



УДК 577.114.5:579.871.1

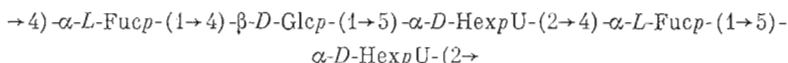
## СТРУКТУРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДА *Rhodococcus* sp. С13-6, СОДЕРЖАЩЕГО *D-ликто-ГЕКСУЛОЗОНОВУЮ* КИСЛОТУ

*Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шапков А. С.,  
Горин С. Е. \*, Вустина Т. Ф. \*, Сойфер В. С. \*,  
Есинов С. Е. \*, Лысак Л. В. \*, Кочетков Н. Е.*

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

*\*Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков  
Минмедбиопрома СССР, Москва*

В состав внеклеточного полисахарида, продуцируемого микроорганизмом *Rhodococcus* sp. С13-6, входят *D*-глюкоза, *L*-фукоза и *D*-ликто-гексулозоновая кислота (HexpU) в соотношении ~1:2:2. Строение последнего моносахарида, ранее не найденного в полисахаридах, установлено путем его восстановления в смесь галактита и тагита или в тагатозу, а также с помощью <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии. На основании анализа методом метилирования и идентификации продуктов автогидролиза полисахарида по гликозидным связям гексулозоновой кислоты (дисахаридного и трисахаридного фрагментов) предложена следующая структура пентасахаридного повторяющегося звена:

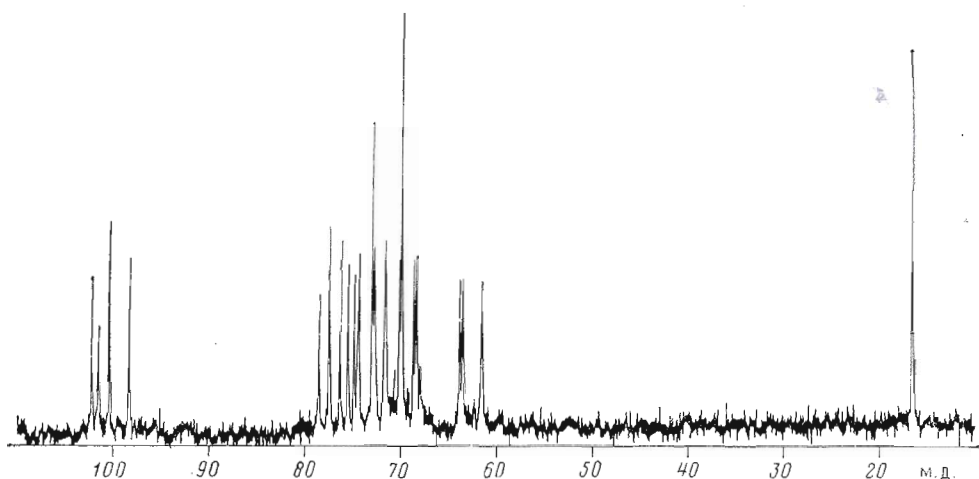


Способность к биосинтезу внеклеточных полисахаридов широко распространена среди микроорганизмов. На примере дрожжей рода *Lipomyces* [1] и некоторых групп бактерий [2] показано, что родственные микроорганизмы способны продуцировать полимеры близкой структуры. При исследовании 17 штаммов выделенных из почвы коринеформных бактерий *Rhodococcus* sp. было установлено, что все они образуют кислые экзополисахариды, содержащие одинаковый набор моносахаридов — глюкозу, фукозу и один и тот же неидентифицированный кислый компонент в различных соотношениях. В связи с тем, что сходство и различия в структурах экзогликанов могут иметь значение для систематики родококков, в настоящей работе нами проведена идентификация кислого компонента и установлено строение внеклеточного полисахарида одного из штаммов *Rhodococcus* sp.

В работе использован штамм С 13-6, выделенный из типичного серозема. Перед выделением полисахарида с целью снижения его вязкости культуральную жидкость подвергали кислотной обработке (рН 3–4) и после нейтрализации полисахарид очищали по методу [3] и осаждали цетавлоном. По данным электрофореза на бумаге, полисахарид был кислым,  $E_{\text{сала}} 0,6$ ; он имел удельное оптическое вращение  $[\alpha]_D -90,2^\circ$  (с 0,5). В ИК-спектре полисахарида присутствовала полоса поглощения карбоксильной группы при 1620 см<sup>-1</sup>. По данным гель-хроматографии на колонке с гелем Sephacryl S300, калиброванной стандартными декстранами, молекулярная масса выделенного полисахарида составляла ~250 000.

<sup>13</sup>C-ЯМР-спектр полисахарида был типичным для регулярного полимера (рисунок). В нем присутствовали сигналы двух метильных групп 6-дезоксисахаров при 16,6 м.д. (двойной интенсивности), три сигнала первичноспиртовых групп при 61,3; 63,8 и 64,1 м.д., четыре сигнала аномерных атомов углерода при 98,4; 100,7; 101,7 и 102,4 м.д., два сигнала карбоксильных групп при 172,3 и 172,4 м.д. и сигналы 18 других углеродных атомов в области 68,5–78,3 м.д.

Сокращения: HexpU — *D*-ликто-гексулозоновая кислота.



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида (область сигналов карбоксильных групп не показана)

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре, снятом без подавления С,Н-взаимодействий, сигналы трех аномерных атомов углерода давали дублеты с константами спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{C,H}} < 170$  Гц, что указывало на их принадлежность остаткам альдопиранозидов [4], причем два из этих остатков, характеризующиеся относительно большими константами  $^1J_{\text{C,H}}$  169,2 Гц (сигналы при 98,4 и 100,7 м.д.), присоединены  $\alpha$ -гликозидными связями, а третий остаток с меньшей константой  $^1J_{\text{C,H}}$  160,9 м.д. (сигнал при 102,4 м.д.) присоединен  $\beta$ -гликозидной связью [5]. Четвертый сигнал в этой области при 101,7 м.д. оставался синглетом, т. е. соответствующий ему аномерный атом углерода не несет ни одного протона и, следовательно, принадлежит кетозидному остатку. Обращала на себя внимание относительно большая интегральная интенсивность этого сигнала, равная интенсивности каждого из сигналов С1 альдопиранозидных остатков, в то время как обычно сигналы атомов  $^{13}\text{C}$ , не несущих протонов, имеют в спектре заметно меньшую интенсивность. Учитывая это, а также принимая во внимание общее число сигналов в спектре, в том числе наличие сигналов двух карбоксильных групп, можно сделать вывод о присутствии в повторяющемся звене двух кетозидных остатков, наиболее вероятно являющихся остатками альдулозоновой кислоты. Этот вывод был подтвержден в ходе дальнейшего структурного анализа; таким образом, всего в повторяющемся звене полисахарида входят пять моносахаридных остатков.

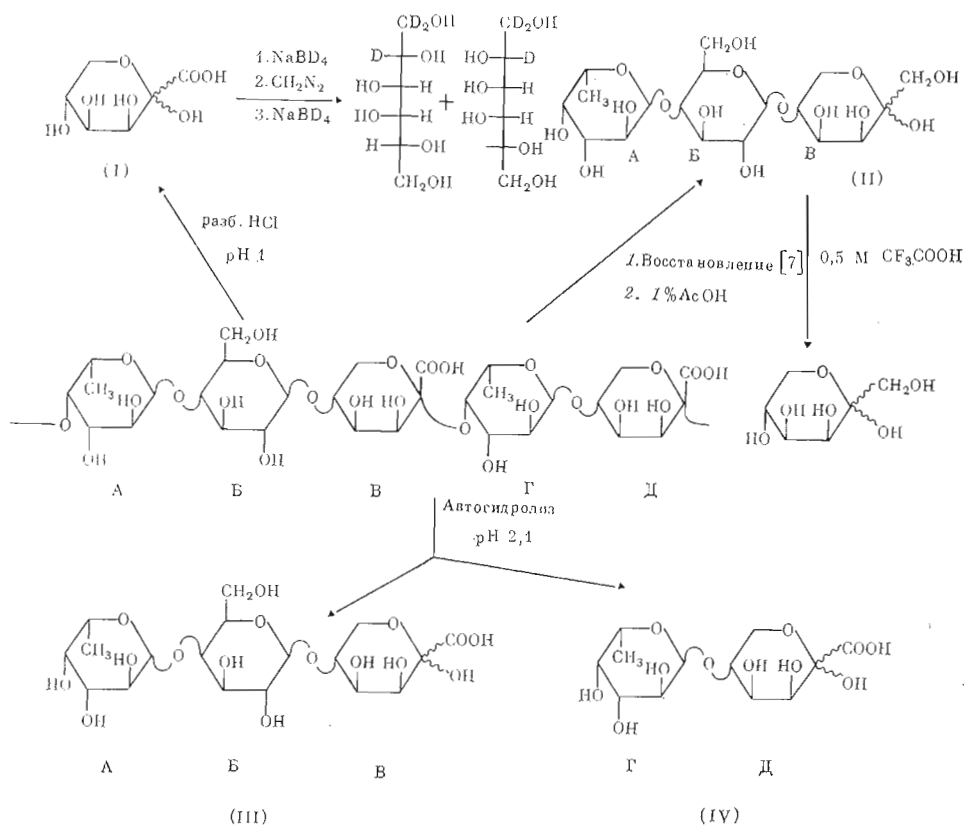
Полисахарид был подвергнут кислотному гидролизу (2 М соляная кислота,  $100^\circ\text{C}$ , 3 ч), в гидролизате были обнаружены фукоза и глюкоза в соотношении  $\sim 2:1$ , которые были идентифицированы с помощью углеводного анализатора, а также методами ВХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Эти моносахариды были выделены из гидролизата с помощью препаративной ВХ, и на основании величин удельного оптического вращения была установлена *L*-конфигурация фукозы и *D*-конфигурация глюкозы. Таким образом, два из трех альдопиранозидных остатков являются остатками *L*-фукозы, а третий — остатком *D*-глюкозы. Альдулозоновая кислота в гидролизате обнаружена не была, вероятно, в результате ее полного разрушения в выбранных условиях гидролиза. Для ее выделения был применен более мягкий гидролиз (разбавленная соляная кислота, рН 1;  $100^\circ\text{C}$ , 3 ч), который привел к смеси мономеров и олигомеров. Из этой смеси ионообменной хроматографией на анионите был выделен кислый моносахарид (I), который имел подвижность при электрофорезе на бумаге  $E_{\text{Ca}^{1A}} 1,0$ .

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр моносахарида (I) содержал несколько серий сигналов, соответствующих, очевидно, нескольким аномерным формам. Однако сигналы одной из серий значительно доминировали. В этой серии присутствовали сигналы аномерного атома углерода при 98,0 м.д., карбоксиль-

ной группы при 176,0 м.д., первичноспиртовой группы при 63,9 м.д. и трех других углеродных атомов при 67,1; 71,8 и 72,3 м.д. Выделить сигналы других серий при первичном анализе спектра было затруднительно.

Моносахарид (I) был восстановлен натрийбордейтеридом по карбонильной группе, этерифицирован диазометаном и полученный метиловый эфир был снова восстановлен натрийбордейтеридом (схема 1). Анализ продуктов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов показал присутствие двух [1,1,2- $^2\text{H}_3$ ]гекситолов, которые по времени удерживания совпадали с двумя эпимерными гекситолами (галактитолом и талитолом), полученными боргидридным восстановлением тагатызы\*. Положение дейтериевой метки свидетельствовало о том, что исходный моносахарид представляет собой 2-кетогексоновую (гексулозоповую) кислоту, а образование тех же продуктов, которые образуются из тагатызы, доказывало *ликс*-конфигурацию этой кислоты. Сравнение удельного оптического вращения моносахарида (I)  $[\alpha]_D -15,2^\circ$  (вода) и *D*-*ликс*-гексулозоповой кислоты ( $[\alpha]_D -7,8^\circ$  (вода)) указывало на его *D*-конфигурацию. Этот вывод был подтвержден анализом эффектов гликозилирования на остатке этого сахара в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах (см. ниже).

Схема 1



Строение гексулозовой кислоты было дополнительно подтверждено ее прямым превращением в тагатызу. С этой целью полисахарид был восстановлен по карбоксильным группам по методу [7], затем подвергнут мягкому кислотному гидролизу разбавленной уксусной кислотой, из продуктов гидролиза ионообменной хроматографией на анионите в боратном буфере был выделен нейтральный трисахарид (II) (установление его строения описано ниже), который был подвергнут более жесткому гидролизу (0,5 М трифторуксусная кислота, 100° С, 1 ч), и в продуктах гидролиза с помощью углеводного анализатора были идентифицированы фукоза,

\* Тагатыза (Tag) — *ликс*-гексулоза.

глюкоза и тагатоza. Таким образом, кислый компонент полисахарида представляет собой *D*-ликсо-гексулозоновую кислоту.

Для установления типов замещения моносахаридных остатков полисахарид переводили в кислотную форму удалением катионов (работкой катионитом КУ-2 в  $H^+$ -форме, метилировали в условиях Хакомори [8], метилированный полисахарид расщепляли 2 М трифторуксусной кислотой и восстанавливали натрийборгидридом. В результате с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде *O*-ацетильных производных были идентифицированы 2,3-ди-*O*-метилфуцитол и 2,3,6-три-*O*-метилглюцитол. Частично метилированные производные гексулозоновой кислоты при этом обнаружены не были. Для их идентификации метилированный полисахарид был восстановлен боргидридом лития, расщеплен в мягких условиях (0,05 М трифторуксусной кислотой), и в результате последующего анализа была обнаружена смесь *O*-ацетильных производных двух эпимерных 3,4-ди-*O*-метилгекситолов. Из этих данных следовало, что все остатки фукозы и глюкозы замещены в положении 4, а остатки гексулозоновой кислоты — в положении 5 (в случае ее пиранозной формы) или 6 (в случае фуранозной формы). Таким образом, полисахарид является линейным.

Для получения олигосахаридных фрагментов полисахарида была использована кислотолабильность гликозидной связи остатков гексулозоновой кислоты. Кислотная форма полисахарида, полученная удалением катионов обработкой выделенного препарата катионитом в  $H^+$ -форме, легко претерпевала автогидролиз (рН 2,4; 100°С, 2 ч), в результате которого образовались кислые олигосахариды (III) и (IV), разделенные геле-хроматографией на геле TSK HW40.

В  $^{13}C$ -ЯМР-спектрах олигосахаридов (III) и (IV) присутствовало по две серии сигналов (основная и минорная), отвечающие двум аномерным формам находящегося на восстанавливаемом конце остатка гексулозоновой кислоты (табл. 1). Соответственно этому две линии резонанса давал атом C1 присоединенного к нему альдопиранозидного остатка (102,4 и 102,7 м.д. в спектре олигосахаридов (III) и 98,1 и 99,4 м.д. в спектре олигосахаридов (IV)). Спектр олигосахаридов (IV) не содержал сигналов других аномерных атомов углерода. Таким образом, он представляет собой дисахарид. В спектре олигосахаридов (III) присутствовал сигнал еще одного аномерного углеродного атома при 100,7 м.д.; следовательно, он является трисахаридом. Общее число сигналов в спектрах обоих олигосахаридов соответствовало этому выводу. Кислотный гидролиз дисахаридов (IV) привел к фукозе; таким образом, этот дисахарид представляет собой фукозилгексулозоновую кислоту. В гидролизате трисахаридов (III) были обнаружены глюкоза и фукоза примерно в равном количестве; следовательно, кроме находящегося на восстанавливаемом конце остатка гексулозоновой кислоты он содержит по одному остатку фукозы и глюкозы.

Для структурного анализа олигосахаридов (III) и (IV) была использована  $^1H$ -ЯМР-спектроскопия. Спектр преобладающей формы трисахаридов (III) был расшифрован с использованием селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 2). Константы спин-спиновой взаимодействия  $J_{3,4}$  3,3 Гц,  $J_{4,5}$  9,5 Гц и  $J_{5,6a}$  10 Гц протонов остатка гексулозоновой кислоты указывали на то, что он находится в пиранозной форме и преимущественно имеет конформацию  $^5C_2$ , а также доказывали аксиальную ориентацию протона H3 и экваториальную ориентацию протонов H4 и H5, что подтверждало его *ликсо*-конфигурацию. Константы  $J_{1,2}$  3,7 и 8,3 Гц остатков фукопиранозы и глюкопиранозы соответственно свидетельствовали об  $\alpha$ -конфигурации первого из этих моносахаридов и  $\beta$ -конфигурации второго. Предоблучение протона H1 остатка фукозы при 4,99 м.д. приводило к возникновению ядерного эффекта Оверхаузера (~9%) на H4 остатка глюкозы, резонирующем при 3,56 м.д. Предоблучение H1 этого остатка глюкозы при 4,60 м.д. вызывало ЯЭО на H5 и H6e (в сумме ~9%) остатка гексулозоновой кислоты, резонирующих при 4,13 и 4,07 м.д. соответственно. Эти данные определяли последовательность моносахаридных остатков и подтверждали места их замещения в трисахариде (III), который, таким образом, имеет строение, приведенное на схеме.

Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Звено А (Fuc)						
Полисахарид	100,7	69,8	71,6 <sup>a</sup>	77,5	68,7 <sup>б</sup>	16,6
Трисахарид (III)	100,7	69,4	70,8	73,2	68,3	16,5
Трисахарид (II)	100,7	69,4	70,8	73,2	68,4	16,5
Fuc( $\alpha$ )-OMe [9]	100,5	69,0	70,6	72,9	67,5	16,5
Звено Б (Glc)						
Полисахарид	102,4	74,5	75,5	78,3	76,5	61,3
Трисахарид (III)	102,4	74,6	75,7	78,6	76,6	61,5
	102,7*					
Трисахарид (II)	102,4	74,6	75,7	78,7	76,6	61,5
Звено В (HexU или Tag)						
Полисахарид	172,4 <sup>b</sup>	101,7	70,2 <sup>r</sup>	72,6 <sup>а</sup>	74,7	64,1 <sup>e</sup>
Трисахарид (III)	$\alpha$ 175,7	97,8	70,3	72,4	75,2	61,9
	$\beta$		67,3	70,9	78,0	60,2
Трисахарид (II)	$\alpha$ 65,2	99,1	70,7	71,2	75,7	61,5
Моносахарид (I)	$\alpha$ 176,0	98,0	71,8	72,3	67,1	63,9
	$\beta$		67,8	70,6	69,4	62,2
Тагатоza **	$\alpha$ 65,5	99,7	71,4	72,5	67,9	63,7
	$\beta$ 65,1	99,7	65,3	71,4	70,8	61,6
Звено Г (Fuc)						
Полисахарид	98,4	69,8	71,7 <sup>a</sup>	77,5	68,5 <sup>б</sup>	16,6
Дисахарид (IV)	98,1	69,0	70,5	73,0	68,0	16,4
	99,4*					
Звено Д (HexU)						
Полисахарид	172,3 <sup>a</sup>	101,7	69,8 <sup>r</sup>	73,0 <sup>а</sup>	73,3	63,8 <sup>e</sup>
Дисахарид (IV)	$\alpha$ 175,4	98,1	70,4	72,6	73,3	61,4
	$\beta$		67,5	70,9	76,8	59,5

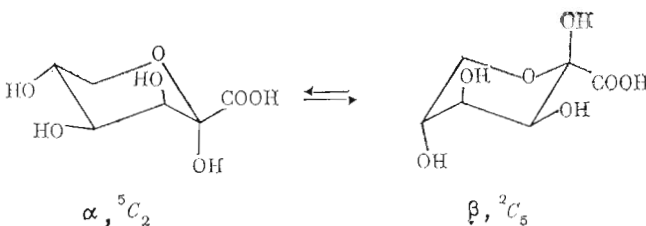
\* Химический сдвиг в дисахариде с  $\beta$ -конфигурацией остатка *ликто-гексулозоновой кислоты*.

\*\* Химические сдвиги определены в настоящей работе, отнесение сделано по данным работы [10].

— e Отнесение сигналов может быть обратным.

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре дисахарида (IV) с помощью двойного гомоядерного резонанса были отнесены сигналы обеих форм, различающихся конфигурацией аномерного центра остатка гексулозоновой кислоты (табл. 3). Константы спин-спинового взаимодействия протонов преимущественной формы гексулозоновой кислоты были близки соответствующим константам в трисахариде (III) и указывали на ее пиранозный цикл и конформацию  $^5\text{C}_2$ . Константы  $J_{3,4}$  3,6,  $J_{4,5}$  4,  $J_{5,6\alpha}$  2,5 и  $J_{5,6\beta}$  2,2 Гц протонов присутствующей в меньшем количестве формы гексулозоновой кислоты заметно отличались от соответствующих констант в преимущественной форме и свидетельствовали о ее конформации  $^2\text{C}_5$ . Имевшая здесь место инверсия цикла при аномеризации (схема 2), характерная также для тагатозы [11], объясняется энергетической предпочтительностью конформации с экваториальной ориентацией объемистой карбоксильной группы.

Схема 2



В соответствии с этим находящаяся в конформации  ${}^5C_2$  преимущественная форма имеет  $\alpha$ -конфигурацию аномерного центра, а вторая форма, находящаяся в конформации  ${}^2C_5$ , является  $\beta$ -аномером. Константа  $J_{1,2}$  4,0 Гц протонов остатка фукопиранозы указывала на  $\alpha$ -конфигурацию этого остатка; следовательно, дисахарид (IV) имеет строение, приведенное на схеме.

Строение олигосахаридов (III) и (IV) согласовывалось с данными их

Таблица 2

Данные  ${}^1H$ -ЯМР-спектра трисахарид (III) \*

Протон	Химический сдвиг, м. д.	Мультиплетность	Константа спин-спинового взаимодействия, Гц
Звено А (Fuc $\alpha$ )			
H1	4,99	д	$J_{1,2}$ 3,7
H2	3,84	дд	$J_{2,3}$ 10,5
H3	3,91	дд	$J_{3,4}$ 3,1
H4	3,87	дд	$J_{4,5} < 1$
H5	4,43	дк	$J_{5,6}$ 6,6
H6 (3H)	1,24	д	
Звено Б (Glc $\beta$ )			
H1	4,60	д	$J_{1,2}$ 8,3
H2	3,36	дд	$J_{2,3}$ 9,1
H3	3,66	т	$J_{3,4} \sim 9$
H4	3,56	т	$J_{4,5} \sim 9,5$
H5	3,63	м	
Звено В (HexU $\alpha$ )			
H3	4,19	д	$J_{3,4}$ 3,3
H4	4,03	дд	$J_{4,5}$ 9,5
H5	4,14	дт	$J_{5,6a} \sim 10$
H6 $a$	3,76	т	$J_{6a,6e} \sim 10,5$
H6 $e$	4,07	дд	$J_{5,6e}$ 4,6

\* Приведены данные для основной серии сигналов, относящейся к трисахариду с остатком  $\alpha$ -гексулозоновой кислоты.

Таблица 3

Данные  ${}^1H$ -ЯМР-спектра дисахарид (IV)

Протон	Химический сдвиг, м. д.	Мультиплетность	Константа спин-спинового взаимодействия, Гц
Звено Г (Fuc $\alpha$ ) *			
H1	4,97 (5,02)	д	$J_{1,2}$ 4,0
H2	3,75 (3,75)	дд	$J_{2,3}$ 10,5
H3	3,88 (3,88)	дд	$J_{3,4}$ 3,0
H4	3,81 (3,80)	дд	$J_{4,5} < 1$
H5	4,27 (4,14)	дк	$J_{5,6}$ 6,6
H6 (3H)	1,20 (1,21)	д	
Звено Д (HexU $\alpha$ )			
H3	4,07	д	$J_{3,4}$ 3,1
H4, H5, H6 $e$	3,89-4,00	м	
H6 $a$	3,65	т	$J_{5,6} \approx J_{6a,6e} \sim 10$
Звено Д (HexU $\beta$ )			
H3	4,19	д	$J_{3,4}$ 3,6
H4	4,05	т	$J_{4,5} \sim 4$
H5	3,93	м	$J_{5,6a}$ 2,5
H6 $a$	3,68	дд	$J_{6a,6e}$ 13,1
H6 $e$	4,12	дд	$J_{5,6e}$ 2,2

\* В скобках приведены химические сдвиги для дисахарид с остатком  $\beta$ -гексулозоновой кислоты.



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров (табл. 1), которые были расшифрованы с помощью селективного гетероядерного двойного резонанса  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , а также с учетом различных интенсивностей сигналов альдопиранозидных остатков и двух аномерных форм гексулозоновой кислоты и с использованием данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров метил- $\alpha$ -*L*-фукопиранозиды [9] и тагатозы [10] (для отнесения минорных серий сигналов остатка гексулозоновой кислоты). В результате этой расшифровки стало возможным также отнесение сигналов  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиранозных форм в спектре моносахарида (I).

Сравнение  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров (табл. 1) трисахариды (III) и олигосахариды (II), полученного при мягком кислотном гидролизе восстановленного полисахарида (см. выше), показало, что они отличаются друг от друга только моносахаридным остатком, находящимся на восстанавливаемом конце, который представлен в трисахариде (II) тагатозой. Так, в спектре трисахариды (II) появился сигнал C1 остатка тагатозы при 65,2 м. д. и произошло некоторое смещение других сигналов основной серии, принадлежащих восстанавливаемому остатку кетосахара (выделить сигналы минорной серии этого остатка в спектре (II) было затруднительно), тогда как положение сигналов остатков фукозы и глюкозы практически не изменилось.

Из строения олигосахаридов (III) и (IV) следовало, что их образование действительно является результатом избирательного гидролитического расщепления полисахарида по гликозидным связям остатков гексулозоновой кислоты. Получение этих олигосахаридов подтверждало также присутствие в повторяющемся звене полисахарида двух остатков этого кетосахара. Учитывая линейный характер исходного полимера, структуры олигосахаридов (III) и (IV) однозначно определяли последовательность моносахаридных остатков в полисахарида. Таким образом, невыясненной оставалась только конфигурация гликозидных связей остатков гексулозоновой кислоты.

Анализ  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида (табл. 1) показал, что в нем отсутствуют сигналы в областях 67–68 и 76–78 м. д., которые могли бы быть отнесены соответственно к C3- и C5-атомам остатка  $\beta$ -гексулозоновой кислоты. Действительно, наиболее близкие к первой области сигналы при 68,5 и 68,7 м. д. должны быть отнесены к C5 двух остатков  $\alpha$ -фукозы, а четыре сигнала во второй области принадлежат C4 и C5 остатка  $\beta$ -глюкозы (ср. с данными спектра трисахариды (III)) и C4 двух остатков  $\alpha$ -фукозы (последние смещены в слабое поле по сравнению с их положением в спектрах олигосахаридов (III) и (IV) за счет  $\alpha$ -эффектов гликозилрования по O4). В то же время в спектре полисахарида присутствуют все сигналы, характерные для двух остатков  $\alpha$ -гексулозоновой кислоты, в том числе сигналы C3 при 69,8 и 70,2 м. д. и C5 при 73,3 и 74,7 м. д. (ср. с данными спектров олигосахаридов (III) и (IV)). Следовательно, оба остатка гексулозоновой кислоты присоединены  $\alpha$ -гликозидными связями.

Таким образом, для повторяющегося звена полисахарида может быть предложена структура, приведенная на схеме. Эта структура хорошо согласуется с результатами расшифровки  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида, которая была проведена путем сравнения со спектрами олигосахаридов (III) и (IV) с учетом замещения остатков фукозы в положении 4.

Обращает на себя внимание заметно более слабopольное положение сигналов C6 остатков гексулозоновой кислоты в спектре полисахарида при 63,8 и 64,1 м. д. по сравнению с их положением в спектрах олигосахаридов (III) и (IV) при 61,4 и 61,9 м. д. соответственно. Рассмотрение молекулярной модели показывает, что в преимущественном конформере [12] дисахаридного фрагмента  $\alpha$ -*D*-HexpU-(2 $\rightarrow$ 4)-*L*-Fucp протоны метильной группы (H6) остатка фукозы пространственно сближены с протонами H6 остатка гексулозоновой кислоты. В соответствии с правилом альтерации [13] взаимодействие протонов, находящихся при разделенных шестью связями углеродных атомах, может вызывать слабopольный сдвиг положения резонанса одного или обоих этих атомов, что наиболее вероятно и является причиной смещения в слабое поле сигналов C6 остатков кето-

сахара в спектре полисахарида. Это смещение подтверждает  $\alpha$ -конфигурацию остатков гексулозоновой кислоты, так как в случае их  $\beta$ -конфигурации указанное межзвеньевое пространственное взаимодействие в преимущественном конформере соответствующего дисахаридного фрагмента и, как следствие, столь значительное изменение химических сдвигов сигналов C6 было бы невозможно.

Межзвеньевым протон-протонным взаимодействием объясняется также смещение в сильное поле на 2–2,7 м. д. сигнала C6 каждого аномера гексулозоновой кислоты при переходе от спектра моносахарида (I) к спектрам олигосахаридов (III) и (IV) ( $\beta$ -эффект гликозилирования). Действительно, в преимущественных конформерах [12] дисахаридных фрагментов  $\beta$ -D-Glcp-(1→5)- $\alpha$ -D-HexpU и  $\alpha$ -L-Fucp-(1→5)- $\alpha$ -D-HexpU протоны H1 остатков глюкозы и фукозы оказываются пространственно сближенными с протоном H6e остатка гексулозоновой кислоты, что было подтверждено для первого из этих фрагментов обнаружением ядерного эффекта Оверхаузера на протоне H6e остатка кетосахара при предоблучении H1 остатка глюкозы в трисахариде (III) (см. выше). Аналогичное межзвеньевое протон-протонное взаимодействие было продемонстрировано расчетом по методу твердых сфер и экспериментами по ядерному эффекту Оверхаузера [14] для дисахарида  $\beta$ -D-Glcp-(1→4)-D-Xylp, у которого фрагмент C3–C5 остатка ксилопиранозы гомоморфен фрагменту C4–C6 остатка  $\alpha$ -ликто-гексулозоновой кислоты. В соответствии с правилом альтераций [13] взаимодействие протонов при 1,4-углеродах (атомы углерода, разделенные тремя связями) вызывает сильнополюсный сдвиг сигналов этих углеродных атомов. Этим и объясняется относительно большой по абсолютной величине  $\beta$ -эффект гликозилирования на C6 гексулозоновой кислоты, а также относительно сильнополюсное положение резонансов C1 остатков глюкозы и фукозы в олигосахаридах (III) и (IV): эффекты от образования гликозидных связей этими моносахаридами составляют ~5 м. д., тогда как, если бы протон-протонные взаимодействия при 1,4-углеродах отсутствовали, они равнялись бы 7–8 м. д. [15].

Существенно, что в преимущественных конформерах [12] рассмотренных дисахаридных фрагментов межзвеньевые пространственные взаимодействия протонов при 1,4-углеродах и, как следствие, сильнополюсные смещения сигналов этих углеродных атомов возможны только при D-конфигурации гликозилируемого сахара. Таким образом, абсолютная конфигурация гексулозоновой кислоты находит независимое подтверждение. К такому же выводу приводит и рассмотрение тех же дисахаридных фрагментов с остатком  $\beta$ -гексулозоновой кислоты, находящимся в конформации  ${}^2C_5$ . В этом случае дополнительным подтверждением D-конфигурации кетосахара служит отсутствие сильнополюсного смещения его сигнала C4 в спектрах олигосахаридов (III) и (IV) по сравнению со спектром  $\beta$ -аномера (I), которое имело бы место вследствие взаимодействия протонов H1 остатков глюкозы и фукозы с экваториальным протоном H4 остатка гексулозоновой кислоты в случае ее L-конфигурации\*.

В заключение отметим, что входящая в состав изученного полисахарида D-ликто-гексулозоновая кислота, по нашим данным, в природных углеводах ранее найдена не была. Среди моносахаридов этого класса описаны лишь одичленные случаи обнаружения D-арабино-изомера (2-кетоглюконовой кислоты), как, например, во внеклеточном полисахариде бактерии *Rhizobium japonicum* [16].

### Экспериментальная часть

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в D<sub>2</sub>O при 30° С, внутренний стандарт — ацетон,  $\delta_H$  2,23 м. д., эксперименты по ЯЭО проводили как описано [17]. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 в D<sub>2</sub>O при 70° С

\* Обобщение результатов исследования связи эффектов гликозилирования в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрах различных дисахаридов с межзвеньевыми пространственными протон-протонными взаимодействиями и возможности использования этих эффектов для определения абсолютных конфигураций моносахаридов будет сделано в отдельном сообщении.



для полисахаридов и 30°С для моносахаридов и олигосахаридов, внутренний стандарт — ацетон,  $d_s$  31,45 м. д. Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20°С.

БХ выполнена на бумаге Whatman 3ММ в системе пиридин — бутанол — вода (6:4:3). Электрофорез на бумаге FN-11 проводили в 0,025 М пиридин эцетатном буфере, рН 4,5, при 28 В/см. Вещества обнаруживали на бумаге с помощью щелочного нитрата серебра; в случае полисахарида предварительно проводили обработку периодатом натрия. Гель-хроматография проведена на колонке (1,5×50 см) с гелем Sephacryl S300 (Pharmacia) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 6,5; выходные кривые построены с помощью дифференциального рефрактометра Кнауер. Идентификацию моносахаридов проводили с помощью углеводного анализатора Technicon (США) на колонке (0,4×15 см) с анионитом Durgum DA×4 в 0,7 М натрий-боратном буфере, рН 7, при 55°С [18]. ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрия выполнены как описано ранее [17].

*Выращивание бактерий и выделение полисахарида.* Культуру *Rhodococcus* sp. С13-6 выращивали при 28°С на качалке (220 об/мин) в колбах объемом 750 мл со 150 мл среды следующего состава (г/л): глюкоза — 10, глицерин — 39, дрожжевой экстракт — 2, пептон — 2, NaCl — 2,5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O — 2,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,5, CaCO<sub>3</sub> — 5,0. Через 4–5 сут подкисляли 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до рН 3–4, встряхивали 1,5–2 ч на качалке, нейтрализовали 2 н. NaOH, клетки отделяли центрифугированием при 9000 об/мин (1 ч), культуральную жидкость депротеинизировали обработкой хлороформом по методу [3], диализовали 2 сут против водопроводной воды, полисахарид осаждали цетавином и выделяли по методу [19].

*Определение моносахаридного состава.* Полисахарид гидролизовали 2 М соляной кислотой (100°С, 3 ч) и гидролизат упаривали. В аналитическом варианте (2 мг) исследовали с помощью БХ, ГЖХ в виде ацетатов полиолов и с помощью углеводного анализатора. В препаративном варианте (100 мг) с помощью БХ выделили L-фукозу,  $[\alpha]_D -62^\circ$  (с 0,4) ([20]:  $-75^\circ$  (вода)), и D-глюкозу,  $[\alpha]_D +25^\circ$  (с 0,3) ([21]:  $+52^\circ$  (вода)). Полисахарид (100 мг) гидролизовали разбавленной соляной кислотой (рН 1; 100°С, 3 ч), упаривали, продукты разделяли ионообменной хроматографией на катионите Dowex 1×4 (100–200 меш, колонка, 1,5×20 см) в линейном градиенте водной уксусной кислоты (0–30%), анализируя фракции с помощью электрофореза на бумаге. Выделили 8 мг кислоты (I), которую восстанавливали бордейтеридом натрия в воде, обрабатывали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>-форма), упаривали, упаривали несколько раз с метанолом, растворяли в метаноле, прибавляли раствор диазометана в эфире до устойчивой желтой окраски, выдерживали 20 мин, упаривали остаток в воде (1 мл), восстанавливали бордейтеридом натрия (20 мг, 20°С, 2 ч), ацетилировали как обычно; исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией.

*Восстановление полисахарида; трисахарид [II].* Полисахарид (100 мг) восстанавливали по методу [7], восстановленный полисахарид выделяли гель-хроматографией на геле TSK HW40, гидролизовали 1% уксусной кислотой (2 ч, 100°С), упаривали, продукт разделяли ионообменной хроматографией на колонке (0,4×15 см) с анионитом Durgum DA×4 в 0,5 М натрий-боратном буфере, рН 9, обрабатывали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>-форма), упаривали остаток несколько раз с метанолом, гель-хроматографией на геле TSK HW40 выделили нейтральный олигосахарид (II), который гидролизовали 0,5 М трифторуксусной кислотой (100°С, 1 ч) и исследовали с помощью углеводного анализатора.

*Частичный гидролиз полисахарида; олигосахариды (III) и (IV).* Полисахарид (100 мг) обрабатывали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>-форма) в 100 мл воды, смолу удаляли, раствор нагревали на кипящей водяной бане (2 ч), упаривали, гель-хроматографией на геле TSK HW40 выделяли трисахарид (III),  $[\alpha]_D -96^\circ$  (с 0,4), и дисахарид (IV),  $[\alpha]_D -32^\circ$  (с 0,4).

*Анализ методом метилирования* проводили по методу Хакомори [8] с использованием полисахарида, обработанного катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>-форма). Для идентификации производных глюкозы и фукозы часть метилированного полисахарида гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (1 ч, 120°С), сахара превращали в ацетаты полиолов и исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией с использованием данных работы [22]. Для идентификации производных гексозооновой кислоты другую часть метилированного полисахарида восстанавливали избытком боргидрида лития в 70% водном изопропаноле (2 ч, 20°С), подкисляли, продукты выделяли с использованием патрона Sep-Pак С18 по методу [23]: гидролизовали 0,05 М трифторуксусной кислотой (1 ч, 100°С), анализировали как описано выше.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабьева И. П., Горин С. Е. // Почвенные дрожжи. М.: МГУ, 1987. С. 30–34.
2. Ботвинко И. В. // Успехи микробиол. 1985. Т. 20. С. 79–122.
3. Sevag M. G. // Biochem. Z. 1934. В. 273. № 2. S. 419–429.
4. Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504–2511.
5. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
6. Beil. IV. В 3(3). S. 1986–1989.
7. Taylor R. L., Shively J. E., Conrad H. E. // Methods Carbohydr. Chem. 1976. V. 7. P. 149–151.
8. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–279.

9. Gorin P. A. J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 8. P. 1212–1223.
10. Que L., Gray G. R. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 1. P. 146–153.
11. Стoddарт Дж. // Стереохимия углеводов. М.: Мир, 1975.
12. Lemieux R. U., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 6. P. 634–653.
13. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173–185.
14. Keller R. M., Wüthrich K. // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1–52.
15. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Y. A., Kochetkov N. K. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26.
16. Rajgopal S. N., Rat P. V. // Ind. J. Exp. Biol. 1986. V. 24. № 11. P. 710–713.
17. Кириель Ю. А., Здорovenko Г. М., Дашунии В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253–1262.
18. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 66. № 3. P. 559–566.
19. Скотт Дж. Е. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 288–293.
20. Beil. IV. B. 31. S. 78.
21. Beil. IV. B. 31. S. 83.
22. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. // Chem. Commun. Univ. Stockholm. 1976. № 8. P. 1–75.
23. Mort A. J., Parker S., Mao-Sung-Kuo // Anal. Biochem. 1983. V. 133. № 2. P. 380–384.

Поступила в редакцию  
12.IV.1988

### STRUCTURE OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *Rhodococcus* sp. CONTAINING *D*-lyxo-HEXULOSONIC ACID

VINOGRADOV E. V., KNIREL Y. A., SHASHKOV A. S., GORIN S. E. \*,  
VUSTINA T. F. \*, SOYFER V. S. \*, ESIPOV S. E. \*, LISAK L. V. \*,  
KOCHETKOV N. K.

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

\* *Institute of Antibiotics, Minmedmikrobioprom, Moscow*

Exopolysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. has a regular structure with a pentasaccharide repeating unit containing two residues of *D*-lyxo-hexulosonic acid (HexU), the sugar not found previously in polysaccharides:

$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-HexpU-(2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-HexpU-(2 $\rightarrow$  The novel sugar was isolated and identified via its reduction into a mixture of galactitol and talitol or into tagatose, and by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis. The repeating unit structure was established by methylation analysis and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR study of the polysaccharide and di- and trisaccharide derived from the polymer by autohydrolysis, which splits highly acid-labile glycosidic linkages of the hexulosonic acid.