

斜顶菌水溶性多糖的构象研究*

梁忠岩 张翼伸

(东北师范大学生物系, 长春)

根据光散射法与粘度法对斜顶菌 (*Glitopilus Caespitosus* PK) 多糖在水中与在二甲亚砷中的分子量所进行的对比测定 (3:1) 以及由多糖水溶液可与刚果红形成络合物的实验结果, 推测此多糖在水中是三股螺旋构象, 而在DMSO中是单股螺旋。在H₂O—DMSO混合溶剂体系中, 体积分数φH₂O降至0.18后, 三股螺旋解体为单股螺旋, 这种解离具有可逆性。变性剂如脲、酸、碱与高温等条件均因破坏氢键而影响构象的变化。用X射线粉末衍射, 确定多糖具有规整有序并有重复性的空间结构。

关键词: 斜顶菌; 葡聚糖; 构象。

多糖同蛋白质、核酸等其它生物大分子一样, 具有复杂的空间结构, 多糖链的折迭研究是相当困难。在溶液中柔弯的多糖分子在折迭上有一定的变化发生, 最多仅能得到一平均的分子形状。多糖单晶尚难于用X射线衍射研究清楚, 仅少数多糖可以定向拉成纤维。我们分离提纯的斜顶菌 (吉林省伊通县产) 多糖^[1] 是一葡聚糖, 它具有β(1→3)连接的葡萄糖残基组成的主干, 及单一的β(1→6)连接的葡萄糖残基侧链的一级结构 (如 Fig.1), 其物理性状为纤维状。从其一级结构和物理性状看, 它与 Schizophyllan^[2] Lintian^[3] Scleroglucan^[4] 有相似性, 估计该多糖也同样具有规整的多股螺旋构象, 为此我们对斜顶菌多糖在溶液中及固态时的构象进行了一些研究。

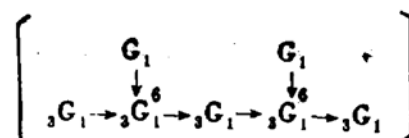


Fig. 1 Repeating unit of the glucan
G = Glucopyranose residue

材 料 与 方 法

一、材料 本室分离提纯的纤维状斜顶菌多糖^[1], 二甲基亚砷 (DMSO), 脲素皆为分析纯, 北京化工厂产。标准分子量葡聚糖为美国 Sigma 化学公司产品。刚果红为国产分析纯。

本文于1984年11月13日收到。

* 中国科学院科学基金资助项目。

二、仪器与方法

1. 分子量测定

(1) 光散射法 用日本岛津光散射仪,按 Norisuye^[2]等及钱人元等^[16]所述方法(按前后向 45° , 135° 散射不对称法测定与计算),测定样品在水中和 DMSO 中的重均分子量 \overline{M}_w 。

(2) 粘度法 以进口标准分子量葡聚糖46.1万, 8.16万, 及200万为标样,测得水溶液中: $k=1.82 \times 10^{-7} \text{ml/mg}$, $a=1$; DMSO 溶液中: $a=1$, $k=1.38 \times 10^{-7} \text{ml/mg}$ 。按公式: $[\eta]=KM^n$ 计算分子量。

2. 刚果红实验:

按文献[5]所述方法,以国产721分光光度计测斜顶菌多糖-刚果红络合物。在0—0.5M NaOH浓度下最大吸收波长的变化(以纯刚果红溶液为对照,手控波长扫描)。

3. 粘度测定 以乌氏四球毛细管粘度计,按常规方法测定。

4. 比旋测定 以国产WXG-6型自动旋光仪(钠灯光源),1dm管,室温下测定。

5. pH测定 以国产PHS-2型酸度计,于室温下测定。

6. 光学显微镜及电子显微镜观察

(1) 光学显微镜观察 以日本Olympus显微镜400倍下观察多糖纤维,并照像。

(2) 电镜观察 以日立H-600型电镜按文献[6]方法,将多糖悬液在支持膜上制膜,以磷钨酸盐染色,进行比较观察。

7. X射线衍射 以日本理学2437型X射线衍射仪,平板相机照像,按文献[4]条件,由吉林省化学纤维所协助测定。

结果与讨论

一、在水溶液中具有三股螺旋结构

贮藏多糖,大都取空心螺旋, $\beta(1 \rightarrow 3)$ 键连接的 β -D-吡喃糖会产生空心螺旋型的链^[7]。近年的研究已指出 $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-葡聚糖几乎大多是三股螺旋结构,相似于 $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-木聚糖^[8, 15]。

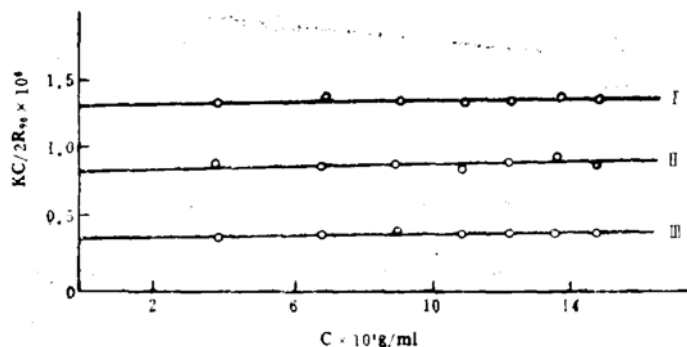


Fig. 2 Light-Scattering envelopes for the glucan sample in water

I — $KC/2R_{90} \times 10^6 \sim C$

II — $C/(s-s_0)_{45^\circ} \times 10^2 (\text{g/ml}) \sim C$

III — $C/(s-s_0)_{135^\circ} \times 10^2 (\text{g/ml}) \sim C$

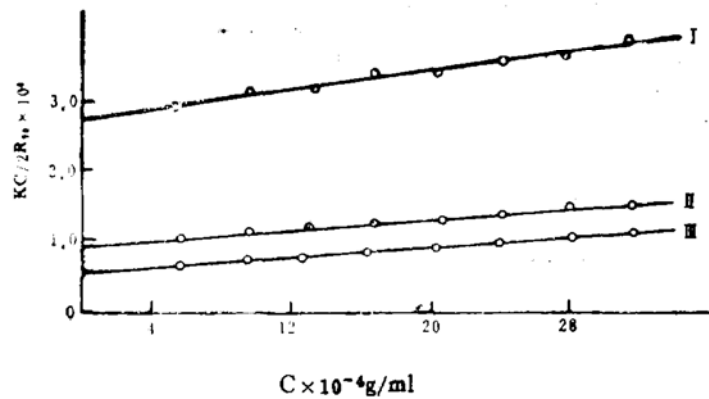


Fig. 3 Light-Scattering envelopes for the glucan sample in DMSO
 I— $KC/2R_{90} \times 10^6 \sim C$ II— $C/(S-S_0)_{45^\circ} \times 10^2 (g/ml) \sim C$
 III— $C/(S-S_0)_{135^\circ} \times 10^2 (g/ml) \sim C$

1. 斜顶菌多糖在水中的分子量与在二甲亚砜中的分子量之比是3:1。

用光散射法测得斜顶菌多糖在水中和二甲亚砜 (DMSO) 中的分子量分别为168万和55.7万。如Fig. 2和Fig. 3。另用粘度法测得两种溶剂中的分子量分别为152万与50万。两种方法测定的结果都表明斜顶菌多糖在水溶液中分子量是在DMSO中的三倍, 而多糖在DMSO中是不会发生降解的, 根据这一事实可推测斜顶菌多糖分子在水溶液中为三股螺旋构象, 而在DMSO中则可能为单股螺旋构象。

2. 斜顶菌多糖可与刚果红形成稳定的络合物。

斜顶菌多糖与刚果红结合后, 在0—0.5N NaOH范围内, 表现为最大吸收波长的特征变化。刚果红被络合后变成紫红色。如Fig. 4。当NaOH浓度高于0.28M后, 最大吸收的波长急骤下降到与对照相同。这种特征变化与Chihiro Hara^[5]等人所观察的 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 葡聚糖情况相同。这表明在中性、弱碱性范围是一有序的单股螺旋, 在强碱性条件下则解体为单股, 不能与刚果红形成络合物。

二、构象的转变

斜顶菌多糖在水中比在DMSO中有高得多的粘度, 这可能是由于三股螺旋比单股螺旋在结构上相对伸展, 密度较小所致。在水与DMSO的混合溶剂中可观察到三股螺旋转变为单股螺旋的构象变化。如Fig. 5所示, 以0.5mg/ml多糖水溶液为起始溶液, 以等浓度该多糖的DMSO溶液调节体积分数 ϕ_{H_2O} , 测不同 ϕ 值下的比旋 $[\alpha]_D$ 与比浓粘度 η_{sp}/c , 结果表明 ϕ 值减至0.18以前, $[\alpha]_D$ 与 η_{sp}/c 无明显变化, 而当 ϕ_{H_2O} 自0.18继续减少时, η_{sp}/c 急剧减少, 而 $[\alpha]_D$ 显著升高, 两种变化均以 $\phi_{H_2O} = 0.18$ 为突变点, 据此可以判定此时发生了由三股螺旋向单股螺旋的构象转化。实验结果同时表明, 原处于DMSO中的单股螺旋在

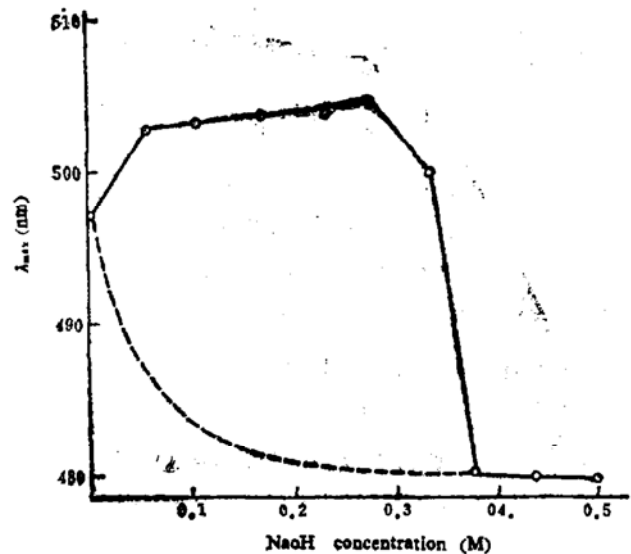


Fig. 4 Change in the absorption maximum of the Congo Red-glucan complex —o—o— The Congo Red-glucan complex-----Congo Red.

$\phi_{H_2O} > 0.18$ 的混合溶剂中可转为三股螺旋, 使 η_{sp}/c 在此范围内保持稳定, 即以上构象的变化是具有可逆性的互变。至于 $[\alpha]_D$ 的骤增, 则可能是由三股螺旋解体形成单股螺旋, 增加了多糖分子的空间不对称性^[9] 所致。

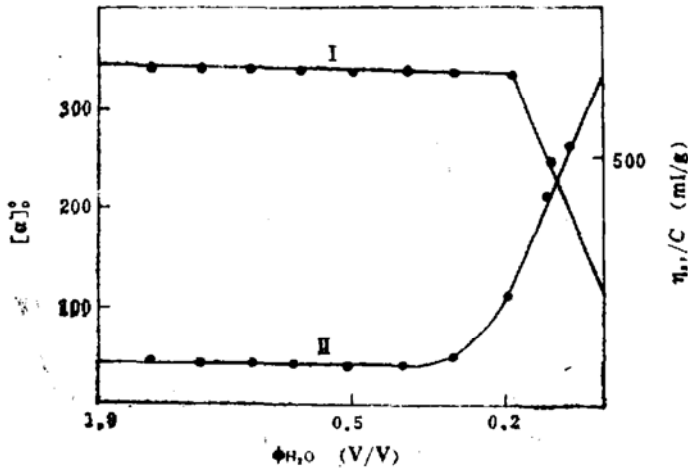


Fig 5 Composition dependence of reduced viscosity and specific rotation for the glucon sample in H₂O- DMSO mixture.
I. $\eta_{sp}/c \sim \phi_{H_2O}$; II $[\alpha]_D \sim \phi_{H_2O}$

三、变性剂对多糖构象的影响

响

1. pH 对斜顶菌多糖水溶液构象变化的影响。

斜顶菌多糖构象的变化与 pH 的依赖关系, 已由刚果红络合物生成反映出来, 即在较高的碱性范围不能与刚果红形成络合物。另外, 在不同的 pH 范围, 多糖比浓粘度的变化也能反映多糖的构象变化。如 Fig. 6 表明多糖水溶液 (0.5mg/ml) 在中性或近中性范围内, η_{sp}/c 无变化, 偏酸、偏碱 η_{sp}/c 则下降, 其中酸性条件则更为显著。斜顶菌多糖与

其它多糖一样, 在溶液中靠氢键形成螺旋^[12-14] (有可能靠单糖残基间 2', 4' 羟基形成氢键)。在中性及弱碱性条件下氢键较稳定, 构象较稳定, 粘度无明显变化, 但当 pH 更高或较低情况下, 则维持三股螺旋的氢键乃至单股螺旋内部的氢键都可能受到破坏。构象由规整的三股螺旋解体为单股螺旋或进一步转为无规卷曲, 线团密度增加导致粘度下降; 至 pH 2.0 以后, 构象呈无规卷曲, 与 pH 的依赖关系就不明显了。

2. 温度、脲对斜顶菌多糖 DMSO 溶液构象变化的影响

斜顶菌多糖在 DMSO 中呈单股螺旋, 温度与变性剂脲影响其构象均很显著。如 Fig. 7 中 I 多糖的 DMSO 溶液 (0.052%) 与温度的关系, 温度升高至 45°C, 比浓粘度显著下降, 与 Southwick J. G.^[10] 所报道的 Xanthan 螺旋构象变化情况相似。另将斜顶菌多糖切去 1→6 分支 (用高碘酸盐氧化、还原、部分水解的方法切去分支) 后, 它变得不溶于水, 但进行同上实验, 温度与 η_{sp}/c 关系也有相类似的结果^[10, 11], 如 Fig. 8 中 I. 多糖的 DMSO 溶液经升温后 (<70°C), 再冷至室温, 仍可重复 η_{sp}/c 随温度变化实验的结果, 说明此类变性属可逆变性。

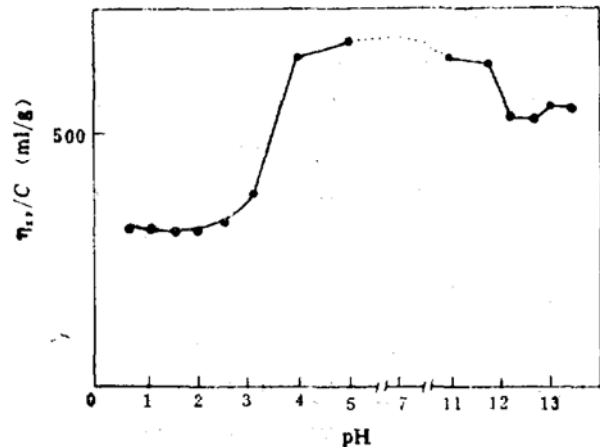


Fig. 6 Reduced viscosity (η_{sp}/c) of a water solution (0.5mg/ml) of the glucon as a function of the pH

用 4 M 脲 90°C 处理斜顶菌多糖的 DMSO 溶液 3 小时, 冷至室温后, 同土浓度测 η_{sp}/c 与

温度的关系,则看不到其间依赖关系 (Fig. 7 中 II), η_{sp}/c 基本上不随温度而变化,仅在高于60℃时有微弱升高。经脲及热处理后,多糖的 η_{sp}/c 较处理前有显著下降,显然是由于脲及热处理破坏氢键使有序构象变为无规卷曲所致。切去1→6分支后的斜顶菌多糖,同样用脲、热处理, η_{sp}/c 的下降更为明显 (Fig. 8 中 II), 这种差异反映出二者对变性剂敏感度不同。很可能,切去1→6分支后的多糖较有分支的多糖有更加规整的螺旋构象,因此,温度、脲所施加的影响后果,更较明显。

斜顶菌多糖在水中可能为三股螺旋构象,在DMSO中为单股螺旋构象。在破坏氢键的因素如高温、酸、碱、变性剂等的影响下,在不同程度上可以发生三股螺旋的解体变化与单股螺旋转变成无规卷曲的变化,其中大多表现为可逆的恢复,是可逆的变性。

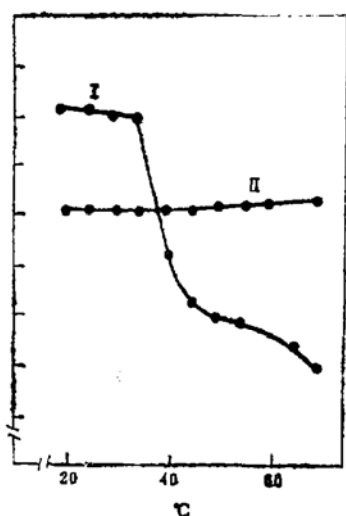


Fig. 7 Reduced viscosity (η_{sp}/c) of a DMSO solution (0.052%) of the glucan as a function of temperature
I—The glucan in DMSO solution
II—The glucan (treated with urea) in DMSO solution

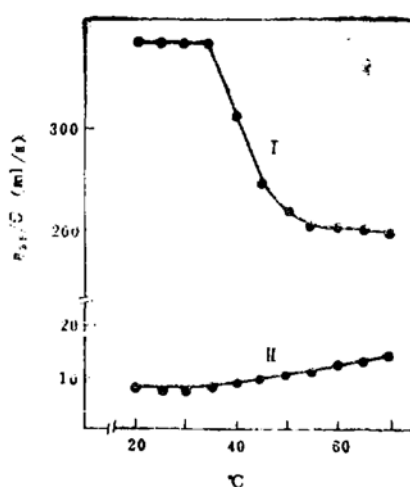


Fig. 8 Reduced viscosity (η_{sp}/c) of a DMSO solution (0.052%) of the glucan as a function of temperature
I—The glucan (no side chains) in DMSO solution
II—The glucan (no side chains and treated with urea) in DMSO solution

四、斜顶菌多糖的固态特征

上面讨论的是斜顶菌多糖在水及DMSO中的构象行为。

斜顶菌多糖不溶于醇,利用醇析的方法析出的多糖,经真空干燥后有纤维状的外形,并有一定的强度。我们对斜顶菌多糖的固态特征也作了光学显微镜、电子显微镜的观察和X射线粉末衍射分析。

1. 显微镜观察

取一条斜顶菌多糖纤维,在400倍光学显微镜下可观察到纤维束的扭转态 (Fig. 9)。

2. 电镜观察

取斜顶菌多糖水悬液进行电镜比较观察^[6],即用多糖溶液在4℃放置24小时后,在支持膜上电镜观察并拍照(6万倍),如Fig. 10。电镜观察到较均一较规整的粒子(用磷钨酸盐负染)。同一溶液4℃放置一周后,同上用多糖悬液电镜观察,晶体粒子增大为原来的400倍,如Fig. 11,表明相同的晶体粒子发生聚集。



Fig. 9 Photomicrograph (400 times) of the glucan fiber



Fig.10 Electron micrograph (6×10^4 times) of the glucan particle (Negatively stained with phosphotungstate)

3. X射线衍射

斜顶菌多糖X射线粉末衍射图如Fig.12。图谱分析如Table 1 所示。

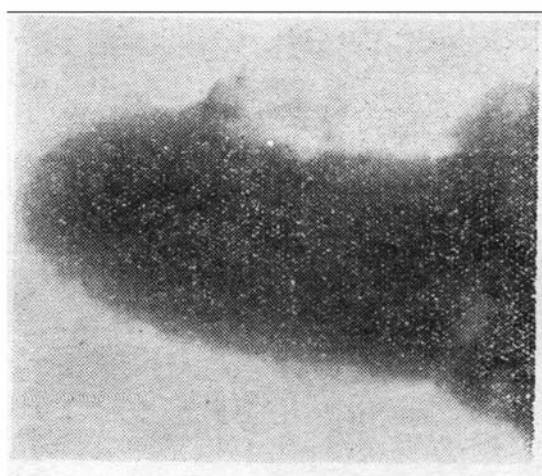


Fig.11 Electron micrograph (6×10^4 times) of the glucan (crystallized particle) (Negatively stained with phosphotungstate)



Fig.12 X-Ray diffraction of a specimen of powdered glucan

Table 1 X-ray Powder Diffraction Data of Polysaccharides From *Gliptotopilus Caespitosus* P.K.

Interplaner distance $d(\text{\AA})$	3.01	3.17	3.50	3.90	4.23	4.78
strength	very weak	moderate	weak	strong	strong	very strong

此图谱有多条规整衍射环,表明斜顶菌多糖分子内具有规则的重复性的空间结构^[6]。另外用甲酸部分降解此多糖,使其分子量降至1.5万,仅为原多糖的1/100。经DMSO取向及热处理后,再经X射线衍射,其衍射图谱与未降解者相同,虽经降解仍保持基本的结构单位,更表明具有规则重复性的空间结构的存在。

参 考 文 献

- [1] 梁忠岩,张翼仲(1983),高等学校化学学报,3,365—370.
- [2] Norisuye, T., et al. (1980), *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 18, 547—558.
- [3] Bluhm, T. L., and Sarko A. (1977), *Canad. J. Chem.*, 55, 293—299.
- [4] Bluhm, T. L., et al. (1982), *Carbohydr. Res.*, 100, 117—130.
- [5] Hara, C., Kiho T., Ukai S. (1983), *Carbohydr. Res.*, 117, 201—213.
- [6] Shirley, C. C., et al. (1983), *Carbohydr. Res.*, 113, 339—344.
- [7] Ree, D. A. 张志伟译(1977), 多糖形态, pp67, 47—48, 1982年科学出版社,北京.
- [8] Bluhm, T. L. and Sarko A. (1977), *Carbohydr. Res.*, 54, 125—138.
- [9] Van Holde, K. E. 郁贤章译(1971), 物理生物化学, pp232, 1978年科学出版社,北京
- [10] Southwick, J. G., et al. (1982), *Carbohydr. Res.*, 99, 117—127.
- [11] Sato, T., et al (1981), *Carbohydr. Res.*, 95, 195—204.
- [12] Casu, B., et al. (1966), *Tetrahedron*, 22, 3061.
- [13] Jacques, M. S., et al. (1978), *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 4386.
- [14] Senior, M., et al. (1973), *Biopolymers*, 12, 65.
- [15] Marchessault, R. H., et al. (1977), *Canad. J. Chem.*, 55, 300—303.
- [16] 钱人元等(1958), 高聚物的分子量测定, P.108—109, 科学出版社,北京.

CONFORMATION OF WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDE FROM
CLITOPILUS CAESPITOSUS PK.

Liang, Zhong-yan Zhang, Yi-shen

(Department of Biology, Northeast Normal University, Changchun)

The comparison of molecular weight of glucan specimen in water and in DMSO (3:1 times) , and the observation of the complex-formation with Congo red indicated that the β -D-glucan from *Clitopilus Caespitosus* PK. probably takes a triple helical conformation in water while it exist as a single helix in DMSO. The triple helix abruptly melts in to single helix when the ϕ_{H_2O} is decreased to 0.18 (V/V) in the H₂O-DMSO mixture. The dissociation is reversible.

The results from treatments with urea, acid, base or high temperature etc. indicated that all factors able to destroy the hydrogen bonds of the glucan may give influence upon its conformation. X-ray diffraction analysis shows that the solid state of glucan has an ordered and repetitive molecular structure.

Key words, *Clitopilus Caespitosus* PK., glucan conformation.