

魔芋葡甘聚糖园二色性与食品营养学性能相关性初探

李 斌, 谢笔钧*

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 研究了温度、pH、钙离子、硼和刚果红等对魔芋葡甘聚糖溶液园二色性的影响, 结果显示在高 pH 条件下产生新的 cotton 效应, 其余均表现为不同程度吸收强度的变化。说明魔芋葡甘聚糖聚集态中不含高度有序的结构, 乙酰基对高级结构有重要影响。初步讨论了这些变化分别与魔芋葡甘聚糖的溶胀、不可逆凝胶食品形成机理、凝胶食品中钙的解析以及魔芋精粉的阻溶作用等性能可能存在相关性。

关键词: 魔芋葡甘聚糖; 园二色性; 构象转变; 性能

Primary Study on Relativity between Circular Dichroism and Food Nutriology Performance of Konjac Glucomannan

LI Bin, XIE Bi-jun*

(Food Science and Technology Institute, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Studied the influence of temperature, pH, Ca^{2+} , boron and congo red on circular dichroism of konjac glucomannan, the results showed that it brought a new cotton effect when in high pH, the rest mainly brought out the changes on absorption intensity in different extent. Therefore aggregation of konjac glucomannan included no quite ordered structure and acetyl had very important influence on aggregation structure. Discussed for preliminary step on the possible relativity between the changes of circular dichroism spectroscopy and swelling of konjac glucomannan, mechanism of irreversible gel food, resolution of calcium in gel food and anti-swelling character of konjac flour.

Key words: konjac glucomannan; circular dichroism; conformation transfer; food nutriology performance

中图分类号: TS2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)02-0076-04

园二色谱(Circular Dichroism Spectroscopy, CD)能够比较直观的显示不同条件下聚合物溶液空间构象变化规律, 在蛋白质、核酸、激素等构象研究中已经发挥了较大的作用, 它不仅可以为较清楚的揭示蛋白质的 α -螺旋、 β -折叠等高级结构, 还可以计算出其高级结构的部分参数, 逐渐成为天然高分子构象研究的重要手段之一^[1~5]。

相对于蛋白质的 CD 研究, 多糖在这方面涉及极少, 获得的信息和经验也远远不够。尽管如此, 张丽萍和张翼仲^[6,7]、缪平和贺峰等^[8]、周义发和杨庆尧^[9]等利用 CD 这一有力的分析手段对金顶侧耳多糖、阿拉伯半乳糖、裂褶菌多糖等多糖进行了初步探讨, 都获得了一些有用的新信息。

魔芋葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM)是近年来研究较多的一种多糖, 作为一种优良的水溶性膳食纤维, 在减肥、降脂、排毒、补钙等方面的报道较多^[10~12], 还有研究显示, KGM 的某些食品营养学特性和其溶液中立体结构关系密切, 当其均方根半径大于 100 nm 时, 才可以抑制血中胆固醇上升^[13]。因此, 探讨 KGM 在溶液中的空间构象以及在不同环境因素下的构象转变, 对于深入研究其营养学和食品学特性具有重要的基础作用。

本文通过几种环境因素对 KGM 园二色性的影响, 研究了 KGM 溶液中的立体结构变化。选择的几种环境因素(温度、pH、钙离子等)是在魔芋膳食纤维食品等加工和吸收过程中典型出现的, 本文试图将此作为溶液行为的

收稿日期: 2003-05-28

* 通讯联系人

作者简介: 李斌(1972-), 男, 博士, 主要从事食品化学及天然产物化学研究。

微观基础, 探讨构象转变与宏观的性能表现相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

魔芋精粉由湖北省恩施楚业魔芋食品厂提供, 来源于魔芋属花魔芋(*Amorphophallus konjac K.Koch*), 其1%水溶胶粘度为15 Pa·s, 其它试剂均系分析纯。

1.2 KGM 的分离纯化

称取10g魔芋精粉, 用50% (V/V, 下同) 乙醇(含0.1%的叠氮钠以抑制葡甘聚糖酶水解)50ml洗涤3次, 每次均在搅拌下进行30min, 自然干燥后, 以50ml无水乙醚/无水乙醇(2:1)在40℃下搅拌8h脱脂, 脱脂样品以蒸馏水配成0.6% (W/W, 下同) KGM溶胶, 在超速冷冻离心机(HIMAC CENTRIFUGE, HITACHI)下, 16000r/min离心20min后取上清液, 以Sevag法脱蛋白, 重复5次, 依次用40%、60%、80%沉淀, 收集沉淀经真空冷冻干燥(Alpha-Z, Germany)得到白色粉末样品。HPLC法测得KGM含量98.37%, 微量凯氏定氮法测得总氮0.03%, $[\alpha]_{D}^{25} = 5.16^{\circ}$, 0.06%水溶胶的电导率1.9ms/m。

1.3 CD 测定

KGM配制成0.1%的浓度, 置于0.2mm的石英池中; 20℃下采用Jasco-500c圆二色谱仪测定。波长范围170~350nm, 温度控制使用仪器程序升温系统, 每个温度下的平衡时间为15min, 所有CD数据均经过3次扫描平均。且曲线经10点算术平滑, 同步采集的吸收光谱数据未进行任何算术平滑处理。

2 结果与讨论

2.1 温度对KGM的CD谱的影响

图1分别显示了25、65、95℃定温溶解KGM水溶液的CD谱, 其吸收特性列于图2, 在176~177nm区间呈现强负Cotton效应, 并随溶胀温度的增加分子间氢键相互作用减弱, 摩尔椭圆率也相应减小, 右圆偏振光

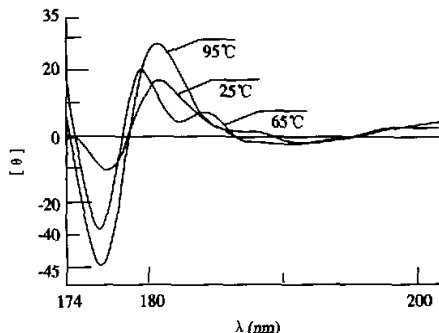


图1 温度对KGM的CD谱的影响

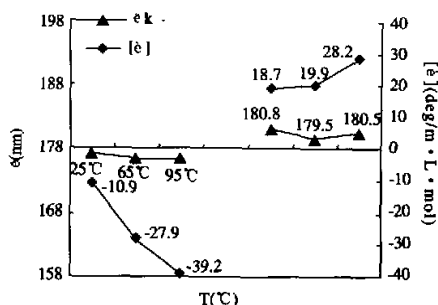


图2 温度对CD谱吸收特性的影响

相对增强, 177.1nm峰蓝移。而在179~181nm呈现强正Cotton效应, 随其溶胀温度的变化规律与负cotton效应区恰好相反, 随温度升高, 摩尔椭圆率增加, 左圆偏振光相对增强, 180.8nm峰也略向蓝移。此结果显示高温下溶胀的KGM具有更强的光学活性, 产生这一现象的原因可能是高温溶胀导致聚集态结构的解聚及氢键作用减弱而导致的KGM非对称性立体结构增强。有趣的是: 在65℃下溶解的KGM水溶液在184.3nm处出现一个新的正吸收, 说明在该温度溶胀时, 存在光学活性或聚集态结构上的突变点。

为了进一步研究温度对KGM高级构象的影响, 在定温溶胀的基础上, 进一步利用程序升温、降温考查KGM CD谱的温度效应, 得到图3, 程序升温过程中, 正Cotton效应增加, 与图1一样, λ 位置均在177.3~180.6nm, 基本没有变化, 未出现新的吸收, 表明KGM在溶液中不存在高度有序的结构, 吸收峰的强度变化说明KGM在溶液中仍存在分子间的不同聚集, 但相对有序程度较高的多糖^[7], 无论是摩尔椭圆率还是吸收峰的位置的变化均很小, 因此聚集态可能是通过主要通过氢键相互作用形成相同趋势的无规松散聚集。

在程序升温后降温至40℃的吸收谱在35℃和55℃两条吸收之间, 表明KGM的无规松散构象在升温降温过程中发生的是可逆的变化, 降温后又重新恢复聚集态。在程序升温中同样出现了图1中出现的现象, 即55℃下在185.3nm处出现一个正吸收峰, 表明KGM在55℃~65℃

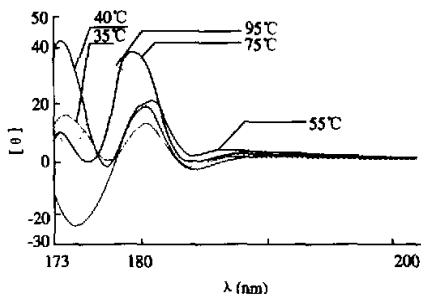


图3 KGM CD谱的温度效应

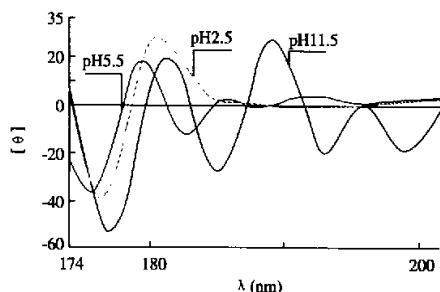


图4 pH对KGM的CD谱的影响

左右范围内聚集态的结构有一突变过程,这与疏水相互作用随温度升高而加强有关,一般在60℃达到最大值,而后随着温度的升高又降低,从KGM在溶液中CD谱的温度效应同样可以说明温度对疏水相互作用的影响规律。

许时婴和钱和^[14]、冲增哲^[15]等均报道KGM溶胀行为中,存在着温度的转变点,前者认为溶胀动力学最高点在70℃,并以活化能进行了解释;后者认为转变点在50~60℃,也从熵的角度进行了探讨,本实验得到的转变温度为55~65℃左右,与文献的报道相符,KGM在溶液中的构象和分子间聚集结构的转变可能是这种溶胀行为的微观原因。

2.2 pH对CD图谱的影响

不同pH条件下KGM的CD图谱差异较大(图4),pH2.5时KGM的吸收图谱与自然pH条件(pH5.5)相近,只是182.1nm处的一个负Cotton效应消失,而在pH11.5的碱性条件下,出现了类似正弦波的CD谱,在189.2nm出现强正Cotton效应,在185.3、193.4、198.1nm处出现了负Cotton效应,

以上变化为魔芋精粉在中性及酸性条件下稳定,而在碱性条件下发生凝胶的食品学特性提供了一种新的理论解释,即在溶液行为方面可以解释为,在酸性及中性条件下的性能的相对稳定在于分子构象和聚集体结构的相对稳定,而在碱性条件下凝胶的形成则是由于KGM分子脱去乙酰基后其构象发生了显著变化,导致聚集态结构由无序向有序聚集发展,可以佐证前期^[16,17]在IR、XRD、DSC、TEM、AFM等方面的研究。

2.3 刚果红实验

中性多糖因其在紫外区较难提供结构信息,所以常可以采用外源性cotton效应试剂探讨分子的不对称性,刚果红试剂常用于研究多糖是否存在螺旋结构,当具有螺旋结构的多糖和刚果红结合,常产生紫外吸收的红移现象^[18],KGM的刚果红实验CD谱见图5,结果仅产生1.3nm红移,正Cotton效应摩尔椭圆率增加约23.8%,具有螺旋结构的树舌多糖出现4个新的吸收峰,红移

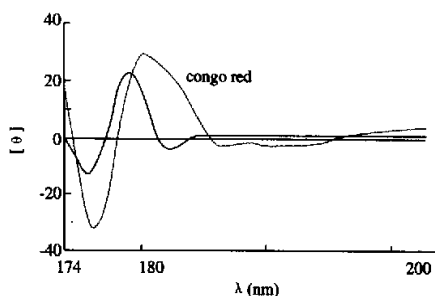
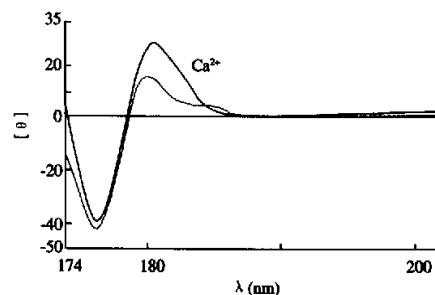


图5 KGM的刚果红CD谱

图6 Ca²⁺对KGM CD谱的影响

30~40nm;裂褶菌多糖红移约10nm,由此说明KGM不具有螺旋结构。

2.4 Ca²⁺对KGM CD谱的影响

某些金属离子尤其是碱土金属离子通过配位作用对多糖的结构造成显著影响,如Ca²⁺能够和海藻胶形成所谓的蛋箱型结构,因而能够显著的改变多糖的立体构象^[19],因此通过添加金属离子于多糖溶液中,检测其CD谱的变化可能提供某些结构信息。在KGM溶液添加Ca²⁺前后的CD谱除吸收强度稍有区别以外,正cotton效应增加,但吸收位置基本一致(图6),说明Ca²⁺与KGM能够发生某种相互作用,但作用较弱。

钙是魔芋食品中被唯一利用的营养素,永山等^[15]从食品营养学的角度对该项目进行过长期的研究,认为魔芋凝胶内的钙结合缓慢而易于游离,但有利于增加凝胶的强度,与本研究在溶液行为中构象转变的表现是一致的。然而,与前面的研究一样,食品营养学的宏观性能和分子对称性得到的圆二色性的精确相关性,尚待进一步深入研究。

2.5 硼对KGM的CD谱的影响

硼是多羟基化合物常用的交联剂之一,也可用作工业用魔芋精粉的阻溶剂,利用圆二色谱研究了硼与KGM的交联作用,如图7所示,硼同时提高了KGM的正Cotton效应和负Cotton效应,且以负cotton效应明显,176.2nm处的摩尔椭圆率增加近2.5倍,右旋偏振光相对增强,这可能是硼选择性的作用于甘露糖C₂、C₃

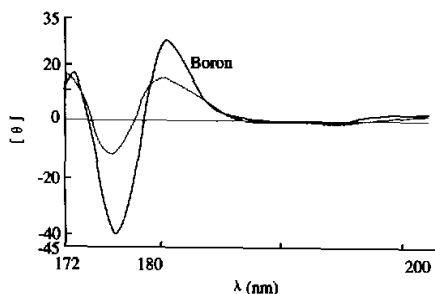


图7 硼对KGM CD谱的影响

位或在分子间发生配位(或桥接)^[18],造成分子不对称性增加所致,但整个分子的柔性变化较小,因而正、负 Cotton 效应的最大吸收位置基本未变,这与碱性条件下脱乙酰不一样。KGM 溶胶达到一定浓度以上,可以和硼通过配位形成凝胶,也可以在碱存在的条件下形成凝胶,由图4和图7的CD谱容易得到:这两种凝胶形成的机理和凝胶结构显然不同,前者对热、对酸不稳定,而后者由于分子间强烈的相互作用和精密缠结的三维网络,分子的高度刚性结构,使之显著的增加了凝胶的不对称,从而不易受温度和氢离子效应的影响。

3 结论

3.1 温度、pH、金属及非金属离子和外源性有序结构刚果红试剂等环境因素对KGM溶液的空间构象均有不同程度的影响,除高pH条件下因脱乙酰基而引起多糖结构变化导致新的cotton效应外,其余影响是吸收强度的变化。表明KGM聚集态中不含高度有序的结构,其乙酰基对KGM的高级结构有着重要影响。

3.2 55~65℃时新的正吸收、pH11.5时CD谱的剧烈变化、Ca²⁺对吸收强度的影响可能分别与KGM溶胀行为70℃(或50~60℃)附近的转变点、不可逆凝胶食品形成机理、凝胶食品中钙的解析作用具有密切关系。硼对KGM CD谱的影响可以部分解释可逆凝胶的形成及对魔芋精粉的阻溶作用。

3.3 KGM食品学性能和圆二色性的精确相关性,尚待进一步深入研究。

参考文献:

[1] ZHANG X F, GONG Y D, ZHAO N M, et al. Circular dichroism analysis of the effect of metallic ions on structure of collagen molecules[J]. Tsinghua Science and Technology,

1997,(1):12-17.

- [2] DU H N, DING J G, CUI D F, etc. Novel Secondary Structure of Calcitonin in Solid State as Revealed by Circular Dichroism Spectroscopy[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2002,(7): 456-461.
- [3] 彭朝晖,苏成芝. 精胺和Mg²⁺对tRNA(Ile)圆二色谱的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1994,(2):23-27.
- [4] 曾宪纲,公衍道,沈子威,等. 人参皂甙引起的人红细胞膜蛋白构象变化的圆二色谱研究[M]. 清华大学学报(自然科学版), 1994,(3):33-36.
- [5] 涂华民,李勇,杨燕生,等. 钕和铜离子对tRNA圆二色谱的影响[M]. 无机化学学报, 1999,2:12-18.
- [6] 张丽萍,张冀伸. 金顶侧耳多糖及其化学修饰产物水溶液构象的圆二色谱测定[J]. 生物化学杂志, 1994,10(5):633-636.
- [7] 张冀伸. 多糖的构象研究[J]. 东北师大学报, 1998,(2):55-60.
- [8] 缪平,贺峰,金声. 罂粟花粉中阿拉伯半乳糖糖的结构及圆二色性的研究[J]. 高等学校化学学报, 1994,(3):123-127.
- [9] 周义发,杨庆尧. 裂褶菌多糖的构象研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995,22 (1):53-56.
- [10] 茅彩萍,徐乃玉,顾振纶. 魔芋精粉对四氧嘧啶糖尿病大鼠的降糖作用[J]. 中国现代应用药学, 2001,(3):14-18.
- [11] 杨艳燕,高尚,王慧平,等. 魔芋低聚糖降低糖尿病小鼠血糖和胆固醇效应的研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2001,(3):37-40.
- [12] 陈黎,杨艳燕,闫达中. 魔芋低聚糖降脂作用的初步研究[J]. 中国生化药物杂志, 2002,(4):57-61.
- [13] 冲增哲[日], 吴万兴. 魔芋甘露聚糖对胆固醇及中性脂肪代谢的影响[J]. 陕西林业科技, 1999, (1):45-49.
- [14] 许时婴,钱和. 魔芋葡甘露聚糖的化学结构与流变性质[J]. 无锡轻工业学院学报, 1991,10(1):1-12.
- [15] 冲增哲[日]. 魔芋科学[M]. 重庆:重庆食品工业研究所, 1987.95-98.
- [16] 李斌,谢笔钧. 魔芋葡甘露聚糖凝胶机理研究[J]. 中国农业科学, 2002,(11):45-49.
- [17] 李斌,谢笔钧. 脱乙酰基对魔芋葡甘露聚糖的构象转变影响[J]. 功能高分子学报, 2002,(6):67-70.
- [18] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994.337-338.
- [19] Lees D A. Polysaccharide Shapes[M]. Chapman and Hall, Science Press, 1977.77-91.