



УДК 547.458.02+577.11

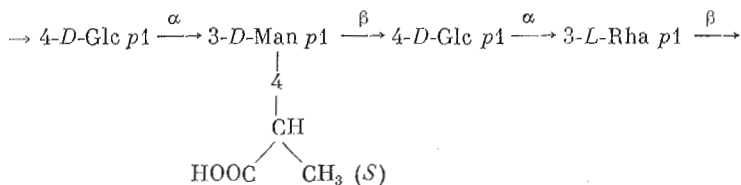
ПОЛИСАХАРИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ

4.* СТРУКТУРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДА, ПРОДУЦИРУЕМОГО *Mycobacterium album* В-88

*Свиридов А. Ф., Арифходжаев Х. А., Шашков А. С.,
Ботвинко И. В., Чижов О. С., Кочетков Н. К.*

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

Методами метилирования, частичного кислотного гидролиза, окислением ангидридом хромовой кислоты и периодатом натрия и с помощью анализа спектра ^{13}C -ЯМР определено строение внеклеточного полисахарида, продуцируемого *M. album* В-88:

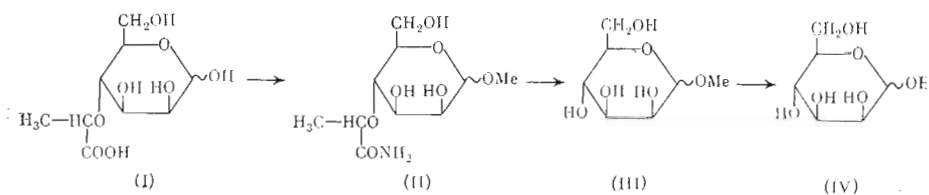


Полисахариды микроорганизмов чрезвычайно разнообразны по структуре и свойствам. Особый интерес вызывают внеклеточные слизевые полисахариды, выделяемые микроорганизмами в ростовую среду. Знание структуры этих полисахаридов позволяет глубже понять эволюционные взаимоотношения микроорганизмов и выявить связи между строением экзогликанов и их биологической функцией. В этой статье мы сообщаем результаты изучения строения внеклеточного полисахарида, продуцируемого *M. album* В-88.

Полисахарид был выделен из культуральной жидкости осаждением цетилапиридинийбромидом, что указывает на его кислую природу. При хроматографировании на Gromatronix на адсорбенте SPG-10 полисахарид выходит одним пиком, и молекулярный вес, определенный в этих условиях по декстранам, составил свыше 150 000. В кислотном гидролизате полисахарида методом ВХ были идентифицированы глюкоза, рамноза и 4-О-[(S)-1'-карбоксиэтил]-D-манноза (маннолактиловая кислота) (I) [1, 2]. Абсолютная конфигурация D-глюкозы была определена окислением D-глюкозоксидазой, L-рамнозы — определением удельного вращения ацетата полиола [3].

Природа и абсолютная конфигурация моносахарида (I), выделенного из гидролизата полисахарида с помощью анионита CG-400 (HCO_3^-), устанавливалась по следующей схеме:

* Сообщение 3 см. [1].



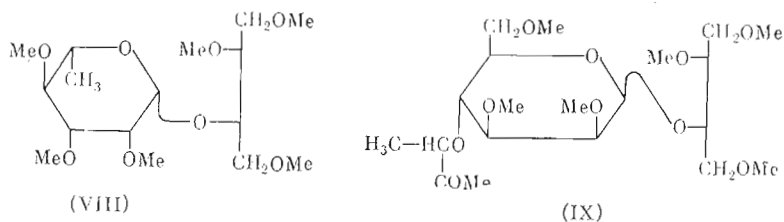
Обработка амида метилгликозида (II) гипохлоритом натрия [4] приводит к метилманнозиду, положительное удельное вращение которого (и его ацетата) позволяет отнести маннозу к *D*-ряду [5, 6]. При гидролизе метилманнозида образуется манноза (IV), идентифицированная методом БХ и в виде ацетата полиола методом ГРХ. (*S*)-конфигурация остатка молочной кислоты следует из совпадения удельного вращения моносахарида (I) с таковым для аналогичного моносахарида [2], абсолютная конфигурация которого доказана как *S* [1], а также полного совпадения спектров ^{13}C -ЯМР их метилгликозидов*.

В гидролизате полисахарида, восстановленного дибораном [7] с последующим восстановлением NaBD_4 и ацетилированием, методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы ацетаты *L*-рамнита, *D*-сорбита и полиола, соответствующего моносахариду (I), в соотношении 1 : 2 : 1 соответственно.

Таким образом, повторяющееся звено полисахарида должно включать в себя минимум два остатка *D*-глюкозы и по одному *L*-рамнозы и моносахарида (I).

Метилирование [8] полисахарида с последующим восстановлением сложноеэфирной группы остатка молочной кислоты LiAlH_4 в эфире, формолизом, гидролизом, восстановлением NaBD_4 и ацетилированием приводит к смеси 1-дейтеропроизводных 2,4-ди-*O*-метил-1,3,5-три-*O*-ацетил-*L*-рамнита (V), 2,3,6-три-*O*-метил-1,4,5-три-*O*-ацетил-*D*-сорбита (VI) и 2,6-ди-*O*-метил-4-*O*-(1'-ацетоксипропил-2)-1,3,5-три-*O*-ацетил-*D*-маннита (VII) в соотношении 1 : 2 : 1 соответственно. Полиолы (V) — (VII) были идентифицированы с помощью хромато-масс-спектрометрии [9]. Другие продукты в смеси не обнаружены, что указывает на высокую степень регулярности строения полисахарида. Таким образом, *D*-глюкоза связана в полисахариде 1→4-связями, а *L*-рамноза и моносахарид (I) — 1→3-связями.

При окислении полисахарида NaIO_4 с последующим восстановлением NaBH_4 , мягким гидролизом [10] и метилированием [8] методом хромато-масс-спектрометрии в смеси идентифицированы практически только два гликозида (VIII, IX):



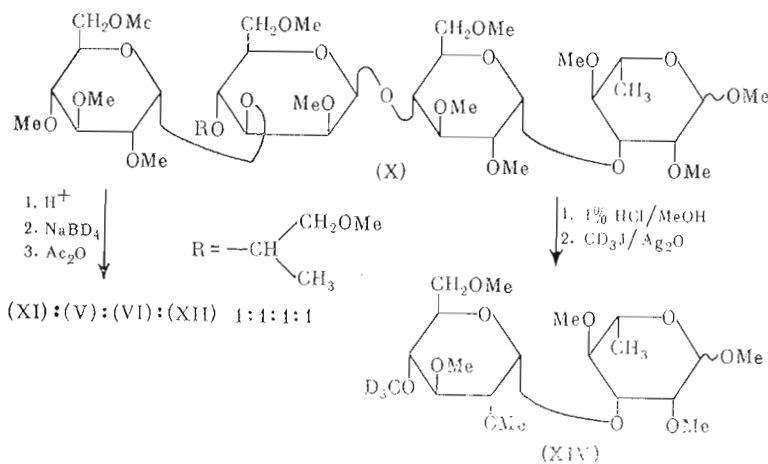
В масс-спектрах гликозидов (VIII) и (IX) имеются интенсивные ионы с m/e 147 и 207, наличие которых показывает, что на восстанавливаемом конце этих соединений находится метилированный тетрит [11]. Ионы с m/e 189, 157 и 291, 259, 187 в спектрах соединений (VIII) и (IX) соответственно определяют природу моносахаридных остатков как *L*-рамнозу для (VIII) и моносахарид (I) для (IX). Выделение гликозидов (VIII) и (IX) подтверждает, что *D*-глюкопиранозные остатки связаны в полисахариде

* Ранее [1] было показано, что спектры ^{13}C -ЯМР *S*- и *R*-изомеров моносахарида (I) различаются по положению сигналов некоторых атомов углерода.

1→4-связями, а *L*-рамноза и моносахарид (I) — 1→3-связями, а также показывает, что остатки *D*-глюкозы в полисахариде разделены между собой *L*-рамнозой и моносахаридом (I).

Найденная таким образом последовательность моносахаридных остатков была подтверждена опытами по частичному расщеплению полисахарида. При частичном гидролизе (0,25 н. H₂SO₄, 100°, 4 ч) полисахарида с последующим электрофорезом на бумаге в пиридин-ацетатном буфере удается выделить два соединения, различающиеся по подвижности. При гидролизе этих олигосахаридов обнаружены те же моносахариды, входящие в полисахарид, причем в аналогичном соотношении. Полученные олигосахариды метилировали [8], восстанавливали LiAlH₄ в эфире и еще раз метилировали по методу Куна [12]. Формолиз, гидролиз, восстановление NaBD₄ и ацетилирование этих олигосахаридов приводит к смеси 1-дейтеро-производных полиолов. С помощью хромато-масс-спектрометрии в более подвижном олигосахариде (X) были идентифицированы 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-1,5-ди-*O*-ацетил-*D*-сорбит (XI), полиолы (V), (VI) и 2,6-ди-*O*-метил-(1'-метоксипропил-2)-*D*-маннит (XII) в соотношении 1:1:1:1. В олигосахариде, обладающем меньшей подвижностью (XIII), были обнаружены те же полиолы в соотношении 1:1, 7:2, 6:2 соответственно. Приведенные данные позволяют для олигосахаридов (X) предложить структуру тетрасахарида, для (XIII) — октасахарида.

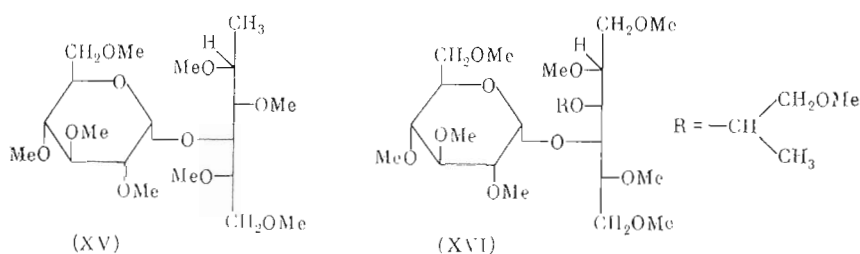
Частичный метанолиз тетрасахарида (X) с последующим метилированием CD₃I [12] приводит главным образом к дисахариду (XIV) (идентификация хромато-масс-спектрометрией):



Масс-спектр дисахаридов (XIV) содержит пики, отвечающие как остатку *L*-рамнозы (*m/e* 249, 189, 157 и др.), так и остатку *D*-глюкозы (*m/e* 222, 190, 187 и др.). Соотношение интенсивностей пиков с *m/e* 88 и 91, 101 и 104, 187 и 190 однозначно указывает на то, что CD₃I-группа занимает положение C4 остатка *D*-глюкозы [13, 14]. На основании приведенных данных, включая метилирование и периодатное окисление полисахарида, тетрасахариду (X) можно однозначно приписать строение, указанное на схеме, причем он является повторяющимся звеном полисахарида.

Наконец, для определения конфигурации гликозидных связей и окончательного установления строения полисахарида было проведено окисление ацетата восстановленного полисахарида ангидридом хромовой кислоты в искусственном ангидриде в условиях, описанных нами ранее [15]. Смесь продуктов окисления ацетата восстановленного полисахарида переводилась обработкой NaBH₄ и последующим метилированием [8] в *O*-метилвые эфиры гликозилполиолов, которые далее исследовались методом хромато-масс-спектрометрии. В реакционной смеси практически в качестве

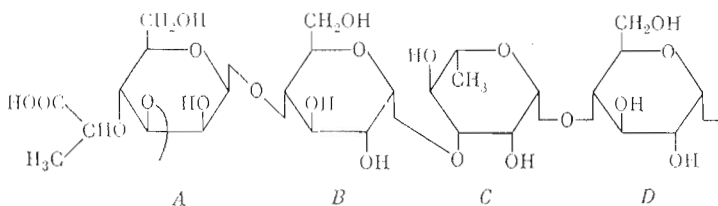
единственных продуктов реакции были идентифицированы гликозилполиололы (XV) и (XVI), строение которых строго следует из анализа их масс-спектров:



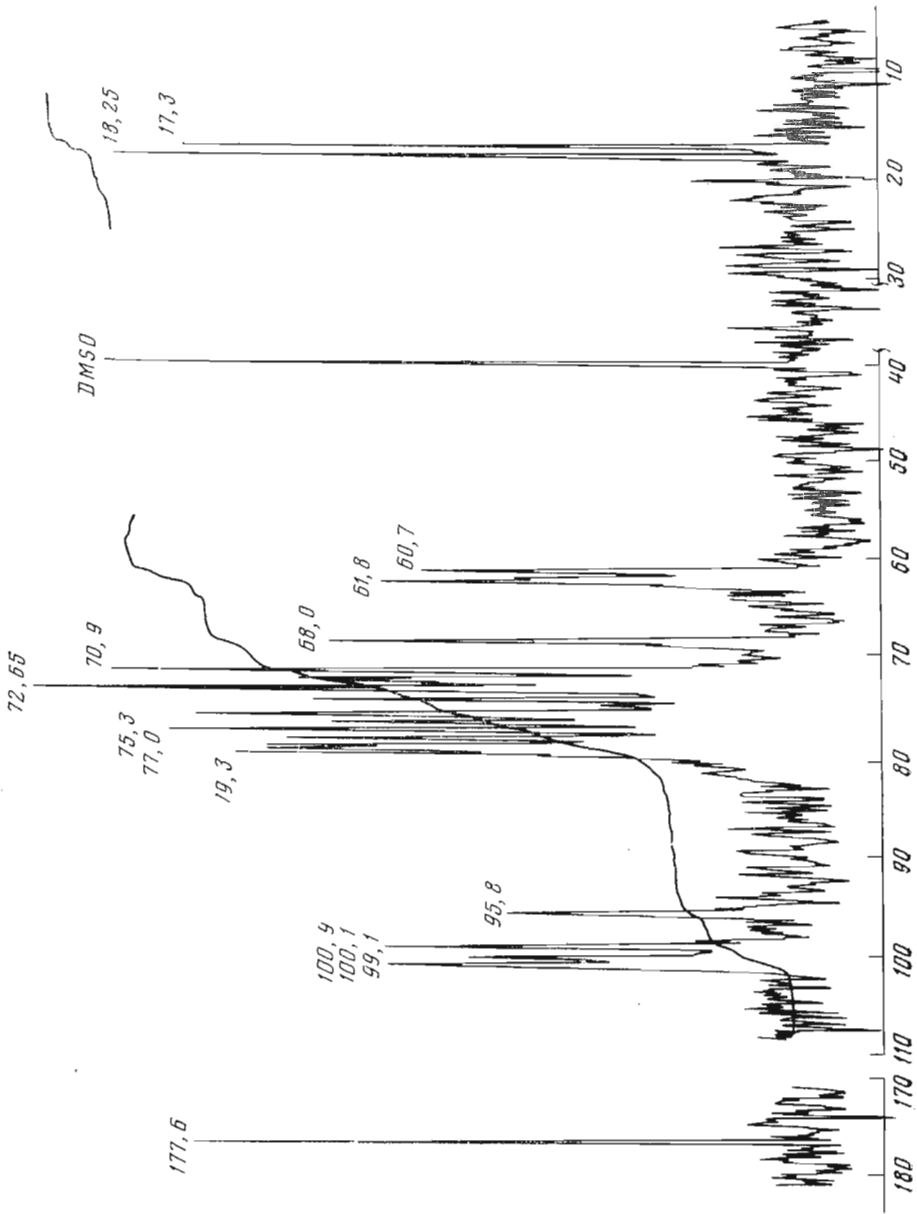
В масс-спектрах соединений (XV) и (XVI) имеются интенсивные ионы с m/e 219, 187, наличие которых однозначно показывает, что на невозстанавливаемом конце дисахаридов (XIV) и (XV) находится полностью метилированная гексоза. Из присутствия ионов с m/e 205 и 265 в спектре (XV) следует, что на восстанавливаемом конце находится полиолы, образовавшиеся при восстановлении 5-кетораминоновой кислоты. Остальные пики в спектре дисахарида (XV) соответствуют приписываемой структуре. Аналогично в спектре соединения (XVI) наряду с пиками, отвечающими полностью метилированной гексозе, имеются интенсивные пики с m/e 293, и 353, отвечающие полиолам, которые получают при восстановлении 5-кетоальдоновой кислоты, соответствующей моносахариду (I). Остальные пики в спектре этого дисахарида также соответствуют приписываемой структуре. Кроме того, метанолиз дисахаридов (XV) и (XVI) приводит к полностью метилированному метилгликозиду и соответствующим полиолам в отношении 1 : 1 соответственно.

Выделение дисахаридов (XV) и (XVI) окончательно подтверждает, что один остаток *D*-глюкозы в полисахариде связан $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связью с *L*-рамнозой, а другой — $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связью с 4-*O*-[(*S*)-1'-карбокситил]-*D*-маннозой (I); с другой стороны, *L*-рамноза и моносахарид (I) связаны $\beta 1 \rightarrow 4$ -гликозидными связями с *D*-глюкозой.

Совокупность приведенных выше данных позволяет приписать влеклеточному полисахариду, продуцируемому *M. album* В-88, следующее строение:



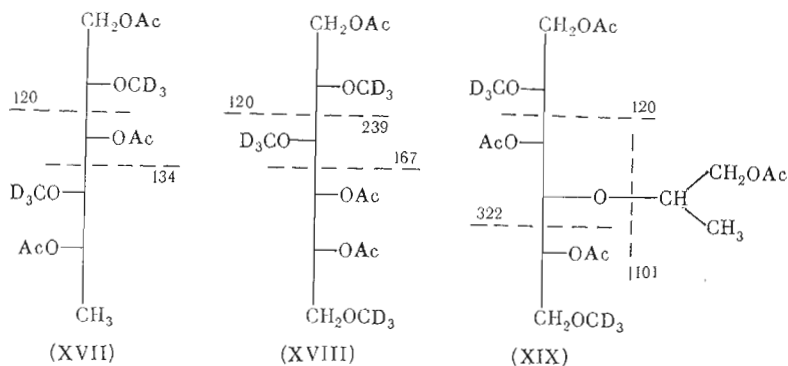
В спектре ^{13}C -ЯМР (см. рисунок) некоторые характерные сигналы позволяют подтвердить правильность предложенной структуры полисахарида. В области резонанса аномерных атомов углерода имеется четыре четких сигнала с интегральной интенсивностью 1 : 1 : 1 : 1, что отвечает составу повторяющегося звена, установленного химическими методами. В низкопольной области спектра имеется единственный сигнал при 177,6 м.д., отвечающий резонансу карбонильной группы звена А. В высокопольной области спектра расплослены два сигнала при 18,25 и 17,3 м.д., принадлежащие метильным группам звеньев С и А соответственно. Три сигнала атомов углерода с первичной гидроксильной группой при 60,6—61,8 м.д. доказывают наличие трех гликопираноз, не замещенных по С6-атомам углерода. Сигнал двойной интегральной интенсивности 68 м.д. гово-



Спектр ¹³С-ЯМР вклеточно-го полисахарида, продуцируемого *M. albini* В-88 (рН 7, D₂O, 80°, внутренний эталон — DMSO)

рит о присутствии двух звеньев (*A* и *C*) с маннозной конфигурацией, которые не замещены по C2. Так как в спектре полисахарида в области резонанса аномерных атомов углерода отсутствуют сигналы ниже 101 м.д., то остаткам *D*-глюкозы следует приписать α -*D*-конфигурацию. Наконец, общее количество атомов углерода в спектре полисахарида соответствует сумме атомов углерода звеньев *A*--*D*. Таким образом, спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида в общем соответствует приписываемой структуре, определенной совокупностью химических методов.

Однако кажется необычным положение сигнала одного из аномерных атомов углерода при 95,8 м.д. Необычный высокопольный сдвиг этого сигнала заставил нас предположить присутствие заместителя при C2 одного из остатков *D*-глюкопираноз. Поскольку в полисахаридах микобактерий часто встречаются метильные группы [16], то первое предположение о характере замещения при одном из остатков *D*-глюкозы заключалось в наличии именно этой группы. С целью определения положения предполагаемой метильной группы полисахарид метилировали CD_3I [8], восстанавливали LiAlH_4 и далее с помощью хромато-масс-спектрометрии изучали ацетаты частично дейтерометилированных полиолов (XVII) — (XIX):



Ни один из фрагментов, образующихся при распаде полиолов (XVII) — (XIX) под действием электронного удара, не содержит CH_3 -группы; следовательно, ее присутствие в полисахариде на основании этого эксперимента исключается.

Для объяснения аномально высокого сдвига одного из аномерных атомов углерода можно также предположить образование внутреннего лактона между остатком молочной кислоты в звене *A* и гидроксильной группой при C2 соседнего остатка *D*-глюкозы. Однако восстановление полисахарида NaBH_4 практически не изменяет его спектра. Отрицательный анализ на сульфат [17], фосфат [18] и нитрогруппу реакцией с дифениламином [19], т. е. на анионы, которые присутствовали в заметном количестве в ростовой среде, также не позволяли выяснить причину столь высокого сдвига одного из аномерных атомов углерода.

Таким образом, причина аномально высокого сдвига одного из аномерных атомов углерода требует дальнейшего изучения.

Экспериментальная часть

Масс-спектры соединений снимали на приборе Varian MAT CH-6, хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Varian MAT-111 Gnom, ГЖХ-анализ — на приборе Varian-1700 и ЛХМ-8-МД на колонках длиной 1–2 м с 5% НПГС, 5% SE-30, 3% ECNSS-3М, OV-1 на хромосорбе W, программное изменение температуры от 80–100° до максимальной для данной фазы. Удельное вращение измеряли на приборе

Perkin-Elmer 141-M при длине волны 589 нм. Спектры ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Varian WP-60 с рабочей частотой по углероду 15,08 Гц. Исследовали растворы веществ в D_2O , внутренний эталон — диметилсульфоксид, сдвиг которого принят за 39,445 м.д. (установлен в специальном эксперименте), химические сдвиги всех линий пересчитали к ТМС (σ -шкала). Температура съемки 35—70°, длина импульса 3 мкс, 30°, частота повторения 1,4 с. Стабилизацию условий резонанса проводили по ядрам дейтерия растворителя. БХ осуществляли в системе бутанол — пиридин — вода, 6:4:3. Биомассу наращивали по работе [20] в среде следующего состава, г/л: KNO_3 — 2; MgSO_4 — 0,8; KH_2PO_4 — 0,6; Na_2HPO_4 — 1,4; MnSO_4 — 0,1; FeSO_4 — 0,01; $n\text{-C}_{10}\text{H}_{24}$ — 2% (v/v); вода водопроводная, рН среды 7,0.

Выделение полисахарида. Полисахарид осаждали из культуральной жидкости цетилпиридинийбромидом (5% раствор) при 40—50°. Осадок отделяли центрифугированием при 7000—8000 об/мин, промывали 0,1%-ным цетилпиридинийбромидом, водой, растворяли в 4 М NaCl и обрабатывали хлороформом (3×300 мл). Раствор полисахарида диализовали 3 сут против дистиллированной воды, после чего обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+) и лиофилизовали. Выход 2,5 г из 1 л культуральной жидкости; $[\alpha]_D^{20} +91,1^\circ$ (c 1,22; вода).

При хроматографировании на жидкостном хроматографе Cromotronic на адсорбенте CPG-10 (Electronucleonics, США) при температуре 20° (длина колонки 3 м, скорость потока воды 0,4 мл/мин, УФ-детектор при 254 нм) полисахарид выходит одним пиком, $M > 150\,000$ (по декстранам).

После гидролиза полисахарида (2 н. H_2SO_4 , 100°, 8 ч) методом БХ идентифицированы рамноза, глюкоза и моносахарид (I).

Восстановление полисахарида дибораом проводили по методу [7]. Восстановленный полисахарид гидролизовали в тех же условиях. Методом БХ идентифицированы глюкоза, рамноза и восстановленный по карбоксильной группе моносахарид (I). Гидролизат полисахарида восстанавливали NaBH_4 , ацетиловали укусным ангидридом в пиридине и методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировали ацетаты рамнита, сорбита и полиола из восстановленного по карбоксильной группе моносахарида (I) в отношении 1:2:1 соответственно.

Определение абсолютной конфигурации *D*-глюкозы проводили путем окисления *D*-глюкозоксидазой. Ацетат *L*-рамнита имел $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$ (c 1,15; хлороформ). Данные [3]: $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$ (c 5; хлороформ).

Выделение кислоты (I). 0,2 г полисахарида гидролизовали 2 н. H_2SO_4 (100°, 8 ч). Гидролизат обрабатывали анионитом CG-400 (HCO_3^-) до нейтральной реакции. Анионит промывали водой до отсутствия нейтральных сахаров (фенол — H_2SO_4) и затем 20% CH_3COOH . Полученную кислотную фракцию еще раз пропускали через анионит CG-400. Выход кислоты (I) 0,053 г, $[\alpha]_D^{20} +13,4^\circ$ (c 1,18; вода) (ср. $[\alpha]_D^{20} +14,2^\circ$ (c 2; вода) [21]).

Определение природы моносахаридного остатка и абсолютной конфигурации кислоты (I). а) 0,035 г кислоты (I) нагревали в сухом метаноле, содержащем 2% HCl (100°, 4 ч в ампуле). Раствор нейтрализовали NH_3 и упаривали досуха. Остаток растворяли в абс. метаноле, насыщенном сухим NH_3 (0°, 24 ч), упаривали и обрабатывали 5 мл 10% NaOCl при 20° в течение 4 ч [4]. Добавляли 0,1 г NaBH_4 , нейтрализовали укусной кислотой и упаривали досуха. Остаток ацетиловали укусным ангидридом в пиридине. Ацетат маннозида (III) извлекали хлороформом, $[\alpha]_D^{20} +35,2^\circ$ (c 2,5; хлороформ).

Ацетат маннозида (III) растворяли в 10 мл 0,2 н. CH_3ONa в метаноле, смесь выдерживали при 20° 5 ч, нейтрализовали укусной кислотой и упаривали досуха. Остаток растворяли в воде и обрабатывали амберлитом CG-400 (HCO_3^-). Элюированием водой получили метил- α , β -*D*-маннопиранозид (III), идентичный заведомому образцу по данным БХ. Выход

0,020 г, $[\alpha]_D^{20} +68^\circ$ (с 2,0; вода). Гидролиз метилманнозида (III) (2 н. H_2SO_4 , 100° , 5 ч) приводит к D-маннозе, идентифицированной методами БХ и ГЖХ (в виде ацетата полиола).

б) 0,3 г полисахарида, тщательно высушенного над P_2O_5 (60° , 10 ч) в вакууме, кипятили 24 ч в абс. метаноле, содержащем 2% HCl . Смесь нейтрализовали раствором аммиака и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл воды, подщелачивали до pH 9 раствором KOH и нагревали 5 ч при 100° , поддерживая pH 9 периодическим добавлением раствора щелочи. Смесь пропускали через колонку анионита CG-400 (HCO_3^-) и промывали несколько раз водой до отсутствия нейтральных сахаров (H_2SO_4 — фенол). После этого колонку промывали несколько раз 20%-ной уксусной кислотой. Элюат упаривали досуха. По данным БХ, в кислой фракции содержался только метилгликозид моносахарида (I), $[\alpha]_D^{20} +40,8^\circ$ (с 2,8; вода). Аналогично был получен метилгликозид соответствующего моносахарида из полисахарида *M. lacticolum* штамм 121, $[\alpha]_D^{20} +38,9^\circ$ (с 4,3; вода). Спектры ^{13}C -ЯМР метилгликозидов моносахарида (I) в D_2O , pH 7, выделенных из двух полисахаридов, полностью совпадают: (C1) 101,4; (C2) 71,1; (C3) 70,6; (C4) 76,7; (C5) 72,0; (C6) 61,2; (CH) 77,8; (CH₃) 19,2; (HOOC) 177,6; (OMe) 55,4 м.д. (см. [1]).

Метилирование полисахарида. 0,03 г полисахарида метилировали по методу Хакомори [8]. Продукт после нейтрализации уксусной кислотой диализовали 3 сут против проточной воды, диализат упаривали досуха и остаток сушили над P_2O_5 . Выход 0,022 г, $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$ (с 2,6; хлороформ).

0,01 г метилированного полисахарида восстанавливали $LiAlH_4$ в эфире (8 ч, кипячение). Формолиз 85% $HCOOH$ (1 ч, 100°), гидролиз 0,5 н. H_2SO_4 (8 ч, 100°), восстановление $NaBD_4$ в 50% водном растворе метанола (12 ч) и ацетилирование (уксусный ангидрид — пиридин), по данным хромато-масс-спектрометрии, приводят к полиолам (V), (VI) и (VII) [9] в отношении 1:2:1.

Частичный гидролиз. 0,25 г полисахарида нагревали в 0,25 н. H_2SO_4 (5 ч, 100°). Гидролизат нейтрализовали анионитом CG-400 (HCO_3^-). Смолу промывали несколько раз водой до отсутствия нейтральных сахаров (H_2SO_4 — фенол), затем 20%-ной уксусной кислотой. Кислый элюат упаривали и остаток делили с помощью электрофореза на бумаге FN-18 (пиридин-ацетатный буфер, pH 4,5; 40 В/см, 2 ч). Выделено 0,065 г олигосахаридов (X) (E_f 0,52) и 0,040 г олигосахаридов (XIII) (E_f 0,44). Гидролиз (5 мг) (1 н. H_2SO_4 , 8 ч, 100°), восстановление $NaBH_4$ и ацетилирование уксусным ангидридом в пиридине олигосахаридов (X) и (XIII) приводят к ацетатам сорбита и рамнита в отношении примерно 2:1.

Остальное количество олигосахаридов метилировали [8], восстанавливали $LiAlH_4$ в эфире (кипячение, 10 ч). По 10 мг каждого метилированного олигосахаридов (X) и (XIII) обрабатывали 85%-ной $HCOOH$ (1 ч, 100°), гидролизовали 2 н. H_2SO_4 (1 ч, 100°). Смесь нейтрализовали $BaCO_3$, фильтровали, восстанавливали $NaBD_4$ (12 ч). После обработки K_2U-2 (H^+) и упаривания с метанолом пробы ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине и методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировали 1-дeйтерoпрoизводные полиолов (XI), (V), (VI), (XII) [9] в отношении 1:1:1:1 для олигосахаридов (X) и 1:1, 7:2, 6:2 для олигосахаридов (XIII).

Масс-спектр полиола (V) содержал следующий набор пиков [m/e (I , % к 118)]: 234(49), 203(8,5), 202(49), 187(12), 173(14), 160(16), 143(10), 141(12), 129(28), 128(71), 118(100), 102(15), 101(94), 100(43), 99(41), 89(94), 88(21), 87(39), 45(36,6), 43(85).

20 мг метилированного тетрасахарида (X) нагревали в 1% HCl в абс. метаноле (1 ч, 100°). Смесь нейтрализовали аммиаком, упаривали досуха и экстрагировали хлороформом. Экстракт упаривали, сушили в ваку-

ум-эксикаторе над P_2O_5 и тридейтерометилировали [12]. После обычной обработки смесь анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. В области дисахаридов идентифицировали соединение (XIV), масс-спектр которого содержал следующий набор пиков [m/e (I , % к 145)]: 249(16), 222(3,2), 190(21), 189(16), 187(7), 157(8), 148(32), 145(100), 129(14), 117(22), 111(22), 104(43), 101(30), 91(43), 88(94), 78(24), 75(21) и 45(34).

Окисление восстановленного полисахарида ангидридом хромовой кислоты. Окисление ацетата восстановленного дибораном [7] полисахарида проводили по методу, описанному ранее [15]. 0,045 г ацетата растворяли в 3 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида и при 50° добавляли раствор 0,15 г CrO_3 в 3 мл уксусного ангидрида. Перемешивали смесь 1 ч при 50° , охлаждали до 0° , разбавляли 20 мл воды и нейтрализовали $BaCO_3$. Продукт экстрагировали хлороформом (3×100 мл), промывали водой и упаривали досуха. Остаток растворяли в 50% водном метаноле, добавляли 0,2 г $NaBH_4$ и выдерживали смесь 12 ч. После обычной обработки смесь метилировали [8] и далее исследовали с помощью хромато-масс-спектрометрии. В области выхода олигосахаридов идентифицировали два дисахариды (XV) и (XVI) в примерно равном отношении.

Масс-спектр дисахариды (XV) содержал следующий набор пиков [m/e (I , % к 187)]: 395(1,3), 381(1,7), 363(0,4), 351(0,9), 265(57), 219(23), 205(32), 187(100), 173(43), 155(39), 145(27), 141(45), 127(37), 115(58), 113(46), 111(67), 101(76), 88(82), 45(52).

Масс-спектр дисахариды (XVI) [m/e (I , % к 187)]: 439(3,3), 407(7,5), 353(2,8), 293(27), 219(33), 187(100), 173(31), 171(46), 159(56), 155(50), 127(42), 111(75), 101(62), 88(52), 75(43), 45(36).

Метанализ дисахаридов (XV) и (XVI), по данным ГЖХ, привел к 1,2,3,4,6-пента-О-метил-*D*-глюкопиранозиду и соответствующим полиолам в отношении 1 : 1.

Периодатное окисление полисахарида. 0,1 г полисахарида растворяли в 50 мл воды, добавляли 50 мл 0,04 М раствора $NaIO_4$ и выдерживали смесь при 5° до постоянного значения расхода $NaIO_4$, контроль на спектрофотометре VSU 2-P (Carl Zeiss, Jena) при 223 нм 24 ч. После разрушения избытка $NaIO_4$ этиленгликолем смесь диализовали против дистиллированной воды 3 сут, упаривали до 20 мл, восстанавливали $NaBH_4$ (0,2 г, 24 ч) и нейтрализовали уксусной кислотой. После подкисления 0,2 н. HCl до pH 1 смесь выдерживали при 20° 6 ч, а затем нейтрализовали $BaCO_3$, фильтровали, обрабатывали $KU-2$ (H^+) и упаривали досуха. Продукт метилировали [8] и далее исследовали методом хромато-масс-спектрометрии. В смеси идентифицировали полностью метилированный рамнозилтетрит (VIII), масс-спектр которого содержал следующий набор пиков: [m/e (I , % к 207)]: 207(100), 189(35), 157(15), 147(50), 129(32), 115(53), 101(47), 88(90), 75(32), 45(30), и 2,3,6-три-О-метил-4-О-(1'-метоксипропил)-маннозилтетрит (IX) [m/e (I , % к 207)]: 377(1,6), 351(0,8), 319(16,6), 291(0,5), 259(5,5), 227(10), 207(100), 187(19,4), 173(83), 160(35), 155(14), 147(83), 115(67), 111(34), 101(36), 89(44), 88(66), 71(36) и 45(33).

Определение предполагаемого замещения по C2 остатка D-глюкопиранозы. а) Полисахарид (0,1 г) метилировали [8] CD_3I и восстанавливали $LiAlH_4$ в смеси хлористый метилен — эфир, 1 : 3. После обработок, описанных выше, методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировали в смеси полиолы (XVII) — (XIX) в соотношении 1 : 2 : 1 соответственно. Масс-спектры полиолов содержали следующие наборы пиков [m/e (I , % к 120)]: 239(42,5), 204(43,7), 193(8), 179(62,5), 176(11,2), 162(12,5), 134(99,8), 127(50), 120(100), 107(37,5), 102(12,5), 92(81), 75(31), 43(67) — для полиола (XVII);

239(100), 179(69), 167(49), 162(19), 149(26), 145(33), 137(75),

132(75), 121(44), 120(100), 119(88), 107(94), 102(94), 101(44), 90(75), 48(45), 43(67) — для полииола (XVIII);

370(2), 325(20), 322(17), 250(28), 190(11), 163(11), 162(11), 150(21), 132(27), 128(24), 127(11), 120(100), 115(24), 111(17), 102(44), 101(100), 48(30), 43(53) — для полииола (XIX).

б) 0,15 г полисахарида растворяли в 10 мл воды, добавляли 0,2 г NaBH_4 и восстанавливали при 20° 24 ч. Продукт обрабатывали КУ-2 (H^+), диализовали против дистиллированной воды 48 ч и лиофилизировали. Выход 0,14 г; $[\alpha]_D^{20} + 90,5^\circ$ (с 1,0; вода). Спектр ^{13}C -ЯМР идентичен изображенному на рисунке.

в) 10 мг полисахарида растворяли в холодной концентрированной H_2SO_4 . Через 15 мин добавляли 1–2 капли раствора дифениламина в H_2SO_4 . Характерной голубой окраски не наблюдали [19].

г) Анализ на сульфат-анион [17] отрицательный.

д) Анализ на фосфат-анион [18] отрицательный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арифходжаев Х. А., Свиридов А. Ф., Шашков А. С., Чижов О. С., Кочетков Н. К. (1979) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 2, 438–442.
2. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Арифходжаев Х. А. (1976) Биоорганич. химия, 2, 1140–1141.
3. McNeely W. H., Binkley W. W., Wolfrom M. L. (1945) J. Amer. Chem. Soc., 67, 527–529.
4. Уэллис Э. С., Лэн Дж. Ф. (1951) в сб.: Органические реакции, т. 3, с. 267, Изд-во иностр. лит., М.
5. Fischer E., Veensch L. (1896) Chem. Ber., 29, 2927–2931.
6. Helferich B., Dave G. (1958) Chem. Ber., 91, 1790–1793.
7. Whistler R. L., Towle G. A. (1970) Arch. Biochem. and Biophys., 138, 39–43.
8. Nakomori S. (1964) J. Biochem., 55, 205–208.
9. Björndal H., Lindberg B., Pilloti A., Svensson S. (1970) Carbohydr. Res., 15, 339–349.
10. Методы химии углеводов (1967) пер. с англ. под ред. Н. К. Кочеткова, с. 236–241, «Мир», М.
11. Karkkänen J. (1970) Carbohydr. Res., 14, 27–30.
12. Kuhn R., Baer H. H., Seelinger A. (1958) Liebigs Ann. Chem., 611, 236–241.
13. Kochetkov N. K., Wulfson N. S., Chizhov O. S., Zolotarev B. M. (1963) Tetrahedron, 19, 2209–2224.
14. 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., 2304–2310.
15. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Бабьева И. П. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2774–2780.
16. Smith W. L., Ballou C. E. (1973) J. Biol. Chem., 248, 7118–7125.
17. Климов В. А. (1967) Основные микрометоды анализа органических соединений, «Химия», М.
18. Weil-Malherbe H., Green R. (1951) Biochem. Z., 49, 286–289.
19. Oldham J. W. H. (1925) J. Chem. Soc., 127, 2840–2847.
20. Гоголева Е. В., Максимов В. Н., Гречушкина Н. Н., Егоров Н. С. (1976) Микробиология, 45, 800–804.

Поступила в редакцию
11.VIII.1978

POLYSACCHARIDES OF MYCOBACTERIA. 4. STRUCTURE OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *MYCOBACTERIUM ALBUM* B-88

SVIRIDOV A. F., ARIFKHODZHAEV Kh. A., SHASHKOV A. S.,
BOTVINKO I. V., CHIZHOV O. S., KOCHETKOV N. K.

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

The following structure of the extracellular polysaccharide from *Mycobacterium album* B-88 has been determined using methylation, partial acid hydrolysis, oxidation with chromium trioxide and sodium periodate, as well as ^{13}C -NMR spectroscopy:

