



УДК 547.458.418.02:543.422.23+577.41

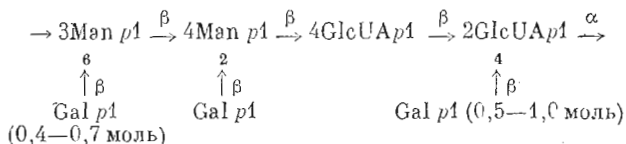
## ПОЛИСАХАРИДЫ *LITROMYCES*

10\*. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ,  
ПРОДУЦИРУЕМЫХ *L. KONONENKOAЕ* И *L. STARKEYI* (II)  
МЕТОДОМ <sup>13</sup>C-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Шашков А. С., Гуллыев Н., Свиридов А. Ф.,  
Горин С. Е.

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

С помощью спектроскопии <sup>13</sup>C-ЯМР была определена структура внеклеточных полисахаридов, продуцируемых *L. kononenkoe* (5 полисахаридов) и *L. starkeyi* (II) (21 полисахарид). Они представляют собой гетерополисахариды, в основе структуры которых лежит повторяющаяся звено из двух остатков *D*-маннопиранозы и двух остатков *D*-глюкуроновой кислоты в пиранозной форме; к некоторым из них присоединены ответвления из остатков *D*-галактопиранозы:



Спектроскопия <sup>13</sup>C-ЯМР становится одним из важнейших методов исследования строения полисахаридов и других биополимеров [2]. При минимуме первоначальной информации (например, качественный и количественный моносахаридный состав) этот метод позволяет сделать существенные выводы о строении биополимеров и наметить дальнейшие пути их исследования. В отдельных случаях [3, 4] спектроскопия <sup>13</sup>C-ЯМР дает возможность обойтись без трудоемких деструктивных химических методов. Это особенно важно при исследовании большой серии однотипных полисахаридов. Совершенно необходимо проводить полное химическое изучение каждого члена серии. Достаточно исследовать строение одного типового полисахарида, а строение других вывести путем сравнения их спектров.

Ранее [1, 5] мы описали полисахариды, продуцируемые *L. starkeyi* (I) и *L. kononenkoe* 269S, строение которых было установлено методом химического анализа и подтверждено данными <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии. Определение структуры этих соединений позволяет провести анализ спектроскопических данных по другим родственным полисахаридам с целью определения их строения. В данной работе приведены результаты исследования методом <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии 26 полисахаридов, продуцируемых различными штаммами *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (21 и 5 полисахари-

\* Сообщение 9 см. [1].

дов соответственно). Было установлено, что в их состав входит *D*-манноза, *D*-глюкуроновая кислота и *D*-галактоза в соотношении 1 : 1 : 1 (для полисахаридов *L. kononenkoe* количество *D*-галактозы в этом соотношении  $\geq 1$ ) [6].

Учитывая некоторые различия спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe*, их можно разделить на три подгруппы. Первой подгруппе соответствуют спектры, в которых основные аналитические линии имеют целочисленные (единичную или кратную единице) интегральные интенсивности (рис. 1). К их числу относятся спектры полисахаридов, продуцируемых *L. starkeyi* (II) (21 полисахарид) и *L. kononenkoe* 283S и 269R (первая подгруппа). В спектрах этих полисахаридов интегральные интенсивности линий с химическими сдвигами 104,5; 103,9; 103,2 и 100,5 м.д. соотносятся как 1 : 1 : 1 : 3, интегральные интенсивности пиков с хим. сдвигами 82,1 и 80,8 м.д.— как 2 : 3, а пик с хим. сдвигом 66,4 м.д. имеет единичную интегральную интенсивность. Вторая подгруппа полисахаридов, в которую входят описанный ранее полисахарид *L. kononenkoe* 269S [5] (см. рис. 2), а также *L. kononenkoe* CBS K, отличается от первой прежде всего тем, что в ее спектрах увеличивается относительная интегральная интенсивность линии с хим. сдвигом 103,9 м.д., а пик с хим. сдвигом 66,4 м.д. раздваивается на 66,4 и 67,4 м.д. с суммарной интенсивностью, равной единице. Наконец, третья подгруппа представлена полисахаридом *L. kononenkoe* 283R, у которого в области резонанса аномерных атомов углерода относительная интенсивность пика с хим. сдвигом 103,2 м.д. значительно меньше, чем во второй подгруппе, а область спектра вблизи 67 м.д. одинакова.

Спектры полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* первой подгруппы (см. рис. 1) во многих деталях сходны со спектрами полисахаридов *L. starkeyi* (I) [5]. Так, в области резонанса аномерных атомов углерода полисахаридов *L. starkeyi* (I) имеются три линии с хим. сдвигами 100,5; 103,2 и 103,9 м.д., точно совпадающими с таковыми для *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа). Большинство линий от кольцевых атомов углерода и экзоциклических атомов C6 в спектрах *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* наблюдается также и в спектре *L. starkeyi* (I). Если не принимать во внимание относительную интенсивность линий сравниваемых спектров, то фактически различие в них сводится к появлению двух новых сигналов 104,5 и 71,2 м.д. в спектрах полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа) по сравнению с *L. starkeyi* (I). Если же учитывать относительную интегральную интенсивность линий, то следует отметить увеличение интенсивности пиков с хим. сдвигами 73,2; 69,2; 75,9 и 61,5 м.д. в спектрах полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа). Поскольку раньше [5] эти сигналы были отнесены к атомам углерода C3—C6  $\beta$ -*D*-галактопиранозы, естественно предположить, что различие в спектрах двух групп полисахаридов прежде всего объясняется увеличением содержания  $\beta$ -*D*-галактопиранозы в полисахаридах *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа) по сравнению с *L. starkeyi* (I). Место присоединения дополнительного остатка  $\beta$ -*D*-галактопиранозы можно определить, исходя из следующих соображений.

1. Дополнительный остаток  $\beta$ -*D*-галактопиранозы не может быть присоединен к C6-атому маннопиранозных звеньев, так как этому противоречит увеличение интегральной интенсивности сигнала при 61,5 м.д. в спектрах *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа) по сравнению с *L. starkeyi* (I).

2. Этот остаток не может быть присоединен ни по одной из экваториальных гидроксильных групп в гексапиранозах, составляющих повторяющееся звено, так как это вызвало бы сдвиг одной или двух линий соседних атомов углерода в спектрах полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoe* (первая подгруппа) по сравнению с *L. starkeyi* (I) за счет  $\beta$ -эффекта гликозилирования [2, 8, 9].

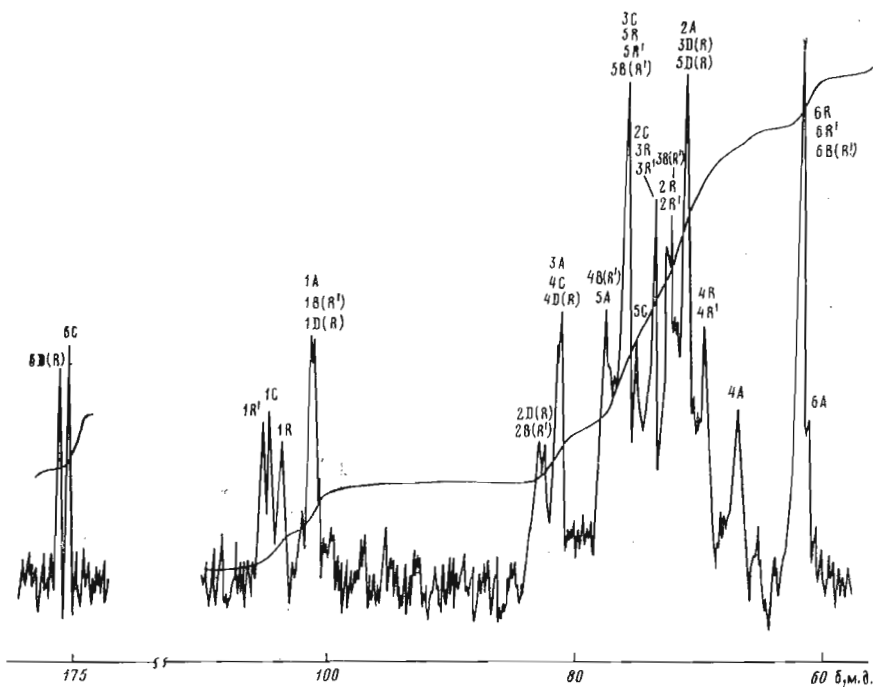


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР внеклеточного полисахарида *L. starkeyi* шт. 267 (здесь и на рис. 2, 3 буквы А, В, С, D соответствуют моносахаридным остаткам повторяющегося звена полисахарида, см. ниже)

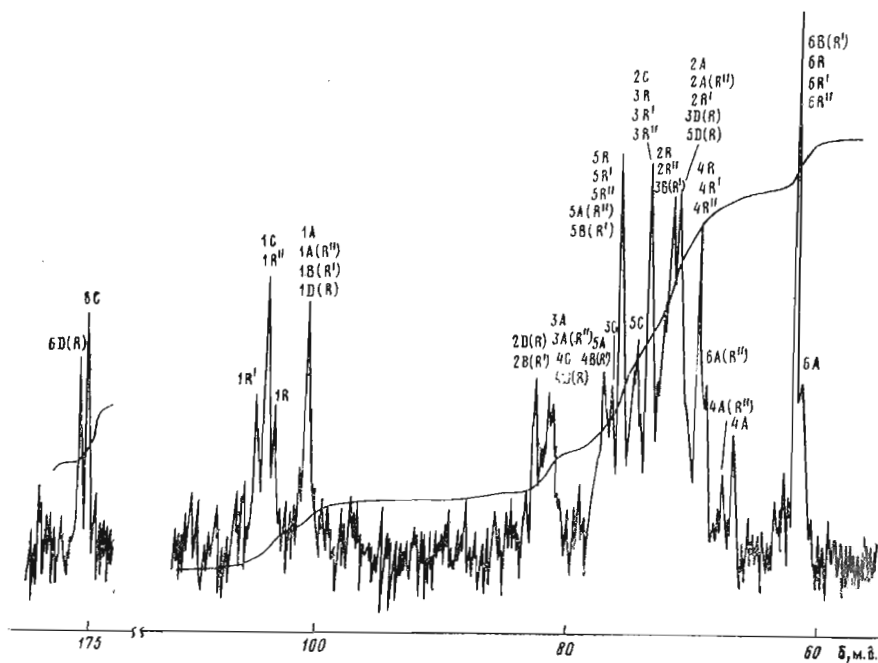
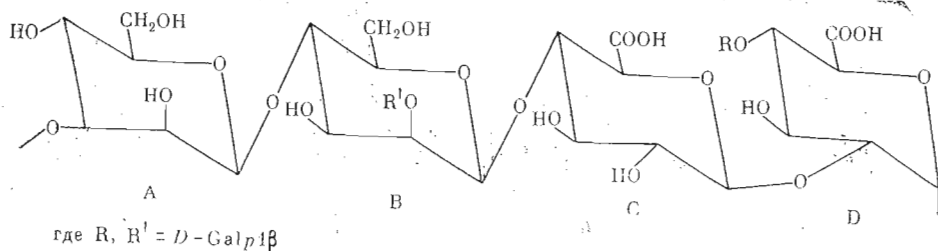


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР внеклеточного полисахарида *L. kononenkoae* шт. 269S

3. Гликозилирование по аксиальной гидроксильной группе, как правило, не вызывает смещения резонанса соседних кольцевых атомов углерода за счет  $\beta$ -эффекта [2, 8, 9]. Поэтому можно предположить, что замещение дополнительным остатком  $\beta$ -D-галактопиранозы в полисахаридах *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) происходит по C2-атому остатка А или В. Анализ области резонанса кольцевых неаномерных атомов углерода в спектрах полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) показал, что линия с хим. сдвигом 72,1 м.д. имеет в них существенно меньшую относительную интенсивность, чем в спектре полисахарида *L. starkeyi* (I). Линия с хим. сдвигом 72,1 м.д. в спектре последнего была отнесена за счет резонанса атомов C2 и C3 остатка В. Поэтому логично предположить, что замещение идет по атому C2 остатка В, что приводит к смещению резонансной линии этого атома в слабое поле на величину порядка 10 м.д. вследствие  $\alpha$ -эффекта гликозилирования.

С учетом отмеченной выше кратности интегральных интенсивностей основных аналитических линий спектры полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) можно интерпретировать, исходя из предположения, что структуры полисахаридов *L. starkeyi* (II), *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) различаются лишь наличием остатка  $\beta$ -D-галактопиранозы в положении C2 остатка В в двух последних. Тогда различие в их спектрах находит следующее объяснение. Интенсивность линий за счет резонанса атомов C3—C6  $\beta$ -D-галактопиранозного остатка увеличивается из-за наложения сигналов C3—C6 от  $\beta$ -D-галактопиранозы при C4 остатка D. Положение резонанса атомов C1 и C2 двух  $\beta$ -D-галактопиранозных остатков несколько отличается из-за различного способа присоединения (по экваториальной гидроксильной группе при C4 звена D или аксиальной при C2 звена В). Для атома C1  $\beta$ -D-галактопиранозного остатка в 2-O- $\beta$ -D-галактопиранозил-L-рамнозе, например, химический сдвиг оказался равным 105,1 м.д. [9]. С учетом этих наблюдений наиболее низкопольный сигнал в области резонансов аномерных атомов углерода полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) (104,5 м.д.) следует отнести к атому C1 остатка  $\beta$ -D-галактопиранозы, присоединенной к атому C2 маннопиранозного остатка В. Ранее наблюдалось небольшое высокопольное смещение сигнала атома C2 галактопиранозного остатка, присоединенного к аксиальной гидроксильной группе [9]. Поэтому линию с хим. сдвигом 71,2 м.д. следует отнести за счет резонанса атома C2 в этом же  $\beta$ -D-галактопиранозном остатке. Предположение о замещении по C2 в звене В позволяет объяснить изменение соотношения интенсивностей линий с хим. сдвигами 82,0 и 80,0 м.д. от 1 : 3 в *L. starkeyi* (I) до 2 : 3 в полисахаридах *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) перекрыванием сигналов атома C2 остатка В и атома C2 остатка D.

Таким образом, структура полисахаридов *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) может быть представлена следующим образом:



Такое строение полисахаридов изученной группы подтверждается анализом структуры одного из биополимеров *L. starkeyi* (II) методом метилирования. Из продуктов метанолиза метилированных (восстановленного и невосстановленного) полисахаридов были выделены и идентифицированы

(в виде тридегтерометильных производных [10] и ацетатов частично метилированных полиолов [11]) 3,6-ди-О-метил-, 2,4,6-три-О-метил-*D*-манноза, 3-О-метил- и 2,3-ди-О-метил-*D*-глюкоза и полностью метилированная *D*-галактоза.

Таким образом, полисахариды *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) отличаются от полисахаридов *L. starkeyi* (I) наличием дополнительного остатка  $\beta$ -*D*-галактопиранозы при С2 звена В.

Спектры второй подгруппы полисахаридов из *L. kononenkoae* (*L. kononenkoae* (вторая подгруппа)) уже описаны ранее [5] (см. рис. 2). Однако мы приводим здесь еще раз спектр этого полисахарида, снятый в условиях, аналогичных таковым для *L. starkeyi* (II) и *L. kononenkoae* (первая подгруппа) (рН 7, а не 9, как в [5]) и с лучшим разрешением за счет снижения вязкости раствора. При сопоставлении спектров полисахаридов первой подгруппы со спектром полисахарида *L. kononenkoae* (вторая подгруппа) необходимо подчеркнуть следующие различия:

- 1) усиление пиков, отнесенных ранее [4] за счет резонанса атомов С2—С5  $\beta$ -*D*-галактопиранозных остатков;
- 2) увеличение интенсивности пика с хим. сдвигом 103,9 м.д.;
- 3) раздвоение пика в области 67 м.д.;
- 4) появление нового пика при 69,6 м.д.;
- 5) уменьшение интегральной интенсивности пика с хим. сдвигом 76,8 м.д.

В соответствии с работой [5] эти изменения интерпретируются как результат присоединения к атому С6 в определенной части звеньев А  $\beta$ -*D*-галактопиранозного остатка. Тогда усиление пика с хим. сдвигом 103,9 м.д. можно объяснить наложением линий от атома С1 этого  $\beta$ -*D*-галактопиранозного остатка на линию от атома С4 остатка С, а раздвоение линии в области 67 м.д.—  $\gamma$ -эффектом заместителя на атоме С4 в гликозилированных по атому С6 остатках А. Сигнал атома С5 в этих остатках смещается за счет  $\beta$ -эффекта в более высокое поле по сравнению с таковым для незамещенного остатка (от 76,8 к 75,9 м.д.); линия с хим. сдвигом 69,6 м.д. возникает за счет резонанса атома С6 замещенного остатка А.

