

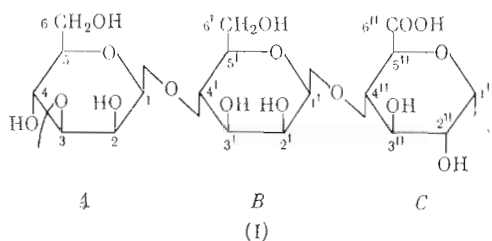


УДК 547.458:543.42.23

ПОЛИСАХАРИДЫ *LIPOMYCES*. VI*. СПЕКТРЫ ^{13}C -ЯМР
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *LIPOMYCES LIPOFER*
И *DIPODASCOPSIS UNINUCLEATA*Шашков А. С., Гуллыев Н., Свиридов А. Ф.,
Горин С. Е., Чижов О. С., Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Получены и интерпретированы спектры ^{13}C -ЯМР внеклеточных полисахаридов, продуцируемых *Lipomyces lipofer* (12 штаммов), структура повторяющегося звена которых была установлена ранее независимыми методами. Обсуждены характерные особенности спектров полисахаридов, содержащих звенья *D*-маннопиранозы и *D*-глюкопиранозидуроновой кислоты. На основании сравнения спектров ^{13}C -ЯМР внеклеточных полисахаридов *L. lipofer* и *Dipodascopsis uninucleata* высказано предположение об идентичности строения повторяющегося звена этих полисахаридов.

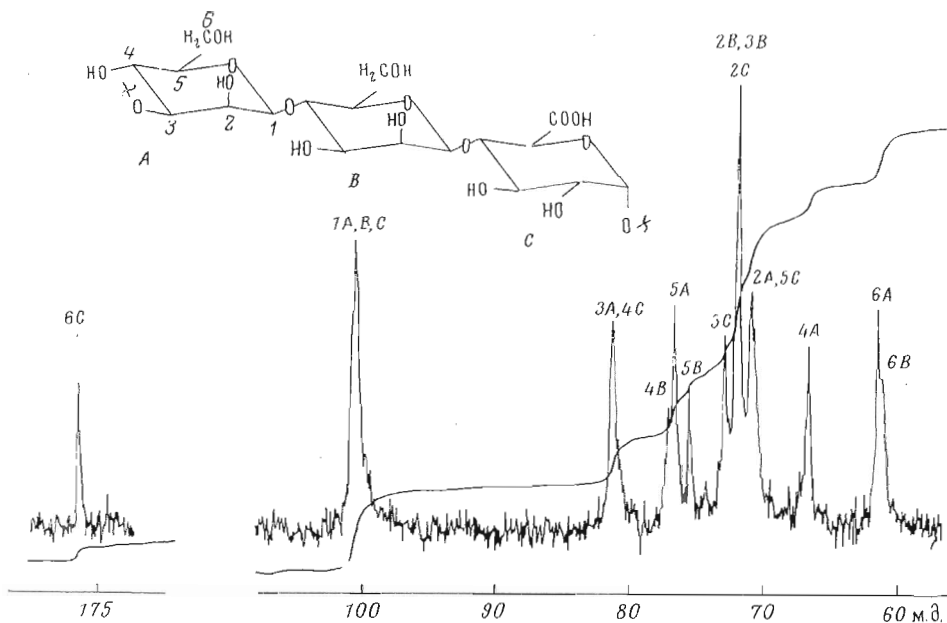
Ранее [2, 3] для внеклеточного полисахарида, продуцируемого капсульными вариантами *Lipomyces lipofer*, различными химическими методами была установлена следующая структура повторяющегося звена:



Поскольку полисахариды, содержащие остатки уроновых кислот, относятся к числу малоисследованных методом ^{13}C -ЯМР [4], расшифровка спектров полисахаридов, продуцируемых *L. lipofer*, представляет интерес для определения их характерных особенностей и в конечном счете должна помочь в определении химической структуры подобных полимеров.

При анализе спектров ^{13}C -ЯМР мы использовали в качестве параметров спектра не только химические сдвиги, но и интегральные интенсивности линий, считая, что в полимерах времена релаксации для всех атомов углерода достаточно малы и примерно одинаковы [5], а усиление за счет эффекта Оверхаузера максимально по крайней мере для всех атомов углерода, непосредственно связанных хотя бы с одним атомом водорода.

* Сообщение V см. [4].

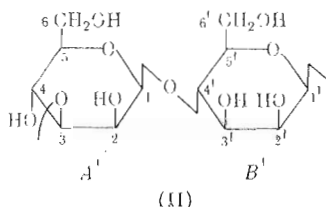


Отнесение сигналов углеродных атомов звеньев А, В и С внеклеточного полисахарида *L. lipofer* (D₂O, рН 8—9, внутренний эталон—диметилсульфоксид)

Исходя из этого интегральные интенсивности линий являлись количественным параметром спектра ¹³С-ЯМР полисахаридов во всех случаях, за исключением сигналов карбоксильного атома углерода.

Спектр ¹³С-ЯМР внеклеточного полисахарида типичного штамма *L. lipofer* представлен на рисунке. Он состоит из 12 основных сигналов, часть которых имеет кратную интегральную интенсивность. Полисахариды, продуцируемые остальными штаммами, дают аналогичные спектры, очень незначительно различающиеся по соотношению интенсивностей основных линий и появлению слабых пиков мипорных компонентов или случайных примесей. Основные линии спектра располагаются в четырех перекрывающихся областях: область резонанса карбоксильного атома углерода (175,8—176,2 м. д., одиночный пик с интенсивностью, соответствующей одному атому углерода); область резонанса аномерных атомов углерода (широкий пик тройной интенсивности с центром 100,6 м. д.); область резонанса всех кольцевых атомов углерода звеньев А, В и С, кроме С1, С1' и С1'' (67—82 м. д., общая интегральная интенсивность ~ 12 атомов) и область резонанса атомов С6 и С6' в маннопиранозных звеньях (60—62 м. д., два перекрывающихся пика с общей интегральной интенсивностью ~ 2 атома углерода).

Расшифровка спектров внеклеточных полисахаридов *L. lipofer* значительно облегчается их сравнением с полностью интерпретированным спектром внеклеточного маннана из *Rhodotorula glutinis* [6], состоящего из чередующихся звеньев β-D-маннопиранозы с 1→3- и 1→4-связями:



Отнесение сигналов углеродных атомов звеньев *A*, *B* и *C* вклеточного полисахарида *L. lipofer* (D₂O, pH 8–9, внутренний эталон – диметилсульфоксид)

Звено <i>A</i> *		Звено <i>B</i> *		Звено <i>C</i> **	
Атом углерода	Химический сдвиг, м.д.	Атом углерода	Химический сдвиг, м.д.	Атом углерода	Химический сдвиг, м.д.
1	100,6 (101,6)	1'	100,6 (98,7)	1''	100,6 (100,3)
2	71,0 (69,4)	2'	72,0 (71,9)	2''	72,0 (71,4)
3	81,4 (81,1)	3'	72,0 (73,2)	3''	72,8 (72,8)
4	66,8 (66,8)	4'	77,1 (78,4)	4''	81,4 (81,8)
5	76,7 (77,8)	5'	75,6 (76,7)	5''	71,0 (69,8)
6	61,5 (62,7)	6'	61,1 (62,3)	6''	176,0 (172,35)

* В скобках даны химические сдвиги углеродных атомов *A'*- и *B'*-звеньев β-*D*-маннопиранозы (структура II) [5].

** В скобках даны химические сдвиги метил-α-метил-4-*O*-метил-*D*-глюкопиранозидуроната.

Из сравнения структур соединений (I) и (II) очевидно, что в спектре полисахарида (I) химические сдвиги, относящиеся к атомам углерода звена *B*, практически должны совпадать с химическими сдвигами атомов углерода звена *B'* структуры полисахарида (II). Следует, конечно, иметь в виду, что небольшие расхождения в химических сдвигах возможны из-за различий в условиях съемки спектров полисахаридов (I) и (II). Исключения могут составить такие положения сигналов *C1'*, связанного β-связью с *C4''* *D*-глюкуроновой кислоты в полисахариде (I) и *C3* остатка *D*-маннозы в соединении (II). Несколько большие изменения химических сдвигов можно ожидать для звена *A* в полисахариде (I) по сравнению с *A'* в полисахариде (II), так как в первом случае атом *C3* звена *A* связан α-гликозидной связью с остатком *D*-глюкуроновой кислоты, а во втором — α-гликозидной связью со звеном *D*-маннозы. Исходя из этих соображений и интегральных интенсивностей пиков, мы сделали отнесение линий атомов углерода маннозных остатков структуры соединения (I) (таблица).

Для отнесения сигналов, принадлежащих атомам углерода в звене *C*, были привлечены данные по химическим сдвигам метил-α-метил-(4-*O*-метил-*D*-глюкопиранозид)уроната (III) *, спектр которого был снят в идентичных условиях. При этом считалось, что сдвиги кольцевых атомов углерода в соединении (III) не различаются [7] и что влияние метилирования на химические сдвиги атомов углерода аналогично влиянию гликозилирования по тем же положениям [8]. Дополнительные подтверждения правильности отнесения пика 81,4 м. д. к *C4''* звена *C* получены в результате съемки спектров полисахаридов из *L. lipofer* с добавкой EuCl_3 . Как показано в работе [9], химические сдвиги всех протонов альдоурановых кислот существенно изменяются при образовании динамического парамагнитного комплекса. Можно считать по аналогии, что при добавке EuCl_3 в раствор полисахарида (I) в первую очередь и в наибольшей мере изменятся химические сдвиги атомов углерода звена *C*, содержащего наиболее эффективный центр комплексообразования. Действительно, при добавке EuCl_3 пик 81,4 м. д. распадается на две линии (81,4 и 80,6 м. д.); видны также изменения в области 71–73 м. д., которые мы не анализировали из-за ее сложности. Эксперимент показывает, что двойной пик 81,4 м. д. содержит линию резонанса углеродного звена *C*.

Подкисление раствора полисахарида (I) до pH 2 также приводит к некоторому смещению линий резонанса: пик 81,4 м. д. распадается на два (81,9 и 80,6 м. д.), пик 72,8 м. д. смещается в область 72 м. д. В соответствии с наблюдениями по влиянию pH среды на химические сдвиги атомов углерода 1 → 4-связанных звеньев глюкуроновой кислоты [4] пики 81,4

* Данные по спектрам ¹³C-ЯМР полной серии метил-α-метил-(*D*-глюкопиранозид)уронатов будут опубликованы позже.

и 72,8 м. д. (в кислой среде 80,6 и 72,0 м. д. соответственно) следует отнести за счет резонанса атомов углерода в звене С.

В соответствии со всеми этими соображениями нами предлагается полная расшифровка спектров полисахаридов, продуцируемых *L. lipofer*, приведенная в таблице. Незначительные изменения и уточнения в отношении возможны лишь для линий в узкой области 71—74 м. д. из-за неполного совпадения условий съемки спектров полисахаридов (I) и (II), а также из-за небольшого различия во влиянии образования О-метильных и О-гликозильных связей на химические сдвиги соседних атомов углерода в кольце.

Отметим некоторые общие особенности спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов, содержащих звенья маннозы и глюкуроновой кислоты, которые могут быть полезными при определении химической структуры подобных биополимеров. Общими признаками присутствия глюкуроновой кислоты в полисахариде является сигнал углеродного атома карбоксильной группы, а также дефицит интегральной интенсивности пиков в области резонанса С6 (60—62 м. д.) по сравнению с областью резонанса аномерных атомов углерода (98—105 м. д.) при заведомом отсутствии связей 1 → 6.

Для звеньев маннозы, не имеющих гликозидных связей по С4, характерен пик в области 66—67 м. д. (от С4). Обычно, если полисахарид не содержит пентозных звеньев (например, остатков ксилозы), эта область свободна от резонансных линий. Для звеньев маннозы, имеющих гликозидную связь по С4, характерен пик в области 77 м. д. (от С4-атома, связанного гликозидной связью). Однако в этой же области могут находиться и другие сигналы, например линии С5 и С3 β-связанных пиранозных звеньев и сигналы углеродных атомов фуранозидов. Поэтому тестом на присутствие замещенных по С4-атому остатков D-маннопирапоз скорее следует считать сочетание:

а) дефицита интегральной интенсивности пиков в области 79—87 м. д. (область резонанса неаномерных атомов углерода, связанных гликозидной связью и несущих экваториальный заместитель) по сравнению с таковой для пиков в области резонанса аномерных атомов углерода;

б) наличия пика в области 77 м. д.

Этот тест неоднозначен, так как аналогичная картина должна наблюдаться и для полисахаридов, содержащих 1 → 4-связанные галактозные звенья.

Наконец, характерной особенностью спектров полисахаридов, содержащих остатки маннозы, является обращение области резонанса атома С1 в α- и β-связанных звеньях. Для полисахаридов, состоящих из наиболее распространенных моносахаридов в пиранозной форме и исследуемых при pH среды, близкой к нейтральной, эта область распадается на две подобласти: от 98 до 102 м. д. (надобласть резонанса атомов С1, связанных α-связью) и 103—105 м. д. (связанных β-связью). Лишь для пираноз с аксиальным заместителем при С2 или С3 это правило нарушается [8]. Так, например, для α-маннанов химические сдвиги С1 лежат в области 103,7—103,9 м. д., а для β-маннанов — в области 98—101 м. д. [6, 8] (для метил-α- и β-маннопиранозидов наблюдается совпадение линий резонанса атома С1).

Спектры метилированных полисахаридов, продуцируемых *L. lipofer*, оказались более сложными для анализа из-за отсутствия спектров низкомолекулярных моделей и меньшей разрешенности спектра. Если в спектре неметилированного полисахарида резонансные линии атомов углерода С2 — С6 (не считая углеродного атома карбоксильной группы) занимают область в 24 м. д., то в метилированных производных эта область в 1,5 раза меньше. Не приводя полного анализа спектра метилированных полисахаридов, отметим некоторые его особенности.

Метилирование полисахарида смещает положение резонанса углеродного атома карбоксильной группы в высокое поле (171,5 м. д.). Резонанс-

ные линии аномерных атомов углерода звеньев *A*, *B* и *C* разделяются в частотной области (103,6 и 100,6 м. д. соответственно). Область резонанса неаномерных кольцевых атомов углерода и C6 (без C6" карбоксильной группы) распадается на три надобласти: 72—73 м. д. — атомы C5 остатков гексоз, связанных β-связью, и C6 (т. е. C5", C6' и C6); 75—78 м. д. — атомы C5 звеньев, связанных β-связью, и атомов C4, связанных с аксиальным заместителем (т. е. C5, C5', C4, C4'); 79—85 м. д. — остальные кольцевые атомы углерода. Область резонанса метоксильных групп (62 м. д. и выше) разделяется на три надобласти: 53,2 м. д. — карбоксиметильная группа [7]; 57—60 м. д. — метоксильные группы при C6 и C6', а также при C2'', C3' и C3, т. е. при атомах углерода, соседних к атому углерода с аксиальным заместителем [10—12]; 61—62 м. д. — остальные метоксильные группы (C4, C4' и C3"). При исследовании других внеклеточных полисахаридов методом ¹³C-ЯМР было обнаружено, что спектр полисахарида, продуцируемого *D. uninucleata*, оказался практически идентичным спектрам полисахаридов *L. lipofer*, что позволяет с большой степенью вероятности считать их структурно подобными.

Таким образом, полученные данные показывают возможность установления ряда элементов структуры полисахаридов, содержащих остатки урановых кислот методом ¹³C-ЯМР, в том числе таких, изучение которых химическими методами затруднено.

Экспериментальная часть

Исследовали 12 штаммов *L. lipofer*, полученных из коллекции кафедры биологии почв МГУ (38, 119, 133, 206, 238, 250, 256, 301, 302, 1748 и 1752), и один штамм *D. uninucleata* CBS 190.37, полученный из Голландской коллекции типовых культур в Дельфте (CBS). Спектры ¹³C-ЯМР снимали на приборе WP-60 Bruker с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц (импульсный режим с последующим фурье-преобразованием). Метод выделения и очистки полисахаридов описан в работе [2]. Полисахариды исследовались в виде 3% растворов в D₂O, а их перметилированные производные (2 полисахарида) — в виде 5% растворов в CD₃OD. Химический сдвиг диметилсульфоксида (внутренний эталон для водных растворов) относительно тетраметилсилана был определен в специальном эксперименте (+ 39,45 м. д.), химические сдвиги всех линий приведены в σ-шкале. Для стандартизации условий эксперимента рН среды поддерживали на уровне 8—9 добавлением нескольких капель водного раствора аммиака. Температура съемки 50°. Для получения нормального спектра в таких условиях оказалось достаточным накопление 25 000—50 000 сигналов свободной индукции. Специальная проверка показала, что относительные интегральные интенсивности линий, включая лицию от карбоксильной группы, не изменяются при вариации интервала между 90-градусными импульсами от 0,5 до 2 с. Спектры сняты при интервале между импульсами, равном времени сбора данных (1,1 с) при масштабе 100 Гц/см. Для одного полисахарида спектры ¹³C-ЯМР снимали после добавки небольших количеств EuCl₃ (20 мг) с целью идентификации некоторых линий глюкуроновой кислоты [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2774—2781.
2. Кочетков Н. К., Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Чижов О. С., Голубев В. И., Бабьева И. П., Поделько А. Я. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2304—2311.
3. Свиридов А. Ф., Джикия О. Д., Горин С. Е., Чижов О. С., Бабьева И. П., Кочетков Н. К. (1977) Биооргани. химия, 3, 232—237.
4. Hamer G. K., Perlin A. S. (1976) Carbohydr. Res., 49, 37—48.
5. Schaefer J., Natusch D. F. S. (1972) Macromolecules, 5, 416—423.
6. Gorin P. A. J. (1974) Carbohydr. Res., 39, 3—10.

7. Gorin P. A. J., Mazurek M. (1975) *Can. J. Chem.*, **53**, 1212—1223.
8. Пфашков А. С., Чижов О. С. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 437—497.
9. Anthonsen T., Larsen B., Smidsrød O. (1972) *Acta chem. scand.*, **26**, 2988—2989; (1973) **27**, 2671—2673.
10. Haverkamp J., van Dongen J. P. C. M., Vliegthart J. F. G. (1974) *Carbohydr. Res.*, **33**, 319—327.
11. Haverkamp J., van Dongen J. P. C. M., Vliegthart J. F. G. (1973) *Tetrahedron*, **29**, 3431—3449.
12. Haverkamp J., de Bie M. J. A., Vliegthart J. F. G. (1974) *Carbohydr. Res.*, **37**, 111—125.

Поступила в редакцию
14.I.1977

**LIPOMYCES POLYSACCHARIDES. VI. ^{13}C -NMR SPECTRA OF EXOCELLULAR
POLYSACCHARIDES OF *LIPOMYCES LIPOFER* AND *DIPODASCOPSIS
UNINUCLEATA***

SHASHKOV A. S., GULLYEV N., SVIRIDOV A. F.,
GORIN S. E., CHIZHOV O. S., KOCHETKOV N. K.

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

^{13}C -NMR spectra were analyzed for exocellular polysaccharides produced by *Lipomyces lipofer* (12 strains), wherein the structure of repeat unit has earlier been established by independent methods. Specifically discussed are the characteristic features in the spectra of polysaccharides comprising *D*-mannopyranose and *D*-glucuronic acid units. Basing on the identity of ^{13}C -NMR spectra, an assumption was made on possible identity of the repeat unit in *Lipomyces lipofer* and *Dipodascopsis uninucleata* exocellular polysaccharides.
