





Параметры <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра олигозида (II) (рН 4,0) \*

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Мультиплетность	Константа взаимодействия, Гц
А	H-1	5,02	д	$J_{1,2}$ 1,5
	H-2	4,55	дд	$J_{2,3}$ 4,0
	H-3	4,11	дд	$J_{3,4}$ 10,5
	H-4	3,69	т	$J_{4,5}$ 10,5
	H-5	3,90	д	
В	H5 **	4,15	д	
	H-1	5,15	д	$J_{1,2}$ 3,5
	H-2	3,90	дд	$J_{2,3}$ 10
	H-3	3,87	т	$J_{3,4}$ 10
	H-4,5	3,70-3,84	м	
С	H-1	4,98	д	$J_{1,2}$ 1,5
	H-2	4,46	дд	$J_{2,3}$ 4,0
	H-3	4,30	м	$J_{3,4}$ 10
	H-4,5	3,92-3,97	м	
	H-4 **	3,96	т	$J_{4,5}$ 10,5
D	H-5 **	4,22	д	
	H-1	3,68	дд	$J_{1,2}$ 1,5
	H-1	3,75	дд	$J_{1,1}$ 1,5
	H-2	4,38	дт	$J_{1,2}$ 1,5
	H-3	4,02	дд	$J_{2,3}$ 1,0
	H-4	3,32	дд	$J_{3,4}$ 1,0
	H-5	4,17	дк	$J_{4,5}$ 1,9
	H6 (3H)	1,22	д	$J_{5,6}$ 1,5

\* Химические сдвиги сигналов CH<sub>3</sub>CON 1,92; 1,98; 2,01; 2,03; 2,09; 2,09 м. д.; д — дублет, т — триплет, к — квартет, м — мультиплет.

\*\* Данные, полученные при рН 1,0.

на его восстанавливающем конце находится остаток N-ацетилфукозамина, о чем свидетельствовало изменение положения сигнала С-6 этого моносахарида при его восстановлении в соответствующий аминополитол от 16,7 к 19,4 м. д. Таким образом, фтористый водород избирательно расщепляет в полисахариде гликозидную связь N-ацетилфукозамина и удаляет O-ацетильную группу.

Анализ структуры олигозида (II) был проведен методами ЯМР-спектроскопии. Его <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр был расшифрован с использованием селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 1) и затем с помощью селективного гетероядерного двойного резонанса <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} были отнесены сигналы в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре (табл. 2). Дублетная форма сигналов H-5 звеньев А и С свидетельствовала об отсутствии протонов при С-6, что подтверждало природу этих звеньев как уроновых кислот. При изменении рН водного раствора сигналы H-5 звеньев А и С перемещались из области 3,87-3,97 м. д. при рН 4 в область 4,15-4,22 м. д. при рН 1, что характерно для уроновых кислот со свободными карбоксильными группами [6]. На основании констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов был сделан вывод, что оба производных уроновых кислот (звенья А и С) имеют *манно*-конфигурацию [7].

Далее, положение сигналов С-2 и С-3 звеньев А и С в области 52,2-54,8 м. д. указывало, что эти углеродные атомы связаны с азотом; таким образом, эти звенья представляют собой остатки 2,3-диацетамидо-2,3-дидезоксиманнуроной кислоты.

Положение замещения звеньев В и С было определено по величинам химических сдвигов сигналов С-4 при 80,0 и 72,0 м. д. Эти сигналы смещены в слабое поле на 8 и 5 м. д. по сравнению с их положением в незамещенных моносахаридах, что соответствует α-эффектам гликозилирования [9, 11], и, следовательно, звенья В и С замещены в положение 4. Аналогично слабopольное положение сигнала С-3 остатка N-ацетилфукозамина (звено D) свидетельствует о его замещении в положение 3. Химический сдвиг сигнала С-4 звена А при 67,7 м. д. соответствует сдвигу С-4 незамещенного остатка 2,3-дидезокси-2,3-диацетамидоманнуроной

Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров полисахарида *A. globiformis*, некоторых его производных

Соединение	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>Звено А</b>						
Полисахарид	101,4	52,4	54,2	72,0	79,5	
О-Деацетилованный полисахарид	100,3	51,8	53,9	71,8	77,7	
Олигосахарид (I)	100,3	52,2	54,5	67,6	79,4	
Олигозид (II)	100,4	52,2	54,5	67,7	79,8	
Олигосахарид (III) [8]	100,6	52,4	54,4	66,9	77,6	
Модифицированный полисахарид <i>P. aeruginosa</i> O3a, 3d [9, 10]	100,7	52,2	54,1	71,7	77,2	
<b>Звено В</b>						
Полисахарид	97,7	52,8	72,9	77,8	72,9	66,8
О-Деацетилованный полисахарид	97,9	54,2	70,2	79,8	71,8	61,0
Олигосахарид (I)	97,7	54,5	70,3	79,9	71,6	61,0
Олигозид (II)	97,6	54,4	70,4	80,0	71,6	61,0
<b>Звено С</b>						
Полисахарид	100,6	52,4	54,6	72,0	80,5	
О-Деацетилованный полисахарид	100,7	52,3	54,2	71,8	78,2	
Олигосахарид (I)	100,9	52,3	54,7	72,2	78,8	
Олигосахарид (II)	100,2	52,5	54,8	72,0	79,0	
<b>Звено D</b>						
Полисахарид	98,2	48,7	78,9	71,0	68,0	16,6
О-Деацетилованный полисахарид	98,5	48,6	78,7	71,2	68,1	16,4
Олигосахарид (I) $\alpha$	92,4	49,6	79,0	71,4	67,4	16,7
$\beta$	96,2	53,4	81,9	70,8	71,7	16,7
Олигозид (II)	62,2	52,7	77,7	74,2	66,5	19,4
Олигосахарид (III) [8] $\alpha$	92,3	49,4	79,4	71,3	67,5	16,8
$\beta$	96,0	52,9	82,2	70,6	71,7	16,8
Модифицированный полисахарид <i>P. aeruginosa</i> O3a, 3d [9, 10]	98,7	48,4	78,8	71,1	68,1	16,4

\* Положение сигналов C-5 производных уруновых кислот различается для различных соединений из-за неодинаковых величин pH растворов образцов. Химические сдвиги сигналов  $\text{CH}_2\text{COO}$  21,6,  $\text{CH}_2\text{CON}$  23,1—23,3,  $\text{CH}_2\text{CO}$  и  $\text{COOH}$  (C-6 производных уруновых кислот) 174,4; 176,3 м. д.

кислоты [8—10]. Таким образом, звено А находится на невозстанавливаемом конце олигосахаридов (I), который имеет линейное строение.

Последовательность моносахаридных остатков в тетрасахариде (I) была определена с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [12]. Последовательное преобладание протонов Н-1 звеньев А, В и С в олигозиде (II) вызывало заметные ЯЭО на Н-4 звена В, Н-4 звена С и Н-3 звена D (табл. 3), что доказывает последовательность этих звеньев и подтверждает положения их замещения, приведенные на схеме. Наблюдающиеся при преобладании Н-1 звеньев А и С значительные ЯЭО на Н-3 и Н-5 облучаемых остатков указывают на их  $\beta$ -конфигурацию, а отсутствие аналогичных ЯЭО в звене В свидетельствует о его  $\alpha$ -конфигурации. Эти выводы подтверждаются константами спин-спиновой взаимодействия  $J_{1,2}$  звеньев А, В и С в олигозиде (II) (табл. 1), а также константами  $^1J_{\text{C-1, H-1}}$  163,3 Гц для сигналов C-1 звеньев А и С и 173,3 Гц для сигнала C-1 звена В [13], определенными из  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра олигозида (II), снятого без подавления С,Н-взаимодействий.

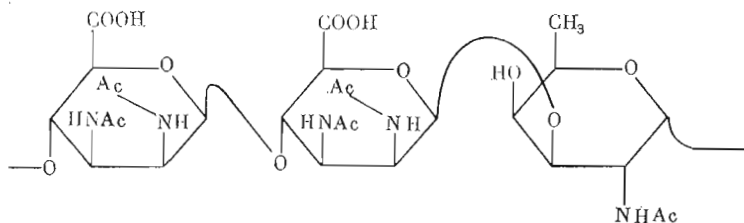
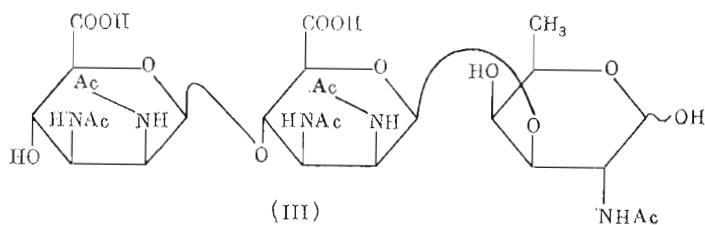
Для дальнейшего структурного анализа было проведено сопоставление  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров тетрасахарида (I), олигозида (II), исходного и О-деацетилованного полисахаридов (табл. 2). Спектр олигосахаридов (I) расшифрован путем сравнения с данными  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров олигозида (II) и модельного трисахаридов (III), полученного из О-специфического полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* O(3a), 3d, 3f [8]. Затем сравнени-

Данные по ядерным эффектам Оверхаузера для олигозида (II) \*

Преобладающее звено	Звено А			Звено В		Звено С				Звено D
	Н-2	Н-3	Н-5	Н-2	Н-4	Н-2	Н-3	Н-4	Н-5	Н-3
A B C	5,3	4,1	9,7	3,6	8,3	6,0	5,1	6,5	10	8,2

\* Наблюдаемые ЯЭО приведены в процентах от интенсивности сигнала Н-1 преобладающего звена.

ем со спектрами олигомеров (I) и (II) для звеньев В и С и со спектром модифицированного полисахарида *P. aeruginosa* О3а, 3д [9, 10] для звеньев А и D были отнесены сигналы в спектре О-деацетилированного полисахарида. Смещение сигнала С-4 звена А от 67,6–67,7 м. д. в спектрах олигомеров (I) и (II) к 71,8 м. д. в спектре полисахарида вызвано  $\alpha$ -эффектом гликозилирования [9, 11], откуда следует, что звено А замещено в положение 4 и полисахарид имеет линейное строение. Положение сигналов С-1 и С-2 звена D в спектре О-деацетилированного полисахарида при 98,5 и 48,6 м. д. соответственно доказывает  $\alpha$ -конфигурацию остатка N-ацетилфукосамина (ср. с данными [9]: 98,3 и 48,7 м. д. для  $\alpha$ -аномера и 102,3 и 51,5 м. д. для  $\beta$ -аномера).

Модифицированный полисахарид *P. aeruginosa* О3а,3д [9]

Сопоставление спектров О-деацетилированного и исходного полисахаридов показало смещение сигналов С-2, С-3 и С-4 звена В от 54,2; 70,2 и 79,8 к 52,8; 72,9 и 77,8 м. д. соответственно. По направлению и величине эти смещения характерны для эффектов О-ацетилирования по О-3 [14]. Таким образом, О-ацетильная группа находится в положении 3 остатка N-ацетилглюкозамина (звена В). Отметим, что некоторому смещению в спектре подверглись сигналы ряда других углеродных атомов, расположенных вблизи места О-ацетилирования: С-1 звена А от 100,3 к 101,1 м. д. и С-5 звена В от 71,8 к 72,9 м. д., в то время как остальные сигналы в спектре сместились незначительно или не изменили своего положения.

Абсолютные конфигурации остатков 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксиманнуроной кислоты (звеньев А и С) определены в результате анализа эффектов гликозилирования в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре О-деацетилированного полисахарида [15]. Относительно небольшие по модулю  $\beta$ -эффекты гликозилирования на С-3 этих звеньев (–0,6 и –0,3 м. д. соответственно),

вызванные их гликозилированием в положение 4 остатками N-ацетил- $\alpha$ -D-гексозаминов (звеньями D и B), доказывают, что звенья A и C имеют такую же абсолютную конфигурацию, т. е. являются D-изомерами, так как в случае их противоположной конфигурации отрицательный  $\beta$ -эффект на C-3 превышал бы по модулю 1 м.д. Для звена C D-конфигурация подтверждается также относительно небольшим по модулю  $\beta$ -эффектом гликозилирования на C-4 гликозилируемого им остатка N-ацетил-D-фукозамина (звена D), составляющим -1 м.д., что характерно для  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-связанных дисахаридов с одинаковой абсолютной конфигурацией (в случае противоположной конфигурации этот эффект превышал бы по модулю 2,5 м.д.). Вывод о D-конфигурации всех моносахаридов согласуется с величиной удельного оптического вращения O-деацетилированного полисахарида,  $[\alpha]_D^{20} +41^\circ$ , что превышает эту величину для модифицированного полисахарида *P. aeruginosa* O3a, 3d [9],  $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$  за счет дополнительного присутствия остатка N-ацетил- $\alpha$ -D-глюкозамина, вносящего положительный вклад в оптическое вращение (остальные компоненты у этих двух полисахаридов идентичны).

Таким образом, полученные данные позволяют установить полную структуру внеклеточного полисахарида исследуемого штамма *A. globiformis*, которая приведена на схеме. Интересно отметить, что два из четырех компонентов повторяющегося звена этого полисахарида являются остатками 2,3-диацетиамидо-2,3-дидезокси-D-маннуронової кислоты — редко встречаемого в природе моносахарида, обнаруженного до сих пор только в O-специфических полисахаридах *P. aeruginosa* O3 [9, 10], во внеклеточном полисахариде *Propionibacterium acnes* C7 [16] и в полисахариде клеточной оболочки *Bacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a [17].

### Экспериментальная часть

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 в D<sub>2</sub>O при 30° C, <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры — на приборе Bruker AM-300 в D<sub>2</sub>O при 70° C для полисахаридов и 30° C для олигосахаридов; внутренний стандарт — ацетон,  $\delta_c$  31,45 м.д. Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20° C. Электрофорез на бумаге FN-11 проводили в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 28 В/см. Анализ моносахаридов выполняли с помощью аминокислотного анализатора BC-200 и углеводного анализатора Technicon. ГЖХ осуществлена как в работе [18]. Гель-фильтрация выполнена на колонке (1,6×80 см) с носителем Fractogel TSK HW-40 в 1% уксусной кислоте, выходные кривые построены с помощью дифференциального рефрактометра Кнауег.

**Выращивание бактериальной культуры и выделение полисахарида.** Культуру бактерий *A. globiformis* выращивали на синтетической среде [19], содержащей питательные соли и этанол в качестве единственного источника углерода; продолжительность культивирования 72 ч на качалке с 200 об/мин. Клетки отделяли центрифугированием при 20 000 об/мин в течение 1 ч, полисахарид осаждали из надосадочной жидкости 3-кратным объемом ацетона, промывали ацетоном и эфиром, растворяли в воде, нагревали 15 мин при 80° C, подкисляли концентрированной HCl до pH 4, осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость нейтрализовали, обрабатывали смесью хлороформа и изоамилового спирта по методу Севега [20], днализировали, полисахарид осаждали ацетоном, растворяли в воде, подкислили 50% трихлоруксусной кислотой до pH 2, осадок отделяли центрифугированием, раствор днализировали, лиофилизировали, получили полисахарид,  $[\alpha]_D^{20} +23^\circ$  (с 0,4).

**O-Деацетилированный полисахарид.** Полисахарид (100 мг) выдерживали 3 ч в 4 мл 1 M раствора натрийгидроксида при 20° C, нейтрализовали концентрированной HCl, денонизировали гель-фильтрацией, лиофилизировали, получили O-деацетилированный полисахарид (80 мг),  $[\alpha]_D^{20} +41^\circ$  (с 0,15).

**Определение моносахаридного состава.** В аналитическом варианте полисахарид (2 мг) гидролизировали 4 M HCl (1 мл, 100° C, 4 ч), гидролизат упаривали, остаток упаривали с водой, анализировали с помощью углеводного и аминокислотного анализатора; порцию гидролизата превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ как описано [18]. В препаративном варианте гидролизат 100 мг полисахарида разделяли ионообменной хроматографией на катионите Chromex UA-8 как описано ранее [21]. выделили хлоргидрат D-глюкозамина ( $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$  (с 0,4), лит. [22]: +82,4° (вода)) и хлоргидрат D-фукозамина ( $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$  (с 0,3), лит. [23]: +93° (вода)).

**Сольволиз безводным фтористым водородом.** Полисахарид (100 мг) обрабатывали 3 ч при 20° C безводным фтористым водородом, свежеперегнанным над кобальттрифторидом, фтористый водород удаляли в вакууме, поглощая его в ловушке с твердым натрийгидроксидом, из сольволизата гель-фильтрацией выделили олигосахарид (I), выход 60 мг. Олигосахарид (I) восстанавливали натрийборгидридом (30 мг) в воде (2 мл) в течение 2 ч при 20° C, денонизировали гель-фильтрацией, получили олигозид (II), выход 50 мг,  $[\alpha]_D^{20} -42^\circ$  (с 0,7).



