



УДК 577.114.5:579.841.11:543.422.23

СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Marinomonas communis* ШТАММА АТСС 27118(Т)

© 1999 г. В. А. Зубков, Е. Л. Назаренко[#], Е. П. Иванова, Н. М. Горшкова, Р. П. ГоршковаТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 23.07.98 г.

Принята к печати 17.11.98 г.

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из *Marinomonas communis* штамма АТСС 27118(Т). На основании данных углеводного анализа, метилирования и ¹³С-ЯМР-спектроскопии установлена структура полисахарида, представляющего собой гомополимер, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев следующего строения: $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow$

Ключевые слова: *Marinomonas communis*; О-специфический полисахарид; метилирование; ЯМР-спектроскопия.

Морские микроорганизмы рода *Marinomonas* выделены в самостоятельный таксон из рода *Pseudoalteromonas* (*Alteromonas*) в 1983 г. на основании данных ДНК-рРНК-гибридизации [1]. В настоящее время известны только два вида данного рода: *M. vaga* и *M. communis*. Представители обоих видов являются автохтонными обитателями океана и выделены из проб морской воды в районе Гавайского архипелага. Следует отметить, что таксономия и физиологические особенности этих грамотрицательных гетеротрофных бактерий с окислительным типом метаболизма практически не изучены, а хемотаксономические признаки, позволяющие дифференцировать представителей данной группы, фактически отсутствуют. В этой связи, структурное исследование О-антигенных полисахаридов, определяющих тонкую иммуноспецифичность и хемотаксономические признаки данных бактерий, является весьма актуальной.

Данная работа посвящена структурному исследованию О-специфического полисахарида *M. communis* типового штамма АТСС 27118(Т). Липополисахарид (ЛПС) выделен из микробной биомассы экстракцией водным фенолом [2] и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой.

При мягкой уксуснокислотной деградации ЛПС с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 получен О-специфический полисахарид (ПС) и низкомолекулярная фракция, которая в дальнейшем не исследовалась. В гидролиза-

те ПС с помощью БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов сравнением с заведомым образцом идентифицирован единственный моносахарид – рамноза. Для определения ее абсолютной конфигурации моносахарид выделен из гидролизата препаративной БХ и на основании величины удельного оптического вращения рамнозы и полученного из нее путем мягкого метанолиза метилрамнозида установлено, что моносахарид имеет L-конфигурацию.

¹³С-ЯМР-спектр ПС (таблица) указывает на регулярный характер и трисахаридный размер его повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы метильной группы 6-дезоксисахара при 17.9 м.д. (тройной интегральной интенсивности), трех аномерных атомов углерода при 101.8, 103.1 и 103.2 м.д., трех неаномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей, при 79.0 (двойной интегральной интенсивности) и 79.2 м.д., а также 9 сигналов вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 70–74 м.д. Таким образом, полисахарид построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из остатков L-рамнозы, причем величины химических сдвигов аномерных атомов углерода и констант спин-спинового взаимодействия (КССВ), определенные из ¹³С-ЯМР-спектра, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий для аномерных атомов углерода ($J_{C,H} \sim 170$ Гц), свидетельствуют о α -конфигурации всех моносахаридных остатков [3]. Величины КССВ подтверждают также заключение о пиранозной форме всех остатков рамнозы (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц) [4]. Спектр независимо расшифрован на основании

[#] Автор для переписки (e-mail: elnaz@piboc.marine.su; тел./факс: (4232) 31-40-50).

Данные ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида *M. communis* ATCC 27118(T) (δ , м. д.)*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→2)- α -L-Rhap-(1→	101.8 (102.1)	79.2 (79.8)	71.2 (71.3)	73.5 (73.5)	71.2 (70.4)	17.9 (18.0)
→3)- α -L-Rhap-(1→	103.2 (103.5)	71.2 (71.4)	79.0 (78.8)	72.8 (72.9)	70.5 (70.4)	17.9 (18.0)
→3)- α -L-Rhap-(1→	103.1 (103.3)	71.2 (71.4)	79.0 (78.8)	72.6 (72.9)	70.4 (70.4)	17.9 (18.0)

* Химические сдвиги измерены относительно метанола (δ_{C} , MeOH 50.15 м. д.). В скобках приведены расчетные данные [5].

данных компьютерного расчета по методу [5] (таблица). При этом сумма квадратичных отклонений (S) химических сдвигов для приведенной ниже структуры в расчетном и экспериментальном спектрах составила 0.5.

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде определен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [6] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов идентифицированы 2,4-ди-*O*-метилрамноза и 3,4-ди-*O*-метилрамноза в соотношении ~ 2 : 1. Эти данные подтверждают триозидный размер повторяющегося звена и свидетельствуют о линейном его характере. Кроме того, отсюда следует, что звено содержит 2 остатка 1 → 3- и 1 остаток 1 → 2-связанной *L*-рамнозы и что трисахаридное повторяющееся звено *O*-специфического полисахарида *M. communis* имеет следующее строение:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

^{13}C -ЯМР-спектр записывали на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 60°C; в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ_{C} 50.15 м.д.).

Растворы лиофилизировали или упаривали в вакууме. Оптическое вращение измеряли на приборе Perkin-Elmer 141. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3MM в системе растворителей *n*-бутанол–пиридин–вода (6 : 4 : 3) при обнаружении моносахаридов щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию выполняли на колонке (2.5 × 100 см) с сефадексом G-50 в 0.3% уксусной кислоте. Элюиционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK 101 (ЧСФР).

Использовали типовой штамм микроорганизма *M. communis* ATCC 27118(T). Культивирование бактерий и выделение ЛПС проводили как описано ранее [7].

Выделение *O*-специфического полисахарида. ЛПС (400 мг) гидролизировали 1% уксусной кислотой (40 мл, 100°C, 3 ч), осадок липида А удаляли центрифугированием (54 мг, 13.5%), раствор концентрировали, гель-хроматографией на сефадек-

се G-50 получали полисахарид, выходящий за свободным объемом колонки (244 мг, 61%), и низкомолекулярную фракцию (40 мг, 10%), которая в дальнейшем не исследовалась.

Полный кислотный гидролиз полисахарида (2 мг) проводили 2 М CF_3COOH (0.5 мл, 120°C, 2 ч), гидролизат упаривали и анализировали БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. В препаративном варианте гидролиза использовали 20 мг полисахарида и 2 мл кислоты; препаративной БХ выделили *L*-рамнозу (8 мг) $[\alpha]_D +7.1^\circ$ (*c* 0.8, вода), которую обработкой 1 М хлористым водородом в абсолютном метаноле (2 мл, 100°C, 1 ч) превращали в метил-*L*-рамнозид $[\alpha]_D -58^\circ$ (*c* 0.5, вода) (ср. [8]: $+9.1^\circ$ и -62.5° , соответственно).

Метилирование полисахарида (5 мг) осуществляли по методу [6], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированный полимер выделяли с помощью патрона Sep Pak C_{18} (Waters), подвергали гидролизу 2 М CF_3COOH (1 мл, 120°C, 2 ч), превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией.

Работа частично финансирована РФФИ (гранты № 96-04-49028 и 96-04-49058).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Landschoot A., De Ley J. // J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. P. 3057–3074.
2. Westphal O., Luderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. Teil B. 7 B. 1952. P. 148–155.
3. Bock A., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans II. 1974. № 4. P. 293–297.
4. Cyr N., Perlin A.S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. P. 2504–2511.
5. Кочетков Н.К., Виноградов Е.В., Книрель Ю.А., Шаилов А.С., Липкинд Г.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 116–125.
6. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205–208.
7. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков В.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С., Шаилов А.С., Книрель Ю.А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 327–336.
8. Micheel F., Klemm A. Chemie der Zucker und Polysaccharide. Leipzig: Acad. Verlag, 1956. P. 463, 429.

The Structure of the Repeating Unit of the O-Specific Polysaccharide from *Marinomonas communis* ATCC 27118(T)

V. A. Zubkov, E. L. Nazarenko[#], E. P. Ivanova, N. M. Gorshkova, and R. P. Gorshkova

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

The O-specific polysaccharide from *Marinomonas communis* ATCC 27118(T) was isolated and characterized. Based on carbohydrate analysis, methylation, and ¹³C NMR spectroscopy; this polysaccharide was found to be a homopolymer built of trisaccharide repeating units of the following structure: $\longrightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\longrightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\longrightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\longrightarrow$.

Key words: Marinomonas communis, O-specific polysaccharide, methylation, NMR spectroscopy

[#] To whom correspondence should be addressed; phonelfax: (4232) 31-4050; e-mail: elnaz@piboc.marine.su.