



УДК 547.458.02:577.11

ПОЛИСАХАРИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ

5. * СТРУКТУРА СВОБОДНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДА, СИНТЕЗИРУЕМОГО *Mycobacterium salivarum* 76

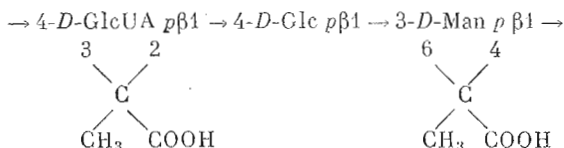
Свиридов А. Ф., Шапков А. С., Кочетков Н. К.

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

Вотвинко И. В., Егоров Н. С.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Методами химического анализа (кислотный гидролиз, метилирование, периодатное окисление) и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии установлено строение внеклеточного полисахарида *Mycobacterium salivarum* 76:



В настоящее время экзогликаны микроорганизмов являются объектом детального изучения по многим направлениям. Некоторые из них с успехом используются в промышленности и медицине. Необходимость всестороннего исследования этих веществ продиктована также важностью изучения физиологических возможностей клетки. Для большинства микроорганизмов, синтезирующих экзополисахариды, характерны гликаны, не встречающиеся у других живых существ. Особенно разнообразны внеклеточные гетерогликаны микроорганизмов, отличающиеся большим набором составляющих их компонентов, иногда уникальных, и типов структур.

В литературе содержится мало сведений о строении внеклеточных полисахаридов микобактерий [2]. Ранее нами была обнаружена способность ряда сапротрофных микобактерий к биосинтезу свободных экзополисахаридов [3]. Активным продуцентом полисахарида является *Mycobacterium salivarum* 76 (до 3 г гликана на 4 л культуры). По предварительным данным, некоторые из экзополисахаридов микобактерий, в частности гликан *M. salivarum* 76, обладают выраженным действием на иммунитет животных. Все это обусловило интерес к изучению полисахарида, синтезируемого *M. salivarum*.

Полисахарид был выделен из культуральной жидкости осаждением цетилпиридинийбромидом [4], что указывает на его полианионную природу. Гликан гомогенен по результатам ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Он содержит *D*-маннозу, *D*-глюкозу, *D*-глюкуроновую кислоту и пировиноградную кислоту в соотношении 1:1:1:2, которое было определено химическим анализом и ^{13}C -ЯМР-спектроскопией.

Моносахариды идентифицировали методом БХ, *D*-глюкозу и *D*-маннозу — также в виде гексаацетатов полиолов методом ГЖХ (соотношение 1:1), *D*-глюкуроновая кислота была идентифицирована после восстановления карбоксильной группы в виде *D*-глюкозы. Пировиноградную кислоту идентифицировали сравнением ее 2,4-динитрофенилгидразона с заведо-

* Сообщение 4 см. [1].

мым образцом методом БХ [5]. Абсолютная конфигурация моносахаридов была определена путем измерения удельного вращения свободных моносахаридов (*D*-глюкуроновую кислоту предварительно восстанавливали до *D*-глюкозы) [6] и гексаацетатов полиолов [7, 8]. Величины удельного вращения оказались близки к литературным данным.

Таким образом, продуцируемый *M. salivarium* виноклеточный гликан представляет собой полимер, в котором на три моносахаридных звена приходится три карбоксильные группы. По своему физико-химическому поведению он близок к полисахаридам типа альгиновых или пектовых кислот. Так, нам не удалось провести метилирование по методу Хакомори [9] нативного полисахарида (1) ввиду его плохой набухаемости DMSO. Попытки получать ацетат или пропионат [10] полисахарида (1) с целью его восстановления по карбоксильным группам, что в дальнейшем облегчило бы его растворимость, также были безуспешны. Поэтому идентифицировать положение остатков пировиноградной кислоты таким путем не удалось. В отдельных случаях мы наблюдали образование трисахаридного фрагмента с $\Delta^{4,5}$ -уроновой кислотой на невосстанавливаемом конце, образующегося в результате щелочного распада полисахарида при метилировании [11], однако количества его от опыта к опыту были нестабильными.

Основная информация о строении полисахарида была получена из данных по метилированию полисахарида, не содержащего остатков пировиноградной кислоты (полисахарид (2)), и методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Полисахарид (2) легко получается нагреванием денонизованного полимера (1) при 100°С (~1 ч). После дигликолиза и лиофилизации получается полисахарид, который значительно лучше набухает в DMSO. По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, остатки пировиноградной кислоты в нем отсутствуют. Метилирование полисахарида (2) по методу Хакомори проходит достаточно полно, что видно из спектра ^{13}C -ЯМР метилированного образца и результатов его кислотного гидролиза. Восстановление *O*-метилового эфира полисахарида (2) LiAlD_4 в эфире позволило надежно идентифицировать остаток *D*-глюкуроновой кислоты по наличию в молекуле соответствующего полиола двух атомов дейтерия при C6. Гидролиз восстановленного LiAlD_4 *O*-метилового эфира полисахарида (2), последующее восстановление приводит к смеси ацетатов частично метилированных гексоз NaBD_4 и ацетилирование приводит к смеси ацетатов частично метилированных гекситов. Наличие атома дейтерия при C1 позволило надежно интерпретировать масс-спектры и определить типы гликозидных связей в полисахариде.

Методом хроматомасс-спектрометрии в смеси обнаружили 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метил-1-дейтеросорбит (3), идентифицированный сравнением с заводским образцом, 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4,6-три-*O*-метил-1-дейтерогексит (4) и 1,4,5,6-тетра-*O*-ацетил-2,3-ди-*O*-метил-1,6,6-тридейтерогексит (5) в соотношении 1 : 1 : 1 [12]. Исходя из состава полисахарида, гексит (4) следует отнести к 1,3-замещенной маннозе, а гексит (5) — к 1,4-замещенной глюкуроновой кислоте. Значит, полисахарид, синтезируемый *M. salivarium*, представляет собой линейный полимер, в котором *D*-глюкоза и *D*-глюкуроновая кислота соединены 1,4-, а *D*-манноза — 1,3-связями.

Как будет показано ниже, один из остатков пировиноградной кислоты образует в полисахариде шестичленный кетальный цикл, другой — пятичленный. Следовательно, один из них должен быть соединен 4,6-связью с *D*-маннозой, другой — 2,3-связью с *D*-глюкозой или *D*-глюкуроновой кислотой. Чтобы окончательно решить вопрос о месте присоединения второго остатка пировиноградной кислоты, полисахарид (1) окислили периодатом натрия в условиях сохранения пируватов в процессе окисления (фосфатный буфер, pH 6,95). Окисленный полисахарид гидролизовали и затем восстановили NaBH_4 . После ацетилирования в смеси методом ГЖХ обнаружены гексаацетаты сорбита и мальтита в соотношении 1 : 10. Следовательно, в этих условиях остаток *D*-глюкозы подвергается окислению, и, таким образом, второй остаток пировиноградной кислоты соединен 2,3-связью с *D*-глюкуроновой кислотой. Полисахариды, содержащие пируваткетальные остатки в этих положениях, довольно широко распространены в природе [13].

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР нативного (1) и модифицированного (2) полисахаридов (м. д. от ТМС)

Полисахарид	Моносахаридный остаток (D)	Химические сдвиги ($^{13}\text{C}_1 - ^1\text{H}_1$, Гц)								
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
(1)	GlcUA $p \beta$	102,4 (169)	79,35 *	79,35 *	80,0	76,7	175,55	110,25	177,0	23,75
	Glc $p \beta$	100,9 (160)	73,65	75,0	79,8 *	76,1	61,1			
(2)	Man $p \beta$	100,3 (162)	69,4	77,0	73,1	65,4	67,9	103,0	176,1	25,9
	GlcUA $p \beta$	103,2 (160)	73,95	75,2	81,2	76,8	175,6			
	Glc $p \beta$	101,4 (158)	73,95	75,3	79,85	76,0	61,35			
	Man $p \beta$	100,8 (158)	69,3	81,4	66,3	77,3	62,2			

* Отнесение может быть обратным.

Таблица 2

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР би- и триуроновой кислот и некоторых модельных соединений (м. д. от ТМС)

Соединение	Моносахаридный остаток	Химические сдвиги						Литература
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	
Биуроновая кислота	GlcUA $p \beta$	103,4	74,1	76,6	72,7	76,4	175,6	
	Glc $p \beta$	96,9	75,2	75,6	80,2	75,9	61,5	
	α	92,95	72,6 *	72,5 *	80,3	71,3	61,4	
Триуроновая кислота	GlcUA $p \beta$	103,4	74,1	76,6	72,7	76,4	175,6	
	Glc $p \beta$ **	101,3	74,0	75,4	80,1	76,0	61,5	
		101,1						
	Man $p \beta$	94,7	69,9	81,6	66,2	77,0	62,25	
	α	94,95	69,5	79,5	66,5	73,6	62,25	
Целлобиоза	Glc $p \beta$	97,1	75,7	75,7	80,1	76,1	61,8	[17, 18]
	Glc $p \alpha$	93,2	72,9	72,9	80,1	71,6	61,8	
GlcUA $p \alpha$ 1Me 3MeMan $p \beta$ 3MeMan $p \alpha$		104,3	73,8	76,5	72,3	75,6	—	[18]
		94,7	68,1	83,2	66,6	77,3	62,0	[19]
		95,0	67,3	80,8	66,8	73,4	62,0	[19]

* Отнесение может быть обратным.

** Раздвоение сигнала C1 обусловлено аномерами Man p .

Для окончательного установления строения полисахарида были подробно исследованы ^{13}C -ЯМР-спектры полисахаридов (1) и (2), а также би- и триуроновой кислот, образующихся при частичном гидролизе полисахарида.

В хорошо разрешенном спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (1), снятого в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия атомов углерода с протонами, видны 24 линии. Некоторые из них находятся в характерных областях спектра (табл. 1). В области резонанса атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода, находятся пять сигналов: 110,25; 103,0; 102,4; 100,9; 100,3 м.д. В высокопольной области спектра имеется два сигнала, характерных для резонанса атомов углерода метильных групп пируватов: 25,9 и 23,75 м.д. [14, 15]. В низкопольной области спектра — три сигнала с химическими сдвигами, характерными для резонанса атомов углерода в карбоксильных группах: 177,0; 176,1; 175,55 м.д. В области резонанса оксиметильных групп имеется один сигнал единичной интенсивности при 61,1 м.д. В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (1), снятого без подавления спин-спинового взаимодействия атомов углерода с протонами, из пяти сигналов в области резонанса атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода, три дают дублеты (102,4; 100,9 и 100,3 м.д.), остальные два остаются несколько уширенными синглетами (110,95 и 103,0 м.д.).

Таким образом, данные спектроскопии ^{13}C -ЯМР полисахарида (1) находятся в полном согласии с результатами химического анализа его мономерного состава. Повторяющееся звено полисахарида состоит из трех остатков (три сигнала от аномерных атомов углерода), имеет две пируватные группировки (два сигнала в высокопольной области спектра; два сигнала в области резонанса четвертичных атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода, и два из трех сигналов в низкопольной области спектра). Подтверждается также, что в состав повторяющегося звена входит уоновая кислота (один из трех пиков в низкопольной области спектра) и что все три остатка являются гексозами (общее число сигналов, за вычетом сигналов от пируватных группировок, составляет 18).

В спектре ПМР полисахарида (1) имеется три сигнала от протонов, связанных с аномерными атомами углерода, при 4,97; 4,82 и 4,67 м.д. и два синглета с интегральной интенсивностью, отвечающей трем протонам, при 1,47 и 1,58 м.д. (метильные группы пируватных группировок) [14, 15]. Два сигнала от аномерных протонов имеют дублетное расщепление (7 Гц для сигнала при 4,97 м.д. и 7,5 Гц для сигнала при 4,67 м.д.); третий пик выглядит уширенным синглетом.

В спектре ^{13}C -ЯМР модифицированного полисахарида (2) отсутствуют сигналы, характерные для пируватных группировок (табл. 1). В области резонанса атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода, остаются три пика (103,2; 101,1 и 100,8 м.д.). В спектре ^{13}C -ЯМР, снятом без развязки взаимодействия углерода с протонами, эти три сигнала имеют дублетные расщепления с константами 160, 158 и 158 Гц соответственно. В области резонанса оксиметильных групп находятся два сигнала (62,2 и 61,35 м.д.). Учитывая результаты анализа мономерного состава, сигнал при 66,3 м.д. можно отнести только за счет резонанса незамещенного атома углерода C4 в маннопиранозном остатке.

Спектр ^{13}C -ЯМР смеси би- и триуроновой кислот состоит из пяти серий сигналов, различающихся по интегральной интенсивности (табл. 2). В области резонанса аномерных атомов углерода наиболее интенсивен сигнал при 103,4 м.д. Следующими по мере убывания интенсивности были сигналы при 96,9 и 92,95 м.д. Совершенно очевидно по величине химических сдвигов, что эти два сигнала принадлежат атому C1 остатка с глюкопиранозной конфигурацией, находящегося на восстанавливаемом конце олигосахаридов (β - и α -аномеры соответственно [17]). В этой же области резонанса аномерных атомов углерода со свободной гидроксильной группой при C1 имеется еще одна пара сигналов малой интенсивности (94,95 и 94,7 м.д.), которые, судя по сдвигу, принадлежат атому C1 маннопиранозы на восстанавливаемом конце другого олигосахаридов (α - и β -аномеры соответственно [16]). Точно такая же по интенсивности пара сигналов имеется в области резонанса аномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидной связи (101,3 и 101,1 м.д.). Этими семью сигналами исчерпывается область резонанса аномерных атомов углерода. Анализ интегральной интенсивности сигналов в этой области показывает, что суммарная интенсивность сигналов при 96,9 и 92,95 м.д. составляет 75% интенсивности сигнала при 103,4 м.д. Суммарная интегральная интенсивность сигналов при 94,95 и 94,7 м.д. (или сигналов при 101,3 и 101,1 м.д.) составляет 25% интенсивности сигнала при 103,4 м.д. Такое распределение интенсивностей сигналов может получиться, если в смеси олигомеров присутствует дисахарид с остатком глюкопиранозы или глюкопирануроновой кислоты на восстанавливаемом конце (75%) и трисахарид с остатком маннопиранозы на восстанавливаемом конце (25%), причем остаток на восстанавливаемом конце ди- и трисахаридов один и тот же; сигнал атома C1 остатка на восстанавливаемом конце ди- и трисахаридов имеет один и тот же химический сдвиг (103,4 м.д., «100%-ный» сигнал).

Дальнейший полный анализ спектра продуктов частичного гидролиза полностью подтверждает это предположение. Большое различие в интенсивности сигналов атомов углерода ди- и трисахаридов позволяет выделить в остальной части спектра сигналы, относящиеся к тому или другому. Наиболее интенсивные из них должны быть отнесены к атомам углерода

остатка на невосстанавливающем конце ди- и трисахарида. Таких «100%-ных» сигналов в высокопольной области спектра четыре: 76,6; 76,4; 74,1 и 72,7 м.д. Наряду с сигналом 103,4 м.д. они составляют подспектр невосстанавливающего остатка ди- и трисахарида. Если иметь в виду мономерный состав исходного полисахарида, такой подспектр можно отнести только за счет резонанса остатка глюкопиранурановой кислоты с β -конфигурацией гликозидного центра [17]. Шестой сигнал этого остатка (углерод карбоксильной группы) находится в низкочастотной области спектра (175,6 м.д.), однако интегральная интенсивность этого сигнала не сопоставима с интегральной интенсивностью сигналов от протонированных атомов углерода С1—С5. Нетрудно показать, что выбор в качестве остатка на невосстанавливающем конце любого другого из двух оставшихся сахаров невозможен по ряду признаков. Так, глюкопиранозный остаток на невосстанавливающем конце должен иметь сигнал от С4 при 70—71 м.д. [16, 17], остаток маннопиранозы — от С4 при 67,8—68,0 м.д. [16]; в рассматриваемом спектре нет сигналов в этих областях, сравнимых по интенсивности с сигналом при 103,4 м.д.

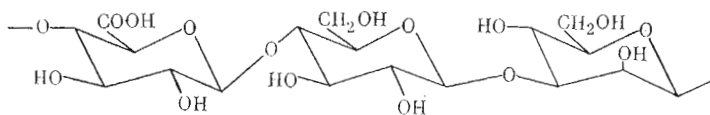
После этих предварительных замечаний ясно, что основным в смеси уруповых кислот является дисахарид с остатком β -D-глюкопиранурановой кислоты на невосстанавливающем конце и остатком глюкопиранозы — на восстанавливающем. Место присоединения первого остатка ко второму определяется после выделения в высокопольной области спектра сигналов, относящихся к остатку глюкопиранозы в дисахариде, с использованием того обстоятельства, что пики как α -, так и β -аномеров остатка глюкозы в дисахариде значительно интенсивнее пиков остатков трисахарида. Сравнение спектра глюкопиранозного остатка в дисахариде со спектрами остатков глюкопиранозы на восстанавливающем конце в софорозе, ламинарибиозе, целлобиозе и гениобиозе [17] с полной определенностью показало, что глюкопиранозный остаток на восстанавливающем конце рассматриваемого дисахарида замещен по С4. Таким образом, одним из продуктов гидролиза полисахарида (2) является 4-O-(β -D-глюкопиранурановая кислота)- α , β -D-глюкопираноза.

Порядок присоединения остатков в трисахариде ясен из общих соображений. Поскольку на невосстанавливающем конце находится остаток β -D-глюкопирануранурановой кислоты, а на восстанавливающем — α , β -D-маннопиранозы, средним остатком может быть только глюкопираноза. Химический сдвиг аномерного атома углерода последнего остатка составляет 101,3 или 101,1 м.д., в зависимости от конфигурации гликозидного центра соседнего остатка маннопиранозы. По значению химического сдвига остатка глюкозы трудно сказать что-либо определенное о конфигурации его гликозидного центра. Однако теперь, когда стало очевидным, что все сахара в повторяющемся звене полисахарида имеют пиранозный размер цикла, мы можем воспользоваться данными по константам спин-спинового взаимодействия аномерных атомов углерода с протонами при них (см. выше). Бок и др. [20] показали, что для пираноз и пиранозидов константа $^1J_{\text{C}_1-\text{H}}$ составляет 158—163 Гц для сахаров с аксиальным протоном при С1 и 169—172 Гц для сахаров с экваториальным протоном при С1. В применении к нашему случаю это означает, что все пиранозы в повторяющемся звене полисахарида (2) имеют β -конфигурацию гликозидных центров. Таким образом, средний остаток в трисахариде также имеет β -конфигурацию гликозидного центра. Место соединения остатка β -D-глюкопиранозы и D-маннопиранозы в трисахариде определяется после выделения сигналов того и другого с использованием различия в их интегральной интенсивности. Сигналы глюкопиранозного остатка (кроме упоминавшегося ранее сигнала от С1) по интенсивности больше, чем сигналы маннопиранозы, так как маннопираноза находится на восстанавливающем конце олигосахарида и представлена в спектре двумя сериями сигналов от α - и β -аномеров с соотношением интенсивностей примерно 3:1 (для α - и β -аномеров маннопиранозы в спектре совпали лишь сигналы от С6: 62,25 м.д.). После выделения сигналов маннопиранозного остатка в спектре трисахарида ясно, что он заме-

щен по C3, так как в спектре имеются сигналы незамещенных C2, C4 и C6 (табл. 2).

Для окончательного выяснения структуры полисахарида (2) остается определить тип замещения остатка β -D-глюкуроновой кислоты в нем. При сравнении спектров трисахарида и полисахарида (2) можно видеть, что в спектре последнего нет сигнала 72,7 м.д., который в спектре трисахарида является одним из самых интенсивных и отнесен за счет резонанса C4 остатка β -D-глюкопирануруновой кислоты на псевдоставляющем конце. Отсутствие этого сигнала в спектре полисахарида можно объяснить либо замещением по C3 (β -эффект гликозирования), либо по C4 (α -эффект гликозирования). β -Эффект гликозирования β -D-пиранозой остатка с *глюко*-конфигурацией состоит в смещении сигналов C4 и C2 в гликозилируемом остатке в высокое поле на 0,6–0,8 м.д. [19]. В спектре полисахарида нет сигналов в более высоком поле, чем 72,7 м.д., вплоть до сигнала со сдвигом 69,3 м.д. При замещении по C4 сигнал 72,7 м.д. в остатке глюкуроновой кислоты должен сместиться в низкое поле на несколько м.д., что, очевидно, и имеет место.

Последнее заключение позволяет теперь с полной определенностью представить структуру повторяющегося звена полисахарида (2):

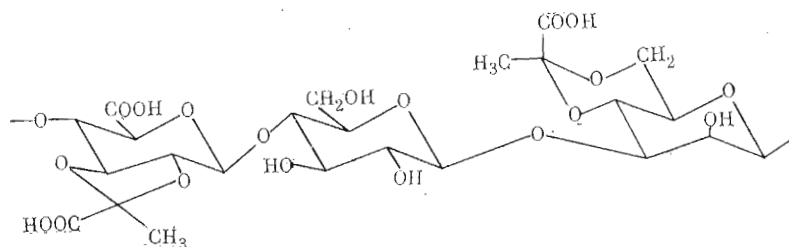


Полное отнесение сигналов в спектре полисахарида может быть выполнено при его сопоставлении со спектрами ^{13}C -ЯМР пираноз, входящих в состав повторяющегося звена, ди- и трисахарида, с учетом α - и β -эффектов образования гликозидных связей. Процедура отнесения ясна при анализе данных табл. 1.

Для окончательного установления структуры нативного полисахарида (1) осталось выяснить места присоединения двух пируватных группировок в нем. Для этого достаточно проследить за изменением положения сигналов от трех остатков в спектре полисахарида (1) при сравнении со спектром полисахарида (2). Сразу обращает на себя внимание отсутствие сигналов 62,2 и 66,3 м.д. (C6 и C4 β -D-маннопиранозного остатка в спектре полисахарида (2)) в спектре полисахарида (1). Сделанное на этом основании предположение о наличии пируватной группировки при C4 и C6 маннозного остатка подтверждается присутствием характерных сигналов при 67,9 и 65,4 м.д. в спектре полисахарида (1), практически совпадающих по положению с сигналами C6 и C5 метил-4,6-O-бензилден- β -D-глюкопиранозы (различия в структуре этого модельного соединения и рассматриваемого остатка в полисахариде (1) не имеют существенного значения для положения сигналов от C5 и C6 в них). Химические сдвиги атомов углерода самих пируватных группировок, по-видимому, также несут информацию о размере цикла, образуемого при присоединении пирувата к остатку сахара. В спектре полисахарида (1) сдвиг 103,0 м.д. характерен для атома углерода, связанного с двумя атомами кислорода и входящего в шестичленный цикл. Далее для пируватных группировок, входящих в шестичленный цикл, характерны химические сдвиги метильной группы 15–18 м.д. (аксиальная) или 25–26 м.д. (экваториальная) [14, 15]. Таким образом, наличие в спектре полисахарида (1) сигнала при 25,9 м.д. также подтверждает образование шестичленного цикла (*S*-конфигурация остатка пировиноградной кислоты). Сигнал при 23,75 м.д. характерен для резонанса метильной группы пирувата, образующего пятичленный цикл с остатком сахара [14, 15]. О наличии атома углерода, связанного с двумя атомами кислорода и входящего в пятичленный цикл, свидетельствует также низкочастотный сдвиг второго четвертичного атома углерода пируватов в спектре полисахарида (1) (110,25 м.д.). Кроме того, само присутствие в спектре полисахарида (1) сигнала от оксиметильной группы (61,1 м.д.) и тип замещения остатков исключает возможность присоединения второй пируват-

ной группировки с образованием шестичленного цикла. Из двух возможностей присоединения пируватной группировки (по С2 и С3 остатка β -D-глюкопиранурановой кислоты или β -D-глюкопиранозы) мы выбрали первый по следующим признакам: 1) сигналы атомов углерода остатков β -D-глюкопиранозы в спектрах полисахаридов (1) и (2) (в том числе сигналы С1) совпадают по положению с точностью до $\pm 0,3$ м.д.; 2) сигнал С1 остатка β -D-глюкопиранурановой кислоты в спектре полисахарида (1) смещен в высокое поле на 0,8 м.д. по сравнению с таковым в спектре полисахарида (2); 3) сигнал при 102,4 м.д. в спектре полисахарида (1), снятом без развязки спин-спинового взаимодействия атомов углерода с протонами, имеет аномально большую для β -конфигурации константу спин-спинового взаимодействия с ближайшим протоном (169 Гц), что может быть следствием искажения пиранозного цикла при присоединении пируватной группировки по С2 и С3 в этом остатке. Для определения абсолютной конфигурации остатка пирувиноградной кислоты при С2 и С3 сахара с глюкопиранозной конфигурацией по спектрам ^{13}C -ЯМР в настоящее время нет данных.

Таким образом, совокупность приведенных доказательств позволяет приписать полисахариду, продуцируемому *M. salivarum* 76, следующее строение:



Полисахарид аналогичной структуры, но без пирувата по остатку уронево́й кислоты и с ацетатом по остатку глюкозы продуцируется *Klebsiella* K-тыре5 [21].

Работа по изучению строения экзогликанов сапротрофных микробактерий продолжается.

Экспериментальная часть

Культура *M. salivarum* 76 получена из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Ее выращивали на жидкой синтетической среде, как описано ранее [3].

Масс-спектры производных полиолов снимали на приборе Varian MAT-111 Gnom, ГЯХ-анализ проводили на приборе ЛХМ-8-МД на колонках с 5% НПГС, 3% SE-30, 3% ECNSS-3М на хромсорбе W. Удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$ образцов измеряли на приборе Perkin-Elmer 141-М при длине волны 589 нм. Спектры ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,89 МГц в D_2O (2%-ые растворы) при 50°C , внутренний стандарт — метанол (50,15 м.д.).

Выделение полисахарида. После отделения клеток центрифугированием при 105 000 g культуральную жидкость депротенизировали хлороформом по методу Севага [22], диализовали и после упаривания осаждали цетилпиридинийбромидом [22]. Образовавшиеся комплексы отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин и растворяли в 4 М растворе NaCl. Затем удаляли цетилпиридинийбромид 3-кратной экстракцией хлороформом, водный раствор полисахарида диализовали и лиофилизовали; $[\alpha]_D^{20} - 40,0$ (с 0,2, вода).

При хроматографировании на DEAE-целлюлозе (Cl^-) полисахарид выходит одним пиком (градиентная элюция NaCl).

Идентификация моносахаридов. Раствор полисахарида (0,3 г) в 30 мл 2 н. H_2SO_4 нагревали 8 ч при 100°C . Охлаждали, нейтрализовали BaCO_3 , отфильтровывали, осадок промывали водой и фильтрат обрабатывали KУ-2

(H⁺). Отфильтровывали и упаривали досуха. Методом БХ (*n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3; обнаружение анилинфталатом) в смеси идентифицировали глюкозу, маннозу и глюкуроновую кислоту.

Часть гидролизата (0,005 г) восстанавливали NaBH₄ и после обычной обработки ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (по 1 мл). Через 1 сут избыток уксусного ангидрида разлагали метанолом и упаривали досуха, добавляя толуол. Методом ГЖХ в смеси идентифицировали гексаацетаты сорбита и маннита (1 : 1).

Оставшуюся часть гидролизата дедлили на бумаге FN-18 в той же системе. Выделено 0,04 г глюкозы, 0,05 г маннозы и 0,04 г глюкуроновой кислоты. Последний моносахарид нагревали 4 ч при 100°С в 10 мл 5%-ного раствора HCl в MeOH в запаянной ампуле, раствор нейтрализовали водным аммиаком и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл 50%-ного раствора метанола в воде и добавляли 0,1 г NaBH₄. Смесь выдерживали 5 ч при 20°С, затем обрабатывали КУ-2 (H⁺) и упаривали досуха, добавляя несколько раз метанол. Полученный метилглюкозид гидролизovali в условиях, описанных выше. Выход глюкозы — 0,025 г.

Удельное вращение *D*-маннозы составило +13,0 (с 1,3; вода), [данные [6] : [α]_D +14,2 (вода)], образцов *D*-глюкозы, полученных из гидролизата полисахарида и восстановлением уроновой кислоты, соответственно +45,0 (с 1,2; вода) и +44,0 (с 1,0; вода) [данные [6] : [α]_D +47,9 (вода)].

Затем эти образцы восстанавливали NaBH₄ и ацетилировали, как описано выше. Удельное вращение гексаацетата *D*-маннита составило +22,0 (с 0,5; хлороформ) [данные [7] : [α]_D +25,0 (хлороформ)], образцов гексаацетата *D*-сорбита, полученных из описанных выше образцов *D*-глюкозы, соответственно +10,5 (с 0,5; хлороформ) и +10,0 (с 0,5; хлороформ) [данные [8] : [α]_D +12,5 (с 0,8; хлороформ)].

Выделение би- и триуроновой кислоты. Раствор 0,3 г полисахарида (1) в 30 мл 0,5 н. HCl нагревали 3 ч при 100°С. Упаривали досуха при температуре не выше 30°С. Остаток переносили на колонку (1×30 см) со смолой амберлит CG-400 (Ac⁻) и промывали непрерывным градиентом вода — 10%-ная CH₃COOH (по 500 мл). Анализ фракций (по 20 мл каждая) проводили с помощью фенола — H₂SO₄. Фракции 27—45 объединяли и упаривали. В гидролизате объединенной фракции (5 мг, 2 мл 1 н. HCl, 100°С, 3 ч) методом БХ обнаружены *D*-манноза, *D*-глюкоза и *D*-глюкуроновая кислота. По данным ¹³C-ЯМР-спектроскопии, вещество представляет собой смесь би- и триуроновой кислот с преобладанием биуроновой кислоты. Раздельные спектры этих соединений представлены в табл. 2.

Идентификация пировиноградной кислоты. Раствор 0,3 г полисахарида (1) в 50 мл воды обрабатывали КУ-2 (H⁺). Смолу отфильтровывали, промывали водой, фильтрат нагревали 1 ч при 100°С. Охлаждали, пировиноградную кислоту экстрагировали эфиром (5×100 мл). Эфирные вытяжки высушивали Na₂SO₄ и упаривали. Выход 0,07 г. Раствор 0,01 г кислоты в 3 мл воды смешивали с 1 мл 0,2% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 50% H₂SO₄. Через 1 ч осадок отфильтровывали, промывали 10% H₂SO₄ и высушивали на фильтре. Методом БХ в системе *n*-бутанол — 0,5 н. NH₄OH — этанол (7 : 2 : 1) (обнаружение 2% NaOH в 90%-ном этаноле) идентифицировали 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты сравнением с заводским образцом.

Водный раствор полисахарида упаривали до 50 мл и лиофилизovali. Выход полисахарида (2) — 0,2 г, [α]_D²⁰ — 50,0 (с 0,2; вода). Спектр ¹³C-ЯМР полисахарида (2) представлен в табл. 1.

Метилирование полисахарида (2). 0,2 г полисахарида (2) растворяли в 40 мл абс. DMSO и приливали раствор 0,4 г NaN в 30 мл DMSO. Смесь перемешивали 2 ч при 20°С, охлаждали до 10°С и прибавляли по каплям 5 мл CH₃I. Перемешивали 30 мин и далее диализовали 2 сут против проточной воды. Упаривали досуха, остаток растворяли в 30 мл хлороформа, фильтровали и упаривали.

0,05 г метилового эфира полисахарида (2) растворяли в 30 мл смеси эфир — хлористый метилец (1 : 2), добавляли 0,1 г LiAlD₄ и кипятили 8 ч. Избыток LiAlD₄ разлагали 1 мл воды, отфильтровывали, осадок промы-

вали хлороформом и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 20 мл 1 н. HCl и нагревали 3 ч в ампуле при 100° С. Упаривали досуха, растворяли в 10 мл 50% метанола, добавляли 0,1 г NaBD₄. Смесь выдерживали 2 ч при 20° С, обрабатывали КУ-2 (H⁺), отфильтровывали, смолу промывали метанолом и фильтрат упаривали, добавляя несколько раз метанол. Остаток ацетилировали. Методом хроматомасс-спектрометрии в смеси идентифицировали 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метил-1-дейтеросорбит (3), 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метил-1-дейтероманнит (4) и 1,4,5,6-тетра-О-ацетил-2,3-ди-О-метил-1,6,6-тридейтеросорбит (5). Масс-спектр сорбита (5) *m/z* (*I*, %): 263(20), 203(20), 189(10), 162(13), 161(15), 145(36), 129(90), 118(100), 102(66), 101(41), 100(26), 99(38), 87(78), 43(90).

Периодатное окисление полисахарида (1). Раствор 0,01 г полисахарида (1) в 10 мл фосфатного буфера (3,40 г KH₂PO₄, 3,55 г Na₂HPO₄ в 1 л воды, рН 6,95) охлаждали до 5° С и добавляли 0,2 г NaIO₄. Смесь выдерживали при этой температуре 3 сут. Диализовали против проточной воды 24 ч, раствор упаривали до 10 мл и добавляли 0,1 г NaBH₄. Через 3 ч обрабатывали КУ-2 (H⁺), фильтровали, смолу промывали 10 мл воды. К фильтрату добавляли 2 мл конц. HCl и выдерживали 3 ч при 100° С. Упаривали досуха при 30° С, растворяли в 10 мл воды, добавляли 0,1 г NaBH₄ и затем после обычной обработки ацетилировали, как описано выше. Методом ГЛХ в смеси обнаружены гексаацетаты сорбита и маннита в соотношении ~1 : 10.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свиридов А. Ф., Арифходжаев Х. А., Шапков А. С., Ботвинко И. В., Чижов О. С., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 568–577.
2. Stacey M., Barker S. A. Polysaccharides of microorganisms. Oxford: Clarendon Press, 1960.
3. Ботвинко И. В., Гречушкина Н. П., Егоров Н. С. Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., 1978, № 2, с. 40–43.
4. Ботвинко И. В., Гречушкина Н. П., Гладько Н. А., Егоров Н. С. Микробиол., 1981, т. 50, вып. 2, с. 229–233.
5. Практикум по микробиологии/Ред. Егоров Н. С. Изд-во Моск. ун-та, 1976, с. 212–215.
6. Staněk J., Cerny M., Kosourek J., Pacak J. The monosaccharides. Prague: Publishing house of the Czechoslovak Academy of sciences, 1963, p. 98–99.
7. Толленс В., Эльснер К. Краткий справочник по химии углеводов. Л.–М.: ГОНТИ, 1938, с. 349.
8. Eveleigh D. E. In: Microbial composition. Handbook of Microbiology, 1973, v. 2, p. 89–146.
9. Nakomori S. J. Biochem., 1964, v. 55, № 2, p. 205–208.
10. Manning I. H., Green I. N. J. Chem. Soc. (C), 1967, p. 2357–2363.
11. Lindberg B., Lönngren J., Svensson S. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1975, v. 31, p. 185–240.
12. Björndal H., Lindberg B., Pilotti A., Svensson S. Carbohydr. Res., 1970, v. 15, № 3, p. 339–349.
13. Свиридов А. Ф., Арифходжаев Х. А., Чижов О. С., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 165–186.
14. Garegg P. J., Lindberg B., Kvarnström I. Carbohydr. Res., 1979, v. 77, p. 71–78.
15. Garegg P. J., Jansson P.-E., Lindberg B., Lindh F., Lönngren J., Kvarnström I., Nimnich W. Carbohydr. Res., 1980, v. 78, № 1, p. 127–132.
16. Gorin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212–1223.
17. Usui I., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1973, № 20, p. 2425–2432.
18. Balza F., Cyr N., Hamer G. K., Perlin A. S., Koch H. J., Stuart R. S. Carbohydr. Res., 1977, v. 59, № 1, p. C7–C11.
19. Gorin P. A. J. Can. J. Chem., 1974, v. 52, № 3, p. 458–461.
20. Bock K., Lundt I., Pedersen C. Tetr. Lett., 1973, p. 1037–1040.
21. Dutton G. G. S., Yang Mo-Tai. Can. J. Chem., 1973, v. 51, № 11, p. 1826–1832.
22. Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 261–289.

Поступила в редакцию
6.IV.1982

POLYSACCHARIDES OF MYCOBACTERIA. 5. STRUCTURE OF FREE
EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCED BY *MYCOBACTERIUM*
SALIVARUM 76

SVIRIDOV A. F., SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K.,
BOTVINKO I. V., EGOROV N. A.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The following structure of the extracellular polysaccharide of *Mycobacterium salivarum* 76 has been determined using methods of chemical analysis (acid hydrolysis, methylation, oxidation with sodium periodate) and ¹³C NMR spectroscopy:

