МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра органической и биоорганической химии

Структура и физико-химические свойства липополисахарида ризосферной бактерии *Pseudomonas chlororaphis* К3

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 412 группы

направления 04.03.01 – «Химия»

Института химии

Астанковой Анастасии Сергеевны

Научный руководитель
доцент, к.б.н. _____ Г. Л. Бурыгин
подпись, дата

Зав. кафедрой
профессор, д.х.н., профессор _____ А. Ю. Егорова
подпись, дата

Саратов 2024

Введение

Актуальность и цель работы: Изучение новых штаммов бактерий является важной задачей для развития разных отраслей науки. Большинство бактерий в настоящее время не описано, а новые микроорганизмы с новыми свойствами появляются каждый год, благодаря высокой вариабельности структуры О-антигена, входящего в состав внешнего слоя наружной мембраны. Бактерии рода *Pseudomonas chlororaphis* используют в качестве почвенного инокулянта в растениводстве и как средство биоконтроля Углеводсодержащие гликополимеры поверхности микроорганизмов играют важную роль во взаимодействии с окружающей средой. Среди них особое место занимают липополисахариды (ЛПС). Молекулы участвуют в уходе от реакций иммунной системы и взаимодействии с растениями.

В связи с вышеперечисленным была поставлена следующая цель работы: выделение и изучение структуры, физико-химических свойств липополисахарида ризосферной бактерии *Pseudomonas chlororaphis* K3 и определение его влияния на рост растений.

В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Выделить очищенный препарат липополисахарида из бактериальных клеток *Pseudomonas chlororaphis* K3 для получения О-полисахарида и дезацилированного липополисахарида.
2. Изучить жирно-кислотный состав липида А и структуру повторяющегося звена О-полисахарида.

Определить физико-химические и биологические свойства липополисахарида и дезацилированного липополисахарида.

Основное содержание работы

При анализе литературных данных выяснили, что штамм ризосферной бактерии *Pseudomonas chlororaphis* К3, его свойства и выделение до сих пор не были широко изучены. ЛПС данного бактериального штамма может обладать рост-стимулирующей активностью, потому что липополисахариды как одни из преобладающих компонентов поверхности грамотрицательных бактерий вовлечены во взаимодействие микроорганизмов с различными объектами среды, в том числе и с растениями, в литературе также есть упоминание биологической активности, бактерий рода *Pseudomonas*. Поэтому мы решили выделить ЛПС данного штамма и исследовать его физико-химические свойства и рост-стимулирующую активность по отношению к микрорастениям картофеля.

2.1 Приготовление и состав ЛПС

Из 11,2 л бактериальной культуры *P. chlororaphis* К3 получили 6,77 г сухой клеточной биомассы, затем из которой методом водно-фенольной экстракции по Вестфалю выделили ЛПС массой 0,810 г (с выходом 12,5%). Содержание ЛПС: 36,67% углеводов (относительно глюкозы) (Рис. 4), 0,76% КДО (Рис. 5).

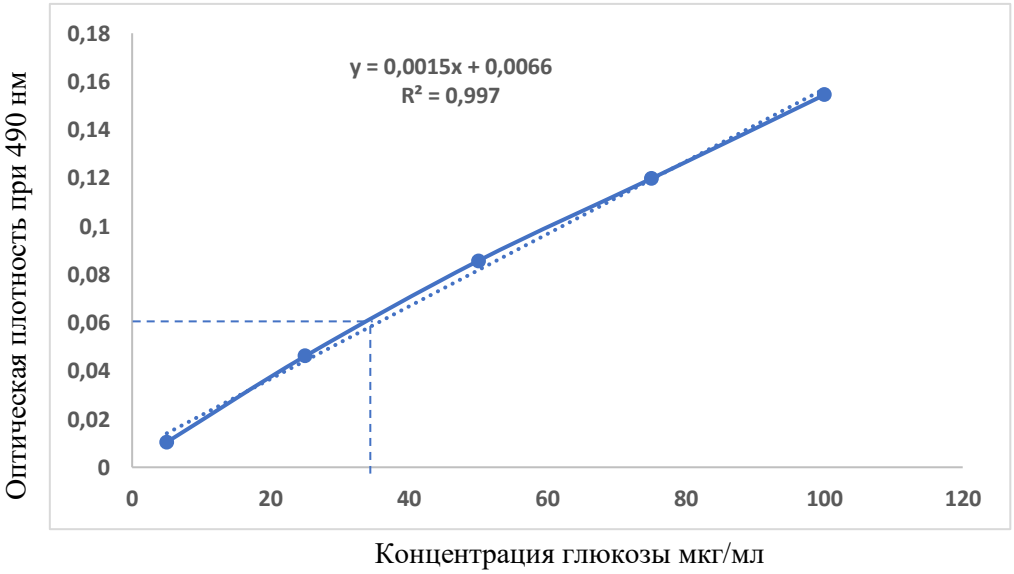


Рис 2.1.4 Градуировочный график для определения содержания углеводов (по глюкозе)

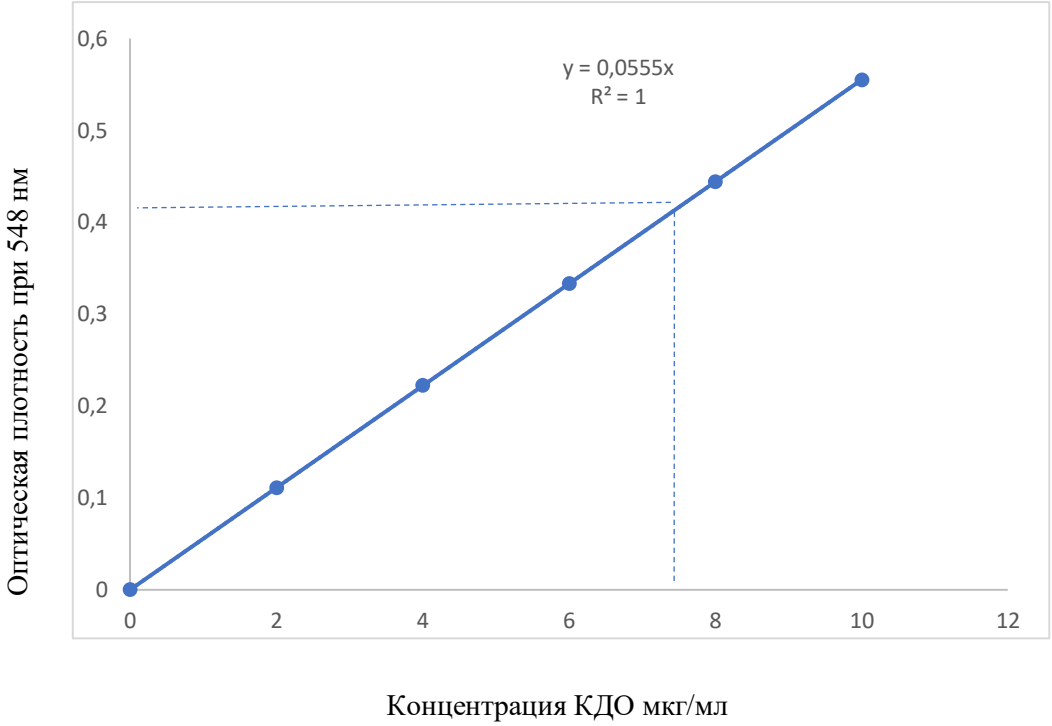


Рис 2.1.4 Градуировочный график для определения 2-кето-3-дезоксиоктоковой кислоты

Жирно-кислотный анализ ЛПС (Рис. 6) и дезацелированного ЛПС (Рис. 7) *Pseudomonas chlororaphis* К3 продемонстрировал наличие 3-гидроксидодекановой и преобладание октадекановой и гексадекановой кислот.

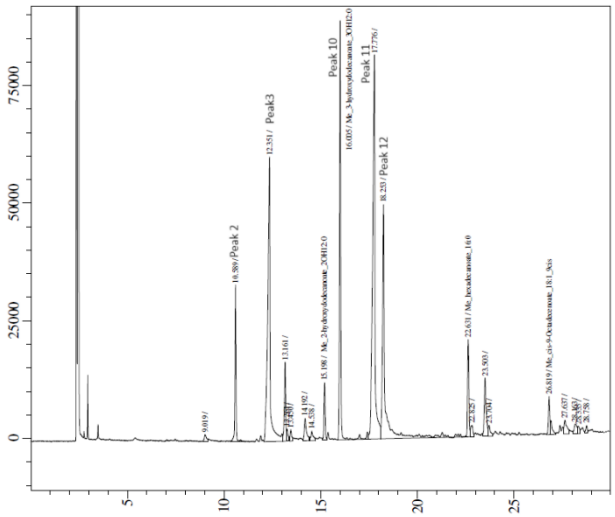


Рис. 2.1.6 Хроматограмма эфиров жирных кислот, содержащихся в ЛПС *P.chlororaphis* К3.

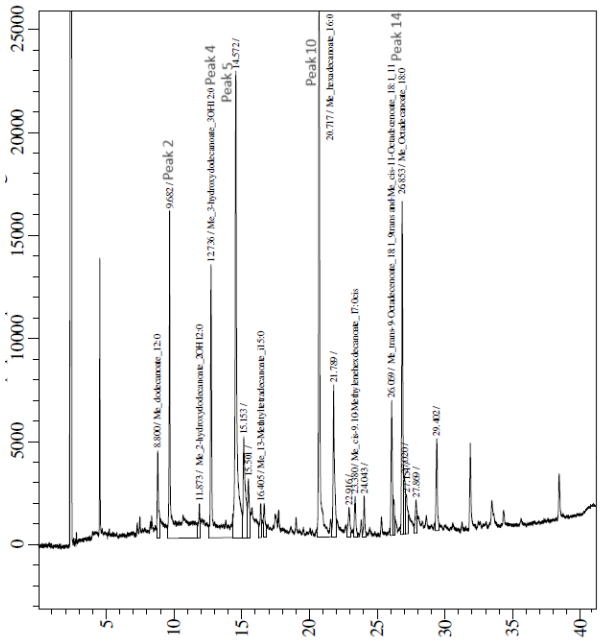


Рис. 2.1.7 Хроматограмма эфиров жирных кислот, содержащихся в дезацелированном ЛПС *P.chlororaphis* К3.

2.2 Структура повторяющихся звеньев О-полисахарида

ОПС изучили методом ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после кислотного гидролиза. В результате, были идентифицированы следующие моносахара в соотношении GlcN:GalN:QuiN:Glc 2:1:1:1 (Рис. 8).

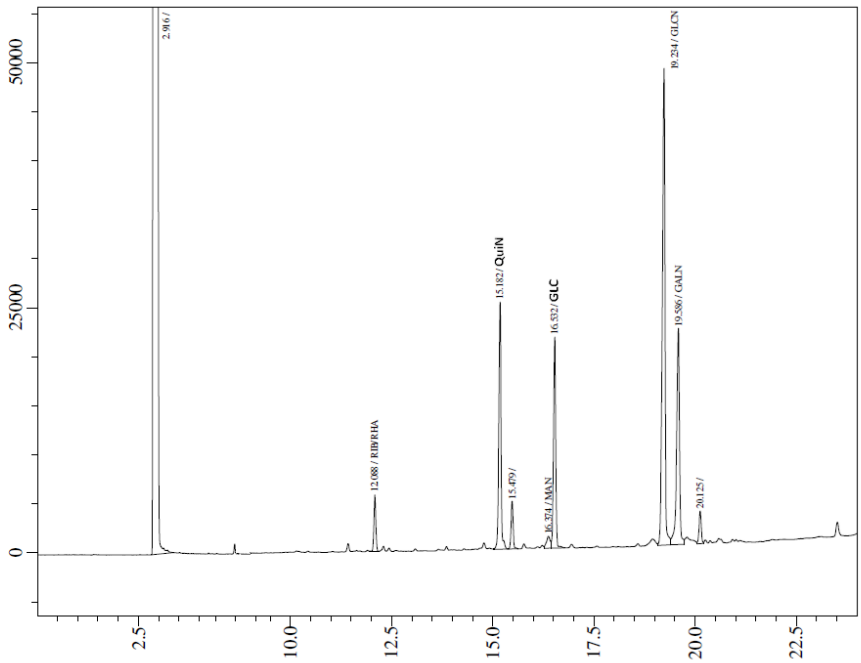


Рис. 2.2.8 Хроматограмма ацетатов полиолов, содержащихся в ЛПС *P.chlororaphis* К3, полученная методом ГЖХ.

Во время изучения структуры выяснили, что ЯМР спектры ЛПС *P. chlororaphis* К3 схожи со спектрами ОПС, выделенных из планктонных *P. chlororaphis* 449[25] .

Спектр ЯМР ^{1}H O - полисахарида указывает на нерегулярность, вероятно, обусловленную нестехиометрическим О-ацетилированием (сигнал для О-ацетильной группы при δ 2.15). О-деацелирование привело к образованию структурно-однородного полисахарида.

В спектре ЯМР ^{1}H наблюдали сигналы для четырех аномерных протонов при δ 4.48-5.49, одной CH_3-C группы (H-6 из QuiNAc) при δ 1.33 и четырех N-ацетильных групп при δ 2.00, 2.08 и 2.10 (двойной интенсивности).

В спектре ЯМР ^{13}C присутствовали сигналы четырех аномерных углеродов при δ 98.1-104.6, одной CH_3-C группы (C-6 QuiNAc) при δ 17.9, трех $HOCH_2$-C групп (C-6 GlcNAc и GalNAc) при δ 60.7-69.1, четырех азотсодержащих углеродов (C-2 аминосахаров) при δ 49.9-56.5 и четырех N-ацетильных групп при δ 23.1-23.6 (Me) и δ 174.9-175.6 (CO).

Четыре спиновые системы сахаров идентифицировали с помощью COSY, TOCSY, ROESY, HSQC (рис. 1) и HMBC экспериментов и соотнесены при помощи сравнения связей с остатками GalNAc (A), QuiNAc (B) и GlcNAc (C и D) (табл. 2 и 3). В частности, наблюдали корреляции H-1 с H-2-H-4 для GalNAc, H-1 с H-2-H-6 и H-6 с H-5-H-2 для QuiNAc и GlcNAc в спектре TOCSY, а также H-5 с H-4 и H-3 для GalNAc в спектре ROESY. Отнесение к каждой спиновой системе проводили с помощью COSY.

.

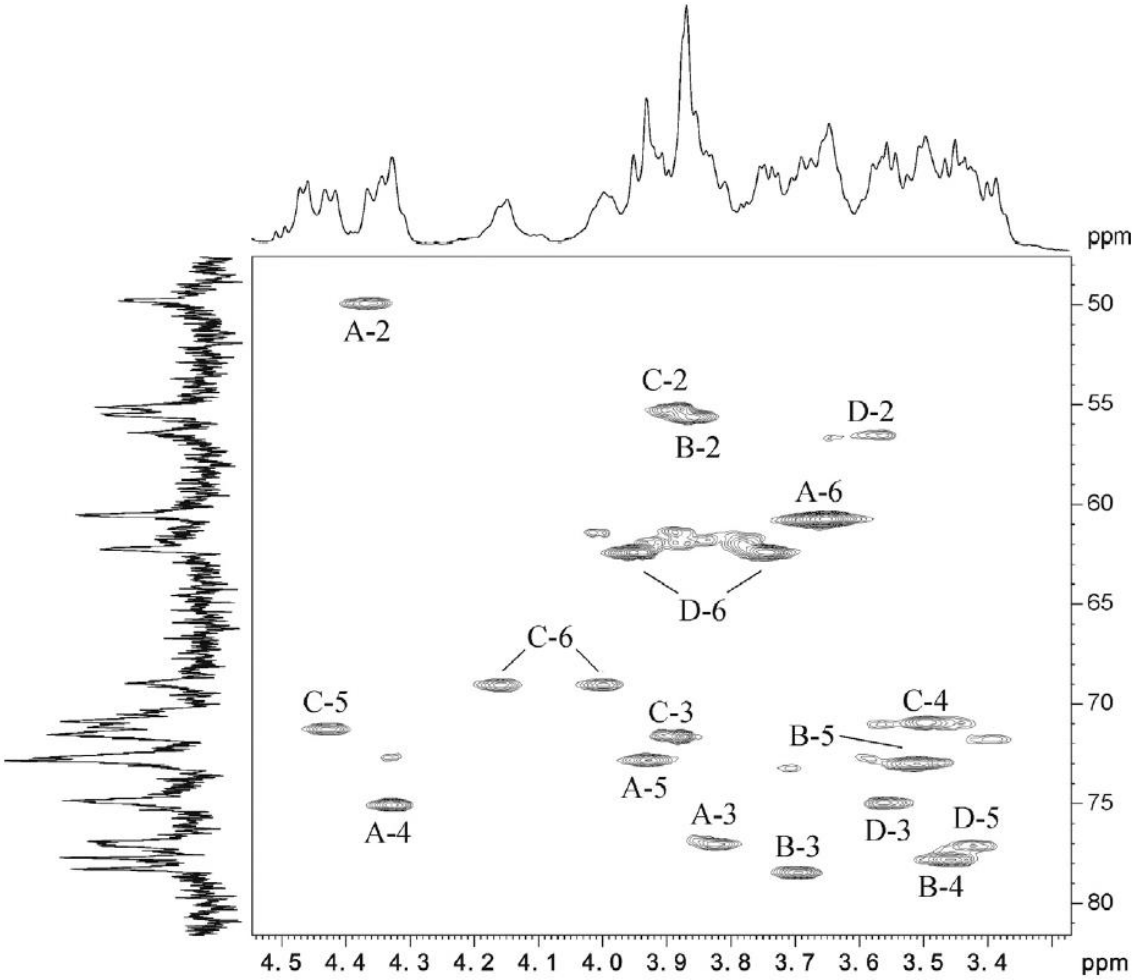


Рис. 2.2.9 ^{1}H и ^{13}C ЯМР сдвиги (δ , ppm) О-деацетилированного О-полисахарида *P.chlororaphis* 449

Остатки сахара		H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
→3,4)-α-D-GalpNAc-(1→	A	5.49 98.2	4.37 49.9	3.83 77.1	4.33 75.1	3.93 72.9	3.66 60.7
→3)-β-D-QuipNAc-(1→	B	4.59 102.5	3.86 55.7	3.69 78.5	3.46 77.9	3.51 73.0	1.33 17.9
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	C	4.93 98.1	3.88 55.3	3.88 71.7	3.50 71.0	4.43 71.3	4.00; 4.16 69.1
β-D-GlcpNAc-(1→	D	4.48 104.6	3.56 56.5	3.55 75.0	3.39 71.8	3.42 77.1	3.75; 3.95 62.4

Табл. 2.2.2 ^{1}H и ^{13}C ЯМР сдвиги (δ , ppm) О-деацетилированного О-полисахарида *P.chlororaphis* 449

Сигналы в области δ 83.0-88.0, характерные для фуранозидов отсутствовали, следовательно все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме. Конфигурация β остатков QuiNAc (B) и GlcNAc (D) определили по относительно низкопольным позициям сигналов C-1 при δ 102.5 и 104.6, а также сигналов C-5 при δ 73.0 и 77.1, соответственно, по сравнению с опубликованными данными для соответствующих α- и β-пиранозидов. Конфигурация а GalNAc (A) и GlcNAc (C) определили из относительно высокополевых положений сигналов C-5 при d 72.9 и 71.3, соответственно.

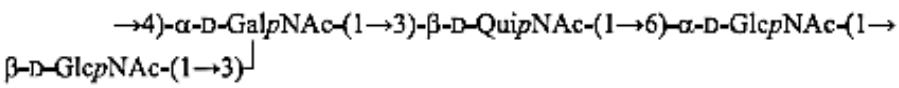
Установили положение замещения моносахаридов, исходя из положений в спектрах соответствующих незамещенных моносахаридов GalNAc (A), C-3 QuiNAc (B) и C-6 GlcNAc (C) при δ 77.1, 75.1, 78.5 и 69.1.

Таким образом, полисахарид является разветвленным с GalNAc (A) в точке разветвления и GlcNAc (D) в боковой цепи. Анализ последовательности определили с помощью ^{1}H, ^{13}C HMBC и ROESY экспериментов, которые показали междоузельные корреляции аномерных атомов с углеродами или протонами на углеродах соседних сахарных остатков (таблица 3).

Атом аномера в остатке сахара (δ)	Связь с атомами в остатках сахара (г) (δ)	
	ROESY	HMBC
A H-1 (5.49)	**B** H-3 (3.69), **B** H-4 (3.46), **A** H-2 (4.37)	**B** C-3 (78.5), **A** C-3 (77.1), **A** C-5 (72.9)
A C-1 (98.2		**B** H-3 (3.69), **A** H-2 (4.37)
B H-1 (4.59)	**C** H-6a (4.00), **B** H-3 (3.69), **B** H-5 (3.51)	**C** C-6 (69.1)
B C-1 (102.5)		**B** H-2 (3.86), **B** H-5 (3.51)
C H-1 (4.93)	**A** H-4 (4.33), **C** H-2 (3.88), **C** H-3 (3.88)	**A** C-4 (75.1), **C** C-5 (71.3)
C C-1 (98.1)		**A** H-4 (4.33)
D H-1 (4.48)	**A** H-3 (3.83), **D** H-3 (3.55), **D** H-5 (3.42)	**A** C-3 (77.1), **D** C-5 (77.1)
D C-1 (104.6)		**A** H-3 (3.83), **D** H-3 (3.55)

рисунок 2.2.3 Корреляции для H-1 и C-1 в 2D ROESY и ^{1}H, ^{13}C HMBC спектров О-деацетилированного О-полисахарида *P. chlororaphis* 449

Полученные данные показали, что О-дезацетилированный полисахарид имеет тетрасахаридную О-единицу со следующей структурой:



Помимо основных сигналов (табл. 1), в спектрах ЯМР обнаружили ряд минорных сигналов, например минорный сигнал H-1 при δ 5,00 для a-GlcpNAc, который может принадлежать моносахаридам из терминальных О-единиц. Сравнение спектров HSQC исходного и О-дезацетилированного полисахаридов (рис. 1 и 2) показало смещение вниз по полю части кросс-пика GalNAc H-6/C-6 с δ 3.66/60.7 во втором спектре на δ 4.02/62.9 и 4.27/62.9 в первом спектре, что указывает на О-ацетилирование GalNAc в положении 6.

Это подтверждается смещением вверх от δ 72.9-70.1 части сигнала C-5 этого остатка (β-эффект О-ацетилирования). Судя по относительной интенсивности сигналов ЯМР для Gal-NAc6Ac и GalNAc, степень О-ацетилирования в планктонном О-полисахариде составила 60%.

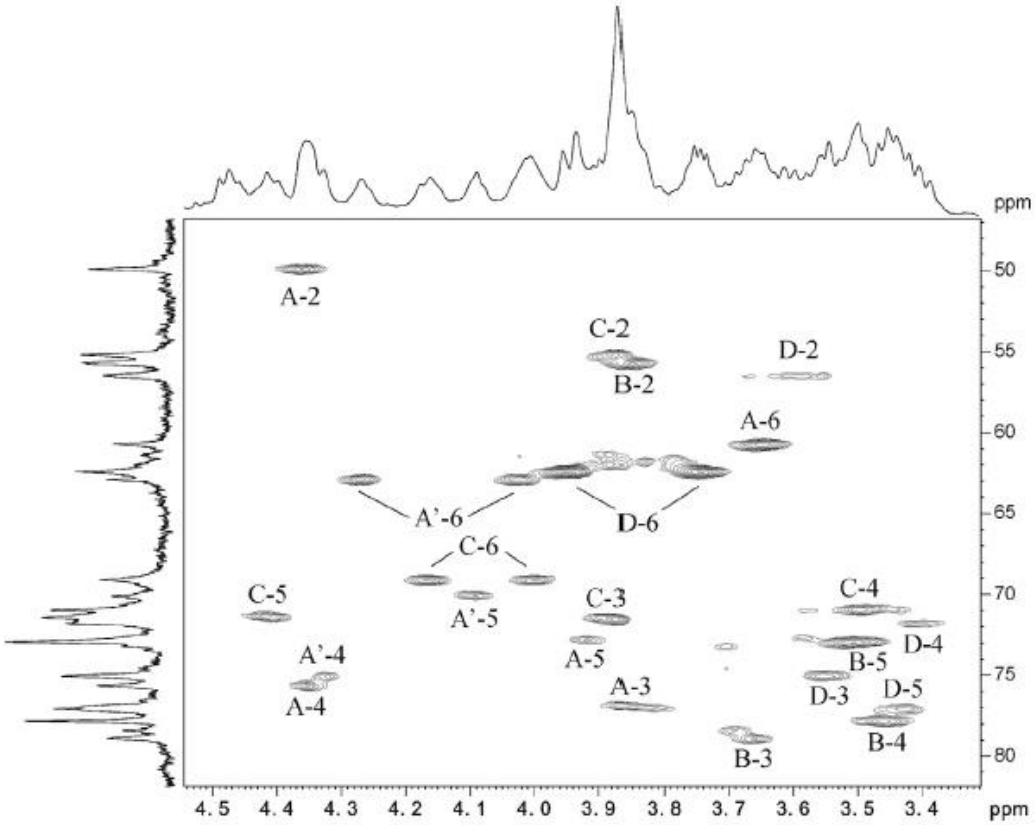


Рис. 2.2.10 Часть спектра HSQC 1H, 13C О-полисахарида P. chlororaphis 449. Соответствующие части ЯМР-спектров 1H и 13C показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. A0 обозначает 6-О-ацетилированный элемент A.

Молекулярное моделирование структуры фрагмента позволило визуализировать структурную формулу (a) и молекулярную модель (b) *P. chlororaphis K3*(Рис 11)

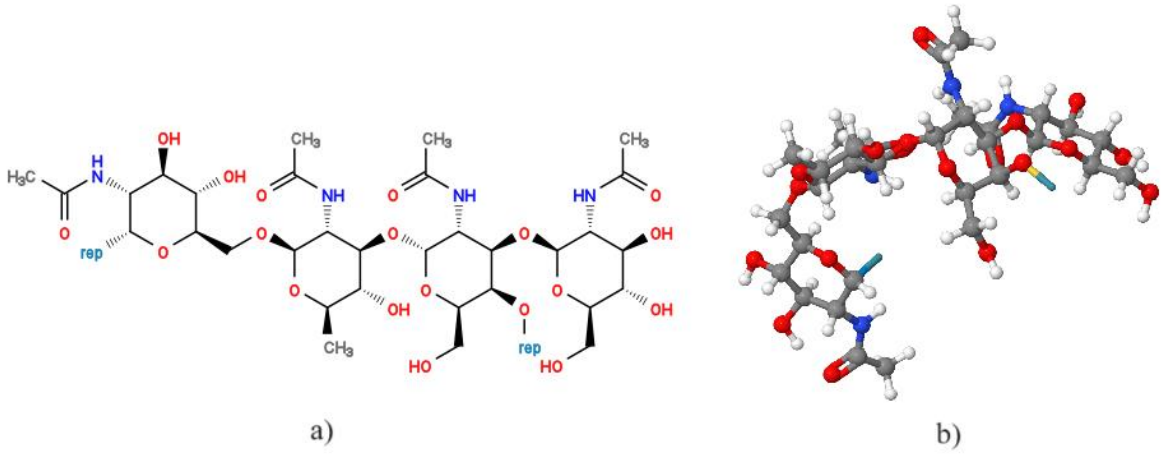


Рис. 2.2.11 Структурная формула (a) и молекулярная модель (b) повторяющегося звена О-полисахарида *P.chlororaphis* K3

Молекулярное моделирование структуры фрагмента *Pseudomonas chlororaphis* K3 (Рис. 12) показало, что из-за бетта связи и связи 1-6 предположительно образуется спиралевидная структура.

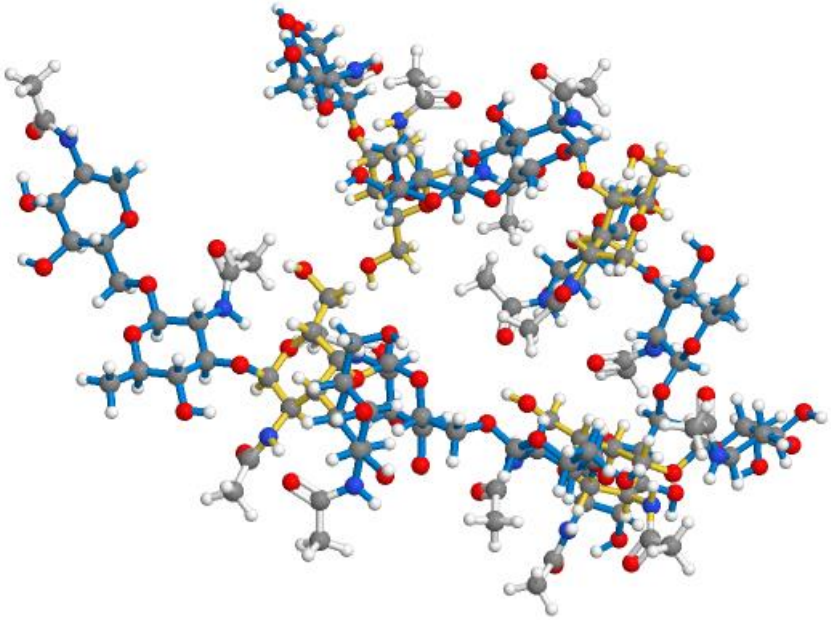


Рис. 2.2.12 Молекулярная модель с несколькими повторяющимися звеньями О-полисахарида *P.chlororaphis* K3

3.3 Физико-химические свойства ЛПС в водной среде

ЛПС в воде образуют надмолекулярные частицы, потому что являются амфифильными молекулами. Результаты измерений с помощью метода динамического рассеяния, показали, что диаметр (d) частиц ЛПС *P. chlororaphis* K3 был равен 68,04 нм (a), а дзета-потенциал равен -15,2 мВ (b) (Рис 13).

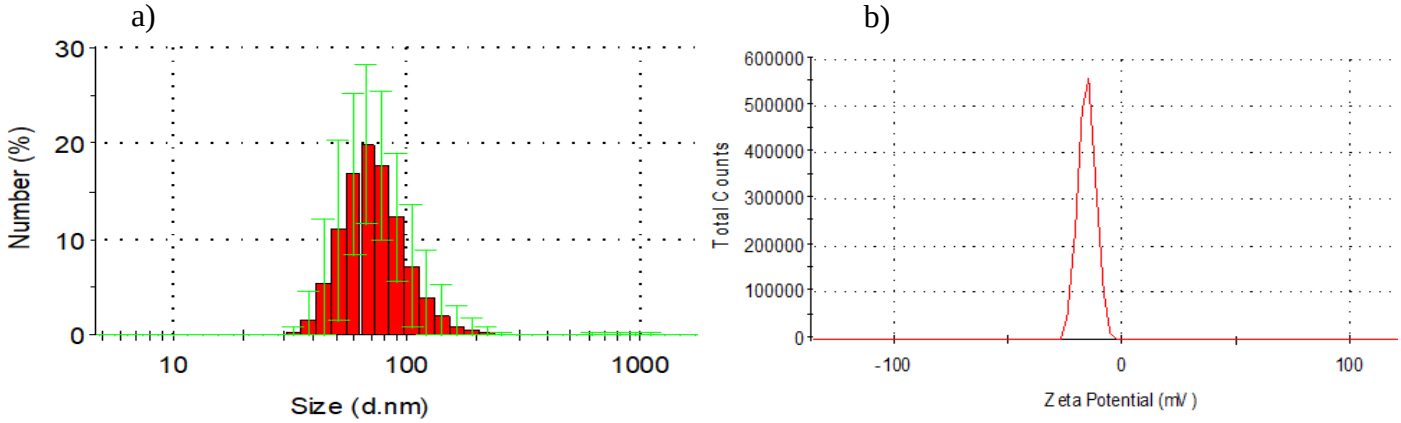


Рис. 3.2.13 Графики диаметра частиц (a) и дзета-потенциала частиц ЛПС *P. chlororaphis* K3, полученные методом рассеяния динамического света

Электрофоретическое разделение биомакромолекул в ПААГ продемонстрировало наличие гетерогенности, проявляющейся в ДСН-ПААГ в виде неоднородности полос.

3.4 Биологическая активность по отношению к микрорастениям картофеля

Добавление ЛПС *P. chlororaphis* К3 значительно повлияло на ингибирование роста микрорастений картофеля, в отличии от дезацилированого ЛПС этого штамма. Длина побегов недостоверно увеличилась на 4,56% (p <0,5) (a), но при этом сухая масса достоверно уменьшилась на 21% (p <0,000001) (b). Суммарная длина корней уменьшилась на 15,1% (p <0,05) (c), и сухая масса корней уменьшилась на 21,4% (p <0,005) (d) (Рис 3.4.14).

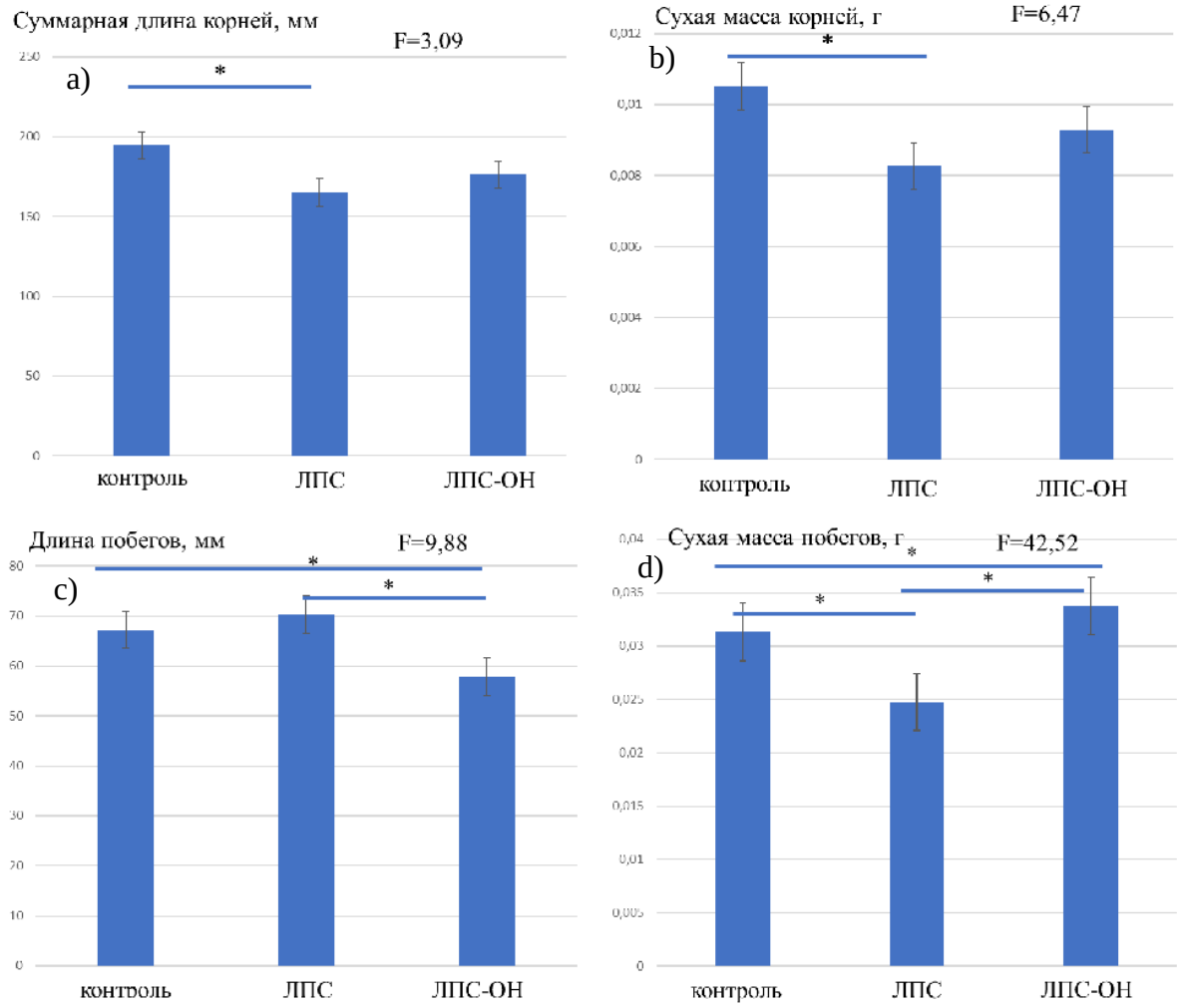


Рис. 3.2.13 Диаграммы, демонстрирующие влияние ЛПС *P. chlororaphis* К3 на морфометрические признаки микрорастений картофеля

Заключение

1. Получено 810 мг препарата липополисахарида штамма Pseudomonas chlororaphis K3 с выходом 12,5%.

2. В составе липида А выявлено присутсвие остатков 3-гидроксидодекановой, октадекановой и гексадекановой кислот. Установлена химическая структура посторяющегося олигосахаридного звена О-полисахарида, в состав которого входят остатки N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилхиновозамина и глюкозы в соотношении 2:1:1:1.

3. В водной среде липополисахирид штамма Pseudomonas chlororaphis K3 образует надмолекулярные частицы с диаметром 68 нм и дзета-потенциалом -15 мВ. При действии на микрорастения картофеля липополисахарид вызывал достоверное снижение сумарную длину корней, сухой массы побегов и корней. Дезацилированый липополисахарид не влиял на массу микрорастений и длину корней, но достоверно снижал длину побега.