



УДК 547.426.2'455.623'233'118.02

ЛИЗИЛТЕЙХОВАЯ КИСЛОТА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
STREPTOMYCES ROSEOFILAVUS VAR.
ROSEOFUNGINI 1128

Наумова И. Б.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Шапиков А. С.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Скоблilова Н. К., Агре Н. С.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Пушкино

Романов В. В.

Лабораторный корпус «А» Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова

Методами химической деградации и спектроскопии ^{13}C -ЯМР установлена структура тейхоевой кислоты клеточной стенки *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128. Полимер состоит из 11–13 глицерофосфатных единиц, объединенных по типу 1,3; 25–30% глицериновых остатков замещены по С2–ОН 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозильными и 20–30% – L-лизильными группами. Тейхоевая кислота составляет ~50% сухого веса клеточной стенки.

Большинство представителей рода *Streptomyces* содержат в составе клеточных стенок тейхоевые кислоты, которые построены из остатков рибита или глицерина, соединенных фосфодиэфирными связями [1]. Наиболее широко распространены глицеринтейхоевые кислоты, структурное разнообразие которых обусловливается качественным и количественным содержанием гликозильных заместителей, а также типом фосфодиэфирной связи. Пока не найдено двух одинаковых по структуре тейхоевых кислот в клеточных стенках двух разных стрептомицетов. Обнаружены 1,3- [2] и 2,3-поли(глицерофосфатные) структуры [3], а также поли(глюкозилглицерофосфат) [4]. Отличительной чертой тейхоевых кислот стрептомицетов по сравнению с тейхоевыми кислотами других групп грамположительных бактерий является присутствие в них разнообразных О-ацильных заместителей, ацетильных, сукцинильных [5], L-лизильных [6], и отсутствие среди них D-аланильных. В настоящем сообщении мы описываем структуру глицеринтейхоевой кислоты из клеточной стенки *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini*. Клеточная стенка была получена из мицелия, взятого в середине логарифмической стадии роста, тейхоевая кислота выделена из нее последовательной экстракцией 10% трихлоруксусной кислотой при 4° С в течение 24 ч (препарат 1) и затем в течение 48 ч (препарат 2) (см. табл. 1).

Жесткий кислотный гидролиз (2 н. HCl, 3 ч, 100° С) обоих препаратов привел к одинаковым продуктам – глицерину, его моно- и дифосфатам, глюкозамину, лизину, неорганическому фосфату, уксусной кислоте, которые были идентифицированы с помощью электрофореза, БХ и ГЖХ.

Сокращения: P_i – неорганический фосфат, P_{общ} – общее содержание фосфора, P_{нк} – фосфор нуклеиновых кислот, P_{тк} – фосфор тейхоевых кислот.

Характеристика клеточной стенки *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* и препаратов тейхоевой кислоты, полученных из нее *

Материал	P _{общ}	P _{НК}	P _{ТК}	Lys	GlcN	P _{ТК} : Lys	P _{ТК} : GlcN
						моль/моль	
Клеточная стенка	4,45	0,11	4,34	4,84		4,2:1,0	
Препарат 1	7,35	0,01	7,34	7,36	12,84	4,7:1,0	3,3:1,0
Препарат 2	9,61	0,01	9,60	7,50	9,70	6,0:1,0	5,7:1,0

* Содержание фосфора, Lys и GlcN приведено в процентах от веса воздушно-сухого образца.

Для дополнительной идентификации аминсахара проведено его окисление нингидрином в пирролине [7] с последующим определением образовавшейся арабинозы с помощью БХ. При мягком кислотном гидролизе (0,1 н. HCl, 30 мин, 100°С) среди продуктов реакции обнаружены лизин и N-ацетилглюкозамин, идентифицируемые БХ сравнением со стандартным образцом.

При щелочном гидролизе оба препарата тейхоевой кислоты образовали моно- и дифосфаты глицерина (IIa, б), глицерин, лизин, в небольших количествах два фосфодиэфира глицерина (III) и (IV) и гликозид (V) (см. схему). Установление структуры этих соединений было проведено следующим образом.

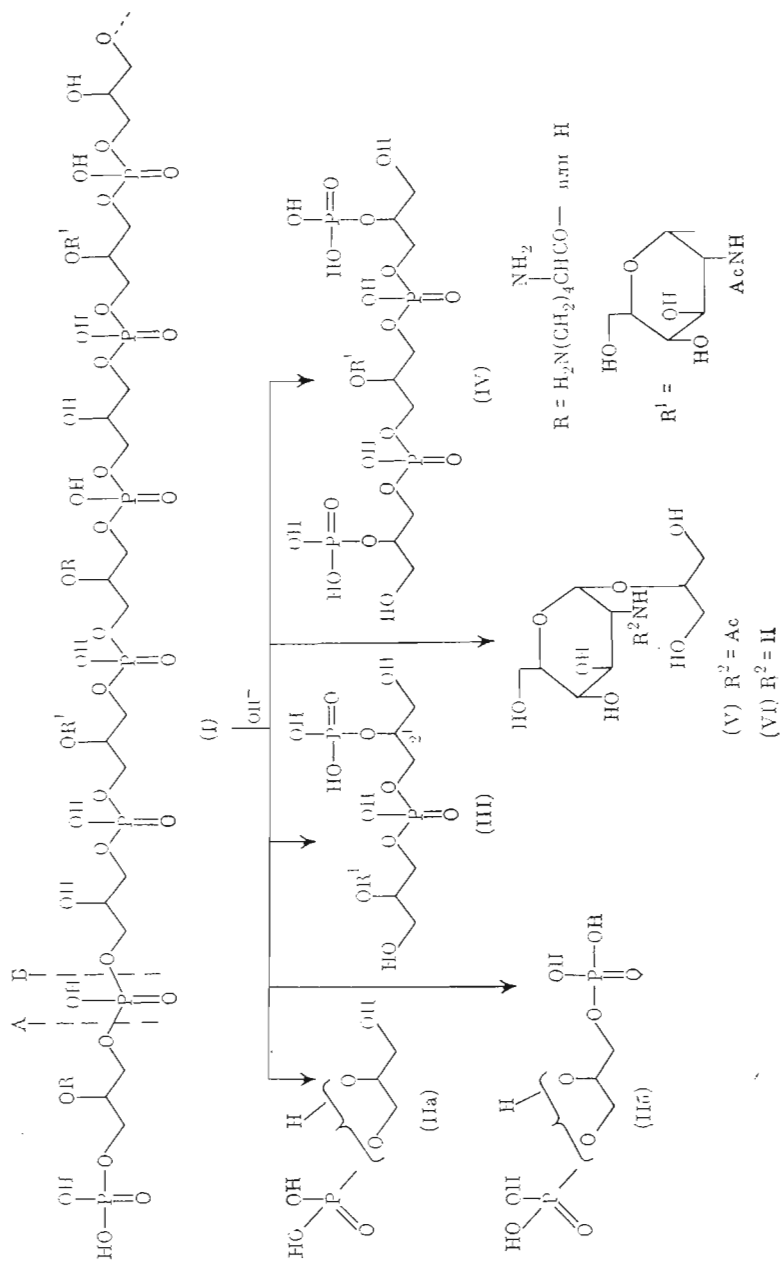
Моно- и дифосфаты глицерина (IIa, б) были идентифицированы сравнением со стандартными образцами с помощью электрофореза и БХ, причем изомерные фосфаты разделялись только при хроматографии.

Гликозид (V) имел значительную подвижность при БХ (табл. 2) и не окрашивался нингидрином. При гидролизе 6 н. HCl (18 ч, 100°С) он давал глицерин и глюкозамин с мольным соотношением 1:1,16, а при гидролизе 2 н. HCl (3 ч, 100°С) — дополнительно гликозид (VI). Последний окрашивался нингидрином, имел небольшую подвижность при БХ и при гидролизе 6 н. HCl (18 ч, 100°С) образовывал глицерин и глюкозамин. Гликозид (V) при периодатном окислении не образовывал формальдегида, что указывало на расположение гликозидной связи при C2 глицерина и пиранозную форму моносахарида. Исходя из этого и учитывая также данные спектроскопии ¹³C-ЯМР об α -конфигурации гликозидного центра и D-пиранозной форме N-ацетилглюкозамина в полимере (см. ниже), мы пришли к выводу, что гликозид (V) является 2-(2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозил)глицерином, а гликозид (VI) — его N-дезацетилированным производным.

При БХ фосфодиэфир глицерина III был разделен на два изомера (IIIa и IIIб), которые изучались отдельно. Эфиры не окрашивались нингидрином и при хроматографировании имели подвижность, близкую к подвижности монофосфатов глицерина (табл. 2). Фосфомоноэстераза отщепляла от обоих эфиров только 50% общего фосфора, а при кислотном гидролизе (2 н. HCl, 3 ч, 100°С) эфиры образовали одинаковые продукты: моно- и дифосфаты глицерина (IIa, б), глюкозамин, глицерин, неорганический фосфат и небольшие количества гликозидов (V) и (VI). При действии фосфомоноэстеразы с последующим щелочным гидролизом был обнаружен гликозид (V).

Мольное соотношение компонентов (Gro, P, GlcN) в эфирах (IIIa) и (IIIб) составляло соответственно 2,12:1,90:1,00 и 2,20:1,98:1,00. Эти результаты, а также данные о механизме щелочного гидролиза тейхоевых кислот [2] позволили приписать эфирам (IIIa) и (IIIб) приведенную формулу, причем различие между ними обусловлено, по-видимому, тем, что они являются энимерами по центру 2'.

Фосфодиэфир глицерина (IV) имел небольшую подвижность при электрофорезе и БХ, не окрашивался нингидрином и не разделялся на



Электрофоретическая и хроматографическая подвижности продуктов деградации
лизилтейхоевой кислоты клеточной стенки
Streptomyces roseoflavus var. roseofungini 1128

Соединения	Электрофорез в буфере А E_{GrOP}	Хроматография, системы		
		1	2	3
		R_{GrO-2P}	R_f	R_{GrO}
Монофосфаты глицерина (IIa)	1,00	0,90		
	1,00	1,00		
Дифосфаты глицерина (IIб)	1,48	0,29		
	1,48	0,34		
Эфир (IIIa)	0,73	0,82 *		
» (IIIб)	0,73	0,77 *		
» (IV)	0,18	0,65		
Фосфат неорганический	1,14	0,60		
Гликозид (V)	0,00	—	—	0,72
» (VI)	—	—	—	0,27
Глюкозамин	+4,0 **	—	—	0,40
N-Ацетилглюкозамин	0,0	—	—	0,80
Глицерин	0,0	—	—	1,00
Лизин	+6,6 ***	—	0,08	—
Гидроксамат лизина	+12,0	—	0,16	—
» N ^α -ацетиллизина	+6,3	—	0,26	—
Lys-NH ₂ (амид А)	+12,9	—	—	—
N ^α -Acyl-Lys-NH ₂ (амид Б)	+8,1	—	—	—

* Отнесение дано условно.

** Цифры со знаком + — подвижность веществ (в см), идущих к катоду.

*** Подвижность лизина и его производных за 2 ч электрофореза; за точку отсчета принято положение глицерина.

изомеры (табл. 2). Фосфомоноэстераза отщепляла 50% общего фосфора эфира, его кислотный гидролиз (2 н. HCl, 3 ч, 100° C) приводил к образованию моно- и дифосфатов глицерина (IIa, б), глицерина, глюкозамина, неорганического фосфата и небольших количеств гликозидов (V) и (VI), при действии фосфомоноэстеразы с последующим гидролизом щелочью он образовывал гликозид (V), а мольное соотношение его компонентов (Gro, P₁, GlcN) составляло 2,98 : 4,10 : 1,00. На основании этих данных, а также результатов исследования гликозида (V) мы приписали эфиру (IV) приведенную на схеме формулу.

Идентификация продуктов кислотного гидролиза полимера показала что тейхоевая кислота имеет глицерофосфатную природу и в ее состав входят N-ацетилглюкозамин и лизин. Представляло решить вопрос о номерных единицах цепи и о типе фосфодиэфирной связи между мономерами. Образование при щелочном расщеплении полимера значительных количеств моно- и дифосфатов глицерина указывало на то, что, во-первых, исходная цепь является поли(глицерофосфатом) и что, во-вторых, в полимере есть глицериновые остатки со свободными оксигруппами. Присутствие же в продуктах гидролиза N-ацетилглюкозаминилглицерина (V) свидетельствовало о существовании в цепи и 2-О-замещенных глицериновых остатков.

Следующая задача заключалась в установлении типа фосфодиэфирной связи в поли(глицерофосфатной) цепи. В тейхоевых кислотах стрептомицетов обнаружены как 1,3- [2], так и 2,3-поли(глицерофосфаты) [3]. Изучение структуры фосфорных эфиров (III) и (IV) показало, что эфиры являются фосфодиэфирами глицерина, в которых одна из глицериновых единиц несет по С2 N-ацетилглюкозаминильный заместитель. Их присутствии в щелочном гидролизате тейхоевой кислоты убедительно свидетельствовало в пользу 1,3-поли(глицерофосфатной) цепи, так как только в том случае, когда в поли(глицерофосфате) глицериновые остатки объединены фосфодиэфирными группами при С1 и С3 (1,3-тип связи), гидролиз цепи может идти с любой стороны фосфодиэфирных связей при наличии

незамещенных гидроксидов при С2 глицерина (по А и Б, см. схему), а в случае тейхоевых кислот 2,3-типа фосфодиэфиры при щелочном гидролизе вообще не образуются [3]. Маловероятно также присутствие в цепи двух рядом расположенных N-ацетилглюкозаминилглицериновых единиц, так как при такой структуре в продуктах щелочного гидролиза был бы обнаружен фосфодиэфир с двумя остатками аминсахара. Отсутствие в продуктах гидролиза фосфомоноэфира гликозилглицерина свидетельствует о том, что конечный глицериновый остаток, несущий фосфомоноэфирную группу, не замещен аминсахаром. В то же время возможно присутствие гетерогенных цепей с различной степенью замещения сахарным компонентом, на что указывает неодинаковое мольное соотношение фосфора и аминсахара в препаратах 1 и 2 (табл. 1). Напротив, наши препараты не могли представлять собой смеси цепей со свободными 2-гидроксильными группами и полностью замещенных поли(глицерофосфатных) цепей, так как последние не гидролизуются щелочью и в продуктах расщепления не были бы обнаружены фосфодиэфиры глицерина с сахарным заместителем.

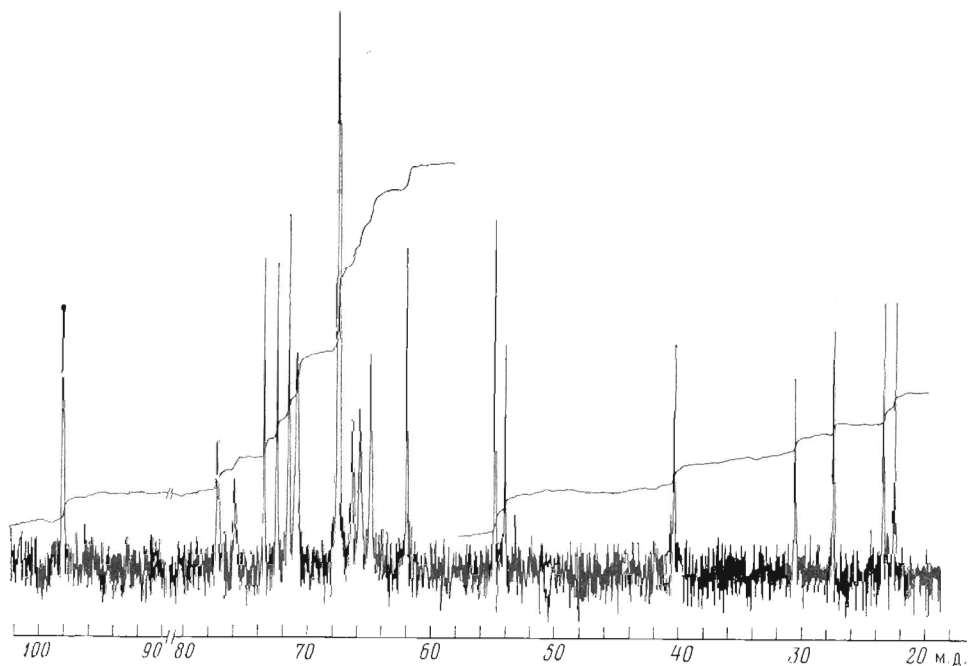
Длина цепи полимера была определена двумя способами: по количеству формальдегида, образующегося в результате периодатного окисления полимера, и по количеству неорганического фосфата, образующегося после обработки полимера фосфомоноэстеразой. Оба метода дали сопоставимые результаты, на основании чего мы полагаем, что цепь имеет 11—13 глицерофосфатных единиц.

Как указано выше, среди продуктов гидролиза тейхоевой кислоты был обнаружен лизин. Ранее эфир этой аминокислоты был найден в составе рибиттейхоевой кислоты из клеточной стенки *S. azureus* [6]. Его L-конфигурация была установлена по спектрам поглощения и КД производного, полученного реакцией с *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола по методу [8].

Для установления типа связи между тейхоевой кислотой и лизином был проведен аммонолиз и гидроксиламинолиз препарата 1. При аммонолизе полимера были обнаружены лизин и его амид (амид А), а кроме того, в небольших количествах N-ациллизин (по-видимому, N-пропиониллизин) и его амид (амид Б) (табл. 2). При гидроксиламинолизе полимера идентифицированы гидроксамат лизина и гидроксамат N-ациллизина (табл. 2). Эти данные свидетельствовали о присоединении лизина и его производного к тейхоевой кислоте с помощью сложноэфирной связи. С целью определения положения ацильного остатка на лизине проведено динитрофенилирование амида Б. Электрофоретическое изучение кислотного гидролизата образовавшегося продукта привело к идентификации N^ε-Dnp-лизина, что указывало на замещение в амиде Б α-аминогруппы лизина.

Результаты определения количества лизина в препаратах тейхоевой кислоты (табл. 1) показывают, что на каждые 4—5 глицерофосфатных остатков в полимере (препарат 1 и клеточная стенка) приходится около одного остатка лизина. Большое мольное соотношение фосфора и лизина в препарате 2 можно объяснить тем, что последний получен в более жестких условиях кислотной экстракции, что привело к частичному гидролизу сложноэфирных связей. Необходимо отметить, что содержание лизина в препарате 1, выделенном из клеточных стенок разных партий мицелия, варьировало с крайними значениями мольного соотношения P : Lys от 3,3 : 1 до 4,7 : 1.

Одновременно с химическим изучением структуры тейхоевой кислоты проводилось и ее исследование ¹³C-ЯМР. Структура тейхоевой кислоты независимым образом может быть установлена при анализе этого спектра (рисунк, табл. 3). Наибольшую интегральную интенсивность в спектре имеют два сигнала при 67,5 и 70,8 м. д. с отношением интегральных интенсивностей 2 : 1. Эти сигналы типичны для незамещенных остатков поли(глицерофосфатной) цепи [9], а их заметное уширение связано с расщеплением за счет взаимодействия с ядрами ³¹P через две и три простые связи соответственно.



Спектр ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты клеточной стенки *Streptomyces roseofungini* 1128

Набор узких сигналов в спектре отвечает резонансам атомов углерода в остатках 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы и L-лизина, что подтверждается сопоставлением спектров тейхоевой кислоты со спектрами метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозиды и дихлоргидрата метилового эфира L-лизина, измеренных в идентичных условиях. Замещение остатков глицерина остатками пиранозы или лизина сопровождается, как обычно, смещением сигналов атомов углерода C1 — C3 в глицерине: сигнал атома углерода, по которому идет замещение, смещается в низкое поле (α -эффекты замещения), а сигналы соседних атомов углерода — в высокое поле (β -эффекты замещения) [9].

Два уширенных сигнала в низком поле при 77,1 и 75,8 м. д. в спектре тейхоевой кислоты в связи с этим естественно отнести к C2 в замещенных по 2-О остатках глицерина. Поскольку интегральные интенсивности сигнала при 77,1 м. д. и сигналов от кольцевых атомов углерода остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы совпадают, этот сигнал был отнесен к C2 остатков глицерина, замещенных именно углеводным остатком. Соответственно сигнал при 75,8 м. д. относится к C2 остатков глицерина, замещенных лизином, так как его интегральная интенсивность совпадает с интенсивностями сигналов углеродов лизина в спектре тейхоевой кислоты.

Сигналы атомов C1 и C3 замещенных остатков глицерина находятся в более сильном поле по сравнению с аналогичными сигналами незамещенных остатков, а именно при 66,3; 65,7 и 64,8 м. д. Их отнесение также упрощается, если принять во внимание интегральные интенсивности. Так, пик при 64,8 м. д. имеет двойную интегральную интенсивность по сравнению с любым из пиков лизиновых остатков в тейхоевой кислоте, и его естественно отнести к атомам C1 и C3 глицериновых остатков, замещенных лизином. Присоединение заместителя с хиральным центром по C2 глицерина является причиной расщепления резонанса сигналов C1 и C3 замещенных остатков глицерина.

Соответствие интегральных интенсивностей сигналов при 66,3 и 65,7 м. д. и сигналов кольцевых атомов углерода остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы подтверждает отнесение первых к атомам C1 и C3 остатков глицерина, замещенных углеводным остатком. Соотно-

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты (препарата 1) *, метил-2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид и дихлоргидрата метилового эфира L-лизина
Растворы в D_2O , внутренний эталон — CH_3OH — δ 50,15 м. д.

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCH_3	CH_2CO
Незамещенные остатки глицерина в тейхоевой кислоте	67,5	70,8	67,5					
Замещенные 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозой остатки глицерина в тейхоевой кислоте	66,3 **	77,1	65,7 **					
Замещенные L-лизином остатки глицерина в тейхоевой кислоте	64,8	75,8	64,8					
Остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы в тейхоевой кислоте	98,0	54,9	72,3	71,4	73,3	61,9		23,4; 175,5
Метил-2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид	99,3	54,85	72,4	71,3	72,9	61,9	56,4	23,15; 175,6
Остатки L-лизина в тейхоевой кислоте	170,3	54,0	27,45	22,5	30,5	40,3		
Метилловый эфир L-лизина (дихлоргидрат)	171,5	54,7	27,3	22,5	30,3	40,0	53,7	

* Спектр ^{13}C -ЯМР препарата 2 аналогичен спектру препарата 1. Все сигналы остатков глицерина в этих спектрах уширены по сравнению с сигналами остатков лизина или 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы.

** Отнесение этих сигналов к C1 или C3 условно. Различие в химических сдвигах обусловлено соседством хирального углерода.

шение интегральных интенсивностей линий в спектре тейхоевой кислоты позволяет оценить содержание незамещенных и различным образом замещенных остатков глицерина в полимерной цепи: незамещенных остатков — 56%, замещенных 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозой — 25% и замещенных L-лизином — 19%. Высокая общая степень замещения остатков глицерина обуславливает нерегулярность ближнего окружения каждого из атомов углерода в этих остатках, и поэтому все сигналы атомов углерода глицерина в цепи тейхоевой кислоты лишь уширены, а не расщеплены в четкие дублеты и триплеты, как это наблюдается в спектре ^{13}C -ЯМР незамещенной поли(глицерофосфатной) цепи или в полимерах с малой степенью замещения [10].

Таким образом, на основании данных химического изучения и ^{13}C -ЯМР можно сделать вывод, что исследуемая тейхоевая кислота имеет структуру (I), приведенную на схеме.

Экспериментальная часть

Спорулирующую культуру *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128 поддерживали на агаризованной среде Чапека с 1% глицерина. Мицелий для получения клеточных стенок выращивали на 100 мл среды с пептоном [1] в 750-мл колбах на качалках при 28°С в течение 18 ч. Посевным материалом служил 18-часовой мицелий, выращенный в указанных условиях из спор. Клетки отделяли от среды центрифугированием, промывали 0,95% NaCl и использовали для получения клеточных стенок. Мицелий разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 при 22 кГц 2 раза по 2 мин при 4°С. Все последующие операции проводили строго при этой температуре.

Неразрушенный мицелий отделяли центрифугированием при 3000 об/мин, а клеточную стенку выделяли из супернатанта центрифугированием при 6000 об/мин. Нижнюю часть осадка — примесь неразрушенного мицелия желтоватого цвета — отбрасывали, а верхний (белый) слой собирали и многократно промывали дистиллированной водой. При повторном центрифугировании нижний слой осадка удаляли. P_1 , $P_{\text{общ}}$, $P_{\text{нк}}$ и $P_{\text{тк}}$ определяли так, как описано в работе [6], глицерин — по методу Ханахан [11],

глюкозамин — по Гладышеву [12], лизин — по методу Патти [13] и на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi». Уксусную и пропионовую кислоты идентифицировали ГЖХ на приборе «Hewlett-Packard 5880-A». БХ и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak FN-13» (ГДР), промытой для препаративных целей 2 н. АсОН и дистиллированной водой.

Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: пропанол-1 — аммиак (d 0,88) — вода (6 : 3 : 1) (А), для разделения фосфорных эфиров и их изомеров; бутанол-1 — АсОН — вода (4 : 1 : 5) (Б), для разделения лизина и его производных; бутанол-1 — пиридин — бензол — вода (5 : 3 : 1 : 3) (В), для разделения N-ацетилглюкозамина, глюкозамина, глицерина и гликозидов.

Электрофорез фосфорных эфиров, образовавшихся при деградации полимера, а также гликозида (VI), лизина и его производных выполняли в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,5—5,6 (Г) [6] и 1 М АсОН (Д). Фосфорные эфиры и гликозид разделяли 4—5 ч, а лизин и его производные — 1—2 ч при 20 В/см. Тейхоевую кислоту и фосфорные эфиры обнаруживали реактивом Ишервуда, лизин, его амид, амид N-ациллизина — нингидрином, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин и гликозиды — 5% AgNO_3 в аммиаке, гидроксаматы — FeCl_3 , как описано в работе [6]. Спектры ^{13}C -ЯМР измеряли для 6% растворов тейхоевой кислоты (препараты 1 и 2) в D_2O при 50° С на приборе WM-250 («Bruker-Physic», ФРГ) с рабочей частотой по углероду 62,89 МГц. В работе использовали щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1, Sigma, США).

Тейхоевую кислоту экстрагировали 24 ч из клеточной стенки 10% трихлоруксусной кислотой при 4° С, применяя 10 мл кислоты на 100 мг стенки. Остаток стенки отделяли центрифугированием и операцию повторяли в течение 48 ч. К каждому из экстрактов отдельно добавляли 5 объемов 96% этанола, образовавшиеся осадки выдерживали 24 ч при 4° С, центрифугировали, растворяли в воде, анализировали и лиофильно сушили. Получали препараты 1 и 2. Все операции по изучению структуры полимера проводили параллельно как с препаратом 1, так и с препаратом 2. Кислотный и щелочной гидролиз тейхоевой кислоты проводили согласно [6].

Изучение гликозидов. Продукты щелочного гидролиза тейхоевой кислоты (100 мг) разделяли последовательно электрофорезом в буфере Г и БХ в системе В. Гликозиды элюировали с бумаги водой и упаривали до суха. Около 0,5 мг сухого остатка гликозидов растворяли в 0,1—0,2 мл 6 н. HCl и гидролизovali 18 ч при 100° С в запаянном капилляре. Гидролизат упаривали и образовавшиеся продукты исследовали БХ в системе В. Для определения молярных соотношений сухой остаток гликозида гидролизovali кислотой в тех же условиях, гидролизат упаривали, растворяли в 3 мл воды и в аликвотах определяли количество глюкозамина. Для определения количества глицерина аликвоту раствора хроматографировали в системе В и глицерин элюировали водой.

Изучение фосфодизэфиров глицерина. Фосфорные эфиры, образовавшиеся при щелочной деградации тейхоевой кислоты, после разделения электрофорезом в буфере Г и затем БХ в системе А элюировали с бумаги водой. Сухой остаток фосфорного эфира гидролизovali 2 н. HCl 3 ч при 100° С, гидролизат упаривали и образовавшиеся продукты исследовали с помощью БХ в системах А, Б, В и электрофореза в буфере Г. Для энзиматического дефосфорилирования к сухому остатку фосфорного эфира добавляли щелочную фосфатазу в аммоний-ацетатном буфере, рН 10,4, и выдерживали в термостате 2 ч при 37° С. Гидролизат доводили до небольшого объема и в аликвотах определяли $P_{\text{общ}}$ и P_1 . Для определения молярных соотношений компонентов сухой остаток фосфорного эфира гидролизovali 6 н. HCl (6 ч, 100° С), кислоту упаривали, нейтрализованный гидролизат обрабатывали щелочной фосфатазой, как описано выше, и в аликвотах гидролизата определяли P_1 , глюкозамин и глицерин. Обнаружение гликозида в эфирах проводили после их обработки щелочной фосфатазой и гидролиза 1 н. NaOH (3 ч при 100° С) с помощью БХ в системе В и электрофореза в буфере Г.

Определение длины цепи. а) Периодатный метод. К 10 мг тейхоевой кислоты (препарат 1 или 2) добавляли 0,1 н. NH_4OH , через 1 ч избыток аммиака упаривали, тейхоевую кислоту количественно переносили в пробирку, добавляли 0,4 мл 0,1 М NaIO_4 и объем доводили водой до 14 мл. Раствор оставляли в темноте при 20°C на 48–60 ч. В аликвотах определяли количество фосфора и образовавшийся формальдегид; для препарата 1 отношение P_1 : формальдегид было через 6 ч 16,9:1, через 12 ч – 16,1:1, через 20 ч – 15,7:1, через 26 ч – 14,7:1, через 40 ч – 12,2:1 и через 60 ч – 11,9:1; для препарата 2 через 60 ч – 11,4:1.

б) Ферментативный метод. 2–5 мг тейхоевой кислоты (препарат 1 или 2) растворяли в 5 мл 1 М аммоний-ацетатного буфера, рН 10,4, добавляли щелочную фосфатазу и выдерживали 2 ч при 37°C. В аликвотах определяли общее количество фосфора и каждые 20–40 мин фосфор неорганический. Получили для препарата 1 $\text{P}_{\text{общ}}:\text{P}_1$ через 20 мин – 11,8:1; через 60 мин – 11,4:1; через 2 ч – 11,5:1; для препарата 2 через 2 ч – 12,6:1.

Гидроксиламинолиз и аммонолиз тейхоевой кислоты, динитрофенилирование амида N-ациллизина (амида Б), а также определение абсолютной конфигурации лизина проводили как описано в работе [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Naumova I. B., Kuznetsov V. D., Kudrina K. S., Bezzubenkova A. P. Arch. Microbiol., 1980, v. 126, № 1, p. 71–75.
2. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Стрешинская Г. М., Панина Л. И. Биооргани. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 815–821.
3. Shashkov A. S., Zaretskaya M. Sh., Yarotsky S. V., Naumova I. B., Chizhov O. S., Shabarova Z. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 2, p. 477–481.
4. Наумова И. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1529–1537.
5. Naumova I. B., Zaretskaya M. Sh., Dmitrieva N. F., Streshinskaya G. M. In: Nocardia and Streptomyces/Eds Mordarski M. et al. Gustav Fischer Verlag, 1978, p. 261–268.
6. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Романов В. В., Шашков А. С. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1409–1419.
7. Stoffyn P. J., Jeanloz R. W. Arch. Biochem. and Biophys., 1954, v. 52, № 2, p. 373–379.
8. Воскова Н. А., Романов В. В., Сумбаган Н. В., Коршунова Г. А., Швачкин В. П. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 731–735.
9. De Boer W. R., Kruijssen F. J., Wouters J. T. M., Kruk C. Eur. J. Biochem., 1976, v. 62, № 1, p. 1–6.
10. Скоблилова Н. К., Агре Н. С., Шашков А. С., Наумова И. Б. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 857–862.
11. Hanahan D. J., Olley J. N. J. Biol. Chem., 1958, v. 231, № 2, p. 813–828.
12. Гладышев Б. Н. Биохимия, 1959, т. 24, № 2, с. 789–793.
13. Patthy M., Patthy A. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 1975, v. 10, № 4, p. 277–286.

Поступила в редакцию
2.XII.1981

LYSYLTEICHOIC ACID OF THE CELL WALL OF *STREPTOMYCES ROSEOFILAVUS* VAR. *ROSEOFUNGINI* 1128

NAUMOVA I. B., SHASHKOV A. S., SCOBLILOVA N. K.,
AGRE N. S., ROMANOV V. V.

M. V. Lomonosov State University, Moscow; N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

The structure of the teichoic acid from the cell wall of *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128 is studied. The polymer consists of 11–13 glycerol phosphate units linked by phosphodiester bonds of 1,3-type. 25–30% glycerol units have 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl substituents and about 20–30% glycerol units have L-lysyl residues. The structure of the polymer was established by chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. The teichoic acid constitutes ~50% of the cell-wall dry weight.