

**Polysacharidy kvasiniek
a kvasinkovitých mikroorganizmov (I)
Povrchový manan *Candida albicans* BERKHOUT**

D. ŠIKL, L. MASLER, Š. BAUER

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Oddelenie biochémie sacharidov,
Bratislava*

Izoloval sa extracelulárny povrchový manan kvasiniek *Candida albicans*, navrhla sa jeho štruktúra a diskutuje sa o rozdieloch medzi povrchovým a vnútrobunkovým mananom.

Najrozšírenejšou patogénnou kvasinkou je *Candida albicans*, ktorá vyvoláva tzv. kandidózu (moniliasis), ochorenie, postihujúce kožu, respiračný, tráviaci a urogenitálny trakt. Od doby, keď sa zaviedla liečba infekčných chorôb antibiotikami, vyskytuje sa kandidóza čoraz častejšie, preto sa pôvodca tejto choroby stáva predmetom intenzívneho štúdia mikrobiológov, epidemiológov, imunológov a chemikov.

Polysacharidmi z *Candida albicans* sa zaoberali viacerí autori [1—3], ale až C. T. Bishop [4] izoloval z bunkových stien elektroforeticky homogénny glukán a manan v približnom pomere 1,00 : 0,64. Na základe metylačnej analýzy, jodistanovej oxidácie a optickej otáčavosti zistil, že manan o priemernom polymerizačnom stupni 41 a $[\alpha]_D = +78^\circ$ je vysoko vetvený polysacharid s krátkymi reťazcami manopyranózových jednotiek spojených α -1,2-väzbami a vzájomne pospájaných α -1,6-väzbami. Uvedenú štruktúru mananu potvrdil aj T. Miyazaki [5].

Všetky doterajšie práce v oblasti izolácie a stanovenia štruktúry polysacharidov z *Candida albicans* sa zaoberali intracelulárnymi polysacharidmi, resp. polysacharidmi bunkových stien. Preto sme v našej práci venovali pozornosť extracelulárnym polysacharidom a skúmaniu rozdielov medzi vnútrobunkovými a mimobunkovými polysacharidmi.

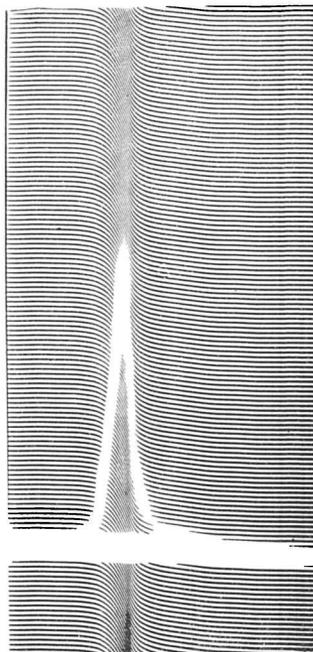
Extracelulárny povrchový polysacharid sme izolovali premývaním buniek teplou vodou po odcentrifugovaní živnej pôdy. Počas premývania nenastalo rozrušenie buniek, čo sme kontrolovali mikroskopicky. Po centrifugácii, dialýze, zrážaní alkoholom, deproteinizácii [6] a lyofilizácii sa získal polysacharid v podobe bieleho prášku v 2,5 — 3 % výťažku, počítané na sušinu kvasiniek. Homogenitu izolovaného polysacharidu sme stanovili v borátovom tlmivom roztoku (pH 9,3) voľnou elektroforézou (obr. 1).

Polysacharid po hydrolýze poskytol ako jediný cukor manózu. D-manózu sme identifikovali chromatografiou na papieri [7, 8], elektroforézou na papieri, špecifickou otáčavosťou a izoláciou *p*-nitrofenylhydrazónu [9].

Povrchový manan neobsahuje dusík. Jeho špecifická otáčavosť je $[\alpha]_D^{22} = +56^\circ$ ($c = 1,068$ vo vode). Táto hodnota po kyslej hydrolyze klesne na $+13^\circ$. Pokles poukazuje na skutočnosť, že v manane prevažujú α -glykozidické väzby, čo potvrdzuje aj infračervené spektrum [10]. Molekulová váha sa analýzou koncových redukujúcich skupín [11] stanovila na 5500.

Pri jodistanovej oxidácii sa spotrebovalo 1,08 mólu jodistanu a vzniklo 0,20 mólu kyseliny mravčej na 1 mól anhydromanózy. Jodistanovou oxidáciou získaný polyaldehyd sa redukoval a hydrolyzoval. V hydrolyzátoch sa chromatografiou na papieri ako jediný polyalkohol stanovil glycerín, čo vylučuje prítomnosť 1,4-väzieb, 1,4,6-väzieb a 1,3-väzieb v povrchovom manane [12]. Metylačnou analýzou mananu sa stanovili tieto metylétery D-manózy: 2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-manóza, 3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manóza a 3,4-di-*O*-metyl-D-manóza v pomere 1 : 3 : 1.

Z výsledkov metylačnej analýzy a jodistanovej oxidácie usudzujeme, že povrchový manan *Candida albicans* je vetvený polysacharid skladajúci sa z D-manopyranózových jednotiek spojených α -1,2-väzbami a α -1,6-väzbami. Rozdiel medzi mananom bunkových stien a extracelulárnym povrchovým mananom je v stupni vetvenia, ktorý je v prípade povrchového mananu nižší než mananu bunkových stien.



Obr. 1. Voľná elektroforéza extracelulárneho povrchového mananu *Candida albicans* BERKHÖUT v borátovom tlmivom roztoku.

Experimentálna časť

Chromatografia sacharidov na papieri sa robila vzostupne v systéme S_1 butanol—pyridín—voda 3 : 2 : 1,5 [7].

Detegovalo sa kyslým ftalanom anilínu [8].

Metylétery sacharidov sa chromatografovali na tenkých tmelených vrstvách silikagélu v systéme S_2 izopropylalkohol—octan etylnatý—voda 1 : 4 : 2,5 a kvantitatívne sa vyhodnotili podľa G. W. Haya [13].

Detekcia sa uskutočnila ako v predchádzajúcom prípade.

Chromatografia polyalkoholov na papieri sa robila vzostupne v systéme S_3 octan etylnatý—pyridín—voda 7 : 2 : 1 [14].

Detegovalo sa systémom metajodistan sodný—benzidín [14].

Elektroforéza sacharidov na papieri sa robila v borátovom tlmivom roztoku podľa Michaelisa (pH 9,3) pri potenciálovom spáde 25 V/cm v priebehu 1 1/2 hodiny.

Pri chromatografii a elektroforéze na papieri sa používal papier Whatman 1.

Voľná elektroforéza sa uskutočnila na Zeissovom elektroforetickom prístroji 35 v borátovom tlmivom roztoku podľa Michaelisa (pH 9,3). Pred elektroforézou sa vzorka jednu hodinu dialyzovala proti tlmivému roztoku.

Infračervené spektrá sa snímali na Zeissovom spektrofotometri UR 10.

Kolorimetrické stanovenia sa robili na Langeho kolorimetri model VII fy dr. B. Lange, Berlín.

Body topenia sa stanovili na Koflerovom bloku a sú korigované.

Dusík sa stanovil Dumasovou mikrometódou.

Kultivácia

Candida albicans kmeň 109 [15, 16] sme kultivovali v živnej pôde, do ktorej sme na jeden liter destilovanej vody pridali 1 ml zmesi obsahujúcej 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % KH_2PO_4 , 2 % glukózy a toľko autolyzátu odhorčených pivovarských kvasníc, aby jeden liter živného roztoku obsahoval 42 mg aminodúsika [17]. Kultivácia sa uskutočnila v jednolitrových bankách o obsahu 300 ml pôdy na kultivačnej trepačke s počtom kyvov 108/min.

Izolácia povrchového mananu

Kontinuitnou centrifugáciou sa bunky (770 g, 20 % sušiny) oddelili od živnej pôdy (40 l), premyli studenou destilovanou vodou a znova sa centrifugovali. Živná pôda a premývacia voda sa spojili a spracovali osobitne. Oddelené bunky sa vymývali 5 krát 2 l destilovanej vody 65 °C teplej. Vymývacie vody sa oddelili centrifugáciou a za vakuu vodnej pumpy sa zahustili na 200 ml. Polysacharid sa vyzrážal štvornásobným množstvom alkoholu, rozpustil sa v 200 ml acetátového tlmivého roztoku podľa Walpolea (pH 4,8) a vytrepal sa 5 krát 150 ml zmesi chloroform—butanol 5 : 1. Potom sa vodný roztok zahustil za vakuu a lyofilizoval sa. Získalo sa 5,8 g bieleho prášku, ktorý obsahoval málo dusíka, preto sa uvedený deproteinizačný postup zopakoval ešte dvakrát. Získalo sa 4,3 g polysacharidu neobsahujúceho dusík v 2,8 % výťažku, počítané na sušinu kvasiniek.

Hydrolyza mananu

260 mg mananu sa 5 hodín hydrolyzovalo v 26 ml 1 N-HCl pri 100 °C v zatavenej trubici. Optická otáčavosť hydrolyzáta $[\alpha]_D^{22} = +13^\circ$ ($c = 1$ v 1 N-HCl). Hydrolyzát sa filtroval cez Amberlit IR-4B v OH cykle. Filtrát sa vákuovo odparil do sucha a analyzoval sa. Chromatografiou na papieri v systéme S_1 a elektroforézou na papieri v borátovom tlmivom roztoku sa ako jediná zložka polysacharidu identifikovala manóza. Do 250 mg zvyšku sa pridalo 250 mg *p*-nitrofenylhydrazínu v 4 ml alkoholu a zahrievalo sa pod spätným chladičom pol hodiny na vriacom vodnom kúpeli. Po ochladení sa reakčná zmes nechala stáť v chladničke cez noc, vzniknutý produkt sa odfiltroval a prekryštali- zoval z alkoholu. Získal sa *p*-nitrofenylhydrazón D-manózy o b. t. 203 °C, $[\alpha]_D^{22} = +54,3^\circ$ ($c = 1,032$; metanol—pyridín 1 : 1) [9].

Oxidácia jódnanom [11]

13,6 mg mananu sa rozpustilo v 2 ml destilovanej vody. Do roztoku sa pridalo 10 ml 0,01 N-J₂ a 1 ml 0,1 N-NaOH a nechalo sa tri hodiny stáť pri laboratórnej teplote. Potom sa okyslilo 2,5 ml 0,1 N-H₂SO₄ a nadbytočný jód sa titroval 0,01 N-Na₂S₂O₃ na škrobový indikátor. Súčasne sa uskutočnil slepý pokus a oxidácia D-manózy. Spotreba 0,01 N-Na₂S₂O₃ na slepý pokus 10,63 ml, na 1,9 mg manózy 8,47 ml, na manan 10,12 ml.

Oxidácia jodistanom

100 mg mananu sa rozpustilo v 100 ml destilovanej vody. Pridalo sa 35 ml 0,14 M-NaJO₄ a doplnilo sa destilovanou vodou na 200 ml. Podobne sa pripravil i slepý pokus. Oxidácia sa uskutočnila v tme pri 20 °C.

10 ml vzorky na stanovenie kyseliny mravčej a jodistanu sa odoberali v časových intervaloch uvedených v tab. 1.

Tabuľka 1

Čas (hod.)	HCOOH	NaJO ₄
6	0,12	1,05
21	0,20	1,08
60	0,20	1,08

Kyselina mravčia sa stanovila tak, že sa do vzorky pridal 1 ml etylénglykolu, aby sa rozrušil nadbytok jodistanu, a po 25 minútach sa titrovalo 0,01 N-NaOH na metyloranž.

Jodistan sa stanovil tak, že sa do vzorky pridal 1 g NaHCO₃, 1 ml 20 % KOH, 4 ml 0,1 N-Na₃AsO₃ a niekoľko kryštálikov KJ. Roztoky sa dali do tmy na 30 minút. Potom sa titrovali 0,01 N-J₂ na škrob.

Výsledky sú udané v móloch na 1 mól anhydromanózy.

Zo 110 ml roztoku mananu po oxidácii, ktorý sa nespotreboval na titráciu, odstránil sa jodistan octanom olovnatým. Vzniknutá zrazenina sa odcentrifugovala, premyla destilovanou vodou a roztok s premývacou vodou sa zahustil za vákuu na 15 ml. Oxidovaný manan sa redukoval 135 mg NaBH₄ a tri hodiny sa hydrolyzoval s 1 N-HCl na vriacom vodnom kúpeli v zatavenej trubici. Hydrolyzát sa filtroval cez Zerolit G v OH cykle a analyzoval sa chromatografiou na papieri v systéme S₃. V hydrolyzáte sa zistil glycerín.

Metylácia mananu [18, 19]

2 g mananu sme rozpustili v čo najmenšom množstve 30 % NaOH a metylovali sme za miešania dimetylsulfátom. Dimetylsulfát a 30 %-ný NaOH sme pridávali po častiach. Celkovo sme pridali 45 ml dimetylsulfátu a 90 ml 30 % NaOH. Metylovalo sa 4 krát. Metylovaný produkt sa vytrepal do chloroformu a chloroform sa odparil. Zvyšok 2,12 g vykazoval ešte malú absorpciu v infračervenom svetle, charakteristickú pre hydroxylové skupiny. Preto sa 700 mg znova 2 krát metylovalo za miešania v dimetylformamide (20 ml) metyljodidom (6 g) za prítomnosti 4 g BaO a 160 mg Ba(OH)₂ · 8H₂O pri 40 °C

[18]. Po centrifugácii sa dimetylformamid odparil za vákua 12 torr, odparok sa extrahoval éterom a éterový extrakt sa odparil. Zvyšok 512 mg nemá v infračervenom spektre absorpčné pásy hydroxylových skupín.

Hydrolyza metylovaného mananu

100 mg metylovaného mananu sa 5 hodín hydrolyzovalo v 1,2 ml 1 N-H₂SO₄ pri 100 °C v zatavenej skúmavke. Neutralizovalo sa pomocou BaCO₃. Vzniknutý síran sa odcentrifugoval a hydrolyzát sa analyzoval chromatografiou na tenkých vrstvách silikagélu v systéme S₂. R_G hodnoty metylovaných D-manopyranóz sú uvedené v tab. 2.

R_G hodnoty autentických vzoriek uvedených O-metyléterov D-manopyranózy boli zhodné s R_G hodnotami metyléterov prítomných v hydrolyzáte metylovaného mananu.

Tabuľka 2

Metyléry-D-manopyranózy	R _G
2,3,4,6-tetra-O-metyl-D-manopyranóza	0,91
3,4,6-tri-O-metyl-D-manopyranóza	0,78
3,4-di-O-metyl-D-manopyranóza	0,67

Stanovenie pomeru O-metylderivátov D-manózy [13, 20]

Na tenkú vrstvu silikagélu (platnička 20 × 20 cm) sa nanieslo 6 mg zneutralizovaného hydrolyzátu permetylovaného mananu. Vyvíjalo sa v systéme S₂. Po vyvíjaní sa okraje platničky v šírke 3 cm detegovali koncentrovanou H₂SO₄, príslušné pásy silikagélu zodpovedajúce jednotlivým metyléterom sa oddelili a vymyli sa 20 ml destilovanej vody.

Pre kolorimetriu sa odpipetovalo 2 ml roztoku príslušného metyléru D-manózy, pridal sa 1 ml 5 % roztoku fenolu vo vode a 7 ml koncentrovanej H₂SO₄. Po 30 minútovom temperovaní v 25 °C teplom vodnom kúpeli sa absorpcia merala za použitia modrého filtra.

Ďakujeme prof. C. T. Bishopovi (Division of Applied Biology, National Research Council, Ottawa) za poskytnutie vzorky 3,4,6-tri-O-metyl-D-manózy a 3,4-di-O-metyl-D-manózy.

Candida albicans sa kultivovala v mikrobiologickom laboratóriu nášho oddelenia (vedúca dr. A. Kocková-Kratochvílová).

ПОЛИСАХАРИДЫ ДРОЖЖЕЙ И ДРОЖЖЕВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (I)
 ПОВЕРХНОСТНЫЙ МАНАН *Candida albicans* ВЕРКНОУТ

Д. Шикл, Л. Маслер, Ш. Бауэр

Химический институт Словацкой академии наук, Отдел биохимии сахаридов,
 Братислава

С поверхности клеточных пленок *Candida albicans* ВЕРКНОУТ род № 109 был выделен растворимый в воде внеклеточный манан с средней степенью полимеризации 36 и удельным вращением $[\alpha]_D = +56^\circ$. При анализе поверхностного манана метилированием были установлены следующие *O*-метилэферы *D*-манозы: 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-; 3,4,6-три-*O*-метил- и 3,4-ди-*O*-метил-*D*-маноза в отношении 1 : 3 : 1. При периодатном окислении было израсходовано 1,08 моль периодата и образовалось 0,20 моль муравьиной кислоты на 1 моль ангидроманозы. Периодатным окислением получившийся полиальдегид восстанавливался. В продуктах гидролиза был обнаружен единственный полиспирт — глицерин. Результаты периодатного окисления подтвердили выводы анализа, основанного на метилировании.

На основе понижения оптического вращения после гидролиза и из инфракрасных спектров установили, что поверхностный манан содержит α -гликозидные связи.

Из вышесказанного вытекает, что внеклеточный поверхностный манан является разветвленным полисахаридом, состоящим из *D*-манопиранозных единиц, связанных α -1,2- и α -1,6-связями. Он отличается от внутриклеточного манана, выделенного Ц. Т. Бишоном [4] из клеточных стенок *Candida albicans* с более низкой степенью разветвления.

Preložila T. Dillingierová

THE POLYSACCHARIDES OF YEASTS AND YEAST-LIKE MICROORGANISMS (I)
 THE EXTRACELLULAR SURFACE MANNAN OF *Candida albicans* ВЕРКНОУТ

D. Šikl, L. Masler, Š. Bauer

Chemical Institute Slovak Academy of Sciences,
 Department of Biochemistry of Saccharides, Bratislava

From the surface of cellular membranes of pathogenous yeast *Candida albicans* ВЕРКНОУТ, strain number 109, in water soluble extracellular surface polysaccharide was isolated of the average degree of polymerisation (DP) = 36 and specific rotation $[\alpha]_D = +56^\circ$. By means of the methylation analysis the following *O*-methylethers of *D*-mannose were determined: 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-; 3,4,6-tri-*O*-methyl- and 3,4-di-*O*-methyl-*D*-mannose in the ratio 1 : 3 : 1. In the periodate oxidation, 1.08 mol sodium metaperiodate was consumed and there resulted 0.20 mol of formic acid to 1 mol of anhydromannose. The polyaldehyd formed by periodate oxidation was reduced and hydrolysed. In the hydrolysates glycerol was determined as the only polyalcohol present. The results of periodate oxidation proved the conclusions of methylation analysis.

From the decrease of optical rotation after acid hydrolysis and from the infrared spectrum it was found, that in the surface mannan there are α -glycosidic bounds.

On the basis of the above mentioned facts, extracellular surface mannan *Candida albicans* strain number 109 is a branched polysaccharide composed of the mannopyranose units bound by α -1,2- and α -1,6-bonds. It is different from the intracellular mannan isolated by C. T. Bishop [4] from the cellular walls of *Candida albicans* by a lower degree of branching.

Preložil D. Šíkl

LITERATÚRA

1. Vogel D. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **86**, 373 (1954).
2. Jensen J., Rasch S., Strand A., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **37**, 449 (1955).
3. Kessler G., Nickerson W. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 228 (1959).
4. Bishop C. T., Blank F., Gardner P. E., *Can. J. Chem.* **38**, 869 (1960).
5. Miyazaki T., *J. Pharm. Soc. Japan* **82**, 1678 (1963).
6. Sevag M. G., *Biochem. Z.* **273**, 419 (1934).
7. Chargaff E., Levine C., Green K., *J. Biol. Chem.* **175**, 67 (1948).
8. Patridge S. M., *Nature* **164**, 443 (1949).
9. Butler C. L., Cretcher L. M., *J. Am. Chem. Soc.* **53**, 4363 (1931).
10. Barker S. A., Bourne E. J., Stephens R., Whiffen D. H., *J. Chem. Soc.* **1954**, 3468.
11. Chanda S. K., Hirst E. L., Jones J. K. N., Percival E. G. V., *J. Chem. Soc.* **1950**, 1289.
12. Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Montgomery R., Smith F., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4970 (1952).
13. Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., *J. Chromatography* **11**, 479 (1963).
14. Viscontini M., Hoch D., Karrer P., *Helv. Chim. Acta* **38**, 642 (1955).
15. Kocková-Kratochvílová A., Šandula J., Hronská L., *Folia microbiologica* **8**, 109 (1963).
16. Šandula J., Kocková-Kratochvílová A., Zámečníková M., *Folia microbiologica* **8**, 313 (1963).
17. Kocková-Kratochvílová A., Stuchlík V., Pokorná M., *Folia microbiologica* **9**, 361 (1964).
18. Haworth W. N., *J. Chem. Soc.* **107**, 13 (1915).
19. Kuhn R., Egge H., Brossmer R., Gaube A., Klesse P., Lochinger W., Röhm E., Trischmann H., Tschampel D., *Angew. Chem.* **72**, 805 (1960).
20. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).

Do redakcie došlo 24. 4. 1964

Adresa autorov:

Inž. Dobroslav Šíkl, CSc., inž. Ladislav Masler, CSc., inž. dr. Štefan Bauer, CSc.,
Chemický ústav SAV, Oddelenie biochémie sacharidov, Bratislava, Dúbravská cesta.