



УДК 577.114.5 : 579.841.11 : 543.422.23

© 1993 Е. Л. Назаренко, Р. П. Горшкова,
В. А. Зубков, А. С. Шашков*, Е. П. Иванова,
Ю. С. Оводов

СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА КИСЛОГО ПОЛИСАХАРИДА
Alteromonas sp. 4MC17

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Кислый полисахарид *Alteromonas* sp. 4MC17 построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих остатки *D*-глюкозы, *D*-маннозы и *D*-галактуроновой кислоты. На основании данных метилирования, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, включая двумерную гомоядерную корреляционную спектроскопию, а также ЯЭО, установлена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:



Настоящая работа продолжает структурное исследование полисахаридов рода *Alteromonas* [1] и посвящена установлению строения кислого полисахарида *Alteromonas* sp. 4MC17.

Полисахарид выделен как в работе [1] и очищен ионообменной хроматографией на геле DEAE TSK 650M. При этом полисахарид элюируется при высокой концентрации соли, что указывает на его кислый характер ($[\alpha]_D +9^\circ$, вода).

В гидролизате полисахарида с помощью БХ, ГЖХ в виде ацетатов полиолов и высоковольтного электрофореза на бумаге идентифицированы глюкоза, манноза и галактуроновая кислота. Все три моносахарида выделены в индивидуальном виде препаративной БХ и электрофорезом, и на основании величин удельного оптического вращения установлено, что все они имеют *D*-конфигурацию.

¹³C-ЯМР-спектр полисахарида (табл. 1, рис. 1) указывает на регулярный характер и трисахаридный размер его повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы трех аномерных атомов углерода при 104,7, 104,2 и 101,5 м.д., трех неаномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей, в области 78—80 м.д., одного слабopольного сигнала С=O-группы при 175,0 м.д., двух гидроксиметильных групп при 61,1 и 61,2 м.д. и девяти вторичных атомов углерода, связанных с кислородом, в области 72—77 м.д.

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{C-1,H-1}$, определенные из ¹³C-ЯМР-спектра, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, относительно невелики (порядка 160 Гц) для всех аномерных атомов, что указывает на β -конфигурацию всех гликозидных связей в полисахариде [2]. Величины КССВ свидетельствуют также о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц [3]).

Данные ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (хим. сдвиги в м.д.)*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 4$)- <i>D</i> -Glc α - β -(1 \rightarrow)	104,2	74,7	76,2	80,2	76,5	62,1
	104,9	74,4	75,6	79,9	75,9	61,3
$\rightarrow 4$)- <i>D</i> -Gal α - β -(1 \rightarrow)	104,7	72,6	75,1	80,5	75,8	175,0
	104,9	71,8	74,8	80,2	75,2	175,0
$\rightarrow 4$)- <i>D</i> -Man α - β -(1 \rightarrow)	101,5	72,2	73,3	78,2	76,7	62,2
	101,9	71,5	73,3	78,2	76,4	61,6

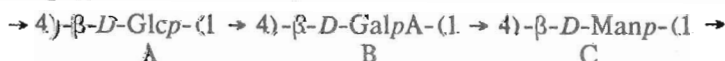
* В нижних строках приведены расчетные данные.

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде установлен методом метилирования [4]. С помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов идентифицирована 2,3,6-три-*O*-метилгексоза, что говорит о включении остатков обеих гексоз в полисахаридную цепь 1 \rightarrow 4-связью. Для выяснения типа замещения остатка *D*-галактуроновой кислоты смесь частично метилированных ацетатов полиолов была подвергнута мягкому метанолизу с последующим ацетилированием. В результате наряду с идентифицированным ранее производным гексоз обнаружен метиловый эфир 2,3,6-три-*O*-ацетил-4,5-ди-*O*-метилгексоновой кислоты, образовавшийся из частично метилированной *D*-галактуроновой кислоты; следовательно, остаток уроновой кислоты также замещен в положение 4.

