



УДК 547.426.2'455.6'26. + 543.422.23

ТЕЙХОЕВАЯ КИСЛОТА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ  
*STREPTOMYCES KANAMYCETICUS* RIA 690  
И ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ДЛЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ  
ФОСФОДИЭФИРНОЙ СВЯЗИ В ЦЕПИ

Наумова И. Б., Шапков А. С., Строганова М. П.

Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова;

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

Из клеточной стенки *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690 выделена глицеринтейхоевая кислота, содержащая в качестве мономерной единицы монофосфат 1-О- $\beta$ -D-глюкопиранозилглицерина. С помощью спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР установлена локализация фосфодиэфирной связи между С3 глицерина и С6 глюкозы. В клетках изучаемого стрептомицета содержится еще одна глицеринтейхоевая кислота иной структуры.

Тейхоевые кислоты — биополимеры поверхностных районов грамположительных бактерий — принимают активное участие в биохимических процессах, связанных с ростом и делением клетки, являясь регуляторами работы автолитических ферментов и ионного обмена. Функционирование этих соединений тесно связано с особенностями их строения [1]. Многие виды стрептомицетов содержат в составе клеточной стенки тейхоевые кислоты различной структуры. Изучены поли(рибитфосфатные) и поли(глицерофосфатные) цепи с различными гликозильными заместителями [2]. В стенках некоторых бацилл, пневмококков и стафилококков обнаружены тейхоевые кислоты, в основную цепь которых входят гликозильные и гликозил-1-фосфатные остатки [3].

Настоящее сообщение посвящено изучению глицеринтейхоевой кислоты из клеточной стенки *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690 — продуцента антибиотика канамицина, особенностью строения которой является участие гликозильного остатка в образовании цепи полимера.

Клеточная стенка стрептомицета, полученная из разрушенного ультразвуком мицелия и очищенная с помощью 4% SDS, содержала 4,20% фосфата. В продуктах ее кислотного гидролиза были идентифицированы глицерин, его фосфорные эфиры, среди которых преобладал глицерофосфат, и глюкоза. Наличие в стенке значительного количества фосфора, а также фосфорных эфиров глицерина указывало на возможное присутствие в ней глице-

Принятые сокращения: ТХУ — трихлоруксусная кислота; SDS — додецилсульфат натрия; ТМС — тетраметилсилан.  $P_{\text{общ}}$  — общее содержание фосфора;  $P_{\text{НК}}$  — фосфор нуклеиновых кислот;  $P_{\text{ТК}}$  — фосфор тейхоевых кислот;  $P_{\text{ФМЭ}}$  — фосфор моноэфирных фосфатных групп.

## Характеристика препаратов тейхоевых кислот, полученных последовательной обработкой ТХУ клеточных стенок и мицелия

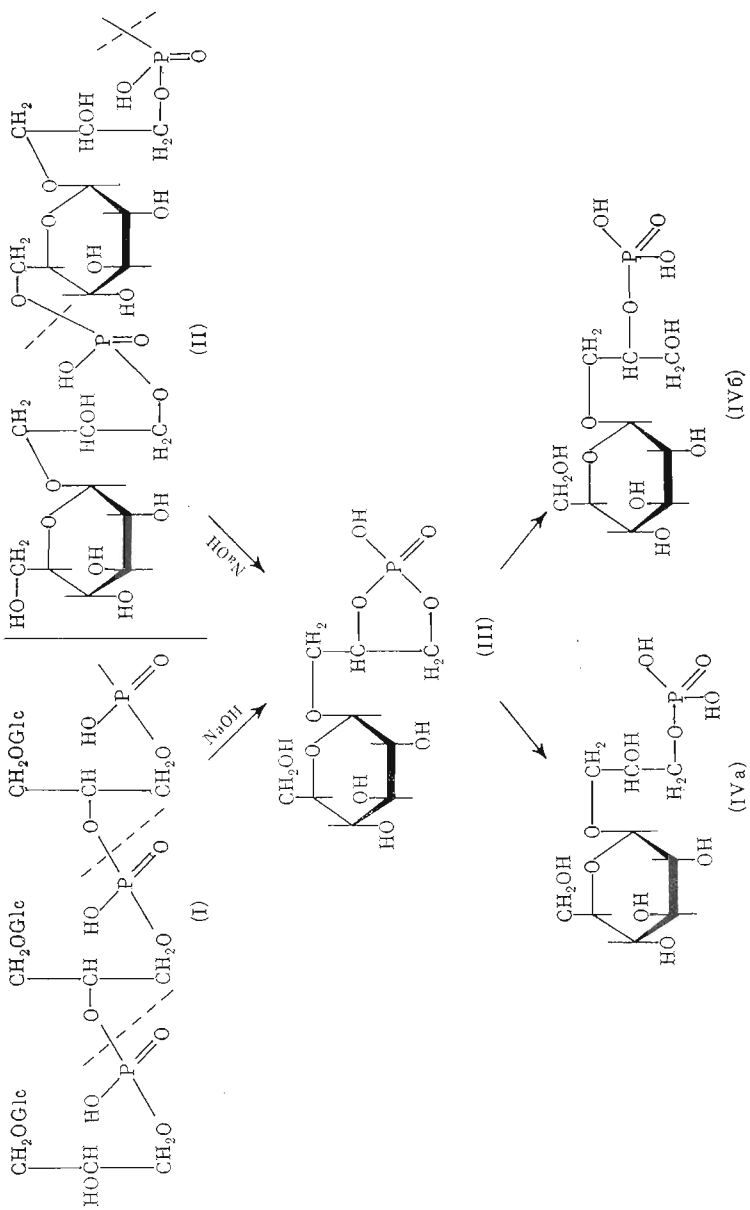
Препарат	Выход, % от веса стенки	Р <sub>общ</sub>	Р <sub>НК</sub>	Р <sub>ТК</sub>	Продукты кис- лотного гидролиза *	Продукты щелочного гидролиза *	Р <sub>общ</sub> / Р <sub>ФМЭ</sub>
		% от навески					
А (10% ТХУ, 24 ч)	17,1	4,70	0,07	4,63	Glc, Gro, GroP, GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup> , P <sub>i</sub>	GlcGroP, GroP** <sup>*</sup> , GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup>	24:1
Б (10% ТХУ, 48 ч)	2,1	4,60	0,09	4,51	Glc, Gro, GroP, GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup> , P <sub>i</sub>	GlcGroP, GroP** <sup>*</sup> , GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup>	—
В (5% ТХУ, 50°, 15 мин)	3,1	6,00	0,14	5,86	Glc, Gro, GroP, GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup> , P <sub>i</sub>	GlcGroP, GroP** <sup>*</sup> , GroP <sub>2</sub> ** <sup>*</sup>	13,8:1
Г (10% ТХУ, 24+48 ч, из мицелия)	—	8,00	0,40	7,60	Glc, Gro, GroP, GroP <sub>2</sub> , P <sub>i</sub>	GlcGroP, GroP, GroP <sub>2</sub> , фосфодиэфир глицерина	23,3:1

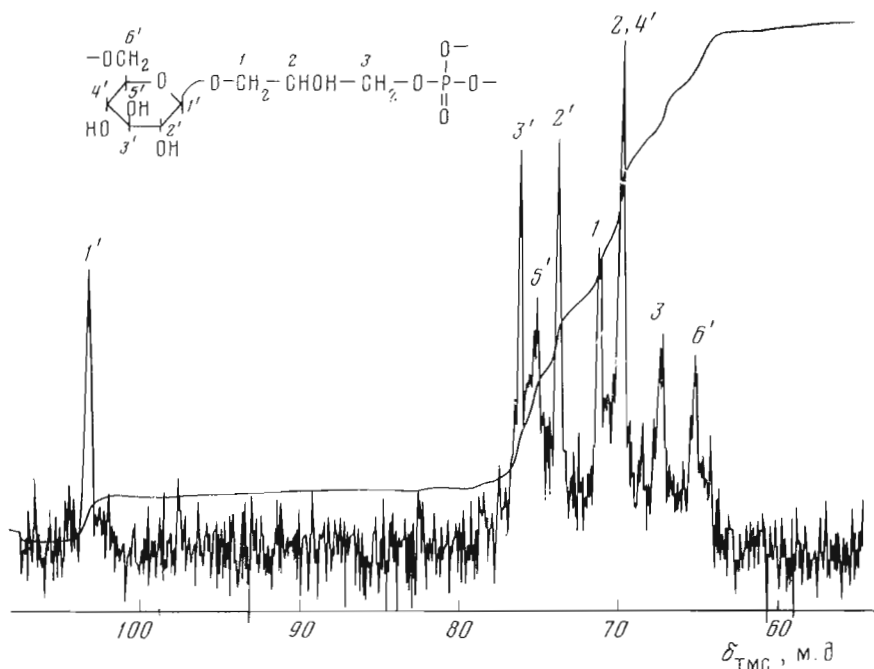
\* Gro — глицерин. \*\* Небольшое количество. \*\*\* Следы.

ринтейхоевой кислоты. Препараты тейхоевой кислоты были выделены при последовательной обработке клеточной стенки 10% ТХУ на холоде в течение 24 ч (А), 48 ч (Б), 5% ТХУ, 15 мин при 50° (В) с последующим осаждением этанолом, растворением в воде, диализом и лиофильным высушиванием. Полученные препараты стеночного полимера содержали в различной степени примесь мембранной тейхоевой кислоты. Кроме того, препарат В отличался от остальных отсутствием О-ацетильных групп, которые отщеплялись при нагревании в 5% ТХУ. Наиболее чистым оказался препарат Б. Для цели выделения глюкозилглицерина использовали препарат тейхоевой кислоты, экстрагированной из всей мицелиальной массы (Г). В табл. 1 приведена характеристика полученных препаратов тейхоевой кислоты.

Из данных табл. 1 следует, что основными компонентами полимера являются глицерин, фосфорная кислота и глюкоза. Определение молярного соотношения этих соединений в тейхоевой кислоте препарата (Б), дополнительно очищенной с помощью электрофореза, показало, что оно близко к эквимольному (глицерин — Р — глюкоза, 1,1 : 1 : 0,9).

Как известно, для установления структуры тейхоевой кислоты важна идентификация продуктов, образовавшихся при щелочном расщеплении полимера. Из всех препаратов тейхоевой кислоты (А, Б и В) при щелочном гидролизе в качестве главных компонентов были получены изомерные глюкозилглицерофосфаты (IVa) и (IVб) с эквимольным соотношением глицерин — Р — глюкоза 1 : 1 : 1,1. При кислотном гидролизе изомерных глюкозилглицерофосфатов были обнаружены глюкоза и глицерофосфат, а при ферментативном расщеплении фосфомоноэстеразой — глюкозилглицерин и P<sub>i</sub>, что указывало на присоединение глюкозы к глицерину гликозидной связью, а фосфомоноэфирной группы — к глицерину. Периодатное окисление глюкозилглицерофосфатов (IVa) и (IVб) не привело к образованию формальдегида, что свидетельствует о пиранозной форме моносахарида в глюкозиде. В то же время глюкозилглицерин, полученный из щелочного гидролизата тейхоевой кислоты (препарат Г) с последующей обработкой продуктов гидролиза ФМЭ, при периодатном окислении давал один молярный эквивалент формальдегида. Этот факт (с учетом пиранозной





Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (15,08 МГц) тейхоевой кислоты клеточной стенки *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690 (δ-шкала)

формы глюкозы) убедительно доказывал локализацию гликозидной связи по первичному гидроксилу глицерина. Ферментативный гидролиз глюкозилглицерина с помощью β-глюкозидазы показал полное его расщепление до глюкозы и глицерина.

Таким образом, основная мономерная единица тейхоевой кислоты представляет собой монофосфат 1-О-β-D-глюкопиранозилглицерина.

Следующей задачей было решение вопроса о типе фосфоэфирной связи в изучаемом полимере. Образование монофосфата глюкозилглицерина в качестве основного продукта щелочного расщепления тейхоевой кислоты, содержащей почти эквимоллярные количества всех трех компонентов, исключает наличие гликозилированной поли(глицерофосфатной) цепи, в которой фосфоэфирные связи находятся между С1 и С3 соседних остатков глицерина (1,3-тип), так как тейхоевая кислота такой структуры устойчива к щелочному гидролизу [4]. Возможны были два других варианта расположения фосфоэфирных связей между мономерными звеньями. Тейхоевая кислота могла иметь строение глюкозилированной поли(глицерофосфатной) цепи (I) с фосфоэфирными связями между С2 и С3 соседних остатков глицерина (структура 2,3-типа). Такие полимеры обнаружены в клеточных стенках *Streptomyces antibioticus* [5] и *Bacillus subtilis* var. niger [6].

Альтернативная возможность заключалась в образовании фосфоэфирных связей между чередующимися остатками глицерина и глюкозы [структура (II)]. Аналогичные цепи содержат стенки *Bacillus licheniformis* [7] и *Bacillus stearothermophilus* [8]. И в том и другом случае щелочное расщепление цепей происходит с промежуточным образованием пятичленного циклофосфата (III). Этот циклический эфир фосфорной кислоты в щелочных условиях гидролизует до смеси изомерных монофосфатов глюкозилглицерина (IVа) и (IVб) (см. схему).

Для установления строения полимерной цепи и подтверждения структуры повторяющегося звена мы изучили спектр <sup>13</sup>C-ЯМР тейхоевой кислоты, лишенной О-ацетильных групп (препарат В). Как видно из рисунка,

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  (м.д.,  $\delta$ -шкала) тейхоевой кислоты и модельных соединений

Соединение	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C1	C2	C3
<i>D</i> -Глюкопиранозо-6-фосфат (динатриевая соль) $\alpha$	92,75	72,2	72,95	69,9	71,55 <sup>1*</sup>	63,7 <sup>2*</sup>			
$\beta$	96,6	74,8	75,9	69,9	75,9 <sup>1*</sup>	63,7 <sup>2*</sup>			
1-О- $\beta$ - <i>D</i> -Глюкопиранозилглицерин-3-фосфат <sup>3*</sup>	103,1	73,7	76,2	70,2	76,3	61,3	70,9	69,5 <sup>4*</sup>	67,5 <sup>5*</sup>
Тейхоевая кислота	103,25	73,75	76,1	69,75	75,0 <sup>6*</sup>	65,0 <sup>6*</sup>	71,0	69,75	67,1 <sup>6*</sup>

<sup>1\*</sup> Дублет,  $^2J_{\text{C1P}-^{13}\text{C}}$  7,3 Гц. <sup>2\*</sup> Дублет,  $^2J_{\text{C1P}-^{13}\text{C}}$  4,6 Гц. <sup>3\*</sup> Данные работы [6]. <sup>4\*</sup> Дублет,  $^2J_{\text{C1P}-^{13}\text{C}}$  7,9 Гц [6]. <sup>5\*</sup> Дублет,  $^2J_{\text{C1P}-^{13}\text{C}}$  5,1 Гц [6]. <sup>6\*</sup> Сигнал уширен.

спектр содержит 8 линий (одна из которых — двойной интегральной интенсивности), что отвечает структуре повторяющегося звена, установленной выше. Химический сдвиг аномерного атома углерода (103,25 м.д.) указывает на  $\beta$ -конфигурацию глюкопиранозильного остатка. Отсутствие сигналов в области 61—63 м.д., т. е. в области резонанса атомов углерода первичных спиртовых групп глюкозилглицерина [6], позволяет предположить, что именно эти группы участвуют в образовании фосфодиэфирных связей. Справедливость этого вывода подтверждается сопоставлением спектра полимера со спектрами модельных соединений —  $\alpha$ ,  $\beta$ -*D*-глюкопиранозо-6-фосфата (динатриевая соль) и 1-О- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилглицерин-3-фосфата [6]. Близкое совпадение химических сдвигов C1—C3 и C1'—C4' в 1-О- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилглицерин-3-фосфате и тейхоевой кислоте и C3'—C6' в  $\alpha$ ,  $\beta$ -*D*-глюкопиранозо-6-фосфате ( $\beta$ -аномер) и тейхоевой кислоте (см. табл. 2), т. е. именно тех атомов углерода, на химические сдвиги которых не влияет различие в структуре моделей и повторяющегося звена, подтверждает правильность приписания полимеру структуры (II).

Данные периодатного окисления тейхоевой кислоты также свидетельствуют об участии глюкозильных остатков в образовании основной цепи полимера. Окисленный полимер разрушался при pH 10,5 до фосфомоноэфиров на 62%, тогда как неокисленная тейхоевая кислота — только на 7%.

Изучаемая тейхоевая кислота, как и все ранее исследованные полимеры из стенок стрептомицетов, содержит О-ацетильные группы, что было установлено по результатам гидроксиламинолиза и мягкого кислотного гидролиза полимера. Содержание остатков уксусной кислоты в изученном нами полимере значительно меньше, чем в тейхоевых кислотах из стенок других стрептомицетов.

В заключение следует отметить, что при кислотном и щелочном гидролизе препаратов тейхоевой кислоты, выделенных из стенки при различных условиях, образуются разные количества глицерофосфата и дифосфата глицерина (см. табл. 1). Это указывает на наличие в препаратах примеси мембранной тейхоевой кислоты. Присутствие мембранного полимера в клетках изучаемого актиномицета не вызывает сомнения, поскольку обработка целого мицелия 10% ТХУ привела к выделению смеси двух тейхоевых кислот глицерофосфатной природы (препарат Г). При щелочном гидролизе этой смеси образовался набор фосфомоно- и фосфодиэфиров глицерина — характерных продуктов расщепления поли(глицерофосфатной) цепи 1,3-типа [9].

Необходимо также указать, что, несмотря на очистку с помощью электрофореза стеночной тейхоевой кислоты (препарат Б), среди продуктов

ее кислотного и щелочного гидролиза обнаружены следы глицерофосфата и дифосфата глицерина, что свидетельствует о наличии остатков глицерина, связанных между собой фосфодиэфирными связями. Образование этих фосфорных эфиров можно объяснить небольшой примесью мембранного полимера, но нельзя исключить и возможность присутствия на конце цепи глицерофосфатного олигомера, соединяющего цепь тейхоевой кислоты с пептидогликаном. Такие связующие олигомеры обнаружены в стафилококках [10, 11] и бациллах [12]. Исходя из данных молярного соотношения компонентов в полимере (глицерин — Р — глюкоза, 1,1 : 1 : 0,9), а также соотношения  $P_{\text{общ}}$  и  $P_{\text{Фмэ}}$  (23—24 : 1), можно предположить, что олигомер содержит 2—3 глицерофосфатных единицы.

### Экспериментальная часть

*Материалы.* Культуру *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690 выращивали на среде с галактозой [13] в колбах емкостью 500 мл со 100 мл среды при 28° в течение 48 ч, засевая колбы 48-часовым мицелием, выращенным из спор на среде того же состава. Споровую культуру поддерживали на агаризованной среде с мальтозой [13]. Мицелий отделяли от среды центрифугированием, промывали 0,95% NaCl и использовали для получения клеточных стенок. Для выделения тейхоевой кислоты мицелий предварительно сушили ацетоном, спиртом и эфиром и досушивали на воздухе. Фосфомоноэстераза (КФ 3.1.3.2) была получена из простаты по методу, описанному в работе [14]. Для обнаружения  $\beta$ -глюкозидной связи использовали эмульсин фирмы Sigma (КФ 3.2.1.24).

*Методы.* БХ и электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN 13 (ГДР). Для препаративных целей бумагу предварительно промывали 2 н. АсОН и отмывали до нейтральной реакции сначала дистиллированной, а затем бидистиллированной водой. Для нисходящей БХ использовали следующие системы растворителей: 1) бутанол-1 — пиридин — бензол — вода, 5 : 3 : 1 : 3; 2) пропанол-1 —  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $d$  0,88) — вода, 6 : 3 : 1 : 3; 3) бутанол-1 — АсОН — вода, 4 : 1 : 5. Электрофорез выполняли в ацетатно-пиридиновом буфере (3,5 мл АсОН и 12 мл пиридина в 1 л, pH 5,5; 20 В/см, 3—5 ч). Тейхоевую кислоту и фосфорные эфиры обнаруживали реактивом Ишервуда, гликозиды и полиолы — 5%  $\text{AgNO}_3$  (аммиачный раствор) и реактивом Шиффа, моносахариды — анилинфталатом, гидроксаматы — 16%  $\text{FeCl}_3$ . Для определения  $P_{\text{общ}}$  вещество минерализовали сжиганием с 57%  $\text{HClO}_4$  при 180° и определяли по Вейль — Малербе и Грину (см. [5]);  $P_{\text{НК}}$  определяли по Спирину (см. [5]). Содержание  $P_{\text{ТК}}$  вычисляли по формуле  $P_{\text{ТК}} = P_{\text{общ}} - P_{\text{НК}}$ . Формальдегид определяли по методу Ханакан (см. [5]), моносахариды — с антроном и анилин-фталатным методом, уксусную кислоту — в хроматографе марки Packard (условия разделения см. в работе [15]).

*Получение клеточных стенок.* Сырой отмывтый мицелий суспендировали в 4% SDS в соотношении 1 : 4 и разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 при 22 кГц (3 раза по 2 мин), охлаждая суспензию в промежутках между импульсами. Разрушенные клетки выдерживали 1 ч при 60° для инактивации автолитических ферментов и центрифугировали при 6000 об/мин. Осадок дважды промывали 4% SDS (активно перемешивая в течение 1 ч) и оставляли в детергенте на ночь. Затем стенки отмывали 1н. NaCl (3 раза) и дистиллированной водой (5 раз). При этом осадок разделился на два слоя: нижний желтоватого и верхний белого цвета. Слои собрали отдельно, промыли водой (5 раз) и высушили лиофильно. Верхний слой содержит более чистые стенки ( $P_{\text{общ}}$  4,2%,  $P_{\text{НК}}$  0,1%), чем нижний ( $P_{\text{общ}}$  2,4%,  $P_{\text{НК}}$  0,24%). Для выделения тейхоевой кислоты использовали стенки из верхнего слоя.

*Выделение тейхоевой кислоты.* А) К клеточным стенкам добавляли 10% ТХУ и полученную взвесь перемешивали 24 ч при 2°. Стенки отде-

ляли на центрифуге при 6000 об/мин, центрифугат фильтровали, добавляли к нему два объема этанола и помещали в холодильник на ночь. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием, растворяли в небольшом количестве воды, нерастворимую часть отбрасывали и прозрачный, слегка опалесцирующий раствор диализовали в течение 2 дней при 2—4°, меняя каждые 12 ч дистиллированную воду. Раствор лиофильно высушивали, получили препарат А.

Б) К оставшимся после первой экстракции стенкам добавляли 10% ТХУ и перемешивали 48 ч при 2°. Последующие операции проводили так же, как и в первом случае. Получили препарат Б.

В) Остатки стенок после второй экстракции смешивали с 5% ТХУ и нагревали в течение 15 мин при 50°. Далее поступали так, как описано выше. Получили препарат В. Оставшиеся после трех экстракций стенки сушили спиртом и эфиром и досушивали в вакуум-экссикаторе. Анализ кислотных гидролизатов, обработанных описанным выше способом стенок, показал, что они содержат следы глицерофосфата и не содержат глюкозы.

Г) Сухой мицелий экстрагировали 10% ТХУ 24 ч и затем еще 48 ч при 2°. Экстракты объединяли и тейхоевую кислоту осаждали спиртом, диализовали и сушили, как при выделении препаратов А и Б из клеточных стенок. Получили препарат Г.

*Исследование тейхоевой кислоты. Кислотный гидролиз.* 2 мг тейхоевой кислоты (препараты А, Б, В или Г) гидролизовали 2 н. HCl в запаянных капиллярах (3 ч при 100°) и гидролизат исследовали при хроматографировании в системах 1 и 2 и электрофоретически. Во всех препаратах обнаружена глюкоза и глицерофосфат и дифосфат глицерина в разных соотношениях (табл. 1).

*Определение молярных соотношений компонентов.* 4 мг тейхоевой кислоты (препарат Б) подвергали очистке с помощью электрофореза в течение 5 ч. Полимер элюировали с бумаги, элюат высушивали в вакууме и сухой остаток гидролизовали 2 н. HCl (5 ч при 100°). Гидролизат упаривали досуха на чашечке из фторопласта в вакуум-экссикаторе, освобождали от HCl многократным повторным упариванием с бидистиллятом. Гидролизат растворяли в небольшом объеме воды и делили на две части. К одной части добавляли аммонийно-ацетатный буфер (рН 5,5), фосфомоноэстеразу и инкубировали 16 ч при 37°. В аликвотах определяли  $R_1$  и глицерин по образующемуся при периодатном окислении формальдегиду (Р — глицерин, 1 : 1,1). В оставшейся половине определяли  $R_{общ}$  и глюкозу двумя методами — с антроном (Р — глюкоза, 1 : 1) и анилинфталатным методом, отделяя глюкозу хроматографически в системе 1 (Р — глюкоза, 1 : 0,8). Учитывая средние данные для глюкозы, получили: Р — глицерин — глюкоза, 1 : 1,1 : 0,9.

*Определение О-ацетильных групп.* а) 20 мг тейхоевой кислоты (препарат Г) растворяли в 1 мл бидистиллированной воды, добавляли 1 мл гидроксиламина, приготовленного по методу [9], раствор подщелачивали 1 н. NaOH до рН 7,6 и оставляли при 37° на 1 ч. Раствор упаривали досуха в вакууме и гидроксаматы экстрагировали 80% этанолом и хроматографировали в системе 3. Обнаружен гидроксамат уксусной кислоты, идентифицированной при сравнении со стандартным образцом ацетилгидроксамата, полученного из этилацетата ( $R_f$  0,58 в системе 3). б) 2 мг тейхоевой кислоты (препарат А) гидролизовали 0,1 н. HCl в запаянной ампуле (1 ч при 100°) и образовавшуюся уксусную кислоту хроматографировали в газовом хроматографе. Идентифицирован пик уксусной кислоты.

*Определение  $R_{ФМЭ}$ .* 5 мг тейхоевой кислоты (препараты А, В или Г) растворяли в 5 мл ацетатно-аммонийного буфера (рН 5,5), добавляли фосфомоноэстеразу и оставляли при 37°. В аликвотах определяли  $R_{общ}$  и через каждые 6 ч  $R_1$ . Минерализация фосфора заканчивалась за 16 ч. Результаты см. в табл. 1.

*Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.* Спектры полимера (препарат В) и  $\alpha,\beta$ -D-глюкопиранозы-6-фосфата (табл. 2) были сняты для их растворов в  $\text{D}_2\text{O}$ . Внутренний эталон — диметилсульфоксид. Химический сдвиг последнего от ТМС принят 39,445 м.д. Все химические сдвиги пересчитаны к ТМС. Условия съемки: температура комнатная, стабилизация условий резонанса по ядрам дейтерия в растворителе, объем памяти 8/4 кбит, время повторения импульсов 1,1 с, длительность импульсов 10 мкс ( $\sim 90^\circ$ ) для полимера и 5 мкс ( $\sim 45^\circ$ ) для фосфата. Рабочая частота прибора WP-60 15,08 МГц по ядрам  $^{13}\text{C}$ .

*Периодатное окисление [16].* 7 мг тейхоевой кислоты (препарат В) растворяли в 0,25 мМ  $\text{NaIO}_4$  (4 мл), раствор оставляли в темноте при комнатной температуре. Через 72 ч избыток периодата разрушали добавлением этиленгликоля (0,1 мМ, 1 мл), раствор выдерживали 3 ч при комнатной температуре и лиофильно высушивали. Сухой остаток окисленного полимера и 7 мг исходной тейхоевой кислоты отдельно растворяли в 5 мл 0,25 М буфера глицин —  $\text{NaOH}$  (рН 10,5) и инкубировали 5 ч при комнатной температуре. Растворы пропускали через смолу КУ-2 ( $\text{NH}_4^+$ -форма), элюат и промывные воды упаривали до небольшого объема, добавляли фосфомоноэстеразу (1 мг) и инкубировали 20 ч при  $37^\circ$ . В окисленной форме тейхоевой кислоты обнаружено 62%  $\text{P}_i$ , а в неокисленной — 7%.

*Щелочной гидролиз.* 10 мг тейхоевой кислоты (препарат А, Б, В или Г) гидролизовали 1 н.  $\text{NaOH}$  в запаянной ампуле (3 ч при  $100^\circ$ ). Гидролизат пропускали через смолу КУ-2 ( $\text{NH}_4^+$ -форма), промывали колодку водой до нейтральной реакции, элюат и промывные воды упаривали в вакууме до небольшого объема. Аликвоты хроматографировали в системе 2 и подвергали электрофорезу. Основным продуктом, образовавшимся при гидролизе препаратов А, Б и В, был монофосфат глюкозилглицерина, который при электрофорезе имел меньшую подвижность, чем глицерофосфат (за 5 ч  $E_{\text{ГРОР}}$  0,5), а при хроматографировании в системе 2 разделился на два изомера ( $R_{\text{ГРОР}}$  0,49 и 0,57). Кроме того, сравнением со стандартными образцами идентифицировано небольшое количество глицерофосфата (в системе 2 разделился на  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомеры) и дифосфата глицерина (за 5 ч  $E_{\text{ГРОР}}$  1,8, в системе 2 — два изомера с  $R_{\text{ГРОР}}$  0,30 и 0,33). Необходимо отметить, что количественное содержание глицерофосфата и дифосфата глицерина в гидролизатах разных препаратов было неодинаковым (табл. 1).

*Изучение монофосфата 1-O- $\beta$ -глюкозилглицерина.* Основной фосфорный эфир, полученный при разделении продуктов щелочного гидролизата тейхоевой кислоты с помощью электрофореза, элюировали с бумаги, высушивали досуха и изучали. В кислотных гидролизатах эфира (2 н.  $\text{HCl}$ , 3 ч при  $100^\circ$ ) обнаружены глюкоза, глицерин, глицерофосфат и  $\text{P}_i$ . Определение молярного соотношения компонентов, выполненное так же, как и для всего полимера, дало: глицерин — Р — глюкоза, 1 : 1 : 1,1. При гидролизе фосфомоноэстеразой эфир образовал глюкозилглицерин и  $\text{P}_i$ .

*Глюкозилглицерин.* Глюкозид был получен из тейхоевой кислоты (препарат Г, 500 мг) так, как описано в работе [16]. Нейтральные продукты, полученные после щелочного и ферментативного гидролиза тейхоевой кислоты, хроматографировали на колонке ( $10 \times 400$  мм) со смолой дауэк 1  $\times$  2 ( $\text{OH}^-$ -форма) (элюент — вода, фракции 5 мл, скорость элюции 20 мл/ч). Глюкозилглицерин обнаружен во фракциях 41—50. Молярное соотношение глицерин — глюкоза составляет 1 : 1,1. При периодатном окислении глюкозида соотношение глюкозид — формальдегид составило 1 : 1,2. 0,5 мг гликозида растворяли в 0,01 мл воды, добавляли 0,02 мл 1% взвеси эмульсина в 0,05 М ацетатном буфере (рН 5,0) и выдерживали 16 ч при  $37^\circ$ . Обнаружены глюкоза и глицерин.

Мы выражаем благодарность В. Д. Кузнецову (Институт микробиологии АН СССР) за предоставленную для исследования культуру *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690, Л. И. Паниной (Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л. Я. Карпова) за проведенный анализ



уксусной кислоты газохроматографическим методом, а также М. Ш. Зарецкой (биологический факультет МГУ) за участие в обсуждении полученных результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наумова И. Б. (1978) Биохимия, 43, 195—207.
2. Naumova I. B., Zaretskaya M. Sh., Dmitrieva N. F., Streshinskaya G. M. (1978) *Nocardia and Streptomyces* (M. Mordarski et al., ed.), pp. 261—268, Gustavfischer Verlag, Stuttgart — New York.
3. Archibald A. R. (1974) *Adv. Microbiol. and Physiol.*, 11, 53—95.
4. Kelemen M. V., Baddiley J. (1961) *Biochem. J.*, 80, 246—254.
5. Зарецкая М. Ш., Наумова И. Б., Шабарова З. А. (1971) Биохимия, 36, 97—107.
6. De Boer W. R., Kruyssen F. J., Wouters J. T. M., Kruk C. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 62, 1—6.
7. Burger M. M., Glaser L. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 494—506.
8. Anderson A. J., Archibald A. R. (1975) *Biochem. J.*, 151, 115—120.
9. Наумова И. Б., Дмитриева Н. Ф. (1974) Биохимия, 39, 201—209.
10. Hancock I., Baddiley J. (1976) *J. Bacteriol.*, 125, 880—886.
11. Bracha R., Glaser L. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 72, 1091—1098.
12. Wyke A. W., Ward J. B. (1977) *J. Bacteriol.*, 130, 1055—1063.
13. Basak K., Majumdar S. K. (1976) *Folia Microbiol.*, 21, 43—49.
14. Voman H. G. (1958) *Arkiv Kemi.*, 12, 453.
15. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Папина Л. И. (1975) Биохимия, 40, 211—212.
16. Archibald A. R., Coopes H. E. (1971) *Biochem. J.*, 124, 449—460.

Поступила в редакцию  
6.IV.1978

### TEICHOIC ACID FROM THE CELL WALLS OF *STREPTOMYCES KANAMYCETICUS* RIA 690 AND THE USE OF <sup>13</sup>C-NMR SPECTROSCOPY FOR THE LOCALIZATION OF PHOSPHODIESTER LINKAGES

NAUMOVA I. B., SHASHKOV A. S., STROGANOVA M. P.

*Biology Department M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

From the cell walls of *Streptomyces kanamyceticus* RIA 690 a glycerol teichoic acid was isolated in which a repeating monomeric unit was 1-O-β-D-glucopyranosylglycerol monophosphate. The localization of the phosphodiester linkages between the glycerol C3 and glucose C6 was established by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. There was an indication of the presence in the cells of the streptomycetes under study of one more glycerol teichoic acid of different structure.