

半知菌曲霉族真菌胞外多糖的研究 II:

爪哇正青霉胞外多糖化学结构的研究*

陈有为, 李绍兰, 杨丽源, 黄浩海, 李治滢, 周 斌

(云南大学 云南省微生物研究所, 教育部微生物资源开放研究 重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 经形态鉴定和 18srRNA 基因组序列分析, 编号 Ym31794 菌株的分类学地位属于半知菌类丛梗孢科曲霉族青霉属丝状真菌, 种名爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*). 该菌发酵液经离心弃菌体, 除脂类及乙醇分级提取, 分离、纯化的胞外多糖相对分子量为 2.6×10^4 , 糖的质量分数为 89%. 真菌胞外多糖经红外光谱(IR), 簿层层析(TLC), 色质联用(GC-MS), 核磁共振(^{13}C -NMR, ^1H -NMR) 等分析可知爪哇正青霉菌胞外多糖为 1-6 连接的葡萄糖和 1-2 连接半乳糖构成主干, 侧链由 1-3 连接的甘露糖和 1-2 连接的葡萄糖构成, 结构应为吡喃糖.

关键词: 爪哇正青霉; 18s rDNA; 胞外多糖化学结构

中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2002)06-0462-03

Ym31794 是爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*). 文献[1]报道了该菌的分离筛选、发酵条件、胞外多糖含量及组分的初步研究. 本文就编号为 Ym31794 菌株的分类学地位及其胞外多糖的化学结构作进一步研究.

1 材料与方法

1.1 材料 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*) 由云南大学省微生物研究所分离自云南滇东南地区土壤中.

1.2 仪器与方法

1.2.1 爪哇正青霉胞外多糖提取、纯化 Ym31794 爪哇正青霉经液体培养收集的发酵液经离心(4 000 r/min)弃菌体, 置 60℃水浴搅拌皂化反应 2 h. 离心除脂类, 以 3 倍 95% 乙醇沉淀, 冻干得粗多糖^[1]. 取质量分数为 10% 粗多糖水溶液经冻融分级, 日立 20PR-520 高速冷冻离心机 10 000 r/min(-2℃)离心弃沉淀物. 多糖上清液对流水透析 48 h. 进行乙醇分级^[2]. 其中 V(多糖溶液): V(95% 乙醇) = 1:4 为主级分(Pt-1). Pt-1 经 Ser-

vage 法除蛋白质, 减压浓缩 1/3 体积, -4℃下 15 000 r/min 离心, 蒸馏水透析过夜, 再次乙醇分级, 冻干得爪哇正青霉胞外多糖质量分数为 89% 的 Pt-2.

1.2.2 胞外多糖纯度鉴别 多糖的硅胶簿层层析按文献[1]所述方法进行. Sephadex G-50 凝胶柱层析及相对分子量测定按文献[3,4]所述的方法进行.

1.2.3 胞外多糖结构分析 采用国产 NDJ-1 型旋转式粘度计测定真菌胞外多糖绝对粘度(η), 红外光谱(IR), 簿层层析(TLC), 色质联用(GC-MS), Smith 降解, 甲基化反应产物分析按文献[3]所述方法进行. ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 测定为瑞士 Bruker AM-400 超导核磁共振仪^[5-7].

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定

2.1.1 形态特征 菌丝无色、有隔. 分生孢子梗由菌丝垂直生出, 有隔膜, 光滑, 顶生对称分支的帚状枝, 顶层具小梗; 分生孢子串呈不分支的链状; 分生

* 收稿日期: 2002-04-30

基金项目: 云南省工业微生物发酵重点实验室基金项目(2000KF-005).

作者简介: 陈有为(1957-), 男, 上海人, 副研究员, 主要从事微生物真菌资源学和应用微生物学研究.

孢子椭圆形,光滑、无色。

2.1.2 培养特征 PDA 培养基,菌落圆形洗绒絮状,紧密扁平,边缘整齐呈白色,中间橄榄绿色,具无色水珠.菌落背面乳黄色,呈现同心环状。

2.1.3 18s rRNA 系列 根据形态、培养特征及 18s rRNA 碱基系列对比分析(图 1),鉴定该菌属于半知菌类丛梗孢科曲霉族青霉属的爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)。

2.2 爪哇正青霉胞外多糖含量及组分 Ym31794 爪哇正青霉胞外粗多糖得率为 12.333 g/L(干重),酚-硫酸法测定粗多糖 F-1 质量分数为 40%,凯氏定氮法测得其蛋白质质量分数为 2.5%。经薄层层析^[1]及色质联用(GC-MS)色谱分析粗多糖组成为甘露糖、半乳糖和葡萄糖。

2.3 爪哇正青霉胞外多糖纯化 粗多糖 Pt-1 除蛋白质,浓缩体积,离心,蒸馏水透析过夜,再次乙醇分级,冻干得多糖质量分数为 89%的 Pt-2。Sephadex G-50 凝胶柱层析为单一不对称分布

峰。端基法测定相对分子量为 2.6×10^4 。Pt-2 属白色粉末,溶于水,绝对粘度为 80 mPa·s。其红外光谱具有多糖的特征峰,在 1594.65, 1236.03, 1044.97 cm^{-1} 示其为吡喃糖,680.908, 571.131 cm^{-1} 表示其为 α -糖苷键(图 2)。

2.4 爪哇正青霉胞外多糖结构分析

2.4.1 Smith 降解 Pt-2 经 Smith 降解产物完全水解为葡萄糖、半乳糖和甘露糖。被氧化糖基分别有末端 $1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 2$, 不氧化糖基为 $1 \rightarrow 3$ Man。

2.4.2 甲基化反应 Pt-2 的甲基化反应产物经 GC-MS 分析结果,表明葡萄糖基存在有非还原端, $1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 6$ 两种连接方式,半乳糖基和甘露糖基存在末端 $1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3$ 两种连接方式。这与多糖组分 Smith 降解的结果相一致。

2.4.3 核磁共振(¹H-NMR)分析 ¹H-NMR 出现多个单一峰型(4.5~4.9 Hz),表明 Pt-2 为 α -型吡喃多糖(图 3)。

```
TCTGGTTGATTCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCACTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA
ATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCCGACTTCAGGAAGGGGTGATTT
ATTAGATAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATATAAAGTAAACGAATGGCATGGCCTTGGCGCGGGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC
CTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAC
ATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAAATACCACATCCCGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACGATACGGGGCTCTTTGGGTCTCGTAAATGGAAT
GAGAACAATTTAAATCCCTTAAACGAGGAACAATGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCANCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCA
GTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGTCTGGCTGGCGGCTCCGCTCNCGGCGAGTACTGTTCCGGCTGGACCTTTCTCTGGGGAACCTCATGGCCTT
CACTGGCTGTGGGGGAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATAGAGTGTCAAAGCAGGCCTTTGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGAGC
TGCGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAAGTATTCAGCTGTGAGAGTGAATTTCTTGGATTTGCT
GAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTCCGCAAGGATGTTTCAATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTGTAGTCTTAACC
ATAAATATGCCACTAGGATCGGACGGGATTCTATGATGACCCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAA
GGCTGAAACTTAAAGAAATGACCGAAGGGCACCAAGCGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTACCAGGTCCAGACAAAATAA
GGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATCTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTAGTTGGTGGAGTGAATTTGCTGCTTAATTGGGATAACGAACGA
GACCTCGCCCTTAAATAGCCCGTCCGCATTTCGGGGCGCTGGCTTCTTAGGGGACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTGGCGGCAATAACAGGTCTG
TGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCTACACTGACAGGCCAGCGAGTACATCACCTTGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTGTTAAACCTGTC
GTGCTGGGATAGAGCATTGCAATATTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCAGGACTATCAGCTCGTCCGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCGCTCGTACTACCGATTGAATGGCTCAGTAGGCCTTCGGACTGGCTCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCGAGCCGGAAGTTGGTCAAACCTCGG
TCA
```

图 1 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*) 18s rDNA 碱基系列(1737bp)

Fig. 1 Sequence of 18s rDNA of *Eupenicillium javanicum*

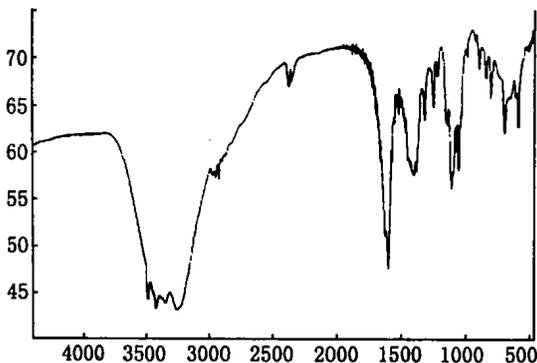


图 2 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)胞外多糖红外光谱

Fig. 2 Infra red spectrogram of extracellular polysaccharides of *Eupenicillium javanicum*

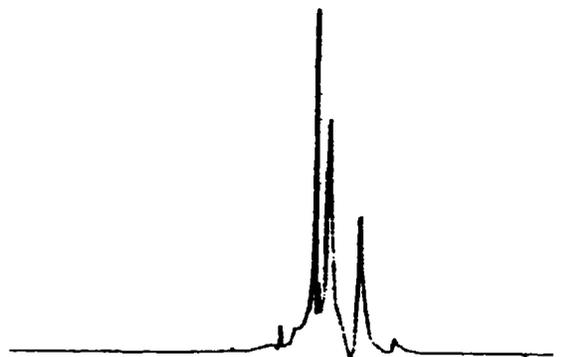


图 3 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)胞外多糖核磁共振¹H-NMR

Fig. 3 ¹H-NMR of extracellular polysaccharides of *Eupenicillium javanicum*

2.4.4 核磁共振(^{13}C -NMR)分析 ^{13}C -NMR 谱表明吡喃糖基为 $\alpha 1 \rightarrow (104.06 \times 10^{-6})$, $\alpha 1 \rightarrow 6 (104.06 \rightarrow 62.79 \times 10^{-6})$, $\alpha 1 \rightarrow 2 (104.06 \rightarrow 69.65 \times 10^{-6})$ 葡萄糖、半乳糖和甘露糖基(图 4)。

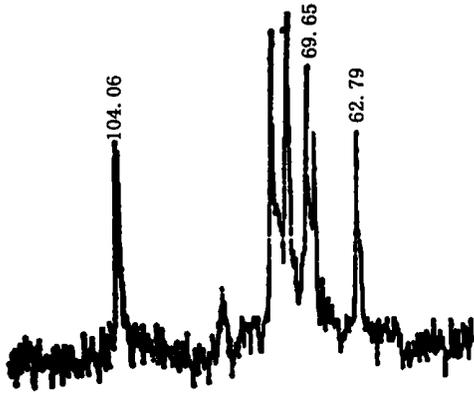


图 4 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)胞外多糖核磁共振 ^{13}C -NMR

Fig. 4 ^{13}C -NMR of extracellular polysaccharides of *Eupenicillium javanicum*

综上所述,上述 Smith 降解、甲基化反应、红外光谱(IR),色质联用(GC-MS)及核磁共振(^{13}C -NMR, ^1H -NMR)分析等结果较为一致.表明 Ym31794 爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)

胞外多糖为 1-6 连接的葡萄糖和 1-2 连接半乳糖构成主干,侧链由 1-3 连接的甘露糖和 1-2 连接的葡萄糖构成,结构应为 α -型吡喃多糖。

致谢:中科院昆明植物研究所完成 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, GC-MS 的测试;云南省工业微生物发酵重点实验室进行 IR 分析.在此一并感谢!

参考文献:

- [1] 陈有为,李绍兰,黄浩海,等.半知菌曲霉族真菌胞外多糖的研究 I.青霉菌胞外多糖的分离筛选[J].微生物学杂志,2002,22(2):119-121.
- [2] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987.
- [3] 梁忠岩,张翼伸.长白山松杉灵芝子实体水溶多糖的分离鉴定与结构研究[J].生物化学与生物物理学报,1993,25(1):59-63.
- [4] 梁忠岩,张翼伸,苗春艳.松杉灵芝发酵菌丝体中水溶多糖的分离纯化与结构的比较研究[J].真菌学报,1994,13(3):211-214.
- [5] 魏远安.高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量[J].药学学报,1989,24(7):532-536.
- [6] 王翎.虫花菌胞外糖蛋白的分离、纯化及其性质研究[J].真菌学报,1996,15(1):48-52.
- [7] 方积年.牛膝多糖的化学研究[J].药学学报,1990,25(7):526-529.

A study on extracellular polysaccharides from *Aspergileae* of fungi imperfecti II: chemical structure of extracellular polysaccharides from *Eupenicillium javanicum*

CHEN You wei, LI Shao lan, YANG Li yuang, HUANG Ha o hai, LI Zh i ying, ZHOU Bin
(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, The Key Laboratory for
Microbial Resources of Ministry of Education, Kunming 650091, China)

Abstract: A strain YM 31794, producing extracellular polysaccharide, was identified, using the methods of morphology and 18s rDNA sequencing analysis, as *Eupenicillium javanicum* Thom. The chemical structure of the extracellular polysaccharide from this strain was analysed through the reaction of methyl, Smith's degradation, thin layer chromatography, GC-MS chromatography, IR spectrum, ^{13}C -NMR and ^1H -NMR. The result indicate that this polysaccharide is a pyranose which is composed of the 1,6 bond linked glucose, 1,2-bond linked galactose and 1,3-bond linked mannose, and 1,2-bond linked glucose on its side chain.

Key words: *Eupenicillium javanicum*; 18s rDNA; chemical structure of polysaccharide