



УДК 547.458.02+577.11

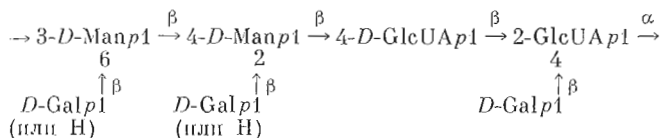
ПОЛИСАХАРИДЫ LIPOMYCES

9*. СТРОЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ
L. KONONENKOAЕ

*Свиридов А. Ф., Бердимбетова Г. Е., Шашков А. С.,
Горин С. Е., Бабьева И. П., Чижов О. С.,
Кочетков Н. К.*

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

Методами химического анализа (метилирование, щелочной распад, окисление ангидридом хромовой кислоты) и спектроскопии ^{13}C -ЯМР исследованы внеклеточные полисахариды, продуцируемые *L. kononenkoeae*, и показано, что в основе структуры полисахаридов лежит повторяющееся звено следующего строения:



В предыдущих сообщениях этой серии были описаны структуры внеклеточных полисахаридов, продуцируемых тремя видами почвенных дрожжей рода *Lipomyces* (*L. lipofer*, *L. tetrasporus*, *L. starkeyi* (1)). В основе структуры этих полисахаридов лежат повторяющиеся звенья из остатков *D*-маннозы и *D*-глюкуроновой кислоты, к которым в различные положения могут быть присоединены остатки *D*-галактозы, причем наличие или отсутствие последнего моносахарида может служить одним из критериев для видовой дифференциации липомицетов [2].

Однако, как было показано нами ранее [3], различия между разными видами липомицетов не исчерпываются наличием или отсутствием *D*-галактозы. Поэтому установление структуры полисахаридов всех видов липомицетов в сочетании с другими признаками может лечь в основу более точной систематизации и определения этих микроорганизмов. Кроме того, изучение строения внеклеточных полисахаридов вследствие уникальности их структуры представляет самостоятельный интерес для разработки новых подходов к установлению строения полисахаридов.

В связи с этим мы предприняли изучение строения внеклеточных полисахаридов, продуцируемых *L. kononenkoeae* — еще не изученного вида липомицетов, образующего капсулы. В данной работе первоначально были исследованы методом ^{13}C -ЯМР внеклеточные полисахариды, продуцируемые тремя штаммами *L. kononenkoeae*, два из которых были пред-

* Сообщение 8 см. [1].

Отнесение сигналов атомов углерода в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (I)
 D_2O , pH 7; 50° , внутривневый эталон – DMSO (хим. сдвиг 39,45 м.д. от TMS, σ -шкала)

Атом углерода	Звенья					
	A	B	C	D	R	R'
C1	100,5 (100,4) *	100,5 (100,4)	103,9 (104,5)	100,5	103,6	103,7
C2	70,8 (70,7)	72,1 (82,2)	73,3 (73,3)	82,0	71,6	71,4
C3	80,8 (80,7)	72,1 (72,0)	76,4 (76,5)	70,8	73,2	73,3
C4	66,4 (67,4)	76,85 (76,8)	80,8 (82,2 или 80,7)	80,8	69,2	69,2
C5	76,8 (75,5)	75,5 (75,5)	74,6 (74,3)	70,8	75,9	75,5
C6	61,05 (69,6)	61,55 (61,5)	175,3 (175,1)	175,9	61,5	61,5

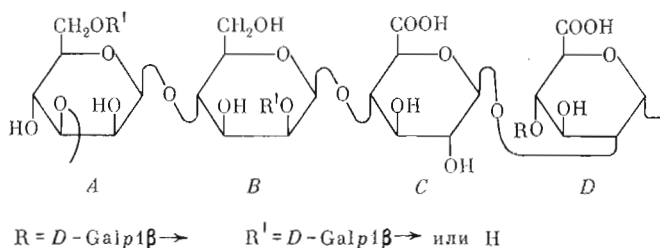
* В скобках даны сигналы атомов углерода остатков моносахаридов, модифицированных дополнительными звеньями *D*-галактопиранозы (R').

ставлены в виде двух форм S и R [4]. Поскольку их спектры мало отличались друг от друга и эти различия были обусловлены главным образом незначительным колебанием содержания *D*-галактозы, для дальнейших исследований химическими методами был выбран полисахарид, продуцируемый штаммом 269 S.

Выделенный из культуральной жидкости [5] полисахарид был гомогенен по данным хроматографии на сефадексе G-100 и DEAE-целлюлозе. Полисахарид содержит *D*-галактозу, *D*-маннозу и *D*-глюкуроновую кислоту в отношении 0,9 : 1 : 0,9 (определено методом ГЖХ ацетатов полиолов из гидролизата, восстановленного дибораном [6] полисахарида).

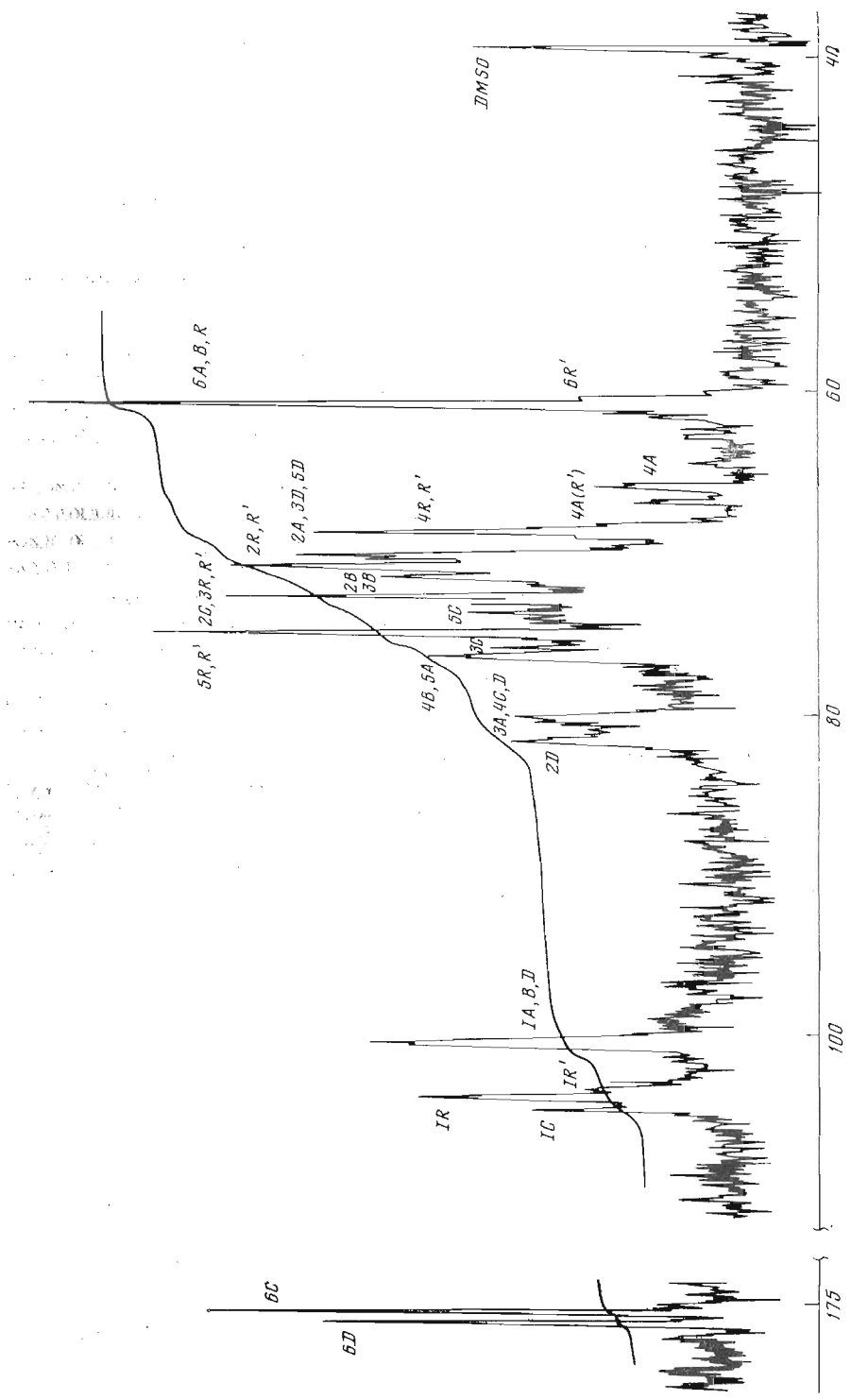
Абсолютная конфигурация моносахаридов была определена по удельному вращению их фенилозаонов [7] (*D*-глюкуроновая кислота предварительно была восстановлена [6] до *D*-глюкозы).

Сравнение спектров ^{13}C -ЯМР и сопоставление данных химического анализа, которые приведены ниже, показывают, что висключочные полисахариды *L. kononenkoe* (полисахарид (I)) структурно близки к изученным ранее полисахаридам *L. starkeyi* (полисахарид (II)) [1]. Спектры ^{13}C -ЯМР полисахаридов (I) и (II) совпадают во многих областях (ср. рисунки этой и предыдущей статьи [1], таблица), и некоторые их характерные детали позволяют предположить почти полную идентичность строения основной цепи этих полимеров:



Так, о наличии двух остатков *D*-глюкуроновой кислоты в полисахариде (I) свидетельствуют сигналы в низком поле с химическим сдвигом 175,1 и 175,8 м. д. Не вызывает сомнения наличие в полисахариде (I) β -1 \rightarrow 3- (66,5 м. д.) и β -1 \rightarrow 4- (76,8 м. д.) связанных звеньев *D*-маннозы. Если учесть, что в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (I) присутствуют все шесть линий терминального остатка β -*D*-галактозы, то можно предположить, что внеклеточные полисахариды, продуцируемые *L. kononenkoe*, модифицированы дополнительными остатками *D*-галактозы по сравнению с полисахаридами *L. starkeyi*.

Очевидно, основное различие полисахаридов (I) и (II) заключается в увеличении содержания β -*D*-галактозных звеньев и в различном их рас-



Спектр ^{13}C -ЯМР внеклеточного полисахарида из *L. kopolovskiae* шт. 269S (D_2O , рН 9; 50°)

положении в повторяющемся звене. Таким образом, расшифровка спектра полисахарида (I) сводится к нахождению места присоединения этих звеньев, исходя из наблюдаемых различий в спектрах полисахаридов (I) и (II). Отметим некоторые из них: 1) в спектре полисахарида (I) появляются новые линии со сдвигом 67,4; 74,3; 103,7; 104,5 м. д.; 2) изменяется относительная интенсивность линий в области 82,0 — 82,2 и 80,0 — 80,8 м. д. (для полисахарида (I) 1 : 1, для (II) — 1 : 3); 3) уменьшается относительная интенсивность линии 72,0 м. д. (в полисахариде (II) эта линия отнесена за счет резонанса атомов C2 и C3 звена B (C2B и C3B)).

Появление новой линии 103,7 м. д. легко объяснить, имея в виду общее увеличение относительной интенсивности сигналов атомов углерода β -D-галактопиранозных остатков. Присоединение концевых остатков β -D-галактопиранозы по другим гидроксильным группам может вызвать смещение сигнала C1 по сравнению с сигналом C1 β -D-галактопиранозного остатка в полисахариде (II), при этом сигналы остальных атомов углерода (C2 — C6) этих звеньев не должны существенно смещаться. Сигнал с химическим сдвигом 67,4 м. д. лежит в специфической области спектра и может принадлежать только атому C4 звена A. Его смещение по сравнению с C4A в полисахариде (II), очевидно, вызвано γ -эффектом от присоединения β -D-галактозы именно к этому звену. Из двух возможных положений присоединения (C2A и C6A) следует предпочесть последнее [8], так как изменение относительной интенсивности линии с химическим сдвигом 76,8 м. д., отнесенной ранее за счет резонанса атомов C5A и C4B, может быть объяснено при этом смещением сигнала C5A в модифицированном звене в более высокопольную область за счет β -эффекта.

Соотношение интенсивностей пиков с химическим сдвигом 67,4 — 66,4 м. д. составляет примерно 1 : 2, т. е. в полисахариде (I) модифицировано только 30% звена A.

Уменьшение интенсивности пика с химическим сдвигом 72,0 м. д. в спектре полисахарида (I), отнесенного в (II) за счет резонанса атомов C2B и C3B, позволяет предположить, что в полисахариде (I) это звено также модифицировано дополнительным присоединением β -D-галактозы. Из трех возможных положений следует предпочесть C2, так как только замещение по аксиальной гидроксильной группе не вызывает существенных изменений в химических сдвигах соседних атомов углерода [9], в то время как замещение по атому C3 должно привести к почти полному исчезновению сигнала с химическим сдвигом 72,0 м. д., что не соответствует виду спектра.

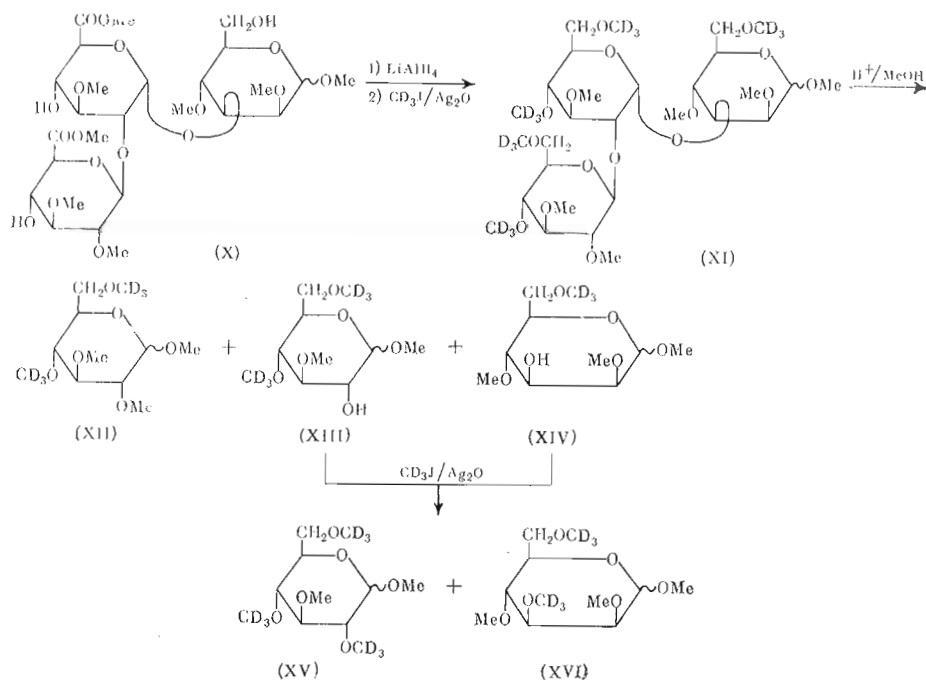
Предположение о модификации звена B по C2 в полисахариде (I) позволяет объяснить и другие различия спектров полимеров (I) и (II). Так, изменение относительной интенсивности пиков при 82,2 и 80,7 м. д. в полисахариде (I) может быть вызвано совпадением положения линий C2B в модифицированном звене с C2D; не исключено также смещение резонанса C4C в более низкопольную область за счет изменения конформации молекулы в области звеньев B и C. Последнее обстоятельство может послужить причиной расщепления резонанса атома C5C (74,7 и 74,3 м. д.) и C1C (104,5 и 104,0 м. д.).

Таким образом, сравнительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов (I) и (II) [1] позволяет предположить их близкое сходство, включая и конфигурацию гликозидных связей. Регулярность полисахаридов, продуцируемых *L. kononenkoae*, по сравнению с полисахаридами *L. starkeyi* [1] нарушена дополнительным неполным включением остатка β -D-галактопиранозы по положениям C6A и C2B. Основные выводы о строении полисахарида (I), сделанные на основании сравнительного анализа спектра ^{13}C -ЯМР, были полностью подтверждены при изучении его структуры химическими методами.

Метилирование полисахарида [10] с последующим метаполизом привело к смеси метилированных моносахаридов, в которой методом ГЖХ были

идентифицированы метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-галактопиранозид (III), метил-2,3,6-три-О-метил-(IV), -2,4,6-три-О-метил- (V), -2,4-ди-О-метил- (VI) и -3,6-ди-О-метил-*D*-маннопиранозиды (VII) в отношении 1,6 : 0,7 : 0,3 : 0,5 [(VI) + (VII)]. Положение метильных групп в моносахаридах (IV) — (VII) было определено по масс-спектрам их тридегтерометилированных производных [11, 12]. Из метанолизата метилированного восстановленного по карбоксильным группам полисахарида были выделены дополнительно метил-2,3,6-три-О-метил- (VIII) и метил-3,6-ди-О-метил-*D*-глюкопиранозиды (IX), строение которых доказывалось аналогично предыдущему, причем соотношение метилгликозидов (III) — (IX) в этом случае составило примерно 1,5 (III) : 0,6 (IV) : 0,7 (V) : 1,2 [(VI) + (VII) + (IX)] : 0,9 (VIII). Приведенные данные позволяют сделать некоторые предварительные выводы о структуре полисахарида. Повторяющимся звеном полисахаридов *L. kononenkoe*, очевидно, является пентасахарид, включающий два остатка *D*-маннозы (1 → 3- и 1 → 4-связанные), два остатка *D*-глюкуроновой кислоты (1 → 4-, 1 → 2- и/или (1 → 4-) связанные) и один остаток *D*-галактозы, который соединен в полисахариде 1 → 2- или 1 → 4-связью с *D*-глюкуроновой кислотой, т. е. в этой части структуры полисахарид (I) очень похож на полисахариды, продуцируемые *L. starkeyi* (подгруппа 1). В полисахариды *L. kononenkoe* входит также дополнительное количество остатков *D*-галактозы, связанных 1 → 6- и 1 → 2-связями с остатками *D*-маннозы, что и является отличительным признаком полисахаридов (I) и (II).

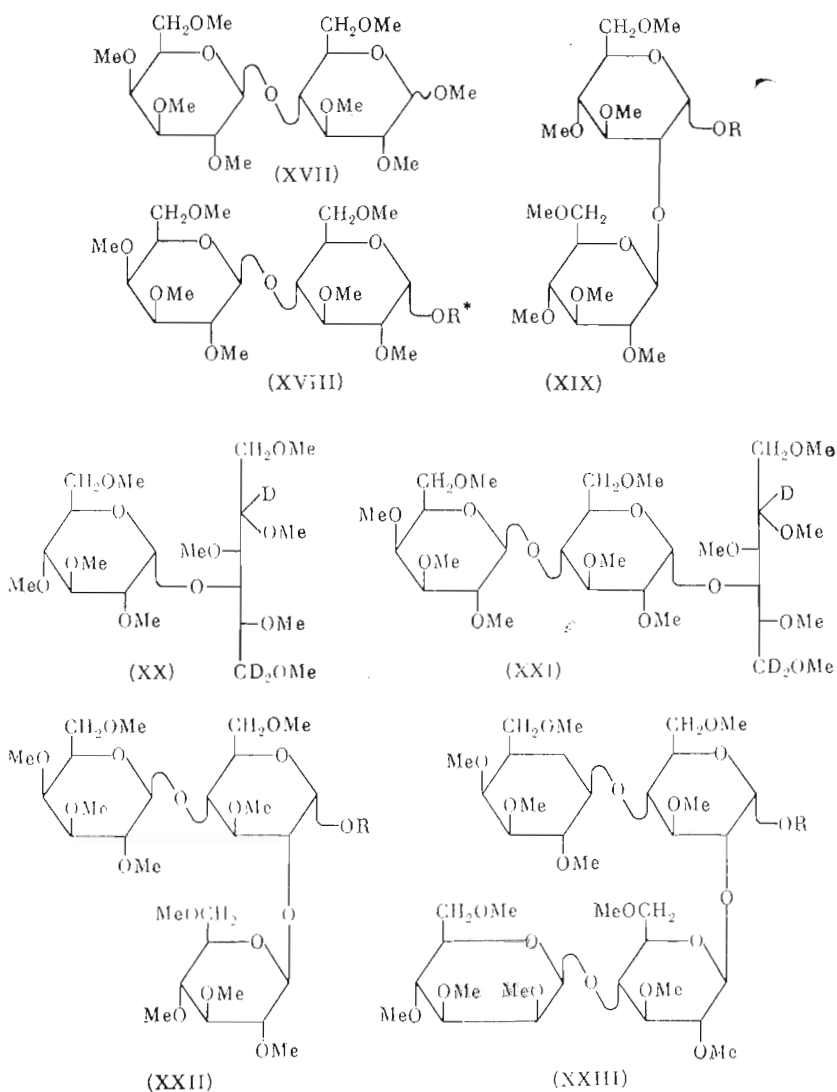
При частичном метанолизе метилированного полисахарида путем разделения на колонке с силикагелем был выделен трисахарид (X), строение которого устанавливалось по следующей схеме:



Восстановление трисахарид (X) LiAlH_4 в эфире с последующим тридегтерометилированием [12] приводит к соединению (XI). В метанолизате последнего с помощью ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии (ХМС) идентифицированы моносахариды (XII) — (XIV) в соотношении 1 : 1 : 1. Строение двух последних моносахаридов (XIII) и (XIV) доказывалось аналогично предыдущему.

Последние данные и строение олигосахаридов, образующихся при окислении ацетата восстановленного полисахарида ангидридом хромовой кислоты (см. ниже), позволяют соединению (X) приписать указанную на схеме структуру.

Новые сведения по структуре были получены при изучении продуктов окисления ацетата восстановленного полисахарида CrO_3 [13]. Окисление проводили при соотношениях ацетат полисахарида — CrO_3 1 : 1 и 1 : 3 (по весу). Используя оба варианта окисления ацетата полисахарида с последующим восстановлением NaBH_4 или NaBD_4 и метилированием по методу Хакомори (или только метилированием) [14] и разделением на колонке с силикагелем, удалось выделить ряд олигосахаридов (XVII) — (XXIII), структура которых приведена ниже:



Олигосахариды (XVII), (XX) и (XXI) выделены из смеси окисления при использовании трехкратного избытка CrO_3 .

* В олигосахариде (XVIII) и последующих R — остаток O-метилового эфира гексита, замещенный в положение 3 (или 4). Конфигурация остатков гексоз в олигосахариде приписаны на основании анализа спектра ^{13}C -ЯМР полисахаридов (I) и (II).

Строение олигосахаридов (XVII) — (XXI) однозначно следует из анализа их метанолизатов методом ГЖХ путем сравнения с заведомыми образцами и изучения масс-спектров концевых гекситов.

Строение частично метилированных продуктов устанавливали также ХМС их тридейтерометильных производных. В метанолизате олигосахарида (XXII) обнаружены с помощью ГЖХ полностью метилированные *D*-глюкоза и *D*-галактоза, гексит, идентичный полученному из олигосахаридов (XVIII) — (XXI), (XXIII), и ди-*O*-метил-*D*-глюкоза в отношении 1 : 1 : 1 : 1.

Строение последнего производного также устанавливали методом тридейтерометилирования и ХМС [12, 15]. Аналогично устанавливали и строение олигосахарида (XXIII). В его метанолизате с помощью ГЖХ обнаружены полностью метилированные *D*-манноза и *D*-галактоза, метил-2,3,6-три-*O*-метил- и 3,6-ди-*O*-метил-*D*-глюкопиранозиды и соответствующий полиол примерно в равных количествах.

Полученные данные позволяют надежно установить строение олигосахаридов (XVII) — (XXIII). Выделение этих соединений однозначно говорит о том, что один из остатков *D*-галактопиранозы связан с *D*-глюкуроновой кислотой 1 → 4-связью, причем это должна быть кислота, которая несет разветвление по С2 в виде другого остатка *D*-глюкуроновой кислоты. К последнему моносахаридному остатку, вероятно, присоединен β-1 → 4-связью *D*-маннопиранозид, который в свою очередь в полисахариде также несет заместитель по С4. Из факта выделения олигосахаридов (X), (XVIII) — (XXIII), особенно (X), (XX) и (XXI), следует, что второй остаток *D*-маннозы в повторяющемся звене полисахарида замещен по С3 и связан 1 → 4-связью с другим остатком *D*-маннозы.

Эти выводы, таким образом, позволяют полисахаридам, продуцируемым *L. kononenkoae*, приписать указанное выше строение. β-*D*-конфигурация большинства остатков моносахаридов в полимере следует из анализа спектра ¹³С-ЯМР. Маннопиранозным остаткам β-*D*-конфигурация приписана на основании того, что этот моносахарид практически не обнаружен в олигосахаридных фрагментах, получающихся при окислении восстановленного полисахарида CrO₃ (исключая (XXIII), который сохраняется при мягком окислении) в соответствии с установленным фактом легкого окисления *D*-маннопиранозы в аналогичных условиях при сохранении α-аномера [16, 17].

Последовательность $C \rightarrow D \rightarrow A \leftarrow R'$ следует из выделения олигосахарида (X), $B \rightarrow C$, $C \rightarrow \overset{\uparrow R}{D}$ и другие — олигосахаридов (XVII) — (XXIII).

В связи с выделением ряда олигосахаридов, образующихся при окислении ацетата полисахарида ангидридом хромовой кислоты, следует еще раз остановиться на причинах, обуславливающих неполное окисление β-*D*-гликопиранозидных связей [13]. Поскольку этот метод в настоящее время широко используется для определения конфигурации гликозидных связей [13], то некритический подход к полученным с его помощью данным, по нашему мнению, может приводить к ошибочным выводам. Одной из основных причин, вероятно, может служить сферическая затрудненность отдельных звеньев, как это имеет место для звена С и R (*D*) в случае полисахаридов *L. kononenkoae* и других, рассмотренных в предыдущих работах этой серии.

Кроме того, при проведении реакции в уксусной кислоте ангидрид хромовой кислоты, а часто и ацетаты полисахаридов плохо растворяются, что также может служить причиной недоокисления β-*D*-гликозидных остатков. Наконец, на полноту окисления может оказать влияние конформация макромолекулы и природа моносахаридного остатка. Например, в случае всех полисахаридов, продуцируемых липомицетами, мы всегда

наблюдали полное окисление остатков *D*-маннопиранозы независимо от положения гликозидных связей и количества заместителей, в то время как остатки β -*D*-галактозы и β -*D*-глюкозы часто сохраняются даже при проведении реакции с трехкратным избытком (по весу) ангидрида хромовой кислоты.

Следовательно, если какой-либо моносахарид не окисляется, то это еще не означает, что он имеет в полисахариде α -*D*-(β -*L*-)конфигурацию. Только в том случае, если данный моносахарид окислился, можно достаточно определенно говорить о его β -*D*-(α -*L*-)конфигурации. Поэтому данные, полученные с помощью окисления ангидридом хромовой кислоты, по крайней мере для разветвленных полисахаридов, необходимо подтверждать другими методами, например ^{13}C -ЯМР-спектроскопией. В то же время, как видно из результатов, приведенных в этой и других статьях данной серии, окисление ацетатов нейтральных полисахаридов, имеющих большое количество β -*D*-связанных остатков гексопираноз, приводит к олигосахаридным фрагментам, которые не могут быть получены другими методами, и, следовательно, может служить хорошим методом структурного анализа.

В заключение необходимо отметить, что почвенные дрожжи рода *Lipomyces* продуцируют внеклеточные полисахариды в основном двух типов: в основе первого из них лежит повторяющееся звено из двух остатков *D*-маннозы и одного остатка *D*-глюкуроновой кислоты (*L. lipofer*), причем в состав этих полисахаридов не входит *D*-галактоза. Внеклеточные полисахариды других видов построены из двух остатков *D*-маннопиранозы и двух остатков *D*-глюкуроновой кислоты, к которым в различных положениях присоединяются остатки *D*-галактозы. Количество последнего моносахарида и его положение в цепи изменяются от одного вида липомицетов к другому.

Экспериментальная часть

Масс-спектры полисахаридов снимали на приборе Varian MAT Gnom 111. ГЖХ-анализ проводили на приборе ЛХМ-8МД на колонках 3% SE-30, 5% НПГС, 3% ECNSS на хромосорбе W.

Выделение и очистку полисахаридов проводили по методу [5], восстановление полисахаридов дибораном — по методу [6]. Метилирование полисахарида и олигосахаридов осуществляли по методу Хакомори [10], моносахаридов — по [12].

Спектры ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Bruker WP-60 с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц. в условиях, описанных для полисахарида (II) [1].

Исследовали полисахариды, продуцируемые штаммами 269 S, 269 R, 283 S, 283 R, 284 S (из коллекции кафедры почвенной биологии МГУ).

Идентификация моносахаридов. Полисахарид (1 г), продуцируемый штаммом 269 S ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 23,2$ (с 1,3; вода)), нагревали при 100° 7 ч в 50 мл 2н. H_2SO_4 . Нейтрализовали BaCO_3 , отфильтровали, фильтрат упарили. Методом БХ (*n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3) в смеси идентифицировали *D*-глюкуроновую кислоту, *D*-галактозу и *D*-маннозу. Гидролизат делили на бумаге FN-18 в той же системе. Получили 0,15 г *D*-маннозы, 0,17 г *D*-галактозы и 0,13 г *D*-глюкуроновой кислоты. Фракцию, содержащую *D*-глюкуроновую кислоту, нагревали 4 ч при 100° с 5%-ным раствором HCl в метаноле, в запаянной ампуле, затем восстанавливали NaBH_4 в 50%-ном водном растворе метанола (12 ч), обработали катионитом КУ-2 (H^+) и упарили досуха, добавляя несколько раз метанол; метилглюкозид гидролизовали в условиях, описанных выше.

Из *D*-глюкозы и *D*-маннозы получен один и тот же фенилоззон [т.пл. 206—208°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 47,6^\circ$ (с 1,2; пиридин) [7]]. Фенилоззон из *D*-галактозы имеет т. пл. 185—188°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 19,7^\circ$ (с 0,85; пиридин) [7]. Вос-

становленный [6] полисахарид (0,05 г) гидролизovali в 5 мл 2 н. H_2SO_4 при 100° 7 ч. Гидролизат после обычной обработки восстановили $NaBH_4$ и далее ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине. Методом ГЖХ в смеси идентифицировали ацетаты маннита, сорбита и дульцита в соотношении 1,0 : 0,9 : 0,9.

Определение типов связей. 0,5 г метилированного полисахарида [10] нагревали в 50 мл 5% HCl в метаноле при 100° 4 ч в ампуле. Нейтрализовали водным аммиаком, упарили досуха и остаток экстрагировали хлороформом. Методом ГЖХ в смеси идентифицировали метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-галактопиранозид (III), метил-2,3,6-три-О-метил- (IV), -2,4,6-три-О-метил- (V), -2,4-ди-О-метил- (VI) и -3,6-ди-О-метил- (VII) -*D*-маннозиды в отношении 1,6 : 0,7 : 0,3 : 0,5 [(VI) + (VII)] соответственно. Моносахариды (IV) — (VII) выделили методом колоночной хроматографии на силикагеле, метилировали CD_3I [12] и соответствующие производные идентифицировали с помощью ГЖХ и ХМС [11]. При метаполлизе в описанных выше условиях метилированного восстановленного полисахарида ($LiAlH_4$, эфир, 10 ч) дополнительно выделили и идентифицировали в виде тридейтерометилпроизводных метил-2,3,6-три-О-метил- (VIII) и -3,6-ди-О-метил- (IX) -*D*-глюкопиранозиды.

Метилированный полисахарид (0,3 г) нагревали в 50 мл 2,5% HCl в метаноле (2 ч, 60°). После обработки, как описано выше, смесь разделили колоночной хроматографией на силикагеле. Получили 0,04 г трисахарид (X), который восстановили $LiAlH_4$ в эфире (кипячение 8 ч) и далее метилировали CD_3I . Образовавшийся олигосахарид (XI) после очистки на колонке силикагеля гидролизovali в 5% HCl в метаноле (4 ч, 100°) и с помощью ГЖХ сравнением со свидетелями идентифицировали моносахариды (XII) — (XIV) в отношении 1 : 1 : 1. Соединения (XIII) и (XIV) выделили препаративной ТСХ, метилировали CD_3I и идентифицировали с помощью ГЖХ. Положения CD_3 -группы в моносахаридах (XII), (XV) и (XVI) определяли методом ХМС. Масс-спектр гликозида (XV) содержал следующий набор пиков, m/e (I , % к иону с m/e 91): 228 (2,3) и 211 (1,2), 196 (10), 193 (4,2), 182 (6,5), 179 (2,1), 152 (28), 114 (14), 111 (5), 107 (91), 104 (77), 91 (100), 88 (22), 75 (77), 48 (54), 45 (19).

Окисление ацетата восстановленного полисахарида ангидридом хромовой кислоты [13]. а) Ацетат восстановленного [6] полисахарида (0,2 г) и 0,6 г CrO_3 нагревали при перемешивании в 6 мл лед. уксусной кислоты 1 ч при 50° . Смесь разбавили равным объемом воды, нейтрализовали $CaCO_3$ и экстрагировали хлороформом. Экстракт высушивали Na_2SO_4 и упаривали досуха. Остаток метилировали по методу Хакомори [10] и делили на колонке с силикагелем. Выход дисахарид (XVII) 0,03 г. Метаполлиз дисахарид (XVII) в стандартных условиях приводит к моносахаридам (III) и (VIII) в отношении 1 : 1 (ГЖХ). Глюкозид (VIII) выделили препаративной ТСХ, метилировали CD_3I и анализировали методом ХМС.

б) Ацетат восстановленного полисахарида (0,16 г) окислили 0,5 г CrO_3 , как описано выше. После упаривания хлороформного экстракта вещество восстанавливали $NaBD_4$ (0,2 г, 10 ч, 20° , 50% метанол). Смесь обработали катионитом КУ-2 (H^+) и упарили досуха, добавляя несколько раз метанол.

Остаток метилировали по методу Хакомори и делили на колонке с силикагелем. Выход дисахарид (XX) 0,04 г, трисахарид (XXI) 0,01 г. Метаполлиз олигосахаридов приводит к метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-глюкопиранозиду и смеси полиолов (которые содержали по три атома дейтерия) в случае (XX) и к моносахаридам (III), (VIII) и тем же полиолам для (XXI) в равном соотношении. Масс-спектр дисахарид (XX) содержал следующий набор пиков, m/e (I , % к иону с m/e 88): 428 (2), 426 (1,5), 383 (1), 298 (5,5), 238 (43), 219 (17), 187 (36), 155 (28), 134 (101), 101 (83), 91 (20), 90 (20), 89 (36), 88 (100), 45 (95). Масс-спектр трисахарид (XXI) (I , % к иону с m/e 187) : 632 (0,5), 630 (0,5), 586 (0,5), 514 (1),

502 (8), 501 (1), 500 (2), 483 (1), 455 (1), 442 (13), 441 (2), 440 (4), 423 (6), 410 (2), 391 (3), 382 (2), 298 (13), 238 (62), 219 (47), 187 (100), 155 (27), 134 (8), 127 (10), 117 (12), 115 (23), 111 (48), 101 (96), 91 (9), 90 (9), 89 (12), 88 (89) и 45 (73).

Метанолизаты олигосахаридов (XX) и (XXI) ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали методом ХМС. Масс-спектр 3-О-ацетил-1,1,5-три-*D*-1,2,4,5,6-пента-О-метилгексита содержал следующий набор пиков, *m/e* (*I*, % к иону с *m/e* 88): 252 (3), 250 (2), 207 (20), 206 (5), 205 (7), 175 (10), 147 (5), 146 (4), 145 (7), 144 (5), 134 (9), 101 (75), 91 (50), 90 (17), 89 (37), 88 (100), 59 (25), 45 (87) и 43 (100).

в) Ацетат восстановленного полисахарида (0,4 г) и 0,4 г сухого CrO_3 в 12 мл уксусной кислоты нагревали при 50° 1 ч. Смесь после охлаждения нейтрализовали CaCO_3 , экстрагировали хлороформом. Экстракт высушили Na_2SO_4 и упарили. Остаток восстанавливали NaNH_4 (0,5 г, 10 ч, 50% метанол). После обычной обработки смесь метилировали по методу Хакомори и делили на колонке с силикагелем. Выход олигосахаридов (XVIII) 0,03 г, (XIX) — 0,037, (XXII) — 0,021 и (XXIII) — 0,015 г. Метанолиз олигосахаридов приводит в случае (XVIII) к моносахаридам (III), (VIII) и гекситу, замещенному по третьему и (или) четвертому положению; для (XIX) — к метил-2,3,4,6-тетра-О-метил- (XXIV), метил-3,4,6-три-О-метил-*D*-глюкопиранозидам и гекситу; для (XXII) — к (III), (XXIV), (IX) и гекситу, для (XXIII) — к (III), (VIII), (IX), метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-маннопиранозиду и гекситу в равном отношении (идентифицированы методом ГЖХ). Частично метилированные производные выделяли препаративной ТСХ, метилировали CD_3I и анализировали методом ХМС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Свиридов А. Ф., Шашков А. С., Горин С. Е., Джикия О. Д., Чижов О. С., Бабьева И. П. (1979) Биоорганическая химия, 5, 408—417.
2. Nicuwdorp P. G., Bos P., Slooff W. Ch. (1974) *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*, 40, 241—254.
3. Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Бабьева И. П., Чижов О. С. (1974) Микробиология, 43, 666—671.
4. Babjeva I. P., Gorin S. E. (1975) *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*, 41, 185—191.
5. 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.
6. Mapping I. H., Green I. N. (1967) *J. Chem. Soc. (C)*, 2357—2363.
7. Методы химии углеводов (1967) пер. с англ. под ред. Н. К. Кочеткова, с. 77—79, «Мир», М.
8. Шашков А. С., Чижов О. С. (1976) Биоорганическая химия, 2, 437—497.
9. Gorin P. A. J. (1974) *Can. J. Chem.*, 52, 458—461; (1975) *Carbohydr. Res.*, 39, 1—10.
10. Nakomori S. (1964) *J. Biochem.*, 55, 205—208.
11. Kochetkov N. K., Wulfson N. S., Chizhov O. S., Zolotarev B. M. (1963) *Tetrahedron*, 19, 2209—2224.
12. Kuhn R., Baer H. H., Seelinger A. (1958) *Liebigs Ann. Chem.*, 611, 236—241.
13. Lindberg B., Lönngren J., Svensson S. (1975) *Advan. Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 31, 185—240.
14. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2774—2781.
15. Bjorndal H., Lindberg B., Pilotti Å., Svensson S. (1970) *Carbohydr. Res.*, 15, 339—349.
16. Laine R. A., Renkonen O. J. (1975) *Lipid Res.*, 16, 102—106.
17. Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M. (1977) *Carbohydr. Res.*, 54, 269—274.

Поступила в редакцию
29.VIII.1978

**POLYSACCHARIDES FROM LIPOMYCES. 9. THE STRUCTURE OF THE
EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES FROM
LIPOMYCES KONONENKOEAE**

SVIRIDOV A. F., BERDIMBETOVA G. E., SHASHKOV A. S., GORIN S. E.,
BAB'EVA I. P., CHIZHOV O. S., KOCHETKOV N. K.

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

The total structure of the extracellular polysaccharide from the *L. kononenkoeae* st. 269S has been determined using chemical analysis and ¹³C-NMR spectroscopy. The identity of extracellular polysaccharides produced by the *L. kononenkoeae* st. 269S, 269R, 283S, 283R and 284 has been established by ¹³C-NMR spectroscopy. On the basis of the data obtained, the repeating unit of these polysaccharides has been ascribed the following structure:

