



УДК 577.114.5

© 1992 г.

А. С. Шапков, А. Ф. Свиридов, И. В. Ботвинко*,
А. М. Семенов**

СТРУКТУРА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА *Prosthecomicrobium* *pneumaticum*

Институт органической химии им. П. Д. Зелинского РАН, Москва;
* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
** Институт микробиологии РАН, Москва

Установлена структура экзополисахарида *Prosthecomicrobium pneumaticum* ВКМ В-1389 методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии нативного полимера и модифицированного. Экзопалисахарид представляет собой ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-D-галактан, содержащий нестехиометрические количества 4,6-кетально-связанного пирувата, а также О-ацетата.

Prosthecomicrobium pneumaticum — представитель группы почкующихся простековых бактерий, интересных не только оригинальной морфологией, но также олиготрофным образом жизни. Экзогликаны этих бактерий практически не исследованы. В литературе есть сообщение лишь о полисахариде почкующейся бактерии *Nurphomicrobium* sp. JTS 811 [1]. Ранее нами уже сообщалось о способности *P. pneumaticum* В-1389 синтезировать экзогликан [2]. Было установлено, что это высокомолекулярный полисахарид, содержащий остатки галактозы, пирувата и ацетата. Дальнейшее исследование полимера с целью установления его строения проводили методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии нативного полисахарида (ПС I), а также его дезацетилированного депирувилированного производного (ПС II).

В спектре ^{13}C -ЯМР ПС I (рис. 1) помимо обычных для углеводов сигналов (95–98 м.д.— аномерные атомы углерода, 62–76 м.д.— остальные атомы углерода в сахарном остатке) имеются три сигнала, типичные для пируватной группировки [3]: 176,6 м.д., синглет в АРТ-спектре [4], COOH-группа; 102,0 м.д., четвертичный атом углерода, связанный с двумя атомами кислорода; сигнал CH_3 -группы при 26,2 м.д. АРТ-спектр выявил сигналы CH_2O -групп в области резонанса неаномерных атомов углерода сахаров: 62,2 м.д. (незамещенные С6 пираноз) и 68,8 м.д. (замещенные CH_2O -группы). Помимо перечисленных сигналов были видны слабые сигналы CH_3CO -групп (21,6 м.д.).

Предварительный анализ спектра ^{13}C -ЯМР ПС I с учетом данных по моносахаридному составу полимера показывает, таким образом, что полисахарид содержит α -связанные галактопиранозные остатки, частично замещенные по С4 и С6 пируватными группировками, химический сдвиг CH_3 которых отвечает экваториальной ориентации этой группы в шестичленном цикле (R-конфигурация). Некоторые остатки галактозы в ПС I ацетилированы.

Для выяснения типа связи галактозных остатков ПС I был дезацетилирован и депирувилирован. Большая величина оптического вращения полученного таким образом ПС II ($\alpha_D^{20} +303,0^\circ$, с 0,1; вода) свидетельствовала о D-конфигурации галактопиранозы. ПС II имел очень простой спектр ^{13}C -ЯМР (шесть сигналов), и его расшифровка не представляла труда при известном моносахаридном составе (рис. 2). Сильнопольный сдвиг аномерного атома углерода свидетельствует о ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-связи и рас-

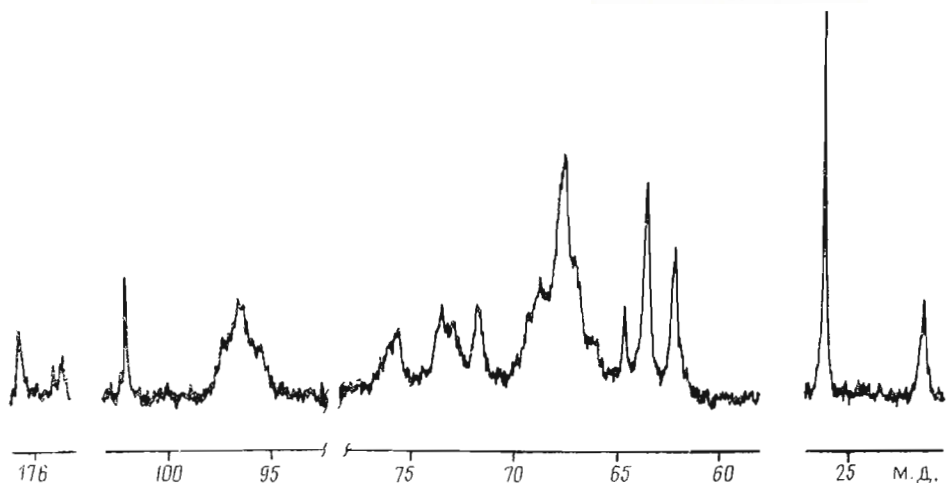


Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр ПС I в D_2O (стандарт – MeOH , 50,15 м. д. относительно $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$)

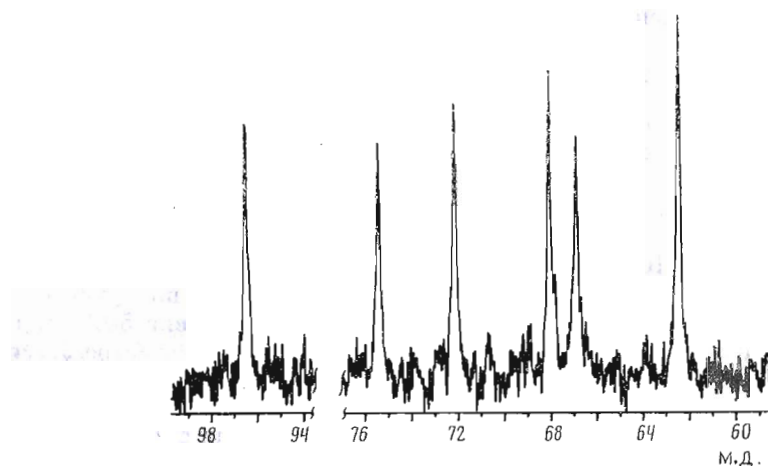


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр ПС II в D_2O (стандарт – MeOH , 50,15 м. д. относительно $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$)

чет [5] химических сдвигов в этом случае дает прекрасное совпадение с их экспериментальными значениями (таблица).

Таким образом, согласно данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии ПС I представляет собой $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ -связанный галактан, регулярность которого замаскирована наличием у части остатков 4,6-присоединенных (R)-пируватных группировок и O -ацетильных групп.

Итак, *P. pneumaticum* В-1389 синтезирует оригинальный экзополисахарид, представляющий собой частично пирувилированный и ацетилированный $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ - D -галактан. Количество остатков пирувата и ацетата в полимере варьирует в зависимости от условий роста бактерий. Полисахарид такого строения ранее в природе обнаружен не был. Ему близки более сложные по строению галактаны красных водорослей и экзополисахариды штаммов *Pseudomonas marginalis*, *Rhizobium meliloti*, также включающие остатки 3-замещенной α - D -галактозы и C_4 , C_6 -кетально-связанные остатки пирувата [6–8]. $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ -Галактаны обнаружены в

Химические сдвиги ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.) ПС I, ПС II и модельных соединений

Остаток	Источник данных	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 3\text{-DGalp}\alpha_1\rightarrow$	Расчет [5]	96,8	68,1	75,3	66,9	72,2	62,4
$\rightarrow 3\text{-DGalp}\alpha_1\rightarrow$	ПС II	96,5	68,1	75,5	66,9	72,2	62,5
$\rightarrow 3\text{-DGalp}\alpha_1\rightarrow$	ПС I	96,5	67,8	75,7	67,1	71,8	62,2
$\rightarrow 3\text{-DGalp}\alpha_1\rightarrow$	ПС I	95,7*					
$\rightarrow 3\text{-DGalp}\alpha_1\rightarrow$	ПС I	97,3	67,5	73,3	73,1	63,6	68,8
$\begin{array}{c} 4 \quad 6 \\ \diagdown \quad / \\ \text{HOOCCH}_3 \end{array}$		176,6**	102,0**	26,2**			

* Химический сдвиг сахарного остатка, гликозилирующего сахар с пируватной группировкой.

** Химические сдвиги С-атомов остатков пирувата.

липополисахаридах *Klebsiella* серогрупп O1 и O6 [9], а также штаммов *Klebsiella* (*Aerobacter aerogenes*) A3 (S1) и NCTC 243, где они содержат ответвления при C4 [10]. Капсульный полисахарид *Klebsiella* K51 тоже представляет собой ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-галактан, остатки которого несут чередующиеся дисахаридные цепочки из остатков глюкозы и глюкуроновой кислоты [11].

Экспериментальная часть

Штамм *Prosthecomicrobium pneumaticum* В-1389 был получен из Всесоюзной коллекции микроорганизмов (ВКМ) АН СССР. Культивирование бактерий, выделение и очистку экзогликана проводили в условиях, описанных ранее [2]. Там же приведены методы первичного анализа полимера.

Спектры ^{13}C -ЯМР ПС I и ПС II в виде растворов в D_2O снимали на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 75,43 МГц при 70°C , внутренний эталон — MeOH (хим. сдвиг 50,15 м.д. от $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). Удельное вращение ПС II измеряли на поляриметре Jasco DIP-360 (Япония).

Деацетилирование ПС I. 150 мг ПС I растворяли в 20 мл дистиллированной воды, добавляли 0,6 мл Et_3N , нагревали 2 ч при 60°C , затем диализовали против водопроводной воды 16 ч и лиофилизировали. Выход 120 мг.

Депирувилрование деацетилированного ПС I. 120 мг полученного полимера растворяли в 12 мл дистиллированной воды, подкисляли 1 н. HCl до pH 4,0 и нагревали 1 ч на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор диализовали и лиофилизировали. Выход ПС II 80 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kanamaru K., Hieda T., Iwamuro Y., Mikami Y., Obi Y., Kisaki T. // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 10. P. 2411–2417.
2. Семенов А. М., Богвинок И. В. // Микробиология. 1988. Т. 57. № 3. С. 511–512.
3. Garegg P. J., Jansson P.-E., Lindberg B., Lindh F., Lönnngren J., Kvarnström I., Nimnich W. // Carbohydr. Res. 1980. V. 78. № 1. P. 127–132.
4. Patt S. L., Shooley J. N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. № 3. P. 535–539.
5. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59–75.
6. Усова А. И. // Прогресс химии углеводов / Ред. И. В. Торгов. М.: Наука, 1985. С. 77–96.
7. Osman S. F., Fett W. F. // Carbohydr. Res. 1990. V. 199. № 1. P. 77–82.
8. Her C.-R., Clazebrook J., Walker C. C., Reinhold V. N. // Carbohydr. Res. 1990. V. 198. № 2. P. 305–312.

9. Björndal H., Lindberg B., Nimmich W. // *Asta chem. scand.* 1971. V. 25. № 2. P. 750.
10. Koeltzow D. E., Epley J. D., Conrad H. E. // *Biochemistry.* 1968. V. 7. № 8. P. 2920–2928.
11. Chakraborty A. K., Dabrowski U., Geyer H., Geyer R., Stirm S. // *Carbohydr. Res.* 1982. V. 103. № 1. P. 101–105.

Поступила в редакцию
5.VII.1991

A. S. SHASHKOV, A. F. SVIRIDOV, I. V. BOTVINKO*. A. M. SEMIONOV**

**THE STRUCTURE OF THE EXOPOLYSACCHARIDE OF
*PROSTHECOMICROBIUM PNEUMATICUM***

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

** M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

*** Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The exopolysaccharide of *Prosthecomicrobium pneumaticum* VKM B-1389 has been investigated by ^{13}C NMR spectroscopy of the native polymer and its modification product. The polysaccharide is (α 1–3)-D-galactan with varying ratio of 4,6-pyruvate ketal and O-acetyl groups.