



УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

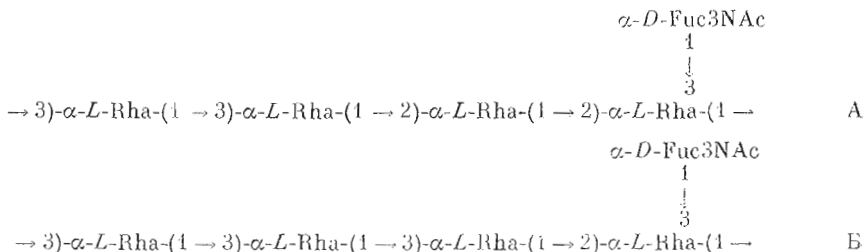
## АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 29 \*. СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS HOLCI* 8300 (СЕРОГРУППА I)

*Енирель Ю. А., Здорovenko Г. М.\*, Шапков А. С.,  
Яковлева Л. М.\*, Губанова Н. Я.\*, Гвоздык Р. И.\**

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

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

Липополисахарид *Pseudomonas holci* 8300 имеет О-специфическую полисахаридную цепь, включающую остатки L-рамнозы и 3-ацетамидо-3-дезоксид-фукозы в соотношении 4 : 1. На основании данных метилирования, распада по Смитсу и анализа методами <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии найдено, что полисахарид построен из пептисахаридных звеньев типов А и Б в соотношении ~2,5 : 1. Присутствующие в меньшем количестве звенья Б в одних участках полисахарида образуют цепочки (иногда довольно длинные), а в других участках чередуются с основными звеньями А.



Вид *Pseudomonas holci*, поражающий широкий круг сельскохозяйственных растений [2], неоднозначно классифицировался в 8-м издании определителя Берджи [3] и не включен в 9-е издание этого определителя [4], очевидно, из-за отсутствия достаточного количества данных, позволяющих определить таксономический ранг этого микроорганизма. При сходстве со штаммами *Pseudomonas syringae* по фитопатогенным свойствам [2] штаммы *P. holci* характеризуются серологической неоднородностью, распределяясь в четырех серогруппах классификационной схемы [5]. Ранее нами были установлены структуры О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов штаммов *P. holci*, относящихся к серогруппам II [1], IV [6] и VI [7], и были найдены как общности, так и различия в их структурной организации. В настоящем сообщении приведены результаты исследования О-специфического полисахарида *P. holci* 8300, входящего в серогруппу I.

Липополисахарид был выделен экстракцией солевым раствором и очищен ультрацентрифугированием [8]. Он обладал высокой О-специфической активностью в реакции кольцепреципитации (титр 1 : 100 000) и пассивной гемагглютинации (титр 1 : 10 240) и содержал не менее трех О-антигенных детерминант по данным двойной диффузии в агаре и иммуноэлектрофореза. При расщеплении липополисахарида 1% уксусной кислотой с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 был получен серологически активный О-специфический полисахарид, однако его активность была ниже, чем у липополисахарида, о чем свидетельствовали данные торможения реакции пассивной гемагглютинации (минимальные ингибирующие дозы 64 и 1 мкг соответственно) и потеря одной линии преципитации при двойной диффузии в геле.

\* Сообщение 28 см. [1]. Сокращение: Fuc3NAc – 3-ацетамидо-3-дезоксифукоза (3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактоза).

