

## 可吸收多糖止血粉体外酶解性能研究

李玲 张敏 宋翠翠 刘连涛

赛克赛斯生物科技股份有限公司, 山东 济南 250000

**[摘要]** 研究来源于淀粉的一种可吸收多糖止血粉的体外酶解性能, 以评价其可降解性。模拟人体温度 (37℃), 在  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶的协同作用下对样品进行体外酶解研究, 采用 3, 5-硝基水杨酸 (DNS) 法对体外降解产生的还原糖进行测试, 并从  $\alpha$ -淀粉酶浓度、双酶活度比影响等因素确定合适的酶解条件。试验结果表明: 双酶解最佳的条件为  $\alpha$ -淀粉酶的浓度为 5.6mg/ml、 $\alpha$ -淀粉酶与糖化酶的活度比为 1:7, 可吸收多糖止血粉在双酶体系中降解 120h 后的降解率为 90.13%。

**[关键词]** 可吸收多糖止血粉;  $\alpha$ -淀粉酶; 糖化酶; 体外酶解

DOI: 10.33142/ec.v3i12.2937

中图分类号: R605.7

文献标识码: A

## Study on Vitro Enzymatic Hydrolysis of Absorbable Polysaccharide Hemostatic Powder

LI Ling, ZHANG Min, SONG Cuicui, LIU Liantao

Saikesaisi Biotechnology Co., Ltd., Jinan, Shandong, 250000, China

**Abstract:** In order to evaluate the biodegradability of an absorbable polysaccharide hemostatic powder derived from starch, the enzymatic hydrolysis in vitro was studied. Under the synergistic action of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase, the in vitro enzymatic hydrolysis of the sample was studied under the simulated human temperature (37℃). The reducing sugar produced in vitro was tested by 3,5-nitrosalicylic acid (DNS) method and the suitable enzymolysis conditions were determined from the factors such as the concentration of  $\alpha$ -amylase and the effect of double enzyme activity ratio. The results showed that the optimum conditions were as follows: the concentration of  $\alpha$ -amylase was 5.6mg/ml, the activity ratio of  $\alpha$ -amylase to glucoamylase was 1:7, and the degradation rate of absorbable polysaccharide hemostatic powder was 90.13% after 120 h degradation in double enzyme system.

**Keywords:** absorbable polysaccharide hemostatic powder;  $\alpha$ -amylase; glucoamylase; enzymolysis in vitro

### 引言

可吸收多糖止血粉以天然植物淀粉为主要原料, 经特殊工艺制成的可吸收多聚糖类止血材料。该类材料是通过吸收血液中的水分, 使血液中的成份 (如血小板、红细胞、凝血因子等) 聚集在颗粒表面, 即时形成凝胶状混合物, 机械性封堵血管破口, 同时启动内源性止血作用, 达到迅速止血的效果<sup>[1]</sup>。淀粉能够在淀粉酶的作用下, 水解生成麦芽糖、葡萄糖以及其它低聚糖<sup>[2]</sup>。其中,  $\alpha$ -淀粉酶能够分解直链淀粉和支链淀粉分子内部的  $\alpha$ -1, 4 糖苷键而产生葡萄糖和少量麦芽糖及麦芽三糖<sup>[3]</sup>, 能被机体完全吸收、代谢从尿液中排出, 具有良好的生物安全性, 而糖化酶只能从淀粉分子链的非还原末端开始水解<sup>[4-5]</sup>。但有关淀粉类止血粉的生物体外双酶解方面的试验研究, 目前相关报道较少。

本研究模拟人体温度 (37℃) 在  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶的作用下对产品进行体外降解试验, 采用 3, 5-硝基水杨酸 (DNS) <sup>[6-7]</sup> 法检测酶降解产生的还原糖含量, 对可吸收多糖止血粉的体外降解行为进行研究。通过体外降解行为的研究, 揭示可吸收多糖止血粉的可降解性, 为淀粉及其衍生物类可吸收止血产品在生物医学领域的应用提供一定的借鉴作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料及试剂

3, 5-硝基水杨酸, 苯酚均由国药集团化学试剂有限公司提供; 氢氧化钠, 无水亚硫酸钠均有湖南尔康制药有限公司提供; 酒石酸钾钠, 天津市大茂化学试剂厂; 无水葡萄糖, 天津市登科化学试剂有限公司;  $\alpha$ -淀粉酶, 北京奥博星生物技术有限公司; 糖化酶, 阿拉丁; 可吸收多糖止血粉, 赛克赛斯生物科技股份有限公司。

#### 1.2 实验仪器

紫外分光光度计, 岛津; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 数显恒温水浴锅, 北京永光明医疗器械有限公司; 真空干燥箱, 北京永光明医疗器械有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 试剂的配制

##### (1) 3, 5-二硝基水杨酸显色液的 (DNS) 配制

称取 3, 5-二硝基水杨酸 3.15g 并溶于 200ml 热水中, 随即加入氢氧化钠 10.5g, 45℃水浴搅拌溶解, 然后倒入溶有 91g 酒石酸钾钠的 250ml 水溶液中, 并加入苯酚 2.5g 和无水亚硫酸钠 2.5g, 45℃水浴搅拌使溶解, 冷却至室温后加水稀释至 500ml, 储于棕色瓶中放置 7-10d 后使用, 并放置在冰箱中储存。

##### (2) 标准葡萄糖溶液配制 (1mg/ml)

取 0.15g 的无水葡萄糖, 置于烘箱 98℃干燥至恒重, 准确称取 0.1g 无水葡萄糖, 先用少量纯化水溶解并定容至 100ml, 冰箱保存备用。

##### (3) $\alpha$ -淀粉酶溶液的配制<sup>[8]</sup>

A. 配制浓度为 28mg/ml: 精确称取  $\alpha$ -淀粉酶 (3700u/g) 7.0000g, 溶于纯化水中, 然后用纯化水定容到 250ml, 得到浓度为 28mg/ml 的  $\alpha$ -淀粉酶溶液。

B. 精确量取 A 溶液, 逐级稀释一定倍数, 分别得到浓度为 5.6mg/ml、0.56mg/ml、0.056mg/ml 的  $\alpha$ -淀粉酶溶液。

##### (4) 糖化酶的配制

取 1ml 液化糖化酶 (活度为 10 万) 于 10ml 的容量瓶中, 用纯化水定容至 10ml, 放冰箱中备用。

##### (5) 样品浸提液的制备

准确称量 0.08g 样品加入到 4ml 的酶溶液中, 按 10g/400ml 的浸提比例在 37℃的恒温培养箱内浸提, 将浸提液 4500r/min 离心 15min, 取上清得到样品浸提液。

#### 1.3.2 吸收波长的确定

##### (1) 试验方法

向各 10ml 试管内, 分别加入 0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml 葡萄糖标准液, 1.5ml DNS 试剂, 沸水浴加热 5 分钟, 流水冷却, 再向个试管中加入纯化水定容至 10ml, 混匀, 20 分钟后, 分别在 480nm、500nm、520nm、540nm、560nm 处测吸光度值。

##### (2) 精密度试验

取 6 份 0.3ml 葡萄糖标准液作为待测样品, 与 DNS 显色 20min 后测吸光值, 通过标准曲线计算每个样品的含糖量, 并计算六个平行样品的平均值和标准差, 以考察测定方法的精确度。

##### (3) 回收率试验

以 0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml 葡萄糖标准液为待测样, 与 DNS 显色 20min 后测吸光值, 通过标准曲线计算每个样品的含糖量, 并计算回收率和离差 (回收率=测得还原糖/实际还原糖\*100%; 离差=回收率-100%) 的绝对值, 以考察测定方法的准确度。

#### 1.3.3 工作曲线的制作

标准曲线的绘制: 按照表 1 取样, 加入到 10ml 的试管中充分混匀后, 于沸水浴中煮沸 5min, 流水冷却至室温后, 再向各试管中加入纯化水定容至 10ml, 混匀。20min 后测吸光度, 绘制吸光度-葡萄糖浓度曲线, 得到线性拟合方程,  $y=16.63773x-0.04954$ ,  $R^2=0.99844$ 。

表 1 葡萄糖标准溶液的配制

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1mg/mL 葡萄糖溶液 (ml)	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
纯化水 (ml)	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.1	0
DNS 试液 (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

#### 1.3.4 降解率的测定

取样品液 1ml 至 50ml 容量瓶中, 用纯化水定容至 50ml 备用。向 10ml 试管内, 加入 0.5 ml 稀释后的试液与 1.5ml

DNS，沸水浴加热 5 分钟，流水冷却，再向各试管中加入纯化水定容至 10ml，混匀，20 分钟后测吸光度。通过标准曲线计算每个样品的还原糖含量，按照公式（1）计算出样品的降解率，公式如下：

$$\text{降解率} = \frac{x * 10 * 10 * 4}{0.5m} * 100\% \quad (1)$$

式中：x—吸光度值；

M—样品原始重量（g）。

### 1.3.5 单酶解和双酶解效率的比较

取等量的三份样品分别为 1#、2#和 3#，其中 1#在 5.6mg/ml 的 α-淀粉酶溶液中降解反应 8h；2#在 5.6mg/ml 的 α-淀粉酶溶液中降解反应 4h，加入 100 μl 糖化酶继续反应 4h；3#在含有 5.6mg/ml 的 α-淀粉酶溶液和 100 μl 的糖化酶混合液中降解反应 8h。分别取降解液，按照 2.3.4 中的方法对各样品中的酶降解产物还原糖的含量进行测定，并计算样品的降解率。

### 1.3.6 α-淀粉酶浓度对降解率的影响

在双酶协同体系中，固定糖化酶用量为 100 μl，逐渐增加 α-淀粉酶浓度，并在降解 2h、4h、6h、8h 和 12h 时间点分别取降解液。按照 2.3.4 中的方法对各样品中的酶降解产物还原糖的含量进行测定，并计算样品的降解率。

### 1.3.7 双酶活度比对降解率的影响

在双酶协同体系中，为研究两种酶的活度比对降解的影响，固定 α-淀粉酶浓度为 5.6mg/ml，改变糖化酶的用量，使 α-淀粉酶与糖化酶的活度比为 1:1、1:3、1:5、1:7 和 1:9，产品在双酶体系中降解 8h 取降解液。按照 2.3.4 中的方法对各样品中的酶降解产物还原糖的含量进行测定，并计算样品的降解率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸收波长的确定

#### 2.1.1 最适吸收波长

取 0.5mL 葡萄糖标准溶液与 DNS 显色液反应后，用紫外分光光度计在波长为 300nm-800nm 处扫描，测定吸光度值，从光谱图像得到，葡萄糖标准溶液在 520nm 处有最大吸收波长。

葡萄糖标准液与 DNS 试剂显色反应后，分别在 480nm、500nm、520nm、540nm、560nm 处测吸光度值，并以此求出不同波长下的回归系数，结果见表 2。由表 2 可以看出，葡萄糖标准液在 540nm 处的 R<sup>2</sup> 最大，精确度最高，因此，选择 540nm 为葡萄糖的最适测定波长，在 540nm 处的标准方程为 y =20.374x-0.0543。

表 2 不同波长下的回归系数

波长 / nm	标准曲线的回归系数
480	0.9985
500	0.9988
520	0.9995
540	0.9998
560	0.9980

#### 2.1.2 精密度试验结果

取 0.3ml 葡萄糖标准液 6 份作为待测样品，与 DNS 显色 20min 后在 540nm 处测吸光值，通过标准曲线 y = 20.374x - 0.0543 计算每个样品的还原糖含量，并计算平均值和标准差，其结果见表 3。

表3 待测样品糖含量及其平均值和标准差

编号	1	2	3	4	5	6	平均值 (g/L)	标准差
糖含量 (g/L)	0.302	0.297	0.292	0.304	0.305	0.293	0.293	$\pm 9.03 \times 10^{-3}$

由表3可知,六个平行的葡萄糖标准溶液的含量平均值为0.293g/L,标准差为 $\pm 9.03 \times 10^{-3}$ ,精密度均较好,540nm为DNS法测定还原糖含量的适宜波长。

### (3) 回收率试验结果

以0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml葡萄糖标准液为待测样,与DNS显色20min后在540nm处测吸光值,通过标准曲线 $y = 20.374x - 0.0543$ 计算每个样品的含糖量,并计算回收率和平均离差,结果见表4。

表4 待测样品糖含量的回收率和离差

项目	实际值	测定值	回收率/%	离差/%	平均回收率/%	平均离差/%
糖含量 (g/L)	0.1	0.098	98	2	98.58	1.42
	0.2	0.196	98	2		
	0.3	0.298	99.33	0.67		
	0.4	0.396	99	1		

由表4可知,葡萄糖平均回收率为98.58%,平均离差为1.42%,说明在540nm处对葡萄糖含量的测定结果准确度较高。

## 2.2 单酶和双酶水解效率的比较

样品1#、2#、3#的降解率测定结果分别为15.74%,结果详见表5。

表5 单酶和双酶解效率的比较

样品	酶	酶用量	反应时间/h	降解率/%
1#	$\alpha$ -淀粉酶	5.6mg/ml	8h	15.74
2#	$\alpha$ -淀粉酶(先)	5.6mg/ml	4h	26.52
	糖化酶(后)	100 $\mu$ l	4h	
3#	$\alpha$ -淀粉酶+糖化酶	5.6mg/ml+100 $\mu$ l	8h	40.73

从表5中可以看出,1#样品的降解率明显低于2#和3#。虽然 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶均是用于淀粉降解的两种最重要的酶, $\alpha$ -淀粉酶能够分解直链淀粉和支链淀粉分子内部的 $\alpha$ -1,4糖苷键,但不能切开 $\alpha$ -1,6糖苷键<sup>[9]</sup>,所以1#样品降解产物葡萄糖测得含量较低。 $\alpha$ -淀粉酶是一种内切酶,进攻链内部的键比端部的快,水解产生大量葡萄糖基残基(糊精)中间体,使淀粉液的粘度降低,露出葡萄糖基残基(糊精)中间体部分具有还原性末端,而糖化酶是一种外切酶,从淀粉分子链的非还原末端水解 $\alpha$ -1,4糖苷键、 $\alpha$ -1,6糖苷键、 $\alpha$ -1,3糖苷键,最终产物为葡萄糖。因此2#和3#样品中因糖化酶的参与,降解产物葡萄糖测得含量较高。3#样品中还原糖含量高于2#,因为 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶协同水解,其效率显著增加, $\alpha$ -淀粉酶为糖化酶不断提供新的非还原末端,提高了糖化酶的底物浓度,同时糖化酶不断消耗 $\alpha$ -淀粉酶的产物,使降解速率显著提高,降解产物中还原糖含量较高。基于此,将选择在 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶的双酶解体系中研究产品体外降解行为。

## 2.3 $\alpha$ -淀粉酶浓度对降解率的影响

在双酶协同体系中,固定糖化酶用量,样品在不同时间点的降解率随 $\alpha$ -淀粉酶浓度的变化趋势图,详见图1。

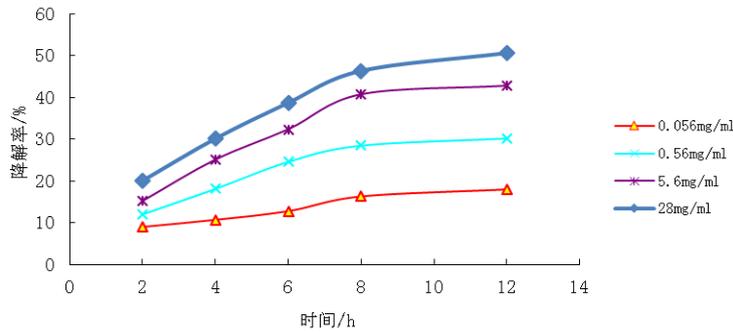


图1  $\alpha$ -淀粉酶溶液浓度对可吸收多糖止血粉降解率的影响

由图1可以看出在糖化酶的添加量一定的情况下,相同时间点,随着 $\alpha$ -淀粉酶浓度的增加,可吸收多糖止血粉的降解率逐渐增加;相同 $\alpha$ -淀粉酶溶液浓度条件下,随着降解时间的延长,降解率逐渐增加;不同的 $\alpha$ -淀粉酶浓度下,其降解率随时间变化的曲势基本一致。当 $\alpha$ -淀粉酶浓度低于5.6mg/ml时,同一个时间点上,随着 $\alpha$ -淀粉酶浓度的增大,降解率增长速率较快,当 $\alpha$ -淀粉酶浓度高于5.6mg/ml时,同一个时间点上,随着 $\alpha$ -淀粉酶浓度的增大,降解率增长速率变慢, $\alpha$ -淀粉酶增加对反应速率的促进作用在达到一定值后,再增加 $\alpha$ -淀粉酶的量并不能使双酶协同的酶活力有显著增加。本文选择浓度为5.6mg/ml的 $\alpha$ -淀粉酶溶液对样品进行浸提。

#### 2.4 双酶活度比对降解率的影响

在双酶协同体系中,固定 $\alpha$ -淀粉酶浓度,改变糖化酶的用量,样品的降解率随淀粉酶与糖化酶的活度比的变化趋势见图2。

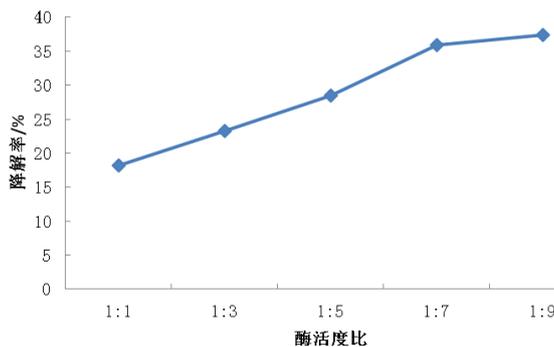


图2  $\alpha$ -淀粉酶与糖化酶的活度比对可吸收多糖止血粉降解率的影响

在双酶协同体系中,增加糖化酶的用量,可吸收多糖止血粉的降解率增加,这说明在复合酶中糖化酶所起到的作用更明显,当活度比大于1:7时,增加率变得平稳,综合考虑本文选择 $\alpha$ -淀粉酶与糖化酶的活度比为1:7。

#### 2.5 止血粉在双酶溶液中的降解

吸收多糖止血粉在最佳条件下降解: $\alpha$ -淀粉酶溶液浓度为5.6mg/ml, $\alpha$ -淀粉酶与糖化酶的活度比为1:7,37℃的条件下,在降解2h、8h、12h、24h、48h、72h、96h和120h分别取降解液进行测试,降解率随时间的变化过程如图3所示。

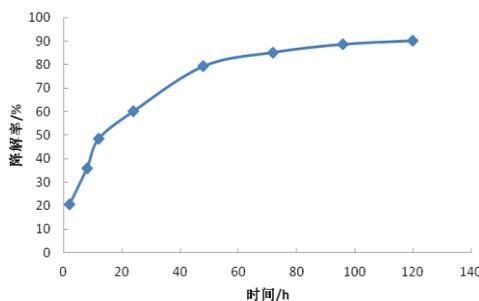


图3 可吸收多糖止血粉降解率曲线

由图 3 可见,可吸收多糖止血粉的降解过程表现为三个阶段:(1)快速降解阶段(0-8h),该阶段产品降解率随时间延长迅速增大,止血粉微粒快速降解,12h 的降解率就达到 48.92%,(2)缓慢降解阶段(12h-72h),该时间段,随着时间的延长,产品降解率缓慢增大,且降解率增加的程度随时间变化越来越小。(3)降解平稳阶段(72h 以后),产品的降解率均逐渐趋于稳定,降解 120h 后,可吸收多糖止血粉降解率达到 90.13%。

可吸收多糖止血粉为改性淀粉颗粒,0-12h 内随着降解时间的增加,止血粉颗粒充分溶胀,淀粉多聚糖大分子表面与酶充分接触,淀粉颗粒的无定形区域被水解,淀粉链之间的氢键被破坏,使得止血粉微粒快速降解。12h 以后,随着降解时间的延长,大部分淀粉颗粒的无定形区域被水解,由于结晶区域中的水解速率远小于非晶区域中的水解速率,因此降解速率显著降低。

### 3 结论

在模拟人体环境温度的条件下,对可吸收多糖止血粉的体外酶降解进行探讨。结果表明:产品在  $\alpha$ -淀粉酶体系中的降解率比在  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶双酶解体系中小;固定糖化酶的量,其降解率随着  $\alpha$ -淀粉酶浓度的增大而升高; $\alpha$ -淀粉酶浓度不变,糖化酶的活度越高,其降解率越大。根据试验结果,同时考虑到成本及双酶协同体系能更好的发挥作用,最终选择  $\alpha$ -淀粉酶浓度 5.6mg/ml,  $\alpha$ -淀粉酶与糖化酶的活度比为 1:7 的条件下,研究止血粉在双酶溶液中降解,其降解率随着时间延长先迅速增大、再缓慢增加、最后趋于平稳;降解 120h 时,降解率可达到 90.13%,且趋于平稳。由于 DNS 法只能检测降解产物中的还原糖含量,无法检测到降解得到的其它产物。由于该检测方法的局限性和体外降解环境与体内环境的差距,该研究结果只能代表可吸收多糖止血粉的体外酶降解趋势,并不能代表产品的体内降解行为。该类止血产品的体内降解行为及体内代谢动力学还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1]张爽,徐庆华,童琳,等.可吸收止血材料的研究现状与应用[J].中国组织工程研究,2020(10):1628-1634.
- [2]何虎翼,唐洲萍,杨鑫,等.马铃薯淀粉合成与降解研究进展[J].生物技术通报,2019(4):101-107.
- [3]曹丹,彭浩,兰阿峰.一株  $\alpha$ -淀粉酶产生菌的分离、鉴定及产酶条件研究[J].食品研究与开发,2020(6):169-174,188.
- [4]刘崇万,刘世娟,范业文,等.  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶协同提高山药饮料稳定性的研究[J].食品科技,2017(1):254-257.
- [5]赵红岩.  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶协同作用生产大麦保健茶工艺[J].中国酿造,2014(9):102-104.
- [6]王莉丽,梅文泉,陈兴连.3,5-二硝基水杨酸比色法测定大 m 中水溶性糖含量[J].中国粮油学报,2020(6):177-182.
- [7]高文军,李卫红,王喜明.3,5-二硝基水杨酸法测定蔓菁中还原糖和总糖含量[J].中国药业,2020(9):113-116.
- [8]张雪娇,田欢,刘春叶.可见分光光度法测定  $\alpha$ -淀粉酶活力[J].化学与生物工程,2020(3):65-68.
- [9]牛雯,刘毅,刘曼玲.一种可吸收多聚糖止血材料的生物降解研究[J].中国新药杂志.2010(4):336-339.

作者简介:李玲(1981-)女,毕业于:山东师范大学,现就职于赛克赛斯生物科技股份有限公司。

本研究受山东省重大科技创新工程项目可吸收创面修复生物材料研发及产业化经费支持,项目编号 2019JZZY011107。