



УДК 577.114/115.5 : 577.152.311*3

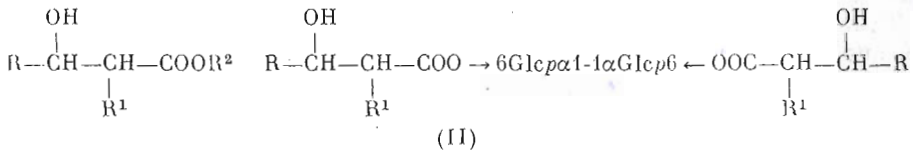
© 1991 г.

*К. Ю. Гордеев, В. Н. Моргунова, Г. Я. Дараселия,
С. Г. Ватраков*

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ МИКОЛОАТОВ ГЛЮКОЗЫ И ТРЕГАЛОЗЫ — СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЛИКОЛИПИДОВ МИКОБАКТЕРИЙ И РОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Научно-исследовательская лаборатория биологически активных веществ гидробионтов
МЗ СССР, Москва*

Многие специфические липиды бактерий семейства *Mycobacteriaceae* представляют собой эфиры миколовых кислот (МК) — жирных 3-гидроксикислот (I) с разветвленной цепью с числом углеродных атомов от 30 до 90 (см. обзоры [1—3]). Из этих липидов наиболее распространены 6,6'-ди-О-миколоаты α, α -D-трегалозы («корд-фактор») (II) и 6-моно-О-миколоаты α, α -D-трегалозы (III). Некоторые организмы в определенных условиях культивирования синтезируют значительные количества 6-О-миколоатов D-глюкозы (IV) или других сахаридов.



(I) $\text{R}^2 = \text{H}$

(III) $\text{R}^2 = \rightarrow 6\text{Glc}\rho\alpha 1-1\alpha\text{Glc}\rho$

(IV) $\text{R}^2 = \rightarrow 6\text{Glc}\rho 1 \sim \text{OH}$

$\text{R} =$ алкил $\text{C}_{15} - \text{C}_{90}$

(см. текст)

$\text{R}^1 =$ алкил $\text{C}_{10} - \text{C}_{24}$

Ацилтрегалозы (II) и (III) — высокоактивные иммуностимуляторы; кроме того, они, как и ацилглюкозы (IV), весьма токсичны для мелких лабораторных животных. Уровень того и другого вида физиологической активности существенно зависит от строения миколоильных остатков, вследствие чего эти элементы структуры гликолипидов (II) — (IV) вызывают особый интерес. Более того, строение углеродных цепей (R и R') МК (I) рассматривается как один из важнейших хемотаксономических признаков микроорганизмов вышеуказанного семейства. Наиболее разнообразны МК в липидах микобактерий — их основные цепи (R) могут содержать до 6 двойных связей, до 3 циклопропановых звеньев, до 3 вторичных метильных групп, а также кетоновые, метоксильные, эпоксидные и карбоксиалкильные группировки.

Для детального анализа структуры МК их отщепляют при помощи гидролиза или метанолиза в кислых или щелочных условиях. Однако в ходе этих реакций происходит частичное, а иногда и полное изменение нативной структуры [3—5] — дегидратация, обусловленная β -элиминированием, эдимеризация при асимметрических C-атомах, соседних с карбонильными группами (в частности, при C2), раскрытие эпоксидного цикла и другие превращения. За 30 с лишним лет, прошедших с начала исследования гликолипидов типа (II) — (IV) и их аналогов, предложен ряд вариантов гидролиза и алкоголиза, позволяющих в той или иной мере сократить масштаб побочных процессов (см., например, [5]), но, как это ни удивительно, не описано ни одной попытки применить для той же цели липолитические ферменты. Такая попытка сделана в настоящей работе.

Для ферментативного гидролиза миколоатов трегалозы (II) и (III) и глюкозы (IV), выделенных из клеток *Mycobacterium smegmatis* ИБФМ-44 и *Rhodococcus sp.* (*M. rubrum* ВКМ В-874 var. 44), использовали панкреатическую липазу свиньи (КФ 3.1.1.3, ICN, США) с активностью 1600 МЕ/мг. К раствору 10 мг гликолипида (II), (III) или (IV) в 20 мл смеси этанол — эфир (1 : 1; здесь и далее указывается объемное соотношение растворителей) добавляли 15 мл 10 мМ трис-НСl-буфера с рН 8,0. Смесь упаривали на ротационном испарителе при 20—25° С/15 мм до объема ~13 мл. К образовавшейся эмульсии прибавляли раствор 10 мкг липазы в 1 мл указанного буфера и смесь интенсивно перемешивали 38—42 ч при 30° С, после чего экстрагировали хлороформом (2 × 10 мл). Экстракт промывали 10 мл воды и упаривали досуха. Получали свободные МК без примеси посторонних веществ.

С целью многократного использования фермента та же панкреатическая липаза была иммобилизована обычным методом [6] на Сферах АРА 1000 и СН 300 (Lachema, ЧСФР). Содержание белка в полученных препаратах 23,2 и 20,1 мг/г, удельная активность препаратов 240 и 75 МЕ/г соответственно. Гидролиз проводили как описано выше; иммобилизованный фермент прибавляли в количестве, эквивалентном по активности 10 мкг коммерческой липазы.

Для качественного анализа реакционных смесей применяли ТСХ на пластинках с силикагелем G 60 (Merck, ФРГ) в системах хлороформ — метанол — вода (80 : 20 : 1) и гексан — эфир — АсОН (50 : 25 : 0,6). Вещества на хроматограммах обнаруживали путем обугливания с серной кислотой при ~200° С, а также антроновым реагентом на производные углеводов [7]. Количественный контроль процессов осуществляли при помощи ВЭЖХ на хроматографе «Милихром», снабженном колонкой (2 × × 5 мм) с силикагелем Silasorb 600, 5 мкм (Lachema). Элюировали смесью изопропанол — гексан — вода (80 : 60 : 1) со скоростью 30 мкл/мин; вымываемые вещества детектировали по оптическому поглощению элюата при 206 нм.

В описанных условиях реакции завершались через 36—38 ч. Для сравнения укажем, что метиловые эфиры МК полностью гидролизировались в тех же условиях за 16—18 ч. Во всех проведенных экспериментах липофильная фракция гидролизата независимо от природы гликолипида и формы фермента состояла только из свободных МК. Строение последних устанавливалось спектрофотометрическими методами [8]. Нативность структуры подтверждена хроматографическим сравнением полученных кислот с аналогичными кислотами, присутствовавшими в экстрактах бактериальных клеток в свободном состоянии и выделенными мягкими хроматографическими методами.

Боковая цепь (R¹) в миколоильных остатках должна существенно затруднять ферментативный гидролиз соответствующих эфиров (ср. [9]). Однако, как показывают результаты настоящей работы, гидролиз панкреатической липазой, по крайней мере рассмотренных эфиров МК (II) — (IV), протекает со скоростью, достаточной для практического использования этого способа деградациии в исследовании структур подобных липидов.

В заключение отметим небезынтересный факт, констатированный при гидролизе мономиколоатов трегалозы (III). В ходе реакции наблюдалось появление в реакционных смесях димиколоатов (II), причем их содержание достигало максимума (12% от исходного количества субстрата) к 12-му часу реакции, после чего постепенно снижалось. Этот факт свидетельствует о существовании наряду с гидролизом вторичного процесса — этерификации мономиколоатов (III) освобожденными МК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батраков С. Г. // Химия природ. соединений. 1985. № 2. С. 147—172.
2. Asselineau C., Asselineau J. // Progr. Chem. Fats and other Lipids. 1978. V. 16. P. 59—99.
3. Minnikin D. E. // The Biology of the Mycobacteria. V. 1 / Eds Ratledge C., Stanford J. L. London: Acad. Press, 1982. P. 95—184.

4. *Baba T., Kaneda K., Kusunose E., Kusunose M., Yano I.* // *Lipids*. 1988. V. 23. № 12. P. 1132—1138.
5. *Goren M. B., Dhariwal K. R., Jenkins I. D.* // *J. Chromatogr.* 1988. V. 440. P. 487—498.
6. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980. С. 202.
7. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981. Т. 1. С. 221—285.
8. *Батраков С. Г., Садовская В. Л., Розынов Б. В., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д.* // *Биоорг. химия*. 1978. Т. 4. № 5. С. 667—681.
9. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. С. 85—92.

Поступило в редакцию
2.X.1990

K. Yu. GORDEEV, V. N. MORGUNOVA, G. Ya. DARASELIYA, S. G. BATRAKOV
ENZYMATIC HYDROLYSIS OF GLUCOSE AND TREHALOSE MYCOLATES,
SPECIFIC GLYCOLIPIDS OF MYCOBACTERIA AND RELATED
MICROORGANISMS

*Research Laboratory of Biologically Active Substances of Hydrobionts,
 Ministry of Public Health of the USSR, Moscow*

6,6'-Di-O- and 6-O-monomycoloyl- α,α -D-trehaloses and 6-O-mycoloyl-D-glucoses, when subjected to hydrolysis with porcine pancreatic lipase (either soluble or immobilized form), release entirely their mycolic acids in the native state. Therefore, this degradation method has the obvious advantage over acidic and alkaline hydrolyses or alcoholyses and may be useful in studying the structures of glycolipids of the above and similar types. The hydrolysis of trehalose monomycolates is accompanied with the formation of the corresponding dimycolates, which disappear towards the end of the reaction.

Технический редактор *Н. Н. Беляева*

Сдано в набор 21.01.91	Подписано к печати 28.02.91	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. кр.-отт. 9,4 тыс.
	Тираж 728 экз.	Уч.-изд. л. 14,5
		Бум. л. 4,5
	Зак. 977	Цена 2 р. 60 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 306
 Телефон: 330-60-38

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6