



УДК 547.458.02+576.851.1.097

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

11 *. СТРУКТУРА И СПЕКТР ^{13}C -ЯМР О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
ИЗ *PSEUDOMONAS CERACIA**Бнирель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А.,
Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. П. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва**Кислячук Н. В., Захарова И. Я.**Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев*

О-Специфический полисахарид, полученный при мягкой кислотной деградации липополисахарида *Pseudomonas ceracia* штамм ИМВ 3181, представляет собой гомополимер редко встречающегося в природе моносахарида — *D*-рамнозы. На основании данных ПМР- и ^{13}C -ЯМР-спектров, анализа методом метилирования, распада по Смуту и расчета величин оптического вращения повторяющемуся звену полисахарида приписана структура

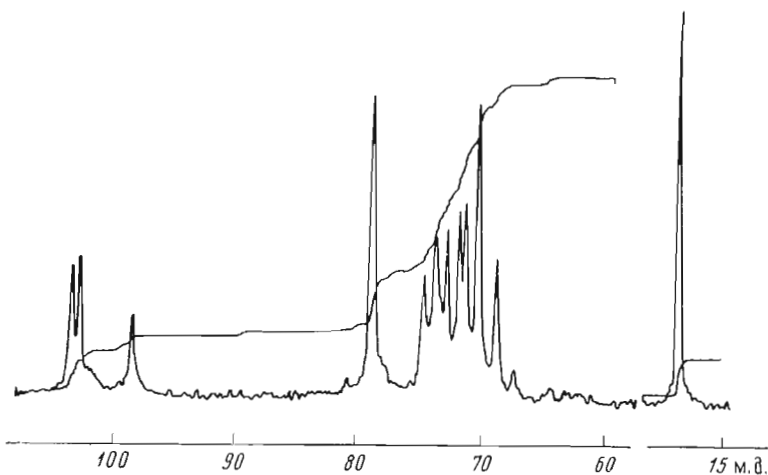


Иммунодоминантным участком О-специфического полисахарида является 2-О-замещенный остаток β -*D*-рамнопираозы. Полностью расшифрованы ^{13}C -ЯМР-спектры О-специфического полисахарида, его олигосахаридного фрагмента, полученного при распаде по Смуту, и окисленного периодатом полисахарида. Обсуждается зависимость химических сдвигов сигналов атомов углерода 3-О-замещенных рамнопираозных остатков от типа присоединенного моносахарида.

Штаммы *Ps. aeruginosa*, возбудители ожоговых и хирургических инфекций человека, на протяжении последнего десятилетия являются объектом всестороннего химического и иммунологического изучения [2]. Сведения о других псевдомонадах, несмотря на их возрастающую роль в инфекционных заболеваниях, скудны и разрозненны; до сих пор не создана их серологическая классификация. По имеющимся в литературе данным, штаммы вида *Ps. ceracia* также могут быть отнесены к категории условно патогенных микроорганизмов [3,4]. Иммунохимическое изучение поверхностных антигенов *Ps. ceracia* имеет важное значение в связи с высокой устойчивостью этих бактерий к применяемым антимикробным препаратам. Кроме того, химическое исследование антигенных липополисахаридов может послужить основой для систематики и классификации псевдомонад.

Настоящая работа посвящена изучению строения специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Ps. ceracia* штамм ИМВ 3181.

* Сообщение 10 см. [1].



Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида из *Ps. ceracia*

По предварительным данным, липополисахарид отличается высоким содержанием рампозы при очень низком содержании фосфата и аминокомпонентов [5]. Липополисахарид, выделенный из клеточных оболочек экстракцией горячим водным фенолом, был высоко активен в реакциях кольцепреципитации и микродиффузной преципитации в агаре, причем титр О-антисыворотки достигал величины $1/1000000$. При иммуноэлектрофорезе липополисахарид двигался к катоду [6].

Нагреванием с 1%-ной уксусной кислотой липополисахарид был расщеплен на «деградированный полисахарид» и липид А. Гель-хроматографией углеводной фракции на сефадексе G-50 был получен высокомолекулярный полисахарид, элюирующийся с удерживаемым объемом колонки, и олигосахаридная фракция («кор»), которая была серологически неактивна [6] и далее не исследовалась.

Полисахарид обладал высокой серологической активностью и давал в тесте Оухтерлони одну линию преципитации [6]. По данным электрофореза на бумаге, полисахарид был нейтральным. В ИК-спектре полисахарида присутствовала полоса поглощения гидроксильных групп ($\sim 3400\text{ см}^{-1}$); линии амидных, сложноэфирных или карбоксильных групп в спектре отсутствовали. В спектре ПМР в области резонанса аномерных протонов имелось 3 сигнала с соотношением интегральных интенсивностей 1:1:1. Два из них (частично перекрывающиеся синглеты при δ 5,07 и 5,11 м. д.) находились в области резонанса аномерных протонов α -гликозидов [7], тогда как третий сигнал при 4,81 м. д., вероятнее всего, принадлежал протону β -связанного моносахарида. В высокопольной части спектра имелся сигнал (9H, δ 1,28—1,37 м. д.), который можно представить как суперпозицию трех дублетов, относящихся к 6-дезоксигруппам трех моносахаридных остатков.

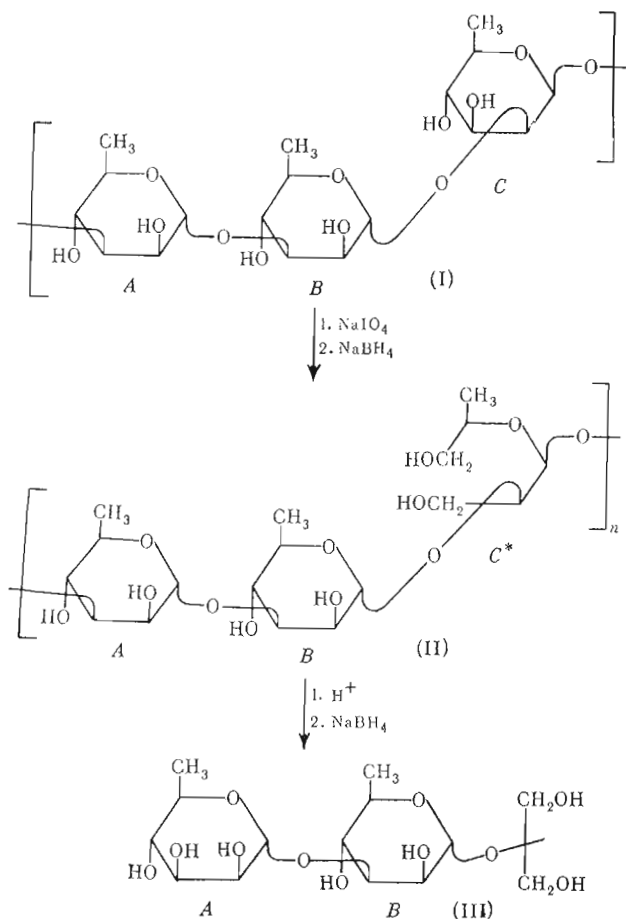
В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (рисунок) присутствовали три сигнала аномерных атомов углерода единичной интенсивности при 103,4; 102,5 и 98,3 м. д. и сигнал тройной интенсивности метильных групп 6-дезоксисахаров (δ 17,9 м. д.). Кроме того, в спектре имелся сигнал тройной интенсивности при 78,7 м. д., соответствующий неаномерным атомам углерода, связанным гликозидной связью, а также набор сигналов в области 68,8—74,7 м. д., отнесение которых требовало дополнительных сведений о структуре полисахарида.

Таким образом, из данных спектров следовало, что специфический полисахарид построен из регулярно повторяющихся трисахаридных звеньев, включающих три остатка 6-дезоксигексоз, причем два остатка имеют α - и один β -конфигурацию гликозидной связи.

В гидролизате полисахарида с помощью углеводного анализатора была идентифицирована рамноза (83,5%) и следовые количества глюкозы. При анализе гидролизата на аминокислотном анализаторе были обнаружены следовые количества глюкозамина и галактозамина. Рамноза была идентифицирована дополнительно с помощью хроматографии на бумаге, а также ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов. Других компонентов в составе полисахарида обнаружено не было.

Для определения абсолютной конфигурации рамнозы была выделена из гидролизата полисахарида с помощью препаративной бумажной хроматографии и превращена в α -метилрамнопиранозид, индивидуальность которого была подтверждена ГЖХ в виде полного ацетата. Полученный α -метилрамнопиранозид имел $[\alpha]_D +68,2^\circ$, что при сравнении с литературными данными [8] для α -метил-*L*-рамнопиранозида ($-67,2^\circ$) однозначно доказывало *D*-конфигурацию остатка рамнозы в полисахариде.

Для определения характера замещения *D*-рамнозных остатков полисахарид был подвергнут метилированию в присутствии метилсульфинил-аниона [9], гидролизу и исследованию методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов [10]. В результате были идентифицированы 3,4-ди-*O*-метил- и 2,4-ди-*O*-метилрамноза в соотношении 1:2, а также следовые количества 2,3,4-три-*O*-метилрамнозы. Полностью метилированное производное рамнозы могло происходить из остатка, находящегося на невосстанавливаемом конце полисахаридной цепи, или из остатка рамнозы «кора», как это было найдено для липополисахаридов *Ps. aeruginosa* [11]. Таким образом, исследуемый полисахарид представляет собой линейный *D*-рамнан, в состав повторяющегося



звена которого входят два остатка *D*-рамнопиранозы, замещенных в положение 3, и один остаток, замещенный в положение 2 (схема, структура (I)).

Невыясненным оставался вопрос о конфигурации рамнозидных связей, так как 2-О-замещенный остаток *D*-рамнозы мог иметь как α -, так и β -конфигурацию. Для решения этого вопроса полисахарид был подвергнут распаду по Смитту, причем были получены и охарактеризованы модифицированный полисахарид (II) и олигосахарид (III) (схема). Модифицированный полисахарид (II) был выделен после периодатного окисления и восстановления натрийборгидридом с помощью хроматографии на колонке с сефадексом G-50, а продукт его частичного гидролиза, олигосахарид (III), — хроматографией на сефадексе G-15. Данные ГЖХ показали, что олигосахарид (III) построен из остатков рамнозы и глицерина, идентифицированных в виде ацетатов полиолов. Так как периодатному окислению в полисахариде мог подвергнуться только рамнозный остаток, замещенный в положение 2, можно заключить, что олигосахарид (III) включает два остатка *D*-рамнозы, причем находящийся в середине олигосахарида (III) остаток замещен в положение 3. В спектре ПМР олигосахарида (III) имелся сигнал при 1,30 м. д. (дублет, 6H, $J_{5,6}$ 6 Гц), относящийся к метильным группам двух рамнозных остатков, и два сигнала аномерных протонов при 5,00 и 4,92 м. д., лежащих вблизи границы резонанса протонов при C1 α - и β -гликозидов [7]. Полученный результат не позволял надежно приписать аномерные конфигурации остаткам *D*-рамнозы в олигосахариде (III).

Вопрос о конфигурациях гликозидных связей был решен с помощью данных о величинах оптического вращения полисахарида (I) ($[\alpha]_D^{25} +22,7^\circ$) и олигосахарида (III) ($[\alpha]_D^{25} +51,6^\circ$). Их сравнение позволяет сделать вывод о том, что периодатному окислению в полисахариде подвергся β -*D*-рамнопиранозный остаток и, следовательно, оба *D*-рамнозных остатка в олигосахариде (III) имеют α -конфигурацию. Этот вывод полностью подтверждается расчетом по правилу Кляйна [12], проведенному для олигосахарида (III) и полисахарида (I) (табл. 1).

Таким образом, замещенный в положение 2 остаток *D*-рамнопиранозы имеет β -конфигурацию гликозидной связи, а оба остатка *D*-рамнопиранозы, замещенных в положение 3, присоединены α -гликозидными связями. Из этих данных однозначно вытекает последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене полисахарида, имеющем, таким образом, структуру (I), приведенную на схеме.

Из рассмотрения модели Драйдинга полисахарида следовало, что линейные повторяющиеся звенья цепи располагаются по отношению друг к другу под углом, близким к прямому, причем место каждого излома полимерной цепи приходится на 2-О-замещенный остаток *D*-рамнозы. Можно предположить, что полисахаридная цепь образует спираль 3₁ или 4₁, имеющую в проекции вдоль цепи соответственно треугольник или квадрат с 2-замещенными остатками *D*-рамнопиранозы в вершинах. Если сделанное предположение правильно, то эти пространственно доступные остатки рамнозы должны играть роль иммунодоминантных участков. Этот вывод полностью подтверждается результатом серологических испытаний. Так, если нативный полисахарид обладал серологической активностью, сравнимой с активностью липополисахарида *Ps. seracia*, то окисленный периодатом полисахарид (II), лишенный 2-О-замещенных остатков *D*-рамнозы, был совершенно неактивен в тесте Оухтерлони [6].

В продолжение наших работ по применению спектроскопии ¹³C-ЯМР в структурном анализе бактериальных антигенных полисахаридов [13,14] представляло интерес полностью расшифровать спектр полисахарида (I), поскольку из имеющихся в литературе данных [13,15,16]

Данные оптического вращения

Соединение	$[\alpha]_D$, град	$[M]_D$, град
Метил- α - <i>L</i> -рамнопиранозид *	-67,2	-119,6
Метил- β - <i>L</i> -рамнопиранозид *	+95,2	+169,5
Метил- α - <i>D</i> -рамнопиранозид	+67,2	+119,6
Метил- β - <i>D</i> -рамнопиранозид	-95,2	-169,5
Олигосахарид (III), значение, рассчитанное		
для двух α - <i>D</i> -рамнопираноз	+62,3	+239,2
для двух β - <i>D</i> -рамнопираноз	-88,2	-339,0
для одной α - и одной β - <i>D</i> -рамнопиранозы найденное	-13,0	-49,9
найденное	+51,6	+198,1
Полисахарид (I), значение, рассчитанное		
для трех α - <i>D</i> -рамнопираноз	+81,9	+358,8
для двух α - и одной β - <i>D</i> -рамнопиранозы найденное	+15,9	+69,7
найденное	+22,2	+97,2

* См. [8].

Таблица 2

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР, м. д.

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Литература
(I)	Звено A	103,1	68,8	78,7	71,8	70,3	17,9	
	Звено B	102,5	71,3	78,7	72,8	70,3	17,9	
	Звено C	98,3	78,7	74,7	73,7	73,7	17,9	
(II)	Звено A	103,2	69,95	78,8	72,1	70,4	18,0	
	Звено B	102,1	71,3	79,5	72,7	70,4	18,0	
	Звено C *	101,0	77,4	60,5	66,5	70,4	18,0	
(III)	Звено A	103,4	71,5	71,5	73,4	70,25	17,8	
	Звено B	100,55	71,5	79,6	72,7	70,25	17,8	
	Gro	62,7	78,1	61,9				
(IV) *	<i>L</i> -Rha α 1	103,6	71,4	71,4	73,3	70,3	17,8	[15]
	\rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha α 1	101,6	71,1	79,4	72,6	70,1	17,8	
(V)	\rightarrow 2)- <i>L</i> -Rha β 1	93,9	82,4	74,3	73,2	73,8	17,9	[16]

* Приведены химические сдвиги после введения одинаковой для всех сигналов аддитивной поправки +0,44 м.д., представляющей собой разницу химических сдвигов мало зависящих от условий съемки спектра сигналов CH_2 -групп остатков рамнозы в спектрах (IV) и (III), вызванную использованием различных внутренних стандартов — диоксана и метанола соответственно.

следовало, что величины химических сдвигов сигналов атомов углерода замещенных остатков рамнозы существенно зависят от химической природы присоединенного моносахарида. Анализ спектра полисахарида (I), содержащего три неэквивалентных остатка рамнозы, мог прояснить характер этой зависимости, а полученные данные могли оказаться полезными при исследовании других рамнозосодержащих полисахаридов и олигосахаридов.

К расшифровке спектра полисахарида (I) (рисунок) были привлечены литературные данные [15] спектра трисахарид α -*L*-рамнопиранозил(1 \rightarrow 3)- α -*L*-рамнопиранозил(1 \rightarrow 6)-*D*-галактозы (IV), а также спектр олигосахарид (III). Хорошее совпадение сигналов рамнозидных остатков в олигосахаридах (III) и (IV) наблюдалось для всех атомов углерода, за исключением C1 в замещенном остатке (звено B). Различие в химических сдвигах этих сигналов достигало 1 м. д. и было обусловлено различной химической природой агликона — глицерина в

случае (III) и *D*-галактозы в случае (IV). Сигналы атомов углерода рамнозных остатков олигосахаридов (III) и (IV) приведены в табл. 2.

Полученные данные позволили выделить из спектра полисахарида (I) сигналы C2—C6 звена B, соответствующего 3-О-замещенному остатку рамнозы в олигосахариде (III), а также сигналы атомов C5 и C6 звена A, поскольку их положение при переходе от спектра (III) к спектру (I) не должно заметно измениться. Сигналы атомов C3—C5 звена C были найдены сопоставлением с химическими сдвигами соответствующих сигналов рамнозы в спектре дисахарида β-*D*-глюкопиранозил(1→2)-β-*L*-рамнопиранозы (V) [16]. Положение резонанса замещенных атомов C3 звена A и C2 звена C определялось присутствием в спектре (I) только одного сигнала (78 м. д.) тройной интенсивности в области резонанса неаномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей. Далее, поскольку химический сдвиг сигнала C1 звена A (α-рамнозного остатка) найден однозначно, оставшиеся сигналы в области резонанса аномерных атомов углерода при 102,5 и 98,3 м. д. естественно отнести за счет резонанса C1 звена B (α-рамнозного остатка) и C1 звена C (β-рамнозного остатка) соответственно. И наконец, оставшиеся неотнесенными сигналы C2 и C4 звена A были выделены из спектра методом исключения. Смещение этих сигналов в сильное поле по сравнению с их положением в спектре олигосахарида (III) на 2,8 и 1,6 м. д. соответственно обусловлено β-эффектом от замещения звена A в положение 3. Таким образом, спектр полисахарида (I) полностью расшифрован (табл. 2) и согласуется с установленной для полисахарида химической структурой.

Заслуживает внимания рассмотрение спектра ¹³C-ЯМР модифицированного полисахарида (II), поскольку анализ изменений в спектре при периодатном окислении может быть привлечен для структурного исследования полисахаридов. Прежде всего при сравнении спектров (I) и (II) обращает на себя внимание отсутствие в спектре (II) трех линий с химическими сдвигами 73,7 (двойной интенсивности), 74,7 и 98,3 м. д., отнесенных соответственно за счет резонанса C4, C5, C3 и C1 звена C в полисахариде (I), что указывает на разрушение β-рамнопиранозного остатка в процессе периодатного окисления. Сигналы окисленного остатка β-рамнопиранозы (звена C*) в спектре (II) могут быть выделены методом исключения и отнесены из общих соображений. Так, сигналы оксиметильных групп, возникающих из C3 и C4, находятся при 60,5 и 66,5 м. д. соответственно, причем большой сдвиг последнего в слабое поле по сравнению с обычным положением углерода оксиметильных групп тектос обусловлен β-эффектом метильной группы при соседнем атоме углерода. Заметный сдвиг в сильное поле за счет раскрытия рамнопиранозного цикла претерпели сигналы C2 и C5, резонирующие при 77,4 и 70,4 м. д. соответственно. И наконец, положение резонанса ацетального атома углерода находим при 101,1 м. д., т. е. на 3 м. д. в более слабом поле, чем C1 звена C. С другой стороны, изменения сигналов неокисленных звеньев A и B коснулись только атомов углерода, лежащих вблизи связи с модифицированным остатком C*; так, заметно сместилась лишь линия C1 звена B и C2 звена A (табл. 2). Таким образом, анализ спектров ¹³C-ЯМР модифицированных периодатным окислением полисахаридов наряду с анализом спектров полученных из них олигосахаридных фрагментов может быть использован при изучении строения полисахаридов, что благодаря простоте проведения модификации по Смитту может значительно упростить структурный анализ.

Суммируя литературные данные [13, 15, 16] и данные, полученные в настоящей работе, следует отметить, что величины β-эффектов на атомах C2 и C4 в 3-О-замещенных остатках *L*-рамнопиранозы существенно зависят от аномерной и абсолютной конфигурации присоединяю-

Величины β -эффектов в остатке *L*-рамнопиранозы в зависимости от замещения по С3

Соединение	Фрагмент	Величина β -эффекта, м.д.		Литература
		на С2	на С4	
3-О- β - <i>D</i> -Глюкопиранозил- <i>L</i> -рамнопираноза	<i>D</i> -Glc(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-0,2	-0,9	[16]
3-О- β - <i>D</i> -Галактопиранозил- <i>L</i> -рамнопираноза	<i>D</i> -Glc(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-0,2	-0,9	
	<i>D</i> -Gal(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-0,1	-1,0	[16]
	<i>D</i> -Gal(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-0,1	-0,8	
3-О-(2-Ацетамидо-2-дезоксид- <i>D</i> -глюкопиранозил)- <i>L</i> -рамнопираноза	<i>D</i> -GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-0,2	-1,1	[16]
	<i>D</i> -GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-0,2	-0,9	
3-О- α - <i>L</i> -Рамнопиранозил- <i>L</i> -рамнопираноза	<i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-0,12	-0,53	[15]
	<i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-0,02	-0,70	
Олигосахарид (IV)	<i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-0,34	-0,69	[15]
Олигосахарид (III) *	<i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	0	-0,7	
Специфический полисахарид из <i>Shigella dysenteriae</i> тип 10	<i>D</i> -ManNAc(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-4,2	-1,3	[13]
Олигосахарид из <i>Shigella dysenteriae</i> тип 10	<i>D</i> -ManNAc(α 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)	-4,4	-1,4	[13]
Полисахарид (I) *	<i>L</i> -Rha(β 1 \rightarrow 3)- <i>L</i> -Rha(α 1 \rightarrow 3)	-2,8	-1,6	

* Для возможности сравнения литературных данных по *L*-рамнозе с данными настоящей работы рассматривается *L*-энантиомерная структура полисахарида (I) и олигосахарида (III), поскольку полное обращение конфигурации не меняет их спектральных характеристик.

щегося моносахарида и практически не зависят от аномерной конфигурации самого *L*-рамнозного остатка (табл. 3).

Из приведенных в табл. 3 данных следует, что β -эффект на С2 *L*-рамнозы незначителен, если присоединенный в положение 3 пиранозный остаток имеет α -*L*- или β -*D*-конфигурацию, и резко возрастает при гликозилировании *L*-рамнозы по С3 α -*D*- или β -*L*-пиранозидом. Аналогичная зависимость, хотя и в менее выраженной форме, наблюдается и для β -эффекта на С4. В применении к *D*-рамнозе должна наблюдаться противоположная зависимость. Отмеченная закономерность, распространяющаяся, очевидно, и на другие сахара с манно-конфигурацией, может пойти применение для определения последовательности моносахаридных остатков в цепи полисахарида с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

Экспериментальная часть

Восходящая хроматография выполнена на бумаге FN-11 в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6:4:3) с обнаружением сахаров щелочным раствором нитрата серебра. Электрофорез на бумаге проведен в пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5 при 28 В/см. Гель-хроматография осуществлена на колонках с сефадексом G-50 (3,7×70 см) в пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5; выходные кривые получены с помощью углеводного анализатора «Technicon». Ионнообменная хроматография сахаров выполнена с использованием анализатора углеводов «Technicon» и аминокислотного анализатора BC-200, как описано ранее [17]. ГЖХ проведена на приборе «Pye-Uniscam», серия 104, на колонке с 3%-ной ECNSS-M; хроматомасс-спектрометрия выполнена на приборе «Varian Mat Gnom 111» с использованием колонки с SE-30 в описанных ранее условиях [17].

ИК-спектр снят на приборе UR-10 в прессовке с KBr. Спектры ПМР записаны на спектрометре BS-497 при 100 МГц в D₂O при 90°C с ацетоном в качестве внутреннего стандарта, химический сдвиг сигнала которого принимался за 2,23 м.д. от гексаметилдисилоксана. Спектры

^{13}C -ЯМР получены на приборе «Bruker-Physik WP-60» при 15,08 МГц для растворов в D_2O при 60°C с использованием метанола в качестве внутреннего стандарта; химические сдвиги даны после пересчета по соотношению $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{MeOH}} + 50,15$ м.д. Величины оптического вращения определяли на автоматическом поляриметре «Perkin-Elmer 141» при 20°C в воде. Растворы упаривали в вакууме при 40°C . Проведение серологических тестов описано ранее [6].

Специфический липополисахарид был выделен как описано ранее [5]. Липополисахарид (600 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (75 мл, 1,5 ч, 100°C), осадок липида отделяли центрифугированием при 20 000 g, супернатант лиофилизovali и хроматографией на колонке с сефадексом G-50 разделяли на высокомолекулярную фракцию (O-специфический полисахарид, 220 мг), $[\alpha]_D^{25} + 22,2^\circ$ (с 1,0), и олигосахаридную фракцию.

Многосахаридный состав. Полисахарид (3 мг) гидролизovali 2 н. HCl (4 ч, 100°C) в запаянной ампуле, гидролизат упаривали досуха, остаток упаривали с водой (3×0,5 мл), исследовали с помощью бумажной хроматографии, а также на углеводном и аминокислотном анализаторе. Часть гидролизата восстанавливали боргидридом натрия (10 мг, 2 ч, 20°C), обрабатывали как обычно, ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (15 мин, 100°C), упаривали и анализировали методом ГЖХ.

Гидролизат полисахарида (30 мг) подвергали препаративной бумажной хроматографии, соответствующую зону элюировали водой, выделенную рамнозу (6,8 мг) обрабатывали 1% раствором хлористого водорода в метаноле (5 мл, кипячение, 3 ч) и получили метил- α -D-рамнопиранозид. $[\alpha]_D^{25} + 68,2^\circ$ (с 0,7).

Анализ методом метилирования. Полисахарид (15 мг) метилировали иодистым метилом в присутствии метилсульфиниланнона по методу [9]. Метилированный полисахарид, очищенный диализом, был подвергнут формолизу 85%-ной HCOOH (3 ч, 100°C) и затем гидролизу 0,3 н. HCl (16 ч, 100°C), гидролизат восстанавливали боргидридом натрия (10 мг, 16 ч, 20°C), ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (15 мин, 100°C) и исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Распад по Смитту. Полисахарид (70 мг) в 0,1 М метапериодате натрия (3 мл) выдерживали 64 ч в темноте при 20°C , прибавляли избыток боргидрида натрия (120 мг), через 2 ч подкисляли уксусной кислотой, пропускали через колонку с сефадексом G-50, лиофилизovali и получили окисленный полисахарид (II) (60 мг). Полисахарид (II) гидролизovali 0,5 н. HCl (2 мл, 72 ч, 20°C), гидролизат хроматографировали на колонке с сефадексом G-15 и в качестве основного продукта получили олигосахарид (III) (28 мг), $[\alpha]_D^{25} + 51,6^\circ$ (с 1,0).

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1980) Биоорган. химия, 6, 1842–1850.
2. Meadow P. M. (1975) in: Genetics and Biochemistry of Pseudomonas (Clarke P. H., Richmond M. H., eds), pp. 67–98, John Wiley and Sons, London – New York – Sydney – Toronto.
3. Gelbart S. M., Reinhardt G. R., Greenlee H. B. (1976) J. Clin. Microbiol., 3, 62–66
4. Basset P. C. J., Dickson J. A. S., Hunt G. H. (1973) Lancet, i, 1263–1264.
5. Касянчук Н. В. (1979) Микробиол. ж., 41, 6–11.
6. Коваленко Э. А., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. (1979) Микробиол. ж., 41, 603–606.
7. Bebault G. M., Choy J. M., Dutton G. G. S., Funnell N., Steffen A. M. (1973) J. Bacteriol., 113, 1345–1347.
8. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. (1920) Ber., 53, 2362–2388.
9. Conrad H. E. (1972) in: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., BeMiller J. N., eds), vol. 6, pp. 361–364, Acad. Press, New York – London. В русском переводе: Методы исследования углеводов (1975) с. 276–278, «Мир», М.
10. Bjordal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) Carbohydr. Res., 5, 433–440.
11. Drewry D. T., Symes K. C., Gray G. W., Wilkinson S. G. (1975) Biochem. J., 149, 93–106.

12. Klyne W. (1950) *Biochem. J.*, **47**, xli - xlii.
13. Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К., Кочетков Н. К. (1979) *Биоорганическая химия*, **5**, 583-587.
14. Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. (1980) *Биоорганическая химия*, **6**, 1332-1337.
15. Laffite C., Nguyen Phuoc Du A. M., Winternitz F., Wylde R., Pratviel-Sosa F. (1978) *Carbohydr. Res.*, **67**, 105-115.
16. Colson P., King R. R. (1976) *Carbohydr. Res.*, **67**, 105-115.
17. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hoffman I. L. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 559-566.

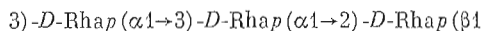
Поступила в редакцию
22.IV.1980

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 11. THE STRUCTURE AND ¹³C NMR SPECTRUM OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA*

KNIREL Yu. A., SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A.,
KOCHETKOV N. K., KASYANCHUK N. V., ZAKHAROVA I. Ya.

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

O-Specific polysaccharide, obtained by mild acid hydrolysis from lipopolysaccharide of *Pseudomonas cepacia* strain IMV 3181 was shown to be a homopolymer of *D*-rhamnose — monosaccharide rarely occurring in nature. On the basis of PMR and ¹³C NMR spectral data, methylation analysis, Smith degradation, and optical rotation calculations, the repeating unit of the O-specific polysaccharide was assigned the following structure:



A 2-O-substituted β -*D*-rhamnose residue was shown to be an immunodeterminant sugar. The ¹³C NMR spectra of O-specific polysaccharide, its oligosaccharide fragment obtained on Smith degradation, and of periodate oxidized polysaccharide, were interpreted. The effect of the attached monosaccharide on the chemical shifts of carbon atoms in 3-O-substituted rhamnopyranose residues is discussed.