



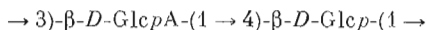
УДК 579.87.222'144.5 : 632.35
© 1991 г.

Н. А. Бочарова, Л. Д. Варбанец*, А. С. Шапков,
В. А. Мурач*, Ю. А. Бнирель

СТРУКТУРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДА *CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM* 7762, ОБЛАДАЮЩЕГО ФИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;
*Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР, Киев

Кислый внеклеточный полисахарид *Corynebacterium sepedonicum* 7762, выделенный ионообменной хроматографией на геле DEAE-TSK 650, содержит равное количество *D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты. Согласно данным метилирования, периодатного окисления и анализа ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, повторяющееся звено полисахарида имеет следующее строение:



Полисахарид обладает фитотоксической активностью, выявленной в тестах на томатах и баклажанах.

Некоторые фитопатогенные коринебактерии продуцируют вещества, ответственные за увядание растений [1—3], в том числе внеклеточные полисахариды, препятствующие включению защитных реакций растений, т. е. являющиеся фитотоксинами. Имеется очень мало данных о полисахаридах коринебактерий, которые могли бы быть использованы для выяснения взаимосвязи между их структурой и функциями. В настоящем сообщении мы описываем структурное исследование биологически активного внеклеточного полисахарида *Corynebacterium sepedonicum* 7762.

Полисахарид выделен из культуральной жидкости с помощью ионообменной хроматографии на геле DEAE-TSK 650 М при использовании ступенчатого градиента концентрации натрий-дигидрофосфатного буфера. Были получены один нейтральный полисахарид (ПС-I) и два кислых полисахарида (ПС-II и ПС-III), которые испытывали на фитотоксическую активность в тестах на томатах и баклажанах (табл. 1). ПС-I был неактивен, кислые ПС-II и ПС-III обладали фитотоксической активностью.

Один из кислых полисахаридов (ПС-III), имеющий удельное оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} -9,2^\circ$ (*c* 1), стал предметом настоящего исследования.

В ^1H -ЯМР-спектре ПС-III присутствовали сигналы двух аномерных протонов при 4,53 и 4,78 м. д. (дублеты, $J_{1,2}$ 8,5 и 8,0 Гц соответственно) и остальных протонов в области 3,39—3,86 м. д. (табл. 2).

^{13}C -ЯМР-спектр ПС-III (рисунки) содержал сигналы двух аномерных атомов углерода при 103,2 и 103,3 м. д., одной гидроксиметильной группы при 61,3 м. д., одной карбоксильной группы при 175,6 м. д. и восьми других углеродных атомов в области 71,2—84,4 м. д. (табл. 3). Из этих данных следует, что полисахарид регулярен и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих, по-видимому, одну гексозу и одну гексуруновую кислоту.

^1H -ЯМР-спектр ПС-III был полностью расшифрован с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 2). Относительно большие константы спин-спинового взаимодействия vicинальных протонов H1 — H5 указывали на то [5], что остаток уроновой кислоты находится в пиранозной форме и имеет β -глюко-конфигурацию. Для второго моносахаридного остатка из-за совпадения положения сигналов H3 — H5

Таблица 1

Фитотоксические свойства гликополимеров *C. sepedonicum* 7762 в тестах на томатах и баклажанах *

Препараты	Томаты	Баклажаны
ПС-I	—	—
ПС-II	2	1
ПС-III	2	—

* Фитотоксичность оценена по 4-балльной системе. Тире означает отсутствие фитотоксичности.

Таблица 2

Данные ¹H-ЯМР-спектра ПС-III *C. sepedonicum* 7762

Параметр	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
β -D-Глюкопираноза							
δ , м. д.	4,78	3,39	3,57-3,70	3,57-3,70	3,57-3,70	3,86	3,79
Мультиплетность	д	т	м	м	м	дд	дд
КССВ, Гц	$J_{1,2}$ 8	$J_{2,3}$ ~8			$J_{5,6}$ 2	$J_{6,6'}$ 12,5	$J_{5,6'}$ 4,5
β -D-Глюкуроновая кислота							
δ , м. д.	4,53	3,56	3,79	3,59	3,77		
Мультиплетность	д	дд	т	т	д		
КССВ, Гц	$J_{1,2}$ 8,5	$J_{2,3}$ ~9	$J_{3,4}$ ~10	$J_{4,5}$ ~10			

Таблица 3

Данные ¹³C-ЯМР-спектров ПС-III *C. sepedonicum* 7762 (δ , м. д.)
→ 3)- β -D-Glc pA-(1 → 4)- β -D-Glc p-(1 →

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
---------	----	----	----	----	----	----

Экспериментальный спектр

→ 4) Glc β	103,3	74,4	75,3	80,0	76,6	61,3
→ 3) GlcA β	103,2	74,2	84,4	71,2	75,9	175,6

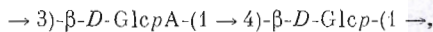
Расчетный [4] спектр

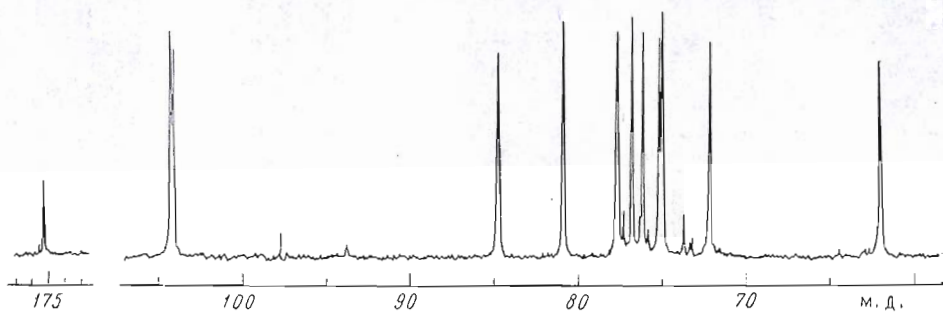
→ 4) Glc β	103,8	74,4	75,6	79,9	75,9	61,3
→ 3) GlcA β	103,6	73,4	85,0	70,8	75,7	—

были найдены только константы взаимодействия $J_{1,2}$ и $J_{2,3}$, равные ~8,0 Гц, свидетельствующие, что это остаток β -глюкопиранозы или β -галактопиранозы.

ПС-III был подвергнут полному кислотному гидролизу и в гидролизате с помощью углеводного анализатора идентифицированы глюкоза и глюкуроновая кислота в соотношении 1 : 1. D-Конфигурация глюкозы следовала из результатов ее окисления D-глюкозооксидазой.

Для структурного анализа ПС-III был применен расчетный метод [4], основанный на сопоставлении ¹³C-ЯМР-спектров, рассчитанных для всех возможных линейных структур полисахарида данного моносахаридного состава, с экспериментальным спектром. В результате была найдена структура (I)





^{13}C -ЯМР-спектр ПС-III *C. sepedonicum*

дающая наименьшую сумму квадратичных отклонений химических сдвигов сигналов расчетного и экспериментального спектров (1,1 в расчете на один моносахаридный остаток). Отнесение сигналов в экспериментальном ^{13}C -ЯМР-спектре, сделанное на основании расчета, а также химические сдвиги расчетного спектра приведены в табл. 2.

Все другие возможные структуры ПС-III, включая структуры, построенные из остатков *D*-глюкозы и *L*-глюкуроновой кислоты, давали значительно большее отклонение (>3) и, таким образом, не удовлетворяли экспериментальному спектру.

Структура ПС-III подтверждена результатами анализа химическими методами.

После периодатного окисления ПС-III обнаружена только глюкуроновая кислота, что согласуется с замещением окисляющегося остатка глюкозы в положение 4 и остатка глюкуроновой кислоты в положение 3.

При метилировании ПС-III с последующим гидролизом и превращением частично метилированных сахаров в ацетаты полиолов идентифицирован 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метилсорбит, полученный из остатка глюкозы. Для подтверждения характера замещения остатка глюкуроновой кислоты метилированный полисахарид перед гидролизом восстановлен по карбоксильным группам. При этом в смеси ацетатов частично метилированных полиолов наряду с идентифицированным ранее производным глюкозы обнаружен 1,3,5,6-тетра-*O*-ацетил-2,4-ди-*O*-метилсорбит, полученный из восстановленного остатка уроновой кислоты. Эти данные свидетельствуют о линейном характере ПС-III и замещении остатка глюкозы в положение 4 и остатка глюкуроновой кислоты в положение 3.

В заключение отметим, что ПС-III довольно легко подвергается автогидролизу по β -глюкопиранозной связи. Это обнаружено при съёмке ЯМР-спектров при повышенной температуре, в ходе которой происходило появление сигналов восстанавливающего остатка глюкопиранозы ($\text{H}1\alpha$, и $\text{H}1\beta$ при 5,17 м. д. (дублет, $J_{1,2}$ 4,0 Гц) и 4,61 м. д. (дублет, $J_{1,2}$ 8,0 Гц), $\text{C}1\alpha$ и $\text{C}1\beta$ при 93,7 и 97,7 м. д. соответственно).

Таким образом, согласно приведенным данным, кислый внеклеточный полисахарид *C. sepedonicum* 7762, обладающий фитотоксической активностью, имеет структуру (I), как и типоспецифический полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, тип 3 [6], с установления строения которого в 1941 г. началась химия бактериальных полисахаридов.

Экспериментальная часть

^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРТ) в D_2O при 30 и 60° С соответственно с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δ_c 50,15 м. д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре Jasco DIP-360 в воде при 20° С. ГЖХ-масс-спектрометрия частично метилированных ацетатов полиолов проведена на приборе Varian MAT-311 на капиллярной колонке с SE-30 (газ-носитель — гелий). Для анализа моносахаридов использовали углеводный анализатор Biotronic, как описано в работе [7].

Бактериальная культура *C. sepedonicum* 7762 получена из коллекции фитопатогенных бактерий ИМВ АН УССР.

Культуру выращивали в течение 6 сут при 28° С на качалках (240 об/мин) на синтетической среде N [8].

Внеклеточные полисахариды получали после отделения клеток от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 об/мин. Супернатант концентрировали под вакуумом, лиофильно высушивали. Очистку полисахаридного материала (600 мг) осуществляли ионообменной хроматографией на колонке (2,0 × 90,0 см) с гелем DEAE-TSK 650 M. Фракции по 180 мл, элюируемые 0,01; 0,25 и 0,50 M NaH_2PO_4 -буфером, pH 6,0, соответствовали нейтральному ПС-I и двум кислым — ПС-II и ПС-III; выходы 25, 50 и 135 мг соответственно.

Гидролиз ПС-III проводили 2 M CF_3COOH (121° С, 2 ч). Гидролизат упаривали, остаток перед анализом упаривали несколько раз с водой.

Периодатное окисление ПС-III осуществляли 0,1 M периодатом натрия (1 мл, 20° С, 48 ч, в темноте), добавляли боргидрид натрия (20 мг), через 2 ч подкисляли CH_3COOH , диализовали и лиофилизовали.

Метилирование ПС-III. Водный раствор ПС-III (2 мг) обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+ -форма) и лиофилизовали. Остаток, высушенный над P_2O_5 в вакууме при 60° С, метилировали по методу [9]. Метилированный полисахарид выделяли с использованием патрона Sep-Pak C_{18} [10]. Часть продукта гидролизовали 2 M CF_3COOH (121° С, 1 ч) и превращали в ацетаты полиолов, как обычно. Другую часть метилированного полисахарида восстанавливали избытком LiBH_4 в 70% 2-пропанол (1 мл, 2 ч), раствор подкисляли CH_3COOH , упаривали с метанолом и анализировали, как описано выше.

Фитотоксичность. Влияние полисахарида на томаты и баклажаны исследовали в теплице путем введения стерильным шприцем полисахаридов в паренхиму, жилку листа и стебель 3-недельного растения. Повторность опытов 5-кратная. Концентрация вводимых веществ составляла 1—5 мг/мл. Результаты учитывали через 3—4 ч, 1 и 2 сут и оценивали по 4-балльной шкале, принимая за 4 балла полное увядание растения.

Авторы благодарят С. Н. Сепченкову за проведение углеводного анализа и Е. В. Виноградова за расчет ^{13}C -ЯМР-спектра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorin P., Spencer J. // Carbohydr. Res. 1980. V. 79. № 2. P. 313—315.
2. Rai R., Strobel G. // Phytopathology. 1969. V. 59. № 1. P. 53—57.
3. Straley C., Straley M., Strobel G. // Phytopathology. 1974. V. 64. № 2. P. 194—196.
4. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
5. Altona C., Haasnoot C. A. G. // Org. Mag. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
6. Reeves R. E., Goebel W. F. // J. Biol. Chem. 1941. V. 139. P. 511—519.
7. Knirel Y. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. № 1. P. 145—155.
8. Vidaver A. // Appl. Microbiol. 1967. V. 15. № 6. P. 1523—1524.
9. Конрад Г. Е. Методы исследования углеводов. М.: Мир, 1975. С. 276—278.
10. Mort A. J., Parker S., Mao-Sung-Kuo // Anal. Biochem. 1983. V. 133. № 2. P. 380—384.

Поступила в редакцию
18.IV.1990

N. A. KOCHAROVA, L. D. VARBANETZ*, A. S. SHASHKOV,

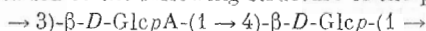
V. A. MURAS*, Yu. A. KNIREL

THE STRUCTURE OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE OF *CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM* 7762 POSSESSING PHYTOTOXIC ACTIVITY

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 acidic extracellular polysaccharide from the *Corynebacterium sepedonicum* strain 7762, isolated by ion-exchange chromatography on DEAE-TSK 650 M gel, contains equal amounts of D-glucose and D-glucuronic acid. Results of the periodate oxidation and ^1H and ^{13}C NMR analysis data led to the following structure of the polysaccharide:



The polysaccharide was characterised by phytotoxic activity in the tomato and eggplants tests.