



УДК 577.114.5:579.841.11:543.422.23

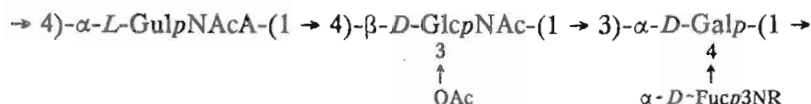
© 1993 Е. Л. Назаренко, В. А. Зубков,
А. С. Шашков*, Ю. А. Книрель*, Р. П. Горшкова,
Е. П. Иванова, Ю. С. Оводов

СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА КИСЛОГО ПОЛИСАХАРИДА *Alteromonas macleodii* 2ММ6

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

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

Кислый полисахарид *Alteromonas macleodii* 2ММ6 построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из остатков *D*-галактозы, 3-*O*-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*L*-гулуруновой кислоты и 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксибутирамидо)-*D*-галактозы. На основании данных моносакхаридного анализа, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, включая ЯЭО и одномерный эксперимент НОНАНА, установлена следующая структура повторяющегося звена кислого полисахарида:



где R: -CO-CH₂-CH₂-CH₂-OH

Данная работа посвящена дальнейшему структурному исследованию полисахаридов рода *Alteromonas* [1, 2]. В настоящем сообщении приведены результаты структурного анализа кислого полисахарида *A. macleodii* 2ММ6.

Полисахарид получен из биомассы микроорганизмов экстракцией водным фенолом и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой. При расщеплении полисахарида разбавленной уксусной кислотой с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 получены высокомолекулярная и в незначительном количестве низкомолекулярная фракции. Поскольку, по данным ¹³C-ЯМР-спектроскопии, исходный полисахарид и полученная из него высокомолекулярная фракция оказались практически идентичными, дальнейшая работа проведена с нативным полимером.

В гидролизате полисахарида с помощью БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы галактоза, глюкозамин и 3,6-дидезокси-3-аминогалактоза (3-аминофукоза). Все три моносакарида выделены в индивидуальном виде препаративной БХ, и на основании величин удельного оптического вращения установлено, что все они имеют *D*-конфигурацию.

Из низкомолекулярной фракции с помощью БХ выделен моносакхарид с R_{Gal} 1,35, который дополнительно очищен микропрепаративной ВЭЖХ. В его ¹H-ЯМР-спектре (табл. 1) наблюдаются три серии сигналов, две из которых принадлежат остаткам α- и β-3-амино-3,6-дидезокси-*D*-галактопиранозы, а третья отвечает 4-гидроксибутирильной группе: H2' при 2,37 м. д. (триплет, J_{2,3} 8,0 Гц),

Данные ЯМР-спектров 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксибутирамидо)-D-галактозы и 3,6-дидезокси-3-амино-D-галактозы (хим. сдвиги, м. д.: КСВВ, Гц)

Аномер	Атом С или Н									
	1	2	3	4	5	6	2'	3'	4'	
α -Fuc3NR*	Н	5,20 д	4,17 дд	3,72 дд	4,23 дк	1,17 д	2,37 г	1,85 м	3,62 г	
	Ј	3,5	3,5	2	6,5		8,0	7,0	7,0	
	С	92,7	67,0	51,8	71,4	67,2	16,5	33,3	28,7	61,8
α -Fuc3N	Н	5,18 д	3,55 дд	3,85 дд	4,19 дк	1,14 д				
	Ј	3,5	3,5	2	6,5					
	С	92,6	66,2	53,5	69,4	66,9	16,5			
β -Fuc3NR	Н	4,63 д	3,46 дд	3,93 дд	3,68 дд	3,87 дк	1,22 д	2,37 м	3,62 г	
	Ј	8,0	10,6	3,5	2	6,5	8,0	7,5	7,0	
	С	97,7	70,5	55,7	71,0	72,7	16,5	33,3	28,7	61,8
β -Fuc3N	Н	4,58 д	3,53 дд	3,35 дд	3,85 дд	3,88 дк	1,19 д			
	Ј	7,6	10,6	3,3	2	6,4				
	С	97,4	69,2	56,8	69,6	72,7	16,6			

* R = -CO-CH₂-CH₂-CH₂-OH.

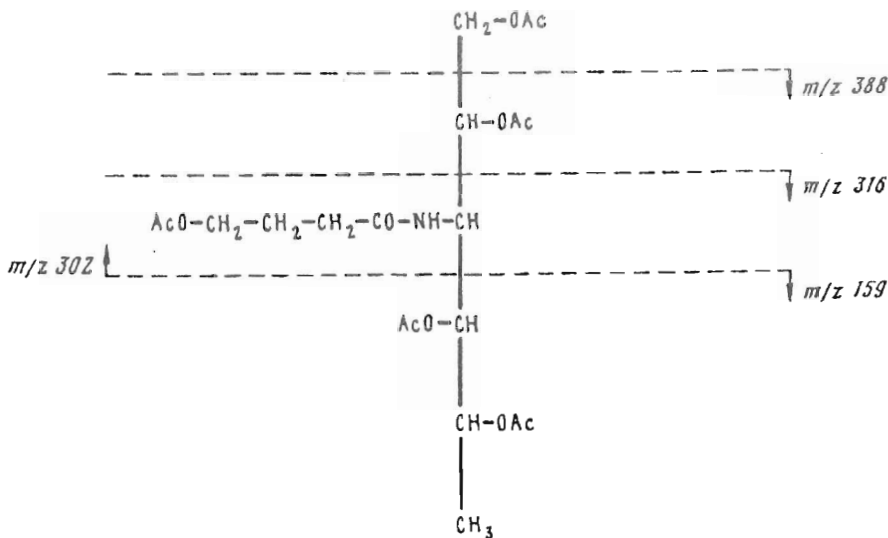


Рис. 1. Фрагментация под электронным ударом ацетата полиола 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксипутирамидо)-D-галактозы (первичные фрагменты)

H3' при 1,85 (мультиплет, $J_{3,4}$ 7,0 Гц) и H4' при 3,62 м. д. (триплет, $J_{3,4}$ 7,0 Гц). Эти данные подтверждены при анализе ^{13}C -ЯМР-спектра моносахарида (табл. 1), в котором наряду с сигналами α - и β -3-аминофукопиранозы присутствуют линии резонанса 4-гидроксипутирановой кислоты: C2' при 33,3 м. д., C3' при 28,7 и C4' при 61,8 м. д. Строение моносахарида подтверждено также ГЖХ-МС его ацетата полиола. Фрагментация этого производного под электронным ударом приведена на рис. 1. Таким образом, можно сделать вывод, что 3-аминосахар, входящий в состав полисахарида, ацилирован 4-гидроксипутирановой кислотой.

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2, табл. 2) указывает на регулярный характер молекулы и тетрасахаридный размер ее повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы 6-дезокси группы 3-аминофукозы при 16,7 м. д., O-ацетильной группы и двух ацетамидных групп. Сигналы при 29,0, 33,6, 62,1 и 175,2 м. д. принадлежат 4-гидроксипутирильному остатку. Из других характерных сигналов следует отметить линии резонанса трех атомов углерода, связанных с азотом, при 47,4, 52,0 и 55,7 м. д. и двух гидроксиметильных групп при 60,5 и 61,5 м. д. В слабом поле присутствует пять сигналов карбонильных групп в области 174,8—177,7 м. д., причем четыре из них принадлежат двум ацетамидным, O-ацетильной и 4-гидроксипутирильной группам. Наличие пятого слабополюсного сигнала, а также сигналов при 47,4 и 23,1 м. д. позволяет предположить присутствие в повторяющемся звене остатка аминокислоты. Результаты эксперимента по неселективному переносу поляризации [3] указывают на отсутствие в составе повторяющегося звена 1,6-связанных моносахаридных остатков.

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{\text{C,H}}$, определенные из ^{13}C -ЯМР-спектра, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, сравнительно велики (порядка 170 Гц) для сигналов аномерных атомов углерода при 99,7 (двойной интенсивности) и 97,5 м. д., которые принадлежат, таким образом, α -связанным моносахаридам. Относительно небольшая константа (163 Гц) для сигнала 103,2 м. д. свидетельствует о β -конфигурации соответствующего моносахарида [4]. Величины КССВ свидетельствуют также о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц [5]).

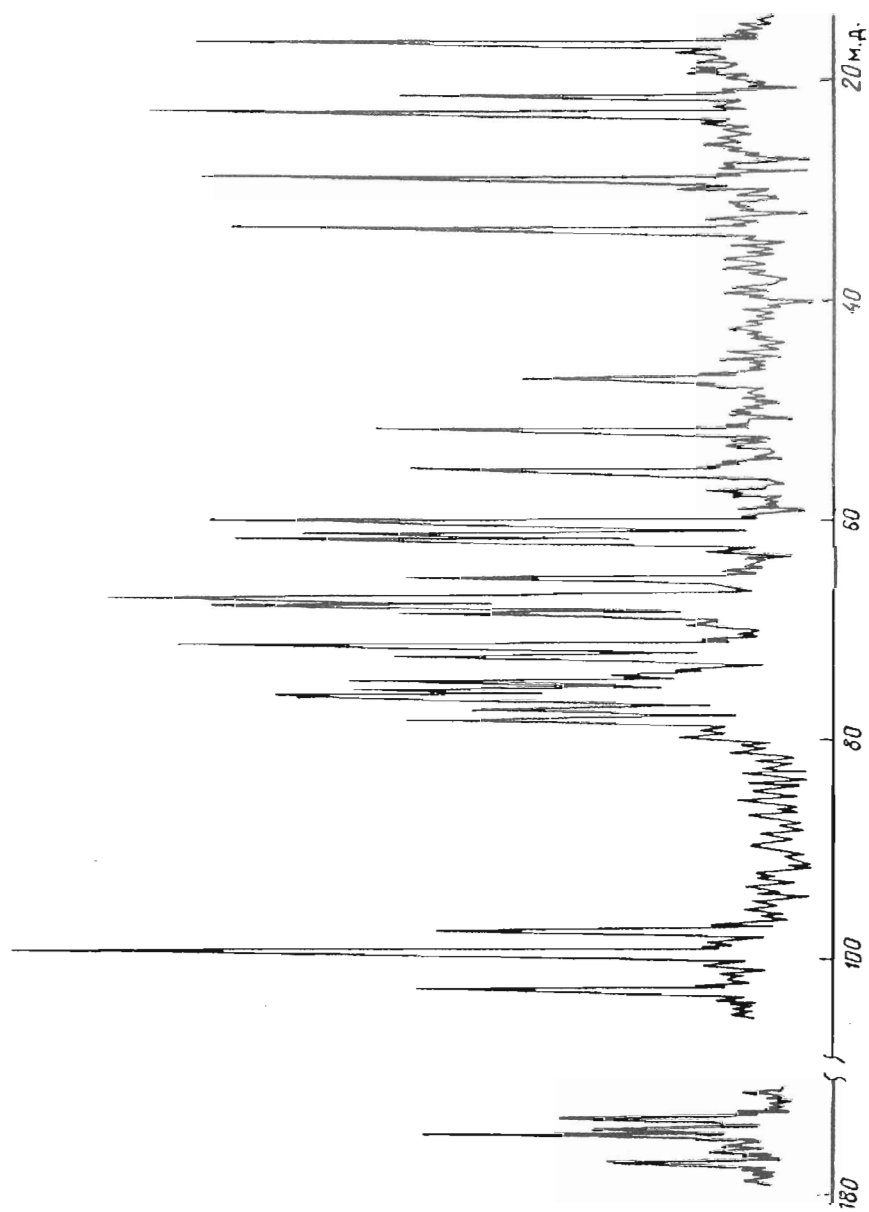


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида *A. masleodii* 2MM6

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

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A: $\rightarrow 4$ -L-GalpNAcA $^{\alpha}$ -(1 \rightarrow	99,7	47,4	65,8	75,0	68,2	177,7
B: $\rightarrow 4$ -D-GlcpNAc $^{\beta}$ -(1 \rightarrow	103,2	55,7	76,3	77,2	76,0	61,5
C: -3,4)-D-Galp- α -(1 \rightarrow	97,5	69,1	78,8	76,3	72,6	60,5
D: D-Fucp3N- α -(1 \rightarrow	99,7	67,7	52,0	71,9	68,2	16,7
-CO-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$ -OH	175,2	33,6	29,0	62,1		

* Сигналы N-ацетильных групп: CH $_3$ при 23,0 и 23,1 м. д., C=O при 173,8 и 174,8 м. д.

Для дальнейшего структурного анализа полисахарида использована ^1H -ЯМР-спектроскопия. Положение сигналов и величины КССВ определены в одномерном эксперименте НОНАНА [6]. Для двух сахаров, имеющих сигналы аномерных протонов при 4,88 и 4,95 м. д., химические сдвиги сигналов кольцевых протонов и их расщепление установлены в эксперименте с возбуждением аномерных протонов (рис. 3). При этом из величин КССВ следует, что моносахарид, имеющий сигнал аномерного протона при 4,95 м. д., является α -D-дезоксигалактозой, а по положению сигнала его H-3 (4,17 м. д.) можно сделать вывод о том, что в положении 3 находится N-ацильная группа. Согласно данным моносахаридного анализа, этим моносахаридом может быть только 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксипиридин-2-ил)-D-галактоза (звено D). Из величин КССВ следует также, что моносахарид с химическим сдвигом аномерного протона при 4,88 м. д. (звено B) имеет β -D-глюко-конфигурацию, а положение сигнала его H-3 в значительно более слабом поле (5,18 м. д.) по сравнению с обычным положением (3,56 м. д.) [7] может быть объяснено только дезэкранирующим влиянием O-ацетильной группы, которая находится, таким образом, в положении 3 этого моносахарида.

Ввиду совпадения сигналов аномерных протонов оставшихся двух моносахаридных остатков (5,08 м. д.) первоначально были определены положение и форма сигналов кольцевых протонов обоих остатков при возбуждении аномерных протонов, а затем при возбуждении хорошо разрешенных сигналов при 4,26, 4,38 и 4,59 м. д. При этом выделены две индивидуальные серии сигналов, относящихся к различным остаткам. Определение конфигурации этих моносахаридов было затруднено из-за малых величин КССВ и совпадения сигналов H-2 и H-3 одного из остатков. Поэтому для определения величин КССВ проведена серия экспериментов гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [8] (табл. 3). Набор констант для остатка A может отвечать только моносахариду с α -D-глюко-конфигурацией, поскольку среди других пираноз с малыми константами $^3J_{\text{H,H}}$ через три связи для кольцевых протонов (α -D-глюко-, β -D-глюко- и β -D-идо-конфигурации) нет сахаров с $^3J_{\text{H,H}} > 3$ Гц [9]. Положение сигнала H-2 этого моносахарида в значительно более слабом поле (4,38 м. д., уш. с, $J_{2,3}$ 4,0 Гц) по сравнению с сигналом H-2 α -D-глюкопиранозы (3,74 м. д.) [9] свидетельствует об N-ацилировании в положении 2. В то же время форма сигнала H-5 этого моносахарида (4,59 м. д., уш. с) и отсутствие сигналов H-6a и H-6b в разностном спектре ЯЭО (см. ниже) при его предоблучении указывают на локализацию в положении 6 карбоксильной группы. Таким образом, остаток A представляет собой α -D-связанную 2-ацетамидо-2-дезоксигулурановую кислоту. По данным моносахаридного анализа и ^{13}C -ЯМР-спектра, оставшийся моносахарид (остаток B), для которого найдены КССВ $J_{1,2}$ 3,5 и $J_{4,5}$ 2 Гц, по методу исключения может иметь только α -D-галакто-конфигурацию.

Последовательность соединения моносахаридных остатков и типы замещения определены с помощью одномерного эксперимента ЯЭО в лабораторной системе координат (рис. 4, табл. 4) и двумерной спектроскопии ЯЭО во вращающейся

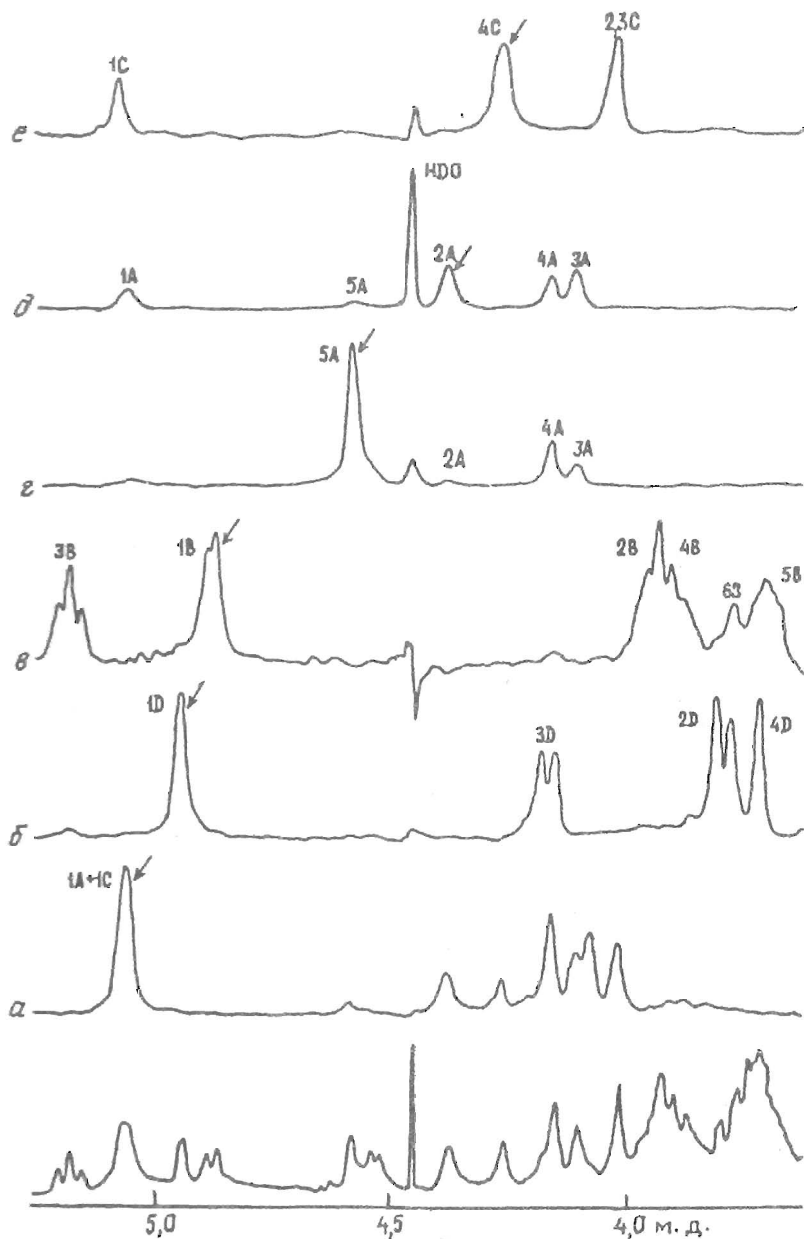


Рис. 3. Слабополярная область ^1H -ЯМР-спектра полисахарида (внизу) и одномерные спектры ПОНАНА, полученные при возбуждении протонов: Н-1А и Н-1С (а), Н-1D (б), Н-1В (в), Н-5А (г), Н-2А (д), Н-4С (е). Здесь и на рис. 4, 5 буквы относятся к моносахаридным остаткам в соответствии со структурной формулой, цифры обозначают номер протона в остатке

системе координат ROESY [10]. При этом последовательное предоблучение аномерных протонов остатков А и С вызывает заметные ЯЭО на Н-2, Н-3 и Н-4 остатка А, Н-2 остатка С и Н-4, Н-5, Н-6а и Н-6б остатка В. Поскольку оба моносахарида имеют α -конфигурацию гликозидного центра, результат эксперимента однозначно указывает на последовательное соединение остатков А, В и В, С. В данном случае предоблучение аномерных протонов должно вызывать ЯЭО только на Н-2 собственного остатка; появление же остальных сигналов —

Данные ^1H -ЯМР-спектра полисахарида

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
A: $\rightarrow 4$ -L-GalpNAcA- α -(1 \rightarrow	H1	5,07	ус	$J_{1,2} \sim 3,0$
	H2	4,38	ус	$J_{2,3} 4,0$
	H3	4,11	ус	$J_{3,4} 4,0$
	H4	4,15	ус	$J_{4,5} 2$
	H5	4,58	ус	
B: $\rightarrow 4$ -D-GlcpNAc- β -(1 \rightarrow	H1	4,89	д	$J_{1,2} 8,5$
	H2	3,93	дд	$J_{2,3} 9,0$
	H3	5,18	т	$J_{3,4} 9,0$
	H4	3,90	т	$J_{4,5} 10,0$
	H5	3,72	м	
	H6a	3,96		
	H6b	3,82	д	$J_{6a,6b} 3,5$
C: $\rightarrow 3,4$ -D-Galp- α -(1 \rightarrow	H1	5,07	ус	$J_{1,2} > 3,5$
	H2	4,03		
	H3	4,03		
	H4	4,28	ус	$J_{4,5} 2$
	H5	3,95		
D: D-Fucp3N- α -(1 \rightarrow	H1	4,95	д	$J_{1,2} 3,5$
	H2	3,79	дд	$J_{2,3} 10,0$
	H3	4,17	дд	$J_{3,4} 3,0$
	H4	3,72	ус	$J_{4,5} < 2$
	H5	4,53		
-CO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	H2'	2,37	т	$J_{2',3'} 8,0$
	H3'	1,85	кв	$J_{3',4',7,5}$
	H4'	3,62	т	

результат контакта аномерных протонов с кольцевыми протонами других остатков через гликозидную связь. Таким образом, появление ЯЭО на H-4, H-5, H-6a и H-6b остатка B свидетельствует о его замещении остатком A в положение 4 или 6. Однако, согласно данным ^{13}C -ЯМР-спектра, в повторяющемся звене отсутствуют замещенные CH₂-группы; следовательно, 1 \rightarrow 6-связь в данном случае исключена. Для фрагмента C \rightarrow A возможна 1 \rightarrow 4-связь в случае L-конфигурации или 1 \rightarrow 3-связь при D-конфигурации гулозного цикла [11].

Предоблучение аномерного протона единственного остатка с β -конфигурацией гликозидной связи (звено B) вызывает ЯЭО на H-2, H-3 и H-5 собственного остатка и H-3 остатка C. Последнее свидетельствует о наличии 1 \rightarrow 3-связи между остатками B и C и их одинаковой абсолютной конфигурации [11].

Наконец, предоблучение аномерного протона фукозаминидного остатка (звено D) приводит к появлению ЯЭО на H-2 собственного остатка, H-4, H-6a и H-6b остатка C, а также небольших по интегральной интенсивности сигналов H-3 и H-5 остатка C. Этот эксперимент указывает на наличие 1 \rightarrow 4-связи между звеньями D и C и их одинаковую абсолютную конфигурацию.

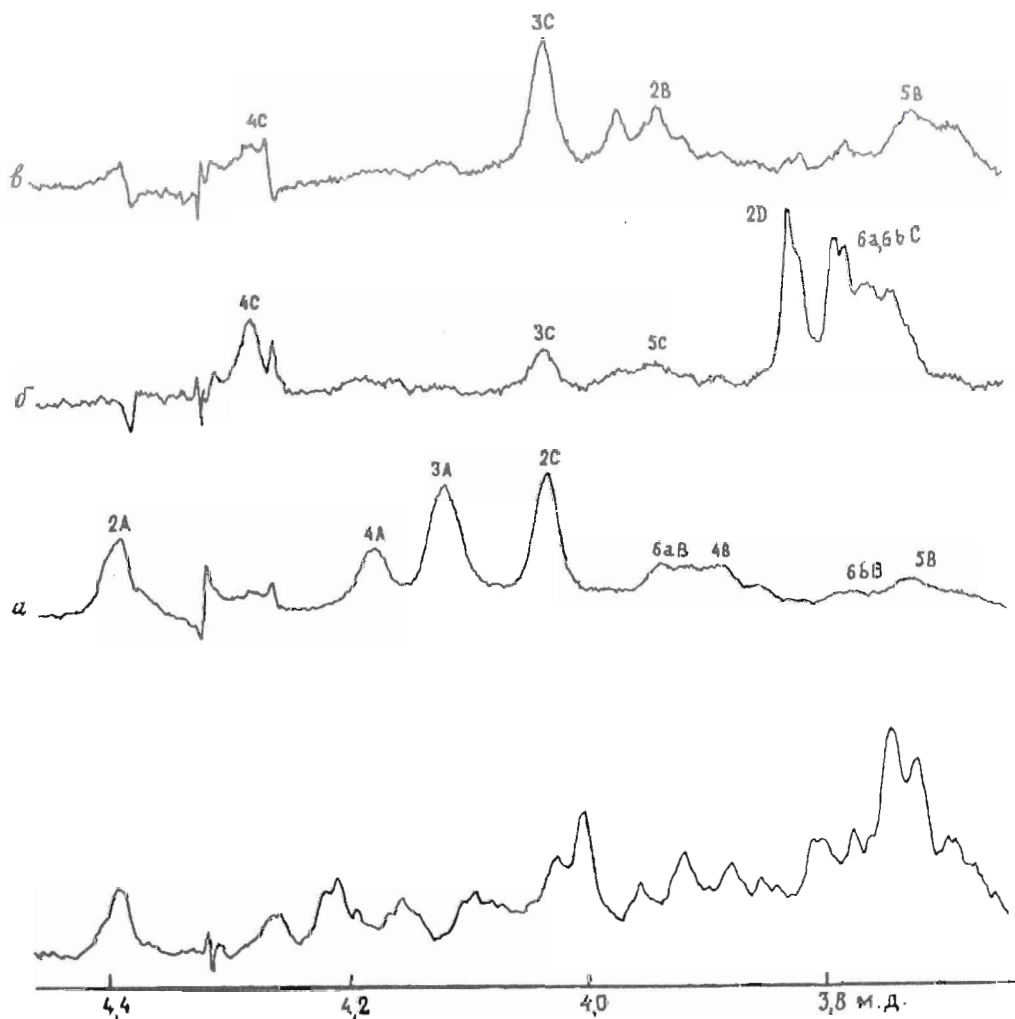


Рис. 4. Средняя область ^1H -ЯМР-спектра полисахарида (внизу) и разностные спектры ЯЭО, полученные при предоблучении аномерных протонов Н-1А, Н-1С (а), Н-1D (б), Н-1В (в). В последнем случае наблюдается также слабый сигнал протона Н-3В, не указанный на рисунке

Результаты двумерного эксперимента ROESY (рис. 5) полностью подтверждают данные одномерного эксперимента ЯЭО и, кроме того, выявляют два важных дальних контакта между протонами Н-3 остатка В и Н-5 остатка А, а также Н-5 звена D и Н-6 звена В. Построение молекулярных моделей с учетом преимущественной конформации вблизи гликозидной связи [12] показывает, что подобные контакты возможны только при разной абсолютной конфигурации остатков А и В и одинаковой абсолютной конфигурации остатков В и D. Поскольку однозначно установлено, что остатки В и D имеют D-конфигурацию, остаток 2-амино-2-дезоксигулурановой кислоты может быть отнесен к L-ряду и, исходя из приведенных выше данных, замещен в положение 4.

Полное отнесение сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида проведено с помощью двумерной гетероядерной $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -корреляционной спектроскопии. В данном эксперименте подтверждены типы связей между моносахаридными остатками,

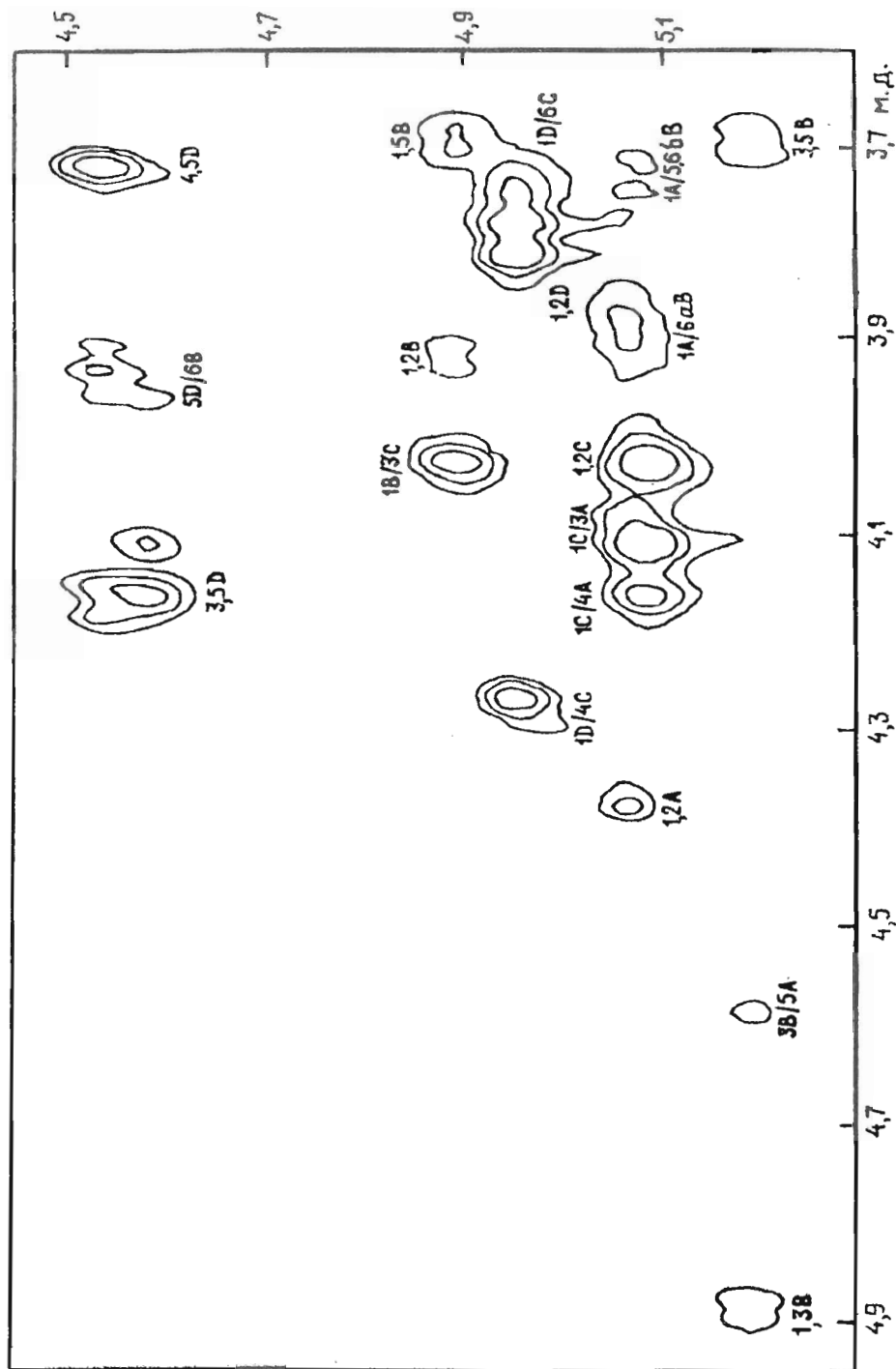


Рис. 5. ROESY-спектр полисахарида

пиридин—вода (6 : 4 : 3) при обнаружении моносахаридов щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию осуществляли на колонке (2,5 × 90 см) с сефадексом G-50 в 0,3% уксусной кислоте. ВЭЖХ проводили на колонке (0,4 × 25 см) с сорбентом Silasorb SPH C₁₈(LC) (7,5 мкм) в 0,05% трифторуксусной кислоте. Элюционные 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 → 225° С. ГЖХ-МС проводили на приборе LKB 9000S на той же колонке.

Продуцирование микроорганизма A. taeniodii 2ММ6 проводили как описано в работе [1].

Полисахарид из сырой микробной биомассы выделяли по методу [17]; нуклеиновые кислоты осаждали 50% трихлоруксусной кислотой при pH 2, осадок удаляли центрифугированием, супернатант диализовали и лиофилизовали. Выход полисахарида 4% от веса влажной биомассы.

Частичный кислотный гидролиз. Полисахарид (1 г) гидролизовали 1% уксусной кислотой (100 мл, 2 ч, 100° С), гидролизат концентрировали и подвергали гель-хроматографии на сефадексе G-50. Получали высокомолекулярную (800 мг) и низкомолекулярную (150 мг) фракции; из последней препаративной БХ с последующей очисткой ВЭЖХ выделили 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксibuтирами-до)-D-галактозу (20 мг), $[\alpha]_{378}^{20} +91^\circ$ (с 0,2, вода). 1 мг моносахарида восстанавливали, ацетиловали и анализировали ГЖХ-МС.

Полный кислотный гидролиз. Полисахарид (2 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (1 мл, 3 ч, 100° С), гидролизат упаривали и анализировали с помощью БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. В препаративном варианте гидролиза использовали 15 мг полисахарида и 2 мл кислоты; препаративной БХ выделили 3 мг D-галактозы, $[\alpha]_{378}^{20} +75^\circ$ (с 0,3, вода), 4 мг D-глюкозамина, $[\alpha]_{378}^{20} +62^\circ$ (с 0,4, вода) и 3 мг 3,6-дидезокси-3-амино-D-галактозы, $[\alpha]_{378}^{20} +22^\circ$ (с 0,3, вода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшкова Р. П., Назаренко Е. Л., Зубков В. А., Иванова Е. П., Оводов Ю. С., Шашков А. С., Книрель Ю. А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 327—336.
2. Назаренко Е. Л., Горшкова Р. П., Зубков В. А., Шашков А. С., Иванова Е. П., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 7. С. 733—739.
3. Dodrell D. M., Pegg D. T., Bendall M. R. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 323—327.
4. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293—297.
5. Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504—2511.
6. Subramanian S., Bax A. // J. Magn. Reson. 1987. V. 71. P. 325—330.
7. Jansson P.-E., Kenne L., Widmalm G. // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169—191.
8. 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.
9. Шашков А. С. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1983. № 6. С. 1328—1336.
10. Bax A., Davis D. G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 65. P. 355—360.
11. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Mamyan S. S., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 181. № 1. P. 1—12.
12. Lemieux R. U., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. P. 631—653.
13. Torii M., Sakakibara K., Kuroda K. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 37. № 2. P. 401—405.
14. Michon F., Brisson J. R., Roy R., Ashton F. E., Jennings H. J. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 20. P. 5592—5598.
15. Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Dabrowski J., Grosskurth H., Stanislavsky E. S., Kholodkova E. V. // Carbohydr. Res. 1992. V. 231. № 1. P. 1—11.

16. 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.
 17. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. B. 7B. № 1. S. 148—155.

Поступила в редакцию
15.II.1993

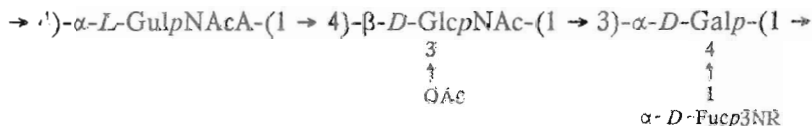
E. L. Nazarenko, V. A. Zubkov, A. S. Shashkov*,
 Y. A. Knirel*, R. P. Gorshkova, E. P. Ivanova, Yu. S. Ovodov

STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF THE ACIDIC
 POLYSACCHARIDE FROM *Alteromonas macleodii* 2MM6

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 macleodii* 2MM6 is shown to consist of tetrasaccharide repeating units containing *D*-galactose, 3-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, 2-acetamido-2-deoxy-*L*-guluronic acid and 3,6-dideoxy-3-(4-hydroxybutyramido)-*D*-galactose residues. On the basis of sugar analysis, ¹H and ¹³C NMR-spectroscopy data including NOE and one-dimensional HOHAHA experiments, the following structure was suggested for the polysaccharide repeating unit:



R: -CO-CH₂-CH₂-CH₂-OH