

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

Кафедра органической и биоорганической химии

**Химическая структура, физико-химические свойства и
биологическая активность липополисахарида *Ochrobactrum
quorumnocens* T1Kr02**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 251 группы _____

направления 04.04.01 «Химия» _____

код и наименование направления, специальности Института химии

Криворучко Александры Александровны

Научный руководитель

доцент, к.б.н., доцент

должность, уч. ст., уч. зв.

подпись, дата

Г.Л. Бурыгин

инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

д.х.н., профессор

должность, уч. ст., уч. зв.

подпись, дата

А.Ю. Егорова

инициалы, фамилия

Саратов 2025 год

Введение

Грамотрицательные бактерии рода *Ochrobactrum* таксономически занимают промежуточное положение между патогенными бруцеллами и клубеньковыми азотфиксирующими ризобиями. Бактерии вида *Ochrobactrum quorumnocens* являются альфа-протеобактериями в составе семейства *Brucellaceae*. Штаммы *Ochrobactrum* spp. выделяют из различных природных источников: из почвы, воды, растительных, животных и клинических образцов, что говорит о высокой экологической пластичности данных бактерий. Несмотря на высокий практический интерес к бактериям данной группы, на сегодняшний день описано лишь 5 структур О-антигенов бактерий рода *Ochrobactrum*.

В современной науке есть проблема получения новых деполимеров с новой структурой, обладающими новыми функциями, существует закономерность новая структура, новая функция. Поиск макромолекул, в том числе полисахаридов с ранее не описанными структурами, открывает возможность, получения макромолекул полисахаридов с новыми свойствами, которые могут быть использованы в медицине, биотехнологии, растениеводстве и тд. А также поиск биологических объектов, которые могут продуцировать, новые макромолекулы как вещества продуценты. Поиск новых организмов продуцирующие новые макромолекулы с новыми свойствами.

Целью работы стало получение препарата липополисахарида (ЛПС) ризосферного штамма *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kf02 и установление химической структуры повторяющего звена О-полисахарида и липида А, изучение биологической активности по отношению к проросткам пшеницы и росткам картофеля.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Получить препараты ЛПС и ОПС штамма *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02
2. Провести анализ жирных кислот липида А, моносахаридного состава и содержания фосфора в ЛПС.
3. Изучить физико-химические свойства ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 в водной среде
4. Установить химических структур повторяющего звена О-полисахарида
5. Изучение биологической активности по отношению к проросткам пшеницы и микрорастениям картофеля

Методы и объекты исследования. В работе исследованы ризосферные бактерии штамма *Ochrobactrum quorumnoscens* T1Kr02, липополисахарид штамма *Ochrobactrum quorumnoscens* T1Kr02, твердая пшеница сорта Николаша, мягкая пшеница сорта Саратовская 29, микрорастения картофеля. Основным методом исследования ЯМР спектроскопия.

Структура работы. Выпускная квалификационная работа состоит из перечня сокращений, условных обозначений и символов, введения, обзора литературы, практической части, обсуждения результатов, выводов и списка используемых источников, включающего наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В введении рассмотрена актуальность исследований получения и установление химической структуры повторяющего звена О-полисахарида и липида А, изучение биологической активности по отношению к проросткам пшеницы и росткам картофеля.

В работе представлен литературный обзор по изучению разнообразных природных полисахаридов и их химических характеристик. Рассмотрена структура липополисахарида, ее биологическая активность. Изучены Бактерии рода *Ochrobactrum*.

В практической части описаны объекты и методы исследования, приведен метод культивирования бактериальных штаммов и выделение из них липополисахарида, приведена характеристика препарата ЛПС, изучена ее физико-химические свойства в водной среде и биологическая активность в отношении проростков пшеницы и микрорастений картофеля.

В обсуждении результатов рассмотрены определение: получения ЛПС и О-полисахарида, анализа жирных кислот, ЯМР-спектроскопии, измерения размера и дзета-потенциала, электрофореза, колориметрического определения концентрации углеводов и фосфатов и биологической активности в отношении проростков пшеницы и микрорастений картофеля.

Результаты и их обсуждения

2.2.1 Получение ЛПС и О-полисахарида

Из 10 л бактериальной культуры *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 было получено 5,6 г сухой биомассы клеток, из которой с помощью водно-фенольной экстракции по Вестфалю было получено 154 мг леофилизированного препарата ЛПС с выходом 2,7 % от сухих клеток. С помощью мягкого кислотного гидролиза с последующим гель-хроматографическим разделением был получен О-полисахарида с выходом 38 %.

2.2.2 Анализ жирных кислот

Анализ жирных кислот ЛПС [1] показал преобладание 3-гидрокситетрадекановой кислоты [14:0 (3-ОН)], 3-гидроксигексадекановой кислоты [16:0 (3-ОН)], лактобацилловой кислоты [19С:0] и 27-гидроксиоктакозановой кислоты [28:0(27-ОН)], а также гексадекановая кислота [16:0] и октадеценновая кислота [18:1] в меньших количествах (рисунок 1).

2.2.3 ЯМР-спектроскопия

При подготовке к ЯМР-анализу препарат О-полисахарида штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 был подвергнут хроматографическому разделению, в результате чего было получено две фракции: ПС-1 и ПС-2. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C фракции ПС-1 показали сигналы различной интенсивности, что указывает на структурную неоднородность полисахарида, в частности, из-за нестехиометрического О-ацетилирования (для О-ацетильной группы были обнаружены сигналы при δH 2,16 и δC 21,7).

Спектр ^1H ЯМР дефосфорилированного липополисахарида (ДЛПС) (Таблица 1) был расшифрован с использованием 2D ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H TOCSY и ROESY экспериментов. Спектры показали присутствие β -

фукофуранозы (β -Fucf, остаток А в таблице 2) и β -фукопиранозы (β -Fucp, остаток В в таблице 2).

Таблица 1 – Химические сдвиги (δ , ppm) ^1H и ^{13}C ЯМР полисахаридов *Ochrobastrum quorumnocens* T1Kr02

Остаток		C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H4	C-5 H-5	C-6 H-6
ДПС							
$\rightarrow 2$)- β -D-Fucf-(1 \rightarrow	(A)	109.0 5.43	90.5 4.34	77.9 4.10	88.4 3.88	68.6 3.94	19.5 1.26
$\rightarrow 3$)- β -D-Fucp-(1 \rightarrow	(B)	103.3 4.60	70.8 3.60	81.4 3.74	72.5 3.92	72.1 3.83	16.7 1.26
ПС-1							
$\rightarrow 2$)- β -D-Fucf-(1 \rightarrow	(A)	108.8 5.43	90.5 4.35	77.7 4.11	88.3 3.88	68.6 3.89	19.5 1.26
$\rightarrow 3$)- β -D-Fucp-(1 \rightarrow	(B')	102.9 4.67	70.9 3.60	81.0 3.77	72.3 3.90	72.2 3.80	16.6 1.26
$\rightarrow 2$)- β -D-Fucf-(1 \rightarrow 3) OAc	(A')	109.0 5.49 174.6	87.0 4.46 21.6 2.16	79.3 5.04	87.3 4.14	68.3 4.02	19.5 1.23
$\rightarrow 3$)- β -D-Fucp-(1 \rightarrow	(B)	103.4 4.60	70.9 3.62	81.4 3.74	72.3 3.90	72.2 3.83	16.6 1.27
ПС-2							
$\rightarrow 2$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow	(G)	103.5 4.90	83.8 3.59	76.8 3.79	70.1 3.48	77.8 3.51	62.1 3.95 3.77
$\rightarrow 2$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) 1)-Suc	(G')	103.5 4.90 176.2	83.8 3.59 30.9 2.75	76.9 3.67 31.2 2.66	69.9 3.59 179.4	74.8 3.70	64.5 4.48 4.39

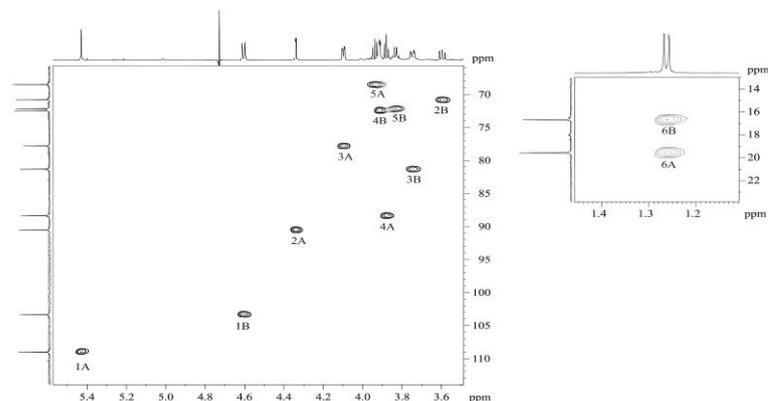


Рисунок 1 – Фрагмент 2D ^1H , ^{13}C HSQC-спектра дезацетилированного полисахарида ПС-1 (ДЛПС) *O. quorunpocens* T1Kr02. Соответствующая часть ^1H ЯМР-спектра показана по горизонтальной оси F2.

Сигналы ^{13}C ЯМР были отнесены с использованием 2D гетероядерных спектров ^1H , ^{13}C HSQC [2] и НМВС. Было обнаружено, что остаток А ($\beta\text{-Fucf}$) замещен по положению 2, а остаток В ($\beta\text{-Fucp}$) - по положению 3 (таблица 1).

Спектр ROESY (таблица 2) содержал межостаточные пики Н-2А, С-1В; Н-3А, С-1В и Н-3В, С-1А, демонстрирующие линейный тип полисахаридной цепи. Спектр НМВС (рисунок 3) окончательно подтвердил структуру цепи следующим образом:

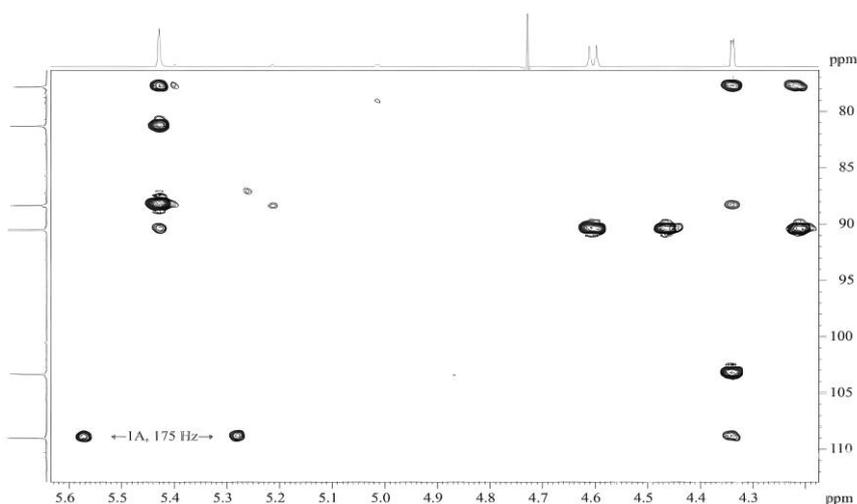


Рисунок 2 – Фрагмент 2D ^1H , ^{13}C HMBC-спектра дезацетилизованного полисахарида ПС-1 *O. quorumnoscens* T1Kr02. Соответствующая часть ^1H ЯМР-спектра показана по горизонтальной оси F2.

Таблица 2 – Корреляции для H-1 и C-1 в 2D ROESY и HMBC спектрах полисахаридов *Ochrobactrum quorumnoscens* T1Kr02

Аномерный атом в сахарном остатке (δ)	Корреляция (s) с атомами в остатках сахара (s) (δ)	
	ROESY	HMBC
ДПС		
A H-1 (5.43)	A H-2 (4.34) B H-3 (3.74) B H-2 (3.60)	A C-3 (77.6) B C-3 (81.4) A C-4(88.4)
A C-1 (109.0)		A C-2 (90.5)
B H-1 (4.60)	A H-2 (4.34) A H-3 (4.10) B H-5 (3.83) B H-3 (3.74) B H-2 (3.60)	B C-2 (90.5)
B C-1 (103.3)		A H-2 (4.34) B H-5 (3.83) B H-2 (3.60)
ПС-1		
A H-1 (5.43)	A H-2 (4.34) B' H-4 (3.90) B' H-3 (3.77) B' H-2 (3.60)	A C-3 (77.7) B' C-3 (81.4) A C-4 (88.3)
A C-1 (108.8)		A H-2 (4.34) B' H-3 (3.77)
B' H-1 (4.67)	A' H-2 (4.46) B' H-3 (3.77) B' H-5 (3.80) B' H-2 (3.60)	A' C-2 (87.0)

B' C-1 (102.9)		A' H-2 (4.45) B' H-5 (3.80) B' H-2 (3.60)
A' H-1 (5.49)	A' H-2 (4.46) B H-4 (3.90) B H-3 (3.74) B H-2 (3.60)	A' C-3 (79.3) A' C-4 (87.3) B C-3 (81.4)
A' C-1 (109.0)		A' H-2 (4.46) B H-3 (3.77)
B H-1 (4.60)	A H-2 (4.34) A H-3 (4.11) B H-5 (3.83) B H-3 (3.74)	A C-2 (90.5)
B C-1 (103.4)		A H-2 (4.35) B H-5 (3.83) B H-2 (3.62)

Основываясь на этих данных, было сделано заключение, что дисахаридное повторяющееся звено ДЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 имеет следующую структуру (рисунок 4):

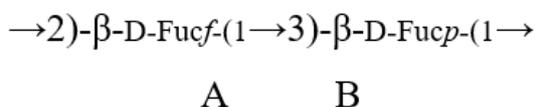


Рисунок 3 – Структура дисахаридного повторяющегося звена ДЛПС *O. Quorumnocens* T1Kr02

ЯМР-спектры ^1H и ^{13}C исходного ПС-1 были отнесены и проанализированы, как описано выше для ДЛПС (таблицы 1, 2).

Молекулярное моделирование структуры фрагмента ПС-1 *O. quorumnocens* T1Kr02 (рисунок 5) показало, что (1 \rightarrow 3)- β -связь между остатками D-Fucf и D-Fucp в повторяющихся звеньях приводит к развороту в расположении моносахаридных остатков внутри O-полисахарида.

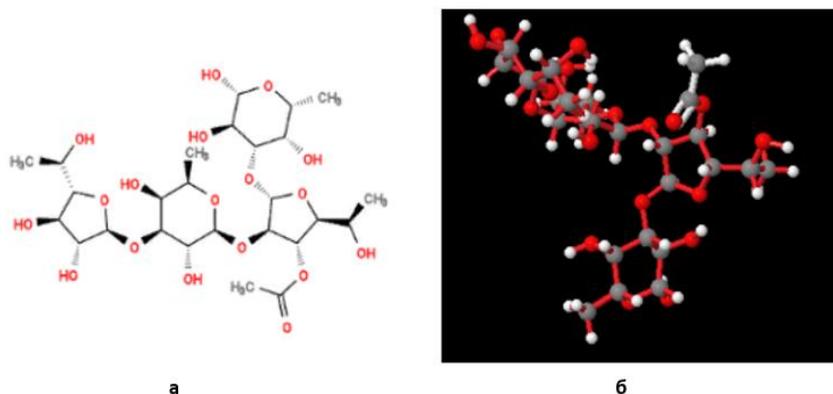


Рисунок 4 – Структурная формула (а) и молекулярная модель (б) предполагаемого повторяющегося звена О-полисахарида (ПС-1) *O. quorumnocens* T1Kr02, содержащего два остатка, каждый D-Fucf и D-Fucp.

Спектр ^{13}C ЯМР ПС-2 (левая проекция рисунок 6, таблица 1) содержал два набора сигналов. Основной набор был характерен для регулярного глюкана и включал шесть сигналов, в том числе аномерный сигнал при δ_{C} 103,4. Второй набор содержал дополнительно четыре пика остатка янтарной кислоты (таблица 2).

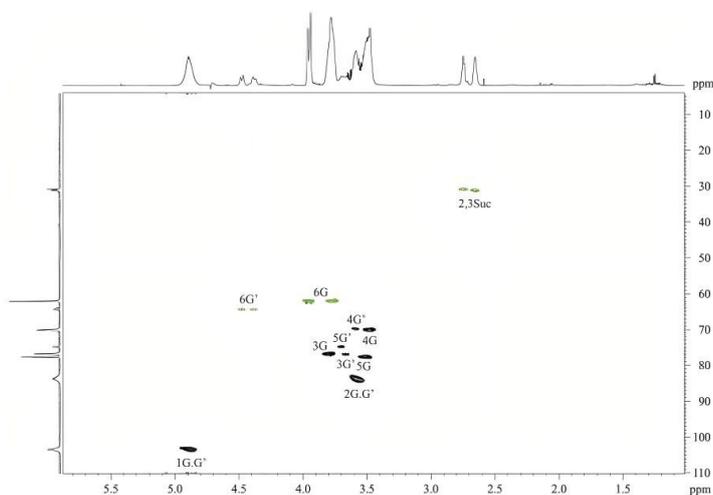


Рисунок 5 – Фрагмент 2D ^1H , ^{13}C HSQC-спектра ПС-2 *O. quorumnocens* T1Kr02. Соответствующая часть ^1H ЯМР-спектра показана по горизонтальной оси F2. Арабские цифры относятся к парам Н/С в остатках сахаров, обозначенных буквами, как показано в таблице 1

Спектр HSQC фракции ПС-2 (рисунок 6) выявил β -конфигурацию глюкопиранозы в глюкане и замещение в остатках в положениях 2 (основной

набор сигналов) и 2 и 6 (второй набор сигналов), принимая во внимание смещение сигналов C-2 и C-6 в более сильное поле по сравнению с β-глюкопиранозой.

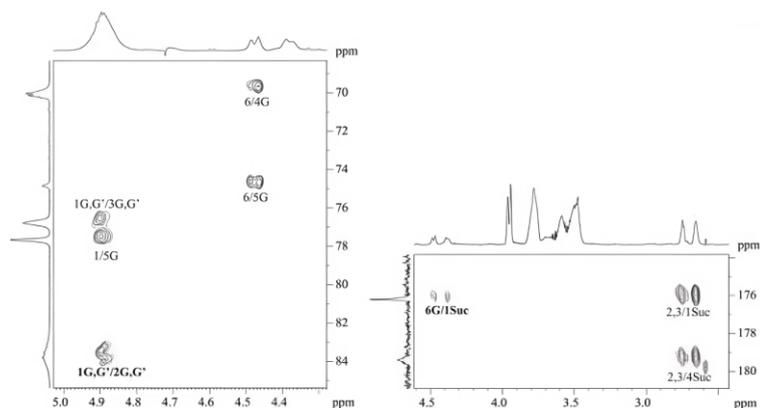


Рисунок 6 – Фрагмент 2D ^1H , ^{13}C НМВС-спектра ПС-2 *O. quorumnocens* T1Kr02. Соответствующая часть ^1H ЯМР-спектра показана по горизонтальной оси F2. Арабские цифры относятся к парам Н/С в остатках сахаров, обозначенных буквами, как показано в таблице 2

На основе совокупности данных ЯМР-химических сдвигов и анализа сахаров было предложено, что ПС-2 представляет собой гомополимер глюкозы, замещенный в положении 6 сукцинатом (~15%), со следующей структурой:

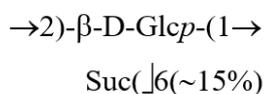


Рисунок 7 – Структура гомополимера глюкопиранозы, замещенный в положении 6 сукцинатом

Молекулярное моделирование структуры фрагмента полисахарида фракции ПС-2 штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 (рисунок 9) показало, что остатки D-Glcp, предположительно, образуют плотную спиралевидную структуру. Остатки сукцината ориентированы наружу от глюкана (рисунок 9, а и б). Это может способствовать лучшей растворимости ПС-2 в воде и

образованию дополнительных водородных и электростатических связей с другими молекулами.

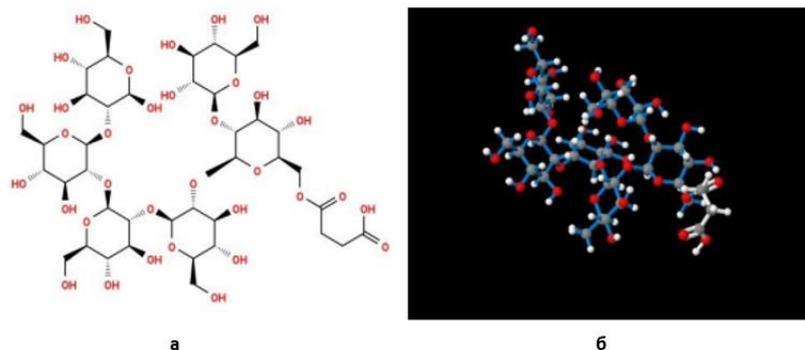


Рисунок 8 – Структурная формула (а) и молекулярная модель (б) β -(1 \rightarrow 2)-глюкана (ПС-2) из *O. quorumnocens* T1Kr02. Один из остатков D-Glcp (~15%) в положении б связан с остатком сукцината.

В результате анализа данных ЯМР-спектроскопии была установлена структура повторяющихся звеньев двух полисахаридов в составе препарата ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02. Структуры повторяющихся звеньев представлены на рисунке 10.

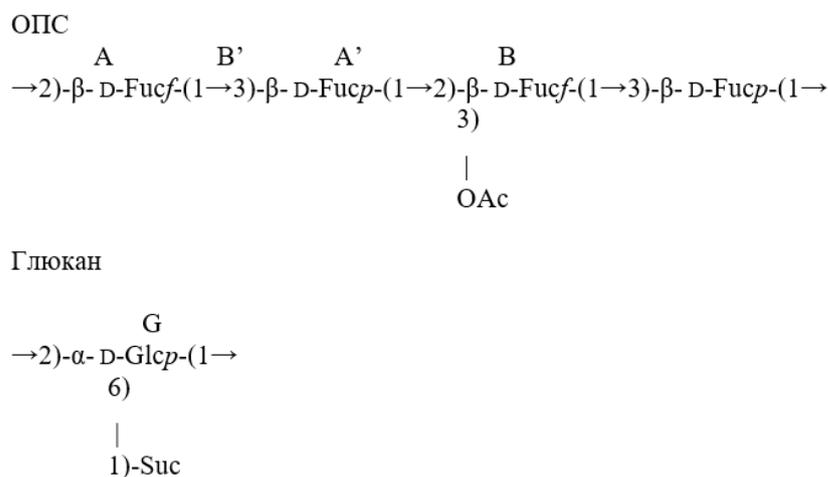


Рисунок 9 – Структуры повторяющихся звеньев ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02

2.2.4 Измерения размера и дзета-потенциала.

Результаты измерений методом динамического светорассеяния (рисунок 11) показали, что в водном растворе *O. quorumnocens* T1Kr02 частицы ЛПС имеют диаметр $72,2 \pm 3,6$ нм и дзета-потенциал $21,5 \pm 0,7$ мВ.

2.2.5 Электрофорез

Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле (рисунок 15) продемонстрировало преобладание высокомолекулярной фракции молекул в составе ЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 при отсутствии гетерогенности, проявляющейся в ДСН-ПААГ в виде лестничного профиля полос, характерного для энтеробактериальных ЛПС.

2.2.6 Колориметрическое определение концентрации углеводов

Анализ содержания углеводов в ЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 с использованием градуировочного графика (рисунок 13) позволил оценить массовую долю углеводов в препарате ЛПС в 31,2%.

2.2.7 Колориметрическое определение концентрации фосфатов

Анализ содержания фосфора в ЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 с использованием градуировочного графика (рисунок 14) показал массовую долю фосфора в препарате ЛПС равную 0,66%.

2.2.8 Биологическая активность в отношении проростков пшеницы

Анализ результатов измерения длины coleoptilya, побега и корней проростков твердой и мягкой пшеницы показал (рисунки 15-17) недостоверное стимулирование роста растений при добавлении исходного ЛПС штамма T1Kr02 в сравнении с контрольными показателями.

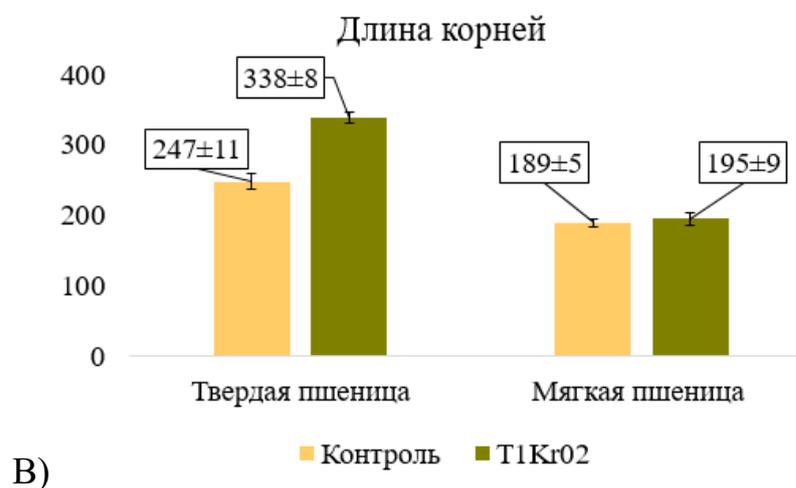
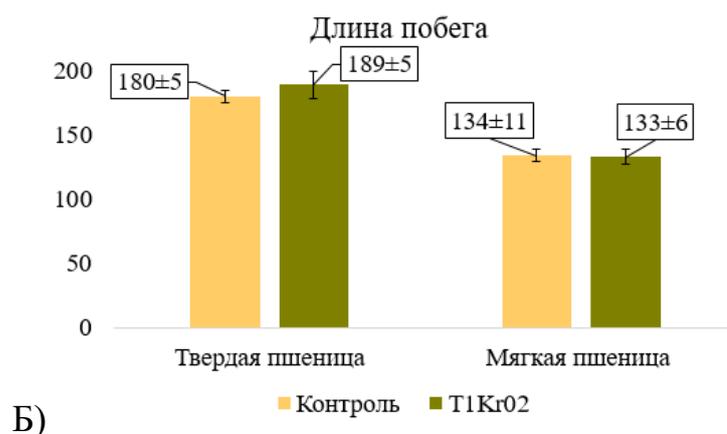
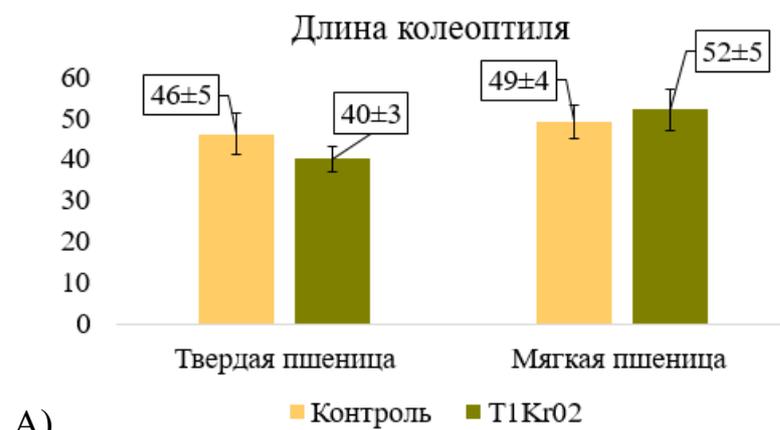


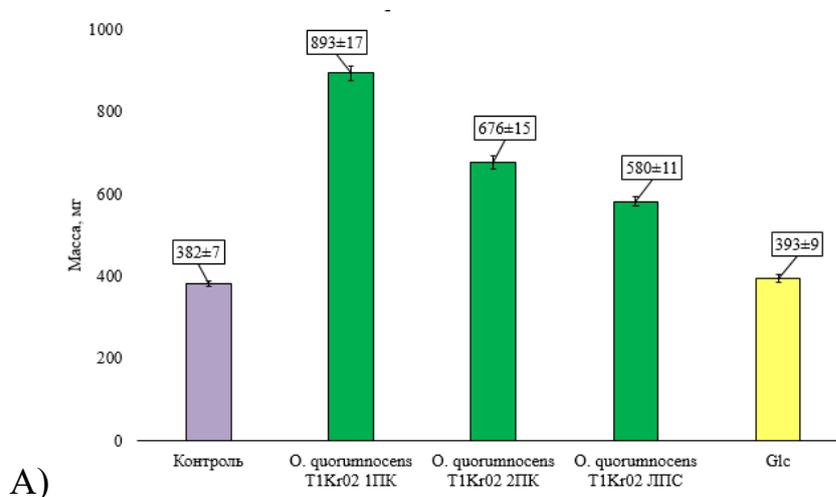
Рисунок 10 – Результаты измерений длины coleoptilya (А), побега (Б), корней (В) твердой и мягкой пшеницы в вариантах с обработкой и без обработки ЛПС штамма *O. quorutnocens* T1Kr02

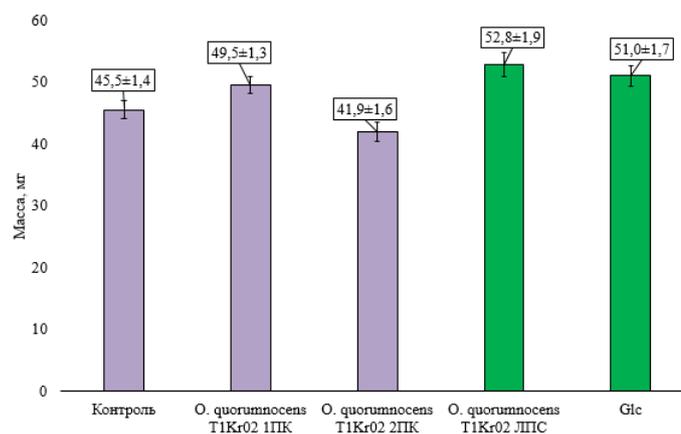
Анализ морфометрических характеристик проростков твердой пшеницы сорта Николаша показал недостоверное увеличение роста длины побега на 5% и достоверное увеличение длины корней на 37%.

Анализ морфометрических характеристик проростков мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 показал недостоверное увеличение роста длины coleoptily на 6%, длины корней на 3%.

2.2.9 Биологическая активность в отношении микрорастений картофеля в условиях *in vitro*

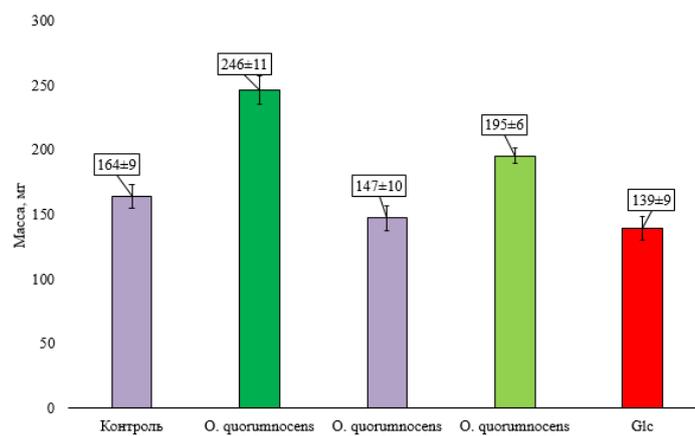
Анализ результатов измерения сырой массы побега, сухой массы побега, сырой массы корней, сухой массы корней микрорастений (рисунки 18-21) показал, достоверное стимулирование роста при добавлении исходного ЛПС штамма T1Kr02 в сравнении с действием фрагментов молекул ЛПС этого штамма. Из двух O-полисахаридов штамма T1Kr02 наиболее активен в отношении микрорастений картофеля – O-полисахарид фракции ПС-1.



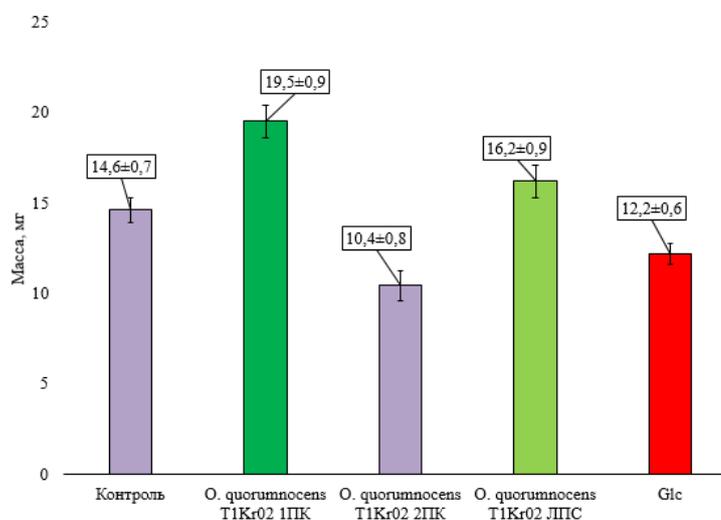


Б)

Рисунок 11 – Анализ результатов влияния исходного ЛПС штамма T1Kr02 в сравнении с действием фрагментов молекул ЛПС на сырую (А) и сухую (Б) массу побегов. Зеленый цвет столбиков показывает статистически достоверное положительное влияние разной степени интенсивности, фиолетовый – недостоверное влияние разной степени интенсивности.



А)



Б)

Рисунок 12 – Анализ результатов влияния исходного ЛПС штамма T1Kr02 в сравнении с действием фрагментов молекул ЛПС на сырую (А) и сухую (Б) массу корней. Зеленый цвет столбиков показывает статистически достоверное положительное влияние разной степени интенсивности, фиолетовый – недостоверное влияние разной степени интенсивности.

Измерение сырой и сухой массы побегов продемонстрировало увеличение массы побегов относительно контрольных микрорастений при действии ЛПС штамма T1Kr02 на сухую массу на 16 %. На сырую массу побегов показали достоверное положительное влияние все добавляемые препараты *O. quorumnocens* T1Kr02 1ПК на 133,8 %, *O. quorumnocens* T1Kr02 2ПК 76,9 %, *O. quorumnocens* T1Kr02 ЛПС на 52,0 %.

Увеличение массы корней относительно контрольных растений повышалась при культивировании с *O. quorumnocens* T1Kr02 1ПК и *O. quorumnocens* T1Kr02 ЛПС: сырая масса на 50 % и 19 %, сухая масса на 39,1 % и 16 %.

Выводы:

1. Получен очищенный препарат ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnosens* T1Kr02 (154 мг) с выходом 2,7%. С помощью мягкого кислотного гидролиза с последующим гель-хроматографическим разделением получен О-полисахарид с выходом 38%.
2. Выявлено доминирование в составе липида А 3-гидрокситетрадекановой, гексадекановой и октодеценновой кислот. Методом ГЖХ ацетатов полиолов показано присутствие остатков фукозы и глюкозы в ОПС.
3. Определено, что в водном растворе молекулы ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnosens* T1Kr02 формируют надмолекулярные частицы диаметром $72,2 \pm 3,6$ нм с дзета-потенциалом $-21,5 \pm 0,7$ мВ.
4. Установлено методом ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектоскопии наличие в ОПС двух полимеров, один из которых содержал остатки глюкопиранозы, другой – остатки D-фукозы в фуранозной и пиранозной формах.
5. Установлено, что препарат ЛПС штамма *Ochrobactrum quorumnosens* T1Kr02, а также его О-полисахарид, содержащий остатки фукозы, оказывают наибольшее положительное влияние на рост и развитие как побегов, так и корней микрорастений картофеля.