



УДК 577.114/115.5

© 1991 г.

К. Ю. Гордеев, В. А. Ненашев, В. П. Моргунова,
Н. В. Демидова, Т. А. Цоцория*, Г. Я. Дараселия*,
С. Г. Ватраков

МИКОЛОАТЫ ГЛЮКОЗЫ И ТРЕГАЛОЗЫ ИЗ ШТАММА
RHODOCOCUS sp.: ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРОЕНИЕ И ДЕЙСТВИЕ
НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ

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

*Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси

Фракция бесфосфорных гликолипидов штамма *Rhodococcus* sp. (*Mycobacterium rubrum* ВКМ В-874 var. 44) состоит из 6,6'-ди- и 6-моно-О-миколоил- α, α -D-трегалоз и 6-О-миколоил-D-глюкопиранозы, на долю которых в заключительной стационарной фазе роста культуры приходится 1,4, 11,4 и 5,7% соответственно суммы экстрагируемых липидов клеток. В структурах гликолипидов преобладают остатки моноеновых миколовых кислот с 40, 42, 44 и 46 атомами углерода в углеродном скелете с двойной связью, расположенной при 9-, 11-, 13-, 15- или 17-м атоме углерода от концевой метильной группы основной цепи, и насыщенными боковыми цепями C₁₀, C₁₂ и C₁₄. Все три гликолипида разобщают окисление и фосфорилирование в митохондриях *in vitro*, подавляют дыхание митохондрий при использовании малата и пирувата в качестве субстрата, но ускоряют его при использовании сукцината в отсутствие акцептора фосфата. В этом отношении 6-О-миколоил-D-глюкопираноза существенно отличается от соответствующих метилгликозидов, изучавшихся ранее.

Исследование специфических липидов бактерий семейства *Mycobacteriaceae* имеет более чем 30-летнюю историю. За это время выделена и охарактеризована в отношении химического строения обширная группа уникальных липидов, а у некоторых из них обнаружена высокая физиологическая активность (см. обзоры [1—6]). Работы в этой области проводились главным образом с представителями родов *Mycobacterium* и *Nocardia* и в значительно меньшем масштабе с коринебактериями. Из организмов рода *Rhodococcus* пока изучено в рассматриваемом аспекте всего лишь несколько штаммов, принадлежащих к видам *R. erythropolis* (см. [7—13] и сообщения, цитированные в этих работах *) и *R. terrae* [14, 15], причем наиболее детально изучены культуры *R. erythropolis*, выращенные на средах, включающих в себя углеводороды как единственный источник углерода.

В исследованных родококках большую часть бесфосфорных специфических липидов составляли жирнокислотные эфиры сахаров (ЖКЭС). Во всех штаммах в числе основных ЖКЭС, а в большинстве штаммов доминирующими были 6,6'-ди-О-миколоаты α, α -D-трегалозы (I), в качестве минорных ЖКЭС присутствовали 6-моно-О-миколоаты (II) того же дисахарида. Одна из особенностей состава ЖКЭС культуры *R. terrae*, растущей на среде с глюкозой, заключалась в наличии значительного количества миколоатов глюкозы и их производных [15], которые не обнаружены в штаммах *R. erythropolis*, культивируемых на углеводородах. Строение этих гликолипидов не установлено. Следует добавить, что димиколоаты трегалозы (I) найдены практически у всех микроорганизмов

Сокращения: МЭМК — метиловые эфиры миколовых кислот, ЖКЭС — жирнокислотные эфиры сахаров.

* Штамму *M. paraffinicum* 134, служившему объектом исследования в ряде работ, в настоящее время присвоено наименование *R. erythropolis* ВКМ Ас-1261 Д.

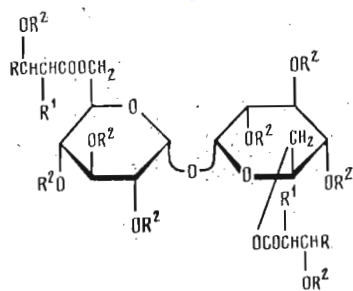
семейства *Mycobacteriaceae*, в достаточной степени изученных в отношении липидного состава, а в липидах некоторых штаммов наряду с ними обнаружены мономиколоаты (II) [2—6]. Показано также, что отдельные представители семейства при культивировании на средах с высокой концентрацией моно-, ди- и трисахаридов синтезируют миколоильные эфиры этих углеводов, которые иногда становятся основными гликолипидами клеток [2, 4, 5]. В частности, из клеток *Corynebacterium diphtheriae*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG [16], *Arthrobacter* sp. * [18] и *Brevibacterium thiogenitalis* * [19], растущих на средах с глюкозой, выделены миколоаты последней, которым приписано строение 6-О-миколоил-*D*-глюкопираноз (III). У эфиров трегалозы (I) и (II) выявлена высокая токсичность для лабораторных животных, которую объясняют способностью гликолипидов нарушать транспорт электронов в митохондриях [4, 5, 20]. Миколоат глюкозы из *R. terrae* также оказался токсичным [15], но его активность в отношении митохондрий, равно как и активность миколоатов (III), не изучалась, однако исследовались в этом аспекте метил-6-О-миколоил- α - и β -*D*-глюкопиранозиды (IVa, б), полученные полусинтетическим путем [20—23].

В настоящем сообщении описываются результаты исследования состава ЖКЭС штамма *Rhodococcus* sp. (*M. rubrum* ВКМ В-874 var. 44), культивируемого на среде, содержащей глюкозу и сахарозу, а также представлены результаты сравнительного изучения воздействия на дыхание митохондрий миколоатов (I)—(III) трегалозы и глюкозы, выделенных из этого организма.

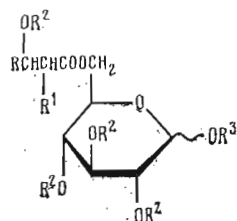
Анализ клеточных липидов родококка, экстрагированных смесями хлороформа и метанола, при помощи ТСХ привел к выводу о присутствии в клетках как минимум трех бесфосфорных гликолипидов. Каждый из них был получен в виде индивидуальной фракции ранее описанным методом [7]. Два гликолипида охарактеризованы как 6,6'-ди- и 6-моно-О-миколоил- α , α -*D*-трегалозы (I и II). При ТСХ и ВЭЖХ они имели одинаковую подвижность с одноименными липидами из *R. erythropolis* ВКМ Ас-1261 D (*M. paraffinicum* 134) [7—9]. Окончательно их строение подтверждено в результате масс-спектрометрии пер-О-ацетильных (Ia и IIa) и пер-О-тридекаацетильных (d_{24} -Ia и d_{24} -IIa) производных, анализа продуктов щелочного и кислотного метанолиза, продуктов деградации по Смитсу и сопоставления полученных данных с соответствующими опубликованными данными [8, 9]. При кислотном гидролизе мономиколоата трегалозы (II) в мягких условиях основными продуктами оказались глюкоза и липофильное вещество, не отличающееся по подвижности при ТСХ и ВЭЖХ от третьего выделенного гликолипида. По этой причине, а также по аналогии с вышеупомянутыми миколоатами глюкозы (III) из других микроорганизмов третьему гликолипиду предварительно была приписана структура 6-О-миколоил-*D*-глюкопиранозы (III). Представленные ниже результаты дальнейшего исследования липида полностью подтверждают ее.

В условиях кислотного метанолиза гликолипид распадался на аномерные метилглюкозиды и метиловые эфиры миколовых кислот (МЭМК, Va), а при щелочном метанолизе — на глюкозу и МЭМК; в обоих метанолизатах присутствовали также небольшие количества продуктов дегидратации МЭМК. Перечисленные продукты деградации идентифицированы при помощи ТСХ и ВЭЖХ, для идентификации МЭМК дополнительно использовали ИК-спектроскопию (характерная полоса $\nu_{C=O}$ с максимумом около 1730 см^{-1} [5, 8]) и масс-спектрометрию (см. ниже). Поскольку в условиях указанных реакций возможны изменения нативной структуры миколовых кислот [5, 24—26], помимо дегидратации, связанной с β -элиминированием, для достоверного определения состава миколоильных остатков гликолипида последний гидролизovali панкреатической липазой [27]. Свободные миколовые кислоты (V), единственный липофильный

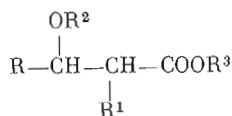
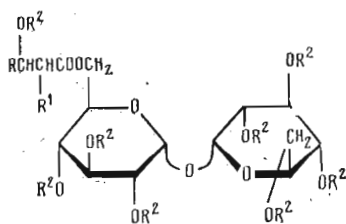
* Систематическое положение этих организмов нуждается в пересмотре, так как, согласно современной классификации, бактерии, синтезирующие миколовые кислоты, объединены в семейство *Mycobacteriaceae*, в которое роды *Arthrobacter* и *Brevibacterium* не входят [17].



- (1) $R^2 = H$
 (Ia) $R^2 = COCH_3$
 (d_{24} -Ia) $R^2 = COC^2H_3$



- (III) $R^2 = R^3 = H$
 (IIIa) $R^2 = R^3 = COCH_3$
 (d_{15} -IIIa) $R^2 = R^3 = COC^2H_3$
 (IV) $R^2 = H, R^3 = CH_3$
 а: α -аномер; б: β -аномер



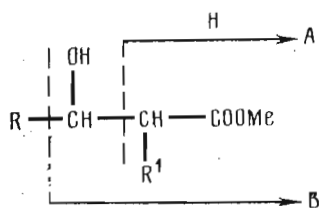
- (II) $R^2 = H$
 (IIa) $R^2 = COCH_3$
 (d_{24} -IIa) $R^2 = COC^2H_3$

- (V) $R^2 = R^3 = H$
 (Va) $R^2 = H, R^3 = CH_3$
 (d_3 -Va) $R^2 = H, R^3 = C^2H_3$
 (Vб) $R^2 = COCH_3, R^3 = CH_3$

Везде R — углеводородный остаток $C_{15}-C_{66}$; R^1 — n -алкил или алкенил C_8-C_{24}

продукт гидролиза, превращали в МЭМК (Va) действием диазометана и подвергали масс-спектрометрическому анализу (здесь и далее для иони-

Схема 1



(Va)

Основные пики в масс-спектрах МЭМК (Va) и соответствующих тридейтерометилловых эфиров (d_3 -Va), полученных из 6-О-миколоил-*D*-глюкопиранозы (III)

m/z по спектру Va	$I_{\text{отн.}}$ %	Тип иона	m/z по спектру d_3 -Va	Примечание
713	1,6	$M_1 - \text{HO}^{\cdot}$	716	48 : 2 *
699	1,4	$M_1 - \text{MeO}^{\cdot}$	699	48 : 2
687	9,8	$M_2 - \text{HO}^{\cdot}$	690	46 : 1
685	4,2	$M_3 - \text{HO}^{\cdot}$	688	46 : 2
681	2,0	$M_1 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	681	48 : 2
673	6,5	$M_2 - \text{MeO}^{\cdot}$	673	46 : 1
671	3,3	$M_3 - \text{MeO}^{\cdot}$	671	46 : 2
659	17	$M_4 - \text{HO}^{\cdot}$	662	44 : 1
657	4,6	$M_5 - \text{HO}^{\cdot}$	660	44 : 2
655	6,2	$M_2 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	655	46 : 1
653	3,1	$M_3 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	653	46 : 2
645	7,4	$M_4 - \text{MeO}^{\cdot}$	645	44 : 1
643	2,6	$M_5 - \text{MeO}^{\cdot}$	643	44 : 2
631	15	$M_6 - \text{HO}^{\cdot}$	634	42 : 1
627	8,3	$M_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	627	44 : 1
625	3,6	$M_5 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	625	44 : 2
617	5,8	$M_6 - \text{MeO}^{\cdot}$	617	42 : 1
603	11	$M_7 - \text{HO}^{\cdot}$	606	40 : 1
599	7,3	$M_6 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	599	42 : 1
589	6,1	$M_7 - \text{MeO}^{\cdot}$	589	40 : 1
577	2,0	$M_8 - \text{HO}^{\cdot}$	580	38 : 0
575	2,5	$M_9 - \text{HO}^{\cdot}$	578	38 : 1
571	6,6	$M_7 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	571	40 : 1
563	1,2	$M_8 - \text{MeO}^{\cdot}$	568	38 : 0
561	1,6	$M_9 - \text{MeO}^{\cdot}$	561	38 : 1
545	1,2	$M_8 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	545	38 : 0
543	1,4	$M_9 - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}$	543	38 : 1
299	45	<i>B</i>	302	14 **
271	83	<i>B</i>	274	12
270	100	<i>A</i>	273	14
243	38	<i>B</i>	246	10
242	83	<i>A</i>	245	12
214	19	<i>A</i>	217	10

* Для ионов $[M - \text{HO}^{\cdot}]^+$, $[M - \text{MeO}^{\cdot}]^+$ и $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}]^+$ указывается «число углеродных атомов: число двойных связей» в соответствующих миколовых кислотах; каждому пику иона $[M - \text{HO}^{\cdot}]^+$ сопутствует пик иона $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$, интенсивность которого составляет 70–85% интенсивности первого.

** Для ионов *A* и *B* указывается число углеродных атомов в боковой цепи (R^1).

зации применяли электронный удар). Параллельно анализировали соответствующие тридейтерометилловые эфиры (d_3 -Va).

Распад МЭМК при ионизации электронным ударом описан в ряде сообщений (см., например, [28, 29]), основные направления фрагментации демонстрирует схема 1.

В масс-спектре полученных МЭМК (Va) (табл. 1) наиболее интенсивные пики принадлежат ионам типа *A* и *B*; их массовые числа показывают, что боковые цепи в молекулах компонентов смеси насыщены и содержат 10, 12 или 14 атомов углерода ($R^1 = \text{C}_{10}\text{H}_{21}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ или $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$). В спектре дейтероаналогов (d_3 -Va) пики ионов *A* и *B* смещены на 3 а. е. м., что подтверждает сделанное отнесение. Наибольшие массовые числа в спектре МЭМК (Va) имеют ионы $[M - \text{HO}^{\cdot}]^+$, $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$ (см. примечание 1 к табл. 1), $[M - \text{MeO}^{\cdot}]^+$ и $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{MeO}^{\cdot}]^+$. Пики двух первых смещены в масс-спектре тридейтерометилловых эфиров (d_3 -Va) на 3 а. е. м., а двух последних сохраняют свое положение. На основании величин m/z этих ионов можно сделать вывод, что миколоильные остатки, входящие в структуры компонентов гликолипидной фракции, содержат четное число атомов углерода (от 38 до 48), а среди них преобладают молекулярные виды с одной двойной связью в основной цепи (*R*) и общим числом углеродных атомов 40, 42, 44 и 46. К такому же выводу привели результаты фракционирования 3-О-

Основные пики в масс-спектре триметилсилильных производных (VIa)

m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	Примечание*	m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	Примечание*
954	0,1	M^+	46	600	14	F	20
939	0,8	$M - \text{Me}^+$	46	599	21	D	22
926	0,2	M^+	44	371	12	E	14
911	2,2	$M - \text{Me}^+$	44	343	54	E	12
898	0,3	M^+	42	342	46	G	14
883	2,4	$M - \text{Me}^+$	42	327	41	C	15
870	0,3	M^+	40	315	80	E	10
855	2,4	$M - \text{Me}^+$	40	314	100	G	12
684	6,2	F	26	299	75	C	13
683	9,1	D	28	286	84	G	10
656	13	F	24	271	88	C	11
655	18	D	26	243	26	C	9
628	13	F	22	215	94	C	7
627	19	D	24				

* Для ионов M^+ и $[M - \text{Me}]^+$ указывается общее число углеродных атомов в углеродном скелете ($k + l + m + 7$), для ионов $C - k$, для ионов $D - (l + m)$, для ионов $F - (k + l)$, для ионов E и $G - m$.

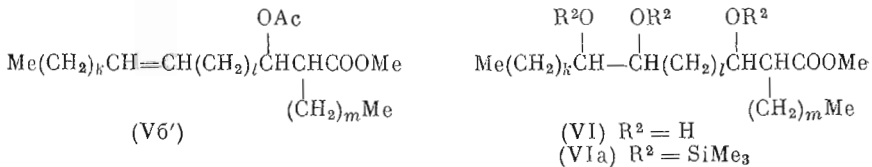
Таблица 3

Основные пики в масс-спектрах пер-О-ацетата (IIIa) и пер-О-тридейтероацетата (d_{15} -IIIa) 6-О-миконоил-*D*-глюкопиранозы

m/z по спектру IIIa	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона *	m/z по спектру d_{15} -IIIa	m/z по спектру IIIa	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона *	m/z по спектру d_{15} -IIIa
969	0,08	H_1	978	757	0,11	J_7	760
943	0,32	H_2	952	681	0,70	J_1	681
941	0,26	H_3	950	655	1,4	J_2	655
915	0,42	H_4	924	653	1,0	J_3	653
913	0,11	H_5	922	627	1,7	J_4	627
887	0,25	H_6	896	625	0,70	J_5	625
859	0,35	H_7	868	599	1,2	J_6	599
841	0,12	I_2	844	561	1,4	J_7	561
839	0,08	I_3	842	535	0,35	J_8	535
833	0,07	H_8	842	533	0,32	J_9	533
831	0,06	H_9	840	331	85	K	343
813	0,16	I_4	816	211	100	L	217
811	0,06	I_5	814	169	55	M	173
785	0,12	I_6					

* Ионам H , I и J , образующимся из одного и того же молекулярного иона, дан одинаковый подстрочный индекс, который соответствует индексу при « M » в табл. 1.

ацетатов МЭМК (V6) на аргентированном силикагеле и данные масс-спектров полученных субфракций. Субфракция моноеновых соединений (V6') составила 80% исходной суммы ацетатов (V6), а ее главные компоненты содержали 40—46 атомов углерода в углеродном скелете. На долю насыщенных и диеновых молекулярных видов приходилось 3 и 10% соответственно.

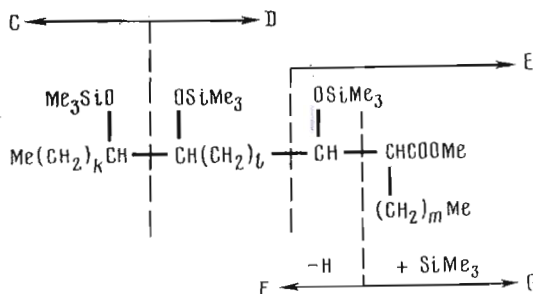


$$\begin{array}{l}
 k = 7, 9, 11, 13, 15; \quad k + l = 20, 22, 24, 26; \\
 l = 1, m = 22, 24, 26, 28; \quad m = 9, 11, 13
 \end{array}$$

Для определения положений двойной связи в молекулах моноеновых миконовых кислот субфракцию моноеновых 3-О-ацетатов (V6') окисляли осмиевым ангидридом, продукты реакции дезацетилировали в условиях щелочного метанолиза и образовавшиеся тригидроксиэфиры (VI) анализи-

ровали методом масс-спектрометрии в виде триметилсилильных производных (VIa). В области наибольших массовых чисел спектра (табл. 2, схема 2) регистрируются молекулярные ионы незначительной интенсивности, которые соответствуют компонентам фракции (VIa) с 40, 42, 44 и 46 атомами углерода в углеродном скелете. Основные диагностические ионы — C и D (их пики входят в число наиболее интенсивных в области $m/z > 150$) — возникают в результате разрыва связи между C-атомами, несущими вицинальные Me_3SiO -группы (ср. [30]). Массовые числа этих фрагментов позволяют заключить, что в доминирующих моноеновых миколовых кислотах двойная связь расположена при 9-, 11-, 13-, 15- или 17-м углеродном атоме от терминальной метильной группы основной цепи (R).

Схема 2



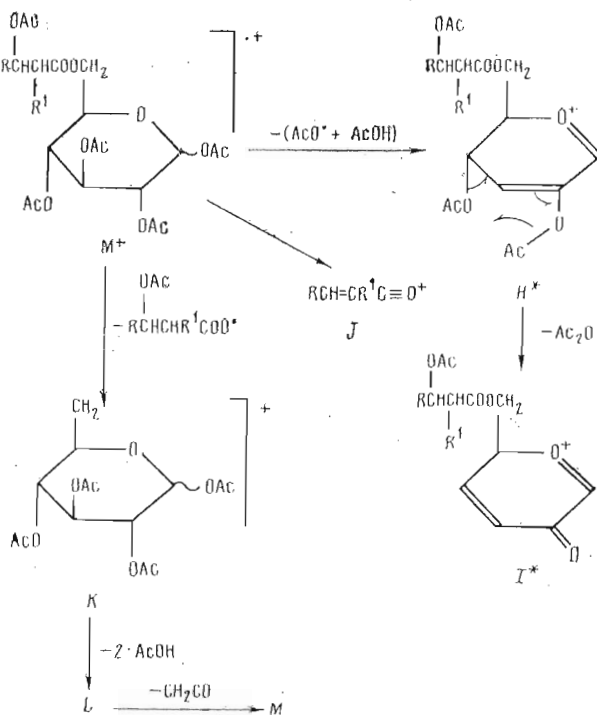
(VIIa)

Аналогичным образом анализировали состав миколоильных остатков в выделенных миколоатах трегалозы (I) и (II). Полученные результаты практически не отличались от вышеописанных. Заметим, что для бактерий семейства *Mycobacteriaceae* число углеродных атомов в синтезируемых ими миколовых кислотах — один из важнейших хемотаксономических признаков; в частности, для родококков характерны миколовые кислоты с 30—60 атомами углерода [11, 17, 31].

Дальнейшую информацию о строении гликолипида дали масс-спектры его пер-О-ацетильного (IIIa) и пер-О-тридейтероацетильного (d_{15} -IIIa) производных (табл. 3). Главные направления распада этих соединений под электронным ударом (схема 3) совпадают в основном с таковыми, характерными для пер-О-ацетатов ди- и моно-О-миколоатов трегалозы (Ia) и (IIa) [7, 9, 32]. В области наибольших массовых чисел масс-спектра производных (IIIa) присутствуют пики ионов $[M - \text{AcOH} - \text{AcO}]^+$ (H). Для доминирующих молекулярных видов гликолипидной фракции хорошо различимы пики ионов $[M - \text{AcOH} - \text{Ac}_2\text{O} - \text{AcO}]^+$ (I). В спектре дейтероаналогов (d_{15} -IIIa) массовые числа ионов первой группы возрастают на 9 а. е. м., а второй — на 3 а. е. м. Область m/z 600—700 содержит серию пиков ацильных фрагментов (J). Массовые числа всех рассмотренных ионов полностью соответствуют величинам m/z ионов $[M - \text{HO}]^+$ ($[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), которые регистрировались при масс-спектрометрии МЭМК (Va) (табл. 1). Максимальную интенсивность в спектре пер-О-ацетата (IIIa) имеет пик «углеводного» фрагмента (K). Смещение его на 12 а. е. м. в спектре пер-О-тридейтероацетата, во-первых, подтверждает происхождение этого иона, а во-вторых, свидетельствует о том, что в глюкозном остатке липида замещена только одна гидроксильная группа. Таким заместителем, очевидно, является остаток миколовой кислоты.

Представленные выше данные не позволяют сделать однозначный вывод о расположении миколоильного остатка и размере углеводного цикла. Для выяснения этих элементов структуры гликолипид подвергали расщеплению по Смитсу по ранее описанной методике [33] (схема 4). Липофильная фракция (VII) продуктов деградации при ТСХ мигрировала в виде единственного пятна (зоны). Эту фракцию обрабатывали тритил-

Схема 3



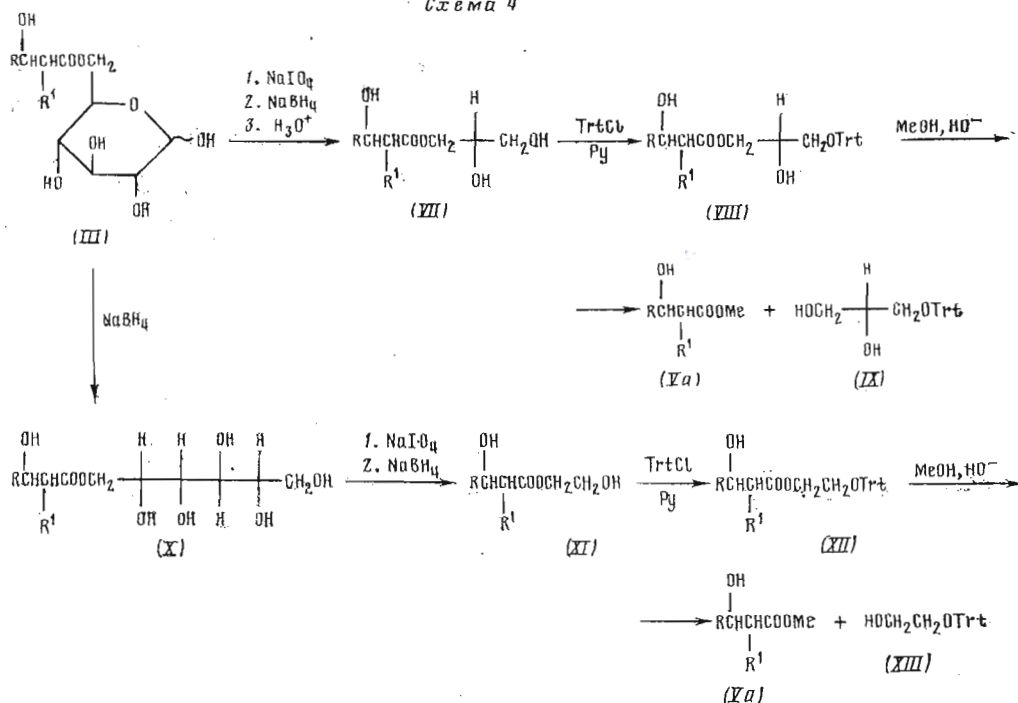
* Для ионов H и I приведена одна из возможных структур.

хлоридом [В] пиридине при 20° С, а полученное тритильное производное (VIII) подвергали щелочному метанолизу. В результате образовались два продукта, которые идентифицированы при помощи ТСХ и ВЭЖХ как МЭМК (Va) и тритилглицерин (IX) (ср. [9]). Отсюда вытекает, во-первых, что в молекуле нативного липида микоилоильный остаток связан с первичной кислородной функцией глюкозного остатка (при С6), а во-вторых, что последний имеет пиранозный цикл. Первый вывод подтверждается результатами следующих превращений (схема 4): восстановление гликолипида боргидридом натрия, расщепление по Смигу образовавшегося микоилоил-сорбита (X), тритилирование липофильного продукта деградации — 2-микоилоилоксиэтанола-1 (XI) в вышеуказанных условиях и щелочной метанолиз тритильного производного (XII) привели к МЭМК (Va) и 2-тритил-оксиэтанола-1 (XIII).

Таким образом, третий гликолипид, выделенный из клеток родококка, представляет собой 6-О-микоилоил-*D*-глюкопиранозу (III). Отнесение моносахаридного остатка к *D*-ряду сделано на основании сопоставления величин молекулярного оптического вращения обсуждаемого гликолипида (III), аналогичных гликолипидов, описанных ранее другими авторами, и метилгликозидов (IVa, б) (табл. 4). Те же данные указывают на преимущественную α -конфигурацию аномерного центра в выделенной микоилоилглюкопиранозе (III).

Из вышеизложенного следует, что фракция ЖКЭС в изучавшемся штамме *Rhodococcus* sp. состоит из 6,6'-ди- и 6-моно-О-миколатов α, α -*D*-трегалозы (I и II) и 6-О-микоилоил-*D*-глюкопиранозы (III). Они обнаружены в клетках на всех стадиях роста культуры, однако максимальное содержание их достигается в заключительной стационарной фазе — 1,1, 8,9 и 4,5 мг на 1 г сухих клеток, или 1,4, 11,4 и 5,7% суммы экстрагируемых липидов соответственно. Как и следовало ожидать, все три гликолипида оказались токсичными для мышей и крыс [34], хотя и в меньшей степени, чем трегалолипиды типа соединений (I) и (II) из микобактерий.

Схема 4



R, R¹ — алкильные остатки.

Известно [4, 5, 20—23], что действие димиколатов трегалозы (I) и некоторых их природных и полусинтетических аналогов на митохондрии проявляется, в частности, в подавлении дыхания и фосфорилирования, снижении дыхательного контроля и разобщении окисления и фосфорилирования. В связи с этим в настоящей работе определяли влияние ЖКЭС (I)—(III) из *Rhodococcus* sp. на скорость поглощения кислорода (V) суспензией митохондрий в трех состояниях: 1) при наличии в суспензии только субстрата — малата с пируватом или сукцината (с добавлением ротенона) (V₄); 2) в присутствии акцептора фосфата — ADP (V₃); 3) в присутствии 2,4-динитрофенола (DNP) — разобщителя окислительного фосфорилирования (V_{DNP}).

При использовании NAD-зависимого субстрата (малат + пируват) все три гликолипида подавляли дыхание (табл. 5), причем величина эффекта возрастала со временем. Аналогичную картину наблюдали другие авторы при изучении действия димиколатов трегалозы (I) и структурно родственных липидов и объясняли ее медленным включением этих веществ в митохондриальную мембрану [35, 36]. Скорость дыхания митохондрий на сукцинате, наоборот, увеличивалась гликолипидами (I)—(III), откуда следует, что торможение транспорта электронов в первом случае происходит на участке цепи переноса, предшествующем включению электронов от сукцината в общую цепь, т. е. на участке NADH-дегидрогеназа — убинон. Ускорение окисления сукцината может быть связано с активацией транспорта протонов через митохондриальную мембрану и сопряженного с ним транспорта электронов по цепи. Такой механизм ускорения дыхания имеет место при действии агентов, разобщающих окисление и фосфорилирование, например 2,4-динитрофенола. В этом случае одновременно падает скорость фосфорилирования, что проявляется в снижении скорости дыхания в присутствии акцептора фосфата — ADP (V₃) и падения дыхательного контроля (V₃/V₄). Соответствующие измерения показали (табл. 5), что ЖКЭС (I)—(III) родококка снижают величину V₃/V₄ до 1 и менее при использовании субстратов обоих видов, т. е. они не только ингибируют транспорт электронов на участке NADH-дегидрогеназа — убинон, но и разобщают окисление и фосфорилирование.

Оптическое вращение 6-О-миконолп-*D*-глюкопираноз (III) и соответствующих метилгликозидов (IVa, б)

Миколаты	Источник получения	$[\alpha]_D$, град	$[M]_D$ *, град	Литература
III	<i>Rhodococcus</i> sp.	+33,4	+270	**
III	<i>C. diphtheriae</i> .	+26,4	+185	[16]
III	<i>M. smegmatis</i>	+20,7	+290	[16]
IVa	Синтез	+22,5	+327	[21]
IVб	»	-6,5	-94	[22]

* При вычислении $[M]_D$ в расчет принимался «средний молекулярный вес» гликолипидной фракции, найденный исходя из состава миконольных остатков гликолипида.

** Данные настоящей работы.

Таблица 5

Действие миколатов сахаров на скорость дыхания (V_4) и дыхательный контроль (V_3/V_4) митохондрий

Миколат	Источник получения	Субстрат						Литература
		Сукцинат			Малат + пируват			
		Количество миколата, мкг/мг белка митохондрий	V_4 , %	V_3/V_4	Количество миколата, мкг/мг белка митохондрий	V_4 , %	V_3/V_4	
I	<i>Rhodococcus</i> sp.	0	100	2,9	0	100	1,9	*
		25	185	1,0	100	56	<1	
II	»	0	100	2,9	0	100	1,9	*
		20	210	1,0	100	29	<1	
III	»	0	100	3,1	0	100	2,2	*
		25	180	1,1	80	26	<1	
I	<i>M. tuberculosis</i>	0	100	3,1	0	100	2,2	[35]
		100	227	1,1	100	54	1,3	
IVa	Синтез	0	100	2,7	0	100	3,0	[21]
		25	105	2,6	25	105	2,5	
		100	104	2,5	100	100	1,5	
IVб	»	0	100	2,9	0	100	3,0	[22]
		25	104	2,9	25	124	2,0	
		100	117	2,7	100	110	1,4	

* Данные настоящей работы; V_3 и V_4 измеряли через 10 мин после введения гликолипидов в суспензию митохондрий при использовании малата с пируватом в качестве субстрата и через 5 мин при использовании сукцината.

Все три гликолипида (I)—(III), внесенные в суспензию митохондрий в количестве 100 мкг/мг белка, подавляли возрастание скорости дыхания, вызываемое DNP: индекс разобщения (V_{DNP}/V_4) в присутствии гликолипидов снижался до 1 и менее. Такой же эффект дают высокие концентрации динитрофенола, ингибирующие перенос протонов через мембрану [37]. Поэтому можно предположить совместное воздействие ЖКЭС (I—III) и динитрофенола на транспорт протонов. Однако, с другой стороны, нельзя исключить и прямое блокирование гликолипидами цепи переноса электронов.

Из вышеизложенного следует, что миколат глюкозы (III) воздействует на дыхание митохондрий подобно миколатам трегалозы (I и II), наблюдаются лишь некоторые различия в величине эффектов. Интересно сопоставить в этом аспекте гликолипид (III) и соответствующие метилгликозиды (IVa, б), полученные полусинтетическим путем на основе миколовых кислот из *M. tuberculosis* H37Rv [21, 22]. В отсутствие акцептора фосфата (ADP) гликозиды (IVa, б) не влияют на скорость дыхания при использовании как пирувата с малатом, так и сукцината (табл. 5). В присутствии ADP они активно подавляют окисление NAD-зависимого субстрата (пируват + малат), но лишь в малой степени замедляют дыхание на сукцинате. Иными словами, небольшое изменение структуры миколата глюкопиранозы

(III), каковым является метилирование полуацетального гидроксила, существенно отражается на его активности в отношении дыхания митохондрий. С другой стороны, наличие этого гидроксила совсем не обязательно для проявления всех сторон активности, что достаточно очевидно хотя бы из результатов исследования миколатов трегалозы (I и II), представленных в настоящем сообщении и в работах других авторов [4, 5, 20, 23].

Экспериментальная часть

Общие методы. ТСХ при анализе липофильных веществ проводили на пластинках (10×10 или 10×5 см) с силикагелем G 60 (Merck, ФРГ) в системах: гексан — эфир, 9 : 1* (система 1), 4 : 1 (2) и 1 : 2 (3), гексан — эфир — AcOH, 85 : 15 : 1 (4), бензол — диоксан, 10 : 1 (5), CHCl_3 — MeOH — вода, 80 : 20 : 2 (6) и 65 : 25 : 4 (7). Вещества на хроматограммах обнаруживали неспецифическим способом — обугливанием с H_2SO_4 при $\sim 200^\circ \text{C}$, а также специфическими реагентами [38]: антроновым реагентом и периодатом — реактивом Шиффа (на производные углеводов), молибденовой синью (на фосфолипиды), нингидриновым реагентом (на группу NH_2) и хлор-бензидиновым реагентом (на группу N—H). ТСХ углеводов осуществляли на тех же пластинках, импрегнированных 0,5 М раствором Na_2HPO_4 , в системе ацетон — изопропанол — 0,1 М лимонная кислота, 2 : 2 : 1, а также на пластинках с силикагелем GHPTLC (Merck), импрегнированных 0,15 М NaNH_2PO_4 , в системе *n*-BuOH — ацетон — вода, 4 : 5 : 1, и на пластинках с целлюлозой (Merck) в системе *n*-BuOH — AcOH — вода, 3 : 1 : 1. Вещества на хроматограммах обнаруживали периодатом — реактивом Шиффа и аммиаком серебра [38].

ВЭЖХ проводили на хроматографе «Милихром», снабженном колонкой (2×50 мм) и УФ-детектором, в изократическом режиме. При анализе свободных микловых кислот, гликолипидов и других полярных липидов в качестве сорбента использовали силикагель Silasorb 600, 5 мкм (Lachema, ЧСФР) и систему растворителей изопропанол — гексан — вода, 80 : 60 : 1 (50 мкл/мин); МЭМК, их ацетаты и все тритильные производные хроматографировали в системе гексан — этанол, 9925 : 75 (30 мкл/мин). Сахара анализировали на аминопропилированном силикагеле Silasorb-NH₂, 5 мкм (Lachema) в системе MeCN — вода, 85 : 15 (30 мкл/мин); метилгликозиды хроматографировали на липофильном силикагеле Silasorb C₁₈, 5 мкм (Lachema), используя бидистиллированную воду в качестве подвижной фазы (30 мкл/мин). Вещества детектировали по оптической плотности элюата при 205 нм; при хроматографировании смесей, содержащих трифенилметановые производные, осуществлялось параллельное детектирование при 260 нм.

Стандартами при хроматографическом анализе служили свободные миколовые кислоты (V), МЭМК (Va), 6,6'-ди- и 6-моно-О-миколил- α , α -D-трегалоза (I) и (II), другие гликолипиды и фосфолипиды, выделенные ранее из *R. erythropolis* ВКМ Ac-1261 D (*M. paraffinicum* 134) [7—10], *rac*-1-О-тритилглицерин и 2-тритилоксэтанол-1, синтезированные по известным методикам [39], а также коммерческие препараты углеводов, трифенилкарбинола и др.

Кислотный и щелочной метанолиз гликолипидов (I)—(II) проводили как описано ранее [7—10]. Однако липофильную фракцию каждого метанолизата перед спектрометрическим анализом хроматографировали на колонке с 5 г силикагеля L 40/100 (Lachema): 20 мл смеси гексан — эфир (9 : 1) элюировали малополярные примеси, в основном дегидратированные МЭМК, после чего смесью тех же растворителей в соотношении 4 : 1 вымывали индивидуальную фракцию МЭМК (Va).

Пер-О-ацетильные и пер-О-тридейтероацетильные производные гликолипидов получали обычным способом — обработкой гликолипидов смесью (1 : 1) пиридина и $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ или $(\text{C}^3\text{H}_3\text{CO})_2\text{O}$ (20—22° С, 16—20 ч). Очистку производных осуществляли на колонке Sep-pak Si (Waters, США) в системе гексан — эфир, 97 : 3.

* Везде указывается объемное соотношение растворителей.

Хроматография ЖКЭС из *Rhodococcus* sp. на колонке с силикагелем SPH 300

Соотношение CHCl ₃ —MeOH в элюенте	Фракции	Масса элюи- рованных липидов, мг	Состав элюиро- ванных липидов	R _f в системе 6	[α] _D ²⁰ , град (с)
99 : 1, 98 : 2	1—26	0	I	0,7	+38,2 (1,5)
97 : 3	27—36	44	I	0,7; 0,55	
97 : 3	37—39	2	I+III	0,55	+33,4 (1,5)
96 : 4, 95 : 5	40—58	36	III	0,5; 0,25	
95 : 5	59—65	2	НЛ (2) *	0,45	+41,4 (0,4)
94 : 6	66—75	4	НЛ (1)	0,35; 0,15; 0,4	
94 : 6, 93 : 7	76—99	3	НЛ (2) + II	0,4	+39,7 (1,8)
93 : 7, 92 : 8	100—111	52	II	0,4; 0,2	
92 : 8, 91 : 9, 90 : 10	112—130	2	II + НЛ		

* НЛ — неидентифицированные липиды (число пятен при ТСХ).

Масс-спектры регистрировали на приборе Varian MAT 44 (США) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ. ИК-спектры получали на спектрографе Perkin — Elmer 180 (США) в пленке вещества. УФ-спектры тритильных производных миколоильных эфиров регистрировали на спектрофотометре Hitachi 220 А (Япония) в изопропанол, а тритилпроизводных глицерина и этандиола — на хроматографе в процессе ВЭЖХ. Оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре Polamat А (Carl Zeiss Jena), ГДР) в СНCl₃.

Выращивание культуры родококка. Культуру *Rhodococcus* sp. (*M. rubrit* ВКМ В-874 var. 44) выращивали на жидкой синтетической среде следующего состава (вес. %): мочевины — 0,15, Na₂HPO₄ — 0,4; KH₂PO₄ — 0,3; MgSO₄ — 0,1; FeCl₃ — 1·10⁻⁴; тиамин — 1·10⁻⁶; глюкоза — 2,4; сахароза — 1,0; рН 7,2. Культивирование проводили в конических колбах емкостью 750 мл, содержащих по 100 мл среды, при встряхивании на круговой качалке (230 об./мин) при 30—37° С в течение 6 сут, клетки отделяли в стационарной фазе роста. Рост культуры контролировали по изменению оптического поглощения культуральной жидкости при 660 нм. По окончании ферментации клетки отделяли центрифугированием при 10 000 g при 2—4° С, промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали до постоянного веса.

Экстракция и предварительное фракционирование клеточных липидов. Клеточные липиды (4,97 г) экстрагировали из 48 г сухих клеток смесями СНCl₃ — MeOH (2 : 1 и 1 : 1) и освобождали от нелипидных примесей, пептидолипидов и большей части фосфолипидов путем экстракции гексаном [7]. Получали 2,91 г смеси липидов, которую хроматографировали на колонке (5 × 10 см), заполненной в СНCl₃ силикагелем L с размером частиц 40—60 мкм. Смесью СНCl₃ — MeOH, 99 : 1 (1500 мл), вымывали 2,05 г малополярных липидов, главным образом каротиноиды, воска, триацилглицерина, свободные миколовые и обычные жирные кислоты. Затем 1400 мл смеси тех же растворителей в соотношении 9 : 1 элюировали 148 мг фракции ЖКЭС.

Выделение гликолипидов (I) — (III). Раствор 147 мг фракции ЖКЭС в 1,5 мл СНCl₃ вносили в колонку (1 × 10 см), заполненную силикагелем SPH 300, 20 мкм (Lachema) в СНCl₃. Вымывали смесями СНCl₃ — MeOH с соотношением 99 : 1, 98 : 2, 97 : 3... 90 : 10 (по 65 мл). Элюат собирали фракциями по 5 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системах 1, 4, 6 и 7. Близкие по составу фракции объединяли и упаривали досуха, остатки сушили 4—5 ч при 30° С/0,02 мм. Результаты хроматографии представлены в табл. 6. В ИК-спектрах гликолипидов (I) — (III) присутствовали полосы, характерные для миколоатов сахаров [5, 7—9, 25]: 3200—3350 (ν_{OH}), 1728—1732 (ν_{C=O}) см⁻¹.

Кислотный гидролиз 6-О-миколоил-α,α-D-трегалозы (II). К перемешиваемой смеси 3 мл СНCl₃, 4 мл MeCN и 0,25 мл конц. HCl добавляли при 20° С раствор 4 мг мономиколоата трегалозы (II) в 0,5 мл СНCl₃. Смесь переме-

шивали 15 ч при 40° С, по охлаждении разбавляли 15 мл CHCl_3 , промывали водой (3 × 7 мл) и упаривали досуха. В остатке при помощи ТСХ в системах 4, 6 и 7, а также методом ВЭЖХ обнаруживали миколоат глюкозы (III), мономиколоат трегалозы (II) и свободные миколовые кислоты (V) в мольном отношении 10: 2 : 3 (по данным ВЭЖХ). Водную фазу нейтрализовали дауэксом 1 × 8 (HCO_3^-) и упаривали досуха. В остатке при помощи ВЭЖХ идентифицировали глюкозу и трегалозу в мольном отношении 10 : 1.

Ферментативный гидролиз гликолипидов (I)–(III) осуществляли по ране описанной методике [27], используя панкреатическую липазу свиньи (КФ 3.1.1.3; ICN, США) с активностью 1600 МЕ/мг белка. Свободные миколовые кислоты (V) превращали в МЭМК (Va) действием избытка CH_2N_2 в эфире и анализировали без предварительной очистки. Для МЭМК (Va): R_f 0,25 (система 1), 0,5 (5); $[\alpha]_D^{20} + 2,1^\circ$ (с 11); ИК-спектр: 3320 (ν_{OH}), 1731 ($\nu_{\text{C=O}}$) cm^{-1} .

Для получения соответствующих тридегтерометилловых эфиров (d_3 -Va) 0,5–1,0 мг свободных кислот (V) растворяли в 0,5 мл $\text{C}^2\text{H}_5\text{O}^2\text{N}$, раствор обрабатывали избытком $\text{C}^2\text{H}_5\text{N}_2$ в эфире [40] и смесь упаривали.

Разделение МЭМК (Va) по степени ненасыщенности. Фракцию МЭМК (Va) (5 мг), полученную при деградации гликолипида (I, II или III), ацетилировали смесью 0,1 мл Ac_2O и 0,1 мл пиридина (20° С, 10 ч). Ацетильные производные (Vб) без предварительной очистки подвергали ТСХ на пластинке (10 × 20 см) с силикагелем G (слой 0,2 мм), содержащим 10% AgNO_3 . Хроматограмму проявляли в системе 1, опрыскивали 0,2%-ным раствором родамина 6G в MeOH и сушили 15 мин при 20° С/20 мм. Зоны субфракций насыщенных (R_f 0,9), моноеновых (R_f 0,7) и диеновых (R_f 0,3) соединений обнаруживали в УФ-свете и снимали с пластинки. Указанные субфракции элюировали с сорбента смесью CHCl_3 — MeOH, 9 : 1, освобождали от индикатора путем распределения между гексаном и водой [8] и анализировали методами ВЭЖХ (количественное определение) и масс-спектрометрии.

Определение положения двойной связи в моноеновых миколовых кислотах. Субфракцию ацетильных производных моноеновых МЭМК (Vб') (3 мг) растворяли в 0,2 мл смеси диоксан — пиридин (4 : 1), к раствору добавляли при 20° С раствор 8 мг OsO_4 в 0,3 мл диоксана, смесь оставляли на 2 ч при той же температуре, после чего в нее пропускали газообразный H_2S . Осадок отделяли центрифугированием при 6000g и промывали 0,5 мл диоксана с последующим центрифугированием. Объединенную надосадочную жидкость упаривали досуха, остаток подвергали щелочному метанолизу по общей методике, получали тригидроксиэфир (VI), R_f 0,25 (система 2), который давал положительную реакцию с периодатом — реактивом Шиффа на хроматограмме.

Тригидроксиэфир (VI) превращали в триметилсилильное производное (VIa) действием Me_3SiCl и $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NH}$ в пиридине в обычных условиях и анализировали методом масс-спектрометрии.

Деградация по Смитцу 6-О-миколоил-D-глюкопиранозы (III). К раствору 5 мг миколоата глюкозы (III) в 0,5 мл смеси MeOH— CHCl_3 , 5 : 1, добавляли при 20° С при интенсивном перемешивании 1 мл 0,1 М раствора NaIO_4 в воде и смесь перемешивали при той же температуре 10 ч, после чего к ней добавляли 0,1 мл 10%-ного раствора этандиола в MeOH и перемешивание продолжали еще 20 мин. Затем к смеси добавляли 3 мл CHCl_3 , нижнюю фазу отделяли, промывали 1 мл воды и упаривали до объема ~0,2 мл. Остаток разбавляли 0,2 мл смеси MeOH — CHCl_3 , 2 : 1, обрабатывали при 2–4° С раствором 15 мг NaBH_4 в 1 мл MeOH, смесь оставляли на 4 ч при 20° С, после чего к ней добавляли 3 капли AcOH и через 15 мин 4 н. HCl до pH 1. Смесь перемешивали 3 ч при 20° С, разбавляли 3 мл CHCl_3 , промывали водой (3 × 1 мл) и упаривали досуха. Получали 3 мг 1-О-миколоил-*sn*-глицерина (VII); R_f 0,35 (система 3).

К раствору 3 мг миколоилглицерина (VII) в 0,1 мл пиридина добавляли при 5° С раствор 6 мг Ph_3CCl в 0,2 мл пиридина. Смесь выдерживали 12 ч при той же температуре, затем 12 ч при 20° С, разбавляли 3 мл CHCl_3 , промывали водой (4 × 1 мл) и упаривали досуха. Остаток растворяли

в 0,3 мл гексана и раствор вносили в колонку, заполненную 1 г силикагеля L 40/100 в гексане. Смесью гексан — эфир, 98 : 2 (10 мл), вымывали Rh_3COH , после чего 10 мл смеси гексан — эфир, 4 : 1, элюировали 3 мг 3-О-третил-1-О-миколоил-*sn*-глицерина (VIII); R_f 0,3 (система 1); УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ϵ 950). Последний подвергали щелочному метанолизу по общей методике. Продукты метанолиза идентифицировали как МЭМК (Va) и 3-О-третилглицерин (IX) при помощи ТСХ и ВЭЖХ. Для третилглицерина (IX): R_f 0,1 (система 1), 0,35 (5); УФ-спектр: λ_{max} 258 нм.

Восстановление 6-О-миколоил-D-глюкопиранозы (III). К раствору 3 мг миколоата глюкозы (III) в 0,1 мл смеси $\text{MeOH} - \text{CHCl}_3$, 5 : 1, добавляли при 0° С раствор 10 мг NaBH_4 в 0,5 мл MeOH . Смесь оставляли на 3 ч при той же температуре, затем разбавляли 1 мл MeOH , обрабатывали избытком дауэкса 50W \times 8 (H^+), катионит отфильтровывали, промывали на фильтре 1 мл MeOH , объединенный фильтрат упаривали досуха. Для удаления борной кислоты остаток растворяли в 1 мл MeOH и раствор упаривали досуха, эту операцию повторяли еще дважды. Получали 3 мг 6-О-миколоил-D-сорбита (X); R_f 0,15 (система 6), 0,75 (7), 0,6 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 7 : 3).

Деградацию 6-О-миколоил-D-сорбита (X) по Смитту осуществляли так же, как это описано для 6-О-миколоил-D-глюкопиранозы (III), за исключением того, что для удаления избытка NaIO_4 применяли пропандиол-1,2, а кислотный гидролиз продуктов боргидридного восстановления не проводили. Получали 2-миколоилоксиэтанол (XI); R_f 0,2 (система 2). В результате третилирования последнего и хроматографии продуктов реакции по вышеописанным методикам получили 2-миколоилокси-1-третилоксиэтан (XII); R_f 0,75 (система 1); УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ϵ 925).

Третильное производное (XII) подвергали щелочному метанолизу по общей методике. Продукты метанолиза идентифицировали как МЭМК (Va) и 2-третилоксиэтанол (XIII) при помощи ВЭЖХ и ТСХ. Для третилоксиэтанола (XIII): R_f 0,45 (система 1), 0,7 (5); УФ-спектр: λ_{max} 259 нм.

Регистрация дыхания митохондрий. Митохондрии печени крыс линии Вистар выделяли, хранили и анализировали на содержание белка как описано ранее [41]. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом [42] в термостатированной кювете объемом 1 мл при перемешивании при 25° С в инкубационной среде следующего состава (мМ): $\text{KCl} - 50$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 3$, трис- $\text{HCl} - 10$, сахараза — 150; pH 7,5. В инкубационную среду, помещенную в кювету и содержащую субстрат (4 мМ малат и 4 мМ пируват или 4 мМ сукцинат с 1 нМ ротеноном), вносили 20—100 мкл суспензии митохондрий (60—80 мг белка/мл). ЖКЭС (I—III) вводили в виде водных суспензий (3—5 мг/мл), приготовленных ранее описанным способом [36]. При измерении V_3 добавляли ADP до 0,2 мМ концентрации, а для разобщения дыхания добавляли DNP до 0,1 мМ концентрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ionedá T., Niigaki N. I., Edson T. A., Levy C. E. // Rev. Microbiol. 1989. V. 20. № 3. P. 345—348.
2. Батраков С. Г. // Химия природ. соединений. 1985. Т. 2. С. 147—172.
3. Verma J. N., Khuller G. K. // Adv. Lipid Res. 1983. V. 20. P. 257—316.
4. Minnikin D. E. // The Biology of Mycobacteria. V. 1 / Eds Ratledge C., Stanford J. London, New York: Acad. Press, 1982. P. 95—184.
5. Asselineau C., Asselineau J. // Progr. Chem. Fats and other Lipids. 1978. V. 16. P. 59—99.
6. Ionedá T., Silva C. L., Gesztesi J.-L. // Actinomycetes / Eds Schaal K. P., Pulverer G. Stuttgart, New York: G. Fischer, 1981. P. 401—406.
7. Batrakov S. G., Rozynov B. V., Koronelli T. V., Bergelson L. D. // Chem. and Phys. Lipids. 1981. V. 29. № 3. P. 241—266.
8. Батраков С. Г., Садовская В. Л., Розынов Б. В., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 5. С. 667—681.
9. Батраков С. Г., Мухитдинова О. А., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 1. С. 83—91.
10. Батраков С. Г., Муратов В. Б., Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д., Коронелли Т. В. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 1087—1099.
11. Koronelli T. V. // J. Chromatogr. 1988. V. 440. P. 479—486.

12. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 115. № 2. P. 491—503.
13. Kretschmer A., Bock H., Wagner F. // Appl. and Environm. Microbiol. 1982. V. 44. № 4. P. 864—870.
14. Sawai H., Sumi Y., Kurano S., Gondaira S., Kato Y., Tomiyasu I., Imaizumi S., Kaneda K., Yano I. // Якугаку дзасси = J. Pharm. Soc. Jap. 1987. V. 107. № 1. P. 37—45.
15. Kurano S., Sugimoto N., Sumi Y., Sawai H., Kato Y., Kaneda K., Yano I. // Якугаку дзасси = J. Pharm. Soc. Jap. 1987. V. 107. № 1. P. 46—52.
16. Brennan P. J., Lehane D. P., Thomas D. W. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 13. № 1. P. 117—123.
17. Jones D., Collins M. D. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed./ Eds Krieg N. R., Holt J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. P. 1435—1457.
18. Li Zu-Yi, Lang S., Wagner F., Witte L., Wray V. // Appl. and Environm. Microbiol. 1984. V. 48. № 3. P. 610—617.
19. Okazaki H., Sugino H., Kanzaki T., Fukuda H. // Agr. and Biol. Chem. 1969. V. 33. № 5. P. 764—770.
20. Asselineau J., Durand E., Lanéelle G., Rouanet J.-M., Tocanne J.-F. // Actinomycetes / Eds Schall K. P., Pulverer G. Stuttgart: G. Fischer, 1981. P. 391—400.
21. Kato M., Asselineau J. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 22. № 2. P. 364—370.
22. Asselineau J., Kato M. // Biochimie. 1973. T. 55. № 5. P. 559—568.
23. Durand E., Gillois M., Tocanne J.-F., Lanéelle G. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 94. № 1. P. 109—118.
24. Etémedi A. H. // Chem. and Phys. Lipids. 1967. V. 1. № 2. P. 165—175.
25. Goren M. B., Dhariwal K. R., Jenkins I. D. // J. Chromatogr. 1988. V. 440. P. 487—498.
26. Baba T., Kaneda K., Kusunose E., Kusunose M., Yano I. // Lipids. 1988. V. 23. № 12. P. 1132—1138.
27. Гордеев К. Ю., Моргунова В. И., Дараселия Г. Я., Батраков С. Г. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 574—576.
28. Bordet C., Michel G. // Bull. Soc. chim. biol. 1969. V. 51. № 3. P. 527—548.
29. Maurice M. T., Vacheron M. J., Michel G. // Chem. and Phys. Lipids. 1971. V. 7. № 1. P. 9—18.
30. Argoudelis C. J., Perkins E. G. // Lipids. 1968. V. 3. № 4. P. 379—381.
31. Minnikin D. E., Goodfellow M. // Microbiological Classification and Identification / Eds Goodfellow M., Board R. G. London: Acad. Press, 1980. P. 189—256.
32. Adam A., Senn M., Vilkas E., Lederer E. // Eur. J. Biochem. 1967. V. 2. № 4. P. 460—468.
33. Karlsson K.-A., Leffler H., Samuelsson B. E. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 574. № 1. P. 79—93.
34. Ненашев В. А., Гордеев К. Ю., Дараселия Г. Я., Буадзе М. О., Проневич Л. А., Батраков С. Г. // Бактериальные токсины. 2-я Всесоюз. конф. Юрмала, 27—30 нояб. 1989. Тез. докл. С. 92.
35. Kato M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1970. V. 140. № 2. P. 379—390.
36. Kato M. // J. Bacteriol. 1971. V. 107. № 3. P. 746—752.
37. Skulachev V. P., Sharaf A. A., Yagujzinsky L. S., Jasaitis A. A., Liberman E. A., Topali V. P. // Curr. Modern. Biol. 1968. V. 2. P. 98—105.
38. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981. Т. 1. С. 221—286.
39. Van der Neut J. H., Uhlenbreek J. H., Verkade P. E. // Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 1953. V. 72. P. 365—371.
40. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новоградская Е. Д., Чекакина Е. В. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 574—585.
41. Ненашев В. А., Придачина Н. Н., Проневич Л. А., Батраков С. Г. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 5. С. 784—787.
42. Кондрашова М. Н., Николаева Л. В., Чистяков В. В., Калинин Л. П. Руководство по изучению биологического окисления полиграфическим методом. М.: Наука, 1973. С. 50—59.

Поступила в редакцию
22.XI.1990

K. Yu. GORDEEV, V. A. NENASHEV, V. N. MORGUNOVA, N. V. DEMIDOVA,
T. A. TSOTSORIYA *, G. Ya. DARASELIYA *, S. G. BATRAKOV

GLUCOSE AND TREHALOSE MYCOLATES OF A *RHODOCOCCUS* SP.
STRAIN: ISOLATION, STRUCTURE AND EFFECT ON MITOCHONDRIAL
RESPIRATION

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

**Institute of Biochemistry of Plants, Academy of Sciences of the Republic Georgia, Tbilisi*

The cell lipids of *Rhodococcus* sp. (*Mycobacterium rubrum* VKM V-874 var. 44) contain a fraction of acylated sugars consisting of 6,6'-di- and 6-mono-O-mycoloyl- α,α -D-trehaloses and 6-O-mycoloyl-D-glucopyranose. At the stationary growth phase they account for 1.4, 11.4 and 5.7%, respectively, of the total extractable lipids. Among the mycoloyl residues of these glycolipids, predominant molecular species have 40, 42, 44 and 46 carbon atoms, saturated C₁₀, C₁₂ and C₁₄ side α -chains and a double bond located in the main chain at 9th, 11th, 13th, 15th or 17th carbon atom from the terminal methyl group. All the glycolipids affect electron transport in mitochondria in vitro, which is manifested in decoupling oxidation from phosphorylation, retarding mitochondrial respiration in the presence of NADH-linked substrates but accelerating it in the presence of succinate (with rotenone) without of phosphoryl acceptor, as well as in loss of the respiratory control. In this respect 6-O-mycoloyl-D-glucopyranose differs substantially from the related methyl glycosides previously studied by other authors.