



УДК 577.114.5.088:579.841.91

## АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 19\*. СТРОЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ALCALIGENES FAECALIS*

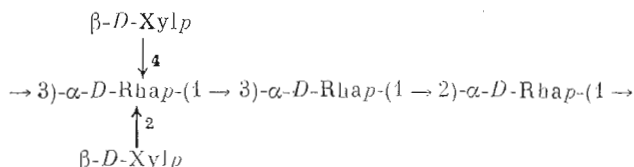
Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М.\*, Шапков А. С.,  
Захарова И. Я.\*, Кочетков Н. Б.

Институт органической химии им. П. Д. Зелинского

Академии наук СССР, Москва;

\*Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного  
Академии наук УССР, Киев

О-Специфический полисахарид, полученный при мягкой кислотной деградации липополисахарида *Alcaligenes faecalis*, содержит D-рамнозу и D-ксилозу в соотношении 3:2. При частичном сольволизе полисахарида фтористым водородом в метаноле был получен метилгликозид разветвленного тетрасахарида, включающего три остатка рамнозы и один остаток ксилозы, а при распаде полисахарида по Смитту образовался гликозид дисахарида, построенный из двух остатков рамнозы и глицерина. На основании строения этих олигосахаридов, данных метилирования, анализа <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров (с использованием ядерного эффекта Оверхаузера) сделан вывод, что линейная цепь полисахарида представляет собой рамноз, а оба остатка ксилозы присоединяются к одному из остатков рамнозы в виде двух ответвлений. Повторяющееся пентасахаридное звено полисахарида имеет следующее строение:



*Alcaligenes faecalis* (Кастеллани и Чалмерс, 1919) — вид грамотрицательных условно-патогенных бактерий с неопределенным таксономическим положением. В последнем издании определителя Берджи [2] род *Alcaligenes*, входящий в секцию грамотрицательных аэробных палочек и кокков, как и ранее, не включен ни в одно из семейств этой секции. Он относится к группе неферментирующих бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к экстремальным условиям внешней среды [3]. Эта относительно мало изученная группа в последнее время вызывает интерес исследователей в связи с усилением роли сапрофитной и условно-патогенной микрофлоры в патогенезе инфекционной заболеваемости [4, 5].

Изучение состава, структуры и иммунохимических свойств О-антигенов (липополисахаридов) бактерий рода *Alcaligenes* и других грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов должно привести к пониманию на молекулярном уровне механизма их взаимодействия с организмом хозяина и с окружающей средой и способствовать разработке иммунологических методов борьбы с инфекцией. Эти данные могут также служить одним из хемотаксономических критериев при решении вопросов классификации микроорганизмов и путей их эволюционного развития.

Ранее было показано, что в состав липополисахарида *A. faecalis*, штамм 6, входят глюкоза, галактоза, ксилоза, рамноза, гентоза, глюкозамин, а также 2-О-метил-D-рамноза [6]. В настоящей работе приведены данные по установлению строения повторяющегося звена О-специфической полисахаридной цепи этого липополисахарида.

\* Сообщение 18 см [1].

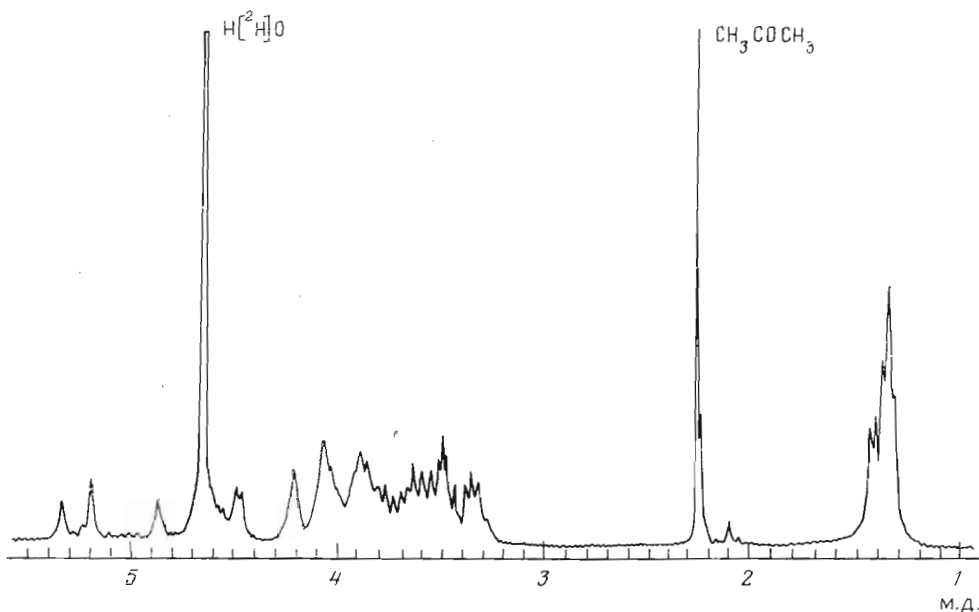


Рис. 1.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *A. faecalis*

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток по методу [7]. Его серологическая [6] и физико-химическая [8] характеристики были получены ранее. При расщеплении липополисахарида разбавленной уксусной кислотой после отделения осадка липида центрифугированием гель-фильтрацией углеводной фракции на сефадексе G-50 был получен О-специфический полисахарид. Он был активен в реакции преципитации с гомологичной О-антисывороткой, но адсорбировал лишь около половины специфических антител, связываемых липополисахаридом.

При кислотном гидролизе полисахарида были получены рамноза и ксилоза, идентифицированные хроматографией на бумаге и ГЖХ; их соотношение составляло  $\sim 3:2$ . Моносахариды были выделены из гидролизата в индивидуальном виде препаративной хроматографией на бумаге, и на основании величины оптического вращения (для рамнозы после превращения метанолизом в метилрамнозид) была установлена их *D*-конфигурация, которая была подтверждена расчетом оптического вращения полисахарида и его олигосахаридных фрагментов по правилу Кляйна (см. ниже).

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы метильных групп трех 6-дезоксисахаров ( $\delta$  1,33 м. д., 6 H, суперпозиция двух дублетов,  $J_{5,6} \sim 6$  Гц;  $\delta$  1,41 м. д., 3 H, дублет,  $J_{5,6}$  6 Гц) и пяти аномерных протонов при 4,48 м. д. (2 H, суперпозиция двух дублетов,  $J_{1,2} \sim 8$  Гц), 4,87; 5,20 и 5,34 м. д. (все уширенные синглеты), а также группа сигналов в области 3,2–4,2 м. д.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2, табл. 1) содержал сигналы метильных групп трех 6-дезоксисахаров при 17,8 (двойной интенсивности) и 18,0 м. д., пяти аномерных атомов углерода при 101,1; 101,5; 103,4; 104,4 и 104,7 м. д., а также 20 сигналов в области 66–81 м. д.

Таким образом, полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, включающих три остатка 6-дезоксисахара (рамнозы) и два остатка пентозы (ксилозы). Следовательно, из идентифицированных ранее в составе липополисахарида *A. faecalis* сахаров [6] только эти два входят в О-специфическую цепь. Из остальных компонентов этого липополисахарида глюкозамин обычно входит в липидную часть; этот же моносахарид, а также глюкоза, галактоза и гептоза входят в состав олигосахарида кора многих граммотрица-

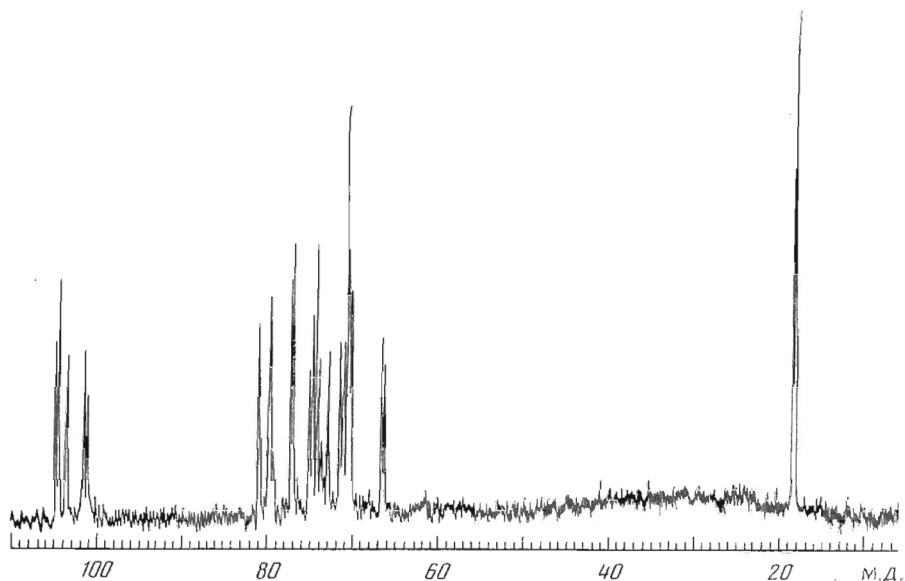


Рис. 2.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *A. faecalis*

тельных бактерий [9]. Положение 2-О-метилдрозы в молекуле липополисахарида остается невыясненным.

Присутствующие в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида сигналы двух аномерных протонов при 4,48 м. д. с большой константой спин-спинового взаимодействия  $J_{1,2} \sim 8$  Гц могут принадлежать только  $\beta$ -кислопиранозным остаткам, и, таким образом, оба остатка кислоты находятся в пиранозной форме и их гликозидные связи имеют  $\beta$ -конфигурацию. Этот вывод подтверждался химическими сдвигами сигналов С5 этих моносахаридов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида (66,3 и 66,4 м. д.; триплеты в спектре, снятом без подавления С, Н-взаимодействий) [10, 11]. Положение сигналов аномерных протонов всех трех остатков рамнозы в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре

Таблица 1

Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах ( $\delta$ , м. д.)

