

Л. И. ЛИНЕВИЧ, С. Х. ЛОБЖАНИДЗЕ, Б. Н. СТЕПАНЕНКО

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА АЗОТФИКСИРУЮЩИХ КЛУБЕНЬКОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ RHIZOBIUM LUPINI

(Представлено академиком А. И. Опариным 3 X 1975)

Биологическая фиксация атмосферного азота является одной из важных проблем сельского хозяйства и имеет большое народнохозяйственное значение. Так, сельскохозяйственные растения, образующие клубеньки, могут внести в почву до 100 кг азота на 1 га (<sup>1</sup>).

Азотфиксирующие клубеньковые бактерии выделяют во внешнюю среду полисахарид, который, согласно одной из гипотез, объясняющих механизм инокуляции растений клубеньковыми микроорганизмами, является фактором, обеспечивающим проникновение клубеньковых бактерий в корневую волосок (<sup>1</sup>) и образование инфекционных нитей в корнях растения-хозяина (<sup>2</sup>). Экзополисахарид (ЭП) — вещество, которое индуцирует образование в растении полигалактуропазы, играющей важную роль в инфекционном процессе. Полигалактуропаза частично деполимеризует пектин клеточной стенки, что, по-видимому, облегчает инвазию растений (<sup>3</sup>). Экзополисахарид является запасным питательным веществом и выполняет защитные функции (<sup>2</sup>), а также играет важную роль в стабилизации частиц почвы (<sup>4</sup>). Были попытки связать состав экзополисахаридов различных штаммов с их специфичностью в кросс-инокуляции (<sup>5</sup>).

Объектом данного исследования является экзополисахарид, выделяемый клубеньковыми азотфиксирующими микроорганизмами *Rhizobium lupini* (эффективный штамм 359<sup>a</sup>), выращенными на синтетической среде. Среда была следующего состава (г/л): маннит 10,0; глутамат натрия 2,0;  $K_2HPO_4$  2,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $CaCl_2$  0,04; дрожжевой экстракт 1,0; биотин 0,00001; тиамин 0,00001, и микроэлементы. Перед засевом среда в колбах подвергалась стерилизации в течение 30 мин. под давлением 0,5 атм. (рН среды 6,3—6,4). Микроорганизмы выращивали в течение трех суток при 28—30° и аэрации 240 мкМ  $O_2$ . Такая же трехсуточная культура микроорганизмов использовалась для последующих засевов колб.

Выделение и очистка. Для выделения полисахарида из культуральной жидкости первоначально центрифугированием отделяли клетки. К надосадочной жидкости прибавляли этиловый спирт в расчете 1 : 10. Выпавший осадок полисахарида с примесью белка центрифугировали на центрифуге К-23. Для удаления белка проводили депротеинизацию методом Севага (<sup>6</sup>). Для этого осадок (полисахарид + белок) растворяли в бидистилляте и прибавляли хлороформ и *n*-бутанол. Смесь встряхивали в течение 30 мин. Осажденный белок отделяли центрифугированием, а к водной фазе прибавляли этиловый спирт для переосаждения полисахарида.

Исследование гомогенности полученного полисахарида. Для исследования гомогенности были проведены: 1) ультрацентрифугирование и 2) электрофорез в полиакриламидном геле (7,5%-ном). Время разгонки 4 часа при силе тока 60 ма. Гель окрашивали в 0,5%-ном растворе ализанового голубого в 7%-ной уксусной кислоте в течение 7 час. От избытка красителя гель отмывали 7%-ной уксусной кислотой. В результате была получена одна полоса и на старте осталась часть полисахарида,

не вошедшая в гель. Денситограмма геля, записанная на денситометре МФ-4, имела один пик. При ультрацентрифугировании полисахарида был получен также один пик, что, как будто, указывало на гомогенность препарата. Однако в дальнейшем, при определении молекулярного веса методом ультрацентрифугирования, полисахарид оказался гетерогенным, с молекулярными весами 30 000 и 14 000.

**Фракционирование.** На основании ультрацентрифугирования оказалось необходимым проведение гель-хроматографии полисахарида с целью получения фракций. Для гель-хроматографии использован сефадекс G-50. Хроматографическую колонку (60×1,7 см) заполняли предва-

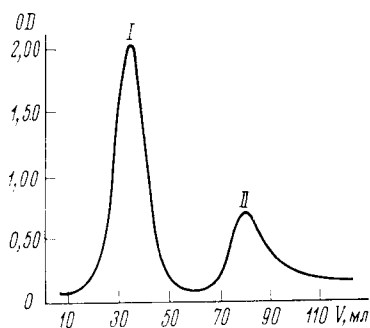


Рис. 1

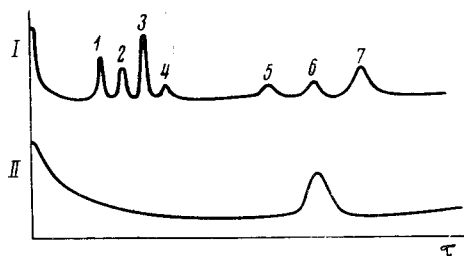


Рис. 3

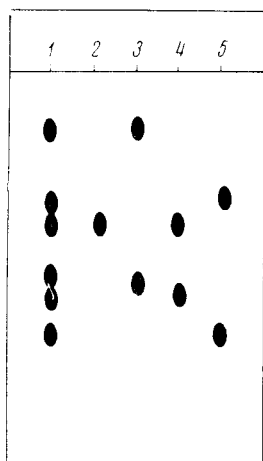


Рис. 2

Рис. 1. Профиль элюции экзополисахарида при хроматографии на сефадексе G-50. Римские цифры соответствуют I и II фракциям полисахарида

Рис. 2. Разделение продуктов кислотного гидролиза фракций экзополисахарида хроматографией на бумаге. 1 — гидролизат I фракции; 2 — гидролизат II фракции; 3 — галактурононовая кислота+манноза; 4 — глюкоза+арабиноза; 5 — галактоза+ксилоза

Рис. 3. Г.ж.х. анализ ацетатов альдононитрилов продуктов кислотного гидролиза фракций экзополисахарида. I — фракция I, II — фракция II. Ацетаты альдононитрилов: 1 — рамнозы; 2 — фукозы; 3 — арабинозы; 4 — ксилозы; 5 — маннозы; 6 — глюкозы; 7 — галактозы

рительно набухшим гелем. Свободный объем колонки определяли пропусканием 0,3% раствора голубого декстрана. На колонку наносили 0,5%-ный раствор полисахарида. Элюирование полисахарида вели 0,2 M раствором NaCl. После выхода 50 мл (свободный объем колонки) собирали фракции по 2 мл на коллекторе фракций. Наличие полисахарида во фракции определяли антроповой реакцией (7). В результате гель-хроматографии были получены препараты двух фракций (рис. 1).

**Установление моносахаридного состава.** Каждая фракция была гидролизована в 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение 3 час., с последующей нейтрализацией углекислым кальцием. Гидролизаты анализированы бумажной и газо-жидкостной хроматографией.

**Нисходящая хроматография на бумаге** проводилась в растворителях: 1) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5); 2) пиридин — *n*-бутанол — вода (4:6:3); 3) ацетон — *n*-бутанол — вода (7:2:1), на ватмане

№ 1. В качестве проявителя использовали азотнокислое серебро. В первой фракции идентифицированы следующие компоненты: уроновая кислота, глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза и арабиноза (рис. 2). Уроновую кислоту определяли в полисахариде также карбазоловым методом <sup>(8)</sup>. Во второй фракции была идентифицирована только глюкоза.

Для газо-жидкостной хроматографии моносахариды переводили в летучие производные — ацетаты альдонитрилов. Лиофильно высушенный гидролизат обрабатывали по Истервуду — Хаффу <sup>(9)</sup>. Образцы инъецировались в хроматограф в виде хлороформного раствора (1 мг вещества в 0,5 мл растворителя). Хроматографию проводили на хроматографе «Цвет», модель 4-67, с использованием колонок (2,5 м × 3 мм), заполненных хромсорбом (45–60 меш) \*. В результате г.ж.х. анализа обнаружены те же компоненты, что и при хроматографии на бумаге, и дополнительно — дезоксисахара, что, по-видимому, объясняется большей чувствительностью газо-жидкостной хроматографии по сравнению с бумажной (рис. 3).

В экзополисахаридах были определены аminosахара модифицированным методом Боус <sup>(10)</sup> и пировиноградная кислота — переводением ее в 2,4-динитрофенилгидразон из предварительно гидролизованного полисахарида (гидролиз в 1 N HCl, 3 часа).

Таким образом, структурными компонентами I фракции ЭП являются: нейтральные сахара — ксилоза, арабиноза, глюкоза, манноза, галактоза; дезоксисахара — рамноза и фукоза; аminosахар; кислоты — уроновая и пировиноградная. Структурным компонентом II фракции является глюкоза.

По предварительным данным (и.-к. спектроскопия), в I фракции обнаруживаются β-гликозидные связи, а во II — α-гликозидные связи.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
3 X 1975

#### ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Е. Н. Мишустин, В. К. Шильникова, Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс, М., 1973. <sup>2</sup> M. Stacey, S. A. Barker, Polysaccharides of Microorganisms, Oxford, 1960. <sup>3</sup> H. Ljunggren, G. Fahraeus, J. Gen. Microbiol., v. 26, 521 (1961). <sup>4</sup> C. Clapp, R. Davist, Soil. Biol. Biochem., v. 2, 109 (1970). <sup>5</sup> L. P. T. M. Zevenhuizen, J. Gen. Microbiol., v. 68, 239 (1971). <sup>6</sup> M. G. Sevag, Biochem. Zs., B. 273, 419 (1934). <sup>7</sup> T. A. Scott, E. H. Melvin, Anal. Chem., v. 25, 1656 (1953). <sup>8</sup> T. Bitter, H. M. Muir, Anal. Biochem., v. 4, 330 (1962). <sup>9</sup> V. M. Easterwood, B. J. L. Huff, Svensk Papperstidn., v. 72, 768 (1969). <sup>10</sup> N. F. Boas, J. Biol. Chem., v. 204, 553 (1953).

\* Пользуемся случаем выразить благодарность Н. А. Макаровой за участие и помощь в проведении г.ж.х.