

# 核盘菌多糖的理化性质\*

刘如林

(南开大学微生物系 天津 300071)

王德润 于宪潮

(南开大学中心实验室 天津 300071)

**摘 要** 核盘菌多糖 (SSG) 是由核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 通过深层发酵产生的一种胞外多糖, 具有潜在的免疫调节活力和明显的抑瘤作用。研究表明, SSG 是一种由  $\beta$ -配糖键连接的葡聚糖, 在水中溶解缓慢, 但粘度较高, 并具有良好的流变学性质。其特性粘度  $[\eta]$  几乎不随离子强度的变化而改变, 在 pH1.88—12.36 之间,  $[\eta]$  值变化不显著, 但当 pH 值为 13.32 时, 由于分子构象的变化导致  $[\eta]$  值急骤下降。温度  $\leq 90^\circ\text{C}$  和热处理对 SSG 溶液的表现粘度影响不大。

**关键词** 核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 深层发酵, 核盘菌多糖 (SSG), 理化性质

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 俗名油菜菌核病<sup>[1]</sup>, 是一种危害农作物的丝状真菌。在琼脂培养基上, 该菌能产生鼠粪状菌核<sup>[2]</sup>。深层培养时, 菌丝体外产生荚膜, 即核盘菌多糖 (Sclerotan 或 SSG)<sup>[3]</sup>。其分子结构与小核菌多糖 (Scleroglucan)、裂褶菌多糖 (Schizophyllan) 和香菇多糖 (Lentinan) 类似, 分子量在百万道尔顿以上。由于该多糖具有良好的流变学性质, 能耐受宽范围的温度、酸碱度和离子强度, 对微生物污染稳定, 故有潜在的工业利用价值<sup>[4]</sup>。重要的是发现了 SSG 具有明显的抑瘤活性和免疫增强作用, 可望用于医药开发研究。80 年代, 日本学者对用热碱水处理其菌核而获得的 SSG 进行了广泛研究<sup>[5-8]</sup>, 国内尚未见有关报道。本文采用深层发酵法制备胞外多糖并对其主要理化性质进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) SS-001, 由江苏农学院植物保护系提供。

### 1.2 样品制备<sup>[9,10]</sup>

以改良的察氏培养基作发酵培养基, 接种后于  $28^\circ\text{C}$ 、200r/min 摇床 (偏心距 5cm) 振荡培养 96 小时。调发酵液至 pH7.0, 置  $75^\circ\text{C}$  水浴 30 分钟, 再调至 pH2.0。用无离子水稀释 1 倍, 10000r/min 离心除菌体。上清液加入  $\frac{1}{4}$  体积的氯仿/异戊醇 (5:1) 混合液,

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 9 月 20 日收到。

摇匀, 5000r/min 离心除蛋白, 反复 3 次。收集上清液, 于 4℃ 下对无离子水透析 48 小时, 加入 3 倍体积 95% 乙醇沉淀多糖, 分离, 并用丙酮、乙醚先后浸洗两次。60℃ 真空干燥, 研磨过筛, 得分析样品。

### 1.3 组分分析

将样品用 1 mol/L  $H_2SO_4$  配成 1.0% 的溶液, 置沸水浴中水解 6 小时以上, 加  $BaCO_3$  中和, 离心后将上清液点于 1<sup>#</sup> 新华滤纸上, 展开 10 小时。展开剂为正丁醇: 吡啶: 水 = 6: 4: 3, 用氨性硝酸银显色, 以标准葡萄糖作对照, 计算  $R_f$  值。

### 1.4 红外光谱分析

样品经 KBr 压片, 用 5 DX 红外光谱仪分析。

### 1.5 粘度测定

用 Brookfield LVT 型旋转粘度计于 25℃ 下测定多糖溶液的流变学性质。用乌氏粘度计采用外推法测定样品溶液的特性粘度  $[\eta]$ , 溶剂水的流出时间  $t_0 = 706s$ , 毛细管直径 0.64mm, 实验温度  $25 \pm 1^\circ C$ 。

## 2 结果和讨论

### 2.1 SSG 的水溶性

样品用蒸馏水配成 0.1% 的水溶液, 浸泡 24 小时, 使充分溶胀, 用电动搅拌器 (4 档) 剧烈搅拌, 记录溶成均匀溶液所用时间。结果表明, 浸泡 24 小时的样品平均水溶时间为 43.2 分钟, 而未经浸泡的样品在搅拌 2 小时后仍未全溶。这与易溶于水的小核菌多糖明显不同, 后者在直接搅拌 31 分钟后即可溶解<sup>[11]</sup>。

据报道<sup>[5,12]</sup>, SSG 是一种高度分枝的  $\beta$ -D-葡聚糖。对其粘度、旋光性和  $^{13}C$ -NMR 的分析表明, SSG 以中性或微碱性水膜形成凝胶, 由凝胶向溶液的转变在自然状态下是缓慢的。为了提高其水溶性, 可将样品进行羟甲基化处理并于低温或减压下迅速干燥。

### 2.2 SSG 的组成

酸解样品的纸层析结果表明, 样品 (S) 均只显一个斑点, 与标准葡萄糖 (B) 的  $R_f$  值相同, 证明 SSG 是一种葡聚糖 (图 1)。

### 2.3 SSG 的红外光谱

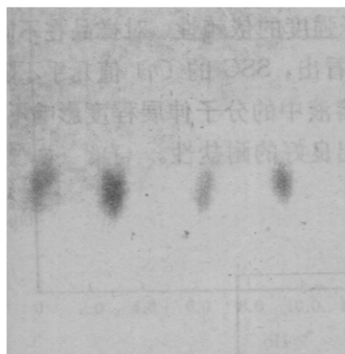
图 2 中显出几个明显的吸收峰, 表明 SSG 分子中存在着下列基团:  $-OH$  ( $3416cm^{-1}$ )、 $-CH-$  ( $2924cm^{-1}$ )、 $C=O$  ( $1646cm^{-1}$ )、弯曲的  $-CH_2$  ( $1375cm^{-1}$ )、和  $C-O$  ( $1077cm^{-1}$ ), 并且在指纹区的  $891cm^{-1}$  附近有一个峰, 表明 SSG 分子主要由  $\beta$ -配糖键连接。

### 2.4 SSG 水溶液的流变学性质

图 3 是用 3<sup>#</sup> 转子于 30r/min 测定的粘度-浓度关系曲线。可以看出, 随着 SSG 浓度的增加, 曲线陡峭上升, 表现出良好的增粘效果。图 4 是用 4<sup>#</sup> 转子测定的 1.0% SSG 水溶液在不同转速下的粘度。表明该多糖溶液的粘度随剪切速率的增加而显著降低; 当转速降低时, 粘度又可回升。说明 SSG 具有良好的剪切稀释性能和假可塑行为。

### 2.5 离子强度对 SSG 特性粘度 $[\eta]$ 的影响

据 Mark-Howink 方程可知, 在一定的溶剂和温度条件下,  $[\eta]$  和分子量是一一对



B

图1 SSG 酸解样品的纸层析图谱

Fig. 1 Paper chromatogram of SSG by acid hydrolysis

B. 标准葡萄糖 Standard glucose; S: SSG.

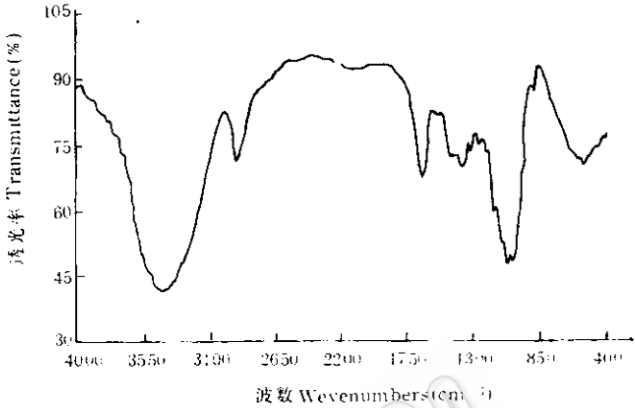


图2 SSG 的红外吸收光谱

Fig. 2 IR spectrum of SSG

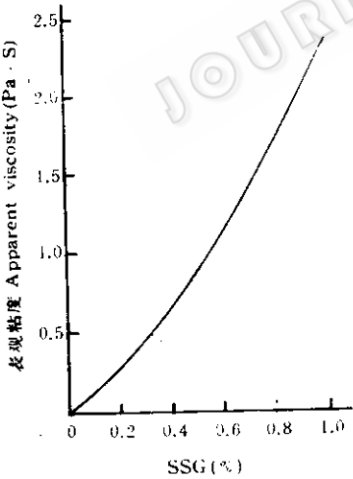


图3 SSG 的浓度对溶液粘度的影响

Fig. 3 Effect of SSG concentration on solution viscosity

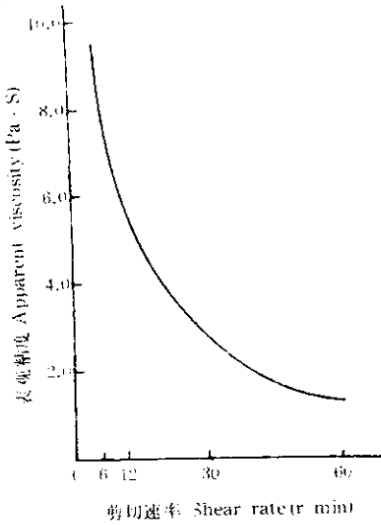


图4 剪切速率对 1.0%SSG 溶液粘度的影响

Fig. 4 Effect of shear rate on 1.0% SSG solution viscosity

应的。因此可通过不同条件下样品  $[\eta]$  值的变化来获得有关分子构象转变的信息。SSG 属中性多糖, 其分子在水溶液中的伸展程度不应受离子强度的影响, 但因分子的不对称性产生的极性可能与环境产生一定的相互作用, 进而影响到分子构象。此作用通常较之分子间的氢键力弱得多。为观察 SSG 在水溶液中对离子强度的依赖性, 对样品在不同浓度  $\text{NaNO}_3$  水溶液中的  $[\eta]$  值进行了研究。从图 5 可以看出, SSG 的  $[\eta]$  值几乎不随离子强度的变化而变化。表明离子强度的变化对 SSG 在溶液中的分子伸展程度影响不大, 即 SSG 在水溶液中的构象不受离子强度的影响, 显示出良好的耐盐性。

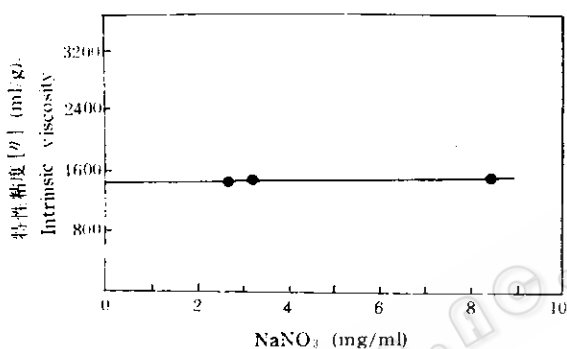


图 5 SSG 在不同浓度  $\text{NaNO}_3$  溶液中的  $[\eta]$  值

Fig. 5  $[\eta]$  value of SSG in solutions with different concentration of  $\text{NaNO}_3$

## 2.6 pH 值对 SSG 在水溶液中构象的影响

从图 6 中可以看出, 在相当宽的 pH 范围内 (1.88—12.36), SSG 的  $[\eta]$  值基本保持不变, 表明 SSG 有较强的耐酸碱性能。这可能是由于 SSG 为中性多糖, 一定范围的 pH 变化尚不影响其电荷性质和分子的高级结构。但当 pH 值达到 13.32 时,  $[\eta]$  值急骤下降近 10 倍。这种突变可能是其分子构象改变的结果, 似不大可能是分子的降解, 因为多糖水解需在强酸条件下进行。这类多糖在水溶液中多以刚性的多股螺旋结构存在, 分子的伸展空间较大, 因而  $[\eta]$  值也较大。但随着 pH 值的增加, 水中  $\text{OH}^-$  离子浓度增加, 就增加了水的溶剂化效应。当 pH 增至一定程度, 溶剂化效应增强到足以破坏多股螺旋结构赖以存在的分子间氢键作用时, 会使以分子间氢键结合的亚分子突然解缔, 大大减小了分子的表现体积, 而表现出  $[\eta]$  值的突然下降<sup>[12]</sup>。

## 2.7 温度对 SSG 溶液粘度的影响

将 SSG 配制成 0.6% 的水溶液 (pH 6.8), 用 LVT 粘度计 4# 转子、30r/min 于不同水浴温度下测其表观粘度, 得粘度-温度关系曲线 (图 7)。

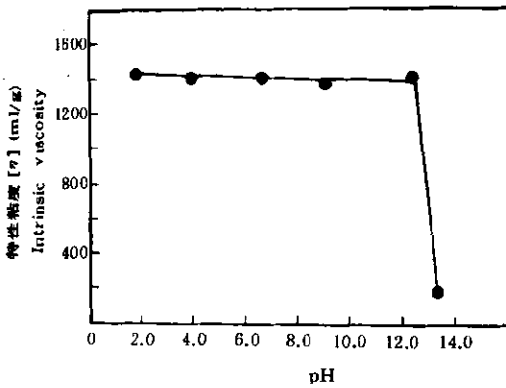
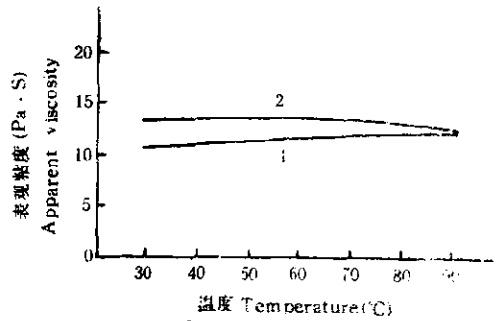
图6 不同 pH 对 SSG 水溶液  $[\eta]$  的影响Fig. 6 Effect of different pH on  $[\eta]$  of SSG solution

图7 温度和热处理对 SSG 溶液粘度的影响

Fig. 7 Effect of temperature and heat treatment on apparent viscosity of SSG

1. 升温过程 Rise the temperature;
2. 降温过程 Lower the temperature

可以看出, SSG 溶液在不同温度下粘度变化不大。但测定程序不同时, 粘度值有所变化。由 90℃ 降温历程比从 40℃ 升温历程粘度略高, 说明 SSG 对于  $\leq 90^\circ\text{C}$  的温度和热处理基本稳定。

致谢 江苏农学院陈厚德教授为本研究提供菌种, 特此致谢!

### 参 考 文 献

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇. 北京: 科学出版社, 1979. 308—312.
- [2] 戴芳澜. 真菌的形态和分类. 北京: 科学出版社, 1985. 173—175.
- [3] 吴东儒. 糖类的生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1987. 543—626.
- [4] 淡家林. 生物工程学报, 1986, 2 (3): 19—24.
- [5] Ohno N, Kurachi K, Yadomae T. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36 (3): 1016—1025.
- [6] Shinohara H, Ohno N, Yadomae T. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36 (2): 819—823.
- [7] Chno N, Shinohara H, Yadomae T. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34 (12): 5071—5078.
- [8] Shinohara H, Ohno N, Yadomae T. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37 (8): 2174—2178.
- [9] Griffith W L, Compere A L. *Dev Ind Microbiol*, 1978, 19: 609—616.
- [10] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分的提取与分离. 上海: 上海科技出版社, 1980. 415—425.
- [11] 刘如林, 赵大健, 衡斌, 等. 南开大学学报 (自然科学), 1991, 2: 84—92.
- [12] Dealandes Y, Marchessault R H, Sarco A. *Macromolecules*, 1980, 13: 1466—1470.

# PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A $\beta$ -GLUCAN FROM *SCLEROTINIA* *SCLEROTIORUM*

Liu Rulin

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Wang Derun Yu Xianchao

(Central Laboratory, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** Sclerotan (SSG) was an extracellular polysaccharide from *Sclerotinia sclerotiorum* by submerged fermentation. It had potential immunomodulating and antitumor activity. The SSG was a glucan composed of  $\beta$ -linked D-glucoses. It was hard to dissolve in water under normal condition, but its aqueous solution had fine rheological properties. Its intrinsic viscosity  $[\eta]$  hardly changed with ionic strength. Change of its  $[\eta]$  value was not remarkable between pH 1.88—12.36. Nevertheless, when the pH came to 13.32, the  $[\eta]$  value decreased rapidly due to change of molecules conformation. Effect of temperature  $\leq 90^\circ\text{C}$  and heat treatment on apparent viscosity of SSG solution was minor.

**Key words** *Sclerotinia sclerotiorum*, Submerged fermentation, Sclerotan (SSG), Physicochemical property