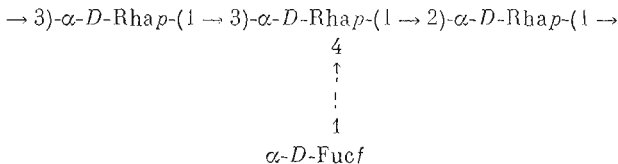




УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ**26 *. СТРОЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ PSEUDOMONAS CERASI 467
и PSEUDOMONAS SYRINGAE, ПАТОВАР SYRINGAE,
ШТАММЫ 218 И P-55, ОТНОсяЩИХСя К СЕРОГРУППАМ II и III****Книрель Ю. А., Здоробенко Г. М.*, Шапков А. С.,
Маляй С. С., Яковлева Л. М.*, Соляник Л. П.*,
Захарова И. Я.***Институт органической химии им. П. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;* Институт микробиологии и вирусологии им. Д. Р. Заболотного
Академии наук УССР, Киев

При мягком кислотном гидролизе липополисахаридов *Pseudomonas cerasi* 467 и *Pseudomonas syringae*, патоваР *syringae*, штаммы 218 и P-55, получены серологически активные О-специфические полисахариды. Согласно анализам методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, полисахарид *P. cerasi* 467 имеет структуру →3)-α-D/Rhap-(1→3)-α-D-Rhap-(1→2)-α-D-Rhap-(1→, идентичную структуре О-специфического полисахарида *P. syringae*, патоваР *morsprunorum* С28 (Smith A. R. W. et al. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 73–78). Полисахариды штаммов *P. syringae*, патоваР *syringae*, имеют такую же основную цепь, но отличаются присутствием D-фукозы, присоединенной в виде моносахаридных ответвлений. Анализ методом метилирования и ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии позволил установить следующую структуру этих полисахаридов:



У штамма 218 замещенными остатками фукофуранозы является ~35%, а у штамма P-55 – ~85% трисахаридных звеньев основной цепи.

В последнем издании определителя Берджи [2] значительное число дифференцируемых ранее по растению-хозяину видов фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* объединено в ранге патоваРов в один вид *Pseudomonas syringae* на основании общности их фенотипических свойств. Этот вид характеризуется значительной серологической неоднородностью, что нашло отражение в классификационной схеме [3]. Исследование состава и структурной организации О-антигенных липополисахаридов *P. syringae* имеет важное значение для понимания молекулярных основ серогруппирования этого вида, вирулентности штаммов и их специализации по растению-хозяину, а также для окончательного выяснения его таксономического положения.

Недавно нами была установлена структура О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Pseudomonas wieringae* (серогруппа IV) и было показано, что она идентична структуре О-специфических полисахаридов ряда патоваРов *P. syringae*, относящихся к той же серогруппе [4]. Известно также строение О-специфического полисахарида *P. syringae*, патоваР *morsprunorum* С28 [5]. В настоящем сообщении приведены данные по структурному исследованию полисахаридных цепей липополисахаридов *Pseudomonas cerasi* 467 и *P. syringae*, патоваР *syrin-*

* Сообщение 25 см. [1].

gae 218, относящихся к серогруппе II, а также *P. syringae*, патовар-
syringae P-55, входящего в серогруппу III (классификационная схе-
ма [3]).

Липополисахариды были выделены экстракцией бактериальной мас-
сы соевым раствором [6] и очищены ультрацентрифугированием. Они
были активны в реакции кольцепреципитации (титры 1 : 1 000 000) и пас-
сивной гемагглютинации (титры 1 : 640 для *P. cerasi* и 1 : 2560 для штам-
мов *P. syringae*) с гомологичными О-антисыворотками. Липополисахарид
P. cerasi давал одну линию преципитации при двойной диффузии в агаро-
вом геле, а липополисахариды штаммов *P. syringae* — по две линии пре-
ципитации; в иммуноэлектрофорезе все липополисахариды давали по од-
ной линии преципитации.

При расщеплении липополисахаридов разбавленной уксусной кисло-
той были получены О-специфические полисахариды, выделенные гель-
хроматографией на сефадексе G-50. Они обладали серологической актив-
ностью в реакции торможения пассивной гемагглютинации в гомологич-
ных тест-системах, хотя она была несколько меньшей по сравнению
с активностью соответствующих липополисахаридов (минимальные инги-
бирующие дозы 32 и 4—8 мкг соответственно).

Кислотный гидролиз полисахаридов *P. cerasi* 467 привел только к рам-
нозе, которая была идентифицирована методом ГЖХ в виде ацетата
альдононитрила [7]. В ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектрах полисахарида (рис. 1
и 2) присутствовали сигналы метильных групп трех остатков рамнозы
(δ_{H} 1,33; 3 H, дублет; 1,36; 6 H, суперпозиция двух дублетов; δ_{C} 17,8;
2 C; 17,9; 1 C), трех аномерных атомов (δ_{H} 5,02; 5,09; 5,26, все уширен-
ные синглеты; δ_{C} 101,9; 103,0; 103,1 м.д.) и 12 других протонов в области
3,56—4,22 м.д. и других углеродных атомов в области 70,4—79,2 м.д. Та-
ким образом, полисахарид является регулярным гомополимером рамнозы,
построенным из трисахаридных повторяющихся звеньев.

Структурный анализ этого полисахарида был проведен методом ^1H -
ЯМР-спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера
(ЯЭО) [8]. ^1H -ЯМР-спектр был расшифрован с помощью селективного
гомоядерного двойного резонанса (табл. 1). Предоблучение протона H1
звена A при 5,09 м.д. вызывало ЯЭО (~8%) на H3 звена B при 3,91 м.д.
Далее, предоблучение H1 звена B при 5,02 м.д. приводило к заметному

Таблица 1

Данные ^1H -ЯМР-спектра полисахарида *P. cerasi* 467

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблю- даемая мультиплет- ность *	БССВ, Гц
-3Rhap α (A)	H1	5,09	д	$J_{1,2}$ 1,5
	H2	4,19	дд	$J_{2,3}$ 3
	H3	3,96	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,62	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	3,81	дк	$J_{5,6}$ 6
	H6 (3 H)	1,33	д	
-3Rhap α (B)	H1	5,02	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,22	дд	$J_{2,3}$ 3
	H3	3,91	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,63	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	3,92	дк	$J_{5,6}$ 6
	H6 (3 H)	1,36	д	
-2Rhap α (C)	H1	5,26	д	$J_{1,2}$ 2
	H2	4,13	дд	$J_{2,3}$ 3
	H3	4,01	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,56	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	3,88	дк	$J_{5,6}$ 6
	H6 (3 H)	1,36	д	

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

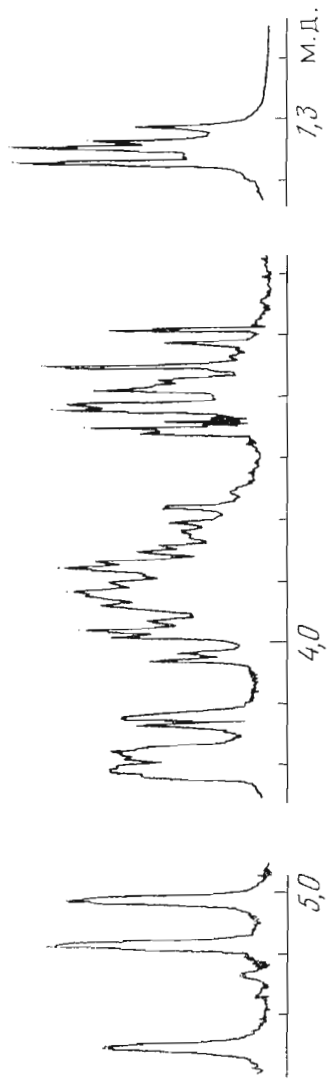


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *R. cergasi* 467 (область резонанса метильных групп уменьшена в 4 раза)

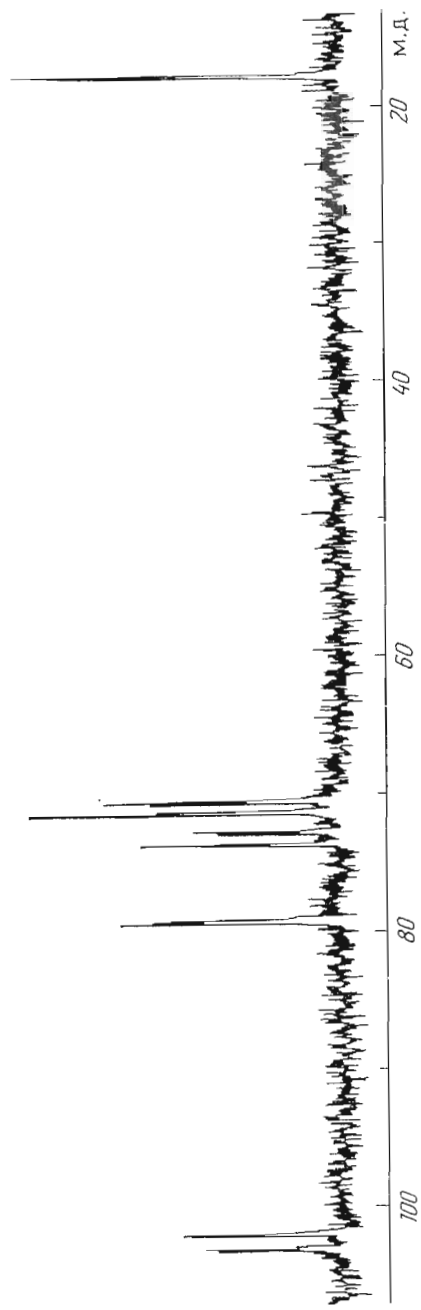


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *R. cergasi* 467

ЯЭО (~17%) на H2 звена C при 4,13 м.д., а также к небольшому (~1,5%) на H1 этого же звена при 5,26 м.д. И наконец, при предоблучении H1 звена C при 5,26 м.д. наблюдался значительный ЯЭО (~24%) на H3 звена A при 3,96 м.д. Из этих данных однозначно следовал линейный характер полимера и типы замещения моносахаридов: звеньев A и B в положение 3 и звена C в положение 2.

Отсутствие заметных ЯЭО на атомах H3 и H5 предоблучаемого звена во всех трех проведенных экспериментах указывало на α -конфигурацию гликозидных связей всех остатков рамнозы. Этот вывод был подтвержден величинами констант спин-спинового взаимодействия $^1J_{C_1,H_1}$, определенными из снятого без подавления C,H-взаимодействий ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида. Относительно большие величины этих констант (169–172 Гц) характерны для экваториальной ориентации протонов H1, т. е. для α -конфигурации остатков рамнозы [9].

Удельное оптическое вращение полисахарида, $[\alpha]_D +89,1^\circ$ (c 0,25), указывало на D -конфигурацию всех трех остатков рамнозы (для трисахаридного повторяющегося звена, включающего три остатка α - D -рамнопираозы, по правилу Кляйна [10], исходя из данных [11], была рассчитана величина $[\alpha]_D +82^\circ$).

Таблица 2

Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектрах (δ , м.д.) *

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид <i>P. cerasi</i> 467 ^{2*}						
-3Rhap α (A)	103,1 (103,5)	71,2 (71,4)	79,0 (78,8)	72,8 (72,9)	70,4 (70,0)	17,8 (18,0)
-3Rhap α (B)	103,0 (103,3)	71,2 (71,4)	79,0 (78,8)	72,6 (72,9)	70,4 (70,0)	17,8 (18,0)
-2Rhap α (C)	101,9 (102,1)	79,2 (79,8)	71,1 (71,3)	73,6 (73,5)	70,6 (70,0)	17,9 (18,0)
Полисахарид <i>P. syringae</i> , патovar <i>syringae</i> 218 ^{3*}						
Структура (II)						
-3Rhap α (A)	103,8	71,4	78,8	72,8	70,4	17,8
-3Rhap α (B)	103,1	71,2	78,6	81,9	69,2	18,5
-2Rhap α (C)	102,0	79,2	71,2	73,5	70,6	18,0
Fuc α (D)	102,8	78,0	76,3	85,5	70,4	18,9
Структура (I)						
-3Rhap α (A)	103,3	71,2	79,0	72,8	70,4	17,8
-3Rhap α (B)	103,1	71,2	79,2	72,5	70,4	17,8
-2Rhap α (C)	102,0	79,3	71,2	73,5	70,6	17,8
Полисахарид <i>P. syringae</i> , патovar <i>syringae</i> P-55 ^{3*}						
Структура (II)						
-3Rhap α (A)	103,6	71,5	78,8	72,8	70,3	17,8
-3Rhap α (B)	102,9	71,3	78,8	81,6	69,3	18,5
-2Rhap α (C)	102,0	79,3	71,3	73,6	70,6	18,0
Fuc α (D)	102,8	78,2	76,4	85,7	70,5	18,9
Структура (I)						
-3Rhap α (A)	103,0	71,3	79,1	72,8	70,3	17,8
-3Rhap α (B)	102,9	71,3	79,1	72,7	70,3	17,8
-2Rhap α (C)	102,0	79,3	71,3	73,6	70,5	17,8
Fuc α 1-OMe ^{4*}	103,8	78,2	76,2	84,6	71,1	20,1

* Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным.

^{2*} В скобках приведены данные, рассчитанные по методу [12, 13] для полисахарида структуры (I).

^{3*} Приведены данные для олигосахаридных звеньев, содержащих и не содержащих остаток фукозы (структуры (II) и (I) соответственно).

^{4*} Химические сдвиги рассчитаны по аддитивной схеме, исходя из данных для метил- α - и - β - D -галактофуранозидов [14] и метил-2-ацетиамидо-2,6-дидезокси- β - D -галактофуранозидов [15].

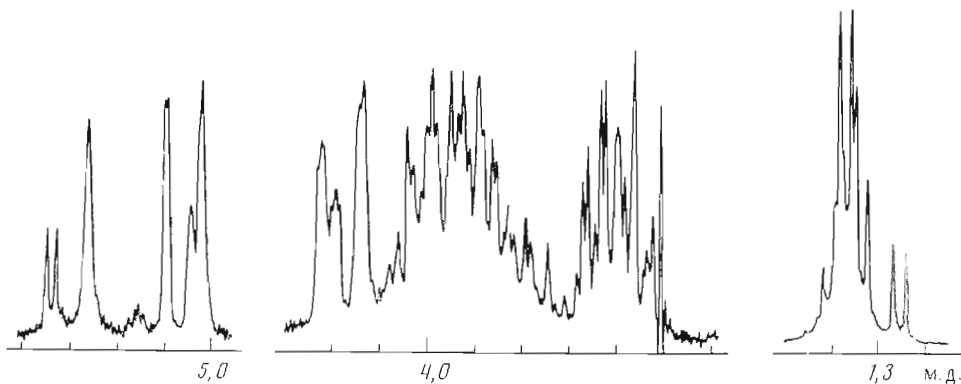


Рис. 3. ^1H -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218 (область резонанса метильных групп уменьшена в 4 раза)

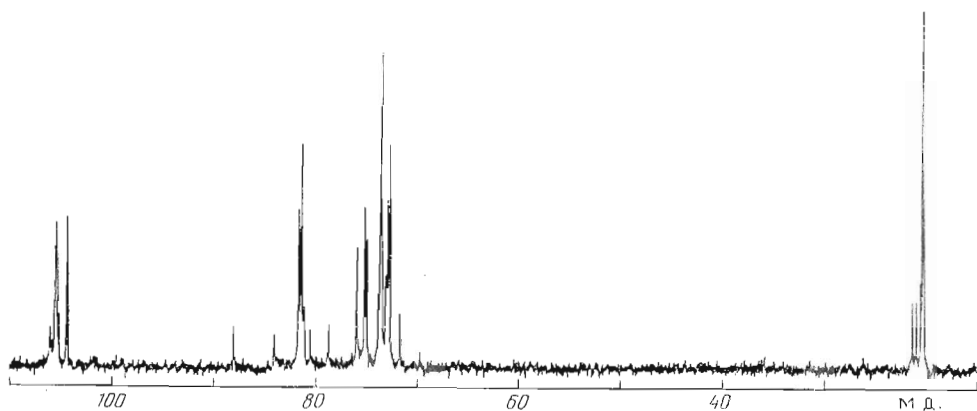
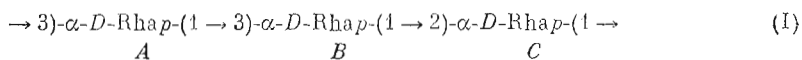


Рис. 4. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218

Таким образом, согласно полученным данным, О-специфический полисахарид *P. cerasi* 467 имеет структуру



Такое строение было подтверждено расчетом ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида по методу [12, 13], который в предположении о структуре (I) привел к результату, наиболее удовлетворяющему экспериментальным данным (сумма квадратов отклонений химических сдвигов сигналов рассчитанного и экспериментального спектров друг от друга составляла 1,7), в то время как для альтернативных структур соответствие между спектрами было значительно хуже (для двух наилучших из них сумма квадратичных отклонений составляла 3,3 и 4,7). Расчет однозначно показал, что все три остатка рамнозы имеют одинаковые абсолютные конфигурации, что согласуется с выводом, сделанным на основании расчета по правилу Кляйна. Произведенное на основании расчета отнесение сигналов в экспериментальном ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида, а также химические сдвиги ^{13}C в спектре, рассчитанном для структуры (I), приведены в табл. 2.

Структура (I) была независимо установлена ранее, главным образом химическими методами, для О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *morsprunorum* С28 [5]. Сопоставление ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, приведенных в работе [5], со спектрами полисахарида *P. cerasi* (рис. 1 и 2) показало, что они идентичны. Таким образом, эти два микроорганиз-

ма продуцируют липополисахариды с одинаковыми по структуре полисахаридными цепями.

При кислотном гидролизе полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218, образовались рамноза и фукоза в соотношении $\sim 9:1$, которые были идентифицированы методом ГЖХ в виде ацетатов альдононитрилов [7], а также с помощью углеводного анализатора. ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры полисахарида (рис. 3 и 4) указывали на отсутствие строгой регулярности в его структуре. Оба спектра содержали по две серии сигналов в соотношении $\sim 2:1$. Сигналы доминирующей серии образовывали спектры, идентичные ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектрам полисахарида (I), приведенным на рис. 1 и 2. Сигналы минорной серии отвечали полисахариду с тетрасахаридным повторяющимся звеном, включающим, по-видимому, остатки рамнозы и фукозы.

Мягкий кислотный гидролиз полисахарида привел к избирательному отщеплению остатков фукозы и образованию полисахарида, построенного только из остатков рамнозы. По данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, этот модифицированный полисахарид идентичен О-специфическому полисахариду *P. cerasi* 467. Его удельное оптическое вращение, $[\alpha]_D^{25} +68,5^\circ$ (c 0,25), указывало на *D*-конфигурацию остатков рамнозы, и, таким образом, модифицированный полисахарид имеет структуру (I). Моносахаридная фракция продуктов мягкого гидролиза представляла собой смесь примерно равных количеств рамнозы и фукозы. Последний моносахарид был выделен в индивидуальном виде ионообменной хроматографией на анионите в боратном буфере, и на основании величины удельного оптического вращения была установлена его *D*-конфигурация.

Полисахарид был подвергнут анализу методом метилирования, и частично метилированные моносахариды идентифицировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. В результате были обнаружены 1,2,5-три-*O*-ацетил-3,4-ди-*O*-метилрамнит, 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4-ди-*O*-метилрамнит и 1,3,4,5-тетра-*O*-ацетил-2-*O*-метилрамнит в соотношении $\sim 1:1,6:0,3$, а также следовые количества 1,4-ди-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-метилфуцита. Из этих данных следовало, что остаток фукозы находится в фуранозной форме и присоединен в положение 4 одного из остатков рамнозы, замещенных в основной цепи в положение 3. Заниженное содержание производного фукофуранозы в смеси частично метилированных моносахаридов может быть объяснено его частичным разложением в условиях кислотного расщепления метилированного полисахарида (ср., например, с частично метилированным производным галактофуранозы [16]) или неполнотой ацетилирования по $\text{O}4$ [17].

Место присоединения остатка фукозы к основной цепи было установлено путем анализа ^1H -ЯМР-спектра полисахарида (рис. 3). В аномерной области этого спектра по сравнению со спектром полисахарида (I) присутствует дополнительно сигнал $\text{H}1$ остатка фукофуранозы при 5,34 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 4,9 Гц), появляется сигнал $\text{H}1$ остатка рамнозы при 5,04 м.д. (уширенный синглет) с интенсивностью, примерно равной интенсивности сигнала $\text{H}1$ остатка фукозы, и уменьшается на такую же величину интенсивность сигнала $\text{H}1$ звена *A* при 5,09 м.д.; положение и интенсивность сигналов $\text{H}1$ звеньев *B* и *C* при 5,02 и 5,26 м.д. практически не изменяются. Частичное смещение сигнала $\text{H}1$ звена *A* указывает на то, что этот протон находится вблизи места присоединения остатка фукозы, т. е. принадлежит остатку рамнозы, гликозилирующему лежащий в узле разветвления моносахарид. Так как звено *A* присоединено к звену *B*, это последнее и находится в узле разветвления, откуда следует полная последовательность моносахаридных остатков в тетрасахаридных звеньях исходного полисахарида.

В ^{13}C -ЯМР-спектре исходного полисахарида отсутствуют сигналы аномерных атомов в более слабом поле, чем 104 м.д., что доказывает α -конфигурацию фукофуранозидной связи, так как в случае ее β -конфигурации атом $\text{C}1$ остатка фукофуранозы резонировал бы в более слабом поле, чем 108 м.д. [14]. Таким образом, содержащие фукозу тетрасахаридные

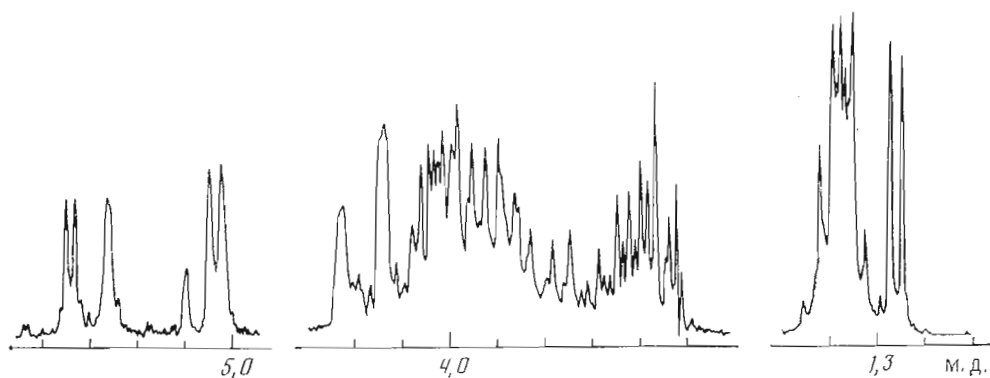


Рис. 5. ^1H -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* P-55 (область резонанса метильных групп умножена в 2 раза)

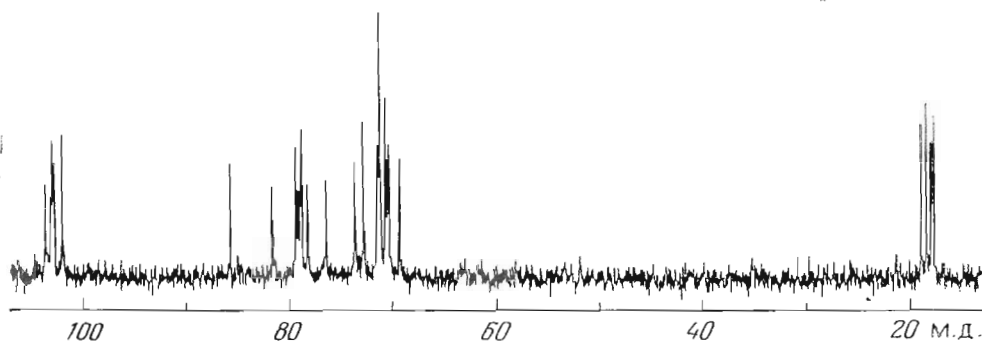
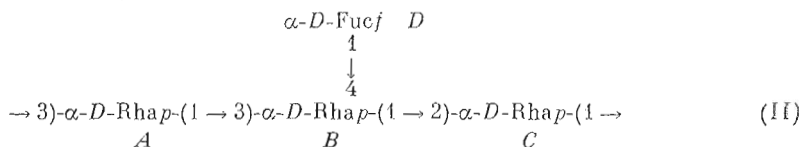


Рис. 6. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* P-55

звенья имеют структуру



Эта структура была подтверждена результатами полной расшифровки ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида, которая была выполнена путем сравнения со спектром рамнозы (I) и метил- α -фукофуранозиды (табл. 2).

Судя по соотношению интенсивностей сигналов доминирующей и минорной серий в ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектрах, относительному содержанию рамнозы и фукозы в гидролизате и соотношению частично метилированных производных рамнозы (см. выше), замещенными остатком фукофуранозы является около одной трети общего количества трисахаридных повторяющихся звеньев основной цепи. Таким образом, О-специфический полисахарид *P. syringae*, патовар *syringae* 218, построен из олигосахаридных звеньев структуры (I) и (II) в соотношении $\sim 2:1$.

Кислотный гидролиз полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* P-55, привел к рамнозе и фукозе в соотношении $\sim 3,7:1$. В ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектрах полисахарида (рис. 5, 6) присутствовала основная серия сигналов, отвечающая полимеру с тетрасахаридным повторяющимся звеном (II) и минорная серия сигналов со значительно меньшей интенсивностью, принадлежащих, наиболее вероятно, трисахаридным участкам структуры (I), как это было установлено путем сравнения со спектрами полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218 (рис. 3, 4, табл. 2).

При анализе полисахарида методом метилирования были идентифицированы 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамнит, 1,3,5-три-О-ацетил-

2,4-ди-О-метилрамнит и 1,3,4,5-тетра-О-ацетил-2-О-метилрамнит в соотношении ~1:1,2:0,7, а также следовые количества 1,4-ди-О-ацетил-2,3,5-три-О-метилфуцита (низкое содержание этого производного в смеси обсуждалось выше). Эти данные согласуются с выводом, сделанным при анализе ЯМР-спектров полисахарида.

Место присоединения остатка фукофуранозы в тетрасахаридных звеньях было подтверждено детальным анализом области апомерных протонов в ^1H -ЯМР-спектре, аналогичным анализу, проведенному для полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218. Протоны H1 остатков рамнозы A, B и C в трисахаридных звеньях структуры (I), не содержащих остатков фукофуранозы, резонируют при 5,09; 5,02 и 5,26 м.д. соответственно. В тетрасахаридных звеньях структуры (II) положение сигналов H1 звеньев B и C практически не изменяется, в то время как сигнал H1 звена A смещается к 5,04 м.д. Это указывает на близость этого протона и остатка фукофуранозы, который, следовательно, присоединен к звену B.

Судя по относительной интенсивности сигналов основной и мипорной серий в ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектрах, относительному содержанию рамнозы и фукозы в гидролизате и соотношению частично метилированных производных рамнозы, замещенными остатком фукофуранозы являются ~85% всех трисахаридных повторяющихся звеньев основной цепи. Таким образом, О-специфический полисахарид *P. syringae*, патовар *syringae* P-55, построен в основном из тетрасахаридных звеньев структуры (II) и содержит также небольшое количество не замещенных остатком фукофуранозы трисахаридных звеньев структуры (I).

Характерной особенностью всех трех изученных штаммов является присутствие в их О-антигенах D-рамнозы в качестве основного компонента. В двух из них обнаружен также другой редко встречающийся в бактериальных полисахаридах моносахарид — D-фукоза. Распространенность D-рамнозы в липополисахаридах фитопатогенных псевдомонад обсуждалась в предыдущем сообщении [1]. D-Фукоза кроме липополисахаридов *P. syringae*, патовар, *syringae*, найдена также в О-антигенах ряда других патоваров этого вида [18]. Фукоза с неустановленной абсолютной конфигурацией входит в состав липополисахаридов некоторых штаммов *P. syringae*, патовар *syringae*, изученных в работах [19, 20]. Судя по соотношению рамнозы и фукозы, легкости отщепления остатков фукозы с образованием рамнана и образованию при действии бактериофага А7 олигосахаридов, содержащих одновременно рамнозу и фукозу [20], можно предположить, что О-специфические полисахариды штаммов С414 и 81/21 имеют такую же структуру, что и изученный нами полисахарид *P. syringae*, патовар *syringae*, штамм P-55.

В основной цепи всех исследованных в настоящей работе полисахаридов лежит одинаковый по структуре D-рамнан, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев. У штамма *P. cerasi* 467 этот рамнан не несет боковых цепей и идентичен по структуре О-специфическому полисахариду *P. syringae*, патовар *morsprunorum* С28 [5], что свидетельствует о тесной близости этих микроорганизмов и целесообразности включения *P. cerasi* в вид *P. syringae* в ранге патовара. Интересно, что такую же по структуре основную цепь имеет О-специфический полисахарид *Alcaligenes faecalis* [21], что может являться указанием на филогенетическую связь между родом *Alcaligenes* с неопределенным таксономическим положением и псевдомонадами.

И наконец, следует отметить, что штаммы *P. syringae*, патовар *syringae* 218 и P-55, имеют сходные по принципу построения О-специфические полисахариды, отличающиеся друг от друга только степенью замещения основной цепи остатками фукофуранозы. Эти данные в сочетании с данными о тесной серологической взаимосвязи между О-антигенами (они будут опубликованы отдельно) показывают, что эти штаммы ошибочно отнесены в классификационной схеме [3] к различным серогруппам (II и III соответственно) и должны быть объединены в составе одной серогруппы.

Экспериментальная часть

¹H-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в D₂O при 50°С (ЯЭО определялись как описано ранее [4]), ¹³C-ЯМР-спектры — на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D₂O при 60°С с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δс 50,15 м.д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20°С. Гель-хроматография, анализ методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии проводились как в работе [4].

Выращивание бактериальных культур, получение сывороток и серологические тесты, выделение липополисахаридов проведено как описано [6]. Расщепление липополисахаридов 1% уксусной кислотой (100°С, 1,5 ч) и выделение О-специфических полисахаридов выполнено как описано в работе [4]. Кислотный гидролиз полисахаридов проводили 1 М трифторуксусной кислотой (100°С, 40 ч); ацетаты альдоновитрилов получали по методу [7]. Метилирование осуществляли по методу [22], частично метилированные моносахариды идентифицировали по данным [23].

Частичный кислотный гидролиз полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 218, проводили 0,1 М соляной кислотой (100°С, 4 ч), гидролизат лиофилизовали, гелефильтрацией на геле TSK HW 40 выделяли полисахарид (I) и моносахаридную фракцию, представляющую собой смесь рамнозы и фукозы в соотношении ~1:1. Эту фракцию разделяли ионообменной хроматографией на колонке (0,6×20 см) с анионитом DA×4 (Dugrum, США) в 0,5 М натрий-боратном буфере с pH 9,0, катионы удаляли обработкой катионитом КУ-2 (H⁺-форма), борную кислоту удаляли трехкратным упариванием с метанолом, получили D-фукозу, [α]_D +56,6° (с 0,1), ср. с данными [24] для L-фукозы, [α]_D -75,02° (вода).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Танатар Н. В., Солдаткина М. А., Шашков А. С., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 77–81.
2. Palleroni N. // Bergey's manual of systematic bacteriology. V. 1/Ed. Holt J. C. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. P. 141–199.
3. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. // Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 4. С. 330–339.
4. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253–1262.
5. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Hignett R. C. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 141. № 1. P. 73–78.
6. Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. Н. // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 65–70.
7. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1971. V. 19. № 3. P. 432–435.
8. Keller R. M., Wüthrich H. // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1–52.
9. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
10. Klyne W. // J. Biochem. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
11. Fisher E., Bergmann M. // Ber. 1920. V. 53. № 11. S. 2362–2388.
12. Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833–841.
13. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Vinogradov E. V., Knirel Y. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1987. In press.
14. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–65.
15. Knirel Y. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislawsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 3. P. 639–652.
16. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 50. № 3. P. 539–547.
17. Hofman J., Lindberg B., Hofstad T., Lygre H. // Carbohydr. Res. 1977. V. 58. № 2. P. 439–443.
18. 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.
19. Andersen A. J. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. № 4. P. 31–35.
20. Zamze S. E., Smith A. R. W., Hignett R. C. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 139. № 12. P. 3393–3401.
21. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1230–1239.
22. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлиа А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–278.
23. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. // J. Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1–75.
24. Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J. // The monosaccharides/Eds Ernest I., Heby J. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 434.

Поступила в редакцию
17.III.1987

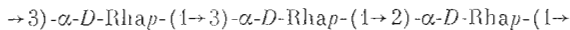
ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 26. STRUCTURE
OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAINS
OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM *PSEUDOMONAS CERASI* 467
AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* STRAINS 218
AND P-55, BELONGING TO SEROGROUPS II AND III

KNIREL Yu. A., ZDOROVENKO G. M.*, SHASHKOV A. S., MAMYAN S. S.,
YAKOVLEVA L. M.*, SOLYANIC L. P.*, ZAKHAROVA I. Y.*

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

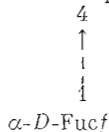
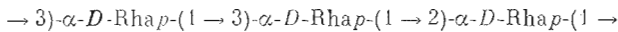
** D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Academy
of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Serologically active O-specific polysaccharides were obtained on mild acid hydrolysis of lipopolysaccharides from *Pseudomonas cerasi* 467 and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains 218 and P-55. On the basis of ¹H- and ¹³C-NMR analysis, it was concluded that the *P. cerasi* polysaccharide has the following structure:



which is identical to that of O-specific polysaccharide from *P. syringae* pv. *morsprunorum* C28 (Smith A. R. W. et al. Eur. J. Biochem., 1985, v. 149, No 1, p. 73-78).

The polysaccharides from *P. syringae* pv. *syringae* strains possess the same backbone but differ by the presence of *D*-fucose as monosaccharide branches. Methylation and ¹H- and ¹³C-NMR analysis revealed the following structure of these polysaccharides:



The degree of substitution of the backbone trisaccharide units by the fucofuranose residues is about 35% for the strain 218 and about 85% for the strain P-55.