



УДК 582.29:577.114.083

## СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ЛИШАЙНИКОВ *Cetraria cucullata* И *C. islandica*

© 1997 г. Р. П. Горшкова<sup>#</sup>, Е. Л. Назаренко, В. А. Зубков, Л. С. Степаненко, В. В. ИсаковТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,  
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 30.05.96 г.

При экстракции горячей водой лишайников *Cetraria cucullata* и *C. islandica* получены идентичные по строению нерастворимые в холодной воде лихенаны –  $\beta$ -D-глюканы, содержащие  $\beta$ -1,3- и  $\beta$ -1,4-связанные остатки D-глюкозы, а также водорастворимые изолихенаны, построенные из  $\alpha$ -1,3- и  $\alpha$ -1,4-связанных остатков D-глюкозы. Строение полисахаридов установлено на основании данных метилирования, ферментативного гидролиза, распада по Смиту, а также  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. При последующей экстракции лишайников водной щелочью получены смеси гетерополисахаридов, построенных из остатков D-маннозы, D-галактозы, D-глюкозы и гексуроновой кислоты.

Ключевые слова: лишайник, полисахарид, олигосахарид, *Cetraria*.

Работа посвящена структурному изучению полисахаридов двух видов лишайников – *Cetraria islandica* и *C. cucullata*, широко распространенных в северных районах России и на Дальнем Востоке. Из представителей рода *Cetraria* достаточно хорошо изучено лишь строение полисахаридов *C. islandica* [1, 2].

В результате исследования химического состава лишайников Магаданской области и Приморского края установлено, что дальневосточные виды имеют некоторые особенности по сравнению с европейскими образцами [3]. В частности, показано, что в широко распространенной вариации вида *C. islandica* var. *polaris* Rassad отсутствовали лихестериновые кислоты, характерные для европейских образцов *C. islandica* (L.) Arch., но обнаружены урсоловая кислота и пероксид эргостерина, впервые идентифицированные в этой вариации [4]. Вариация *C. islandica* var. *polaris* Rassad является переходной между типичной европейской *C. islandica* (L.) Arch. и родственным видом *C. laevigata* Rassad. [5]. *C. cucullata* (Bell.) Ach. (цетрария клубочковая) – вид более однородный, и дальневосточные образцы не имеют существенных отличий от европейских ни по морфологическим показателям, ни по химическому составу.

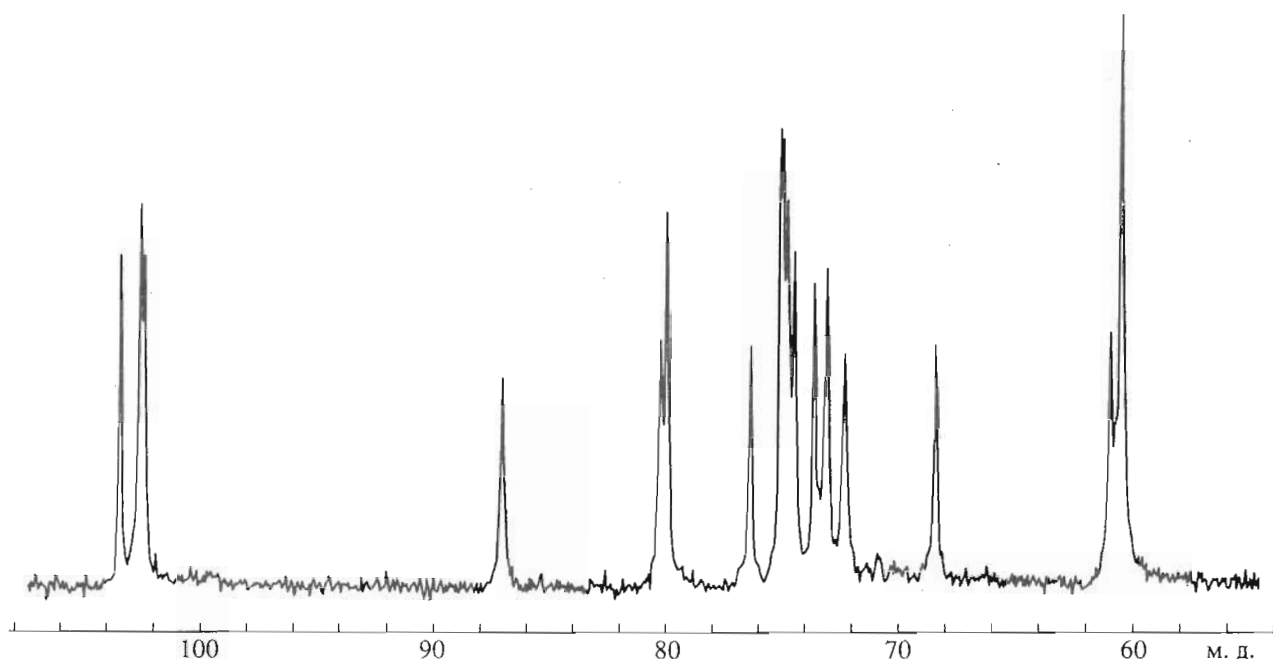
Лишайники освобождали от низкомолекулярных соединений экстракцией смесью ацетон-хлороформ (1 : 2). Полисахариды выделяли экстракцией кипящей водой, а затем 2% KOH (40–50°C). При охлаждении экстрактов до 4°C из водных растворов выпадал осадок водонерастворимого лихенана (*C. cucullata* – 20%,  $[\alpha]_D +9^\circ$ , 1 н. NaOH;

*C. islandica* – 17%,  $[\alpha]_D +24^\circ$ , 1 н. NaOH). Супернатанты концентрировали и в результате осаждения этанолом получали изолихенаны (*C. cucullata* – 3%, *C. islandica* – 6%). Щелочные экстракты нейтрализовали, концентрировали и осаждали этанолом; выходы кислых полисахаридов – 17% (*C. cucullata*) и 3% (*C. islandica*). Для *C. cucullata* дополнительное количество лихенана (10%) выделено из щелочного экстракта.

Углеводный анализ лихенанов обоих видов показал наличие в их составе единственного моносахарида – D-глюкозы, абсолютная конфигурация которого определена на основании величины его удельного оптического вращения  $[\alpha]_D +80^\circ$ . Методом метилирования [6] показано, что лихенаны содержат 1,3- и 1,4-связанные остатки D-глюкозы в соотношении 1 : 2.

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах лихенанов (рис. 1, табл. 1) присутствуют три сигнала аномерных атомов углерода при 102.4, 102.5 и 103.4 м. д., что указывает на регулярный характер и трисахаридный размер повторяющегося звена. КССВ  $J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  аномерных атомов углерода (~160 Гц) свидетельствует о  $\beta$ -конфигурации всех гликозидных связей в полисахаридах [7] и пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц) [8]. Из величин эффектов гликозирования глюкопираноз [9] следует, что сигнал при 87.0 м. д. принадлежит С3  $\beta$ -1,3-связанного остатка глюкозы, а сигналы при 80.2 и 79.9 м. д. – С4  $\beta$ -1,4-связанных глюкозных остатков (табл. 1). В результате обработки лихенанов ламинариназой L-IV из двустворчатого моллюска *Spisula sacchalinensis* [10] с последующей гель-хроматографией и

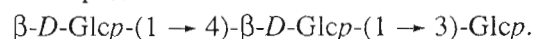
<sup>#</sup> Автор для переписки.

Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр лихенана *C. cucullata*.

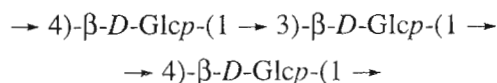
препаративной БХ получен олигосахарид  $R_{\text{Gal}} 0.53$ ;  $[\alpha]_D +15^\circ$ .

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр олигосахарид (табл. 1) содержал два сигнала аномерных атомов углерода при 103.4 и 103.6 м. д. и сигналы двух аномерных атомов углерода моносахарида, локализованного на восстанавливающем конце при 93.1 м. д. ( $\alpha$ -аномер) и 96.9 м. д. ( $\beta$ -аномер). Эти данные свидетельствуют о том, что олигосахарид является трисахаридом. Наличие двух сигналов при 86.0 и 83.6 м. д. указывает на замещение восстанавливающего моносахаридного остатка в положение 3 [9]. Присутствие в области резонанса кольцевых атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей, одного сигнала при 79.8 м. д. свидетельствует о замещении другого остатка глюкозы в положение 4. Приведенные данные, а также

результаты расчета эффектов гликозилирования [9] позволяют предложить следующую структуру олигосахарид:



Таким образом, на основании данных метилирования, ферментативного гидролиза и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии установлено следующее строение лихенанов *C. cucullata* и *C. islandica*:

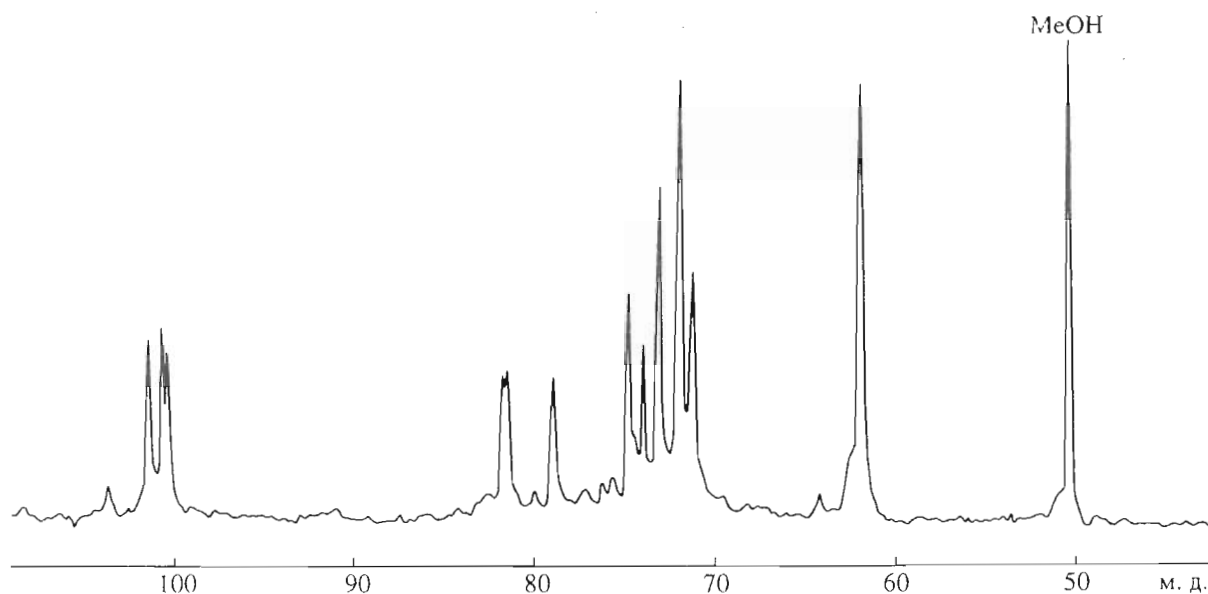


Из водорастворимой полисахаридной фракции *C. islandica* гель-хроматографией на геле TSK-65(F) получен изолихенан ( $[\alpha]_D +181^\circ$ ). На основании данных метилирования показано, что этот полисахарид также построен из 1,3- и 1,4-связанных

Таблица 1. Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров\* лихенанов *C. islandica* и *C. cucullata* ( $\delta$ , м. д.)

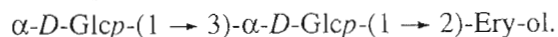
Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Лихенан						
$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Glcp-(1} \rightarrow$	103.4	73.0	74.4	79.9	75.0	60.4
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glcp-(1} \rightarrow$	102.4	72.2	87.0	68.3	76.3	60.8
$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Glcp-(1} \rightarrow$	102.5	73.5	74.7	80.2	74.8	60.4
Олигосахарид						
$\beta\text{-Glcp-(1} \rightarrow$	103.4	74.2	76.8	70.8	77.2	61.4
$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Glcp-(1} \rightarrow$	103.6	74.4	75.4	79.8	76.0	61.9
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glcp}$	96.9	75.0	86.0	69.4	76.0	62.0
$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glcp}$	93.2	72.2	83.6	69.4	72.5	62.0

\* Спектры сняты в  $\text{Me}_2\text{SO-}d_6$  при  $60^\circ\text{C}$  ( $\delta$  39.6 м. д. от  $\text{Me}_4\text{Si}$ ).

Рис. 2.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр изолихенана *C. islandica*.

остатков глюкозы. В результате распада по Смитсу с последующей гель-хроматографией получен олигосахарид ( $[\alpha]_D +14.8^\circ$ ). В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре олигосахарид (табл. 2) наблюдаются сигналы двух аномерных атомов углерода при 100.3 и 99.0 м. д. и четыре сигнала гидроксиметильных групп в области 61–64 м. д. Всего в спектре присутствуют 16 сигналов, что отвечает наличию двух гексозных остатков и одного остатка эритрита (Ery-ol) (характерные сигналы при 61.1, 64.0, 73.3, 79.9 м. д.) [11]. Величины химических сдвигов аномерных ато-

мов углерода свидетельствуют об  $\alpha$ -конфигурации моносахаридных остатков [7], а количество незамещенных гидроксиметильных групп (4) указывает на замещение остатка эритрита одним из остатков глюкозы в положение 2. Таким образом, данные метилирования и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии позволяют предположить следующую структуру олигосахарид:



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр изолихенана *C. islandica* (рис. 2, табл. 2) идентичен спектру изолихенана *C. islandica*,

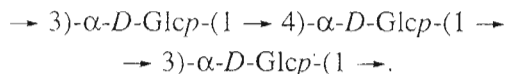
Таблица 2. Данные \*  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров изолихенанов *C. cucullata* и *C. islandica* ( $\delta$ , м. д.)

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Изолихенан						
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow$	100.3 (100.0)	71.6 (71.5)	81.4 (80.8)	71.0 (70.8)	72.7 (73.2)	61.7 (61.9)
$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow$	101.0 (100.9)	71.6 (71.5)	81.5 (80.8)	70.9 (70.8)	73.6 (73.2)	61.7 (61.9)
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow$	100.0 (100.0)	72.7 (72.7)	74.4 (74.3)	78.6 (78.3)	71.6 (71.9)	61.7 (61.9)
Олигосахарид						
$\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow$	100.3 (100.0)	72.8 (72.5)	74.4 (73.4)	70.9 (70.7)	71.4 (72.4)	61.8 (61.7)
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow$	99.0 (99.0)	71.2 (71.5)	81.6 (80.8)	70.2 (70.8)	73.0 (73.2)	61.9 (61.9)
$\rightarrow 2\text{-Ery-ol}^{**}$	61.1 (61.1)	79.9 (79.9)	73.4 (73.3)	63.9 (64.0)		

\* В скобках приведены расчетные данные [14].

\*\* В скобках приведены данные [11].

описанному ранее [12]. Спектр независимо расшифрован на основании литературных данных [13], а также компьютерного метода расчета строения линейных полисахаридов [14]. Таким образом, на основании полученных данных предложена следующая структура повторяющегося звена изолихенана:



В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре водорастворимого полисахарида *C. cucullata* присутствовали сигналы аномерных атомов углерода при 103.4, 102.5, 102.4, 101.0, 100.3 и 100.0 м. д., наличие которых указывало на смесь лихенана и изолихенана, идентичного по строению изолихенану *C. islandica*.

Углеродный анализ кислых полисахаридов показал наличие в обоих образцах остатков *D*-маннозы, *D*-галактозы и *D*-глюкозы в соотношении 13 : 15 : 72 (*C. islandica*) и 43 : 45 : 14 (*C. cucullata*), а также небольшого количества уроновой кислоты. Кислая полисахаридная фракция *C. cucullata* при ионообменной хроматографии на геле DEAE TSK 650M разделена на нейтральную и кислую фракции (соотношение ~1 : 4). По данным моносахаридного анализа, кислая фракция содержала остатки *D*-маннозы, *D*-галактозы и *D*-глюкозы в соотношении 55 : 35 : 10, а также уроновую кислоту.

Таким образом, из приведенных данных следует, что полисахаридные фракции *C. cucullata* и *C. islandica* содержат идентичные по строению лихенаны и изолихенаны, близкие по строению кислые полисахариды и различаются количественным содержанием сахаров.

Дальневосточный образец *C. islandica* отличается от описанного ранее лишайника этого вида [1] меньшим содержанием кислых полисахаридов (соответственно 3 и 55%).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры получали на приборе Bruker WM-250 в  $\text{D}_2\text{O}$  при 60°C, в качестве внутреннего стандарта использовали метанол ( $\delta$  50.15 м. д.). Аналитическую и препаративную БХ, определение удельного оптического вращения, гель-хроматографию, ионообменную хроматографию, ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрию проводили как описано ранее [15].

**Выделение полисахаридов лишайников.** Лишайники собирали в Тенькинском районе Магаданской области. Сухой измельченный лишайник (25 г) экстрагировали в аппарате Сокслета смесью ацетон-хлороформ (1 : 2) до полного извлечения низкомолекулярных компонентов. Высушенный от растворителей лишайник экстрагировали кипящей водой (1 л  $\times$  3, 100°C, 1 ч), объединенные водные экстракты концентрировали и охлаждали до 4°C. Выпавший осадок суспендировали в воде и

лиофилизировали. Выходы лихенана 5 г (*C. cucullata*) и 4.35 г (*C. islandica*). Супернатант концентрировали и осаждали 5 объемами этанола. Выходы изолихенана 0.75 г (*C. cucullata*) и 1.50 г (*C. islandica*).

Остаток лишайника далее экстрагировали 2% КОН (1 : 30 по весу, 40–50°C, 1 ч) в токе аргона. Экстракт нейтрализовали до pH 5, диализовали, концентрировали, осаждали спиртом и лиофилизировали. Выходы кислых полисахаридов 4.35 г (*C. cucullata*) и 1.08 г (*C. islandica*). В случае *C. cucullata* из кислой полисахаридной фракции при растворении и охлаждении до 4°C дополнительно выделяли 2.50 г лихенана.

**Гидролиз полисахаридов** (по 5 мг) проводили 2 М трифторуксусной кислотой (0.5 мл, 100°C, 3 ч). Гидролизаты анализировали БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов и альдононитрилов. В препаративном варианте гидролиза использовали 100 мг полисахарида и 10 мл кислоты; препаративной БХ выделяли *D*-глюкозу (50 мг),  $[\alpha]_D + 80^\circ$  (с 1.0, вода).

**Метилирование полисахаридов** (3–5 мг) осуществляли по Хакомори [6] метилиодидом (1 мл) в диметилсульфоксиде (1 мл) в присутствии натрийметилсульфинилметанида, избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированные полисахариды выделяли с помощью патрона SepPak  $\text{C}_{18}$  (Waters), гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (120°C, 1 ч). Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией.

**Ферментативный гидролиз.** Лихенан (200 мг) суспендировали в 60 мл воды, содержащей 1.5 мл раствора фермента L-IV [10], и инкубировали при 37°C в течение суток. Реакционную смесь центрифугировали, супернатант концентрировали и хроматографировали на геле TSK HW 40(F). В результате получали три фракции: высокомолекулярную (47 мг), промежуточную (75 мг) и низкомолекулярную (46 мг). После рехроматографии низкомолекулярной фракции препаративной БХ получены *D*-глюкоза (15 мг) и олигосахарид (25 мг).

**Распад по Смитсу.** Изолихенан *C. islandica* (200 мг) в 100 мл 0.1 М  $\text{NaIO}_4$  выдерживали 2 сут в темноте при комнатной температуре. К раствору добавляли 700 мг  $\text{NaBH}_4$ , через 2 ч избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой и раствор диализовали. Окисленный и восстановленный полисахарид гидролизовали 1% уксусной кислотой (100°C, 3 ч) и хроматографировали на геле TSK HW 40(F). При этом получена олигосахаридная фракция (50 мг) ( $[\alpha]_D + 118.3^\circ$  (с 1.0, вода)).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorin P.A.J., Baron M., Corradi da Silva M.D.L., Teixeira A.J.A., Jacomini M. // Cienc. Cultura. 1993. V. 45. P. 27–36.

2. *Teixeira A.J.A., Jacomini M., Gorin P.A.J.* // Carbohydr. Res. 1995. V. 226. P. 309–314.
3. *Кривощекова О.Е., Максимов О.Б., Степаненко Л.С., Мищенко Н.П.* // Бриолихенологические исследования в СССР. Апатиты, 1986. С. 101–104.
4. *Степаненко Л.С., Скирина И.Ф., Дмитренко П.С., Хотимченко С.В.* // Химия природ. соединений. 1996. № 1.
5. *Рассадина К.А.* // Тр. Бот. ин-та им. В.Л. Комарова АН СССР. II. 1950. Вып. 5. С. 171–304.
6. *Nakomori S.* // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205–208.
7. *Bock K., Pedersen C.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
8. *Cyr N., Perlin A.S.* // Can. J. Chem. 1979. V. 57. P. 2504–2511.
9. *Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K.* // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
10. *Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 212. P. 111–115.
11. *Angyal S.J., Fur R.L.* // Carbohydr. Res. 1980. V. 84. P. 201–209.
12. *Gorin P.A.J., Jacomini M.* // Carbohydr. Res. 1984. V. 128. P. 119–132.
13. *Bock K., Pedersen C.* // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–65.
14. *Кочетков Н.К., Виноградов Е.В., Книрель Ю.А., Шапков А.С., Липкинд Г.М.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 116–125.
15. *Горшкова Р.П., Исаков В.В., Командрова Н.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 413–417.

## Structural Study of Polysaccharides from *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica* Lichens

R. P. Gorshkova, E. L. Nazarenko, V. A. Zubkov, L. S. Stepanenko, and V. V. Isakov

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

**Abstract**—Extraction of lichens *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica* with hot water resulted in cold-water insoluble lichenans of identical structure ( $\beta$ -D-glucans with  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,4-bound D-glucose residues) and water soluble isolichenans built from  $\alpha$ -1,3- and  $\alpha$ -1,4-bound D-glucose residues. The structures of polysaccharides were established by methylation analysis, enzymic hydrolysis, the Smith degradation, and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. The subsequent extraction of lichens with an aqueous alkali gave the mixtures of heteropolysaccharides built from the residues of D-mannose, D-galactose, D-glucose, and an hexuronic acid.

*Key words:* lichen, polysaccharide, oligosaccharide, *Cetraria* spp.