



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 7 \* № 7 \* 1981

УДК 547.39'96+576.852.21

## ЛИПИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ.

VI. ПЕПТИДОЛИПИДЫ ПАРАФИНОКИСЛЯЮЩЕЙ БАКТЕРИИ  
*MUSOBACTERIUM PARAFFINICUM*.  
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Батраков С. Г., Муратов В. Е., Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

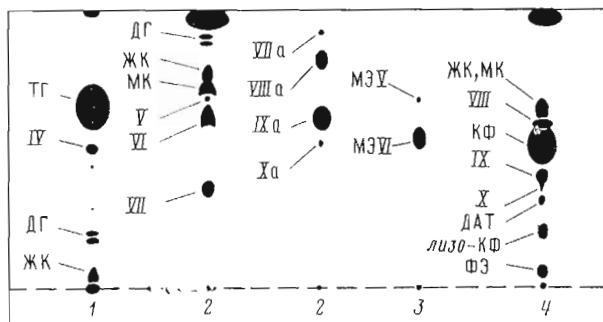
Коронелли Т. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет

Из клеточных липидов парафинокисляющей бактерии *Musobacterium paraffinicum* методами адсорбционной и ионообменной хроматографии выделены в хроматографически гомогенном состоянии семь ранее неизвестных пептидолипидов (один из них — в виде ацетильного производного), представляющих собой N- и N,O-жирноацильные производные пептидов. В соответствии с подвижностью при ТСХ полученные липиды делятся на две группы: «малополярную» и «полярную», которые состоят соответственно из трех и четырех компонентов. Пептидная часть молекул представителей первой группы построена из остатков L-валина, L-треонина и L-лейцина (мольное соотношение 2:1:1); пептидные фрагменты молекул «полярных» липидов состоят из остатков глицина, L-лейцина, D-алло-изолейцина, L-треонина, L-серина, L-гомoserина и D-аланина. В структуры пяти пептидолипидов входят эфиросвязанные микроволевые кислоты; три «полярных» липида содержат остаток глюкозы.

Пептидолипиды, представляющие собой N-жирноацильные производные пептидов, обнаружены пока только в микроорганизмах, и в настоящее время их можно считать одним из наименее изученных классов природных липидов. К синтезу подобных веществ в особенности склонны микробактерии и родственные им микроорганизмы (см. обзоры [1—4]). Предполагают, что эти соединения являются компонентами клеточной стенки. Продуцируемые названными бактериями пептидолипиды делятся на два структурных типа: собственно пептидолипиды и гликозиды пептидолипидов (их называют также микозидами С).

К первому типу относятся фортуитин (I), выделенный из клеток *Musobacterium fortuitum* [5], пептидолипид (II) из *M. johnei* [6], не охарактеризованный полностью пептидолипид из *M. paratuberculosis* [7] и циклический пептидолипид (III) — пептидолипин НА — из *Nocardia asteroides* [8]. Гликопептидолипиды (микозиды С) найдены только у представителей рода *Musobacterium*. В отличие от рассмотренных выше N-ацилпептидов, молекулы которых не имеют каких-либо общих структурных блоков (см. формулы I—III), N-ацилпептидная часть молекул микозидов С построена по общей схеме: RCO-D-Phe-(D-aThr-D-Ala)<sub>n</sub>-X, где R — алкильный оста-



ТСХ липидов *M. paraffinicum*. Системы растворителей: 1 – бензол – этил-ацетат (1 : 1), 2 –  $\text{CHCl}_3$  –  $\text{MeOH}$  (10 : 1), 3 –  $\text{CHCl}_3$  –  $\text{MeOH}$  (20 : 1), 4 –  $\text{CHCl}_3$  –  $\text{MeOH}$  – вода (80 : 15 : 1); обнаружение обугливанием с серной кислотой при  $\sim 200^\circ\text{C}$ . ТГ – триглицериды, ДГ – 1,2- и 1,3-диглицериды, ЖК – свободные жирные кислоты, МК – свободные микровые кислоты, КФ – корд-фактор, ДАТ – 6,6'-ди-O-( $\alpha$ -ацил  $\text{C}_{12}\text{--C}_{16}$ )- $\alpha,\alpha$ -D-трегалоза, ФЭ – фосфатидилстаниоламин, МЭ – метиловые эфиры; римскими цифрами обозначены пептидолипиды и их производные (см. текст)

ток  $\text{C}_{15}\text{--C}_{27}$ , X – остаток L-аланинола или N,O-диметилсерина,  $n=1, 2$  или 3 [1–4]. Углеводными компонентами молекул микозидов С являются O-метилированные и ацетилированные L-рамноза и L-талоза, соединенные гликозидной связью с остатками D-алло-треопина и L-аланинола. В качестве липофильного фрагмента пептидолипиды обоих типов содержат остатки жирных кислот  $\text{C}_{16}\text{--C}_{28}$ , которые в некоторых случаях имеют гидроксильную или метоксильную группу при  $\text{C}_{(3)}$ .

Все известные до настоящего времени пептидолипиды микобактерий и родственных организмов представляют собой вещества нейтрального характера. Считают, что микроорганизмы, синтезирующие пептидолипиды первого типа, неспособны продуцировать гликопептидолипиды, и наоборот [3]. Имеются данные о том, что микозиды С, располагаясь на поверхности бактериальной клетки, служат рецепторами фагов [4], однако биологические функции пептидолипидов пока не выяснены. Настоящее сообщение посвящено анализу состава пептидолипидов, продуцируемых парафинокисляющей бактерией *Mycobacterium paraffinicum*. В нем описывается выделение семи пептидолипидов (одного из них – в виде ацетильного производного) из суммарных клеточных липидов бактерии, приводятся их физико-химические характеристики, а также некоторые сведения о структуре.

Анализ клеточных липидов *M. paraffinicum*, экстрагированных смесями хлороформ – метанол (2 : 1 и 1 : 1), при помощи ТСХ в различных системах растворителей с применением различных специфических реагентов для обнаружения показал, что среди этих липидов находятся по крайней мере семь бесфосфорных компонентов (IV–X; см. рисунок), которые, вероятно, содержат аминные группы. По хроматографической подвижности указанные компоненты делятся на две группы: «малонаполярную» (фракции (IV) – (VI)) и «полярную» ((VII) – (X)). Первые мигрируют на уровне нейтральных глицеридов и свободных жирных кислот, вторые – на уровне трегалозолипидов (корд-фактора и его аналогов), продуцируемых тем же микроорганизмом [9,10]. С целью выяснения химической природы обсуждаемых липидов мы осуществили выделение каждого из них в хроматографически гомогенном состоянии.

Липиды (IV) – (VI) выделяли хроматографическими методами непосредственно из суммы клеточных липидов. Клеточные липиды предварительно освобождали от наиболее полярных компонентов хроматографированием на колонке с силикагелем, а затем подвергали ионообменной хроматографии на ТЕАЕ-целлюлозе\*. При этом липиды (IV) и (VII) вы-

\* Триэтиламиноэтилцеллюлоза.

Таблица 1

Основные характеристические полосы поглощения в ИК-спектрах пептидолипидов (IV, VI–X) и их производных \*

Вещества	$\nu_{\text{макс.}}, \text{см}^{-1}$				
	$\nu_{\text{OH}}, \nu_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{C=O}}$ в сложном эфире	$\nu_{\text{C=O}}$ в амидных группах	$\delta_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{C-O}}$
(IV)	3315, 3080	1740	1662, п. 1645	1538	1238, 1150
(VI) **	3278, п. 3380, 3076	1743	1635, п. 1647	1497	1215, 1155
(VII)	3282, п. 3420, 3080	1738	1623, п. 1642	1524	1238, 1120, 1080
(VIIa)	3282, 3082	1743	1628, п. 1640	1518	1232, 1160, 1040
(VIII)	3285, 3080	1735	1624, п. 1648	1538	1248, 1162, 1080
(VIIIa)	3282, 3080	1742	1628, п. 1650	1535	1244, 1060
(IX)	3300, п. 3440, 3082	1740	1631, п. 1668	1536	1242, 1168, 1078, 1055
(IXa)	3300, п. 3420, 3080	1742	1631, п. 1668	1540	1245, 1184, 1055
(IXб)	3290, 3080	1740	1634, п. 1670	1538	1242, 1160, 1050
(IXв)	3300, 3078	1746	1658, п. 1672	1540	1242, 1162, 1078, 1050
(Xa)	3310, п. 3420, 3077	1740	1634, п. 1664	1535	1244, 1170, 1072, 1055

\* Для веществ (IV), (VI), (VII) и (VIIa) спектры получены в пленках веществ, свободных от растворителя, для веществ (VIII), (VIIIa), (IX), (IXa–в) и (Xa) — в таблетках с КВг; п.— плечо.

\*\* Кроме указанных полос в спектре присутствуют характерные полосы поглощения карбонильной группы:  $\nu_{\text{C=O}}$  с максимумом при  $1715 \text{ см}^{-1}$  и широкая полоса  $\nu_{\text{OH}}$  в области  $2800$ — $2500 \text{ см}^{-1}$ .

Таблица 2

Жирнокислотный состав (в мол.%) пептидолипидов (IV–X) \*

Жирные кислоты	Пептидолипиды						
	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)
Миколовые кислоты	30 : 0 32 : 0 34 : 0 и 34 : 1 36 : 0 и 36 : 1 38 : 0 и 38 : 1 40 : 1 42 : 1 Более 42 C-атомов (моноеноевые)			7 20 27 21 12 9 4 сл.	2 8 38 28 10 6 5 3	2 7 34 21 16 10 7 2	6 32 31 18 8 5 2 1
Незамещенные нормальные жирные кислоты	44 : 0 46 : 0 16 : 4 18 : 0 18 : 4 20 : 0 20 : 4 22 : 0 22 : 4 24 : 0 24 : 1 26 : 0 26 : 1 28 : 1		2 5 1 23 3 20 26 25 1	5 14 1 19 3 21 18 19 22 22 22 20 26 25 сл.	24 48 19 6 6 5 24 1 7 24 21 44 1 7 5 5	4 21 12 48 24 1 21 1 7 21 15 42 сл. сл. сл. сл.	10 42 18 42 17 18 12 15 3 3

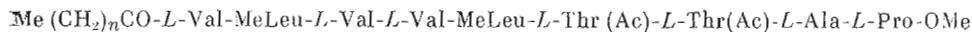
\* сл.— относительное содержание кислоты менее 1%.

мывались нейтральной системой растворителей, что говорит об их нейтральном характере. Липиды (V) и (VI) удавалось элюировать только кислотными или основными системами. Этот факт указывает на кислотные свойства пептидолипидов (V) и (VI). Дальнейшее разделение каждой пары веществ и их окончательную очистку проводили путем хроматографирования на колонке с силикагелем. Описанная методика оказалась неудобной для выделения липидов (VIII) и (IX), поскольку их очистка от гликолипидов требовала многократного хроматографирования. Поэтому для получения индивидуальных фракций (VIII) и (IX) сумму клеточных липидов экстрагировали большим объемом гексана. При этом гликолипиды практически полностью переходили в раствор наряду с восками, триглицеридами, свободными жирными кислотами и основной массой фосфолипидов. Не растворившийся в гексане остаток состоял главным образом из пептидолипидов (VIII) и (IX) и фосфолипидов. Липиды (IV) — (VI) также присутствовали в нерастворимом остатке, но значительная часть их переходила в экстракт. Фосфолипиды удаляли хроматографией на DEAE-целлюлозе, а разделение пептидолипидов (VIII) и (IX) и их последующую очистку осуществляли при помощи хроматографии на колонке с силикагелем. Оба липида элюировались с DEAE-целлюлозы нейтральной системой растворителей, что свидетельствует об их нейтральном характере.

Все выделенные пептидолипиды (IV) — (IX) на хроматограммах не реагировали с никидрином и, следовательно, не содержали свободных аминогрупп. Однако они давали положительную реакцию на группировку N — H с бензидиновым реагентом после обработки хроматограмм хлором [11]. Фракции (VIII) и (IX), кроме того, давали характерную реакцию с аントропиевым реагентом [12] и с периодатом — реагентом Шиффа [13], из чего следует, что они содержат углеводные остатки. ИК-спектры липидов (IV) — (IX) указывали на наличие пептидных остатков и сложноэфирных групп в молекулах этих веществ (табл. 1).

Липиды «малополярной группы» (IV) — (VI) на основании результатов анализа продуктов их химической деградации, а также данных ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии нативных веществ и их производных охарактеризованы как N-ацил-L- треонил-L-валил-L-валил-L-лейцилолид (IV), N-ацил-L-(O-n-ацил) треонил-L-валил-L-валил-L-лейцин (V) и N-ацил-L-(O-миколоил) треонил-L-валил-L-валил-L-лейцин (VI); N-ацильными остатками во всех случаях и O-ацильным остатком в липиде (V) являются остатки нормальных пасынченных и моноеновых кислот C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> и C<sub>28</sub> (см. табл. 2). Доказательству перечисленных структур посвящены отдельные сообщения [14, 15]. Таким образом, все пептидолипиды «малополярной группы» представляют собой близкородственные соединения — основу их молекул составляет N-ацилтетрапептидная цепь, которая либо не замещена (липид (IV)), либо несет O-ацильный остаток (липиды (V), (VI)). Пептидолипиды с вышеуказанным строением пептидной цепи ранее были неизвестны, не встречались также пептидолипиды, содержащие миколовые кислоты.

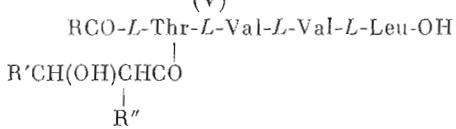
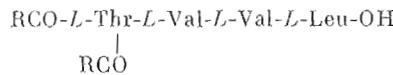
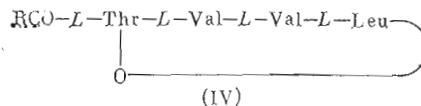
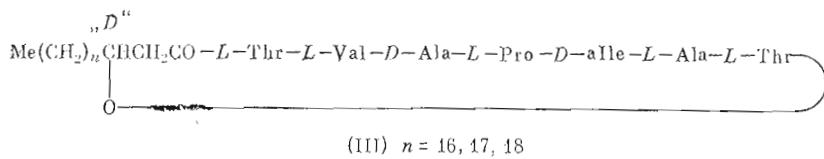
Предварительное исследование выделенных нами пептидолипидов «поларной группы» (VII) — (IX) показало, что они не имеют прямой биогенетической связи с пептидолипидами (IV) — (VI). Прежде всего об этом говорит аминокислотный состав. В результате кислотного гидролиза в жестких условиях все «поларные» липиды (VII) — (IX) давали нормальные пезамещенные жирные кислоты, миколовые кислоты и аминокислоты, а в гидролизатах липидов (VIII) и (IX) также присутствовала глюкоза. Аминокислотные фракции гидролизатов трех названных липидов были идентичны и состояли из глицина, L-лейцина, D-алло-изолейцина, L-треонина, L-серина, L-гомосерина и D-аланина в мольном соотношении 3 : 3 : 2 : 2 : 2 : 1 : 1; L-валин, который в «малополярных» липидах (IV) — (VI) является доминирующей аминокислотой, в гидролизатах отсутствовал. В пептидных остатках липидов (VII) — (IX) содержится значительное-



(I)  $n = 18, 20$



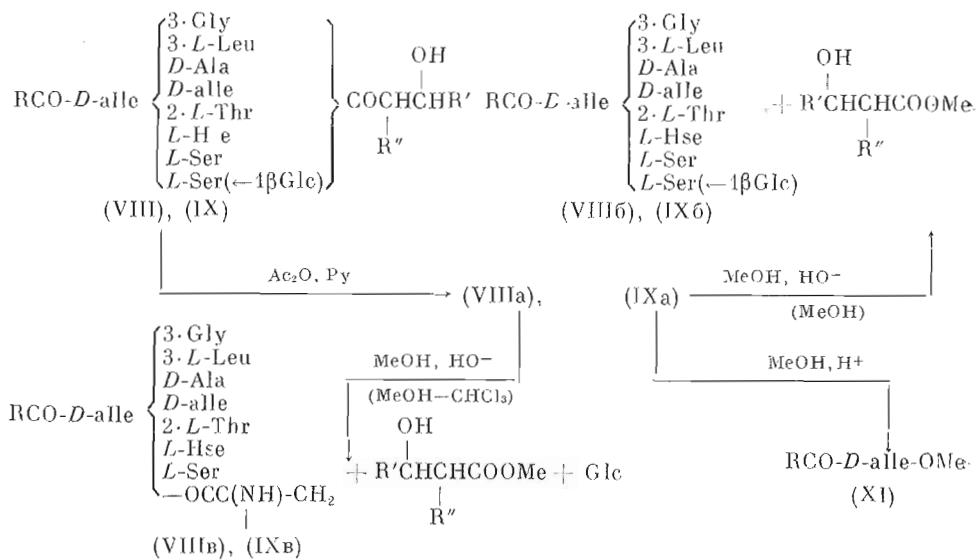
(II)  $n = 16, 18, 20$



$\text{R}'$  — алкил  $\text{C}_{17}-\text{C}_{29}$ ,  $\text{R}''$  — алкил  $\text{C}_{10}, \text{C}_{12}$   
 $\text{R}$  — алкил  $\text{C}_{19}-\text{C}_{27}$  (см. табл. 2)

жкличество оксиаминокислот, в том числе *L*-серина и *L*-гомосерина, которые вообще не встречались в известных до настоящего времени пептидолипидах микобактерий и родственных организмов. Наблюдается некоторое различие в строении нормальных незамещенных жирных кислот «малополярных» и «полярных» пептидолипидов — в последних преобладают гомологи с более короткой цепью ( $\text{C}_{14}-\text{C}_{20}$ ) (табл. 2). Состав миколовых кислот в «полярных» пептидолипидах (VII) — (IX) оказался таким же, как в липиде (VI) (табл. 2), и практически не отличался от состава миколовых кислот в упомянутых выше трегалозолипидах [9, 10]. Во всех трех «полярных» пептидолипидах содержание миколовых и нормальных жирных кислот было эквимольным.

Щелочной метанолиз в гетерогенных условиях ацетильных производных (VIIa) — (IXa) «полярных» пептидолипидов (VII) — (IX) приводил в каждом случае к образованию только двух продуктов: метилового эфира миколовой кислоты и пептидсодержащего вещества (VIIб) — (IXб) (см. схему), причем пептидсодержащие продукты (VIIIб) и (IXб), полученные из ацетатов (VIIIa) и (IXa), при ТСХ проявляли одинаковую подвижность, их ИК-спектры также были идентичны. Отсюда можно заключить, что липиды (VIII) и (IX) имеют одинаковую глюказил-*N*-ацилпептидную цепь. В результате жесткого кислотного гидролиза продуктов метанолиза (VIIб) — (IXб) образовались нормальные жирные кислоты и перечисленные выше аминокислоты в том же мольном соотношении, а в случае веществ (VIIIб) и (IXб) в продуктах гидролиза присутствовала и глюкоза. Изложенные данные показывают, что принципы построения молекул у пептидолипидов (VII) — (IX) «полярной группы» не отличаются от таких у «малополярных» пептидолипидов (IV) — (VI). Следовательно: 1) все имеющиеся в молекуле аминокислотные остатки составляют единую пептидную цепь, 2) *N*-концевая аминокислота ацилирована низкомолекулярной нормальной незамещенной жирной кислотой, 3) миколовые кислоты связаны с пептидным остатком сложноэфириной связью.



О строении глюкопептидолипидов (VIII) и (IX) мы получили некоторые дополнительные сведения. Эти липиды были подвергнуты кислотному метанолизу. Анализ липофильных фракций метанолизатов показал, что они состоят из нормальных жирных кислот, миколовых кислот и амидсодержащего вещества (XI). Последнее было выделено при помощи препаративной ТСХ и подвергнуто кислотному гидролизу в жестких условиях. Продукты гидролиза мы идентифицировали как нормальные жирные кислоты и *D*-алло-изолейции и на основании этого прислали продукту метанолиза (XI) структуру метилового эфира N-ацил-*D*-алло-изолейцина. Таким образом, N-концевой аминокислотой в липидах (VIII) и (IX) и, вероятно, в (VII) является *D*-алло-изолейцин, что существенно отличает их от «малонаполярных» пептидолипидов (IV) — (VI).

Локализацию глюкозного остатка в молекулах глюкопептидолипидов (VIII) и (IX) мы осуществили на основании результатов щелочного метанолиза ацетильных производных этих липидов (VIIIa) и (IXa) в гомогенных условиях. Указанная реакция приводит к количественному отщеплению миколовых кислот и глюкозы. Анализ аминокислотного состава продуктов метанолиза в гомогенных условиях (VIII $\delta$ ) и (IX $\delta$ ) обнаружил потерю 1 моль L-серина. При анализе аминокислот в тех же продуктах после их катализического гидрирования также было установлено уменьшение количества серина вдвое по сравнению с его содержанием в нативных липидах и в продуктах гетерогенного метанолиза (VIII $\delta$ ) и (IX $\delta$ ), в то же время количество аланина оказалось вдвое большим. Отсюда следует, что в молекулах глюкопептидолипидов (VIII) и (IX) остаток глюкозы связан с гидроксильной группой остатка L-серина. В основных условиях моносахарид отщепляется путем  $\beta$ -элиминирования. Определение аномерной конфигурации глюкозного остатка методом окисления хромовым ангидридом [16] пер-O-ацетатов (VIIIa) и (IXa) показало, что в обоих пептидолипидах он имеет  $\beta$ -конфигурацию.

Ряд хроматографических фракций, полученных при выделении пептидолипида (IX), содержал наряду с ним незначительную примесь более полярного вещества (X), мигрирующего при ТСХ очень близко к липиду (IX). Выделить это вещество в хроматографически индивидуальном состоянии удалось лишь в виде ацетильного производного (Xa). Анализ продуктов кислотного гидролиза и щелочного метанолиза ацетата (Xa) показал, что липид (X) также является глюкопептидолипидом. По аминокислотному составу липид (X) не отличался от доминирующих «полярных»

пептидолипидов (VII)–(IX); качественный состав миколовых и нормальных жирных кислот в нем оказался таким же, как в пептидолипиде (IX). наблюдалось лишь некоторое различие в количественном соотношении отдельных кислотных компонентов (табл. 2). При определении вышеописанным методом положения глюкозного остатка в молекуле липида (X) выяснилось, что этот моносахарид связан с гидроксильной группой треоинового остатка, а не серинового, как в пептидолипидах (VIII) и (IX).

Изложенные выше результаты исследования пептидолипидов *M. paraffinicum* указывают на необычность строения последних. В отличие от ранее изучавшихся в этом аспекте микобактерий и родственных организмов *M. paraffinicum* продуцирует довольно широкий круг липидов рассматриваемого класса, которые образуют две структурные группы, соответствующие двум направлениям биосинтеза. Обращает на себя внимание присутствие в клеточных липидах гликозилированных и негликозилированных пептидолипидов — явление, с которым ранее не сталкивались. В настоящее время нами завершается полная структурная идентификация пептидолипидов «полярной группы» (VII–IX).

### Экспериментальная часть

Для хроматографии на колонках применяли силикагель КСК (Воскресенского химкомбината) либо силикагель Л (Lachema, ЧССР) с размером частиц 100–250 и 100–160 мкм соответственно. Силикагель КСК предварительно обрабатывали ранее описанным способом [17]. Силикагель Л промывали 5 объемами смеси  $\text{CHCl}_3\text{--MeOH}$  (2 : 1 \*), затем 5 объемами MeOH и сушили на воздухе 12 ч.

ТСХ проводили на готовых пластинках с закрепленным слоем (0,25 мм) силикагеля 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ). Вещества на хроматограммах обнаруживали по флуоресценции, а также опрыскиванием следующими реагентами: 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с последующим обугливанием при  $\sim 200^\circ\text{C}$ , бензидиновым реагентом [11] после обработки хроматограмм газообразным хлором, антромочевым реагентом [12], периодатом — реагентом Шиффа [13].

Анализ аминокислот проводили параллельно тремя методами: на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США); при помощи ГЖХ *n*-бутиловых эфиров N-трифторацетиламинокислот [18] на хроматографе «Perkin-Elmer 910» (Швеция), снажженном колонкой (2100×3 мм) с 0,3% ПЭГА на хромосорбе G-AW (80–100 меш), температурный режим колонки: 100→210° С (3° С/мин), расход гелия 20 мл/мин \*\*; методом ГЖХ-масс-спектрометрии; использовали хроматомасс-спектрометр LKB 9000 (Швеция), для ГЖХ применяли колонку (1800×3 мм) с 3% SE-30 на хроматоне N-AW (90–120 меш) при температурном режиме: 80→150° С (3° С/мин), расход гелия 25 мл/мин, энергия ионизирующих электронов при масс-спектрометрии 70 эВ.

Абсолютную конфигурацию аминокислот устанавливали при помощи ГЖХ двумя методами параллельно: метиловые эфиры аминокислот превращали в N-(N-трифторацетил-L-пролил)производные [19, 20], которые хроматографировали на приборе «Varian-2100» (США), снажженном колонкой (2000×2 мм) с 5% силикона SE-30 на хроматоне N-AW (75–90 меш), температура колонки 150° С, расход гелия 20 мл/мин; N-трифторацетильные производные изопропиловых эфиров аминокислот хроматографировали на капиллярной колонке (35 м×0,4 мм), в качестве стационарной фазы применяли N-стеароил-L-валил-*тетр*-бутиламид (оптическая чистота 83%), синтезированный нами аналогично [21], температурный режим колонки: 4 мин при 80° С, далее 80→170° С (3° С/мин),

\* Везде указывается объемное соотношение растворителей.

\*\* Здесь и далее для детектирования веществ при ГЖХ применяли пламенно-ионизационный детектор.

расход гелия 3 мл/мин. В качестве стандартов в обоих случаях служили соответствующие производные D- и L-антиподов исследуемых аминокислот.

Нормальные незамещенные жирные кислоты анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии в виде метиловых эфиров. ГЖХ проводили на хроматографе «Perkin-Elmer 910». Использовали колонку (2000×2 мм) с 10% Silar 10 с на хроматоне N-AW (75–90 меш) в изотермическом режиме – 250° С, расход гелия 30 мл/мин. Для ГМХ-масс-спектрометрии применяли вышеуказанный хроматомасс-спектрометр, ГЖХ осуществляли на колонке (1500×2 мм) с 5% SE-30 на хроматоне N-AW (80–100 меш) при температурном режиме: 150–310° С (5° С/мин).

Микровые кислоты анализировали в виде 3-О-метилпроизводных соответствующих метиловых эфиров [9] методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии. ГЖХ проводили на хроматографе «Varian 2100», снабженном колонкой (2000×2 мм) с 3% силикона SE-30 на хроматоне W-HP (80–100 меш), температурный режим колонки: 200–320° С (6° С/мин), расход гелия 30 мл/мин. Для разделения смесей производных микровых кислот при ГЖХ-масс-спектрометрии применялась та же колонка в тех же условиях. Указанные хроматограф и колонка использовались также для определения глюкозы в виде триметилсилильного производного; температурный режим колонки в этом случае: 80–300° С (10° С/мин).

ИК-спектры регистрировали на спектрографе «Perkin-Elmer», модель 180, в пленке вещества или в таблетке с КВг. Оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре «Perkin-Elmer 141».

Полный гидролиз пептидолипидов и продуктов их деградации осуществляли путем нагревания веществ (0,5–1 мг) в запаянной ампуле с 0,5 мл 6 н. HCl при 108–110° С в течение 48 ч. По охлаждении смесь разбавляли 2 мл воды и экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (2×2 мл). Объединенный экстракт промывали 1 мл воды, водную фазу объединяли с водной фазой гидролизата и упаривали досуха, остаток освобождали от следов HCl многократной отгонкой с водой, полученные аминокислоты и глюкозу анализировали вышеописанными методами. Хлороформный экстракт упаривали досуха, остаток обрабатывали раствором диазометана в эфире (20° С, 30 мин), смесь упаривали, полученные метиловые эфиры микровых и нормальных незамещенных жирных кислот разделяли при помощи препаративной ТСХ на пластинках (10×10 см) с закрепленным слоем (0,4 мм) силикагеля G (Merck, ФРГ; 5% гипса) в системе гексан – эфир (85 : 15). Зоны веществ обнаруживали в УФ-свете после опрыскивания хроматограмм 0,3% раствором морина в MeOH, метиловые эфиры тех и других кислот вымывали с адсорбента смесью CHCl<sub>3</sub> – MeOH (9 : 1) и анализировали вышеописанными методами. Поскольку в процессе кислотного гидролиза в описанных выше условиях микровые кислоты в значительной степени деградируют, для количественного определения их отцепляли в условиях щелочного метанолиза (см. ниже).

Пептидолипиды ацетилировали действием смеси Ac<sub>2</sub>O – пиридин (1 : 1) при 20–25° С в течение 12 ч. Реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в CHCl<sub>3</sub>, раствор наносили на колонку, заполненную 2 г силикагеля KCK в CHCl<sub>3</sub>, колонку промывали 10 мл CHCl<sub>3</sub>, после чего 15 мл смеси CHCl<sub>3</sub> – MeOH (9 : 1) вымывали ацетильные производные пептидолипидов.

Культуру *M. paraffinicum* выращивали на среде с гексадеканом в ранее описанных условиях [22]. Клетки отделяли центрифугированием (4000g, 30 мин), промывали гексаном, дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Липиды экстрагировали из сухой биомассы смесями CHCl<sub>3</sub> – MeOH (2 : 1 и 1 : 1) [17] и освобождали от пелинидных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 [23]. Из 20 г сухой биомассы получили 3,3 г клеточных липидов.

*Выделение пептидолипидов (IV)–(VII).* На колонку (20×3 см), заполненную силикагелем Л в CHCl<sub>3</sub>, наносили раствор 1,63 г клеточных

липидов в 20 мл  $\text{CHCl}_3$ . Колонку промывали 500 мл  $\text{CHCl}_3$ , после чего 500 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (20 : 1) элюировали 293 мг липидной фракции, содержащей пептидолипиды (IV) — (VII). Эту фракцию растворяли в 5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (15 : 1) и раствор наносили на колонку (25×2 см), заполненную DEAE-целлюлозой (Serva, ФРГ;  $\text{HO}^-$ -форма) в указанной системе растворителей. Той же системой (300 мл) элюировали 215 мг фракции нейтральных липидов, содержащей пептидолипиды (IV) и (VII), затем 300 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{AcOH}$  (4 : 1) элюировали 70 мг кислотных липидов, среди которых находились липиды (V) и (VI).

Раствор фракции нейтральных липидов в 5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (2 : 1) тщательно смешивали с 5 г силикагеля Л, смесь сушили 30 мин на роторном испарителе при 30° С/10—15 мм, после чего суспензировали в системе бензол — этилацетат (5 : 1). Суспензию вносили в колонку (20×3 см), заполненную силикагелем Л в той же системе растворителей. Вымывали смесями бензол — этилацетат (до 300 мл) — 5 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1 и 1 : 1, затем смесями  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (по 350 мл) — 50 : 1, 40 : 1, 30 : 1, 25 : 1, 20 : 1, 15 : 1 и 10 : 1. Элюат собирали фракциями объемом 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системах бензол — этилацетат, 1 : 1 (А), и  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 10 : 1 (Б). Ряд фракций, элюированных смесью бензол — этилацетат (3 : 1), содержал хроматографически гомогенный пептидолипид (IV). После упаривания этих фракций и высушивания остатка (все пептидолипиды и их производные сушили 4—5 ч при 30° С/0,1 мм) получали 18 мг пептидолипида (IV);  $R_f$  0,55 (в системе А), 0,45 (бензол — этилацетат —  $\text{AcOH}$ , 25 : 10 : 0,2);  $[\alpha]_{546}^{22} -19,5^\circ$ ,  $[\alpha]_{365}^{22} -41^\circ$ ,  $[\alpha]_{366}^{22} -148^\circ$  (при 22° С;  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 2 : 1, с 0,4). Часть фракций, элюированных смесями  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (25 : 1 и 20 : 1), содержала хроматографически гомогенный пептидолипид (VII). После упаривания этих фракций и высушивания остатка получали 12 мг пептидолипида (VII);  $R_f$  0,35 (в системе Б), 0,6 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  —  $\text{AcOH}$ , 90 : 10 : 1), 0,6 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 180 : 20 : 1);  $[\alpha]_{546}^{22} +6,8^\circ$ ,  $[\alpha]_{434}^{22} -16^\circ$ ,  $[\alpha]_{312}^{22} -52^\circ$  (при 20° С;  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 2 : 1, с 0,25).

Фракцию кислотных липидов растворяли в 5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (2 : 1), раствор смешивали с 3 г силикагеля Л, смесь высушивали на роторном испарителе как указано выше, остаток суспензировали в  $\text{CHCl}_3$ , содержащем 1%  $\text{MeOH}$ , и вносили в колонку (15×2 см), заполненную силикагелем Л в том же растворителе. Вымывали последовательно смесями  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (по 70 мл) — 100 : 1, 80 : 1, 50 : 1 и 30 : 1. Элюат собирали фракциями объемом 5 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  —  $\text{AcOH}$ , 150 : 10 : 1 (Б). Начальные фракции, элюированные последней системой растворителей, содержали хроматографически гомогенный пептидолипид (V), последующие фракции — хроматографически гомогенный липид (VI). Из первых фракций получали 0,8 мг липида (V);  $R_f$  0,35 (в системе Б), из вторых — 16 мг липида (VI);  $R_f$  0,25 (в системе Б), 0,45 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — вода, 100 : 10 : 0,5), 0,55 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 65 : 25 : 4);  $[\alpha]_D^{22} -12,4^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 2 : 1; с 0,23).

**Выделение пептидолипидов (VIII) и (IX).** Суммарные клеточные липиды (1,45 г) экстрагировали гексаном по ранее описанной методике [10], оставалось 480 мг липидной фракции, не растворившейся в гексане. Фракцию растворяли в 3 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (9 : 1) и раствор наносили на колонку (25×3,5 см), заполненную DEAE-целлюлозой (Reanal, Венгрия;  $\text{AcO}^-$ -форма) в той же смеси растворителей. Этой же смесью (600 мл) элюировали 265 мг фракции нейтральных липидов. Последнюю растворяли в 5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (50 : 1) и раствор наносили на колонку (30×2 см), заполненную силикагелем КСК в той же системе растворителей. Вымывали последовательно смесями  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (по 400 мл) — 50 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 9 : 1, 8 : 1, 7 : 1 и 2 : 1. Элюат собирали фракциями объемом 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в

системе  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — вода, 85 : 15 : 1 (Г). Ряд фракций, элюированных смесью  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (8 : 1), содержал хроматографически гомогенный пептидолипид (VIII). После упаривания этих фракций и высушивания остатка получали 17 мг пептидолипида (VIII);  $R_f$  0,6 (в системе Г), 0,75 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — вода, 80 : 20 : 2 (Д)), 0,4 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  —  $\text{AcOH}$ , 80 : 20 : 1 (Е)), 0,6 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 90 : 10 : 1 (Ж)). Из фракций, элюированных смесью  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (7 : 1), получали 53 мг пептидолипида (IX),  $R_f$  0,4 (в системе Г), 0,6 (в системе Д), 0,3 (в системе Е), 0,5 (в системе Ж);  $[\alpha]_D^{20} -7,0^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 2 : 1, с 0,23).

Ацетат (IXa):  $R_f$  0,6 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$ , 9 : 1 (И));  $[\alpha]_{589} +15,2^\circ$ ,  $[\alpha]_{546} +27,2^\circ$ ,  $[\alpha]_{404,6} +79,4^\circ$ ,  $[\alpha]_{312,5} +144^\circ$  (при 20°C;  $\text{CHCl}_3$ , с 0,125).

*Выделение ацетата (Xa).* Последние фракции, элюированные с вышеописанной колонки смесью  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (7 : 1) и содержащие наряду с липидом (IX) пептидолипид (Х), упаривали досуха. Остаток (9 мг) ацетилировали как указано выше, смесь ацетатов растворяли в 0,5 мл  $\text{CHCl}_3$  и раствор наносили на колонку (10×1,5 см), заполненную силикагелем КСК в  $\text{CHCl}_3$ . Вымывали последовательно смесями  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (по 70 мл) — 100 : 1, 80 : 1, 50 : 1 и 40 : 1. Элюят собирали фракциями объемом 5 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе И. Начальные фракции, элюированные смесью  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (40 : 1), содержали 4 мг хроматографически гомогенного ацетата (IXa), затем элюировали 2,5 мг смеси ацетатов (IXa) и (Ха), из последующих фракций получили 2,0 мг хроматографически гомогенного ацетата (Ха);  $R_f$  0,5 (в системе И);  $[\alpha]_{589} +12,6^\circ$ ,  $[\alpha]_{546} +26,8^\circ$ ,  $[\alpha]_{404,6} +37,1^\circ$ ,  $[\alpha]_{312,5} +56,4^\circ$ ,  $[\alpha]_{302} +63,4^\circ$  (при 20°C;  $\text{CHCl}_3$ , с 0,18).

*Щелочной метанолиз ацетата (IXa) в гомогенных условиях.* К раствору 10 мг ацетата (IXa) в 1 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (2 : 1) добавляли при 20°C 0,1 мл 0,3 М раствора KOH в MeOH. Смесь тщательно перемешивали, оставляли на 2 ч при той же температуре, нейтрализовали дауэксом 50×8 ( $\text{H}^+$ ), обрабатывали раствором диазометана в эфире (30 мин, 20°C) и упаривали досуха. Остаток, по данным ТСХ, содержал метиловые эфиры миколовых кислот, глюкозу и пептидсодержащий продукт (IXb). Для количественного определения глюкозы аликвоту смеси продуктов реакции (~1 мг) обрабатывали смесью пиридина — гексаметилдисилазан — trimethylchlorosilane (6 : 3 : 0,5; 25°C, 30 ч) и анализировали при помощи ГЖХ в вышеописанных условиях. Оставшуюся часть продуктов реакции растворяли в 1 мл смеси  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (10 : 1) и раствор наносили на колонку, заполненную 5 г силикагеля КСК в той же смеси растворителей. Этой же смесью (20 мл) элюировали метиловые эфиры миколовых кислот, которые подвергали O-метилированию нодистым метилом в присутствии окиси серебра [9] и анализировали вышеописанным методом (результаты анализа см. в табл. 2). Смесью  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  (5 : 1; 20 мл) с колонки вымывали пептидсодержащий продукт (IXb);  $R_f$  0,6 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — вода, 75 : 25 : 2 (К)), 0,85 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — вода —  $\text{AcOH}$ , 70 : 30 : 2 : 2), 0,7 ( $\text{CHCl}_3$  —  $\text{MeOH}$  — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 80 : 20 : 1), па хроматограммах вещества не обнаруживалось анtronовым реагентом и периодатом — реагентом Шиффа.

*Щелочной метанолиз ацетата (IXa) в гетерогенных условиях.* К 10 мг ацетата (IXa) добавляли при 20°C 1 мл 0,05 М раствора KOH в MeOH. Смесь перемешивали при той же температуре до полной гомогенизации (около 1,5 ч) и сразу же обрабатывали вышеописанным способом. По данным ТСХ, полученная смесь продуктов реакции состояла из метиловых эфиров миколовых кислот и пептидсодержащего продукта (IXb) (свободные углеводы в метанолизате отсутствовали), которые разделяли при помощи хроматографии на колонке с силикагелем по вышеупомянутой методике. Полученные метиловые эфиры миколовых кислот подвергали O-метилированию, O-метилпроизводные анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии. Продукт метанолиза (IXb) имел  $[\alpha]_{589} -13^\circ$ ,

$[\alpha]_{343} -39,2^\circ$  (при 20° С; CHCl<sub>3</sub> — MeOH, 2 : 4, с 0,15);  $R_f$  0,45 (в системе K), на хроматограмме вещество давало положительную реакцию с антристоновым реагентом и с периодатом — реагентом Шиффа.

Аналогично проводили метанолиз в гомогенных и гетерогенных условиях ацетатов (VIIa) и (Xa).

**Кислотный метанолиз пептидолипидов (VIII) и (IX).** Смесь 5 мг пептидолипида (VIII) или (IX) и 2 мл 0,75 М раствора сухого HCl в MeOH кипятили 20 мин, после чего нейтрализовали дауэксом 2×8 (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) и упаривали досуха. Остаток экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (3×1 мл), экстракт промывали 1 мл 1% HCl и 1 мл воды, упаривали до объема ~0,2 мл и наносили на пластинку (10×10 см) с закрепленным слоем (0,4 мм) силикагеля G (Merck, ФРГ; 5% гипса), которую предварительно промывали в системе CHCl<sub>3</sub> — MeOH (2 : 1) и высушивали 6 ч на воздухе при 20° С и 1 ч при 105° С. Хроматограмму проявляли в CHCl<sub>3</sub>, сушили 15 мин на воздухе, опрыскивали 0,3% раствором морина в MeOH и сушили на воздухе в течение 1 ч. В УФ-свете наблюдали три основные зоны веществ, соответствующие метиловым эфирам нормальных незамещенных жирных кислот (мигрируют с фронтом растворителя), метиловым эфирам микролипидов (R<sub>f</sub> 0,05) и метиловому эфиру N-ацил-D-алло-изолейцина (XI) (R<sub>f</sub> 0,2). Последнюю зону отделяли и экстрагировали смесью CHCl<sub>3</sub> — MeOH (5 : 1). Получали хроматографически гомогенный продукт метанолиза (XI), R<sub>f</sub> 0,4 (бензол — этилацетат, 3 : 1), 0,4 (гексан — ацетон, 3 : 1).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lederer E. Biogenese, Struktur, biologische Wirkung der Lipide des Tuberkelbazillus.— Angew. Chem., 1964, B. 76, № 6, S. 241—280.
2. Goren M. B. Mycobacterial lipids: selected topics.— Bacteriol. Revs, 1972, v. 36, № 1, p. 33—64.
3. Barksdale L., Kwang-Shin Kim. Mycobacterium.— Bacteriol. Revs, 1977, v. 41, № 1, p. 217—372.
4. Asselineau C., Asselineau J. Lipides spécifiques des mycobactéries.— Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1978, v. 129A, № 1, p. 49—69.
5. Vilcas E., Miquel A. M., Lederer E. Sur l'isolement et la structure de la fortuitine, peptidolipide de *Mycobacterium fortuitum*.— Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 70, № 2, p. 217—218.
6. Lanéelle G., Asselineau J., Wolstenholme W. A., Lederer E. Détermination de séquence d'acides aminés dans les oligopeptides par la spectrométrie de masse. III. Structure d'un peptidolipide de *Mycobacterium johnnei*.— Bull. Soc. chim. France, 1965, № 17, p. 2133—2134.
7. Lanéelle G., Asselineau J. Isolement de peptidolipides à partir de *Mycobacterium paratuberculosis*.— Biochim. et biophys. acta, 1962, v. 59, № 3, p. 731—732.
8. Guinand M., Michel G. Structure d'un peptidolipide isolé de *Nocardia asteroides*, la peptidolipide NA.— Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 125, № 1, p. 75—91.
9. Баграков С. Г., Садовская В. Л., Розынов Б. В., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д. Липиды микобактерий. II. «Корд-фактор» и масс-спектрометрический анализ микролипидов кислот *Mycobacterium paraffinicum*.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 667—681.
10. Баграков С. Г., Мухитдинова О. А., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д. Липиды микобактерий. III. Мономикколат трегалозы из *Mycobacterium paraffinicum*.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 83—91.
11. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 460. 721.
12. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. Distribution of lipids in subcellular particles of guinea pig brain.— Biochem. J., 1964, v. 92, № 1, p. 91—100.
13. Shaw N. The detection of lipids on thin-layer chromatograms with the periodate—Schiff reagents.— Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 164, № 2, p. 435—436.
14. Баграков С. Г., Муратов В. Б., Розынов Б. В., Решетова О. С., Бергельсон Л. Д., Коронелли Т. В. Липиды микобактерий. V. Циклотетрапептид, ацилированный жирной кислотой, из *Mycobacterium paraffinicum*.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 563—573.
15. Баграков С. Г., Муратов В. Б., Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д., Коронелли Т. В. Липиды микобактерий. VII. N-Ацилтетрапептид с остатком микролипидов из *Mycobacterium paraffinicum*.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1087—1099.
16. Hoffman J. Oxidation of oligo- and polysaccharides with chromium trioxide.— Chem. Communns (Univ. of Stockholm), 1977, № 3, p. 7—30.

17. 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, № 1, p. 29–40.
18. Gelpi E., Koenig W. A., Gilbert J., Oró J. Combined gas chromatography-mass spectrometry of amino acid derivatives.—J. Chromatogr. Sci., 1969, v. 7, № 3, p. 604–613.
19. Halpern B., Westley J. W. High sensitivity optical resolution of *D,L*-amine acids by gas chromatography.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, v. 19, № 3, p. 361–363.
20. Halpern B., Westley J. W. High sensitivity optical resolution of poly-functional amino acids by gas liquid chromatography.—Tetrahedron Lett., 1966, № 21, p. 2283–2286.
21. Charles R., Beiter U., Feibusch B., Gil-Av E. Separation of enantiomers on packed columns containing optically active diamide phases.—J. Chromatogr., 1975, v. 112, № 1, p. 121–133.
22. Коронелли Т. В. Образование липидов микобактериями при использовании *n*-гексадекана и глюкозы.—Микробиология, 1968, т. 37, № 6, с. 984–987.
23. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 128–129.

Поступила в редакцию  
20.I.1981

## LIPIDS OF MYCOBACTERIA. VI. PEPTIDOLIPIDS OF THE PARAFFIN-OXIDIZING BACTERIUM *MYCOBACTERIUM PARAFFINICUM*. ISOLATION AND GENERAL CHARACTERIZATION

BATRAKOV S. G., MURATOV V. B., BERGELSON L. D., KORONELLI T. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Biology Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

From the total cell lipids of the paraffin-oxidizing bacterium *Mycobacterium paraffinicum* seven so far unknown peptidolipids have been isolated by means of silica gel, TEAE and DEAE cellulose chromatography, one of those being purified as an acetyl derivative. The isolated lipids proved to be fatty acyl derivatives of peptides. In the molecules of the three lipids revealing the highest mobilities on TLC the peptide fragments are composed of *L*-valine, *L*-threonine, and *L*-leucine residues in the molar ratio of 2:1:1. The peptide components of the remaining four lipids consist of glycine, *L*-leucine, *D-allo*-isoleucine, *L*-threonine, *L*-serine, *L*-homoserine and *D*-alanine residues present in the molar ratio of 3:3:2:2:2:1:1. Five of the peptidolipids contain O-mycoloyl substituents, three of those being glucosylated.