



УДК 547.458.02:543.422.23

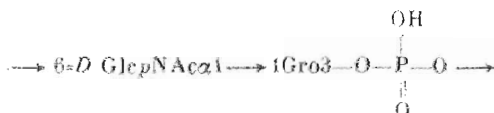
© 1992 г.

Р. Ш. Горшкова, В. В. Исаков, Н. А. Командрова,
Е. Р. Иванова, Ю. С. Оводов

СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОГЛИКАНОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *BACILLUS PUMILUS*

Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВО РАН, Владивосток

Из клеточной стенки *Bacillus pumilus* КММ 3-35-7/1 выделены и охарактеризованы маннан и тейхоевая кислота. Показано, что маннан представляет собой разветвленный полисахарид, подобный маннанам дрожжей; тейхоевая кислота содержит остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, глицерина и фосфата. На основании данных ^{13}C и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии тейхоевой кислоты и дефосфорилированного олигосахарида установлена структура ее повторяющегося звена:

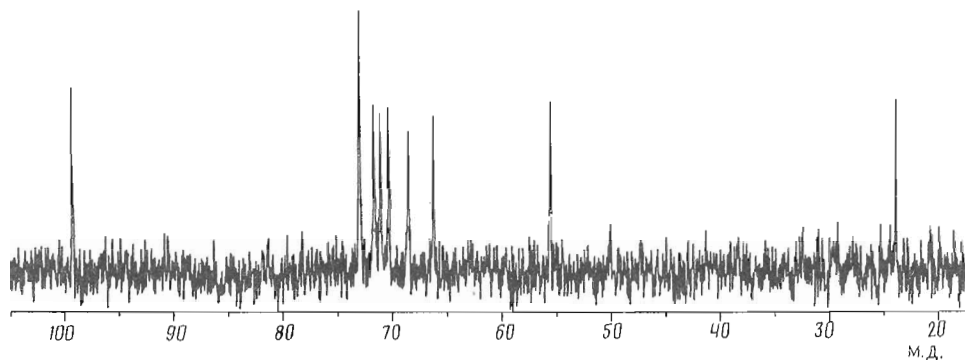


Из культуральной жидкости получены идентичные по строению вышеописанные маннан и тейхоевая кислота, при этом бактерия выделяет в культуральную жидкость в 2 раза больше маннана и тейхоевой кислоты, чем их содержится в клеточной стенке.

Для исследования взята грамположительная морская бактерия *Bacillus pumilus* КММ 3-35-7/1 из коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО АН СССР. Исследуемую культуру выращивали на среде Youschi-tuzi-Kimura [1] в колбах на качалке. Клетки отделяли от культуральной жидкости на проточной центрифуге.

Тейхоевую кислоту и нейтральный полисахарид выделяли из клеток и культуральной среды. Клетки микроорганизма экстрагировали 10% трихлоруксусной кислотой, биополимеры очищали от сопутствующего белка обработкой по Вестфалу [2], разделяли с помощью хроматографии на DEAE-Toyopearl 650M; при этом трис-HCl-буфером элюируется нейтральный полисахарид, а трис-NaCl - тейхоевая кислота. Полисахарид очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, при этом сразу за свободным объемом колонки выходит нейтральный полисахарид, $[\alpha]_{578}^{20}$ 45° (с 1,0, H₂O), в гидролизате которого БХ и ГЖХ в виде ацетата полиола идентифицирован единственный моносахарид манноза, в качестве второй фракции элюируется тейхоевая кислота, $[\alpha]_{578}^{20}$ 24° (с 1,0, H₂O).

При выделении биогликанов из культуральной жидкости последнюю упаривали, центрифугировали, диализовали, полимеры осаждали спиртом. Нейтральный маннан и тейхоевую кислоту разделяли последовательно хроматографией на DEAE-Toyopearl 650M и гель-фильтрацией на сефадексе G-50, как и при выделении из клеток. Маннан и тейхоевая кислота из культуральной жидкости идентичны по моносахаридному составу и спектрам ^{13}C -ЯМР соответствующим полимерам из клеточной стенки. Содержание маннана и тейхоевой кислоты в культуральной жидкости вдвое больше, чем в клеточной стенке.



^{13}C -ЯМР-спектр тейхоевой кислоты *B. pumilus* КММ 3-35-7/1

Маннан метилировали по Хакомори [3]. В сполна метилированном маннани хроматомасс-спектрометрией идентифицированы 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-*D*-манноза, 3,4,6-три-*O*-метил-*D*-манноза, 2,3,4-три-*O*-метил-*D*-манноза и 3,4-ди-*O*-метил-*D*-манноза в соотношении 2 : 1 : 0,7 : 1,7 соответственно. Таким образом, в результате полученных данных можно сделать вывод, что маннан является разветвленным полисахаридом. Основная цепь его состоит из остатков 1,6-связанной маннозы, во второе положение которой присоединяются боковые цепи, построенные из остатков 1,2-связанной маннозы; при этом некоторые остатки маннозы в главной цепи не замещены. Следовательно, полученный маннан, по данным метилирования, подобен маннанам дрожжей [4–6].

В ^{13}C -ЯМР-спектре маннана в аномерной области атомов углерода наблюдаются четыре сигнала при 103,0, 101,5, 100,6 и 99,3 м.д., аналогичные описанным ранее [4–6] сигналам маннанов дрожжей. Таким образом, данные спектра ^{13}C -ЯМР маннана подтверждают результаты метилирования.

Тейхоевая кислота обладает серологической активностью, дает одну полосу преципитации с антисывороткой в агаре, при иммунном электрофорезе движется к аноду. В гидролизате тейхоевой кислоты идентифицированы глюкозамин и глицерин в соотношении 1 : 1.

Показано, что в составе тейхоевой кислоты содержится 32,5% глюкозамина и 5,4% фосфора. В спектре ^{31}P -ЯМР тейхоевой кислоты наблюдается сигнал при $\delta +1,4$ м.д., указывающий на присутствие в структуре тейхоевой кислоты дизамещенного фосфата [7]. Таким образом, в состав тейхоевой кислоты входят остатки 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы, глицерина и фосфата.

В спектре ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты (рисунок) наблюдается 10 сигналов, соответствующих 11 углеродным атомам. В области резонанса аномерных *C*-атомов сахаров наблюдается один сигнал при δ 98,4 м.д. и $J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 173 Гц. Кроме того, в спектре присутствуют характерные сигналы *C*-атома, связанного с азотом (δ 54,8 м.д.), и *C*-атомов ацетамидной группы (δ 23,2 и 173,3 м.д.). Эти данные подтверждают наличие в структуре тейхоевой кислоты остатка 2-амино-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозы [8]. Сигналы при δ 65,5, 68,3 и 69,6 м.д. принадлежат гидроксиметильным группам, их величины указывают на участие этих групп в образовании связи. Отсутствие сигнала *C*-атома свободной гидроксиметильной группы в области 60–63 м.д. позволяет предположить, что *C*6-атом остатка 2-амино-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозы замещен.

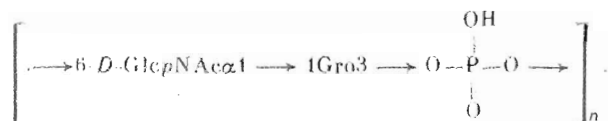
Химические сдвиги (δ) атомов углерода в спектрах дефосфорилированного производного и тейхоевой кислоты

Фрагмент	C1	C2	C3	C4	C5	C6	CH ₂ CO	
GlcNAc α 1-	98,4	54,8	72,2	71,5	73,2	61,4	23,4	175,5
-1Gro	69,3	70,1	63,9					
(-6GlcNAc α 1-	98,4	54,8	72,1	71,0	72,1	65,5 *	23,2	173,3
-1Gro3-PO ₄ -)	69,6	70,3 *	68,5 *					

* Сигналы уширены.

При дефосфорилировании тейхоевой кислоты 40% HF и гель-фильтрации продуктов реакции на TSK-40 выделен олигосахарид, $[\alpha]_{578}^{20} -2,8^{\circ}$ (с 3,0, H₂O), в спектре ¹³C-ЯМР которого в области резонанса аномерных С-атомов наблюдается один сигнал при 98,4 м.д. с J_{C1-H1} 173 Гц, а восемь сигналов моносахаридного остатка совпадают по положению с восемью сигналами метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид [8]. Кроме того, сигналы при 69,3 и 63,9 м.д. являются гидроксиметиленовыми и совпадают по положению с сигналами углеродных атомов глицерина, гликозилированного по С1 [9]. Из приведенного анализа спектра ¹³C-ЯМР дефосфорилированного олигосахарида однозначно следует, что он является 1-(2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкозил)глицерином. Сопоставление спектров дефосфорилированного производного и исходного полисахарида (таблица) показывает, что С6-атом остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы в тейхоевой кислоте гликозилирован (сдвиг в слабое поле $\Delta\delta$ 3,6 м.д.). Этот вывод подтверждает и сдвиг сигнала С5-атома аминосахара в сильное поле: β -эффект $\Delta\delta$ 1,1 м.д. Кроме того, при сопоставлении спектров видно, что сигнал С3-атома глицерина сдвигается в слабое поле ($\Delta\delta$ 4,5 м.д.) и соответствует химическому сдвигу С3-атома глицерина, связанного с фосфатной группой [9].

Таким образом, из данных ³¹P- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии вытекает, что повторяющееся звено исследуемой тейхоевой кислоты имеет структуру



Экспериментальная часть

Аналитическую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 в системе растворителей *n*-бутанол - пиридин - вода (6:4:3). Моносахариды обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра, аминосахара - 2% раствором нингидрина в ацетоне. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin - Elmer, модель 141. Растворы лиофилизовали или унашивали в вакууме при 40° С.

Гель-фильтрацию осуществляли на колонках с сефадексом G-50 (3×75 см), G-25 (2×60 см) в 0,3% уксусной кислоте, TSK-40(F) (1,5×80 см) в воде. Ионообменную хроматографию проводили на колонке с DEAE-Toyorearl 650M (3×35 см) в трис-HCl-буфере (pH 7,0), кислую фракцию элюировали 0,5 M NaCl в том же буфере. Детектирование фракций осуществляли с помощью дифференциального рефрактометра Ridk-101 (ЧСФР).

ГЖХ выполняли на приборе Pye-Uniscam-104 с использованием стеклянных колонок (0,4×150 см), упакованных 3% QF-1 на Gas-Chrom Q

(100–120 меш). Ацетаты полиолов анализировали в программе температур 175–225° С (5°/мин), ацетаты частично метилированных метилгликозидов — в интервале температур 125–225° С (5°/мин). ГЖХ-масс-спектрометрию выполняли на приборе LKB-9000S с использованием колонок той же фазы.

Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе Biotonic LC-2000 в колонках (0,22×6 см), упакованных смолой DC-6A. Фосфор определяли по методике [10].

³¹P-ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-250 при 20° С относительно 85% H₃PO₄. ¹³C-ЯМР-спектры получали на том же приборе в D₂O при 80° С. в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ 50,15 м.д.).

Микроорганизмы. Культура *Bacillus pumilus* КММ 3-35-7/1 получена из коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО АН СССР. Бацилла выделена из губки *Bajalus laxus* Lendenfeld во время экспедиционного рейса НИС «Академик Опарин» в 1986 г. и идентифицирована как *B. pumilus* на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков [11]. Культуру выращивали в среде Youschitzki — Kimura [1] в 20-л колбах на качалках в течение 1 сут при –25° С. Клетки отделяли от культуральной жидкости на проточной центрифуге С-40.

Выделение полимеров из клеточной стенки. Клетки, полученные из 20 л среды, экстрагировали 10% трихлоруксусной кислотой (200 мл) дважды в течение 12 и 24 ч при 4° С при перемешивании на магнитной мешалке. Экстракты центрифугировали при 7000 об/мин, надосадочные растворы диализовали против проточной воды 2 сут, упаривали до 100 мл, осаждали пятью объемами этанола. Выход полимерной фракции 460 мг. Полученную фракцию растворяли в воде и обрабатывали 45% фенолом по Вестфалю [2]. Выход смеси биогликанов 260 мг.

Полученную смесь (250 мг) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Toyopearl 650M. Трис-НСI-буфером (50 мМ, рН 7,0) элюировали нейтральную фракцию (80 мг), трис-NaCl (0,5 М) — тейхоевую кислоту (130 мг). При разделении нейтральной фракции на колонке с сефадексом G-50 выделяли две фракции: 1) маннан (60 мг), 2) тейхоевую кислоту (10 мг).

Выделение экзополисахаридов. Культуральную жидкость (20 л) концентрировали до 2 л, осадок отделяли центрифугированием при 7000 об/мин, раствор диализовали против проточной воды в течение 2 сут. Раствор упаривали, центрифугировали и осаждали пятью объемами этанола. Выход сырого лиофилизованного препарата 6,7 г. Препарат (6,6 г) растворяли в 200 мл трис-НСI-буфера, трижды добавляли в раствор DEAE-целлюлозу, каждый раз фильтруя раствор через фильтр Шотта № 1. Кислую фракцию вымывали с DEAE-целлюлозы на фильтре трис-NaCl-буфером. Получали приблизительно по 1 г нейтральной и кислой фракции. Нейтральную фракцию (310 мг) фракционировали на колонке с сефадексом G-50, выделяли 200 мг маннана и 28 мг тейхоевой кислоты. Кислую фракцию (1 г) разделяли на колонке с DEAE-Toyopearl 650M, выделяли три фракции: 1) нейтральную (35 мг), 2) 100 мг, 3) тейхоевую кислоту (320 мг).

100 мг тейхоевой кислоты очищали на колонке с сефадексом G-25, получали 90 мг кислоты, которая выходила одним пиком сразу за свободным объемом колонки.

Полный кислотный гидролиз. Маннан и тейхоевую кислоту (10 мг) гидролизовали 3 ч в ампулах 2 н. НСI (1 мл) при 100° С, упаривали с метанолом 3 раза и исследовали БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Тей-

хоевую кислоту (2 мг) гидролизovali 4 ч 4 н. HCl при 100° С, упаривали 3 раза с метанолом и подвергали аминокислотному анализу.

Метилирование. Маннан (20 мг) метилировали по Хакомори [3], диа-лизovali, упаривали. Выход 15 мг. Сполна метилированный маннан (10 мг) подвергали метанолизу в течение 3 ч смесью HClO₄ — метанол (1 : 2 : 10) при 100° С, нейтрализовали дауэксом (НСО₃⁻-форма), фильтровали, упаривали и ацетилировали. Ацетаты частично метилированных метил-гликозидов идентифицировали ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрией.

Дефосфорилирование. 90 мг теихоевой кислоты растворяли в 2,5 мл 40% HF и выдерживали 2 сут при 4° С, кислоту удаляли высушиванием в вакуум-эксикаторе над NaOH. Полученный продукт хроматографировали на TGКНВ-40 (F), выделяя дефосфорилированный дисахарид (50 мг), $[\alpha]_{578}^{20} -2,8^{\circ}$ (с 1,0, Н₂O).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Youschimizu P., Kimura T. // Fish. Pathol. 1976. V. 10. № 2. P. 243-259.
2. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. V. 7B. С. 148-155.
3. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205-208.
4. Tojo M., Shibata N., Ban Y., Suzuki S. // Carbohydr. Res. 1990. V. 199. P. 215-226.
5. Кочин П., Маслер Л., Шандула И., Усов А. И., Шапков А. С., Яроцкий С. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 536-544.
6. Kogan G., Pavliar V., Sandula J., Masler L. // Carbohydr. Res. 1988. V. 184. P. 171-182.
7. Egan W., Shincerson R., Werner K. E., Lon G. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898-2910.
8. Шапков А. С., Евсезнев А. Ю., Дерезицкая В. А. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495-1506.
9. Boer V. K. D., Kruyssen F. J., Wouters J. T. M., Kruk C. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 1. P. 1-6.
10. Chem P. S., Torribana T. V., Warner H. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 1756-1760.
11. Williams and Wilkins. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore -- London.

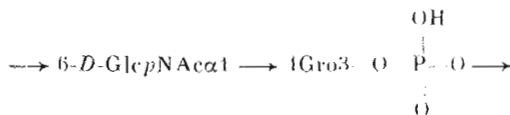
Поступила в редакцию
26.VI.1991

R. P. GORSHKOVA, V. V. ISAKOV, N. A. KOMANDROVA, E. P. IVANOVA,
Yu. S. OVODOV

STRUCTURAL STUDIES OF BIOGLYCANS PRODUCED BY *BACILLUS PUMILUS*

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy
of Sciences, Vladivostok*

A mannan and a teichoic acid were isolated from the cell wall of *Bacillus pumilus* KMM 3-35-7/1 and characterized. The mannan was shown to be a branched polysaccharide closely related to the yeast-like fungi mannans. The teichoic acid was found to contain residues of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose, glycerol and phosphate. On the basis of ¹³C- and ³¹P NMR spectral data of the teichoic acid and its dephosphorylation product, the structure of the repeating unit of the teichoic acid was suggested as follows:



The identical mannan and teichoic acid as exoglycans were isolated from the cultural medium of *B. pumilus* in amounts twice as large as from the cell wall.