



УДК 547.458.7.04+576.851.151.095.383

**ЖИРНЫЕ ДИ- И ТРИКЕТОКИСЛОТЫ ИЗ КЛЕТОК
АЗОФИКСИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ
*AZOTOBACTER CHROOCOCCUM***

Батраков С. Г., Придачиа Н. И., Кругляк Е. Б.,
Новогрудская Е. Д., Чекаева Е. В.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт микробиологических средств
защиты растений и бактериальных препаратов, Москва*

Из суммарных клеточных липидов азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcum* 92 с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе и адсорбционной хроматографии на силикагеле выделены две кислотные фракции. На основании данных УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии нативных кислот и их метилпроизводных одна из фракций охарактеризована как смесь 3,5-дикетогексакозановой и 3,5-дикетоктоакозановой кислот, а другая — как смесь 3,5,7-трикетоктоакозановой и 3,5,7-трикетотриаконтановой кислот. Предполагается, что два последних соединения являются биогенетическими предшественниками описанного ранее 1,3-диокси-5-алкилбензола — одного из основных компонентов липидного экстракта бактериальных клеток.

При анализе липидного экстракта клеток азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcum* 92 методом ТСХ мы обнаружили в его составе ряд веществ, которые давали на хроматограммах положительные реакции со специфическими реагентами на енольные (или фенольные) гидроксильные группы. В предыдущем сообщении [1] мы описали выделение и структурную идентификацию одного из этих веществ — 1,3-диокси-5-алкил (C_{16} — C_{22})бензола (I). Алкилрезорцин (I) является одним из доминирующих компонентов суммарных клеточных липидов микроорганизма: на его долю приходится до 20% общей массы последних. Было высказано предположение, что липид (I) в бактериальной клетке выполняет функцию антиоксиданта, предохраняющего клеточную нитрогеназу от действия кислорода воздуха. В настоящем сообщении описывается выделение и установление строения двух компонентов (II и III) клеточных липидов микроорганизма, содержащих енольные группировки.

Для выделения компонентов (II) и (III) липидный экстракт подвергали ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Нейтральные липиды вымывали смесями хлороформа и метанола, после чего системой хлороформ — уксусная кислота элюировали смесь липидов (II) и (III), содержащую следы свободных незамещенных жирных кислот. Такое поведение фракций (II) и (III) на DEAE-целлюлозе говорит о том, что они состоят из карбоновых кислот (ср. [2]). Выделение их в хроматографиче-

* Настоящий адрес — Центральный ордена Ленина институт усовершенствования врачей, Москва.

Цветные реакции на хроматограммах резорцинолипида (I),
кислотных фракций (II) и (III) и их метилпроизводных (IIa)
и (IIIa)

Вещества	Окраска, появляющаяся при действии реагентов			
	бис-Диазоти- рованный бензидин	Реактив Пау- ли	$FeCl_3-K_3Fe(CN)_6$	2,4-Динитро- фенилгидра- зин
(I)	Красная	Оранжевая	Голубая	Нет
(II)	Оранжевая	Желтая	»	»
(IIa)	Нет	Нет	Нет	»
(III)	Красная	Оранжевая	Голубая	Желтая
(IIIa)	Желтая	Желтая	Голубая (слабая)	»

ски гомогенном состоянии осуществлялось при помощи хроматографии на колонках с силикагелем. Однако выход индивидуальных фракций оказался невысоким — около половины общего количества соединений (II) и (III) элюировалось в виде смеси. Количественное разделение кислотных фракций (II) и (III) было достигнуто после их превращения в метилпроизводные (IIa) и (IIIa) действием диазометана и хроматографии этих производных на колонке с силикагелем.

На хроматограммах фракция (II) давала положительные реакции на енольную группировку с реактивом Паули, бис-дiazотированным бензидином и с хлорным железом — красной кровяной солью [3] (табл. 1), но не окрашивалась 2,4-динитрофенилгидразиновым реагентом. Реакция метилпроизводных (IIa) со всеми перечисленными реагентами была отрицательной. Фракция (III), равно как и метилпроизводные (IIIa), давала характерную окраску как с реактивами на енольный гидроксил, так и с 2,4-динитрофенилгидразином. Из этого можно заключить, что кислоты (II), адсорбированные на силикагеле, не содержат неенолизованных кетогрупп, но имеют енольные HO-группы, которые полностью замещаются при обработке диазометаном. Напротив, в молекулах кислот (III) и их метилпроизводных (IIIa) присутствуют группировки обоих типов. Метилпроизводные (IIa) не изменялись при действии уксусного ангидрида в пиридине (60° С, 24 ч), что говорит об отсутствии в их молекулах свободных гидроксильных групп.

При периодат-перманганатном окислении [4] обе кислотные фракции (II и III) дали одни и те же липофильные продукты — насыщенные нормальные жирные кислоты $C_{22:0}$ и $C_{24:0}$ в соотношении ~10:1. На основании этого мы предположили, что липофильная часть молекул кислот (II и III) представлена алкильными остатками $n-C_{21}H_{43}$ и $n-C_{23}H_{47}$. Информацию о строении полярной части молекул мы получили из данных масс-спектров высокого разрешения и спектров ПМР метилпроизводных (IIa и IIIa). Кроме того, был измерен масс-спектр тридейтерометилпроизводных (d_3 -IIa), полученных действием дидейтеродиазометана в CD_3OD на смесь кислот (II). В масс-спектре эфиров (IIa) (табл. 2) имеются пики двух гомологичных молекулярных ионов — M_1^+ и M_2^+ с m/z 420 и 448, отвечающих компонентам фракции (IIa), содержащим вышеуказанные алкильные остатки. Этим молекулярным ионам соответствуют брутто-формулы $C_{22}H_{48}O_3$ и $C_{23}H_{52}O_3$. Следовательно, полярная часть молекул метилпроизводных (IIa) должна иметь состав $C_6H_8O_3$. В масс-спектре фракции присутствует интенсивный пик иона (A) с m/z 125, которому отвечает такая же брутто-формула и который, вероятно, образуется в результате элиминирования молекулярными ионами (M_1^+ и M_2^+) вышеуказанных алкильных остатков. В таком случае к наблюдаемому в спектре иону (B) с m/z 140 должен приводить разрыв связи алкильного остатка, находящейся в β -положении по отношению к полярной группировке, с миграцией атома водорода к заряженному фрагменту (перегруппировка Маклаффер-

Основные пики в масс-спектре метилпроизводных (IIa) кислотной фракции (II)

m/z	$I_{\text{отн.}}, \%$	Тип иона	Брутто-формула	m/z	$I_{\text{отн.}}, \%$	Тип иона	Брутто-формула
448	14,2	M_2^+	$C_{29}H_{52}O_3$	279	12,2	$B \ n=11$	$C_{17}H_{27}O_3$
420	76,0	M_1^+	$C_{27}H_{48}O_3$	265	12,8	$B \ n=10$	$C_{16}H_{25}O_3$
405	3,6	$B \ n=20$	$C_{26}H_{45}O_3$	251	12,5	$B \ n=9$	$C_{15}H_{23}O_3$
391	8,7	$B \ n=19$	$C_{25}H_{43}O_3$	237	9,4	$B \ n=8$	$C_{14}H_{21}O_3$
389	7,5	$M_2^+ - C_2H_3O_2$	$C_{27}H_{46}O$	223	5,8	$B \ n=7$	$C_{13}H_{19}O_3$
388	1,0	$M_2^+ - C_2H_4O_2$	$C_{27}H_{46}O$	210	3,9	$B \ (n=6) + H$	$C_{12}H_{18}O_3$
377	9,2	$B \ n=18$	$C_{24}H_{41}O_3$	209	13,6	$B \ n=6$	$C_{12}H_{17}O_3$
363	9,7	$B \ n=17$	$C_{23}H_{39}O_3$	196	30,8	$B \ (n=5) + H$	$C_{11}H_{16}O_3$
361	23,3	$M_1^+ - C_2H_3O_2$	$C_{25}H_{45}O$	195	11,0	$B \ n=5$	$C_{11}H_{15}O_3$
360	8,1	$M_1^+ - C_2H_4O_2$	$C_{25}H_{44}O$	182	13,7	$B \ (n=4) + H$	$C_{10}H_{14}O_3$
349	9,7	$B \ n=16$	$C_{22}H_{37}O_3$	167	7,0	$B \ n=3$	$C_9H_{11}O_3$
335	11,0	$B \ n=15$	$C_{21}H_{35}O_3$	153	100,0	$B \ n=2$	$C_8H_9O_3$
321	11,9	$B \ n=14$	$C_{20}H_{33}O_3$	140	81,5	B	$C_7H_8O_3$
307	12,5	$B \ n=13$	$C_{19}H_{31}O_3$	125	58,5	A	$C_6H_8O_3$
293	12,4	$B \ n=12$	$C_{18}H_{29}O_3$				

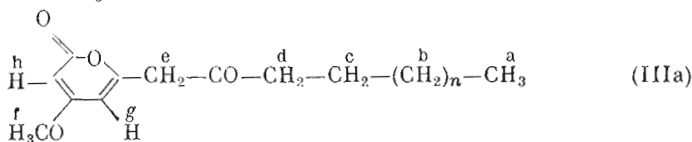
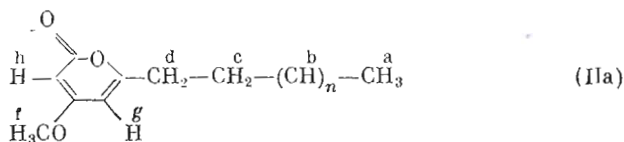
ти). При расщеплении γ -, δ -, ϵ - и последующих связей алифатических цепей молекулярных ионов возникают фрагменты типа B : $[C_6H_5O_3(CH_2)_n]^+$ ($n=2-22$). Пики всех рассмотренных ионов в масс-спектре дегидропроизводных (d_3 -IIa) смещены в область больших массовых чисел на 3 единицы. Это свидетельствует о том, что молекулы метилпроизводных (IIa) содержат только одну метоксильную группу. Таким образом, структура полярной части молекул (IIa) может быть представлена как $CH_3OC_5H_9O_2$.

Описанные выше результаты структурного анализа метилпроизводных (IIa) позволяют однозначно интерпретировать их спектр ПМР (табл. 3). В области сильного поля спектра присутствует трехпротонный триплет (δ 0,88 м.д., J 7,5 Гц) от протонов терминальных метильных групп алкильных остатков. Протонам метиленовых групп тех же остатков, расположенных при полярной группировке, соответствует триплет (2H, J 7,5 Гц) при δ 2,44 м.д., а протонам метиленовых групп, находящихся в β -положении — мультиплет (2H) при δ 1,58 м.д.; протонам остальных метиленовых групп алифатических цепей отвечает узкий мультиплет при δ 1,25 м.д. Трехпротонный синглет при δ 3,80 м.д., очевидно, принадлежит протонам метоксильной группы, которая, судя по химическому сдвигу, должна быть расположена при двойной связи. В области сильного поля спектра находятся два однопротонных дублета (при δ 5,40 и 5,76 м.д.), отвечающие двум винильным протонам. Оба сигнала расщеплены на две линии с $J=2$ Гц. Это показывает, что протоны расположены не при соседних углеродных атомах, а разделены тремя атомами углерода.

На основании совокупности изложенных результатов структурного анализа мы предложили для метилпроизводных одной из кислотных фракций липидов *A. chroococcum* 92 структуру (IIa) (схема 1), а соответствующие им кислоты (II) охарактеризованы как 3,5-дикетогексакозановая и 3,5-дикетookтакозановая. Предложенные структуры метилпроизводных (IIa) подтверждены ИК- и УФ-спектрами, а строение кислот (II), кроме того, и масс-спектром.

В ИК-спектре эфиров (IIa) присутствуют полосы валентных колебаний винильных связей C—H (3082 cm^{-1}), сложноэфирного карбонила (1730 cm^{-1}), связей C=C диенольной системы (1651 и 1572 cm^{-1}), связей C—O (1255, 1146, 1037 cm^{-1}). В ИК-спектре нативных кислот (II) полоса при 1730 cm^{-1} не наблюдается, но имеются полосы с максимумами при 1687 и 1620 cm^{-1} , которые мы приписали валентным колебаниям карбоксильной и кетонной групп, сопряженных с двойной связью енола. Как и

Спектры ПМР метилпроизводных (IIa) и (IIIa) кислотных фракций (II) и (III)

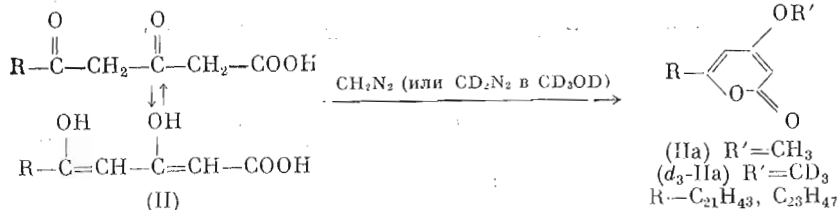


Протоны	Число протонов		Химический сдвиг, м.д.		Структура сигналов
	(IIa)	(IIIa)	(IIa)	(IIIa)	
a	3	3	0,88	0,88	Триплеты, J 7,5 Гц
b			1,25	1,25	Мультиплеты
c	2	2	1,58	1,58	»
d	2	2	2,44	2,52	Триплеты, J 7,5 Гц
e	—	2	—	3,51	Синглет
f	3	3	3,80	3,80	»
g	1	1	5,40	5,45	Дублеты, J 2 Гц
h	1	1	5,76	5,90	» J 2 »

в спектре метилпроизводных (IIa), в спектре кислотной фракции (II) весьма интенсивны полосы валентных колебаний связей С=С диенольной системы (1652, 1571, 1549 см^{-1}); спектр содержит также широкую полосу в области 2700–2500 см^{-1} , отвечающую валентным колебаниям связи О—Н карбоксильной группы. В УФ-спектре метиловых эфиров (IIa) в области 220–320 нм присутствует единственный максимум поглощения — при λ 283 нм (ϵ 6500). Наблюдаемое положение максимума удовлетворительно совпадает с рассчитанным (λ 284 нм) по правилу Вудворда [5] для $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода подобного диенового хромофора.

Масс-спектр нативных дикетокислот (II) (табл. 4) не содержит пиков молекулярных ионов, а наибольшие массовые числа в спектре имеют ионы типа $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ с m/z 406 и 434 (второй пик незначительной интенсивности). Можно полагать, что в ионном источнике масс-спектрометра дикетокислоты (II) подвергаются дегидратации, превращаясь в еноллактоны (схема 2). О протекании указанной реакции говорит тот факт, что последующий распад ионов $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ полностью совпадает с фрагментацией молекулярных ионов метилпроизводных (IIa) (см. схему 2). Возникающие при этом фрагменты имеют массовые числа, меньшие на 14 единиц по сравнению с фрагментами того же типа, образующимися из молекулярных ионов метиловых эфиров (IIa). В масс-спектре кислот (II) среди наиболее интенсивных — пики ионов А, m/z 111, и В, m/z 126; присутствует серия пиков гомологичных ионов типа В ($n=2-22$). В области высоких значений массовых чисел наблюдаются два относительно интенсивных пика — при m/z 346 и 347. Как показывают имеющиеся в спектре метастабильные ионы с m' 294,9 и 296,6, фрагменты, отвечающие вышеуказанным пикам, возникают из иона $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ с m/z 406. Ионы, аналогичные обсуждаемым, с m/z 360 и 361, наблюдались и в масс-спектре метилпроизводных (IIa). В этом случае к ним приводила потеря соответствующим молекулярным ионом (M^+ , m/z 420) фрагментов с брутто-формулами $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ и $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$, в то же время в структурах ионов с m/z 360 и 361 сохранялась метоксильная группа, о чем свидетельствовал сдвиг их пиков на 3 единицы массы в спектре дейтеропроизводного (d_3 -IIa). Вероятно, рассматриваемые ионы — с m/z 346 и 347 в случае дикетокислот

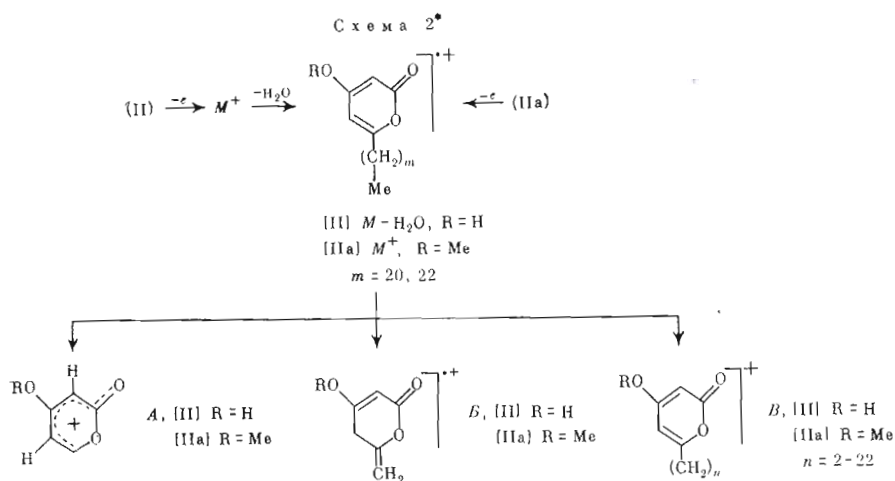
Схема 1



(II) и с m/z 360 и 361 в случае метилпроизводных (IIa) — образуются вследствие одних и тех же процессов, которые, скорее всего, являются перегруппировочными. Изложенные результаты спектрального анализа нативных дикетокислот полностью подтверждают предложенную для них структуру (II).

УФ-спектр метилпроизводных (IIIa) ($\lambda_{\text{макс}}$ 283 нм, ϵ 5500), полученных из второй кислотной фракции (III), не отличался от УФ-спектра эфиров (IIa), откуда следует, что компоненты фракции (IIIa) содержат такую же хромофорную группировку, что и метиловые эфиры (IIa), а именно метоксил- и алкилзамещенный диеноллактонный цикл. В ИК-спектре метилпроизводных (IIIa) наблюдаются полосы поглощения, аналогичные присутствующим в ИК-спектре эфиров (IIa): это полосы валентных колебаний винильных связей C—H (3086 см^{-1}), сложноэфирного карбонила (1727 см^{-1}), связей C=C енольной системы (1661 и 1570 см^{-1}), C—O-связей (1272 , 1260 , 1147 , 1035 см^{-1}). Однако значительно бóльшая, чем в спектре эфиров (IIa), интенсивность и ширина карбонильной полосы говорят о том, что эта полоса составная. Действительно, в ИК-спектре нативной кислотной фракции (III) наряду с полосами сопряженной карбоксильной группы (1660 см^{-1}) и связей C=C енольной системы (1629 и 1581 см^{-1}) содержится интенсивная полоса при 1712 см^{-1} , которая отсутствует в ИК-спектре кислот (II) и которую мы отнесли к валентным колебаниям несопряженной кетогруппы. Правильность такого отнесения подтверждается масс-спектром метиловых эфиров (IIIa).

Масс-спектр метилпроизводных (IIIa) (табл. 5) содержит пики двух гомологичных молекулярных ионов — M^+ и M^- с m/z 462 и 490 и брутто-формулами $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_4$ и $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_4$ соответственно. Учитывая, что липофильная часть молекул кислот (III) представлена алкильными остатками $n\text{-C}_{21}\text{H}_{43}$ и $n\text{-C}_{23}\text{H}_{47}$ (см. выше), можно определить состав полярной группировки метилпроизводных (IIIa) — ей отвечает брутто-формула $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4$ и, таким образом, эта группировка отличается от диеноллактонной группы метиловых эфиров (IIa) на фрагмент CH_2CO . В области низких значений массовых чисел спектра присутствуют интенсивные пики при m/z 125, 140, 167 и 182. Поскольку в молекулах компонентов фракции (IIIa) содержится такой же диеноллактонный цикл, как и в молекулах метилпроизводных (IIa), очевидно, что первые два пика принадлежат ионам А и Б. Пик при m/z 153, который в случае метиловых эфиров (IIa) отвечал иону типа В ($n=2$), в спектре эфиров (IIIa) не наблюдается. Это указывает на отсутствие метиленовой группы в β -положении по отношению к диеноллактонному кольцу. В то же время ион с m/z 167 имеет брутто-формулу $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4$, из чего следует, что кетогруппа в молекулах метилпроизводных (IIIa) находится в алифатической цепи и отделена от цикла одной метиленовой группой, а ион (Г) с m/z 167 образуется вследствие разрыва α -связи кетонной группировки (см. схему 3). В результате разрыва β -связи, сопровождающегося миграцией атома водорода к заряженному фрагменту (перегруппировка Маклафферти), возникает четвертый из перечисленных ионов — Д с m/z 182. Аналогично масс-спектру эфиров (IIa) спектр эфиров (IIIa) содержит серию гомологичных ионов Е ($n=2-22$), образующихся при последовательном расщеплении связей C—C алкильных цепей.



* В скобках указаны вещества, к которым относится данный ион.

Установленное на основании масс-спектра положение неенолизированной кетогруппы в молекулах метилпроизводных (IIIa) подтверждается спектром ПМР последних (табл. 3). Основное отличие этого спектра от спектра ПМР метилпроизводных (IIa) состоит в появлении в первом двухпротонного синглета при δ 3,51 м.д., который, очевидно, следует отнести к протонам метиленовой группы, расположенной между кетонным карбонилем и диеноллактонным циклом. Описанные данные спектрального исследования метилпроизводных второй кислотной фракции позволяют приписать им изображенное на схеме 4 строение (IIIa), а нативные кислоты (III) охарактеризовать как 3, 5, 7-трикетоктоказановую и 3, 5, 7-трикетотриаксантовую.

Предложенная структура трикетокислот (III) подтверждена масс-спектром этой фракции. В масс-спектре (табл. 6) пики молекулярных ионов отсутствуют, но имеются пики ионов типа $[M-H_2O]^+$ с m/z 448 и 476, вероятно, имеющих строение еноллактонов (см. схему 3, ср. схему 2). Об этом свидетельствует характер последующего распада этих ионов, полностью аналогичный характеру фрагментации молекулярных ионов метилпроизводных (IIIa) (схема 3). В области низких значений массовых чисел спектр кислотной фракции (III) содержит пики ионов типа A, B, Г и Д, отличающихся от соответствующих ионов в масс-спектре эфира (IIIa) на 14 единиц массы. В масс-спектре кислот (III) присутствует также серия пиков фрагментов типа E, интенсивность которых, как и в случае метилпроизводных (IIIa), довольно мала.

Еще одно подтверждение структуры метиловых эфиров (IIIa), а следовательно, и трикетокислот (III) мы получили в результате каталитического гидрирования первых над платиной и изучения строения доминирующего продукта реакции (IV). Судя по ИК-спектру, молекулы компонентов фракции (IV) не содержат двойных связей и НО-групп, но включают несопряженные сложноэфирный (лактонный) и кетонный карбонилы (1732 и 1710 cm^{-1} соответственно). По данным масс-спектра кетоллактонов (IV), образование этих продуктов гидрирования является следствием не только насыщения двойных связей, но и гидрогенолиза метоксильной группы метилпроизводных (IIIa). В масс-спектре соединения (IV) присутствуют пики гомологичных молекулярных ионов $-M^+$, и M^+ с m/z 436 и 464, а также пики ионов типа $[M-H_2O]^+$ с m/z 418 и 446. Основные направления фрагментации молекулярных ионов демонстрирует схема 5.

Основные пики в масс-спектре фракции 3,5-дикетокислот (II)

m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона
434	3,3	$M_2^+ - \text{H}_2\text{O}$	279	12,1	$B \ n=12$
416	1,1	$M_2^+ - 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	265	12,6	$B \ n=11$
406	43,6	$M_1^+ - \text{H}_2\text{O}$	251	12,6	$B \ n=10$
391	2,7	$B \ n=20$	237	13,2	$B \ n=9$
388	12,1	$M_1^+ - 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	223	10,0	$B \ n=8$
377	6,3	$B \ n=19$	209	8,4	$B \ n=7$
363	7,9	$B \ n=18$	195	11,0	$B \ n=6$
349	9,0	$B \ n=17$	182	23,6	$B \ (n=5) + \text{H}$
347	22,0	$M_1^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$	181	37,8	$B \ n=5$
346	22,6	$M_1^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	168	30,5	$B \ (n=4) + \text{H}$
335	9,0	$B \ n=16$	153	18,4	$B \ n=3$
321	11,6	$B \ n=15$	139	87,0	$B \ n=2$
307	11,6	$B \ n=14$	126	100,0	B
293	12,1	$B \ n=13$	111	57,0	A

В заключение следует остановиться на возможных путях биосинтеза и биохимической роли ди- и трикетокислот (II и III) в клетках *A. chroococcum*. Известно (см., например, обзор [6]), что синтез нормальных жирных кислот с четным числом углеродных атомов осуществляется в микроорганизмах, как и в животных тканях, путем постадийной конденсации ацетатных фрагментов. На каждой стадии начальным продуктом конденсации является 3-кетокислота, которая далее превращается в незамещенную жирную кислоту в результате восстановления кетонного карбонилла до оксигруппы, дегидратации образовавшейся оксикислоты и насыщения продукта дегидратации — α , β -ненасыщенной кислоты. Можно предположить, что в клетках *A. chroococcum* описанный трехстадийный процесс удаления кетогруппы имеет место лишь до построения углеводородной цепи жирных кислот какого-то определенного размера, дальнейшее же наращивание этой цепи не сопровождается восстановлением кетогруппы. Поэтому в клетках появляются жирные 3, 5-дикетокислоты типа (II) и 3, 5, 7-трикетокислоты типа (III). Мы не обнаружили в липидном экстракте 3-монокетокислот; вероятно, они обладают высокой метаболической активностью и быстро превращаются в дикетокислоты (II). Исходя из химической структуры жирных трикетокислот (III), можно полагать, что они служат биогенетическими предшественниками описанного нами ранее резорцинолипида (I). Возможный путь образования последнего представлен на схеме 6.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали культуру *A. chroococcum* 92 [7], полученную во ВНИИбакпрепарат путем селекции из исходного штамма (образец из коллекции Института микробиологии АН СССР). Культуру выращивали на жидкой синтетической безазотистой среде Федорова в колбах при встряхивании на круговой качалке (200 об./мин) при 30° С в течение 72 ч. Клетки отделяли центрифугированием при 3000g (20–25 мин), промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Применяли описанные в предыдущем сообщении [4] методы экстракции клеточных липидов, очистки последних от нелипидных примесей, ТСХ липидов, а также приборы и условия для УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии (за исключением того, что УФ-спектры соединений (IIa) и (IIIa) регистрировали в диоксане) и масс-спектрометрии. При ТСХ вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием 50% серной кислотой с последующим нагреванием пластинок при 200° С, 0,2% раствором морина в

Основные пики в масс-спектре метилпроизводных (IIa) кислотной фракции (II)

m/z	$I_{\text{отн.}}$ %	Тип иона	Брутто-формула	m/z	$I_{\text{отн.}}$ %	Тип иона	Брутто-формула
490	0,4	M_2^+	$C_{31}H_{51}O_4$	307	0,1	$E \ n=10$	$C_{18}H_{27}O_4$
472	0,6	$M_2^+ - H_2O$	$C_{31}H_{49}O_3$	293	0,1	$E \ n=9$	$C_{17}H_{25}O_4$
462	2,3	M_1^+	$C_{29}H_{50}O_4$	279	0,1	$E \ n=8$	$C_{16}H_{23}O_4$
447	0,1	$E \ n=20$	$C_{28}H_{47}O_4$	265	0,1	$E \ n=7$	$C_{15}H_{21}O_4$
444	3,4	$M_1^+ - H_2O$	$C_{29}H_{48}O_3$	251	0,1	$E \ n=6$	$C_{14}H_{19}O_4$
433	0,1	$E \ n=19$	$C_{27}H_{45}O_4$	237	0,1	$E \ n=5$	$C_{13}H_{17}O_4$
419	0,1	$E \ n=18$	$C_{26}H_{43}O_4$	223	0,1	$E \ n=4$	$C_{12}H_{15}O_4$
405	0,1	$E \ n=17$	$C_{25}H_{41}O_4$	209	0,4	$E \ n=3$	$C_{11}H_{13}O_4$
391	0,1	$E \ n=16$	$C_{24}H_{39}O_4$	195	7,3	$E \ n=2$	$C_{10}H_{11}O_4$
377	0,1	$F \ n=15$	$C_{23}H_{37}O_4$	182	20,3	D	$C_9H_{10}O_4$
363	0,1	$E \ n=14$	$C_{22}H_{35}O_4$	167	29,6	G	$C_8H_7O_4$
349	0,1	$E \ n=13$	$C_{21}H_{33}O_4$	140	100,0	B	$C_7H_5O_3$
335	0,1	$E \ n=12$	$C_{20}H_{31}O_4$	125	7,6	A	$C_6H_3O_3$
321	0,1	$E \ n=11$	$C_{19}H_{29}O_4$				

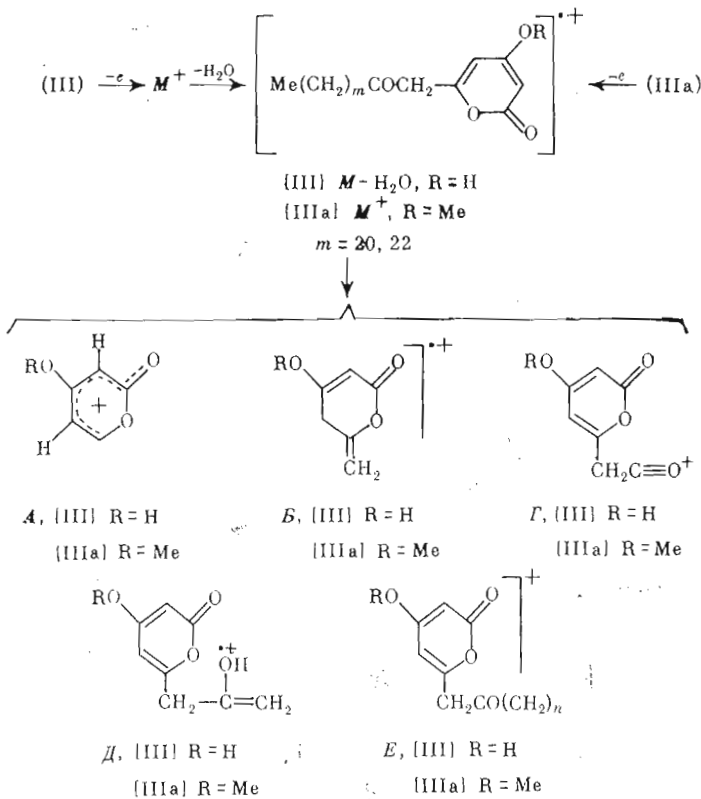
MeOH (пятна веществ наблюдали в УФ-свете), а также реагентами, указанными в табл. 1. Для хроматографии на колонках применяли силикагель марки КСК (100–150 меш), который предварительно обрабатывали ранее описанным способом [8].

Масс-спектры высокого разрешения получали на масс-спектрометре MS-902 (Англия) при разрешающей способности 10 000 с системой обработки данных DS-30; энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 3,5 кВ, температура испарения образцов около 90°С.

Выделение фракций 3,5-дикетокислот [II] и 3,5,7-трикетокислот [III]. Раствор 1,16 г клеточных липидов *A. chroococcum* 92, экстрагированных из 13 г сухой биомассы, в 15 мл смеси $CHCl_3 - MeOH$ (9:1) наносили на колонку (30 × 2,5 см), заполненную DEAE-целлюлозой в AcO^- -форме [2]. Колонку последовательно промывали следующими системами растворителей: $CHCl_3 - MeOH$, 9:1 (600 мл), $CHCl_3 - MeOH$, 7:3 (700 мл), $CHCl_3 - AcOH$, 4:1 (400 мл), $MeOH$ (300 мл) и $CHCl_3 - MeOH$, 2:1, содержащей 10% конц. NH_4OH (400 мл). Фракции, полученные при вымывании каждой из перечисленных систем, собирали отдельно и анализировали при помощи ТСХ в системе $CHCl_3 - MeOH - вода$, 80:20:1. Фракция, элюированная системой $CHCl_3 - AcOH$ (4:1), содержала кетокислоты (II), R_f 0,8, и (III), R_f 0,7. В других фракциях эти кислоты отсутствовали. После упаривания указанной фракции и высушивания остатка при 25°С/0,2 мм в течение 4 ч получали 104 мг смеси кислот (II) и (III). Раствор этой смеси в 5 мл $CHCl_3$ наносили на колонку (20 × 2 см), заполненную силикагелем в $CHCl_3$. Колонку промывали 300 мл $CHCl_3$, после чего вымывание продолжали смесями $CHCl_3 - MeOH$ (50:1, 40:1, 30:1 и 20:1; по 250 мл). Элюат собирали фракциями объемом по 15 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в вышеуказанной системе растворителей. Ряд фракций, элюированных последней смесью растворителей, содержал хроматографически гомогенные кислоты (II). После упаривания этих фракций и высушивания остатка (5 ч, 25°С/0,2 мм) получали 24 мг кетокислот (II). Из последующих фракций, элюированных той же системой растворителей, выделяли 60 мг смеси кислот (II) и (III). Эту смесь снова хроматографировали в описанных условиях, в результате получали 10 мг дикетокислот (II) и 20 мг трикетокислот (III), а также 23 мг их смеси. Всего выделено 34 мг фракции дикетокислот (II) и 20 мг фракции трикетокислот (III). УФ-спектры трикетокислот (III): $\lambda_{\text{макс}}$ 256 нм, ϵ 390 (E+OH).

Метилпроизводные (IIa) и (IIIa). Суммарную фракцию кетокислот (100 мг), полученную в результате хроматографии клеточных липидов на

С х е м а 3*



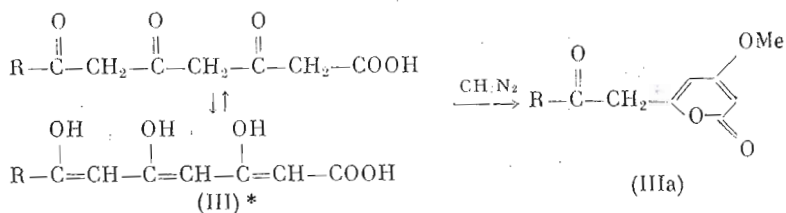
* В квадратных скобках указаны вещества, к которым относится данный ион.

DEAE-целлюлозе и состоящую главным образом из кислот (II) и (III), растворяли в 1 мл смеси $CHCl_3 - MeOH$ (9:1) и обрабатывали избытком раствора диазومتана в эфире. Реакционную смесь оставляли на 12 ч при $20-22^\circ C$, после чего упаривали досуха. Остаток растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , раствор наносили на колонку (20×2 см), заполненную силикагелем в CH_2Cl_2 . Колонку промывали 250 мл CH_2Cl_2 , затем элюировали смесями $CH_2Cl_2 - CHCl_3$, 4:1, 3:1 и 2:1 (по 300 мл). Элюат собирали фракциями объемом по 15 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе $CH_2Cl_2 - CHCl_3$ (4:1). Фракции, содержащие хроматографически гомогенные метилпроизводные (IIa) и (IIIa) (все элюируются смесью $CH_2Cl_2 - CHCl_3$, 3:1), объединяли и упаривали, остатки сушили 4 ч при $25^\circ C/0,4$ мм. Получили 52 мг метилпроизводных (IIa), R_f 0,7 ($CH_2Cl_2 - CHCl_3$, 4:1), 0,85 (бензол - этилацетат, 5:1), и 41 мг метилпроизводных (IIIa), R_f 0,55 и 0,7, в тех же системах растворителей.

При обработке эфирным раствором диазومتана хроматографически гомогенных кислотных фракций (II) и (III) были получены соответствующие метилпроизводные (IIa) и (IIIa), не отличающиеся от вышеописанных по подвижности при ТСХ в указанных системах растворителей и по масс-спектрам.

Тридейтерометилпроизводные (d_3 -IIa). Хроматографически гомогенную кислотную фракцию (II) (1 мг) растворяли в 1 мл смеси безводного $CHCl_3$ и CD_3OD (1:1), раствор оставляли на 1 ч при $20^\circ C$, после чего обрабатывали 0,5 мл эфирного раствора дейдейтеродиазومتана, который получали по ранее описанной методике [9], но вместо водного раствора КОН использовали 40% NaOD в D_2O (получали растворением металлического натрия в D_2O). Реакционную смесь оставляли на 12 ч при $20^\circ C$,

Схема 4*

R = *n*-C₂₁H₄₃ и *n*-C₂₃H₄₇

* Приводятся только полная кетоформа и полная енольная форма кетокислот, однако последние существуют и в смешанных формах.

затем упаривали досуха, получили хроматографически гомогенную фракцию тридегтерометилпроизводных (*d*₃-IIa), не отличающуюся по подвижности при ТСХ от метилпроизводных (IIa).

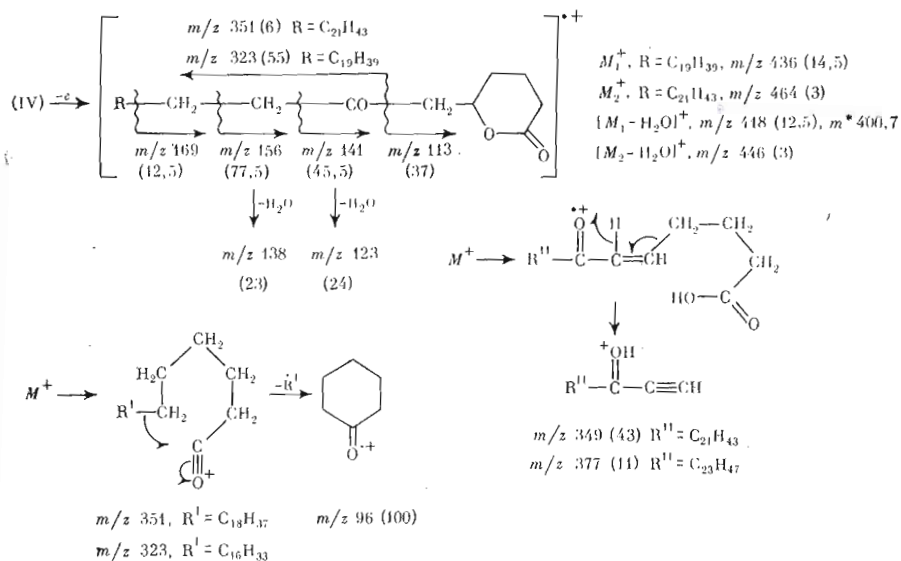
Периодат-перманганатное окисление кислотных фракций [II] и [III]. К раствору 2 мг фракции (II) или (III) в 2 мл *трет*-бутанола добавляли 0,1 мл 0,02 М раствора K₂CO₃ и 0,5 мл воды. Смесь встряхивали 5 мин и при 20° С обрабатывали 0,8 мл окисляющего раствора (214 мг NaIO₄ и 39,5 мг KMnO₄ в 100 мл воды). Реакционную смесь встряхивали 3 ч при 20° С, затем подкисляли 10% серной кислотой до pH 1, обесцвечивали добавлением твердого Na₂SO₃, разбавляли 3 мл воды и экстрагировали смесью гексан — эфир (1 : 1, 4 × 2 мл). Объединенный экстракт промывали 2 мл воды и упаривали досуха. Остаток, судя по данным ТСХ в системе гексан — эфир — AcOH (80 : 20 : 0,2), состоял из жирных кислот; в качестве стандарта применяли бегеновую кислоту. Полученные кислоты превращали в метиловые эфиры действием избытка эфирного раствора диазометана и анализировали при помощи ГЖХ. Использовали хроматограф «Цвет-6», снабженный пламенно-ионизационным детектором и колонкой (2500 × 4 мм) с 8% полидиэтиленгликольсукцината на хромосорбе G-AW (80–100 меш); температура колонки 192° С, газ-носитель — гелий (20 мл/мин). Кроме того, для анализа полученных метиловых эфиров жирных кислот применяли ГЖХ-масс-спектрометрию на приборе LKB 9000 (Швеция). Разделение смесей осуществляли на колонке (1500 × 2 мм) с 5% силикона SE-30 на хроматоне N-AW (80–100 меш) при температурном режиме: 150 → 310° С (5° С/мин); газ-носитель — гелий (20 мл/мин). Обои названными методами продукты окисления кислот (II) и (III) идентифицированы как генэйкозановая и трикозановая кислоты.

Таблица 6

Основные пики в масс-спектре нативной кислотной фракции (III)

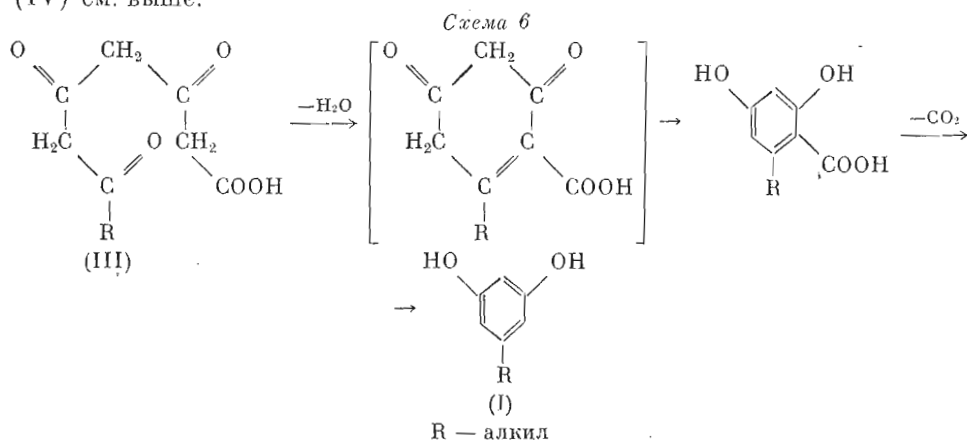
<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} , %	Тип иона	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} , %	Тип иона
476	0,8	<i>M</i> ₂ ⁺ - H ₂ O	265	0,6	<i>F</i> <i>n</i> =8
458	2,4	<i>M</i> ₂ ⁺ - 2 · H ₂ O	251	0,5	<i>E</i> <i>n</i> =7
448	14,9	<i>M</i> ₁ ⁺ - H ₂ O	237	0,8	<i>E</i> <i>n</i> =6
430	44,6	<i>M</i> ₁ ⁺ - 2 · H ₂ O	223	0,7	<i>E</i> <i>n</i> =5
419	0,8	<i>E</i> <i>n</i> =19	209	0,7	<i>E</i> <i>n</i> =4
405	1,1	<i>E</i> <i>n</i> =18	205	6,4	<i>E</i> (<i>n</i> =5) - H ₂ O
391	0,4	<i>E</i> <i>n</i> =17	195	1,9	<i>E</i> <i>n</i> =3
377	0,4	<i>E</i> <i>n</i> =16	192	6,1	<i>E</i> (<i>n</i> =4) + H - H ₂ O
363	0,6	<i>E</i> <i>n</i> =15	191	3,1	<i>E</i> (<i>n</i> =4) - H ₂ O
349	0,4	<i>E</i> <i>n</i> =14	181	45,6	<i>E</i> <i>n</i> =2
335	0,5	<i>E</i> <i>n</i> =13	168	93,0	<i>D</i>
321	0,6	<i>E</i> <i>n</i> =12	163	2,8	<i>E</i> (<i>n</i> =2) - H ₂ O
307	0,4	<i>E</i> <i>n</i> =11	153	100,0	<i>Г</i>
293	0,5	<i>E</i> <i>n</i> =10	126	14,9	<i>В</i>
279	0,5	<i>E</i> <i>n</i> =9	111	3,9	<i>А</i>

Схема 5*



* В скобках после массовых чисел ионов указана их относительная интенсивность в %.

Гидрирование метилпроизводных (IIIa). К раствору 7 мг метилпроизводных (IIIa) в 1 мл безводного свежеперегнанного диоксана добавляли 10 мг двуокиси платины. Смесь перемешивали 1 ч в атмосфере водорода при 25°С и давлении 752 мм рт. ст., после чего фильтровали, катализатор промывали 1 мл диоксана, объединенный фильтрат упаривали досуха. Остаток растворяли в 0,3 мл $CHCl_3$, раствор наносили на пластинку (15×15 см) с закрепленным слоем (0,5 мм) силикагеля G с 5% гипса (Merck, ФРГ). Хроматограмму проявляли в системе $CHCl_3$ — этилацетат (5:1), сушили 10 мин на воздухе, опрыскивали 0,2% раствором морина в MeOH и снова сушили на воздухе 40 мин. В УФ-свете на хроматограмме наблюдали две флуоресцирующие зоны с R_f 0,8 и 0,6. Указанные зоны отделяли, вещества с адсорбента вымывали смесью $CHCl_3$ — MeOH (9:1, 4×7 мл). После упаривания элюатов получили 3,5 мг более подвижного при ТСХ продукта гидрирования (IV), R_f 0,75 ($CHCl_3$ — CH_2Cl_2 , 4:1), и 1,9 мг менее подвижного продукта, R_f 0,6 (в той же системе). ИК-спектр последнего (KBr, ν_{max} , cm^{-1}): 1738 (C=O сложного эфира), 1715 (C=O кетона), 1258, 1107, 1044 (C—O). ИК-спектр соединения (IV) см. выше.



ЛИТЕРАТУРА

1. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д. Фенольный липид из *Azotobacter chroococcum*.— Химия природн. соед., 1977, № 4, с. 494–499.
2. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. Lipid composition of beef brain, beef liver, and the sea anemone: two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixtures.— J. Amer. Oil Chem. Soc., 1963, v. 40, No 6, p. 425–454.
3. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 729–731.
4. Spence M. W. A simple method for determining the doublebond position in monoenoic fatty acids.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 218, No 2, p. 357–359.
5. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. М.: Мир, 1977, с. 435.
6. Kates M. Biosynthesis of lipids in microorganisms.— Ann. Rev. Microbiol., 1966, v. 20, p. 13–44.
7. Новогрудская Е. Д. Антибиотики в борьбе с болезнями сельскохозяйственных культур. Бактериальные и энтомопатогенные препараты.— Тр. ВНИИбакпрепарат. М., 1973, вып. 1, с. 27–35.
8. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. Diol lipids. XXVI. Identification of a *threo*-butane-2,3-diol phospholipid from *Actinomyces olivaceus*.— Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 337, No 1, p. 29–40.
9. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 244.

Поступила в редакцию
15.VII.1980

FATTY DIKETO- AND TRIKETO ACIDS FROM THE CELLS OF NITROGEN-FIXING BACTERIUM *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*

BATRAKOV S. G., PRIDACHINA N. N., KRUGLYAK E. B.,
NOVOGRUDSKAYA E. D., CHEKASINA E. V.

*All-Union Research Institute of Microbiological Means for Plant
Protection and Bacterial Preparations, Moscow*

Two unusual acid fractions have been isolated from the total cell lipids of nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum* 92 by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose followed by silica gel column chromatography. On the basis of UV, IR, PMR and mass spectra of the native acids and their methyl derivatives, one of the fractions has been characterized as a mixture of 3,5-diketohexacosanoic and 3,5-diketo-octacosanoic acids, whereas another has been shown to be a mixture of 3,5,7-triketo-octacosanoic and 3,5,7-triketotriacontanoic acids. These triketo acids are believed to be biogenetic precursors of previously reported 1,3-dihydroxy-5-alkylbenzene which is one of the main components of the cell lipid extract.