

· 特约综述 ·

菌类多糖链构象及其表征方法研究进展*

李 盛 许淑琴 张俐娜**

(武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘 要 概述了菌类多糖在溶液中链构象及其表征方法的研究进展. 主要报道从各种真菌(香菇、茯苓、灵芝、木耳、黄单胞菌、裂褶菌等)中提取的多糖在溶液中的分子量、分子形态和尺寸,即链构象. 同时介绍多糖链构象对生物活性的影响,并且指出多糖刚性链带电基团及适量分子量有利于促进它与免疫细胞上受体结合,从而抑制肿瘤细胞增殖. 由此表明,多糖链构象的研究对弄清其生物功能和推动生命科学发展十分重要. 多糖在溶液中主要以无规线团、双螺旋、三螺旋、蠕虫状、棒状链以及聚集体构象存在,它取决于单糖组成、糖苷键、支链结构以及分子内和分子间作用力. 测定链构象的方法主要包括光散射、黏度、显微技术(透射电镜,扫描电镜以及原子力显微镜)、微量热法和小角 X-射线散射等. 此外,介绍了多糖溶液理论以及计算链构象参数的表达式.

关键词 菌类多糖, 链构象分子量, 表征方法, 生物活性

多糖是生命有机体不可缺少的组成部分,是生物体内除蛋白质和核酸外又一类重要的生物大分子^[1-3]. 与蛋白质和核酸相比,糖类在生命过程中是最理想的信息载体,它能以最小的结构单元承载最大的生物信息量. 多糖还参与细胞的各种生命现象及生理过程的调节,具有多种生物学功能,例如免疫修饰和抗肿瘤活性. 多糖及其复合物在细胞识别、生物信息携带和传递、新陈代谢和分泌、机体免疫反应调节以及蛋白质转移等生命活动中起重要作用. 因此,具有生物活性的多糖类化合物又称为免疫调节剂(immunomodulator)、免疫引发剂(immunoinitiator)或生物反应修饰剂(biological response modifier).

菌类多糖是从真菌(香菇、灵芝、茯苓、木耳、虎奶菇、黄单胞菌、裂褶菌等)子实体、菌丝体、菌核以及发酵液中分离出的一类碳水化合物活性物质. 它们主要有 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖、 α -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖、糖蛋白、中性杂多糖和酸性杂多糖等. 不少真菌多糖对危害人类健康的疾病有显著疗效,并且其生物功能与它们的链构象密切相关. 因此,只有弄清多糖分子在溶液中的链构象才能深入研究它们的生物活性以及揭示它们在生命过程中的

作用,从而更好地利用它们.

1 多糖概述

1.1 多糖生物活性

自从 Chihara^[4]等于 1969 年发现香菇多糖具有抗肿瘤活性和增强机体免疫功能以来,已发现具有抗肿瘤活性的药用真菌达二百多种^[5-11]. 多糖类化合物是优良的免疫调节剂,它们能增加巨噬细胞和白细胞的吞噬功能、诱导产生细胞坏死因子(TNF)和白细胞素,从而增强人体的免疫功能,而且对正常细胞几乎无毒副作用^[12,13]. 据报道巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK)和细胞毒性 T 细胞(CTL)对某些多糖有特殊结合作用,可激发免疫淋巴细胞的吞噬作用致使肿瘤细胞凋亡或坏死,某些多糖通过直接细胞毒性作用抑制肿瘤细胞增殖^[14]. 已发现有的多糖硫酸酯衍生物具有抗爱滋病毒(HIV)作用,它可以与 T 细胞和正常细胞的 CD4⁺受体优先结合,从而抑制 HIV 与正常细胞结合,降低 HIV 对机体的感染^[15-18]. 此外,菌类多糖还具有抗炎症^[19]、抗氧化^[20]、抗病毒^[18,21]等活性,而且多糖中含蛋白质有利于抑制白血病细胞增殖^[22].

* 2010-07-29 收稿,2010-09-25 修稿;国家自然科学基金重点项目(基金号 30530850)、国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2006AA02Z102)和国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2010CB732203)资助;** 通讯联系人,E-mail:lnzhang@public.wh.hb.cn, lnzhangwhu@gmail.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2010.10232

人体免疫系统中已发现 β -葡聚糖特异性受体,这说明为什么某些葡聚糖具有增强机体免疫力的功能,由此真菌多糖结构与生物活性关系的研究日益引人注目^[23,24]. C 型凝集素受体 (dectin-1) 是最近发现的一种葡聚糖特异性受体,它广泛分布在巨噬细胞上^[25]. 它与免疫系统有紧密联系,并已证实菌类多糖可以刺激免疫系统提高机体的免疫功能. 香菇 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖是目前已知最强免疫增强剂之一,它几乎无任何副作用. 据报道,三螺旋链裂褶菌 β -D-葡聚糖当分子量不太高时具有较强的抗肿瘤活性^[26]; 1 $\rightarrow$ 6 键接支链的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖能提高机体免疫功能^[27]; β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的免疫增强活性与螺旋链结构及其外表的羟基有关^[28,29]. 尤其,科学家已发现 β -葡聚糖与动物和人类的免疫细胞,包括单细胞^[30]、巨噬细胞^[31~33]、中性粒细胞^[34]和自然杀伤细胞^[35],发生特异性结合,增强机体免疫功能.

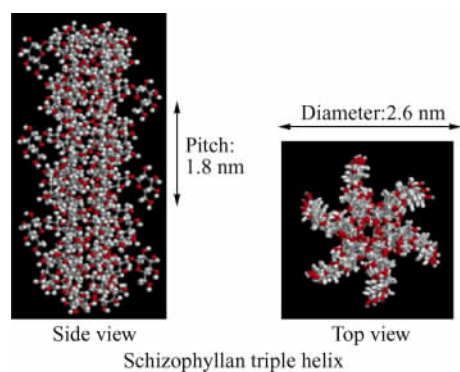


Fig. 1 A representative model of schizophyllan triple helix^[27]. Copyright 2010 Springer Science.

1.2 多糖三维结构

多糖在溶液中的分子空间三维结构和构象对生物功能的影响以及对生命科学发展十分重要. 传统上,高分子链构象是指高聚物主链由于 C—C 单键内旋转造成高分子在空间的各种形态. 合成高分子在溶液中可呈现无规线团、半柔顺或半刚性链、棒状链、扁椭圆球体、球形或球壳等,其中无规线团链构象最为常见. 与合成高分子相比,天然高分子具有更复杂的结构,因此其构象更加复杂多变,而且传统的构象定义无法描述多糖链构象. 多糖分子链在溶液中的可能构象主要有无规线团链、半柔顺性链、双螺旋、三螺旋和聚集体等^[36]. 图 1 示出三螺旋裂褶菌葡聚糖链构象模型. 在该多糖链中分子内氢键维持螺旋状,而分子间氢键

维持其三股链束缚在一起^[37]. 多糖分子链葡萄糖单元的 2-OH 侧是疏水面,而 6-OH 侧是亲水面^[38]. 其三螺旋结构是由螺旋内部的 2-OH 基团之间氢键支撑形成的稳定结构^[39]. 这种三螺旋结构的内腔相应疏水,类似环糊精内腔.

1.3 构效关系

多糖在水中的溶解度、分子量、支化度、化学结构和链构象明显地影响其生物活性. 香菇三螺旋葡聚糖具有较强的抗 S-480 肿瘤生物功能,而且其分子量适中的 ($5.0 \times 10^5 \sim 15.0 \times 10^5$) 多糖活性比分子量很低或者很高的都强^[40],当三螺旋链转变成单股柔顺链后活性明显降低^[41]. 茯苓 α -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖是线型水不溶性多糖,它几乎不显示抗肿瘤活性,而它的硫酸酯及磷酸酯衍生物却显示很强的抑制肿瘤细胞增殖的作用,而且是通过诱导凋亡达到抑制肿瘤细胞增殖^[42~44]. 灵芝线型 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖是水不溶性多糖,然而它的硫酸酯化和羧甲基化衍生物是水溶性多糖,它们均具有良好的抑制肿瘤生长和低毒副作用,以及促进肿瘤细胞早期凋亡的作用^[45]. 由此表明,磷酸酯或硫酸酯基团的引入以及较伸展的链构象可增加多糖与免疫细胞受体结合的机会,激发免疫反应从而导致抗癌活性增强. 据报道, β -葡聚糖可以通过与细胞表面的受体结合,引发依赖于病原相关模式识别所引起的体液、细胞和酚氧化反应,从而提高机体免疫功能^[46].

多糖支化链有利于提高其水溶性,而且良好的水溶性、高支化球状及刚性链构象有利于提高多糖的抗癌活性^[47]. 虎奶菇高支化链多糖的硫酸酯衍生物能诱导人体肝癌 HepG₂ 细胞凋亡,它们对免疫反应的调节作用可通过肿瘤坏死因子 TNF- α 来介导^[48]. 此外,通过微米化虎奶菇,可以降低多糖分子量,而且明显提高多糖的溶解性和生物活性^[49].

值得注意的是,多糖分子具有聚集和自组装的倾向,这种现象与它在生命过程中的作用有关. 裂褶菌葡聚糖 (SPG) 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中变性为单股无规线团后,与聚核苷酸的水溶液混合,则两条多糖链和一条聚核苷酸链重新组装形成新的三螺旋复合链^[50,51]. 图 2 示出分子模拟得到的裂褶菌葡聚糖和聚胞嘧啶核苷酸 (poly(C)) 重新组装成三螺旋复合物的最稳定结构^[52]. 聚核苷酸与多糖链通过主链 C-2 位 OH 基的氢键作用结合在一起. 然而,在水溶液中可形成聚集体的聚

尿嘧啶核苷酸 (poly(U))、聚鸟嘌呤核苷酸 (poly(G))、聚次黄嘌呤核苷酸 (poly(I))、聚脱氧胞嘧啶核苷酸 (poly(dC)) 和聚脱氧鸟嘌呤核苷酸 (poly(dG)) 则不能与变性的单股链裂褶菌葡聚糖复合为三螺旋结构. 因为这些聚集体本身已形成分子间氢键, 没有可利用的氢键作用点.

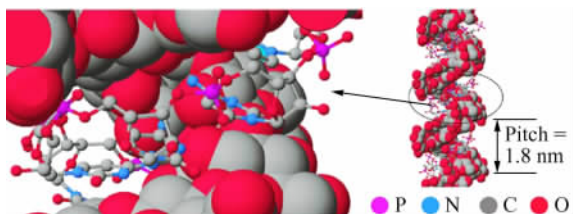


Fig. 2 The most stable structure for the poly(C)/s-SPG complex obtained by molecular mechanics calculations. The glucan chains are presented by the CPK model and the poly(C) chain by a ball-and-stick model^[62]. Copyright 2004 Elsevier.

2 多糖链构象表征

多糖链构象主要由它在稀溶液中的分子参数确定, 同时也可用显微技术直接观察. 研究多糖分子量、链尺寸和构象 (统称二级结构) 的方法, 主要包括静态和动态光散射、尺寸排除色谱、黏度法、荧光光谱、NMR、小角 X-射线散射、小角中子散射、原子力显微镜、透射电镜和示差扫描量热法等^[6].

2.1 光散射法 (LS)

静态激光光散射 (LLS) 主要依据高分子溶液中光的散射性质与大分子质量、尺寸、浓度有关的特性, 检测高聚物的分子量、链尺寸和形态等^[6,53]. 由光散射法测得不同浓度 (c) 和不同散射角 (θ) 下的散射光强 (I_θ) 数据, 按 Zimm 图外推求取高聚物的重均分子量 (M_w)、均方旋转半径 ($\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$) 和第二维利系数 (A_2). 除用 Zimm 拟合方法处理光散射数据外, 还可采用 Debye 或 Berry 等拟合方法处理实验数据. 我们从黑木耳子实体中分离出的一种水溶性酸性葡聚糖 AAG, 其主链为 β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡聚糖, 在 C-6 位部分被 D-葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸取代 (摩尔比为 6:1). 图 3 示出由 LLS 得出该多糖在 0.1 mol/L NaCl 水溶液的 Zimm 图. 由此得出该酸性葡聚糖在 0.1 mol/L NaCl 水溶液中的 M_w 和 $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ 分别为 2.88×10^5 和 45.5 nm, 它的 $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ 值比相同分子量的柔顺链高分子相对偏大, 反映出半刚性链

的特征^[64].

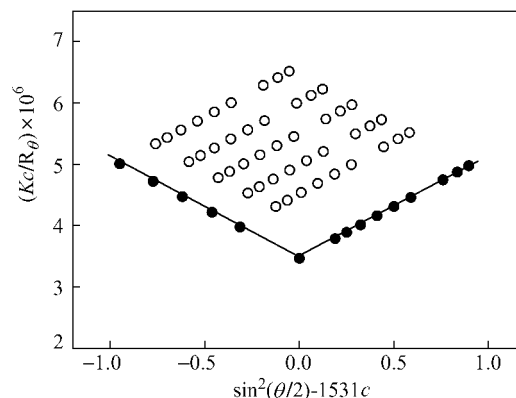


Fig. 3 The Zimm plot of the fraction AAG in 0.1 mol/L NaCl^[64]. Copyright 2008 Wiley-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA.

Yamakawa 等按照螺旋形蠕虫链模型 (HW) 提出大分子参数的理论关系式, 它可用于计算链刚性参数. 通常用持续长度 (q) 和单位围长摩尔质量 (M_L) 描述高分子链的刚性. 对于多糖螺旋链、刚性或半刚性链, 可以用重均分子量 (M_w)、均方旋转半径 ($\langle s^2 \rangle$) 按照以下表达式计算出 q , M_L 等构象参数^[55,56]

$$(M_w^2/12 \langle s^2 \rangle)^{2/3} = M_L^{4/3} + (2/15) (M_L^{1/3}/q) M_w \quad (1)$$

$$(M_w / \langle s^2 \rangle)^{1/2} = (3M_L/q)^{1/2} + 3M_L (3qM_L)^{1/2} / 2M_w \quad (2)$$

其中, (1) 式适用于 $M_w/2qM_L < 2$ 的情况. 以 $(M_w^2/12 \langle s^2 \rangle)^{2/3}$ 对 M_w 作图, 则由直线外推的斜率和截距可求得 M_L 和 q 值. 当高聚物的 $M_w/2qM_L > 2$, 即链的刚性稍低时, 则采用公式 (2) 计算 M_L 和 q 值. 如果螺旋链高分子溶于一种可以破坏维持其多股螺旋结构的分子内和分子键氢键的强极性溶剂如二甲亚砜 (DMSO) 或镉乙二胺饱和水溶液 (cadoxen) 中, 则多股螺旋链立即解开并卷曲形成单股无规线团或柔顺链. 因此通过比较螺旋链高分子在水溶液和在强极性溶剂中的 M_w 值, 由下式可计算多糖螺旋链在水溶液中分子链的股数 (n_s).

$$n_s = M_{w,H_2O} / M_{w,DMSO} \quad (3)$$

由上述方法得出黄原胶多糖 (一种聚电解质多糖) 在 0.01 mol/L HCl/0.01 mol/L NaCl 水溶液中 (pH=2) 的构象参数. 它的螺距 (h)、单位围长摩尔质量 (M_L) 和持续长度 (q) 分别为 0.47 nm、1900 nm⁻¹ 和 68 nm, 由此确定黄原胶为双螺旋链

构象^[65]. 然而, 其持续长度仅为黄原胶在中性水溶液中的一半, 这主要由于酸性介质使多糖分子中静电排斥效应降低, 从而抑制其链伸展.

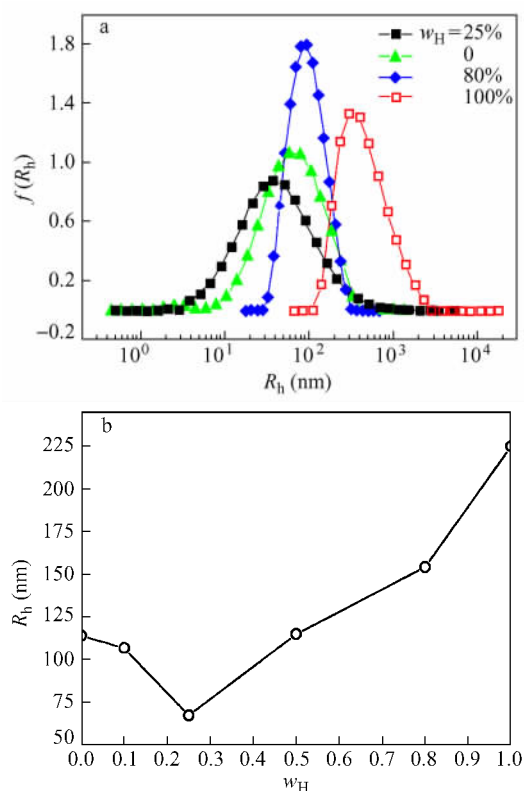


Fig. 4 The distributions of hydrodynamic radius R_h for lentian in desired water-diluted DMSO solutions (■ and ◆), pure DMSO (▲) and water (□) at a fixed c of 0.95×10^{-3} g/mL at 25°C , where $\theta = 90^\circ$ (a) and w_H dependence of R_h for lentian in water-diluted DMSO solutions with a fixed c of 0.97×10^{-3} g/mL at storage time of about 2 h, where $\theta = 90^\circ$ (b) ^[67]. Copyright 2004 American Chemical Society.

动态光散射法(DLS)主要测量散射光强随时间的涨落, 故称为“动态”. 动态光散射常用于表征大分子尺寸或粒子直径分布. 平移扩散系数($\langle D \rangle$)是由动态光散射得到的最简单信息^[66, 63]. 由 $\langle D \rangle$ 可以求得高分子在稀溶液中的平均流体力学半径 $\langle R_h \rangle$. 通过静态、动态光散射可得到高分子在稀溶液中的 M_w 、均方根旋转半径($\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$)、 A_2 、 $\langle D \rangle$ 和 R_h 等数据. 由 R_g 和 R_h 值得到结构参数 $\rho (= R_g/R_h)$, 它是与高分子链构象相关的参数. 一般规律为, 当 $\rho = ca. 0.77$ 时, 硬球构象; $\rho = 1.0 \sim 1.1$, 高支化链; $\rho = 1.5 \sim 1.8$, 线型柔顺链; $\rho > 2$, 刚性链. 图4示出变性为单股无规线团的香菇葡聚糖在DMSO溶液中

随水含量(w_H)变化的 R_h 分布. 如图4(a)所示, 当DMSO/ H_2O 混合溶剂中水含量(w_H)低, 香菇葡聚糖的 R_h 值较小; 当 $w_H = 0.25$ 时, R_h 达最小, 表明此时无规线团发生塌陷. 然而, 随着 w_H 增加, R_h 逐渐增大, 表明随水的增加, 香菇葡聚糖无规线团链发生聚集, R_h 分布峰值移向较大尺寸. 图4(b)示出香菇葡聚糖分子的 R_h 值随 w_H 变化曲线. 它反映分子链构象由无规线团 $\rightarrow$ 塌陷 $\rightarrow$ 聚集的变化过程^[67]. 右旋糖酐(dextran)是一种高支化多糖. 图5示出它不同分子量的级分在0.5 mol/L NaOH溶液中的均方根旋转半径、流体力学半径以及参数 ρ 与分子量的依赖关系. 它的 ρ 值为1.22, 表明该右旋糖酐属于高支化多糖^[68].

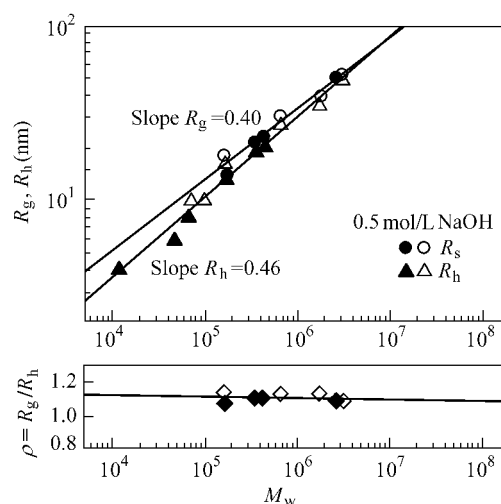


Fig. 5 Molar mass dependences of the radius of gyration (circular symbols) and the hydrodynamic radius (triangular symbols) for different samples in 0.5 mol/L NaOH. The lower part shows the ρ parameter (line: regression through the points) ^[68]. Copyright 2000 American Chemical Society.

此外, 动态光散射也是一种给出高分子聚集体结构及动力学过程的可靠方法^[69]. 当多糖溶液中存在两种链构象或是两种链尺寸相差较大时, 在DLS测量中表现为快扩散和慢扩散两种模式. 采用DLS与SLS相结合的方法可同时研究两种组分的链构象、尺寸及分子量等. 通过DLS测量得到两种模式的振幅, 结合在SLS中测得的总的时间平均散射光强($\langle I(q) \rangle$)和在动态光散射测量中通过双幂函数拟合或者CONTIN拟合得到的振幅($A(q)$), 可以由下式计算出每个模式对应的散射光强.

$$I_{\text{fast}}(q) = A_{\text{fast}}(q)I(q)$$

$$I_{\text{slow}}(q) = A_{\text{slow}}(q)I(q) \quad (4)$$

$$I(q) = I_{\text{total}}(q) = I_{\text{fast}}(q) + I_{\text{slow}}(q) \quad (5)$$

式中, $I_{\text{fast}}(q)$ 和 $I_{\text{slow}}(q)$ 分别为高聚物浓度波动下快扩散时间和慢扩散时间对应的时间平均光强. 分别按 Zimm 图外推可求取二种链构象参数^[69]. 采用这种方法可以准确地测量出多糖溶液中聚集体和单股链的分子量和尺寸以及它们的组成比. 硬质葡聚糖是一种三螺旋链多糖, 用碱变性并复性后可以得到三螺旋链与环状链共存的多糖溶液^[60,61]. Sletmoen 等用 DLS 与 SLS 相结合的方法研究了这种硬质葡聚糖变性-复性后溶液中多糖链构象, 并得出该三螺旋链分子量为 3.9×10^5 , R_g 为 136 nm, R_h 为 92 nm^[62].

2.2 尺寸排除色谱(SEC)

SEC 或称凝胶渗透色谱(GPC)基本原理是依据高分子渗透进入多孔填料孔洞中的几率对其分子尺寸的依赖关系^[66,63], 由此得出高分子尺寸大小随保留时间(或保留体积)变化的曲线, 即分子量分布色谱图. 它是测量分子量的相对方法, 当标定曲线用的标样与待测高分子的结构或链刚性相差较大时, 则得出的分子量误差比较大. 然而尺寸排除色谱和光散射联用(SEC-LLS)则成为绝对方法, 可直接测定 M_w 、多分散系数(d)和 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$. 目前这种技术采用示差折光仪、紫外光度计、黏度计多个检测器与 SEC 柱联用在线检测高聚物分子量及其分布. 由 SEC 柱淋洗出的分布曲线上每个点皆视为单分散的级分, 因此光散射检测能测定每个级分的 $M_{w,i}$ 和 $\langle S^2 \rangle_{z,i}^{1/2}$. 将无数个级分的 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ 对 M_w 作图, 得到 $\langle S^2 \rangle_z^{1/2} = KM^\alpha$ 关系式, 由 α 值可初步判断高分子链构象. 其指数 α 反映分子链构象, 它为 0.33、0.50~0.60 和 1 时, 分别表示高分子为球状、无规线团和刚性棒状链构象. 同时还可利用这些数据并且结合高分子溶液理论计算高分子的构象参数 q 和 M_L , 由此进一步推断高分子链构象. 我们用 SEC-LLS 得到香菇 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖在 0.5 mol/L NaOH 水溶液中的 SEC 图谱^[63]. 由 SEC-光散射和黏度数据计算出它在水溶液中的构象参数 ($M_L = 2180 \text{ nm}^{-1}$, $q = 120 \text{ nm}$, $h = 0.31 \text{ nm}$), 它们符合三螺旋链理论模型^[64]. 同时证明它在水/DMSO 混合溶液中由三螺旋链转变为单股无规线团构象, 该有序-无序构象的转变点在 80%~85% DMSO 水溶液范围.

Matsuda 等用 CD(圆二色谱)和 SEC-LLS 研

究了黄原胶的在溶液中的热变性, 复性和聚集的不同变条件. SEC-MALS 结果表明, 黄原胶双螺旋在变性浓度 $c(d)$ (黄原胶浓度) $\leq 1 \text{ mg/cm}^3$ 时, 解离成两股单链. 同时, 黄原胶单股链在复性过程中重组形成发夹环状的分子间双螺旋结构. 此时, 黄原胶二聚体在 $c(d) = 10 \text{ mg/cm}^3$ 浓度变性成非匹配的配对聚集体, 此外它复性的聚集程度随加入的盐浓度升高而增加^[65].

2.3 黏度法

黏度法是测量分子量的相对方法. 高分子-溶剂间的热力学相互作用决定高分子线团体积, 一定质量高分子的流体力学体积是由其特性黏数 ($[\eta]$) 表达. 高分子溶液的黏度与分子量、分子形态、支化度、高分子与溶剂分子间相互作用以及分子链在溶液中的穿流行为有关^[66~70]. 将 $[\eta]$ 代入相同高分子在同一溶剂和温度下建立的 Mark-Houwink 方程 ($[\eta] = KM^\alpha$), 可求出黏均分子量 (M_η). 此外, 由 Mark-Houwink 方程指数 α 可初步判断高分子在溶液中的链构象^[71]. 通常, α 为 0~0.3、0.5~0.8、1~2 分别表示高分子链在溶液中呈现紧缩线团、 θ 条件下卷曲线团、柔顺链、较伸展链及半刚性和刚性链构象. 多糖的 $[\eta]$ 值在不同条件下的变化可反映它在溶液中的构象转变. 琥珀葡聚糖在 0.01 mol/L NaCl 水溶液中 25℃ 下以双股螺旋链构象存在, 但升高温度会导致其构象转变. 图 6 示出该多糖 3 个试样的 $[\eta]$ 对温度依赖关系^[72]. 由不同温度下的特性黏数值的趋势可得出, 在 40~75℃ 范围内, 其构象发生双螺旋-单股无规线团链构象转变. 75℃ 左右

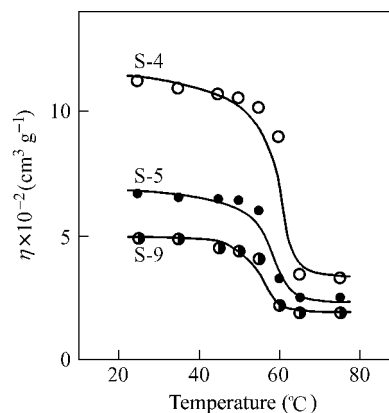


Fig. 6 Temperature dependence of $[\eta]$ for succinoglycan samples S-4, S-5, and S-9 in 0.01 mol/L aqueous NaCl^[72]. Copyright 2003 American Chemical Society.

该多糖完全转变为无规线团。

2.4 原子力显微镜 (AFM)

AFM 是近十年发展的研究生物大分子构象的有力工具. 它超越了光和电子波长对显微镜分辨率的限制, 可在三维立体上观察大分子链形貌和尺寸, 并能获得探针与大分子链相互作用的信息. 由此, 可以在接近生理环境的条件下, 用特殊的原子探针 (probe) 对蛋白质^[73]、DNA^[74] 和多糖^[75] 等生物大分子的形态和构象进行直接观察和研究. McIntire 等^[76-78] 用 AFM 观测到裂褶菌葡聚糖 (schizophyllan) 和硬葡聚糖 (scleroglucan) 的刚性三螺旋链结构, 并发现经加热处理后三螺旋链结构变为单股无规线团链的构象转变. 当裂褶菌多糖或菌核多糖的单股链与 DNA 或 RNA 形成更刚性的三螺旋链时, 可观察到更清晰的 AFM 照

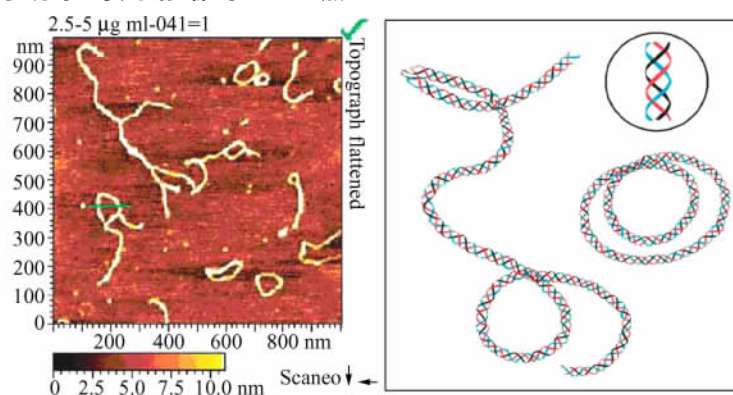


Fig. 7 AFM image and schematic of the lentinan solution at 25 °C^[85]. Copyright 2008 American Chemical Society.

Marszalek^[75] 等扩展了 AFM 的应用范围, 提出单分子原子力谱技术 (SMFS), 可以在单个分子水平上研究溶液中多糖链构象, 尽管多糖链的张力相对低. 与其他聚合物相似, 但它的行为类似熵弹簧. 用 AFM 进行拉伸测量时证明在较高作用力下, 大多数多糖的弹性偏离聚合物弹性的熵模型. 力-伸展平台特性表现出这些偏离, 它反映各种由力诱导的糖环的构象转变. 由于多糖链应力-应变曲线与多糖结构及链构象有关, 不同的多糖具有其各自的特征“指纹”应力-应变曲线. AFM 在活细菌表面多糖的研究中的成果已有报道^[86-88]. 例如, 用多糖受体, 如凝集素-I (lectin-I) 修饰的 AFM 针尖检测细胞表面多糖力的拉伸曲线, 可以确定细胞表面多糖的种类^[86-88].

单分子力谱 (SMFS) 不仅可以反映柔顺单链聚合物的力学性能, 而且可检测多糖的特殊二级结构. 例如, 用 SMFS 得出原始的黄原胶与升温之

片^[79]. Shinkai 等^[80] 利用 AFM 技术观察到变性的单链裂褶菌葡聚糖和凝胶多糖在复性为三螺旋链时与单壁碳纳米管 (SWNTs) 结合, 并且发现在 SWNTs 纤维表面组装成条纹状有序结构. 另外, 人们还利用 AFM 成功研究了吉兰胶在凝胶化过程中的构象变化^[81]、海藻酸凝胶化过程中阳离子桥状态的结构^[82]、果胶支化和侧链长度^[83] 以及双螺旋链黄原胶的凝胶网络形成过程^[84]. 我们采用高分子构象参数和 AFM 证明香菇三螺旋链多糖在水溶液中它形成蠕曲的三螺旋链, 而不是伸展的刚直链. 图 7 示出由 AFM 得到的香菇三螺旋 β -D-葡聚糖在水溶液中的分子链形态^[85]. 由于该三螺旋分子链很长, 因此主链弯曲导致分子内自缠结形成蠕虫状、环状以及交迭的螺旋链结构.

后变性的黄原胶的力曲线截然不同 (图 8), 反映其热致无序-有序转变. 这是由于原始的黄原胶具有螺旋结构, 其力曲线出现与有序构象相关的一个平台. 然而, 变性为单股柔顺链的黄原胶的力曲线中平台消失, 表明有序构象已破坏^[89]. 单分子力谱能够反映 α -(1,4)-键接糖环的纳米力学指纹——力诱发船-椅式构象转变, 这是传统方法无法做到的^[90]. 通常, 由 SMFS 实验得到的是光电二极管电压 (piezopath) 的记录信息, 需要将其转化成力-拉伸曲线. 首先计算出悬臂梁刚接触和按压基底发生变形产生的斜线部分的斜率 s (电压/长度). AFM 针尖与基底之间的真实距离 x 可以通过 piezopath (a) 根据 $x = a - s^{-1}ph_{a-b}$ (ph_{a-b} 为光电二极管电压). AFM 悬臂的弹簧常数 k_c 通过热方法校准, 而悬臂梁产生的力则由公式 $F = k_c(x - a)$ 得到^[91]. 这样就得到 $F-x$ 力曲线. 由于大分子在基底上的多分散性和拉伸点的不确定性, 导

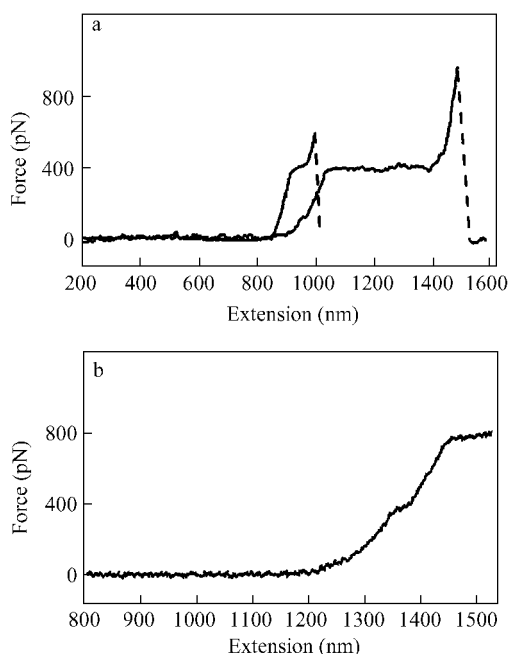


Fig. 8 (a) Force curve of native xanthan in PBS buffer and (b) force curve of native xanthan showing double plateau^[9]. Copyright 1998 Wiley-VCH Verlag GMBH & CO. KGaA.

致聚合物链的拉伸长度不同. 为了比较这些力曲线, 分子的伸展数值必须经过归一化. FJC 模型指出链伸展 x 在力 F 作用下, 与聚合物轮廓长度 L_c 成比例. 因此, 当 x 除以 $x(F_0)$ [$x(F_0)$ 为较低力值 F_0 作用下的伸展], F_0 归一化后伸展数值设定为 1, 其他力作用下的伸展则为 F_0 作用下的百分数. 多条归一化后力曲线能够很好的重叠表明其为单链拉伸. 这是由于半径为 20 ~ 50 nm 针尖仅允许少量的链吸附在上面, 不同长度的链同时被拉伸表现出复杂的力信号^[9]. 据报道, 多糖力曲线一般用 M-FJC 模型 (式 (4)) 进行拟合^[2]. M-FJC 模型以扩展的 Langevin 函数为基础, 假定大分子由统计独立片段组成, 这些片段是自由连接在一起且能在应力下发生变形.

$$x(F) = \left[\coth\left(\frac{FI_k}{k_B T}\right) - \frac{FI_k}{k_B T} \right] (L_c + nF/K_{\text{segment}}) \quad (6)$$

x 为聚合物链的拉伸长度; F 为施加在单链上的力; L_c , I_k 为链轮廓长度和库恩长度; $n (= L_c/I_k)$ 为库恩片段的数量; k_B 为玻尔兹曼常数; T 为绝对温度. 用片段弹性 K_{segment} 来表征片段的变形. 聚合物单链的弹性由库恩长度和片段弹性表示. $K_0 (= L_c/I_k)$ 也可以表示用来进行链弹性的比较.

2.5 示差扫描微量热法 (Micro-DSC)

Micro-DSC 可以精确测量大分子由动态过程产生微小 ($0.084 \mu\text{J/s}$) 能量变化^[3,94]. 因此利用它可以研究高分子络合与缔合、熔融、结晶、相转变、玻璃化转变等变化以及分子动力学. 通过在温度变化或某一恒定温度过程中产生的能量信息, 还可以得到大分子间和表面或界面之间的相互作用以及分子的组装和识别等相关信息. 我们采用黏度法以及 Micro-DSC 研究了香菇三螺旋链多糖在 DMSO/水混合溶液中的氢键变化即构象转变^[5]. 比浓对数黏度 ($\ln\eta_r$) 和 DSC 结果揭示它随温度升高发生两种不同的构象转变. 图 9 示出在低温区 ($0 \sim 60^\circ\text{C}$) 发生从主链高度固定的三螺旋 I 到较易转动的三螺旋 II 的可逆转变; 在高温区 ($60 \sim 130^\circ\text{C}$) 三螺旋链解开为单股柔顺链. 第一转变区的三螺旋 I 是由侧链与水团簇氢键结合形成缔合水层, 它使主链高度固定, 而三螺旋 II 则是主链和侧链相对易转动的结构. 第二转变区由于维持香菇三螺旋链多糖三螺旋结构的分子内和分子间的氢键同时被破坏而引起急剧变化, 即变性为单股柔顺链, 因此 $\ln\eta_r/c$ 和 C_p 曲线都出现突变. 由此得出, 三螺旋多糖在水溶液中存在多种氢键作用, 导致随温度变化而发生多重构象转变^[5].

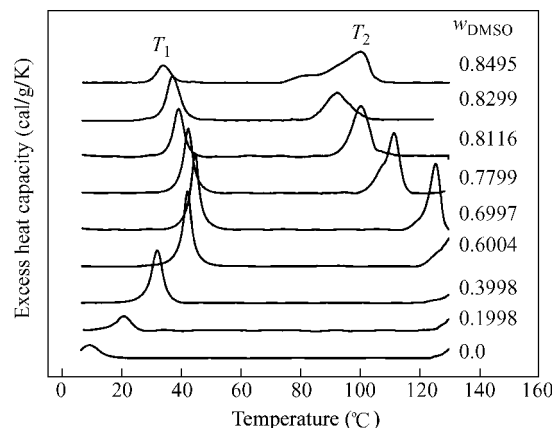


Fig. 9 Temperature dependence of the specific heat capacity (C_p) for lentinan in DMSO/ H_2O mixtures detected by US-DSC^[5]. Copyright 2009 American Chemical Society.

2.6 透射电镜 (TEM)

TEM 是研究高分子形貌和内部结构的重要仪器之一. 它利用透射电子成像从而获得多糖分子链的高分辨率超微结构图像^[6~98]. TEM 可用于观察多糖的三维尺寸、大分子单链及其聚集体

等,粒子尺寸可达纳米级.裂褶菌葡聚糖三螺旋链内腔的疏水作用使它能与 SWNTs 复合形成螺旋状复合物^[67].图 10 示出利用高分辨 TEM 观察到的氨基修饰裂褶菌葡聚糖/单壁碳纳米管与磺氨基修饰裂褶菌葡聚糖/单壁碳纳米管复合物通过静电相互作用力自组装结构^[69].图 10(a)和 10

(b)示出氨基修饰裂褶菌葡聚糖/单壁碳纳米管以及氨基修饰裂褶菌葡聚糖/单壁碳纳米管在水溶液中为单分散.图 10(c)和 10(d)示出两种单分散的复合物在静电作用力下发生了自组装形成新的带状结构.

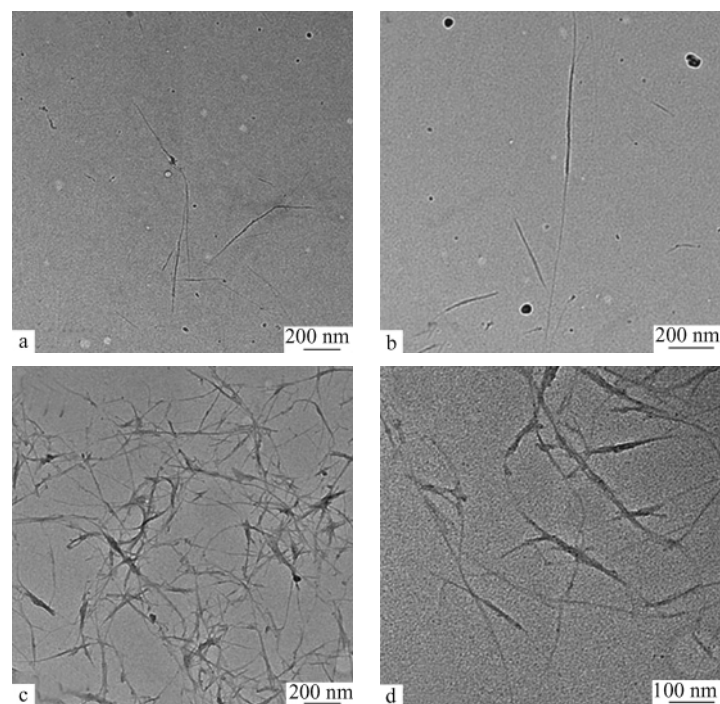


Fig. 10 TEM images of (a) $\text{cur-N}^+/\text{SWNT}$ composite, (b) $\text{cur-SO}_3^-/\text{SWNT}$ composite, (c) fibrous bundle structure containing the limited number of SWNTs ($[\text{cur-N}^+/\text{SWNT}]/[\text{cur-SO}_3^-/\text{SWNT}] = 1/5$) and (d) magnified TEM image of (c)^[69]. Copyright 2008 Wiley-VCH Verlag GMBH & CO. KGaA.

利用透射电镜可以直接观察球形高分子的尺寸,并且计算分子量及其分布.分子量愈大,测量误差愈小.由 TEM 法测定分子量(M)按下式计算

$$M = (1/6)N\pi d^3\rho \quad (7)$$

式中 N 是阿佛加德罗常数; ρ ,试样的本体密度; d ,球粒直径.而且由分子尺寸分布可按式计算球形高分子的重均、数均分子量及分散度指数(M_w/M_n).

2.7 小角度 X-射线散射(SAXS)

SAXS 依靠原光束附近很小角度内电子对 X-射线的漫散射现象,可用于测量 1 ~ 100 nm 的尺度范围分子结构^[100,101].SAXS 能够提供多糖溶液从稀到浓乃至固态的链构象信息,而且可测量固态、液态试样. Gawronski 等^[102]用 SAXS 研究了一种霉菌多糖(cinerean)经超声波降解的级分在稀溶液中的链构象.这种霉菌多糖是 β -(1,3)(1,6)-D-葡聚糖^[103],在水溶液中为持续长度较大的

蠕虫状链构象.它经过超声波降解后的级分为棒状链构象^[104].SAXS 结果表明,霉菌多糖级分在水溶液中为棒状链构象,单位围长摩尔质量(M_L)为 $(2400 \pm 300) \text{ nm}^{-1}$,分子链直径(d)为 $(1.7 \pm 0.2) \text{ nm}$,仍然符合三螺旋链构象理论模型.同时发现它溶液中出现了相分离,是由棒状链紧密堆积导致的相分离,紧密堆积结构直径为 1.9 nm.

上述几种表征方法中,黏度法是研究多糖链尺寸和形态变化最简便的方法.尤其当多糖溶液的温度、压力、溶剂组分发生变化时,其构象转变很容易通过 $[\eta]$ 或比浓黏度(η_{sp}/c)数据显示.但它是相对方法,必须依靠其它的绝对方法进一步确定.光散射法是测定高聚物重均分子量和尺寸的绝对方法,可以直接给出多糖的链构象参数,并且能精确反映链构象转变,适用于从 10^3 到 10^8 分子量范围的多糖研究.但是它对样品和溶剂纯

度要求较高. 当多糖溶液中存在聚集或者多糖分散度大时, 往往不能给出真实的链构象参数. 将尺寸排除色谱与光散射联用可以节约样品用量, 并能研究稀溶液中多糖链构象. 透射电镜和原子力谱可以给出多糖链的直观形貌, 需要的样品较少, 但需要用光散射测量的参数来分析它得到的图像是否真实反映它的单股链还是聚集体构象. 由于多糖主要含 C、H、O 等轻元素, 衬度低, 在进行 TEM 测试时往往需要对多糖样品进行染色, 不可避免会对多糖链真实形貌产生影响. 微量热法可以精确测量大分子由动态过程产生微小 ($0.084 \mu\text{J/s}$) 能量变化. 通过在温度变化或某一恒定温度过程中产生的能量信息, 还可以得到大分子间和表面或界面之间的相互作用以及分子的组装和识别等相关信息. 小角度 X-射线散射法能够提供多糖溶液从稀到浓乃至固态的链构象信息, 而且可测量固态、液态试样. 与光散射法相比, 它可以测量固态样品, 可测量的多糖分子尺寸在 $1 \sim 100 \text{ nm}$ 范围的分子结构, 它可以测量比光散射法 ($10 \sim 1000 \text{ nm}$) 更小尺寸范围的分子结构.

3 多糖在溶液中链构象

多糖在溶液中的三维结构和空间构象对多糖活性起重要作用. 多糖由于链接方式、支化结构、支化度、分子内氢键及取代基团的静电排斥作用不同导致它们的分子在溶液中以不同形态存在, 主要为球形链、无规线团、半柔顺链、单一和双螺旋、三螺旋链构象存在溶液中. 其中单螺旋链构象较少见, 但是在一些双螺旋或者三螺旋构象转变

中观察到单螺旋链构象中间体存在. 因此, 即使化学结构相同的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖, 它们来自不同真菌则存在不同相互作用力引起不同链构象, 例如无规线团 (茯苓葡聚糖)、聚集体 (虎奶菇葡聚糖)、三螺旋 (香菇葡聚糖) 等.

3.1 球形链 (sphere chain)

高度支化的多糖由于其独特的分枝结构使它在溶液中呈球形的链构象. 我们从虎奶菇菌核中提取出一种水溶性多糖 (TM3b). 它是 β -(1 $\rightarrow$ 6), β -(1 $\rightarrow$ 4), β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1, 4, 6)-链接的高支化 β -D-葡聚糖, 取代度为 57.6%, 并且 M_w 为 9.2×10^5 . TM3b 及其硫酸酯衍生物在水溶液中的 Mark-Houwink 方程分别为 $[\eta] = 0.18 M_w^{0.28 \pm 0.03}$ 和 $[\eta] = 2.24 \times 10^{-2} M_w^{0.52 \pm 0.06} (\text{mL/g})$. 它们较低的 α 指数值表明多糖分子在水溶液中为紧缩线团或球状链构象, 而且 TEM 显示该分子链在水中呈现球形链^[88,105]. 我们通过高温、高压从虎奶菇菌核中提取出另一种水不溶性高支化多糖 (TM3a). TM3a 是一种结构复杂的高分子量 β -D-葡聚糖, 支化度为 67.5%. 由于分子量很高, 尽管有支链, 也难溶于水. 它在 $0.25 \text{ mol/L LiCl/DMSO}$ 中的 $[\eta]$ 、 M_w 、 $\langle S^2 \rangle_z$ 和流体力学半径 (R_h) 分别为 $43.8 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 、 4.81×10^6 、 42.5 nm 和 30.7 nm . 该高支化多糖在 LiCl/DMSO 溶液中 $[\eta]$ - M_w 关系为: $[\eta] = 0.46 M_w^{0.30 \pm 0.01} (\text{mL g}^{-1})$, $\rho = \langle S^2 \rangle^{1/2} / R_h$ 值为 1.3 (图 11a). 由此确定这种高支化多糖在溶液中呈球形链构象. 并且用高分辨透射电镜 (TEM) 观察到 TM3a 的球状形态 (图 11b)^[106].

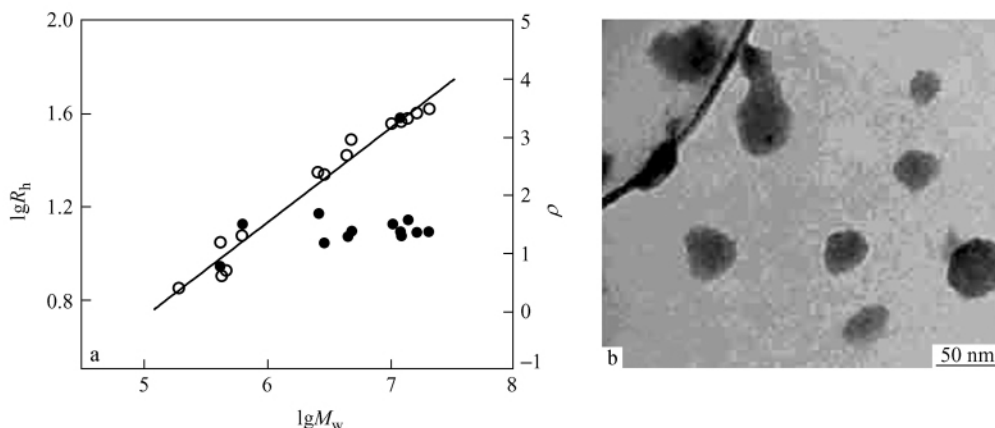


Fig. 11 Hydrodynamic radius ($\circ$) and ρ ($\bullet$) as a function of M_w for the TM3a fractions in $0.25 \text{ mol/L LiCl/DMSO}$ at 25°C (a) and TEM images of TM3a in $0.25 \text{ mol/L LiCl/DMSO}$ (b)^[106]. Copyright 2007 American Chemical Society.

3.2 无规线团链(random coil)

α 或 β -(1 $\rightarrow$ 6) 链接的直链多糖, 由于其分子链具有较大的内旋转自由度, 因此在溶液中通常以无规线团构象存在, 如茁霉聚糖(pullulan). 茁霉聚糖是以麦芽三糖为重复单元, 通过 α -(1 $\rightarrow$ 6)-糖苷键连接的直链多糖. 它在水溶液中的 Mark-Houwink 方程指数为 0.67, 极限特征比 $C_\infty = 4.3$, 表明它在水溶液中以柔顺的无规线团链构象存在^[107]. 我们从新鲜茯苓菌核中分离出一种水不溶性的葡聚糖, 并且用 ^{13}C -NMR 证明它是线型 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖(PCS3-II). PCS3-II 的分子量为 4.0×10^5 , 尽管 M_w 并不高, 但由于它是线型 β -D-葡聚糖, 因此不溶于水. 它可溶解在 0.5 mol/L NaOH/0.2 mol/L 尿素水溶液中, 并且它的 Mark-Houwink 方程为 $[\eta] = 3.39 \times 10^{-2} M_w^{0.62}$ (mL/g). 我们利用接触珠链模型得到 PCS3-II 在水溶液中的分子构象参数为: 持续长度(q) = 2.3 nm, 单位围长摩尔质量(M_L) = 580 nm^{-1} , 分子链直径(d) = $(0.8 \pm 0.2) \text{ nm}$, 极限特征比 $C_\infty = 3.6$. 由此得出, 该葡聚糖 PCS3-II 在溶液中确实是以柔顺性无规线团链构象存在^[108].

然而, 大多数 β -(1 $\rightarrow$ 4)- α -(1 $\rightarrow$ 3)- α -(1 $\rightarrow$ 4)- β -(1 $\rightarrow$ 3) 链接的线型菌类多糖在溶液中以半柔顺连构象存在. 半柔顺多糖的 q 和 C_∞ 值高于无规线团链. 此外, 大多数多糖硫酸酯衍生物和羧甲基衍生物在水溶液中呈较为伸展的半刚性链构象^[109-111].

3.3 双螺旋链(double helical chain)

DNA 是典型双螺旋链生物大分子, 除此之外也发现有些多糖以双螺旋链存在. 琥珀聚糖(succinoglycan)和黄原胶(xanthan)是两种水溶性生物大分子聚电解质, 它们在水中表现出双螺旋链构象. 琥珀聚糖是以 β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖和(1 $\rightarrow$ 3)链接的半乳糖为主链, 每隔 3 个主链残基上链接一个由 4 个(1 $\rightarrow$ 6)链接的葡萄糖组成, 另外还含有羧基和一个酮醛基的侧基. Dentini 等用旋光法、圆二色谱和微量热法等证明琥珀聚糖在水溶液中低温条件下存在有序结构^[112]. 同时 Kido 由静态光散射和黏度法测得的数据结合高分子溶液理论计算, 得到它在 0.01 mol/L NaCl 水溶液中 25 $^{\circ}\text{C}$ 下的构象参数为: $M_L = (1500 \pm 170) \text{ nm}^{-1}$, $q = (53 \pm 8) \text{ nm}$, $d = (2.5 \pm 1) \text{ nm}$. 这些参数符合双螺旋理论模型, 由此证明琥珀聚糖在水溶液中以双螺旋链构象存在. 然而, 它在

0.01 mol/L NaCl 水溶液中 75 $^{\circ}\text{C}$ 下, 构象参数变为 $M_L = (800 \pm 180) \text{ nm}^{-1}$, $q = (10 \pm 3) \text{ nm}$, $d = (2.0 \pm 0.5) \text{ nm}$. 由此表明, 升高温度可使琥珀聚糖的双螺旋链构象解开并破坏变成单股半柔顺链^[113].

黄原胶分子由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、乙酸和丙酮酸(摩尔比为 2.8:3:2:1.7:0.51~0.63)组成的“五糖重复结构单元”聚多糖. 主链是葡萄糖残基通过 β -(1 $\rightarrow$ 4)-糖苷键连接, 每隔 1 个葡萄糖残基上链接着 1 条侧链, 侧链是由 2 个甘露糖和 1 个葡萄糖醛酸交替连接而成的三糖基. Paradossi 等利用旋光、圆二色谱和 NMR 等方法证明黄原胶在盐水溶液中以有序构象存在^[114]. 他们基于高分子溶液理论, 对光散射和黏度法测定的数据进行拟合和计算, 得出它的分子参数分别为: $M_L = 1940 \text{ nm}^{-1}$, $q = 120 \text{ nm}$, $d = 2.7 \text{ nm}$, $h = 0.47 \text{ nm}$, 它们与黄原胶晶体结构数据一致. 由此证明黄原胶在盐水溶液中呈双螺旋构象^[114].

3.4 三螺旋链(triple helical chain)

裂褶菌葡聚糖(schizophyllan)^[115]、菌核葡聚糖(scleroglucan)^[116, 117]、香菇葡聚糖(lentinan)^[118]、凝胶多糖(curdlan)^[119]、霉菌多糖(cinerean)^[102]和 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-木聚糖^[120]等多糖在水溶液中呈三螺旋链构象. 裂褶菌葡聚糖由 β -D-葡萄糖连接而成的带侧链的多糖, 每 3 个 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡萄糖主链上链接一个 β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡萄糖残基. 它在水溶液中的分子量是在 DMSO 中的 3 倍, 表明 DMSO 使其维持三螺旋链的分子内和分子间氢键破坏, 从而转变为单股柔顺链. 当分子量低于 5×10^5 时, 它在水中 Mark-Houwink 方程的 α 指数为 1.7, 而在 DMSO 中的指数为 0.68^[121]. 由此得出, 它在水溶液中的构象参数分别为 $M_L = 2150 \text{ nm}^{-1}$, $q = 200 \text{ nm}$, $d = 2.6 \text{ nm}$, $h = 0.30 \text{ nm}$, 它符合三螺旋构象模型, 而且与 X-射线衍射得到的螺距数据一致, 由此证明该葡聚糖以三螺旋链构象存在^[122, 123].

香菇中含有 1 种 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡萄糖, 每 5 个主链结构单元上接有 2 个葡萄糖侧基. 我们利用超声波降解和重沉淀分级法结合制备出不同分子量的香菇葡聚糖级分($59.5 \times 10^4 \sim 163.5 \times 10^4$). 超声波方法只降解多糖分子链而不破坏其三螺旋结构. 该葡聚糖在 0.15 mol/L NaCl 水溶液中的 Mark-Houwink 方程为 $[\eta] = 6.04 \times 10^{-5}$

$M_w^{1.16 \pm 0.03} (\text{mL g}^{-1})$. 它的构象参数分别为 $M_L = 2150 \text{ nm}^{-1}$, $q = 200 \text{ nm}$, $d = 2.6 \text{ nm}$, $h = 0.30 \text{ nm}$, 符合三螺旋链理论模型^[63]. 同时,它在 DMSO 中变为单股无规线团链,其 Mark-Houwink 方程为 $[\eta] = 1.16 \times 10^{-2} M_w^{0.71 \pm 0.02}$; 它的 M_L 、 q 和特征比 (C_∞) 依次为 970 、 4.8 和 8.7 nm . 由此证明该香菇葡聚糖在 0.15 mol/L NaCl 水溶液中呈三

螺旋链构象,而在 DMSO 中以单股柔顺链构象存在^[24]. 此外,升高温度 (145°C)^[85]、NaOH 浓度较高也引起该三螺旋破坏变成单股无规线团^[25]. 有趣的是,破坏为单股无规线团的香菇葡聚糖在大量水中透析后又可恢复三螺旋链构象^[67]. 几种典型多糖的螺旋链构象及分子参数如螺距 h 和链直径 d 值汇集于表 1.

Table 1 Pitch (h) and diameter (d) of helical natural polysaccharides chains

Polysaccharides / solvent	Chain conformation	$h \text{ (nm)}$				$d \text{ (nm)}$		Reference
		From $[\eta]$	From s_0^a	From $\langle S^2 \rangle$	From X-ray	From $[\eta]$	From s_0^a	
Schizophyllan / water	Triple helix	0.3	0.29	0.30 ^b	0.30	2.6 ± 0.6	2.6 ± 0.4	[23]
Scleroglucan / 0.01 mol/L NaOH	Triple helix	0.29	0.3	0.32	0.30	2.6 ± 0.6	2.4 ± 0.4	[17] [26]
Xanthan gum / 0.1 mol/L NaCl	Double helix	—	0.47	0.47	0.47	—	2.7 ± 0.5	[27] [28]

^a Limiting sedimentation coefficient; ^b In 0.01 mol/L NaOH

3.5 棒状链 (rod-like chain)

当刚性链多糖的分子量较低时,它们常以棒状链构象存在. 例如,三螺旋链裂褶菌葡聚糖在的分子量小于 5×10^5 时,它在水中的 Mark-Houwink 方程指数为 1.7 ,表明它在水中呈棒状行为^[23]. 双螺旋链黄原胶的分子量小于 $\sim 10^5$ 时,它在 0.1 mol/L NaCl 水溶液中也呈棒状链构象^[27]. 具有类似棒状行为的还有三螺旋硬葡聚糖^[17],它在分子量较低范围的 Mark-Houwink 方程指数趋近于 1.8 . 我们用动态光散射研究了低分子量香菇三螺旋链多糖水溶液 ($M_w \approx 5.0 \times 10^5 \text{ g/mol}$),发现它在水中呈棒状链构象^[69],实验证明它在动态时间弛豫谱中呈现双峰 (图 12a). 运用“快”和“慢”模型分析得出,两个峰分别归属于香菇多糖

的三螺旋链及其聚集体. 它们的流体力学半径分别为 $\langle R_h \rangle_{\text{indi}} = 14.9 \text{ nm}$ 和 $\langle R_h \rangle_{\text{agg}} = 98.4 \text{ nm}$; 相应的重均分子量分别为 $M_{w,\text{indi}} = 4.61 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 和 $M_{w,\text{agg}} = 7.17 \times 10^6 \text{ g/mol}$; 均方根旋转半径分别为 $R_{g,\text{indi}} = 48.2 \text{ nm}$, $\langle R_g \rangle_{\text{agg}} = 75.4 \text{ nm}$ 以及构象参数为 $\rho_{\text{indi}} = 3.23$ 和 $\rho_{\text{agg}} = 0.766$. 运用迭代算法估算出香菇三螺旋链多糖聚集体约占总组分的 10% . 分子参数分析结果表明,聚集体为紧缩体积的构象,即它由很短的三螺旋链平行排列形成“柴捆状”聚集体^[69]. 原子力显微镜图像 (图 12c) 进一步提供了有力的证据支持这种棒状短链. 因此,当三螺旋链较短时,它能有序排列形成“柴捆”状聚集体. 图 12 (b) 示出溶液中三螺旋链与“柴捆状”聚集体共存的示意图^[69].

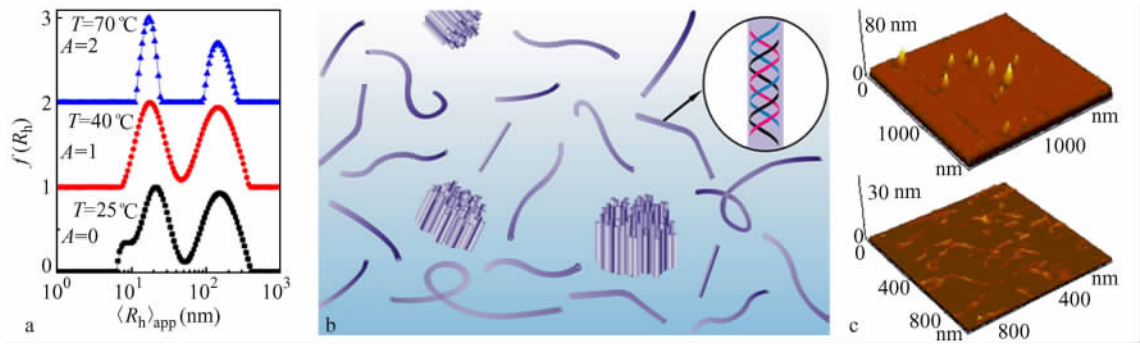


Fig. 12 (a) Concentration dependence of intensity-intensity time correlation functions of LFS-420 in water with c ranged from 0.6 mg/mL to 3.0 mg/mL at 70°C , where the corresponding hydrodynamic radius distributions were calculated from CONTIN analysis; (b) Schematic of triple helical lentinan in water solution. Stiff rods represent the individuals and the spheres represent aggregates of single chains; and (c) the 3D image of MAC mode AFM topographic images of lentinan aqueous solution at 25°C ^[69]. Copyright 2010 American Chemical Society.

3.6 聚集体 (aggregate)

多糖链富含羟基而容易形成分子间氢键互相缠绕或通过链间缔合形成多分子的集合,即聚集体.我们从茯苓菌丝体提取出 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖(PCM3),它在含水的DMSO中形成聚集体.按照数学分形概念来用动态光散射发现聚集体的分形维数随水的含量增加而增大,而且大于一般快聚集模型所预期的理论值1.70~1.80,表明该多糖在溶液中形成紧密的聚集体结构^[29]. Gawronski等^[30]用SEC-MALLS和SAXS法研究了PGG在水溶液中的链构象.结果表明PGG在水溶液中呈现三螺旋链构象.同时也存在由3个三螺旋链分子紧密堆积形成的聚集体,其中少部分聚集体进一步紧密堆积形成更有序的“棒束”团簇,形成微纤维超分子结构.

裂褶菌 β -(1,3)-D-葡聚糖具有独特的天然纳米管行为.这源于它很强的螺旋形成特性以及单股柔顺链和三螺旋链之间的可逆转变.在复性过程中,它们能够与小分子、高聚物、无机物等通过分子自组装形成水溶性的一维纳米复合物.这些小分子、高聚物及无机物等自组装进入裂褶菌 β -(1,3)-D-葡聚糖螺旋结构形成的一维空腔中.进一步,这种具有可功能化表面的一维复合物可以通过层层自组装得到二维或三维纳米结构^[7, 131, 132].

骶骨多糖(sacrans)是一种从蓝藻的凝胶状胞外基质中提取出具有高分子量(百万级)的杂多糖.在浓度($c = 0.01$ wt%)的稀溶液中用光学显微镜能观察到发生自动取向排列,形成长度达3 μ m微米棒.图13(a)示出该多糖链缠绕在一起形成束状的AFM图像.它在 $c > 0.09$ wt%的溶液中形成双螺旋(图13b);当 $c > 0.5$ wt%时,骶骨多糖链形成大区域的液晶(图13c),这个浓度比一般的具有液晶行为的多糖发生液晶所需浓度要低很多.螺旋链的形成是由于多糖链上的功能基团之间静电力的作用而使多条链交叠、扭曲.而且,螺旋链类似刚性棒,当浓度增大,更多链交叠缠绕,从而出现液晶相^[33].图14示出该多糖溶液(0.5 wt%)的偏光显微镜图像.它明显的显示出双折射现象,表明多糖溶液中形成了液晶.图中可观察到刷状线(brushes)(图14中箭头所示),并且其周围伴随着点缺陷(point defect),证明该多糖液晶为向列型^[34].高浓度的低分子量裂褶菌葡聚糖溶液会发生相分离,形成胆甾型液晶.出现胆甾型液晶的多糖临界浓度与多糖链长径比有关,长径比增大,临界浓度减小,更易形成液晶态^[35].Fang等^[36]发现,在剪切力作用下,这种裂褶菌葡聚糖液晶会经历由胆甾型转变成向列型过程.

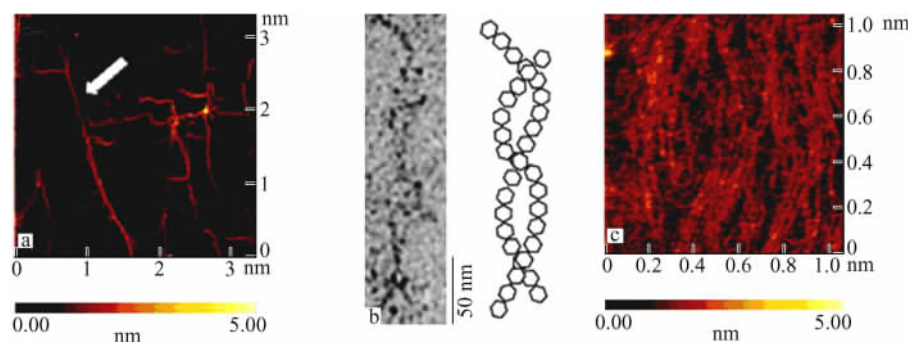


Fig. 13 Microscopic images of sacran chains

AFM images of sacran chains dried from very dilute solutions on mica substrates (arrow: a representative bundle of sacran chains) (a); TEM images of specimens dried on a carbon-coated Cu grid. Illustration: helical form of sacran chains speculated as the basis of TEM images (b); AFM images of sacran chains dried from concentrated solutions at $c > 0.5$ wt% (c). Arrows show sacran chains bridging sacran ropes^[33]. Copyright 2009 American Chemical Society.

含憎水基的茁霉聚糖(pullulan)在水中表现有趣的溶液性质和自组装行为.胆固醇基茁霉聚糖(CHP)由亲水的茁霉聚糖主链和部分取代的憎水的胆固醇基组成.由于憎水的胆固醇基使它

在水溶液中形成稳定的水凝胶纳米粒子.图15为CHP及其在水溶液中自聚集形成的水凝胶纳米粒子的示意图^[37].这种水凝胶是由憎水和疏水作用驱动的自组装成网络状的凝胶,它可用于载

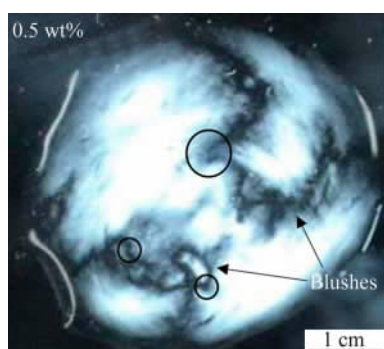


Fig. 14 The image of the saccharin solution taken under the crossed-polarizer [34]

药以及肿瘤治疗等 [37-141] .

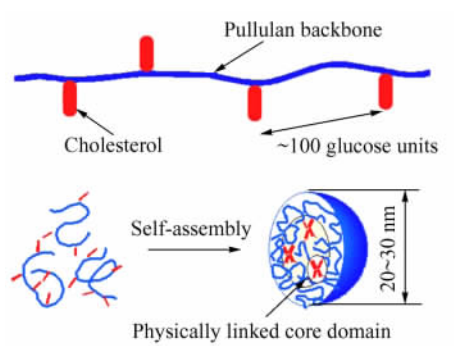


Fig. 15 Schematic depiction of a cholesterol-bearing pullulan (CHP) and the hydrogel nanoparticle formed by self-aggregation in an aqueous solution [37]. Copyright 2004 Elsevier.

3.7 影响链构象的因素

多糖链构象主要与链结构、分子内和分子间作用力及溶剂有关。多糖分子作用力主要包括氢键、偶极相互作用、疏水的力、静电力等非共价作用力 [42]。多糖由于单糖单元差异以及不同链接方式的糖苷键使多糖分子在溶液中具有各种形态,即链构象。多糖分子链在溶液中的可能构象如图 16 所示 [43],主要有无规线团链、单螺旋、双螺旋、三螺旋、蠕虫状、棒状和聚集体等。线型 α -或 β -(1 $\rightarrow$ 3) 葡聚糖由于空间位阻相对较小,具有较大内旋自由度而呈现无规线团链构象。带有一定量侧链的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖则容易产生分子内和分子间氢键,形成三螺旋链构象。香菇葡聚糖作为一种重要的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,它与裂褶菌多糖具有相似的化学结构、链构象及其它大部分特性。Shinkai 等通过分子模拟方法研究了 β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-侧链对 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖三螺旋构象的影响,发现侧链数目增多三螺旋连螺距减小。带有侧链的裂褶菌多糖三螺旋链中存在着尺寸为

0.35 nm 的疏水空腔,然而不含侧链的凝胶多糖则没有空腔存在 [44]。当氢键作用力被破坏时,如碱性条件、高温、强极性溶剂条件下或者强的静电作用力影响,多糖构象会发生有序-无序的转变。强极性溶剂(如 DMSO)可通过破坏氢键作用力导致多糖链构象变化。此外侧链强烈影响多糖水溶性,较多的侧链使多糖水溶性提高。聚电解质多糖(如黄原胶多糖)存在大量带电基团,它在纯水中产生静电排斥作用力,引起多糖链扩张,加入盐可以抑制或消除聚电解质的静电排斥作用,使分子链呈现正常高分子的溶液行为。

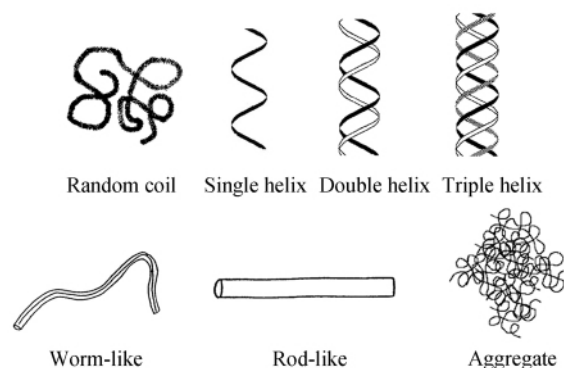


Fig. 16 Scheme figure of possible polysaccharides chain conformations in aqueous solution [43]

4 真菌多糖应用前景与展望

真菌多糖广泛存在真菌细胞壁或细胞培养液中,具有来源广、可再生、安全性好等特点。它们参与生命活动,具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等生物活性,是理想的天然保健品、药物和食品添加剂,在医药、生物材料、食品及日用品领域有广阔应用前景。目前,真菌类的灵芝、茯苓和香菇多糖注射液已广泛用于临床治疗各种肿瘤、提高免疫功能。同时已发现一些真菌多糖及其复合物对多种疾病,如免疫紊乱、癌症、糖尿病、高血压、肝炎、血栓、肺炎、病毒等都具有显著疗效,并且参与细胞各种生命现象的调节。

不同来源的真菌多糖具有不同的化学结构、分子尺寸及链构象,它们对其生物功能有明显影响。 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖因三股螺旋链结构具有显著的抗肿瘤活性和它在与其它物质(如核苷酸、碳纳米管)结合的特性,可以预见它在生物活性药物方面将有应用前景,并且对揭示生命过程将起重要作用 [45]。当多糖分子链较伸展、链刚性较强并具有良好的水溶性以及带有负电基团时,它

具有明显的抑制肿瘤生长、抗病毒等生物活性. 因此, 多糖链构象及其表征方法、多糖溶液理论及多糖与其它生物大分子的相互作用以及人体免疫系统细胞上多糖特异性受体的研究将促进医学和

生命科学的发展. 这也是我们所要面临的挑战与机遇. 因此, 阐明真菌多糖在水溶液中的分子链构象对人类的生存与健康有重大意义和应用前景.

REFERENCES

- 1 Marszalek P, Oberhauser A, Pang Y, Fernandez J. *Nature*, 1998, 396: 661 ~ 664
- 2 Srivastava R, Kulshreshtha D. *Phytochemistry*, 1989, 28: 2877 ~ 2883
- 3 Liu X, Dordick J. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 466 ~ 467
- 4 Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F. *Nature*, 1969, 222: 687 ~ 688
- 5 Wasser S, Weis A. *Critical Reviews in Immunology*, 1999, 19: 65 ~ 96
- 6 Miles P, Chang S. *Mushroom Biology*. Singapore: World Scientific Publishing Company, 1997
- 7 Benjamin D. *Mushrooms: Poisons and Panaceas*. New York: W. H. Freeman and Co, 1995
- 8 Ooi V E C, Liu F. *Int J Med Mushrooms*, 1999, 1: 195 ~ 206
- 9 Lin Y, Ye Z, Huang Y, Xie H. *Int J Med Mushrooms*, 2002, 4: 313 ~ 319
- 10 Reshetnikov S, Wasser S, Tan K. *Int J Med Mushrooms*, 2001, 3: 361 ~ 394
- 11 Cui J, Chisti Y. *Biotech Adv*, 2003, 21: 109 ~ 122
- 12 Ooi V E C, Liu F. *Current Med Chem*, 2000, 7: 715 ~ 729
- 13 Chihara G. *Intern J Orient Med*, 1992, 17: 57 ~ 77
- 14 Aoyagi H, Iino Y, Kurebayashi J, Maemura M, Ishida T, Morishita Y, Horiuchi R. *Jpn Soc Cancer Ther*, 1994, 29: 849 ~ 854
- 15 Yang Q, Jong S, Li X, Zhou J, Chen R, Xu L, Xu B. *J Immunol Immunopharmacol*, 1992, 12: 29 ~ 34
- 16 Mizuno T. *Foods Food Ingrid J*, 1996, 167: 69 ~ 85
- 17 Montefiori D, Robinson W, Modliszewski A, Roxland J, Schuffman S. *J Antimicrob Chemother*, 1990, 25: 313 ~ 318
- 18 Cheung P C K, Lee M. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 3148 ~ 3151
- 19 Lu M K, Cheng J J, Lin C Y, Chang C C. *Food Chem*, 2010, 118: 349 ~ 356
- 20 Schinella G, Tournier H, Prieto J, Bushiazio P D, Rios J. *Life Sci*, 2002, 70: 1023 ~ 1033
- 21 Wang D Y, Guo Z H, Ma X, Hu Y L, Huang X Y, Fan Y P, Yang S J, Guo L W. *Carbohydr Polym*, 2010, 79: 461 ~ 465
- 22 Lai C, Wong K, Cheung P. *Int J Med Mushrooms*, 2008, 10: 255 ~ 264
- 23 Brown G, Taylor P, Reid D, Willment J, Williams D, Martinez-Pomares L, Wong S, Gordon S. *J Exp Med*, 2002, 196: 407 ~ 412
- 24 Schorey J, Lawrence C. *Curr Drug Targets*, 2008, 9: 123 ~ 129
- 25 Brown G, Gordon S. *Nature*, 2001, 413: 36 ~ 37
- 26 Kashiwagi Y, Norisuye T, Fujita H. *Macromolecules*, 1981, 14: 1220 ~ 1225.
- 27 Zhuang C, Mizuno T, Shimada A. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57: 901 ~ 906
- 28 Bohn J A, BeMiller J N. *Carbohydr Polym*, 1995, 28: 3 ~ 14
- 29 Kiho T, Yoshida I, Nagai K, Ukai S, Hara C. *Carbohydr Res*, 1989, 189: 273 ~ 279
- 30 Konopski Z, Rasmussen L T, Seljelid R, Eskeland T. *Scand J Immunol*, 1991, 33: 297 ~ 306
- 31 Elstad M R, Parker C J, Cowley F S, Wilcox L A, McIntyre T M, Prescott S M, Zimmerman G A. *J Immunol*, 1994, 152: 220 ~ 230
- 32 Konopski Z, Smedsrod B, Seljelid R, Eskeland T. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1221: 61 ~ 65
- 33 Tapper H, Sundler R. *J Biochem*, 1995, 306: 829 ~ 835
- 34 Ross G D, Cain J A, Newman S L, Lachmann P J. *J Immunol*, 1985, 134: 3307 ~ 3315
- 35 Duan X, Ackerly M, Vivier E, Anderson P. *Cell Immunol*, 1994, 157: 393 ~ 402
- 36 Zhang Lina (张俐娜), Xue Qi (薛奇), Mo Zhishen (莫志深), Jin Xigao (金熹高). *Modern Research Methods in Polymer Science (高分子物理近代研究方法)*. Wuhan (武汉): Wuhan University Press (武汉大学出版社), 2003. 11 ~ 76
- 37 Numata M. *J Incl Phenom Macro*, 2010, 68: 25 ~ 37
- 38 Miyoshi K, Uezu K, Sakurai K, Shinkai S. *Chem Biodiver*, 2004, 1: 916 ~ 924
- 39 Atkins E, Parker K. *Nature*, 1968, 220: 784 ~ 785
- 40 Zhang L, Li X, Xu X, Zeng F. *Carbohydr Res*, 2005, 340: 1515 ~ 1521
- 41 Surenjav U, Zhang L, Xu X, Zhang X, Zeng F. *Carbohydr Polym*, 2006, 63: 97 ~ 104
- 42 Huang Q, Zhang L, Cheung P C K, Tan X. *Carbohydr Polym*, 2006, 64: 337 ~ 344
- 43 Huang Q, Jin Y, Zhang L, Cheung P, Kennedy J. *Carbohydr Polym*, 2007, 70: 324 ~ 333

- 44 Chen X,Xu X,Zhang L,Zeng F. Carbohydr Polym,2009,78:581 ~ 587
- 45 Wang J,Zhang L,Yu Y,Cheung P. J Agric Food Chem,2009,57:10565 ~ 10572
- 46 Brown G,Gordon S. Cell Microbiol,2005,7:471 ~ 479
- 47 Tao Yongzhen(陶永真),Zhang Lina(张俐娜),Han Llu(韩露),Zeng Fanbo(曾凡波),Ding Kan(丁侃). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(9):852 ~ 859
- 48 Tao Y,Zhang L,Cheung P. Carbohydr Res,2006,341:2261 ~ 2269
- 49 Wong S,Wong K,Chiu L,Cheung P. Carbohydr Polym,2007,68:206 ~ 217
- 50 Sakurai K,Mizu M,Shinkai S. Biomacromolecules,2001,2,641 ~ 650
- 51 Takeda Y,Shimada N,Kaneko K,Shinkai S,Sakurai K. Biomacromolecules,2007,8:1178 ~ 1186
- 52 Bae A H,Lee S W,Ikeda M,Sano M,Shinkai S,Sakurai K. Carbohydr Res,2004,339:251 ~ 258
- 53 Murphy R. Curr Opin Biotech,1997,8:25 ~ 30
- 54 Ma Z,Wang J,Zhang L. Biopolymers,2008,89:614 ~ 622
- 55 Zhang L,Liu W,Norisuye T,Fujita H. Biopolymers,1987,26:333 ~ 341
- 56 Murakami H,Norisuye T,Fujita H. Macromolecules,1980,13:345 ~ 352
- 57 Xu X,Zhang X,Zhang L,Wu C. Biomacromolecules,2004,5:1893 ~ 1898
- 58 Ioan C,Aberle T,Burchard W. Macromolecules,2000,33:5730 ~ 5739
- 59 Zhang Y,Li S,Zhang L. J Phys Chem B,2010,114:4945 ~ 4954
- 60 Falch B,Elgsaeter A,Stokke B. Biopolymers,1999,50:496 ~ 512
- 61 Sletmoen M,Christensen B,Stokke B. Carbohydr Res,2005,340:971 ~ 979
- 62 Sletmoen M,Geissler E,Stokke B. Biomacromolecules,2006,7:858 ~ 865
- 63 Zhang L,Zhang X,Zhou Q,Zhang P,Zhang M,Li X. Polym J,2001,33:317 ~ 321
- 64 Flory P J. Principles of Polymer Chemistry. Ithaca:Corneil University Press,1953
- 65 Matsuda Y,Biyajima Y,Sato T. Polym J,2009,41:526 ~ 532
- 66 Huggins M. J Am Chem Soc,1942,64:2716 ~ 2718
- 67 Kraemer E,Lansig W. J Phys Chem,1935,39:153 ~ 168
- 68 Schulz G V,Blaschke F. J Prakt Chem,1941,158:130 ~ 135
- 69 Cheng Rongshi(程榕时). Gaofenzi Tongxun(高分子通讯),1960,4(3):159 ~ 163
- 70 Fuoss R,Strauss U. J Polym Sci,1948,3:246 ~ 263
- 71 Beer M,Wood P,Weisz J. Carbohydr Polym,1999,39:377 ~ 380
- 72 Nakanishi T,Norisuye T. Biomacromolecules,2003,4:736 ~ 742
- 73 Thompson J,Hansma H,Hansma P,Plaxco K. J Mol Biol,2002,322:645 ~ 652
- 74 Sha R,Liu F,Millar D,Seeman N. Chem Biol,2000,7:743 ~ 751
- 75 Marszalek P,Li H,Fernandez J. Nat Biotechnol,2001,19:258 ~ 262
- 76 McIntire T,Penner R,Brant D. Macromolecules,1995,28:6375 ~ 6377
- 77 McIntire T,Brant D. Biopolymers,1997,42:133 ~ 146
- 78 McIntire T,Brant D. J Am Chem Soc,1998,120:6909 ~ 6919
- 79 Hansma H,Laney D,Bezani M,Sinsheimer R,Hansma P. Biophys J,1995,68:1672 ~ 1677
- 80 Sakurai K,Uezu K,Numata M,Hasegawa T,Li C,Kaneko K,Shinkai S. Chem Com,2005,35:4383 ~ 4398
- 81 Gunning A,Kirby A,Ridout M,Brownsey G,Morris V. Macromolecules,1996,29:6791 ~ 6796
- 82 Decho A. Carbohydr Res,1999,315:330 ~ 333
- 83 Round A,MacDougall A,Ring S,Morris V. Carbohydr Res,1997,303:251 ~ 253
- 84 Capron I,Alexandre S,Muller G. Polymer,1998,39:5725 ~ 5730
- 85 Wang X,Xu X,Zhang L. J Phys Chem B,2008,112:10343 ~ 10351
- 86 Francius G,Alsteens D,Dupres V,Lebeer S,De Keersmaecker S,Vanderleyden J,Gruber H,Dufrene Y. Nat Protoc,2009,4:939 ~ 946
- 87 Hinterdorfer P,Dufrene Y. Nat Methods,2006,3:347 ~ 355
- 88 Francius G,Lebeer S,Alsteens D,Wildling L,Gruber H,Hols P,Keersmaecker S,Vanderleyden J,Dufrene Y. ACS Nano,2008,2:1921 ~ 1929
- 89 Li H,Rief M,Oesterhelt F,Gaub H. Adv Mater,1998,3:316319
- 90 Li H,Rief M,Oesterhelt F,Gaub H. Chem Phys Let,1999,305:197 ~ 201
- 91 Butt H,Jaschke M. Nanotechnology,1995,6:1 ~ 7
- 92 Hugel T,Seitz M. Macromol Rapid Commun,2001,22:989 ~ 1016
- 93 Tiktopulo E I,Bychkova V E,Ricka J,Ptitsyn O B. Macromolecules,1994,27:2879 ~ 2882

- 94 Tiktopulo E I, Uversky V N, Lushchik V B, Klenin S I, Bychkova V E, Ptitsyn O B. *Macromolecules*, 1995, 28: 7519 ~ 7524
- 95 Wang X, Zhang Y, Zhang L, Ding Y W. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 9915 ~ 9923
- 96 Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Winkler S, Wilson D, Kirschner D, Kaplan D. *Biomacromolecules*, 2000, 1: 534 ~ 542
- 97 Numata M, Asai M, Kaneko K, Bae A, Hasegawa T, Sakurai K, Shinkai S. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 5875 ~ 5884
- 98 Sakurai K, Shinkai S. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 4520 ~ 4521
- 99 Numata M, Sugikawa K, Kaneko K, Shinkai S. *Chem-Eur J*, 2008, 14: 2398 ~ 2404
- 100 Glatter O, Kratky O. *Small Angle X-ray Scattering*. London: Academic Press, 1982
- 101 Xia Z Y, Sue H J, Rieker T P. *Macromolecules*, 2000, 33: 8746 ~ 8755
- 102 Gawronski M, Aguirre G, Conrad H, Springer T, Stahmann K P. *Macromolecules*, 1996, 29: 1516 ~ 1520
- 103 Stone B A, Clarke A E. *Chemistry and Biology of (1-3)-[beta]-glucans*. Victoria: La Trobe University Press, 1992. 566 ~ 742
- 104 Stahmann K P, Monschau N, Sahm H, Koschel A, Gawronski M, Kopp F, Conrad H, Springer T. *Carbohydr Res*, 1995, 266: 115 ~ 128
- 105 Tao Y, Zhang L. *Biopolymers*, 2006, 83: 414 ~ 423
- 106 Tao Y, Zhang L, Yan F, Wu X. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 2321 ~ 2328
- 107 Kato T, Okamoto T, Tokuya T, Takahashi A. *Biopolymers*, 1982, 21: 1623 ~ 1633
- 108 Chen X, Xu X, Zhang L, Kennedy J. *Carbohydr Polym*, 2009, 75: 586 ~ 591
- 109 Huang Q, Zhang L. *Biopolymers*, 2005, 79: 28 ~ 38
- 110 Everett W W, Foster J F. *J Am Chem Soc*, 1959, 81: 3464 ~ 3469
- 111 Zhang M, Zhang L, Cheung P. *Biopolymers*, 2003, 68: 150 ~ 159
- 112 Dentini M, Crescenzi V, Fidanza M, Coviello T. *Macromolecules*, 1989, 22: 954 ~ 959
- 113 Kido S, Nakanishi T, Norisuye T, Kaneda I, Yanaki T. *Biomacromolecules*, 2001, 2: 952 ~ 957
- 114 Paradossi G, Brant D. *Macromolecules*, 1982, 15: 874 ~ 879
- 115 Kaneda I, Kobayashi A, Miyazawa K, Yanaki T. *Polymer*, 2002, 43: 1301 ~ 1305
- 116 Itou T, Teramoto A, Matsuo T, Suga H. *Macromolecules*, 1986, 19: 1234 ~ 1240
- 117 Yanaki T, Norisuye T. *Polym J*, 1983, 15: 389 ~ 396
- 118 Coviello T, Maeda H, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiura K, Dentini M, Crescenzi V. *Macromolecules*, 1998, 31: 1602 ~ 1607
- 119 Sait H, Yoshioka Y, Yokoi M, Yamada J. *Biopolymers*, 1990, 29: 1689 ~ 1698
- 120 Deslandes Y, Marchessault R H, Sarko A. *Macromolecules*, 1980, 13: 1466 ~ 1471
- 121 Zhang L, Wang C, Cui S, Wang Z, Zhang X. *Nano Lett*, 2003, 3: 1119 ~ 1124
- 122 Norisuye T, Yanaki T, Fujita H. *J Polym Sci Polym Phys*, 1980, 18: 547 ~ 558
- 123 Yanaki T, Norisuye T, Fujita H. *Macromolecules*, 1980, 13: 1462 ~ 1466
- 124 Sato T, Norisuye T, Fujita H. *Macromolecules*, 1983, 16: 185 ~ 189
- 125 Zhang X, Zhang L, Xu X. *Biopolymers*, 2004, 75: 187 ~ 195
- 126 Bluhm T, Deslandes Y, Marchessault R, Perez S, Rinaudo M. *Carbohydr Res*, 1982, 100: 117 ~ 130
- 127 Sato T, Norisuye T, Fujita H. *Macromolecules*, 1984, 17: 2696 ~ 2700
- 128 Okuyama K, Arnott S, Moorhouse R, Walkinshaw M D, Atkins E. D T, Wolf-Ullrich C H. *Fiber Diffraction Studies of Bacterial Polysaccharides*, Vol. 141. Houston: American Chemical Society, 1980. 411 ~ 427
- 129 Ding Q, Zhang L, Wu C. *J Polym Sci Polym Phys*, 1999, 37: 3201 ~ 3207
- 130 Gawronski M, Park J T, Magee A, Conrad H. *Biopolymers*, 1999, 50: 569 ~ 578
- 131 Numata M, Shinkai S. *Adv Polym Sci*, 2008, 220: 65 ~ 121
- 132 Sato M, Sano M. *Langmuir*, 2005, 21: 11490 ~ 11494
- 133 Okajima M K, Kaneko D, Mitsumata T, Kaneko T, Watanabe J. *Macromolecules*, 2009, 42: 3057 ~ 3062
- 134 Okajima M K. *Macroscopic birefringence in liquid crystals from novel cyanobacterial polysaccharide with an extremely high molecular weight*. In: Glogarova M, ed. *Liquid Crystals and Applications in Optics* (Vol 6587). Bellingham WA: International Society for Optical Engineering, 2007. 658711 ~ 658718
- 135 Itou T, Teramoto A. *Macromolecules*, 1984, 17: 1419 ~ 1420
- 136 Fang Y, Takemasa M, Katsuta K, Nishinari K. *J Rheol*, 2004, 48: 1147 ~ 1166
- 137 Lee I, Akiyoshi K. *Biomaterials*, 2004, 25: 2911 ~ 2918
- 138 Lu D, Wen X, Liang J, Gu Z, Zhang X, Fan Y. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*, 2009, 89: 177 ~ 183
- 139 Kuroda K, Fujimoto K, Sunamoto J, Akiyoshi K. *Langmuir*, 2002, 18: 3780 ~ 3786
- 140 Bae B, Na K. *Biomaterials*, 2010, 31: 6325 ~ 6335
- 141 Akiyoshi K, Kang E-C, Kurumada S, Sunamoto J, Principi T, Winnik F M. *Macromolecules*, 2000, 33: 3244 ~ 3249
- 142 Rinaudo M. *Macromol Biosci*, 2006, 6: 590 ~ 610

- 143 Zhang Lina(张俐娜), Science and Materials in Natural Polymers(天然高分子科学与材料). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2007. 114
- 144 Okobira T, Miyoshi K, Uezu K, Sakurai K, Shinkai S. Biomacromolecules, 2008, 9: 783 ~ 788
- 145 Zhang Y, Li S, Wang X, Zhang L, Cheung P C K. Food Hydrocolloid, 2010, 25: 196 ~ 206

ADVANCES IN CONFORMATIONS AND CHARACTERIZATIONS OF FUNGI POLYSACCHARIDES

LI Sheng, XU Shuqin, ZHANG Lina

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract This paper summarizes the current research results on the chain conformations of the fungi polysaccharides in solution and characterization methods. The molecular weight, particle size, and chain conformation of various polysaccharides exacted from mushrooms including *Lentinus edodes*, *Poria cocos*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia auricula-judae*, *Xanthomonas*, *Schizophyllum*, etc. in solution are introduced, and the relationships between the bioactivity and the chain conformation are outlined. It is concluded that extended chain, charged groups and moderate molecular weight of the polysaccharides are beneficial to enhance the antitumor activities, as results of the increasing the interaction between polysaccharide molecules and immune system. It is indicated the importance of understanding the relationship between polysaccharide chain conformation and biological activity. Polysaccharides mainly exist as random coil, double helix, triple helix, the worm-like and rod-like chain conformations, as well as aggregates in solution, depending on the type of monosaccharide and glycosidic link, the branch chain structure and intermolecular interactions. The major characterization methods include light scattering, viscosity, microscopy (TEM, SEM and atomic force microscope), microcalorimetry and small angle X-ray scattering. In addition, the polysaccharides solution theory and the calculation expression of chain conformation parameters are represented and discussed.

Keywords Fungi polysaccharides, Chain conformation, Molecular weight, Characterization methods, Bioactivities