

二糖对丙三醇水溶液反玻璃化行为影响

张明珂，高才

(合肥工业大学汽车与交通工程学院，合肥市 230009)

(Tel: 13721029540, Email: gaocai@hfut.edu.cn)

摘要: 玻璃化保存过程中，复温过程中的冰晶生长往往比降温过程中的冰晶对细胞造成的伤害更大，寻找有效的冰晶抑制剂是人们长期以来的努力方向。本文利用低温显微镜，系统考察四种二糖（蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖）对60%的丙三醇水溶液的反玻璃化行为的影响，重点考察成核率和冰晶生长速率的差异。结果显示，这几种糖都能某种程度上限制冰晶成核及生长。有趣的是，在抑制降温结晶时被证实最有效的海藻糖，在抑制反玻璃化结晶方面的效果反而不如蔗糖。相同条件下，仅从降低反玻璃化冰晶损伤的角度考虑，我们推荐使用蔗糖而非海藻糖作为玻璃化溶液的组分之一。

关键词: 低温保存；反玻璃化；二糖；冰晶；甘油

Influence of Disaccharides on Devitrification Behaviors of Glycerol Aqueous Solution

Mingke Zhang Cai Gao

(School of Automobile and Transportation Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

Abstract Upon analysis of the cryopreservation process, it has been determined that one of the major causes of cell death is actually ice recrystallization (growth) during the thawing process, rather than cell death during freezing. Reliable quantification of the ice recrystallization inhibition efficiency is a long-sought goal. In the present study, the influence of four disaccharides (trehalose, sucrose, maltose and lactose) on the devitrification behaviors of glycerol aqueous solutions (60% w/w) was investigated by using cryomicroscopy. Results showed that all the four disaccharides can inhibit the nucleation and growth of ice crystals during devitrification. Interestingly, sucrose seems to be the most effective one to inhibit the nucleation and ice growth. While trehalose, which was improved to be a good ice inhibitor during freezing, only shows discounted ice inhibiting ability during devitrification. Our results indicate that sucrose may be used as an effective ice inhibitor to decrease the ice injury caused by ice growth during devitrification.

Keywords Cryopreservation, Devitrification, Disaccharides, Ice crystal, Glycerol

0 前言

玻璃化低温保存中，玻璃化溶液配方的选择至关重要。降温过程中，冰晶成核后温度的进一步降低使冰晶失去生长的条件，而复温到玻璃化温度以上，随着水分子活动性的增加，这些晶核开始长大，即所谓的反玻璃化现象。许多研究已经证实，反玻璃化对细胞或胚胎的损伤比降温冰晶造成的损伤更为致命，需要严格控制。从动力学角度，采用快速升温是一种可选方案，但对于稍大体积的样品，快速复温并非易事。而寻找有效的反玻璃化冰晶抑制剂是另一种可选方案。抗冻蛋白、纳米颗粒¹、人工聚合物（如PVA）²等都被人们广泛尝试。二糖作为传统的冻干保护剂应用广泛，其中又以两种非还原糖（蔗糖和海藻糖）最为常见。在干燥保存领域，海藻糖被誉为“生命之糖”。在抑制水溶液降温过程中的冰晶的生长方面，Sei³等的研究证实海藻糖比蔗糖更为有效，但二糖对反玻璃化过程的结晶的抑制效果至今还不清楚。为此，本文选择了四种常见的二糖，包括蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖，利用低温显微镜考察它们对反玻璃化过程的影响。反玻璃化模型系统选用质量浓度为60%的丙三醇水溶液，其典型的反玻璃化行为已经被文献和我们早期的工作证实。

1 实验

蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖均为Sigma公司分析纯试剂，未经进一步纯化直接使用。丙三醇为国产分析纯试剂，用去离子水配置成质量浓度为60%的水溶液作为母液，在此基础上添加0~5w/w的二糖形成二元或三元水溶液备用。低温显微镜系统参见前期工作⁴，其采集视频的温度程序如下：先以80°C/min降温至-130°C，再以不同的升温速率（5、10、50°C/min）升温至-72°C等温结晶。每个实验重复5次并做误差分析。

2 结果与讨论

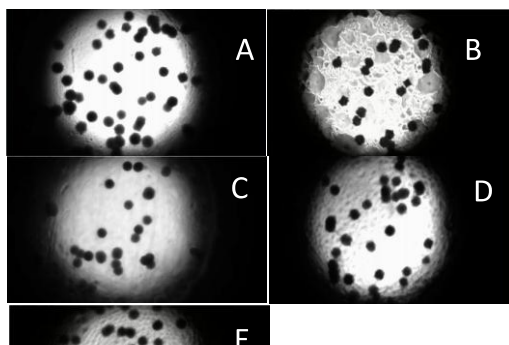


图1 添加不同二糖的甘油水溶液反玻璃化过程成核率低温显微图。A-E分别是：未加二糖、蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖

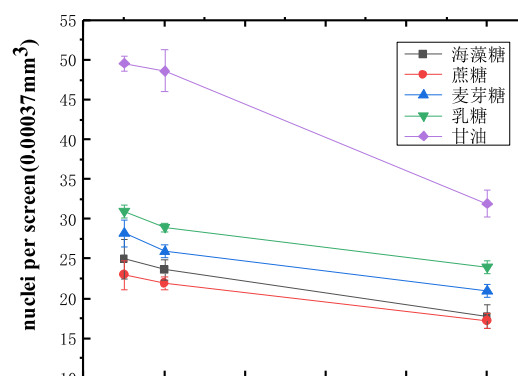


图2 不同升温速率下添加不同二糖（2%w/w）的甘油水溶液反玻璃化过程成核率

图1给出成核率统计的典型图示。图2给出不同升温速率下二糖的加入对丙三醇水溶液成核率的影响。图3和图4则分别给出反玻璃化过程中枝状冰晶生长显微图片及速率对照。从图1和2可以看出，二糖的加入能显著降低成核率。其中成核率最低的是添加蔗糖的溶液，其次是海藻糖，而乳糖是四种二糖中抑制成核效果最差的。在降温速率一致的情况下，不同的升温速率得到的成核率并不相同，升温速率越快，成核率越低，这表明冰核并不都是在降温过程中形成，升温过程有部分冰晶形成且受升温速率影响。值得注意的是，抑制成核效果好的二糖，其对应溶液的冰晶的生长速率也小。所有溶液中的冰晶都是枝状冰晶，半径方向的生长速率随时间都不变化，即都是线性生长。

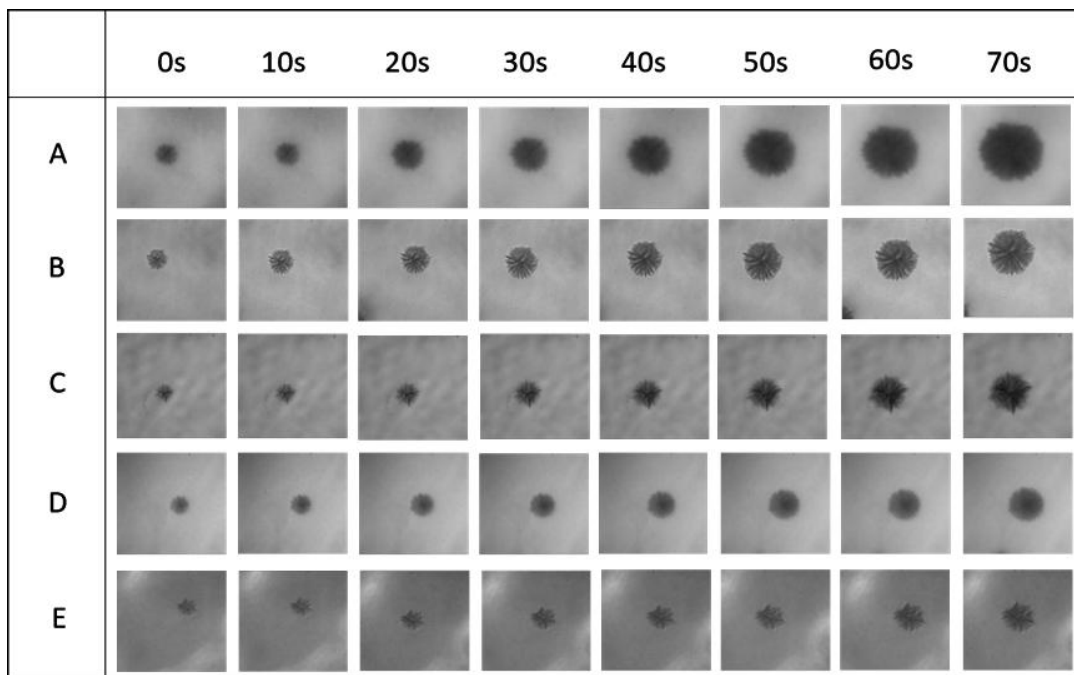


图3 添加不同二糖 (2%w/w) 的丙三醇水溶液反玻璃化过程中冰晶生长速率对照显微镜图。A-E 分别是：未加二糖、加蔗糖、加海藻糖、加麦芽糖、加乳糖。图片宽度均为 20 μ m。

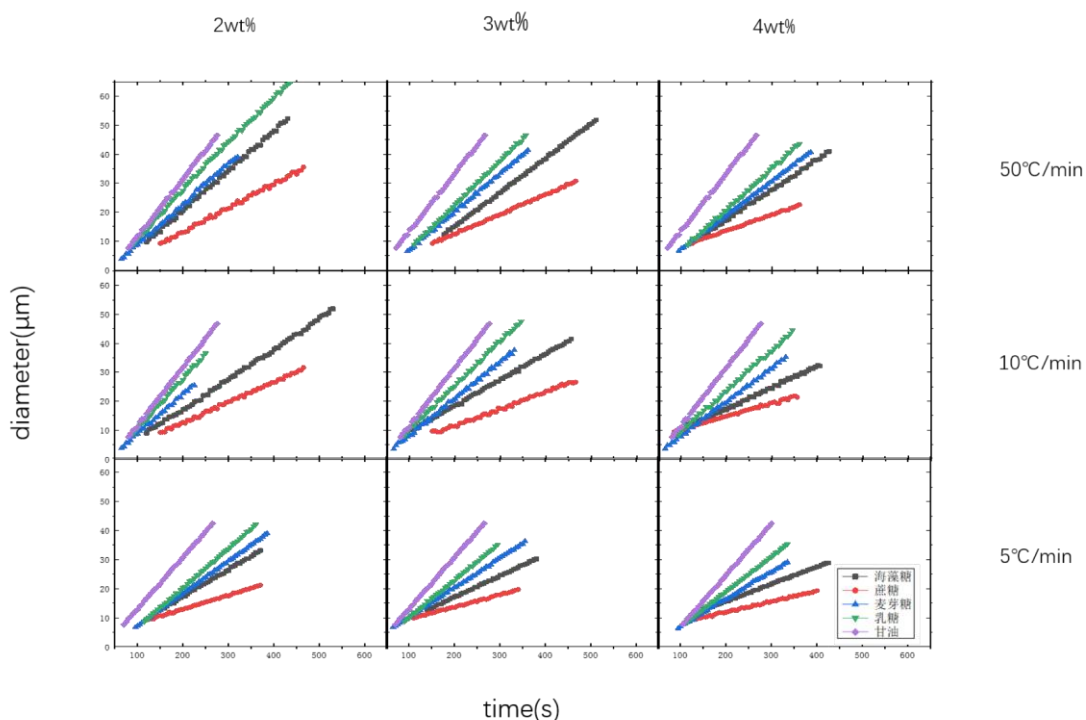


图4 添加不同二糖 (2%w/w) 的丙三醇水溶液反玻璃化过程中枝状冰晶在-72 $^{\circ}$ C等温生长时半径与时间的关系

对于二糖的浓度为 1%w/w 的情形，由于成核率和生长速率较未添加的情形差异不明显，因此图 4 未给出相关数据。对于完全抑制冰晶成核的二糖浓度，几种糖差异不大，都在 4.5%w/w 左右。需要说明的是，乳糖的溶解度差，在浓度 4%左右即出现长时间难以溶解的情况。考虑到其抑制成核与生长的效果也差，有理由怀疑这种糖与水的氢键作用不及其他几种糖类。蔗糖和海藻糖都是非还原性糖，而麦芽糖和乳糖是还原性糖，在抑制反玻璃化效果方面，显然两种非还原性糖的效果较还原性糖好。在低浓度范围，糖的加入

可能会增加结晶的速率，超过这个浓度，结晶速率才会收到抑制⁵。在本文的浓度范围内，三元系的氢键相互作用异常复杂，目前还缺乏相关实验数据。传热传质方面，对于纯的水溶液，结晶属于传热控制。但对于浓度高的溶液，主要收到传质控制，即扩散系数⁶。有研究表明，对于浓缩糖溶液的再结晶的速率显示，水的自扩散系数能显著影响晶体的生长速率⁷。因此，有理由相信，二糖分子构象的差异，导致与水的氢键作用的差异，最终影响了对水分子的束缚能力，导致水分子扩散至晶界面的速率不同，从而影响枝晶的生长速率。需要说明的是，本文仅仅是从冰晶的成核率和生长速率方面考察了差异性，还缺乏机理分析方面的实验。今后的工作中，可以采用分子动力学模拟和 NMR 等手段考察这种差异产生的原因。

参考文献

- [1] Lv, F.; Liu, B.; Li, W.; Jaganathan, G. K., Devitrification and recrystallization of nanoparticle-containing glycerol and PEG-600 solutions. *Cryobiology* 2014, 68 (1), 84-90.
- [2] Wang, H. Y.; Inada, T.; Funakoshi, K.; Lu, S. S., Inhibition of nucleation and growth of ice by poly(vinyl alcohol) in vitrification solution. *Cryobiology* 2009, 59 (1), 83-9.
- [3] Sei, T.; Gonda, T.; Arima, Y., Growth rate and morphology of ice crystals growing in a solution of trehalose and water. *Journal of Crystal Growth* 2002, 240 (1-2), 218-229.
- [4] Li, L.; Chen, Z.; Zhang, M.; Panhwar, F.; Gao, C.; Zhao, G.; Jin, B.; Ye, B., Cell membrane permeability coefficients determined by single-step osmotic shift are not applicable for optimization of multi-step addition of cryoprotective agents: As revealed by HepG2 cells. *Cryobiology* 2017, 79, 82-86.
- [5] Shimada, W.; Furukawa, S., Rapid growth of ice crystal dendrite tips in dilute solution of trehalose. *Journal of Crystal Growth* 2018, 493, 25-29.
- [6] Kapembwa, M.; Rodríguez-Pascual, M.; Lewis, A. E., Heat and Mass Transfer Effects on Ice Growth Mechanisms in Pure Water and Aqueous Solutions. *Crystal Growth & Design* 2013, 14 (1), 389-395.
- [7] Hagiwara, T.; Hartel, R. W.; Matsukawa, S., Relationship between Recrystallization Rate of Ice Crystals in Sugar Solutions and Water Mobility in Freeze-Concentrated Matrix. *Food Biophysics* 2006, 1 (2), 74-82.