

分类号: Q93
密 级: 公开

单位代码: 10363
学 号: 2200450103

超高压协同酶解对右旋糖酐结构和凝血活性研究

STUDIES ON THE STRUCTURE AND
COAGULANT ACTIVITY OF DEXTRAN UNDER
ULTRA-HIGH-PRESSURE AND ENZYMATIC
DIGESTION

学生姓名: 汪 剑
指导教师: 刘艳 (教授)、朱双杰 (教授)
专 业: 生物工程
研究方向: 微生物代谢与发酵工程

论文答辩日期: 2024 年 5 月

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：汪剑

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：汪剑

日期：2024 年 5 月 30 日

指导教师签名：刘纪

日期：2024 年 5 月 30 日

超高压协同酶解对右旋糖酐结构和凝血活性研究

摘 要

右旋糖酐，是肠膜状明串珠菌发酵蔗糖产生的中性多糖，主要通过 α -1,6糖苷键连接，被广泛应用于医药、食品等领域。中低分子量的右旋糖酐已被《中国药典》收录，在临床上可作为代血浆和补血剂使用。同时低分子量的右旋糖酐在药物传递系统中也发挥着重要作用。通过发酵得到的高分子量右旋糖酐无法被生物体直接吸收利用，高分子量右旋糖酐可以通过右旋糖酐酶降解成低分子量右旋糖酐。超高压是一种非热加工技术，据报道可以在一定程度上改善多糖的生物活性。因此，本文利用超高压处理右旋糖酐，提高其抗凝血活性；同时利用酶解来降低右旋糖酐的分子量；在此基础上，研究超高压协同酶解对右旋糖酐抗凝血活性和抗血小板活性的影响，通过结构表征来阐述其机理。研究采用未经处理的右旋糖酐作为对照。

主要研究了以下几个方面：

(1) 超高压对改善右旋糖酐凝血活性的工艺研究；超高压处理右旋糖酐后，能改善其凝血活性，降低其作为代血浆使用时的风险。通过单因素试验，以凝血四项为指标，研究其优化工艺，最终以凝血酶原时间（PT）为响应值，采用响应面优化超高压改善右旋糖酐抗凝血活性的工艺，得到最佳的优化工艺参数，即超高压处理压力 400 MPa、处理时间 19 min、处理次数为 1 次。在此条件下，PT 值的变化最大。

(2) 右旋糖酐酶水解工艺条件的研究；对右旋糖酐酶水解规律进行探究，优化酶水解条件。试验从酶浓度、酶解时间、酶解温度、酶解底物浓度、酶解 pH 和酶解底物分子量等方面优化酶解工艺，为了得到分子量较低且分布相对均匀的不同组分的右旋糖酐，最终确定酶解条件参数如下：酶解时间 50 min，pH=5，酶解温度为 50 °C，底物浓度是 10 mg/mL，酶浓度为 10 U/mL，底物选择右旋糖酐-70。

(3) 对处理后的右旋糖酐的结构特点进行探究；以高效液相色谱（HPLC）、傅里叶红外（FT-IR）、X 射线（X-ray）、扫描电子显微镜（SEM）等分析技术鉴定其结构。超高压处理后，

右旋糖酐分子量和糖苷键没有发生变化，依旧是由 α -1,6糖苷键连接。但是在酶解之后，右旋糖酐被裂解成两个不同的组分，其分子量分别在 3000 Da 和 800 Da 左右，经结构鉴定确认为右旋糖酐。同时酶解和超高压处理破坏了右旋糖酐的晶体构型，使右旋糖酐从晶体结构变为无定型结构。在表面形态上，超高压处理使得右旋糖酐表面变得光滑平整，孔隙增多。而酶解处理使得右旋糖酐边缘变得光滑，同时表面孔隙消失。

(4) 对右旋糖酐的凝血活性进行探究；论述了协同酶解对右旋糖酐抗凝血活性和抗血小板聚集活性的影响机制，超高压可以破坏右旋糖酐内源性凝血途径，使活化部分凝血酶时间 (APTT) 减少，与空白试验相接近；同时改变了右旋糖酐外源性凝血活性途径和共同凝血途径，使 PT 延长，纤维蛋白原 (FIB) 浓度降低。而酶解处理对右旋糖酐 APTT 延长率与未经处理的右旋糖酐溶液几乎相持平，由此判断分子量大小不会对右旋糖酐内源性凝血途径产生影响。超高压主要在外源性凝血途径和共同途径上影响右旋糖酐的凝血活性，酶解不会对右旋糖酐的凝血活性造成太大的变化。当两者协同时，右旋糖酐抗凝血活性通过外源性凝血途径增强 10.5%，提升了右旋糖酐的抗凝血活性，同时 FIB 浓度降低了 5.1%。添加右旋糖酐氯化钠溶液后，血小板聚集率下降了 17.3%，通过超高压和酶处理后，右旋糖酐血小板聚集率仅下降了 9.6%，有效的降低了右旋糖酐对血小板抑制率。

关键词：右旋糖酐，超高压，酶解，凝血活性，血小板聚集

STUDIES ON THE STRUCTURE AND COAGULANT ACTIVITY OF DEXTRAN UNDER ULTRA-HIGH-PRESSURE AND ENZYMATIC DIGESTION

ABSTRACT

Dextran, a neutral polysaccharide produced by the fermentation of sucrose by *Leuconostoc mesenteroides*, which is mainly linked by α -1,6 glycosidic bonds, and is widely used in the fields of medicine and food. Medium and low molecular weight dextrose has been included in the Chinese Pharmacopoeia and can be used clinically as a plasma substitute and blood tonic. Also low molecular weight dextran plays an important role in the drug delivery system. The high molecular weight dextran derived from fermentation cannot be directly absorbed and utilized by organisms, and large molecular weight dextran can be degraded to low molecular weight dextran by dextranase. Ultra-high pressure (UHP) is a non-thermal processing technique that has been reported to improve the bioactivity of polysaccharides to a certain extent. Therefore, in this paper, we used UHP to treat dextran to improve its coagulant activity; meanwhile, we used enzymatic hydrolysis to degrade the molecular weight of dextran; on this basis, we investigated the effect of UHP co-enzymatic hydrolysis on the anticoagulant activity and antiplatelet activity of dextran, and elucidated the mechanism through structural characterization. Untreated dextran was used as a control for the study.

The following aspects were mainly studied:

(1) Process study on the improvement of the coagulant activity of dextrose anhydride by ultrahigh pressure; ultrahigh pressure treatment of dextrose anhydride slightly improved its

coagulant activity and reduced the risk when it is used as a plasma substitute. Through the one-way test, the four items of coagulation were used as the indexes to study the optimization process, and finally the PT was used as the response value, and the response surface was used to optimize the process of ultrahigh pressure to improve the anticoagulant activity of dextrose anhydride, and the best optimized process parameters were obtained: the pressure of ultrahigh pressure treatment was 400 Mpa, the time of treatment was 19 min, and the number of times of treatment was 1 time. This condition showed the greatest change in the PT value.

(2) Study on the process conditions of dextranase hydrolysis. The enzymatic decomposition rules of dextran were studied, and the enzyme hydrolysis conditions were optimized. The test was conducted to optimize the enzymatic hydrolysis process from enzyme concentration, enzyme hydrolysis time, enzyme hydrolysis temperature, enzyme hydrolysis substrate concentration, enzyme hydrolysis pH, and molecular weight of enzyme hydrolysis substrate, in order to obtain different components with lower molecular weights and relatively homogeneous components, and finally the parameters of enzyme hydrolysis conditions were determined as follows: the enzyme hydrolysis time was 50 min, pH=5, the temperature of enzyme hydrolysis was 50°C, the concentration of the substrate was 10 mg/mL, the enzyme concentration was 10 U/mL, and the substrate was dex-70.

(3) The structural features of dextran were explored; its structure was identified by high performance liquid chromatography, Fourier infrared, X-ray, scanning electron microscope (SEM) and other analytical techniques. After UHP treatment, the molecular weight and glycosidic bond of dextran did not change, still linked by α -1,6 glycosidic bond. However, after enzymatic hydrolysis, dextran was cleaved into two different components with molecular weights around 3000 Da

and 800 Da, which were confirmed to be dextran by structural identification. At the same time, the enzyme digestion and UHP treatment destroyed the crystal conformation of dextran, which changed the dextran from a crystal structure to an amorphous structure. In terms of surface morphology, the UHP treatment caused the surface of dextran to become smooth and flat, and the pores increased. In contrast, the enzymatic treatment caused only the edges of dextran to become smooth, while the surface pores disappeared.

(4) The coagulation activity of dextran was investigated; the mechanism of the effect of co-enzymatic digestion on the anticoagulant activity and antiplatelet aggregation activity of dextran was discussed, and the ultrahigh pressure could disrupt the endogenous coagulation pathway of dextran, which resulted in a decrease in the activated partial thromboplastin time (APTT), which was close to that of the blank test; at the same time, it altered the pathway of the exogenous coagulant activity of dextran and the co-coagulant pathway, and resulted in a prolongation of the PT and a fibrinogen (FIB) concentration decreased. The elongation of APTT of dextran treated by enzymatic hydrolysis was almost the same as that of untreated dextran solution. Therefore, it can be concluded that molecular weight does not affect the endogenous coagulation pathway of dextran. Ultrahigh pressure mainly affects the clotting activity of dextran in exogenous and common pathways, and enzymatic hydrolysis does not cause much change in the clotting activity of dextran. When the two were synergized, the anticoagulant activity of dextran was enhanced by 10.5% through the exogenous coagulation pathway, which increased the anticoagulant activity of dextran, while the FIB concentration was reduced by 5.1%. Platelet aggregation rate decreased by 17.3% with the addition of dextran sodium chloride solution, and platelet aggregation rate decreased by only 9.6% through ultrahigh pressure and enzyme treatment, which effectively

reduced the platelet inhibition rate of dextran.

KEY WORDS: dextran, ultrahigh pressure, enzymatic digestion, coagulant activity, platelet aggregation

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪 论	1
1.1 右旋糖酐简述	1
1.1.1 结构和来源	1
1.2.2 功能和性质	2
1.2 右旋糖酐改性	2
1.2.1 物理改性	2
1.2.2 生物改性	3
1.2.3 化学改性	4
1.3 超高压技术在多糖方面的应用	5
1.3.1 超高压技术的原理和特点	5
1.3.2 超高压技术在多糖上的应用	5
1.4 右旋糖酐凝血活性的研究现状	5
1.5 研究的目的及意义	6
1.6 研究的主要内容及技术路线图	6
1.6.1 本文的主要内容	6
1.6.2 主要技术路线	7
第 2 章 超高压对改善右旋糖酐体外抗凝血活性工艺研究	8
2.1 引言	8
2.2 试验仪器与材料	8
2.2.1 材料和试剂	8

2.2.2 设备和仪器	9
2.3 试验方法	9
2.3.1 超高压处理工艺流程	9
2.3.2 右旋糖酐水溶液的制备	9
2.3.3 单因素试验	9
2.3.4 响应面试验	10
2.3.5 右旋糖酐的体外抗凝血活性的测定	10
2.3.6 数据处理	11
2.4 数据与分析	11
2.4.1 单因素试验结果	11
2.4.2 响应面试验结果	18
2.5 本章小结	21
第 3 章 右旋糖酐酶水解工艺研究	23
3.1 引言	23
3.2 试验材料与仪器	23
3.2.1 材料和试剂	23
3.2.2 设备和仪器	24
3.3 试验方法	24
3.3.1 溶液的制备	24
3.3.2 右旋糖酐酶酶活测定方法	24
3.3.3 酶水解终产物分子量分析	25
3.3.4 右旋糖酐酶解工艺条件优化	25
3.3.5 分子量及其分布测定	26
3.3.6 数据处理	27
3.4 结果与分析	27
3.4.1 右旋糖酐分子量标准曲线	27
3.4.2 右旋糖酐终产物分子量大小分析	27

3.4.3 右旋糖酐酶解工艺条件优化	29
3.5 本章小结	34
第 4 章 超高压协同酶解对右旋糖酐结构和凝血活性影响	36
4.1 引言	36
4.2 试验材料与仪器	36
4.2.1 试验材料	36
4.2.2 试验仪器	37
4.3 试验方法	37
4.3.1 超高压协同酶解处理	37
4.3.2 分子量及其分布测定	38
4.3.3 FT-IR 分析	38
4.3.4 XRD 分析	38
4.3.5 SEM 分析	38
4.3.6 凝血四项分析	38
4.3.7 抗血小板聚集分析	39
4.3.8 数据分析	39
4.4 结果与分析	39
4.4.1 分子量的测定	39
4.4.2 FT-IR 分析	40
4.4.3 XRD 结果分析	41
4.4.4 SEM 分析	42
4.3.5 凝血四项分析	43
4.3.6 抗血小板聚集分析	45
4.5 本章小结	46
第 5 章 结论和展望	47
5.1 主要结论	47
5.2 展望	48

参考文献	49
攻读学位期间参加科研项目及发表的学术论文目录	56
致谢	57

第 1 章 绪 论

1.1 右旋糖酐简述

1.1.1 结构和来源

右旋糖酐（dextran）又名葡聚糖，是市场上最受欢迎的多糖，在食品和药品等领域广泛使用^[1]。它主要有两种制备方法：一是直接发酵法，即以蔗糖为底物，由肠膜状明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）发酵生成，再经过沉淀和水解两道工序，由喷雾干燥所得，该法得到的右旋糖酐分子量较大，常作为工业原料使用；另一种是酶合成法，是通过右旋糖酐蔗糖酶催化蔗糖产生 D-葡萄糖基，并将其转移到糖链上聚合，可灵活的形成不同分子量的右旋糖酐^[2]。右旋糖酐是通过葡萄糖脱水缩合而成，主链是以 α -1,6 糖苷键连接，分支由 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 糖苷键连接而成，如图 1-1 所示。

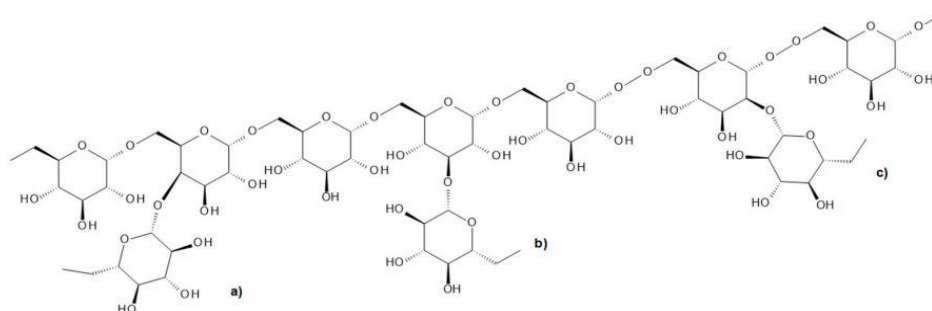


图 1-1 右旋糖酐结构图，(a) α -(1 $\rightarrow$ 4)，(b) α -(1 $\rightarrow$ 3) 和 (c) α -(1 $\rightarrow$ 2)。

Fig.1-1 Structural of dextran, (a) α -(1 $\rightarrow$ 4), (b) α -(1 $\rightarrow$ 3) and (c) α -(1 $\rightarrow$ 2).

不同来源的右旋糖酐其支链比例也大不相同。Díaz-Montes^[3]等表明右旋糖酐分子量、分支类型和比例的变化是通过生产菌株或酶的差异来影响的，发酵或合成条件的不同也会导致其发生变化。Diana^[4]等人从龙舌兰中分离出来四株肠系膜乳杆菌，对其胞外多糖进行结构鉴定发现四株菌株所产右旋糖酐的分支结构均有所差异，四种右旋糖酐的主链都是由 α -1,6 糖苷键连接，支链由 α -1,3 糖苷键连接，但连接的比例却各有不同。Du^[5]等人对从自然发酵的哈密瓜中分离出来的 *W.confusa* H2 菌株产的胞外多糖进行结构分析，发现其单糖组成为葡萄糖，主链由 α -1,6 糖苷键连接，其比例高达 96.6%，支链由 α -1,3 糖苷键连接，占比 3.4%，确定该胞外多糖为 H2

右旋糖酐。刘^[6]等以肠膜明串珠菌（CICC-23614）菌株发酵生产胞外多糖，由 GPC 和紫外光谱判断该多糖是由葡聚糖组成的右旋糖酐，经计算得出高碘酸的消耗量和甲酸的生成量、通过液相数据图和 Smith 降解判断其主链为 α -1,6 糖苷键，占比 91.4%；支链为 α -1,3 糖苷键，占比 6.5%，以及少量的 α -1,2 糖苷键和 α -1,4 糖苷键。

1.2.2 功能和性质

随着对右旋糖酐的深入研究发现，右旋糖酐在医药、化工、生物絮凝剂等方面都有着一定的作用^[7-9]。在医药方面，右旋糖酐、右旋糖酐衍生物和右旋糖酐水凝胶等由于其无毒、无免疫性而被广泛的应用在药物递送系统。右旋糖酐可以通过醚化、酯化、硫酸化和氧化等反应进行衍生化，衍生化后具有优异的水溶性、生物相容性和生物降解性，在给药系统中增强了药物的稳定性、同时还可以防止药物在血液循环中积累，为制备新的药物输送系统提供了物质基础^[7]。低分子量的右旋糖酐（dex-20、dex-40、dex-70）具有抗凝、抗血小板、和调节血液微平衡的作用，已被中国药典收录，在临床上用作代血浆^[10]。在化工方面，右旋糖酐可作为色谱柱的填充物使用，同时由于其独特的粘稠性，在石油钻井工业中可用作增稠剂使用^[11]。在生物絮凝剂方面，右旋糖酐可以与金属离子结合，具有良好的生物降解性和较强的去污能力而被用于处理污水领域。

1.2 右旋糖酐改性

右旋糖酐的改性主要分为两个方面，一是分子量的变化，由于右旋糖酐的分子量不同，其功能亦有所差异，高分子量的右旋糖酐在产糖领域被当做废弃物处理，在工业领域常用作色谱柱填充物、在食品领域用作食品添加剂使用，经济效益低^[1, 12]；而低分子量的右旋糖酐可以作为代血浆使用，在临床上被广泛使用。通过右旋糖酐分子量的变化来提高其应用价值，是右旋糖酐改性的主要原因之一。另一种是通过缀合物和衍生化的方式，断裂右旋糖酐分子量的羟基和羧基等，接入特定的化合物基团，从而提高右旋糖酐的功能价值。

1.2.1 物理改性

一般对产品的物理改性方法包括超声、微波、湿热和高速搅拌等^[13, 14]。其中超声改性是在没有引入其他化学物质的情况下，采用低频超声来有效降解右旋糖酐的分子量分布，超声可显著增加解聚，降低粘度^[15]。于^[16]等人采用 Vijayalakshmi 的超声降解模型，对超声波降解右旋糖酐的分子量

分布曲线进行拟合，为超声降解右旋糖酐分子量控制的可行性提供了理论依据，同时通过试验验证，该模型可以在一定范围内预测超声降解右旋糖酐分子量分布范围。同时陈^[17]等人通过用高效凝胶渗透色谱测定在不同超声功率、温度及初始分子量的条件下被超声降解后的右旋糖酐分子量变化，结果表明，在一定强度下超声对大分子的右旋糖酐降解作用更突出，同时降解后的右旋糖酐分子量分布相对均匀。这与于^[16]等建立的超声降解模型相符合，二者都表明单一的超声处理在低频的强度下，能有效的降解大分子量的右旋糖酐。

研究也表明，超声可以安全无害的降低右旋糖酐的分子量，但降解速率与降解效果却不是很理想，研究者通过将超声降解与酶解结合起来，达到更好的降解效果。王^[18]等人发现超声和酶解联合处理右旋糖酐可以降低在同等降解效率下降低超声的强度，减小能耗；同时通过对比超声、超声协同酶解和酶解三种方法制备特定分子量的右旋糖酐，发现在不同的超声强度下，超声酶解联合处理比单一的超声处理显著提高右旋糖酐降解速率，缩短降解时间，同时使得分子量降解下限降低，最终确定在 4 W/ml 的超声强度下，酶解 80 min 能在较短的时间得到 $10^4\sim 10^5$ Da 的分子量片段。超声在右旋糖酐降解上展现出了较大的应用潜力，但降解的机制尚未确定，还有待进一步的研究。

1.2.2 生物改性

生物改性主要是酶降解法，是通过右旋糖酐酶专一性的识别、断裂右旋糖酐分子中的 α -1,6 糖苷键，以此来达到调控右旋糖酐分子量的目的^[19]。酶降解法相对于传统的酸水解，操作简单、反应条件温和，且产品中不会和其他物质混入，更受研究者的关注。另外随着生物技术的进步和对绿色、清洁、安全产品需求的增加，通过微生物发酵对多糖进行改性在提高其理化和生物活性方面变得越来越重要^[20]。

目前针对酶法调控右旋糖酐分子量主要有单酶降解法和多酶协同法两种方式。一种是直接以大分子右旋糖酐为原料，通过右旋糖酐酶或者超声等协同右旋糖酐酶处理从而达到降解分子量的目的。陈^[21]等人通过对不同分子量和不同浓度的右旋糖酐进行酶解，考察 0~120 min 酶解过程中，右旋糖酐分子量、多分散系数以及 $10^4\sim 10^5$ Da 分子量片段所占百分比的变化。结果表明，随着酶解时间的增加，分子量逐步降低，但是在初始分子量较大时，酶解初始阶段就发生了明显的降解， $10^4\sim 10^5$ Da 分子量片段在初始降解阶段所占百分比比较大。

值得注意的是，不同分子量和不同底物浓度的右旋糖酐都遵循二级降

解动力学。苏^[1]等人通过研究酶固定化策略对右旋糖酐水解行为的影响，评价 PDA 和 TA/APTES 两种膜的表面修饰方法，通过培养和污染诱导两种模式在超滤膜基质上固定化右旋糖酐酶的效果，研究酶降解过程中寡聚右旋糖酐的生产以及分子量的调控。同时研究者们^[10, 22]通过对比酸解法和酶解法来调控右旋糖酐分子量，发现两种方法都可以调控右旋糖酐分子量，产物的分布系数都在合理范围内，产品均一性较好。但酶解法反应温度比酸解法低，且能耗小，没有杂质产生，表明酶解法是一种低能耗的生产低分子量右旋糖酐的方法。

另一种是在发酵阶段在控制发酵条件的基础上利用多酶协同来完成右旋糖酐的生产以及分子量的调控，可以省去繁杂的步骤，节省能耗。因此，利用双酶协同来合成制备和调节生产低聚右旋糖酐成为研究热点。甘^[23]等人在右旋糖酐蔗糖酶体系中，通过右旋糖酐酶添加次数、添加时间来揭示右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶的协同作用过程。利用四种不同的右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶的组合，合成了多种高收率的低聚右旋糖酐。Iqbal^[24]等对系膜乳杆菌 KIBGE-IB26 菌株生产天然的右旋糖酐的发酵条件进行优化，同时对酸解和酶解处理后的低分子量的右旋糖酐进行表征，确定酶降解右旋糖酐的优势。

总结以上研究内容发现，近几年，国内外学者致力于研究酸解和右旋糖酐酶降解右旋糖酐，从而获得低分子量的右旋糖酐。但相对于酸水解，酶解法反应条件温和，高效节能的同时提高了右旋糖酐的品质，更受学者们的青睐。

1.2.3 化学改性

右旋糖酐的结构链上具有大量的活性基团，可以通过化学修饰的方法提高右旋糖酐的生物活性。主要包括氧化反应、酯化反应和醚化反应等。通过改性右旋糖酐可以得到各种药物-右旋糖酐偶联物、右旋糖酐水凝胶、右旋糖酐-胶束纳米载体体系、右旋糖酐-磁性层状复合材料和葡聚糖的生物粘接剂口服输送体系等在医药领域被广泛使用^[7]。

除了医药领域外，右旋糖酐改性絮凝剂也是废水处理的一种重要材料。李^[25]等通过接枝共聚反应合成了新型的阴离子共聚物，其在碱性条件下表现出较强的絮凝能力，同时具有高效、耐热和可持续使用等特点。右旋糖酐金属类化合物-右旋糖酐铁作为补铁类药物应用在临床上的缺铁性贫血，也备受关注。王^[26]等通过定点诱变一步酶法合成分子量在 3k-6k 的右旋糖酐，它的载铁量约为 33.5%，对右旋糖酐铁商业化生产提供了有力的支撑。

1.3 超高压技术在多糖方面的应用

1.3.1 超高压技术的原理和特点

超高压技术原理是容器内一定温度下施加 100~1000 MPa 压力, 改变形成生物高分子立体结构的各种非共价键, 使淀粉变性、蛋白质凝固, 同时激活或者失活酶活性, 灭杀微生物。超高压技术属于非热技术, 具有升压快, 作用时间短, 温度要求低和提取率高等优点, 被广泛应用于天然产物的提取上。超高压技术的优势是能够在生产过程中不添加防腐剂的情况下, 也能有效抑制食品的腐败, 并减少热敏性功能营养成分的损失, 提高安全水平。

1.3.2 超高压技术在多糖上的应用

超高压可以提高多糖的提取率, 被广泛应用于多糖提取领域^[27]。陈^[28]等通过超高压提取大叶黄茶多糖, 研究其在超高压条件下, 结构和生物活性的变化, 结果表明经超高压处理后, 大叶黄茶多糖的单糖组成成分发生了明显变化, 提取的多糖分子量也有差异, 改变了大叶黄茶多糖的表面结构和空间形态, 对其生物活性也有着明显的增强。

然而, 在其他研究中^[29], 经超高压辅助提取, 多糖的一级结构并没有发生变化。Zhu^[30]等从黄芪中分离得到一种具有降血糖活性的多糖结合物, 经超高压处理后, 其一级结构没有发生改变, 但对高级结构产生了一定的影响, 增强了其对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用。Chen^[31]等利用超高压复合酶技术在火龙果果皮中成功提取火龙果果皮多糖, 增加了火龙果果皮多糖的提取率的同时改善了其理化性质, 增强了抗氧化性。超高压在多糖改性中有着巨大的潜力, 通过改变多糖表面和空间结构, 使能发挥效用的片段暴露出来, 从而达到提高多糖生物活性的目的。

1.4 右旋糖酐凝血活性的研究现状

右旋糖酐因其特性已被用作临床诊断, 中分子量的右旋糖酐不易渗出血管, 可提高血浆胶体渗透压, 从而作为血容量扩充药, 维持胶体渗透压^[32]。低分子和小分子的右旋糖酐能抑制血小板和红细胞的聚集, 从而降低血液的粘滞性, 能防止血栓形成, 改善微循环。Bosek^[33]等通过考察红细胞聚集与右旋糖酐分子质量的关系, 表明了红细胞压积的平均孔隙率是与右旋糖酐浓度息息相关的, 增加了对引起红细胞聚集性质的理解, 提高了右旋糖酐作为血浆代用品在医疗领域中的认识。Neu^[34]等人在右旋糖酐分子量对红细胞聚集的影响中发现, 分子量在 200-500 kDa 左右能够更好地

使红细胞聚集，同时右旋糖酐对红细胞聚集的影响并不是随着分子量的增加而增加。

研究也发现右旋糖酐在右旋糖酐方面具有一定的优势，如，Xu^[35]等通过对右旋糖酐在载药过程中研究发现，浓度为 10 % 的 dex-40 溶液可以增加红细胞的载药量，能很好的保护了其生物活性。同时对硫酸化的右旋糖酐抗凝血活性也有相关研究，Drozd^[36]和 Zeerleder^[37]在研究中表明，硫酸右旋糖酐对抗凝血活性的影响是取决于右旋糖酐的分子量而不是抗凝血酶，分子量越低，其右旋糖酐越低。

1.5 研究的目的及意义

右旋糖酐通过改性来提高其自身的生物活性在国内外已被广泛研究，但对于右旋糖酐作为代血浆的使用却鲜有报道，对于代血浆的研究更多的集中在羟乙基淀粉溶液和明胶等方面。本论文研究目的是探讨超高压处理右旋糖酐水溶液、右旋糖酐酶水解处理右旋糖酐水溶液、超高压和右旋糖酐酶协同处理右旋糖酐水溶液对右旋糖酐的结构的影响，在此基层上对加工工艺进行优化，以提高其抗凝血活性。

利用 FT-IR、HPLC、X-ray 衍射、SEM 等表征手段分析改性后右旋糖酐的初级结构，以及初步分析改性后的右旋糖酐对于体外抗凝血活性和体外抗血小板聚集的影响，为降低右旋糖酐作为代血浆使用时产生的副作用提供理论依据，同时也为了降解大分子右旋糖酐，提高右旋糖酐的经济价值提供技术支撑。

本文通过上述两种方法对右旋糖酐改性的影响，利用体外抗凝血活性和抗血小板聚集活性的分析，得出超高压和酶解对右旋糖酐抗凝血活性的作用机制，可以有效的减缓使用右旋糖酐时所带来的副作用，说明超高压和酶解在提高右旋糖酐凝血活性方向有着潜在的研究价值。

1.6 研究的主要内容及技术路线图

1.6.1 本文的主要内容

(1) 基于超高压对右旋糖酐抗凝血活性的影响，通过响应面法优化超高压处理工艺。

(2) 通过对右旋糖酐酶水解途径的研究，得到目标产物，同时确定右旋糖酐有效的降解条件。

(3) 利用常见的结构表征的方式初步分析超高压协同酶解对右旋糖酐抗凝血活性和抗血小板聚集率的作用机理。

1.6.2 主要技术路线

右旋糖酐改性的技术路线如图 1-2 所示。

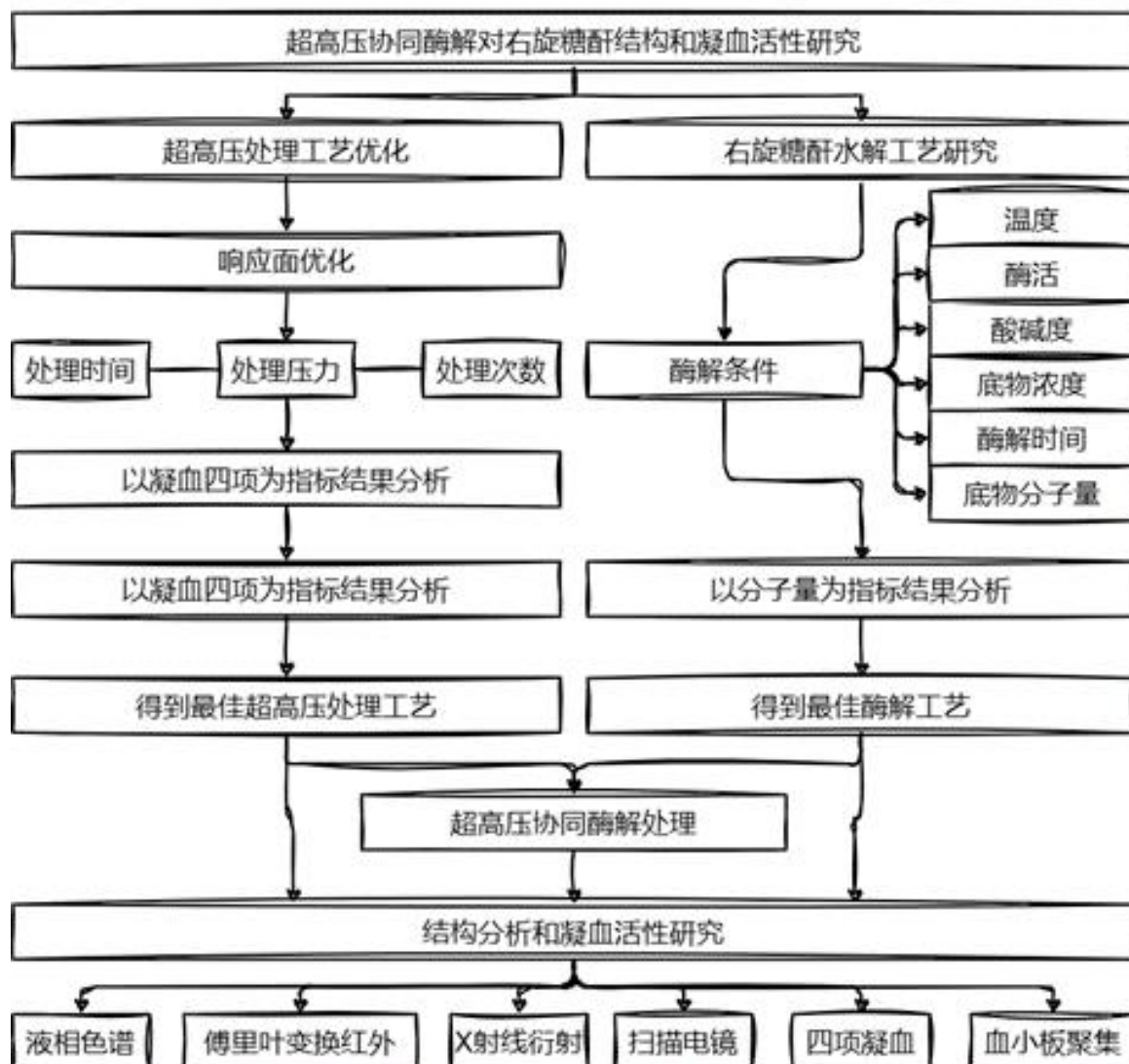


图 1-2 右旋糖酐改性的技术路线图

Fig.1-2 Technical roadmap of dextran modification

第 2 章 超高压对改善右旋糖酐体外抗凝血活性工艺研究

2.1 引言

代血浆是临床上常用的一种药物，用于血容量扩充，它可以在静脉中停留较长时间，能够有效提高血管内胶体渗透压，把水分从组织外吸收进入到血管当中，从而有效的改善血容量^[38]。右旋糖酐作为临床上常用的代血浆，具有提高血浆渗透压、增加血容量、改善体内微循环等作用。主要有中分子量右旋糖酐（dex-70），低分子量右旋糖酐（dex-40）和小分子量右旋糖酐（dex-10）^[39]。不同分子量的右旋糖酐其扩容强度和扩容时间也有差异，分子量越大，其扩容强度越大，扩容时间越长，dex-70 溶液分子量接近血浆蛋白的重量，扩容时间 24 小时左右，6%的右旋糖酐生理盐水溶液 500 ml 可增加血容量 450~500 ml，但在输入量过大时，可导致凝血时间延长、血浆蛋白浓度降低等不良反应。通过采用超高压处理的方式对右旋糖酐溶液进行处理，以活化部分凝血酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）以及纤维蛋白原（FIB）的变化值为指标，探究超高压对右旋糖酐凝血活性的影响。

2.2 试验仪器与材料

2.2.1 材料和试剂

试验所需材料和试剂如表 2-1 所示。

表 2-1 试验所需材料和试剂

Tab.2-1 The materials and reagents of experiment

名称	纯度或规格	产地
右旋糖酐-70	500 g	生工生物工程（上海）有限公司
无水乙醇	500 mL	天津市凯通化学试剂有限公司
氯化钠	500 g	无锡市亚盛化工有限公司
FIB 试剂盒	6*2 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
APTT 试剂盒	6*2 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
PT 试剂盒	6*4 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
TT 试剂盒	6*4 mL	北京赛科希德科技股份有限公司

2.2.2 设备和仪器

试验所需设备和仪器如表 2-2 所示。

表 2-2 试验所需设备与仪器

Tab.2-2 The equipment and instruments of experiment

设备或仪器名称	型号	生产厂家
超高压设备	HPP.L1-600/3	天津华泰森淼超高压设备工程技术有限公司
电子分析天平	JB/7534	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
磁力加热搅拌器	78-1	上海江星仪器有限公司
真空封口机	VS5400	东莞市盈尔电器有限公司
真空冷冻干燥机	LC-10N-50A	上海力辰邦西仪器科技有限公司
低速离心机	SC-3616	安徽中科中佳科学仪器有限公司
全自动凝血分析仪	SF8200	北京赛科希德科技有限公司
烘箱	DHG-9030A	上海一恒科学仪器有限公司

2.3 试验方法

以 APTT、TT、PT 和 FIB 值的变化为考察凝血活性的指标，考察不同处理压力、处理时间和处理次数对右旋糖酐氯化钠制剂凝血活性的影响，在此基础上选择参数和水平，根据 Box-Behnken 响应面设计方案，确定超高压处理工艺。

2.3.1 超高压处理工艺流程



2.3.2 右旋糖酐水溶液的制备

称取 10 g 的商品右旋糖酐固体粉末，加入生理盐水溶液配置成浓度为 100 mg/ml 的右旋糖酐氯化钠溶液，定容静置 24 h 后，装入耐高压聚乙烯包装袋，密封保存以备用。

2.3.3 单因素试验

超高压对改善右旋糖酐的凝血活性的优化工艺从单因素试验入手，通过凝血四项的指标，考察处理时间、处理压力和处理次数对右旋糖酐凝血活性的影响规律。

2.3.3.1 超高压处理时间的影响

取上述水溶液放入超高压容器中，在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，350 MPa，加压 1 次，料液比为 1:10 的条件下，研究不同处理时间（10 min、20 min、30 min、40 min 和 50 min）对右旋糖酐凝血活性的影响，以 APTT、PT、TT、FIB 的变化为响应值。

2.3.3.2 超高压处理压力的影响

取上述水溶液放入超高压容器中，在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，最佳处理时间，加压 1 次，料液比为 1:10 的条件下，研究不同处理压力（250 MPa、300 MPa、350 MPa、400 MPa、450 MPa）对右旋糖酐凝血活性的影响，以 APTT、PT、TT、FIB 的变化为响应值。

2.3.3.3 超高压处理加压次数的影响

取上述水溶液放入超高压容器中，在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，最佳处理时间，最佳处理压力，料液比为 1:10 的条件下，研究不同处理次数（处理 1 次、处理 2 次、处理 3 次、处理 4 次、处理 5 次）对右旋糖酐凝血活性的影响，以 APTT、PT、TT、FIB 的变化为响应值。

2.3.4 响应面试验

为进一步优化试验参数，需要在单因素试验的基础上，选取超高压处理压力大小（A）、处理时间（B）和处理次数（C）三个因素为主要因素，采用 Box-Behnken（BBD）设计原理，以凝血四项 APTT、PT、TT 和 FIB 的变化为响应值，应用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行 3 因素 3 水平响应面优化试验，建立超高压对改善右旋糖酐抗凝血活性的优化工艺。根据单因素试验研究结果，采用 BBD 的设计方法设计试验，试验因素与水平见表 2-3。

表 2-3 响应面因素和水平试验设计

Tab.2-3 Response surface factors and horizontal experimental design

试验因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
处理压力 MPa	A	350	400	450
处理时间 min	B	10	20	30
处理次数 c	C	2	3	4

2.3.5 右旋糖酐的体外抗凝血活性的测定

静脉采血，将新鲜血液（医学检查废血，从健康志愿者处获得，由滁州市中西医结合医院提供）与 3.2 % 柠檬酸钠按 9:1 比例混合均匀。在室

温下以 3000 rpm 离心 5 min，取上清液，4℃冷藏保存。取右旋糖酐生理盐水溶液，将待测血浆和右旋糖酐氯化钠溶液按照 4:1 的体积比进行混合均匀，然后进行体外抗凝血活性的研究。

2.3.5.1 APTT 的测定

取 50 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）加入测试杯中，同时加入 50 μL 配制好的 APTT 试剂到测试杯中，混合摇匀后在 37℃ 预温区准确培育 180 s，然后向测试杯中加入 37℃ 的 CaCl_2 溶液，同时用仪器记录结果。

2.3.5.2 PT 的测定

取 50 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯中，于 37℃ 预温区中预热 180 s，将预温后的 37℃ PT 试剂 100 μL 加入到上述测试杯中，同时用仪器记录结果。

2.3.5.3 TT 的测定

取 100 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯中，于 37℃ 预温区中预热 180 s，将预温后的 37℃ TT 试剂 100 μL 加入到上述测试杯中，同时用仪器记录结果。

2.3.5.4 FIB 的测定

取 100 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯中，于 37℃ 预温区中预热 180 s，将 FIB 试剂（室温）加入测试杯中，同时用仪器自动测试并换算 FIB 含量。

2.3.6 数据处理

所有试验均重复 10 次操作，Design-Expert.V8.0.6.1 软件分析响应面试验结果，IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行平均标准差和 ANOVA 分析，用配对样本 T 检验进行实验前和实验后差异显著性分析。Origin 2021 软件作图。

2.4 数据与分析

2.4.1 单因素试验结果

2.4.1.1 处理压力对凝血四项的影响

超高压处理压力对 PT 的影响如图 2-1 所示。与实验前相比，在不同的处理压力下实验后，PT 均显著升高 ($P<0.05$)。这样可能是，超高压改变了右旋糖酐结构。与原样进行对比，随着压力的增加，PT 增加的时间呈现先增强在逐渐减弱的趋势，其中在 400 MPa 时，PT 的增加值呈现最大化为 2.4 s。这样可能是不同超高压对右旋糖酐结构的影响不同。该研

究说明，超高压处理可能通过改变右旋糖酐的结构改变 PT 值。

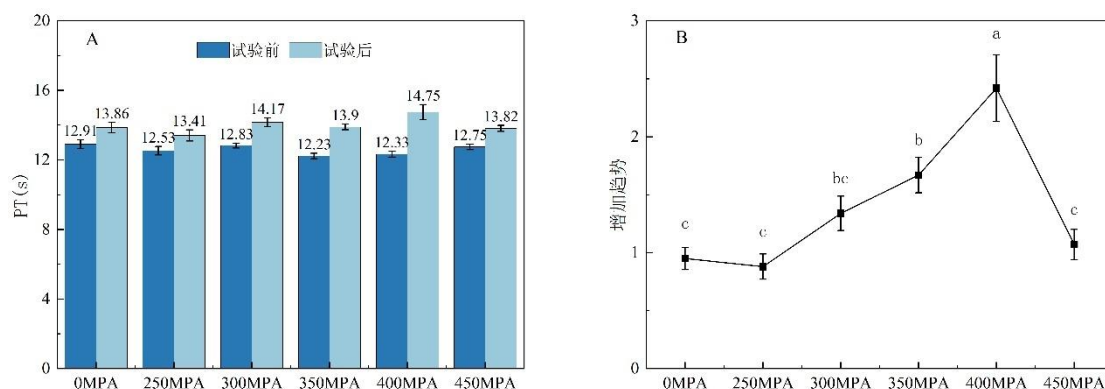
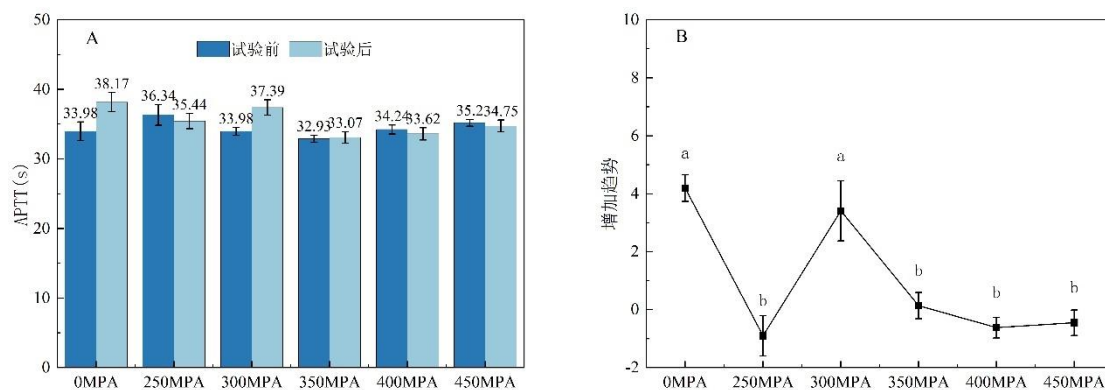


图 2-1 超高压处理压力对 PT 的影响

Fig.2-1 The Effect of UHP treatment pressure on PT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate



significant difference ($P < 0.05$)

图 2-2 超高压处理压力对 APTT 的影响

Fig.2-2 The Effect of UHP treatment pressure on APTT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA.* in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

如图 2-2 所示，与实验前相比，原样组和 300 MPa 组实验后 APTT 均显著升高 ($P < 0.05$)。APTT 的变化趋势较为复杂，在 300 MPa 时呈现与原样相似的结果，增加的时间为 3.41 s，但比起添加右旋糖酐 APTT 增长的 4.19 s 却有所降低，在其他压力条件下，APTT 表现出近乎稳定的状态，增加值在 0 s 上下波动，几乎与不添加右旋糖酐溶液的保持一致的结果。

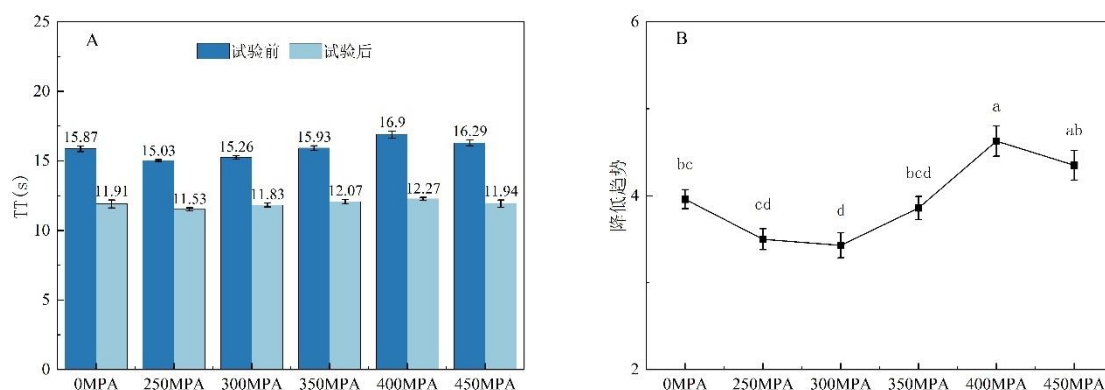


图 2-3 超高压处理压力对 TT 的影响

Fig.2-3 The Effect of UHP treatment pressure on TT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

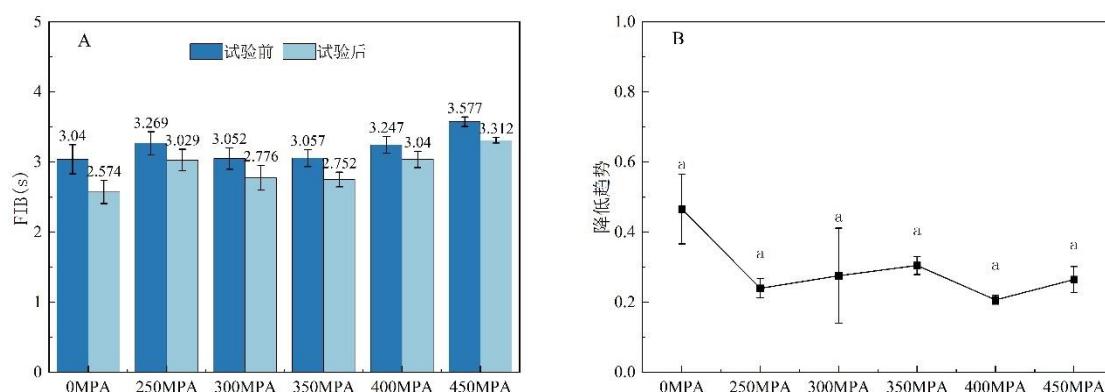


图 2-4 超高压处理压力对 FIB 的影响

Fig.2-4 The Effect of UHP treatment pressure on FIB. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

超高压处理压力对 TT 的变化如图 2-3 所示，与实验前相比，在不同的处理压力下实验后 TT 均显著降低 ($P < 0.05$)。随着右旋糖酐的添加，TT 均保持负增长，这是由于此次试验中在血浆处理过程中添加了 Ca^{2+} ， Ca^{2+} 可以导致 TT 值的缩短。超高压处理压力对 FIB 的浓度变化如图 2-4 所示，与实验前相比，在原样、250 MPa、350 MPa、400 MPa 和 450 MPa 条件下，实验后 FIB 均不显著降低。随着压力的增加，浓度增加值在 0.3 g/L 上下波动，趋于稳定的状态，但相对于未经超高压处理的样品，有着明显的降低趋势。所以超高压处理压力选择 400 MPa。

2.4.1.2 处理时间对凝血四项的影响

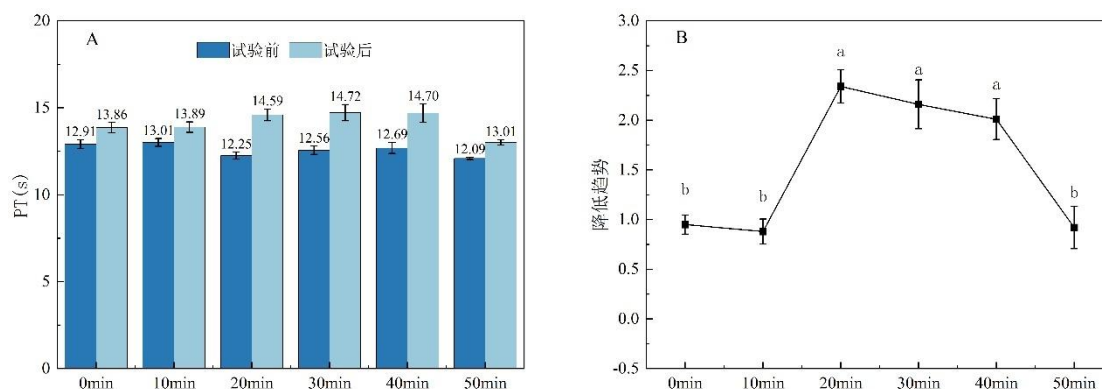


图 2-5 超高压处理时间对 PT 的影响

Fig.2-5 The Effect of UHP treatment time on PT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

超高压处理时间对 PT 的变化如图 2-5 所示，与实验前相比，不同超高压处理时间均显著增加实验后 PT 值。随着处理时间的增加，PT 值呈现先减后增再减的状态，其中在 20 min 时 PT 的值增加了 2.34 s，30 min 时 PT 的值增加了 2.16 s，40 min 时 PT 的值增加了 2.01 s，PT 的值在此三个时间段数据对比变化最大。

超高压处理时间对 APTT 的影响如图 2-6 所示，与实验前相比，原样和超高压处理 40 min 均显著增加实验后 APTT 值 ($P < 0.05$)。右旋糖酐在没有经过超高压处理时，APTT 值增加了 4.19 s，经过超高压处理后 APTT 的延长值随着时间的变化从 4.19 s 逐渐缩短，最终在 0 s 上下波动。这表明随着处理时间的延长，APTT 前后变化的值逐渐减小，在超过 10 min 后，APTT 的就基本没有太大的变化。

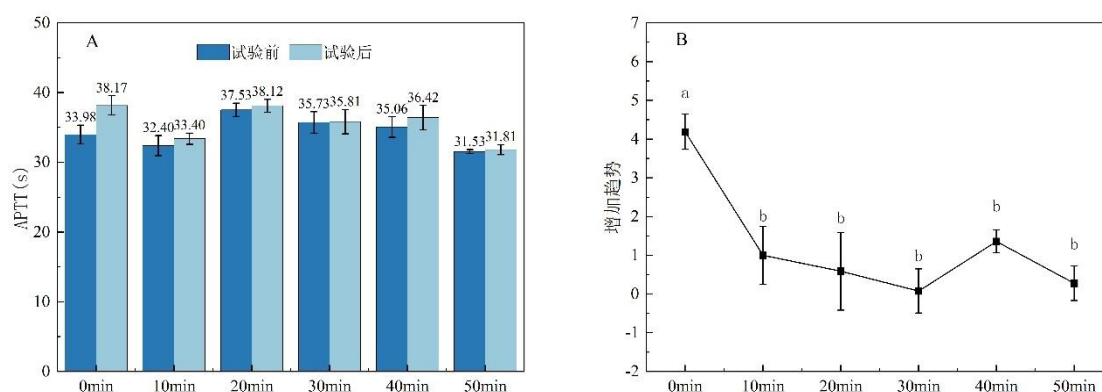


图 2-6 超高压处理时间对 APTT 的影响

Fig.2-6 The Effect of UHP treatment time on APTT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

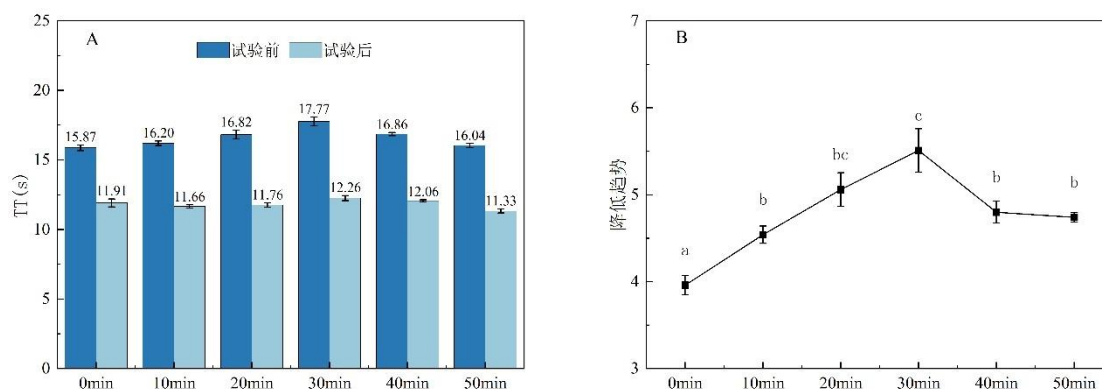


图 2-7 超高压处理时间对 TT 的影响

Fig.2-7 The Effect of UHP treatment time on TT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

超高压处理时间对 TT 的影响如图 2-7 所示, 与实验前相比, 不同超高压处理时间均显著降低实验后 TT 值。TT 的值从 15.87 s 减少至 11.91 s, 采用超高压处理之后, 依旧呈现降低的趋势, 降低值都在 4.8 s 上下波动。但临床上 TT 的减少没有任何意义, 此次试验中出现是由于在处理血浆时添加了 CaCl_2 溶液, Ca^{2+} 可以导致 TT 值的降低。所以最佳的处理时间为 20min。

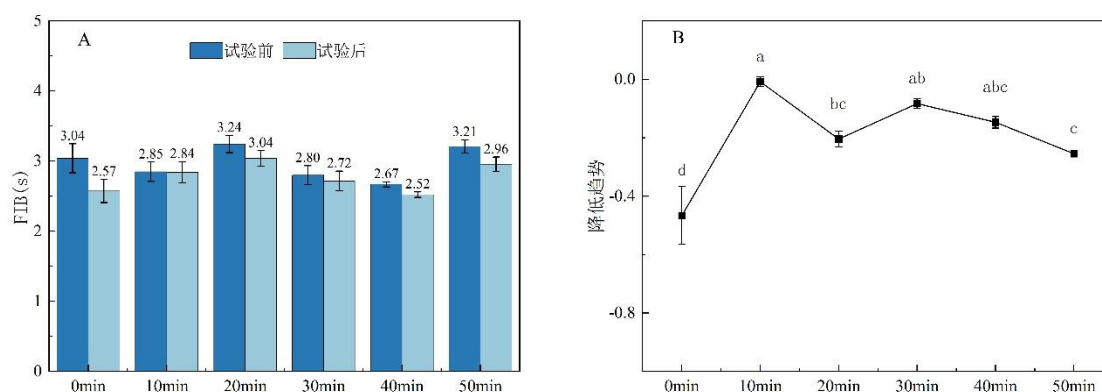


图 2-8 超高压处理时间对 FIB 的影响

Fig.2-8 The Effect of UHP treatment time on FIB. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

超高压处理时间对 FIB 的影响如图 2-8 所示, 与实验前相比, 原样、超高压处理 20 min、30 min、40 min 和 50 min 均显著降低实验后 FIB 值 ($P < 0.05$)。FIB 的浓度增加了 0.17 g/L, 经过超高压处理后 FIB 的浓度值从 0.47 g/L 随着处理时间的增加, 逐渐降低至 0.1 g/L 上下波动。FIB 的

组间变化随着处理时间的延长逐渐稳定，在没有经过超高压处理时，FIB浓度的变化差异性较大，但随着超高压处理时间的延长，该差异性减小。

2.4.1.3 处理次数对凝血四项的影响

超高压处理次数对 PT 的影响如图 2-9 所示，与实验前相比，原样、超高压处理 3 次、4 次和 5 次均不显著增加实验后 PT 值。处理次数是为了更好的使样品均匀受力，随着处理次数的增加，PT 的增加值先是减小至 0.24 s 左右，随后有个小幅度的增加，在处理 3 次时达到顶峰，随后增长幅度在 1.1 s 上下波动，同时保持着较为稳定的状态。

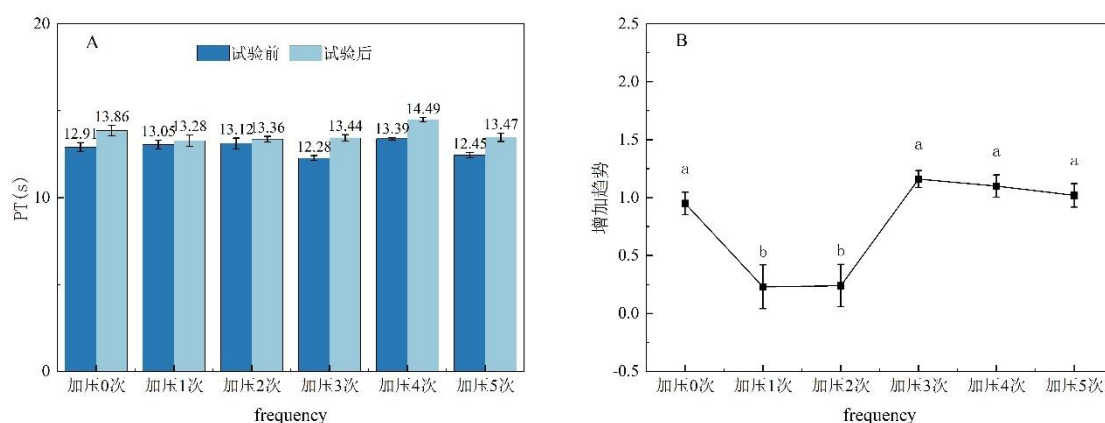


图 2-9 超高压处理次数对 PT 的影响

Fig.2-9 The Effect of the number of UHP treatments on PT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

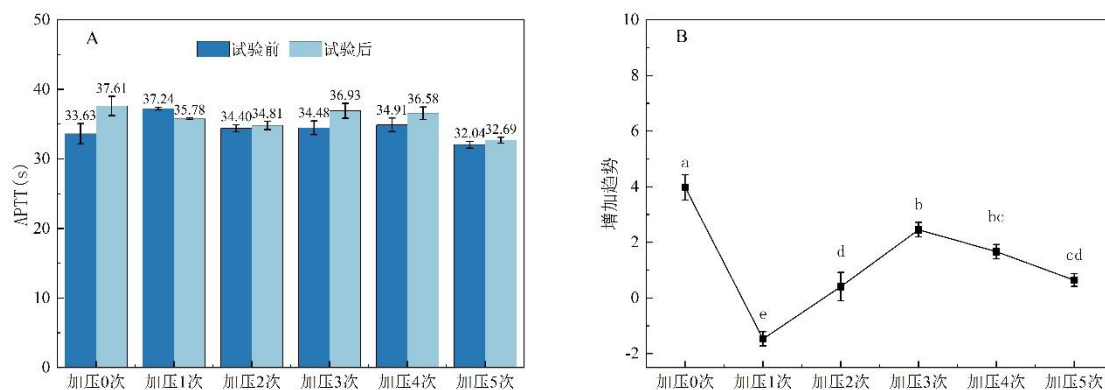


图 2-10 超高压处理次数对 APTT 的影响

Fig.2-10 The Effect of the number of UHP treatments on APTT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

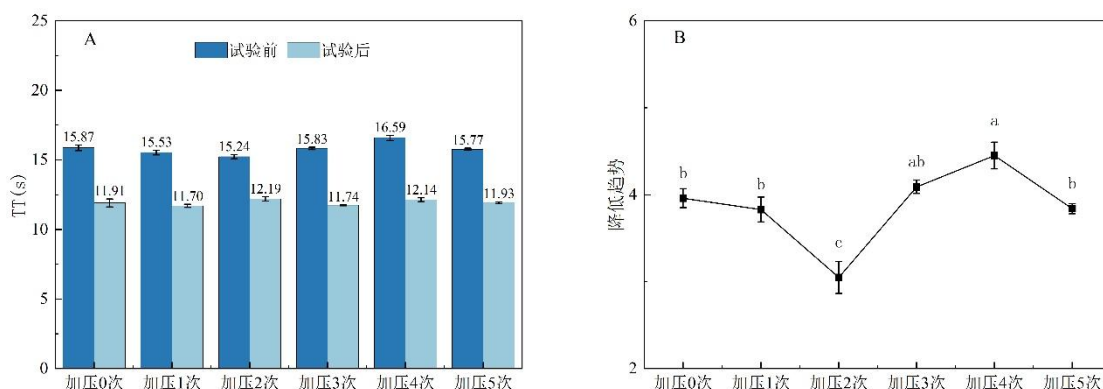


图 2-11 超高压处理次数对 TT 的影响

Fig.2-11 The Effect of the number of UHP treatments on TT. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

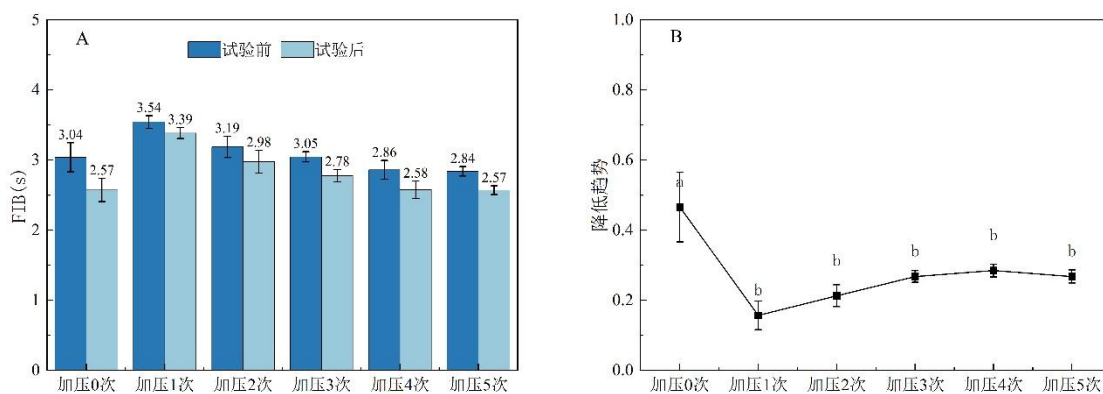


图 2-12 超高压处理次数对 FIB 的影响

Fig.2-12 The Effect of the number of UHP treatments on FIB. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

超高压处理次数对 APTT 的变化如图 2-10 所示, 与实验前相比, 原样、超高压处理 3 次和 4 次均显著增加实验后 APTT 值, 超高压处理 1 次显著降低实验后 APTT 值 ($P < 0.05$)。变化值在处理 1 次时极剧下降, 从 3.98 s 缩短至 -1.46 s, 随着处理次数的增加, 呈现增后减的趋势, 在处理 3 次时达到顶峰 ($P < 0.05$), 并逐渐稳定在 1.67 s 左右。

超高压处理次数对 TT 的变化值如图 2-11 所示, 与实验前相比, 原样和不同超高压次数均显著降低实验后 TT 值。整体保持相对稳定, 略有波动。超高压处理次数对 FIB 的变化值如图 2-12 所示, 与实验前相比, 原样和不同超高压次数均显著降低实验后 FIB 值。在超高压处理 1 次后, 有着一次明显的降低 ($P < 0.05$), 从浓度降低值从 0.47 g/L 下滑至 0.15 g/L。随着处理次数的增加, 血浆中添加右旋糖酐与否对 FIB 值的变化则没有太大

区别，趋于相对稳定的状态，浓度值在 0.28 g/L 上下波动，这表明右旋糖酐对血浆中 FIB 浓度值的影响通过超高压的处理后，正逐渐减小。由此可知，最佳的处理次数在 3 次左右。

2.4.2 响应面试验结果

表 2-4 响应面试验及结果
Tab.2-4 Response surface test and results

试验序号	因素			PT
	处理压力 A/MPa	处理时间 B /min	处理次数 C /c	相应时间 Y/s
1	400	20	3	1.64
2	400	30	2	1.37
3	400	30	4	0.79
4	350	20	2	1.05
5	450	20	2	0.95
6	400	10	4	1.37
7	400	20	3	1.65
8	450	20	4	1.20
9	400	20	3	1.63
10	350	30	3	0.71
11	400	20	3	1.60
12	450	10	3	0.76
13	450	10	2	0.72
14	400	20	3	1.65
15	350	20	4	1.07
16	450	30	3	0.76
17	350	10	3	0.63

2.4.2.1 响应面优化试验结果

由单因素试验可以观察到，超高压对右旋糖酐凝血活性的影响主要体现在 PT 的变化上，对于 APTT、TT 以及 FIB 的变化则相对稳定一点，在临床上，PT 的变化超过 3s 就会判断定为异常，而 APTT 的变化要超过对照值 10s 以上才会被判定为异常，本次试验 PT 的变化值在 2s 上下浮动，而 APTT 的变化最大只是在 6s 左右浮动，所以在进行响应面试验时，以 PT 作为响应值来进行分析。

为进一步优化试验参数，在单因素试验的基础上，采用 Box-Bekeken (BBD) 设计原理，选取超高压处理压力大小 (A)、处理时间 (B) 和处理次数 (C) 三个因素，以 PT 为响应值，应用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行 3 因素 3 水平响应面优化试验，建立超高压对改善右旋糖酐抗凝血活性的优化工艺，响应面优化试验方案和结果如表 2-4 所示。

2.4.2.2 回归模型拟合及方差分析

对表 2-4 数据进行回归拟合，得到以 PT 为响应值的二次多项回归方程： $Y=1.63+0.026A+0.019B-0.01-43C-0.02AB+0.058AC-0.31BC-0.46A^2-0.46B^2-0.11C^2$

式 2-1

表 2-5 回归模型方差分析表
Tab.2-5 Regression model ANOVA table

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F
模型	2.4	9	0.27	195.72	<0.0001
A 处理压力	5.513×10^{-3}	1	5.513×10^{-3}	4.04	0.0843
B 处理时间	2.813×10^{-3}	1	2.813×10^{-3}	2.06	0.1941
C 处理次数	0.014	1	0.014	10.60	0.0140
AB	1.6×10^{-3}	1	1.6×10^{-3}	1.17	0.3146
AC	0.013	1	0.013	9.70	0.0170
BC	0.38	1	0.38	277.38	<0.0001
A ²	0.88	1	0.88	644.90	<0.0001
B ²	0.90	1	0.90	659.09	<0.0001
C ²	0.05	1	0.050	37.02	0.0005
残差	9.545×10^{-3}	7	1.36×10^{-3}		
失拟项	7.825×10^{-3}	3	2.608×10^{-3}	6.07	0.0571
纯误差	1.72×10^{-3}	4	4.3×10^{-3}		
总和	2.41	16			
$R^2=0.996$, $R^2_{Adj}=0.991$, 变异系数 C.V.%=3.21					

注： $P<0.0001$ ，高度显著； $P<0.05$ ，显著； $P>0.05$ ，不显著。

对回归拟合方程模型进行方差分析，结果由表 2-5 可知，回归拟合模型 $P<0.0001$ ，拟合模型高度显著；失拟项 $P=0.0571>0.05$ ，差异不显著，表示此模型合理且不再引入更高次的项；模型拟合系数 R^2 为 0.996， R^2_{Adj} 为 0.991，拟合模型能阐明 99.1% 的响应值，变异系数为 3.21%，表明该模型可信度较高。从回归方程的显著性检验可知，三个因素对右旋糖酐凝血酶原时间的影响程度为： $C>A>B$ 。

2.4.2.3 响应面各因素交互作用分析

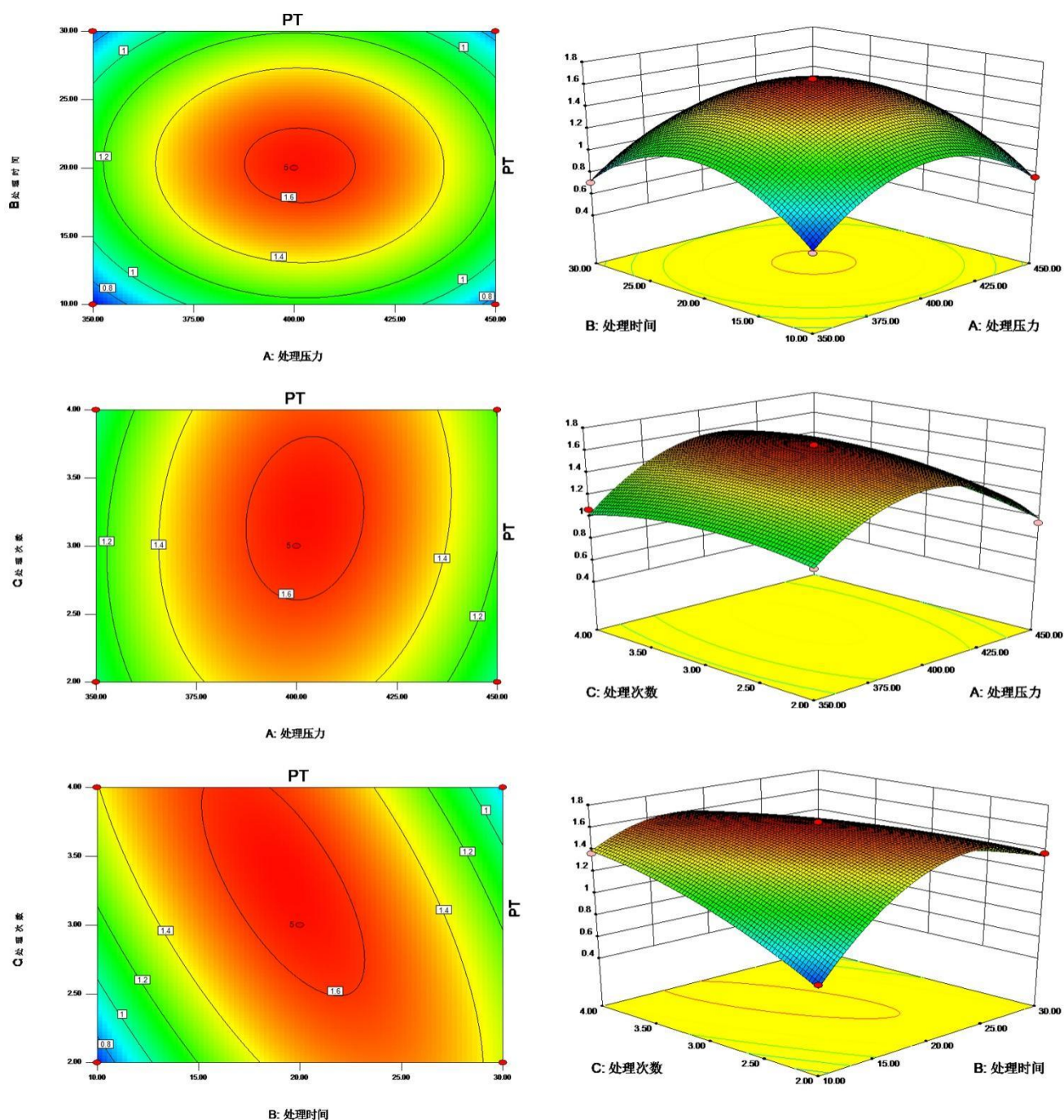


图 2-13 超高压处理条件交互作用对 PT 的影响

Fig.2-13 Effect of UHP treatment condition interaction on PT

在响应面分析中，响应面坡度越陡，表明各因素对响应值的影响越显著，等高线的密集度表明各因素间交互作用的显著性，越密集表明各因素对响应值的影响越大^[40]。从图 2-13 中可以看出，处理时间和处理压力的三维曲面图陡峭，等高线密集且为椭圆形，说明处理压力和处理时间之间的交互作用明显；而处理压力与处理次数及处理时间与处理次数之间虽然

具有一定的交互作用，单作用不是特别明显。可见在工艺优化试验中，主要是处理压力和处理时间之间的交互作用对右旋糖酐的 PT 值影响更明显。

2.4.2.4 响应面优化及验证试验

根据响应面实验结果，优化试验参数为处理压力为 402.63 MPa，处理时间为 19.06 min，处理次数为 3.34 次，在该条件下右旋糖酐对 PT 的影响值最大，延长 1.64 s。考虑到试验的可行性对各种处理参数进行优化，处理压力调整为 400 MPa，处理时间 19 min，处理次数为 3 次后进行 10 次平行验证，得到右旋糖酐对 PT 的影响延长 1.71 s。考虑实际操作过程中，志愿者血液存在一定差异，此次结果与拟合模拟理论预测相接近。

2.5 本章小结

本次试验是利用超高压处理右旋糖酐溶液，对比处理前后，右旋糖酐氯化钠溶液体外抗凝血活性的影响，以凝血四项指标为参考，优化超高压处理工艺，通过响应面试验分析，得出最佳的优化方案。

凝血“瀑布学说”是凝血基础理论中的主要学说，它是指在正常情况下血液中的凝血因子以无活性酶原形式存在，当某一凝血因子被激活后，可使许多凝血因子按一定的次序先后被激活，彼此之间存在着复杂的催化作用的一种假说。经典的“瀑布学说”认为凝血过程是一些凝血因子相聚酶解激活的过程，通常分为内源性凝血途径、外源性凝血途径和共同凝血途径^[41]。APTT 主要反映的是内源性凝血系统的状况，是指血液中凝血因子在活化部分凝血酶的作用下形成凝血酶所需要的时间^[42, 43]。PT 是指血液中凝血酶原转化为凝血酶的时间^[44, 45]，凝血酶原是一种血浆蛋白，它在凝血过程中被转化为凝血酶，从而促进血液凝固，是反应外源性凝血系统状况。TT 主要反应的是纤维蛋白原转化为纤维蛋白的时间^[46]，FIB 含量测定是加入凝血酶将可溶性的血浆蛋白纤维蛋白原转化为纤维蛋白，TT 与 FIB 的检测步骤基本相同，其最终都是使纤维蛋白原凝固，两者组成共同凝血途径。

通过单因素试验发现，超高压处理对右旋糖酐体外抗凝血活性的影响主要是通过外源性凝血途径来完成的，经过超高压处理后，APTT 的增加值减小，当压力超过 350 MPa 时，APTT 的变化趋近于零。TT 和 FIB 前后变化差异也随着时间和压力的增加而逐渐缩小，尤其是 FIB 的变化值，当压力超过 250 MPa 时，变化值就减短至 1.0 g/L 左右。反而是 PT 的变化呈现不一样的趋势，在压力 400 MPa 时，时间在 20 min 到 40min 时，PT 生物变化达到最高点，有接近 3 s 的变化。对比未经超高压处理的右旋糖酐凝血四项指标的前后差异可以看出，右旋糖酐氯化钠溶液可以在一定

程度上导致凝血功能障碍，但经过超高压处理后的右旋糖酐氯化钠溶液其凝血活性变化逐渐降低。但在外源性凝血系统上，这种差异不是特别明显，故选择 PT 作为响应面试验的响应值，探究超高压对 PT 的变化情况的影响。通过响应面试验，得到了最佳的超高压处理工艺，即处理压力 400 Mpa、处理时间 19 min，处理次数为 3 次。并经过试验验证，与预测值接近相同。考虑到实际经济效益与实际操作过程，超高压处理次数与其他条件相互作用效果较差、耗能等情况，决定后续的实验仅处理 1 次。

本试验发现右旋糖酐作为代血浆使用时，会存在着一些问题，这些问题大多集中在凝血方面，通过前期的预实验处理，发现右旋糖酐可以造成凝血功能障碍，在对右旋糖酐进行超高压处理时可改变右旋糖酐的凝血活性。通过本章试验，得到了一个超高压处理右旋糖酐的工艺，但对于超高压是通过什么方式改变了右旋糖酐的凝血活性尚未进行讨论。本研究将超高压对右旋糖酐的作用机理放在后面做了统一的论述。

第 3 章 右旋糖酐酶水解工艺研究

3.1 引言

右旋糖酐是通过葡萄糖脱水缩合而成，主链是以 α -1,6 糖苷键连接，分支由 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 糖苷键连接而成。由于葡萄糖主链的支化多样，右旋糖酐聚合物在链长和理化性质上具有显着的多样性。葡聚糖的降解需要许多具有不同特异性和作用方式的糖基水解酶如内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶等^[47]。不同分子量的右旋糖酐其作用有着较大的差异^[48]。在体内，大分子量的右旋糖酐无法被直接吸收利用，中、低分子量右旋糖酐（dex-70、dex-40、dex-10）可以作为血容量扩充药物，有提高血浆胶体渗透压，增加血浆容量和维持血压的作用。右旋糖酐是可以通过肾脏排除体外，其排泄速度与分子量大小有关，dex-70 通过尿液在 1 h 内可以排出 30 %，但 dex-10 在 1 h 内可以排出 70 %。

右旋糖酐酶可以有效的降解分子量。本章以右旋糖酐分子量大小为评价指标，通过对右旋糖酐进行酶水解，比较不同酶解条件下，右旋糖酐分子量变化趋势，从而确定最佳的酶水解工艺。

3.2 试验材料与仪器

3.2.1 材料和试剂

试验所需材料和试剂如表 3-1 所示。

表 3-1 试验所需材料和试剂

Tab.3-1 The materials and reagents of experiment

名称	规格	产地
右旋糖酐酶	—	中诺生物科技发展江苏有限公司
右旋糖酐-70	500 g	生工生物工程（上海）股份有限公司
十二水磷酸氢二钠	500 g	南京化学仪器股份有限公司
磷酸二氢钠	500 g	天津博迪化工股份有限公司
无水硫酸钠	500 g	天津市汇杭化工科技有限公司
叠氮化钠	120 g	山东艾孚特科技有限公司
3,5-二硝基水杨酸	25 g	上海蓝季科技发展有限公司
氢氧化钠	500 g	天津市汇杭化工科技有限公司
苯酚	500 g	天津市科密欧化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	500 g	天津市汇杭化工科技有限公司
无水亚硫酸钠	500 g	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	500 g	天津市科密欧化学试剂有限公司
甲醇	500 mL	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 设备和仪器

试验所需设备和仪器如表 3-2 所示。

表 3-2 试验所需设备与仪器

Tab.3-2 The equipment and instruments of experiment

设备或仪器名称	型号	生产厂家
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101T	析牛科技有限公司
液相色谱仪	1260	安捷伦科技有限公司
紫外可见光分光光度计	UV-1900	岛津仪器（苏州）有限公司

3.3 试验方法

3.3.1 溶液的制备

3.3.1.1 右旋糖酐水溶液的配制

称取一定量的商品右旋糖酐固体粉末，加入去离子水配置成固定浓度的右旋糖酐溶液，定容静置 24 h 后，装入聚乙烯密封袋，密封保存以备用。

3.3.1.2 磷酸缓冲液的配制

A 液：0.2 M 磷酸二氢钠水溶液，称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 粉末 27.6 g，溶于去离子水中，稀释并定容至 1000 mL。

B 液：0.2 M 磷酸氢二钠水溶液，称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 粉末 53.6 g，溶于去离子水中，稀释并定容至 1000 mL。

不同 pH 的磷酸缓冲液：加入适当的 A 液和 B 液，调节 pH 获得。

3.3.1.3 DNS 试剂的配制

2 mol/L 氢氧化钠：称取 40.0 g 氢氧化钠固体粉末，溶解在少量去离子水中，转移至 500 mL 的容量瓶中，定容摇匀。

DNS 试剂的配制：称取 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g，量取 2 mol/L 氢氧化钠 262 mL，一起加入到 500 mL 含有 182 g 酒石酸钾钠的热水溶液中，用磁力搅拌器搅拌均匀后，再加上 5.0 g 苯酚和 5.0 g 无水亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加水定容到 1000 mL，即制成 DNS 试剂，贮于棕色瓶中放置一周后备用。

3.3.2 右旋糖酐酶酶活测定方法

采用 DNS 法测定右旋糖酐酶酶活力，根据问^[49]等人的方法加以修改。

3.3.2.1 标准曲线的制作

配置 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液，分别量取 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL，用超纯水补齐 1 mL，再加入 2 mL DNS 溶液，沸

水浴 5 min，然后流水浴冷却，用超纯水定容至 10 mL，在 540 nm 下测定吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标，纵坐标为吸光度，绘制葡萄糖溶液标准曲线。

3.3.2.2 酶活测定

酶活定义：采用 DNS 法，在 50℃ 下，每分钟催化底物（dex-70）水解产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位，以 U 表示。

将商品酶液用一定 pH 值的缓冲液适当稀释后，取 0.5 mL 酶液加入到 0.5 mL 10 mg/mL 的 dex-70 溶液中，50℃ 反应 10 min，加入 2 mL DNS 终止反应，沸水浴 5 min 显色，然后流水浴冷却至室温，定容至 10 mL；

空白对照采用 0.5 mL 10 mg/mL 的 dex-70 溶液，50℃ 反应 10 min，先后加入 2 mL DNS 和 0.5 mL 的酶液，定容至 10 mL。以去离子水为对照测定 540 nm 处的吸光值，样品与空白对照的吸光值之差根据回归方程计算出反应液中的葡萄糖量，从而确定酶活。各样品均做三个平行。

3.3.3 酶水解终产物分子量分析

取 10 mg/mL 的 dex-70 样品溶液 40 mL，加入等体积的酶液，在 50℃ 水浴锅中反应，反应 2 h 后再继续添加酶液，间隔 2 小时继续加入酶液。当反应进行 6 h，18 h 分别取样 3 mL，沸水浴 5 min 灭活，用 HPLC 分析其分子量大小。

3.3.4 右旋糖酐酶解工艺条件优化

3.3.4.1 不同反应温度对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成 10 mg/mL 的 dex-70 溶液 40 mL 于烧杯中，调节 pH=5.0，在不同温度（45℃、50℃、55℃、60℃、65℃）水浴锅中保温 10 min，加入 1 mL 右旋糖酐酶液，酶浓度为 10 U/mL，在水浴锅中反应 50 min，取样在沸水浴中灭活 5 min，水解液使用 0.22 μm 水系过滤头过滤，采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.4.2 不同 pH 对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成 10 mg/mL 的 dex-70 溶液 40 mL 于烧杯中，调节不同 pH（pH=4、pH=4.5、pH=5、pH=5.5、pH=6），在最佳反应温度的水浴锅中保温 10 min，加入 1 mL 右旋糖酐酶液，酶浓度为 10 U/mL，在水浴锅中反应 50 min，取样在沸水浴中灭活 5 min，水解液过 0.22 μm 水系过滤头，采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.4.3 不同底物浓度对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成不同浓度（10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40

mg/mL、50 mg/mL) 的 dex-70 溶液 40 mL 于烧杯中, 调节至最佳 pH 值, 在最佳反应温度的水浴锅中保温 10 min, 加入 1 mL 右旋糖酐酶液, 酶浓度为 10 U/mL, 在水浴锅中反应 50 min, 取样在沸水浴中灭活 5 min, 水解液过 0.22 μ m 水系过滤头, 采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.4.4 不同酶浓度对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成最佳底物浓度的 dex-70 溶液 40 mL 于烧杯中, 调节至最佳 pH 值, 在最佳反应温度的水浴锅中保温 10 min, 加入 1 mL 右旋糖酐酶液, 酶浓度为 10 U/mL, 在水浴锅中反应 50 min, 取样在沸水浴中灭活 5 min, 水解液过 0.22 μ m 水系过滤头, 采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.4.5 不同底物分子量对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成最佳底物浓度的右旋糖酐 (dex-10、dex-20、dex-40、dex-70) 溶液 40 mL 于烧杯中, 调节至最佳 pH 值, 在最佳反应温度的水浴锅中保温 10 min, 加入 1 mL 右旋糖酐酶液, 酶浓度为 10 U/mL, 在水浴锅中反应 50 min, 取样后沸水浴中灭活 5 min, 水解液过 0.22 μ m 水系过滤头, 采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.4.6 不同酶解时间对右旋糖酐分子量变化的影响

取用流动相配制成最佳底物浓度的右旋糖酐 dex-70 溶液 40 mL 于烧杯中, 调节至最佳 pH 值, 在最佳反应温度的水浴锅中保温 10 min, 加入 1 mL 右旋糖酐酶液, 酶浓度为 10 U/mL, 在水浴锅中反应, 取样时间在 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min, 随后在沸水浴中灭活 5 min, 水解液过 0.22 μ m 水系过滤头, 采用 HPLC 检测其分子量。

3.3.5 分子量及其分布测定

采用高效液相色谱法测定右旋糖酐分子量变化, 根据样品各成分的出峰时间判断其多糖分子量分布情况。首先使用色谱柱测试范围内对应的已知分子量的右旋糖酐标准品经过 HPLC 凝胶色谱处理, 以出峰时间为横坐标, 分子量的对数为纵坐标, 拟合出线性方程作为多糖分子量的计算方程^[50]。然后测定样品, 根据出峰时间和多糖分子量的计算公式算出对应的重均分子量。

配置标准品溶液, 取一定量的相对分子质量的 dextran 标准品, 用流动相配置浓度为 1 mg/mL 的标准品溶液, 用水膜过滤头过滤后取适量注入进样瓶。

色谱柱选择 TSKgelG4000PWxl 色谱柱; 流动相为 0.71% 的硫酸钠溶液 (内含 0.02% 叠氮化钠溶液); 进样量为 20 μ L; 流速为 0.5 ml/min; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 检测器为示差折光检测器; 检测器温度为 35 $^{\circ}$ C。

3.3.6 数据处理

所有试验均重复 3 次操作，用 Excel 对数据进行初步整理，采用 Origin 2021 软件作图。

3.4 结果与分析

3.4.1 右旋糖酐分子量标准曲线

根据 6 个右旋糖酐分子量标准品 ($M_w=505$ 、 5070 、 10300 、 20800 、 40000 、 70000) 的液相色谱数据，绘制用于检测分子量大小的右旋糖酐标准曲线如图 3-1 所示：

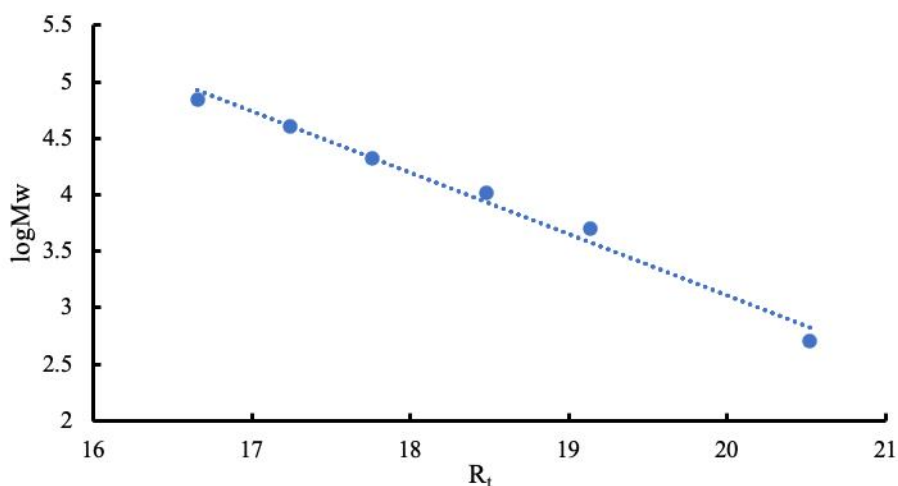


图 3-1 右旋糖分子量标准曲线

Fig.3-1 Molecular weight standard curve for dextrose

液相色谱检测中不同分子量右旋糖酐的标准曲线方程为：

$$Y = -0.5446X + 13.996 \quad (R^2 = 0.985) \quad \text{式 3-1}$$

其中，X 为洗脱时间，

Y 为右旋糖酐分子量的对数值。

此标准曲线拟合度较好，可用来计算分子量在 550 Da~70,000 Da 范围内的右旋糖酐的分子量。

3.4.2 右旋糖酐终产物分子量大小分析

酶解过程底物的消耗和产物的产生情况较为复杂，往往会出现理论结果与实际结果有偏差的情况，为了更好的控制成本、优化生产工艺，事半功倍，需要对最终产物进行分析，便于在酶解过程中控制工艺，终产物分

子量分析可以有效的查看酶解的最终阶段，同时终产物分子量也可以对酶解过程进行反馈，从而分析酶解活动进行的程度。

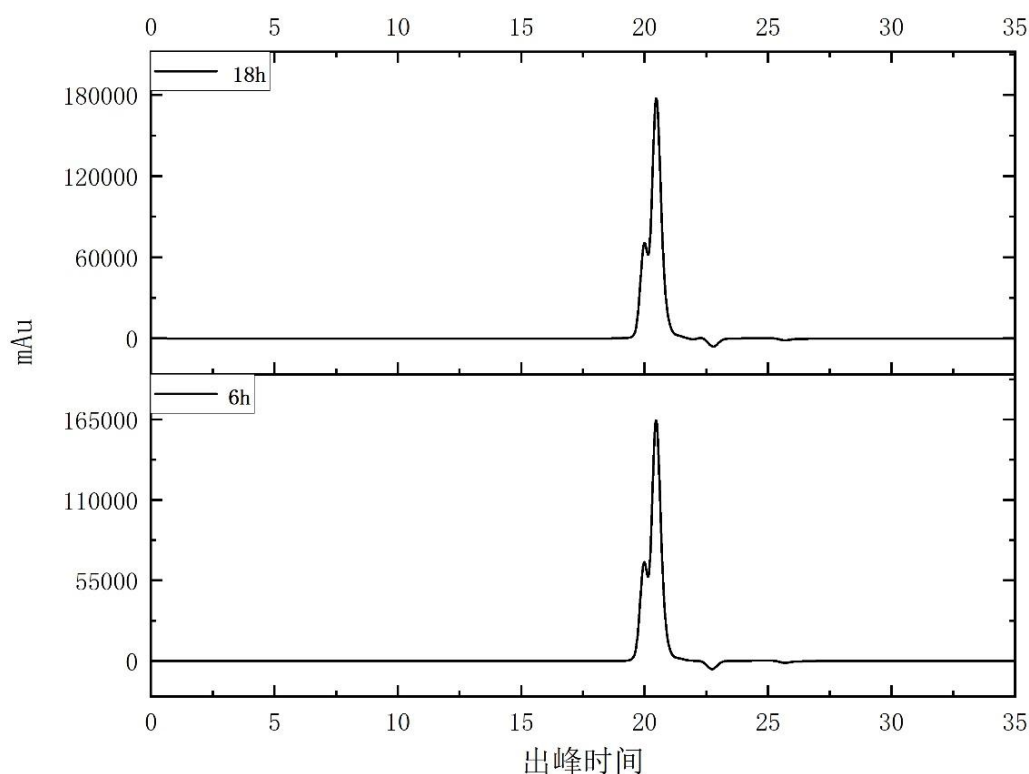


图 3-2 酶水解终产物的液相色谱图

Fig.3-2 HPLC of the final product of enzymatic hydrolysis

在经过酶水解 6 h 和酶水解 18 h 后，其分子量分布由图 3-2 所示。Dex-70 分解成两个部分，大分子量的右旋糖酐占比较小，小分子量的右旋糖酐占比较大，由 6 h 和 18 h 出现的峰对比可以发现，右旋糖酐酶酶解行为存在一定限制，低浓度或者小分子量的右旋糖酐无法被酶解，这与其他人的研究结果相似。酶解 6 h 后，主要降解成两个分子量的右旋糖酐，色谱图中出现两个峰，第一个峰面积小，保留时间短，出峰时间为 19.991 min，其分子量大小为 1200 Da 左右；第二个峰面积大，出峰时间为 20.487 min，根据右旋糖酐标准曲线可判断，其分子量大小为 690 Da 左右。酶解 18 h 后，也同样出现两个峰，第一个峰面积小，保留时间短，出峰时间为 20.003 min，其分子量大小为 1200 Da 左右；第二个峰面积大，出峰时间为 20.475 min 根据右旋糖酐标准曲线可判断，其分子量大小 700 Da。由此可知，酶解终产物为分子量在 700 Da 左右的右旋糖酐。

3.4.3 右旋糖酐酶解工艺条件优化

3.4.3.1 温度对右旋糖酐分子量变化的影响

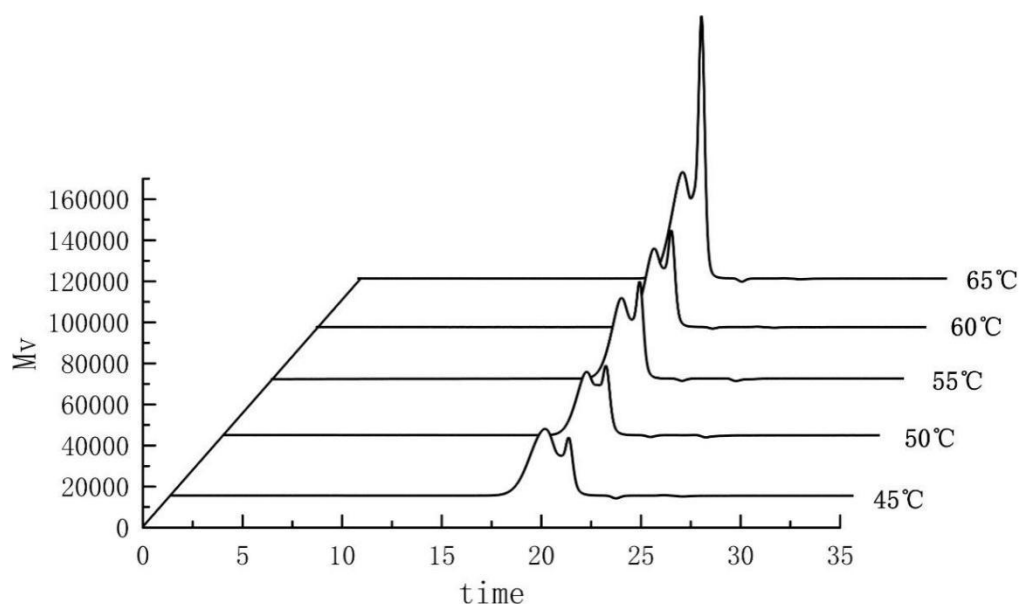


图 3-3 温度对右旋糖酐分子量变化的影响

Fig.3-3 Effect of temperature on changes in molecular weight of dextran

由图 3-3 可以看到，右旋糖酐酶解之后，主要降解为两种产物，随着温度的升高，低分子量的右旋糖酐降解的比例增大，由表 3-3 可知，酶解之后，右旋糖酐分子量大约在 3000 Da 和 800 Da。当温度为 50℃ 时，3000 Da 分子量的右旋糖酐比例与 800 Da 分子量的右旋糖酐相差不大，随着温度不断升高，800 Da 分子量逐渐增加，酶解更加彻底，分析其原因可能是温度越高右旋糖酐的粘度越小，从而有效的提高底物与酶分子的接触，导致右旋糖酐降解更加彻底^[51-53]。

表 3-3 温度对右旋糖酐分子量变化的影响

Tab.3-3 Effect of temperature on changes in molecular weight of dextran						
温度		45℃	50℃	55℃	60℃	65℃
第一个峰	出峰时间 (t)	19.18	19.39	19.38	19.40	19.30
	Mw	3553	2744	2754	2686	3076
第二个峰	出峰时间 (t)	20.39	20.41	20.38	20.38	20.41
	Mw	782	764	790	788	757

3.4.3.2 pH 对右旋糖酐分子量变化的影响

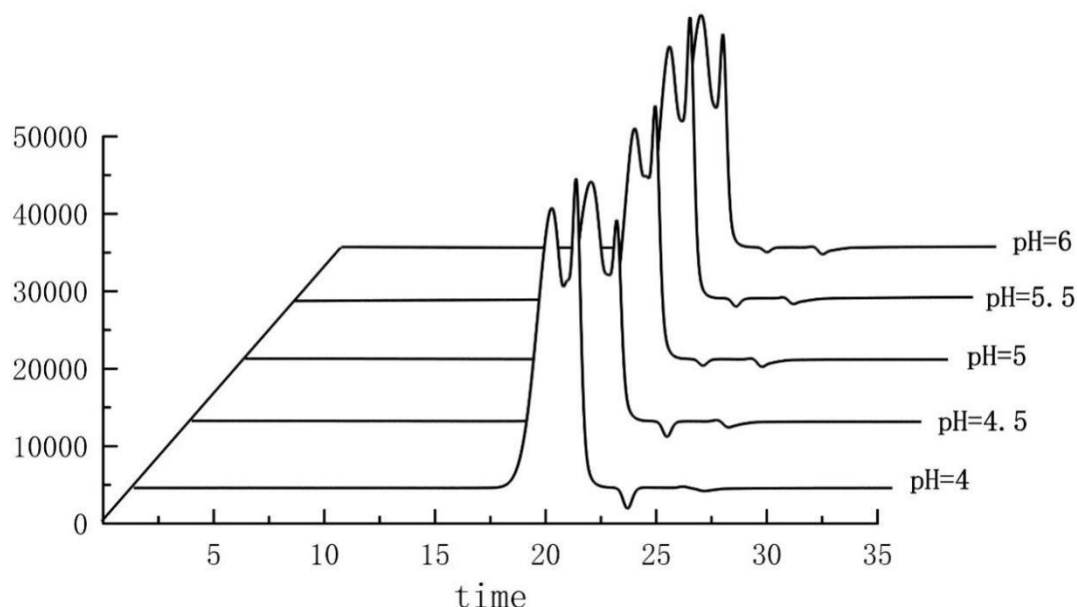


图 3-4 pH 对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-4 Effect of pH on changes in molecular weight of dextran

pH 对酶活力的影响极为显著，酶表现最高活性时所在的 pH，即为酶的最适 pH^[54, 55]。由图 3.4 可知，随着 pH 的变化，右旋糖酐分子量比重也随之发生变化，小分子量的右旋糖酐比重随着 pH 的增加而有所改变。由表 3-4 所知，随着 pH 的不断增加，右旋糖酐分子量呈现先减后增的趋势，在 pH=5 时，右旋糖酐分子量最低，且两个不同分子量的右旋糖酐分布较为均匀。该水解工艺的最适反应温度为 pH=5。

表 3-4 pH 对右旋糖酐分子量降解的影响

Tab.3-4 Effect of pH on changes in molecular weight of dextran

pH		4.00	4.50	5.00	5.50	6.00
第一个峰	出峰时间 (t)	19.28	19.15	19.38	19.33	19.22
	Mw	3154	3689	2754	2955	3362
第二个峰	出峰时间 (t)	20.40	20.38	20.41	20.38	20.38
	Mw	774	789	764	785	785

3.4.3.3 底物浓度对右旋糖酐分子量变化的影响

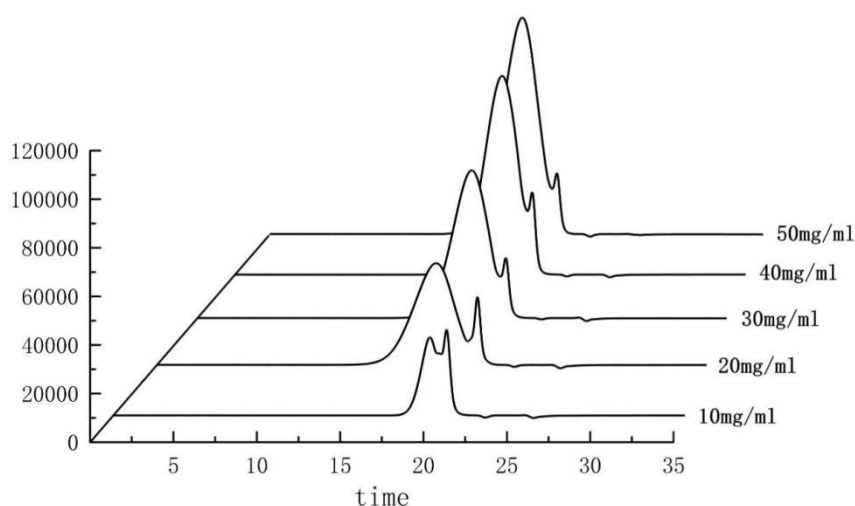


图 3-5 底物浓度对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-5 Effect of substrate concentration on changes in molecular weight of dextran

在一定的条件下，底物浓度较低时，只有一部分酶能与底物反应，溶液中会存在多余的酶没有与底物结合，因此随着底物浓度的增加，酶解反应会加速进行，产物的生成速率也随之加快。但是当底物浓度足够大时，没有对应的酶与之结合，反应达到最大反应速率，在特殊情况下，底物浓度过大也会导致酶解反应随之降低。由图 3-5 所示，随着浓度的增加，酶解的效率呈现降低的趋势，低分子量的右旋糖酐比例较小，由表 3-5 可知，酶解过后，高浓度的右旋糖酐降解困难，且降解不完全，未达到预期效果。底物浓度在 10 mg/mL 的右旋糖酐经过酶解后，分子量片段在 3000 Da 左右和 800 Da 左右，且比例相对均匀，而其他浓度的右旋糖酐，在经过相同条件酶解后，其分子量片段大于 10000 Da 的占据着主导地位，仅有少量的 800 Da 片段，分析原因可能是随着随着底物浓度的增加，右旋糖酐溶液黏度也随之增大，高黏度的右旋糖酐溶液不利于与酶的有效接触，因此反应进行的较慢，且反应进行的不彻底。所以最佳底物浓度为 10 mg/mL。

表 3-5 底物浓度对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-5 Effect of substrate concentration on changes in molecular weight of dextran

底物浓度		10mg/mL	20mg/mL	30mg/mL	40mg/mL	50mg/mL
第一个峰	出峰时间 (t)	19.38	17.78	18.14	18.32	17.92
	Mw	2754	20689	13107	10498	17249
第二个峰	出峰时间 (t)	20.41	20.41	20.38	20.37	20.37
	Mw	764	764	785	796	801

3.4.3.4 不同酶浓度对右旋糖酐分子量变化的影响

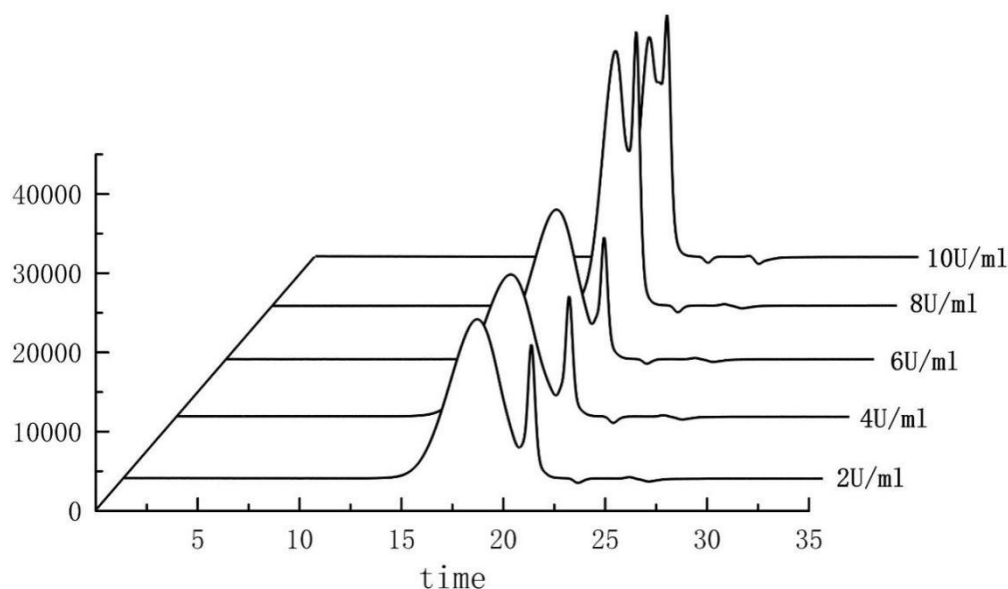


图 3-6 酶浓度对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-6 Effect of enzyme concentration on changes in molecular weight of dextran

酶浓度的大小影响着酶解反应的速率，当底物浓度不变时，酶浓度越大，底物转化的速率越快，酶解反应越彻底，酶浓度越小，底物转换速率越慢，酶解反应不彻底^[56]。酶浓度对右旋糖酐分子量降解的影响如图 3-6 所示，酶浓度较低时，酶解反应不彻底，大量的大分子右旋糖酐没有被降解，随着酶浓度的提高，酶解速率加快，右旋糖酐被快速的降解，但酶浓度达到 8 U/mL 和 10 U/mL 时，右旋糖酐没有继续降解，或者降解趋势过小，这是由于酶浓度达到与底物浓度相持平的状态。由表 3-6 可知，酶浓度在 8 U/mL 和 10 U/mL 时，右旋糖酐的分子量在 3000 Da 左右。考虑到实际效益，最佳的酶浓度应为 10 U/mL。

表 3-6 酶浓度对右旋糖酐分子量降解的影响

Tab.3-6 Effect of enzyme concentration on changes in molecular weight of dextran

酶浓度		2U/mL	4U/mL	6U/mL	8U/mL	10U/mL
第一个峰	出峰时间 (t)	17.69	17.36	17.83	19.22	19.38
	Mw	23161	34901	19431	3387	2754
第二个峰	出峰时间 (t)	20.39	20.40	20.40	20.38	20.41
	Mw	775	772	770	790	764

3.4.3.5 底物分子量对右旋糖酐分子量变化的影响

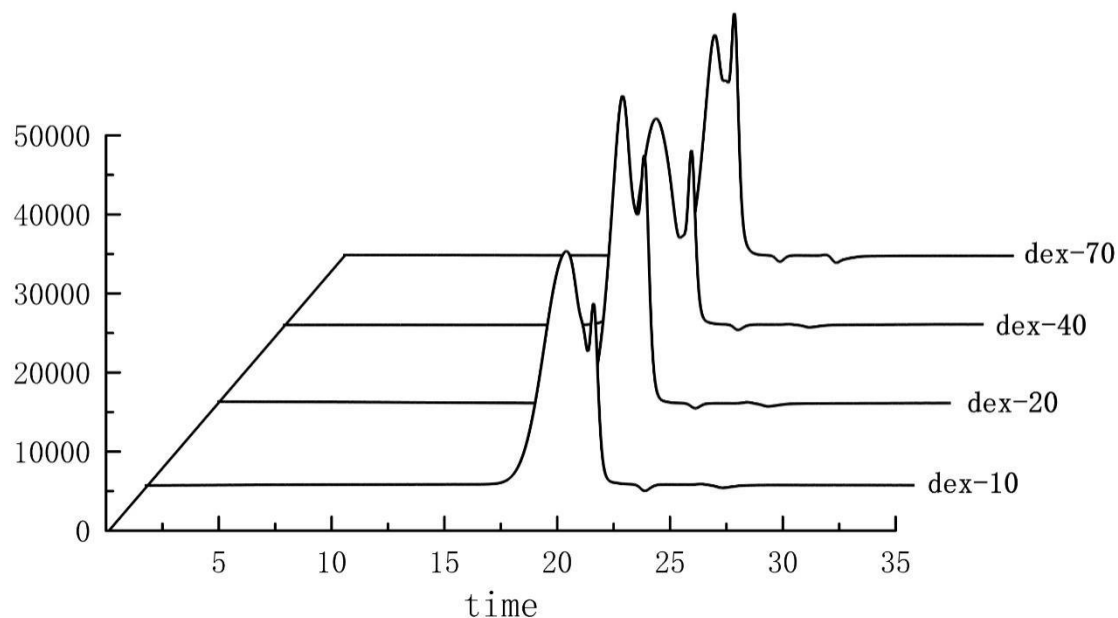


图 3-7 底物分子量对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-7 Effect of substrate molecular weight on changes in molecular weight of dextran

底物分子量大小可以判断右旋糖酐酶的性质，由图 3-7 所示，dex-10、dex-20、dex-40、dex-70 酶解效果逐步增强，低分子的右旋糖酐难以被酶解，而大分子的右旋糖酐可以快速有效的被酶解，这与右旋糖酐的性质有关，右旋糖酐酶能专一性的识别 α -1,6 糖苷键，从而达到降解右旋糖酐的目的，但右旋糖酐酶解存在一定限制，即对小分子的右旋糖酐难以发挥作用，这可能是由于底物特异性导致右旋糖酐酶的亲和力随着分子量的降低而减弱^[10]。所以选择 dex-70 作为酶解底物分子量。

表 3-7 底物分子量对右旋糖酐分子量降解的影响

Tab.3-7 Effect of substrate molecular weight on changes in molecular weight of dextran

底物分子量		dex-10	dex-20	dex-40	dex-70
第一个峰	出峰时间 (t)	19.16	19.34	18.63	19.38
	Mw	3657	2925	7063	2751
第二个峰	出峰时间 (t)	20.39	20.37	20.39	20.41
	Mw	781	804	776	765

3.4.3.6 酶解时间对右旋糖酐分子量变化的影响

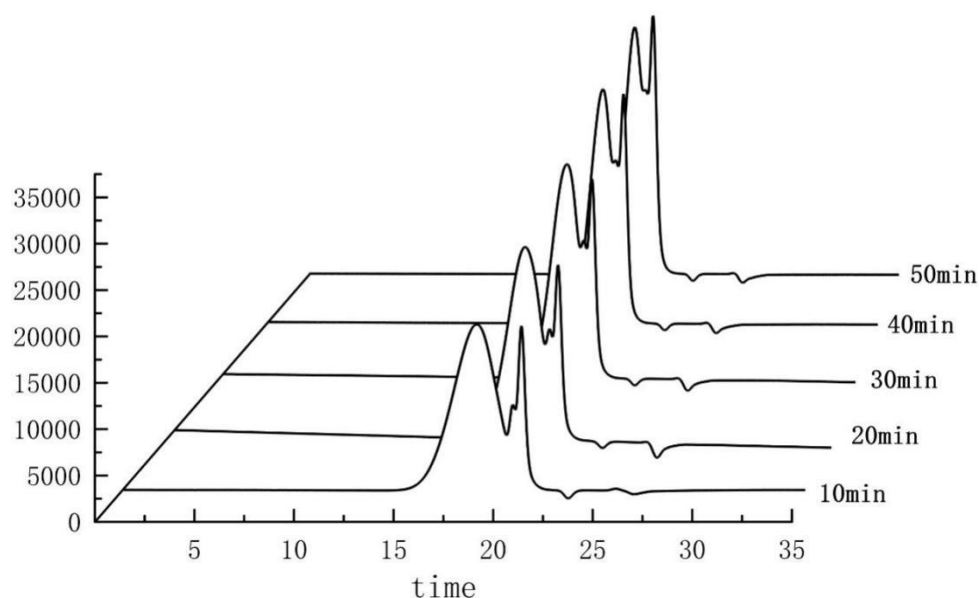


图 3-8 酶解时间对右旋糖酐分子量降解的影响

Fig.3-8 Effect of digestion time on changes in molecular weight of dextran

酶解时间可以准确的控制酶解的程度，减小试验能源损耗，当酶解超过一定时间后，酶解过程已经结束，酶解时间的延长也就没有了意义，由图 3-8 可知，随着酶解时间的延长，酶解程度也随之逐渐加深，但在酶解 40 min-50 min 后，分子量比例几乎不发生变化，由表 3.8 可知，酶解 40 min 后，底物分子量在 3300 Da 左右，但是到酶解 50 min 后，分子量降低到 2700 Da，此时反应速率平缓，酶解过程趋近结束。所以选在酶解时间 50 min 作为反应的条件。

表 3-8 酶解时间对右旋糖酐分子量降解的影响

Tab.3-8 Effect of digestion time on changes in molecular weight of dextran

酶解时间		10min	20min	30min	40min	50min
第一个峰	出峰时间 (t)	18.15	18.68	19.04	19.23	19.39
	Mw	12944	6676	4251	3349	2744
第二个峰	出峰时间 (t)	20.44	20.43	20.42	20.41	20.40
	Mw	735	742	752	760	766

3.5 本章小结

在本章节中，为了得到分布均匀的不同分子量右旋糖酐片段，主要探讨了酶解的工艺条件，从酶解温度、酶解 pH、酶解底物浓度、酶浓度、酶解底物分子量和酶解时间等方面展开研究，探究酶解的工艺条件。在此过

程中，通过高效液相色谱仪来进行分子量的分析。

通过酶解温度的研究发现，右旋糖酐酶在 50℃ 左右能更好的发挥作用，温度过低、反应进行的不彻底，温度过高，酶失活。在 50℃ 时，酶将 dex-70 分解成两个片段，两个片段之间所占比例接近，可以得到两个不同分子量的片段，一是分子量在 800 Da 左右，一是分子量在 3000 Da 左右。

通过对酶解 pH 和酶解时间的研究发现，右旋糖酐在 pH=5 时，所表现出来的酶活力最高，在此条件下，右旋糖酐最终产物分子量最低，不同分子量片段分布也相对均匀。酶解时间的增加会导致最终产物中低分子量片段比重加大，在超过 30 min 后，产物中两种不同分子量的右旋糖酐比重相对均匀，同时酶解反应速率降低，达到酶解最大效果。所以选择 50 min 作为酶解的最佳反应时间。

在酶解底物浓度、酶浓度以及底物分子量的研究中发现，底物分子量对右旋糖酐酶的影响偏大，低分子量的右旋糖酐的酶亲和力低，不利于酶解反应的进行。酶浓度和底物浓度相辅相成，两者达到相对平和的状态时，酶解效果最好，最经济。为了控制产物分子量，选择 dex-70 作为底物，其底物浓度为 10 mg/mL，同时选择酶浓度在 10 U/mL。

综上所述，水解最佳工艺为酶解时间为 50 min，pH=5，酶解温度 50 ℃，底物浓度 10 mg/mL，酶浓度 10 U/mL，底物为 dex-70。

第 4 章 超高压协同酶解对右旋糖酐结构和凝血活性影响

4.1 引言

超高压处理后，右旋糖酐凝血活性会发生变化，在经过单因素试验分析后，采用 PT 值作为相应值开展响应面试验，最终确立了在超高压 400 MPa 下处理 20 min 可以使 PT 的变化达到最大值，约 2 s。紧接着对右旋糖酐酶解条件进行研究，通过对酶解温度、酶解 pH、酶解底物浓度、酶浓度、酶解底物分子量和酶解时间等方面的研究，以 HPLC 为指标，最终确定得到分子量不同且均匀的两个右旋糖酐片段。

在本章试验，将会对酶解和超高压处理过后的右旋糖酐进行结构表征并且检验其凝血活性。同时，采用超高压协同酶解的方式，以 HPLC 检验产物分子量和均一性，以 FT-IR 判断产物结构，以 X-ray 确定产物的结晶度，以 SEM 对比产物的表面形态，来阐述超高压协同酶解对右旋糖酐凝血四项和抗血小板聚集的影响机理。

4.2 试验材料与仪器

4.2.1 试验材料

试验所需材料和试剂如表 4-1 所示。

表 4-1 试验所需材料和试剂
Tab.4-1 The materials and reagents of experiment

名称	纯度或规格	产地
右旋糖酐-70	500 g	生工生物工程（上海）有限公司
无水乙醇	500 mL	天津市凯通化学试剂有限公司
氯化钠	500 g	无锡市亚盛化工有限公司
FIB 试剂盒	6*2 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
APTT 试剂盒	6*2 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
PT 试剂盒	6*4 mL	北京赛科希德科技股份有限公司
TT 试剂盒	6*4 mL	北京赛科希德科技股份有限公司

4.2.2 试验仪器

试验所需设备和仪器如表 4-2 所示。

表 4-2 试验所需设备与仪器

Tab.4-2 The equipment and instruments of experiment

设备或仪器名称	型号	生产厂家
超高压设备	HPP.L1-600/3	天津华泰森淼超高压设备工程技术有限公司
电子分析天平	JB/7534	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
磁力加热搅拌器	78-1	上海江星仪器有限公司
真空封口机	VS5400	东莞市盈尔电器有限公司
真空冷冻干燥机	LC-10N-50A	上海力辰邦西仪器科技有限公司
低速离心机	SC-3616	安徽中科中佳科学仪器有限公司
全自动凝血分析仪	SF8200	北京赛科希德科技有限公司
烘箱	DHG-9030A	上海一恒科学仪器有限公司
扫描电镜	S-4800	日立有限公司
X 射线衍射仪	D8 Advance	布鲁克科技有限公司
傅里叶红外光谱	VERTEX 80	布鲁克科技有限公司
高效液相色谱仪	1260	安捷伦科技有限公司

4.3 试验方法

4.3.1 超高压协同酶解处理

样品 1：用生理盐水溶液配制 100 mL 右旋糖酐-70 溶液，浓度为 10 mg/mL。

样品 2：采用超高压处理右旋糖酐样品 1 溶液，超高压时间为 20 min，处理压力为 400 MPa。

样品 3：采用右旋糖酐酶水解右旋糖酐样品 1 溶液，酶解时间为 50 min，pH=5，酶解温度 50℃，底物浓度 10 mg/mL，酶浓度 10 U/mL。

样品 4：先超高压处理，再酶解处理，超高压参数和酶解参数与样品 2 和样品 3 保持一致。

样品 5：先酶解处理，再超高压处理，超高压参数和酶解参数与样品 2 和样品 3 保持一致。

所有样品处理结束后，采用 1:1 醇沉 24 小时后再利用冷冻干燥冻干成固体粉末，备用。

4.3.2 分子量及其分布测定

试验步骤同 3.2.5。

4.3.3 FT-IR 分析

用 FT-IR 光谱仪记录各样品的傅里叶红外光谱图，采用溴化钾压片法来测定。将精确称取后的 1 mg 样品和干燥的 100 mg KBr 进行混合，研磨均匀，在液压机上将其压成透明薄片，以空白 KBr 片为参比，利用傅立叶变换红外光谱进行扫描，测定样品的红外吸收光谱图。

扫描范围： $400\text{ cm}^{-1}\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。

4.3.4 XRD 分析

通过 X 射线衍射仪来测定样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 和样品 5 的晶体性质变化。将样品冻干后，粉碎，在室温下， 2θ 角范围在 $5^\circ\sim 70^\circ$ 。将 50 mg 样品放置在石英载体上，并记录峰强度。

4.3.5 SEM 分析

用导电胶带将在一定量的样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 和样品 5 粉末粘附在扫描电镜样品平台上，预处理之后，采用 S-4800 扫描电镜在不同加速度电压下的样品进行分析，观察不同放大倍率下的样品表面形态图像。

4.3.6 凝血四项分析

4.3.6.1 APTT 的测定

取 50 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）加入测试杯中，同时加入 50 μL 配制好的 APTT 试剂到测试杯中，混合摇匀后在 37°C 预温区准确培育 180 s，然后向测试杯中加入 37°C 的 CaCl_2 溶液，同时用仪器记录结果。

4.3.6.2 PT 的测定

取 50 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯中，于 37°C 预温区中预热 180 s，将预温后的 37°C PT 试剂 100 μL 加入到上述测试杯中，同时用仪器记录结果。

4.3.6.3 TT 的测定

取 100 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯中，于 37°C 预温区中预热 180 s，将预温后的 37°C TT 试剂 100 μL 加入到上述测试杯中，同时用仪器记录结果。

4.3.6.4 FIB 的测定

取 100 μL 待测样品（多糖与血浆的混合液）及测试珠加入到测试杯

中，于 37℃ 预温区中预热 180 s，将 FIB 试剂（室温）加入测试杯中，同时用仪器自动测试并换算 FIB 含量。

4.3.7 抗血小板聚集分析

通过血小板聚集分析来评估样品对细胞止血其中一个阶段的影响。采用 0.2 mM ADP 作为聚集诱导剂，将人富血小板血浆与样品一起孵育，然后加入 ADP。最后将装有血浆的比色皿放入血小板聚集仪中，根据血小板聚集曲线记录聚集情况。

4.3.8 数据分析

所有试验均重复十次操作，Design-Expert.V8.0.6.1 软件分析响应面试验结果，IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行平均标准差和 ANOVA 分析，用配对样本 T 检验进行试验前后差异显著性分析，Origin 2021 软件作图。

4.4 结果与分析

4.4.1 分子量的测定

采用 HPLC 对样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 和样品 5 组分进行分析，图 4-1 为各样品的液相色谱图，测定结果如表 4-3 所示。

表 4-3 五种样品的分子量大小
Tab.4-3 Molecular weights of the five samples

底物浓度		样品 3	样品 4	样品 5
第一个峰	出峰时间 (t)	19.22	19.38	19.37
	Mw	3378	2764	2800
第二个峰	出峰时间 (t)	20.42	20.41	20.38
	Mw	750	760	786

样品 1 和样品 2 均显示出单一对称峰，表示这两组样品组分均一性较好^[21]。样品 1 和样品 2 的分子量都在 70,000 Da 左右，可见单一超高压处理的右旋糖酐分子量没有发生变化，超高压直接作用在多糖样品上，并不能使多糖的分子量断裂，但是在陈^[28]等人的研究中发现，应用超高压辅助提取多糖可以使多糖的分子量发生变化，在主分子量不变的前提下，会产生一个新的多糖组分。样品 3、样品 4 和样品 5 都经过酶解处理，分子量

发生变化, dex-70 断裂成两个组分, 组分一和组分二分子量在 3000 Da 和 800 Da 左右。

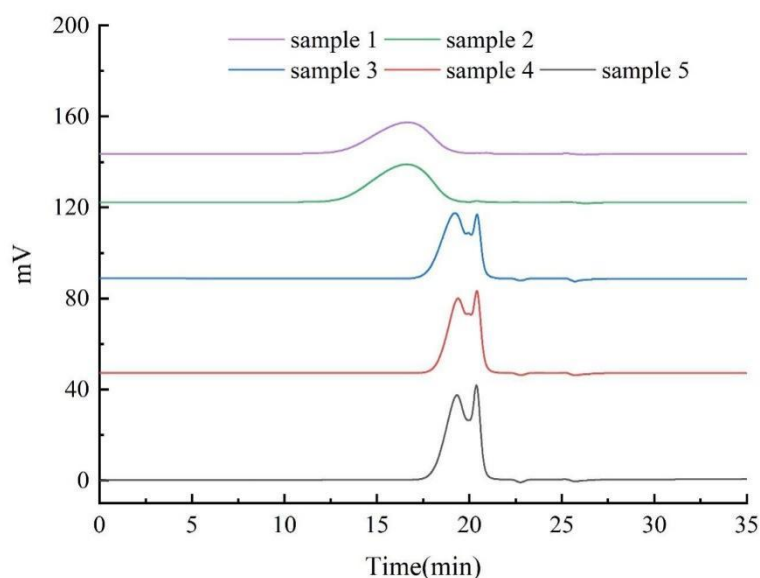


图 4-1 五种样品的液相色谱图

Fig4-1 Liquid chromatograms of five samples

4.4.2 FT-IR 分析

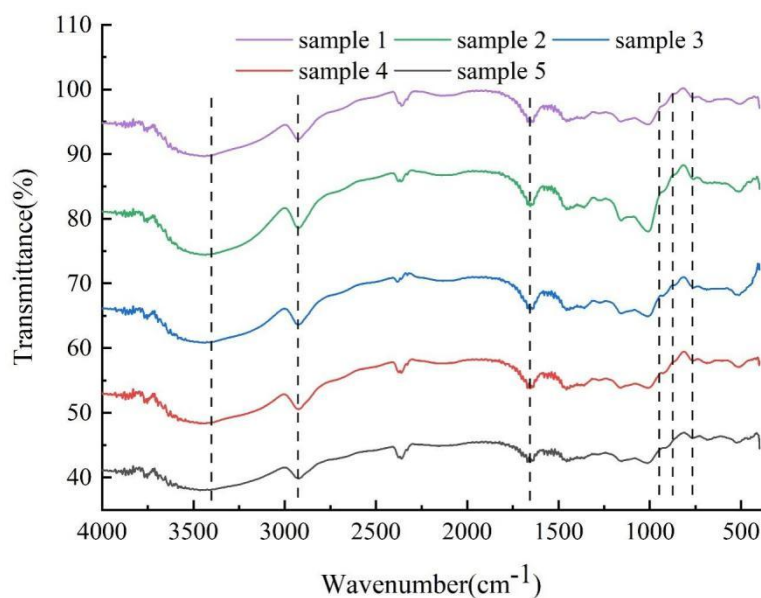


图 4-2 五个样品的红外光谱图

Fig.4-2 FT-IR graph of five samples

五个样品的红外光谱分析图如图 4-2 所示。多糖组分显示出相似的 FT-IR 光谱图。在 3394 cm^{-1} 左右处出现一个强而宽的吸收峰, 这是 O-H 的伸缩运动导致的, 表明多糖链在分子间和分子内发生强烈的相互作用^[57],

^{58]}。在 2929 cm^{-1} 处的峰归功于 C-H 的伸缩振动，此处的峰是多糖的特征吸收峰^[59]。 1654 cm^{-1} 处出现一个尖锐的峰，这是 O-H 在此处的弯曲振动导致的^[60]。在 910 cm^{-1} 和 758 cm^{-1} 处，出现两个较弱的尖峰，这是糖类物质吡喃环的对称和非对称伸缩振动峰^[61]。 860 cm^{-1} 处出现的峰是 α -糖苷键的特征吸收峰，这些峰的出现表明在经过超高压处理和酶解处理，右旋糖酐的一级结构没有发生变化。

4.4.3 XRD 结果分析

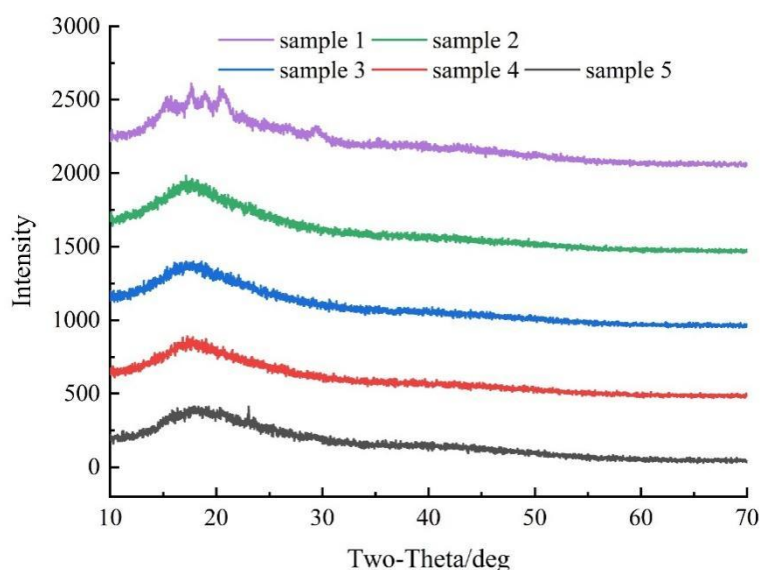
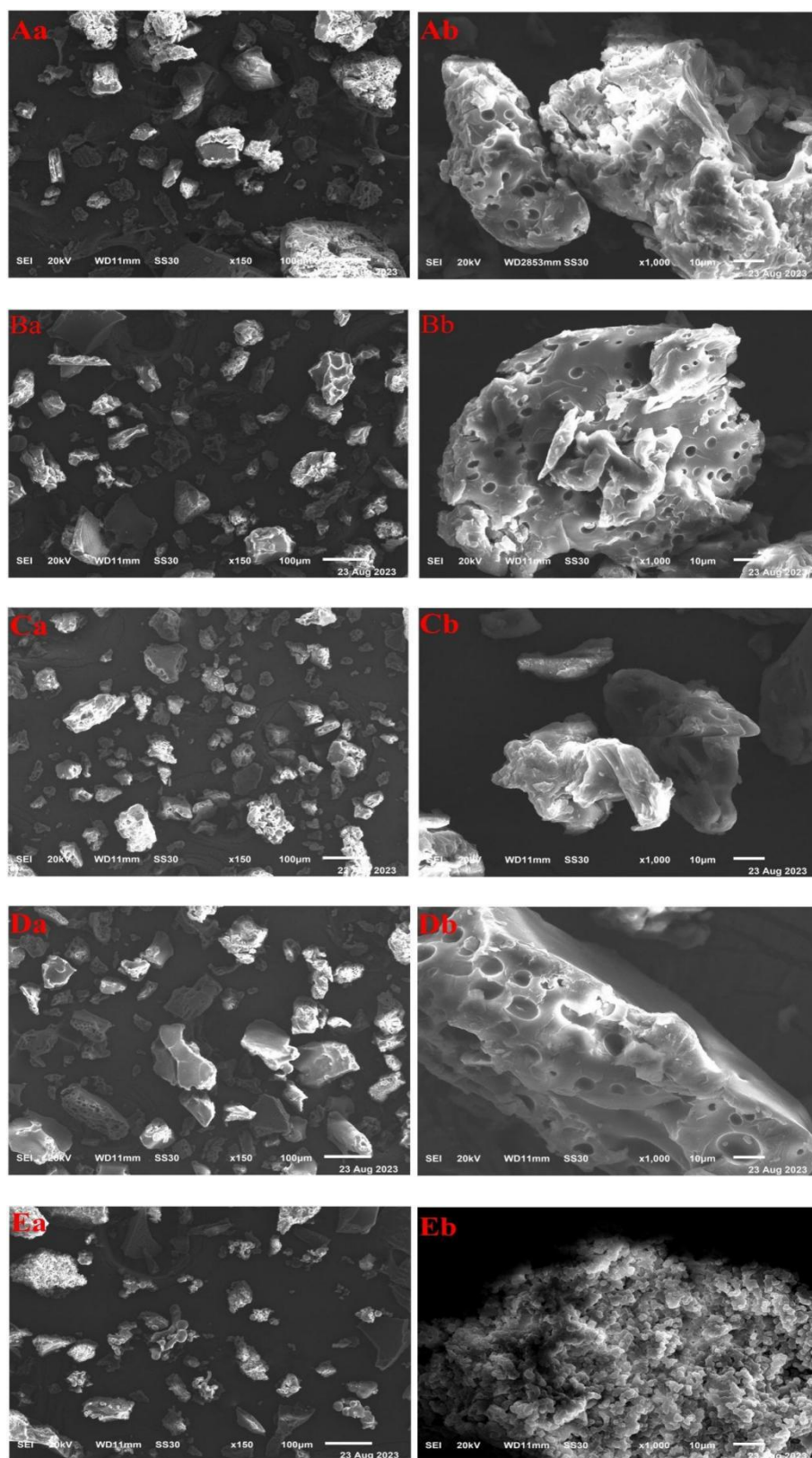


图 4-3 五个样品的 X 射线衍射图

Fig. 4-3 X-ray diffraction patterns of five samples

XRD 是一种表征晶体结构及其变换形态的方式，可以确定样品是无定型还是晶体结构，结晶度高的多糖存在尖锐的衍射峰，而结晶度较低的多糖会呈现出宽而窄的衍射峰^[62, 63]。如图 4-3 所示，在 $2\theta=18^\circ$ 所有多糖样品均出现明显的衍射峰，样品 1 在此处出现多个尖锐的峰，这说明右旋糖酐粉末有很高的结晶度，但经过超高压和酶解处理后，4 个样品在此处的峰变得宽而弥散，没有显著的差异，这个结果表明，酶解和超高压都会对右旋糖酐的结晶度产生影响，破坏了右旋糖酐的空间排列结构，使右旋糖酐的晶体结构转变为无定型结构。

4.4.4 SEM 分析



sample 1 (A), sample 2 (B), sample 3 (C), sample 4 (D), sample 5 (E).
a: magnification 150×; b: magnification 1000×

图 4-4 五个样品的扫描电镜图
Fig.4-4 SEM images of five samples

如图 4-4 所示, 样品的扫描电镜图展现了右旋糖酐的表面形态^[63, 64], 样品 1 呈现出不规则的颗粒形貌, 表面凹凸不平, 并伴有少量的大小不一的圆形孔隙, 超高压处理后, 样品 2 表面要比样品 1 表面要更加光滑, 但表面孔隙增多。当样品 1 通过酶解处理后, 样品 3 展现出边缘光滑的颗粒状, 同时伴随着圆形气孔的消失。当超高压协同酶解处理后, 先超高压处理和先酶解处理展现出不同的表面形态, 先进行超高压处理后, 再进行酶解处理, 样品表面会保留大量的圆形孔隙, 但先酶解处理后, 再进行超高压处理, 超高压会将样品进行压缩, 在样品表面呈现大小不一的圆形颗粒。

4.3.5 凝血四项分析

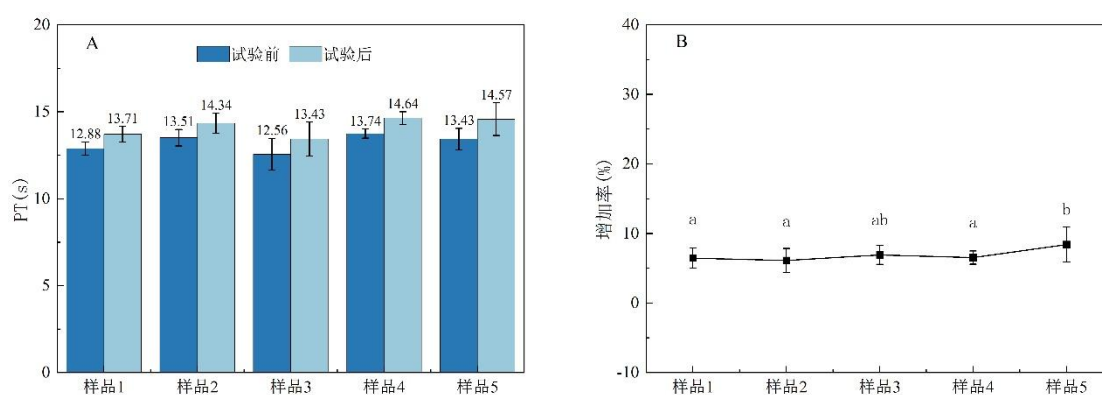


图 4-5 五个样品的体外抗凝血活性 (PT)

Fig.4-5 Ex vivo anticoagulant activity of (PT) five samples. The data are presented as mean $\pm$ SD (n = 10) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference (P < 0.05)

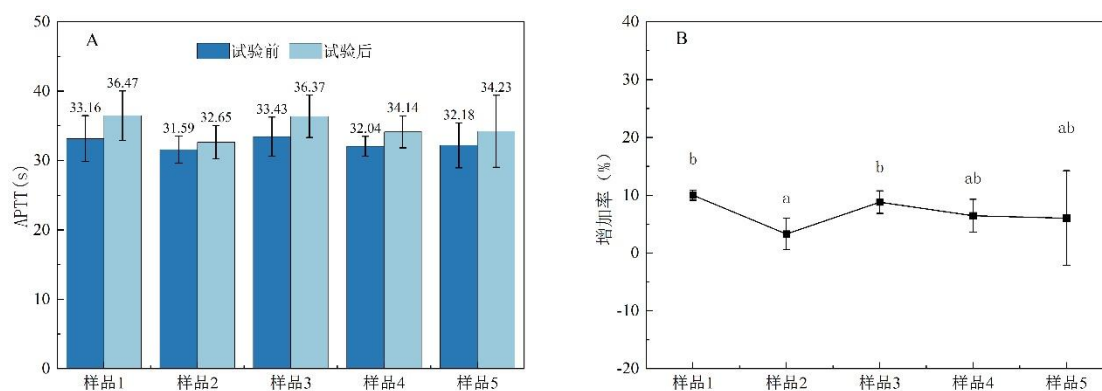


图 4-6 五个样品的体外抗凝血活性 (APTT)

Fig.4-6 Ex vivo anticoagulant activity of (APTT) five samples. The data are presented as mean $\pm$ SD (n = 10) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference (P < 0.05)

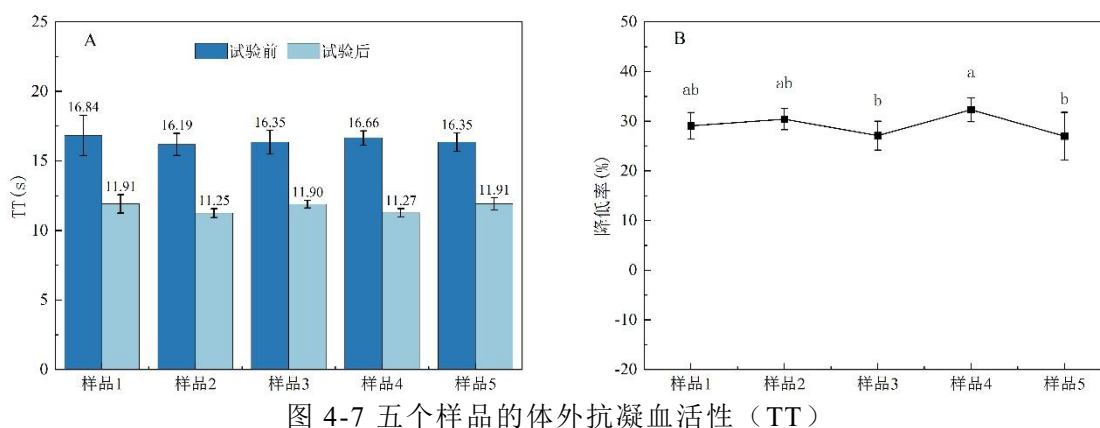


图 4-7 五个样品的体外抗凝血活性 (TT)

Fig.4-7 Ex vivo anticoagulant activity of (TT) five samples. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

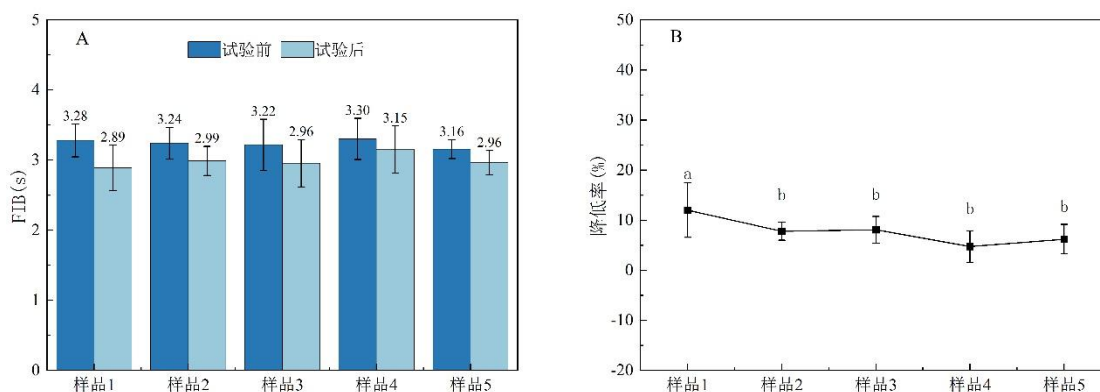


图 4-8 五个样品的体外抗凝血活性 (FIB)

Fig.4-8 Ex vivo anticoagulant activity of (FIB) five samples. The data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 10$) and evaluated by one-way ANOVA. * in superscript donate significant difference ($P < 0.05$)

采用经典的凝血试验 PT、APTT、TT 和 FIB 来考察样品的抗凝血活性，同时以未添加样品的血浆作为空白对照 (KB)。采用不同条件处理的样品对 PT 和 APTT 的影响如图 4-5 和图 4-6 所示。与实验前相比，所有添加右旋糖酐的样品在实验后 PT 和 APTT 均显著升高 ($P < 0.05$)。由图 4-7、图 4-8 所示，与实验前相比，样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 和样品 5 实验后 TT 和 FIB 浓度均显著降低 ($P < 0.05$)。在图 4-5 中，样品 4 PT 延长率和样品 5 PT 延长率为 6.5 % 和 8.5 %，是略高于样品 1、样品 2 和样品 3，这表明超高压协同酶解可以有效的通过外源性凝血途径提高右旋糖酐凝血活性。由图 4-6 可以看出，样品 2 APTT 的增长率为 3.3 %、样品 4 APTT 的增长率为 6.5 %，样品 5 APTT 的增长率为 6.4%。而样品 3 APTT 的增长率为 8.8%，与样品 1 几近相同，这表明单一的酶解不能通过内源性

凝血途径对右旋糖酐的凝血活性产生影响，但当与超高压协同作用时，会对超高压作用起缓和作用，表明低分子量右旋糖酐可以通过超高压作用来降低右旋糖酐的凝血活性。由图 4-7 和图 4-8 可知，样品 1 纤维蛋白原转化为纤维蛋白的时间缩短，且纤维蛋白原的含量浓度降低。这表明右旋糖酐-70 具有轻微的抗凝作用，当右旋糖酐被用作代血浆时，过量使用会引起出血倾向，抗凝效果不佳，这会导致体内大量出血时难以止血。样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 和样品 5 均导致 TT 值缩小，TT 是代表凝血酶时间，反映纤维蛋白原转化为纤维蛋白的时间，TT 的值降低无临床意义。这里 TT 值的降低是由于在实验过程中添加了 Ca^{2+} 离子。当超高压联合酶解处理，两种处理方式的先后顺序会对右旋糖酐的凝血活性产生影响，将样品进行超高压处理后继续酶水解，会导致 PT 值略有上升，但上升幅度不大，APTT 的值显著降低，FIB 的浓度变化趋势最小；而先将样品进行酶水解后执行超高压操作，会使 PT 的值增加最大，APTT 与 FIB 的变化与超高压处理之后在进行酶处理结果相似。这些结果表明，超高压协同酶解处理时会导致右旋糖酐的凝血活性发生变化。从而降低右旋糖酐作为代血浆使用时产生的凝血功能障碍的风险。

4.3.6 抗血小板聚集分析

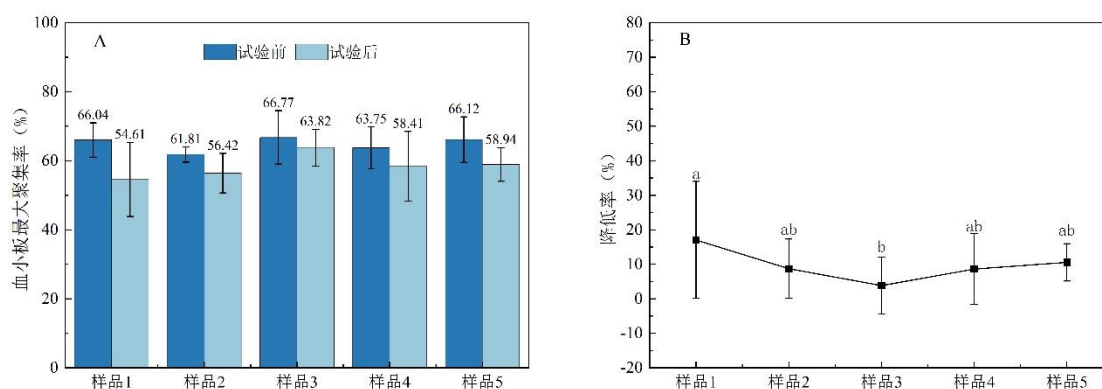


图 4-9 五个样品的血小板聚集图

Fig.4-9 Platelet aggregation plots for five samples

血小板聚集是血小板相互黏附的行为。血管破裂后，可引发血小板聚集，在破裂的部位形成血小板血栓，这是止血过程中最早的反应^[65]。由图 4-9 所示，与实验前相比，样品 1 直接添加右旋糖酐溶液会导致血小板聚集率显著降低；样品 2 经过超高压处理后右旋糖酐血小板最大聚集率显著降低；样品 3 经过酶解处理后右旋糖酐对血小板最大聚集率影响不显著；样品 4 和样品 5 表示经过超高压协同酶解处理后右旋糖酐血小板最大聚集

率显著降低。加入右旋糖酐之后，血小板聚集率显著降低，最大聚集率从 66.04 % 降低至 54.60 %，这是由于添加了血小板聚集药物右旋糖酐-70 所致。样品 3 的血小板聚集率变化最小，相对于原样仅下降了 3%，这表明低分子量右旋糖酐不会导致血小板聚集率。样品 2、样品 4 和样品 5 的血小板最大聚集率较样品 1 都有所下降，下降的幅度分别为 5.38%、5.34% 和 7.18%，较样品 1 血小板聚集率降低 11.44 % 有着显著的提升。综上所述超高压和酶解都能起到调节右旋糖酐对血小板聚集的抑制作用。

4.5 本章小结

在此章节中，首先是对超高压、酶解以及两者的协同作用处理右旋糖酐进行结构表征，将之与经过相同操作的右旋糖酐进行对比。通过液相、FT-IR、X-ray 和 SEM 的比较，来阐明超高压和酶解对右旋糖酐凝血活性和血小板聚集的影响。

分子量在 7 万的右旋糖酐可以在临床上作为代血浆使用，但本身却具有一定的抗凝血活性以及抗血小板聚集活性。通过分析其结构特点，来阐明右旋糖酐的抗凝血活性和抗血小板聚集活性的机理，结果表明，右旋糖酐的晶体构型和表面孔隙对凝血活性存在影响，但具体的影响哪种凝血因子还需要继续深入研究。超高压处理之后，右旋糖酐的分子量和红外结构没有发生变化，表明超高压不改变右旋糖酐的一级结构，但在晶体结构了表面形态发生了变化，直接表现在右旋糖酐对抗凝血活性的影响，超高压对外源性凝血活性的途径以及共同途径都会产生影响，这种影响是随着超高压处理的条件不断变化的，但是对于内源性凝血途径，却表现为相似的结果，即超高压会对内源性凝血途径造成不可逆的破坏。酶解的目的主要是为了降低右旋糖酐的分子量，右旋糖酐的药用价值随着分子量的减小而逐渐增加的，降低右旋糖酐的分子量来提高它的生物活性。当超高压协同酶解之后，右旋糖酐结构会发生变化，同时伴随着凝血活性和血小板聚集活性也随之变化。当两者协同时，右旋糖酐抗凝血活性通过外源性凝血途径增强 10.5%，提升了右旋糖酐的抗凝血活性，同时 FIB 浓度降低了 5.1%。添加右旋糖酐氯化钠溶液后，血小板聚集率下降了 17.3%，经过超高压和酶处理后，右旋糖酐血小板聚集率仅下降了 9.6 %，有效的降低了右旋糖酐对血小板的抑制率。两者协同处理之后，可以起到一个较为缓和的效果，同时从多途径作用于右旋糖酐的凝血活性。

第 5 章 结论和展望

5.1 主要结论

(1) 超高压工艺的研究

试验选取 dex-70 作为原料, 通过单因素试验, 得出超高压会对外源性凝血途径产生影响。以 PT 为响应值, 采用响应面优化超高压对改善右旋糖酐抗凝血活性的工艺, 得到最佳的优化工艺参数为: 超高压处理压力 400 MPa、处理时间 19 min、处理次数为 1 次。此条件下, PT 值的变化最大。

(2) 酶水解工艺条件的研究

试验从酶浓度、酶解时间、酶解温度、酶解底物浓度、酶解 pH 和酶解底物分子量优化酶解工艺, 为了得到分子量较低且组分相对均匀的不同组分, 最终确定酶解条件参数如下: 酶解时间 50 min, pH=5, 酶解温度为 50 °C, 底物浓度是 10 mg/mL, 酶浓度为 10 U/mL, 底物为 dex-70。

(3) 凝血活性的研究

阐明超高压、酶解和协同作用后的右旋糖酐的分子量、糖苷键、晶体结构和表面形貌。超高压处理后, 右旋糖酐分子量与糖苷键没有发生变化, 酶解之后, 右旋糖酐分子量分裂成两个组分, 分子量为 3000 Da 和 800 Da, 晶体结构和表面形态也随之发生变化。协同处理后, 在表面形态方面有着较大的差异。

论述了协同酶解对右旋糖酐抗凝血活性和抗血小板聚集活性的机制, 超高压可以破坏右旋糖酐内源性凝血途径, 使 APTT 减少; 同时改变了右旋糖酐外源性凝血活性途径和共同凝血途径, 使 PT 延长, FIB 浓度降低。而酶解处理对右旋糖酐 APTT 延长率与未经处理的右旋糖酐溶液几乎相持平, 由此判断分子量大小不会对右旋糖酐内源性凝血途径产生影响。超高压主要在外源性凝血途径和共同途径上影响右旋糖酐的凝血活性, 酶解不会对右旋糖酐的凝血活性造成太大的变化。当两者协同时, 右旋糖酐抗凝血活性通过外源性凝血途径增强 10.5%, 提升了右旋糖酐的抗凝血活性, 同时 FIB 浓度降低了 5.1%。添加右旋糖酐氯化钠溶液后, 血小板聚集率下降了 17.3%, 经过超高压和酶处理后, 右旋糖酐血小板聚集率仅下降了 9.6 %, 有效的降低了右旋糖酐对血小板的抑制率。

5.2 展望

本课题以市售的右旋糖酐固体粉末为原料，对该多糖进行超高压和酶解处理，通过优化工艺条件，得到较佳的制备工艺，通过 HPLC、FT-IR、X-ray 和 SEM 进行了系统的结构鉴定，采用体外抗凝血活性和血小板聚集率的研究，探究超高压和酶解处理的抗凝血活性及机制，为右旋糖酐作为代血浆的优化、制备提供了理论依据，但仍存在一些问题有待进一步研究：

- （1）右旋糖酐对凝血因子的具体影响有待进一步研究；
- （2）右旋糖酐处理后作为代血浆的应用效果有待进一步研究；
- （3）改性的右旋糖酐其他活性是否发生变化有待进一步研究。

参考文献

- [1] 苏子然. 酶膜反应器生产均一分子量的寡聚右旋糖酐 [D]; 中国科学院大学, 2018.
- [2] 相萍萍. 生物法调控右旋糖酐分子量的研究进展 [J]. 2023, 2023(28): 159-161.
- [3] DÍAZ-MONTES E. Dextran: Sources, Structures, and Properties [J]. Polysaccharides, 2021, 2(3): 554-565.
- [4] DIANA C-R, HUMBERTO H-S, JORGE Y-F. Structural characterization and rheological properties of dextran produced by native strains isolated of Agave salmiana [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 1-8.
- [5] DU R, PEI F, KANG J, et al. Analysis of the structure and properties of dextran produced by Weissella confusa [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 204: 677-684.
- [6] 刘祥芳. 右旋糖酐的制备,水解及纯化工艺研究 [D]; 广东工业大学, 2020.
- [7] DHANESHWAR S, BHILARE N, ROY S. Dextran Pharmaceutical Applications [M]. Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications. Springer. 2021: 1-28.
- [8] GHIMICI L, NICHIFOR M. Dextran derivatives application as flocculants [J]. Carbohydrate polymers, 2018, 190: 162-174.
- [9] ZHAO Y, JALILI S. Dextran, as a biological macromolecule for the development of bioactive wound dressing materials: A review of recent progress and future perspectives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 666-682.
- [10] 慕娟, 问清江, 郑巧霞, 等. 右旋糖酐水解改善右旋糖酐分子量分布的研究 [J]. 陕西农业科学, 2020, 6: 45-49.

- [11] 曾涛. 高分子右旋糖酐的氧化,接枝改性及其絮凝活性的研究 [D]; 合肥工业大学, 2019.
- [12] VANDAMME E J, RENARD C E F G, ARNAUT F R J, et al. Process for obtaining improved structure build-up of baked products [Z]. Google Patents. 2002
- [13] CHEN X, YANG J, SHEN M, et al. Structure, function and advance application of microwave-treated polysaccharide: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 123: 198-209.
- [14] BENCHAMAS G, HUANG S, HUANG G. The influence of traditional and new processing technologies on the structure and function of food polysaccharide [J]. Food & function, 2020, 11(7): 5718-5725.
- [15] KAWADKAR A S, GOGATE P R. Intensified depolymerization using ultrasound—A Review of mechanisms, reactors, operating conditions and applications [J]. Chemical Engineering and Processing-Process Intensification, 2023, 191: 109446.
- [16] 于玥, 陈华磊, 李素霞, 等. 葡聚糖超声降解的反应动力学研究 [J]. 应用化工, 2017, 46(03): 473-476+480.
- [17] 陈华磊, 侯殿志, 李素霞, 等. 超声降解葡聚糖及过程动力学研究 [J]. 食品科技, 2017, 42(07): 73-78.
- [18] WANG Q, LIU T, XU X, et al. Dextran degradation by sonoenzymolysis: Degradation rate, molecular weight, mass fraction, and degradation kinetics [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 169: 60-66.
- [19] 常国炜, 黄曾慰, 黎志德, 等. 右旋糖酐酶开发及应用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2019, 35(06): 196-204.
- [20] WANG G, XIE L, HUANG Z, et al. Recent advances in polysaccharide biomodification by microbial fermentation: production, properties, bioactivities, and mechanisms [J]. Critical

- Reviews in Food Science and Nutrition, 2023: 1-25.
- [21] 陈华磊. 双酶(DS/DN)体系合成右旋糖酐的聚合过程研究 [D]; 广西大学, 2018.
- [22] 黄瑞杰, 李媚, 廖安平, 等. 酸解法与酶解法调控右旋糖酐分子质量的比较 [J]. 食品科学, 2020, 41(06): 43-50.
- [23] GAN W, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Biosynthesis of oligodextrans with different Mw by synergistic catalysis of dextransucrase and dextranase [J]. Carbohydrate polymers, 2014, 112: 387-395.
- [24] IQBAL S, MARCHETTI R, AMAN A, et al. Enzymatic and acidic degradation of high molecular weight dextran into low molecular weight and its characterizations using novel Diffusion-ordered NMR spectroscopy [J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 103: 744-750.
- [25] LI R-H, ZHANG H-B, HU X-Q, et al. An efficiently sustainable dextran-based flocculant: Synthesis, characterization and flocculation [J]. Chemosphere, 2016, 159: 342-350.
- [26] WANG T, JIANG Z, WANG Y, et al. Low Molar Mass Dextran: One-Step Synthesis With Dextransucrase by Site-Directed Mutagenesis and its Potential of Iron-Loading [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 747602.
- [27] CHEN X, ZHAO Y, ZHAO Y, et al. Effect of ultra-high pressure treatment on the characteristics of a tea polysaccharide conjugate aqueous solution [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 171: 113859.
- [28] CHEN H, HUANG Y, ZHOU C, et al. Effects of ultra-high pressure treatment on structure and bioactivity of polysaccharides from large leaf yellow tea [J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132862.
- [29] ZHANG S, YI W, WANG Z, et al. Ultrahigh pressure extraction of polysaccharide from *Morinda officinalis* and effect on the

- polsaccharide structure [J].
- Separation Science and Technology*
- , 2021, 56(10): 1741-1751.

- [30] ZHU Z-Y, LUO Y, DONG G-L, et al. Effects of the ultra-high pressure on structure and α -glucosidase inhibition of polysaccharide from *Astragalus* [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 87: 570-576.
- [31] CHEN R, LUO S, WANG C, et al. Effects of ultra-high pressure enzyme extraction on characteristics and functional properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel pectic polysaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107016.
- [32] 胡志华, 李邦良, 龚浩. 疏血通联合低分子右旋糖酐抗凝对断指再植术后凝血功能及血管危象的影响 [J]. *江西医药*, 2022, 57(10): 1440-1442.
- [33] BOSEK M, ZIOMKOWSKA B, PYSKIR J, et al. Relationship between red blood cell aggregation and dextran molecular mass [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 19751.
- [34] NEU B, WENBY R, MEISELMAN H J. Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation [J]. *Biophysical journal*, 2008, 95(6): 3059-3065.
- [35] XU E, WU X, ZHANG X, et al. Study on the protection of dextran on erythrocytes during drug loading [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 189: 110882.
- [36] DROZD N, LOGVINOVA Y S, TORLOPOV M, et al. Effect of sulfation and molecular weight on anticoagulant activity of dextran [J]. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2017, 162: 462-465.
- [37] ZEERLEDER S, MAURON T, LÄMMLE B, et al. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests [J]. *Thrombosis research*, 2002, 105(5): 441-446.

- [38] 邱佑芝. 胎儿脐动脉舒张末期血流缺失影响因素及低分子右旋糖酐, 小剂量肝素干预效果探究 [J]. 中国社区医师, 2021, 037(024): 39-40.
- [39] 陈槐卿. 分子量不同的右旋糖酐对红细胞悬浮液触变特性的影响 [J]. 华西医科大学学报, 1986, (03): 169-172.
- [40] 朱晓峰, 张桢, 丁立人, 等. 响应面法优化菜籽粕的酶解条件 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(03): 1708-1715.
- [41] 杨阳. 医用聚氯乙烯体外循环导管的生物相容性改性研究 [D]; 北京化工大学, 2019.
- [42] LIN S, MAJIDA A-W, NIU L, et al. Degradation enhances the anticoagulant and antiplatelet activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. leaves [J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 133: 674-682.
- [43] SEEDEVI P, BIOREFINERY. Antioxidant and anticoagulant activity of crude polysaccharide and α -L-Rhamnose from *Grateloupia lithophila* [J]. Biomass Conversion, 2022: 1-9.
- [44] 陈艳萍, 贺菊萍, 刘意, 等. 超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺优化及其体外抗凝血活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 2020211.
- [45] TANG H, HUANG J, YUAN Q, et al. A regular *Chlorella* mannogalactan and its sulfated derivative as a promising anticoagulant: Structural characterization and anticoagulant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 314: 120956.
- [46] MARTINICHEN-HERRERO J C, CARBONERO E R, GORIN P A J, et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirens* Hale [J]. Carbohydrate polymers, 2005, 60(1): 7-13.
- [47] KHALIKOVA E, SUSI P, KORPELA T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2005, 69(2): 306-325.
- [48] NILSSON I M, EIKEN O. Further studies on the effect of dextran of

- various molecular weight on the coagulation mechanism [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1964, 11(01): 038-050.
- [49] 问清江, 慕娟, 孙晓宇, 等. 右旋糖酐酶学性质研究 [J]. *陕西农业科学*, 2019, 65(05): 50-53.
- [50] 程冬. 色谱柱及标准曲线的选择对 HPGPC 法测定右旋糖酐分子量及分子量分布的影响 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(02): 367-372.
- [51] 张利, 范明才, 冯喜文, 等. 铁皮石斛中石斛多糖与石斛碱的纤维素酶法提取研究 [J]. *化学研究与应用*, 2011, 23(03): 356-359.
- [52] 李学鹏, 刘晏玮, 谢晓霞, 等. 热预处理对蓝蛤酶解及酶解液呈味特性的影响 [J]. *食品科学*, 2020, 41(02): 133-140.
- [53] JIN X, SHAN J, ZHAO J, et al. Bimetallic oxide Cu-Fe₃O₄ nanoclusters with multiple enzymatic activities for wound infection treatment and wound healing [J]. *Acta Biomaterialia*, 2023.
- [54] 杨文君, 段杉, 崔春. 豌豆蛋白深度酶解制备咸味肽的研究 [J]. *中国调味品*, 2021, 46(08): 1-5.
- [55] 郝晓华, 郑凯南, 刘可心. 碱性蛋白酶酶解藜麦芽制备多肽工艺的研究 [J]. *中国饲料*, 2022, (09): 104-107+112.
- [56] 万仁口, 贺杨正, 李功景, 等. 酶解制备竹笋可溶性膳食纤维及其抗氧化活性研究 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(03): 153-160.
- [57] SU Y, LI L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales [J]. *Carbohydrate polymers*, 2020, 229: 115407.
- [58] FAN Y, WU X, ZHANG M, et al. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from *Grifola frondosa* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48(5): 798-803.
- [59] XU Y, LIU N, FU X, et al. Structural characteristics, biological, rheological and thermal properties of the polysaccharide and the degraded polysaccharide from raspberry fruits [J]. *International*

- journal of biological macromolecules, 2019, 132: 109-118.
- [60] XING L, MIAO Y, LI N, et al. Molecular structure features and lactic acid fermentation behaviors of water-and alkali-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58: 532-540.
- [61] 陆启蒙. 基于高分子量右旋糖酐改性的新型多糖絮凝剂的制备、表征及絮凝研究 [D]; 合肥工业大学, 2022.
- [62] 景永帅, 马云凤, 李明松, 等. 植物多糖结构解析方法研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(03): 411-422.
- [63] EL HALAL S L M, COLUSSI R, PINTO V Z, et al. Structure, morphology and functionality of acetylated and oxidised barley starches [J]. Food chemistry, 2015, 168: 247-256.
- [64] LI X, JIANG F, LIU M, et al. Synthesis, characterization, and bioactivities of polysaccharide metal complexes: A review [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(23): 6922-6942.
- [65] NGUYEN T M H, LE H L, HA T T, et al. Inhibitory effect on human platelet aggregation and coagulation and antioxidant activity of *C. edulis* Ker Gawl rhizome and its secondary metabolites [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 263: 113136.

攻读学位期间参加科研项目及发表的学术论文目录

1. 参加的学术交流与科研项目

- [1] 安徽高校自然科学研究重大项目，超高压处理对铁皮石斛鲜汁褐变的抑制及机理研究(编号: KJ2021ZD0133), 2021-2023.

2. 发表学术论文

- [1] Liu Y, Wang J, Huang JB, Li XF, Chen Y, Liu K, Zhao M, Huang XL, Gao XL, Luo YN, Tao W, Wu J, Xue ZL. Advances in regulating vitamin K2 production through metabolic engineering strategies. World J Microbiol Biotechnol. 2023 Nov 8;40(1):8. doi: 10.1007/s11274-023-03828-5. PMID: 37938463.
- [2] Wang J, Liu Y, Zhu SJ. Structural Characterization and Anticoagulant Activity of Dextran: Influence of Combined Modification by Enzymatic Hydrolysis and Ultra-high Pressure. CURRENT TOPICS IN NUTRACEUTICAL RESEARCH. 2024(Accept)..

致谢

时光匆匆，三年的研究生生涯伴随着疫情逝去，安徽工程大学一年四季的美景，实验室兢兢业业的科研人给我留下了深刻的印象。在这三年的学习中，感触颇深，在此我想感谢很多人。

首先，我要感谢的是我的第一责任导师刘艳教授，是刘老师在一直鞭策着我，一直激励着我，将我从最无助的深渊中拉了出来，做我坚实的后盾。一次次的失败，一次次的无助，刘老师总是在关键的时候点醒我，给我帮助，无论是生活还是科研。当课题停滞不前的时候，是刘老师帮助我，给我指明方向；刘老师积极乐观的生活态度深深的影响着我，让我学会了路要一步一步走，对待生活要乐观，少一点抱怨，多一点努力，在此请允许我向我的导师表示由衷的感谢！

同时，我还要感谢滁州学院的朱双杰教授，朱老师帮助我完成了论文的选题，试验方案的设计以及论文的撰写。这些都倾注着朱老师的心血。在试验过程中，是朱老师带着我去一步一步完成的，给与我耐心的指导以及无私的帮助，生活上，帮助我解决了一个又一个棘手的问题，不断鼓励和支持我，带我增长见识。正是朱老师的鼓励和信任，使我在迷茫中找到出路。

感谢刘艳老师课题组的师兄师姐师弟师妹们，对我论文部分悉心的指导和帮助；感谢滁州学院的老师们和师弟师妹们在试验阶段给予的指导；感谢滁州中西医结合医院检验科提供的实验支持；感谢王丽玮师妹在我实验阶段的帮助，非常荣幸的在你们的陪伴下度过难忘的3年。

最后，感谢各位评审专家及参加答辩的专家提出的宝贵意见，帮助完善本文的书写。

汪

剑