

# 根瘤菌 TISTR 386 胞外酸性多糖的结构研究

钱世钧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

雨村明伦 原田笃也

(日本大阪大学产业科学研究所)

根瘤菌 TISTR 386 胞外酸性多糖有二种九糖的重复单位构成。重复单位主要成份是 D-葡萄糖, D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸, 它们的克分子比例分别是 6:1:2 和 5:2:2。另外还含有一些丙酮酸和醋酸。甲基化分析表明, 这个多糖由一个(1→3)键, 一个(1→6)键, 三个(1→4)键, 一个(1→4, 1→6)键连结的葡萄糖残基, 一个(1→3)键连结的 D-半乳糖残基, 以及一个(1→3)键, 一个(1→4)键连结的 D-葡萄糖醛酸残基所组成。非还原末端糖残基是 D-葡萄糖或是带有丙酮酸的 D-半乳糖, 这也是二种九糖重复单位区别所在。

从土壤里分离出来的菌种 N<sub>1</sub> 能在以这种多糖作为唯一碳源的培养基里生长。从培养液里分离出来一种寡糖, 经成份分析表明是多糖的九糖重复单位。这说明菌种 N<sub>1</sub> 所产生的酶水解了邻近多糖分支葡萄糖残基的半乳糖基的(1→4)键而产生了直链的重复单位。

黄杆菌 M64 (*Flavobacterium* M64) 的(1→6)-β-D-葡聚糖酶把九糖的重复单位特异水解成二个寡糖, 即一个四糖和一个五糖。用甲基化分析测定出四糖的结构是: D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→3)-D-Gal。这个四糖似乎是多糖的骨架, 它的结构与粪产碱杆菌产粘变株 (*Alcaligenes faecalis* var *myxogenes*), 三叶草根瘤菌 (*Rhizobium trifolii* J60) 和许多苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 及土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 所产生的琥珀酸型葡聚糖类 (*Succinogluca*n) 的多糖的骨架相同。五糖的结构是多糖的侧链。

菌种 TISTR 386 也能在培养液里累积具有相同结构的九糖重复单位, 并发现有环状(1→2)-β-D-葡聚糖。

**关键词:** 根瘤菌; 多糖

根瘤菌属细菌往往是作为具有固氮功能的微生物材料来加以研究。它们一个明显的特征是产生高粘度的胞外多糖。目前, 许多研究者对胞外多糖的一级结构与它在宿主植物上的生物特性之间关系感到兴趣并开始进行了探讨。

根瘤菌 TISTR 386 能产生大量胞外多糖。它由 D-葡萄糖, D-半乳糖, 糖醛酸, 丙酮酸和 O-酰基所组成<sup>[1]</sup>。这种多糖结构似乎不同于以前报道的其他根瘤菌多糖的结构<sup>[2-6]</sup>。我们发现, 多糖是由二种九糖重复单位所组成, 这二种九糖重复单位

的差别只是非还原末端糖残基不同。菌种 TISTR 386 在以酵母膏为培养基里还能累积形成九糖重复单位。菌种 N<sub>1</sub> 能在以这种多糖作为唯一碳源的培养基里生长, 并能产生九糖重复单位。

## 材料和方法

### (一) 菌种、培养基和培养条件

本文于 1983 年 3 月 28 日收到。

本文采用的英文缩写符号:

Glc: 葡萄糖; Gal: 半乳糖;

Glc UA: 葡萄糖醛酸; Pyr: 丙酮酸;

g.l.c: 气相色谱; N.M.R: 核磁共振。

根瘤菌 TISTR 386 是从 *Neptunia* 分离, 泰国微生物资源中心 (Microbiological Resources Center, Bangkok, MIRCEN) 收集得到。菌种保存在酵母膏-甘露糖琼脂斜面<sup>[1]</sup>。产多糖发酵培养基是: 100ml 蒸馏水含葡萄糖 4g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.15 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.05g;  $\text{NaCl}$ , 1 mg;  $\text{CaCl}_2$ , 1 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  1mg;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mg; 硫胺素, 20 $\mu\text{g}$ ; 生物素 2 $\mu\text{g}$ ;  $\text{CaCO}_3$ , 0.5g; pH7.0。种子培养基与上述培养基相同。在装有 25ml 上述培养基的 500ml 三角瓶中, 接上种子培养液 5ml。每分钟振荡 120 次, 30 $^\circ\text{C}$  培养 5 天。

菌种  $\text{N}_1$  是从土壤里分离, 是一株能在以根瘤菌 TISTR 386 胞外酸性多糖作为唯一碳源的培养基里生长的细菌。用于水解 TISTR 386 多糖的菌种  $\text{N}_1$  的培养基是: 每 100ml 蒸馏水含  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.15 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.05g;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{CaCl}_2$ , 1mg;  $\text{NaCl}$ , 1mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 $\mu\text{g}$ ;  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7 $\mu\text{g}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 $\mu\text{g}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 $\mu\text{g}$ ; TISTR386 多糖 0.5g。培养基调 pH 到 7。种子培养基同上。在含 95ml 培养基的 500ml 三角瓶里接上 5ml 种子培养液, 在 30 $^\circ\text{C}$  振荡培养 24—48h。

## (二) TISTR386 胞外酸性多糖的制备

胞外酸性多糖按 Misaki 等所述方法<sup>[2]</sup>, 用丙酮和十六烷基吡啶盐酸盐 (Cetylpyridinium hydrochloride) 沉淀制备。所得多糖再经过 Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$  型树脂) 处理。氢离子型多糖被用于以后的分析。

## (三) 脱丙酮酸多糖的制备

用 10mM 盐酸在 100 $^\circ\text{C}$  水浴处理多糖 2h, 脱去多糖中所含的丙酮酸。

## (四) 寡糖 1 的制备

离心菌种  $\text{N}_1$  的培养液, 除掉菌体, 加上二倍体积乙醇, 离心去除残留多糖。浓缩所得上清液到小体积, 加上四倍以上体积乙醇, 再次离心。沉淀溶于适量水中, 溶液通过火棉胶膜, 进行超滤以除去痕迹量多糖。滤液通过 Sephadex G-10 柱除盐。浓缩寡糖部分到小体积, 冷冻干燥。为了进一步纯化, 这部分寡糖上一个预先用 1mM KCl 溶液平衡的 DEAE-纤维素柱 (2 $\times$ 10cm),

用 1000ml 1—100mM KCl 溶液进行梯度洗脱。收集大约在 80mM KCl 洗脱的寡糖部分且浓缩, 再通过 Sephadex G-10 柱脱盐, 冷冻干燥。

## (五) 寡糖 2 的制备

TISTR386 菌种在添加 0.1% 酵母膏的培养基里培养以后, 离心去除细胞。在上清液里加上二倍体积乙醇, 离心去除含多糖的沉淀。所得上清液按“寡糖 1 的制备”所述制备寡糖 2。

## (六) 测定方法

1. 丙酮酸、糖醛酸、酯和总糖的分析: 丙酮酸、糖醛酸、酯和总糖分别用 2,4-二硝基苯酚<sup>[3]</sup>, 吡唑<sup>[4]</sup>, 氧肟酸<sup>[5]</sup>, 和酚-硫酸<sup>[6]</sup>方法测定。

2. 沉降速度: 沉降速度用 Spino model E 分析超离心机, 25 $^\circ\text{C}$ , 52000rpm 测定。

3. 糖的定量分析: 按 Hisamatsu 等<sup>[13]</sup>所述, 用气相色谱方法, 以木糖作为标准物来分析样品中中性糖。

4. 纸层析: 用 Toyo Roshi NO50 纸点样, 展开的溶剂系统是: 正丁醇-吡啶-水 (6:4:3V/V)。纸上的糖用硝酸银试剂检测。

5. 高压纸电泳: 高压纸电泳在一个 Camag 仪器进行, 0.05M 硼酸钠液作为电泳液。用 5%  $\alpha$ -萘酚 10N 硫酸液喷射, 接着在 100 $^\circ\text{C}$  烤箱干燥 10min 检测纸上的糖。

6. 寡糖还原末端糖的测定: 寡糖液 (1mg/1ml) 用 4mg 氢硼化钠还原。还原寡糖在一个密闭的充氮小管里, 用 1ml 2N 盐酸水解 2h。乙酰化水解物在一个 Shimadzu GC 7A 装有 1.5% Silicon OV-17 柱的色谱仪上分析。糖的乙酰化衍生物及糖醇在这个柱上分离开。来源于还原末端糖的糖醇的气体流组分用毛细玻璃管收集, 溶于甲醇后在 3% ECNSS-M 柱上再次层析。

7. 甲基化分析: 用 Hakomori<sup>[14]</sup> 方法制备甲基化糖, 按 Hisamatsu<sup>[15]</sup> 等人所述方法在装有 0.3% OV-275 0.4% GEXF1150 (80—100 网眼 Shimalite) 的柱 (3mm $\times$ 2m) 的 Shimadzu GC 7A 色谱仪上分析。

8. 用黄杆菌 M64(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶水解寡糖: 寡糖 1 用 (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶来水解<sup>[16]</sup>, 15mg 寡糖 1 同 10 单位酶在 0.5ml pH5.8 0.05M 乙酸缓冲液, 30 $^\circ\text{C}$  放置二天。加上一滴甲苯防止微生物生长。消化的产物用 Amberlite IR120( $\text{H}^+$

树脂)处理,接着在 Toyo Roshi NO50 纸上作纸层析。

9.核磁共振分析: 5mg 脱丙酮酸多糖溶解在 0.5ml 重水,在 JEOL JNM-FX100 (100MHz) 仪器上, 85℃ 分析。

10.多糖的羧基还原: 多糖的羧基按 Taylor 和 Conrad 方法<sup>[17]</sup>进行还原。

## 结果和讨论

### (一) 多糖的沉降和纸电泳

原多糖和脱丙酮酸多糖的分析超离心图谱(图 1)表明都只有单个峰,沉降系数

为 3.1S ( $S_{20,W}$ )。从纸电泳图谱(图 2)可看出,原多糖停留在原点,这是由于它的高粘度性,而脱丙酮酸多糖离开原点并得到一个斑点。这些结果表明,多糖制剂看来是均一的。

