



УДК 577.114.5 : 543.422.25

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ДРОЖЖЕВЫХ  $\alpha$ -D-МАННАНОВ  
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ  $^{13}\text{C}$ -ЯМР

Кочин П., Маслер Л., Шандула Й.

Институт химии Словацкой Академии наук, Братислава, Чехословакия

Усов А.И., Шапков А.С., Яроцкий С.В.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Возможности спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР как метода структурного анализа полисахаридов исследованы на примере дрожжевых  $\alpha$ -D-маннанов. Показано, что значения химических сдвигов сигналов атомов углерода в характеристических областях спектров позволяют определить положения гликозидных связей, константы спин-спинового взаимодействия  $J_{\text{C-1, H-1}}$  дают информацию о конфигурации аномерных центров, а интегральные интенсивности сигналов дают возможность оценить относительное содержание моносахаридных звеньев каждого типа в полисахаридных молекулах. Данные спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР использованы для характеристики 16 маннанов, выделенных из разных видов дрожжей, и классификации их по структурным признакам.

Клеточные стенки большинства дрожжей содержат гликопротеины, углеводные цепи которых построены из остатков D-маннозы. Методы экстракции, включающие в себя щелочную обработку, приводят к расщеплению углевод-белковых связей и позволяют получать полисахаридные препараты — дрожжевые маннаны. Структурный анализ этих полисахаридов представляет значительный интерес, поскольку установлено, что именно маннаны клеточной стенки определяют антигенную специфичность поверхности клеток дрожжей, многие из которых являются патогенными [1]. Сведения о строении этих полисахаридов могут быть использованы для выявления структурных элементов, которые служат антигенными детерминантами, и для хемотаксономии дрожжей.

Большинство известных дрожжевых маннанов построены из остатков  $\alpha$ -D-маннопиранозы и имеют высоковетвленную структуру, исследование которой химическими методами является достаточно трудоемкой и длительной работой. В последние годы для отнесения маннанов по структурным особенностям к определенным группам был привлечен метод спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР [2], а затем и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР [3–5]. Однако оба этих метода использовались по принципу «отпечатков пальцев» без подробного анализа спектров. В частности, в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннанов рассматривалась главным образом лишь область, отвечающая сигналам C-1, хотя отнесение сигналов C-1 к определенным звеньям без интерпретации остальных областей спектра не может считаться достаточно корректным, поскольку в отличие от большинства моносахаридов сигналы C-1 остатков маннопиранозы с  $\alpha$ - и  $\beta$ -конфигурацией гликозидного центра расположены в перекрывающихся областях спектра [6].

Данная работа посвящена полной интерпретации спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ряда дрожжевых маннанов, содержащих  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-связанную главную цепь из остатков D-маннопиранозы, полностью или частично замещенных по положению 2 единичными остатками  $\alpha$ -D-маннопиранозы или короткими олигосахаридными цепочками. Такой тип строения дрожжевых маннанов является одним из наиболее распространенных. Полисахариды, взятые в качестве объектов исследования, были получены по стандартной методике [7] из дрожжей, перечисленных в табл. 1.

По данным частичного ацетоллиза [10–13], маннан из *S. chevalieri* [1] имеет  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-связанную главную цепь, практически все моносахаридные:

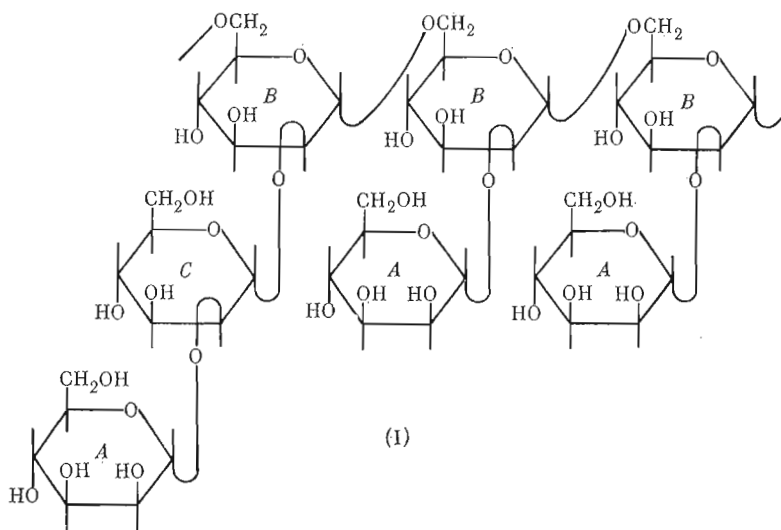
Относительное содержание структурных элементов в маннанах из различных видов дрожжей

Источник маннана	Звено				
	A	B	C	D	E
<i>Saccharomyces chevalieri</i> (I)	2,4	2,4	1,0		
<i>S. rouxii</i> *	1,1(1,4)	1,1(1,4)	1,0(1,0)		(0,3)
<i>S. cerevisiae</i> *	1,7(2,1)	1,7(2,0)	1,0(1,0)	(0,13)	1,7(1,0)
<i>S. bisporus</i>	1,0	1,0	2,4		
<i>Candida albicans</i> , серотип В	2,3	2,3	2,3		1,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	4,7	4,7	1,0		1,7
<i>C. parapsilosis</i>	1,6	1,6	4,0	1,2	1,0
<i>C. lipolytica</i>	2,0	2,0	3,3	1,7	1,0
<i>C. krusei</i>	1,8	1,8	2,0		1,0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (III)	6,0	6,0	1,0	1,0	1,5
<i>Cryptococcus albidus</i>	1,8	1,8	2,5		1,0
<i>Hansenula anomala</i> (II)	7,0	7,0	1,0	1,5	
<i>H. petersonii</i>	3,3	3,3	4,7	1,0	1,3
<i>H. jadinii</i>	3,5	3,5	5,0	1,0	2,5
<i>Torulopsis glabrata</i>	1,7	1,7	1,5		1,0
<i>T. etchelsii</i>	4,4	4,4	1,0		

\* В скобках приведены величины, полученные из данных химических методов анализа для *S. cerevisiae* [8] и *S. rouxii* [9].

звенья которой замещены по положению 2 цепочками из  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2-связанных остатков *D*-маннопиранозы, причем незначительное количество концевых остатков в этих цепочках может быть присоединено  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3-связями. При анализе спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР этого полисахарида (рис. 1, табл. 2) мы использовали данные, полученные при интерпретации спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР различных синтетических манноолигосахаридов [14–19], и общие закономерности изменения положения сигналов  $^{13}\text{C}$  в спектрах молекул углеводов в зависимости от места *O*-гликозилирования и ориентации заместителей при гликозилированном и соседних с ним атомах углерода [6].

Интерпретацию спектра маннана (I)



мы начали с наиболее слабopольной области сигналов C-1. Эта область содержит три сигнала, которые в соответствии с приведенными выше данными о строении полисахарида (I) должны отвечать атомам C-1 концевых, 2-моно- и 2,6-ди-*O*-замещенных остатков маннозы. В самом слабом поле ( $\delta$  103,0 м.д.), очевидно, расположен сигнал концевых остатков А манно-

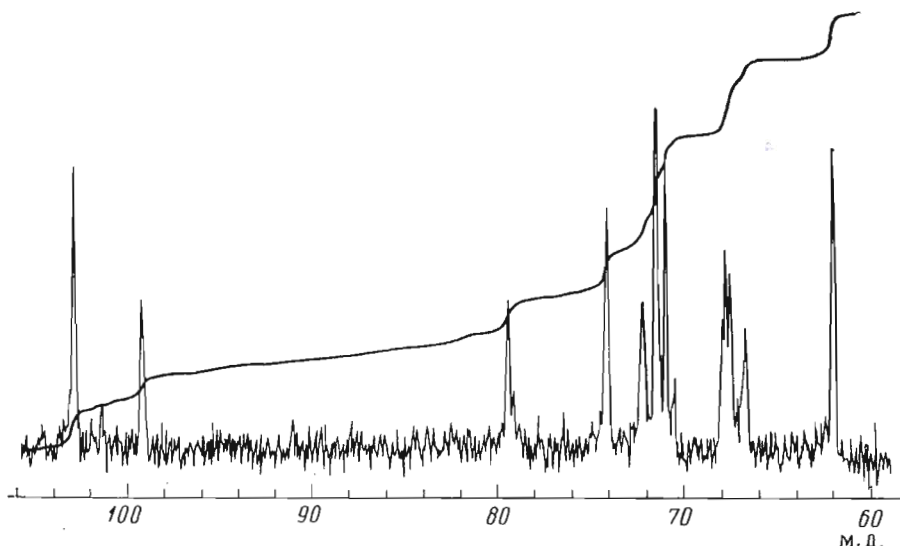


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана из *S. chevalieri* (I)

пиранозы (рис. 1), поскольку в них отсутствуют заместители, под влиянием которых этот сигнал мог бы смещаться в более сильное поле. Из спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР манноолигосахаридов известно, что положение сигналов С-1 концевых остатков маннозы зависит от места гликозилирования ими следующего остатка маннозы в цепочке [19]. Этот эффект получил название «сдвиг гликозилирования». В частности, значение химического сдвига резонанса С-1  $\delta$  103,0 м.д. соответствует С-1 концевому остатку маннозы, соединенного с С-2 следующего остатка  $\alpha$ -гликозидной связью. Наличие такого же сигнала в спектре полисахарида (I) указывает на то, что концевые остатки А в нем присоединены  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2-связями; углеродным атомам С-2 — С-6 остатков А в спектре соответствует еще пять сигналов с близкими интегральными интенсивностями, обнаружение и отнесение которых было проведено по аналогии с известной интерпретацией спектра метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида [20]. В самом сильном поле в области резонансов С-1 ( $\delta$  99,3 м.д.) должен находиться сигнал С-1 2,6-ди-О-замещенных остатков маннозы в главной цепи (звено В), что объясняется совместным влиянием  $\beta$ -эффекта О-маннозилирования по С-2 и смещения сигнала С-1 при образовании гликозидной связи по О-6 соседнего остатка В в главной цепи маннана [19]. Третий сигнал в области резонансов С-1 в анализируемом спектре, очевидно, соответствует 2-О-замещенным остаткам маннозы в боковых цепочках (звено С). Положение его определяется  $\beta$ -эффектом при замещении по С-2 вместе с эффектом гликозилирования по С-2 при образовании  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2-связи между остатками маннозы [19].

Следующей информативной областью спектра является область сигналов кольцевых атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей (81—78 м.д.). В ней наблюдаются два разрешенных сигнала. Зная обычные эффекты маннозилирования [19] и положение сигналов С-2 — С-6 в спектре метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида [20], можно утверждать, что оба

Таблица 2

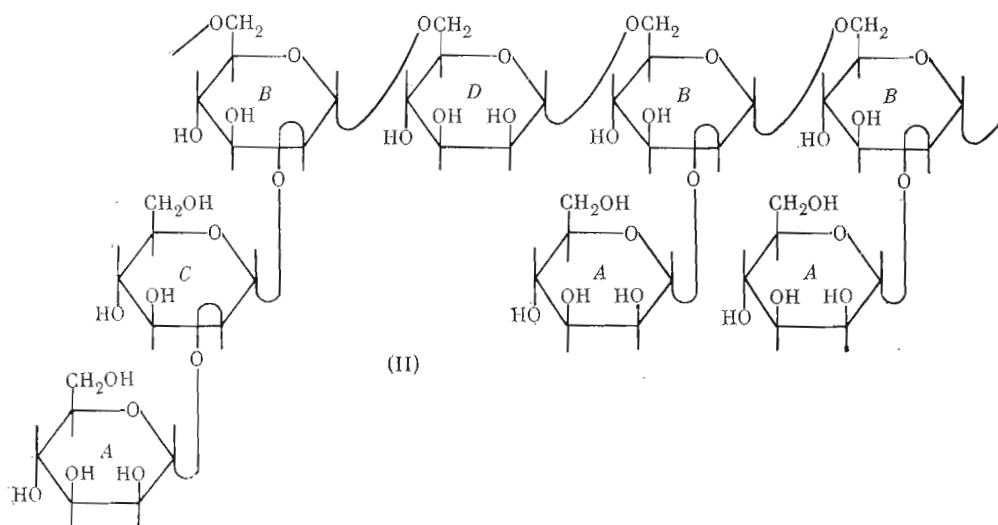
Химические сдвиги (м. д.) сигналов атомов углерода в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР дрожжевых маннанов

Звено	С-1	С-2	С-3	С-4	С-5	С-6
A	103,0	71,6	71,6	67,9	74,2	62,1
B	99,3	79,5	71,1	67,7	72,3	66,9
C	101,5	79,2	70,8	67,9	74,1	62,1
D	100,6	71,2	71,8	67,8	72,4	66,6
E	103,1	70,8	80,0	67,1	74,3	62,2

они относятся к С-2 остатков маннозы, замещенных по положению 2, т. е. звеньев *B* и *C*. Отнесение этих сигналов к конкретным звеньям было сделано на основании сравнения их интегральных интенсивностей с интенсивностями сигналов С-1 рассматриваемых звеньев. Исходя из этого параметра, мы установили, что сигнал с  $\delta$  79,5 м.д. относится к С-2 остатков *B*, а с  $\delta$  79,1 м.д. — к С-2 звеньев *C*. Сигнал свободных С-6 имеет хим. сдвиг 62,1 м.д., а участвующих в образовании гликозидных связей — 66,9 м.д. Сравнивая положения прочих сигналов со спектрами модельных соединений и учитывая различия в интегральных интенсивностях резонансных линий углеродных атомов, принадлежащих к различным звеньям молекулы полисахарида, мы смогли провести отнесение всех остальных резонансов в спектре маннана (I) (см. табл. 2).

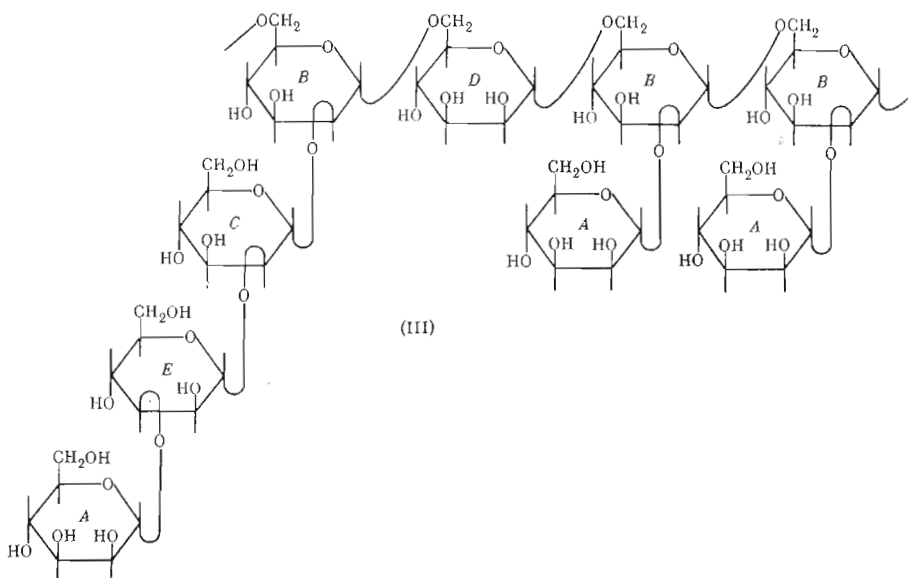
Интерпретация спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана (I) дала возможность изучить этим методом строение других маннанов подобного типа. В качестве объектов для дальнейшего исследования мы выбрали маннаны из *H. anomala* (II) и *K. marxianus* (III), которые ранее были охарактеризованы спектрами  $^1\text{H}$ -ЯМР [2, 10, 21]. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов (II) и (III) оказались сходными со спектром маннана из *S. chevalieri*, однако были обнаружены и некоторые различия.

Так, в области сигналов С-1 в спектре маннана (II)



присутствовал дополнительный сигнал с  $\delta$  100,55 м.д. (рис. 2). На основании литературных данных по типу структуры (II) [10] и указанных выше закономерностей мы отнесли его к С-1 не замещенного по С-2 звена *D* в  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-связанной главной цепи (отсутствие заместителя при С-2 приводит к смещению сигнала С-1 в слабое поле по сравнению с сигналом С-1 звена *B*). Исходя из интегральной интенсивности сигнала С-1 звена *D*, мы провели анализ всех остальных областей спектра маннана (II), в результате чего оказалось возможным выделить и отнести все резонансы, соответствующие углеродным атомам звена *D* (табл. 2).

При рассмотрении спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана (III) мы обнаружили новый характеристический сигнал с  $\delta$  80,0 м.д., который отсутствовал в спектрах полисахаридов (I) и (II). Используя тот же, что и ранее, подход с учетом  $\alpha$ -эффекта маннозилрования по положению 3 и сопровождающих его  $\beta$ -эффектов, мы отнесли данный сигнал к С-3 не встречавшегося ранее звена *E* в боковой цепи маннана (III) (рис. 3), а сигналы с  $\delta$  70,8 и 67,1 м.д. — соответственно к С-2 и С-4 этого звена. Сигналы остальных С-атомов звена *E*, которые не испытывают сколько-нибудь значительного воздействия при замещении по С-3, совпадают по положению с соответствующими сигналами звена *A*, увеличивая их интегральную интенсивность.



Таким образом, мы полностью интерпретировали спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР трех дрожжевых маннанов, содержащих практически все структурные элементы, типичные для разветвленных дрожжевых манназов с  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-связанной главной цепью. Это дает возможность по спектрам  $^{13}\text{C}$ -ЯМР идентифицировать аналогичные по структуре маннаны из других источников. Так, тот же набор сигналов, что и в спектре маннана (I), содержится в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннанов из *T. etchellsii* и *S. rouxii*, однако соотношение их интегральных интенсивностей указывает на различное содержание отдельных звеньев, т. е. в конечном счете на различия в длине боковых цепочек (табл. 1). По типу маннана (III) построены полисахариды из *C. albicans*, серотип В, *C. pseudotropicalis*, *T. glabrata* и *S. cerevisiae*, в которых идентифицированы все структурные элементы, характерные для полисахаридов типа (III), за исключением звена D. Следует отметить, что выводы о строении изученных маннанов, сделанные на основании анализа спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, находятся в соответствии со сведениями, полученными при их исследовании химическими и иммунохимическими методами, а также с данными спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР.

Особый интерес представляло изучение возможности получения из спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннанов не только качественной, но и количественной

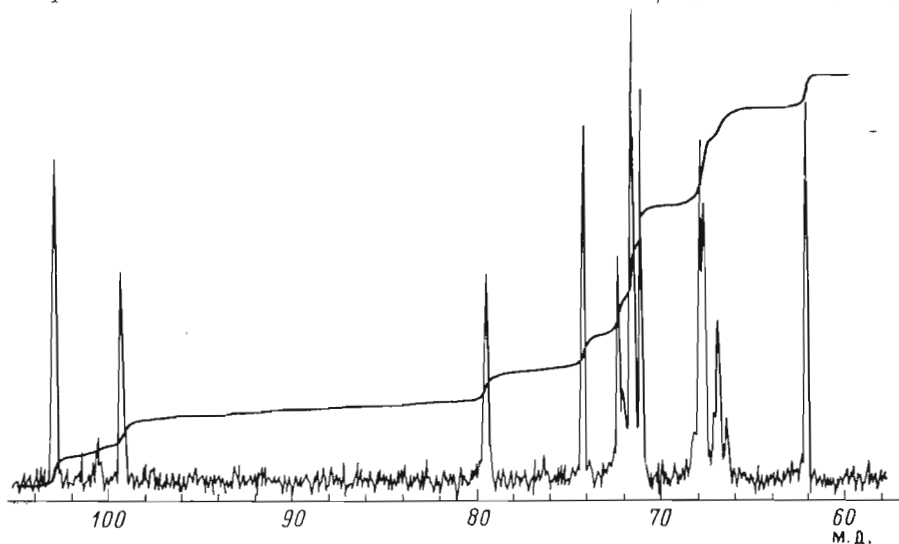


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана из *H. anomala* (II)

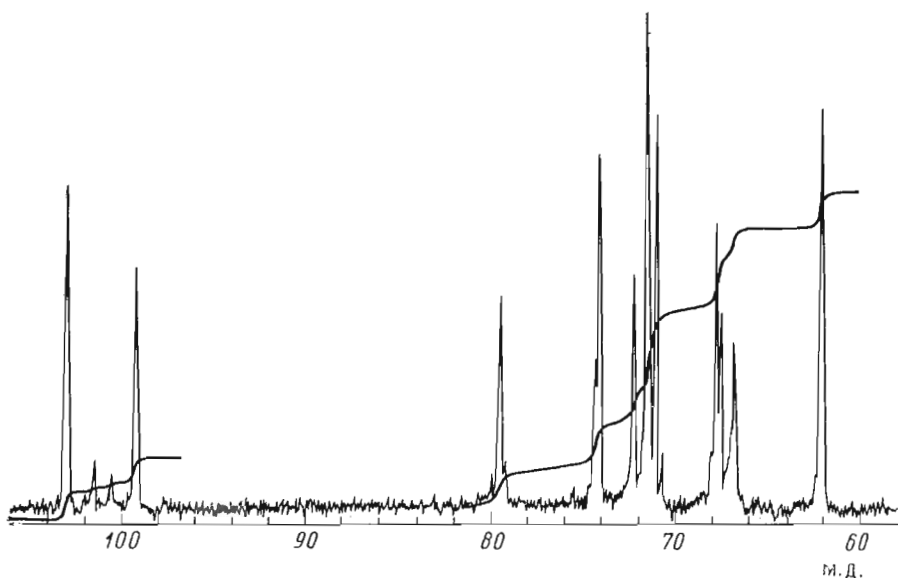
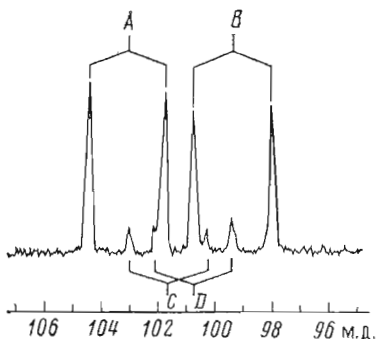


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР из *K. marxianus* (III)

характеристики их структуры. Ранее мы показали на примере линейных ксиланов [22] и разветвленных арабианов [23], что по интегральным интенсивностям разрешенных групп сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов можно достаточно точно определить относительное содержание структурных элементов. Располагая полностью интерпретированными спектрами дрожжевых маннанов, мы попытались использовать такой подход и в данном случае. При этом в некоторых случаях, а именно для маннанов, содержащих только звенья *A*, *B* и *C* (см. табл. 1), мы обнаружили несоответствие между интегральными интенсивностями сигналов C-1 звеньев *A* и *B* (первая выше на  $\sim 20\%$ ), хотя из общих соображений количество точек разветвления в молекуле полисахарида должно равняться количеству концевых моносахаридных остатков; в то же время интегральные интенсивности других разрешенных сигналов этих звеньев оказались равными. Было показано, что причиной такого отклонения являются не различия во временах релаксации для C-атомов в цепи и разветвлениях, а разные значения усиления за счет ядерного эффекта Оверхаузера для атомов C-1 этих остатков, поскольку при съемке спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР таких полисахаридов с использованием техники «inverse gated decoupling», при которой полностью отсутствует усиление за счет эффекта Оверхаузера, эти интегральные интенсивности выравниваются. Следовательно, и в случае разветвленных маннанов (используя при необходимости специальные приемы) можно получить достаточно корректную информацию об относительном содержании структурных элементов. Рассчитанные из спектров

Рис. 4. Область сигналов C-1 в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана (II), полученного с использованием техники «gated decoupling»



значения этих величин приведены в табл. 1, там же для сравнения даны результаты определения относительного содержания отдельных звеньев в некоторых маннанах методом метилирования.

Как уже отмечалось выше, рассмотрение одной области сигналов C-1 в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннанов, полученных в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами, не всегда позволяет определить конфигурацию гликозидных центров остатков маннозы. Однако сведения об аномерных конфигурациях можно получить, определив константы спин-спинового взаимодействия C-1 с H-1. Нами на примере спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР маннана (II) (рис. 4), полученного с использованием техники «gated decoupling», установлено, что значения КССВ  $J_{\text{C-1, H-1}}$  для сигналов атомов C-1 всех звеньев маннана (II) равны 169,7 Гц, что характерно для  $\alpha$ -аномеров гекоспираноз (для  $\beta$ -аномеров они меньше на величину порядка 10 Гц [6]).

Таким образом, спектроскопия  $^{13}\text{C}$ -ЯМР позволяет получить обширную информацию о строении дрожжевых маннанов, в том числе о конфигурации гликозидных связей, наличии разветвлений и положении связей между моносахаридными звеньями.

### Экспериментальная часть

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР получены на спектрометре Bruker-Physik WM-250 для 3% растворов полисахаридов в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $30^\circ\text{C}$  в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами, для ряда маннанов — с использованием техники «inverse gated decoupling», а для полисахарида из *H. anomala* также и без подавления взаимодействия с протонами с применением техники «gated decoupling» [24]. Химические сдвиги измерены относительно диметилсульфоксида в качестве внутреннего стандарта и пересчитаны относительно тетраметилсилана по соотношению  $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{DMSO}} + 39,5$  м.д.

Культуры дрожжей получены из коллекции дрожжей Института химии Словацкой Академии наук. Дрожжевые клетки культивировали на полусинтетической среде, содержащей 50 г глюкозы, 3 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 г  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 г дрожжевого автолизата и 1 мл стандартного раствора микроэлементов на 1000 мл среды (ср. [10]) в течение 3 сут при  $28^\circ\text{C}$ . Клетки отделяли центрифугированием и дважды промывали водным NaCl. Маннаны экстрагировали 2% водным КОН ( $100^\circ\text{C}$ , 1 ч) и очищали через медный комплекс, образующийся с реактивом Фелинга [7].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ballou C. E. Adv. Microbiol. and Physiol., 1976, v. 14, p. 93–158.
2. Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. Adv. Appl. Microbiol., 1970, v. 13, p. 25–87.
3. Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. Can. J. Chem., 1973, v. 51, № 14, p. 2375–2383.
4. Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. Can. J. Microbiol., 1972, v. 18, № 11, p. 1709–1715.
5. Gorin P. A. J. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1981, v. 38, p. 13–104.
6. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорганическая химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
7. Эдвардс Т. Е. В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 382–385.
8. Peat S., Turvey J. R., Doyle D. J. Chem. Soc., 1961, p. 3918–3923.
9. Gorin P. A. J., Perlin A. S. Can. J. Chem., 1956, v. 34, p. 1796–1803.
10. Sandula J., Kočková-Kratochvílová A., Šíkl D. J. Gen. Microbiol., 1974, v. 83, Pt. 2, p. 339–347.
11. Ballou C. E., Lipke P. N., Raschke W. C. J. Bacteriol., 1974, v. 117, № 2, p. 461–467.
12. Sandula J., Vojtková-Lepsiková A. Folia Microbiol., 1974, v. 19, № 1, p. 94–101.
13. Karson E. H., Ballou C. E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 18, p. 6484–6492.
14. Ogawa T., Katano K., Sasajima K., Matsui M. Tetrahedron, 1981, v. 37, № 16, p. 2779–2786.
15. Ogawa T., Sasajima K. Tetrahedron, 1981, v. 37, № 16, p. 2787–2792.
16. Ogawa T., Sasajima K. Carbohydr. Res., 1981, v. 93, № 1, p. 53–66.
17. Ogawa T., Sasajima K. Carbohydr. Res., 1981, v. 93, № 1, p. 67–81.
18. Ogawa T., Sasajima K. Carbohydr. Res., 1981, v. 93, № 2, p. 231–240.
19. Ogawa T., Sasajima K. Carbohydr. Res., 1981, v. 97, № 2, p. 205–227.
20. Gorin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212–1223.
21. Spencer J. F. T., Gorin P. A. J. Can. J. Microbiol., 1969, v. 15, № 4, p. 375–382.
22. Усов А. И., Яроцкий С. В., Шашков А. С., Тищенко В. П. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 1, с. 57–65.

23. Кочиш П., Усов А. И., Шашков А. С., Яроцкий С. В., Томан Р., Цанек П. Бюро-  
рган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 240–245.
24. Breitmaier E., Bauer G. Carbon-13 NMR spectroscopy. An operation guide with  
exercises. Stuttgart: Thieme, 1977.

Поступила в редакцию  
21.IX.1983

### <sup>13</sup>C NMR STUDY ON THE STRUCTURE OF YEAST $\alpha$ -D-MANNANS

KOČIŠ P., MASLER L., ŠANDULA J., USOV A. I., SHASHKOV A. S.,  
YAROTSKY S. V.

*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava;  
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Based on the complete interpretation of <sup>13</sup>C NMR spectra of several yeast  $\alpha$ -D-mannans of known structures, it was shown that valuable information on the linkage positions, anomeric configurations, and proportions of different monosaccharide residues may be obtained from the chemical shifts of carbon resonances, spin-spin coupling constants  $J_{C-1, H-1}$ , and integrated intensities of signals, respectively. <sup>13</sup>C NMR spectra were used for structural characterization and classification of sixteen mannans isolated from different species of yeast.