

*

南海红树林真菌(1356号)多糖分离提取及甲醇解研究

余志刚, 胡谷平, 吴耀文, 林永成, 吴雄宇

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 从南海海洋真菌(1356号)菌体中分离到一种新的杂多糖 W_{11} , 甲醇解研究表明 W_{11} 是由葡萄糖和半乳糖组成的, 其摩尔比为 3:2. 药理研究表明, 该多糖能提高机体的免疫功能, 对人肝癌细胞 HepG2 和 Bel7402 有细胞毒作用, 半数杀伤浓度 (IC_{50}) 分别为 $50 \mu\text{g/mL}$ 和 $25 \mu\text{g/mL}$.

关键词: 真菌多糖; 甲醇解; 三甲硅醚化反应

中图分类号: O636.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 06-0123-02

近年来, 由于糖类在生物体内功能不断被揭示, 人们逐渐认识到生物体内的糖类除了作为能源物质或结构材料外, 糖类参与了生命现象中细胞的各种活动; 由于多糖具有良好生物活性, 许多多糖类药物得到了开发和应用. 因而近年来对多糖的研究也越来越受到重视^[1]. 真菌由于培养方便, 生长周期短, 不受季节限制, 还可以进行大规模的生产, 因此是多糖的一个主要资源. 我们已经从南海海洋真菌中分离到多个新化合物^[2,3], 最近, 我们又从海洋南海红树林真菌 1356 号菌体中提取分离出一种新杂多糖 W_{11} , 通过甲醇解研究, 该多糖是由葡萄糖和半乳糖组成的. 药理研究表明, 该多糖能提高机体的免疫功能, 对人肝癌细胞 HepG2 和 Bel7402 有细胞毒作用, 半数杀伤浓度 (IC_{50}) 分别为 $50 \mu\text{g/mL}$ 和 $25 \mu\text{g/mL}$.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂 美国 Finnigen 公司 Vayager GC/MS 气相色谱质谱联用仪, 氯化三甲基硅烷为 Merck 公司产品, DEAE 纤维素, Sephadex G50 是 Sigma 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 W_{11} 的分离纯化

(1) 分离. 取干菌体粉碎, 分别用乙醇乙醚和甲醇脱脂. 用热水提取, 合并滤液, 浓缩, 加乙醇沉淀, 离心, 沉淀重新溶解, 加胃蛋白酶分解, 调 pH 到中性, 浓缩, 用 Sevag 法除少量的蛋白, 调 pH 值, 加 H_2O_2 脱色, 离心除去不溶物, 溶液加乙醇沉淀, 离心, 沉淀分别用乙醇,

丙酮, 乙醚洗涤, 脱水, 真空干燥, 得到粗多糖.

(2) 纯化. 取粗多糖溶于适量的水, 先用 DEAE 纤维素进行分离, 用不同浓度的 NaCl 进行洗脱, 用恒流泵调节速度, 自动部分收集器收集, 硫酸苯酚法检验, 再用 Sephadex G50 过柱, 用自动部分收集器收集, 硫酸苯酚法检验, 合并单一峰部分, 浓缩, 加乙醇沉淀, 抽滤, 分别用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 真空干燥, 得真菌多糖 W_{11} . 该多糖经醋酸纤维电泳, 硼酸缓冲溶液作电泳液, 甲苯胺兰作显色剂, 显色为一点.

1.3 W_{11} 甲醇解

(1) HCl 甲醇溶液的制备. 分析纯甲醇加 Mg 条和少量碘回流, 蒸馏, 得无水甲醇, 取无水甲醇于三颈瓶中, 称量. 用浓 H_2SO_4 滴加入 NaCl 中, 加热, 将产生的 HCl 分别通过浓 H_2SO_4 干燥塔、无水 CaCl_2 干燥塔, 通入已称量的无水甲醇的三角锥瓶中, 三颈瓶放入冰水中冷却. 多余 HCl 气体通过 CaCl_2 干燥管, 用 NaOH 溶液吸收. 通完 HCl 后, 再次称量三颈瓶, 计算 HCl 甲醇溶液的浓度, 用无水甲醇稀释制备所需浓度的 HCl 甲醇溶液.

(2) W_{11} 甲醇解. 称取经 P_2O_5 真空干燥后 W_{11} 于 Ample 瓶中, 通干燥 N_2 , 用注射器注入 HCl 甲醇溶液, 封管, 在 80°C 反应 20 h, 反应完后, 冷至室温, 小心用 N_2 吹干, 真空干燥, 得多糖的甲醇解产物.

1.4 甲醇解产物的三甲基硅醚化 干燥的甲醇解产物注入无水吡啶, 待完全溶解后, 再注入六

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672053; 20072058); 广东省自然科学基金资助项目 (980371)

收稿日期: 2001-10-29; 作者简介: 余志刚 (1961—), 男, 副教授, 博士研究生; 通讯联系人: 林永成.

甲基二硅氮烷和氯化三甲基硅烷, 摇均, 室温放置 30 min.

1. 5 三甲硅醚衍生物 GC/MS 分析 将三甲硅醚衍生物进行 GC/MS 分析, 取上清液 1 ~ 5 μ L 进样. GC 条件: SE-54 石英毛细管柱 (0. 25 mm $\times$ 30 m), 进样口温度 270 $^{\circ}$ C, 程序升温 150 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C, 保持 4min. MS 条件: 接口 230 $^{\circ}$ C, 离子源 El^{+} , En-erge: 70 eV, 检测器电压: 280 eV, 质谱扫描 43. 00 ~ 650. 00.

2 结果与讨论

1356 号菌体经过乙酸乙酯和乙醇提取脱脂后, 除掉脂溶性的小分子物质, 再用热水提取, 水提物用 Sevag 法除蛋白, 加 H₂O₂ 脱色, 经过 DEAE 纤维素和 Sephadex G50 柱色谱得到真菌多糖 W₁₁, 经醋酸纤维薄膜电泳证明为均一组分. 真菌多糖 W₁₁ 的甲醇解产物, 经过三甲硅醚化后进行 GC/MS 分析, 结果见表 1.

从 GC/MS 实验结果看, 多糖甲醇解后, 其组成单糖可已行成多个峰, 有 α 和 β 异构体、吡喃型和呋喃异构体以及不同取代生物, 这种多峰现象不影响确定多糖的单糖比例. 从化合物 1 和 14 的面积看, 所占比例较小, 可以看成是杂质, 因此该多糖主要是由葡萄糖和半乳糖的摩尔比按 3 : 2 比例组成.

表 1 W₁₁ 甲醇解后三甲硅醚衍生化的 GC/MS 分析结果

Tab 1 The result of GC/MS analysis for the trimethylsilyl derivatives of methanolysis for W₁₁

峰序号	化合物	保留时间/ min	峰面积比/ %
1	Xylose	5. 50	0. 3
2	Glucose	6. 12	
3	Glucose	6. 40	
4	Glucose	6. 73	58. 4
5	Glucose	7. 39	
6	Glucose	7. 54	
7	Glucose	7. 59	
8	Galactose	6. 44	
9	Galactose	6. 64	
10	Galactose	6. 80	41. 0
11	Galactose	6. 8	
12	Galactose	7. 11	
13	Galactose	7. 33	
14	Galacturonic acid	7. 74	0. 3

参考文献:

[1] HURTLEY S, SERVICE R, SZUROMI P. Cinderella' s coach is ready[J] . Science, 2001, 291(5512) : 2337.
[2] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel N-cinnamoylcyclopeptide an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea [J] . Tetrahedron Letters, 2001, 42: 449.
[3] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five unique compounds, xyloketal s from mangrove fungus *Xylaria* sp (#2508) from the South China Sea coast[J] . J Org Chem, 2001, 66(19) : 6252.

Study on the Methanolysis of the Fungal Polysaccharide from the Marine Mangrove Fungus (Strain No. 1356) from the South China Sea

SHE Zhi gang, HU Gu ping, WU Yao wen, LIN Yong cheng, WU Xiong yu

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A fungal polysaccharide W₁₁ was isolated and purified from the marine mangrove fungus (strain No. 1356) from the South China Sea. The methanolysis of W₁₁ was studied. The reaction products were trimethylsilylated and analyzed quantitatively by GC/MS. The results indicated that W₁₁ consists of glucoses and galactoses. Their mole rate is 3 : 2. The polysaccharide showed cytotoxic effect to human hepato cellular cancer cells, HepG2 and Bel7402. The IC₅₀ equals 50 μ g/mL and 25 μ g/mL respectively.

Keywords: fungal polysaccharide; methanolysis; trimethyl silylation; marine mangrove fungus