

裂褶菌胞外多糖的粘度性质及其构象研究

周 林 郭祀远 蔡妙颜 李 琳

(华南理工大学轻工食品学院, 广州, 510640)

摘 要 采用高效凝胶渗透色谱(GPC)测定了裂褶菌胞外多糖(SPG)的分子量;借助乌氏粘度计和旋转粘度计研究了温度、pH、变性剂(脲)和金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+})对裂褶多糖溶液粘度的影响;采用刚果红染色法分析了 NaOH 和盐的浓度对 SPG 构象的影响。研究表明,所分离的裂褶多糖的重均分子量(M_w)和数均分子量(M_n)分别为 $2.5 \times 10^7 \text{ u}$ 和 $1.2 \times 10^7 \text{ u}$, 特性粘数为 625.29 mL/g 。质量浓度为 0.010% 的 SPG 表现为牛顿流体,大于此浓度则表现为非牛顿流体。随着温度的升高($20 \sim 70^\circ\text{C}$),其相对粘度逐渐降低。 $0.1 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ HCl 和 0.1 mol/L NaOH 的加入使其粘度有所增加,随着酸和碱浓度的增加,SPG 溶液粘度逐渐降低。但加入不同浓度的 HCl,其粘度均大于对照值;而浓度大于 0.5 mol/L 的 NaOH 则会使其粘度降低至对照值以下。不同浓度的金属离子的加入可使 SPG 溶液的粘度增加,但 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 比 Na^+ 、 K^+ 对 SPG 粘度的影响较大。 $0.1 \sim 0.7 \text{ mol/L}$ 脲使其粘度有所增加。刚果红实验表明,NaOH 可以使 SPG 的三螺旋结构解体,而不同浓度的 Na^+ 、 K^+ 都可以稳定其构象,其中 K^+ 更为显著。

关键词 裂褶多糖,粘度,构象

裂褶菌胞外多糖(Schizophyllan, SPG)是由裂褶菌真菌发酵产生的一种中性的胞外多糖,具有 β -(1-6)葡萄糖苷分支的 β -(1-3)-D 葡聚糖结构,其中主链上每隔 3 个葡萄糖单元产生 1 个分支。它具有良好的抗肿瘤活性,还可用于食品工业、日化工业等^[1]。其粘度性质和构象变化规律对于指导生产和应用研究都十分重要。Takashi 和 Peng 等研究了裂褶多糖在 NaOH 和 DMSO 溶液中的粘度变化,主要探讨了其构象变化规律^[2,3]。本研究则主要考虑了其在食品和日化工业中的应用前景,对裂褶多糖的特性粘数、分子量以及引起裂褶多糖溶液粘度变化的因素,如温度、酸、碱、盐、变性剂等进行研究,为进一步开发裂褶多糖的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

裂褶多糖的分离纯化,参考文献[4]的方法。刚果红(AR)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,其余试剂均为国产分析纯。

UV-2102PC 紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;Brookfield Digital Viscometer DV-I 旋转粘度计(转子 S00 转筒 UL/Y),美国 Brookfield 公司;Waters 高效凝胶渗透色谱(Waters 717 plus autosampler, Waters 1525 Binary 泵, Waters 2414

示差折光检测器);HQ45B 气浴恒温摇床,中科院武汉科学仪器厂;501 型超级恒温器,上海实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 特性粘数的测定^[5]

准确称取 75 mg 经冷冻干燥的 SPG,充分溶解后用蒸馏水定容至 25 mL,玻璃沙芯漏斗过滤后用硫酸-苯酚法精确测定其浓度。取 10 mL SPG 水溶液加入乌氏粘度计于 25°C 恒温水槽中测定 SPG 溶液的流出时间,采用逐步稀释法求出样品的特性粘数。

1.2.2 相对粘度和表观粘度的测定

相对粘度的测定采用乌氏粘度计,用秒表分别测定溶剂和溶液的流出时间,计算其比值,得到特定温度下的相对粘度;表观粘度的测定采用 Brookfield 旋转粘度计,在 25 mL 的三角瓶中加入 10 mL 0.097% 的 SPG 溶液,以及 6 mL 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 mol/L 的酸、碱、盐、脲溶液(HCl、NaOH、KCl 等),对照则加入 6 mL 蒸馏水。置于 25°C , 80 r/min 的摇床上振荡 20 min,然后倒入带夹套的 UL/Y 转筒(超级恒温器 25°C 恒温),设定不同的转速,3 min 后待读数稳定读出其粘度值并计算相应剪切速率。

1.2.3 GPC 法测定分子量

TSK G5000PW_{xl} + G3000PW_{xl} 两柱依次串联,1 mg/mL SPG 上样量 20 μL ,流动相为 0.02 mol/L KH_2PO_4 ,流速 0.6 mL/min,柱温 40°C 。标准品为 Waters Dextran 系列,峰位分子量分别为 4400、9900、

第一作者:博士研究生。

收稿日期:2005-07-07

214000、43500、124000、196000、277000、401000_u。标准品和样品均用 0.02 mol/L KH_2PO_4 溶解并经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,实验用水为超纯水。随机 Breeze 软件进行数据分析。

1.2.4 刚果红实验^[6]

1.2.4.1 NaOH 对 SPG 构象的影响

配制 5.0×10^{-6} mol/L 的刚果红溶液,0.002% 和 0.004% SPG 溶液,NaOH 浓度系列为 0.1~0.7 mol/L。将刚果红、SPG 溶液和 NaOH 溶液按体积比 1:1:2 混合并摇匀,25℃ 静置 20 min 后用紫外可见分光光度计于 400~600 nm 进行扫描,利用随机 U-NICO 软件读取其最大吸收波长。

1.2.4.2 Na^+ 、 K^+ 对 SPG 构象的影响

取一定量的 1.2.2 中含 NaCl 和 KCl 的 SPG 溶液,NaOH 浓度为 0.5 mol/L,其余同 1.2.4.1 方法进行。

2 结果与讨论

2.1 特性粘数和分子量

特性粘数作为反映高分子溶液粘度特性的一个物理量,不随其浓度而改变。将 SPG 的比浓粘度与其对应的浓度作图,可得一直线。通过计算可以得到 SPG 的特性粘数为 625.29 mL/g。其 GPC 洗脱曲线见图 1,测定其峰位 (M_p)、重均 (M_w) 和数均分子量 (M_n) 分别为 3.8×10^7 _u、 2.5×10^7 _u 和 1.2×10^7 _u。 $M_w/M_n=2.1$ 表明样品分子量分布较分散。国内其他研究者报道的 SPG 的分子量主要在 $10^5 \sim 10^6$ ^[4,7,8],而多糖的分子量可能影响其理化性质和生理活性。

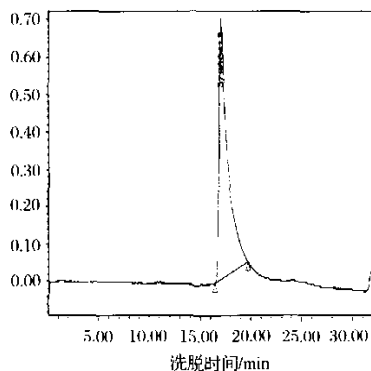


图 1 SPG 的凝胶渗透色谱洗脱曲线
(STKG5000PW_{x1} + G3000PW_{x1} 两柱串联,40℃,
0.02 mol/L KH_2PO_4 ,0.6 mL/min)

2.2 SPG 溶液浓度对其粘度的影响

配置一系列不同质量浓度的 SPG 溶液,固定其他测量条件,记录其在不同转速下的粘度,作出粘度-剪切速率曲线(图 2)。可以看到,在 0.103%~0.031% 的质量分数范围内,SPG 的粘度随着剪切速率的增加而降低,表现为非牛顿流体的剪切稀化现象。当 SPG 的质量分数为 0.010%,其粘度基本不随剪切速率变化,即表现为牛顿流体特性。这和大多数高分子溶液的流变学特性一致。

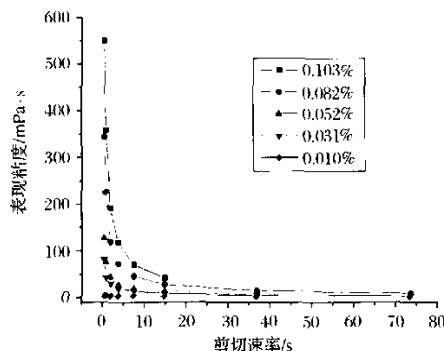


图 2 不同浓度的 SPG 溶液的表现
粘度-剪切速率曲线

2.3 温度对 SPG 溶液粘度的影响

质量分数为 0.097% 的 SPG 溶液,温度从 20℃ 升至 70℃ 时,相对粘度逐渐降低,且趋势未发生明显变化(图 3)。

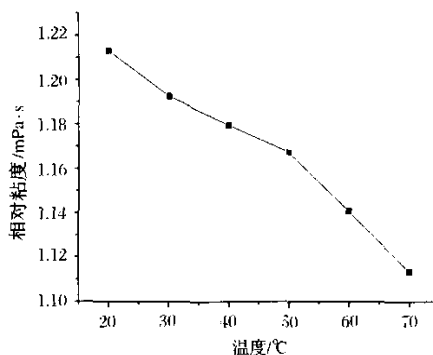


图 3 温度对 SPG 溶液(0.097%)粘度的影响

Kitamura 的研究也表明,当温度高于 135℃ 时,SPG 由三螺旋结构解聚为单线圈结构^[9]。而 SPG 解聚后的松散构象使其粘度有所增加,因而可以推断,随着温度的升高,SPG 构象发生改变时其粘度降低的幅度会有所改变。类似的现象出现在和 SPG 具有相似结构的从苦腐病菌中分离的葡聚糖的结构研究中^[10]。因而在 20~70℃,SPG 溶液构象仍然十分稳定。考虑到进行膜过滤时即使低浓度的 SPG 溶液仍然十分粘稠,因而生产时可以适当提高处理的温度以

加快分离速度而又不会造成其构象以及活性的破坏。

2.4 pH 对 SPG 溶液粘度的影响

图 4 显示,随着 NaOH 的加入,SPG 的粘度先略有增加,然后逐渐降低。一定浓度的 NaOH 可以使 SPG 的三螺旋结构解体,变为无规卷曲构象,粘度会增加。另一方面,三螺旋结构的解体又会导致 SPG 分子量的减少,使粘度降低。Takashi^[2]发现,SPG 在 DMSO 中的分子量仅为在水溶液中的 1/3。因而可以推断,当 NaOH 的浓度较低时,SPG 的三螺旋结构未被破坏,因而分子量基本没有发生变化,但是由于部分氢键遭破坏,分子链的伸展加剧,因而粘度略有增加;随着 NaOH 浓度的增加,SPG 的三螺旋结构逐渐解体,虽然无规则构象导致粘度有所增加,但是相对于分子量的影响来说小得多,因而仍表现为粘度的降低。加入 HCl 时,SPG 溶液粘度的变化规律与加入 NaOH 类似(图 5),但其粘度整体上表现为增加。可以推测实验条件下其三螺旋结构没有解体。

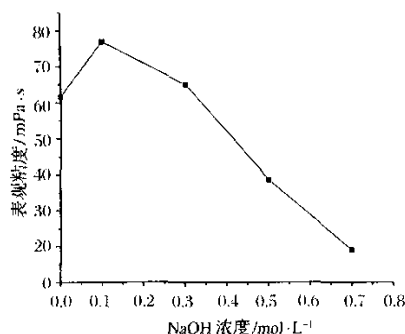


图 4 NaOH 浓度对 SPG 溶液(0.097%)粘度的影响

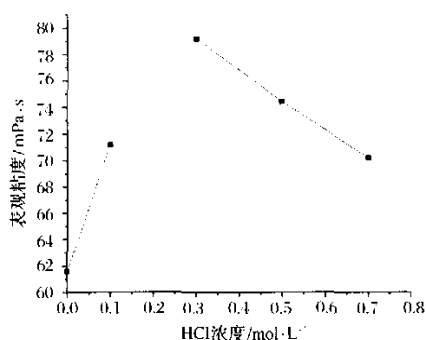


图 5 HCl 浓度对 SPG 溶液(0.097%)粘度的影响

2.5 金属离子对 SPG 溶液粘度的影响

图 6 说明,不同浓度的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的加入均可使 SPG 溶液的粘度增加。但各种金属离子使其粘度增加的能力并不相同。其中 Na^+ 、 K^+ 对其粘度的影响较小,而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的影响较大。当加入的金属离子的浓度为 0.3 mol/L 时,其粘度出现最

大值。这可能是由于多糖分子链中存在的羟基与某些金属离子发生络合作用,形成蛋-箱结构,导致 SPG 分子量加大,溶液粘度增加^[11]。可以考虑开发富集钙、铁、锌、硒等的多糖保健品。

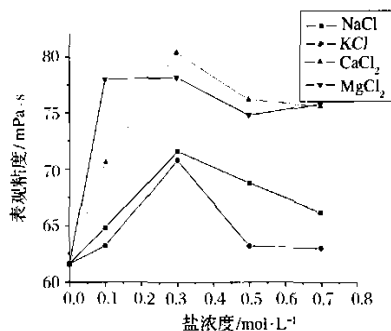


图 6 金属离子对 SPG 溶液粘度的影响

2.6 脲浓度对 SPG 溶液粘度的影响

0.1~0.7 mol/L 的脲均使 SPG 溶液的表观粘度有所增加。当脲的浓度为 0.3 mol/L 时,SPG 的表观粘度有最大值(图 7)。这可能是由于部分氢键被破坏,SPG 的三螺旋结构有所伸展。

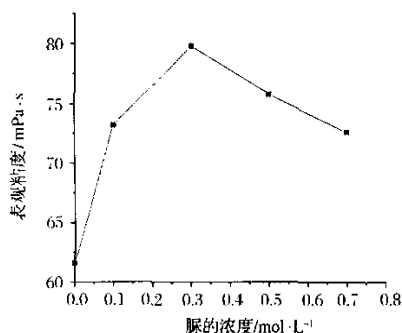


图 7 脲的浓度对 SPG 溶液(0.103%)粘度的影响

2.7 刚果红实验

2.7.1 NaOH 的浓度对 SPG 构象的影响

以纯的刚果红溶液作为空白,0.002% 和 0.004% SPG 的加入均使刚果红的最大吸收波长向长波方向移动,随 NaOH 浓度的升高,复合物的最大吸收波长逐渐减少(图 8),说明 SPG 高度有序的螺旋结构逐渐解体。其他研究者也有相似的报道^[7,12]。由图 8 还可以发现,当 SPG 浓度为 0.002% 时,NaOH 浓度分别为 0.2~0.3 mol/L 和 0.4~0.5 mol/L,SPG 和刚果红的复合物出现相对稳定区域,表明 SPG 存在多股螺旋构象^[6],同时也说明用刚果红染色法进行多糖构象的研究,存在刚果红-多糖浓度的最适配比问题。

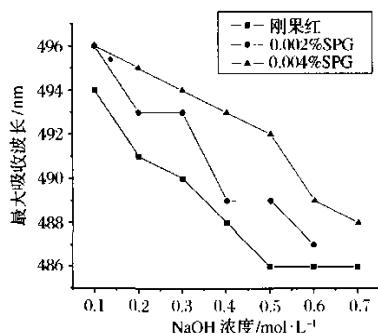


图8 NaOH浓度对SPG构象的影响

2.7.2 Na⁺、K⁺对SPG构象的影响

不同浓度的Na⁺、K⁺均使SPG和刚果红形成的复合物的最大吸收波长红移,说明Na⁺、K⁺都可以起到稳定SPG构象的作用。且同样的浓度条件下,和K⁺作用的SPG溶液构象更为稳定。

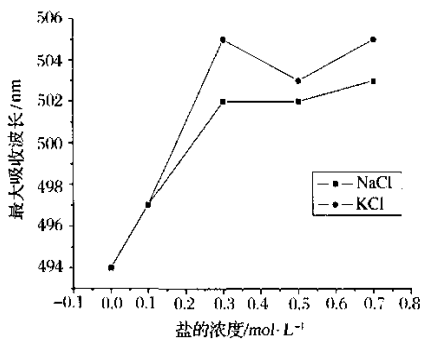


图9 盐浓度对SPG构象的影响

3 结论

(1)所分离的裂褶菌胞外多糖的特性粘数为625.29 mL/g,其重均分子量(*M_w*)、数均分子量(*M_n*)和峰位分子量(*M_p*)分别为 2.5×10^7 、 1.2×10^7 和 3.8×10^7 。

(2)质量浓度为0.010%的SPG表现为牛顿流体,大于此浓度则表现为非牛顿流体。温度从20~70℃时其相对粘度逐渐降低,但其构象十分稳定。

(3)低浓度HCl和NaOH的加入使SPG溶液的粘度有所增加,随着酸和碱浓度的增加其粘度逐渐降低。大于0.1 mol/L的NaOH使SPG三螺旋结构逐渐解体,SPG因分子量的减少粘度降至对照值以下。但加入0.1~0.7 mol/L的HCl,其粘度整体上表现为增加。

(4)不同浓度的金属离子的加入使SPG溶液的粘度增加,但Mg²⁺、Ca²⁺比Na⁺、K⁺对SPG粘度的影响较大。0.1~0.7 mol/L脲使SPG溶液的粘度有所增加。刚果红实验表明,NaOH可以使SPG的三螺旋结构解体,而不同浓度的Na⁺、K⁺可以稳定其构象。且同样的浓度条件下,和K⁺作用的SPG溶液构象更为稳定。

参考文献

- 1 Udo Rau. Production of schizophyllan, in: Methods in Biotechnology-Carbohydrate Biotechnology Protocols [M]. USA:Humana Press Inc,1999. 61~91
- 2 Takashi N, Toshio Y, Hiroshi F. Triple helix of a schizophyllum commune polysaccharide in aqueous solution [J]. Journal of Polymer Science, 1980,18: 547~558
- 3 Peng Fang Y, Takahashi R, Nishinari K. Rheological characterization of schizophyllan aqueous solutions after denaturation-renaturation treatment [J]. Biopolymers, 2004, 74: 302~315
- 4 李兆兰. 裂褶多糖的结构研究 [J]. 南京大学学报, 1994, 30(2): 482~486
- 5 赵学苑. 胶体与界面化学试验 [M]. 北京:北京大学出版社, 1993. 225~231
- 6 Bluhm T L, Sarko A. Conformational studies of polysaccharide multiple helices [J]. Carbohydrate Research, 1977, 54: 125
- 7 周义发, 张丽萍, 杨庆尧, 等. 裂褶菌多糖的构象研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995(1): 53~56
- 8 冀颐之, 杜连祥. 深层培养裂褶菌胞外多糖的提取及结构研究 [J]. 微生物学通报, 2003(5): 15~20
- 9 Kitamura S. A differential scanning calorimetric study of the conformational transitions of schizophyllan in mixtures of water and dimethylsulfoxide [J]. Biopolymers, 1989, 28: 639~654
- 10 Karem G, Josef K, Gerhard F. Structural investigations of glucans from cultures of Glomerella cingulata Spaulding & von Schrenck [J]. Carbohydrate Research, 1991, 217: 153~161
- 11 吴东儒. 糖类的生物化学 [M]. 北京:高等教育出版社, 1988. 582~586
- 12 Kengo T, Wataru T, Takemasa K. Ultrasonic degradation of Schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by Schizophyllum commune Fries [J]. Carbohydrate Research, 1981, 89: 121~135

Research on the Viscosity and Conformation Character of Schizophyllan

Zhou Lin Guo Siyuan Cai Miaoyan Li Lin

(College of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

ABSTRACT Viscosity and conformation character of Schizophyllan (SPG) with intrinsic viscosity of 625.29 mL/g, weight-averaged (M_w) and number-averaged (M_n) molecular weights of 2.5×10^7 and 1.2×10^7 respectively measured by Gel Permeation Chromatography (GPC) were studied with Ubbelohde-type viscometer and rotating cylinder viscometer as well as ultraviolet spectrometer. 0.010% (wt%) SPG aqueous system behaves as Newtonian fluids and its viscosity decreases with the increasing of temperature from 20°C to 70°C. The viscosity of SPG solution increases with 0.1~0.3 mol/L hydrochloric acid or 0.1 mol/L sodium hydroxide solution, but it decreases with higher concentration of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. However the viscosity of SPG aqueous with above 0.5 mol/L sodium hydroxide solution is smaller than that of blank which contains distilled water of the same Volume as the sodium hydroxide, while the viscosity of SPG aqueous with 0.1~0.7 mol/L hydrochloric acid is higher than that of blank. The viscosity of SPG aqueous can be improved by all of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} and is obviously increased even more by Mg^{2+} , Ca^{2+} than Na^+ , K^+ . The congo red colouration experiment showed that the triple helix structure of SPG can be destroyed by sodium hydroxide solution and the ordered structure can be stabilized by certain concentrations of Na^+ and K^+ , especially by K^+ in the experiment.

Key words schizophyllan, viscosity, conformation

市场
动态

2005年无醇饮料市场全面繁荣

从1999至2004年,无醇饮料是世界上发展最快的饮料。特别是瓶装矿泉水、无醇饮料和功能饮料的销量长势惊人,呈现出名副其实的繁荣景象。

为了促进充气饮料的发展,如柠檬汁和可乐,生产商们在甜度的增加方面正在努力寻求降低能量的增添方法,如:饮食甜度或中卡热量等,尽量减少饮料的热量。

2005年慕尼黑饮料及液体食品技术博览会发布了2005年无醇饮料市场的发展趋势:在广泛的技术革新基础上,瓶装水、软饮料、热饮料、运动饮料和功能饮料领域遍地开花,无醇饮料市场呈现全面繁荣。

载尼斯国际公司(Zenith International)专门从事国际食品和饮料行业的市场研究人员分析,在1999~2004年,热灌装饮料的销售量扩大了6.4%,牛乳饮料也是如此,而软饮料的生产和销售发展最快,迄今已增长26.2%。

瓶装水——世界范围内发展最快的领域。

根据饮料销售公司的预测,今后3年内,瓶装水的销量预计将超过充气饮料,如:柠檬汁饮料和牛乳等。到2007年,全球消费瓶装水将会超过2000亿L大关,而到2008年则接近2200亿L。2008年,全球人均消费瓶装水预计达33L,比2004年平均增加8L。所有其他无醇饮料的销量预计或多或少都有增长,全球平均年增长率约0.5%~2%。

近几年来,瓶装水在德国很受欢迎。矿泉水的消费量现在首次超过了啤酒的消费量。德国有266家商业性矿泉水生产企业,2004年生产了94亿L矿泉水,其品种不同,约有500多种瓶装矿泉水,创世界纪录。德国矿泉水生产商(不仅供应矿泉水,而且还有软饮料等)2004年销售了123亿L饮料。其中长期最受欢迎的是矿泉水——不充气的和略充气的矿泉水。

在2004年,德国不充气矿泉水的销售量增长了19.4%,而在2005年的上半年几乎就增长了25%。略带或不带 CO_2 矿泉水的销售量现在已经赶上了带 CO_2 矿泉水的销售量。

软饮料在美国和欧洲一路畅销,根据载尼斯国际公司(Zenith International)的统计,在北美洲畅销的2种饮料中,其一是软饮料:总饮料的销售量为2214亿L,其中55%归为软饮料这一类。软饮料在美国非常流行,目前在西欧也正在兴起。近5年来,西欧软饮料的销售约占饮料总销售量2481亿L的40%,这类饮料的增长率大约为15%;在东欧地区,总饮料消费为1253亿L,相当于西欧的一半,其中软饮料仅占24%的市场份额。然而,这部分的增长比在西欧强劲得多,自1999年以来,增长了33%。