### (二) 原多糖和修饰的多糖的组分

原多糖和脱丙酮酸多糖,羧基还原多糖的组分见表 1。原多糖由 D-葡萄糖, D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸组成,它们的克分子比为 5.5:1.5:2,此外还有一些丙酮酸及乙酸。在羧基还原多糖里,增加了葡萄糖,

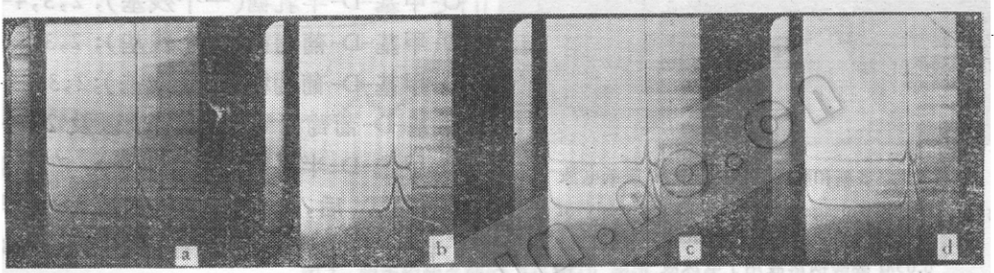


图 1 原多糖和脱丙酮酸多糖在 0.1N NaCl 中沉降图谱

Fig. 1 Sedimentation patterns of native and depyrulylated polysaccharides in 0.1N NaCl 样品溶液在 (a) 10 分, (b) 20 分, (c) 30 分, (d) 40 分。上面: 原多糖, 下面: 脱丙酮酸多糖。  
 $S_{20,W} = 3.1S$

Sample solutions at (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40min.

Upper: native polysaccharide, Lower: depyrulylated polysaccharide.

$S_{20,W} = 3.1S$

表 1 根瘤菌 TISTR 386 的原多糖、修饰多糖和寡糖的组分分析

Table 1. Component analysis of native and modified polysaccharides and oligosaccharides of *Rhizobium* strain TISTR 386

|                                           | 葡萄糖<br>Glucose            | 半乳糖<br>Galactose | 葡萄糖醛酸<br>Glucuronic acid | 丙酮酸<br>Pyruvic acid | 乙酸<br>Acetic acid |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|
|                                           | 相对比例 Relative proportions |                  |                          |                     |                   |
| 原多糖<br>Native polysaccharide              | 5.7                       | 1.5              | 2.1                      | 0.3                 | 0.8               |
| 脱丙酮酸多糖<br>Depyrulylated polysaccharide    | 5.6                       | 1.5              | 1.8                      | 0                   | 0.8               |
| 羧基还原多糖<br>Carboxyl-reduced polysaccharide | 7.4                       | 1.5              | 0.3                      | n.d*                | n.d*              |
| 寡糖 1<br>Oligosaccharide 1                 | 5.7                       | 1.5              | 2.0                      | 0.3                 | 0.4               |
| 寡糖 2<br>Oligosaccharide 2                 | 6.0                       | 1.5              | 2.0                      | 0.3                 | 0.2               |

\* 没有测定 not determined

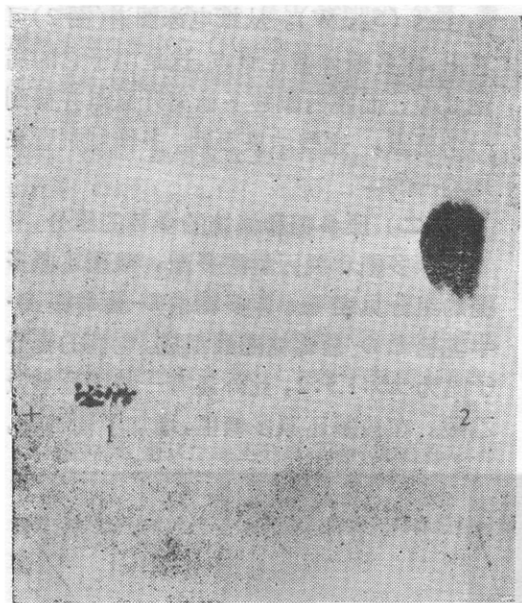


图2 原多糖和脱丙酮酸多糖的高压纸电泳

Fig. 2 High voltage paper electrophoresis of native and depyruvylated polysaccharides

0.05M 硼酸钠溶液用于电泳液

1. 原多糖; 2. 脱丙酮酸多糖。

0.05M sodium borate solution was used as the electrophoresis solution.

1. native polysaccharide,

2. depyruvylated polysaccharide.

同时减少了等量的糖醛酸成分(表1), 从

而确定原多糖含 D-葡萄糖醛酸。脱丙酮酸多糖的 N.M.R 图谱(图3)说明在 2.17 ppm 处有一强信号, 而这恰是乙酰基上甲基的质子的特征峰, 这就证明多糖中含有乙酸。

### (三) 原多糖及修饰多糖的甲基化分析

多糖的甲基化糖的 g.l.c 图谱见图4, 它们的相对比例见表2。

原多糖的甲基化糖是: 2,3,4,6-四-O-甲基-D-葡萄糖(半个残基); 2,4,6-三-O-甲基-D-半乳糖(一个残基); 2,3,4-三-O-甲基-D-葡萄糖(一个残基); 2,3,6-三-O-甲基-D-葡萄糖(三个残基); 2,3-二-O-甲基-D-葡萄糖(一个残基)以及 2,3-二-O-甲基-D-半乳糖(半个残基)。在多糖脱丙酮酸以后, 2,3-二-O-甲基-D-半乳糖(半个残基)消失了, 而等量增加了 2,3,4,6-四-O-甲基-D-半乳糖。这些结果说明, 多糖有一个处于分支点的葡萄糖, 它通过 1→4 或 1→6 键连接分支。多糖还有二个不同的非还原末端, 一个是 D-葡萄糖残基, 另一个是 D-半乳糖, 它通过 0-4 和 0-

表2 根瘤菌 TISTR386 的原多糖、修饰多糖和寡糖的甲基化分析

Table 2 Methylation analysis of native and modified polysaccharide and oligosaccharides of *Rhizobium* TISTR 386

|                                           | 甲基化糖(相对比例)<br>Methylated sugars (relative proportions) |             |           |           |           |           |         |         |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|
|                                           | 2,3,4,6-Glc                                            | 2,3,4,6-Gal | 2,4,6-Glc | 2,4,6-Gal | 2,3,4-Glc | 2,3,6-Glc | 2,3-Glc | 2,3-Gal |
| 原多糖<br>Native polysaccharide              | 0.4                                                    | 0.1         | 0         | 1.0       | 1         | 3.2       | 1.0     | 0.5     |
| 脱丙酮酸多糖<br>Depyruvylated polysaccharide    | 0.4                                                    | 0.4         | 0         | 0.9       | 1         | 3.2       | 1.0     | 0       |
| 羧基还原多糖<br>Carboxyl-reduced polysaccharide | 0.3                                                    | 0.2         | 0.6       | 1.2       | 1         | 4.4       | 0.9     | 0.8     |
| 寡糖 1<br>Oligosaccharide 1                 | 0.4                                                    | 0           | 0         | 0.8       | 2         | 2.9       | 0       | 0.5     |
| 寡糖 2<br>Oligosaccharide 2                 | 0.3                                                    | 0           | 0         | 0.7       | 2         | 3.0       | 0       | 0.4     |
| OS-1-1                                    | 1.2                                                    | 0           | 0         | 0.8       | 0         | 2         | 0       | 0       |
| OS-1-2                                    | 0.4                                                    | 0           | 0         | 0         | 0.6       | 1         | 0       | 0.2     |

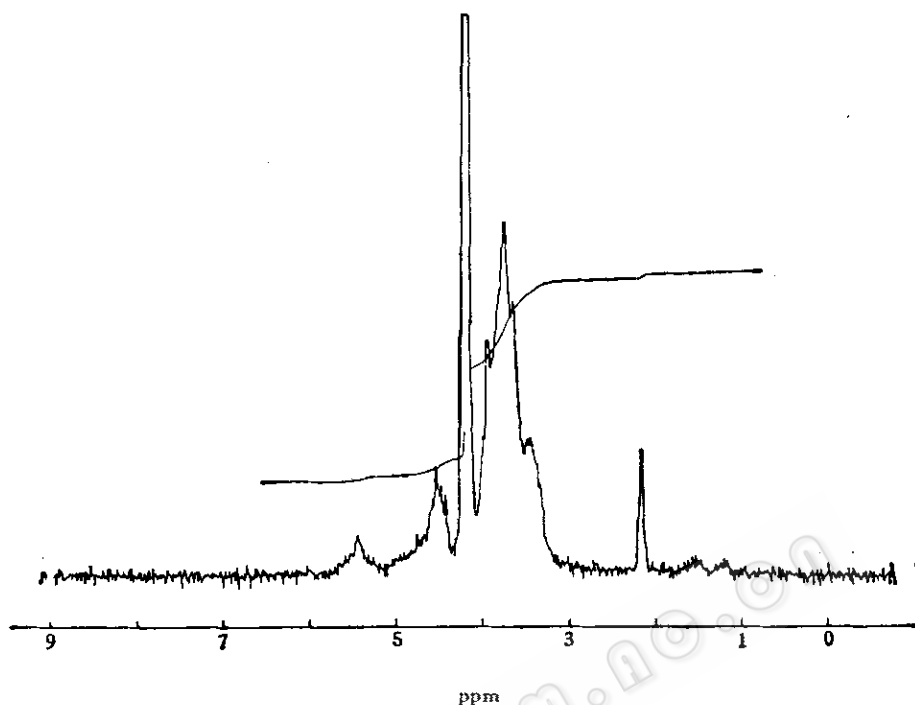
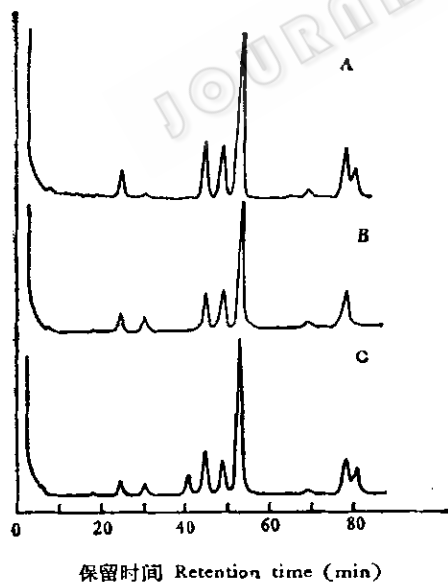
图3 脱丙酮酸多糖的<sup>1</sup>H-NMR 图谱Fig. 3 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of depyruvylated polysaccharide.

图4 原多糖、脱丙酮酸多糖,还原多糖的甲基化糖苷乙酸酯的气相色谱图谱

Fig. 4 The gas liquid chromatographic patterns of the alditol acetates of methylated sugars from native, depyruvylated and reduced polysaccharides. A. 原多糖 Native polysaccharide B. 脱丙酮酸多糖 Depyruvylated polysaccharide C. 还原多糖 Reduced polysaccharide

6 连接丙酮酸。这说明原多糖存在二种不同多糖重复单位。而甲基化分析数据也说明,原多糖中葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸

的总的比例是 5.5:1.5:2, 这些与多糖的成份分析数据完全一致。

通过羧基还原,增加了一个 2,4,6-三-

O-甲基-D-葡萄糖和-一个2,3,6-三-O-甲基-D-葡萄糖,这表明多糖有(1→3)和(1→4)键连接的葡萄糖醛酸残基。

#### (四) 菌种 $N_1$ 培养液的九糖重复单位的分离

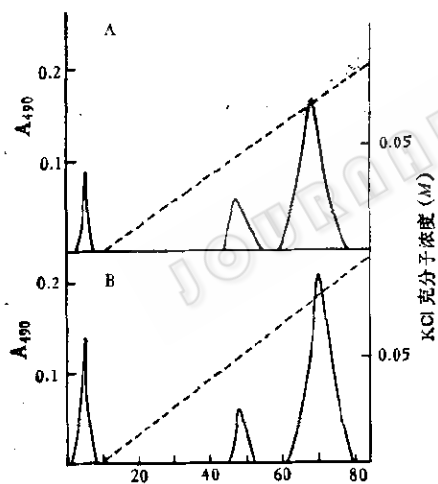
研究多糖结构一个有用的方法是用酶把多糖水解成寡糖。这种酶能从以多糖为唯一碳源的培养基里生长的微生物中得到。而菌种  $N_1$  恰好能在 TISTR 386 多糖作为唯一碳源的培养基里很好生长。然而,我们不能从  $N_1$  菌种的培养液中分离水解多糖的酶,为此,我们直接从培养液中分离经酶水解后得到的寡糖部分。

按“材料和方法”所述分离纯化。按 DEAE-纤维素层析图谱所示(图5),得到三个含糖的峰。甲基化分析表明,第一个

峰在柱上没有吸附就洗脱下来了,它是由(1→2)-连接的葡萄糖残基所组成,没有非还原末端和分支点。

第三个峰所得的糖,被命名为寡糖1,它由D-葡萄糖、D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸、内酮酸和乙酸所组成。这些成分的比例与原多糖十分相似。(见表1)。

按“材料与方法”所述测定寡糖1的还原末端糖。OV-17柱的层析图见图6。图中峰A和B分别对应于 $\alpha$ -和 $\beta$ -D-葡萄糖五乙酸酯,而峰C对应于D-葡萄糖醇六乙酸酯或D-半乳糖醇六乙酸酯,而这二种化合物在这个柱上不能分离。为了鉴别峰C,

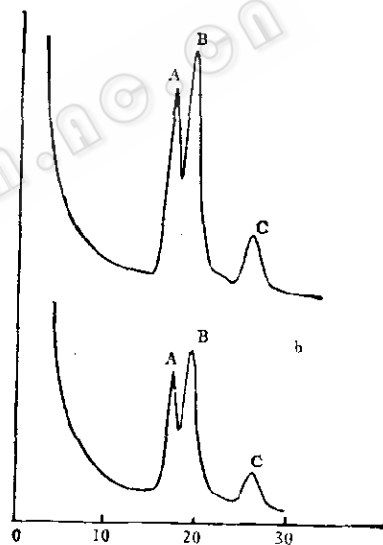


管号 Fraction number

图5 寡糖1和2的DEAE-纤维素层析

Fig. 5 DEAE-cellulose chromatography of oligosaccharide 1 and oligosaccharide 2. 寡糖用150ml 0.01M KCl,再用1000ml KCl梯度洗脱。(1mM到100mM),柱大小 $2 \times 10$ cm,每个管收集11ml The oligosaccharides were eluted with 150ml 0.01M KCl and a 1000ml linear gradient of KCl (1mM to 100mM). The size of column was  $2 \times 10$ cm and fractions of 11ml were collected.

A. 寡糖1 Oligosaccharide 1; B. 寡糖2 Oligosaccharide 2



保留时间 Retention time(min)

图6 还原寡糖1和2的酸水解物的乙酰衍生物的气相色谱图谱

Fig. 6 Gas liquid chromatographic patterns of the acetyl derivatives of an acid hydrolysates of reduced oligosaccharide 1 and oligosaccharide 2.

- A.  $\alpha$ -D-葡萄糖五乙酸酯
- B.  $\beta$ -D-葡萄糖五乙酸酯
- C. D-葡萄糖醇六乙酸酯或D-半乳糖醇六乙酸酯
- A.  $\alpha$ -D-glucose pentaacetate,
- B.  $\beta$ -D-glucose pentaacetate,
- C. D-glucitol hexaacetate or D-galactitol hexaacetate.

- a. 还原寡糖1 Reduced oligosaccharide 1
- b. 还原寡糖2 Reduced oligosaccharide 2

从气体流中收集这个组分, 再在 ECNSS-M 柱上重新层析。这样, 我们得到了相对应于 D-半乳糖醇六乙酸酯的单个峰。因此, 寡糖 1 的还原末端糖被确定为 D-半乳糖。从图 7 得出, 葡萄糖对糖醇 (D-半乳糖醇) 的比例是 6, 另外, 这个寡糖含 2 克分子 D-葡萄糖醛酸, 所以寡糖 1 的聚合度为 9。

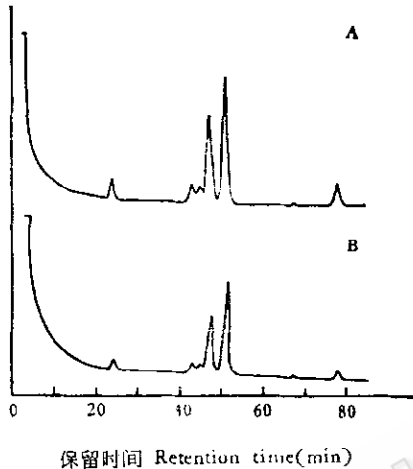


图 7 寡糖 1 和寡糖 2 的甲基化糖苷乙酸盐的气相色谱图谱

Fig. 7 Gas liquid chromatography patterns of the alditol acetates of methylated sugars from oligosaccharide 1 and oligosaccharide 2

A. 寡糖 1 Oligosaccharide 1  
B. 寡糖 2 Oligosaccharide 2

寡糖 1 的甲基化分析 (图 7, 表 2) 表明寡糖 1 没有 2, 3-二-O-甲基-D-葡萄糖, 因而不含有分支的 D-葡萄糖残基, 与原多糖比较, 增加了一克分子 2, 3, 4-三-O-甲基-D-葡萄糖。从 g.l.c 图谱可看出, 对应于 2, 4, 6-三-O-甲基-D-半乳糖峰比所期望的要小。这大概是在甲基化过程中由于  $\beta$ -消除, 末端的 (1  $\rightarrow$  3)-连接的 D-半乳糖残基被修饰了, 被修饰的残基在 2, 4, 6-三-O-甲基-D-半乳糖和 2, 3, 4-三-O-甲基-D-葡萄糖之间产生一个新峰。(1  $\rightarrow$  3) 连接的还原末端糖在甲基化过程中对  $\beta$ -消除比较敏感是众所周知的。

这些结果说明, 寡糖 1 是多糖的重复

单位, 它是通过水解分支点上葡萄糖残基的键而得到的。这些键一定是 1  $\rightarrow$  4 键, 因为增加了一克分子 2, 3, 4-三-O-甲基-D-葡萄糖。菌种 N<sub>1</sub> 含有使多糖分解成九糖重复单位的酶。

图 5 中第二个峰较小, 没有进一步分析。

#### (五) 用黄杆菌 M64 (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡聚糖酶水解九糖重复单位

黄杆菌 M64 (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-葡聚糖酶能水解九糖重复单位成二个更小的寡糖, 然后再用纸层析分离。溶剂系统是: 正丁醇: 吡啶: 水 (6:4:3)。这二个寡糖用水从纸上抽提出来, 冷冻干燥。分别命名为 OS-1-1 和 OS-1-2。

OS-1-1 的甲基化分析 (表 2, 图 8) 说明, OS-1-1 含有二个 (1  $\rightarrow$  4)-键连接的 D-葡萄糖, 一个 (1  $\rightarrow$  3)-键连接的 D-半乳糖和一个非还原末端 D-葡萄糖。在 OS-1-1 中, 没有测出 D-葡萄糖醛酸, 而 D-半乳糖势必定位在还原末端, 因此 OS-1-1 的结构是:

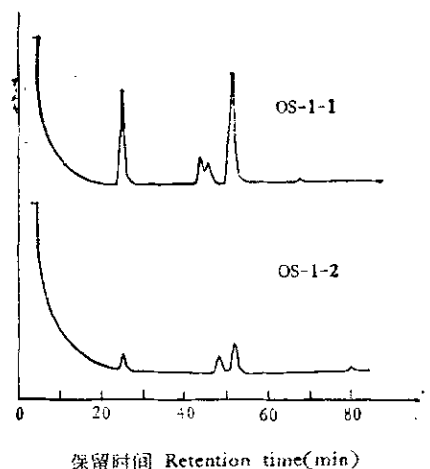
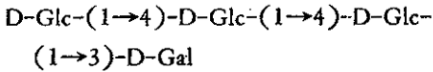


图 8 OS-1-1 和 OS-1-2 甲基化糖苷乙酸盐的气相色谱图谱

Fig. 8 Gas liquid chromatographic patterns of the alditol acetates of methylated sugars from OS-1-1 and OS-1-2

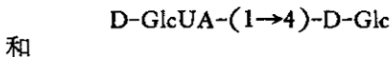


这个四糖与产碱杆菌、三叶草根瘤菌、苜蓿根瘤菌和土壤杆菌的多糖的骨架有相同的结构。

OS-1-2 的甲基化分析表明, OS-1-2 含有一个 (1→4) 键连接的 D-葡萄糖, 一个 (1→6) 键连接的 D-葡萄糖, 非还原末端 D-葡萄糖残基或带有丙酮酸的 D-半乳糖。这个寡糖含有 D-葡萄糖醛酸。

以上结果说明, 原多糖的二种不同九糖重复单位都有相同的骨架, 即 OS-1-1, 在支链上的差别仅是非还原末端糖残基不同, 二种九糖重复单位的 D-葡萄糖, D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸的克分子比例分别是: 6:1:2 和 5:2:2。

为了进一步研究 OS-1-2 的糖的顺序, 原多糖用 4M 三氟乙酸在 100℃ 部分水解 3h。在这种水解条件下, 多糖中大部分糖苷键比糖醛酸键更易水解。水解物的纸层析图谱说明有 D-葡萄糖, D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸和二糖 (图 9)。这两个寡糖命名为 OS-A 和 OS-B。用水把它们从纸上抽提出来。OS-A 和 OS-B 是由 D-葡萄糖醛酸和 D-葡萄糖组成, 它们的克分子比例分别是 1:1 和 2:1。OS-A 和 OS-B 的甲基化分析仅得到一个对应于 (1→4) 键连接的 D-葡萄糖的甲基化糖。这些结果表明, OS-A 和 OS-B 的结构是:



$\text{D-GlcUA-D-GlcUA}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc}$ 。  
这两个小寡糖只能在含有 D-葡萄糖醛酸的 OS-1-2 之中, 这样 OS-1-2 的二个可能结构是:

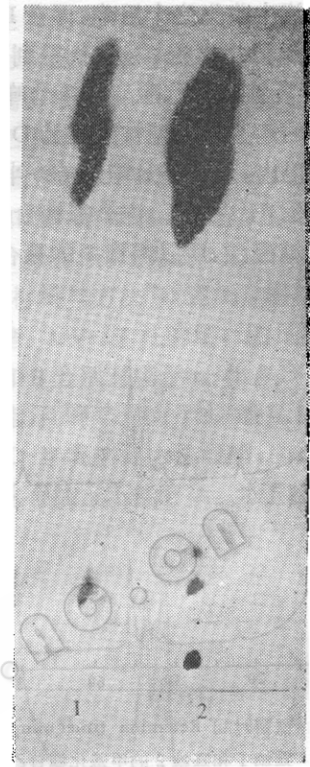
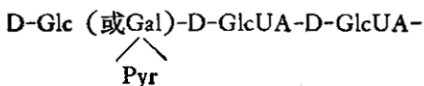


图 9 原多糖水解产物的纸层析图谱

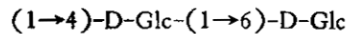
Fig. 9 Paper chromatogram of hydrolysate of native polysaccharide.

水解条件: 4M 三氟乙酸在 100℃ 水解三小时。

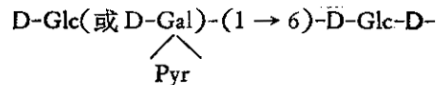
1. 标准样品: 葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸,
2. 样品

Hydrolysis condition: 4M trifluoroacetic acid for 3h at 100℃.

1. Standard: glucose, galactose, glucuronic acid
2. Sample



或



D-葡萄糖醛酸是通过 (1→3) 和 (1→4) 键连接。这个五糖是多糖的支链。

(六) 用菌种 TISTR 386 产生九糖重复单位和环状 (1→2)-β-D-葡聚糖

最近发现, 有株产碱杆菌及其变种和



许多土壤杆菌除了产生琥珀酸型葡聚糖类多糖和 Cudlan 以外, 还能产生多糖的八糖重复单位以及环状  $(1 \rightarrow 2)$ - $\beta$ -D-葡聚糖,<sup>[18,19]</sup> Hisamatsu 等提出, 这些菌种产生的八糖重复单位不是由琥珀酸型葡聚糖水解所形成的, 而是从一些与琥珀酸型葡聚糖生物合成有关的胞内化合物所释放出来的。

我们研究了在菌种 TISTR 386 的培养液里是否也含有多糖的重复单位和(或)葡聚糖。按材料和方法“寡糖 2 的制备”所述, 在 DEAE-Cellulose 层析图谱上(图 5), 出现三个含糖的峰。甲基化分析结果指出, 第一个峰是由  $(1 \rightarrow 2)$  键连接 D-葡聚糖组成, 没有非还原末端和分支点。第二个峰很小, 没有研究。

第三个峰被命名为寡糖 2, 它是由 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸、丙酮酸和乙酸组成(表 1)。甲基化分析表明(表 2、图 7), 它的聚合程度是 9, 与 TISTR 386 多糖的九糖重复单位完全相同。

这些结果说明, 根瘤菌 TISTR 386 同样也能产生多糖的重复单位及环状  $(1 \rightarrow 2)$ - $\beta$ -D-葡聚糖。

## 参 考 文 献

[1] Footrakul, P. et al.: *J. Ferment. Technol.*,

59: 9, 1981.

- [2] Jansson, P. -E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 99: 3812, 1977.
- [3] Jansson, P. -E. et al.: *Carbohydr. Res.*, 75: 207, 1979.
- [4] Dudman, W. F.: *Carbohydr. Res.*, 66: 9, 1978.
- [5] Ghai, S. K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 122: 33, 1981.
- [6] Amemura, A. et al.: *Carbohydr. Res.*, 91: 59, 1981.
- [7] Graham, P. H. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 31: 349, 1965.
- [8] Misaki, A. et al.: *Biochemistry*, 8: 4645, 1969.
- [9] Koepsell, H. J. and E. S. Sharpe: *Arch. Biochem. Biophys.*, 38: 443, 1952.
- [10] Galambos, J. T.: *Anal. Biochem.*, 19: 119, 1967.
- [11] McComb, E. A. and R. M. McCready: *Anal. Chem.*, 29: 819, 1957.
- [12] Dubois, M. et al.: *Anal. Chem.*, 28: 350, 1956.
- [13] Hisamatsu, M. et al.: *Carbohydr. Res.*, 61: 89, 1978.
- [14] Hakomori, S.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 55: 205, 1964.
- [15] Hisamatsu, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44: 1049, 1980.
- [16] Abe, J. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44: 1877, 1980.
- [17] Taylor, R. L. and H. E. Conrad: *Biochemistry*, 11: 1383, 1972.
- [18] Hisamatsu, M. et al.: *Carbohydr. Res.*, 66: 289, 1978.
- [19] Harada, T.: 4th Carbohydrate symposium, Tokyo, Japan, 1981.

## STRUCTURAL STUDIES ON EXTRACELLULAR ACIDIC POLYSACCHARIDE PRODUCED BY *RHIZOBIUM* SP. TISTR 386

Qian Shijun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Akinori Amemura Tokuya Harada

(The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan)

The extracellular acidic polysaccharide of *Rhizobium* TISTR 386 is composed of two types of repeating-unit of the nonasaccharide with components of D-glucose, D-galactose and D-glucuronic acid in a molar ratio of 6:1:2 or 5:2:2 and some pyruvic acid and acetic acid. Methylation analysis showed that this polysaccharide is composed of (1→3)-, (1→6)-, (1→4)- and (1→4, 1→6) linked D-glucose residues, (1→3)-linked D-galactose residues (1→3)- and (1→4)-linked D-glucuronic acid residues and nonreducing terminal sugar residues in a molar ratio of 1:1:3:1:1:1. The terminal sugar residues are D-glucose residues or D-galactose residues with pyruvic acid.

Strain N<sub>1</sub>, isolated from soil as a bacterium capable of utilizing the polysaccharide as the sole source of carbon, hydrolyzed the polysaccharide to the linear nonasaccharide repeating unit. An enzyme of this organism was shown to hydrolyze the galactosyl (1→4)-linkages adjacent to branching glucose residues of the polysaccharide to produce linear repeating-unit.

The nonasaccharide repeating-unit

was hydrolyzed into two oligosaccharides, tetra- and pentasaccharides, with specific (1→6)-β-D-glucanase of *Flavobacterium* M64. The structure of the tetrasaccharide was determined to be D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→3)-D-Gal by methylation analysis. This tetrasaccharide seems to be derived from the backbone of the polysaccharide and the structure of the backbone seems to be the same as those of succinoglycan-type polysaccharides produced by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, *Rhizobium trifolii* J60 and many strains of *Rhizobium meliloti* and *Agrobacterium*. The structure of the pentasaccharide, probably composing the side chain of polysaccharide, is still uncertain.

Strain TISTR 386 accumulated the linear repeating-unit nonasaccharide with the same structure in the culture fluid as shown previously in *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 22 and 22-33.

Cyclic (1→2)-D-glucan was also found in the culture fluid of strain TISTR 386.

### Key words

*Rhizobium*; polysaccharide