# \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА И ЛИПИДА А *PANTOEA AGGLOMERANS* П324

© 2021 г. Э. Л. Здоровенко<sup>*a*</sup>, А. А. Кадыкова<sup>*a*, *b*</sup>, А. С. Шашков<sup>*a*</sup>, Л. Д. Варбанец<sup>*c*</sup>, Т. В. Булыгина<sup>*c*</sup>, \*, Ф. В. Тоукач<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup>Институт органической химии им. Д.Н. Зелинского, РАН, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Высший химический колледж РАН, Москва, 125047 Россия

<sup>с</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

\*e-mail: tati20@ukr.net Поступила в редакцию 08.05.2020 г. После доработки 08.07.2020 г. Принята к публикации 08.08.2020 г.

Из Pantoea agglomerans П324 выделен и охарактеризован липополисахарид (ЛПС), в результате мягкого кислотного гидролиза которого были получены фракции липида A и O-специфического полисахарида (ОПС). Исследования методом масс-спектрометрии HR ESI с отрицательными ионами показали гетерогенность липида A, основной формой которого является гексаацилированное производное, содержащее бифосфорилированный дисахарид GlcN, четыре остатка 14:0 (3-OH), один остаток 18:0 и один остаток 12:0 жирных кислот. На основании моносахаридного состава, спектров ЯМР и расчетных методов показано, что ОПС представлен дисахаридными повторяющимися единицами:  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . ЛПС *P. agglomerans* П324 оказывал токсическое и пирогенное действие. Изучение влияния ЛПС и его структурных компонентов на активность пептидаз *Bacillus* показало, что ОПС и липид A играют значительную роль в гидролизе фибрина протеазами *Bacillus*, но не влияют на активность протеазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 и протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324. Гидролиз эластина усиливался в присутствии ОГ-кора и липида A, в то время как отмечено ингибирующее влияние отдельных фракций на гидролиз коллагена по сравнению с действием нативного ЛПС.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, липополисахарид, структура О-специфического полисахарида и липида А, ЯМР, активность пептидаз *Bacillus* 

**DOI:** 10.31857/S0026365621010134

Pantoea agglomerans является одним из самых распространенных микроорганизмов, по меньшей мере, на территории, заселенной людьми. Эти бактерии могут конкурировать и выживать в различных средах, что делает их полезными для биоконтроля, биоремедиации и биодеградации. Первоначально, представители этого вида были обнаружены в растениях (Walterson, Stavrinides, 2015), позднее – в воздухе, почве, воде, пыли, продуктах животного происхождения, теле членистоногих и других животных, а иногда и в крови человека, ранах и внутренних органах (Völksch, et al., 2009; Walterson, Stavrinides, 2015). Представители данного вида бактерий могут быть как полезными, в частности, стимулировать выработку веществ, эффективных при лечении рака и других заболеваний (Kohchi et al., 2006), так и патогенными для человека, вызывая заболевания у людей, которые вдыхают органическую пыль (Rylander, Burrell, 1987).

Структура макромолекулы липополисахарида (ЛПС), представленная липидом А, олигосахаридом кора и О-специфическим полисахаридом (ОПС), определяет ее разнообразную функциональную и биологическую активность. Кроме характерных для ЛПС свойств, таких как антигенность, токсичность, пирогенность, способность индуцировать цитокины и т.д., в литературе встречаются сообщения о влиянии ЛПС на активность ферментов, таких как бактериальные протеазы (Jackson, Smith, 1993). Эти данные были в основном посвящены влиянию ЛПС на omptin белки (КФ 3.4.23.49, семейство аспартатпротеаз) внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Данные белки включают Escherichia coli OmpT и OmpP, Shigella flexneri SopA, Salmonella enterica PgtE и активатор плазминогена Yersinia pestis. R.A. Kramer и соавт. обнаружили, что ЛПС необходим для активации интегральной протеазы ОтрТ внешней мембраны E. coli (Kramer et al., 2002). Авторы показали,

что связывание молекулы ЛПС с белком приводит к конформационным изменениям белка, необходимым для получения активной формы протеазы. Остается неизвестным, почему ЛПС необходим для ферментативной активности отртіп белков. Другие авторы (Elif, Bert, 2012) показали, что ЛПС необходим для активности активатора плазминогена у *Yersinia pestis*, важного при развитии как бубонной, так и легочной форм чумы. Физиологической функцией активатора плазминогена является расщепление (активация) человеческого плазминогена с образованием плазмина.

Известно (Novak et al., 2009), что как ЛПС грамотрицательных бактерий, так и протеазы являются одними из факторов микробной агрессии. При этом протеазы обеспечивают протеолитическое расщепление антимикробных факторов белковой природы, таких как иммуноглобулины, лизоцим и др., а ЛПС способствует проникновению через клеточные барьеры. Это приводит к снижению антимикробного потенциала клетки. что предполагает активацию механизма заражения. Согласно литературным данным (Tagawa et al., 2012), на поверхности грамотрицательных бактерий протеаза С активируется только после взаимодействия с ЛПС. Способность ЛПС индуцировать протеолитическую активность показана исследованиями in vitro клеток крови одиночной асцидии, Ciona intestinalis (Jackson, Smith, 1993).

Поскольку влияние ЛПС на активность протеаз бактерий практически не изучалось, целью данной работы было выделить и охарактеризовать ЛПС *P. agglomerans* П324, а также оценить его влияние на ферментативную активность протеаз *Bacillus*. Взаимодействие этих биополимеров представляет интерес, поскольку *Pantoea agglomerans* — это фитопатогенный вид, представители которого вместе с растительной пищей могут попадать в организм человека и сельскохозяйственных животных, а представители различных видов *Bacillus* входят в состав широко используемых в пищу пробиотических препаратов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выращивание бактерий, выделение ЛПС, липида A и OПС. Pantoea agglomerans П324 (изолирован из пшеницы, Херсонская область, Украина) был получен из коллекции живых культур отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Культуру выращивали на картофельной агаризованной среде при  $28^{\circ}$ С в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием (20 мин, 5000 g) и высушивали обработкой ацетоном и диэтиловым эфиром. Экстракцию ЛПС проводили водно-фенольным методом (Westphal, Jann, 1965). Очистку от нуклеиновых кислот осуществляли осаждением с помощью 50% водного раствора

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

ССІ<sub>3</sub>СООН, а также ультрацентрифугированием при 105000 g (4 ч, 3 раза). Очищенный ЛПС лиофилизовали. Для получения отдельных структурных компонентов молекулы ЛПС расщепляли 2% уксусной кислотой (100°С, 2 ч). Осадок липида А получали ультрацентрифугированием (25000 g, 40 мин), а супернатант концентрировали до объема 10 мл и фракционировали на колонке (70 × 30 см) с сефадексом G-50 в 0.025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4.5. В результате получали фракции О-специфического полисахарида (ОПС) и олигосахарида кора (ОГ-кор). Фракции лиофилизовали.

Содержание в препаратах углеводов, нуклеиновых кислот, белков и 2-кето-3-дезоксиманноктоновой кислоты определяли количественно, как описано ранее (Zdorovenko et al., 2017).

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 М  $CF_3COOH$  (2 ч, 120°С) и анализировали в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ (Albershein et al., 1976) на ГХ Maestro 7820 GC ("Интерлаб", Россия), оборудованном колонкой HP-5MS с пламенно-ионизационным детектором, используя градиент температуры от 160°С (1 мин) до 290°С при 7°С/мин. Идентификацию моносахаридов осуществляли путем сравнения времени удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов со стандартными. Количественные соотношения моносахаридов выражали в % к общей сумме площадей пиков.

Абсолютные конфигурации моносахаридов определяли методом ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилгликозидов, как описано в работе (Leontein, Lonngren, 1993).

Определение жирнокислотного состава осуществляли путем гидролиза образца в растворе хлористого ацетила (1.5%) в метаноле (100°С, 4 ч). Идентификацию жирных кислот проводили в виде метиловых эфиров на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert, колонка HP-5MS (30 M  $\times$  0.25 MM  $\times$  0.25 HM), температурный режим 150-250°С, градиент температуры 4°С/мин; гелий использовали в качестве газа-носителя при скорости потока через колонку 1.2 мл/мин. Температура испарителя составляла 250°С, распределение потока - 1 : 100. Идентификацию жирных кислот проводили с помощью базы данных персонального компьютера, а также стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот. Количественное соотношение жирных кислот выражали в % к общей сумме площадей пиков.

**ЯМР спектроскопия.** Образцы дважды лиофилизовали из  $D_2O$  и затем исследовали в 99.9% растворе  $D_2O$ . <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектры снимали на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz (Германия) при 30°C. В качестве внутреннего стандарта использовали 3-триметилсилилпропаноат натрия-2,2,3,3-d4

(TSP,  $\delta$ H 0.0,  $\delta$ C 1.6). Программное обеспечение Bruker TopSpin 2.1 использовалось для сбора и обработки данных ЯМР. Время смешивания TOCSY и ROESY экспериментов — 200 мс. При записи HMBC спектров использовали 60 мс задержку.

Химические сдвиги <sup>13</sup>С ЯМР были проанализированы и сравнены с опубликованными значениями сервисом моделирования ЯМР GODDESS, в которой обобщены известные структурные воздействия на химические сдвиги <sup>13</sup>С ЯМР (Караеv et al., 2014). Уточнение структуры проведено с помощью службы определения структуры ЯМР GRASS, реализованной на платформе базы данных по структуре углеводов (Carbohydrate Structure Database) (Toukach, Egorova, 2016).

Масс-спектрометрия. Прибор Bruker micrOTOF II использовали лля записи масс-спектра ESI с высоким разрешением в режиме отрицательных ионов (Belyakov et al., 2010). Напряжение на капиллярной границе раздела составляло 3200 В, диапазон масс составлял от m/z 50 до 3000 Да, в качестве сухого газа использовали азот, скорость потока составляла 3 мкл/мин, температура интерфейса была установлена на уровне 180°С. Шприц для инъекций использовали для растворов ацетонитрил/вода/Et<sub>3</sub>N в соотношении 1 : 1 : 0.1. Калибрующий раствор для электрораспыления ("Fluka") использовали для внутренней калибровки.

Биологический анализ. При исследовании биологической и функциональной активности использовали следующие концентрации ЛПС: 500 мкг/0.2 мл, 250 мкг/0.2 мл, 125 мкг/0.2 мл, 62.5 мкг/0.2 мл (токсичность); минимальная пирогенная доза –  $7.5 \times 10^{-3}$  мкг/мл на 1 кг веса животного (пирогенность); от 0.5 до 3 мг/мл (процессы адгезии); 1 мг/мл (серологические исследования). Работа проводилась в соответствии с "Общими этическими принципами экспериментов на животных".

Определение чувствительности микробной культуры к полимиксину В. Чувствительность микробных культур *P. agglomerans* к полимиксину В определяли диско-диффузионным методом (Wainstein, 2019). Зону ингибирования роста бактериальной культуры вокруг диска с антибиотиком измеряли с точностью до 1 мм.

Определение токсичности ЛПС. Токсичность ЛПС исследовали на здоровых белых беспородных мышах обоих полов весом 19–21 г, которые ранее не использовались для каких-либо экспериментов. Для сенсибилизации всем мышам внутрибрюшинно вводили 0.5 мл 3.2% раствора гидрохлорида D-галактозамина в 0.9% апирогенном стерильном растворе NaCl. Сразу после этого внутрибрюшинно вводили 0.2 мл ЛПС в изотоническом стерильном апирогенном физиологическом растворе, нагретом до 37°С, со скоростью

0.1 мл/с. В серии разведений ЛПС определяли  $LD_{50}$  и его значение использовали для оценки токсичности ЛПС. Контрольная и экспериментальная группы состояли из 10 мышей в каждой. Контрольным мышам вводили 0.2 мл стерильного 0.9% раствора NaCl вместе с гидрохлоридом D-галактозамина. Животных наблюдали в течение 48 ч.  $LD_{50}$  рассчитывалась, как описано в работе (Muthannan, 2016).

Определение пирогенности ЛПС. Пирогенность ЛПС определяли на кроликах (порода шиншилла, возраст 1.0–1.5 года) массой 2.0–3.5 кг, как описано в работе (Bennett, 1948). Использовали животных с начальной разницей температуры в диапазоне 0.2°С. Температуру измеряли с 30-мин интервалами перед инъекцией и с 1-ч интервалами после инъекции. Тестируемый ЛПС считали не пирогенным, если сумма повышения температур у трех кроликов была меньше или равна 1.4°С; если эта сумма превышала 2.2°С – пирогенным.

Серологические исследования. Для получения О-антисыворотки использовали прогретые клетки *P. agglomerans* (2.5 ч, кипящая водяная баня). Кроликов иммунизировали внутривенно пятикратно с интервалом 4 сут, концентрация клеток составляла  $2 \times 10^9$ /мл (от 0.1 до 1 мл). Антигенную активность ЛПС исследовали методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони (Ouchterlony, 1962).

Адгезивную активность изучали экспресс-методом (Brilis, et al., 1968) на свежих эритроцитах кролика. Индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) представляет собой среднее количество микробных клеток, прикрепленных к одному эритроциту, вовлеченному в процесс адгезии. Этот параметр был определен для 50 эритроцитов под микроскопом.

Влияние ЛПС *P. agglomerans* П324 и его структурных компонентов на активность протеаз Bacillus. Основными объектами исследования были протеазы из штамма Bacillus thuringiensis ИМВ В-7324 (полученного путем химического мутагенеза), B. thuringiensis var. israelensis ИМВ B-7465 (выделен из Черного моря в районе острова Змеиный и любезно предоставленный сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета им. И.И. Мечникова) и *Bacillus* sp. ПЗ (выделен из перифитона вольеров с дельфинами в Научно-исследовательском центре Вооруженных Сил Украины "Государственный океанариум"). Выделение и очистка протеаз описаны paнee (Matseliukh et al., 1999).

Были использованы протеазы со следующей специфической активностью:

– протеаза 1 *В. thuringiensis* ИМВ В-7465 с эластолитической (442 ед./мг белка) и коллагеназной (212.7 ед./мг белка) активностью; – протеаза 2 В. thuringiensis ИМВ В-7465 с фибринолитической (250 ед./мг белка), эластолитической (289.5 ед./мг белка) и коллагеназной (345.8 ед./мг белка) активностью;

– протеаза 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 с фибринолитической (100 ед./мг белка), эластолитической (197.3 ед./мг белка) и коллагеназной (106 ед./мг белка) активностью;

– протеаза 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 с фибринолитической (88.75 ед./мг белка) и коллагеназной (187 ед./мг белка) активностью;

– протеазы 1 и 2 *Bacillus* sp. ПЗ с фибринолитической (13.3 и 5.6 ед./мг белка), эластолитической (38.5 и 62.5 ед./мг белка) и коллагеназой (58 ед./мг белка) активностью.

При исследовании коллагеназной активности (Mandl, 1970) инкубационную смесь, содержащую 10 мг коллагена, 2.5 мл 0.01 mpuc-HCl буфера (рН 9.0–10.0) и 1 мл исследуемого препарата, выдерживали на водяной бане в течение 3 ч при 37°С. После этого реакционную смесь центрифугировали при 10000 g 5 мин и 0.1 мл супернатанта переносили в пробирки, содержащие 0.5 мл 4% раствора нингидрина в ацетоне и равный объем 0.2 М цитратного буфера. Инкубирование проводили в течение 20 мин на горячей бане, после чего к охлажденной смеси добавляли 5 мл 50% раствора н-пропанола и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Продукты расщепления определяли с использованием спектрофотометра DeNovix DS-11 при длине волны 600 нм. По стандартной кривой, построенной для свободного L-лейцина, определяли эквивалентное количество мкмолей высвободившихся в процессе гидролиза аминокислот. Одна единица активности эквивалентна 1 мкмоль L-лейцина, высвобождаемого из коллагена в течение 3 ч гидролиза при 37°С.

Эластолитическую активность определяли путем колориметрического измерения интенсивности окраски раствора, содержащего конго-красный эластин в качестве субстрата для фермента (Matseliukh et al., 1999). Инкубационная смесь содержала 2.5 мл 0.01 М *трис*-HCl буфера (pH 7.5), 5 мг эластина, окрашенного 0.002% раствором конго-красного и 1 мл раствора фермента. Смесь выдерживали 3 ч при 37°С. Реакцию останавливали, выдерживая пробирки с реакционным раствором на ледяной бане в течение 30 мин. Не гидролизированный эластин отделяли центрифугированием при 10000 g, 5 мин. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре DeNovix DS-11 при длине волны 515 нм. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мг эластина за 1 мин.

Фибринолитическую активность определяли по методу Масады (Masada, 2004). В качестве субстрата использовали фибрин, полученный из плазмы крови человека. Реакционная смесь содержала 1 мг

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

фибрина, 1.8 мл 0.01 М *трис*-HCl буфера (pH 7.5) с добавлением 0.005 М CaCl<sub>2</sub> и 0.2 мл раствора исследуемого препарата. Инкубационную смесь выдерживали 30 мин при 37°С. Продукты гидролиза определяли на спектрофотометре SF-26 при длине волны 275 нм. Единицу фибринолитической активности определяли как количество фермента, которое увеличивало оптическую плотность реакционной смеси на 0.01 единицы за 1 мин в условиях эксперимента.

Обработку протеаз штаммов *Bacillus* ЛПС в конечной концентрации 0.01% проводили в течение 60 мин при комнатной температуре. Все эксперименты повторяли 5–8 раз.

Статистический анализ. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента (t). Все результаты представлены как среднее значение величин  $\pm$  стандартная ошибка (SEM). Различия со значением P < 0.05 считались статистически значимыми.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ЛПС *P. agglomerans* П324 показало, что его выход из клеток составлял 5.3%, что несколько ниже, чем у типового штамма *P. agglomerans* 8674<sup>T</sup> (6.8%), однако соответствует средним показателям, характерным для представителей *Enterobacteriaceae*. Очищенный ЛПС содержал значительное (45.0%) количество углеводов и незначительное (2.7%) – нуклеиновых кислот.

Анализ моносахаридного состава показал, что преобладающими моносахаридами ЛПС *P. agglome*rans П324 были глюкоза (41.2%) и рамноза (25.2%), а также обнаружено незначительное содержание галактозы (4.6%). Характерными компонентами ЛПС грамотрицательных бактерий являются 2-кето-3-дезоксиманноктоновая кислота (КДО) и гептозы, содержание которых в ЛПС *P. agglomer*ans П324 составляло 0.13 и 12.3% соответственно.

Анализ жирнокислотного состава ЛПС *P. agglomerans* П324 показал присутствие жирных кислот с длиной цепи от 12 до 18 атомов углерода, включая 14:0 (3-OH) кислоту в качестве преобладающего компонента (38.96%). Кроме насыщенных, были обнаружены мононенасыщенные кислоты 16:1 и *цис-* и *транс-*изомеры 18:1, которые не являются характерными компонентами липида А, но могли образоваться при отщеплении воды от оксикислот.

В результате мягкой кислотной деградации ЛПС *P. agglomerans* П324 были получены структурные компоненты: ОПС и липид А.

Исследование структуры липида A с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI) в режиме отрицательных ионов показало присут-

Остатки моносахаридов и положение	$\delta_{\rm C}$	$\delta_{\rm H}$ ( <i>J</i> in Hz)
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ - <i>L</i> -Rha <i>p</i> -(1 $\rightarrow$		
A1	101.7	4.95, s
A2	68.4	4.19, s
A3	77.0	3.83, m
A4	71.4	3.58 t (9.4)
A5	70.5	4.08, m
A6	17.9	1.30, d (6.2)
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ - <i>D</i> -Glc <i>p</i> -(1 $\rightarrow$		
B1	96.7	5.08, d (3.7)
B2	72.9	3.61, m
B3	72.9	3.88, t (9.4)
B4	78.4	3.63, t (9.6)
B5	72.0	4.07, m
B6	61.1	3.76, 3.82, m

**Таблица 1.** Химические сдвиги ЯМР <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С (δ, м.д.) О-полисахарида *P. agglomerans* Π324

S – синглет, d – дублет, t – триплет, m – мультиплет.

ствие в масс-спектре двух основных пиков: 1854.4900 Да и 1360.8135 Да, которые были отнесены к дифосфорилированному дисахарилу GlcN с четырьмя 14:0 (3-ОН), одним 18:0 и одним 12:0 ацильными заместителями (расчетная масса 1854.5219 Да) и тетраацилированному дисахариду, в котором отсутствует один 14:0 (3-ОН) и один 18:0 заместители (расчетная масса 1360.8277 Да). Эти данные согласуются с данными, опубликованными ранее (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019). Несколько других незначительных пиков были определены как другие гексаацилированные производные с замещением 18:0 на 16:0 или 14:0 ( $\Delta m = 28.03 \text{ Да}$ ). Масс-спектр показал гетерогенность липида А P. agglomerans П324, но основная форма была гексаацилированная. В отличие от ранее изученных штаммов (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019), производные гексаацилированного липида A P. agglomerans П324 содержали 18:0 кислоту.

Анализ моносахаридного состава ОПС методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) производных ацетатов полиолов, полученных путем полного кислотного гидролиза, показал присутствие глюкозы и рамнозы. ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилгликозидов свидетельствует о том, что рамноза имеет L-конфигурацию. Абсолютная конфигурация Glc была определена как D по эффектам гликозилирования на основании данных <sup>13</sup>С ЯМР химических сдвигов, как суммировано и рассчитано сервисом моделирования ЯМР GODDESS (Kapaev, Toukach, 2014).

<sup>13</sup>С ЯМР спектр О-полисахарида содержал 12 сигналов, характерных для регулярного полимера. Их химические сдвиги были заданы в системе GRASS (Караеv et al., 2018). Мономерный состав был представлен двумя моносахаридами (Glc, Rha). Поиск структурных гипотез привел к единственной гипотезе, соответствующей экспериментальному <sup>13</sup>С ЯМР спектру и имеющей критерий адекватности ниже  $0.5 \text{ м.д.:} \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  (критерий адекватности 0.33 м.д., среднее квадратическое отклонение моделирования по сравнению с экспериментом 0.42 м.д., линейная корреляция 1.000, достоверность прогноза 90%; параметры подробно описаны в работе Караеv et al., 2018).

Структурная гипотеза, приведенная выше, была подтверждена полным отнесением ЯМР спектров, выполненных с помощью 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY и <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC экспериментам (табл. 1). Соответственно, <sup>1</sup>H ЯМР спектр ОПС (табл. 1) содержал сигналы для двух аномерных протонов при  $\delta$  4.95–5.08, одной группы CH<sub>3</sub>–C (H-6 Rha) при  $\delta$  1.30, других протонов моносахаридного цикла при  $\delta$  3.58–4.19. <sup>13</sup>C ЯМР спектр ОПС (табл. 1) содержал сигналы для двух аномерных протонов углерода при  $\delta$  96.7–101.7, одной группы CH<sub>3</sub>–C (C-6 Rha) при  $\delta$  17.9, одной группы HOCH<sub>2</sub>–C (C-6 Glc) при  $\delta$  68.4–78.4.

Спиновые системы в <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР спектрах были идентифицированы для двух моносахаридных остатков (**A**, **B**) на основании корреляции в двухмерных ЯМР спектрах и значений констант  ${}^{3}J_{\rm H, H}$ .



**Рис. 1.** Структура О-специфического полисахарида *P. agglomerans* П324.

Аномерная конфигурация остатков Rha и Glc была подтверждена значением химических сдвигов C-5 (по сравнению с опубликованными данными соответствующими α- и β-пиранозидов (Lipkind et al., 1988), усредненными сервисом моделирования ЯМР GODDESS (Караеv et al., 2018). α-Конфигурация моносахаридов также подтверждается наличием H-1/H-2 корреляций в ROESY спектре.

Смещения в слабое поле сигналов С-3 остатка **A** и С-4 остатка **B** по сравнению с типичными значениями для незамещенных моносахаридов (Lipkind et al., 1988) показывали положение замещения в повторяющемся звене. Единственно возможная последовательность моносахаридов была подтверждена корреляциями в спектре ROESY **A** H-1/**B** H-4, **B** H-1/**A** H-3.

В результате была установлена (рис. 1) следующая структура О-специфического полисахарида *P. agglomerans* П324:  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ .

Согласно систематическому поиску в базе данных по структуре углеводов (Carbohydrate Structure Database), (Toukach, Egorova, 2016) эта структура была впервые обнаружена для представителей вида *P. agglomerans*. Ранее такая же структура была обнаружена (Knirel, 2011) для O-антигенов представителей двух семейств (*Burkholderiaceae* и *Enterobacteriaceae*): *Burkholderia cepacia* O1, O9 (CSDB 31598, 108499, 126042), *Serratia marcescens* S1254, O27 (CSDB 179 и 255) и *Klebsiella pneumoniae* i28/94 (CSDB 3608).

Известно, что различные виды биологической активности ЛПС, в частности, устойчивость бактерий к антибиотикам связаны с наличием заряженных групп в липиде А. Установлено, что заместители, такие как 4-амино-4-дезокси-L-арабиноза, при 4'-фосфате липида А могут вызывать устойчивость бактерий к некоторым поликатионным антибиотикам, например, полимиксину В (Trent et al., 2001). Как было показано с помошью диско-диффузионного метода, полимиксин В задерживал рост клеток P. agglomerans П324 (зона ингибирования роста составляла 20 мм) (рис. 2). Данный результат указывает на чувствительность бактериальных клеток к полимиксину В, и можно предположить, что липид А ЛПС *P. agglomer*ans, выделенный из этого штамма, не содержал



**Рис. 2.** Чувствительность микробной культуры *P. ag*glomerans П324 к полимиксину В.

4-амино-4-дезокси-L-арабинозу в качестве заместителя. Это предположение согласуется с данными ESI масс-спектрометрии липида А ЛПС, описанными выше.

Липид А отвечает за такие эндотоксические активности, как токсичность и пирогенность. В качестве стандарта при определении токсичности ЛПС мы использовали токсичность ЛПС E. coli О55:В5, известного как классический эталонный штамм (LD<sub>50</sub> = 0.012 мкг/мышь или 0.48 мкг/кг) (Vorob'eva et al., 2006). Летальная токсичность ЛПС *P. agglomerans* П324 (LD<sub>50</sub> = 53 мкг/мышь или 2.12 мг/кг) в экспериментах на мышах, сенсибилизированных D-галактозамином, была в 4400 раз ниже, чем у Е. coli. Таким образом, ЛПС P. agglomerans П324 можно отнести к малотоксичным веществам. Хотя он продемонстрировал более высокий уровень токсичности, чем ЛПС других исследованных представителей вида P. agglomerans (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019).

ЛПС исследуемого штамма оказывал пирогенное действие (рис. 3): введение раствора ЛПС в течение первого часа привело к резкому повышению температуры у экспериментальных животных (уровень повышения температуры был почти в два раза выше, чем после введения пирогенала фармацевтического препарата, используемого для повышения температуры у пациентов).

Патогенность грамотрицательных бактерий зависит от способности макромолекул ЛПС прикрепляться к клеткам. Было показано (рис. 4), что изученный ЛПС уменьшал ИАМ: чем выше была концентрация ЛПС в реакционной смеси, тем меньше происходило взаимодействий между поверхностными структурами эритроцитов и клетками *E. coli* АТСС 25922. Под влиянием ЛПС *P. agglomerans* П324 в концентрации 3 мг/мл ИАМ составлял ~2.2 ед.

Известно, что серологическая специфичность микробных клеток зависит от состава ЛПС и наличия антигенных детерминант, распознаваемых



4.03.5 3.0 Ę 2.5 ИАМ, 2.0 1.5 1.0 0.5 0.5 1.5 2.0 2.5 1.0 3.0 Концентрация ЛПС, мг/мл

**Рис. 3.** Пирогенность ЛПС *P. agglomerans* П324. Данные представлены как среднее значение величин  $\pm$  стандартная ошибка (SEM).

**Рис. 4.** Влияние различных концентраций ЛПС *P. ag*glomerans П324 на индекс адгезивности *E. coli*. Данные представлены как среднее значение величин ± SEM.



**Рис. 5.** Реакция двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони О-антисыворотки к *P. agglomerans* П324 (две центральные лунки) и ЛПС *P. agglomerans* 7960a (1), 7969 (2), 8456 (3), 8488 (4), 8490 (5), 8606 (6), 8674 (7), П1a (8), П324 (9), 7406 (10), 7604 (11), 9637 (12), 9649 (13), 9668 (14), \* – пустая ячейка.

клетками высших организмов. Поликлональная О-антисыворотка была получена путем иммунизации кроликов прогретой культурой исследуемого штамма *P. agglomerans* П324. Антигенами для серологических исследований служили ЛПС, выделенные из 14 штаммов P. agglomerans (P. agglomerans 7960a, 7969, 8456, 8488, 8490, 8606, 8674, П1а, П324, 7406, 9637, 9649 и 9668). Реакцией двойной иммунодиффузии в агаре было показано, что антисыворотка к *P. agglomerans* П324 реагировала только с гомологичным ЛПС. Серологических перекрестных реакций антисыворотки к *P. agglomerans* П324 с ЛПС других исследованных штаммов обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии общих антигенных детерминант, то есть о принадлежности P. agglomerans П324 к иной серогруппе (рис. 5).

Имеются сообщения о влиянии ЛПС на активность некоторых ферментов высших животных (каспазы-1, интерлейкин-1 конвертирующего фермента, Schumann et al., 1998; ферментов системы комплимента и ферментов в макрофагах мыши, Salimuddin, et al., 1999). Что касается микроорганизмов, существует только несколько работ о влиянии ЛПС на активность ферментов, в частности, авторы одной из них (Kramer et al., 2002) считают, что для активации интегральной протеазы ОтрТ наружной мембраны кишечной палочки необходим ЛПС, который вызывает тонкие конформационные изменения в структуре OmpT, тем самым изменяя свойства активного центра таким образом, что он становится способным к гидролизу субстратов. Показаны сайты связывания молекулы ЛПС с аминокислотами фермента.



**Рис. 6.** Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на фибринолитическую активность протеаз *Bacillus.* Сплошная линия – активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин  $\pm$  SEM. Величины, значительно (*P* < 0.05) отличные от контроля, обозначены (\*).

Ранее нами было показано, что ЛПС P. agglomerans П324 оказывал наибольшее стимулирующее влияние на активность протеаз Bacillus (Dzyublyuk et al., 2018). Он повышал фибринолитическую активность протеазы 1 B. thuringiensis ИМВ В-7324 более чем в четыре раза, а протеазы 2 *Bacillus* sp. ПЗ более чем в три раза. Поскольку каждый компонент полифункциональной макромолекулы ЛПС вносит определенный вклад в ее биологическую активность, в данной работе мы изучили влияние отдельных структурных компонентов ЛПС *P. agglomerans* П324 на активность протеаз Bacillus. Было показано (рис. 6), что ОПС проявлял наибольшее стимулирующее влияние на фибринолитическую активность протеазы 2 В. thuringiensis ИМВ В-7324 (в два раза по сравнению с контролем) и протеазы 2 Bacillus sp. ПЗ (в четыре раза по сравнению с контролем). Можно предположить, что в активации этих ферментов ЛПС *P. agglomerans* П324 важную роль играет углеводная часть молекулы, а именно ОПС. Наряду с этим липид А также повышает активность тех же протеаз, но в меньшей степени (только в два раза). Олигосахарид кора активировал протеазу 2 В. thuringiensis ИМВ В-7465 и протеазу 1 В. thuringiensis ИМВ В-7324 (50 и 18% по отношению к контролю, соответственно). Фибринолитическая активность протеазы 1 *Bacillus* sp. П3 существенно не изменялась под влиянием отдельных фракций ЛПС. Аналогичный эффект имел место в случае протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324.

Исследования эластолитической активности показали, что нативный ЛПС либо не влиял на данную активность, либо подавлял ее почти в два раза (рис. 7). Действие отдельных компонентов ЛПС на эластолитическую активность показало наибольший стимулирующий эффект липида А (в 1.5–2.5 раза в зависимости от штамма).

Показано (рис. 8), что отдельные фракции ЛПС, в отличие от нативного, незначительно ингибируют активность коллагеназы.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии как нативного ЛПС, так и отдельных его структурных компонентов на активность исследуемых ферментов. Можно предположить, что значительная активация исследуемых протеаз нативным ЛПС является следствием совместного действия трех его структурных компонентов (О-специфического полисахарида, олигосахарида кора и липида A).

Вместе с тем имеются незначительные сведения о том, что особенности строения ЛПС могут влиять на активность ферментов. Так, показано



**Рис.** 7. Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на эластолитическую активность протеаз *Bacillus*. Сплошная линия – активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин  $\pm$  SEM. Величины, значительно (*P* < 0.05) отличные от контроля, обозначены (\*).



**Рис. 8.** Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на коллагеназную активность протеаз *Bacillus*. Сплошная линия — активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин  $\pm$  SEM. Величины, значительно ( $P \le 0.05$ ) отличные от контроля, обозначены (\*).

(Dentovskaya et al., 2007), что укорочение олигосахарида кора приводит к ингибированию фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей активатора плазминогена *Yersinia pestis*, тогда как снижение степени ацилирования липида A на их активность не влияет. Sugiyama, Minami, Ishii и Amano (Sugiyama et al., 2013) показали важную роль фосфатных группы липида A в ингибировании Lon протеазы *E. coli*.

Таким образом, из *P. agglomerans* П324 выделен ЛПС и его структурные компоненты, которые химически охарактеризованы. По составу жирных кислот липида А исследуемый ЛПС сходен с ЛПС других представителей *Enterobacteriaceae*. Структура липида А *P. agglomerans* П324, как и липидов А других исследованных штаммов этого вида, характеризуется гетерогенностью, обусловленной разной степенью ацилирования, однако, в отличие от других липидов А, содержит С18:0 кислоту. ОПС P. agglomerans П324 отличается структурой повторяющегося звена от установленных до настоящего времени структур других штаммов этого вида. Интересным представляется аналогия структур ОПС *P. agglomerans* П324 со структурами представителей семейства Burkholderiaceae: Burkholderia cepacia O1, O9 (CSDB 31598, 108499, 126042), a также Enterobacteriaceae: Serratia marcescens S1254. O27 (CSDB 179 и 255) и Klebsiella pneumoniae i28/94 (CSDB 3608). Поскольку серологическими исследованиями нами показано отсутствие общих антигенных детерминант в ЛПС P. agglomerans П324 и других изученных нами штаммах P. agglomerans, нам представляется перспективными дальнейшие исследования по установлению серологических взаимосвязей между P. agglomerans П324 и бактериями с аналогичной структурой ОПС. Полученные нами результаты о способности ЛПС исследуемого штамма влиять на активность протеаз с различной специфичностью ожидают дальнейшего обсуждения с точки зрения целесообразности такого взаимодействия.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Александру Чижову (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия) за регистрацию спектра ESI MS липида A *P. agglomerans* П324.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Компьютерная интерпретация данных ЯМР и выяснение структуры ОПС была поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00098.

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

#### СОКРАЩЕНИЯ

СОЅҮ, корреляционная спектроскопия; СЅDВ, База данных по структуре углеводов; ГЖХ, газо-жидкостная хроматография; GODDESS, эмпирическое моделирование на основе баз данных, оптимизированное для гликанов; GRASS, генерация, ранжирование и назначение моносахаридных структур; HSQC, гетероядерная одноканальная корреляция; HR ESI MS, электрораспылительная ионизационная массспектрометрия высокого разрешения; ЛПС, липополисахарид; ЯМР, ядерный магнитный резонанс; OPS, O-специфический полисахарид; ROESY, спектроскопия Оверхаузера с вращающейся рамой; TOCSY, тотальная корреляционная спектроскопия.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A.*, A method for analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydr. Res. 1976. P. 340–345.

Belyakov P.A., Kadentsev V.I., Chizhov A.O., Kolotyrkina N.G., Shashkov A.S., Ananikov V.P. Mechanistic insight into organic and catalytic reactions by joint studies using mass spectrometry and NMR spectroscopy // Mendeleev Commun. 2010. V. 20. P. 125–131.

*Bennett I.L.* A study of the relationship between the fevers caused by bacterial pyrogens and by the intravenous injection of the sterile exudates of acute inflammation // J. Exper. Med. 1948. V. 88. P. 279–284.

*Brilis V., Briline T., Lencner H., Lencner A.* A method for investigation of the adhesive process in microorganisms // Laboratornoe delo. 1968. № 4. P. 210–212.

*Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteyeva I.V., Anisimov A.P.* Presence of the full lipopolysaccharide core structure is necessary for activation of plasminogen by *Yersinia pestis* // Probl. Espec. Danger. Infect. 2007. V. 93. P. 49–51.

*Dzyublyuk N.A., Varbanets L.D., Bulyhina T.V.* Influence of *Pantoea agglomerans* lipopolisaccharides on the activity of *Bacillus* proteases // Mikrobiol. Z. 2018. V. 80. P. 27–35.

*Elif E., Bert B.* Structural basis for activation of lipopolysaccharide // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 23971–23976.

Jackson A.D., Smith V.J. LPS-sensitive protease activity in the cells of the solitary ascidian, Ciona intestinalis (L) // Compar. Biochem. Physiol. Part B. 1993. V. 106. P. 505–512.

*Kapaev R.R., Toukach P.V.* GRASS: semi-automated NMR-based structure elucidation of saccharides // Bioinformatics. 2018. V. 34. P. 957–963.

*Kapaev R.R., Egorova K.S., Toukach P.V.* Carbohydrate structure generalization scheme for database-driven simulation of experimental observables, such as NMR chemical shifts // J. Chem. Inform. Model. 2014. V. 54. P. 2594–2611.

*Knirel Y.A.* Structure of O-antigens // Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: Springer-Verlag, 2011. P. 41–115.

Kohchi C., Inagawa H., Nishizawa T., Yamaguchi T., Nagai S., Soma G. Applications of lipopolysaccharide derived from Pantoea agglomerans (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 102. P. 485–496.

Kramer R.A., Brandenburg K., Vandeputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 1746–1752.

*Leontein K., Lonngren J.* Determination of the absolute configuration of sugars by gas-liquid chromatography of their acetylated 2-octyl glycosides // Methods Carbohydr. Chem. 1993. V. 9. P. 87–89.

*Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K.* A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of <sup>13</sup>C-n.m.r. data // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.

Mandl I. Collagenase // Science. 1970. V. 169. P. 1234-1238.

*Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food Style. 2004. V. 8. P. 92–95.

*Matseliukh O.V., Nidialkova N.A. Bacillus thuringiensis* elastases with insecticide activity // Ukrainskyi biokhimichniy zhurnal. 1999. V. 84. P. 25–36.

*Muthannan A.R.* Determination of 50% endpoint titer using a simple formula // World J. Virol. 2016. V. 5. P. 85–86.

*Novak V.L., Oborin O.M.* Endogenous intoxication syndrome, sepsis and multiple organ failure: pathophysiological and clinical aspects of the problem (literature review) // Zhurnal of AMN of Ukraine. 2009. V. 15. P. 263–275.

*Ouchterlony O.* Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II // Progr. Allergy. 1962. V. 6. P. 30–154.

*Rylander R., Burrell R.* Endotoxins in inhalation research. Summary of conclusions of a workshop held at Clearwater, Florida, U.S.A., 28–30 September 1987 // Annals Occupat. Hyg. 1987. V. 32. P. 553–556.

Salimuddin, Nagasaki A., Gotoh T., Isobe H., Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide // Amer. J. Physiol. 1999. V. 277. e110–e117.

Schumann R.R., Belka C., Reuter D., Lamping N., Kirschning C.J., Weber J.R., Pfeil D. Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells // Blood. 1998. V. 91. P. 577–584.

Sugiyama N., Minami N., Ishii Y., Amano F. Inhibition of Lon protease by bacterial lipopolysaccharide (LPS) though inhibition of ATPase // Adv. Biosci. Biotechnol. 2013. P. 590–598.

*Tagawa K., Yoshihara T., Shibata T., Kitazaki K., Endo Y., Fujita T., Koshiba T., Kawabata S.* Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or -independent manner // PLoS One. 2012. V. 7. e36783.

*Toukach P.V., Egorova K.S.* Carbohydrate Structure Database merged from bacterial, archaeal, plant and fungal parts // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. P. D1229–D1236.

*Trent M.S., Ribeiro A.A., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R.* An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 43122–43131.

*Völksch B., Thon S., Jacobsen I.D., Gube M.* Polyphasic study of plant- and clinic associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential // Infect. Genet. Evol. 2009. V. 9. P. 1381–1391.

*Vorob'eva E.V., Krasikova I.N., Solov'eva T.F.* Influence of lipopolysaccharides and lipids A from some marine bacteria on spontaneous and *Escherichia coli* LPS-induced TNF- $\alpha$  release from peripheral human blood cells // Biochemistry. 2006. V. 71. P. 936–944.

*Wainstein M.P.* M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (29th ed.). Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

*Walterson A.M., Stavrinides J., Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 968–984.

*Westphal O., Jann K.* Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure // Methods in Carbohydrate Chemistry / Ed. Roy L. Whistler. New York: Academic Press, Inc., 1965. V. 5. P. 83–91.

Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V., Knirel Y.A. Lipopolysaccharide of Pantoea agglomerans 7969: Chemical identification, function and biological activity // Carbohydr. Polym. 2017. V. 165. P. 351–358.

Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V., Knirel Y.A. Lipopolysaccharides of Pantoea agglomerans 7604 and 8674 with structurally related Opolysaccharide chains: Chemical identification and biological properties // Carbohydr. Polym. 2018. V. 181. P. 386– 393.

Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V. Pantoea agglomerans P1a lipopolysaccharide: Structure of the O-specific polysaccharide and lipid A and biological activity // Carbohydr. Res. 2019. V. 484. P. 1067–1077.

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

# Structure and Biological Properties of the O-Specific Polysaccharide and Lipid A from *Pantoea agglomerans* P324

## E. L. Zdorovenko<sup>1</sup>, A. A. Kadykova<sup>1, 2</sup>, A. S. Shashkov<sup>1</sup>, L. D. Varbanets<sup>3</sup>, T. V. Bulyhina<sup>3, \*</sup>, and P. V. Toukach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, High Chemical College, Moscow, 125047 Russia <sup>3</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences, Kiev, 03143 Ukraine \*e-mail: tati20@ukr.net

Received May 8, 2020; revised July 8, 2020; accepted August 8, 2020

Abstract—The lipopolysaccharide (LPS) of a new *Pantoea agglomerans* strain P324 was studied by chemical and biological methods. Mild acid hydrolysis of the LPS resulted in lipid A and O-specific polysaccharide (OPS) fractions. Studies by negative-ion mode HR ESI mass spectrometry showed heterogeneity of the lipid A, the major form being a hexa-acylated derivative containing biphosphorylated GlcN disaccharide, four 14:0 (3-OH), one 18:0, and one 12:0 residues. The following structure of the OPS was elucidated by chemical, NMR, and computational methods:  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . The *P. agglomerans* P324 LPS showed a medium level of toxic and pyrogenic activities. Structural components of the LPS exhibited varying effects on the activity of *Bacillus* peptidases. Thus, the OPS and lipid A played a significant role in fibrin hydrolysis by *Bacillus* proteases but did not affect the activity of protease 2 of *B. thuringiensis* IMV B-7324. Hydrolysis of elastin was intensified by the core oligosaccharide and lipid A. Hydrolysis of collagen in the presence of the isolated fractions was accompanied by inhibition of activity as compared to the native LPS.

**Keywords:** *Pantoea agglomerans*, lipopolysaccharide, structures of the O-specific polysaccharide and lipid A, NMR, activity of *Bacillus* peptidases