

TOMASZ JĘDRZEJCZYK**Instytut Podstaw Chemii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka**

KWAS MURAMINOWY ZNANY I NIEZNANY

Recenzent: prof. dr hab. Wojciech Ambroziak

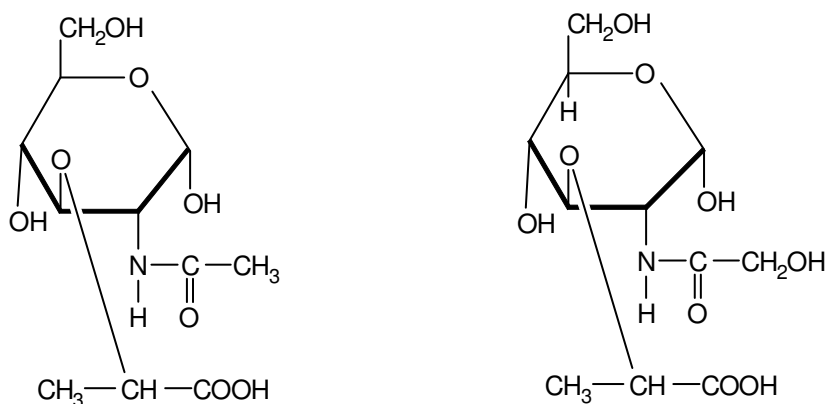
W pracy opisano stan wiedzy na temat specyficznej cząsteczki zwanej kwasem muraminowym, która występuje w polisacharydach ścian komórkowych bakterii i zarodników. W pracy omówiono jego strukturę, występowanie, właściwości fizykochemiczne, funkcje i przemiany, rolę biologiczną i fizjologiczną oraz metody analizy.

1. Występowanie i struktura

Po raz pierwszy o odkryciu bliżej nieznanego aminocukru donosił Park w 1952 r. [1]. Następnie obecność tego aminocukru wykryli Strange i Powell w 1954 r. w kwasowych hydrolizatach peptydów otrzymanych ze sporów bakterii, także Cummins i Harris wyizolowali tę substancję ze ścianek komórkowych dużej liczby bakterii gramdodatnich [2, 3, 4]. W 1957 r. Weidel i Primosigh znaleźli identyczną substancję w izolatach ścian komórkowych z *Escherichia coli* [5]. Dopiero jednak Park i Strominger w 1957 r. wykazali, że heksozamina, odkryta uprzednio przez Parka jako składnik kompleksów urydyno- pirofosforanowych traktowanych penicyliną komórek *Staphylococcus aureus*, jest tożsama z substancją wykrywaną później przez wielu naukowców [6]. Aminocukier ten nazwano kwasem muraminowym [R-2-amino-3-O-(1-karboksyetylo)-2-deoksy-D-glukoza, 3-O- α -karboksyetylo-D-glukozaminą].

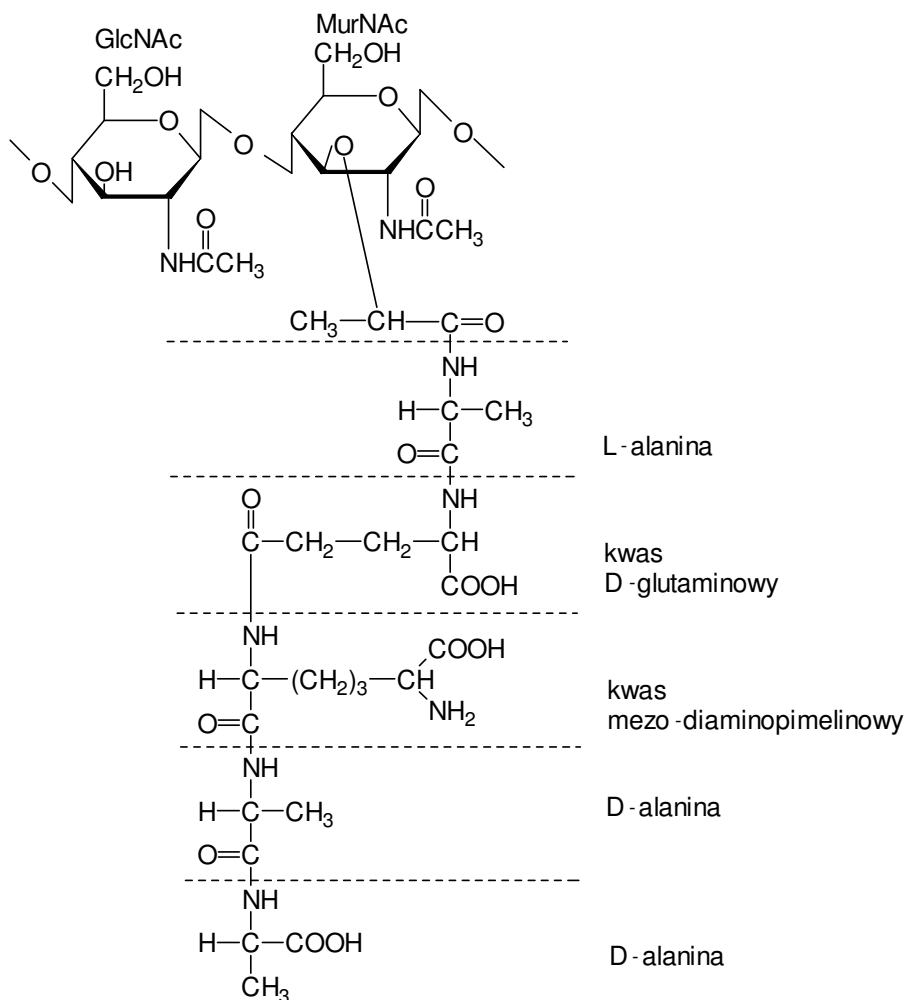
Kwas muraminowy występuje w ściankach komórkowych i zarodnikach bakteryjnych. Szkielet ściany komórki bakteryjnej składa się z jednolitego polimeru, peptydoglikanu zwanego mureiną zawierającego również kwas diaminopimelinowy. Ta makrocząsteczka jest heteropolimerem złożonym z łańcuchów, w których występują na przemian cząsteczki glukozaminy i kwasu muraminowego połączone wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Te długie łańcuchy połączone są w sieć poprzez mostki peptydowe. U większości bakterii grupy aminowe cukrów są acetylowane, choć u niektórych gatunków N-acetylacja nie obejmuje wszystkich reszt glukozaminy. Bardzo rzadko obserwowany jest brak N-acetylacji kwasu muraminowego.

U mikrobakterii *Nocardia kirovani* i *Micromonospora* sp. kwas muraminowy podstawiony jest grupą N-glikolilową (produkt oksydacji grupy acetylowej). Cząsteczki kwasu N-acetylmuraminowego *Staphylococcus aureus* i *Neisseria gonorrhoeae* są dodatkowo acetylowane przy atomie węgla C-6 (O-acetylacja). U wszystkich bakterii gram-dodatnich występują polimery N-acetylglikozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączone krzyżowymi mostkami peptydowymi. Ściany bakterii gram-ujemnych mają bardziej złożoną budowę. Łańcuchy polisacharydowe wiązane są bezpośrednio grupą karboksylanową D-alaniny jednego łańcucha z grupą aminową kwasu diaminopimelinowego drugiego. Na końcu łańcuchów cukrowych mureiny niektórych bakterii gram-ujemnych znajduje się wewnątrzcząsteczkowe wiązanie 1,6-anhydro, czyniące ten cukier nieredukującym.



Rys. 1. Struktura kwasu N-acetylmuraminowego i N-glikolilmuraminowego

Długość łańcuchów cukrowych, jak również długość mostków peptydowych i skład aminokwasowy mureiny są różne u różnych gatunków bakterii. W trakcie biosyntezy mureiny syntetyzowane są długie łańcuchy cukrowe, które następnie cięte są na krótsze przez autolityczne glikozydazy. W zależności od charakteru enzymu uczestniczącego w skracaniu łańcuchów kończą się one resztą kwasu muraminowego z wolnym końcem redukującym (muramidaza) lub kwasem 1,6-anhydromuraminowym (lityczna transglikozylaza). Cząsteczki kwasu muraminowego mają przyłączony do reszty mleczanowej, za pomocą wiązania peptydowego, krótki peptyd – z wyjątkiem niektórych reszt w mureinie *Micrococcus* i nielicznych innych bakterii. Podczas gdy budowa łańcucha cukrowego jest raczej stała, część peptydowa wykazuje dość znaczne zróżnicowanie w zależności od gatunku, wieku komórki, a nawet od warunków wzrostu, szczególnie u bakterii gram-dodatnich. Peptyd przyłączony do kwasu muraminowego zawsze jest syntetyzowany w postaci pentapeptydu złożonego z aminokwasów występujących na przemian w konfiguracji L i D. Za podstawową strukturę można przyjąć pentapeptyd *Escherichia coli* występujący również u wielu innych gatunków bakterii (rys. 2).

Rys. 2. Budowa disacharydopentapeptydu mureiny *Escherichia coli*

Typowe aminokwasy występujące w peptydach to: L-alanina, kwas D-glutaminowy, kwas mezo-diaminopimelinowy lub L-lizyna oraz D-alanina. Aminokwasy diaminowe, a więc kwas diaminopimelinowy i L-lizyna, odgrywają ważną rolę w powstawaniu usieciowanej struktury mureiny, ponieważ ich obie grupy aminowe mogą brać udział w tworzeniu wiązań peptydowych, a tym samym mogą łączyć ze sobą dwa heteropolimeryczne łańcuchy (rys. 2). Na miejscu kwasu mezo-diaminopimelinowego lub lizyny mogą występować ornityna, lantionina, kwas L,L-diaminopimelinowy, kwas diaminomasłowy lub hydroksypochodne tych aminokwasów oraz homoseryna. L-alanina może być zastępowana na etapie syntezy prekursorów przez D-aminokwasy: glicynę, leucynę, serynę lub metioninę.

Dzięki wiązaniom peptydowym sieciującym łańcuchy polisacharydowe bezpośrednio lub krzyżowo tworzy się olbrzymia cząsteczka podobna do woreczka, zwana woreczkiem mureinowym. Pełni on funkcję szkieletu podporowego ściany komórkowej i jest poprzeplatany lub otoczony innymi substancjami [7, 8, 9].

2. Właściwości fizykochemiczne

Kwas muraminowy po raz pierwszy został wyizolowany w formie krystalicznej z peptydów sporów *Bacillus megaterium* przez Strange' a i Darka w 1956 r. [10]. Przypisano mu strukturę 3-O- α -karboksyetyloheksosaminy [11]. Kent w 1957 r. zsyntetyzował 3-O- α -karboksyetyloglucozaminę i wykazał, że jej właściwości są podobne do kwasu muraminowego [12]. Ta synteza kwasu muraminowego, podobnie jak wszystkie inne, opierała się na tworzeniu wiązania eterowego między kwasem D-mlekowym i grupą hydroksylową przy węglu C-3 D-glukozaminy (2-amino-2-deoksy-D-glukozy). Substratem większości syntez był 2-acetamido-4,6-O-benzylideno-2-deoksy- α -D-glukopiranozyd metylowy. Związek ten po utworzeniu soli sodowej przy węglu C-3 był kondensowany z różnymi pochodnymi kwasu α -halogenopropionowego. Użycie pochodnych racemicznego kwasu α -halogenopropionowego prowadziło do tworzenia diastereoizomerów pochodnych kwasu muraminowego i izomuraminowego. Wymagało to rozdzielania chromatograficznego izomerów [13, 14]. Obydwie metody dawały niskie wydajności z powodu konieczności przeprowadzenia wielu reakcji przed ostatecznym oczyszczeniem produktu. Matsushima i Park zsyntetyzowali kwas muraminowy, stosując optycznie czynną pochodną kwasu L- α -chloropropionowego, co pozwoliło uniknąć tworzenia kwasu izomuraminowego i rozdzielania chromatograficznego [15]. Można też stosować jako materiał wyjściowy pochodną alloksazynową 2-benzamido-2-deoksy-5,6-O-izopropylideno-D-glukofuranozy i wówczas oddziela się diastereoizomery przez destylację frakcjonowaną [16, 17].

Flowers i Jeanloz zastosowali po raz pierwszy reakcję α -glukozydu benzyłowego z kwasem D,L- α -chloropropionowym i stwierdzili, że tworzy się prawie wyłącznie jeden naturalny izomer pochodnej kwasu N-acetylmuraminowego, a więc reakcja jest stereospecyficzna [18].

Stereospecyficzną metodę syntezy kwasu muraminowego zastosowali również Osawa i Jeanloz, przeprowadzając reakcję 2-acetamido-4,6-O-benzylideno-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu benzyłowego z nadmiarem racemicznego kwasu α -chloropropionowego w obecności wodoru sodu, co prowadziło do otrzymania pochodnej kwasu muraminowego z wydajnością 76% i pochodnej kwasu izomuraminowego z wydajnością 1-3% [19].

Kwas muraminowy krystalizuje z roztworów wodnych, tworząc bezbarwne kryształy o temperaturze topnienia 152-154°C, a jego skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25}$ wynosi +103° (c = 0,26 w wodzie) [15]. Inni autorzy donoszą, że otrzymali bezbarwne kryształy kwasu muraminowego z 90% wodnego roztworu etanolu

o temperaturze topnienia 160-162°C, a roztwór wykazuje mutarotację od wartości $[\alpha]_D^{22} +146^\circ$ po 6 minutach do wartości $[\alpha]_D^{23} +116^\circ$ w stanie równowagi po 31 godzinach ($c = 0,57$ w wodzie) [19].

Kwas N-acetylmuraminowy krystalizowany z mieszaniny octanu etylu z metanolem miał temperaturę topnienia 119-121°C, a roztwór wykazywał mutarotację od wartości $[\alpha]_D^{20} +56^\circ$ po 10 minutach do wartości $[\alpha]_D^{20} +40^\circ$ w stanie równowagi po 24 godzinach ($c = 0,68$ w wodzie) [19].

Kwas izomuraminowy krystalizowano z mieszaniny eteru z metanolem, a jego kryształy topiły się w temperaturze 80-92°C. Skręcalność właściwa roztworu wynosiła $[\alpha]_D^{25} +24^\circ$ ($c = 0,927$ w wodzie) [15].

Kwas muraminowy jest stabilny we wrzącym kwasie solnym i średnio mocnych kwasach na gorąco [11, 12, 13]. Utlenianie ninhydriną daje podstawioną pentozę z grupą kwasową. Utlenianie nadjodanem prowadzi do wydzielenia HCHO, HCOOH i NH₃, a po działaniu HI i czerwonym fosforem na kwas muraminowy z produktów reakcji wydzielono kwas propionowy [11, 13]. Kondensacja kwasu muraminowego z acetyloacetonem prowadzi do utworzenia 3-acetylo-4-hydroksy-2-metylo-5-(tetrahydroksybutylo-)pirolu, podobnie jak dla innych heksozamin. Zewnętrzny łańcuch i grupa acetylowa były usunięte w reakcjach prowadzonych przez Cornfortha i Firtha, dając lotny 2-metylopirol [20].

Ustalenie struktury kwasu muraminowego odbywało się stopniowo. Analiza elementarna i oznaczenie masy cząsteczkowej dało wzór sumaryczny C₉H₁₇NO₇·H₂O [11, 13]. Stwierdzenie, że kwas muraminowy daje pozytywną reakcję na obecność heksozaminy metodami kolorymetrycznymi sugerowało, że jest to 2-deoksyaminocukier z grupą karbonylową sąsiadującą z grupą aminową [13]. Potwierdzenie obecności grupy redukującej otrzymano przez określenie mocy redukującej i dodanie HCN [21]. Miareczkowanie potencjometryczne potwierdziło obecność grupy karbonylowej i wolnej grupy aminowej w kwasie muraminowym, a ich wartości pK były równe w przybliżeniu 2,6 i 8,8 [11]. Ilościowa acetylacja tego kwasu wykazała obecność 4 grup hydroksylowych i aminowych [12]. Najpóźniej ustalono konfigurację wokół centralnego atomu węgla reszty kwasu mlekowego.

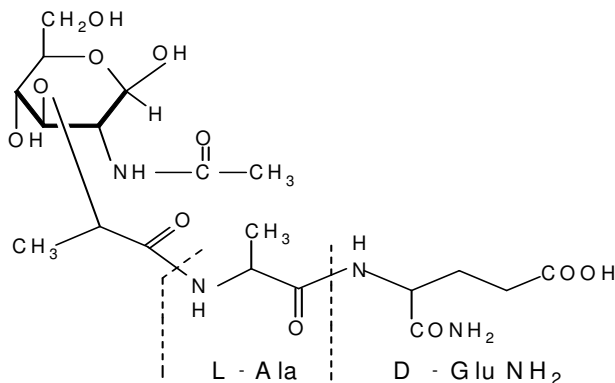
3. Biologiczne oddziaływania kwasu N-acetylmuraminowego

3.1. Oddziaływanie lektyn roślin strączkowych z kwasem muraminowym i N-acetylmuraminowym [22]

Badano możliwość oddziaływania kwasu muraminowego i N-acetylmuraminowego z różnymi lektynami z roślin strączkowych, włączając Glc/Man- i Gal/GalNAc- specyficzne lektyny. Doświadczenia przeprowadzono techniką inhibicji hemaglutynacji (antykoagulacja krwinek). Dane literaturowe wskazują, że wiele lektyn, przede wszystkim specyficzne dla Glc/Man, oddziałuje z kwasem muraminowym i N-acetylmuraminowym często bardziej intensywnie niż z innymi

monosacharydami i ich pochodnymi, takimi jak N-acetyloglukozoamina i kwas sjałowy. Wykazano również, że Glc/Man specyficzne lektyny oddziałują z muramylodipeptydem MurNAc-D-Ala-D-isoGln. Fakt ten może wyjaśnić, dlaczego lektyny łatwo aglutynują z niektórymi szczepami bakteryjnymi, których ściany komórkowe zawierają peptydoglikany z wysokim stężeniem kwasu N-acetylomuraminowego.

Muramylodipeptyd (MDP) jest fragmentem mureiny wspólnym dla większości bakterii (rys. 3).



Rys. 3. Budowa MDP

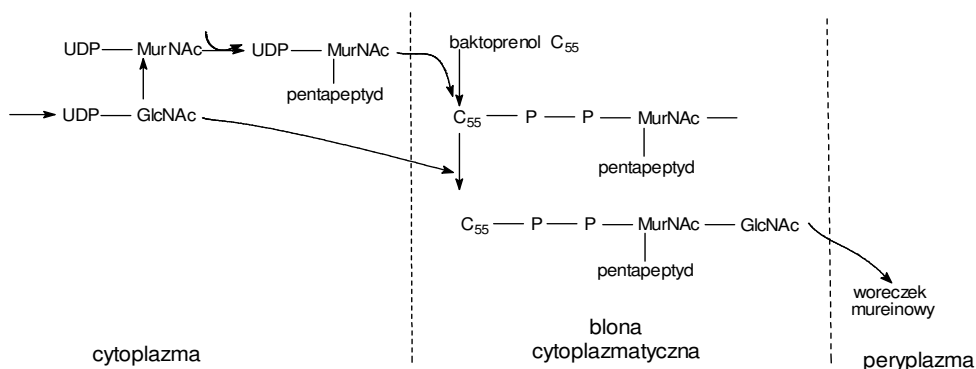
3.2. Reakcja z przeciwciałami

Naturalne antyciała przeciwko dipeptydom glukozaminyłomuramylowym (GMDP) wyizolowane z ludzkiej surowicy (serum) metodą termiczną mają zdolność reakcji krzyżowej z wyznacznikiem łańcucha glukanowego, tetrasacharydem zawierającym N-acetyloglukozaminę i kwas N-acetylmuraminowy. Intensywność oddziaływania naturalnego przeciwciała ze specyficznym ligandem jest znacząco wyższa niż z tetrasacharydem. Naturalne antyciała przeciwko tetrasacharydom charakteryzują się własnościami przeciwciał heteroklitycznych, np. intensywność ich oddziaływania z obcopolodnymi ligandami jest znacznie wyższa niż ze swoistymi tetrasacharydami. Podejrzewa się, że GMDP jest specyficznym antygenicznym peptydoglikanem determinantowym, przeciwko któremu są tworzone antyciała w procesie naturalnej immunizacji, reagujące z różną intensywnością względem swoistych i względnych haptenu (antygenów resztkowych) [23].

Hodowle ludzkich keratynocytów stymulowane kwasem muraminowym były analizowane pod kątem zdolności do produkcji interleukin różnych typów. Interleukiny są odpowiedzialne za stany zapalne i czyraki. Stwierdzono, że kwas muraminowy powoduje wzrost ilości interleukin produkowanych przez ludzkie keratynocyty [24].

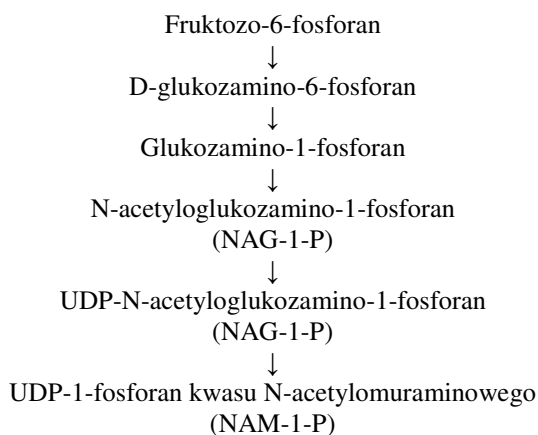
4. Rola kwasu muraminowego w przemianach biochemicznych

W szlaku biosyntezy mureiny wyodrębniono trzy etapy w zależności od miejsca w komórce, w którym proces przebiega (rys. 4)



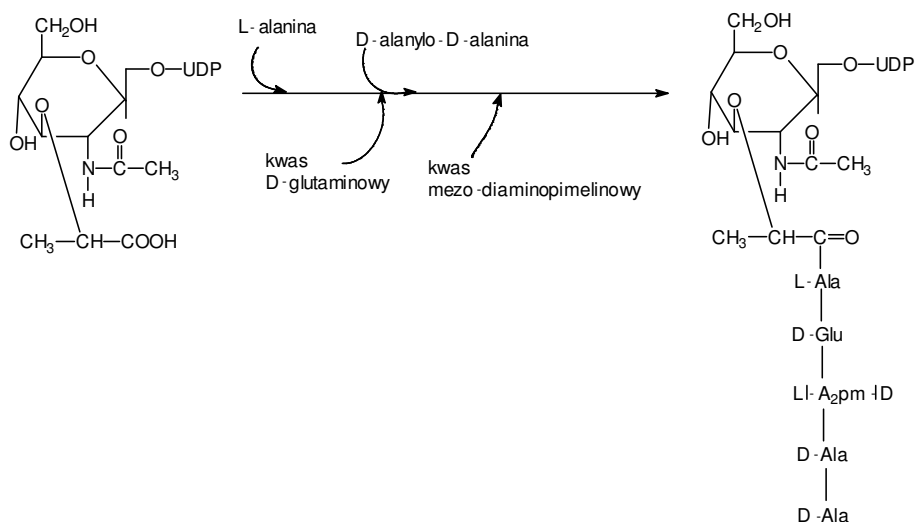
Rys. 4. Etapy syntezy mureiny

W pierwszym etapie, odbywającym się w cytoplazmie, następuje wytworzenie prekursora – UDP-N-acetylmuramiloilopentapeptydu. Synteza prekursora rozpoczyna się od utworzenia UDP-N-acetyloglukozaminy z UTP i N-acetyloglukozamino-1-fosforanu, ale substratem do syntezy mureiny jest fruktozo-6-monofosforan. Kwas UDP-N-acetylmuraminowy powstaje przez dołączenie cząsteczki fosfoenolpirogronianu do UDP-N-acetyloglukozaminy z następującą redukcją reszty pirogronianowej (rys. 5).



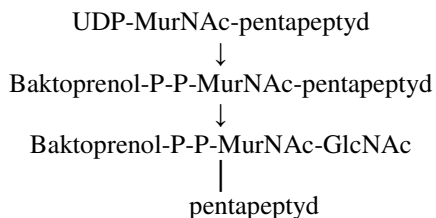
Rys. 5. Synteza N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (NAM); UTP-urydynotrifosforan, UDP- urydynodifosforan

Wytworzenie kwasu N-acetylmuraminowego hamowane jest przez fosfonomycynę, antybiotyk będący strukturalnym analogiem fosfoenolopirogronianu. Antybiotyk ten selektywnie wiąże się z bakteryjną transferazą enolopirogronianową. Z kolei do kwasu UDP-N-acetylmuraminowego u *Escherichia coli* dołączane są kolejno: L-alanina, kwas D-glutaminowy i kwas mezo-diaminopimelinowy. Każda z tych reakcji przeprowadzana jest przez swoistą ligazę, a energia bierze się z hydrolizy ATP. Pozostałe dwie cząsteczki alaniny dołączane są razem w postaci dipeptydu zsintetyzowanego z L-alaniny przy współudziale racemazy alaninowej oraz ligazy D-alanylo-D-alaninowej (rys. 6).



Rys. 6. Etapy w biosyntezie UDP-N-acetylmuramoilopentapeptydu

W drugim etapie, zachodzącym na wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej, następuje translokacja UDP-N-acetylmuramoilopentapeptydu do lipidowego przenośnika-fosforanu undekaprenyłu (baktoprenolu) z równoczesnym uwolnieniem UMP. W tym samym czasie, przy współudziale swoistej transferazy, odbywa się przeniesienie N-acetyloglukozaminy z UDP-N-acetyloglukozaminy do związanego z lipidowym przenośnikiem prekursora, z wytworzeniem β -1,4-disacharydopentapeptydu (rys. 7).



Rys. 7. Tworzenie łańcucha mukopeptydu

W trzecim etapie syntezy odbywa się translokacja ostatecznego prekursora przez błonę cytoplazmatyczną i wbudowanie go do już istniejącej mureiny. W tej fazie zachodzą też reakcje wydłużania łańcuchów cukrowych przez dołączanie kolejnych prekursorów (reakcje transglikozylacji) oraz reakcje wytwarzania poprzecznych wiązań (transpeptydacja) [7, 8, 9].

5. Jakościowe i ilościowe oznaczanie kwasu muraminowego

5.1. Metody kolorymetryczne

Kwas muraminowy zwykle oznacza się jako aminocukier lub poprzez grupę aminową w reakcji z ninhydriną. Metody te są też stosowane do oznaczania kwasu N-acetylmuraminowego po jego deacetylacji, ale ponieważ nie są one specyficzne, konieczne jest uprzednie oddzielenie od innych składników dających podobne reakcje.

Specyficzne oznaczenia kwasów muraminowego i N-acetylmuraminowego opierają się na reakcji reszty kwasu mlekowego obecnej w cząsteczce. Te oznaczenia mogą być przeprowadzone po uwolnieniu kwasu mlekowego na drodze hydrolizy kwasowej [25, 26] lub zasadowej [27, 28], a także przez zastosowanie rozkładu enzymatycznego po dodaniu dehydrogenazy D-mleczanowej [29]. Wcześniej metoda oznaczania kwasu muraminowego bazowała na degradacji cząsteczki pod wpływem kwasów do utworzenia acetyloacetonu, który następnie był oznaczany fotometrycznie w reakcji z p-hydroksydifenylem [30, 31, 32]. Metoda ta stosowana była do oznaczania wolnego kwasu muraminowego w mieszaninach zawierających komponenty peptydoglikanowe ścianek komórkowych bakterii [33]. Została ona zmodyfikowana poprzez wprowadzenie procesu hydrolizy, podwyższenie temperatury reakcji, zmiany udziału ilościowego H_2SO_4 i fotometrycznego oznaczania kwasu N-acetylmuraminowego w jednym etapie postępowania analitycznego. Ulepszona metoda jest prostsza i szybsza, przy takiej samej czułości i dokładności. Konwersja kwasu mlekowego do acetaldehydu pozwala na oznaczenie kwasu muraminowego i N-acetylmuraminowego jako wolnej cząsteczki lub jako disacharydu (GM) z zadowalającą dokładnością i czułością [34].

Znana jest również metoda utleniania kwasu muraminowego nadjodanem z pomiarem ilości utworzonego kwasu mrówkowego i formaldehydu [35, 36].

5.2. Metody chromatograficzne

W chromatografii bibułowej powszechnie używano bibuły Whatman nr 1 i 4 oraz różnych mieszanin rozwijających [4, 13]. Wartości R_F w różnych układach rozwijających podano w tabeli 1.

Tabela 1

Ruchliwość R_F kwasu muraminowego i glukozaminy w różnych mieszaninach rozwijających w chromatografii bibułowej

	Butanol- kw.octowy -woda (4:1:5)	Pirydyna -woda (4:1)	Fenol- woda (3:1)	Alk.tert- amyłowy-woda- kw. mrówkowy (4:2:1)	Butanol- etanol-woda (4:1:1) [cm]
Glukozamina	0,11	0,78	0,36	0,22	19,5
Kwas muraminowy	0,36	0,80	0,49	0,78	15,3

Oznaczanie kwasu muraminowego z użyciem elektroforezy bibułowej prowadzonej w $\text{pH} = 8,6$ proponowali Strange i Kent [13]. Strominger i Park badali ruchliwość kwasu muraminowego wyizolowanego ze sporów i z nukleotydu urydynowego przy trzech wartościach $\text{pH} = 2,2$; $2,8$ i $4,5$, nie stwierdzając istotnego wpływu pH na wartości R_F [6].

Opisano oznaczanie kwasu muraminowego, kwasu uronowego galaktozaminy i glukozaminy za pomocą chromatografii jonowymiennej na kolumnie Dowex 50 przy $\text{pH} = 4,7$ z użyciem buforów cytrynianowych i octanowych [37]. Kolumny z Dowex 50 użyto również do oznaczania kwasu muraminowego, fosforanu kwasu muraminowego i fosforanu galaktozaminy w $\text{pH} 3,25$ - $4,25$, stosując bufor cytrynianowy [38]. Do oznaczania kwasu muraminowego i innych cukrów Zeleznick użył kolumny chromatograficznej Sephadex G-25 i mieszaniny butanol-kwas octowy-woda w stosunku objętościowym 62:15:25 [39].

Znane są metody oznaczania mikroilości kwasu muraminowego i innych aminocukrów metodami: chromatografii cienkowarstwowej z elucją mieszaniną butanol-pirydyna-kwas octowy-woda w stosunku objętościowym 60:45:4:40 [40], kapilarnej chromatografii gazowej w postaci lotnych pochodnych octanów alditolu [41] i wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconą fazą [42].

Opisano metody ilościowego oznaczania kwasu muraminowego jako markera bakteryjnego peptydoglikanu występującego w zanieczyszczeniach organicznych, w postaci pochodnej trimetylosillilowej, z użyciem chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią masową (GC-MS) [43, 44]. Ta sama metoda była używana do oznaczania kwasu muraminowego pochodzącego z komórek i sporów bakteryjnych oraz leukocytów ludzkich [45, 46]. Stosowano też do oznaczania wysoko rozdzielczą anionowymienną chromatografię cieczową HPAE w połączeniu z MS [47]. Zawartość kwasu muraminowego występującego w kurzu w powietrzu badano po utworzeniu lotnych pochodnych z octanem alditolu i przeprowadzeniu w laktam pentaoctanu muramicitolu techniką GC-MS, stosując niepolarną kolumnę GC (DB-5MS), używając do detekcji MS z systemem wychwytu jonów [48]. Black i współpracownicy używali tandemowej spektrometrii masowej z jonizacją typu „electrospray” (ESI MS-MS) do oznaczania niezwiązanego kwasu muraminowego w hydrolizatach bakteryjnych [49]. Znane są również metody ilościowego

oznaczania kwasu muraminowego: GC-MS-MS [50], z użyciem techniki GC-MS-MS połączonej z wytworzeniem jonów ujemnych (NICI) po utworzeniu oksymu pentafluorobenzylowego (PFBO) octanu kwasu muraminowego [51] oraz z zastosowaniem wysoko sprawnej chromatografii anionowymiennej w połączeniu z amperometrią pulsową [52].

5.3. Inne metody

Technika spektrometrii masowej (MS) połączona z dwuwymiarową spektroskopią jądrowego rezonansu magnetycznego (^1H i ^{13}C NMR) pozwala na jednoznaczną interpretację budowy różnych glikanów bakteryjnych i fragmentów wchodzących w ich skład: m.in. kwasu muraminowego i N-acetyloglukozaminy [53]. Zawartość aminokwasów i aminocukrów, w tym kwasu muraminowego, badano metodami radiochemicznymi, stosując związki znaczone węglem ^{14}C po rozkładzie peptydoglikanu przez lizozym i traktowaniu antybiotykami typu penicyliny. Radioaktywność mierzono na spektrofotometrze, stosując roztwór scyntylacyjny Insta-Gel [54].

Literatura

- [1] **Park J.T.:** Uridine-5'-pyrophosphate derivatives. II. A structure common to three derivatives. *J. Biol. Chem.*, **194**, 885-895, (1952).
- [2] **Strange R.E., Powell J.F.:** Hexosamine-containing peptides in spores of *Bacillus subtilis*, *B. megatherium* and *B. cereus*. *Biochem. J.*, **58**, 80-85, (1954).
- [3] **Cummins C.S., Harris H.:** Carbohydrate and amino acid constituents of the cell walls of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochem. J.*, **57**, XXXII, (1954).
- [4] **Cummins C.S., Harris H.:** The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Mikrobiol.*, **14**, 583-600, (1956).
- [5] **Weidel von W., Primosigh J.:** The common method of lysis of *Escherichia coli* by penicillin and phage. *Z. Naturf.*, **12B**, 421-427, (1957).
- [6] **Park J.T., Strominger J.L.:** Mode of action of penicillin. *Science*, **125**, 99-101, (1957).
- [7] **Kunicki-Goldfinger W.J.H.:** *Życie bakterii*, PWN, Warszawa (2005).
- [8] **Schlegel H.G.:** *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa (2000).
- [9] **Markiewicz Z.:** *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, PWN, Warszawa (1993).
- [10] **Strange R.E., Dark F.A.:** Unidentified amino sugar present in cell walls and spores of various bacteria. *Nature*, **177**, 186-188, (1956).
- [11] **Strange R.E.:** The structure of an amino sugar present in certain spores and bacterial cell walls. *Biochem. J.*, **64**, 23P, (1956).
- [12] **Kent L.H.:** The structure of muramic acid, *Biochem. J.*, **67**, 5P, (1957).
- [13] **Strange R.E., Kent L.H.:** Isolation, characterization, and chemical synthesis of muramic acid. *Biochem. J.*, **71**, 333-339, (1959).
- [14] **Lambert F., Zilliken F.:** 2-Amino-3-O-(1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose and 2-amino-2-deoxy-3-O-ethyl-D-glucose. *Ber.*, **93**, 2915-2923, (1960).

- [15] **Matsushima Y., Park J.T.:** Stereospecific synthesis of 2-amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid) and related compounds. *J. Org. Chem.*, **27**, 3581-3583, (1965).
- [16] **Gigg R., Carroll P.M.:** A convenient synthesis of muramic acid and other 3-ethers of 2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Nature*, **191**, 495-496, (1961).
- [17] **Lindberg B., Agback H.,** 3-O-Substituted 2-amino-2-deoxy-D-glucose; oxazoline and N-benzoyl derivatives. *Acta Chem. Scand.*, **18**, 185-190, (1964).
- [18] **Flowers H.M., Jeanloz R.W.:** Amino sugars. XXXVII. The synthesis of 2-acetamido-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (N-acetylmuramic acid) and of benzyl glycoside derivatives of 2-amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid). *J. Org. Chem.*, **28**, 2983-2986, (1963).
- [19] **Osawa T., Jeanloz R.W.:** Amino sugars. XLII. An improved, stereoselective synthesis of 2-amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid). *J. Org. Chem.*, **30**, 448-450, (1965).
- [20] **Cornforth J.W., Firth M.E.:** Identification of two chromogens in the Elson-Morgan determination of hexosamines. A new synthesis of 3-methylpyrrole. Structure of the "pyrrolenepthalides". *J. Chem. Soc.*, 1091-1099, (1958).
- [21] **Militzer W.E.:** The Kiliani reaction as a direct measure of reducing groups. *Arch. Biochem.*, **9**, 91-94, (1946).
- [22] **Ayoub A., Chatelain C., Rouge P.:** Legume lectins interact with muramic acid and N-acetylmuramic acid. *FEBS-Lett.*, **289**, 102-104, (1991).
- [23] **Pinegin B.V., Kulakov A.V., Yarilin D.A., Klimova S.V., Khaitov R.M.:** Competitive analysis of specificity of natural antibodies against the epitope of bacterial cell wall peptidoglycan: glucosaminylmuramyl dipeptide carrying adjuvant activity. *Immunol. Infect. Dis.*, **6**, 133-137, (1996).
- [24] **Galdiero M., Cipollaro de l'Ero G., Donnarumma G., Marcatili A., Moliterno M., Petrillo G.:** Production of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 by human keratinocytes stimulated in vitro with gram-negative and gram-positive components. *Immunol. Infect. Dis.*, **6**, 71-80, (1996).
- [25] **Hadzija O.:** Simple method for the quantitative determination of muramic acid. *Anal. Biochem.*, **60**, 512-517, (1974).
- [26] **Asabe Y., Kojima S., Suzuki M., Takitani S.:** Fluorometric determination of acetaldehyde and its related compounds with o-phenylphenol. *Anal. Biochem.*, **79**, 73-82, (1977).
- [27] **Ghuysen J.M., Bricas E., Leyh-Bouille M., Lache M., Shockman G.D.:** Peptide Na⁺-(L-alanyl-D-isoglutaminyl)-Nε-(D-isoasparaginy)-L-lysyl-D-alanine and the disaccharide N-acetylglucosaminy-1,4-N-acetylmuramic acid in cell wall peptidoglycan of *Streptococcus faecalis* strain ATCC 9790. *Biochemistry*, **6**, 2607-2619, (1967).
- [28] **Perkins H.R.:** The use of photolysis of dinitrophenyl-peptides in structural studies on the cell-wall mucopeptide of *Corynebacterium poinsettiae*. *Biochem. J.*, **102**, 29c-32c, (1967).
- [29] **Tipper D.J.:** Alkali-catalyzed elimination of D-lactic acid from muramic acid and its derivatives and the determination of muramic acid. *Biochemistry*, **7**, 1441-1449, (1968).
- [30] **Roseman S., Dafner I.:** Colorimetric method for determination of glucosamine and galactosamine. *Anal. Chem.*, **28**, 1743-1746, (1956).

- [31] **Cessi C., Piliago F.:** Determination of amino sugars in the presence of amino acids and glucose. *Biochem. J.*, **77**, 508-510, (1960).
- [32] **Steward-Tull D.E.S.:** Determination of amino sugars in mixtures containing glucosamine, galactosamine, and muramic acid. *Biochem. J.*, **109**, 13-18, (1968).
- [33] **Valinger Z., Ladesić B., Tomasić J.:** Partial purification and characterization of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from human and mouse serum. *Biochim. Biophys. Acta*, **701**, 63-71, (1982).
- [34] **Sesartic L., Hadzija O.:** Spectrophotometric determination of N-acetylmuramic acid in complex molecules. *Anal. Chim. Acta*, **242**, 221-224, (1991).
- [35] **Jeanloz R.W., Forchelli E.:** Hyaluronic acid and related substances. II. Periodate oxidation of glucosamine and derivatives. *J. Biol. Chem.*, **188**, 361-369, (1951).
- [36] **O'Dea I.F., Gibbons R.A.:** Estimation of small amounts of formaldehyde liberated during the oxidation of carbohydrates and other substances with periodate. *Biochem. J.*, **55**, 580-586, (1953).
- [37] Brownlee S.T., Ph.D. Dissertation, Duke Univ. (1963).
- [38] **Spackman D.H., Stein W.H., Moore S.:** Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190-1205, (1958).
- [39] **Zeleznick L.D.:** Sephadex G-25 in partition column chromatography. *J. Chromatogr.*, **14**, 139-141, (1964).
- [40] **Esser K.:** Determination of microamounts of amino acids and amino sugars by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **18**, 414-416, (1965).
- [41] **Fox A., Morgan S.L., Hudson J.R., Zhu Z.T., Lau P.Y.:** Capillary gas chromatographic analysis of alditol acetates of neutral and amino sugars in bacterial cell walls. *J. Chromatogr.*, **256**, 429-438, (1983).
- [42] **Tomasic J., Sesartic L., Martin S.A., Valinger Z., Ladesic B.:** Comparative susceptibility of a peptidoglycan monomer from *Brevibacterium divaricatum* and its anhydromuramyl analog to hydrolysis with N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. Isolation and characterization of anhydromuramyl-peptidoglycan monomer. *J. Chromatogr.*, **440**, 405-414, (198).
- [43] **Mielniczuk Z., Mielniczuk E., Larsson L.:** Determination of muramic acid in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, **670**, 167-172, (1995).
- [44] **Fox A., Rosario R.M.T., Larsson L.:** Monitoring of bacterial sugars and hydroxy fatty acids in dust from air conditioners by gas chromatography-mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4354-4360, (1993).
- [45] **Fox A., Wright L., Fox K.:** Gas chromatography-tandem mass spectrometry for trace detection of muramic acid, a peptidoglycan chemical marker, in organic dust. *J. Microbiol. Methods*, **22**, 11-26, (1995).
- [46] **Lehtonen L., Eerola E., Toivanen P.:** Muramic acid in human peripheral blood leukocytes in different age groups. *Eur. J. Clin. Invest.*, **27**, 791-792, (1997).
- [47] **Fox K., Wunschel D.S., Fox A., Steward G.:** Complementarity of GC-MS and LC-MS analyses for determination of carbohydrate profiles of vegetative cells and spores of bacilli. *J. Microbiol. Methods*, **33**, 1-11, (1998).
- [48] **Fox A., Krahrmer M., Harrelson D.:** Monitoring muramic acid in air (after alditol acetate derivatization) using a gas chromatograph-ion trap tandem mass spectrometer. *J. Microbiol. Methods*, **27**, 129-138, (1996).

- [49] **Black G.E., Fox A., Fox K., Snyder A.P., Smith P.B.W.:** Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Native Muramic Acid in Whole Bacterial Cell Hydrolyzates. *Anal. Chem.*, **66**, 4171-4176, (1994).
- [50] **Bal K., Larsson L.:** New and simple procedure for the determination of muramic acid in chemically complex environments by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **738**, 57-65, (2000).
- [51] **Kozar M.P., Fox A.:** Analysis of a stable halogenated derivative of muramic acid by gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 946, 229-238, (2002).
- [52] **Bal K., Larsson L., Mielniczuk E., Mielniczuk Z.:** Structure of muramic acid TMS derivative mass spectrum's base ion ($m/z = 185$) used for quantification of bacterial peptidoglycan. *J. Microbiol. Methods*, **48**, 267-270, (2002).
- [53] **Lee J., Hollingsworth R.I.:** Oligosaccharide beta-glucans with unusual linkages from *Sarcina ventriculi*. *Carbohydrate Research*, **304**, 133-141, (1997).
- [54] **Keglevic D., Ladesic B., Tomasic J., Valinger Z., Naumski R.:** Isolation procedure and properties of monomer unit from lysozyme digest of peptidoglycan complex excreted into the medium by penicillin-treated *Brevibacterium divaricatum* mutant. *Biochim. Biophys. Acta*, **585**, 273-281, (1979).

THE MURAMIC ACID IS KNOWN AND UNKNOWN

Summary

The review describes present knowledge about the very specific molecule namely muramic acid which is an important constituent of bacteria cell walls. Details about physical and chemical characterization are presented with its physiological and biological roles, synthesis, bioconversion. Methods of analytical determination are also described.

Institute of General Food Chemistry
Technical University of Lodz