



УДК 547.458.418 : 543.422.23 + 577.11

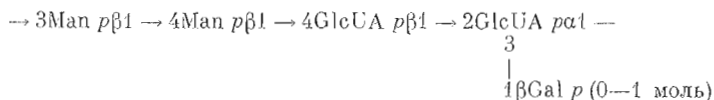
ПОЛИСАХАРИДЫ *LIPOMYCES*

7*. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *LIPOMYCES TETRASPORUS*

Шапков А. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е.,
Джикия О. Д., Чижов О. С., Гуляев Н.,
Кочетков Н. К.

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

Методами химического анализа и спектроскопии ^{13}C -ЯМР установлено полное строение внеклеточных полисахаридов, продуцируемых *Lipomyces tetrasporus*. В основе их структуры лежит повторяющееся звено из двух остатков *D*-маннозы и двух остатков *D*-глюкуроновой кислоты. К части последних присоединены ответвления из единичных остатков *D*-галактозы.

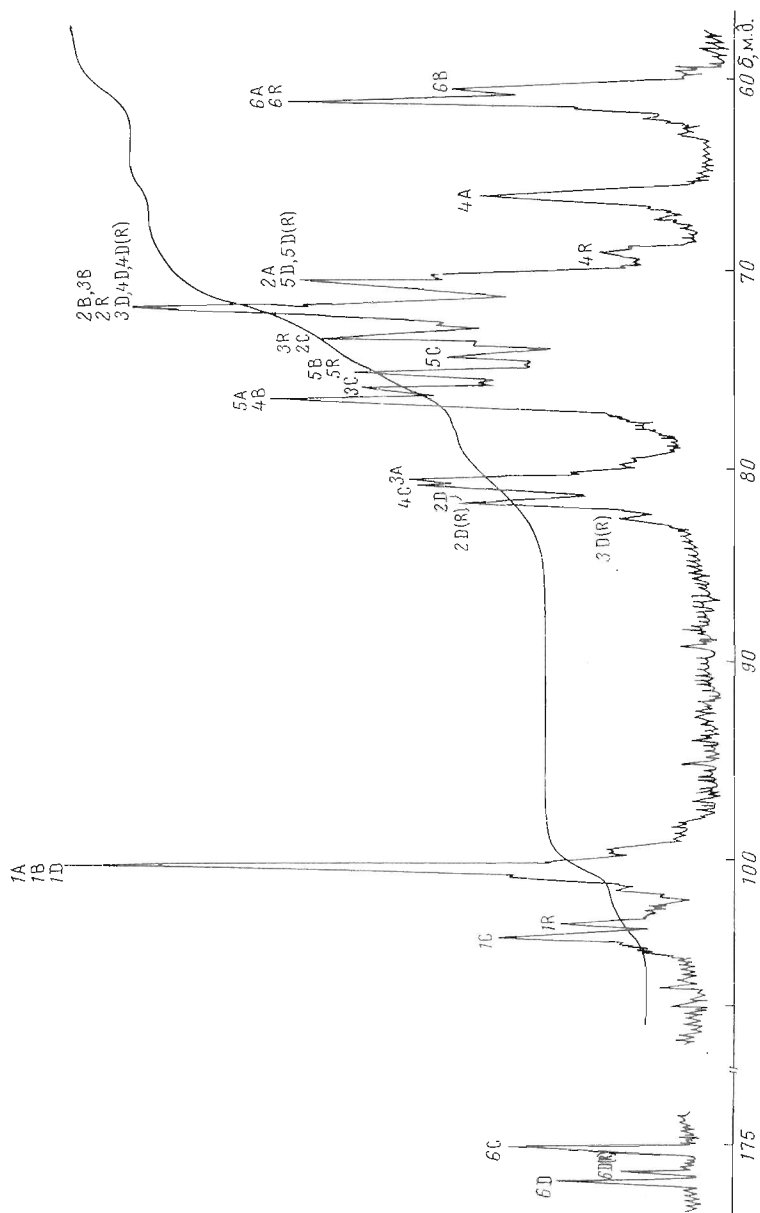


Внеклеточные полисахариды, продуцируемые различными штаммами *Lipomyces tetrasporus*, содержат *D*-глюкуроновую кислоту, *D*-маннозу и *D*-галактозу [2]; если соотношение первых двух моносахаридов для всех изученных 11 штаммов постоянно и примерно равно 1 : 1, то количество *D*-галактозы колеблется от 0 (штамм 416) до 0,5 моль на моль Ман (штамм 421). Сходство спектров ^{13}C -ЯМР этих полисахаридов говорит о близости их химического строения. Данная работа посвящена установлению строения полисахаридов, продуцируемых упомянутой выше группой микроорганизмов химическими методами и с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида *L. tetrasporus*, штамм 70**, типичного для данной группы микроорганизмов (содержит 0,2 моль *D*-галактозы на моль Ман), представлен на рисунке. Спектры полисахаридов, продуцируемых другими штаммами, отличаются от приведенного спектра лишь отсутствием или интенсивностью отдельных линий и поэтому здесь не приводятся. Как видно из рисунка, в спектрах ^{13}C -ЯМР полисахаридов в области резонанса атомов C-1 имеются три сигнала (100,5; 103,3 и 104,0 м.д.). Интенсивность пика при 103,3 м.д. пропорциональна содержанию *D*-галактозы, а его химический сдвиг позволяет заключить, что остатки этого моносахарида имеют β -*D*-конфигурацию [4]. Соотношение интенсивностей линий при 100,5 и 104,0 м.д. остается неизменным от спектра к спектру и составляет приблизительно 3 : 1. Из сопоставления этого факта с при-

* Сообщение 6 см. [1].

** Данные о частичной структуре этого полисахарида см. в работе [3].



Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида, продуцируемого *L. tetrasporus*, штамм 70 (D_2O , внутренний эталон DMSO , pH 7)

веденными выше данными о моносахаридном составе изучаемых полисахаридов вытекает, что все они должны содержать по крайней мере по два неравноценных остатка *D*-глюкуроновой кислоты, которым по аналогии с данными для *D*-глюкозы [5] следует приписать β -*D*- (104,0 м.д.) и α -*D*-конфигурацию (100,5 м.д.).

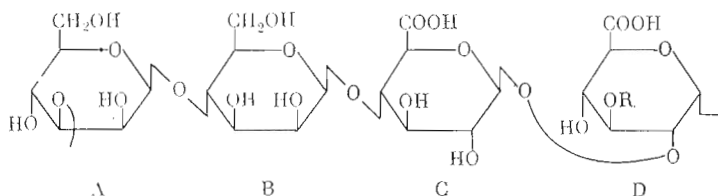
Этот вывод подтверждается рассмотрением низкопольной части спектра, где резонируют углеродные атомы карбоксильных групп. При отсутствии *D*-галактозы в полисахаридах (штаммы 383 и 416) здесь наблюдаются два сигнала при 175,3 и 176,8 м.д. В спектрах полисахаридов, содержащих *D*-галактозу, в этой области имеется линия при 176,5 м.д., интенсивность которой растет по мере увеличения содержания *D*-галактозы, тогда как интенсивность линии 176,8 м.д. падает. Отсюда можно предположить, что *D*-галактоза соединена с одним из звеньев *D*-глюкуроновой кислоты и именно ее присутствие вызывает смещение сигнала атома С-6 тех остатков, с которыми она связана. Это согласуется с химическими данными [3].

Анализ спектра в области высоких полей показывает, что в полисахаридах *L. tetrasporus* должно быть не меньше двух неравноценных остатков *D*-маннозы со свободными гидроксильными группами при С-6, поскольку для полисахаридов, не содержащих *D*-галактозы (штаммы 383 и 416), имеются два различных сигнала для атомов С-6 при 61,7 и 61,1 м.д. Однако оба *D*-маннозных остатка должны иметь β -*D*-конфигурацию [4] и свободные гидроксильные группы при С-2, так как при α -конфигурации маннозидных связей должен был бы появиться сигнал около 101,5 м.д. [6], а замещение при С-2 для α -конфигурации маннозидной связи должно было бы привести к сдвигу сигнала аномерного атома углерода до значений порядка 100,0 м.д. [4, 7], тогда как на самом деле в спектре имеется единственный острый пик при 100,5 м.д. приблизительно утроенной интенсивности. Соотношения интегральных интенсивностей линий С-4 (66,5 м.д.) и С-6 в спектрах полисахаридов штаммов 383 и 416 близки к 1 : 2. Значит, только один из маннозных остатков может иметь свободную гидроксильную группу при С-4. Отсюда следует, что один из остатков *D*-маннозы замещен по С-4, а другой — по С-3.

Таким образом, предварительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР позволяет установить размер и состав повторяющегося звена полисахаридов, продуцируемых *L. tetrasporus* (4—5 моносахаридов, два остатка *D*-маннозы, два остатка *D*-глюкуроновой кислоты и 0—1 моль *D*-галактозы), а также определить конфигурацию гликозидных связей каждого из моносахаридных остатков, характер замещения в звеньях *D*-маннозы и тот моносахарид, с которым связаны остатки *D*-галактозы.

Приведенные выше данные о структуре внеклеточных полисахаридов, продуцируемых этой группой липомицетов, были дополнены и подтверждены химическими методами. При метанолизе метилированных полисахаридов во всех случаях были идентифицированы метил-2,3,6- (I) и метил-2,4,6-три-О-метил-*D*-маннопиранозиды (II) в отношении, примерно равном 1 : 1. С появлением в полисахаридах *D*-галактозы в метанолизатах их метилированных производных появляется метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-галактопиранозид (III), содержание которого пропорционально количеству *D*-галактозы и достигает 1 моль по отношению к содержанию моносахарида (I) или (II) для полимера, продуцируемого штаммом 421. Эти данные подтверждают вывод о наличии во всех полисахаридах, продуцируемых *L. tetrasporus*, двух неравноценных остатков *D*-маннопиранозы и показывают, что остатки *D*-галактопиранозы находятся в разветвлениях.

При анализе ацетатов частично метилированных полиолов, полученных путем гидролиза, восстановления NaBD_4 и последующего ацетилирования О-метилового эфира восстановленного полисахарида методом хромато-масс-спектрометрии, были идентифицированы соединения, перечисленные в табл. 1. Идентификация полиолов (IV) — (X) окончательно



R = β -D-Galp или H

С установлением полного строения полисахаридов, продуцируемых *L. tetrasporus*, появилась возможность более детального анализа спектров ^{13}C -ЯМР, в частности отнесение сигналов в области резонанса неаномерных атомов углерода. Такой анализ мог бы иметь в дальнейшем существенное значение для определения структуры близких полисахаридов, продуцируемых другими видами липомицетов, с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР.

В табл. 2 приведены данные по отнесению линий в спектрах этих полисахаридов. Сигналы звеньев А и В отнесены по аналогии с полисахаридом из *Lipomyces lipofer* [1]. Линии β -D-галактопиранозного остатка (R) и C-3 в звене D идентифицированы по изменению их интенсивности с изменением содержания D-галактозы в полисахаридах из различных штаммов и отнесены путем сравнения со спектром β -метил-D-галактопиранозида. Результаты, как видно из табл. 2, еще раз подтверждают β -D-конфигурацию галактопиранозного остатка.

Наконец, для отнесения сигналов звеньев С, D и D(R) в условиях, идентичных условиям измерения спектров полисахаридов, были сняты спектры модельных соединений, перечисленных в табл. 3. Поскольку дисахариды (XVI) и (XVII) содержат первичную спиртовую группу вместо карбоксильной, для сравнения с химическими сдвигами атомов углерода звеньев С и D вводились поправки, учитывающие влияние такой замены на химические сдвиги. Величины поправок взяты из работы [4]. Для соединения (XVIII) поправки на влияние замены карбоксильной группы на метоксикарбонильную не вводились (ср. [4]).

Менее однозначно отнесение сигналов атомов углерода, связанных гликозидной связью (C-4 в звене С и C-2 в звене D). Приписывая им значения химических сдвигов, приведенные в табл. 2, мы исходили из того, что углеродный атом C-4 звена С в полисахариде из *L. lipofer* [1] имеет резонансную линию при 81,4 м.д. в нейтральной среде. Различия в конфигурации гликозидных связей в этом звене (α -конфигурация [1]) и звене С в полисахариде из *L. tetrasporus* (β -конфигурация), по-видимому, не имеет существенного значения (ср. химические сдвиги атома C-4 в метил- α - и - β -целлобиозидах [5]).

Следует отметить, что химические сдвиги некоторых линий спектра полисахаридов *L. tetrasporus* заметно зависят от pH среды. Поскольку в литературе имеются указания на возможность идентификации линий от D-глюкуроновой кислоты по смещению их химических сдвигов в высоком поле при переходе от нейтральной к кислой среде [10], мы намеревались использовать это обстоятельство для дополнительного подтверждения правильности отнесения, данного в табл. 2. Однако уже исследование зависимости химических сдвигов от pH среды для низкомолекулярных моделей (XVIII) и (XIX) показало, что определенной закономерности в смещении сигналов атомов углерода нет даже для этих соединений. Так, для кислоты (XVIII) при переходе от pH 7 к pH 2 наблюдается высокопольный сдвиг для C-5 (1,4 м.д.) и C-6 (3 м.д.), для кислоты (XIX) — лишь сдвиг в высокое поле атома углерода C-6 (изменение для других атомов углерода в обоих соединениях не превышает 0,3 м.д.).

В полисахаридах, продуцируемых *L. tetrasporus*, наибольшие изменения при подкислении растворов до pH 2 претерпевают химические сдвиги

Таблица 2

Отнесение сигналов атомов углерода в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида,
[продуцируемого *L. tetrasporus*, штамм 70
 δ , м. д., рН 7, D_2O , внутренний стандарт ДМСО

Атом углерода	Моносахаридный остаток					
	A	B	C	D *	D(R) *	R *
1	100,5	100,5	104,0 (104,1)	100,5	100,5	103,3
2	70,9	72,2 (71,9)	73,7 (73,3)	82,1 (82,7)	82,1 (82,7)	72,0 (71,6)
3	80,9 (80,7) **	72,2 (71,9)	76,4 (76,8)	72,2 (71,7)	82,9 (82,7)	73,6 (73,4)
4	66,5 (66,2)	76,9	81,2 (80,2)	72,2 (71,7)	72,1 (71,7)	69,4 (69,2)
5	76,9	75,6	74,7 (74,3)	70,9 (70,8)	70,8 (70,65)	75,6 (75,5)
6	61,7	61,1 (61,25)	175,3 (172,1)	176,8 (173,1)	176,5 (172,6)	61,7 (61,5)

* Звено D ($R = \text{H}$); звено D(R): $R = \beta\text{-D-Gal p}$; звено R: $\beta\text{-D-Gal p}$.

** В скобках даны химические сдвиги атомов углерода при рН 2.

Таблица 3

Спектры ^{13}C -ЯМР некоторых модельных соединений (δ , м. д.)

Атом углерода	β -Фенил- целлоби- озид (XVI) *	Расчетные значения для звена C **	α -Метил- софорозид (XVII) *	Расчетные значения для звена D **	Метил- α -метил-2-О-метил- <i>D</i> -глюко- пиранозидуронат (XVIII) [11] *	Метил- α -метил-2,3-ди-О-метил- <i>D</i> -глюко- пиранозидуронат (XIX) [11] ***	β -Метил- <i>D</i> -галактопиранозид *
1	100,8	—	99,5	99,5	97,8	98,2	104,5
2	73,45	73,05	80,9	80,3	80,5	81,0	71,4
3	78,6	75,2	72,65	72,25	72,4	82,0	73,45
4	79,2	80,7	70,2	72,1	72,0	71,8	69,3
5	74,9	73,6	71,9	71,1	71,5	70,85	75,75
6	60,7	—	61,4	—	172,3	170,8	61,6
1'	103,3	(103,3)	104,3	—	—	—	—
2'	73,9	—	73,9	—	—	—	—
3'	76,7	—	76,4	—	—	—	—
4'	70,2	—	70,2	—	—	—	—
5'	76,3	—	76,3	—	—	—	—
6'	61,4	—	61,4	—	—	—	—

* Раствор в D_2O , рН 7.

** Введена поправка, обусловленная заменой первичной спиртовой группы на карбоксильную [4].

*** Раствор в CDCl_3 .

неаномерных атомов углерода, связанных гликозидной связью (см. табл. 2), причем направления смещения химических сдвигов для C-4 в звене C и C-2 в звене D имеют противоположный характер, положение сигнала C-5 в звене C не изменяется, сигнал C-3 смещается в низкое поле.

Как видно, зависимость химических сдвигов атомов углерода в остатках *D*-глюкуроновой кислоты при изменении рН среды имеет сложный характер и не может служить критерием для идентификации линий спектра. Важно, однако, отметить, что такая зависимость существует и, следовательно, при описании и сопоставлении спектров различных полисахаридов рН среды должен указываться в качестве необходимого параметра условий съемки.

Экспериментальная часть

Исследованы полисахариды, продуцируемые 11 штаммами *L. tetrasporus*, полученными из коллекции кафедры биологии почв МГУ (штаммы 70, 72, 218, 302, 309, 322, 357, 383, 385, 416 и 421). Метод выделения из культуральной жидкости и очистки полисахаридов описан в работе [12]. Восстановление полисахаридов дибораном проводили по методу [13], метилирование полисахаридов — по методу Хакомори [14], формализ,

гидролиз, восстановление NaBD_4 , ацетилирование и хромато-масс-спектрометрический анализ — по стандартным методам. Полученные данные представлены в табл. 1. Окисление ацетата восстановленного полисахарида из *L. tetrasporus* (штамм 421) в уксусном ангидриде проводили аналогично [3].

Масс-спектры снимали на приборе Varian MAT 111 «Gnom», спектры ^{13}C -ЯМР — на приборе WR-60 «Bruker» с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц (импульсный режим с последующим фурье-преобразованием). Полисахариды исследовались в виде 3%-ных растворов в D_2O . Химический сдвиг ДМСО (внутренний эталон) относительно ТМС был определен в специальном эксперименте (+39,45 м.д.), химические сдвиги всех линий пересчитаны к ТМС (δ -шкала). Для стандартизации условий съемки спектров pH среды поддерживали на уровне 8—9 добавлением раствора NaOH, а при съемке в кислой среде эти растворы обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+ -форма). Температура съемки 50°. Для получения нормального спектра в таких условиях оказалось достаточным накопление 25 000—50 000 сигналов свободной индукции. Специальная проверка показала, что относительные интегральные интенсивности линий (включая линию от карбоксильной группы) не изменяются при варьировании интервала между 90-градусными импульсами от 0,5 до 2 с. Спектры сняты при интервале между импульсами, равном времени сбора данных (1,1 с) при масштабе 100 Гц/см.

Окисление ацетата восстановленного полисахарида L. tetrasporus (штамм 70) в уксусной кислоте (двойное). Ацетат восстановленного полисахарида (0,1 г) и ангидрид хромовой кислоты (0,3 г) в 5 мл абсолютной уксусной кислоты, перемешивая, нагревали 1,5 ч при 50°. Затем реакционную смесь разбавляли водой, нейтрализовали CaCO_3 , экстрагировали хлороформом и упаривали. Половину полученного вещества обрабатывали 1 н. раствором метилата натрия в метаноле при комнатной температуре. Смесь обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+ -форма) и упаривали. Остаток гидролизovali 7 ч 2 н. H_2SO_4 при 100°, нейтрализовали BaCO_3 , отфильтровывали, восстанавливали NaBH_4 и после обычной обработки ацетилировали. Полученные ацетаты полиолов исследовали методом ГЖХ на колонке ECN SS-3M.

Вторую половину окисленного полисахарида восстанавливали NaBH_4 и после ацетилирования вновь окисляли в тех же условиях. После аналогичной описанному выше обработки смесь ацетатов полиолов исследовали методом ГЖХ. По данным ГЖХ-анализа, соотношение ацетатов полиолов в исходном полисахариде и окисленных образцах остается практически неизменным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Гудильев Н., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Чижов О. С., Кочетков Н. К. (1977) Биоорганич. химия, 3, 1028—1033.
2. Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Бабьева И. П., Чижов О. С. (1974) Микробиология, 43, 666—671.
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. Gorin P. A. J., Mazurek M. (1975) Can. J. Chem., 53, 1212—1223.
5. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sigiya H., Seto S. (1973) J. Chem. Soc., Perkin I, 2425—2432.
6. Voelter W., Breitmaier E. (1973) Org. Magn. Reson., 5, 311—318.
7. Gorin P. A. J. (1974) Can. J. Chem., 52, 458—461; (1975) Carbohydr. Res., 39, 3—10.
8. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) Acta chem. scand., 26, 661—667.
9. Lindberg B., Lonngren J., Svensson S. (1975) Advan. Carbohydr. Chem. and Biochem., 31, 185—240.
10. Colson P., Jennings H. J., Smith I. C. P. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 8081—8087.
11. Shashkov A. S., Sviridov A. F., Chizhov O. S., Kovac P. (1978) Carbohydr. Res., 60, in press.

