上能够减少耗时和简化操作, 可有效的实时快速跟踪监测 PGA 的降解情况, 可高效地应用于类似降解条件的筛选和优化, 以及将来工业化大生产降解程度的及时控制。

本实验采用的方法是传统的体外测定法也叫称重法, 是一种简单, 快速, 经济的方法, 该方法进行测定时只需要医用胶带和载玻片, 同时控制温度和湿度恒定即可, 另外, 该测试方法重复性比较好, 而且测试方法适应于各种类型的保湿剂, 并且不受待测样品数量的限制。低分子量 γ -PGA 保水性能的体外测试, 有望使低分子量的 γ -PGA 在化妆品领域开辟新的应用。

参考文献:

- [1] Kubota H, Matsunobu T, Uotani K. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and applications [J]. Chemical Record, 2005, 5(6): 352-66.
- [2] 曹名锋, 金映虹, 解慧, 等. γ -聚谷氨酸的微生物合成、相关基因及应用展望[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 388-395.
- [3] 陈咏竹, 孙启玲. γ -多聚谷氨酸的性质、发酵生产及其应用[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 122-126.
- [4] 刘霞, 刘飞, 刘少英, 等. 聚谷氨酸的保湿功效及安全性评价[J]. 日用化学工业, 45(5): 275-279.
- [5] 卢祥国, 高树森. 聚合物相对分子质量选择的最佳范围[J]. 东北石油大学学报, 1998(3): 18-20.
- [6] 曹惠忠, 刘立勇, 赵红伟, 等. 凝胶渗透色谱法测定多元共聚物(ZF422KS)的分子量及其分布[J]. 科技创新与应用, 2012, (19): 5-5.
- [7] 王昌涛, 秦允荣, 刘婉洁, 等. 化妆品保湿剂性能评价体内法和体外法比较的研究[J]. 国际日用化工学术研讨会, 2005: 10-13.
- [8] 杜雪洁, 杜徐. 护肤产品的保湿功能评价[J]. 日用化学工业, 2000, 30(3): 47-52.
- [9] 鲁红. 凝胶渗透色谱仪及其使用[J]. 分析仪器, 2010, 3: 65-69.