

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КИСЛЫХ
ЭКЗООЛИГОСАХАРИДОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. *VICIAE* VF39

© 2020 г. А. Ш. Канапина^а, *, В. В. Марченков^б, А. К. Сурин^с, Т. В. Ивашина^а

^аФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

^бФГБУ Институт белка Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

^сФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: doc.asya63@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.

После доработки 29.04.2020 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

С использованием методов масс-спектрометрии и HCD-фрагментации ионов определены структуры низкомолекулярных экзоолигосахаридов, продуцируемых симбиотическими азотфиксирующими бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Показано, что экзоолигосахариды являются мономерами, димерами и тримерами повторяющегося октасахаридного звена кислого высокомолекулярного экзополисахарида. Мажорная фракция представлена мономерами октасахаридов с двумя остатками глюкуроновой кислоты на восстанавливаемом конце. В культуральной жидкости обнаружены также гептасахариды, соответствующие октасахаридному звену, лишенному остатков GlcA-с или Glc-b в главной цепи. Выявлена гетерогенность экзоолигосахаридов по содержанию *O*-ацетильных и гидроксипутаноильных заместителей.

Ключевые слова: *Rhizobium leguminosarum*, экзоолигосахариды, масс-спектрометрия, структура, модификации

DOI: 10.31857/S0026365620050110

Формирование симбиоза является многоэтапным процессом координированного взаимодействия клубеньковых бактерий и бобовых растений, в ходе которого происходит обмен молекулярными сигналами между партнерами, приводящий к дифференциальной экспрессии генов у обоих симбионтов. Результатом такого взаимодействия является образование азотфиксирующего клубенька, который можно рассматривать как новый специализированный орган растений. Одним из важнейших факторов формирования симбиоза является синтез бактериями семейства *Rhizobiaceae* экзополисахаридов (ЭПС).

Как и у многих микроорганизмов, экзополисахариды ризобий участвуют в защите бактерий от абиотических стрессов, образовании биопленок и подавлении защитных систем растения-хозяина (Marczak et al., 2017). Мутации, блокирующие синтез ЭПС у клубеньковых бактерий, нарушают и образование азотфиксирующих (Fix⁺) клубеньков недетерминированного типа в симбиозе с такими бобовыми растениями, как *Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*, *Pisum*, *Astragalus* (Leigh et al., 1987; Rolfe et al.,

1996; Cheng, Walker, 1998). В частности, установлено, что у Eho⁻-мутантов нарушены ранние этапы формирования симбиоза, а именно, инициация и элонгация инфекционных нитей. На более поздних стадиях симбиоза ЭПС защищает микросимбионт от бактерицидного действия NCR (nodule-specific cysteine-rich) пептидов растительного происхождения (Arnold et al., 2018). Последние исследования свидетельствуют о том, что экзополисахариды необходимы и при установлении симбиозов детерминированных типов с *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*. Так, показано, при инокуляции *Lotus corniculatus* и *L. japonicus* мутантным по синтезу ЭПС штаммом *Mezorhizobium loti* наблюдается блок не только на стадии развития инфекционных нитей, но и на стадии освобождения бактерий из инфекционных нитей в клетки растений (Kelly et al., 2013).

Клубеньковые бактерии продуцируют две формы ЭПС, отличающиеся степенью полимеризации повторяющихся звеньев: высокомолекулярные ЭПС и низкомолекулярные экзоолигосахариды (ЭОС) (Djordjevic et al., 1987; Gonzalez et al., 1998;

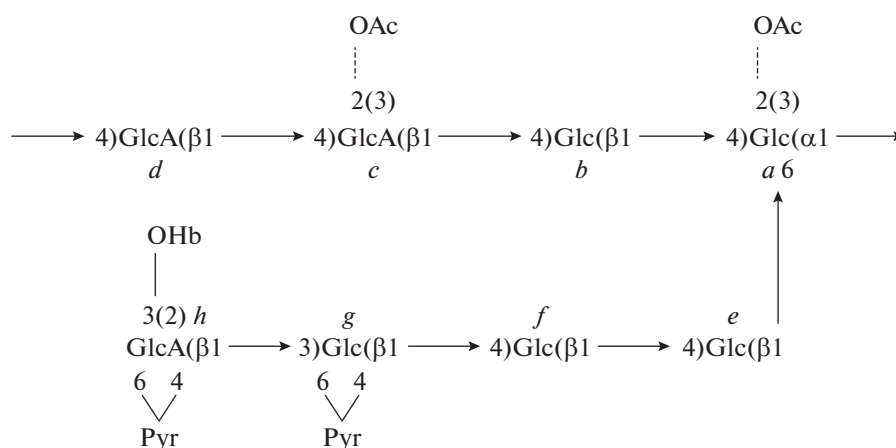


Рис. 1. Структура повторяющегося звена кислого экзополисахарида, синтезируемого штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39.

Stahelin et al., 2006). У штаммов *Sinorhizobium meliloti* – симбионтов люцерны – ЭОС представляют собой мономеры, димеры и тримеры повторяющегося октасахаридного звена сукциногликана (ЭПС) (Wang et al., 1999). Низкомолекулярная фракция экзополисахарида штамма *Rhizobium* sp. GRN2 состоит из димеров повторяющегося октасахаридного звена кислого ЭПС (Lopez-Lara et al., 1993). У *Rhizobium* sp. NGR234 ЭОС представлены мономерами ЭПС, содержащими девять моносахаридных остатков, и их октасахаридными производными (Stahelin et al., 2006).

Роль ЭОС в симбиозе не выяснена. Известно, что добавление определенных фракций ЭОС при инокуляции растений штаммами ризобий, у которых блокирован синтез ЭПС, восстанавливает способность этих бактерий образовывать азотфиксирующие клубеньки (Djordjevic et al., 1987; Urzainqui et al., 1992; Gonzalez et al., 1996). Эти данные позволили предположить, что ЭОС наряду с липохитоолигосахаридами (Nod-факторами) могут выполнять функцию сигнальных молекул при органогенезе азотфиксирующих клубеньков. У *S. meliloti* биологически активными являются тримеры повторяющегося звена ЭПС (Wang et al., 1999). Выявлена корреляция между структурой ЭОС и специфичностью взаимодействия микросимбионта с растениями-хозяевами (Simsek et al., 2007). При этом существенным фактором является наличие и количество в составе ЭОС *S. meliloti* неуглеводных заместителей, в частности, сукцинильной группы (Simsek et al., 2013). Следует, однако, отметить, что для отдельных пар микро- и макросимбионтов отсутствие ЭОС лишь снижает эффективность симбиоза, и достаточным условием для его установления является наличие модифицированного высокомолекулярного ЭПС (Mendis et al., 2016).

Ранее нами было показано, что клубеньковые бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 синтезируют кислый высокомолекулярный гетерополисахарид, необходимый для азотфиксирующего симбиоза с *Pisum sativum*, *Vicia faba* и *V. sativa* (Ivashina et al., 1994). Повторяющееся звено ЭПС является разветвленным октасахаридом, содержащим 5 остатков *D*-глюкозы, 2 остатка *D*-глюкуроновой кислоты и остаток *D*-галактозы (рис. 1). Октасахарид модифицирован двумя остатками ацетата пировиноградной кислоты (Pyr), *O*-ацетильными (Ac) и гидроксипуантоильными группами (Hb) (<http://csdb.glycoscience.ru/>, *CSDB ID 25288*, Ivashina et al., 2010). Сходные по структуре ЭПС синтезируются и близкородственными штаммами *R. leguminosarum* (Ivashina, Ksenzenko, 2012).

Структуры ЭОС у штаммов *Rhizobium leguminosarum* различных биоваров к настоящему времени не определены и механизмы их функционирования в симбиозе не изучены. В связи с этим, целью работы было определение структурных особенностей низкомолекулярных форм кислых полисахаридов у симбиотических азотфиксирующих бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия их культивирования. Объектами исследования являлись штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39rif^R (далее *Rlv* VF39) (Ivashina et al., 1994) и его производные с мутациями в генах глюкуронозил-(β-1,4)-глюкозилтрансферазы PssE (Ivashina et al., 2010) и глюкансинтазы NdvB (данная работа). Для трансформации и выделения плазмидной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* DH5α (“Novagen”, США). Конъюгативный перенос плазмиды в клетки *Rlv* VF39 осуществляли из штамма *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983). Для стандартного культивирования ри-

зобий использовали среду TY (Beringer, 1974). Для выделения полисахаридов штаммы выращивали в синтетической среде ВММ (Ivashina et al., 2010), содержащей *D*-маннит в концентрации 5 г/л. Бактерии *E. coli* культивировали в среде LB (Sambrook et al., 1989). Концентрации антибиотиков в селективных средах для *E. coli* и *Rhizobium* составляли, соответственно, (мкг/мл): тетрациклина – 10 и 5, канамицина – 20 и 60, рифампицина – 25.

Конструирование штамма с мутацией в гене *ndvB* осуществляли путем замещения аллеля гена дикого типа на его мутантный аллель в результате гомологичной рекомбинации. Для введения мутации в ген *ndvB*, кодирующий глюкансинтазу, сконструирована плаزمида рEXΔ*ndvB*-Km. Фрагмент ДНК длиной 6748 п.н., содержащий ОРС *ndvB* с окаймляющими последовательностями геномной ДНК, амплифицировали с использованием праймеров *ndvB_f* (AAGAATTC AACCCAGCACG-CCAAATG) и *ndvB_r* (TTGGTACCCCCACCTTC-CGCA) и клонировали в векторе рEX18Tc (Hoang et al., 1998) по сайтам EcoRI и KpnI. В результате была получена плазмида рEX*ndvB*. Для введения делеции длиной 1296 п.н. в ген *ndvB* плазмиду рEX*ndvB* гидролизировали эндонуклеазой рестрикции XhoI, два сайта которой расположены в кодирующей последовательности гена, и лигировали в условиях образования кольцевых молекул. Для маркирования делеции и последующей селекции мутантов в XhoI-сайт вводили Km^R-кассету из плазмиды рUC4K (“Pharmacia LKB”, Швеция). Конъюгативный перенос плазмиды рEXΔ*ndvB*-Km в клетки штамма *Rlv* VF39 осуществляли из штамма *E. coli* S17-1 с отбором Rif^RTc^SKm^RSuc^R-клонов. Наличие мутации подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров *ndvB_f* и *ndvB_r*.

Выделение полисахаридов. Культуру бактерий, выращенную в среде TY до ранней стационарной фазы, вносили в 50 мл среды ВММ до начальной оптической плотности 0.1. Бактерии выращивали в течение 4 сут при 28°C в колбах объемом 750 мл на роторной качалке (200 об./мин). Клетки дважды осаждали центрифугированием при 8000 об./мин (“Beckman J2-21”, США) в течение 30 мин при 4°C. Высокомолекулярные формы экзополисахарида осаждали из надосадочной жидкости добавлением 3-х объемов 96% этанола с последующим центрифугированием при 13000 об./мин в течение 1 ч при 4°C. Супернатант, содержащий экзополисахариды, концентрировали на роторном испарителе. ЭОС осаждали добавлением 10 объемов охлажденного 96% этанола с последующим центрифугированием при 19000 об./мин в течение 1 ч при 4°C (“Beckman J2-21”) и хранили при –20°C.

Концентрацию сахаров определяли антроновым методом (Loewus, 1952). Для построения калибро-

вочных кривых использовали растворы *D*-глюкозы в диапазоне концентраций 20–200 мкг/мл.

Ионообменную хроматографию низкомолекулярных олигосахаридов выполняли на ВЭЖ хроматографе ProStar (“Varian”, США). Образец ЭОС (2.4 мг в 20 mM *трис*-HCl буфере, pH 8.0) наносили на колонку MonoQ 5/50 GL (“GE Healthcare”, Швеция). Для удаления не связавшихся нейтральных сахаридов колонку промывали этим же буфером. Кислые ЭОС элюировали линейным градиентом NaCl (0–0.35 M) в 20 mM *трис*-HCl буфере, pH 8.0. Скорость потока составляла 0.6 мл/мин. Начиная с 3-ей минуты, собирали 72 фракции по 0.4 мл и анализировали на присутствие углеводов антроновым методом. Фракции, образующие один пик, объединяли. Олигосахариды осаждали 10 объемами охлажденного 96% этанола, растворяли в 500 мкл 0.1 M NH₄OAc буфера, pH 6.9 и фракционировали с помощью гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию ЭОС проводили на колонке Superdex Peptide 10/300 GL (“GE Healthcare”, Швеция) с использованием хроматографа ProStar (“Varian”, США). В качестве элюента использовали 0.1 M NH₄OAc, pH 6.9. Скорость потока составляла 0.6 мл/мин. Начиная с 12-й минуты, собирали 30 фракций по 500 мкл. Фракции из одного хроматографического пика объединяли, ЭОС осаждали 10 объемами 96% этанола и лиофилизировали.

Масс-спектрометрический анализ экзополисахаридов выполняли в режиме регистрации отрицательных ионов на приборе Orbitrap ELITE (“Thermo Scientific”, Германия), снабженном источником ионизации нанораспылением (NSI). ЭОС растворяли в смеси 30% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота и 10 mM NH₄HCO₃. Ввод образца ЭОС (50–200 пмоль/мкл) выполняли с помощью боросиликатного эмиттера (“Thermo Scientific”, США). Напряжение на входном конусе во время ионизации образцов варьировали в диапазоне 0.9–1.3 кВ. Температура прогреваемого капилляра составляла 200°C. Панорамное сканирование для регистрации ионов выполнялось в диапазоне *m/z* 500–4000. Для получения MS/MS спектров использовали режим HCD (диссоциация, активированная соударением в высокоэнергетической камере) с диапазоном сканирования ионизированных фрагментов с *m/z* 100–2000. Нормализованная энергия столкновений HCD составляла 25–50%. Все измерения выполняли при разрешении не ниже 200000. Масс-спектры регистрировали и обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения от производителя (“Xcalibur 2.2”). При расчете молекулярных масс ионов ЭОС и их фрагментов использовали следующие значения: *D*-глюкоза (Glc) – 180.06 Да, *D*-галактоза (Gal) – 180.06 Да,

D-глюкуроновая кислота (GlcA) – 194.04 Да, пирувил (Pyr) – 72.02 Да, *O*-ацетил (Ac) – 43.02 Да, гидроксипутаноил (Hb) – 87.04 Да. В зависимости от типа рассматриваемого масс-спектра, панорамный спектр или спектр фрагментации, мы использовали массы углеводов с учетом потери одной или двух молекул воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фракционирование экзоолигосахаридов. Для анализа секретируемых в культуральную среду полисахаридов бактерии *Rlv* VF39 выращивали в синтетической среде ВММ. Анализ культуральной жидкости на присутствие полисахаридов после осаждения и удаления высокомолекулярного ЭПС выявил наличие низкомолекулярных полисахаридов, концентрация которых была сопоставима с концентрацией высокомолекулярного ЭПС (соответственно, 598 ± 86 и 586 ± 26 мкг/мл). Суммарный препарат экзоолигосахаридов был разделен с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50GL. В результате показано, что только 70% ЭОС связывалось с носителем. Возможно, как и в случае других штаммов ризобий, не связавшиеся ЭОС представляют собой нейтральные полисахариды или β -глюканы (Breedveld, Miller, 1994).

Известно, что помимо нейтральных глюканов штаммы *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* синтезируют глицерофосфорилированные β -1,2-глюканы (Zevenhuizen et al., 1990; Breedveld, Miller, 1994; Mendis et al., 2016). Сравнительный хроматографический анализ экзоолигосахаридов, продуцируемых штаммом дикого типа и его мутантами с полностью заблокированным синтезом кислого ЭПС (*pssE*) и глюканов (*ndvB*) (рис. 2), позволил заключить, что наблюдаемые на хроматограмме ЭОС штамма *Rlv* VF39 являются формами кислого ЭПС с разной степенью полимерности (рис. 2а).

В профиле элюции ЭОС штамма *Rlv* VF39 можно выделить 4 основных пика: М1–М4 (рис. 2а). ЭОС из отдельных пиков М1–М4 были дополнительно фракционированы с помощью гель-фильтрации (рис. 3). При этом была выявлена относительная однородность исследуемых олигосахаридов: большая часть ЭОС из пиков М1 и М2 формировали на гель-хроматограммах мажорные пики S1 и S2, максимумы которых приходились соответственно на 22.5 и 18.5 минуты элюции (рис. 3а, 3б). Наибольшее количество ЭОС из пика М3 элюировалось между 16 и 18 минутами (пик S3, рис. 3в). ЭОС из пика М4 элюировались практически в свободном объеме колонки, что свидетельствовало об их большой молекулярной массе (пик S4, рис. 3г). Высокая степень полимерности ЭОС из пика S4 подтверждена фракционированием на колонке Superdex 200 10/300 GL (данные не представ-

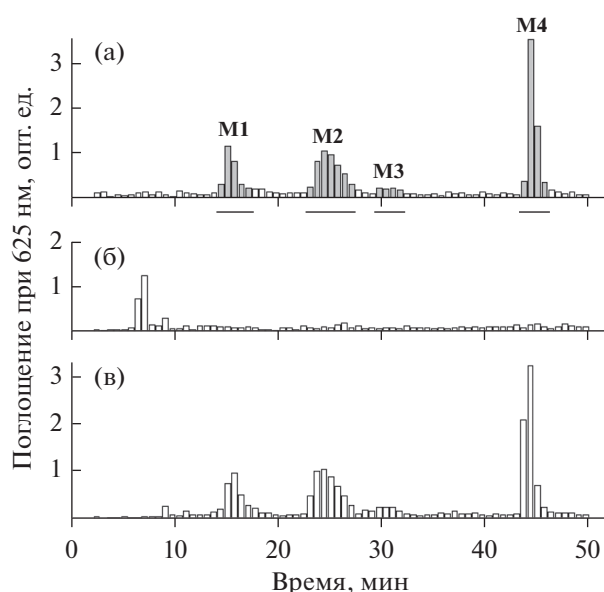


Рис. 2. Ионообменная хроматография экзоолигосахаридов штамма *Rlv* VF39 (а) и его производных с мутациями в генах *pssE* (б) и *ndvB* (в) на колонке MonoQ 5/50 GL. (□) – профиль элюции ЭОС по данным антронового теста. (■) – фракции ЭОС, формирующие пики М1–М4, объединяли и фракционировали с помощью гель-фильтрации.

лены). Основываясь на результатах ионообменного фракционирования и масс-спектрометрического анализа ЭОС, полученных при гидролизе высокомолекулярного ЭПС штамма *Rlv* VF39 гликозилгидролазой PssW (неопубликованные данные), мы предположили, что олигосахариды из пиков S1, S2 и S3 являются, соответственно, мономерами, димерами и тримерами повторяющегося октасахаридного звена кислого ЭПС (рис. 3). Это предположение подтверждено результатами масс-спектрометрического анализа. ЭОС из пика S4 в силу их высокой полимерности были исключены из хода дальнейших исследований.

Масс-спектрометрический анализ экзоолигосахаридов пика S1. На масс-спектре олигосахаридов из пика S1 выявлены три серии двухзарядных отрицательных ионов (рис. 4). Установлено, что серия ионов с m/z 731.19, 752.20, 773.20, 774.21, 795.21 и 816.22 соответствует дегидратированным ионам октасахаридного звена (M_8) высокомолекулярного ЭПС, содержащего два остатка пировиноградной кислоты, и отличающихся степенью ацетилирования и наличием Hb-группы (табл. 1). Кроме того, идентифицированы ионы гидратированной формы октасахаридов (M_8^h) с соответствующими модификациями, а также ионы их Na^+ и K^+ аддуктов. Группу мажорных ионов составляют ионы октасахаридов с одной ацетильной группой (M_8Ac), с ацетильной и гидроксипу-

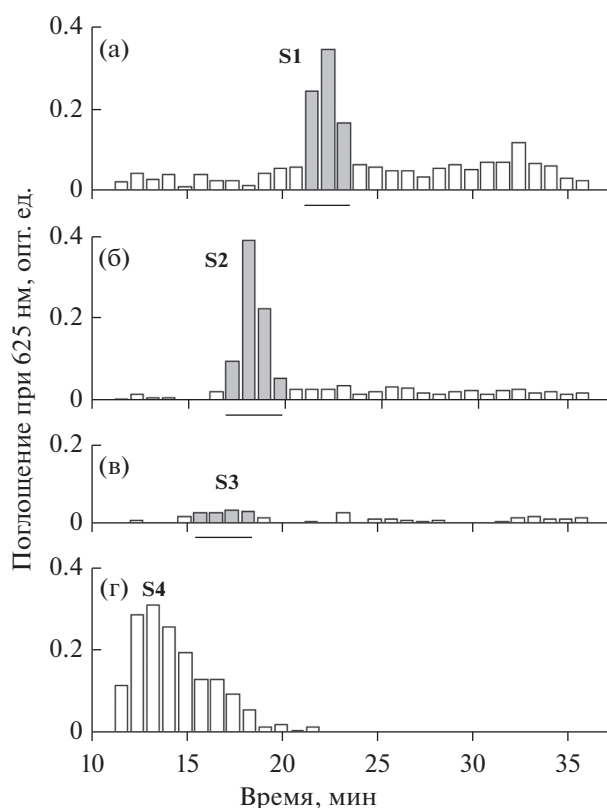


Рис. 3. Гель-фильтрация кислых экзоолигосахаридов из пиков M1 (а), M2 (б), M3 (в) и M4 (г) на колонке Superdex Peptide 10/300 GL. (□) – профиль элюции ЭОС по данным антронового теста. (■) – фракции ЭОС, формирующие пики S1, S2 и S3, объединяли и анализировали методом масс-спектрометрии.

таноильной группами (M_8AcHb), а также ионы октасахаридов (M_8). Ионы октасахаридов M_8Ac_2 , M_8Hb и M_8Ac_2Hb присутствовали в значительно меньших количествах (табл. 1).

Две другие серии ионов с m/z 652.18, 673.18, 695.20, 716.20 и 659.17, 680.17, 701.18, 702.19, 723.19,

744.20 представлены двухзарядными ионами гептасахаридов ${}^aM_7^h$ (m/z 652.18) и ${}^bM_7^h$ (m/z 659.17). У гептасахаридов из четырех гексоз главной цепи октасахаридного звена ЭПС отсутствуют либо остаток GlcA-c (${}^aM_7^h$), либо остаток Glc-b (${}^bM_7^h$). На это указывают значения $\Delta 158.02$ Да (GlcA) и $\Delta 144.04$ Да (Glc) между ионами с m/z 652.18 и m/z 659.17 соответствующих гептасахаридов и ионом октасахаридов M_8 (m/z 731.19). Из двух гептасахаридов мажорным является ${}^bM_7^h$. Ионы гептасахаридов ${}^bM_7^h$ с двумя Ac группами (${}^bM_7^hAc_2$ и ${}^bM_7^hAc_2Hb$) обнаруживаются в следовых количествах, а ${}^aM_7^hAc_2$ и ${}^aM_7^hAc_2Hb$ отсутствуют (табл. 2).

Результаты HCD фрагментации подтвердили наши предположения относительно состава ЭОС из пика S1 и позволили получить дополнительные сведения об их структуре. Так, фрагментация двухзарядного отрицательного иона октасахаридов M_8 (m/z 731.19) приводила к отщеплению одного или двух остатков GlcA, в результате чего на спектре появлялись пики ионов ${}^aM_7^h$ (m/z 1305.36) и ${}^aM_7^h$ (m/z 1129.33) (рис. 5а). В главной цепи этих олигосахаридов помимо остатка Glc-a с присоединенной боковой цепью сохранялся второй остаток Glc-b (рис. 1). Отщепление остатка Glc-b зафиксировано при фрагментации двухзарядного гидратированного иона октасахаридов (M_8^h , m/z 740.19) (рис. 5б). В доминирующей на спектре серии однозарядных ионов идентифицирован пик иона пентасахаридов (M_5^h) с m/z 967.28, у которого помимо двух остатков GlcA отсутствует и остаток Glc-b.

Необходимо отметить, что на этом же спектре зафиксированы пики ионов с m/z 1319.34 (${}^bM_7^h$) и 1143.31 (${}^bM_6^h$). Известно, что в достаточно мягких

Таблица 1. Двухзарядные отрицательные ионы октасахаридов и его модифицированных вариантов

Формула	m/z					M_w	Интенсивность*, %
	$[M - 2H]^{2-}$	$[M^h - 2H]^{2-}$	$[M - 3H + Na]^{2-}$	$[M^h - 3H + Na]^{2-}$	$[M - 3H + K]^{2-}$		
M_8	731.19	740.20	742.18	751.19	750.16	1464.38	75
M_8Ac	752.20	761.20	763.19	772.19	771.17	1506.40	100
M_8Ac_2	773.20	782.21	784.19	793.20	792.17	1548.40	25
M_8Hb	774.21	—	785.20	794.21	793.18	1550.42	15
M_8AcHb	795.21	804.22	806.20	815.21	814.19	1592.42	78
M_8Ac_2Hb	816.22	—	827.21	836.22	835.18	1634.44	8

Примечание. M_w – молекулярная масса олигосахаридов. Серой заливкой выделены минорные ионы.

* Относительная интенсивность приведена для серии ионов $[M - 2H]^{2-}$; за 100% принята интенсивность максимального на спектре пика M_8Ac .

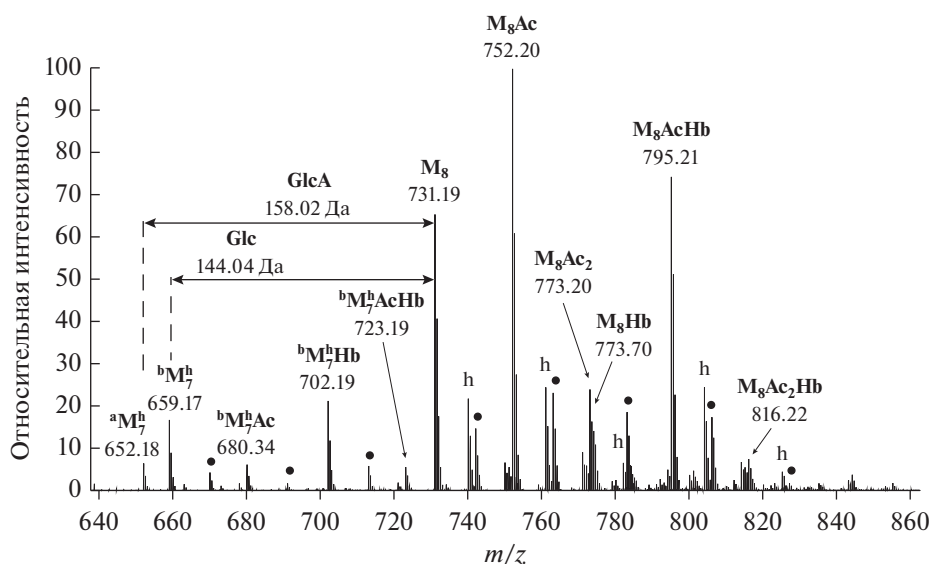


Рис. 4. Фрагмент NSI масс-спектра экзоолигосахаридов из хроматографического пика S1. Обозначены двухзарядные отрицательные ионы октасахарида M_8 и его модифицированных производных, а также ионы гидратированных форм гептасахаридов $^aM_7^h$ и $^bM_7^h$. M – олигосахарид, содержащий две Руг группы; h и \bullet – гидратированные формы и Na^+ аддукты соответственно. aM_7 и bM_7 – гептасахариды, лишенные остатков глюконовой кислоты (GlcA-c, Δ 158.02 Да) и глюкозы (Glc-b, Δ 144.04 Да) соответственно.

условиях фрагментации первыми разрываются гликозидные связи, прилежащие к восстанавливающему концу олигосахаридов. Таким образом, обнаружение ионов с m/z 1319.34 и 1143.31 допускает существование мономеров, у которых на восстанавливающем конце расположен остаток

глюкозы. Однако интенсивность ионов $^bM_7^h$ и $^bM_6^h$ в несколько раз меньше интенсивности ионов $^aM_7^h$ (m/z 1305.36) и $^aM_6^h$ (m/z 1129.33). Этот факт, наряду с данными по фрагментации M_8 (m/z 731.19), позволяет говорить, что основной

Таблица 2. Двухзарядные отрицательные ионы гептасахаридов и их модифицированных вариантов

Формула		m/z		M_w	Интенсивность*, %
		$[M - 2H]^{2-}$	$[M - 3H + Na]^{2-}$		
-GlcA	$^aM_7^h$	652.18	—	1306.36	6.2
	$^aM_7^hAc$	673.18	—	1348.37	1.5
	$^aM_7^hHb$	695.20	—	1392.40	0.1
	$^aM_7^hAcHb$	716.20	—	1434.41	0.4
-Glc	$^bM_7^h$	659.17	670.16	1320.34	18
	$^bM_7^hAc$	680.17	691.16	1362.35	6
	$^bM_7^hAc_2$	701.18	712.17	1404.36	0.03
	$^bM_7^hHb$	702.19	713.18	1406.38	23
	$^bM_7^hAcHb$	723.19	—	1448.39	6.3
	$^bM_7^hAc_2Hb$	744.20	—	1490.40	Следы

Примечание. Обозначения как в табл. 1.

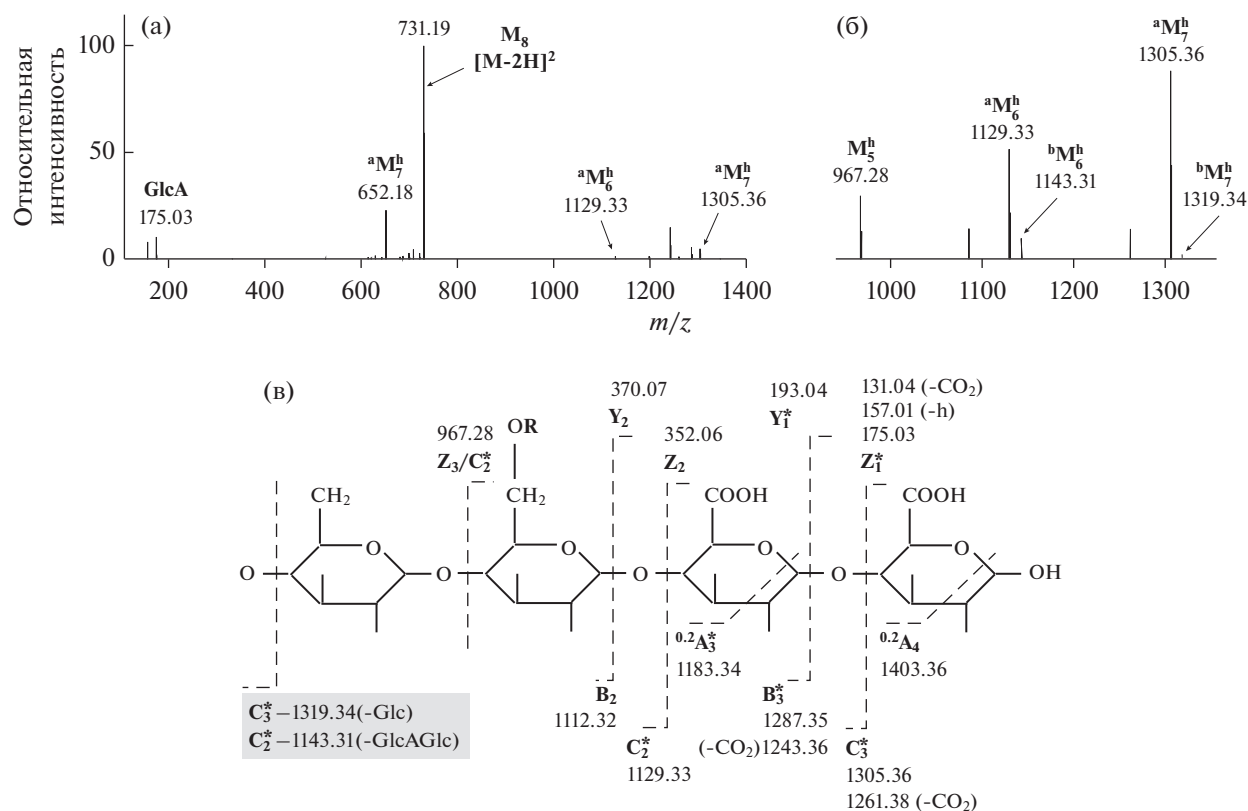


Рис. 5. Спектры HCD фрагментации двухзарядных отрицательных ионов октасахарида M_8 с m/z 731.19 (а) и его гидратированной формы M_8^h с m/z 740.20 (б); в – схема фрагментации октасахарида. **R** – боковая цепь (Glc₃GalPyr₂). * – ионы, наблюдаемые на спектре; (■) – ионы, образующиеся в случае расположения остатка Glc на противоположном восстанавливающем конце октасахариды.

формой мономера является октасахарид, у которого на восстанавливающем конце расположен фрагмент GlcA-GlcA. На основании данных расшифровки HCD спектров (табл. 3) предложена схема фрагментации октасахариды с использованием принятых номенклатурных обозначений (рис. 5в) (Domon, Costello, 1988).

Результаты фрагментации двухзарядных отрицательных ионов гептасахаридов $^bM_7^h$ (m/z 659.17) (рис. 6а) и $^bM_7^hNb$ (m/z 702.19) подтвердили наличие в составе главной цепи гептасахариды $^bM_7^h$ двух остатков GlcA и отсутствие остатка Glc-b (данные не представлены). Об этом свидетельствует разница в 176.03 Да (GlcA) между зафиксированными на HCD спектре ионом исходного гептасахариды и продуктами его фрагментации: гекса- ($^bM_6^h$) и пентасахариды (M_5^h). Схема фрагментации и структурная формула $^bM_7^h$, а также данные расшифровки HCD спектра данного олигосахариды представлены, соответственно, на рис. 6б и в табл. 4.

Анализ спектра HCD фрагментации иона гептасахариды $^aM_7^h$ (m/z 652.18) (данные не представлены) подтвердил наличие остатка Glc-b и отсутствие остатка GlcA-c в его составе, что объясняет отсутствие на масс-спектре $^aM_7^h$ с двумя Ac группами. Результаты фрагментации ионов с m/z 702.19 и 752.20, предварительно идентифицированных как ионы $^bM_7^hNb$ и M_8Ac , подтвердили наличие Nb и Ac групп в составе этих олигосахаридов. Необходимо отметить, что используемый в ходе HCD фрагментации энергетический режим приводил к дроблению лишь главной цепи олигосахаридов, практически не затрагивая боковой цепи. Исключение составило отщепление терминального фрагмента Gal-Pyr боковой цепи, наблюдаемое при фрагментации и M_8 и $^bM_7^h$.

Анализ экзоолигосахаридов пика S2. Установлено, что ЭОС из пика S2 являются димерными формами октасахариды (рис. 7а). Подобно описанным выше мономерам, каждое звено димера содержало две Pyr группы. Число других неуглеводных заместителей варьировало (табл. 5). Сравнительная интенсивности сигналов, соответствующую

Таблица 3. HCD фрагментация двухзарядного отрицательного иона октасахарида M₈ (m/z 731.19)

m/z	z	Формула фрагмента	Масса	Обозначение
113.02	(1-)	GlcA ^{-h} -CO ₂	114.02	*dZ ₁ ^{-h}
157.01	(1-)	GlcA ^{-h}	158.01	Z ₁ ^{-h}
175.03	(1-)	GlcA	176.03	Z ₁
615.16	(2-)	M ₈ -(GalPyr)	1232.32	Y _{6α}
643.17	(2-)	^a M ₇	1288.34	C ₃ ^{-h}
652.18	(2-)	^a M ₇ ^h = M ₈ -GlcA	1306.36	C ₃
659.17	(2-)	^b M ₇ = M ₈ -Glc	1320.34	C ₃
700.19	(2-)	M ₈ ^{-h} -CO ₂	1402.38	d[M ^{-h} -2H] ²⁻
709.19	(2-)	M ₈ -CO ₂	1420.38	d[M-2H] ²⁻
722.18	(2-)	M ₈ ^{-h}	1446.37	[M ^{-h} -2H] ²⁻
731.19	(2-)	M₈	1464.38	[M-2H]²⁻
967.28	(1-)	M ₃ ^h	968.28	Z ₃ /C ₂
1129.33	(1-)	^a M ₆ ^h	1130.33	C ₂
1143.31	(1-)	^b M ₆	1144.31	C ₂
1183.34	(1-)	^a M ₇ -CO ₂ -C ₂ H ₃ O	1184.34	d ^{0.2} A ₃
1199.37	(1-)	^a M ₇ -2CO ₂	1200.37	2dB ₃
1243.36	(1-)	^a M ₇ -CO ₂	1244.36	dB ₃
1261.38	(1-)	^a M ₇ ^h -CO ₂	1262.38	dC ₃
1287.35	(1-)	^a M ₇	1288.35	B ₃
1305.36	(1-)	^a M ₇ ^h	1305.36	C ₃
1319.34	(1-)	^b M ₇ ^h	1320.34	C ₃

Примечание. Серой заливкой выделены ионы, фиксируемые при фрагментации иона M₈^h (m/z 740.19), с остатком Glu на восстанавливаемом конце.

* d – декарбоксилированные ионы.

щих ионам D, DAc, DAc₂, DAc₃, и DAc₄ (табл. 5) и учитывая суперпозиции изотопных распределений ионов в разной степени модифицированных форм димеров (рис. 7б и 7в), мы обнаружили, что на спектре доминировали формы с высоким содержанием модифицирующих групп, а формы D и DAc попадали в разряд минорных. Результаты фрагментации ионов димерных форм ЭОС подтвердили наличие характерных для ЭПС неуглеводных заместителей. Показано, что мажорным является димер, на восстанавливаемом конце которого расположен остаток Glc: интенсивность

иона фрагмента GlcA-Glc в несколько раз превышала интенсивность иона фрагмента GlcA-GlcA (данные не представлены).

Анализ экзоолигосахаридов пиков S3. Определить структуру ЭОС из пика S3 не удалось в силу их недостаточного количества. Однако мы полагаем, что эти ЭОС являются тримерами повторяющегося октасахаридного звена кислого ЭПС. Данное предположение основывается на совпадении времени элюции олигосахаридов из пика S3 со временем элюции тримеров октасахаридов, полученных в результате гидролиза высокомолекулярных олигосахаридов.

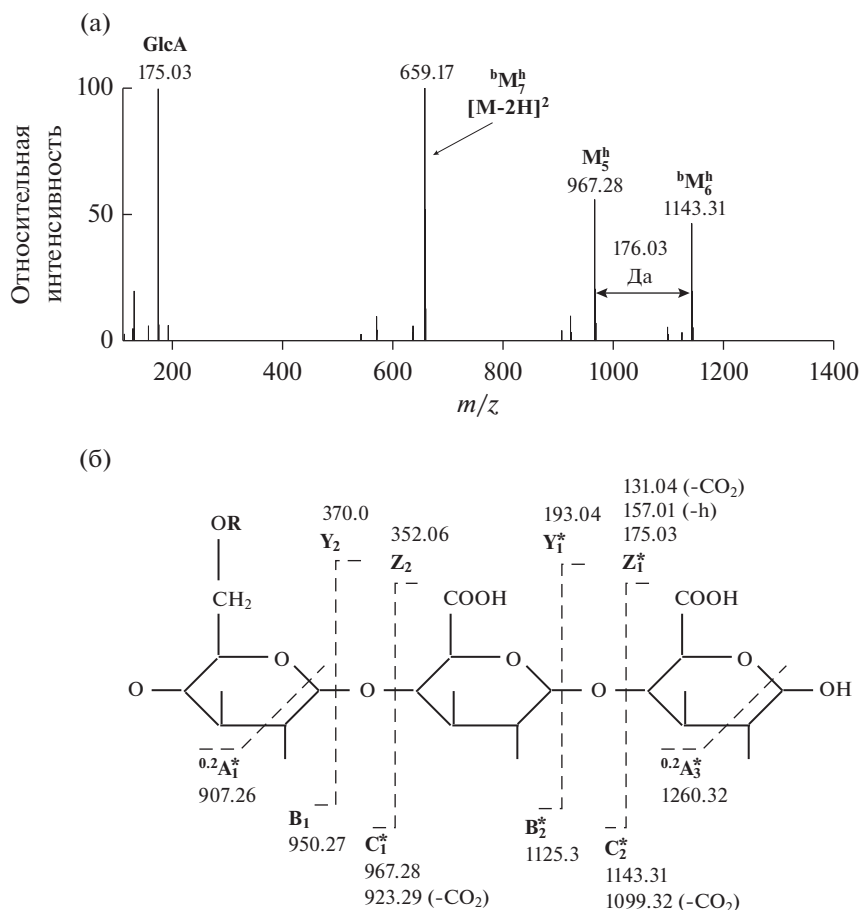


Рис. 6. а – Спектр HCD фрагментации двухзарядного отрицательного иона гептасахарида bM_7^h (m/z 659.17). Обозначены ионы гекса- (bM_6^h) и пентасахаридов (M_5^h), лишенные одного и двух остатков GlcA соответственно. б – Схема фрагментации гептасахарида bM_7 . R – боковая цепь (Glc₃GalPyr₂). * – ионы, наблюдаемые на спектре.

кулярного ЭПС гликозилгидролазой PssW, и тримеров октасахарид, продуцируемых штаммом *R/v VF39* с мутацией в гене полисахаридлиазы PlvB. В обоих случаях степень полимеризации и структура выделенных ЭОС были подтверждены масс-спектрометрическим анализом (данные не приведены).

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что выделенные из культуральной жидкости кислые ЭОС представлены моно-, ди- и тримерами повторяющегося октасахаридного звена высокомолекулярного ЭПС штамма *R/v VF39*. В культуральной жидкости обнаружены также гептасахариды, соответствующие по структуре октасахариду без остатков GlcA-*c* или Glc-*b* в главной цепи. Известно, что одним из механизмов образования ЭОС у ризобий является гидролиз ЭПС специфическими гидролазами (York, Walker, 1998a; Finnie et al., 1998; Staehelin et al., 2006). Возможно, что и в случае изучаемого штамма ЭОС возникают в результате деполимеризации ЭПС гидролитическими ферментами, гены которых идентифици-

рованы как в геноме исследуемого штамма, так и в геномах других штаммов ризобий (Ivashina, Ksenzenko, 2012).

Сравнительный анализ интенсивностей сигналов ионов мономеров и димеров (табл. 1 и 5) выявил следующую закономерность: среди мономеров на спектре доминировали ионы неацетилированного октасахарид и октасахарид с одной ацетильной группой. Напротив, среди димеров и тримеров преобладали формы с высоким содержанием *O*-ацетильных групп. Нестехиометрическое ацетилирование повторяющихся звеньев ЭПС описано в ряде работ (O'Neill et al., 1991; Muszyński et al., 2016). Более того, продемонстрировано влияние неуглеводных заместителей в составе полисахаридов на их гидролиз. Так, например, мутация в гене *exoZ*, блокирующая ацетилирование сукциногликана, приводила к повышенной продукции его низкомолекулярных форм (York, Walker, 1998b). Показано также, что предпочтительным субстратом для глюкуронанлиазы *S. meliloti* M5N1CS является деацетилированный глюкуронан. При этом гидролиз полисахарида с

Таблица 4. HCD фрагментация двухзарядного отрицательного иона гептасахарида ${}^bM_7^h$ (m/z 659.17)

m/z	z	Формула фрагмента	Масса	Обозначение
131.04	(1-)	GlcA-CO ₂	132.04	dZ ₁
157.01	(1-)	GlcA ^{-h}	158.01	Z ₁ ^{-h}
175.03	(1-)	GlcA	176.03	Z ₁
193.04	(1-)	GlcA	194.04	Y ₁
543.14	(2-)	${}^bM_7^h$ -GalPyr	1088.28	Y _{6α}
571.15	(2-)	${}^bM_6^h$	1144.30	C ₂
629.16	(2-)	${}^bM_7^h$	1260.32	^{0.2} A ₃
637.17	(2-)	${}^bM_7^h$ -CO ₂	1276.34	dC ₂
659.17	(2-)	${}^bM_7^h$	1320.34	[M - 2H]²⁻
907.26	(1-)	M ₅ ^h -C ₂ O ₂ H ₄	908.26	^{0.2} A ₁
923.29	(1-)	M ₅ ^h -CO ₂	924.29	dC ₁
967.28	(1-)	M ₅ ^h	968.28	C ₁
1099.32	(1-)	${}^bM_6^h$ -CO ₂	1100.32	dC ₂
1125.30	(1-)	bM_6	1126.30	B ₂
1143.31	(1-)	${}^bM_6^h$	1144.31	C ₂

Таблица 5. Данные NSI масс-спектра двухзарядных отрицательных ионов ЭОС из хроматографического пика S2

Формула	m/z	M _w	Интенсивность моноизотопного пика*, %
D	1463.38	2928.76	1.9
DAc	1484.38	2970.76	15.3
DAc ₂	1505.39	3012.78	47.3
DHb**	1506.39	3014.78	3.3
DAc ₃	1526.39	3054.80	57.5
DAcHb**	1527.40	3056.80	23.3
DAc ₄	1547.40	3096.80	22
DAc ₂ Hb**	1548.41	3098.82	82.2
DHb ₂ **	1549.41	3100.82	4.1
DAc ₃ Hb	1569.41	3140.82	100
DAcHb ₂ **	1570.42	3142.84	35.6
DAc ₄ Hb	1590.42	3182.84	38.4
DAc ₂ Hb ₂ **	1591.42	3184.84	79.5
DAc ₃ Hb ₂	1612.43	3226.86	97.3
DAc ₄ Hb ₂	1633.44	3268.88	35.6

Примечание. Серой заливкой выделены мажорные пики.

* За 100% принята интенсивность максимального моноизотопного пика DAc₃Hb с m/z 1569.41.

** Ионы, интенсивности которых рассчитаны с учетом суперпозиций изотопных распределений.

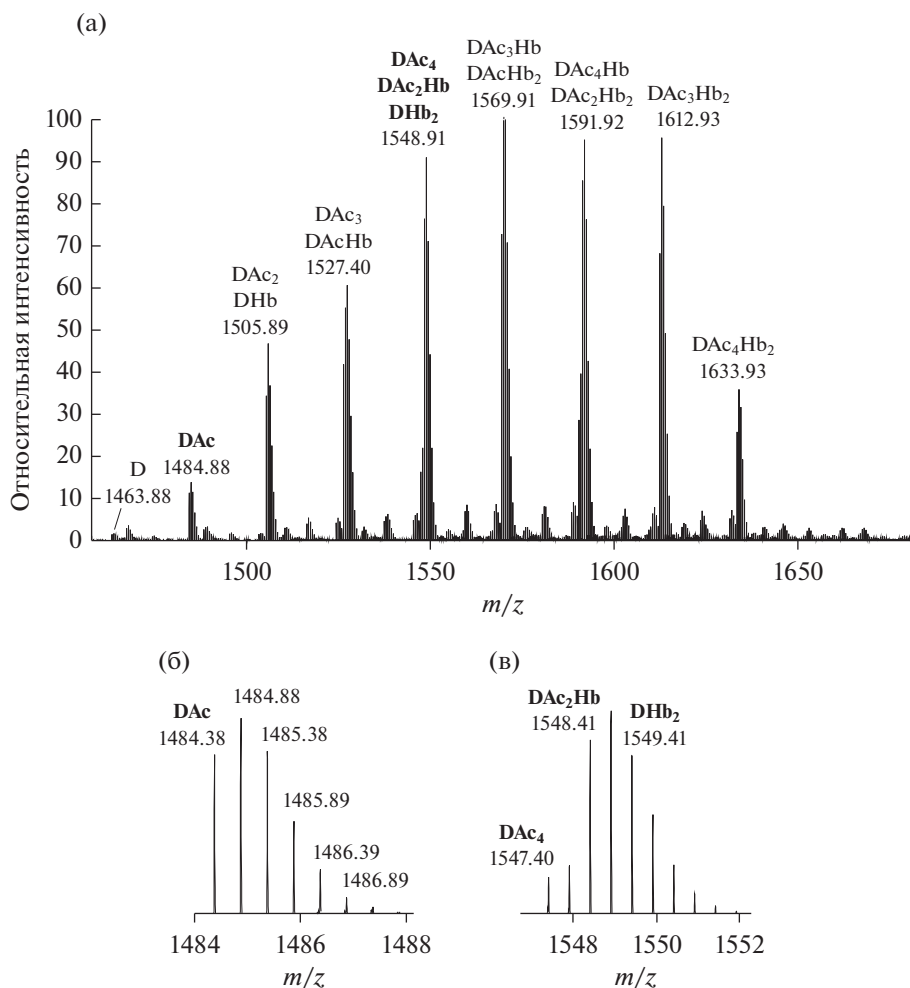


Рис. 7. (а) Фрагмент NSI масс-спектра экзоолигосахаридов хроматографического пика S2. Представлена область двухзарядных отрицательных ионов (m/z 1460–1680); (б и в) примеры изотопного распределения ионов DAc и суперпозиции изотопных распределений ионов димеров с различным содержанием Ac и Hb групп. D – димер октасахарида, содержащий 4 Pуг-группы.

промежуточной степенью ацетилирования происходил на неацетилированных последовательностях, а близкое расположение к сайту гидролиза двух *O*-ацетилированных остатков ингибировало этот процесс (Da Costa et al., 2003). Результаты нашего исследования указывают на то, что *in vivo* до мономерных форм ЭОС также расщепляются наименее ацетилированные участки высокомолекулярного ЭПС штамма *Rlv* VF39. Следовательно, установленная *in vitro* корреляция между степенью ацетилирования ЭПС и его устойчивостью к действию гликозилгидролаз реализуется и *in vivo*. Этот факт является еще одним косвенным доказательством в пользу высказываемого в литературе предположения о том, что избирательное ацетилирование/деацетилирование бактериальных полисахаридов может влиять на различные процессы, протекающие с их участием (Sutherland, 2001; Vuong et al., 2004; Downie, 2010).

Полученные данные о структурах экзоолигосахаридов у штамма *Rlv* VF39 открывают перспективы для дальнейшего изучения механизмов их функционирования в симбиозе в качестве сигнальных молекул. В пользу сигнальной функции ЭОС, по крайней мере, для некоторых пар симбионтов свидетельствуют данные о взаимодействии октасахаридного мономера кислого ЭПС, синтезируемого штаммом *Mesorhizobium loti* R7A, с LysM рецепторной киназой Erg3, локализованной на клеточной поверхности эпидермальных клеток корня *Lotus japonicus*. Интересно отметить, что инфицирование мутантным штаммом *M. loti* R7A *exoU*, синтезирующим пентасахарид со сниженным отрицательным зарядом вместо октасахарид, приводит к негативному ответу растения (Kawaharada et al., 2015; Muszyński et al., 2016). Можно предположить, что наличие кислого остатка (GlcA) на восстанавливающем конце моно-

мерной формы ЭПС штамма *R/v VF39* и, возможно, ацетильных групп в определенном положении октасахарида определяет специфическое связывание с рецепторными комплексами растительных клеток, контролирующими успешное развитие инфекционного процесса при симбиозе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП “Структурно-функциональные исследования белков и РНК” (584307).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Arnold M.F.F., Penterman J., Shabab M., Chen E.J., Walker G.C. Important late stage symbiotic role of the *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide succinoglycan // J. Bacteriol. 2018. V. 200. e00665-17.

Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // J. Gen. Microbiol. 1974. V. 84. P. 188–198.

Breedveld M., Miller K.J. Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae* // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 145–161.

Cheng H.P., Walker G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 5183–5191.

Da Costa A., Michaud P., Heyraud A., Colin-Morel P., Courtois B., Courtois J. Acetyl substitution of glucuronan influences glucuronan cleavage by GlyA from *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS (NCIMB 40472) // Carbohydr. Polym. 2003. V. 51. P. 223–228.

Djordjevic S.P., Chen H., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. Nitrogen fixation ability of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 53–60.

Domon B., Costello C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates // Glycoconjugate J. 1988. V. 5. P. 397–409.

Downie J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. P. 150–170.

Finnie C., Zorreguieta A., Hartley N.M., Downie J.A. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 1691–1699.

Gonzalez J.E., Semino C.E., Wang L.X., Castellano-Torres L. Biosynthetic control of molecular weight in the polymer-

ization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13477–13482.

Gonzalez J.E., York G.M., Walker G.C. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function // Gene. 1996. V. 179. P. 141–146.

Hoang T.T., Karkhoff-Schweizer R.R., Kutchma A.J., Schweizer H.P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants // Gene. 1998. V. 212. P. 77–86.

Ivashina T.V., Fedorova E.E., Ashina N.P., Kalinchuk N.A., Druzhinina T.N., Shashkov A.S., Shibaev V.N., Ksenzenko V.N. Mutation in the *pssM* gene encoding ketal pyruvate transferase leads to disruption of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* – *Pisum sativum* symbiosis // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. P. 731–742.

Ivashina T.V., Khmel'nitsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. The *pssA* gene from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39: cloning, sequence and the possible role in polysaccharide production and nodule formation // Gene. 1994. V. 150. P. 111–116.

Ivashina T.V., Ksenzenko V.N. Exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: from genes to functions // The Complex World of Polysaccharides / Ed. Karunarathne D.N. Rijeka, Croatia: In Tech, 2012. P. 99–126.

Kawaharada Y., Kelly S., Nielsen M.W., Hjuler C.T., Gysel K., Muszyński A., Carlson R.W., Thygesen M.B., Sandal N., Asmussen M.H., Vinther M., Andersen S.U., Krusell L., Thirup S., Jensen K.J., Ronson C.W., Blaise M., Radutoiu S., Stougaard J. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection // Nature. 2015. V. 523. P. 308–312.

Kelly S.J., Muszyński A., Kawaharada Y., Hubber A.M., Sullivan J.T., Sandal N., Carlson R.W., Stougaard J., Ronson C.W. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium*–*Lotus* symbiosis // Mol. Plant. Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 319–329.

Leigh J.A., Reed J.W., Hanks J.F., Hirsch A.M., Walker G.C. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion // Cell. 1987. V. 51. P. 579–587.

Loewus F.A. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates // Anal. Chem. 1952. V. 24. P. 219.

Lopez-Lara I.M., Orgambide G., Dazzo F.B., Olivares J., Toro N. Characterization and symbiotic importance of acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium* sp. strain GRH2 isolated from *Acacia* nodules // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 2826–2832.

Marczak M., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants // Genes. 2017. V. 8. P. 360.

Mendis H.C., Madzima T.F., Queiroux C., Jones K.M. Function of succinoglycan polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* host plant invasion depends on succinylation, not molecular weight // mBio. 2016. V. 7. e00606-16.

Muszyński A., Heiss C., Hjuler C.T., Sullivan J.T., Kelly S.T., Thygesen M.B., Stougaard J., Azadi P., Carlson R.W., Clive W., Ronson C.W. Structures of exopolysaccharides involved in receptor-mediated perception of *Mesorhizobium loti* by *Lo-*

- tus japonicas* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 20946–20961.
- O'Neill M.A., Darvill A.G., Albersheim P. The degree of esterification and points of substitution by *O*-acetyl and *O*-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 9549–9555.
- Rolfe B.G., Carlson R.W., Ridge R.W., Dazzo F.B., Mateos P.F., Pankhurst C.E. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Aust. J. Plant Physiol. 1996. V. 23. P. 285–303.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Simon R., Priefer U., Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Bio/Technology. 1983. V. 1. P. 784–791.
- Simsek S., Ojanen-Reuhs T., Stephens S.B., Reuhs B.L. Strain-ecotype specificity in *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago truncatula* symbiosis is correlated to succinoglycan oligosaccharide structure // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 7733–7740.
- Simsek S., Wood K., Reuhs B.L. Structural analysis of succinoglycan oligosaccharides from *Sinorhizobium meliloti* strains with different host compatibility phenotypes // J. Bacteriol. 2013. V. 195. P. 2032–2038.
- Stahelin C., Forsberg L.S., Haeze W.D., Gao M.Y., Carlson R.W., Xie Z.-P., Pellock B.J., Jones K.M., Walker G.C., Streit W.R., Broughton W.J. Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 6168–6178.
- Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // Microbiology (SGM). 2001. V. 147. P. 3–9.
- Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R., Otto M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 54881–54886.
- Urzainqui A., Walker G.C. Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti* mutants // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 3403–3406.
- Wang L.-X., Wang Y., Pellock B.J., Walker G.C. Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6788–6796.
- York G.M., Walker G.C. The *Rhizobium meliloti* ExoK and ExsH glycanases specifically depolymerize nascent succinoglycan chains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998a. V. 95. P. 4912–4917.
- York G.M., Walker G.C. The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH // J. Bacteriol. 1998b. V. 180. P. 4184–4191.
- Zevenhuizen L.P.T.M., van Veldhuizen A., Fokkens R.H. Re-examination of cellular cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-1-phosphate substitution // Antonie Leeuwenhoek. 1990. V. 57. P. 173–178.

Mass Spectrometric Analysis of the Acidic Exo-Oligosaccharides of a Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39

A. S. Kanapina^{1, *}, V. V. Marchenkov², A. K. Surin³, and T. V. Ivashina¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino 142290 Russia

²Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino 142290 Russia

³Branch of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: doc.asya63@rambler.ru

Received March 13, 2020; revised April 29, 2020; accepted April 30, 2020

The structures of low-molecular exo-oligosaccharides produced by a symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 were determined using the methods of mass spectrometry and HCD fragmentation of ions. Exo-oligosaccharides were shown to be monomers, dimers and trimers of a repeating octasaccharide unit of the acidic high-molecular-weight exopolysaccharide. The major fraction was represented by octasaccharide monomers with two glucuronic acid residues at the reducing end. Heptasaccharides corresponding to an octasaccharide unit devoid of GlcA-c or Glc-b residues in the main chain were also found in the culture medium. Heterogeneity of exo-oligosaccharides according to the content of *O*-acetyl and hydroxybutanoyl substituents was revealed.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum*, exo-oligosaccharide, mass spectrometry, structure, modifications