



УДК 547.458.2 : 542.943

СТРОЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ГЛЮКУРОНОМАНАНА  
ИЗ *DIPODASCOPSIS UNINUCLEATA* CBS 19037Свиридов А. Ф., Джикия О. Д., Горин С. Е.,  
Бабьева И. П., Чижов О. С., Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

Структура внеклеточного полисахарида *Dipodascopsis uninucleata* CBS 19037 исследована методами метилирования, щелочного распада и окисления хромовым ангидридом. На основании полученных данных полисахариду приписана регулярная линейная структура с повторяющимся звеном:  $\rightarrow 4-D-GlcUA p1 \xrightarrow{\alpha} 3-D-Man p1 \xrightarrow{\beta} 4-D-Man p1 \xrightarrow{\beta}$ , идентичная строению ранее изученного полисахарида, продуцируемого *Lipomyces lipofer*.

Как было показано в предыдущем сообщении [1], внеклеточные полисахариды, продуцируемые *Lipomyces lipofer* и *Dipodascopsis uninucleata* CBS 19037 (эти два микроорганизма относятся к различным семействам сумчатых грибов [2]), имеют весьма сходные спектры  $^{13}C$ -ЯМР. На основании этого можно было предположить, что два систематически далеких микроорганизма продуцируют внеклеточные полисахариды одинакового строения. Целью настоящей работы является установление строения внеклеточного полисахарида, продуцируемого *D. uninucleata* CBS 19037, и сравнение его со строением внеклеточного полисахарида, продуцируемого *L. lipofer*.

Полисахарид, выделенный из культуральной жидкости по методу, описанному ранее [3], осаждением реактивом Фелинга, был однороден по данным гель-хроматографии на сефадексе G-100 и электрофореза. При кислотном гидролизе методом бумажной хроматографии были идентифицированы *D*-манноза и *D*-глюкуроновая кислота, абсолютная конфигурация которых была определена путем сведения их к соответствующему фенилозону [4] (*D*-глюкуроновая кислота была предварительно восстановлена до *D*-глюкозы). Кислотный гидролиз восстановленного полисахарида привел к *D*-маннозе и *D*-глюкозе в отношении 2 : 1, идентифицированным методом БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

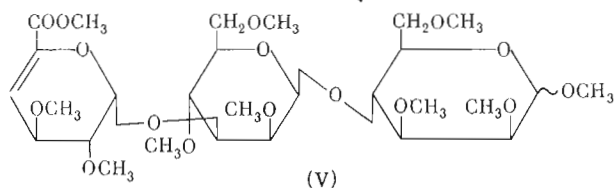
После метанолиза метилированного кислого полисахарида методом ГЖХ были идентифицированы метил-2,3,4,6-тетра-*O*-метил- $\alpha,\beta$ -*D*-маннопиранозиды (I), метил-2,4,6-три-*O*-метил- $\alpha,\beta$ -*D*-маннопиранозиды (II) и метил-2,3,6-три-*O*-метил- $\alpha,\beta$ -*D*-маннопиранозиды (III) в отношении 1 : 18 : 21.

При метанолизе восстановленного метилированного полисахарида кроме указанных маннозидов (I) — (III) был идентифицирован также метил-2,3,6-три-*O*-метил- $\alpha,\beta$ -*D*-глюкопиранозид (IV), количество которого было примерно равно маннопиранозидам (II) или (III).

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде подтверждается также анализом масс-спектров полиолов [5], полученных путем восстановления гидролизата метилированного нейтрального полисахарида  $\text{NaBD}_4$  с последующим ацелированием. С помощью хромато-масс-спектрометрии здесь были идентифицированы 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-1,5-ди-*O*-ацетил-*D*-, 2,3,6-три-*O*-метил-1,4,5-три-*O*-ацетил-*D*-, 2,4,6-три-*O*-метил-1,3,5-три-*O*-ацетил-*D*-манниты и 2,3,6-три-*O*-метил-1,4,5-три-*O*-ацетил-*D*-сорбит в отношении 1 : 17 : 19 : 16.

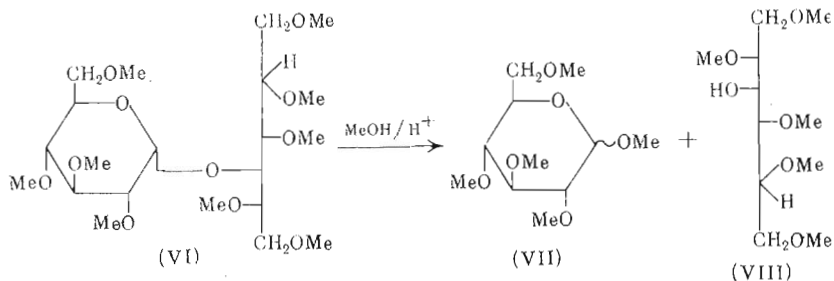
Таким образом, на основании приведенных данных для полисахарида, продуцируемого *D. uninucleata* CBS 19037, можно предположить линейную структуру с чередующимися 1 → 3 и 1 → 4-связями между остатками *D*-маннозы и *D*-глюкуроновой кислоты.

Для определения последовательности моносахаридных остатков в цепи был применен метод щелочной дегградации метилированного кислого полисахарида под действием диметилсульфинилианиона в DMSO [6]. При этом, как и в случае полисахарида *L. lipofer* [7], основным продуктом реакции был трисахарид (V), ИК-спектр которого имел полосу поглощения в области  $1680 \text{ см}^{-1}$ , соответствующую эфиру  $\alpha, \beta$ -ненасыщенной кис-



лоты. При полном метанолизе трисахарид (V) образуются маннозиды (II) и (III) в отношении 1 : 1. При частичном гидролизе (20%-ная  $\text{AsOH}$ ) отщепляется остаток непредельной  $\Delta^4$ -уроносовой кислоты и образуется соответствующий маннобиозид. Метилирование и последующий метанолиз этого маннобиозида приводит к маннозидам (I) и (III) в отношении 1 : 1. Приведенные данные однозначно указывают на строение трисахарид (V).

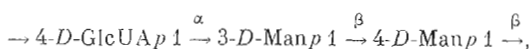
Конфигурация гликозидных связей в молекуле глюкурономаннана была определена путем окисления ацетата восстановленного полисахарида ангидридом хромовой кислоты [8]. После окисления, последующего восстановления  $\text{NaBH}_4$  [9] и метилирования полученного вещества по методу Куна [10], с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в качестве главного продукта выделены глюкозилполиолы (VI):



После метанолиза соединений (VI) методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы глюкозид (VII) и гекситы (VIII).

Выделение глюкозилполиола (VI) свидетельствует о том, что оба остатка *D*-маннопиранозы должны иметь  $\beta$ -конфигурацию, а остаток *D*-глюкуроновой кислоты —  $\alpha$ -конфигурацию.

Исходя из данных, приведенных в настоящей работе, внеклеточному полисахариду, продуцируемому *D. uninucleata*, можно приписать линейное регулярное строение с повторяющимся звеном:



аналогичное структуре внеклеточного полисахарида *L. lipofer* [7]. Таким образом, сходство спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР внеклеточных полисахаридов *D. uninucleata* и *L. lipofer* не случайно и отражает идентичность их структур. Наши данные указывают, что  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопия может быть использована для идентификации сравнительно сложных биополимеров.

### Экспериментальная часть

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Varian MAT 111 Gnom на колонке 3% SE-30, ГЖХ — на приборе Varian-1700 на колонках 5% НПГС, 3% SE-30, 3% ECNSS-3М, на хромосорбе W. ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (ГДР) в растворе хлороформа.

**Идентификация моносахаридов.** Выделение и очистку внеклеточного полисахарида из культуральной жидкости *D. uninucleata* CBS 19037 (культура получена из голландской коллекции типовых культур, CBS, в Дельфте) производили аналогично выделению и очистке внеклеточного глюкурономаннана из *L. lipofer*, штамм 133 (выход внеклеточного полисахарида составил 7% в пересчете на потребляемую глюкозу) [3]. Полисахарид элюируется с колонки (70 × 1,5 см) сефадекса G-100 холостым объемом,  $[\alpha]_D^{20} + 47,2^\circ$  (с 1,06, вода).

Полисахарид (1 г) гидролизовали в 50 мл 2 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100°, 7 ч). Обрабатывали раствор  $\text{BaCO}_3$  до нейтральной реакции, отфильтровывали и фильтрат упаривали. Методом БХ в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) на бумаге FN-11 в смеси идентифицировали маннозу и глюкуроновую кислоту. Гидролизат делили на бумаге FN-18 в той же системе. Выделили 0,2 г маннозы и 0,14 г глюкуроновой кислоты. Фракцию, содержащую глюкуроновую кислоту, нагревали 4 ч с 5% раствором  $\text{HCl}$  в метаноле при 100° (в ампуле), обрабатывали раствором аммиака и упаривали досуха, затем растворяли в 15 мл воды и добавляли 0,1 г  $\text{NaBH}_4$ . Через 12 ч смесь обрабатывали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ -форма) и упаривали досуха, добавляя несколько раз метанол для удаления остатков борной кислоты. Полученный метилгликозид гидролизовали в соответствии с описанной методикой [11]. Из выделенных в результате описанных превращений глюкозы и маннозы получили идентичные фенилосазоны [4] с т. пл. 208°,  $[\alpha]_D^{20} - 48^\circ$  (с 1,33, пиридин).

Восстановленный [12, 13] полисахарид (0,05 г) гидролизовали 7 ч в 5 мл 2 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при 100°, восстанавливали  $\text{NaBH}_4$  и ацетилировали  $\text{Ac}_2\text{O}$  в пиридине. Методом ГЖХ идентифицировали гексаацетаты маннита и сорбита в отношении 2 : 1.

**Определение положения связей между моносахаридными остатками в глюкурономаннани.** Глюкурономаннан (0,1 г) метилировали по методу Хакомори [14] и метилированный полисахарид подвергали в течение 4 ч метанолизу в 5% растворе  $\text{HCl}$  в метаноле при 100° в запаянной ампуле, после чего нейтрализовали раствором  $\text{NH}_3$ , упаривали и экстрагировали  $\text{CHCl}_3$ . Методом ГЖХ в смеси идентифицировали: метил-2,3,4,6-тетра-О-метил- $\alpha, \beta$ -*D*-маннозид (I), метил-2,4,6-три-О-метил- $\alpha, \beta$ -*D*-маннозид (II) и метил-2,3,6-три-О-метил- $\alpha, \beta$ -*D*-маннозид (III) в соотношении 1 : 18 : 21.

Метилирование восстановленного глюкурономаннана проводили по методу Хакомори [14]. Далее 0,02 г полисахарида подвергали метанолизу, как описано выше. Методом ГЖХ идентифицировали в смеси маннозиды (I) — (III) и метил-2,3,6-три-О-метил- $\alpha, \beta$ -*D*-глюкопиранозид (IV) в соотношении 1 : 18 : 21 : 17. Метилированный восстановленный полиса-

харид (0,05 г) гидролизовали [11], восстанавливали  $\text{NaBH}_4$  и ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине. С помощью хромато-масс-спектрометрии в смеси идентифицировали [5] 2,3,4,6-тетра-О-метил-1,5-ди-О-ацетил-*D*-маннит; 2,3,6-три-О-метил-1,4,5-три-О-ацетил-*D*-маннит; 2,4,6-три-О-метил-1,3,5-три-О-ацетил-*D*-маннит и 2,3,6-три-О-метил-1,4,5-три-О-ацетил-*D*-сорбит в отношении 1 : 17 : 19 : 16.

*Окисление ацетата восстановленного полисахарида* (ср. [15]) проводили аналогично описанному ранее [7]. Окисленную смесь (из 0,2 г ацетата восстановленного полисахарида) восстанавливали  $\text{NaBH}_4$ , метилировали по методу Куна [10] и далее хроматографировали на силикагеле. Получили 0,042 г (38%) глюкозилполиола (VI), после метанолиза которого методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировали метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-глюкопиранозид (VII) и 1,2,4,5,6-пента-О-метилгекситы (VIII).

*Щелочной распад нативного метилированного полисахарида*. Метилированный [14] полисахарид (0,2 г) обрабатывали диметилсульфиниланионом в DMSO, как описано ранее [6, 7]. Смесь делили на силикагеле, получили 0,045 г (23%) трисахарида (V). При метанолизе трисахарида (V) (5% раствор HCl в метаноле, 100°, 4 ч) методом ГЖХ идентифицировали метил-2,4,6-три-О-метил-*D*-маннопиранозид (II) и метил-2,3,6-три-О-метил-*D*-маннопиранозид (III) в отношении 1 : 1. Трисахарид (V) (0,02 г) гидролизовали 20%-ной  $\text{AsOH}$  (100°, 1 ч). Смесь упаривали досуха и метилировали по Куну [10], затем обрабатывали 5% раствором HCl в метаноле (100°, 4 ч) и методом ГЖХ идентифицировали метил-2,3,4,6-тетра-О-метил- и метил-2,3,6-три-О-метил-*D*-маннозиды (I) и (III) в отношении 1 : 1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Гуллыев Н., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Чижов О. С., Кочетков Н. К. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 1028—1033.
2. Kreisel H. (1969) *Grundzüge eines natürlichen System der Pilze*. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.
3. 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.
4. Fischer E. (1908) *Ber.*, 41, 75—77.
5. Axberg K., Björndal H., Pilotti A., Svensson S. (1972) *Acta chem. scand.*, 26, 1319—1325.
6. Lindberg B., Lönngren I., Thompson I. L. (1973) *Carbohydr. Res.*, 28, 351—357.
7. Свиридов А. Ф., Джикия О. Д., Горин С. Е., Чижов О. С., Бабьева И. П., Кочетков Н. К. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 232—237.
8. Свиридов А. Ф., Чижов О. С. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 345—350.
9. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2774—2781.
10. Kuhn R., Baer H. H., Seelinger A. (1958) *J. Liebigs Ann. Chem.*, 611, 236—241.
11. Bouveng H. O., Kiessling H., Lindberg B., McKay I. E. (1962) *Acta chem. scand.*, 16, 615—621.
12. Zitko V., Bishop C. T. (1966) *Can. J. Chem.*, 44, 1275—1282.
13. Manning I. H., Green I. W. (1967) *J. Chem. Soc. (C)*, 2357—2363.
14. Hakomori S. (1964) *J. Biochem.*, 55, 205—208.
15. Whistler R. G., Towle C. A. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 138, 39—43.

Поступила в редакцию  
23.VI.1977

#### STRUCTURE OF EXTRACELLULAR GLUCURONOMANNAN OF *DIPODASCOPSIS UNINUCLEATA* CBS 19037

SVIRIDOV A. F., JIKIA O. D., GORIN S. E., BABYEVA I. P.,  
CHIZHOV O. S., KOCHETKOV N. K.

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

Extracellular polysaccharide of *D. uninucleata* CBS 19037 has been studied by means of methylation, alkaline degradation and oxidation by chromium trioxide. A linear regular structure  $\rightarrow 4\text{-D-GlcUA}p1 \xrightarrow{\alpha} 3\text{-D-Man}p1 \xrightarrow{\beta} 4\text{-D-Man}p1 \xrightarrow{\beta}$  has been assigned therefrom which is identical to that of extracellular polysaccharide of *Lipomyces lipofer* strain 133 studied earlier.