



УДК 547.458.02:542.943

ПОЛИСАХАРИДЫ *LIPOMYCES*V. ПОЛНАЯ СТРУКТУРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*LIPOMYCES LIPOFER*, ШТ. 133*Свиридов А. Ф., Джикия О. Д., Горин С. Е.,  
Чижов О. С., Бабьева И. П., Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Структура внеклеточного полисахарида *L. lipofer*, шт. 133, исследована методами окисления хромовым ангидридом ацетата восстановленного полисахарида и щелочного распада метилированного нативного полисахарида. На основании полученных данных полисахариду приписана регулярная линейная структура с повторяющимся звеном:  $\rightarrow 4\text{-D-GlcUA}p1 \xrightarrow{\alpha} 3\text{-D-Man}p1 \xrightarrow{\beta} 4\text{-D-Man}p1 \xrightarrow{\beta}$ .

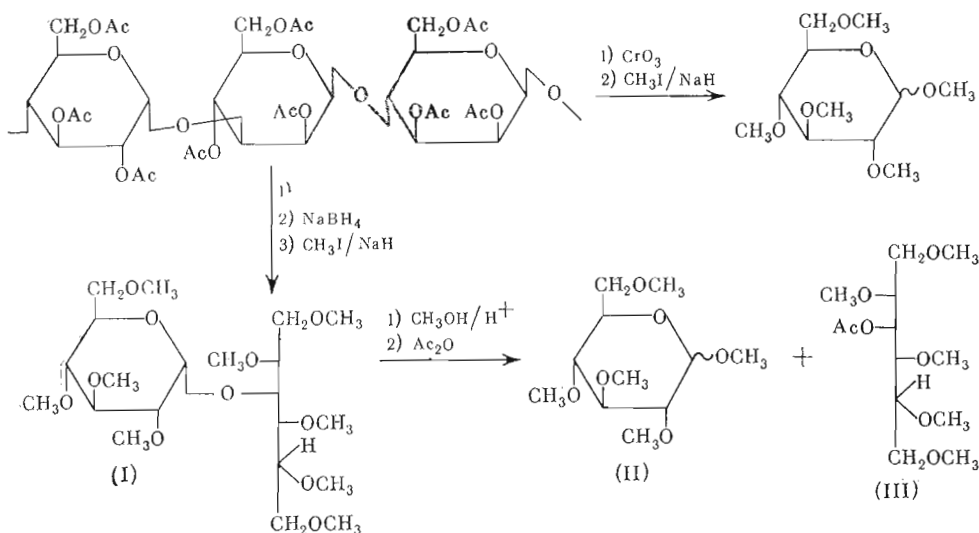
В предыдущем сообщении [1], исходя из данных метилирования и распада амида метилированного полисахарида полимеру из *L. lipofer*, шт. 133, было приписано строение  $(\rightarrow 4\text{-D-GlcUA}p1 \xrightarrow{\alpha} 3\text{-D-Man}p1 \xrightarrow{\alpha} 4\text{-D-Man}p1 \rightarrow)_n$ .  $\alpha$ -Конфигурация гликозидной связи между остатками *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-маннозы предполагалась лишь на основании высокого положительного значения удельного вращения  $([\alpha]_D^{20} + 108,5^\circ)$  соответствующей биуроновой кислоты, а  $\alpha$ -конфигурация связи между остатками *D*-маннозы следовала из положительного удельного вращения  $([\alpha]_D^{20} + 41,3^\circ)$  соответствующего метилманнобиозида и расчета по правилу Кляйна. Однако, как будет показано ниже, это последнее заключение о конфигурации связи между остатками маннозы оказалось ошибочным. Наконец, конфигурация связи между остатками *D*-маннозы и *D*-глюкуроновой кислоты оставалась неизвестной, а регулярность строения полисахарида требовала дополнительного подтверждения. В связи с этим было предпринято дальнейшее изучение внеклеточного полисахарида методами окисления хромовым ангидридом его восстановленного полного ацетата и щелочного распада метилированного полисахарида.

Как известно [2], при окислении ацетатов полисахаридов хромовым ангидридом происходит их избирательный распад по связям, имеющим  $\beta$ -*D*- или  $\alpha$ -*L*-конфигурацию. Это позволяет не только определять конфигурацию связи, но и получать структурные фрагменты полимеров, не содержащие указанных выше типов связей, которые не могут быть получены ни одним другим известным способом. Следует иметь в виду, что природа реально получаемых фрагментов существенно зависит от способа их выде-

ления и последующей обработки [3]. При окислении ацетата восстановленного полисахарида из *L. lipofer*, шт. 133, с последующим метилированием продуктов окисления по методу Хакомори [4] в качестве единственного углеводородного фрагмента методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) идентифицирован  $\alpha, \beta$ -метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-глюкопиранозид. Если смесь после окисления полисахарида предварительно восстановить  $\text{NaBH}_4$  и затем метиллировать [4], удастся выделить глюкозилполиол (I), образующийся из соответствующего гликозида 5-кетоальдоновой кислоты — продукта окисления остатка  $\beta$ -*D*-маннопиранозы, связанной с остатком  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозил-уроновой кислоты.

Строение глюкозилполиола (I) помимо прямой масс-спектрометрической идентификации (его масс-спектр содержал тот же набор пиков, что и известный из работы [5] спектр полностью метилированного 3-О- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилсорбита) было подтверждено результатами метанолиза. После ацетилирования метанолизата в нем методом ХМС были идентифицированы путем сравнения с заведомыми образцами  $\alpha, \beta$ -метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-глюкопиранозид (II) и 1,2,4,5,6-пента-О-метил-3-О-ацетилгексит (III) (схема 1).

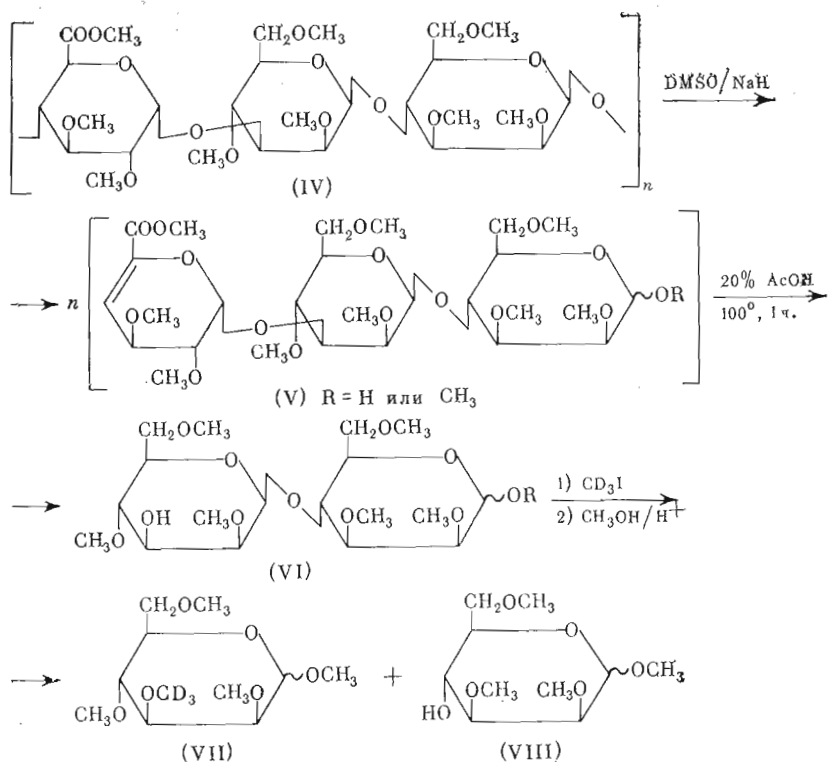
С х е м а 1



Приведенные данные доказывают, что в исходном невосстановленном полисахариде связи между остатками *D*-маннозы и между *D*-маннозой и *D*-глюкуроновой кислотой имеют  $\beta$ -*D*-конфигурацию. Кроме того, выделение полностью метилированной *D*-глюкозы (II) и глюкозилполиола (I) подтверждает  $\alpha$ -*D*-конфигурацию остатка *D*-глюкуроновой кислоты (в соответствии с механизмом окисления хромовым ангидридом).

В последние годы в структурной химии полиуронидов большое значение приобрел избирательный распад их метиловых эфиров под действием оснований [6]. Этот метод позволяет расщепить полиурониды по остаткам 1  $\rightarrow$  4-связанных уроновых кислот. Обычно смеси после обработки основаниями подвергают мягкому кислотному гидролизу (10%  $\text{AcOH}$ , 100°, 1 ч) с целью отщепления образовавшихся  $\Delta^{4,5}$ -непредельных уроновых кислот [7]. В случае исследуемого нами полисахарида это привело к образованию метилированной маннобиозы (VI). Соответствующий метилманнобиозид был ранее выделен при распаде амида метилированного полисахарида по реакции Гофмана [1] (схема 2).

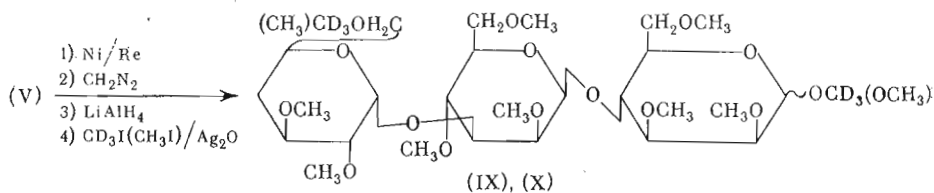
Схема 2



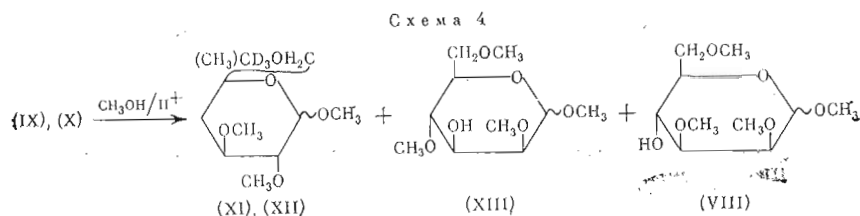
Строение дисахарида (VI) было установлено, как описано нами ранее [1], по масс-спектрам продуктов метанолиза его дейтерометилированного производного.

Чтобы выделить более крупные фрагменты, необходимые для определения степени регулярности строения полисахаридов, мы впервые применили новую модификацию обработки продуктов щелочного распада полиуронидов. Согласно этой модификации, образующиеся при щелочном распаде олигосахариды первоначально гидрируют над никелевым катализатором для восстановления двойных связей  $\Delta^{4,5}$ -гексуроновых кислот. В результате получают более устойчивые к действию кислых агентов 4-дезоксигексуроновые кислоты. Далее смесь обрабатывают эфирным раствором диазометана на тот случай, если некоторые метиловые эфиры карбоксильных групп уроновых кислот подверглись гидролизу в процессе обработок, и затем восстанавливают алюмогидридом лития. При последующем дейтерометилировании или метилировании образуются полностью замещенные олигосахариды, в которых в отличие от прежней процедуры [7] остатки уроновых кислот сохранены в виде восстановленных звеньев (схема 3).

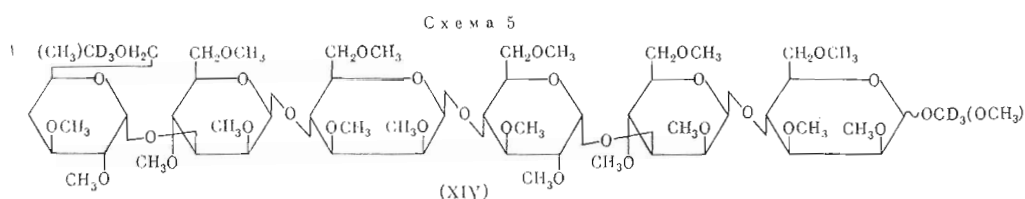
Схема 3



После метанолиза олигосахаридов (IX) и (X) были выделены соответствующие метилгликозиды, идентифицированные методом ХМС путем сравнения с заведомыми образцами [8] (схема 4).



Из реакционной смеси методом ТСХ на SiO<sub>2</sub> был выделен также гексасахарид (XIV), при метанолизе которого методом ХМС были идентифицированы метилгликозиды (XI, XII), α,β-метил-2,3,6-три-О-метил-D-глюкопиранозид и метилгликозиды (XIII) и (VIII) в соотношении 1 : 1 : 2 : 2, что позволяет приписать соединению (XIV) структуру, изображенную на схеме 5.



Существенно, что олигосахариды, образующиеся в результате распада (олигосахарид (V) и гексасахарид (XIV)), не восстанавливаются алюмогидридом лития, поскольку в присутствии этого катализатора восстанавливается лишь ациклическая карбонильная форма, количество которой в условиях реакции (абс. эфир) ничтожно. Так, например, в диоксане при 100° за 6 ч глюкоза восстанавливается алюмогидридом лития только на 20%, а рибоза на 10% [9].

Данные, приведенные в настоящей статье, а также результаты работы [1] позволяют приписать полисахариду, продуцируемому *L. lipofer*, шт. 133, регулярное строение с повторяющимся звеном:  $\rightarrow 4-D-GlcUAp1 \xrightarrow{\alpha} \rightarrow 3-D-Manp1 \xrightarrow{\beta} 4-D-Manp1 \xrightarrow{\beta} \dots$

### Экспериментальная часть

Масс-спектры соединений снимали на приборе Varian MAT CH-6 при ускоряющем напряжении 70 эВ и температуре ввода 150°. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Varian MAT 111gном на колонке 3% SE-30, ГЖХ-анализ — на приборе Varian-1700 на колонках 5% НПГС, 3% SE-30 на хромосорбе W. ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (ГДР) в растворе хлороформа.

Метанолиз (5% HCl в CH<sub>3</sub>OH) проводили в запаянных ампулах в течение 4—5 ч. Метанолизаты нейтрализовали раствором NH<sub>3</sub>, упаривали, экстрагировали хлороформом.

*Окисление ацетата восстановленного глюкономаннана L. lipofer, шт. 133.* Нативный полисахарид восстанавливали NaBH<sub>4</sub> в виде β-оксиэтилового эфира [10]. Восстановление проводили до исчезновения в гидролизате полисахарида D-глюкуроновой кислоты (контроль вели методом бумажной хроматографии). Восстановленный полисахарид ацетилировали в смеси формамида и пиридина уксусным ангидридом [11].

К 0,2 г ацетата восстановленного полисахарида, высушенного в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (60°, 4 ч) в 5 мл As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, добавляли раствор 0,6 г CrO<sub>3</sub> в 18 мл

As<sub>2</sub>O. Смесь нагревали на водяной бане 1,5 ч при 50°. Затем реакционную смесь разбавляли водой, нейтрализовали CaCO<sub>3</sub>, экстрагировали хлороформом и растворитель отгоняли в вакууме.

а) Половину вещества, полученную после отгонки растворителя, метилировали по методу Хакомори [4]. Затем смесь разделяли колоночной хроматографией на SiO<sub>2</sub>. Получили 0,006 г (23% от веса исходного соединения) α, β-метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-D-глюкопиранозида (II), идентифицированного методом ХМС с заведомым образцом.

б) Другую половину окисленной смеси растворяли в 20 мл CH<sub>3</sub>OH, добавляли 5 мл воды и восстанавливали 0,2 г NaBH<sub>4</sub> в течение 10 ч. Реакционную смесь обрабатывали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>) и упаривали досуха. Остаток несколько раз упаривали с CH<sub>3</sub>OH до полного удаления H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> и высушивали в вакууме. Продукты восстановления метилировали по методу Хакомори [4] и затем смесь разделяли на колонке SiO<sub>2</sub>. Получили 0,024 г (44% от веса исходного соединения) глюкозилполиола (I). Его масс-спектр идентичен спектру метилированного 3-β-D-глюкопиранозилсорбита [5]. 10 мг глюкозилполиола (I) подвергали метанолизу в 2 мл 5% раствора HCl в CH<sub>3</sub>OH. После нейтрализации и упаривания остаток ацетилировали As<sub>2</sub>O в пиридине 10 ч. При помощи ХМС путем сравнения с заведомыми образцами идентифицированы метилгликозид (II) и 3-О-ацетилгексит (III).

*Щелочной распад метилированного внеклеточного полисахарида L. lyoper, шт. 133.* Метилированный [4] полисахарид (0,5 г) тщательно высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (60°, 5 ч), растворяли в 100 мл свежеперегнанного над CaH<sub>2</sub> DMSO, прибавляли 2 мл диметоксипропана, 10 мг TsOH и перемешивали 30 мин в токе азота. Приливали 50 мл 2 н. раствора CH<sub>3</sub>SOCH<sub>2</sub>Na в DMSO и перемешивали еще 12 ч в токе азота. Подкисляли 50% раствором CH<sub>3</sub>COOH, экстрагировали хлороформом. Экстракт промывали водой и высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровывали и упаривали.

а) Половину вещества растворяли в 2 мл CH<sub>3</sub>COOH, добавляли 8 мл воды и кипятили 1 ч. Упаривали досуха, остаток обрабатывали CD<sub>3</sub>I или CH<sub>3</sub>I по методу Куна [12]. Смесь метилированных продуктов делили колоночной хроматографией на SiO<sub>2</sub>. Получали 0,063 г (37% от веса исходного вещества) маннобиозида (VI). 20 мг маннобиозида (VI) подвергали метанолизу в 5 мл 5% раствора HCl в CH<sub>3</sub>OH. В метанолизате с помощью ХМС идентифицировали путем сравнения с заведомыми образцами метилманнозиды (VII) [1] и (VIII) в соотношении 1 : 1.

б) Вторую половину вещества, полученную в результате щелочного распада полисахарида, растворяли в 50 мл этанола и гидрировали над Ni / Re в токе водорода. Окончание реакции определяли с помощью ИК-спектроскопии по полному смещению полосы от 1680 см<sup>-1</sup> (эфир α, β-непределельной кислоты) до 1720 см<sup>-1</sup>. Отфильтровывали катализатор, осадок на фильтре промывали несколько раз этанолом и фильтрат упаривали. Остаток обрабатывали эфирным раствором CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (1 ч), упаривали и восстанавливали 0,3 г LiAlH<sub>4</sub> в абс. эфире (100 мл) 8 ч при кипячении. Восстановленные продукты метилировали CD<sub>3</sub>I или CH<sub>3</sub>I по методу Куна [12]. Метилированные продукты делили на колонке с SiO<sub>2</sub>. Получили 0,081 г (31% от веса исходного вещества) трисахариды (IX, X). В продуктах его метанолиза методом ХМС идентифицировали [8] метилгликозиды (XI, XII), (XIII) и (VIII) в соотношении 1 : 1 : 1. Масс-спектр 4-дезоксипроизводного (XI) содержит следующий набор пиков (в скобках приведены интенсивности, %): 45 (40), 48 (45), 59 (61), 71 (48), 73 (60), 75 (63), 88 (100), 97 (24), 101 (22), 115 (7), 118 (7), 131 (3), 143 (1,5), 152 (2,5), 157 (2,5), 161 (5), 175 (4) и 192 (1,3).

Получили также 10 мг гексасахариды (XIV). В продуктах его метанолиза идентифицировали методом ХМС метилгликозиды (XI, XII), α, β-метил-2,3,6-три-О-метил-D-глюкопиранозид и метилманнозиды (XIII) и (VIII) в соотношении 1 : 1 : 2 : 2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Чижов О. С., Голубев В. И., Бабьева И. П., Поделько А. Я. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2304—2310.
2. Свиридов А. Ф., Чижов О. С. (1976) Биоорган. химия, 2, 315—350.
3. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2774—2781.
4. Nakomori S. (1964) J. Biochem., 55, 205—208.
5. Karkkänen J. (1970) Carbohydr. Res., 14, 27—30.
6. Lindberg B., Lönngren J., Thompson J. L. (1973) Carbohydr. Res., 28, 351—357.
7. Curvall M., Lindberg B., Lönngren J., Nimmich W. (1975) Carbohydr. Res., 42, 73—83.
8. Kochetkov N. K., Wulfson N. S., Chizhov O. S., Zolotarev B. M. (1963) Tetrahedron, 19, 2209—2224.
9. Enders H., Oppelt M. (1968) Chem. Ber., 91, 478—482.
10. Zitko V., Rishop C. T. (1966) Can. J. Chem., 44, 1275—1282.
11. Whistler R. L., Towle C. A. (1970) Arch. Biochem. and Biophys., 138, 39—43.
12. Kuhn R., Baer H. H., Seelinger A. (1958) J. Liebigs Ann. Chem., 611, 236—241.

Поступила в редакцию  
3.VIII.1976

### POLYSACCHARIDES FROM *LIPOMYCES*. V. THE TOTAL STRUCTURE OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *LIPOMYCES LIPOFER*, ST. 133

SVIRIDOV A. F., GIKIA O. D., GORIN S. E.,  
CHIZHOV O. S., BAB'EVA I. P., KOCHETKOV N. K.

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

The structure of the extracellular polysaccharide from *L. lipofer*, st. 133, has been investigated using oxidation of reduced polysaccharide acetate by CrO<sub>3</sub> and alkaline degradation of methylated native polysaccharide. On the basis of the data obtained, the polysaccharide has been ascribed a regular linear structure with the following repeated unit: 4-*D*-GlcUA<sub>1</sub>  $\xrightarrow{\alpha}$  3-*D*-Man<sub>1</sub>  $\xrightarrow{1 \rightarrow \beta}$  4-*D*-Man<sub>1</sub>  $\xrightarrow{\beta}$ .