Спектр второго полисахарида этой подгруппы (*L. kononenkoae* CBS К) отличается еще большим содержанием галактозы при С6 остатка А (соотношение интенсивностей пиков с хим. сдвигами 66,4 и 67,4 м.д. 1 : 1 в полисахариде *L. kononenkoae* CBS К и 2 : 1 в полисахариде *L. kononenkoae*, 269S).

Спектр полисахарида третьей подгруппы *L. kononenkoae* (штамм 283R) представлен на рис. 3. Количество  $\beta$ -*D*-галактопиранозы в нем, судя по сигналам от кольцевых атомов углерода С3—С5, сопоставимо с таковыми для полисахаридов первой подгруппы *L. kononenkoae*, но общий вид спектра несколько иной. Так, сильное ослабление линии 103,2 м.д. свидетельствует о дефиците галактозных остатков при атоме С4 остатка D; соответственно усиливается общая интегральная интенсивность линий в области 71—72 м.д., соотношение пиков с хим. сдвигами 82,0 и 80,8 м.д. становится близким к 1 : 1.

О присоединении к атому С4 в части звеньев D этого полисахарида остатков  $\beta$ -*D*-галактопиранозы можно судить по виду спектра в области резонанса карбоксильных атомов углерода. Наряду с интенсивным сигналом от карбоксильной группы звена С в этой же области находятся два менее интенсивных пика от звена D (не замещенного остатком  $\beta$ -*D*-галактопиранозы по атому С4) и D(R) (замещенного остатком  $\beta$ -*D*-галактопиранозы). Характерное для спектров полисахаридов *L. kononenkoae* (вторая подгруппа) расщепление пика, относящегося к атому С4 остатка А, хорошо видно и в спектре полисахарида из *L. kononenkoae* шт. 283R, что свидетельствует о частичном замещении остатка А  $\beta$ -*D*-галактопиранозой по атому С6. Все эти факты позволяют предположить, что полисахарид, продуцируемый последним микроорганизмом, имеет необычную структуру

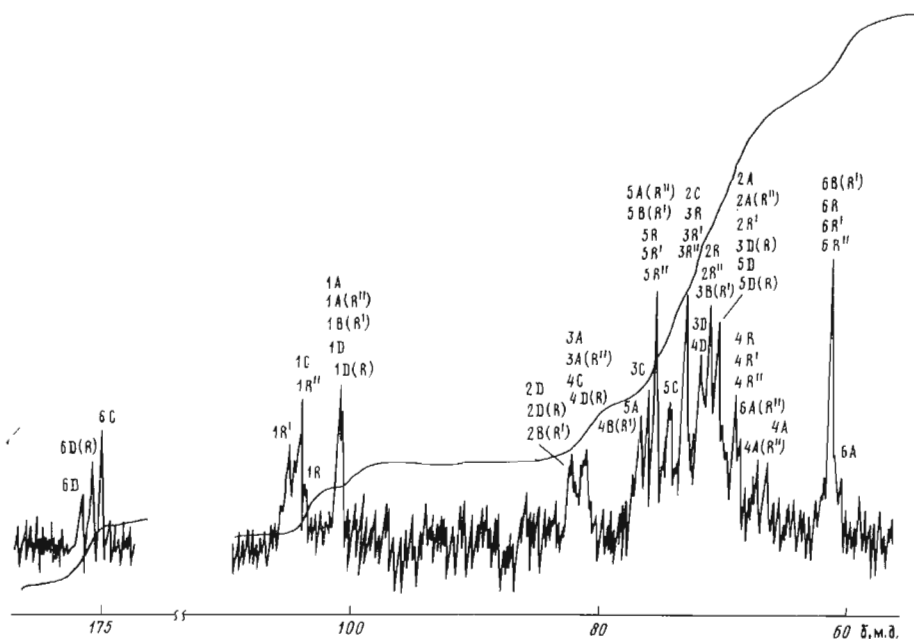


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР внеклеточного полисахарида *L. kononenkoae* шт. 283R

повторяющегося звена: в отличие от описанных ранее полисахаридов первых двух групп в нем имеются остатки D, не замещенные  $\beta$ -D-галактопиранозой, но по аналогии с группой (II)  $\beta$ -D-галактопираноза присутствует в некоторых остатках A (при атоме C6).

Завершая исследования по структуре внеклеточных полисахаридов липомицетов, приведем итоговую таблицу химических сдвигов атомов углерода моносахаридных остатков в тех полисахаридах, где основу структуры составляет тетрасахаридное повторяющееся звено (*L. tetrasporus*, *L. starkeyi* (I) и (II), *L. kononenkoae*). Эти группы липомицетов продуцируют сходные по строению полисахариды, различающиеся лишь количеством и положением остатков  $\beta$ -D-галактопиранозы. Так, среди полисахаридов, продуцируемых *L. tetrasporus*, можно встретить весь набор, начиная с полного отсутствия  $\beta$ -D-галактопиранозы (шт. 416) и кончая полисахаридом из *L. tetrasporus* шт. 424, где звено D полностью замещено по C3 [7]. Полисахариды из *L. starkeyi* (I) и (II) построены более регулярно; в первом

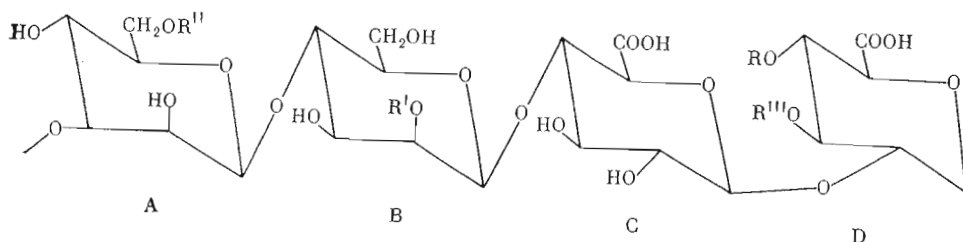
Отнесение сигналов атомов углерода в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР внеклеточных полисахаридов липомицетов *L. tetrasporus*, *L. starkeyi* (I) и (II), *L. kononenkoae* (pH 7–9, 50° C) \*

Атом углерода	A	A(R'')	B	B(R')	C	D	D(R''')	D(R)	R, R'''	R'	R''
C1	100,5	100,5	100,5	100,5	103,9	100,5	100,5	100,5	103,2	104,5	103,9
C2	70,8	70,8	72,1	82,1	73,3	82,1	82,1	82,0	71,6	71,2	71,6
C3	80,8	80,8	72,1	72,1	76,4	72,2	82,9	70,8	73,3	73,2	73,3
C4	66,4	67,4	76,9	76,9	80,0	72,2	72,1	80,8	69,3	69,2	69,3
C5	76,8	75,9	75,5	75,5	74,6	70,9	70,8	70,8	75,9	75,9	75,9
C6	61,1	69,6	61,5	61,5	175,3	176,8	176,5	175,9	61,5	61,5	61,5

\* Столбцы A и A (R'') содержат данные по химическим сдвигам атомов C1 — C6 для остатков A соответственно не замещенных (R''=H) и замещенных остатком галактопиранозы (R''=Gal p1 $\beta$ ). То же для остатков B — D.

случае звено D полностью замещено по положению C4 [4], во втором — дополнительно и по C2 звена B. Наиболее варибельную группу представляют собой полисахариды, продуцируемые *L. kononenkoae*. Здесь остатки  $\beta$ -D-галактопиранозы встречаются в звеньях A, B и D, причем часто в нецелочисленных молярных соотношениях. Среди большого числа исследованных нами полисахаридов липомицетов не встретилось ни одного, где остатки  $\beta$ -D-галактопиранозы гликозилировали бы звено C.

Таким образом, для внеклеточных полисахаридов перечисленных выше групп липомицетов можно представить следующую усредненную структуру повторяющегося звена:



- L. tetrasporus* R, R', R''=H; R'''=H или D-Gal p1 $\beta$   
*L. starkeyi* (I) R', R'', R'''=H; R=D-Gal p1 $\beta$   
*L. starkeyi* (II) R'', R'''=H; R, R'=D-Gal p1 $\beta$   
*L. kononenkoae* R'''=H; R, R', R''=H или D-Gal p1 $\beta$

Анализ обобщающей таблицы наглядно показывает, каким образом, имея достаточно большую серию родственных по структуре полисахаридов, можно по данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии для членов ряда с известной структурой и расшифрованными спектрами определить структуру новых членов ряда. Практически таким способом в данной работе были определены структуры полисахаридов из *L. starkeyi* (II) и из *L. kononenkoae*. Вместе с тем совершенно очевидно, что такая расшифровка не была бы возможна без предварительной работы по определению структуры достаточно большого ряда полисахаридов этой серии традиционными химическими методами (*L. tetrasporus*, *L. starkeyi* (I), *L. kononenkoae* шт. 269S).

### Экспериментальная часть

В работе использованы образцы полисахаридов, продуцируемых пятью штаммами *L. kononenkoae* (283S, 283R, 269S, 269R и CBS K) и 21 штаммом *L. starkeyi* (II) (267, 271—274, 394—406, 417, 425, 433), полученные из коллекции кафедры биологии почв МГУ. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР снимали на приборе WP-60 (Bruker) с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц в импульсном режиме с последующим фурье-преобразованием. Образцы готовились в виде 3% растворов в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . В качестве внутреннего эталона использовался диметилсульфоксид. Химические сдвиги приведены относительно тетраметилсилана. Пересчет их выполняли, используя значение химического сдвига диметилсульфоксида относительно тетраметилсилана 39,45 м.д. ( $\delta$ -шкала) [1]. Спектры получены в идентичных условиях при pH 7,0 и 50° С. Для получения каждого спектра было достаточно накопления 25 000—50 000 сигналов свободной индукции. Специальная проверка показала, что относительные интегральные интенсивности линий (включая сигнал карбоксильного атома углерода) не изменяются при варьировании интервала между 90-градусными импульсами от 0,5 до 2 с. Спектры сняты при интервале между импульсами и времени сбора данных, равных 1,1 с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свиридов А. Ф., Бердимбетова Г. Е., Шашков А. С., Горин С. Е., Бабьева И. П., Чижев О. С., Кочетков Н. К. (1979) Биоорган. химия, 5, 418—428.
2. Шашков А. С., Чижев О. С. (1976) Биоорган. химия, 2, 437—497.
3. Шашков А. С., Гуллыев Н., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Чижев О. С., Кочетков Н. К. (1977) Биоорган. химия, 3, 1028—1033.
4. Свиридов А. Ф., Джикия О. Д., Горин С. Е., Бабьева И. П., Чижев О. С., Кочетков Н. К. (1978) Биоорган. химия, 4, 245—248.
5. Кочетков Н. К., Свиридов А. Ф., Шашков А. С., Горин С. Е., Джикия О. Д., Чижев О. С., Бабьева И. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 408—417.
6. Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Бабьева И. П. (1978) Микробиология, 47, 756—761.
7. Шашков А. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Джикия О. Д., Чижев О. С., Гуллыев Н., Кочетков Н. К. (1978) Биоорган. химия, 4, 752—759.
8. Gorin P. A. I. (1974) Can. J. Chem., 52, 458—461; (1975) Carbohydr. Res., 39, 3—10.
9. Colson P., King R. R. (1976) Carbohydr. Res., 47, 1—13.
10. Kochetkov N. K., Wulfson N. S., Chizhov O. S., Zolotarev V. M. (1963) Tetrahedron, 19, 2209—2224.
11. Axberg K., Björndal H., Pilotti A., Svensson S. (1972) Acta chem. scand., 26, 1319—1325.

Поступила в редакцию  
29.1.1980

POLYSACCHARIDES FROM LIPOMYCES. 10. STRUCTURAL ANALYSIS  
OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES FROM *L. kononenkoae*  
AND *L. starkeyi* (II) BY  $^{13}\text{C}$  NMR SPECTROSCOPY

SHASHKOV A. S., GULLYEV N., SVIRIDOV A. F., GORIN S. E.

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

The structure of extracellular polysaccharides — 5 from the *L. kononenkoae* and 21 from *L. starkeyi* (II) strains — was established by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. The compounds are heteropolysaccharides, whose principal structural feature is a repeat unit of two *D*-mannopyranose and two *D*-glucuronic acid residues in pyranose form; some of them are branched, bearing *D*-galactopyranose residues:

