



УДК 582.282.23-119.2:577.114.5.088

СТРОЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ГЕТЕРОГЛИКАНОВ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ КРИПТОКОККОВВитовская Г. А., Самаркина Г. М., Апаньева Е. П.,
Шапков А. С.*, Гончаров А. Ю.

Химико-фармацевтический институт, Ленинград;

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

Изучены внеклеточные гетерогликаны — глюкуроноксилосаманнаны, образуемые дрожжами *Cryptococcus skinneri*, *Cr. dimennae*, *Cr. humicolus*, *Cr. luteolus*. Показано, что полисахариды имеют одинаковое строение основной цепи, представляющей собой (1→3)- α -D-маннан, и различия в степени замещения маннозных единиц кора остатками глюкуроновой кислоты и ксилозы боковых цепей, а также в строении боковых цепей. Наиболее просто построенный гетерогликан *Cr. humicolus* идентичен капсульному полисахариду серотипа D *Cr. neoformans*. Глюкуроноксилосаманнан *Cr. skinneri* является самым разветвленным из до сих пор изученных полисахаридов криптококков.

Криптококки — капсулированные, аспорогенные, неферментирующие дрожжи. В составе рода *Cryptococcus* наряду с сапрофитными имеется один патогенный вид — *Cr. neoformans*, возбудитель глубокого микоза, называемого криптококкозом или европейским бластомикозом [1]. Распространение различных серотипов *Cr. neoformans* имеет территориальные ограничения. Антигенные детерминанты их капсульных полисахаридов важны для диагноза и прогноза криптококкозов. Сапрофитные виды широко распространены в почвах различных географических зон, входят в состав природных биоценозов [2], способны продуцировать высоковязкие биологически активные полисахариды [3] и другие соединения [4, 5]. Состав и структура полисахаридов служат хемотаксономическими критериями, характеризующими родовую принадлежность дрожжей [6].

В настоящей работе приведены данные по установлению строения внеклеточных гетерогликанов, представителей четырех видов криптококков (*Cr. skinneri*, *Cr. dimennae*, *Cr. humicolus*, *Cr. luteolus*). Исследование строения полисахарида *Cr. luteolus* было начато ранее [7]. *Cr. humicolus* до недавнего времени относился к роду *Candida* и, следовательно, должен был образовывать, как и другие неокрашенные дрожжи, маннан характерного строения [3].

Исходные полисахариды были выделены осаждением этанолом из супернатантов ферментационной массы после выращивания дрожжей на глюкозо-пептоно-минеральной среде в течение 5 сут при 24–25°С и постоянном перемешивании (220 об/мин) [8]. Анализом гидролизатов полисахаридов с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов [9] в них определены манноза (32–60%), ксилоза (15,5–61,1%), глюкуроновая кислота (3,5–14%) и галактоза (2–10,5%). Содержание зольных элементов колебалось в пределах 3–8%, белка — 0,42–1,3%, О-ацетильных групп — 2–7%. При гель-хроматографии на сефарозе 6В, ВЭЖХ и ультрацентрифугировании полисахариды давали довольно размытые профили. С помощью осаждения в виде цетавлоновых солей мы [10] показали, что в полисахаридах *Cr. skinneri*, *Cr. dimennae*, *Cr. humicolus* содержится по две фракции с соотношением 9–9,5 : 0,5–1. В главной фракции определили маннозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту (табл. 1). В составе минорной фракции найдены манноза (36–67%), ксилоза (15–32%), галактоза (13–48%). Полисахарид *Cr. luteolus* был представлен одной фракцией (табл. 1).

Характеристика внеклеточных гетерогликанов

Полисахарид	Моносахаридный состав, %			Содержание ОАс, %	[α] _D ²⁰ , град (с 0,1, растворитель)	Содержание белка, %	Относительная вязкость (с 0,1, H ₂ O)
	Man	Xyl	GlcA				
<i>Cr. skinneri</i>	28,5	62,1	9,4	6,08±0,18	-23 (H ₂ O)	0,39±0,18	2,88±0,17
<i>Cr. dimennae</i>	47,2	42,9	9,9	2,79±0,27	-17 (H ₂ O)	0,07±0,03	1,65±0,21
<i>Cr. humicolus</i>	59,7	23,0	17,3	6,38±0,32	-15 (1 н. NaOH)	0,50±0,10	2,69±0,15
<i>Cr. luteolus</i>	58,2	15,2	26,6	7,20±0,28	-24 (1 н. NaOH)	0,05±0,02	5,81±0,20

Таблица 2

Результаты периодатного окисления гетерогликанов

Полисахарид	NaIO ₄	HCOOH	Количество гликозидных связей, %		
	моль/моль сахарного остатка		Передующие концевые единицы и/или 1 → 6	1 → 4 и/или 1 → 2	1 → 3
<i>Cr. skinneri</i>					
нативный	1,20	0,47	47	26	27
восстановленный	1,25	0,54	54	18	28
<i>Cr. dimennae</i>					
нативный	1,12	0,54	54	5	42
восстановленный	1,13	0,55	55	3	42
<i>Cr. humicolus</i>					
нативный	0,79	0,35	35	10	55
восстановленный	0,68	0,27	27	14	59
<i>Cr. luteolus</i>					
нативный	0,64	0,23	23	18	59
восстановленный	0,86	0,32	32	21	48

Абсолютная конфигурация моносахаридов, входящих в состав глюкуронооксиломаннанов, была определена по удельному вращению фенилозаонов маннозы и глюкозы [11], а также дважды кристаллизованной ксилозы, полученных из восстановленных по карбоксильной группе полимеров. При гель-хроматографии на сефарозе 6В, ультрацентрифугировании и ВЭЖХ глюкуронооксиломаннаны давали по одному четкому симметричному пику. Молекулярная масса, определенная с помощью ВЭЖХ относительно набора стандартных образцов декстранов (Pharmacia, Швеция), составляла более 500 000.

Из-за наличия в полисахаридах глюкуроновой кислоты периодатному окислению подвергали как нативные, так и восстановленные по карбоксильным группам гетерогликаны (табл. 2). При этом данные окисления восстановленных глюкуронооксиломаннанов следует считать более достоверными, поскольку эти полимеры были менее подвержены сверхокислению. После боргидридного восстановления окисленных периодатом полисахаридов и полного кислотного гидролиза БХ были обнаружены манноза, глицерин, а в случае полимера *Cr. skinneri* — дополнительно следы ксилозы.

После обработки полисахарида *Cr. dimennae* по Смуту получили нерастворимый маннан (БХ гидролизата показано наличие лишь маннозы). Выход его составил 45% от количества взятого для деградации нативного полимера, что примерно соответствовало содержанию в нем маннозы (47,2%, табл. 1). Из супернатанта осаждением спиртом выделили растворимый в воде полисахарид (выход 2%), содержащий, по данным ГЖХ, 84,8% маннозы, 10,6% ксилозы, 4,6% глюкуроновой кислоты ($[\alpha]_D^{20} + 20^\circ$ (с 0,1; 1 н. NaOH)).

Нерастворимые маннаны были получены также при деградации гетерогликанов *Cr. skinneri* и *Cr. humicolus*. При этом были выделены сходные

Значение химических сдвигов в ^{13}C -ЯМР-спектре альдобиоуроновой кислоты из гетерогликана *Cr. humicolus*

Сахарный остаток	Химический сдвиг, м. д.					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>D</i> -Манр α	93,25	79,84	70,63	68,35	73,60	61,84
β	94,86	81,96	74,34	68,35	77,52	62,06
<i>D</i> -ГлеpA $\beta(\beta)$	104,88	73,30	76,32	72,53	76,32	174,5
$\beta(\alpha)$	102,91	73,60				

Таблица 4

Результаты анализа метилированных производных моносахаридов нативных и восстановленных гетерогликанов *

Метилпроизводные моносахаридов	Полисахариды						
	<i>Cr. skinneri</i>		<i>Cr. dimeanae</i>		<i>Cr. humicolus</i>		<i>Cr. luteo-</i> <i>lus</i>
	I	II	I	II	I	II	I
2,3,4Me ₃ Xyl	5,2	5,4	4,8	5,2	1,0	1,1	1,0
2,3Me ₂ Xyl	1,0	1,1	—	—	—	—	—
2,3,4,6Me ₄ Glc	—	1,0	—	1,0	—	1,0	—
2,4,6Me ₃ Man	—	—	—	—	1,0	1,2	1,0
4,6Me ₂ Man	—	—	1,1	1,1	1,9	2,1	2,2
2,6Me ₂ Man	—	—	3,3	3,3	—	—	1,0
6MeMan	3,3	3,2	1,0	1,0	—	—	—

* Приведены соотношения метилпроизводных, рассчитанные относительно наименьшего компонента; I — нативный полисахарид, II — восстановленный полисахарид.

по составу с вышеприведенными минорные, растворимые в воде фракции с $[\alpha]_D^{20} + 23^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} + 28^\circ$ соответственно (с 0,1; 1 н. NaOH). Из гетерогликана *Cr. luteolus* получили лишь маннан, частично растворимый при подщелачивании до pH 8 и нагревании до 60°C , что, по-видимому, было связано с низкой молекулярной массой этого фрагмента. Маннаны были устойчивы к действию периодата.

Для растворимых продуктов деградации были сняты ^{13}C -ЯМР-спектры. На них отчетливо выявились шесть сигналов, принадлежащих остатку α -*D*-маннопиранозы (м.д.): 103,37 (C1), 70,99 (C2), 79,55 (C3), 67,48 (C4), 74,82 (C5), 62,37 (C6), что свидетельствует об одном типе связи между всеми маннозными единицами. Химический сдвиг атома C1 гликозилирующей маннозы при 103,37 м.д. соответствует 1→3-типу связи [12]. Следует отметить, что наличие (1→3)- α -маннанов в качестве основных цепей характерно для построения криптококковых полисахаридов [6].

После частичного гидролиза гетерогликанов БХ выявили пятно, соответствующее по расположению альдобиоуроновой кислоте ($R_{\text{сат}}=0,2$) [13]. Вещество выделили преларативной БХ и рехроматографировали. Угол вращения $[\alpha]_D^{20}$ варьировал от -28 до -31° (с 0,1; вода) в зависимости от исследуемого образца. После гидролиза трифторуксусной кислотой методом ТСХ обнаружили маннозу и глюконовую кислоту.

^{13}C -ЯМР-спектр полученной из гетерогликана *Cr. humicolus* альдобиоуроновой кислоты содержал 20 сигналов (табл. 3), что соответствовало дисахаридному фрагменту. Из них 12 принадлежали α, β -*D*-маннопиранозе, остальные — β -*D*-глюкопирануровой кислоте. Расщепление сигнала при C1 глюконовой кислоты (≈ 2 м.д.) в зависимости от конфигурации гликозидного центра маннозы свидетельствовало в пользу наличия 1→2-связи в дисахаридах. Полная расшифровка спектров с привлечением спектров модельных соединений [12] подтверждает это предположение. Таким образом, выделенный фрагмент имел строение: β -*D*-GlcA-(1→2)- α, β -*D*-Manp.

Альдобиоуроновые кислоты, полученные из глюкуроноксилеманнанов *Cr. skinneri* и *Cr. dimennae*, по данным ^{13}C -ЯМР-спектров оказались практически идентичными альдобиоуроновой кислоте из *Cr. humicolus*.

Как следует из данных по метилированию нативных и восстановленных по карбоксильным группам гетерогликанов с последующим ГЖХ-анализом метилпроизводных в виде ацетатов частично метилированных метилгликозидов (табл. 4), в полисахариде *Cr. skinneri* все остатки глюкуроновой кислоты занимают концевое положение. Из соотношения 2,3,4-три-*O*-метил-*D*-ксилозы и 2,3-ди-*O*-метил-*D*-ксилозы следует, что из пяти терминальных ксилозных остатков один гликозилирует по С4-атому другую ксилозную единицу боковой цепи. Присутствие 6-*O*-метил-*D*-маннозы указывает на двойное замещение соответствующего остатка маннозы основной цепи по С2 и С4.

В полисахариде *Cr. dimennae* и глюкуроновая кислота, и ксилоза занимают только концевое положение. Количество 2,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы практически в 3 раза превышает содержание 4,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы и 6-*O*-метил-*D*-маннозы, т. е. на 3 маннозные единицы основной 1→3-цепи, замещенные по С4, приходится по одному остатку маннозы, замещенному по С2 или по С2 и С4.

Для уточнения местоположения глюкуроновой кислоты в глюкуроноксилеманнаниде *Cr. dimennae* осуществляли щелочную обработку нативного метилированного полисахарида, приводящую к отщеплению остатков уроновой кислоты. После реметилирования продукта щелочной деградации ГЖХ-анализом выявлено наличие 2,3,4-три-*O*-метил-*D*-ксилозы, 2,4,6-три-*O*-метил-*D*-маннозы, 2,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы, а также минорных количеств 4,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы. Появление триметилового эфира маннозы свидетельствует о том, что глюкуроновая кислота в исходном полимере присоединяется к С2-атому маннозного остатка основной цепи, не несущего других заместителей. Это подтверждается обнаружением в гидролизате лишь следовых количеств 4,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы.

В восстановленном полисахариде *Cr. humicolus* все остатки глюкозы также являются невосстанавливаемыми концевыми. Соотношение 2,4,6-три-*O*-метил-*D*-маннозы и 4,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы, равное примерно 1 : 2, свидетельствует о том, что каждая третья единица в маннозной цепи является незамещенной, в то время как остальные остатки маннозы замещены по положению С2.

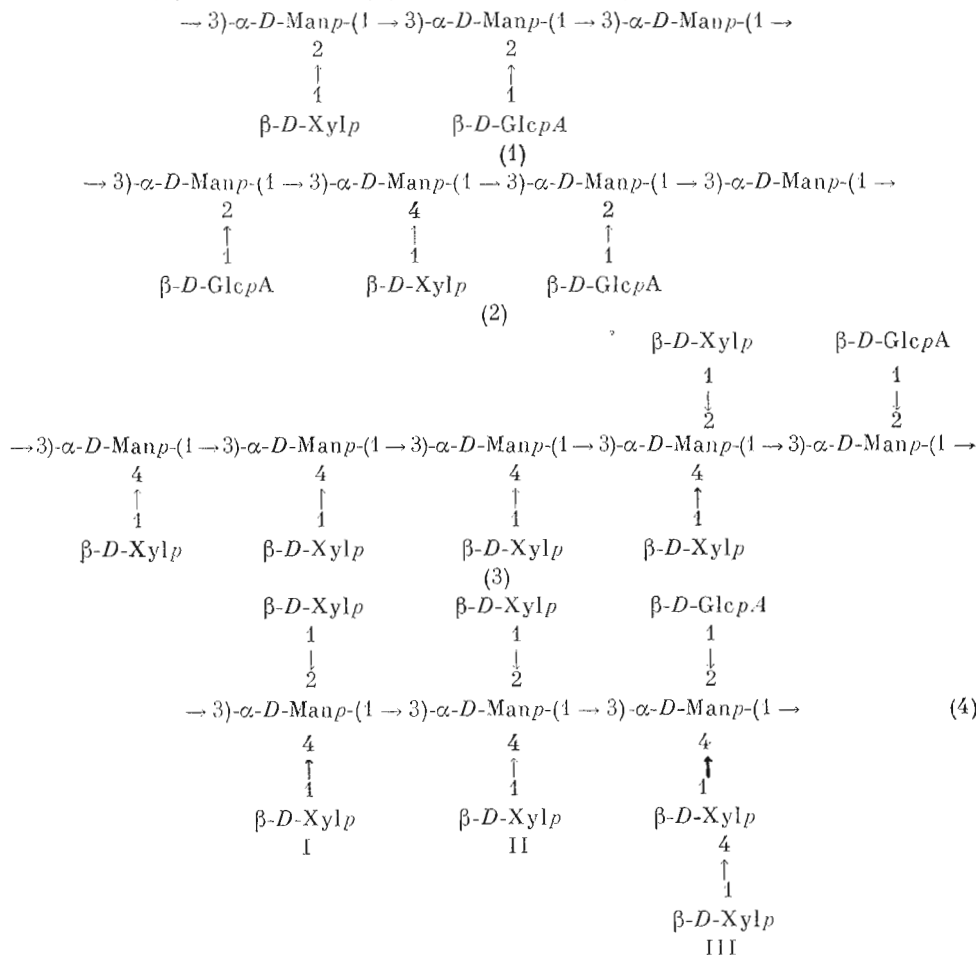
В гетерогликане *Cr. luteolus* количество 4,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы в 2 раза превышает содержание 2,4,6-три-*O*-метил-*D*-маннозы и 2,6-ди-*O*-метил-*D*-маннозы-метил-*D*-маннозы (соотношение 2 : 1 : 1). Каждая четвертая единица в маннозной цепи является незамещенной. Двойное замещение маннозных единиц основной цепи отсутствует. Следует подчеркнуть, что соотношение метилпроизводных маннозы, ксилозы, глюкозы у всех исследованных метилированных восстановленных гетерогликанов было близким с соотношением маннозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты в нативных полимерах (ср. табл. 4 и 1).

^{13}C -ЯМР-спектры нативных и восстановленных по карбоксильным группам полисахаридов были плохо разрешены вследствие сложности строения разветвленных полимеров и большой вязкости их водных растворов. Поэтому стремились получить и исследовать частично деградированные гетерогликаны.

Было установлено, что расщепление восстановленных по карбоксильным группам глюкуроноксилеманнанов в условиях окисления хромовым ангидридом [14] приводит к выделению менее вязких продуктов, отличающихся от нативных полисахаридов соотношением мономеров (табл. 5). Для деградированных таким образом полисахаридов *Cr. dimennae* и *Cr. skinneri* получены сходные ^{13}C -ЯМР-спектры, однако более разрешенный для первого полимера. В них удалось идентифицировать все сигналы, принадлежащие остаткам β-*D*-ксилопиранозы, а также сигналы С1- и С6-атомов α-*D*-маннопиранозы. В спектрах имелось два сигнала С2 ксилозы: 74,7 и 73,9 м. д. Для остальных атомов ксилозных остатков наблюдался один набор сигналов (табл. 6). Расщепление сигнала С2 ксилозы

обусловлено, очевидно, наличием двух типов этих остатков, присоединенных по положениям 2 или 4 маннопиранозы. Кроме того, в спектре ¹³С-ЯМР окисленного хромовым ангидридом полисахарида *Cr. dimennae* отмечено расщепление сигналов С1 и С6 маннозных единиц. Химически* сдвиг при 103,38 м.д. соответствует С1 1→3-связанной маннозы, а при 101,37 м.д. — С1 того же маннозного остатка, но дополнительно гликозилированного в положении 2. Сигнал при 61,70 м.д. принадлежит атому С6 остатка 1→3-связанной маннозы, замещенной в положении 4, а при 62,32 м.д. — не замещенной в этом положении. Таким образом, установлено, что в гетерогликанах ксилоса находится в β-пиранозной форме и связана с маннозными остатками основной цепи или между собой 1→2- и 1→4-связями.

На основании данных, полученных при использовании указанных выше методов и находящихся в полном соответствии друг с другом, приведены возможные типичные структурные единицы гетерогликанов *Cr. humicolus* (1), *Cr. luteolus* (2), *Cr. dimennae* (3), *Cr. skinneri* (4):



Как следует из приведенных формул, все исследованные гетерогликаны имеют одинаковое строение основной цепи, однако различаются по степени замещения маннозных единиц кора боковыми цепями и по строению самих боковых цепей. Наиболее просто построенный гетерогликан *Cr. humicolus* идентичен капсульному полисахариду серотипа D *Cr. neoformans* [15]. Это может быть одним из доказательств того, что полисахариды *Cr. neoformans* не имеют отношения к патогенности этого микроорганизма. Кроме того, наличие у *Cr. humicolus* гетерогликана такого типа подтверждает правомерность перенесения этого организма из рода *Candida* в род *Cryptococcus* [1].

Характеристика продуктов окисления восстановленных по карбоксильным группам полисахаридов хромовым ангидридом

Полисахариды	Моносахариды, %			$[\alpha]_D^{20}$, град (с 0,1, H ₂ O)
	Man	Xyl	Glc	
<i>Cr. skinneri</i>	50,2	42,0	7,8	+17
<i>Cr. dimennae</i>	67,7	23,9	8,4	+19
<i>Cr. humicolus</i>	66,4	19,5	14,1	+20

Таблица 6

Значение химических сдвигов (δ , м. д.) в ^{13}C -ЯМР-спектрах продуктов окисления хромовым ангидридом

Полисахарид	Сахарный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>Cr. dimennae</i>	<i>D</i> -Xyl β β	104,58	74,73; 74,01	76,78	70,58	66,47	
	<i>D</i> -Man α α	103,38; 101,37					62,32; 61,70
<i>Cr. skinneri</i>	<i>D</i> -Xyl β β	104,80	74,67; 73,73	76,77	70,43	66,32	
	<i>D</i> -Man α α	103,25					62,04

В наиболее сложно построенном гетерополимере *Cr. skinneri* в отличие от указанного выше варианта формулы 4 фрагмент III может включать только ксилозные заместители, а глюкуроновая кислота может располагаться во фрагментах I или II. В этом случае во фрагменте III боковая цепь из двух ксилозных единиц может замещать маннозу как по C2, так и по C4. Поскольку ксилозные единицы быстро отщеплялись даже при очень мягких условиях гидролиза, выделение олигосахаридных фрагментов, включающих остатки ксилозы, было затруднительным.

Для установления строения боковых цепей подобных полимеров, по-видимому, наиболее удовлетворительным методическим приемом могло служить использование специфичной α -1,3-маннан — манногидролазы, после воздействия которой можно было бы получить набор олигосахаридов, включающих маннозный остаток основной цепи и боковые заместители. Однако попытки поисков фермента, способного преодолеть такие препятствия, как высокая степень замещения кора боковыми цепями и большая вязкость растворов полимеров, не привели к успеху. Использованные коммерческие препараты манназа не обладали необходимым действием.

Изученные гетерогликаны проявляли иммуномодулирующие и детоксицирующие свойства, оказывали стимулирующее влияние на процесс кроветворения [46, 17].

Экспериментальная часть

^{13}C -ЯМР-спектры олигосахаридов и модифицированных полисахаридов сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D₂O при 40° С с использованием в качестве внутреннего стандарта MeOH (50,15 м. д.). Седиментационные кривые получены на центрифуге MOM 3170B (ВНР) при скорости вращения ротора 50000 об/мин. Оптическое вращение определено на поляриметре Perkin — Elmer-241 при 20° С, ГРХ выполнена на приборе «Цвет-162» на стеклянной колонке (150×4 см) с 3% OV-225 на хроматоне (0,315—0,400 мм). Подвергали исследованию ацетаты полиолов (скорость гелия 40 л/ч, 190° С) и ацетаты частично метилированных метилгликозидов (скорость гелия 30 л/ч, программирование температуры в пределах 120—220°/2° С). ВЭЖХ проведена на приборе Du Pont 830 (США) с использованием колонок (4,1×250 мм), наполненных Synchropack GPS-100, GPS-500, GPS-1000. Скорость подвижной фазы (0,05% водный раствор азидата натрия) 0,6 мл/мин. В качестве детектора использован дифференциальный рефрактометр LDS (США). В прибор вносили 50 мкл 0,5% раствора полисахарида. ВХ моносахаридов и полиолов проводили в системе *n*-бутанол — этанол — вода — кока.

аммиак (40 : 10 : 49 : 1), олигосахаридов — в системе этилацетат — уксусная кислота — вода (9 : 2 : 1) на бумаге Filtrak FN-11. Препаративную БХ выполняли на бумаге FN-18. ТСХ выполняли на пластинках «Silufol» в условиях, аналогичных БХ моносахаридов, с проявлением кислым фталатом анилина. Продукты обнаруживали кислым фталатом анилина, щелочным раствором нитрата серебра и 2% раствором *n*-анилидина в этаноле. Гель-хроматографию осуществляли на колонке (1×30 см) с сепарозой 6 В. Предварительно образцы полисахаридов диализовали против фосфатного буфера, pH 7,2, которым проводили уравнивающие колонки и элюцию. Количество наносимой пробы 2–4 мг/мл, скорость фильтрации 8–10 мл/ч, обнаружение — реакцией с февол-серной кислотой. Содержание О-ацетильных групп определяли по методу Хестриева [18], белка — по методу Лоури [19]. Вязкость растворов полисахаридов относительно воды измеряли вискозиметрически.

Выделение спектрофоточных гетерогликанов. Использовали культуры *Cr. skinneri* ИБФМ У-356, *Cr. dimenae* ИБФМ У-381, *Cr. humicolus* ИБФМ У-984, полученные из коллекции музейных культур Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР (Пушню), и *Cr. luteolus* IFO-0411 из коллекции Института ферментации (Осака, Япония). Полисахариды получали ранее описанным методом [8]. Выход составил 3,0–11,5 г/л питательной среды. Наиболее продуктивными были культуры *Cr. skinneri* и *Cr. humicolus*. Гетерогликаны, содержащие глюкуроновую кислоту, выделяли с помощью цетавлона [10].

Определение моносахаридного состава. Полисахариды (10 мг) гидролизуют 4 ч в 0,5 мл 2 н. H₂SO₄ при 100°С. Раствор обрабатывали BaCO₃ до нейтральной реакции, центрифугировали и исследовали методом БХ. 30–50 мг полисахаридов использовали для получения ацетатов полиолов [9] и исследовали с помощью ГЖХ. Для получения восстановленных по карбоксильным группам полисахаридов использовали метод Фасно [20] в модифицированном варианте. 1 г полимера перемешивали 48 ч в 600 мл смеси метанол — хлороформ — хлористый водород (10 : 1 : 1) при 20°С. После нейтрализации 1 н. NaHCO₃ смесь диализовали 1 сут против дистиллированной воды, добавляли 2 г NaBH₄ и непрерывно перемешивая, выдерживали 48 ч при 4°С. Восстановленный продукт нейтрализовали 2 н. CH₃COOH и диализовали 1 сут против дистиллированной воды. Диализат упаривали до сиропообразного состояния и осаждали этанолом (2 объема). Осадок последовательно промывали этанолом, ацетоном и высушивали в вакууме при 30°С. Для полисахаридов *Cr. skinneri* и *Cr. humicolus* полное восстановление достигалось после двукратной обработки. Восстановленные полисахариды гидролизуют как нативные. Смесь моносахаридов разделяли препаративной БХ. Из выделенных маннозы и глюкозы получили идентичные фенолзазоны [11] с т. пл. 268°С, $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ (с 1,33, пирдин). Ксилозу дважды кристаллизовали из этанола.

Получили продукт с т. пл. 143°С, $[\alpha]_D^{20} = +18,2^\circ$ (с 2,0, вода).

Периодатное окисление и распад по Смитсу. 50 мг нативного или восстановленного полисахарида в 0,015 М водном растворе метапериодата натрия выдерживали 120 ч при 4°С. Каждые 24 ч контролировали поглощение периодата и выделение муравьиной кислоты [14]. Расчет количества гликозидных связей проводили общеизвестным методом [21] с учетом величины средней молекулярной массы сахарного остатка в каждом конкретном случае. Полиолы определяли методом БХ после восстановления окисленных полимеров (20 мг) NaBH₄, деионизации реакционной смеси понитами КУ-2 (H⁺) и ЭДЭ-2П (OH⁻), удаления остатков борной кислоты трехкратным упариванием с метанолом и гидролиза (1 мл 0,5 н. HCl, 6 ч, 100°С).

Полисахарид (250 мг) обрабатывали 40 мл 0,85 М раствора метапериодата натрия в воде в течение 5 сут при 20°С. Смесь диализовали против дистиллированной воды 2 сут, упаривали до 10–15 мл, добавляли 250 мг NaBH₄, выдерживали 12 ч. Доводили pH восстановленного продукта до 5–6 добавлением 2 н. CH₃COOH, обрабатывали КУ-2 (H⁺) и ЭДЭ-2П (OH⁻), упаривали досуха, затем трижды с метанолом. Гидролизовали в 125 мл 0,5 н. HCl в течение 8 ч при 20°С. Нерастворимую часть деградированного полисахарида отделяли центрифугированием при 3000 об/мин. Из супернатанта растворимый полимер осаждали этанолом (2 объема).

Частичный гидролиз нативных полисахаридов. Полисахарид (500 мг) гидролизуют 5 ч в 33 мл 1 н. H₂SO₄ при 100°С, нейтрализовали BaCO₃. Осадок отделяли центрифугированием при 6000 об/мин. Супернатант дополнительно фильтровали и пропускали через колонки 1×15 и 1×30 см с понитами КУ-2 (H⁺) и АВ-17 (OH⁻) соответственно.

Элюцию с первой колонки проводили водой, со второй — сначала водой для удаления нейтральной фракции, затем 1 н. HCOOH для выделения кислой фракции. Последнюю концентрировали упариванием.

С помощью препаративной БХ выделили 15–50 мг альдобиноуроновой кислоты в зависимости от содержания глюкуроновой кислоты в полисахариде. Альдобиноуроновую кислоту (2 мг) гидролизуют в 0,1 мл 2 н. трифторуксусной кислоты 10 ч при 100°С, гидролизат анализируют ТСХ.

Анализ методом метилирования. Метилированию подвергали нативные и восстановленные глюкуроноксептоманы (50 мг). Использовали двукратную обработку по методу Хакомори [22]. Полисахариды *Cr. skinneri* и *Cr. humicolus* дополнительно метилировали по Шурди [23]. Полностью метилированные продукты анализировали ГЖХ в виде ацетатов частично метилированных метилгликозидов.

Окисление восстановленных по карбоксильным группам ацетилированных полисахаридов ангидридом хлороводной кислоты. Восстановленный полисахарид (100 мг) ацетилировали и окисляли как описано ранее [14]. Реакционную смесь, разбавлен-

ную в 2 раза водой, подвергали диализу против проточной (24 ч), а затем против-дистиллированной воды (48 ч) до полного удаления остатков трехоксида хрома.

Деацетилирование окисленных полисахаридов проводили в растворе метоксида натрия (на 100 мг полисахарида 0,5 г металлического натрия в 20 мл метапола). Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды, а затем осаждали этанолом (2 объема). Получили 70–80 мг продукта.

Щелочная обработка нативного метилированного полисахарида. Метилированный полисахарид (20 мг) обрабатывали по методу [24]. Модифицированный полисахарид реметилировали по методу Хакомори и исследовали как описано выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубев В. И. Таксономия и идентификация дрожжевых грибов рода *Cryptococcus*. Пуцдино: ИЦБИ АН СССР, 1980. С. 26.
2. Голубев В. И., Манукян А. Р. // Микробиология. 1979. Т. 48. № 2. С. 314–318.
3. Елинов Н. П. Химия микробных полисахаридов. М.: Высшая школа, 1984. С. 207–232.
4. Залашко М. В. Биосинтез липидов дрожжами. Минск: Наука и техника, 1971. С. 416.
5. Burt W. R., Cazin J. J. // J. Bacteriol. 1976. V. 125. № 3. P. 955.
6. Витовская Г. А. // Микробиол. журн. 1986. Т. 48. № 3. С. 91–101.
7. Ананьева Е. П., Витовская Г. А., Елинов Н. П., Фарбитейн Н. А. // Всесоюз. конф. «Химия и биохимия углеводов». Пуцдино: ИЦБИ АН СССР, 1982. С. 80.
8. Ананьева Е. П., Витовская Г. А., Елинов Н. П., Самаркина Г. М., Синецкая И. А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 22. № 5. С. 684–689.
9. Елинов Н. П., Витовская Г. А., Ананьева Е. П., Абелян В. А., Киселева С. М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 5. С. 636.
10. Abercrombie M. J., Jones J. K. N., Lock M. V., Perry M. B., Stoodley R. J. // Can. J. Chem. 1960. V. 38. № 3. P. 1617–1624.
11. Fischer E. // Ber. 1908. V. 41. P. 75–77.
12. Шашков А. С. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 246–253.
13. Perry M. B., Webb A. C. // Can. J. Biochem. 1982. V. 60. № 2. P. 124–130.
14. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев, Наукова думка, 1982. С. 99, 101, 126.
15. Bhattacharjee A. K., Bennet J. F., Glaudemans C. P. J. // Rev. Infect. Diseases. 1984. V. 6. № 5. P. 619–624.
16. Самаркина Г. М., Караваева А. В., Витовская Г. А., Кашкина М. А. // Всесоюз. конф. «Перспективы создания лекарственных средств с использованием биотехнологии». М.: Минмедбиопротом, 1985. С. 116.
17. Стуков А. Н., Соколова И. П., Гуляева Е. П., Александров В. А., Филов В. А. // II Всесоюз. научн. конф. «Результаты и перспективы научных исследований микробных полисахаридов». Л.: Минмедбиопротом, 1984. С. 138.
18. Hestrin S. // J. Biol. Chem. 1949. V. 180. № 1. P. 249–261.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal K. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
20. Fasio S. A., Wheinger D. J., Paruer J. H., White D. C. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 43. № 5. P. 1151–1159.
21. Розенфельд Е. Л. // Биохимия. 1958. Т. 23. № 4. С. 635–638.
22. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205–207.
23. Purdie T., Irvine J. C. // J. Chem. Soc. 1903. V. 83. P. 1021.
24. Lindberg B., Lönngren I., Thompson J. L. // Carb. Res. 1973. V. 28. P. 351–357.

Поступила в редакцию

26.I.1988

После доработки

8.IV.1988.

STRUCTURE OF EXTRACELLULAR HETEROGLYCANS OF SOME CRYPTOCOCCUS SPECIES

VITOVSKAYA G. A., SAMARKINA G. M., ANANJEVA E. P.,
SHASHKOV A. S., GONCHAROV A. U.

Leningrad Chemical-Pharmaceutical Institute;

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

Extracellular polysaccharides produced by some *Cryptococcus* species have been structurally investigated. These polymers have identical core structure, which was found to be α -1,3-mannan and different degrees of substitution of mannose in the core by xylose and glucuronic acid residues of side chains and different composition of side chains. Heteropolysaccharide from *Cr. humicolus*, the simplest one, has the same structure as the *Cr. neoformans* serotype D capsular polysaccharide. The *Cr. skinneri* polymer proved to be the most branched among *Cryptococcus* polysaccharides.