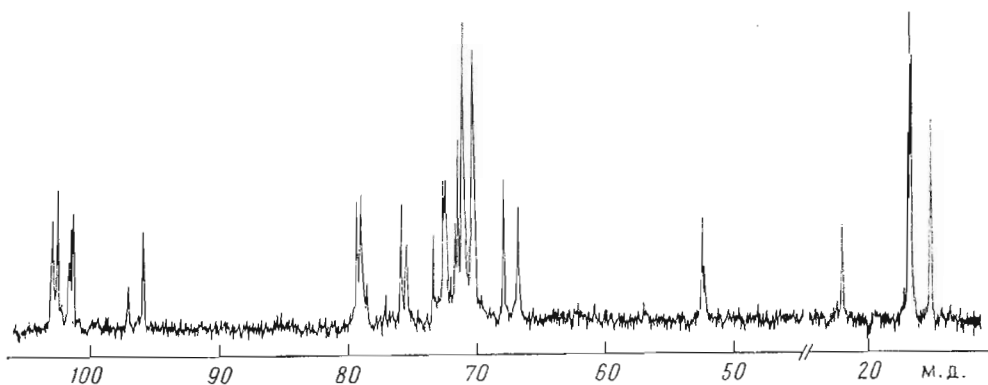


Рис. 1

Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. holci*

Рис. 2. Гель-хроматография на геле TSK HW 40 продуктов распада по Смуту О-специфического полисахарида

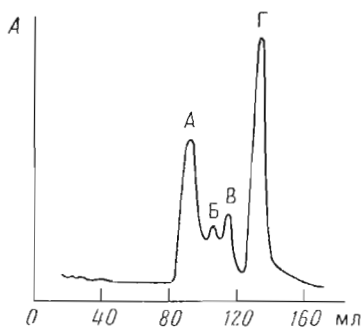


Рис. 2

По данным кислотного гидролиза, в состав полисахарида входят рамноза и 3-амино-3,6-дидезоксиглюкоза. Рамноза была идентифицирована методами хроматографии на бумаге и ГЖХ в виде ацетата полиола; она была выделена из гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге, и на основании величины удельного оптического вращения полученного из нее метилрамнозида была установлена принадлежность этого моносахарида к *L*-ряду. Структура аминосахара была установлена методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Масс-спектр полученного из него полного ацетата полиола был идентичен спектру соответствующего производного 3-амино-3,6-дидезокси-*D*-глюкозы [9] и содержал интенсивные пики ионов с  $m/z$  216 и 230, отвечающие фрагментам C1—C3 и C3—C6 соответственно и указывающие на присутствие ацетамидогруппы в положении 3. *D*-галакто-Конфигурация этого аминосахара была установлена при анализе  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров (см. ниже).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 1) содержал две серии сигналов с соотношением интенсивностей  $\sim 2,5:1$ . Сигналы доминирующей серии образовывали подспектр, отвечающий полисахариду с пентасахаридным повторяющимся звеном (присутствуют пять сигналов аномерных углеродных атомов в области 96—103 м.д.); все пять моносахаридов являются 6-дезоксисахарами (пять сигналов C6 в области 16—18 м.д.), а один из них представляет собой *N*-ацетилированный аминосахар (сигнал атома углерода, связанного с азотом, при 52,5 м.д. и *N*-ацетильной группы при 23,2 ( $\text{CH}_3$ ) и 175,4 ( $\text{CO}$ ) м.д.). Определить при предварительном анализе, чему отвечает подспектр, образованный сигналами минорной серии, было затруднительно, так как большинство этих сигналов совпадало, по-видимому, с сигналами основной серии.

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре, снятом без подавления С,Н-взаимодействий, были определены константы спин-спинового взаимодействия сигналов аномерных атомов углерода как доминирующей, так и минорной серий. Величины всех этих констант находились в интервале 169—171 Гц; следовательно, гликозидные связи всех моносахаридных остатков в полисахариде имеют  $\alpha$ -конфигурацию [10].

Для определения типов замещения полисахарид был подвергнут анализу методом метилирования, в результате которого с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов [11] были идентифицированы 3,4-ди-О-метилрамноза, 2,4-ди-О-метилрамноза и 4-О-метилрамноза в соотношении ~1:3:1. Кроме того, была обнаружена 2,4-ди-О-метил-3-(N-метил)ацетамидо-3,6-дидезоксигексоза; в масс-спектре ее производного присутствовали интенсивные пики ионов с  $m/z$  202 и 216, отвечающие фрагментам С1—С3 и С3—С6 соответственно и указывающие на присутствие метоксильных групп при С2 и С4. Таким образом, полисахарид является разветвленным, терминальный моносахарид боковой цепи представляет собой остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигексозы, а в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положения 2 и 3; остальные остатки рамнозы монозамещены в положение 2 или 3.

Далее полисахарид был подвергнут распаду по Смитсу, включающему периодатное окисление, восстановление натрийборгидридом, мягкий гидролиз разбавленной уксусной кислотой и повторное восстановление натрийборгидридом. Продукты распада были разделены на четыре фракции А—Г гелей-хроматографией на геле TSK HW 40 (рис. 2).

По данным  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров, фракция Г представляет собой олигосахарид (I), включающий три остатка рамнозы, остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигексозы и остаток глицерина (табл. 1, 2). Его образование является, таким образом, результатом окисления лежащего в основной цепи остатка рамнозы, монозамещенного в положение 2, с последующим гидролизом гликозидной связи окислившегося моносахарида.

Строение олигосахарида (I) было установлено методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии с использованием ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО) [12].  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр был расшифрован с помощью селективного двойного гомоядерного резонанса (табл. 1). На основании констант спин-спинового взаимодействия vicинальных протонов  $J_{1,2}$  3,8,  $J_{2,3}$  11,  $J_{3,4}$  3,1,  $J_{4,5}$  ~1 Гц было найдено, что остаток аминсахара имеет  $\alpha$ -галакто-конфигурацию и, таким образом, представляет собой 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозу. Затем были определены ЯЭО, возникающие при последовательном предоблучении аномерных протонов. При предоблучении H1 аминсахара (звена E) возникали заметные ЯЭО (7–8%) на H2 и H3 одного из остатков рамнозы (звена D). Этот результат указывает на присоединение 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы в положение 3 и одновременно доказывает, что этот моносахарид имеет противоположную рамнозе абсолютную конфигурацию, т. е. является D-изомером. Действительно, при замещении рамнозы (звена D) в положение 2 сближение протонов H1' и H3, а следовательно, и ЯЭО на H3 невозможны по стерическим причинам, в то время как при замещении звена D в положение 3 такое сближение и ЯЭО допустимы при условии различной абсолютной конфигурации  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связанных пиранозных остатков [13]. Далее, предоблучение H1 звена D вызывало ЯЭО (~8%) на H3 следующего остатка рамнозы (звена A), а предоблучение H1 звена A приводило к ЯЭО (11%) на H3 третьего остатка рамнозы (звена B). И наконец, предоблучение H1 звена B вызывало ЯЭО (~6%) на остатке глицерина (звене C). Таким образом, олигосахарид является линейным и имеет структуру (I).

Структура олигосахарида была подтверждена данными  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра (табл. 2), который был расшифрован с использованием селективного гетероядерного двойного резонанса  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ . Относительно небольшой  $\alpha$ -эффект (~3,5 м.д.) на С1 остатка 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы и относительно большой по модулю  $\beta$ -эффект (~3 м.д.) на С2 гликозидируемого им остатка рамнозы (звена D) характерны для различной абсолютной конфигурации этих пиранозных остатков, связанных между собой  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -гликозидной связью [14], что еще раз подтверждает D-конфигурацию аминсахара.

По данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра (рис. 3), выделенная в результате распада по Смитсу фракция А представляет собой регулярный полисахарид, построенный из пентасахаридных повторяющихся звеньев, включающих четыре остатка рамнозы и один остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалак-

Данные <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра олигосахарид (I)

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
Fuc3NAα (E)	H1	5,44	д	$J_{1,2}$ 3,8
	H2	3,89	дд	$J_{2,3}$ 11
	H3	4,30	дд	$J_{3,4}$ 3,1
	H4	3,79	дд	$J_{4,5}$ ~1
	H5	4,43	дк	$J_{5,6}$ 6,7
	H6 (3H)	1,21	д	
-3Rhaα (D)	H1	5,14	д	$J_{1,2}$ 1,9
	H2	4,28	дд	$J_{2,3}$ ~3,5
	H3	3,94	дд	$J_{3,4}$ ~9,5
	H4	3,63	т	$J_{4,5}$ ~9,5
	H5	3,87-3,98	м	
	H6 (3H)	1,32 *	д	$J_{5,6}$ 6,2
-3Rhaα (A)	H1	5,06	д	$J_{1,2}$ 1,8
	H2	4,20	дд	$J_{2,3}$ 3,3
	H3	3,96	дд	$J_{3,4}$ ~9,5
	H4	3,59	т	$J_{4,5}$ ~9,5
	H5	3,87-3,98	м	
	H6 (3H)	1,33 *	д	$J_{5,6}$ 6,2
-3Rhaα (B)	H1	4,99	д	$J_{1,2}$ 2,0
	H2	4,12	дд	$J_{2,3}$ 3,3
	H3	3,90	дд	$J_{3,4}$ ~9,5
	H4	3,59	т	$J_{4,5}$ ~9,5
	H5	3,87-3,98	м	
	H6 (3H)	1,36 *	д	$J_{5,6}$ 6,4
-2Gro (C)	H2	3,82	м	

\* Отнесение может быть обратным.

Таблица 2

Данные <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров (δ, м. д.) \*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Олигосахарид (I)						
Fuc3NAα (E)	96,8	67,3	52,5	71,8	68,2	16,4
-3Rhaα (D)	103,1	68,4	77,1	71,6	70,3	17,9
-3Rhaα (A)	103,4	71,2	79,6	72,6	70,4	17,9
-3Rhaα (B)	100,5	71,5	79,6	72,6	70,5	18,0
-2Gro (C)	61,6	79,6	62,7			
Полисахарид (II)						
-3Rhaα (A)	103,2	71,2	78,8	72,5	70,4	17,8
-3Rhaα (B)	103,3	71,2	79,5	72,7	70,4	17,9
-3Rhaα (C)	102,8	71,2	79,0	72,8	70,4	18,0
-2,3Rhaα (D)	101,9	76,0	77,2	71,6	70,5	17,8
Fuc3NAα (E)	97,3	67,0	52,4	72,2	68,1	16,4
Полисахарид (III) **						
-3Rhaα (A)	103,1	71,1	79,0	72,5	70,4	17,8
-3Rhaα (B)	102,7	71,1	79,4	72,7	70,4	17,8
-2Rhaα (C)	101,7	79,1	71,1	73,5	70,4	18,0
-2,3Rhaα (D)	101,5	75,6	76,0	71,5	70,4	17,7
Fuc3NAα (E)	96,0	66,8	52,5	71,8	68,0	16,3

\* Сигналы C1—C6 остатка 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы и C1—C4 остатков рамнозы в спектре олигосахарид (I) отнесены с помощью селективного гетероядерного двойного резонанса <sup>13</sup>C(<sup>1</sup>H); в остальных случаях отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,3 м. д., может быть обратным.

\*\* Приведены химические сдвиги сигналов основной серии в спектре исходного O-специфического полисахарида.

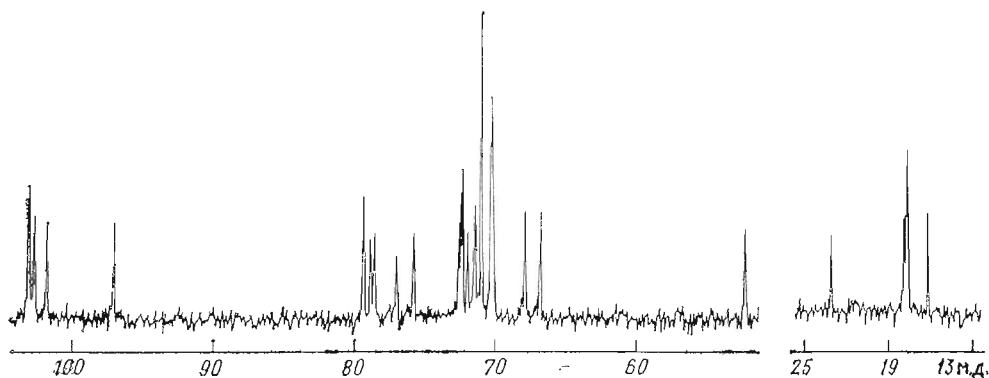


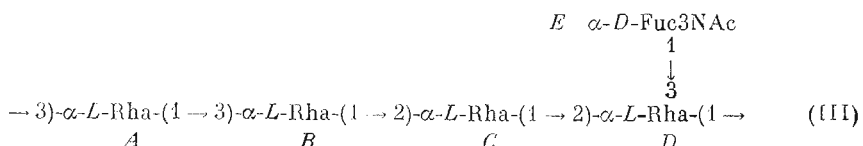
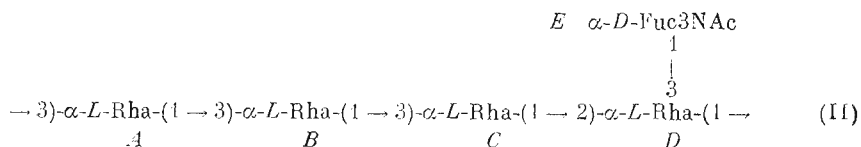
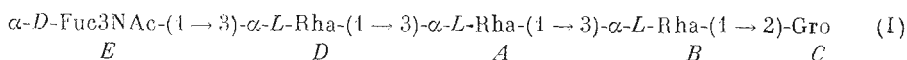
Рис. 3.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида структуры (II)

тозы (присутствуют пять сигналов аномерных атомов углерода в области 97–103 м.д., сигналы пяти метильных групп 6-дезоксисахаров в области 16–18 м.д., одного углеродного атома, связанного с азотом, при 52,4 м.д. и одной N-ацетильной группы при 23,2 ( $\text{CH}_3$ ) и 175,5 ( $\text{CO}$ ) м.д.). Таким образом, этот полисахарид имеет такой же моносахаридный состав, что и полисахарид, образующий основную серию сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре исходного полисахарида, однако некоторые сигналы основной серии, например при 71,8; 73,5; 75,6; 96,0; 101,5 м.д., в спектре этого полисахарида отсутствовали. В то же время в нем присутствовали все сигналы минорной серии спектра исходного полисахарида (при 72,2; 77,2; 78,8; 97,3; 101,9 м.д.). Таким образом, фракция А представляет собой полимер, построенный из не окисляющихся периодатом пентасахаридных звеньев. Присутствующих в исходном полисахариде в меньшем количестве по сравнению с окисляющимися периодатом пентасахаридными звеньями.

Кислотный гидролиз вещества фракции А привел, как и ожидалось, к тем же моносахаридам (рамнозе и 3-амино-3,6-дидезоксигалактозе), которые были обнаружены в гидролизате исходного полисахарида. Анализ методом метилирования привел к идентификации 2,4-ди-О-метилрамнозы и 4-О-метилрамнозы в соотношении  $\sim 3:1$ , а также сполна метилированного производного 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы. Таким образом, полисахарид фракции А является разветвленным, 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактоза представляет собой терминальный моносахарид боковой цепи, в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положении 2 и 3, а остальные остатки рамнозы замещены в положение 3. Эти результаты согласуются с устойчивостью полисахарида к периодатному окислению.

Окончательная структура этого полисахарида была установлена в результате детального анализа его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра. Сильнопольное положение сигнала С1 остатка 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы в этом спектре при 97,3 м.д. отвечает относительно небольшому эффекту ( $\sim 4$  м.д.) от образования им гликозидной связи, что показывает присоединение этого моносахарида к остатку рамнозы в положение 3 и одновременно его *D*-конфигурацию [14] (ср. с приведенными выше данными для олигосахарида (I)). В то же время в спектре полисахарида в отличие от спектра олигосахарида (I) отсутствует сигнал вблизи 68,5 м.д., который мог бы быть отнесен к С2 остатка рамнозы, замещенного остатком 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы. Это может быть объяснено только замещением этого остатка рамнозы в основной цепи в положение 2, что вызывает смещение сигнала С2 за счет  $\alpha$ -эффекта гликозилирования в слабое поле в области 75–80 м.д. Таким образом, остаток 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы присоединяется непосредственно к основной цепи полисахарида в положение 3 дизамещенного остатка рамнозы, и, следовательно, полисахарид фракции А имеет структуру (II). Эта структура находится в соответствии с результатами расшифровки его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спект-

ра (табл. 2), которая была проведена путем сравнения со спектром олигосахарида (I).

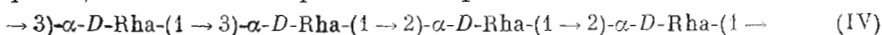


После того как выяснилось, что сигналы минорной серии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра исходного полисахарида отвечают пентасахаридным звеньям структуры (II), стало возможным установить структуру доминирующих в исходном полисахариде пентасахаридных звеньев, дающих при периодатном окислении олигосахарид (I). В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре исходного полисахарида, как и в спектре полисахарида (II), в области 68–69 м.д. отсутствует сигнал С2 остатка рамнозы, замещенного в положение 3 остатком 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы (наличие 1→3-связи между этими моносахаридами следует из структуры олигосахарид (I)). Это свидетельствует о том, что аминоксахар присоединен непосредственно к дизамещенному остатку рамнозы и, следовательно, с учетом структуры олигосахарид (I) основные пентасахаридные звенья исходного полисахарида имеют структуру (III). Эта структура также была подтверждена отсутствием сигналов доминирующей серии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра исходного полисахарида (табл. 2), которое было выполнено путем сравнения со спектрами олигосахарид (I) и полисахарида (II).

Фракции Б и В, выделенные в результате распада по Смитсу (рис. 2), имели, по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров, тот же моносахаридный состав, что и исходный полисахарид. Судя по устойчивости этих фрагментов к периодатному окислению, они включают только остатки рамнозы, замещенные в положение 3 или в положения 2 и 3, что подтверждалось анализом методом метилирования. Их образование является, очевидно, результатом присутствия в исходном полисахариде смешанных участков, включающих как неокисляющиеся периодатом пентасахаридные звенья структуры (II), так и пентасахаридные звенья структуры (III), за счет периодатного окисления которых происходит разрыв цепи исходного полимера.

Результаты распада по Смитсу показывают, что в одну и ту же цепь О-специфического полисахарида *P. holci* 8300 входят пентасахаридные звенья различной структуры, причем присутствуют как довольно длинные участки, построенные из пентасахаридных звеньев одинаковой структуры (им отвечает образование фракций А и Г), так и смешанные участки (им отвечает фракции Б и В). Судя по соотношению интенсивностей сигналов доминирующей и минорной серий в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре исходного полисахарида, количество звеньев структуры (III) в ~2,5 раза превышает количество звеньев структуры (II). Единственным различием между структурами (II) и (III) является неодинаковое замещение одного из четырех остатков рамнозы (в положение 3 или 2 соответственно). Такая необычная для О-специфических полисахаридов нерегулярность обнаружена нами также у штамма *P. syringae*, патовар *syringae* 281 [15], относящегося, как и изученный в настоящей работе штамм, к серогруппе I, причем присутствующие в меньшем количестве звенья в обоих полисахаридах имеют структуру (II), а доминирующие звенья отличаются друг от друга только местом присоединения остатка 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы к основной цепи.

По составу и структуре О-специфического полисахарида штамм *P. holci* 8300 является более обособленным по сравнению с другими штаммами этого вида. Так, основная цепь полисахаридов *P. holci* 90a, 1055a и 8299, относящихся к серогруппам II, IV и VI соответственно, представлена регулярным  $\alpha$ -D-рампаном, имеющим структуру (IV) [1, 6, 7], в то время как у штамма 8300 это  $\alpha$ -L-рамнан, построенный из двух различных типов тетрасахаридных звеньев. Интересно, что доминирующие звенья этого нерегулярного полисахарида имеют такую же структуру, что и повторяющиеся звенья регулярного рамнана (IV), и, таким образом, являются их зеркальным отражением.



Все изученные штаммы *P. holci* отличаются друг от друга природой «ветвящего» заместителя в О-специфических полисахаридах, который представлен 3-ацетамидо-3,6-дидезокси-D-галактозой, D-рамнозой, N-ацетил-D-глюкозаминном или D-фукозой в серогруппах I, II, IV и VI соответственно. Этот «ветвящий» заместитель, очевидно, определяет серологические различия между штаммами, на основании которых было проведено их серогруппирование [5]. При такой внутривидовой серологической гетерогенности штаммы *P. holci* серологически родственны штаммам различных патоваров *P. syringae*, которые попадают в те же серогруппы в классификационной схеме [5] и имеют такие же или очень сходные по структуре О-специфические цепи липополисахаридов [1, 6, 7, 15]. Эти данные дополняют и подтверждают вывод о возможности признать *P. holci* синонимом вида *P. syringae* [3] и свидетельствуют в пользу целесообразности объединения всех штаммов этих видов в составе одного таксона. Они показывают также отсутствие прямой корреляции между серологической специфичностью и структурой О-антигена, с одной стороны, и специализацией по растению-хозяину — с другой.

Авторы благодарят С. С. Мамяна за съемку  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров.

### Экспериментальная часть

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $30^\circ\text{C}$ ; эксперименты по определению ЯЭО проведены как описано в [6].  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $30^\circ\text{C}$  для олигосахарида (I) и  $60^\circ\text{C}$  для полисахаридов; в качестве внутреннего стандарта использовался метанол,  $\delta_{\text{с}}$  50,15 м.д. Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при  $20^\circ\text{C}$ . Растворы лиофилизovali или упаривали в вакууме при  $40^\circ\text{C}$ .

Восходящая хроматография на бумаге FN-13 выполнена в системе бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3 по объему) при обнаружении веществ щелочным раствором нитрата серебра. Гель-хроматография выполнена на колонке (4×53 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, и на колонке (1,7×80 см) с гелем TSK HW 40 в 0,5% уксусной кислоте; элюционные кривые построены по реакции с фенолом и серной кислотой или с использованием дифференциального рефрактометра Кнауер (ФРГ) соответственно. ГЖХ выполнена на приборе Chrom-5 (ЧССР) на колонке (3×120 см) с 3% NPGS на носителе Chromosorb W (60–80 меш), газ-носитель — гелий. ГЖХ-масс-спектрометрия проведена на приборе Varian MAT 311 на капиллярной колонке (25 м) с SE-30, газ-носитель — гелий.

Выращивание бактерий, выделение липополисахарида, получение сыворотки и серологические исследования проводили как описано в работе [8]. Деградация липополисахарида и выделение О-специфического полисахарида выполнены согласно [6], выход полисахарида ~40% от веса липополисахарида,  $[\alpha]_{\text{D}} +8,2^\circ$  (с 1).

Кислотный гидролиз полисахаридов проводили 2 М соляной кислотой, моносахариды превращали в ацетаты полиолов как обычно, в препаративном варианте гидролизат 20 мг О-специфического полисахарида упаривали, остаток упаривали трижды с водой, разделяли препаративной хроматографией на бумаге, зону, соответствующую по подвижности рамнозе, элюировали водой, обрабатывали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ -форма), упаривали, остаток высушивали в вакууме, обрабатывали 1% раствором хлористого водорода в метаноле (2 ч, кипячение), упаривали, получили метил-L-рамнозид (4 мг),  $[\alpha]_{\text{D}} -26^\circ$  (с 0,1), ср. с данными [16] для метил-L-рамнозида, полученного из заведомого образца L-рамнозы,  $[\alpha]_{\text{D}} -32^\circ$  (вода).

Метилирование полисахаридов проводили по методу [17], метилированные полимеры выделяли диализом против дистиллированной воды, расщепляли и превращали в ацетаты полиолов как описано [41]. Данные масс-спектра 1,5-ди-О-ацетил-2,4-дв-О-метил-3-(N-метил)ацетамидо-3,6-дидезоксигалактитола ( $m/z$ , в скобках относительные интенсивности, %): 260 (0,8), 246 (0,6), 228 (1,4), 216 (12), 214 (4), 202 (17), 174 (10), 172 (2), 160 (17), 156 (47), 149 (8), 142 (30), 140 (8), 131 (17), 130 (40), 117 (32), 114 (98), 112 (21), 101 (36), 100 (100), 98 (28), 89 (34), 88 (47), 73 (26), 72 (38).

Распад по Смигу. О-Специфический полисахарид (30 мг) окисляли 0,1 М периодатом натрия (2 мл, 20° С, 2 сут, в темноте), добавили натрийборгидрид (100 мг), через 2 ч подкислили концентрированной уксусной кислотой, деионизировали гель-фильтрацией на колонке с гелем TSK HW 40, лиофилизовали, гидролизовали 1% уксусной кислотой (100° С, 2 ч), лиофилизовали, восстановили натрийборгидридом в воде (15 мг, 20° С, 2 ч), гель-хроматографией на геле TSK HW 40 выделяли фракции А (~7 мг,  $[\alpha]_D -5,3^\circ$  (с 0,2)), Б (~2 мг), В (~2 мг) и Г (~15 мг,  $[\alpha]_D +9,4^\circ$  (с 0,35)).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 166-171.
2. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д., Яковлева Л. М. // Тез. докл. III Всесоюз. конф. по бактериальным болезням растений. Тбилиси: Мецниереба, 1976. С. 45-48.
3. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th Ed. Baltimore: Williams, 1974. 1268 P.
4. Palleroni N. // Bergey's manual of systematic bacteriology. V. 1. / Ed. Holt J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. P. 141-199.
5. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. // Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 4. С. 330-339.
6. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253-1262.
7. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Губанова Н. Я., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 92-99.
8. Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. И. // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 65-70.
9. Seltman G., Beer W. J. // Basic Microbiol. 1985. V. 25. № 8. P. 551-552.
10. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkins Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.
11. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. // Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1-75.
12. Keller R. M., Wüthrich K. // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1-52.
13. Мамян С. С., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Байрамова Н. Э., Николаев А. В., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 205-215.
14. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173-185.
15. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Губанова Н. Я., Яковлева Л. М., Соляник Л. П. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 180-186.
16. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С., Варбанец Л. Д., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1268-1273.
17. Коирад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276-278.

Поступила в редакцию  
25.V.1987

### ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 29. STRUCTURE OF THE POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *PSEUDOMONAS HOLCI* 8300 (SEROGROUP I) LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Y. A., ZDOROVENKO G. M.\*, SHASHKOV A. S.,  
YAKOVLEVA L. M.\*, GUBANOVA N. Y.\*, GVOZDYAK R. I.\*

*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*

The *Pseudomonas holci* 8300 lipopolysaccharide has an O-specific polysaccharide chain, containing L-rhamnose and 3-acetamido-3-deoxy-D-fucose residues in the ratio 4:1. On the basis of methylation, Smith degradation, and <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy data, it was concluded that the polysaccharide is built up of pentasaccharide units of A and B types in the ratio ~2,5:1. In some stretches of the polysaccharide, minor B units form rather long chains, and in the others they alternate with predominant A units.

