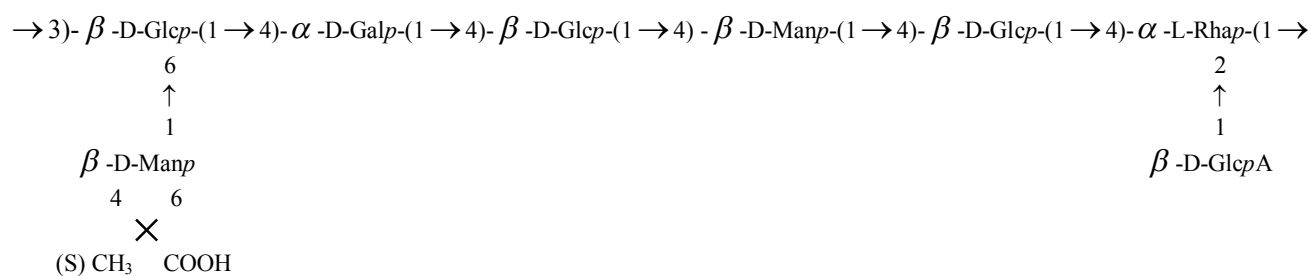


УДК 579.222:577.114

Пирог Т.П., Сенченкова С.М., Грінберг Т.А., Малашенко Ю.Р.

**СТРУКТУРА АЦИЛЬОВАНОГО ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ,
СИНТЕЗОВАНОГО БАКТЕРІЯМИ *Acinetobacter sp.***

Комплексний полісахаридний препарат етаполан, синтезований бактеріями *Acinetobacter sp.*, складається з нейтрального (мінорний компонент) і двох кислих екзополісахаридів (ЕПС), один з яких є ацильованим. На основі хімічних модифікацій ЕПС, сольволізу безводним фтористим воднем, що приводить до отримання пента- і октасахаридних фрагментів, деградації по Сміту, ^1H - і ^{13}C -ЯМР-спектроскопії встановлена структура повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга ацильованого полісахариду:



Припускається, що в ацильованому ЕПС один з залишків глюкози і залишок галактози О-ацильовані.

Ключові слова: мікробний екзополісахарид, структура, моносахариди, олігосахариди, деградація по Сміту, сольволиз, ЯМР-спектроскопія.

Адреса для контакту: Пирог Тетяна Павлівна,
03143, м. Київ, вул.Заболотного, 154, ІМВ НАН України,
тел.: (044) 266-99-69, факс: (044) 266-23-79
E-mail: tapirog@yahoo.com

Протягом останніх 20-30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) – високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів - є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем обумовили широке використання цих біополімерів в нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС обумовлена їх позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, в нафтодобуванні.

Комплексний полісахаридний препарат етаполан, синтезований бактеріями *Acinetobacter sp.*, складається з нейтрального і двох кислих ЕПС, один з яких є ацильованим [1, 2]. Нейтральний ЕПС є мінорним компонентом. Розроблено спосіб розділення етаполану на ацильований (АП) і неацильований (НАП) компоненти, оснований на емульгуючих властивостях розчинів ацильованих ЕПС [2]. АП і НАП ідентичні по молярному співвідношенню глюкози, манози, галактози, рамнози, глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1). Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид вміщує жирні кислоти (C₁₂-C₁₈) [2]. Реологічні властивості розчинів етаполану (здатність до емульгування, підвищення в'язкості в присутності одно- і двовалентних катіонів, при зниженні рН, в області низьких швидкостей зсуву, в системі Cu²⁺-гліцин) обумовлені наявністю в його складі жирних кислот і визначаються співвідношенням ацильованого і неацильованого компонентів, а також вмістом жирних кислот в ацильованому полісахариді [2, 3]. Слід відзначити, що

сукупність таких властивостей не характерна для жодного з відомих мікробних ЕПС. Унікальні фізико-хімічні властивості розчинів етаполану дозволяють розглядати його як полісахарид багатофункціонального призначення, який може бути використаний для інтенсифікації нафтовидобутку, в гірничодобувній, харчовій промисловості, побутовій хімії, косметології [1, 4, 5].

Мета даної роботи полягала в визначенні структури повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга ацильованого полісахариду, який входять до складу етаполану. Такі дані необхідні для розробки підходів до регуляції складу і фізико-хімічних властивостей етаполану з метою одержання препаратів зі стабільними заданими властивостями в залежності від області їх практичного використання.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Культивування бактерій *Acinetobacter sp.* з метою одержання ЕПС, виділення і очистку етаполану, розділення його на ацильований і неацильований компоненти проводили, як описано в роботі [2].

Загальні методи. ^1H - і ^{13}C -ЯМР-спектри знімали на спектрометрах Bruker WM-250 і Bruker AM-300 відповідно в D_2O при 30°C для олігосахаридів і при 60°C для полісахаридів (внутрішній стандарт ацетон, δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45).

Газо-рідинну хроматографію (ГРХ) виконували на хроматографі “Hewlett-Packard 5890” зі скляною колонкою (0.2 мм x 25 м), заповненою метилсиліконовою смолою. ГРХ метилових ефірів здійснювали на хроматографі “Varian MAT 311”.

Гель-фільтрацію виконували на колонці (70 x 2.2 см) з сефадексом G-15 (елюційні профілі побудовані по поглинанню при 206 нм на “2138 Uvicord S”), а також на колонці (80 x 1.6 см) з фрактогелем TSK HW-40 (S) (Merck) (елюційні профілі побудовані за допомогою диференційного рефрактометра Knauer). Іонно-обмінну хроматографію полісахаридів здійснювали на колонці (10 x 0.3 см) з DEAE-Trisacryl M в ступінчатому градієнті 0.01 M \rightarrow 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 6.3), що містить 0 \rightarrow 0,5 M NaCl. Іонно-обмінну хроматографію моносахаридів виконували на колонці (20 x 0.6 см) з Durrum DAx4 в 0.5 M Na-боратному буфері (pH 9.0) при

55°C. Елюційні профілі побудовані по реакції з орцинол-сірчаною кислотою.

Одержання модифікованих полісахаридів. Для дезацильовання АП до його наважки (100 мг) додавали 12.5%-ний аміак (100 мл, 16 год., 37°C), отриманий розчин концентрували в вакуумі до мінімального об'єму (2-3 мл) і пропускали через колонку з сефадексом G-15. Розчин в'язкого елюату піддавали ультразвуковій обробці ('USDN-2T', 44 кГц, 0°C). Дезацильований АП (АП_{ДА}, 43 мг) був виділений іонно-обмінною хроматографією на DEAE-Trisacryl M.

В іншому варіанті дезацильовання АП проводили з використанням 0,1 М NaOH [6]. В цьому випадку 100 мг АП обробляли 1М NaBH₄ в 0.1 М NaOH (100 мл, 16 год., 50°C). Після нейтралізації розчину льодовою оцтовою кислотою АП_{ДА} (90 мг) був виділений гель-фільтрацією на сефадексі G-15.

Для вилучення піровиноградної кислоти до наважки АП (100 мг) додавали 2%-ну оцтову кислоту і нагрівали впродовж 2 год. при 100°C. АП_{НОАС} (70 мг) був виділений гель-фільтрацією на сефадексі G-15 з наступною ультразвуковою обробкою.

Аналітичні методи. Для аналізу моносахаридів АП_{ДА} (0.2 мг) гідролізували в запаяних ампулах з 2 М CF₃CO₂H впродовж 2 год. при 121°C. Гідролізати випарювали в вакуумі і аналізували на вуглеводному аналізаторі "Biotronik LC-2000" (колонка 0.38 x12.5 см, смола Chromex DA-X8-11) в 0.5 М Na-боратному буфері (рН 8.0) при 60°C для визначення нейтральних моносахаридів і в 0.04 М фосфатному буфері (рН 2.4) при 70°C для визначення уронових кислот, детектували при 570 нм після реакції з 2,2¹-біцинхонінатом міді.

Для визначення абсолютної конфігурації моносахаридів гідролізат, отриманий з 8 мг АП_{ДА}, фракціонували іонно-обмінною хроматографією на колонці з Durrum DAx4. Рамнозу, манозу, галактозу переводили в ацетильовані (+)-2-октилглікозиди [7] і аналізували методом ГРХ. Абсолютну конфігурацію глюкози і глюкуронової кислоти (після відновлення карбоксилів) визначали за допомогою глюкозооксидази, як описано в роботі Виноградова з співавт. [8]. Для відновлення АП_{ДА} (1 мг) розчиняли в 2 мл 1 М HCl в метанолі, нагрівали в

запаяній ампулі (4 год., 85°C), після цього обробляли надлишком боргідриду літію в 50% ізопропанолі (16 год., 20°C) і гідролізували, як описано вище.

Піровиноградну кислоту (ПВК) визначали колориметрично по реакції з 4-диметиламінобензальдегідом [9]. Очистку ПВК здійснювали на колонці з Al_2O_3 [10]. Жирні кислоти визначали методом ГРХ після метанолізу (0.5 М HCl в метанолі, 16 год, 80°C).

Метильовання ЕПС здійснювали згідно описаному методу [11], метильовані продукти гідролізували 2 М $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ впродовж 1 год. при 121°C, сахариди перетворювали в ацетати альдитолів і аналізували методом ГРХ. Відновлення метильованих продуктів з LiBH_4 здійснювали, як описано вище.

Сольволіз фтористим воднем. З метою одержання олігосахаридних фрагментів здійснювали сольволіз АП_{ДА} фтористим воднем, як описано в роботі Виноградова з співавт. [8]. Для цього до 100 мг АП_{ДА} додавали безводний фтористий водень (10 мл, 10 хв., -78°C), холодний розчин виливали в холодну суміш ефіру і гексану (1:1), осад збирали, промивали в холодному ефірі, розчиняли в воді, нерозчинну фракцію відділяли центрифугуванням, супернатант пропускали через гель TSK HW-40. Відновлення отриманого пентасахариду за допомогою боргідриду натрію призводило до отримання олігосахариду **1** (12 мг). Олігосахарид **2** (8.5 мг) був отриманий аналогічним чином при сольволізі нативного АП, не підданого дезацильованню.

Деградація по Сміту. Для одержання олігосахаридних фрагментів АП і АП_{ДА} проводили деградацію їх по Сміту [12]. Деградація по Сміту передбачає таку послідовність реакцій: періодатне окислення, відновлення боргідридом натрію і м'який кислотний гідроліз. Мета такої обробки полягає у повному гідролізі нециклічних ацеталів зі збереженням (або мінімальним гідролізом) глікозидних зв'язків.

75 мг АП_{ДА} розчиняли в 75 мл 0.05 М періодату натрію (NaIO_4), витримували (при перемішуванні) впродовж 72 год. в темряві при кімнатній температурі, після чого додавали 0.2 мл етиленгліколю. Розчин діалізували і осад відділяли центрифугуванням. Супернатант відновлювали 1 М NaBH_4 в 0.1 М

NaOH (16 год.), нейтралізували льодовою оцтовою кислотою, гель-фільтрацією на сефадексі G-15 виділяли окислений полісахарид, який ліофілізували. Далі здійснювали гідроліз отриманого полісахариду 2%-ною оцтовою кислотою (2 год., 100°C) і отримували олігосахарид **3** (10 мг), виділений гель-хроматографією на TSK HW-40.

Деградація по Сміту 200 мг нативного, не підданого дезацильованню, АП в умовах, описаних вище, призвела до отримання олігосахаридів **4** і **5**.

Комп'ютерний аналіз даних ^{13}C -ЯМР-спектрів олігосахаридів **3**, **4** і **5** проводили з використанням програми SCAN (Structural Computerized Analysis) [13]. Ця програма оснований на розрахунках ^{13}C -ЯМР-спектрів для всіх можливих первинних структур по адитивній схемі, виходячи із хімічних зсувів ^{13}C вільних моносахаридів і ефектів глікозильовання з наступним знаходженням структури, для якої розрахований спектр найбільш близький до експериментального.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Структура АП була встановлена на основі його хімічних модифікацій, сольволізу безводним фтористим воднем, деградації по Сміту, ^1H - і ^{13}C -ЯМР-спектроскопії.

У зв'язку з високою в'язкістю розчинів АП спроби отримати ^{13}C -ЯМР-спектри цього нативного полісахариду виявилися марними. Тому ^{13}C -ЯМР-спектри були одержані для дезацильованого АП (АП_{ДА}). ^{13}C -ЯМР-спектр АП_{ДА} представлений на рис. 1.

Аналіз моносахаридів в АП_{ДА} показав наявність в його складі глюкози, манози, галактози, рамнози та глюкуронової кислоти у співвідношенні 3:2:1:1:1. D-конфігурація глюкози і глюкуронової кислоти була встановлена шляхом окислення D-глюкозооксидазою, D-конфігурація манози та галактози, L-конфігурація рамнози - за допомогою ГРХ ацетильованих (+)-2-октил глікозидів. Наявність піровиноградної кислоти в складі АП встановлена колориметричним методом. На основі порівняння інтегральних інтенсивностей метильних груп ПВК і рамнози у ^1H - і ^{13}C -ЯМР-спектрі АП_{ДА} виявлено, що молярні кількості ПВК та

рамнози однакові (δ_{H} 1.31 і 1.47 м.д.; δ_{C} 18.0 і 26.1 м.д. для рамнози і пірувата відповідно).

Обробка АП 2%-ною оцтовою кислотою з наступною його ультразвуковою обробкою призвела до одержання ще одного модифікованого полісахариду - АП_{НОAc}. Згідно ¹³C-ЯМР-спектру такого полісахариду в його складі була відсутня ПВК, однак встановлена наявність О-ацильних груп (сигнал 21.6 м.д. порівнянний з таким для СН₃-рамнози). Аналіз жирних кислот в АП_{НОAc} показав наявність кислот С₁₂-С₁₈.

Сольволиз АП_{ДА} за допомогою безводного фториду водню при -78°C призвів до отримання олігосахариду **1**, який був виділений гель-хроматографією на сефадексі G-15. В складі олігосахариду виявлена наявність глюкози, манози, рамнози та глюкуронової кислоти у співвідношенні 2:1:1:1. Відновлення цього олігосахариду боргідридом натрію призводило до перетворення рамнози в рамнітол (Rha-ol), що свідчить про розташування цього моносахариду на відновлюваному кінці олігосахариду.

¹H- та ¹³C-ЯМР-спектри відновленого олігосахариду **1** підтвердили його структуру як тетраглікозилрамнітолу (табл. 1 і 2).

¹H-спектр олігосахариду **1** (табл. 1) містив сигнали чотирьох аномерних протонів при 4.44; 4.60; 4.62 (всі дублети, $J_{1,2}$ 7.6-7.9 Гц) і 4.72 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 0.8 Гц), сигнал метильної групи (H-6 рамнітолу) при 1.20 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 6.5 Гц) та сигнали інших протонів в області 3.2-4.1 м.д.

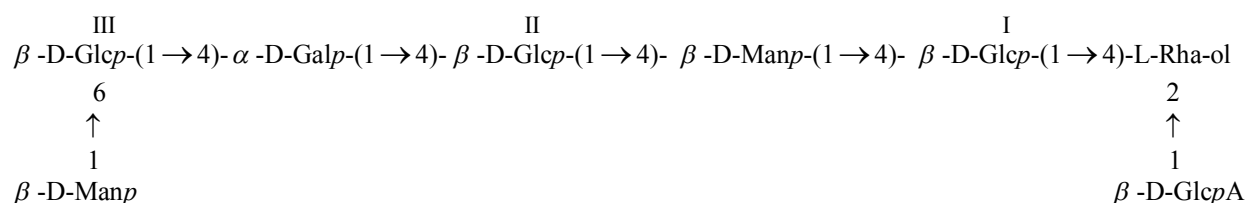
¹³C-ЯМР-спектр олігосахариду **1** (табл. 2) містив сигнали чотирьох аномерних атомів вуглецю при 101.1; 103.7; 103.8 і 104.3 м.д., метильної групи (C-6) рамнітолового залишку при 19.2 м.д., чотирьох СН₂ОН груп (C-6 трьох гексоз та C-1 рамнітолу) при 61.2; 61.4; 61.7 та 61.9 м.д. і 20-ти інших вуглецевих атомів в області 69-83 м.д. Сигнал COOH-групи (C-6 глюкуронової кислоти) був слабким, очевидно, із-за недостатньої кількості матеріалу.

Аналіз продуктів метанолізу олігосахариду **1** показав наявність 1,3,5-три-О-метилрамнітолу, 2,3,4,6-тетра-О-метилглюкози, 2,3,6-три-О-метилглюкози та 2,3,6-три-О-метилманози у вигляді ацетатів альдитолів. При відновленні

В результаті сольволізу нативного АП за допомогою безводного фториду водню був отриманий більший, ніж **1**, олігосахарид, виділений гель-хроматографією на фрактогелі TSK HW-50. При відновленні цього олігосахариду боргідридом одержано олігозидальдитол **2**, виділений гель-фільтрацією на сефадексі G-15. Гомогенність його була встановлена іонно-обмінною хроматографією в боратному буфері. В складі **2** виявлені ті ж моносахариди і в тих же співвідношеннях, що і у вихідному АП (за винятком того, що рамнітол був присутнім замість рамнози). Таким чином, олігозидальдитол **2** являв собою модифіковану октасахаридну повторювану одиницю.

На основі даних ^1H -ЯМР-спектру октасахаридальдитолу **2** (рис. 2.) була встановлена його структура.

Значення констант спінової взаємодії віцинальних протонів $J_{1,2}$ 7-8 Гц [14] свідчать про те, що залишки глюкози та глюкуронової кислоти мають β -конфігурацію, у той час як значення $J_{1,2} < 4$ Гц вказують на α -конфігурацію галактозного залишку. Значні ЯЕО, що спостерігаються при передопроміненні Н-1 протонів на Н-3 і Н-5 опромінюваних залишків манози, а також сильнопольне положення сигналів Н-1 при 4.72 і 4.80 м.д. свідчать про те, що обидва манозних залишки мають β -конфігурацію. На основі даних ядерних ефектів Оверхаузера (табл. 3) структура октасахарид-альдитолу **2** може бути представлена у вигляді:



2

Наведена структура октасахарид-альдитолу **2** погоджується зі структурою пентасахарид-альдитолу **1**, наведеною вище.

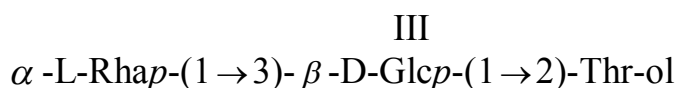
Очевидно, що октасахарид-альдитол **2** отриманий в результаті селективного розщеплення рамнозидного зв'язку, в той час як пентасахарид-альдитол **1** утворився при розщепленні рамнопіранозидного або α -галактопіранозидного

зв'язку. Відомо, що α -гексопіранозиди менш стабільні при обробці безводним фтористим воднем у порівнянні β -гексопіранозидами.

Деградація АП_{ДА} по Сміту призводила до руйнування обох манозних одиниць, галактози та глюкуронової кислоти, часткової деструкції глюкози. Рамноза при цьому залишалася інтактною (співвідношення глюкози і рамнози після окислення складало 1.3:1). В результаті м'якого кислотного гідролізу деградованого полісахариду був отриманий олігосахарид-альдитол **3**, виділений гель-хроматографією на TSK HW-40. За даними ГРХ цей олігосахарид-альдитол містив рівні кількості глюкози, рамнози та трейтолу (Thr-ol).

Комп'ютерний аналіз даних ¹³C-ЯМР-спектрів продуктів деградації АП_{ДА} по Сміту дозволив встановити тільки одну структуру олігосахариду **3**, що погоджується з результатами експериментального спектру (табл. 2). Дана структура характеризувалася найменшим середньоквадратичним відхиленням хімічних зсувів у розрахованому та експериментальному спектрі на одну моносахаридну одиницю (S=0.2), в той час як інші можливі структури мали значення S>1. Ця структура була підтверджена даними метанолізу, в результаті якого були одержані 2,3,4-три-О-метилрамноза і 2,4,6-три-О-метилглюкоза.

Структура олігосахарид-альдитолу **3** може бути представлена у вигляді:



3 (S=0.2)

Деградація по Сміту АП, не підданого дезацильованню, призводила до отримання двох додаткових олігосахарид-альдитолів **4** і **5**. Олігосахарид-альдитол **4** містив глюкозу, рамнозу і трейтол у співвідношенні 2:1:1; олігосахарид-альдитол **5** складався з майже рівних кількостей глюкози, галактози, рамнози і еритритолу (Ery-ol). Як і для олігосахарид-альдитолу **3**, структури олігосахарид-альдитолів **4** і **5** були встановлені за допомогою комп'ютерного аналізу їх ¹³C-ЯМР-спектрів (табл. 2). Дві структури із значеннями S, рівними 0.1 і 0.4, узгоджувалися з даними експериментального спектру для олігосахарид-альдитолу

Точне місце О-ацильовання полісахариду залишається невідомим. Однак утворення олігосахаридів **4** і **5**, тобто стійкість глюкози та галактози при деградації АП по Сміту, дозволяє припустити, що, принаймні, ці два моносахаридних залишки ацильовані.

Попередні дослідження показали, що структура повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга неацильованого полісахариду аналогічна структурі АП_{ДА} [4].

Отримані дані є основою для розробки принципів управління процесами біосинтезу етаполану, регуляції його складу і фізико-хімічних властивостей з метою одержання препаратів зі стабільними заданими властивостями в залежності від області їх практичного використання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁- C₂ -соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. -212 с.
2. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р. // Микробиология. - 1994. - 63, N 5. - С.840-846.
3. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р. // Микробиология. - 1995. - 65, N 4. - С.527-532.
4. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.*: Автореф. дис. – д-ра. биол. наук. - Киев, 1999. – 36 с.
5. Grinberg T.A., Pirog T.P., Malashenko Yu.R., Vlasov S.A. // Energy & Fuels. - 1995. – 9, N 6. - P. 1086-1089.
6. Tako M., Nakamura S. // Agr. Biol. Chem. – 1984. – 48, N 12. – P. 2987-2993.
7. Leontein K., Lindberg B., Lonngren J. // Carbohydr. Res. – 1978. – 62. – P. 359-362.
8. Виноградов Е.В., Шашков А.С., Книрель Ю.А. и др. // Биоорганическая химия. – 1987. – 13, N 5. – С. 660-669.
9. Kageura M., Ohkura Y., Momose T. // Chem. Pharm. Bull. – 1971. – 19 (11). – P. 2294-2300.
10. Телегина Т.А. Количественное определение пировиноградной кислоты. В кн.: Биохимические методы. М.: Наука, 1980. – С. 154-157.
11. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. - Киев: Наук. думка, 1982. - 192 с.
12. Goldstein I.J., Hay G.W., Lewis B.A., Smith F. // Methods Carbohydr. Chem. – 1965. – 5. – P. 361-370.
13. Кочетков Н.К., Виноградов Е.В., Книрель Ю.А. и др. // Биоорганическая химия. - 1992. - 18, N 1. - С. 116-125.
14. Altona C., Haasnoot C.A.G. // Org. Magn.Reson. – 1980. – 13. – P. 417-429.

Таблиця 1

Хімічні зсуви ^1H -ЯМР-спектрів (δ , м.д.)

Олігосахарид	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Олігосахарид 1						
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	4.66	3.38	3.55	3.55	3.87	
β -D-Glcp-(1 \rightarrow (II)	4.52	3.32	3.53	3.41	3.52	н.в.
\rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	4.79	4.13	3.78	3.82	3.59	н.в.
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (I)	4.69	3.44	3.72	3.72	3.60	н.в.
\rightarrow 4)-L-Rha-ol	н.в.	3.97	4.01	4.03	4.15	1.29
2						
↑						
Олігосахарид 2						
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	4.66	3.37	3.54	3.54	3.65	
β -D-Manp-(1 \rightarrow	4.72	4.05	3.67	3.60	3.40	н.в.
\rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (III)	4.68	3.38	3.54	3.42	3.62	3.82
\rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	5.46	3.96	3.96	4.66	4.05	н.в.
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (II)	4.53	3.37	3.81	3.83	3.66	н.в.
\rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	4.80	4.14	3.79	3.73	3.59	н.в.
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (I)	4.70	3.45	3.73	4.03	3.60	н.в.
\rightarrow 4)-L-Rha-ol	н.в.	3.94	4.02		4.15	1.39
2						
↑						

Примітка: н.в. – не визначали.

Таблиця 2

Хімічні зсуви ^{13}C -ЯМР-спектрів (δ , м.д.)

Олігосахарид	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Олігосахарид 1						
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	103.6	73.9	76.5	76.1		
β -D-Glcp-(1 \rightarrow (II)	103.7	74.1	76.5	70.5	77.0	61.6
\rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	101.0	71.1	72.5	77.5	76.1	61.3
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (I)	104.2	74.1	75.1	79.6	75.1	61.1
\rightarrow 4)-L-Rha-ol	61.8	81.4	69.4	82.5	69.6	19.1
2 ↑						
Олігосахарид 2						
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	103.4	74.0	76.6	72.7	76.8	
β -D-Manp-(1 \rightarrow	101.5	71.4	73.8	67.7	77.2	61.9
\rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (III)	104.7	74.6	76.6	70.7	75.8	69.8
\rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	100.7	70.6	69.9	79.5	72.1	61.9
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (II)	103.4	74.0	76.8	77.7	75.5	61.5
\rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	100.9	71.0	72.5	77.4	76.1	61.7
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (I)	104.2	74.1	75.0	79.5	75.2	61.2
\rightarrow 4)-L-Rha-ol	61.9	81.4	69.4	82.4	69.7	19.0
2 ↑						
Олігосахарид 3						
α -L-Rhap-(1 \rightarrow	102.5	71.8	71.6	73.4	70.3	17.9
	(102.3)	(71.6)	(71.3)	(73.5)	(70.5)	(18.0)
\rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (III)	103.2	75.3	83.5	69.5	77.2	61.9
		(75.3)	(83.4)	(69.6)	(77.2)	(62.1)
\rightarrow 2)-D-Thr-ol	61.9	81.0	72.0	63.6		

продовження табл. 2

Олігосахарид	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Олігосахарид 4						
	104.6	74.4	77.1	70.8	77.3	62.0
β -D-Glcp-(1 → (I)	(104.3)	(75.0)	(77.0)	(70.9)	(77.2)	(62.1)
	102.1	71.7	71.5	82.5	68.6	18.0
→ 4)- α -L-Rhap-(1 →	(102.3)	(71.6)	(71.3)	(82.4)	(68.7)	(18.0)
	103.0	75.2	83.4	69.4	77.1	62.0
→ 3)- β -D-Glcp-(1 → (III)		(75.3)	(83.4)	(69.6)	(77.2)	(62.1)
	62.0	80.9	72.1	63.5		
→ 2)-D-Thr-ol						
Олігосахарид 5						
	102.2	71.7	71.7	73.4	70.3	17.8
α -L-Rhap-(1 →	(102.3)	(71.6)	(71.3)	(73.5)	(70.5)	(18.0)
	104.8	75.5	83.9	69.7	77.2	62.2
→ 3)- β -D-Glcp-(1 → (III)	(104.9)	(75.3)	(83.4)	(69.6)	(77.2)	(62.1)
	99.4	70.2	71.3	79.6	73.0	62.3
→ 4)- α -D-Galp-(1 →		(69.6)	(71.1)	(79.9)	(72.9)	(62.4)
	61.3	80.2	72.2	63.9		
→ 2)-D-Ery-ol						

Примітка: В дужках приводяться розрахункові дані (для олігосахаридів 3-5) комп'ютерного аналізу ^{13}C -ЯМР-спектрів продуктів деградації по Сміту нативного АП і АП_{ДА}. Комп'ютерний аналіз проведений згідно описаному методу [13].

Дані ядерних ефектів Оверхаузера для олігосахариду 2

Вуглевод	Протон	Крос-кореляція піків з H-1						
		β -GlcA	β -Man	β -Glc (III)	α -Gal	β -Glc (II)	β -Man	β -Glc (I)
β -Glc	H-2	+						
	H-3	+						
	H-5	+						
β -Man	H-2		+					
	H-3		+					
	H-5		+					
β -Glc(III)	H-2			+				
	H-3			+				
	H-5			+				
	H-6		+					
α -Gal	H-2				+			
	H-4			+				
	H-5			+				
β -Glc(II)	H-3					+		
	H-4				+			
	H-5					+		
β -Man	H-2						+	
	H-3						+	
	H-4					+		
	H-5						+	
β -Glc(I)	H-3							+
	H-4						+	
	H-5							+
Rha-ol	H-2	+						
	H-3	+						
	H-4							+
	H-5							+

Підписи до рисунків

Рис.1 ^{13}C -ЯМР-спектр дезацильованого АП (АП_{ДА}).

Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр октасахарид-альдитулу **2**.

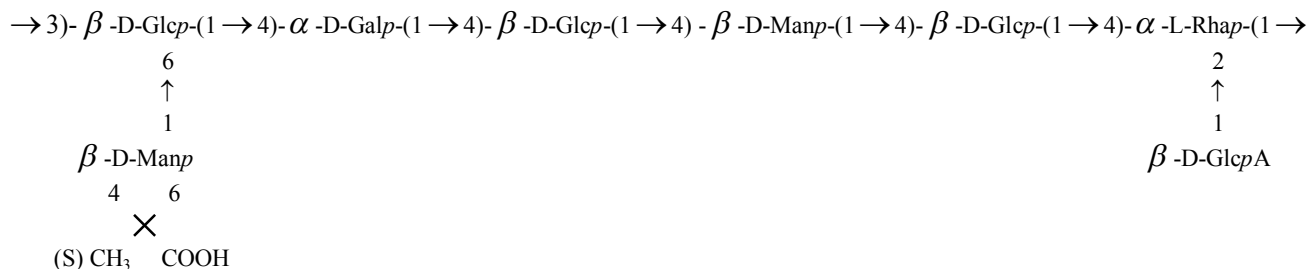
УДК 579.222:577.114

Пирог Т.П., Сенченкова С.М., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р.

СТРУКТУРА АЦИЛИРОВАННОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА, СИНТЕЗИРОВАННОГО БАКТЕРИЯМИ *Acinetobacter sp.*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного
Национальной академии наук Украины, Киев*

Комплексный полисахаридный препарат этаполан, синтезированный бактериями *Acinetobacter sp.*, состоит из нейтрального (минорный компонент) и двух кислых экзополисахаридов (ЭПС), один из которых является ацилированным. На основе химических модификаций ЭПС, сольволиза безводным фтористым водородом, приводящего к получению пента- и октасахаридных фрагментов, деградации по Смитсу, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии установлена структура повторяющейся единицы углеводной цепи ацилированного полисахарида:



Предполагается, что в ацилированном ЭПС один из остатков глюкозы и остаток галактозы O-ацилированы.

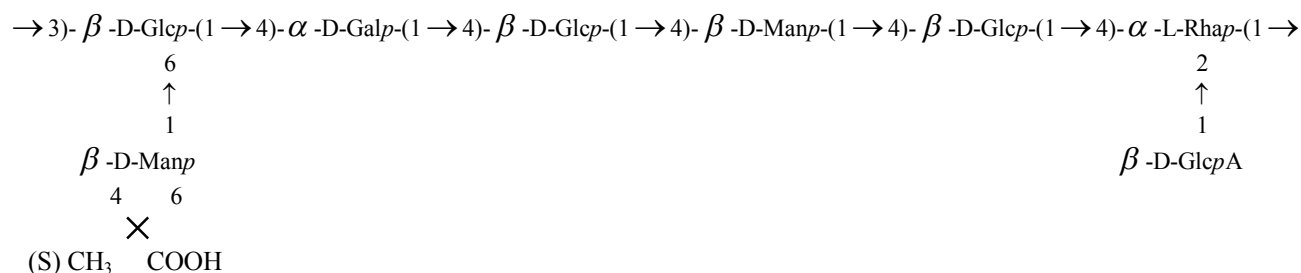
Ключевые слова: микробный экзополисахарид, структура, моносахариды, олигосахариды, деградация по Смитсу, сольволиз, ЯМР-спектроскопия.

T.P.Pirog, S.N. Senchenkova, T.A.Grinberg, Yu.R.Malashenko

**STRUCTURE OF ACYLATED EXOPOLYSACCHARIDE,
SYNTHESIZED BY *Acinetobacter sp.***

*Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of
Ukraine, Kiev*

The complex preparation ethapolan synthesized by *Acinetobacter sp* consists of neutral (minor component) and two acidic exopolysaccharides (EPS) one of which is acylated. On the basis of chemical modification of EPS, solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride resulting in a penta- and octasaccharide fragments, Smith degradation, ^1H - and ^{13}C NMR analysis the following structure of the acylated polysaccharide repeating unit was established:



It is suggested that in the acylated EPS at least one glucose residue and the galactose residue are O-acylated.

Key words: microbial exopolysaccharide, structure, monosaccharides, oligosaccharides, Smith degradation, solvolysis, NMR-spectroscopy.