

环状 β - (1, 2) -葡聚糖的提纯与鉴定*

杨雪霞** 顾渊海 高红亮 马向东 姚占芳

(河南农业大学生物工程学院 郑州 450002)

刘宏民

(郑州大学化学系 郑州 450007)

摘要: 三叶草根瘤菌 H954 在 GMS 培养基上 28℃ 培养 8d 后, 发酵液用无水乙醇分步沉淀法抽提, 经过 Sephadex G-50、Sephadex G-10、DEAE-纤维素柱层析纯化, 并用气相色谱 (GC)、¹³C-核磁共振 (NMR) 和质谱分析, 证明该菌产生环状 β - (1, 2) -葡聚糖, 该糖是一种以葡萄糖为单体, 通过 β - (1, 2) -葡聚糖苷键连接而成的环状分子, 且绝大部分为中性糖, 聚合度从 17 到 22, 其中以 19 为主, 分子量为 3078D。

• 河南省教委资助课题 (No. 961800002)

** 中国科学院化工冶金研究所 97 级博士

收稿日期: 1999-11-26, 修回日期: 2000-02-21

关键词: 三叶草根瘤菌, 环状 β - (1, 2) -葡聚糖

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 03-0045-06

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CYCLIC β - (1, 2) -GLUCANS

YANG Xue-Xia GU Su-Hai GAO Hong-Liang MA Xiang-Dong YAO Zhan-Fang

(College of Bioengineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

LIU Hong-Min

(Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450007)

Abstract: *Rhizobium leguminosarum* biov. trifolii H954 has been fermented for eight days on the GMS medium. Culture supernatant is extracted by ethanol precipitation, sample is purified by Sephadex G-50, Sephadex G-10 and DEAE-Cellulose chromatography. Gas chromatography (GC), ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS) analysis indicated that the sample is cyclic, neutral glucan, and composes of glucose linked solely by 1 \rightarrow 2 glycosidic bonds. Cyclic glucan has degrees of polymerization ranging from 17 to 22, with a degree of polymerization of 19 as the major glucan cycles.

Key words: *Rhizobium leguminosarum* biov. trifolii, Cyclic β - (1, 2) -glucans

根瘤菌在生长过程中会产生大量的糖类物质, 如脂多糖、胞外多糖、荚膜多糖等, 对这些糖类已经有许多研究报道^[1]。环状 β -葡聚糖是根瘤菌产生的另一类糖。根瘤菌科的所有菌株都能产生这类糖。在一定的培养条件下, 环状 β -葡聚糖能占到细胞总干重的 5% ~ 20%。在根瘤菌属和土壤杆菌属中, 环状 β -葡聚糖是由 β - (1, 2) 葡萄糖苷键连接而成的; 在慢生根瘤菌属中它是由 β - (1, 3) 和 β - (1, 6) 葡萄糖苷键连接而成的, 这些分子都是以葡萄糖为唯一的单体聚合而成的环状结构。它们既存在于胞内, 也分泌到胞外, 不同菌体产生糖的聚合度大小, 有无分支和取代基也各不相同^[2]。

环状 β -葡聚糖于 1942 年首次报道^[3], 但直到 80 年代才对它有较大研究。目前的研究主要集中在不同菌株产生这类糖的结构以及在根瘤菌中所起的重要生理功能^[2]。环状 β -葡聚糖具有极其重要的生理功能, 主要有: (1) 环状 β -葡聚糖在菌体对低渗环境的适应中起重要作用^[4,5], 低渗环境能诱导该糖大量合成, 积累在细胞周质空间, 使菌体能够在低渗环境中生存; (2) 参与菌体对宿主植物的侵染的整个过程^[6], 包括对宿主植物特异性识别, 附着于植物细胞表面的特定位点, 与宿主植物代谢物相互作用增加结瘤等, 而且能够抑制宿主植物的防御系统; (3) 胞内的环状 β -葡聚糖影响细胞膜的结构^[5,7], 不能合成环状 β -葡聚糖突变株的细胞膜性质发生许多变化, 而且侵染植物的能力也大大降低。对其更具体的生理功能目前正在进一步研究当中, 环状 β -葡聚糖特异的环状结构能与一些疏水性物质形成包涵物^[8], 这种类似于环状糊精的性质在工业上将有很大的应用价值。该糖溶解性更高 (环状 β -葡聚糖溶解度为 250g/L, 环状糊精为 18g/L)^[2], 内径比环状糊精大, 能包接更大的疏水分子, 对这些天然功能的开发将在食品、医药工业上有许多新应用。