| Соединение   | Остаток               | C1                 | C2                | C3                | C4                | C5                | C6   |
|--|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Полисахарид <i>A. faecalis</i>                                       | -2,3,4Rha $\alpha$ 1- | 101,1 <sup>a</sup> | 79,5              | 74,9              | 80,8 <sup>b</sup> | 70,0 <sup>b</sup> | 18,0 |
|  | -3Rha $\alpha$ 1-     | 103,4              | 71,3              | 79,5              | 72,7              | 70,2 <sup>b</sup> | 17,8 |
|  | -2Rha $\alpha$ 1-     | 101,5 <sup>a</sup> | 80,6 <sup>b</sup> | 70,9              | 73,6              | 70,2 <sup>b</sup> | 17,8 |
|  | Xyl $\beta$ 1-        | 104,7              | 74,5              | 76,9              | 70,5              | 66,1              |      |
|  | Xyl $\beta$ 1-        | 104,4              | 74,0              | 77,1              | 70,5              | 66,3              |      |
| Олигосахарид (IV) *  | -3,4Rha $\alpha$ 1-   | 101,8 <sup>a</sup> | 71,5              | 75,8              | 81,1 <sup>b</sup> | 69,1              | 18,1 |
|  | Rha $\alpha$ 1-       | 103,9              | 71,3 <sup>b</sup> | 71,5 <sup>b</sup> | 73,5 <sup>r</sup> | 69,9 <sup>a</sup> | 17,8 |
|  | -2Rha $\alpha$ 1-     | 101,3 <sup>a</sup> | 80,6 <sup>b</sup> | 70,6 <sup>b</sup> | 73,3 <sup>r</sup> | 70,2 <sup>a</sup> | 17,8 |
|  | Xyl $\beta$ 1-        | 104,7              | 74,4              | 77,0              | 70,6              | 66,1              |      |
| Олигосахарид (III)   | Rha $\alpha$ 1-       | 103,2              | 71,4              | 71,4              | 73,3              | 70,3              | 17,8 |
|  | -3Rha $\alpha$ 1-     | 100,5              | 71,4              | 79,5              | 72,5              | 70,3              | 17,8 |
|  | -2Cro                 | 62,6               | 79,5              | 61,9              |                   |                   |      |
| Полисахарид <i>P. syringae</i> , патовар <i>morsprunorum</i> [21] ** | -2Rha $\alpha$ 1-     | 101,9              | 79,2              | 71,2              | 73,7              | 70,6              | 17,9 |
| Полисахарид <i>P. wiekingae</i> [22]                                 | -3,4Rha $\alpha$ 1-   | 102,5              | 71,5              | 77,1              | 80,5              | 69,4              | 18,4 |
|  | Xyl $\beta$ -OMe [10] | Xyl $\beta$ 1-     | 105,1             | 74,0              | 76,9              | 70,4              | 66,3 |

а-д Отнесение может быть обратным.

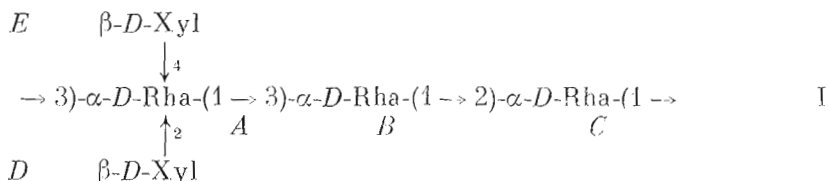
\* Химический сдвиг сигнала О-метильной группы 56,9 м. д.

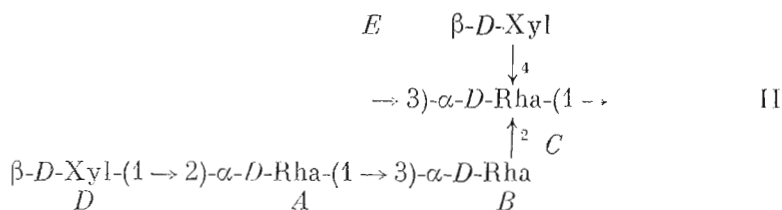
\*\* Данные округлены до десятичного знака миллионов долей и приведены с аддитивной поправкой +0,85 м. д., необходимость которой вызвана тем, что в работе [21] химический сдвиг метанола принимался +49,3 м. д.

полисахарида в более слабом поле, чем 4,9 м. д., показывало, что их гликозидные связи имеют  $\alpha$ -конфигурацию [12]. Пиранозная форма остатков рамнозы следовала из отсутствия в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида сигналов в более слабом поле, чем 82 м. д., характерных для С4 фуранозидов [13]. Вывод о конфигурациях гликозидных связей согласовывался с величинами констант спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ , определенными из  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида, снятого без подавления С, H-взаимодействий. Два сигнала аномерных углеродных атомов при 104,4 и 104,7 м. д. имели в этом спектре вид дублетов с  $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  163 Гц, а три других сигнала — вид дублетов с  $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  168–173 Гц, т. е. два моносахарида имеют  $\beta$ -конфигурацию, а три других являются  $\alpha$ -аномерами [14].

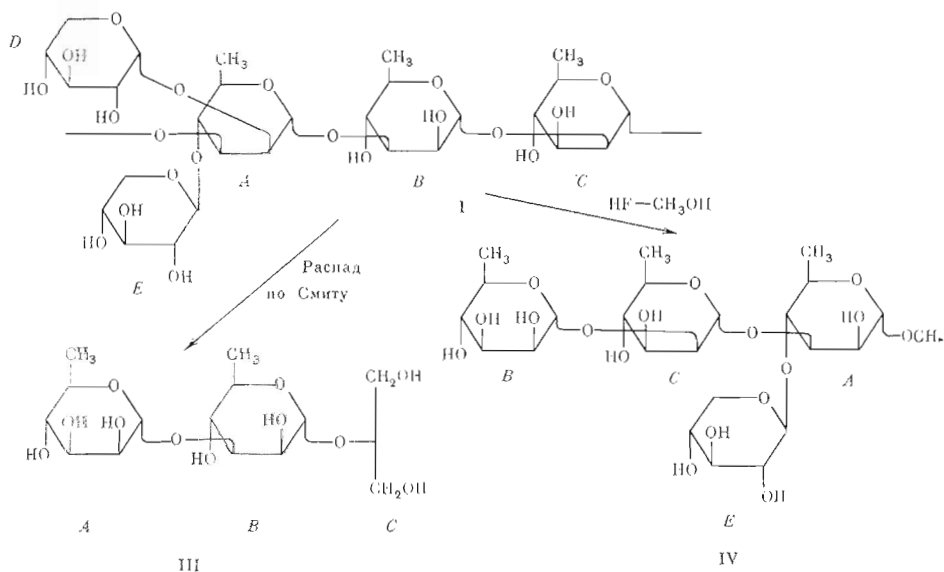
Для определения типов замещения моносахаридов полисахарид был подвергнут метилированию по методу [15]. Анализ методом ГЖХ-масс-спектрометрии частично метилированных моносахаридов, полученных при кислотном гидролизе метилированного полисахарида, проводился в виде ацетатов полиолов с использованием данных [16]. В результате были идентифицированы 2,3,4-три-*O*-метилксилоза, 2,4-ди-*O*-метилрамноза, 3,4-ди-*O*-метилрамноза и рамноза в соотношении  $\sim 1,5 : 1 : 1 : 1$ , а также следовые количества 4-*O*-метилрамнозы. Так как полисахарид, по данным ЯМР-спектров, является строго регулярным и других производных ксилозы, кроме полностью метилированного, обнаружено не было, можно заключить, что оба остатка ксилозы являются терминальными моносахаридами боковых цепей. Заниженное содержание в смеси метилированных сахаров 2,3,4-три-*O*-метилксилозы объясняется, вероятно, повышенной летучестью этого производного по сравнению с производными рамнозы, приводящей к его частичной потере в ходе подготовки образца для анализа. Присутствие в повторяющемся звене двух боковых цепей подтверждалось идентификацией неметилированного производного рамнозы, являющейся узлом двойного разветвления полисахаридной цепи. Два других остатка рамнозы являются монозамещенными, один — в положение 3, а другой — в положение 2. Происхождение следовых количеств 4-*O*-метилрамнозы, обнаруженной в смеси частично метилированных сахаров, остается не вполне ясным; возможно, оно связано с наличием соответственно замещенной рамнозы также в составе кора липополисахарида *A. faecalis*.

Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене была определена методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [17]. Предоблучение протонов H1 обоих остатков ксилозы в полисахариде (звенья *D* и *E*) при 4,48 м. д. вызывало значительный ЯЭО ( $\sim 3\%$ ) на атоме H1 остатка рамнозы (звена *A*) при 5,20 м. д. В этом же эксперименте наблюдался значительный ЯЭО ( $\sim 3\%$ ) на атоме H6 одного из остатков рамнозы при 1,41 м. д. Эти эффекты возможны только в случае 1 $\rightarrow$ 2- и 1 $\rightarrow$ 4-связей между моносахаридными остатками соответственно. Следовательно, один из остатков ксилозы (звено *D*) присоединяется к остатку рамнозы (звено *A*) в положение 2, а второй остаток ксилозы (звено *E*) — к одному из остатков рамнозы в положение 4. Предоблучение при 4,87 м. д. протона H1 остатка рамнозы (звено *B*) вызывало заметный ЯЭО ( $\sim 7\%$ ) на атоме H1 другого остатка рамнозы (звено *C*), резонирующем при 5,34 м. д.; аналогичный ЯЭО на H1 звена *B* наблюдался при предоблучении H1 звена *C*. Таким образом, звенья *B* и *C* соединены друг с другом 1 $\rightarrow$ 2-связью. Этим данным по ЯЭО удовлетворяли две структуры повторяющегося звена — (I) и (II), причем структура (II) по стериическим соображениям представляется значительно менее вероятной.





Для выбора между этими двумя альтернативными структурами и независимого подтверждения последовательности моносахаридов полисахарида был подвергнут избирательному расщеплению. При распаде полисахарида по Смитсу с последующим восстановлением продукта боргидридом натрия был получен олигосахарид (III) (схема). По данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра (табл. 1), он был построен из двух остатков рамнозы и глицери-на и был идентичен олигосахариду, полученному при распаде по Смитсу  $\text{O}$ -специфического полисахарида *Pseudomonas cepacia* 3181 [18]. Его образование находится в соответствии с типами замещения моносахаридов в структуре (I) и доказывает, что единственный окисляющийся периодатом монозамещенный в положение 2 остаток рамнозы (звено C) находится в основной цепи полисахарида.



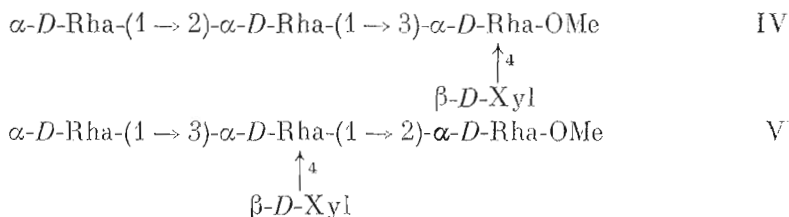
Другой путь избирательного расщепления полисахарида заключался в сольволизе безводным фтористым водородом в среде метанола. Так как ксилопиранозидные и рамнопиранозидные связи легко расщепляются безводным фтористым водородом при температуре  $-40^\circ\text{C}$  и выше [19], сольволиз был проведен при  $-78^\circ\text{C}$ . Гель-фильтрацией продуктов реакции на TSK HW 40 были выделены четыре хорошо разделяющиеся фракции примерно в равных количествах. Вещество, элюирующееся непосредственно вслед за свободным объемом колонки, имело  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр, идентичный спектру исходного полисахарида, и, таким образом, являлось нерасщепившимся или незначительно расщепившимся полимером. Следующей элюировалась фракция, по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра и объему удерживания являющаяся смесью высших олигосахаридов, которые в дальнейшем не исследовались. Третья фракция представляла собой единственный образовавшийся низший олигосахарид (IV) (схема), а последняя фракция являлась смесью метилксилосидов и метилрамнозидов.

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре олигосахарид (IV) присутствовали сигналы трех метильных групп 6-дезоксисахаров при 1,29; 1,32 и 1,39 м. д., одной  $\text{O}$ -метильной группы при 3,43 м. д., четырех аномерных протонов при

4,47 м. д. (дублет,  $J_{1,2}$  7,5 Гц), 4,71; 4,90 (оба уширенные синглеты) и 5,39 м. д. (дублет,  $J_{1,2}$  1,6 Гц), а также группа сигналов в области 3,2–4,1 м. д.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр олигосахарид (IV) содержал сигналы трех метильных групп 6-дезоксисахаров при 17,8 (двойной интенсивности) и 18,1 м. д., O-метильной группы при 55,9 м. д., четырех аномерных атомов углерода при 101,3; 101,8; 103,9 и 104,7 м. д. и 16 сигналов остальных углеродных атомов в области 66–82 м. д. (табл. 1). Таким образом, в состав олигосахарид (IV) входят три остатка рамнозы и один остаток ксилозы. Так как остатки ксплозы являются в полисахариде терминальными, один из остатков рамнозы входит в олигосахарид (IV) в виде метилгликозида, причем на основании химического сдвига сигнала метоксигруппы (55,9 м. д.) он находится в пиранозной форме и имеет  $\alpha$ -конфигурацию [10].

Анализ олигосахарид (IV) методом метилирования привел к идентификации 2,3,4-три-O-метилксплозы, 2,3,4-три-O-, 3,4-ди-O- и 2-O-метилрамноз. Из этих данных следовало, что олигосахарид является разветвленным, одна из его цепей заканчивается остатком ксплозы, вторая — остатком рамнозы, а в узле разветвления находится остаток рамнозы, замещенный в положении 3 и 4.

Место присоединения остатка ксплозы в олигосахариде (IV) было определено методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии с использованнем ЯЭО [17]. Предоблучение при 4,47 м. д. H1 остатка ксплозы привело к заметному увеличению ( $\sim 4$ –6%) сигналов H2, H3 и H5a этого же остатка при 3,54; 3,44 и 3,30 м. д. соответственно (отнесение этих сигналов в спектре было сделано с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса и сравнением со спектром метил- $\beta$ -D-ксилопиранозида), а также к увеличению одного из сигналов рамнозы при 3,74 м. д. ( $\sim 7\%$ ). Этот сигнал имел вид триплета ( $^3J$  9,5 Гц) и, следовательно, мог принадлежать только H4. Таким образом, остаток ксплозы присоединяется к замещенному остатку рамнозы в положение 4. Этот вывод подтверждался ЯЭО ( $\sim 3\%$ ) на резонирующем при 1,39 м. д. атома H6 остатка рамнозы, полученным в том же эксперименте.



Выбор между двумя возможными структурами (IV) и (V) олигосахарид, удовлетворяющими данным метилирования и ЯЭО, был сделан методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Известно, что атом C1  $\alpha$ -метилрамнопиранозида и его гликозидированных в положение 3 или 4 производных резонирует в области 101,5–102,5 м. д., а в случае его гликозидирования в положение 2 — в более сильном поле, чем 100,5 м. д. [20]. Отсутствие в аномерной области  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра олигосахарид сигналов в более сильном поле, чем 101,3 м. д., и в то же время присутствие сигнала при 101,8 м. д. согласуется, следовательно, со структурой (IV), но не со структурой (V). Кроме того, структуре (V) противоречит присутствие в спектре олигосахарид двух сигналов аномерных атомов углерода в более сильном поле, чем 102 м. д. (при 101,8 и 101,3 м. д.), так как известно, что атом C1 не замещенной в положение 2  $\alpha$ -рамнопиранозы, гликозилирующей рамнопиранозу в положение 2 или 3, резонирует в более слабом поле, чем 102,5 м. д. [20]. В олигосахариде со структурой (IV) эти сигналы могут быть отнесены к остатку рамнозы, образующему метилгликозил, и к остатку, замещенному в положение 2, соответственно.

Таким образом, полученный при сольволизе олигосахарид имеет структуру (IV), которая полностью согласуется со структурой (I) полисахарида, установленной на основании данных по ЯЭО. Результаты полной

Расчет оптического вращения по правилу Кляйна

| Соединение                     | $[\alpha]_D$ (вода),<br>град | $M_T$ | $[M]_D$ , град |
|--------------------------------|------------------------------|-------|----------------|
| <i>LRha</i> $\alpha$ -ОМе [24] | -67.2                        | 176   | -119,6         |
| <i>DXyl</i> $\beta$ -ОМе [25]  | -65.5                        | 164   | -107,4         |
| Полисахарид <i>A. faecalis</i> |                              |       |                |
| Рассчитано для                 |                              |       |                |
| <i>DRha</i> и <i>DXyl</i>      | +20.5                        | 702   | +144,0         |
| <i>LRha</i> и <i>LXyl</i>      | -20.5                        | 702   | -144,0         |
| <i>LRha</i> и <i>DXyl</i>      | -81.7                        | 702   | -573.7         |
| <i>DRha</i> и <i>LXyl</i>      | +81.7                        | 702   | +573.7         |
| Экспериментальное значение     | +25,7                        |       |                |
| Олигосахарид (IV)              |                              |       |                |
| Рассчитано для                 |                              |       |                |
| <i>DRha</i> и <i>DXyl</i>      | +40.5                        | 620   | +251,4         |
| <i>LRha</i> и <i>LXyl</i>      | -40.5                        | 620   | -251,4         |
| <i>LRha</i> и <i>DXyl</i>      | -75.2                        | 620   | -466,2         |
| <i>DRha</i> и <i>LXyl</i>      | +75.2                        | 620   | +466,2         |
| Экспериментальное значение     | +42,1                        |       |                |
| Олигосахарид (III)             |                              |       |                |
| Рассчитано для                 |                              |       |                |
| <i>DRha</i>                    | +62,3                        | 384   | +239,2         |
| <i>LRha</i>                    | -62,3                        | 384   | -239,2         |
| Экспериментальное значение     | +48,4                        |       |                |

расшифровки  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров олигосахарида (IV) и полисахарида (табл. 1) также находятся в соответствии с найденными для них структурами. Спектр олигосахарида (IV) был расшифрован при сравнении со спектрами метил- $\beta$ -D-ксилопиранозида [10], O-специфического полисахарида *Pseudomonas syringae*, патовар *morsprunorum* [21], имеющего структуру  $\rightarrow 3$ - $\alpha$ -D-Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Rha-(1 $\rightarrow$ , и O-специфического полисахарида *P. wieringae* [22], включающего дизамещенный в положения 3 и 4 остаток рамнозы. Спектр полисахарида *A. faecalis* был расшифрован путем сравнения со спектрами олигосахаридов (III) и (IV) с учетом дополнительного замещения находящегося в узле разветвления остатка рамнозы в положение 2.

В заключение структурного исследования был проведен расчет оптического вращения олигосахаридов (III) и (IV), а также полисахарида по правилу Кляйна [23], результаты которого, приведенные в табл. 2, подтвердили абсолютные конфигурации моносахаридов.

Обнаружение в составе O-специфического полисахарида *A. faecalis* D-рамнозы, относительно редко встречающегося в природе моносахарида, является отличительной особенностью этого полимера. Ранее D-рамноза была найдена только у представителей семейства псевдомонад [18, 21, 22, 26]. Сходство *A. faecalis* с псевдомонадами, в основном фенотипическое, наблюдали и другие авторы, и даже были сделаны попытки (пока не получившие признания) отнесения этого вида к семейству псевдомонад [27]. По результатам гибридизации ДНК/рРНК вид *A. faecalis* входит в одно надсемейство с некоторыми представителями псевдомонад [2]. Обнаружение в липополисахариде D-рамнозы, если распространенность этого моносахарида подтвердится при исследовании других штаммов *A. faecalis*, также может стать одним из аргументов в пользу таксономической и эволюционной близости этого вида семейству псевдомонад.

Более того, выявленное нами сходство проявляется не только в присутствии в липополисахариде общего редкого моносахарида, но и в структурной организации O-специфической полисахаридной цепи. Так, линейная, построенная из остатков D-рамнозы часть повторяющегося звена полисахарида *A. faecalis* идентична трисахаридному повторяющемуся звену O-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *morsprunorum* [21], является фрагментом повторяющегося звена полисахаридов ряда

других патоваров *P. syringae* [22] и *P. wieringae* [22] и отличается от трисахаридного повторяющегося звена полисахарида *P. ceracia* 3181 конфигурацией только одной рамнопиранозидной связи [18].

С другой стороны, полисахарид изученного штамма *A. faecalis* идентичен по структуре повторяющегося звена О-специфическому полисахариду мутантного штамма *E. coli*, характеризующегося фенотином *A. faecalis* и полученного при длительном культивировании кишечной палочки в воде (эти данные будут опубликованы отдельно). Этот факт указывает на возможную связь *A. faecalis* с семейством энтеробактерий и свидетельствует в пользу высказанного ранее предположения о промежуточном положении этого вида и формировании за его счет измененных форм энтеробактерий [27]. В этой связи заслуживает внимания и обнаружение в составе липида *A. P. ceracia* 3181 пула жирных кислот, характерного не для псевдомонад, а для энтеробактерий (неопубликованные данные). Все это в определенной мере может быть указанием на общность происхождения культур и взаимосвязь семейств псевдомонад и энтеробактерий.

### Экспериментальная часть

Восходящая хроматография выполнена на бумаге FN-11 в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) при обнаружении веществ щелочным нитратом серебра. Гель-фильтрация выполнена на колонке (70×3,5 см) с сефадексом G-50 в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, и на колонке (80×1,7 см) с TSK HW 40 в воде. Элюционные кривые записаны с использованием углеводного анализатора Technicon (США) или дифференциального рефрактометра Knauer (ФРГ). ГЖХ проведена на приборе Pye Unicam 105, модель 64 (Англия), на колонке с 3% OV-1 на диатомите СQ (100–120 меш), газ-носитель — азот, скорость 30 мл/мин. ГЖХ-масс-спектрометрия выполнена на приборе Varian MAT Gnom 111 (США) с использованием той же фазы.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры записаны на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в D<sub>2</sub>O при 50° С для полисахарида и при 30 или 90° С для моно- и олигосахаридов. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D<sub>2</sub>O при 60° С для полисахарида и 30° С для олигосахаридов. В качестве внутреннего стандарта использовали ацетон (δ<sub>H</sub> 2,23) и метанол (δ<sub>C</sub> 50,15). Эксперименты по ЯЭО проведены по методике [28] разностным способом, задержка релаксации 4 с, время построения ЯЭО 0,5 с. Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20° С. Растворы лиофилизировали или упаривали в вакууме при 40° С. Серологические тесты проводили как описано в работе [6].

Метил-β-D-ксилопиранозид (Serva, ФРГ), <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 4,345 (H1, дублет, J<sub>1,2</sub> 7,8 Гц), 3,99 (H5e, дублет дублетов, J<sub>4,5e</sub> 5,4 Гц), 3,64 (H4, дублет дублетов, J<sub>4,5a</sub> 10,5 Гц), 3,46 (H3, триплет, J<sub>3,4</sub> 9,0 Гц), 3,34 (H5a, дублет дублетов, J<sub>5a,5e</sub> 11,4 Гц), 3,27 (H2, дублет дублетов, J<sub>2,3</sub> 9,1 Гц).

**Выделение О-специфического полисахарида.** Липополисахарид (200 мг), выделенный по методу [7] как описано ранее [6], нагревали при ~100° С с 1% уксусной кислотой (30 мл, 2 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, сульфатант лиофилизировали, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделили О-специфический полисахарид (90 мг), элюирующийся непосредственно вслед за свободным объемом колонки, и олигосахаридную фракцию (20 мг), которая в дальнейшем не исследовалась.

**Кислотный гидролиз** полисахарида (1 мг) проводили 2 М соляной кислотой (0,5 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали, остаток упаривали несколько раз с водой, исследовали методом хроматографии на бумаге и ГЖХ (после превращения в ацетаты полиолов по обычной методике) [18]. В препаративном варианте использовали 20 мг полисахарида и 3 мл 1 М соляной кислоты, после аналогичной обработки препаративной хроматографией на бумаге выделили D-ксилозу (3 мг), [α]<sub>D</sub> +13° (с 0,1) (ср. с данным [29]: [α]<sub>D</sub> +18,8° (вода)), и D-рамнозу (4 мг), которую метанолизом 1% раствором хлористого водорода в метаноле (2 мл, кипячение 2 ч) превратили в метил-D-рамнозид, [α]<sub>D</sub> +36° (с 0,2) (ср. с данным [24] для метил-α-L-рамнопиранозид: [α]<sub>D</sub> -67,2° (вода)); по данным [30], L-рамноза в этих же условиях метанолиза дает метил-L-рамнозид, [α]<sub>D</sub> -32° (вода).



*Анализ методом метилирования* проводили по методу [15], метилированный полисахарид выделяли диализом против дистиллированной воды, метилированный олигосахарид (IV) выделяли с использованием патрона Ser-Pak с силикагелем  $C_{18}$  (Waters, США) по методу [31]. Метилированные продукты расщепляли и превращали в ацетаты полиолов как описано в работе [18].

*Распад по Смитту.* Полисахарид (30 мг) окисляли 0,1 М периодатом натрия (3 мл, 48 ч, 20° С, в темноте), обрабатывали 100 мг боргидрида натрия, через 2 ч подкисляли концентрированной уксусной кислотой, денонизировали гель-фильтрацией на TSK HW 40, гидролизовали 1% уксусной кислотой (2 мл, 100° С, 1,5 ч), гидролизат лиофилизовали, восстанавливали боргидридом натрия (20 мг) в воде (1 мл, 1 ч), гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделяли 6 мг олигосахаридов (III),  $[\alpha]_D^{25} +48,4^\circ$  (с 0,6) (ср. с данными [18]:  $[\alpha]_D^{25} +51,6^\circ$  (вода)).

*Сольволиз фтористым водородом.* Полисахарид (40 мг) высушивали над пятиокисью фосфора (70° С, 3 ч, в вакууме), растворяли в 5 мл абсолютного метанола, помещали в герметичный тефлоновый сосуд, в который при охлаждении смесью твердой двуокиси углерода и ацетона перегоняли фтористый водород (~10 мл), предварительно высушенный над трифторидом кобальта [32], перемешивали 30 мин при -78° С, выливали в смесь твердой двуокиси углерода, карбоната кальция (50 г) и четыреххлористого углерода (70 мл), при перемешивании нагревали до 20° С, центрифугировали, осадок промывали несколько раз водой, органический слой и водные экстракты упаривали, остатки растворяли в небольшом объеме воды, объединяли, центрифугировали, супернатант упаривали, из остатка гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделяли (в порядке элюирования) 6 мг полисахарида, 5 мг высших олигосахаридов, 7 мг олигосахаридов (IV),  $[\alpha]_D^{25} +42,1^\circ$  (с 0,3), и 5 мг моносахаридной фракции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Станицлавский Е. С., Машилова Г. М. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 10, с. 1384-1390.
2. Kersters K., De Ley J. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, v. 1, p. 361-373.
3. Шендеров Б. А., Серкова Г. П. Журн. микробиол., 1979, № 2, с. 18-25.
4. Тимаков В. Д., Петровская В. Г. Журн. микробиол., 1977, № 9, с. 3-12.
5. Калина Г. П., Виноградова Л. А., Трухина Г. М. Журн. микробиол., 1985, № 5, с. 3-11.
6. Здоровенко Г. М. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 103-109.
7. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325-332.
8. Здоровенко Г. М., Воцелко С. К., Скрипник С. И. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 11, с. 1540-1548.
9. Lüderitz O., Freudenberg M. A., Galanos C., Lehman V., Rietschel E. T., Shaw D. H. Curr. Top. Membrane Trans., 1982, v. 17, p. 79-151.
10. Gorin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212-1223.
11. Gorin P. A. J., Mazurek M. Carbohydr. Res., 1976, v. 48, № 2, p. 171-186.
12. Bebault G. M., Choy J. M., Dutton G. G. S., Funnell N., Steffen A. M. J. Bacteriol., 1973, v. 113, № 3, p. 1345-1347.
13. Шашков А. С., Чижов О. С. Биорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437-496.
14. Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, p. 293-297.
15. Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975, с. 276-278.
16. Bjordal H., Lindberg B., Svensson S. Carbohydr. Res., 1967, v. 5, № 4, p. 433-440.
17. Keller R. M., Wüthrich K. Biol. Magn. Reson., 1981, v. 3, p. 1-52.
18. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1851-1859.
19. Mort A. J. Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. Meet., 1981, v. 181, CARB-49.
20. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1984, v. 42, p. 193-225.
21. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Hignet R. C. Eur. J. Biochem., 1985, v. 149, № 1, p. 73-78.
22. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1253-1262.
23. Klyne W. Biochem. J., 1950, v. 46, № 4, p. xli-xlii.
24. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. Ber., 1920, B. 53, № 11, S. 2362-2388.

25. Hudson C. S. J. Amer. Chem. Soc., 1925, v. 47, p. 265.
26. Hickman J., Ashwell C. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 6, p. 1424–1428.
27. Рашба Е. Я. В кн.: Биология и биохимия щелочеобразующих бактерий кишечной группы. Киев: Наук. думка, 1961, с. 6–8.
28. Wagner G., Wüthrich K. J. Magn. Reson., 1979, v. 33, № 3, p. 675–680.
29. Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J. In: The Monosaccharides. Prague: Publ. House Czech. Acad. Sci., 1963, p. 98.
30. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С., Варбанец Л. Д., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1268–1273.
31. Mori A. J., Parker S., Mao-Sung-Kuo. Anal. Biochem., 1983, v. 133, № 2, p. 380–384.
32. Mori A. J., Lamport D. T. A. Anal. Biochem., 1977, v. 82, № 2, p. 289–309.

Поступила в редакцию  
19.III.1986

## ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 19. STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *ALCALIGENES FAECALIS* LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Yu. A., ZDOROVENKO G. M\*, SHASHKOV A. S.,  
ZAKHAROVA I. Ya\*, KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; \* D. K. Zabolotny Institute of Microbiology  
and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

On mild acid hydrolysis of *Alcaligenes faecalis* lipopolysaccharide, the O-specific polysaccharide containing D-rhamnose and D-xylose in the 3 : 2 ratio was obtained. Solvolysis of the polysaccharide with hydrogen fluoride in methanol resulted in methyl glycoside of a branched tetrasaccharide including three rhamnose and one xylose residues. Smith degradation of the polysaccharide led to the glycoside of disaccharide composed of two rhamnose residues and glycerol. On the basis of identification of the oligosaccharide fragments, methylation, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis (including nuclear Overhauser effect data), it was established that the polysaccharide linear chain is a rhamnan, both xylose residues being attached to one of the rhamnose residues as two branches. The repeating unit of the polysaccharide has the following structure:

