



УДК 547.427.2'455.623'118+543.422.23

СТРУКТУРА РИБИТТЕЙХОЕВОЙ КИСЛОТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ  
*STREPTOMYCES AZUREUS* RIA 1009*Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Романов В. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова**Шапков А. С.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Исследована структура тейхоевой кислоты продуцента триострептона *Streptomyces azureus* RIA 1009. Полимер локализован в клеточной стенке и составляет около 20% ее сухого веса. Цепь тейхоевой кислоты состоит из 6–8 рибитфосфатных единиц, часть которых несет по C4(C2) β-D-глюкопиранозильный заместитель. К полимеру эфирной связью присоединены уксусная кислота и L-лизин.

В предыдущем сообщении [1] мы указывали, что *Streptomyces azureus* RIA 1009 содержит тейхоевую кислоту 1,5-поли(рибитфосфатной) природы. Локализация фосфоэфирной связи и положение β-глюкозильного заместителя было установлено <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопическим исследованием.

Цель настоящей работы — установление места расположения полимера в клетке, природы соединений, входящих в тейхоевую кислоту в минорных количествах, и типа их связи с основной цепью, а также длины цепи тейхоевой кислоты. Кроме того, в задачу исследования входило подтверждение химическими методами данных о локализации глюкозильного остатка и присутствии поли(рибитфосфатной) цепи (есть сведения о тейхоевых кислотах поли(глюкозилрибитфосфатной) природы [2]), полученных с помощью <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии, так как этот метод был впервые применен для структурного исследования поли(рибитфосфатного) полимера [1].

Для выяснения места расположения тейхоевой кислоты была получена клеточная стенка из 48-часового мицелия. В продуктах ее кислотного гидролиза методами БХ и электрофореза были обнаружены фосфорные эфиры рибита, что могло указывать на присутствие в стенке рибиттейхоевой кислоты.

Полимер получен из стенки экстракцией 10% трихлоруксусной кислотой. Установлено, что он составляет 20% ее сухого веса.

Кроме тейхоевой кислоты, выделенной из клеточной стенки (препарат 1), в работе использована тейхоевая кислота, полученная из всего мицелия (препарат 2 и 3, табл. 1).

Установление структуры тейхоевой кислоты химическими методами сводится к расщеплению полимера различными агентами и определению строения образовавшихся продуктов. Особенно важен анализ продуктов

Характеристика клеточной стенки и препаратов тейхоевой кислоты \*

Препарат **	P <sub>общ</sub>	P <sub>лаб</sub>	P <sub>нк</sub>	P <sub>тк</sub>	Lys/P <sub>тк</sub> , моль/моль
Стенка	2,00	0,07	0,33	1,60	1 : 7,4
Препарат 1	5,71	0,25	0,58	4,88	1 : 21,7
Препарат 2	7,23	Нет	1,21	6,02	1 : 20,6
Препарат 3	7,32	»	0,30	7,02	1 : 68,8

\* Количество фосфора приведено в процентах от веса воздушно-сухого образца.

\*\* Препарат 1 выделен из стенки (10% ТХУ, 24 ч, 4°С), препарат 2 и 3 — из мицелия (10% ТХУ, 24 ч + 48 ч, 4°С). Стенка и препарат 2 получены из мицелия одновременного выращивания, а препарат 3 — из мицелия, выращенного с годовым перерывом.

щелочного гидролиза полимера, так как, во-первых, строение образующихся фосфорных эфиров свидетельствует о положении фосфодиэфирной связи между мономерными единицами и, во-вторых, в условиях щелочной дегградации сохраняются возможные гликозильные заместители альдитных остатков. При щелочном гидролизе полимера поли(альдитфосфатной) природы разрыв цепи происходит только в тех местах, где рядом с фосфодиэфирной есть свободная гидроксильная группа. Гидролиз протекает через промежуточные циклические триэфиры фосфорной кислоты, которые неустойчивы в щелочной среде и гидролизуются с образованием изомерных фосфомоноэфиров альдита. Поли(рибитфосфатная) цепь дает набор моно- и дифосфатов рибита или гликозилрибита. Возможные пути щелочного расщепления такой цепи подробно описаны в работе [3].

Соединения, образующиеся при кислотном гидролизе, указывают на качественный состав изучаемого полимера; кроме того, идентификация среди продуктов гидролиза моно- и дифосфатов альдита служит дополнительным подтверждением наличия в цепи фосфодиэфирных связей, объединяющих соседние альдитные остатки (а не альдитные и сахарные, как установлено для тейхоевых кислот из некоторых бактерий [2,4]).

В кислотном гидролизате (препараты 1—3) методом ВХ в системах Б и В сравнением со стандартными образцами идентифицированы рибит, ангидрорибит, глюкоза, лизин, а с помощью электрофореза в буфере Г — моно- и дифосфаты рибита, ангидрорибитфосфат, неорганический фосфат и незначительные количества монофосфата глюкозилрибита (изомерные эфиры не разделяли). Идентификацию фосфорных эфиров рибита проводили определением мольного соотношения фосфора и рибита, образующихся после дефосфорилирования их фосфомоноэстеразой. Ангидрорибитфосфат и монофосфат глюкозилрибита определены сравнением их подвижности при электрофоретическом изучении (буфер Г) и ВХ в системе А с аналогичными эфирами щелочного гидролизата (табл. 2; установление структуры этих эфиров приведено ниже).

Анализ кислотного гидролизата тейхоевой кислоты указывал на присутствие в полимере поли(рибитфосфатной) цепи, содержащей глюкозу, по всей вероятности, в качестве гликозильного заместителя. Для подтверждения результатов, полученных при кислотной дегградации полимера, были исследованы продукты щелочного расщепления, идентификация которых очень важна для воссоздания исходной структуры тейхоевой кислоты, о чем мы писали выше.

В щелочном гидролизате полимера (препараты 1—3) с помощью электрофореза в буфере Г обнаружены моно- и дифосфаты рибита и глюкозилрибита, ангидрорибитфосфат и неорганический фосфат, методом ВХ в системе А — изомеры фосфатов рибита и глюкозилрибита, а в системах Б и В — глюкозилрибит, рибит, ангидрорибит и лизин (табл. 2).

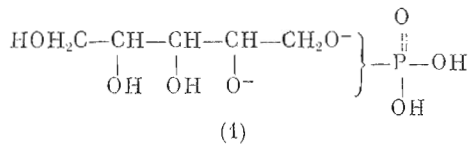
Электрофоретическая и хроматографическая подвижности продуктов деградации тейхоевой кислоты

Соединения	Электрофорез в буфере Г $E_{GroP}$	Хроматография в системах		
		А	Б	В
		$R_{1,2-GroP_2}$	$R_{Gro}$	$R_f$
Монофосфаты рибита (1)	0,65 0,65	2,36 2,90		
Дифосфаты рибита (2)	1,39 1,39	0,79 0,96		
Ангидрорибит-5-фосфат (3)	1,39	1,11		
Монофосфаты 4(2)-O-β-D-глюкопиранозилрибита (4)	0,85 0,42	2,30 1,79		
Дифосфаты 4(2)-O-β-D-глюкопиранозилрибита (6)	0,42 1,09	2,03 0,90		
Рибит	4,09	1,02		
Ангидрорибит			0,74	
4(2)-O-β-D-глюкопиранозилрибит (5)			1,0	
Глюкоза			0,46	
Лизин	+6,6 *		0,61	0,08
Амид лизина (амид А)	+12,9			
Амид N <sup>α</sup> -ациллизина (амид Б)	+8,1			
Гидроксамат лизина	+12,0			0,16
Ацетилгидроксамат				0,55

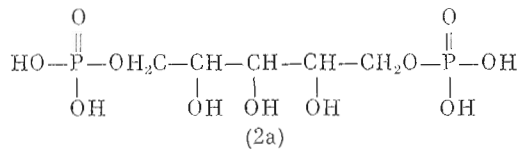
\* Цифры со знаком «+» — подвижность веществ (в см), идущих к катоду в течение 2 ч; за нулевую точку отсчета принято положение глицерина.

Структуру фосфорных эфиров устанавливали на основании качественного и количественного определения компонентов, входящих в их состав, продуктов их кислотного и ферментативного расщепления, а также с учетом данных <sup>13</sup>С-ЯМР о наличии 1,5-типа связи между мономерными единицами.

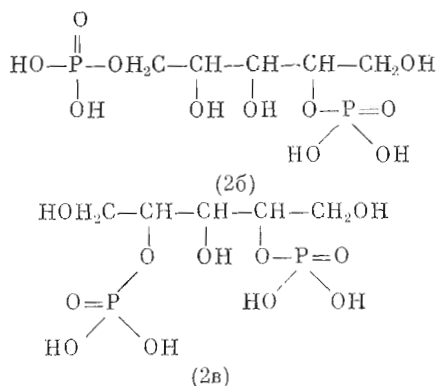
Монофосфаты рибита (1) при действии фосфомоноэстеразы распадались до рибита и P<sub>1</sub>, соотношение которых было эквимольным. При кислотном гидролизе эфиров образовывался ангидрорибит и P<sub>1</sub>.



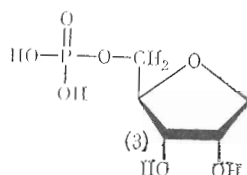
Дифосфаты рибита (2) полностью расщепляются фосфомоноэстеразой до рибита и P<sub>1</sub><sup>\*</sup>. Мольное соотношение этих компонентов было около 1:2. Кислотная деградация эфиров приводила к образованию ангидрорибит-фосфата (3) и P<sub>1</sub>.



\* P<sub>1</sub> — неорганический фосфат, P<sub>общ</sub> — общее содержание фосфора, P<sub>нк</sub> — фосфор нуклеиновых кислот, P<sub>лаб</sub> — фосфор, минерализуемый 1 н. HCl при 100° С за 7 мин, P<sub>тк</sub> — фосфор тейхоевых кислот, P<sub>фмэ</sub> — фосфор моноэфирных фосфатных групп.

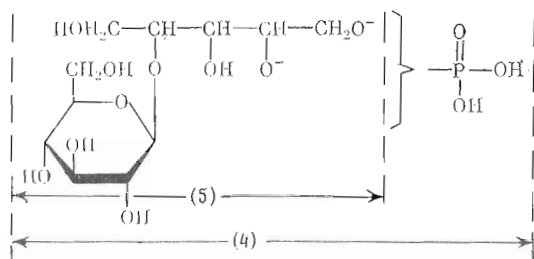


Ангидрорибит-5-фосфат (3) фосфомоноэстераза расщепляла до ангидрорибита и P<sub>1</sub>. Ангидрорибит с реактивом Шиффа давал медленно развивающееся синее окрашивание, характерное для циклических гликолей [5].



Механизм образования эфира (3) см. в работе [6].

Монофосфаты 4-(2)-O-β-D-глюкопиранозилрибита (4) фосфомоноэстераза расщепляла на глюкозилрибит (5) и P<sub>1</sub>, что указывает на наличие фосфоэфирной связи. Глюкоза и фосфор находятся в эфире (4) в эквимольном отношении. При кислотном гидролизе эфира образуются глюкоза, монофосфаты рибита (1), ангидрорибит и P<sub>1</sub>, а при действии β-глюкозидазы — глюкоза и монофосфаты рибита (1).

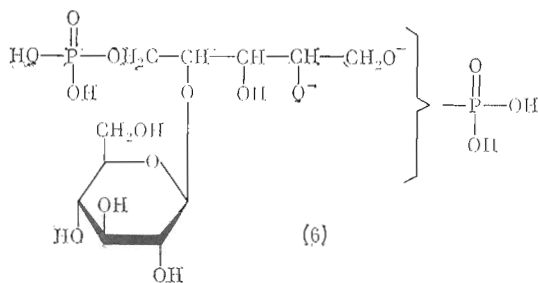


Наличие фосфорных эфиров рибита в продуктах ферментативного и кислотного гидролизис указывает на связь монофосфатного остатка с рибитом, а не с глюкозой.

4-(2)-O-β-D-глюкопиранозилрибит (5). При щелочном и кислотном (HF) гидролизис тейхоевой кислоты всегда обнаруживали только один глюкозид с эквимольным соотношением глюкозы и рибита. β-Глюкозидаза полностью расщепляла его до глюкозы и рибита, что говорило о существовании β-глюкозидной связи и пиранозного цикла глюкозы. При периодатном окислении глюкозида с последующим восстановлением NaBH<sub>4</sub> и кислотном гидролизис продуктов реакции (распад по Смитсу) методом БХ в системе Б обнаружен глицерин. Расположение глюкозидной связи при С1 или С5 рибита привело бы к идентификации в продуктах кислотного гидролизис восстановленного образца, кроме глицерина, этиленгликоля. В то же время после периодатного окисления на хроматограмме глюкозил-

рибит с реактивом Шиффа образует синее окрашивание (а не желтое), из чего следует, что положение С3 в рибите также свободно [7]. О том, что гидроксильная группа при С4 или С2 рибита замещена, свидетельствует также вычисленное мольное соотношение формальдегида, полученного при периодатном окислении глюкозида, и глюкозы, равное 1,0 : 1,0. Следовательно, гликозидная связь локализована по С4 или С2 рибита.

Дифосфаты 4(2)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилрибита (6) при дефосфорилировании фосфомоноэстеразой образуют глюкозид (5) и  $P_i$ , соотношение глюкоза — фосфор в соединении (6) близко к 1:2. Кислотный гидролиз эфиров приводит к образованию глюкозы, рибитдифосфатов (2), ангидро-рибитфосфата (3) и  $P_i$ .



Таким образом, анализ продуктов кислотной и щелочной деградации тейхоевой кислоты показал, что полимер имеет поли(рибитфосфатную) цепь. Неоспоримым доказательством этого факта является образование при расщеплении полимера моно- и дифосфатов рибита (при щелочной деградации трех изомеров — 2а, 2б, 2в) и глюкозилрибита, что согласуется с механизмом кислотного и щелочного расщепления тейхоевых кислот поли(альдитфосфатной) природы [8]. Кроме того, образование моно- и дифосфатов рибита, а также свободного рибита при щелочном расщеплении свидетельствует о наличии в полимере незамещенных рибитфосфатных единиц, а образование изомерных монофосфатов глюкозилрибита и глюкозилрибита — о замещении некоторых рибитных единиц глюкозильным остатком. Идентификация среди продуктов щелочного гидролиза изомеров дифосфата глюкозилрибита (6) указывает на присутствие глюкозильного заместителя на конце цепи, имеющем фосфомоноэфирную группу, так как эфиры структуры (6) не могут образоваться из средних глюкозилрибитфосфатных единиц из-за отсутствия свободной гидроксильной группы при С4 (С2) рибита [3].

Длина цепи тейхоевой кислоты определена двумя методами — периодатным и ферментативным. Количественное определение формальдегида, образующегося при периодатном окислении полимера из конечного рибитного остатка, и общего фосфора показало, что их мольное соотношение равно 1 : 8,4 соответственно. Определение же количества моноэфирного и общего фосфора полимера дало соотношение 1 : 6 соответственно. Эти данные позволяют предположить, что полимер имеет 6—8 рибитфосфатных единиц.

Следует указать, что тейхоевые кислоты, полученные из партий мицелия *S. azureus*, выращенного с интервалом в год (препараты 2 и 3, табл. 1), не были идентичны по своей структуре. Различия между ними сводились к степени глюкозиллированности полимера и содержанию лизина (табл. 1). В продуктах щелочного гидролиза тейхоевых кислот, полученных в разное время, обнаружены различия в количественном содержании фосфорных эфиров (1) — (4). Так, препарат 2 давал при гидролизе в основном монофосфаты глюкозилрибита — свидетельство большой степени глюкозиллирования цепи, а препарат 3, кроме того, моно- и дифосфаты рибита, что указывало на наличие в цепи рибитфосфатных остатков,



лишенных  $\beta$ -D-гликопиранозильного заместителя. Эти данные подтверждаются сравнительным анализом спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тейхоевых кислот из двух партий мицелля, полученных с годовым перерывом. Сопоставление интегральных интенсивностей пиков 65,9 м. д. (С5 остатков рибита, глюкозилированных по С4) и 68 м. д. (С1 глюкозилированных и С1 и С5 неглюкозилированных остатков рибита) [1] показало, что соотношение незамещенных и замещенных рибитных единиц в препарате 3 близко к 1:2. Следовательно, в цепи около 30% альдитных остатков свободны, в то время как в препарате 2 содержание глюкозы и рибита, как было определено в работе [1], близко к эквивольному.

Как говорилось выше, в кислотных и щелочных гидролизатах полимера обнаружен лизин, который идентифицирован сравнением со стандартным образцом аминокислоты методами ВХ (система В), электрофореза (буферы Г и Д) и на аминокислотном анализаторе. Методом кругового дихроизма (КД) определена его абсолютная конфигурация. Для этого проведена реакция суммарного количества лизина, полученного при кислотном гидролизе полимера, с *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола [9]. Из сравнения спектров поглощения и КД полученных производных лизиновых остатков из тейхоевой кислоты и производных стандартного образца *L*-лизина сделан вывод, что все остатки лизина в изучаемой тейхоевой кислоте имеют *L*-конфигурацию.

Для изучения природы связи лизина с полимером проведен гидроксиламинолиз и аммонолиз тейхоевой кислоты. Подвижности обнаруженных гидроксамата и амида (амид А) при хроматографическом (система В) и электрофоретическом (буфер Г) исследованиях полностью совпали с подвижностями гидроксамата и амида лизина, полученных из стандартного образца метилового эфира лизина (табл. 2). Эти данные говорят о присоединении лизина к полимеру сложноэфирной связью.

Среди продуктов вышеперечисленных реакций были обнаружены также гидроксамат и амид уксусной кислоты, свидетельствующие о присутствии в полимере постоянного компонента тейхоевых кислот стрептомицетов — О-ацетильных групп [10].

В продуктах аммонолиза полимера обнаружен еще один амид (амид Б), который имел меньшую подвижность к катоду и при кислотном гидролизе давал лизин. Можно было предположить, что амид Б является амидом лизина, одна из аминогрупп которого ацилирована. Положение N-ацильного заместителя было установлено динитрофенилированием амида Б. Электрофоретическое исследование продуктов кислотного гидролиза динитрофенильного производного привело к идентификации N<sup>c</sup>-Dnp-лизина, что указывало на замещение  $\alpha$ -аминогруппы.

Таким образом, к поли(рибитфосфатной) цепи изучаемой тейхоевой кислоты сложноэфирной связью присоединяются лизин и уксусная кислота. Обнаружение в продуктах аммонолиза малых количеств амида N<sup>c</sup>-ациллизина показывает, что меньшая часть лизиновых остатков полимера имеет закрытую  $\alpha$ -аминогруппу. Равновероятно присоединение О-ацильных остатков к гидроксильным группам как рибита, так и глюкозы.

Количественное определение лизина в тейхоевой кислоте, полученной в мягких условиях из клеточной стенки (препарат 1), и в патиной стенке показало, что соотношение  $R_{\text{тк}} - \text{Lys}$  для этих препаратов 20,6:1 и 7,4:1 соответственно (табл. 1). Учитывая известную лабильность в кислой среде сложноэфирных связей [11], можно предположить, что часть лизина утеряна при выделении тейхоевой кислоты. Если принять, что весь лизин стенки связан с полимером, то цепь из 6—8 единиц должна нести один остаток *L*-лизина. В связи с этим отметим, что в пептидогликане стенки *S. azureus* лизин отсутствует, пептидная часть пептидогликана представлена диаминопимелиновой и глутаминовой кислотами, алавином и глицином\*.

\* Данные будут опубликованы нами позже.

Ранее эфир лизина был найден в составе мембранной тейхоевой кислоты одного из штаммов стрептококка группы *D* в качестве минорного компонента [12], в полимере же клеточной стенки бактерий эфир этой аминокислоты найден впервые.

### Экспериментальная часть

*Streptomyces azureus* RIA 1009\* — продуцент тиострептона выращивали на среде с пептоном, глюкозой и минеральными солями [13]. 48-часовую культуру (середина логарифмической стадии роста) промывали физиологическим раствором и использовали для получения клеточной стенки или высушивали спиртом, ацетоном, эфиром для дальнейшей экстракции тейхоевой кислоты из всего мицелия. Клеточную стенку получали разрушением сырого мицелия ультразвуком с последующим дифференциальным центрифугированием [14].  $P_{\text{общ}}$ ,  $P_{\text{нп}}$ ,  $P_{\text{лаб}}$ ,  $P_{\text{тн}}$  определяли так, как описано в работе [14], количество глюкозы определяли с антроновым реактивом [15], рибит — по формальдегиду [16]. Хроматографию (БХ) и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak FN-13» (ГДР), которую для препаративных целей промывали 2 н.  $\text{AcOH}$  и отмывали дистиллированной и бидистиллированной водой. БХ проводили в следующих системах растворителей: пропанол —  $\text{NH}_3$  ( $d$  0,88) — вода, 6:3:1 (А)\*\* для разделения фосфорных эфиров; бутанол — пиридин — бензол — вода, 5:3:1:3 (Б) для разделения глюкозилрибита, рибита, ангидрорибита и глюкозы; бутанол —  $\text{AcOH}$  — вода, 4:1:5 (В) для разделения лизина и его производных. Электрофорез фосфорных эфиров, образовавшихся при деградации полимера, лизина и его производных выполняли в ацетатно-пиридиновом буфере, pH 5,5—5,6 (Г) [4] и 1 н.  $\text{AcOH}$  (Д). Фосфорные эфиры разделяли 4—5 ч, а лизин и его производные — 1—2 ч при 20 В/см. Тейхоевую кислоту и фосфорные эфиры обнаруживали реактивом Ишервуда [17], лизин, его амид и амид N-ациллизина — нингидрином [18], ацетамид — O-толидином [19], глюкозу, рибит и глюкозилрибит — аммиачным раствором 5%  $\text{AgNO}_3$  [18], ангидрорибит — реактивом Шиффа [5], гидроксаматы —  $\text{FeCl}_3$  [18].  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопическое исследование проводили в условиях, описанных ранее [1], количество лизина определяли на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi».

**Выделение тейхоевой кислоты.** Тейхоевую кислоту экстрагировали 24 ч из лиофилизованной стенки 10% трихлоруксусной кислотой при 2—4°C (из расчета 10 мл кислоты на 300 мг стенки), полимер осаждали 2 объемами спирта и отделяли от надосадочной жидкости, растворяли в холодной дистиллированной воде, нерастворившуюся часть промывали холодной водой (3 раза) и отбрасывали, основной раствор и промывные воды объединяли, диализовали против дистиллированной воды 48 ч и лиофилизовали. Получили препарат 1.

Поскольку выход полимера из стенки был невелик, тейхоевую кислоту получали также из всего мицелия. Сухой мицелий обрабатывали двумя порциями 10% трихлоруксусной кислоты 24 и 48 ч при 2—4°C (из расчета 10 мл кислоты на 1 г мицелия), экстракты объединяли, осаждение спиртом и очистку проводили как описано выше. Из двух партий мицелия, выращенных с интервалом в год, получены препараты 2 и 3. Клеточная стенка и препарат 2 получены из мицелия одновременного выращивания (табл. 1).

Препараты 1—3 подвергали кислотному и щелочному расщеплению и образовавшиеся продукты изучали методами БХ и электрофореза. Установлена качественная идентичность образовавшихся соединений всех трех препаратов.

\* Привнесим благодарность В. Д. Кузнецову (Институт микробиологии АН СССР) за предоставление культуры *Streptomyces azureus* RIA 1009.

\*\* Для разделения изомеров фосфорных эфиров растворитель пропускали многократно (до 14 сут) с периодическим высушиванием хроматограммы.

Препараты 2 и 3 использованы для изучения строения фосфорных эфиров, образовавшихся при кислотной и щелочной деградации тейхоевой кислоты, для получения лизина с целью определения его абсолютной конфигурации, а также для  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопического изучения. Препарат 1 использован для количественного определения лизина и установления длины цепи.

*Кислотный гидролиз.* Навеску клеточной стенки или препарата полимера (3–5 мг) гидролизovali 3 ч в 0,5–1,0 мл 2 н.  $\text{HCl}$  при  $100^\circ\text{C}$  в запаянном капилляре. Кислоту отгоняли в вакууме над  $\text{KOH}$  и образовавшиеся продукты изучали с помощью БХ и электрофореза.

*Щелочной гидролиз.* Навеску препарата полимера (10–15 мг) гидролизovali 3 ч в запаянной ампуле в 2–3 мл 1 н.  $\text{NaOH}$  при  $100^\circ\text{C}$ , гидролизат обрабатывали смолой КУ-2 ( $\text{NH}_4^+$ -формы) на колонке размером  $150 \times 10$  мм, водный элюат лиофилизovali, растворяли в 0,2–0,3 мл воды и образовавшиеся продукты изучали с помощью БХ и электрофореза.

*Изучение фосфорных эфиров.* Фосфорные эфиры, образовавшиеся при деградации тейхоевой кислоты, после разделения методами электрофореза в буфере Г и БХ в системе А (для разделения изомерных фосфорных эфиров) элюировали с бумаги водой, элюат упаривали досуха и затем исследовали сухой остаток. а) Кислотный гидролиз. Сухой остаток фосфорного эфира растворяли в 0,1–0,2 мл 2 н.  $\text{HCl}$  и гидролизovali 3 ч в запаянном капилляре при  $100^\circ\text{C}$ . Гидролизат обрабатывали так же, как и кислотный гидролизат полимера. Образовавшиеся продукты исследовали методом БХ и электрофореза. б) Энциматическое дефосфорилирование. К сухому остатку фосфорного эфира (0,3–0,5 мг) добавляли 0,01–0,02 мл 0,005% раствора фосфомоноэстеразы из простаты (КФ 3.1.3.2) в 0,5 М ацетатно-аммонийном буфере (рН 5,5), 0,5 мл того же буфера и выдерживали в термостате 18–20 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Продукты гидролиза исследовали методом БХ. в) Определение мольных соотношений компонентов. Сухой остаток моно- и дифосфатов глюкозилрибита растворяли в 3 мл дистиллированной воды и в аликвотах определяли количество  $\text{P}_{\text{общ}}$  и глюкозы. Отношение компонентов в моно- и дифосфатах рибита определяли двумя путями: 1) к сухому остатку эфира добавляли фосфомоноэстеразу и гидролизovali так, как описано в пункте «б». В гидролизате определяли количество  $\text{P}_i$  и рибита и вычисляли их мольное соотношение; 2) к сухому остатку эфира на чашечке из фторопласта добавляли 0,01–0,02 мл 40%  $\text{HF}$  и оставляли в закрытом тefлоновом сосуде при  $2\text{--}4^\circ\text{C}$  на 48–72 ч. Кислоту упаривали 72 ч в вакууме над  $\text{KOH}$  при  $2\text{--}4^\circ\text{C}$ . В гидролизате определяли количество  $\text{P}_i$  и рибита и вычисляли их мольное соотношение. г) Гидролиз  $\beta$ -глюкозидазой осуществляли так же, как и в случае глюкозида (см. ниже).

*Изучение глюкозилрибита.* а) Получение. Навеску препарата 2 или 3 (10 мг) помещали в плотно закрывающийся сосуд из тefлона, заливали 1 мл 40%  $\text{HF}$  и гидролизovali 72 ч при  $2\text{--}4^\circ\text{C}$ . К гидролизату добавляли смолу дауэкс  $2 \times 8$  ( $\text{CO}_3^{2-}$ - или  $\text{HCO}_3^-$ -форма) до прекращения образования  $\text{CO}_2$  [20], затем смолу отделяли, промывали водой, гидролизат и промывные воды объединяли, лиофилизovali и методом БХ в системе Б отделяли глюкозилрибит от остальных продуктов гидролиза, элюировали водой, элюат упаривали досуха и сухой остаток исследовали. б) Гидролиз  $\beta$ -глюкозидазой и определение мольных соотношений. К сухому остатку глюкозида (0,5 мг) добавляли 0,05 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 5,0), 0,05 мл 1% взвеси эмульсина (Sigma, КФ 3.2.1.21) в том же буфере и выдерживали 16 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Образовавшиеся при гидролизе рибит и глюкозу разделяли БХ в системе Б, элюировали с бумаги водой, определяли их количественное содержание и вычисляли мольное соотношение. в) Распад по Смитту осуществляли так, как описано в [3].



*Определение длины цепи тейхоевой кислоты* проводили двумя способами. а) 10 мг тейхоевой кислоты (препарат 1), предварительно обработанной 0,1 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (для снятия О-ацильных остатков), растворяли в 6 мл бидистиллированной воды, смешивали с 1,5 мл 0,3 М  $\text{NaIO}_4$  и выдерживали в темноте при 20° С. В аликвотах смеси (1 мл) через каждые 6 ч определяли количество образовавшегося формальдегида. Через 24 ч окисление полимера заканчивалось. В аликвотных пробах определяли количество  $\text{P}_{\text{тк}}$  и вычисляли мольное соотношение  $\text{P}_{\text{тк}}$ —формальдегид. б) 8 мг тейхоевой кислоты (препарат 1) растворяли в 2 мл 0,5 М ацетатно-аммонийного буфера (рН 5,5), добавляли 0,2 мл 0,005% раствора фосфомоноэстеразы из простаты в том же буфере и выдерживали при 37° С. Через каждые 3 ч в аликвотах смеси (0,5 мл) определяли  $\text{P}_{\text{фмэ}}$ . Минерализация фосфора заканчивалась через 10 ч. В аликвотных пробах определяли  $\text{P}_{\text{общ}}$  и вычисляли мольное соотношение  $\text{P}_{\text{общ}}$ — $\text{P}_{\text{фмэ}}$ .

*Определение О-ацильных групп.* а) Гидроксиламинолиз проводили так, как описано в работе [4]. Навеску тейхоевой кислоты (15—20 мг, препараты 2, 3) обрабатывали раствором гидроксиламина при рН 7,7—7,8. Образовавшиеся гидроксаматы уксусной кислоты и лизина исследовали методом БХ в системе В и электрофореза в буфере Г сравнением со стандартными образцами ацетилгидроксамата и гидроксамата лизина, полученных из этилацетата и метилового эфира лизина (Reanal) соответственно (табл. 2). б) Аммонолиз. Навеску тейхоевой кислоты (2—5 мг, препараты 1—3) растворяли в 2 мл 10%  $\text{NH}_4\text{OH}$  и оставляли на 20 ч при 20° С. Избыток аммиака удаляли в вакууме и образовавшиеся продукты разделяли электрофоретически в буфере Г и методом БХ в системе В. Сравнением со стандартными образцами обнаружены лизин и ацетамид. Кроме того, в продуктах реакции найдены два амида — А и Б. Амиды элюировали с электрофореграммы водой, элюат высушивали и сухой остаток гидролизovali 8 ч 6 н.  $\text{HCl}$  при 100° С. В гидролизате как амида А, так и Б обнаружен только лизин. Подвижность количественно преобладающего амида А совпала с подвижностью амида лизина, полученного аммонолизом метилового эфира лизина. Амид Б, количество которого было небольшим, имел меньшую подвижность в сторону катода и плохо окрашивался нингидрином (табл. 2). в) Динитрофенилирование. Сухой остаток водного элюата амида Б растворяли в 0,2 мл 70% этанола, добавляли 0,05 мл триэтиламина и 0,015 мл 0,097 М 2,4-динитрофторбензола в этаноле, смесь встряхивали 1 ч в темноте при 20° С, 1 ч — при 37° С, затем упаривали, избыток реагента удаляли экстракцией этилацетатом и образовавшиеся продукты реакции гидролизovali 8 ч в 0,10 мл 6 н.  $\text{HCl}$  при 100° С. Кислоту упаривали в вакууме и гидролизат исследовали методом электрофореза в буфере Д. Сравнением со стандартным образцом идентифицирован  $\text{N}^{\epsilon}$ -Dnp-лизин.

*Определение абсолютной конфигурации лизина.* Навеску тейхоевой кислоты (100 мг, препарат 2 и 3) гидролизovali 8 ч 4 н.  $\text{HCl}$  при 100° С и лизин выделяли хроматографией на даэуксе  $50 \times 8$  ( $\text{H}^+$ -форма). Препарат лизина подвергали дополнительной очистке с помощью электрофореза в буфере Д, элюировали с электрофореграммы водой. К аликвотной пробе прибавляли равный объем стандартного раствора о-фталевого альдегида и 2-меркаптоэтанола в 0,1 М боратном буфере (рН 9,7). Смесь выдерживали 5 мин при 20° С, после чего записывали спектр КД в интервале 250—400 нм, а также измеряли поглощение при 330—340 нм [9]. Максимум полосы поглощения и положительный пик КД продуктов реакции лизина с о-фталевым альдегидом находится в районе 334 нм. Аналогично обрабатывали стандартный образец L-лизина, снимали его спектр КД и измеряли поглощение.

Авторы приносят благодарность Г. С. Катрухе за участие в обсуждении настоящей работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Стрешинская Г. М., Наумова И. Б. Применение спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для изучения рибиттейхоевой кислоты из *Streptomyces azureus* RIA 1009.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 782–785.
2. Poxton I. R., Tarelli E., Baddiley J. The structure of C-polysaccharide from the walls of *Streptococcus pneumoniae*.— Biochem. J., 1978, v. 175, № 3, p. 1033–1042.
3. Наумова И. Б., Белозерский А. Н. Рибиттейхоевая кислота из клеточной стенки актиномицета – продуцента антибиотика аурантина.— Биохимия, 1966, т. 31, № 6, с. 1276–1282.
4. Наумова И. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. Тейхосовая кислота из клеточной стенки *Streptomyces kanamyceticus* RIA-690 и применение спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для локализации фосфодиэфирной связи в цепи.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1529–1537.
5. Baddiley J., Buchanan J. G., Handschumacher R. E., Prescott J. G. Chemical studies in the biosynthesis of purine nucleotides. Part I. The preparation of N-glycylglycosylamines.— J. Chem. Soc., 1956, № 8, p. 2818–2823.
6. Applegarth D. A., Buchanan J. G., Baddiley J. Synthesis of ribitol 1,5-diphosphate and of a polymeric ribitol phosphodiester.— J. Chem. Soc., 1965, № 2, p. 1213–1219.
7. Armstrong J. J., Baddiley J., Buchanan J. G. Structure of teichoic acid from cell walls of *Bacillus subtilis*.— Nature, 1959, v. 184, № 4682, p. 248–249.
8. Armstrong J. J., Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Greenberg G. R. Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls.— J. Chem. Soc., 1958, № 12, p. 4344–4354.
9. Воскова Н. А., Романов В. В., Сумбатян Н. В., Коршунова Г. А., Швачкин Ю. П. Метод определения абсолютной конфигурации и количественного содержания стереоизомеров аминокислот в смесях.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 731–735.
10. Naumova I. B., Zaretskaya M. Sh., Dmitrieva N. F., Streshinskaya G. M. Structural features of teichoic acids of certain *Streptomyces* species.— In: Nocardia and Streptomyces. Proceedings of the international symposium on Nocardia and Streptomyces / Mordarski M. et al., Gustav Fischer Verlag, 1978, p. 261–268.
11. Shabarova Z. A., Hughes N. A., Baddiley J. The influence of adjacent phosphate and hydroxyl groups on amino acid esters.— Biochem. J., 1962, v. 83, № 1, p. 216–219.
12. Wicken A. J., Baddiley J. Structure of intracellular teichoic acid from group D streptococci.— Biochem. J., 1963, v. 87, № 1, p. 54–62.
13. Naumova I. B., Kuznetsov V. D., Kudrina K. S., Bezzubenkova A. P. The occurrence of teichoic acids in Streptomyces.— Arch. Microbiol., 1980, v. 126, № 1, p. 71–75.
14. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Пашина Л. И. Химический состав клеточной стенки *Streptomyces chrysomallus*, образующего антибиотик аурантин.— Микробиология, 1979, в. XLVIII, № 5, p. 814–819.
15. Зайцева Г. И., Афанасьева Т. И. Количественное определение углеводов методом нисходящей хроматографии на бумаге.— Биохимия, 1957, т. 22, № 6, с. 1035–1042.
16. Hanahan D. J., Olley J. N. Chemical nature of monophosphoinositides.— J. Biol. Chem., 1958, v. 231, № 2, p. 813–828.
17. Белсон А. Биохимические методы анализа растений. М.: Изд-во иностр. лит., 1960, с. 146–182.
18. Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 719–756.
19. Rendel F., Hoppe W. Über eine Färbemethode zum Anfärben von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen und Papierelectropherogrammen.— Chem. Ber., 1954, v. 87, № 7, p. 1103–1107.
20. Anderson A. J., Green R. S., Archibald A. R. Specific determination of ribitol teichoic acid in whole bacteria and isolated walls of *Bacillus subtilis* W23.— Carbohydr. Res., 1977, v. 57, C7–C10.

Поступила в редакцию  
9.III.1981

### STRUCTURE OF RIBITOL TEICHOIC ACID FROM THE CELL WALL OF *STREPTOMYCES AZUREUS* RIA 1009

STRESHINSKAYA G. M., NAUMOVA I. B., ROMANOV V. V., SHASHKOV A. S.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow; N. D. Zelinsky Institute  
of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The structure of the teichoic acid of *Streptomyces azureus* RIA 1009 producing the antibiotic tiostrepton is studied. The polymer is located in the cell wall and amounts to about 20% of its dry weight. The teichoic acid chain consists of 6-8 ribitol phosphate units,  $\beta$ -D-glucopyranosyl substituents being linked at C4(C2) of some ribitol residues. The acetic acid and L-lysine are in ester linkages with hydroxyl groups of the polymer.