由于根瘤菌在生长代谢过程中产生大量的多糖及寡糖, 这就给从发酵液中提取纯化环状 β -葡聚糖造成困难。该糖属分子量较大的寡糖, 分子量一般为 3,000 ~ 4,000D, 聚合度在 17 ~ 24 之间, 且为环状结构, 因此该糖的鉴定需要综合应用多种方法。对这

样大分子环状糖的结构分析在国内报道较少。本研究成功地从三叶草根瘤菌 H954 中提取出环状 β -葡聚糖, 并对其纯化和详细的结构分析, 为进一步研究其生理功能和开发应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 三叶草根瘤菌 H954 (*Phizobium leguminosarum* biov. *trifolii* H954) 从河南农业大学校园三叶草根瘤中分离, 保存在 GMS 培养基斜面上^[9]。

1.1.2 标准样品: 环状 β - (1, 2)-葡聚糖标准样品由荷兰 Wageningen 农业大学微生物系 Zevenhuizen, L. P. T. M 教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 培养方法: 用 GMS 液体培养基培养菌种, 取对数后期用于接种。发酵培养时甘露醇为 10g/L, 其余成分同 GMS 培养基。用 500mL 三角瓶装 100mL 培养基, 接种量为 3%, 28℃ 120r/min, 摇床培养 8d。

1.2.2 样品测定: 样品中总糖含量用苯酚-硫酸法测定^[10], 还原糖含量 Somogyi 比色法测定^[11]。

1.2.3 样品粗提: 取发酵液加水稀释后于 4,000r/min 离心 40min, 收集上清液加 3 倍体积的无水乙醇, 3,000r/min 离心 30min, 收集上清液, 减压浓缩至原体积的 1/10, 再加 3 倍体积的无水乙醇, 3000r/min 离心 30min, 收集上清液, 减压浓缩至原体积的 1/20, 再加 10 倍体积的无水乙醇, 4℃ 过夜形成白色沉淀, 离心收集沉淀, 溶于少量水得粗样品。

1.2.4 样品纯化: 取少量粗样品溶液上样于 Sephadex G-50 凝胶层析柱 (2.5cm × 80cm), 以含 7% (V/V) 丙醇的 0.15mol/L 乙酸胺缓冲液 (pH = 7.4) 进行洗脱, 流速为 15mL/h, 每管收集 5mL, 收集洗脱峰中无还原性的糖馏份, 经 Sephadex G-10 脱盐后, 上样于 DEAE-纤维素离子交换层析柱, 先用含 7% (V/V) 丙醇的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4) 洗脱, 然后加入 KCl (0 ~ 300mmol/L) 梯度洗脱。收集中性糖冷冻干燥后, 待做以下鉴定用。

1.2.5 气相色谱 (GC): 中性糖先用 8% HCl (w/w) 甲醇液 80℃ 加热回流 2h, 完全水解转化为甲基- α -D-葡萄糖苷和甲基- β -D-葡萄糖苷, 比例为 65:35。然后再加入三甲基氯硅烷、吡啶、六甲基二硅胶一起反应, 3,000r/min 离心 10min, 取上清液, 用 GS-SP3460, 色谱仪做气相色谱分析, 柱型为 OV-101, 柱温 160℃, 氢火焰离子检测器 (FID)。用标准的甲基- α -D-葡萄糖苷和甲基- β -D-葡萄糖苷作对照。

1.2.6 ¹³C-核磁共振 (¹³C-NMR): 用 Bruker DPX-400 型超导核磁共振仪作, 溶剂为 D₂O。

1.2.7 质谱分析 (MS): 用 Bruker 公司 BEFLEX III 质谱仪, 以 DHB (二羟基苯甲酸) 作基质, 正离子检测。

2 结果

2.1 样品纯化

2.1.1 Sephadex G-50 层析: 从图 1 中可以看出粗样品过 Sephadex G-50 层析只产生一个主峰, 测定其还原性发现此峰又可以分为两部分, 前面大部分糖含量很高但无还原性,

而后面一小部分糖含量很低，还原性却很强。由于本试验所要提纯的糖是无还原性的，所以收集第55管到第65管无还原性的馏份，过Sephadex G-10脱盐。

2.1.2 DEAE-纤维素离子交换层析：脱盐后馏份上样于DEAE-纤维素离子交换层析柱，先用含7% (V/V) 丙醇的10mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH = 7.4) 洗脱出一个主峰，为中性糖，然后用含KCl的缓冲液梯度洗脱出一个小峰，为酸性糖 (图2)，由图可知酸性糖含量较少，中性糖占大部分，故收集中性糖进行鉴定。

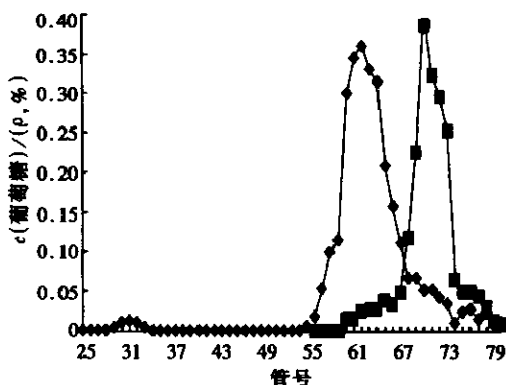


图1 样品过Sephadex G-50柱层析洗脱曲线 (15mL/h, 5mL/管)
◆ 糖含是曲线, -■- 还原糖曲线

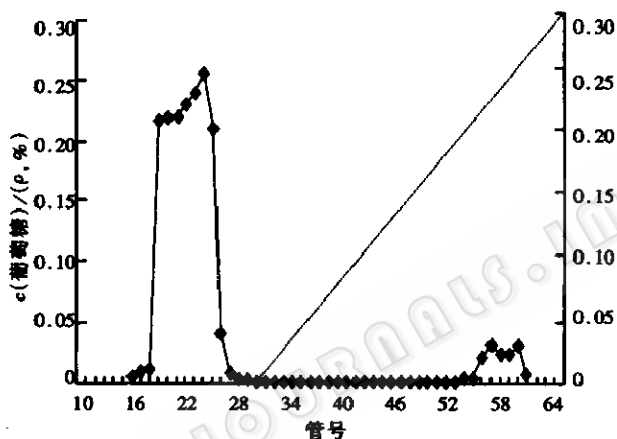


图2 样品过DEAE-Cellulose洗脱曲线(15mL/h, 5mL/管)

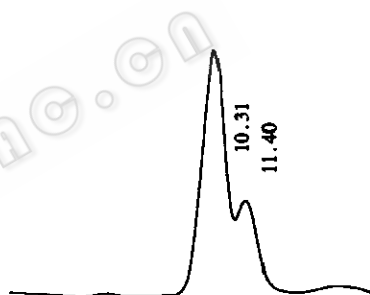


图3 样品水解产物的GC图谱

2.2 样品鉴定

2.2.1 气相色谱 (GC) 分析：用气相色谱分析其完全水解产物，从图谱中可以看出样品水解产物的RT值为10.31和11.40 (图3)，与标准甲基- α -D-葡萄糖苷和标准甲基- β -D-葡萄糖苷RT值相同，由此可见样品是以葡萄糖为唯一单体组成的。

2.2.2 ^{13}C -核磁共振 (NMR) 分析：表1是 ^{13}C -NMR所测各碳位的化学位移 (δ_C)。标准甲基- β -D-葡萄糖苷1-C位上 δ_C 为103.4ppm，样品1-C位上的 δ_C 为103.159ppm，故样品对应的1-C位为 β 构型。

表1 样品及标准品的 ^{13}C -NMR各碳位 δ_C (ppm)

碳位	样品	标准甲基- α -D-葡萄糖苷	标准甲基- β -D-葡萄糖苷	标准样品
1-C	103.159	99.7	103.4	103.187
2-C	83.338	71.9	73.5	83.442
3-C	76.447	73.5	76.3	76.365
4-C	69.833	70.0	70.1	69.890
5-C	77.268	71.6	76.2	77.297
6-C	61.5	61.0	61.2	61.5

标准甲基- α -D-葡萄糖苷和甲基- β -D-葡萄糖苷 2-C 位上的 δ_c 分别为 71.9ppm 和 73.5ppm，而样品中 2-C 位上的 δ_c 为 83.338ppm，表明样品 2-C 的 δ_c 发生了偏移，所有 2-C 位的碳原子都参与了葡萄糖苷键的构成。而其它碳原子的 δ_c 均与标准葡萄糖苷键的 δ_c 的差别不大，可见样品中只有 1-C 和 2-C 相连的糖苷键，而无其它糖苷键存在，即证明该糖分子无分枝无取代基存在。

样品中 1-C 位碳原子的 δ_c 为 103.159ppm 对应着非还原性 1-C 末端，而 92ppm 到 96ppm 这一区域信号对应着还原性 1-C 末端，所测在这一区域内没有共振信号出现，故证明无还原性末端残基的存在。同时，从 2-C 位的 δ_c 看该位的碳原子全部参与了成键反应，即样品也不存在非还原性末端的残基，说明样品为环状结构。

另外，样品的 1-C、2-C、3-C、4-C 位上的碳原子的 δ_c 有多个值 (图 4)，说明样品不是由单一分子量的组分组成，以下的质谱分析也证明了这一点。

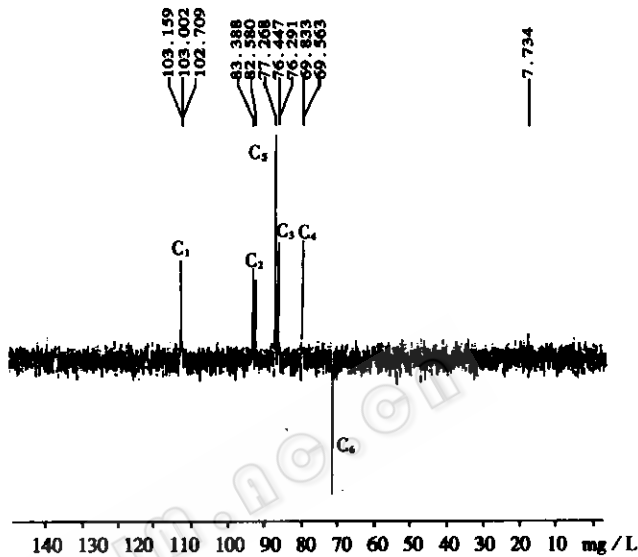


图 4 样品的 ^{13}C -NMR 图谱

2.2.3 质谱分析：从质谱图谱 (图 5) 可以看出样品是由不同分子量的组分组成，聚合度从 17 ~ 22，其中以聚合度 19 为主，对应的分子量为 3078D。

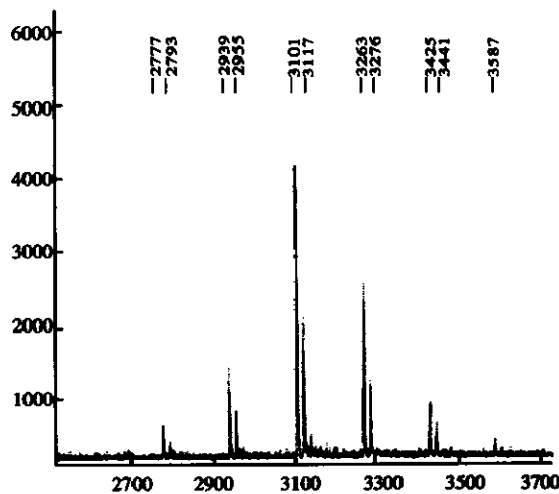


图 5 样品的质谱图谱

综上所述可知：中性糖是由葡萄糖为单体，通过 β (1, 2)-葡萄糖苷键聚合而成的环状分子，主要聚合度为 19。

3 讨论

本实验依次用 3 倍、3 倍、10 倍体积无水乙醇沉淀后，沉淀物经过 Sephadex G-50 柱层析后主要为环状 β -(1, 2)-葡聚糖。由于环状 β -葡聚糖在根瘤菌中的产量一般比较低，在 50 ~ 200mg/g 细胞干重之间^[2]，且发酵液中同时存在其它糖类物质，故要想在工业上获得应用需要采取措施提高产量，同时减少其它糖类物质的产生以利于提取。Harris^[12]和 Higashiura^[13]等利用突变株使根瘤菌大量产生环状 β -葡聚糖，而较少产生其它糖类物质，产量达到 1 ~ 10g/L 发酵液，这就为工业应用环状 β -葡聚糖提供了可能。如果能进一步研究了解其生物合成的机制，则可以人为地促进其大量合成。

如果能在工业上获得应用需要采取措施提高产量，同时减少其它糖类物质的产生以利于提取。Harris^[12]和 Higashiura^[13]等利用突变株使根瘤菌大量产生环状 β -葡聚糖，而较少产生其它糖类物质，产量达到 1 ~ 10g/L 发酵液，这就为工业应用环状 β -葡聚糖提供了可能。如果能进一步研究了解其生物合成的机制，则可以人为地促进其大量合成。

关于环状 β -葡聚糖在根瘤菌对宿主植物的侵染过程中起重要作用虽已知道,但其更为深入的机理仍不清楚,如菌株如何通过环状 β -葡聚糖识别特异的宿主,环状 β -葡聚糖与植物细胞表面分子和胞内代谢物分子是如何作用的,这都需要进一步的研究,为植物固氮的研究提供新的线索。

致谢 感谢荷兰 Wageningen 农业大学微生物系 Zevenhuizen, L. P. T. M 教授为本实验提供标准样品。

参 考 文 献

- [1] Gray J X, Rolfe B G. *Mo Microbiol*, 1990, 4: 1425 ~ 1431.
- [2] Breedveld M W, Miller K J. *Microbio Rev*, 1994, 58: 145 ~ 161.
- [3] McIntire F C, Peterso W H, Riker A J. *J Biol Chem*, 1942, 143: 491 ~ 496.
- [4] Miller K J, Kennedy E P, Reinhold V N. *Science*, 1986, 231: 48 ~ 51.
- [5] Dylan T, Helinski D R, Ditta G S. *J Bacteriol*, 1990, 172: 1400 ~ 1408.
- [6] Clarke H R G, Leigh J A, Douglas C J. *Cell*, 1993, 71: 191 ~ 199.
- [7] Cangelosi G A, Martinetti G, Nester E W. *J Bacteriol*, 1990, 172: 2172 ~ 2174.
- [8] Morris V J, Brownsey G J, Chilvers J E, *et al.* *Food Hydrocoll*, 1991, 5: 185 ~ 188.
- [9] Zevenhuizen L P T M. *Antonie Leeuwenhoek*, 1981, 47: 481 ~ 497.
- [10] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, 16 ~ 17.
- [11] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1979, 36 ~ 39.
- [12] Harris J E, Mellon F A, Morris V J, *et al.* *Carbohydr Polym*, 1991, 16: 321 ~ 326.
- [13] Higashiura T Ikeda M, Okubo M, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 1865 ~ 1866.