Таким образом, на основании анализа моносахаридного состава, метилирования и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии можно сделать вывод о том, что полисахарид является линейным и построен из остатков *D*-глюкозы, *D*-маннозы и *D*-галактуроновой кислоты, соединенных β -1 \rightarrow 4-связями.

Для дальнейшего структурного анализа полисахарида использована ^1H -ЯМР-спектроскопия. Протонный спектр расшифрован с помощью двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY в сочетании с серией экспериментов гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [5]. После отнесения сигналов в спектре определены КССВ вицинальных протонов (табл. 2). На основании этих данных подтверждена пиранозная форма всех моносахаридных остатков и доказана β -конфигурация всех гликозидных связей в повторяющемся звене. Тип связей и последовательность моносахаридных остатков установлены в эксперименте с ЯЭО во вращающейся системе координат ROESY [6] (рис. 2). Как следует из рисунка, на координате химического сдвига аномерного протона остатка *D*-глюкозы (звено А) есть четыре пика, три из которых имеют химический сдвиг по второй координате, отвечающей протонам Н-2, Н-3 и Н-5 того же звена А, а четвертый соответствует протону Н-4 остатка *D*-галактуроновой кислоты (звено В). Аналогично, корреляционные пики остатка *D*-маннозы (звено С) лежат в координатах химических сдвигов протонов Н-1 и Н-2, Н-3 и Н-5 этого же остатка; четвертый пик находится на пересечении координат химических сдвигов Н-1 звена С и Н-4 звена А. И наконец, на координате химических сдвигов протонов Н-1 и Н-4 остатка *D*-галактуроновой кислоты (В) имеются корреляционные пики с протонами Н-3 и Н-5 того же звена и протона Н-1 звена В с Н-4 звена С. Приведенное описание спектра суммировано в табл. 3.

Таким образом, из эксперимента ROESY, с учетом всех приведенных выше результатов, однозначно следует структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas* sp. 4MC17:



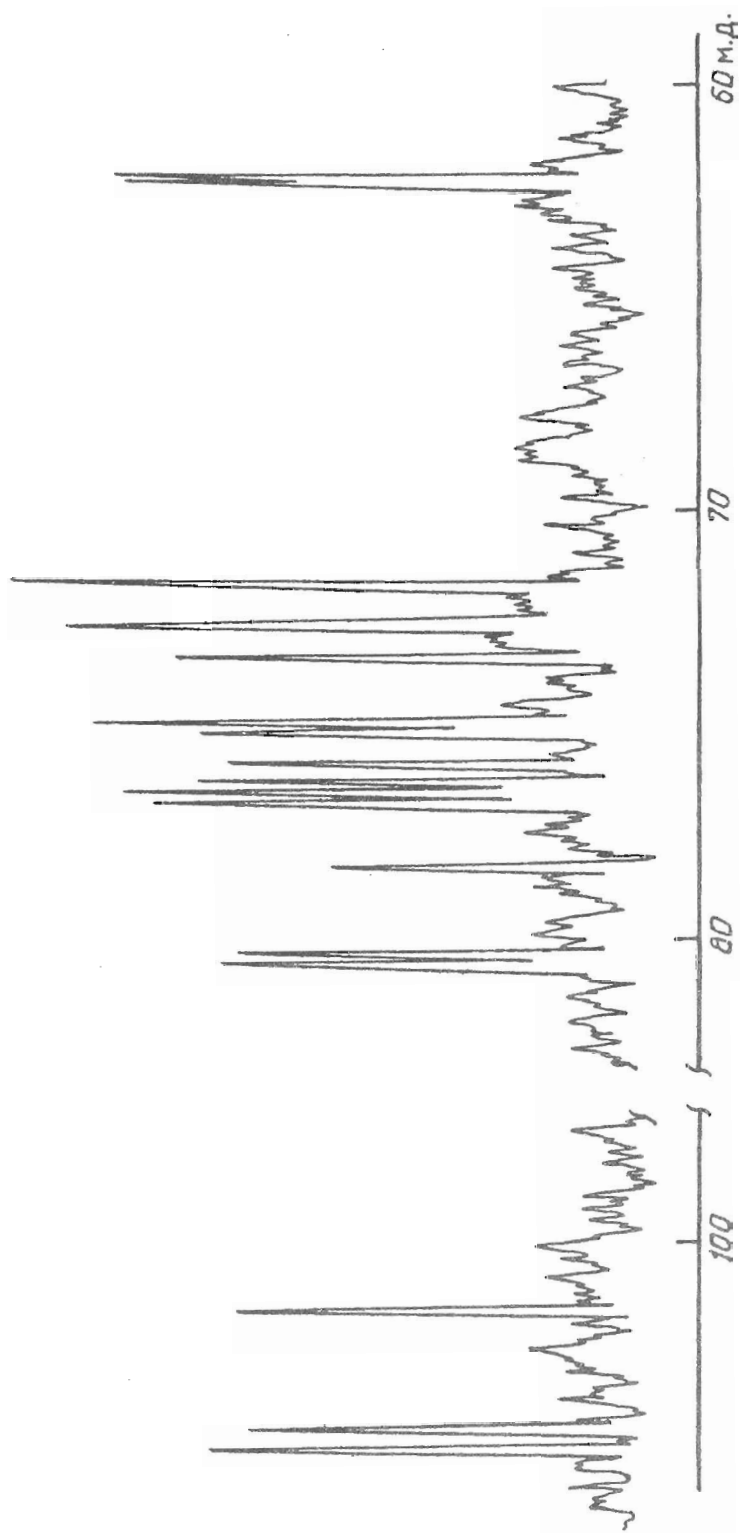


Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр полісахарида (область резонанса С-О-груп не приведена).

Данные ^1H -ЯМР-спектра полисахарида (хим. сдвиги в м.д.)

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
$\rightarrow 4$ -D-Glcp- β -(1 \rightarrow)	H1	4,63	д	$J_{1,2}$ 8,5
	H2	3,38	дд	$J_{2,3}$ 10,0
	H3	3,68	дд	$J_{3,4}$ 9,0
	H4	3,65	т	$J_{4,5}$ 10,0
	H5	3,48	м	$J_{5,6}$ 3,5
	H6a	3,85	дд	$J_{6a,6b}$ 13,0
	H6b	3,67	дд	
$\rightarrow 4$ -D-GalpA- β -(1 \rightarrow)	H1	4,44	д	$J_{1,2}$ 8,0
	H2	3,65	дд	$J_{2,3}$ 10,0
	H3	3,80	дд	$J_{3,4}$ 3,5
	H4	4,44	дд	$J_{4,5}$ 1,5
	H5	4,08	с	
$\rightarrow 4$ -D-Manp- β -(1 \rightarrow)	H1	4,75	с	
	H2	4,12	д	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,80	дд	$J_{3,4}$ 10,0
	H4	3,82	т	$J_{4,5}$ 10,0
	H5	3,56	м	$J_{5,6a}$ 3,0
	H6a	3,95	дд	$J_{6a,6b}$ 13,0
	H6b	3,83	дд	

Таблица 3

Данные спектра ROESY
(пояснения см. в тексте)

Протоны, на которых наблюдается ЯЭО	Аномерные протоны		
	1A	1B + 4B	1C
2A	+		
3A	+		
4A			+
5A	+		
3B		+	
4B	+		
5B		+	
2C			+
3C			+
4C		+	
5C			+

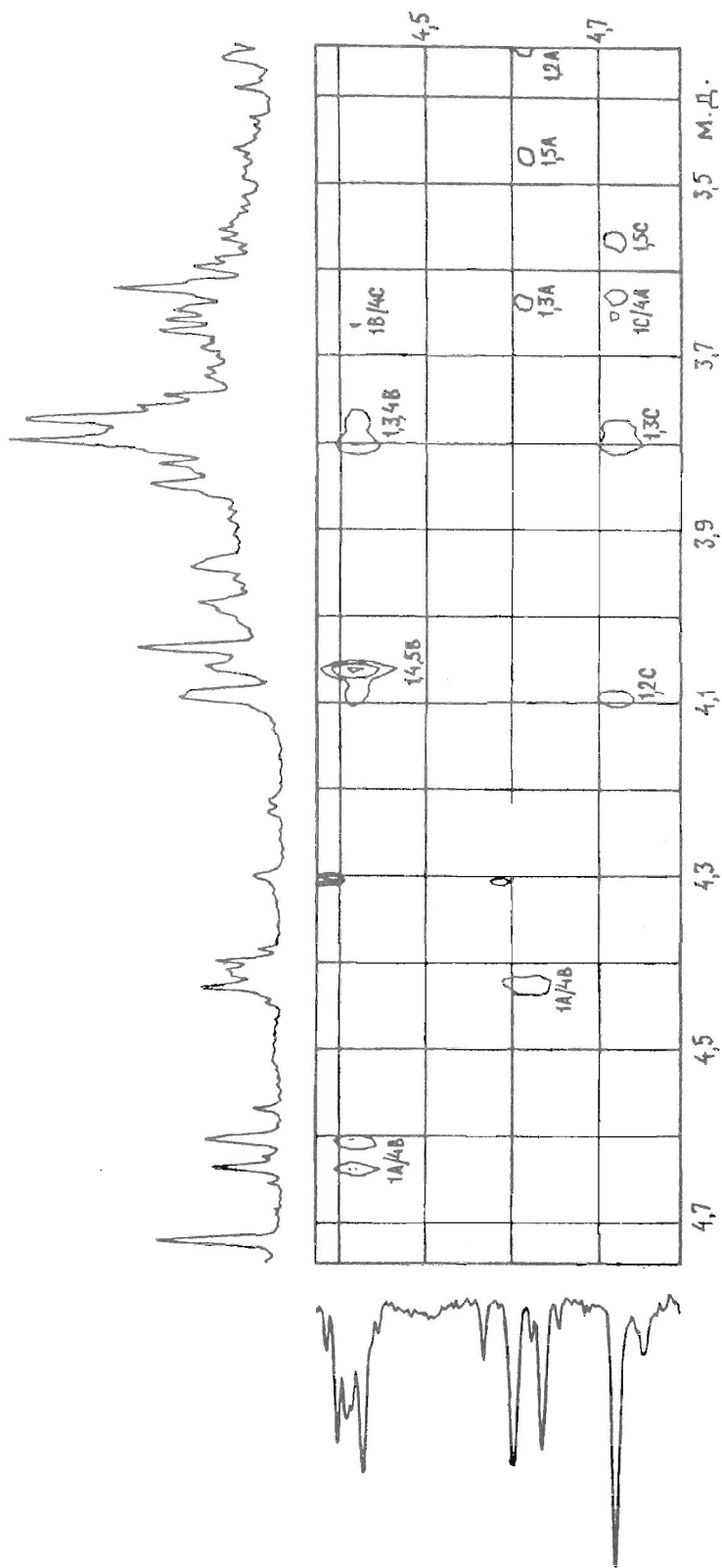


Рис. 2. ROESY-спектр полисахарида

Для подтверждения приведенной структуры проведен компьютерный расчет ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида по методу [7] (табл. 1). При этом расчетные химические сдвиги оказались близкими к экспериментальным (сумма квадратичных отклонений химических сдвигов углеродных атомов составила 1,5).

Экспериментальная часть

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 30°C . ^{13}C -ЯМР-спектр снят на спектрометре Bruker AM-300 в D_2O при 60°C . ЯЭО-спектры и двумерный гомоядерный корреляционный COSY-спектр получены как описано ранее [8].

Растворы лиофилизovali или упаривали в вакууме. Оптическое вращение измеряли на приборе Perkin — Elmer 141. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3MM в системе растворителей *n*-бутанол—пиридин—вода, 6 : 4 : 3; электрофорез на бумаге осуществляли в 0,25 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 10 В/см в течение 90 мин; моносахариды обнаруживали щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию проводили на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-50 в 0,3% уксусной кислоте, ионообменную хроматографию — на колонке (2,5×60 см) с гелем DEAE TSK 650M в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,0), кислый полисахарид элюировали 0,5 М NaCl в том же буфере. Элюионные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK 101 (ЧСФР). ГЖХ-анализ выполняли на приборе Pye Unicam 104 на колонке (0,4×150 см) с 3% QF-1 на Gas Chrom Q (100—120 меш) в интервале температур $175\rightarrow 225^\circ\text{C}$, газ-носитель — аргон. ГЖХ-МС проводили на приборе LKB 9000S на той же колонке.

Продуцирование биомассы микроорганизма и выделение полисахарида проводили как описано в работе [1].

Метилирование полисахарида осуществляли по методу Хакомори [4], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированный полисахарид выделяли с помощью патрона Sep Pak C_{18} (Waters), подвергали гидролизу 2 М трифторуксусной кислотой (120°C , 1 ч). Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-МС. Часть смеси частично метилированных ацетатов полиолов подвергали мягкому метанолизу 1 М HCl в метаноле (65°C , 30 мин), ацетиловали, анализировали ГЖХ-МС.

Полный кислотный гидролиз. Полисахарид (2 мг) гидролизovali 2 М трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100°C , 3 ч), гидролизат упаривали и анализировали БХ, электрофорезом и ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

В препаративном варианте гидролиза использовали 10 мг полисахарида и 2 мл кислоты; препаративной БХ выделили 2 мг *D*-глюкозы, $[\alpha]_{578}^{20} + 58^\circ$ (с 0,2, вода), 2 мг *D*-маннозы, $[\alpha]_{578}^{20} + 20^\circ$ (с 0,2, вода), препаративным электрофорезом на бумаге выделили 2 мг *D*-галактурановой кислоты, $[\alpha]_{578}^{20} + 47^\circ$ (с 0,2, вода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшкова Р. П., Назаренко Е. Л., Зубков В. А., Иванова Е. П., Оводов Ю. С., Шашков А. С., Кширель Ю. А.//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 327—336.
2. Bock K., Pedersen C.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293—297.
3. Cyr N., Perlín A. S.//Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504—2511.
4. Nakomori S.//J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
5. Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Pier G. B.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 23. P. 11291—11295.
6. Braunschweiler L., Ernst R. R.//J. Magn. Reson. 1983. V. 53. P. 521—528.

7. Кочетков Н. К., Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шашков А. С., Липкинд Г. М.//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 116—125.
8. Shashkov A. S., Vinogradov E. V., Daeva E. D., Knirel Y. A., Zdorovenko G. M., Gubanova N. Y., Yakovleva L. M., Zakharova I. Y.//Carbohydr. Res. 1991. V. 212. № 2. P. 301—305.

Поступила в редакцию
15.II.1993

*E. L. Nazarenko, R. P. Gorshkova, V. A. Zubkov,
A. S. Shashkov*, E. P. Ivanova, Yu. S. Ovodov*

STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF THE ACIDIC
POLYSACCHARIDE FROM

Alteromonas sp. 4MC17

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Far
East Division, Vladivostok;*

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

An acidic polysaccharide from *Alteromonas sp. 4MC17* is built up of trisaccharide repeating units containing *D*-glucose, *D*-mannose and *D*-galacturonic acid residues. On the basis of methylation studies, ¹H and ¹³C NMR-spectroscopy data, including two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy and nuclear Overhauser effects, the following structure was suggested for the polysaccharide repeating unit:

