



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

mom 15 * № 12 * 1989

УДК 577.114.5.088.53:579.842.14.083.3

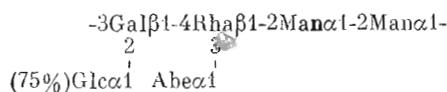
СТРУКТУРА О-АНТИГЕННОГО ПОЛИСАХАРИДА
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *SALMONELLA*
KENTUCKY
ШТАММА 98/39 (O : 8, H : i, Z₆)

*Торгов В. И., Шибаев В. Н., Нігаиков А. С.,
Рожнова С. М.**

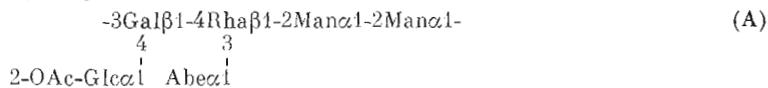
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва;

* Центральный научно-исследовательский Институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения СССР, Москва

Установлено строение О-антагенного полисахарида из грамотрицательной бактерии *Salmonella kentucky*, серогруппа C₃, штамм 98/39 (O : 8, H : i, Z₆). На основании данных спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР нативного полисахарида и полисахарида без остатков арабекозы, а также продуктов их частичного гидролиза и распада по Смиту, в совокупности с данными анализа методом метилирования установлено, что главная цепь полисахарида построена из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, нестехиометрически замещенных остатками глюкозы, причем рамнозил-маннозная связь имеет β -конфигурацию. В отличие от ранее опубликованных данных для *S. kentucky*, штамм I.S.98 (8,20), остаток глюкозы в исследованном полимере присоединен по OH-2 остатка галактозы и O-ацидильные группы отсутствуют.



Бактерии рода *Salmonella* — одна из наиболее хорошо изученных групп микроорганизмов в отношении структуры их О-антигенных полисахаридов. В частности, для полисахарида из *S. kentucky*, представителя серогруппы С₃, Линдбергом и сотрудниками в начале 70-х годов была предложена структура (А) [1]:



Вывод о конфигурации рамнозил-маннозной связи был сделан шведскими исследователями на основании результатов окисления хромовым ангидридом. Однако позднее было показано, что в случае дезоксисахаров этот метод не всегда дает однозначные результаты [2].

В связи с проводимыми в нашей лаборатории исследованиями по синтезу фрагментов и биосинтетических предшественников этого полисахарида [3] нам представлялось необходимым повторное изучение его структуры. Результаты этой работы описаны в настоящем сообщении.

В качестве объекта был использован штамм 98/39 *S. kentucky* (O:8, Н:и, Z₆), полученный из коллекции Всесоюзного института контрольных культур им. А. А. Тарасевича.

Липополисахарид (ЛПС) выделяли из сухих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом по методу Вестфала [4]. Мягкий кислотный гидролиз уксусной кислотой и последующая гель-фильтрация на сепадексе G-50 приводили к О-антителному полисахариду (ПС-І). По данным моносахаридного анализа, ПС-І содержал рамнозу, маниозу, галактозу, глюкозу и арабинозу в примерном соотношении 1:2:1:1:0,8, что

Сокращения: Абе – абеквоза (3,6-дидезокси-D-ксило-гексоза), ИОН – ионообменная хроматография.

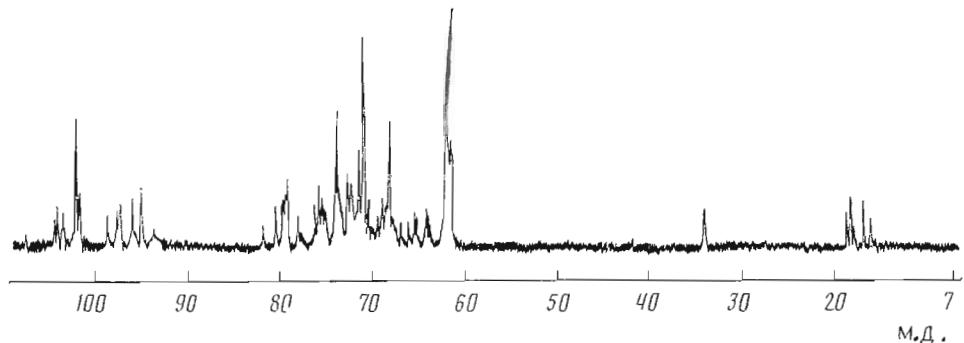


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР нативного О-полисахарида *S. kentucky*

соответствовало литературным данным для ранее исследованного полисахарида [1].

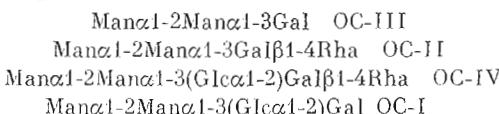
Анализ ПС-І методом метилирования [5] показал наличие терминальных остатков абеквазы и глюкозы, 4-моно- и 3,4-дизамещенных остатков рамнозы, 2-замещенной маннозы, 3-моно- и 2,3-дизамещенных остатков галактозы (табл. 1) и отсутствие 3,4-дизамещенных остатков галактозы. Данные метилирования (см. табл. 1) позволили предполагать нерегулярность исследуемого полимера.

Эта нерегулярность ярко проявлялась в спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 1). В этом спектре в области 22,0 м.д. отсутствуют сигналы О-ацетильных групп, что, как и данные метилирования, указывает на отличие ПС-І от изученного ранее О-антителного полисахарида [1].

Мягкий кислотный гидролиз ПС-І (1% AcOH , 8 ч, 100° С) привел к полисахариду без остатков абеквазы (ПС-ІІ), выделенному с помощью гель-фильтрации на TSK-40(S). Сравнение данных метилирования ПС-І и ПС-ІІ (табл. 1) однозначно указывает на присоединение терминального остатка абеквазы по OH-3 рамнозы. По данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР, ПС-ІІ также был нерегулярным.

Кислотный гидролиз ПС-І в более жестких условиях (0,05 М CF_3COOH , 100° С, 4 ч) привел к деградации полисахарида до олигосахаридов. Из гидролизата с помощью гель-фильтрации на TSK-40(S) была выделена суммарная фракция олигосахаридов. Анализ этой фракции с помощью ИОХ в боратном буфере ($\text{DAx}4$, 70° С, рН 8,5, 0,5 М борат) [7] показал наличие четырех олигосахаридов (ОС-І – ОС-ІV, рис. 2), которые были выделены в индивидуальном состоянии в указанных условиях.

Строение выделенных олигосахаридов (ОС-І – ОС-ІV) было установлено на основании результатов анализа их моносахаридного состава, идентификации концевого моносахаридного остатка путем восстановления олигосахарида NaBH_4 и последующего моносахаридного анализа, а также спектров ^{13}C -ЯМР выделенных фрагментов и продуктов их восстановления (см. табл. 2). При их ЯМР-анализе широко использовалась микрокомпьютерная программа ANMROL [8] и опубликованные данные по эффектам гликозилирования в олиго- и полисахаридах [9].



Простейшим из выделенных соединений является трисахарид ОС-ІІІ, построенный из остатков маннозы и галактозы в соотношении 2 : 1 и со-

Таблица 1
Данные метилирования ПС-І и ПС-ІІ

Ацетаты частично метилированных полиолов	Мольные соотношения (расчетаны по [6])	
	ПС-І	ПС-ІІ
2,4- $\text{Me}_2\text{-Abe-ol}$	+	–
2,3- $\text{Me}_2\text{-Rha-ol}$	0,68	1,07
2,3,4,6- $\text{Me}_2\text{-Glc-ol}$	1,0	0,93
2- $\text{Me}\text{-Rha-ol}$	0,93	–
3,4,6- $\text{Me}_2\text{-Man-ol}$	3,2	2,13
2,4,6- $\text{Me}_2\text{-Gal-ol}$	0,73	{ }= 1
4,6- $\text{Me}_2\text{-Gal-ol}$	1,3	

Таблица 2

Данные спектров ^{13}C -ЯМР олигосахаридов *

Моносахарид	C1	C2	C3	C4	C5	C6
OC-III $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\alpha,\beta$						
Man-II	103,49	71,20	71,49	68,20	74,46	62,40
Man-I	95,88					
	95,60	80,29	71,12	68,07	73,88	62,08
Gal α	93,40	67,90	74,46	66,38	71,49	62,4
β	97,52	71,49	77,78	65,80	76,06	62,15
OC-II $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Rha}\alpha,\beta$						
Man-II	103,24	70,87 ^a	71,02 ^a	67,94	74,21	61,81 ^b
Man-I	95,65	80,02	70,87	67,82	73,67	61,81 ^b
Gal	104,44	71,24 ^a	77,52	65,38	75,85	62,45 ^b
Rha α	94,61	71,70	70,81	82,21	67,82	17,89
β	94,28	72,18	73,67	81,74	71,49	17,89
OC-IV $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Glc}\alpha 1\text{-}2)\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Rha}\alpha,\beta$						
Man-II	103,12	70,60 ^a	71,20	67,75	74,06	61,63 ^d
Man-I	96,00	79,49	71,00 ^a	67,75	73,72	61,63 ^d
Gal	104,20	72,41 ^b	75,13 ^c	64,50	75,29 ^c	61,95 ^d
Glc	97,46	72,00 ^b	73,72	70,60	72,20 ^b	61,95 ^d
Rha α	94,45	72,00	70,60	79,85	68,10	17,91
β	94,10	72,20	73,72	79,15	71,4	17,91
OC-Ia $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Glc}\alpha 1\text{-}2)\text{Gal-ol}$						
Man-II	103,40	71,19	71,45	68,05	74,73	62,29
Man-I	100,88	79,78	71,19	68,05	74,34	62,13
Glc	101,67	72,79	74,17	70,87	73,54	61,70
Gal-ol	62,64	80,47	79,63	70,43	71,10	64,45
OC-IIIa $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Gal-ol}$						
Man-II	102,79	71,10	71,20	67,62	74,42	61,91
Man-I	100,22	79,54	70,73	67,62	73,95	61,69
Gal-ol	63,83	70,73	78,89	70,30	71,95	63,82
OC-IVa $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Glc}\alpha 1\text{-}2)\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Rha-ol}$						
Man-II	103,13	70,91	71,20	68,26	64,48	61,85
Man-I	94,94	79,44	70,77	67,90	73,91	61,79
Gal	103,83	75,72	72,72	64,90	75,61	62,41
Glc	97,82	71,80	73,91	70,77	72,20	61,49
Rha-ol	63,61	72,57	71,36	80,34	69,15	18,61
C-OC-I Abe $\alpha 1\text{-}3(\text{Gal}\beta 1\text{-}4)\text{Rha}\beta 1\text{-}2X$						
Gal	103,90	72,60	74,19	70,05	76,50	62,32
Abe	93,60	64,35	34,30	69,63	67,84	16,50
Rha	100,40	67,10	76,22	79,74	72,47	18,50
X	104,10	77,94	60,81	67,63	76,30	63,00

* Буквами отмечены сигналы, отнесение которых неоднозначно и может быть обратным.

держащий остаток галактозы на восстанавливающем конце. Сопоставление его ^{13}C -ЯМР-спектра со спектром полученного ранее дисахарида $\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}$ [10] однозначно подтверждает структуру OC-III. Особенностью характерным является относительно сильнопольное положение сигнала C1 остатка Man-I (95,9 м.д., сдвиг относительно свободного моносахарида всего +0,6 м.д.), возможное только при такой комбинации межмолекулярных связей.

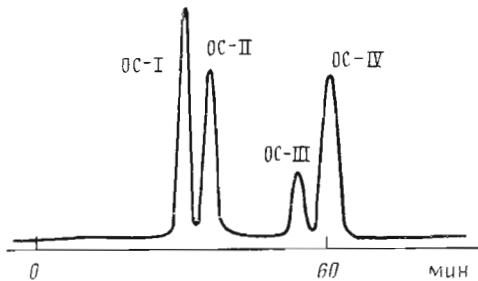


Рис. 2. ИОХ продуктов частичного гидролиза О-полисахарида *S. kentucky* (условия в «Экспер. части»)

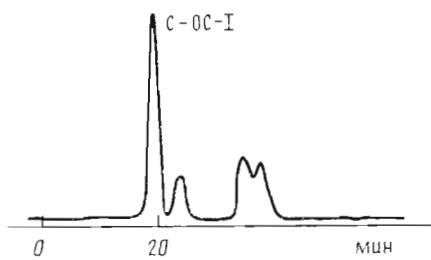


Рис. 3. ИОХ продуктов распада по Смиту О-полисахарида *S. kentucky* (условия в «Экспер. части»)

Фрагмент ОС-II отличается от трисахарида ОС-III присутствием дополнительного остатка рамнозы, находящегося на восстанавливющем конце цепи. Анализ спектра ^{13}C -ЯМР с помощью программы ANMROL однозначно свидетельствует о существовании $\beta\rightarrow 4$ -связи между остатками галактозы и рамнозы и, таким образом, позволяет приписать трисахариду ОС-II указанную структуру.

Пентасахарид ОС-IV содержит все моносахаридные компоненты соединения ОС-II и дополнительный остаток глюкозы; на восстанавливющем конце находится остаток рамнозы. Спектр ^{13}C -ЯМР позволяет сделать однозначный вывод о присутствии $\alpha\rightarrow 2$ -гликозидной связи между остатками глюкозы и галактозы. Особенно характеристическими для идентификации структуры ОС-IV являются положения сигналов C1 остатка глюкозы, присоединенной $\alpha\rightarrow 2$ -связью, при 97,5 м.д. и C4 остатка 2,3-дизамещенной β -галактозы при 64,5 м.д. В модельном производном $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Glc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta\text{-OMe}$ [11] соответствующие сигналы находятся при 97,5 и 64,5 м.д. Спектр модельного разветвленного трисахарида с альтернативным положением глюкозилирования $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Glc}\alpha 1-4)\text{Gal}\beta\text{-OMe}$ [12] содержит сигнал C1 остатка глюкозы при 101,2 м.д., а сигнал C4 остатка галактозы — при 73,8 м.д.; существенно, что в последнем случае в спектре отсутствуют сигналы между 67,5 и 62 м.д.

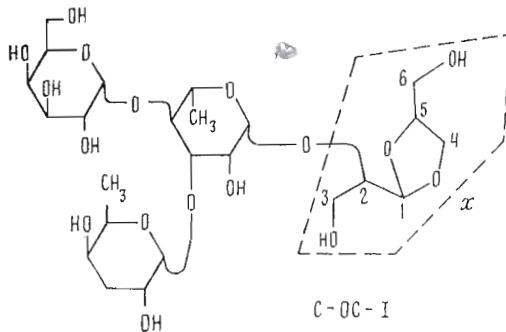
Фрагмент ОС-I, по данным моносахаридного состава и результатам концевого анализа, соответствует глюкозилированному производному ОС-III. В этом случае однозначная интерпретация спектра ^{13}C -ЯМР не представляется возможной, что связано со значительным содержанием фурапозных форм остатка дизамещенной галактозы в рассматриваемом трисахариде. Однако подобных затруднений не наблюдалось в случае ОС-III и синтезированного ранее [3, 13] разветвленного трисахарида, содержащего 3,4-дизамещенный остаток галактозы. Естественно, что образование фурапозных форм возможно только при свободном OH-4 остатка галактозы, т. е. в случае 2,3-дизамещенного производного. 2,3-Дизамещение однозначно вытекает далее из сравнения спектров ^{13}C -ЯМР олигосахарид-полиолов, полученных восстановлением ОС-III (ОС-III α) и ОС-I (ОС-I α). В первом из них значительное смещение (по сравнению со спектром незамещенного дульциита) претерпевают лишь сигналы C2 и C3 (при альтернативной интерпретации C4 и C5) остатка дульциита, во втором — сигналы C1, C2 и C3 (или C4, C5 и C6). Следовательно, фрагменту ОС-I можно приписать указанную структуру.

Таким образом, исследование продуктов частичного гидролиза указывает на то, что основная цепь ПС-І построена из трисахаридных повторяющихся звеньев $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Rha}$, к которым присоединены боковые остатки α -глюкозы по OH-2 остатка галактозы в нестехиометрическом соотношении.

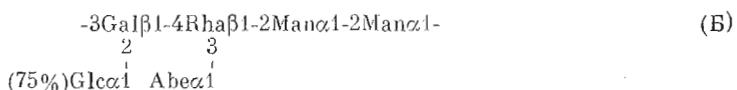
Для выяснения конфигурации рамнозил-маннозной связи ПС-І был подвергнут распаду по Смиту [14], и с помощью гель-фильтрации из продуктов распада была выделена олигосахаридная фракция, содержащая смесь три-, тетра- и пентасахаридов (С-ОС). Анализ олигосахаридов С-ОС с помощью ИОХ в боратном буфере (рис. 3, условия разделения анало-

гичны разделению ОС-I – ОС-III) показал наличие основного продукта (C-ОС-I), который, по данным моносахаридного анализа, являлся трисахаридом (Gal – Rha – Abe, 1 : 1 : 1). Однако восстановление C-ОС-I NaBH₄ и последующий моносахаридный анализ не позволили идентифицировать терминальный моносахарид на восстанавливающем конце, так как хроматографическая подвижность и моносахаридный состав C-ОС-I не изменились после его восстановления NaBH₄.

В спектре ¹³C-ЯМР C-ОС-1 (табл. 2) помимо 18 сигналов трех моносахаридных остатков (абеквозы, рамнозы и галактозы) дополнительно присутствовали сигналы шестиуглеродного фрагмента X, содержащего две CH₂OH-группы. Этот фрагмент мог образоваться из окисленного 2-замещенного остатка маннозы в результате внутримолекулярной переацетализации при мягком кислотном гидролизе, следующем за распадом по Смиту. Образование аналогичных продуктов переацетализации при распаде по Смиту наблюдалось ранее [15]. С помощью двойного гетероядерного резонанса было показано, что в ¹³C-ЯМР-спектре C-ОС-I сигнал при 104,1 м.д. (¹J_{c,n} 172 Гц) относится к C4 шестиуглеродного фрагмента X (¹H-ЯМР, 5,13 м.д., J_{1,2} 3,75 Гц) сигнал при 103,9 м.д. (¹J_{c,n} 162,8 Гц) – к C1 остатка β-галактозы (¹H-ЯМР, 4,70 м.д. J_{1,2} 8 Гц), сигнал при 100,4 м.д. (¹J_{c,n} 160,9 Гц) – к остатку β-рамнозы (¹H-ЯМР, 4,87 м.д., J_{1,2} < 1 Гц), сигнал при 93,6 м.д. (¹J_{c,n} 168,3 Гц) – к остатку α-абеквозы (¹H-ЯМР, 5,13 м.д., J_{1,2} 3,75 Гц). Наличие сигнала при 34,3 м.д. дополнительно подтверждает α-конфигурацию остатка абеквозы. При проведении ЯЭО экспериментов показано, что при предоблучении сигнала H1 остатка β-галактозы наблюдается изменение интенсивности сигнала H4 рамнозы, при предоблучении H1 α-абеквозы – сигнала H3 рамнозы. На основании этих данных выделенному соединению можно приписать следующее строение:



Таким образом, из суммирования полученных результатов видно, что ПС-І имеет тетрасахаридный скелет с $\beta 1 \rightarrow 2$ -рамнозил-маннозной связью, к которому присоединены остатки α-абеквозы и α-глюкозы в нестехиометрическом соотношении, т. е. его структура может быть выражена формулой (Б):



Нестехиометричность абеквозилирования в ПС-І, по-видимому, вызвана частичной потерей остатков 3,6-дидезоксисахаров при отщеплении ПС-І от лицида с помощью мягкого кислотного гидролиза.

Структура (Б) отличается от структуры (А), предложенной шведскими исследователями для аналогичного полимера из другого штамма *S. kentucky* [1], отсутствием О-ацетильных групп и присоединением остатка глюкозы по OH-2, а не по OH-4 остатка галактозы. Эта разница связана, по-видимому, с межштаммовым различием микроорганизмов, так как надежность идентификации ацетатов частично метилированных полиолов методом хроматомасс-спектрометрии в работе [1] не вызывает сомнений.

Таблица 3

Отнесение сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектрах нативного (ПС-I)
дезабеквализированного (ПС-II) полисахаридов *S. kentucky*

Хим. сдвиги (δ) для		Интерпретация		Наличие	
ПС-I	ПС-II	остаток	атом	Glc	Abe
105,07	105,01	Gal	C1	—	—
104,76	104,70	Gal	C1	+	—
104,40	—	Gal	C1	+	+
102,76	102,66	Man-II	C1	±	±
		Rha	C4	±	—
102,37	—	Rha	C4	±	+
99,19	—	Abe, Glc	C1?	+	+
98,17	98,12	Glc	C1	+	—
97,98	—	Glc, Abe	C1?	+	+
96,63	96,56	Man-I	C1	—	+
95,69	95,69	Man-I	C1	+	±
94,32	—	Abe	C1?	—	+
82,60	82,50	Rha	C4	—	—
81,16	—	Rha	C4	—	+
80,30—	80,29	Man-I, Man-II	C2	±	±
79,5	80,16	Rha	C4	+	—
мультиплет	79,94	Rha	C3(?)	±	+
	79,65				
78,67	78,42	Gal	C3	—	±
77,04	—	Rha	C3 или C4	±	+
76,46	—	Gal	C5	±	±
76,28	76,28	Gal	C5	±	±
75,96	75,90	Gal	C3	+	±
75,62	—	Gal	C3	+	±
74,71	74,64	Man-I, Man-II	C5	±	±
74,32	74,51	Rha, Glc	C3	±	—
74,45	—	—	—	—	—
73,41	73,51	Glc	C5	+	±
73,12	73,11	Glc	C2	+	±
72,88	72,83	Gal	C2	+	±
		Rha	C2	—	—
72,25	72,16	Man-I, Man-II	C3	±	±
71,55	71,49	Rha	C2 и C5	±	—
70,97	—	Gal	C2	—	±
		Glc	C4	+	—
69,51	—	—	—	—	—
69,41	—	Abe	C4	±	+
68,86	68,82	Man-II, Man-I	C4	±	±
68,53	68,46	—	—	—	—
68,24	—	Abe	C5	±	+
68,11	—	—	—	—	—
67,24	—	Rha	C2	±	+
66,27	66,18	Gal	C4	—	±
65,62	—	Gal	C4	+	+
65,48	65,44	Gal	C4	+	—
64,55	—	—	—	—	—
64,36	—	Abe	C2	±	+
62,45	62,40	Gal	C6	±	±
62,22	62,31	Man-I	C6	±	±
62,12	62,07	Man-II	C6	±	±
34,56	—	Abe	C3	±	+
19,00	18,61	—	—	—	—
18,65	18,35	Rha	C6	±	±
17,45	—	—	—	—	—
16,49	—	Abe	C6	±	+

Предполагаемая структура полисахарида находит однозначное подтверждение при тщательном анализе спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов ПС-І и ПС-ІІ (см. рис. 4 и табл. 3).

Рассмотрение спектра ПС-ІІ показывает, что этот препарат является полимером, включающим фрагменты ОС-ІІ и ОС-ІV в соотношении приблизительно 1 : 3. В его спектре присутствует ряд сигналов, характерных для этих фрагментов (систематическое смещение в сторону слабого поля по сравнению со спектрами олигосахаридов на 0,5–0,8 м.д.), причем для некоторых сигналов наблюдается «раздвоение», связанное с небольшими различиями химических сдвигов, которые можно видеть для ОС-ІІ и ОС-ІV (см. табл. 2). К числу легко идентифицируемых относятся сигналы С1, С2 и С5 остатка α -глюкозы (98,1; 73,1 и 73,5 м.д.); «раздвоенные» сигналы атомов остатков β -галактозы (С1: 105,0 и 104,7 м.д.; С4: 66,2 и 65,4 м.д.), α -маннозы-І (С1: 96,6 и 95,7 м.д.) и рамнозы (С6: 18,6 и 18,3 м.д.). Присутствие в полимере неглюкозилированных тетрасахаридных звеньев подтверждается также характерными для них сигналами С3 остатка галактозы (78,4 м.д.) и С4 остатка β -рамнозы (82,5 м.д.). Соответствующие сигналы для глюкозилированных звеньев трудно однозначно идентифицировать из-за близости других сигналов.

Существенное различие спектров ПС-ІІ и упомянутых олигосахаридных фрагментов состоит в присутствии в спектре полимера сигнала двойной интенсивности при 102,7 м.д. вместо сигналов, характерных для С4 остатков рамнозы и маннозы-ІІ. Идентификация этого сигнала подтверждается данными $J_{\text{с.н}}$, которые соответствуют С4 α - и β -моносахарида [16]. Этот факт позволяет сделать вывод о наличии $\beta 1 \rightarrow 2$ -гликозидной связи между остатками рамнозы и маннозы-ІІ в ПС-ІІ. Расчет из данных спектра ОС-ІІ и эффектов гликозилирования, приведенных в работе [9], показывает, что в этом случае разность химических сдвигов сигналов С4 рамнозы и маннозы-ІІ составляет +0,7 м.д., т. е. лежит в пределах точности расчета, в то время как при других мыслимых вариантах она выходит за эти пределы, составляя –1,9 м.д. для $\alpha 1 \rightarrow 2$ -связи, от –1,3 до –1,6 м.д. при $\alpha 1 \rightarrow 4$ -, $\beta 1 \rightarrow 3$ - и $\beta 1 \rightarrow 4$ -связях и –6,2 м.д. для $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связи. Положение сигналов С2 остатка рамнозы и С2 и С3 остатка маннозы-ІІ в спектре ПС-ІІ соответствует присыпываемому типу связи между олигосахаридными звеньями, хотя их точная идентификация в спектре затруднена.

Из сопоставления спектров ПС-І и ПС-ІІ следует, что первый полимер отличается от второго присутствием остатков абеквозы, присоединенных $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связью к остатку рамнозы. Наиболее существенные для этого вывода сигналы легко идентифицируются в сильнопольной области спектра. Почти все сигналы, относящиеся к остатку абеквозы, являются «раздвоенным» — очевидно, за счет частичной модификации остатка галактозы глюкозилированием. При использовании спектра производного модельного дисахарида Abe α 1-3Rha β -R [17] не вызывает затруднений идентификация в спектре ПС-І сигналов остатка α -абеквозы, относящихся к С6 (16,5 и 17,1 м.д.), С3 (34,6 м.д.), С5 (68,1 и 68,2 м.д.) и С4 (69,4 и 69,5 м.д.). В спектре ПС-ІІ все эти сигналы отсутствуют. Сильнопольное положение сигналов С1 остатка абеквозы (94,3 м.д.) и С2 остатка рамнозы в спектре ПС-І определенно указывает на присоединение остатка α -абеквозы по OH-3 моносахарида с L-манно-конфигурацией (см. [18]).

Таким образом, имеющиеся данные по связи структуры олигосахаридов и спектров ^{13}C -ЯМР позволяют подтвердить структуру Б этого полисахарида.

Экспериментальная часть

^{13}C -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker АМ-300 (ФРГ) в D_2O при 30°С для олигосахаридов и 60°С для полисахаридов с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола, δ 50,15 м.д. Анализ моносахаридов и выделение олигосахаридов ИОХ проводили как описано в работе [7]. Бактериальную массу выращивали так, как описано в работе [19]. Анализ методом метилирования осуществляли аналогично методике [5].

Выделение ПС-I. 30 г сухих измельченных клеток *S. kentucky* (O: 8, II: i, Z₆), штамм ГИСК 98/39, перемешивали 20 мин с 500 мл воды и 500 мл 90% водного фенола при 60–75° С, охлаждали, центрифугировали при 2000г, водный слой объединяли, диализовали 2 сут против проточной водопроводной воды, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном, осадок отделяли, раствор упаривали до 200 мл, диализовали против дистиллированной воды, люофильизовали, получали линополисахарид (2 г, 6,6%).

Липополисахарид (1 г) в растворе 1% уксусной кислоты (100 мл) нагревали на кипящей водяной бане до выпадения осадка липида А (1 ч), раствор охлаждали, центрифугировали, супернатант упаривали до объема 15 мл, гель-фильтрацией на сепадексе G-50 выделяли О-специфический полисахарид (500 мг).

Выделение ПС-II. Раствор 200 мг ПС-I в 20 мл 1% уксусной кислоты нагревали на водяной бане 8 ч, нейтрализовали триэтиламином, упаривали до объема 1 мл, гель-фильтрацией на TSK-40(S) выделяли 100 мг дезабеквонилированного полисахарида ПС-II.

Частичный кислотный гидролиз ПС-I. Раствор 200 мг ПС-I в 50 мл 0,05 М трифтормукосной кислоты нагревали на водяной бане 4 ч, охлаждали, нейтрализовали триэтиламином, упаривали до объема 1 мл, суммарную олигосахаридную фракцию выделяли с помощью гель-фильтрации на TSK-40(S).

ИОХ олигосахаридной фракции на смоле DAX-1 в боратном буфере [7] привела после удаления солей к ОС-I (R_t 30 мин, 4 мг), ОС-II (R_t 35 мин, 6 мг), ОС-III (R_t 50 мин, 5 мг) и ОС-IV (R_t 60 мин, 9 мг).

Восстановление олигосахаридов. К раствору 1–5 мг олигосахарида в 1 мл воды прибавляли порциями 2×5 мг NaBH₄ в течение 3 ч, оставляли на 18 ч при 20° С, нейтрализовали уксусной кислотой. Олигосахарид-полиол выделяли гель-фильтрацией на TSK-40(S).

Распад по Смиту. Полисахарид ПС-I (100 мг) растворяли в 0,1 М растворе периодаата патрия (5 мл), выдерживали 48 ч при 20° С в темноте, прибавляли 0,1 мл этиленгликоля и через 20 мин избыток NaBH₄, выдерживали 2 ч при 20° С, нейтрализовали концентрированной уксусной кислотой, гель-хроматографией на TSK-40(S) выделяли полимерную фракцию, которую гидролизовали 0,5 М HCl 48 ч при 20° С, нейтрализовали триэтиламином, упаривали до объема 1 мл, олигосахаридную фракцию выделяли гель-фильтрацией на TSK-40(S). С помощью ИОХ в боратном буфере и последующего обессоливания выделен олигосахарид С-ОС-I (R_t 20 мин, 3 мг).

Авторы выражают глубокую благодарность Ю. А. Книрелю и Г. М. Липкинду (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва) за полезное обсуждение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hellqvist C.-G., Hoffman J., Lindberg A., Lindberg B., Svensson S. // Acta chem. scand. 1972. V. 26. № 8. P. 3282–3286.
2. Laine R. A., Renkonen O. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. P. 102–106.
3. Torgov V. I., Panossian C. A., Shibaev V. N. // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 1. P. 97–112.
4. Вестфаль О., Янн К. // Методы химии углеводов/Ред. Kochetkov Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
5. Jansson P. E., Kenne L., Lindgren H., Lindberg B., Lönnqvist J. A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. Univ. Stockholm, Chem. Communis. 1976. № 8. P. 1–59.
6. Sweet D. P., Shapiro R. H., Albersheim P. // Carbohydr. Res. 1975. V. 40. № 2. P. 217–225.
7. Jann K., Pillat M., Weisgerber C., Shibaev V. N., Torgov V. I. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 151. № 2. P. 393–397.
8. Шибаев В. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 926–937.
9. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59–75.
10. Торгов В. И., Паносян К. А., Смелянский А. Т., Шибаев В. Н. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 83–90.

11. Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибаев В. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1224–1233.
 12. Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибаев В. Н., Мамян С. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 359–370.
 13. Kochetkov N. K., Torgov V. I., Malyshova N. N., Shashkov A. S., Klimov E. M. // Tetrahedron. 1980. V. 36. № 9. P. 1227–1230.
 14. Гольдштейн И. Дж., Хэй Г. В., Льюис Б. А., Смит Ф. // Методы химии углеводов/ Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 471–478.
 15. Gorin P. A. G., Spenser J. F. T. // Can. J. Chem. 1965. V. 43. № 11. P. 2978–2984.
 16. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437–497.
 17. Черняк А. Я., Демидов И. В., Карманова И. Б., Черняк Н. В., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 111–122.
 18. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26. № 9. P. 735–747.
 19. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Н., Дружинина Т. Н., Калинчук Н. А., Кочетков Н. К., Кильеско В. А., Рожнова С. Ш. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 1. С. 47–56.

Поступила в редакцию
29.V.1989

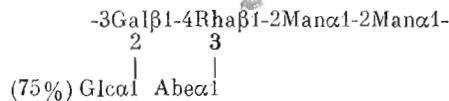
THE STRUCTURE OF THE O-ANTIGENIC POLYSACCHARIDE
OF GRAMNEGATIVE BACTERIA *SALMONELLA KENTUCKY*
STRAIN 98/39 (O : 8, H : i, Z₆)

TORGOV V. I., SHIBAEV V. N., SHASHKOV A. S., ROZHNOVA S. Sh.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

** Central Research Institute of Epidemiology, Ministry of Health
of the USSR, Moscow*

The computerized calculation of the ^{13}C NMR spectra of polysaccharide and oligosaccharides (ANMROL), together with chemical analysis (methylation and Smith degradation) showed that the polysaccharide has the following structure:



which differs from the previous data published for *Salmonella kentucky* strain I. S. 98 (8.20).