

BIOSYNTHÈSE DE CELLULOSE BACTERIENNE À PARTIR DE GLUCOSE SÉLECTIVEMENT DEUTERIÉ EN POSITION 6: ÉTUDE PAR RMN

Didier GAGNAIRE et François R. TARAVEL

*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Centre National de la Recherche Scientifique,
Domaine Universitaire, B.P. 53, 38041 Grenoble, France*

Received 25 June 1975

Summary

D-glucose specifically deuterated at C-6 was prepared and used for the biosynthesis of bacterial cellulose with *Acetobacter xylinum*. The material obtained was converted into glucitol hexaacetate and analyzed by 250 MHz n.m.r. and mass spectrometry. These spectra indicated that about 70% of the starting D-glucose was incorporated without modification of deuteration at the C-6 position. However an explanation is required of the finding that deuterium was also incorporated at the C-2 and C-1 positions of the cellulose, arising respectively from the 6 pro-R and 6 pro-S positions of the initial D-glucose.

1. Introduction

L'obtention de cellulose extracellulaire et microfibrillaire à partir de culture d'*Acetobacter xylinum* [1] s'effectue facilement et conduit à une cellulose pure, avec des périodes de croissance variables selon les composés de départ.

Des études préliminaires faites dans ce laboratoire à partir de molécules marquées au deutérium ont montré [2,3]:

(a) que les taux d'échange entre deutérium et proton en positions 1 et 6 sont plus faibles que sur les autres positions (2,3,4 et 5): ces résultats ont été obtenus à partir de D-glucose totalement deutérié.

(b) que la biosynthèse avec du D-glucose monodeutérié en position 1 conduit à un effet isotopique important qui se manifeste par un rendement faible et par une période d'inhibition importante de la biosynthèse.

Le but de ce travail est de montrer les résultats obtenus avec des échantillons sélectivement deutériés en position 6. Dans le cas de la monodeutérisation, une synthèse de D-glucose où la deutérisation est la plus sélective possible en 6R a été recherchée. Une comparaison avec le cas du glucose dideutérié en 6, facilement accessible [4] a été effectuée.

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation de glucose monodeutérié en 6, à majorité 6R (1)

La monodeutérisation du glucose en 6 peut se faire par réduction du méthyl 6-aldéhydo- α -D-glucosidaldo-1,5-pyranoside [5]. L'identification non ambiguë par r.m.n. des protons 6R et 6S a été réalisée préalablement dans le cas de dérivés du glucose et de produits synthétisés à partir de glucose (par exemple l'hexaacétate de glucitol) [6]. Cependant, la répartition du deutérium (40% en 6R, 60% en 6S environ) obtenue dans cette réduction est insuffisamment dissymétrique pour en déduire des résultats significatifs lors de la biosynthèse, et une réduction plus sélective a été recherchée. Le meilleur résultat a été obtenu en prenant comme réducteur un dérivé de l'alpha pinène droit, le (–)-disopinocampheyldeuterioborane qui a déjà été utilisé pour des réductions asymétriques [7]. Le composé est préparé à partir de 8 g de dérivé 6-aldéhydo, 3.24 g de borodeutérure de sodium, 125 ml (X4) de tétrahydrofurane, 12.84 ml de trifluorure de bore éthéré (fraîchement distillé sur hydrure de calcium) et 32.4 ml de (+)- α -pinène optiquement pur. Après 55 h d'agitation on ajoute une solution 3 N de soude dans de l'eau lourde jusqu'à neutralisation et une

solution d'eau oxygénée à 30% jusqu'à cessation du dégagement gazeux. Le mélange réactionnel est alors évaporé complètement et repris par un peu d'eau. Une extraction au chloroforme permet d'obtenir une phase aqueuse débarrassée de ses principales impuretés. Cette phase est alors chromatographiée sur une colonne de gel de silice (Kieselgel 60-0, 063-0,200 mm, éluant: acétate d'éthyle-éthanol-eau 95:16:8). On obtient 3.5 g de méthyl α -D-glucopyranoside que l'on peut convertir en glucose puis en hexaacétate de glucitol (2), en vue de l'analyse isotopique; la monodeutérisation réalisée, déterminée par r.m.n. à 250 MHz et spectrographie de masse, est de 82%, le rapport relatif 6R : 6S étant de 88 : 12 environ. On peut noter que l'utilisation du réducteur inverse optique préparé à partir de (-)- α -pinène conduit à une majorité de dérivé S, mais est beaucoup moins sélective (mélange relatif 6R : 6S de 30 : 70 environ).

2.2 Préparation de D-glucose-6- 2 H₂ (5)

Le glucose dideutérié a été préparé selon la méthode de Sowden [4] par réduction au borodeutérite de sodium du 1,2-O-isopropylidène- α -D-glucofuranuronon-6,3-lactone. Son analyse par spectrographie de masse sous forme du dérivé 1,2-O-isopropylidène (6) indique 90% de dérivé dideutérié et 10% de dérivé monodeutérié.

2.3 Obtention et analyse de la cellulose biosynthétisée

Le milieu de culture à partir d'une souche d'*Acetobacter xylinum* a déjà été décrit par Hestrin [8]. Il fournit des échantillons de cellulose bactérienne qui sont lavés longuement à l'eau puis à la soude à 1% pendant une semaine, rincés par une solution d'acide acétique à 0.5% puis à l'eau. Ensuite la cellulose est acétylée par le mélange acide acétique, anhydride

acétique, acide perchlorique [2] ce qui conduit aux composés (3) et (7). Du point de vue rendement, 1 g de glucose marqué permet d'obtenir environ 120 mg de triacétate de cellulose. Cette quantité est suffisante pour l'étude ultérieure précise par r.m.n., qui peut être effectuée de deux façons:

(a) sur le triacétate de cellulose lui-même. En effet, dans le spectre à 250 MHz tous les protons du cycle sont séparés et peuvent être dosés approximativement par simple intégration. Leur identification a été faite par Friebolin et Keilich [9] qui cependant n'ont pas déterminé les protons 6 pro-R et 6 pro-S. L'expérience de biosynthèse réalisée à partir de glucose monodeutérié nous a permis une identification non ambiguë de ces deux protons (voir plus loin).

(b) sur l'hexaacétate de glucitol obtenu après hydrolyse totale de la cellulose, réduction au borohydride de sodium et acétylation (composés (4) et (8)). Les spectres sont évidemment plus précis que ceux de triacétate de cellulose et permettent non seulement le dosage du pourcentage de deutérisation des positions 1 à 5, 6R et 6S mais également l'observation directe (à l'aide des constantes de couplage) de molécules particulières mono- ou dideutériées. On notera que c'est en cela que le marquage par atomes lourds (ici D) est supérieur au marquage par élément radioactif (par exemple 3 T): en effet, l'observation d'un double marquage est possible (en r.m.n. ou en spectrographie de masse).

3. Résultats

La deutérisation des protons du squelette glucose de la cellulose biosynthétisée à partir des échantillons deutériés en 6 se fait sur les positions 1,2 et 6. Le tableau 1 donne les taux de deutérisation sur ces trois

Tableau 1
Taux de deutérisation des échantillons de glucose et de cellulose biosynthétisée

Composé	Nombre de deutérium par unité glucose			
	en 6	en 2	en 1	
Glucose 'mono-deutérié' (1)	0.82	0.72 en 6R 0.10 en 6S	0	0
Cellulose (3)	0.60		0.05	
Glucose 'di-deutérié' (5)	1.90		0	0
Cellulose (7)	1.40		0.10	0.50

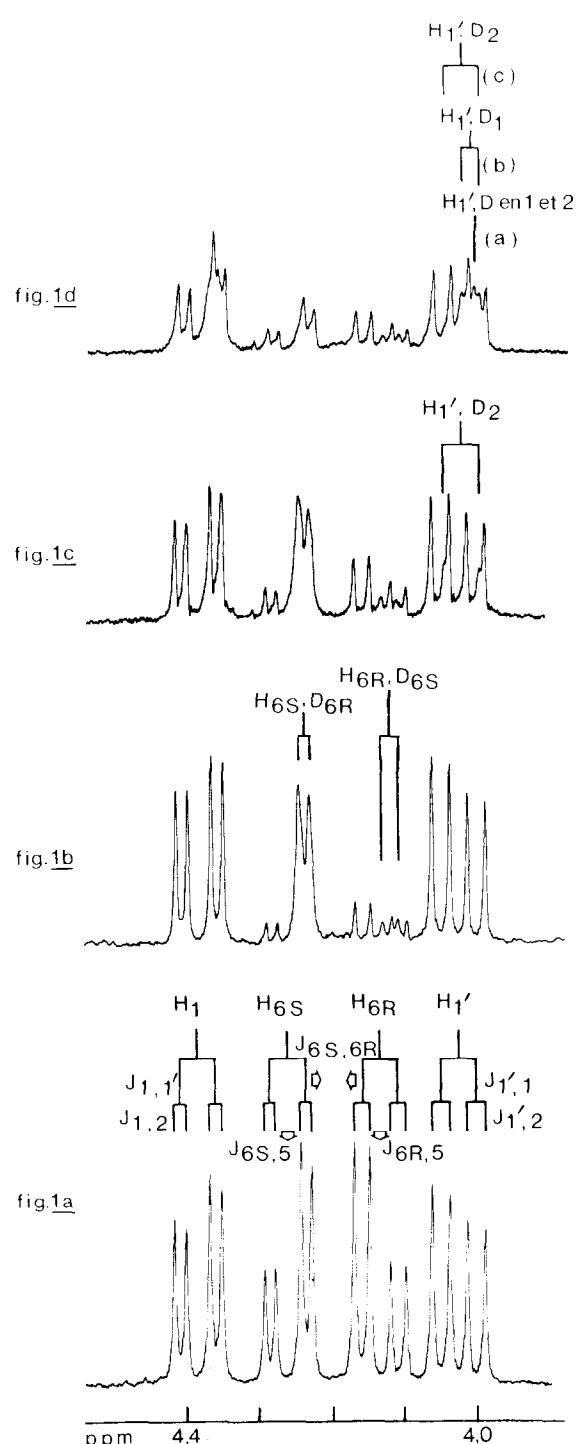


Fig.1. Spectres partiels de r.m.n. à 250 MHz de divers hexaacétates de glucitol dans le chloroforme-d.

positions, déterminés par l'intermédiaire des dérivés (2) et (6) en ce qui concerne les échantillons de glucose et par l'intermédiaire des dérivés (4) et (8) en ce qui concerne les échantillons de cellulose bactérienne. Le tableau 2 donne la répartition du deutérium sur les positions 6 pro-R, et 6 pro-S ainsi que la répartition en espèces mono-, di- et non-deutéries. D'autre part, le spectre de r.m.n. du triacétate de cellulose (3) obtenue à partir du glucose (1) montre que le proton 6 majoritaire résonne à $\delta = 4.35$ ppm/TMS et présente un couplage $J_{6,5}$ faible de l'ordre de 2 Hz, tandis que le proton 6 minoritaire résonne à $\delta = 4.04$ ppm/TMS et présente un couplage J plus grand, de l'ordre de 5 Hz. Le passage à l'état d'hexaacétate de glucitol (2), substance dont l'attribution 6R-6S a été faite [6], identifie au proton 6S le proton majoritaire. L'attribution des deux protons 6 pro-R et 6 pro-S dans le triacétate de cellulose est donc réalisée de façon non ambiguë (6 pro-R à 4.04 ppm et 6 pro-S à 4.35 ppm).

La figure 1 montre comment les spectres r.m.n. des hexaacétates de glucitol (4) et (8) permettent non seulement de déterminer les taux de deutérialion mais également de 'voir' indirectement les espèces mono- et dideutéries. La figure 1a donne la partie du spectre du dérivé non-deutérié correspondant aux protons 1 et 1', 6 pro-R et 6 pro-S [10] avec indication du couplage (voir tableau 3). La figure 1b correspond à l'hexaacétate de glucitol obtenu directement à partir du glucose (1). On voit clairement, en faisant référence aux données du spectre précédent, la contribution relative du produit non deutérié et des produits mono-deutériés en 6R et 6S. En effet, on note à 4.12 ppm la présence d'un doublet caractéristique du proton 6R voisin d'un deutérium en 6S, et couplé avec le proton 5. De même à 4.24 ppm et se superposant au signal déjà présent, on remarque la présence d'un doublet correspondant au proton 6S voisin d'un deutérium en 6R, et couplé avec le proton 5.

La figure 1c présente le spectre de r.m.n. de l'hexaacétate de glucitol (4) provenant de la cellulose biosynthétisée à partir du glucose mono-deutérié (1). On retrouve les trois espèces précédentes. En outre, dans la région correspondant au proton 1' apparaissent deux épaulements centrés à 4.02 ppm, avec une constante de couplage de 12.0 Hz et représentant la contribution d'un produit mono-deutérié en 2 (suppression du couplage $J_{1,2}$); ce phénomène confirme la deutérialion en 2 déjà visible sur les spectres de r.m.n. de triacétate

Tableau 2
Répartition des espèces deutériées sur les positions 6

	Unités di-deutériées	Unités mono-deutériées		Unités non-deutériées
		6R	6S	
Cellulose (3)		53%	7%	40%
Cellulose (7)	70%	5%	5%	20%

de cellulose bactérienne ou par intégration de ceux des hexaacétates de glucitol. On notera que le même effet est difficilement visible dans la région du proton 1.

La figure 1d montre le spectre de r.m.n de l'hexaacétate de glucitol (8) provenant de la cellulose biosynthétisée à partir de glucose di-deutérié (5). Outre les trois espèces déjà vues ce spectre met en évidence, dans la région du proton 1', des espèces dideutériées en 1 et 2 (suppression simultanée pour le proton observé des deux couplages $J_{1'1}$ et $J_{1'2}$ -- signal a centré à 4.01 ppm) ainsi que des espèces monodeutériées en 1 (suppression du seul couplage $J_{1'1}$ -- signaux b centrés à 4.02 ppm). On remarquera que dans ce cas, les épaulements correspondant à la mono-deutériation en 2 sont moins visibles que dans le cas de la figure 1c (signaux c), et que le dosage précis des différentes espèces est difficile.

4. Discussion des résultats

Le fait le plus significatif est le comportement très différent du marqueur, en ce qui concerne l'incorporation sur les positions 1 et 2, selon qu'il provient d'un site 6 pro-S ou d'un site 6 pro-R.

La deutériation en 6 pro-R est maintenue pour plus

de 70% dans la cellulose biosynthétisée ce qui pourrait traduire le fait qu'au moins 70% du glucose initial est incorporé sans modification en 6. Par contre, une modification doit intervenir au niveau du mécanisme pour expliquer la présence de deutérium sur la position 2 (5 et 10% dans le cas respectivement de la cellulose (3) et (7)). Dans ce dernier cas, la di-deutérisation en 6 est maintenue à environ 70%; le reste du deutérium se retrouve sur chaque position 1 (25%) et 'individuellement' sur chaque position 6 pro-R et 6 pro-S (5%). En outre, l'observation d'un marquage en 2 dans l'échantillon (4) et en 1 et 2 dans l'échantillon (8), montre que par une voie biosynthétique mineure le deutérium des positions 6 pro-R et 6 pro-S se retrouve en positions 2 et 1 respectivement; aucun mécanisme ne permettant actuellement d'expliquer ce résultat. Le passage par un cyclitol qui ferait disparaître l'un des protons (vraisemblablement 6 pro-S d'après [11]), ne peut rendre compte que d'espèces mono-deutériées dans la cellulose.

En conclusion, il est clair que plusieurs mécanismes se superposent dans la biosynthèse de la cellulose par *Acetobacter xylinum*; le processus majoritaire (70% environ) conservant les sites 6 pro-R et 6 pro-S du glucose. Ce résultat peut être rapproché de celui trouvé par Gorin [12] dans le cas de la biosynthèse de mannanes. Cependant, une analyse plus précise des

Tableau 3
Paramètres spectraux partiels de r.m.n. à 250 MHz de l'hexaacétate de glucitol

	H-1	H-6S	H-6R	H-1'		
δ (ppm/TMS) dans CDCl_3	4.38	4.25	4.13	4.02		
J (Hz)	$J_{1,1'}$ -- 12.0	$J_{1,2}$ 4.0	$J_{1,2}$ 6.0	$J_{5,6S}$ 3.8	$J_{5,6R}$ 5.3	$J_{6S,6R}$ -- 12.3

produits montre le passage du deutérium de la position 6 pro-R à la position 2 et de la position 6 pro-S à la position 1.

Remerciements

Nous remercions vivement Monsieur Bosso pour la partie spectrométrie de masse relative à ce travail et Madame Marais pour la partie biosynthèse de la cellulose.

Références

- [1] Mühlthaler, K. (1949) *Biochem. Biophys. Acta*, 3, 527.
- [2] Barnoud, F., Gagnaire, D., Odier, L. et Vincendon, M. (1971) *Biopolymers*, 10, 2269.
- [3] Vincendon, M. (1972) *Thèse d'Etat*, Université de Grenoble.
- [4] Sowden, J. C. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 4377.
- [5] Horton, D., Luetzow, A. E. et Wease, J. C. (1968) *Carbohydr. Res.*, 8, 366.
- [6] Gagnaire, D., Horton, D. et Taravel, F. R. (1973) *Carbohydr. Res.*, 27, 363.
- [7] Wolfe, S. et Rauk, A. (1966) *Can. J. Chem.*, 44, 2571.
- [8] Hestrin, S. (1963) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. III, 4. Academic Press, New York and London.
- [9] Friebohm, H., Keilich, G. et Siefert, E. (1969) *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 8, 766.
- [10] Angyal, S. J., Le Fur, R. et Gagnaire, D. (1972) *Carbohydr. Res.*, 23, 121.
- [11] Byun, S. M., Jenness, R., Ridley, W. P. et Kirkwood, S. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 54, 961.
- [12] Gorin, P. A. J. (1975) *Carbohydr. Res.*, 39, 3.