



УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

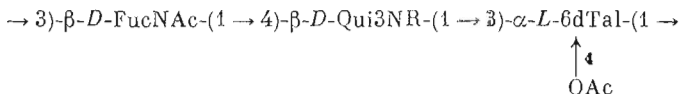
Хоменко В. А., Набережных Г. А., Исаков В. В.,  
Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С., Книрель Ю. А.\*,  
Виноградов Е. В.\*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ

Академии наук СССР, Владивосток;

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

О-Специфический полисахарид, полученный при мягкой кислотной деградации липополисахарида *Pseudomonas fluorescens*, штамм 361, содержит 6-дезоксигалактозу (6dGal), 2-ацетиламино-2,6-дидезокси-D-галактозу (FucNAc) и 3-амино-3,6-дидезокси-D-глюкозу с неидентифицированным N-ацильным заместителем (Qui3NR), а также O-ацетильные группы. На основании O-дезацетилирования, полного кислотного гидролиза, метилирования, избирательного расщепления безводным фтористым водородом и анализа методом <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии найдено, что полисахарид построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, имеющих следующую структуру:

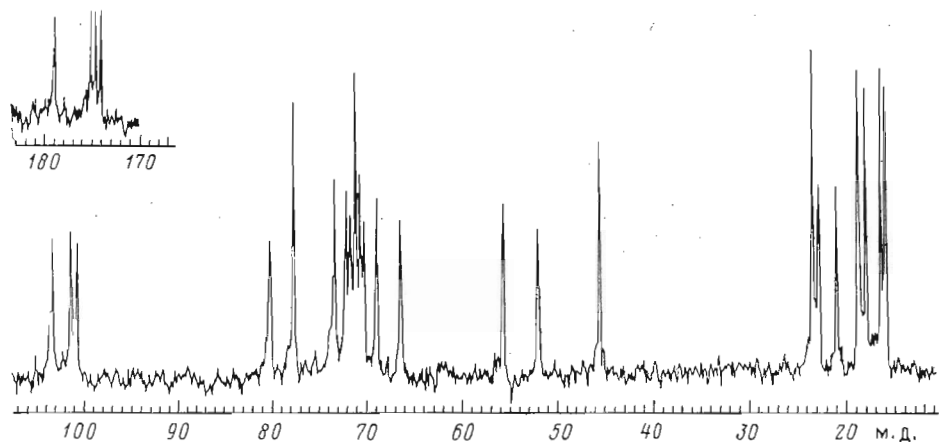


Бактерию *Pseudomonas fluorescens*, относящуюся к флуоресцирующим псевдомонадам группы I, обнаруживают в почве, воде, пищевых продуктах, на различных растительных и животных субстратах [1]. Этот вид можно считать условно-патогенным для человека, хотя по частоте выделения из патологического материала он отстает от *P. aeruginosa* [2]. *P. fluorescens* характеризуется высокой фенотипической гетерогенностью [1], и проблемы его классификации окончательно не решены. В связи с этим представляет интерес исследование расположенных на наружной поверхности внешней мембраны O-антигенов (липополисахаридов) этого микроорганизма. Эти биополимеры в значительной степени определяют характер взаимодействия бактериальной клетки с окружающей средой, в том числе с организмом хозяина, и их структура и состав являются одним из важных хемотаксономических критериев.

Сведения о химическом составе липополисахаридов *P. fluorescens* крайне ограничены [3–5], а данные об их детальном строении вовсе отсутствуют. При предварительном изучении липополисахарида *P. fluorescens*, штамм 361, было показано, что он подобно липополисахаридам энтеробактерий и *P. aeruginosa* состоит из трех структурно различных частей: O-специфической полисахаридной цепи, олигосахарида кобра и липида А — и отличается высоким содержанием аминсахаров [4]. Настоящая работа посвящена изучению строения O-специфического полисахарида этого штамма.

Полисахарид был получен мягким гидролизом 1% уксусной кислотой липополисахарида, выделенного по методу [6], с последующей гель-хроматографией углеводной части на сефадексе G-50. Полисахарид обладал высокой серологической активностью и давал в иммунодиффузии одну линию преципитации с гомологичной O-антисывороткой. Он был нейтральным, по данным электрофореза на бумаге, и имел оптическое вращение  $[\alpha]_D^{20} -22,9^\circ$  (с 0,5).

Сокращения: 6dGal — 6-дезоксигалактоза, FucNAc — 2-ацетиламино-2,6-дидезокси-галактоза (2-ацетиламино-2-дезоксиглюкоза), Qui3NR — 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-глюкоза (3-ацетиламино-3-дезоксиглюкоза).



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. fluorescens*

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида (рисунок) присутствовали сигналы метильных групп трех 6-дезоксисахаров при 16,0; 16,5 и 18,0 м.д., одной N-ацетильной группы при 22,8 м.д., одной O-ацетильной группы при 20,8 м.д., двух соответствующих им карбонильных групп в области 174,2—175,2 м.д., двух атомов углерода, связанных с азотом, при 52,1 и 55,9 м.д., трех аномерных углеродных атомов при 100,9; 101,5 и 103,5 м.д., а также 10 атомов углерода, связанных с кислородом, в области 66,5—80,3 м.д. Из этих данных следовало, что полисахарид построен из регулярно повторяющихся трисахаридных звеньев, в состав которых входят три 6-дезоксигексозы, две из которых являются аминосахарами, а также одна N-ацетильная и одна O-ацетильная группа. Аминогруппа второго аминосахара ацилирована остатком другой карбоновой кислоты, которая в настоящее время не идентифицирована. К этому остатку относятся присутствующие в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида сигналы при 18,7; 23,4; 45,7; 71,3 и 77,5 м.д., а также сигналы двух карбонильных групп при 178,9 м.д. и в области 174,2—175,2 м.д., как это было найдено при сравнении с данными спектра несущего его моносахарида (см. ниже).

Для определения моносахаридного состава полисахарид был подвергнут кислотному гидролизу 2 М соляной кислотой, и гидролизат был разделен с помощью ионообменной хроматографии на катионите Dowex 50×8 на основную и нейтральную фракции. Присутствующий в основной фракции аминосахар с помощью электрофореза на бумаге, аминокислотного анализатора и хроматомасс-спектрометрии был идентифицирован как фукозамин; на основании величины оптического вращения N-ацетильного производного была определена его D-конфигурация.

Из нейтральной фракции гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге были выделены два моносахарида, имеющие подвижность  $R_{\text{DHA}}$  1,0 и 1,14. Жесткий кислотный гидролиз менее подвижного моносахарида 4 М соляной кислотой привел к аминосахару, который был исследован методом хроматомасс-спектрометрии в виде полного ацетата полиола. Его масс-спектр содержал интенсивные пики с  $m/z$  216 и 230, отвечающие фрагментам C1—C3 и C3—C6 соответственно и характеризующие положение ацетамидной группы при C3 [7]. Этот масс-спектр был идентичен спектру аналогичного производного 3-амино-3,6-дидезокси-D-галактозы, и, таким образом, полученный аминосахар является 3-амино-3,6-дидезоксигексозой.

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре выделенного из гидролизата N-ацильного производного этого аминосахара были найдены все сигналы, относящиеся к преобладающей  $\beta$ -пиранозной форме, и на основании больших констант спин-спинового взаимодействия vicинальных протонов пиранозного цикла (табл. 1) была определена его *глюко*-конфигурация. В спектре полностью ацетилированного производного этого моносахарида (табл. 1) на-

Параметры  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров ( $\delta$ , м. д.)

Протон	Qui3NR $\beta$	2,4Ac <sub>2</sub> Qui3NR $\beta$ -OAc **
H1	4,96 (д *, $J_{1,2}$ 8 Гц)	5,74
H2	3,48 (дд, $J_{2,3}$ 10,2 Гц)	4,99
H3	4,02 (т *, $J_{3,4}$ ~ 10 Гц)	4,42
H4	3,34 (т, $J_{4,5}$ 10 Гц)	4,70
H5	3,69 (дк *, $J_{5,6}$ 6,3 Гц)	3,75
H6	1,30 (3 H, д)	1,2-1,3

\* д — дублет, т — триплет, к — квартет.

\*\* В растворе в  $\text{CDCl}_3$ .

Таблица 2

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

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
6-Дезокси- <i>L</i> -галопираноза *	6dTal $\alpha$	95,2	71,0	66,0	72,8	67,8	16,3
6-Дезокси- $\alpha$ -галопираноза (рассчитанные)		95,3	71,1	66,05	73,0	67,8	16,6
N-Ацетил- <i>D</i> -фукозамин	FucNAc $\alpha$	91,6	50,7	68,2	71,9	67,0	16,2
	FucNAc $\beta$	95,8	54,2	71,9	71,5	71,3	16,2
3-Ациламино-3,6-дидезокси- <i>D</i> - глюкопираноза	Qui3NR $\alpha$	92,3	70,4	54,6	73,8	68,8	17,4 <sup>a</sup>
	Qui3NR $\beta$	97,3	73,0	57,8	73,8	74,1	17,5 <sup>a</sup>
Дисахарид (I)	FucNAc $\beta$	101,5	53,3	71,3	71,3	70,9	16,5
	Qui3NR $\alpha$	92,1	71,2	53,0	78,2	68,7	17,8
	Qui3NR $\beta$	97,1	73,6	56,1	78,2	73,3	17,8
О-Дезацетилированный поли- сахарид	FucNAc $\beta$	101,2	52,2	80,6	71,6 <sup>a</sup>	71,1 <sup>a</sup>	16,3 <sup>b</sup>
	Qui3NR $\beta$	102,5	72,5	55,9	78,2	73,8	18,1
	6dTal $\alpha$	103,9	70,6 <sup>a</sup>	74,1	70,7 <sup>a</sup>	68,5	16,6 <sup>b</sup>
Интактный полисахарид	FucNAc $\beta$	101,5	52,1	80,3	70,9 <sup>a</sup>	70,5 <sup>a</sup>	16,9 <sup>b</sup>
	Qui3NR $\beta$	100,9	72,4	55,9	77,5	73,7	18,0
	6dTal $\alpha$	103,5	69,1 <sup>a</sup>	72,0	71,3 <sup>a</sup>	66,5	16,5 <sup>b</sup>

<sup>a,б</sup> Отнесение может быть обратным.\* Приведены только сигналы преобладающей  $\alpha$ -пиранозной формы.

блюдалось характерное значительное смещение в слабое поле сигналов H2 и H4, вызванное дезэкранирующим эффектом О-ацетильных групп и подтверждающее присутствие гидроксильных групп в исходном аминосакхаре в положениях 2 и 4. В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре 3-ациламино-3,6-дидезокси-глюкозы (3-ациламино-3-дезоксихинозозы) присутствовали сигналы  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных форм пиранозного цикла в соотношении ~1:3, отнесенные при сравнении с данными спектра 3-ацетамидо-3,6-дидезокси-*D*-глюкозы [8] (табл. 2), а также сигналы N-ацильного заместителя при 18,4; 23,2; 45,8; 71,6; 78,2; 175,7 и 179,7 м.д. Таким образом, 3-амино-3,6-дидезокси-глюкоза N-ацелирована остатком неидентифицированной карбоновой кислоты, и, следовательно, N-ацетильная группа в полисахариде находится на остатке фукозамина.

Строение более подвижного моносахарида, выделенного из нейтральной фракции гидролизата полисахарида, исследовалось методом хромато-масс-спектрометрии в виде полностью ацетилированных полиола и метилгликозидов. Характер фрагментации этих производных показал, что исследуемый моносахарид является 6-дезоксигексозой [9]. По хроматографической подвижности на бумаге и в тонком слое силикагеля он был подобен 6-дезокситалозе, данные для которой приведены в работе [10]. Конфигурация этого сахара была подтверждена методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Расчет химических сдвигов сигналов 6-дезокси- $\alpha$ -галопиранозы, проведенный методом аддитивных поправок исходя из данных  $^{13}\text{C}$ -

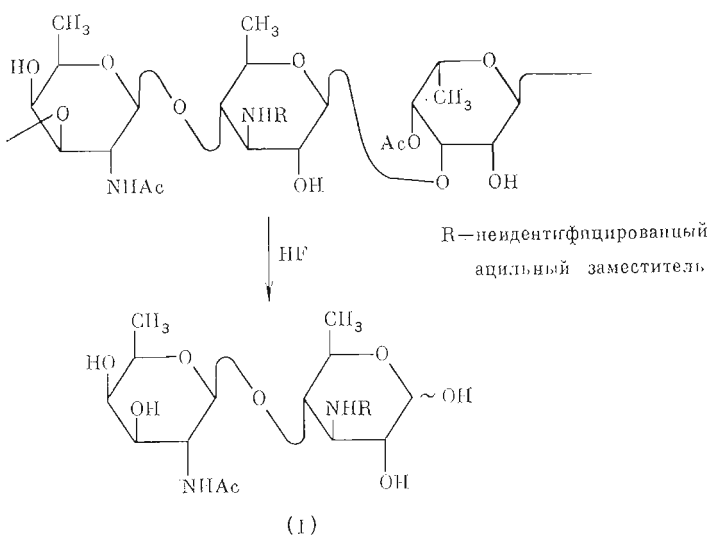
ЯМР для галактопиранозы, фукопиранозы [11] и талопиранозы [12], привел к величинам, хорошо совпадающим с экспериментальными данными для  $\alpha$ -пиранозной формы 6-дезоксигексозы из полисахарида (табл. 2). В то же время химические сдвиги сигналов всех остальных 6-дезоксигексоз (экспериментальные [11—13] или рассчитанные по тому же методу) значительно отличались от данных для 6-дезокситалопиранозы; особенно это относится к сигналу C3, который в спектре 6-деокси- $\alpha$ -талопиранозы находится вблизи 66 м.д., а в спектрах остальных семи 6-деокси- $\alpha$ -гексопираноз — в более слабом поле, чем 70 м.д. На основании величины оптического вращения было установлено, что 6-дезокситалоза имеет *L*-конфигурацию.

Таким образом, в состав *O*-специфического полисахарида входят 6-дезоксид-*L*-талоза, *N*-ацетил-*D*-фукозамин и 3-амино-3,6-дидезоксиглюкоза с неидентифицированным *N*-ацильным заместителем. Абсолютная конфигурация 3-аминосахара была определена при исследовании дисахарида (I) (см. ниже).

Для определения типов гликозидных связей полисахарид метилировали по методу [14], метилированный полисахарид подвергали метанолизу и анализировали частично метилированные метилгликозиды методом хроматомасс-спектрометрии в виде ацетатов. В результате был идентифицирован метил-2,4-ди-*O*-метил-6-дезокситалопиранозид (с использованием данных [9]) и метил-4-*O*-метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2,6-дидезоксигалактопиранозид, масс-спектр которого был идентичен приведенному в работе [15]. Таким образом, 6-дезокситалоза и *N*-ацетилфукозамин замещены в положение 3, и, следовательно, полисахарид является линейным. Эти выводы согласовывались с устойчивостью полисахарида к периодатному окислению. Производное 3-ациламино-3,6-дидезоксиглюкозы при анализе частично метилированных сахаров обнаружено не было, вероятно, вследствие низкой летучести.

Далее полисахарид был подвергнут избирательному сольволизу безводным фтористым водородом при 0°С, и из сольволизата высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращенной фазе C<sub>18</sub> был выделен олигосахарид (I). По данным <sup>13</sup>C-ЯМР-спектра (табл. 2), он является дисахаридом, построенным из фукозамина и 3-амино-3,6-дидезоксиглюкозы, несущих соответствующие *N*-ацильные заместители. Положение сигналов C1 $\alpha$  и C1 $\beta$  моносахарида, находящегося на восстанавливающем конце олигосахарида (I), было близким к положению соответствующих сигналов в спектре 3-ациламино-3,6-дидезоксиглюкозы и отличалось (особенно для C1 $\beta$ ) от их положения в спектре *N*-ацетилфукозамина (табл. 2), и, следовательно, последний находится на невосстанавливающем конце дисахарида (I). Этот вывод подтверждался хорошим совпадением химических сдвигов сигналов этого моносахарида в спектре (I) с данными для  $\beta$ -пиранозной формы *N*-ацетилфукозамина, тогда как ни одной из аномерных форм 3-ациламино-3,6-дидезоксиглюкозы эти сигналы в спектре (I) принадлежать не могут. Из этих данных также следует, что остаток *N*-ацетилфукозамина в олигосахариде (I) имеет  $\beta$ -конфигурацию. Сопоставление <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров дисахарида (I) и 3-ациламино-3,6-дидезоксиглюкозы, в частности хорошее совпадение сигналов C1 $\alpha$  и C1 $\beta$  этого моносахарида в обоих спектрах, доказывало его замещение в дисахариде в положении 4. При этом были определены эффекты гликозилирования на положение сигналов остатка 3-ациламино-3,6-дидезоксиглюкозы, что позволило установить абсолютную конфигурацию этого моносахарида, используя известную закономерность для гексопираноз [16], распространяющуюся также на 3-ациламинопроизводные [8]. Действительно, относительно большая (по модулю) величина  $\beta$ -эффекта на C3 (−1,6 м.д. для  $\alpha$ -аномера и −1,7 м.д. для  $\beta$ -аномера) доказывала, что в дисахариде (I) оба  $\beta$ 1→4-связанных пиранозных остатка имеют одинаковую абсолютную конфигурацию [16], и, следовательно, 3-амино-3,6-дидезоксиглюкоза, так же как фукозамин, относится к *D*-ряду. Таким образом, дисахарид (I) имеет структуру, приведенную на схеме, и, так как, по данным метилирования, полисахарид имеет линейное строение, из строения дисахарида

вытекает последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене.



Для определения конфигураций гликозидных связей в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида были определены константы спин-спинового взаимодействия аномерных атомов углерода с аномерными протонами. Относительно большая константа  $J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  169,9 Гц для сигнала при 103,5 м.д. указывала на то, что соответствующий моносахарид имеет  $\alpha$ -конфигурацию [17]. Так как  $\text{C}1\alpha$  пиранозидов с *глюко*- и *галакто*-конфигурацией не могут резонировать в более слабом поле, чем 102 м.д. [13, 18], этот сигнал принадлежит 6-дезокситалозе, которая, таким образом, имеет  $\alpha$ -конфигурацию. Для других двух сигналов аномерных углеродов при 100,9 и 101,5 м.д. были найдены относительно небольшие константы  $J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  161,3 и 159,9 Гц соответственно, и, следовательно, оба аминсахара присоединены  $\beta$ -гликозидными связями [17]. Для *N*-ацетилфукозамина (1) (см. выше), а для 3-ацетиламино-3,6-дидезоксиглюкозы  $\beta$ -конфигурация подтверждается положением сигнала  $\text{C}3$  в спектре полисахарида при 55,8 м.д., близким к положению сигнала  $\text{C}3\beta$  этого моносахарида при 56,1 м.д. в спектре дисахарида (1).

*O*-Ацетильная группа была локализована в результате расшифровки и сравнительного анализа  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров интактного и *O*-деацетилированного полисахаридов (табл. 2). Расшифровка спектра *O*-деацетилированного полисахарида была проведена путем сравнения с данными спектров дисахарида (1) и соответствующих моносахаридов с учетом эффектов гликозилирования. Сравнение этого спектра со спектром интактного полисахарида показало, что смещению от 68,5 и 74,1 к 66,5 и 72,0 м.д. подвергаются сигналы  $\text{C}5$  и  $\text{C}3$  остатка 6-дезокситалозы соответственно. По направлению и величине эти смещения характерны для  $\beta$ -эффектов *O*-ацетилирования этого моносахарида в положение 4 [19], что позволяет локализовать *O*-ацетильную группу на остатке 6-дезокситалозы. В соответствии с этим выводом сигналы остатков аминсахаров при *O*-деацетилировании изменяются лишь незначительно; исключение составляет сигнал  $\text{C}1$  3-ацетиламино-3,6-дидезоксиглюкозы, гликозилирующей 6-дезокситалозу в положение 3, что, очевидно, связано с пространственной близостью этого углеродного атома и *O*-ацетильной группы.

Таким образом, согласно полученным данным, повторяющееся звено полисахарида *P. fluorescens* имеет структуру, приведенную на схеме. В настоящее время проводится установление строения *N*-ацильного заместителя 3-амино-3,6-дидезоксиглюкозы.

## Экспериментальная часть

Нисходящая хроматография на бумаге FN-3 и FN-15 выполнена в системе растворителей — бутанол — пиридин — вода, 6:4:3 (А) или этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота, 5:5:1:3 (Б) при обнаружении веществ на бумаге щелочным раствором нитрата серебра или раствором нингидрина в ацетоне. ТСХ проведена на силикагеле LSL 254 5/40 (ЧССР) в системе этилацетат — изопропанол — метанол, 70:15:15, при обнаружении моносахаридов концентрированной  $H_2SO_4$ . Электрофорез на бумаге осуществляли в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 28 В/см в течение 90 мин.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (50×2 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5. Высокоэффективная хроматография выполнена на колонке (250×4,6 мм) Ultrosphere-ODS  $C_{18}$  (Altex, США) в системе вода — метанол (9:1) при использовании для детектирования дифференциального рефрактометра Кнауер (ФРГ). Анализ аminosахаров проводили на автоматическом анализаторе аминокислот LKB-Biosal 3201 (Швеция). ГЖХ выполнена на приборе Pye Unicam 104 (Англия) на стеклянных колонках (150×0,4 см) с 3% QF-1 (колонка А) или с 3% OV-225 (колонка Б) на газхроме Q (100–200 меш) в программе температур 175–225°С (5°/мин) для ацетилированных полиолов или 120–225°С (5°/мин) для ацетилированных метилгликозидов. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе LKB-9000 (Швеция) с использованием тех же фаз.

$^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker-Physics WM-250 (ФРГ) в  $D_2O$  при 25 и 60°С соответственно с использованием в качестве внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силацетан-5-сульфокислоты ( $\delta_H$  0,015) и метанола ( $\delta_C$  49,6). Оптическое вращение определяли на автоматическом поляриметре Perkin — Elmer 141 в воде при 20°С. Растворы лиофилизовали или упаривали в вакууме при 40°С. Серологические тесты проводили как описано ранее [4].

*Выделение липополисахарида и О-специфического полисахарида.* Бактериальная культура *P. fluorescens*, штамм 361, получена из коллекции Института микробиологии АН БССР (Минск). Культуру выращивали как описано в работе [4]. Сухие бактериальные клетки экстрагировали 45% водным фенолом по методу [6], водный и фенольный слой разделяли центрифугированием и отдельно диализовали против воды, нуклеиновые кислоты отделяли трехкратным центрифугированием при 105 000 g (3 ч при 4°С). Выход липополисахарида из фенольного слоя составил 0,8%; водный слой практически не содержал липополисахарида.

Липополисахарид (200 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (100 мл, 100°С, 2,5 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 из супернатанта выделили О-специфический полисахарид (60 мг) и олигосахаридную фракцию (65 мг), которая в дальнейшем не исследовалась.

*О-Дезацетилирование полисахарида.* Полисахарид (50 мг) восстанавливали избытком боргидрида натрия в воде, после обычной обработки нагревали с 0,1 М раствором NaOH (2 мл, 60°С, 3 ч), нейтрализовали HCl, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделили О-дезацетилированный полисахарид (40 мг).

*Идентификация моносахаридов.* В аналитическом варианте полисахарид (5 мг) гидролизовали 2 М HCl (100°С, 3 ч), гидролизат упаривали и исследовали с помощью электрофореза и хроматографии на бумаге в системах А и Б, аминокислотного анализатора и ГЖХ на колонках А и Б в виде ацетатов полиолов. Для получения метилгликозидов полисахарид (4 мг) подвергали метанолизу 0,55 М раствором хлористого водорода в метаноле (85°С, 20 ч), упаривали, ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине как обычно и исследовали ГЖХ на колонке А и хроматомасс-спектрометрией.

В препаративном варианте полисахарид (85 мг) гидролизовали 2 М HCl (100°С, 3 ч), упаривали, остаток растворяли в воде и наносили на колонку (15×1 см) с катионитом Dowex 50×8 ( $H^+$ -форма), нейтральную фракцию элюировали водой (100 мл), фракцию аminosахаров — 1 М HCl (150 мл), элюаты упаривали, моносахариды выделяли препаративной хроматографией на бумаге FN-3 в системе А. Из нейтральной фракции получили 6-дезоксигалактозу (6,2 мг),  $[\alpha]_D -17,9^\circ$  (с 0,3), ср. данные [20]:  $[\alpha]_D -20^\circ$  (вода), и 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-D-глюкозу (9,6 мг),  $[\alpha]_D +7^\circ$  (с 0,25), которую ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (1:1, 20°С, 16 ч), выделяя продукт экстракцией хлороформом, или гидролизовали 4 М HCl (100°С, 16 ч), N-ацетилировали [21] и исследо-

вали в виде ацетата полиола ГЖХ на колонке Б и хроматомасс-спектрометрией. Из фракции аминсахаров получили фукозамин, который N-ацетилировали [21] в 2-ацетиамидо-2,6-дидезокси-D-галактозу (5,6 мг),  $[\alpha]_D^{+70^\circ}$  (с 0,3), ср. данные [22]:  $[\alpha]_D^{+92^\circ}$  (вода).

*Анализ методом метилирования.* Полисахарид (15 мг) метилировали по методу [14], продукт подвергли метанолизу 0,55 М раствором хлористого водорода в метаноле (85° С, 20 ч), ацетилировали как обычно, ацетаты частично метилированных метилгликозидов исследовали ГЖХ на колонке Б и хроматомасс-спектрометрией.

*Сольволиз безводным фтористым водородом.* Полисахарид (50 мг) высушивали в вакууме над пятиокисью фосфора (60° С, 2 ч), обрабатывали в тефлоновом реакторе свежеперегранным над трифторидом кобальта [23] фтористым водородом (~10 мл, ~0° С, 15 мин), фтористый водород удаляли в вакууме при адсорбции твердой гидроокисью натрия, сольволизат растворяли в воде, высокоэффективной жидкостной хроматографией выделили дисахарид (I) (4 мг).

Авторы благодарят А. С. Шашкова за помощь при обсуждении результатов и съемку <sup>13</sup>C-ЯМР-спектра дисахарид (I), а также д-ра G. Ashwell (Национальный институт здоровья, Бетесда, США) за образец 3-ацетиамидо-3,6-дидезокси-D-галактозы и Н. А. Кочарову за образец N-ацетил-D-фукозамина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Palleroni N. J.* In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*/Ed. Holt J. G. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, v. 1, p. 141–199.
2. *Калина Г. П.* Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1985, № 5, с. 91–98.
3. *Wilkinson S. G. J.* Gen. Microbiol., 1972, v. 70, part 2, p. 365–369.
4. *Набережных Г. А., Хоменко В. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С.* Химия природ. соединений, 1977, № 6, с. 755–760.
5. *Здоровенко Г. М., Веремейченко С. Н., Захарова И. Я.* Тезисы V Всесоюз. биохим. съезда. М.: Наука, 1986, т. 3, с. 317–318.
6. *Вестфаль О., Янн К.* В кн.: *Методы химии углеводов*/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325–332.
7. *Bjorndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S.* Angew. Chem., 1970, v. 82, № 16, p. 643–646.
8. *L'vov V. L., Tochtamysheva N. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Capek K.* Carbohydr. Res., 1983, v. 112, № 2, p. 233–235.
9. *Елькин Ю. Н., Дубинин А. Н.* Деп. ВИНТИ, 1979, № 2773.
10. *Kaufmann H., Muhlradt P., Reichstein T.* Helv. chim. acta, 1967, v. 50, № 8, p. 2287–2298.
11. *Gorin P. A. J., Mazurek M.* Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212–1223.
12. *Шашков А. С.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1983, № 6, с. 1328–1336.
13. *Bock K., Pedersen C.* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1983, v. 41, p. 27–66.
14. *Копрад Г. Е.* В кн.: *Методы исследования углеводов*/Ред. Хорлин А. М.: Мир, 1975, с. 276–278.
15. *Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashitova G. M.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 106, № 3, p. 643–651.
16. *Шашков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев В. А., Кочетков Н. К.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1364–1371.
17. *Bock K., Pedersen C. J.* Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, p. 293–297.
18. *Bock K., Pedersen C., Pedersen H.* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1984, v. 42, p. 193–225.
19. *Cagnaire D., Mancier D., Vincendon M.* Org. Magn. Reson., 1978, v. 11, № 7, p. 344–349.
20. *MacLennan A. P.* Biochim. et biophys. acta, 1961, v. 48, № 3, p. 600–603.
21. *Horton D., Rodemeyer G., Rodemeyer R.* Carbohydr. Res., 1977, v. 56, № 1, p. 129–138.
22. *Perry M. B., Daoust V.* Can. J. Chem., 1973, v. 51, № 6, p. 974–977.
23. *Mort A. J., Lamport D. T. A.* Anal. Biochem., 1977, v. 82, № 2, p. 289–309.

Поступила в редакцию  
10.IV.1986

STRUCTURAL STUDY OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF  
*PSEUDOMONAS FLUORESCENS* LIPOPOLYSACCHARIDE

KHOMENKO V. A., NABEREZHNYCH G. A., ISAKOV V. V., SOLOV'eva T. F.,  
OVODOV Y. S., KNIREL Y. A.\*, VINOGRADOV E. V.\*

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Science Centre,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok;*  
*\*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

An O-specific polysaccharide, containing 6-deoxy-*L*-talose (6dTal), *N*-acetyl-*D*-fucosamine (FucNAc), 3-amino-3,6-dideoxy-*D*-glucose with an unidentified *N*-acyl substituent (Qui3NR), and *O*-acetyl groups, was obtained on mild acid degradation of a *Pseudomonas fluorescens* strain 361 lipopolysaccharide. On the basis of *O*-deacetylation, acid hydrolysis, methylation, selective solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride, and <sup>13</sup>C NMR analysis, the polysaccharide is built up of trisaccharide repeating units of the following structure:

