



УДК 579.222:547.21

РАЗВЕТВЛЕННЫЕ АЛКАНЫ И ДРУГИЕ НЕПОЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ ЦИАНОБАКТЕРИЕЙ

Microcoleus vaginatus ИЗ ПУСТЫНИ НЕГЕВ

© 2001 г. В. М. Дембицкий*,***#, И. Дор**, И. Шкроб**, М. Аки***

* Факультет фармацевтической химии и природных соединений,
Фармацевтический институт Еврейского университета,
п.я. 12065, 91120, Иерусалим, Израиль;** Факультет наук об окружающей среде, Институт прикладных наук Еврейского университета,
91904, Иерусалим, Израиль;*** Группа природных липидов, Еврейский университет,
п.я. 39074, 91390, Иерусалим, Израиль

Поступила в редакцию 05.06.2000 г. Принята к печати 15.09.2000 г.

При помощи газовой хроматографии–масс-спектрометрии с использованием последовательно соединенных капиллярных колонок с разной полярностью стационарных фаз показано, что почвенная цианобактерия *Microcoleus vaginatus* из пустыни Негев продуцирует 4 нормальных и более 60 разветвленных алканов, состав которых необычен, а также ряд жирных кислот, циклических и ненасыщенных углеводородов, альдегидов, спиртов и кетонов. Преобладающими соединениями являются гептадекан (12%), 7-метилгептадекан (7.8%), гексадекановая кислота (6.5%), (Z)-9-гексадеценная кислота (5.6%), 4-этил-2,2,6,6-тетраметилгептан (2.8%), (Z)-9-октадеценная кислота (2.8%) и 4-метил-5-пропилнонан (2.7%).

Ключевые слова: алканы разветвленные; жирные кислоты; альдегиды; спирты; кетоны; газовая хроматография–масс-спектрометрия; почвенные цианобактерии; *Microcoleus vaginatus*.

ВВЕДЕНИЕ

Твердые корки микробных образований обнаруживают на поверхности почв по всему миру: как в тропических, так и в полярных областях [1]. Главная особенность таких образований в аридных зонах – это доминирование в них почвенных сине-зеленых водорослей (цианобактерий), в особенности тех видов, которые образуют клеточные оболочки и продуцируют углеводороды [2]. Было показано, что у выживших к настоящему времени древних форм цианобактерий углеводородный состав подобен составу осадочных пород [3–5].

Ранее мы описали микробные образования, которые широко представлены в почвах пустыни Негев и бассейна Мертвого моря, и соответствующие почвенные водоросли [6, 7]. Из этих микробных ковров было выделено несколько образцов цианобактерий рода *Microcoleus* [8, 9]. Климатические условия оказывают решающее влияние на состав микробных популяций и почвенных цианобактерий. Основным фотосинтезирующим микроорганизмом в коврах *Microcoleus* является *M. vaginatus* – типичная цианобактерия почвенной микрофлоры пустынь [8, 10–12], которая широко распространена во многих регионах мира и,

в частности, встречается повсеместно в микробных коврах в северо-восточной части пустыни Негев, носящей название Хацева [11]. Климат этой пустыни характеризуется чрезвычайной сухостью – количество осадков не превышает 30 мм в год. Здесь очень жаркое лето, и температура воздуха обычно составляет 50°C при низкой влажности, а температура поверхности почвы днем может достигать весьма высоких значений, например, наибольшая средняя полуденная температура почвы в июле составляет 90°C. Для пустыни Негев характерен и повышенный уровень УФ-радиации [13].

Цианобактерии рода *Microcoleus* содержат полисахариды [9, 11, 14, 15], каротиноиды [16] и микоспоринподобные аминокислоты [17]. Летучие компоненты почвенной бактерии *M. chichonoplastes* были изучены Гримальтом и др. [2], а жирнокислотный и углеводородный состав образцов *M. vaginatus*, собранных в пустыне Негев, был недавно описан нами [18]. Мы показали, что основными углеводородами в этих образцах являются *n*-гептадекан и 6- и 7-метилгептадеканы, и образцы содержат много разветвленных алканов.

В цианобактериях большинства видов присутствуют незначительные количества углеводородов с короткой цепью (13–21 C-атомов в молекуле), при-

Автор для переписки (e-mail: dvalery@cc.huji.ac.il).

чем преобладающими компонентами часто являются *n*-гептадекан или *n*-гептадецен [2, 3, 19–22]. Недавно мы описали сложный углеводородный состав и летучие соединения, продуцируемые культурой цианобактерии *Nostoc* sp. [23]. С помощью газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ–МС) мы идентифицировали более 130 соединений, среди которых 11 изомерных производных циклопентана, 41 циклогексановое производное и множество углеводородов с короткими цепями (от 7 до 14 С-атомов). В цианобактериях рода *Aphanizomenon* были также обнаружены короткоцепочечные жирные кислоты (гидрокси-, разветвленные и насыщенные) и дикарбоновые кислоты [24, 25].

Это сообщение – продолжение наших исследований по изучению липидных компонентов цианобактерий [23–25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа посвящена идентификации ряда летучих соединений в *M. vaginatus* с помощью ГХ–МС. Анализ разветвленных алканов и жирных кислот этой цианобактерии позволил идентифицировать около девяноста различных углеводородов, жирных кислот и других летучих соединений и оценить их количественное содержание (см. табл. 1 и 2).

n-Алканы

В клетках *M. vaginatus*, выделенных из микробных ковров пустыни Негев и выращенных на сухом агаре и затем на среде ВГ-11, мы обнаружили четыре *n*-алкана: октан, тетрадекан, октадекан и, основной, гептадекан (12%) (табл. 1, рис. 1). Сообщения о том, что *n*-гептадекан – основной алкан

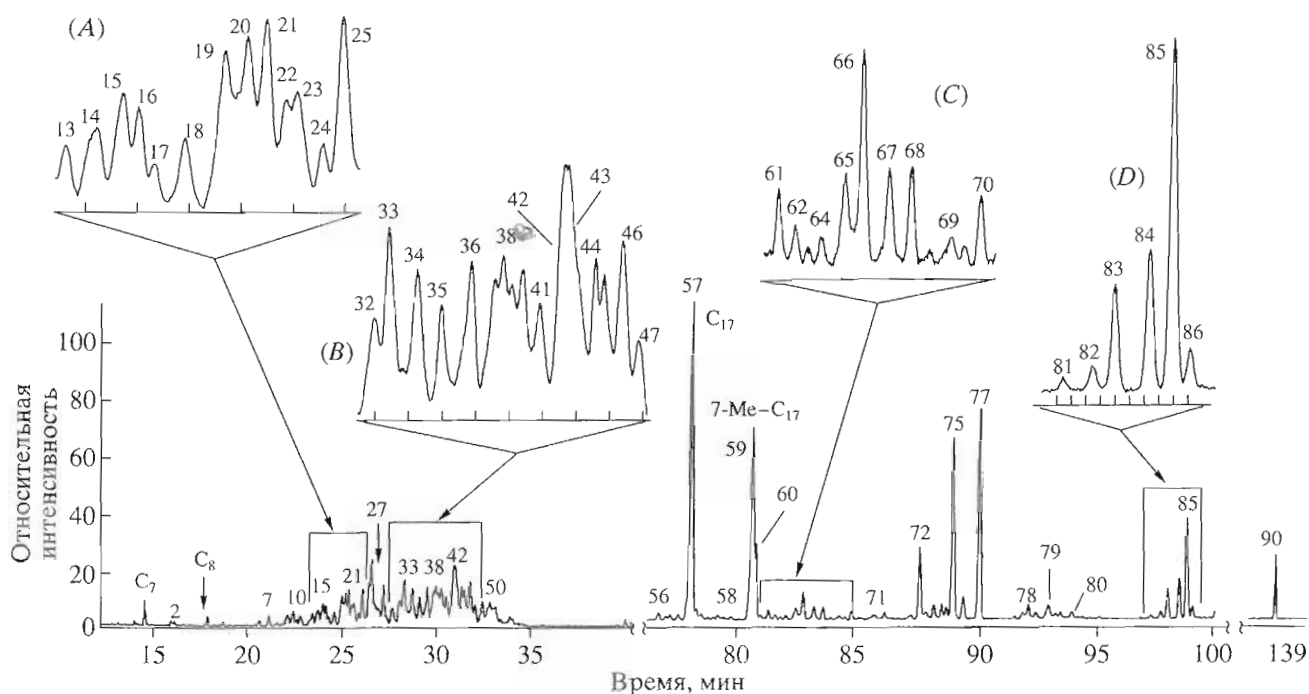


Рис. 1. Хроматограмма углеводородов и жирных кислот почвенной сине-зеленой водоросли *M. vaginatus*. Разделение алканов и МЭ ЖК проводили с помощью газовой хроматографии на двух последовательно соединенных капиллярных колонках с разными полярными фазами (см. “Эксперимент. часть”). Полная временная развертка хроматограммы – 150 мин; показаны участки 12–40, 70–100 и 139 мин.

В увеличенном масштабе представлены пики, которым соответствуют: А: 13 – 4-пропилгептан; 14 – 3,4,5-триметилгептан; 15 – 2,6,6-триметилгептан; 16 – 4-метилдекан; 17 – 2,3-диметилнонан; 18 – 2,5,6-триметилгептан; 19 – 2,4,6-триметилгептан; 20 – 2,3,7-триметилгептан; 21 – 2,5-диметилундекан; 22 – 2,4,6,8-тетраметилнонан; 23 – 3,5,7-триметилдекан; 24 – 2,2,6-триметилдекан; 25 – 4,7-диметилундекан; В: 32 – 5-бутилнонан; 33 – 2,6,7-триметилдекан; 34 – 2,3,7-триметилдекан; 35 – 5-этилундекан; 36 – 5,7-диметилундекан; 37 – 2,3,5-триметилдекан; 38 – 2-метил-6-этилдекан; 39 – 3-метил-3-этилдекан; 40 – 5-(1-метилпропил)нонан; 41 – 2,6-диметилдодекан; 42 – 4-метил-5-пропилнонан; 43 – тетрадекан; 44 – 6-метилтридекан; 45 – 2,7,10-триметилдодекан; 46 – 2,6,10-триметилдодекан; 47 – 2,4-диметилтридекан; С: 61 – 5-метилгептадекан; 62 – 4-метилгептадекан; 63 – 3-метилгептадекан; 64 – 2-метилгептадекан; 65 – МЭ пентадекановой кислоты; 66 – МЭ 12-метилтетрадекановой кислоты; 67 – МЭ 9-метилтетрадекановой кислоты; 68 – октадекан; 69 – изопропилмиристан; 70 – 7-гексилтридекан; D: 81 – МЭ 6,12,15-октадекатриеновой кислоты; 82 – МЭ 8,10,13-октадекатриеновой кислоты; 83 – МЭ (Z,Z,Z)-9,12,15-октадекатриеновой кислоты; 84 – МЭ (Z,Z)-9,12-октадекадиеновой кислоты; 85 – МЭ (Z)-9-октадеценной кислоты; 86 – МЭ 10-октадеценной кислоты.

Идентификация остальных пиков приведена в табл. 1.

Таблица 1. Углеводороды, идентифицированные среди метаболитов *Microcoleus vaginatus*

Номер пика*	Соединение	Время удерживания, мин	Мол. масса	Содержание, %
n-Алканы				
4	Октан	17.768	114	0.325
43	Тетрадекан	31.333	198	1.160
57	Гептадекан	77.936	240	12.046
68	Октадекан	83.436	256	0.427
				Всего: 13.958
Метилалканы				
2	4-Метилгептан	15.803	114	0.124
3	2-Метилгептан	16.014	114	0.077
12	3-Метилнонан	23.334	142	0.586
16	4-Метилдекан	24.192	156	0.248
44	6-Метилтридекан	31.463	198	1.275
49	5-Метилпентадекан	32.669	226	0.873
53	4-Метилгексадекан	65.553	240	0.428
55	2-Метилгексадекан	69.321	240	0.124
59	7-Метилгептадекан	80.499	254	7.839
60	6-Метилгептадекан	80.621	254	1.592
61	5-Метилгептадекан	81.136	254	0.342
62	4-Метилгептадекан	81.422	254	0.171
63	3-Метилгептадекан	81.640	254	0.098
64	2-Метилгептадекан	81.865	254	0.158
				Всего: 13.935
Диметилалканы				
5	2,4-Диметилгексан	18.596	114	0.098
6	2,3-Диметилгептан	20.561	128	0.158
11	3,3-Диметилоктан	22.696	142	0.393
17	2,3-Диметилнонан	24.487	156	0.488
21	2,5-Диметилундекан	25.464	184	0.556
25	4,7-Диметилундекан	26.362	184	1.463
27	3,7-Диметилундекан	26.619	184	0.492
30	4,6-Диметилундекан	27.594	184	0.864
31	3,5-Диметилундекан	28.026	184	1.249
36	5,7-Диметилундекан	29.832	184	1.352
41	4,6-Диметилдодекан	30.873	198	2.178
47	2,4-Диметилтридекан	32.205	212	0.415
				Всего: 9.706
Триметилалканы				
10	2,2,4-Триметилгексан	22.493	128	0.137
14	3,4,5-Триметилгептан	23.888	142	0.813
15	2,6,6-Триметилоктан	24.038	156	0.552
18	2,5,6-Триметилоктан	24.875	156	1.194
19	2,4,6-Триметилоктан	25.092	156	1.249
20	2,3,7-Триметилоктан	25.271	156	1.159
23	3,5,7-Триметилдекан	25.820	184	0.351

Таблица 1. Окончание

Номер пика*	Соединение	Время удерживания, мин	Мол. масса	Содержание, %
24	2,2,6-Триметилдекан	26.009	184	1.249
29	2,6,6-Триметилдекан	27.125	184	1.425
33	2,6,7-Триметилдекан	28.668	184	1.772
34	2,3,7-Триметилдекан	29.031	184	1.309
37	2,3,5-Триметилдекан	29.958	184	1.335
45	2,7,10-Триметилдодекан	31.740	212	1.853
46	2,6,10-Триметилдодекан	31.921	212	1.006
48	2,6,11-Триметилдодекан	32.289	212	1.108
				Всего: 16.512
Этилалканы и полиразветвленные алканы				
1	3-Этилпентан	13.399	100	0.852
7	3-Этилгептан	21.074	128	0.282
8	2,2-Диметил-3-этилпентан	22.024	128	0.509
9	2,2,3,4-Тетраметилпентан	22.310	128	0.534
13	4-Пропилгептан	23.624	142	0.723
22	2,4,6,8-Тетраметилнонан	25.568	184	0.761
26	2,2,6,6-Тетраметил-4-этилгептан	26.506	184	2.862
28	9-Этилундекан	26.858	184	0.565
32	5-Бутилнонан	28.241	184	1.994
35	5-Этилундекан	29.480	184	1.951
38	2-Метил-6-этилдекан	30.082	184	0.847
39	3-Метил-3-этилдекан	30.241	184	1.438
40	5-(1-Метилпропил)нонан	30.500	184	1.352
42	4-Метил-5-пропилнонан	30.921	198	2.725
50	6-Пентилундекан	33.822	226	0.389
70	7-Гексилтридекан	84.918	268	0.141
89	9-Октилэйкозан	121.504	394	0.309
90	2,6,10,15,19,23-Гексаметил-2,6,10,14,18,23-тетракозагексаен (сквален)	139.687	410	0.454
				Всего: 18.688

* На хроматограмме, см. рис. 1.

цианобактерий, появились более тридцати лет назад [19–22, 26]. Гелпи и др. [3] определили, что основные углеводороды *M. lyngbyaceus* – алканы $C_{15}H_{32}$ (10%), $C_{16}H_{34}$ (20%) и $C_{17}H_{36}$ (70%). Высокое содержание алкана $C_{17}H_{36}$ (более 80%) было обнаружено и во многих других видах цианобактерий [22].

Монометилалканы

В клетках *M. vaginatus* мы идентифицировали 14 метилалканов (табл. 1, рис. 1). В наибольших концентрациях присутствовали 7-метилгептадекан (7.8%), 6-метилгептадекан (1.6%) и 6-метилтридекан (1.3%). По данным Гримальята и др. [2],

метилалканы являются минорными компонентами ковров *Microcoleus* из дельты р. Эбро (Южная Каталония, Испания). Для микробных образований пустынь Среднего Востока характерно большое разнообразие разветвленных алканов. Так, в пробах из Гавиш Сабха (Синай) присутствуют умеренные количества разнообразных метилалканов, среди которых представлены 4-, 5- и 6-метилгептадеканы, 8-метилпентадекан, 8-метилгексадекан, 6-, 7-, 8- и 9-метилнонадеканы, а также 6- и 7-метилоктадеканы [27]. Микробные ковры из Абу-Даби содержат значительные количества 8-метилгексадекана, 6- и 7-метилгептадеканов, 6-, 7- и 8-метилнонадеканов; 4-метилгептадекан, 5-метилоктадекан; в минорных количествах в них

Таблица 2. Жирные кислоты и другие метаболиты, обнаруженные в *Microcoleus vaginatus*

Номер пика*	Соединение	Время удерживания, мин	Мол. масса	Содержание, %
Жирные кислоты (в виде метиловых эфиров)				
58	Тетрадекановая	79.006	242	0.209
65	Пентадекановая	82.288	256	0.547
66	12-Метилтетрадекановая	82.597	256	0.984
67	9-Метилтетрадекановая	83.094	256	0.513
69	Изопропиловый эфир миристиновой кислоты	84.653	270	0.284
73	7,10-Гексадекадиеновая	88.093	266	0.479
74	(Z)-7-Гексадеценовая	88.413	268	0.389
75	(Z)-9-Гексадеценовая	88.798	268	5.687
77	Гексадекановая	90.045	270	6.543
78	Дигексиловый эфир угольной кислоты	92.092	230	0.518
79	2-Метилгексадекановая	92.406	284	0.180
80	Гептадекановая	93.891	284	0.166
81	6,12,15-Октадекатриеновая	97.214	292	0.132
82	8,10,13-Октадекатриеновая	97.651	292	0.235
83	(Z,Z,Z)-9,12,15-Октадекатриеновая	97.921	292	0.899
84	(Z,Z)-9,12-Октадекадиеновая	98.407	294	1.211
85	(Z)-9-Октадеценовая	98.732	296	2.876
86	10-Октадеценовая	98.939	296	0.317
87	Октадекановая	99.936	298	0.192
88	15-Октадеценовая	101.833	298	0.197
				Всего: 22.558
Спирты, кетоны и алкены				
51	Гексадеканол	44.694	242	0.308
52	6,10-Диметил-5(E),9-ундекадиен-2-он	62.409	194	0.616
54	3,7,11-Триметил-2,6,10-додекатриен-1-ол	67.238	222	0.162
56	8-Гептадецен	76.978	238	0.167
71	Октадеканаль	85.581	268	0.239
72	1,18-Нонадекадиен	87.507	264	2.328
76	14-Метил-8(Z)-гексадецен-1-ол	89.231	254	0.791
				Всего: 4.611

* На хроматограмме, см. рис. 1.

обнаруживаются также 6-, 7- и 8-метилнонадеканы [28]. Цианобактерии, образующие ковры поблизости от горячих источников, также продуцируют разнообразные монометилалканы. 5-Метилгептадекан является доминирующим, а 6- и 7-метилгептадеканы – минорными метилалканами среди идентифицированных в цианобактериальном ковре вблизи термальной зоны Оракей Корако в Новой Зеландии [29]. Монометилгептадеканы со значительным содержанием 7-метилизомера были также обнаружены в ковре цианобактерий близ горячего источника в Йеллоустонском национальном парке [30]. В образцах микробных ковров, собранных поблизости от горячих источ-

ников Исландии, где преобладает *Mastigocladus laminosus*, основными метилалканами были 5- и 6-метилгептадекан и гораздо меньше содержалось 2-, 3-, 4-, 8- и 9-метилгептадеканов [31]. 4-Метилгептадекан, найденный в *Chlorogloea fritschii*, составлял 11.5% суммы углеводов [19]. 2-, 3-, 4-, 5-, 6- и 7-Метилгептадеканы были выделены из цианобактерии *Calothrix scopulorum* [32], а 7- и 8-метилгептадекан – из культур *P. luridum* [4].

Диметилалканы

Среди метаболитов *M. vaginatus* мы обнаружили 12 диметилалканов. Преобладающими явля-

ются 4,6-диметилдодекан (2.1%) и 4,7-диметилундекан (1.4%), а на изомерные диметилундеканы приходится основное количество алканов этой группы (табл. 1, рис. 1).

Преобладание диметилалканов среди соединений, выделенных из ковров цианобактерий, привело к предположению, что цианобактерии – основной источник этих углеводородов в природе [28, 29, 31, 32]. В цианобактериальных коврах из Гавиш Сабха (Синай), расположенного неподалеку от пустыни Негев, де Лейв и др. идентифицировали 7,10- и 6,10-диметилдодеканы [27]. Кениг и др. обнаружили широкий спектр диметилалканов в современных и голоценовых микробных образованиях из Абу-Даби [28]. 5,13-Диметилгептадекан преобладает в смеси изомеров, выделенных из микробных ковров у горячих источников в Исландии [31]. Кроме того, диметилгептадекан также является основным углеводородом в современном цианобактериальном ковре с атолла Хао во Французской Полинезии [33], изомерные диметилгептадеканы были найдены в культуре цианобактерии *P. luridum* [34, 35] и в культуре *Calothrix* sp. [32].

Триметилалканы

Мы обнаружили в *M. vaginatus* 15 триметилалканов. Наибольшее количество изомеров (шесть) было идентифицировано среди производных декана; найдено также четыре изомерных триметиллоктана и три изомерных триметилдодекана. Хорошее разделение изомеров триметилдекана (пики 23, 24, 29, 33, 34 и 37, рис. 1) подтверждает их идентичность. Недавно изомеры триметилгептадекана выделены из волокнистой цианобактерии *Calothrix scopulorum* [32]. Триметилалканы широко представлены и в липидах некоторых насекомых [36].

Этилалканы и полиразветвленные алканы

Эта группа углеводородов доминирует у *M. vaginatus* (18.7%, табл. 1). Мы также детектировали высокоразветвленный ненасыщенный углеводород (пик 90), который идентифицировали по масс-спектру как сквален (молекулярный ион при m/z 410; характерные фрагментные пики: основной, m/z 81, интенсивный дублет при m/z 136 и 137, фрагментные пики при $M - 69$ и -43). Ранее сквален был обнаружен в нескольких водорослях и цианобактериях [3], тогда как насыщенные и ненасыщенные углеводороды были выделены из многих видов микроводорослей [37].

В *M. vaginatus* мы обнаружили пять необычных разветвленных алканов гомологичного строения (рис. 2): 3-этилпентан (0.852%), 4-пропилгептан (0.723%), 5-бутилнонан (1.994%), 6-пентилундекан (0.389%), 7-гексилтридекан (0.141%), а также 9-октилэйкозан (0.309%); масс-спектры этих соединений приведены на рис. 3. Для всех этих углеводородов характерны молекулярные пики малой интенсивности и фрагментация с потерей соответствующих алкильных фрагментов. Интересная особенность их масс-спектров – появление дублетных пиков для фрагментных ионов C_2 (m/z 70/71), C_3 (m/z 98/99), C_4 (m/z 126/127), C_5 (m/z 154/155) и C_6 (m/z 182/183); при этом пики фрагментных (перегруппировочных) ионов с четной величиной m/z имеют большую интенсивность, чем нечетные. Эти гомологичные разветвленные алканы не были ранее обнаружены в природных источниках, и их присутствие следует, по-видимому, считать характерной особенностью цианобактерий.

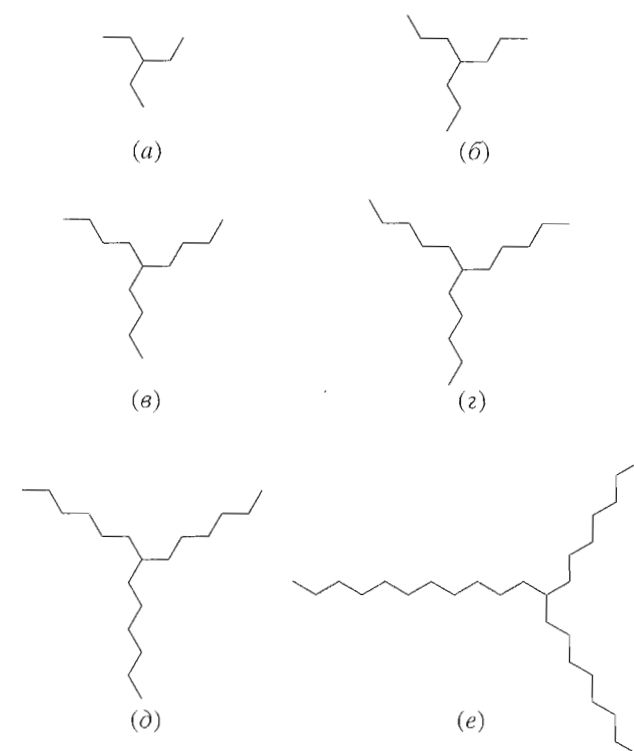


Рис. 2. Пять гомологичных разветвленных алканов необычного строения и 9-октилэйкозан, идентифицированные в цианобактерии *M. vaginatus*: 3-этилпентан (а), 4-пропилгептан (б), 5-бутилнонан (в), 6-пентилундекан (г), 7-гексилтридекан (д), 9-октилэйкозан (е).

Высоконенасыщенные изопреноидные алканы часто встречаются в морских отложениях [38]. Так, Волкмач и др. [37, 39] и Сининге Дамсте и др. [40] идентифицировали разветвленные алкены C_{25} – C_{30} с 3–6 двойными связями в культурах диатомовых водорослей *Haslea ostrearia* и *Rhizosolenia setigera*, соответственно. Врэг и др. [41] и Белт и др. [42] установили положение двойных связей в

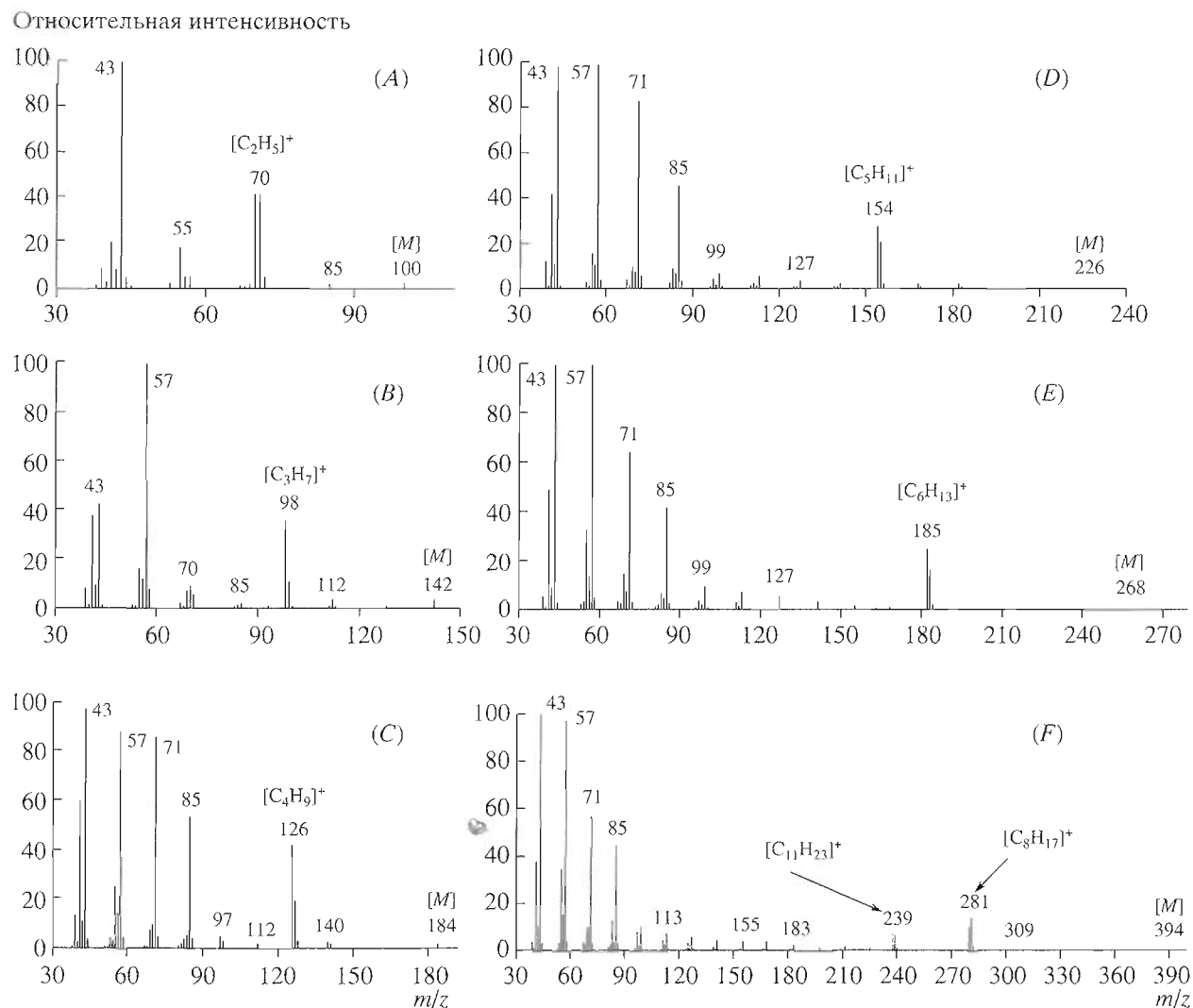


Рис. 3. Масс-спектры некоторых разветвленных алканов, выделенных из почвенной цианобактерии *M. vaginatus*. (A) – 3-этилпентан (пик 1, см. табл. 1), (B) – 4-пропилгептан (пик 13), (C) – 5-бутилнонан (пик 32), (D) – 6-пентилундекан (пик 50), (E) – 7-гексилтридекан (пик 70), (F) – 9-октилэйкозан (пик 89).

алканах $C_{25:3}$, $C_{25:4}$, $C_{25:5}$ и $C_{25:6}$, выделенных из *H. ostrearia*. Разветвленные октадеканы, содержащие этильный, бутильный и пентильный заместители, были идентифицированы в ряде образцов сырой нефти различного возраста [43]. Авторы предполагают, что источником этих разветвленных алканов могли бы быть цианобактерии.

Жирные кислоты

Цианобактерии всех видов синтезируют углеводороды, содержание которых обычно меньше, чем содержание жирных кислот [19, 21, 22]. Однако, как показано в нашей работе, в случае почвенной цианобактерии *M. vaginatus* суммарное содержание углеводородов составляло 72.8% от всех неполярных метаболитов, тогда как содержание жирных кислот достигало только 22.5% (табл. 1 и

2). Среди жирных кислот (табл. 2) основными были 16 : 0 (29% от общего содержания жирных кислот), (Z)-9-16 : 1 (25%) и (Z)-9-18 : 1 (12.8%). В меньших количествах содержались также кислоты (Z,Z)-9,12-18 : 2 (5.4%), 12-Me-14 : 0 (4.4%) и (Z,Z,Z)-9,12,15-18 : 3 (4%); состав минорных жирных кислот приведен в табл. 2. Состав жирных кислот, продуцируемых *M. vaginatus*, не имеет существенных отличий в сравнении с большинством других цианобактерий [22, 44].

Алкены, спирты и кетоны

Содержание алкенов, спиртов и кетонов этих соединений и их число были наименьшими по отношению к другим летучим в условиях анализа соединениям (4.6%, табл. 2). Наиболее интересны два вещества этой группы: 3,7,11-триметил-

2,6,10-додекатриен-1-ол (I) (рис. 1, пик 54) (масс-спектр, m/z (I , %): 69 (100), 41 (82), 81 (23), 29 (21), 55 (20), 93 (18), 107 (5), 121 (4), 136 (3), 179 (1), 191 (1), 222 (0.5)) и (5E)-6,10-диметил-5,9-ундекадиен-20-он (II) (рис. 1, пик 52) (масс-спектр, m/z (I , %): 43 (100), 69 (38), 41 (36), 151 (12), 107 (10), 136 (6), 194 (1)). Структуры этих веществ и основные пути их фрагментации приведены на рис. 4.

Ненасыщенный изопреноидный спирт фарнезол (I) является производным фарнезана, а кетон (геранилацетон) (II) – продуктом окисления спирта (I). У многих цветов основу аромата составляет запах фарнезола, тогда как фарнезен и его геометрические изомеры известны как “феромоны тревоги” [45, 46]. Геранилацетон является растительным аттрактантом для насекомых; он выделен из летучих соединений, продуцируемых дикими видами *Medicago* [47, 48]. 1,8-Нонадекадиен был найден в дюфуровой железе трех видов евроафриканских муравьев *Messor* и северо-американских *Pogonomyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) [49], в летучем секрете дюфуровой железы рабочих особей бродячих муравьев *Dorylus* (*Anomma*) *molestus* [50], в частично окаменевших листьях мха *Sphagnum* и корешках *Ericaceae* [51]. Множество жирных спиртов, альдегидов и кетонов было выделено из микроводорослей [37, 52].

Идентификация углеводов и других соединений

Изучение диагностических ионов с использованием интерпретатора масс-спектров из программ NIST98 и AMDIS проводили для каждого индивидуального пика углеводорода, метилового эфира жирной кислоты (МЭ ЖК) или другого соединения. Данная программа позволяет относить каждый ион (m/z) к соответствующему фрагменту целой молекулы и одновременно определять химическую структуру этого фрагмента (т.е., его структурную и/или эмпирическую формулу). Таким образом, при исследовании индивидуального пика на хроматомасс-спектрограмме с использованием интерпретатора масс-спектров NIST98, мы получали полную информацию обо всех осколках, которые образовывались в результате фрагментации природного соединения. Имея же масс-спектр соответствующего стандартного компонента из базы данных библиотек масс-спектров (Wiley 138 и 275, NBS75, и NIST98 Mass Spectral Library) и данные о фрагментных ионах этого природного соединения (m/z , их эмпирические и/или структурные формулы), мы могли устанавливать его структуру. Сканирование индивидуального пика проводили, как правило, в трех точках, а основной масс-спектр получали для максимальной точки пика и при максимально возможном увеличении.

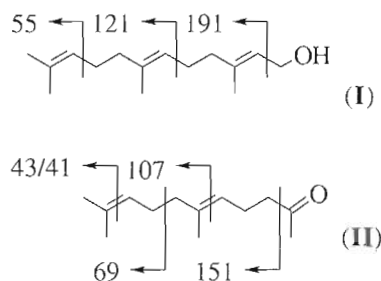


Рис. 4. Структуры и основные пути фрагментации фарнезола (I) и геранилацетона (II).

Индивидуальность каждого пика на хроматограмме определяли с помощью программ Chemstation HP-98 и приложений, а также программы NIST98. В некоторых случаях, когда на хроматомасс-спектрограмме какие-либо соединения не разделялись и одному пику могло соответствовать два компонента или более, использовали программу селективной идентификации (MassLib/PC, Mülheim/Ruhr) для каждого из компонентов. При этом изучали масс-спектры каждого компонента отдельно за вычетом ионов, принадлежащих другим компонентам. В этом случае достоверная вероятность идентификации каждого компонента не превышала 90%.

Используя описанную выше процедуру идентификации индивидуальных разветвленных алканов, мы идентифицировали новые, не найденные ранее в живых организмах гомологи (рис. 2): 3-этилпентана, 4-пропилгептана, 5-бутилнонана, 6-пентилундекана, 7-гексилтридекана, а также 9-октилэйкозана, масс-спектры которых приведены на рис. 3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микробные образования были собраны в сентябре 1998 г. в районе Хацева пустыни Негев, где были выявлены их обширные скопления (ковры) [6, 11, 53]. *M. vaginatus* Gom. (Microcoleoideae, Phormidiaceae) выделяли из образцов микробных образований и культивировали по методу [12, 53]. Культуру клеток выращивали на сухом агаре и затем на среде BG-11 при 27°C, как описано в работе [12], при освещении люминесцентным белым светом ($50 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ на поверхности сосуда) в течение 4 мес. Клетки отделяли центрифугированием, лиофилизировали и хранили при глубоком охлаждении [23, 24]. Эталонные образцы этой цианобактерии находятся в хранилище факультета наук об окружающей среде Института прикладных наук Еврейского университета (Иерусалим, Израиль).

Лиофилизованные клетки (460 мг) выдерживали 6 ч при 60°C в 100 мл смеси метанол–вода–конц. HCl, 90 : 9 : 3 (об.) в сосуде с плотно закры-

той пробкой. После охлаждения до 10°C к ним прибавляли 150 мл холодной смеси вода-пентан, 2 : 1 (об.), перемешивали 1 ч, фильтровали через бумажный фильтр (Whatman № 1), и слой разделяли. Пентановый слой упаривали в вакууме, а водный экстрагировали 150 мл хлористого метилена, и экстракт также упаривали в вакууме. Остатки от упаривания обоих экстрактов растворяли каждый в 2.5 мл смеси пентан-CH₂Cl₂, 1 : 1 (об.), объединяли и использовали для ГХ-МС-анализа.

ГХ проводили на приборе Hewlett-Packard 5890 (series II), модифицированном для стеклянных капиллярных колонок и снабженном МС-детектором Hewlett-Packard 5971В MSD. Разветвленные алканы и МЭ ЖК анализировали, применяя две последовательно соединенные стеклянные капиллярные колонки фирмы Restek (Пенсильвания, США): RTX-1 (0.25 мм × 30 м, толщина фазы 0.25 мкм) и затем RTX-1701 (0.25 мм × 30 м, толщина фазы 0.25 мкм); в качестве газа-носителя использовали гелий (25 см/с). Температурная программа: выдержка при 40°C (2 мин), линейный градиент до 300°C (2°C/мин) и выдержка при 300°C (20 мин); температура инжектора 180°C, ввод образца без разделения потока (splitless). Задержка растворителя составляла 10 мин. Температура МС-детектора 194°C, энергия ионизации 70 эВ; диапазон сканирования 30–650 ед. *m/z* (0.9 ед./с). Дополнительно применяли также единичную капиллярную колонку SP-2560 (Supelco, США, 0.25 мм × 100 м, толщина фазы 0.20 мкм); температурная программа: выдержка при 40°C (2 мин), линейный градиент до 150°C (5°C/мин), линейный градиент до 250°C (12°C/мин) и выдержка при 250°C (20 мин); скорость гелия 10 см/с.

Углеводороды и МЭ ЖК идентифицировали путем поиска в МС-библиотеках NBS75, Wiley 138 и Wiley 275 по данным удерживания и путем сравнения с опубликованными масс-спектрами. Для определения индексов удерживания проводили одновременное введение стандартных смесей МЭ ЖК (C₁₀ : 0–C₂₀ : 0) и *n*-алканов (C₁₀–C₃₀). Для идентификации разветвленных алканов применяли метод [54]; в этом случае полученные относительные факторы удерживания преобразовывали в вычисленные индексы удерживания, подобные индексам Ковача.

Учитывая, что среди алканов и других неполярных компонентов *M. vaginatus* присутствует более девяноста соединений, а содержание некоторых из них не превышает 0.1%, количественное содержание каждого компонента определяли (и приводили в таблицах) с точностью до 0.001%, используя для расчетов стандартные углеводороды.

Для идентификации МЭ ЖК и других летучих компонентов также использовали процедуру ГХ-МС, описанную нами ранее [23–25, 55]. Дополнительную идентификацию монометил-, диметил-, триметил-, этил-, пропил- и бутилалканов проводили по расчетным индексам, временам удерживания и масс-спектрам, используя данные, взятые из работ [23, 28, 32, 43, 56–61], в которых разветвленные алканы были идентифицированы с применением газовой хроматографии, ГХ-МС и ¹³C-ЯМР-спектроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Starks T.S., Shubert L.E., Trainor F.R. // *Phycologia*. 1981. V. 20. P. 65–80.
2. Grimalt J.O., de Wit R., Teixidor P., Albages J. // *Org. Geochem.* 1992. V. 19. P. 509–530.
3. Gelpi E., Schneider H., Mann J., Oro J. // *Phytochemistry*. 1970. V. 9. P. 603–612.
4. Brassel S.C. // *Isopentenoids and Other Natural Products: Evolution and Function* / Ed. W.D. Nes. Washington: American Chemical Society, ACS Symp. Series 562, 1994. Ch. 1. P. 1–30.
5. Summons R.E. // *Organic Geochemistry: Principles and Applications* / Eds M.H. Engel, S.A. Macko. New York: Plenum Press, 1993. Ch. 1. P. 3–21.
6. Dor I., Danin A. // *Archiv Hydrobiol. Algal Studies*. 1996. V. 83. P. 197–206.
7. Danin A., Dor I., Sandler A., Amit R. // *J. Arid Environm.* 1998. V. 38. P. 161–174.
8. Dor I. // *Israel J. Plant Sci.* 1998. V. 46. P. 239–254.
9. Mazor G., Kidron G.J., Vonshak A., Abeliovich A. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1996. V. 21. P. 121–130.
10. Belnap J., Gardner J.S. // *Great Basin Naturalist*. 1993. V. 53. P. 40–47.
11. Danin A., Bar-Or Y., Dor I., Israeli T. // *Ecol. Mediteran.* 1989. V. 15. P. 55–64.
12. Dor I. // *Botanica Marina*. 1987. V. 30. P. 507–510.
13. Kudish A.I., Evseev E., Kushelevsky A.P. // *Int. J. Climatol.* 1997. V. 17. P. 1697–1704.
14. De Philippis R., Vincenzini M. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1998. V. 22. P. 151–175.
15. Lange G.J., Kidron B., Budel A., Meyer E., Kilian E., Abeliovich A. // *Function. Ecol.* 1992. V. 6. P. 519–527.
16. Lopez C.A., Tovar D. // *Geomicrobiol. J.* 1992. V. 10. P. 115–123.
17. Karsten U., Garcia-Pichel F. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1996. V. 19. P. 285–294.
18. Дембицкий В.М., Дор И., Шкроб И. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 1666–1672.
19. Han J., McCarthy E.D., Calvin M., Benn M.H. // *J. Chem. Soc. (C)*. 1968. P. 2785–2791.

20. *Winters K., Parker P.L., van Baalen C.* // Science. 1969. V. 163. P. 467–468.
21. *Murata N., Nishida I.* // The Biochemistry of Plants Lipids: Structure and Function / Ed. P.K. Stumpf. Orlando (Florida): Acad. Press, 1987. V. 9. P. 315–347.
22. *Nevenzel J.C.* // Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils / Ed. R.G. Ackman. Boca Raton (Florida): CRC Press, 1989. V. 1. P. 3–72.
23. *Dembitsky V.M., Shkrob I., Dor I.* // J. Chromatogr. 1999. V. 862. P. 221–229.
24. *Dembitsky V.M., Shkrob I., Lev O.* // J. Chem. Ecol. 2000. V. 26. P. 1359–1366.
25. *Дембицкий В.М., Шкроб И., Го Дж.В.* // Биохимия. 2000 (в печати).
26. *Oro J., Tornabene T.G., Nooner D.W., Gelpi E.* // J. Bacteriol. 1967. V. 93. P. 1811–1818.
27. *de Leeuw J.W., Sinninghe Damste J.S., Klok J., Schenck P.A., Boon J.J.* // Ecological Studies Hypersaline Ecosystems / Eds G.M. Friedman, W.E. Krumbein. Berlin: Springer, 1985. V. 53. P. 350–367.
28. *Kenig F., Sinninghe Damste J.S., Klok J., Dalen A.C., Rijpstra W.J.C., Huc A.Y., de Leeuw J.W.* // Geochim. Cosmochim. Acta. 1995. V. 59. P. 2999–3015.
29. *Shiea J., Brassell S.C., Ward D.M.* // Org. Geochem. 1990. V. 15. P. 223–231.
30. *Dobson G., Ward D.M., Robinson N., Eglinton G.* // Chem. Geol. 1988. V. 68. P. 155–179.
31. *Robinson N., Eglinton G.* // Org. Geochem. 1990. V. 15. P. 291–298.
32. *Köster J., Volkman J.K., Rullkötter J., Scholz-Böttcher B.M., Rethmeier J., Fischer U.* // Org. Geochem. 1999. V. 30. P. 1367–1379.
33. *King F.* // Sedimentation, Distribution et Diagenese de la Matière Organique Dans un Environnement Carbonate Hypersaline: le Systeme Lagune Sabkha d'Abu Dhabi (E.A.U.) / Ed. Ph.D. Thesis. Universite d'Orleans, 1995.
34. *Summons R.E., Jahnke L.L., Simoneit B.R.T.* // Ciba Found. Symposium 202. Chichester: Wiley, 1996. P. 174–194.
35. *Summons R.E., Jahnke L.L., Hope J.M., Logan D.A.* // Geochem. Conference. Canberra, 28–30 Sept. 1998. Abstracts. P. 10–11.
36. *Lockey K.H.* // Comp. Biochem. Physiol. 1988. V. 89B. P. 595–645.
37. *Volkman J.K., Barrett S.M., Blackburn S.I., Mansour M.P., Sikes E.L., Gelin F.* // Org. Geochem. 1998. V. 29. P. 1163–1179.
38. *Rowland S.J., Robson J.N.* // Marine Environm. Res. 1990. V. 30. P. 191–216.
39. *Volkman J.K., Barrett S.M., Dunstan G.A.* // Org. Geochem. 1994. V. 21. P. 407–413.
40. *Sinninghe Damste J.S., Schouten S., Rijpstra W.J.C., Hopmans E.C., Peletier H., Gieskes W.W.C., Greenevasen J.A.J.* // Org. Geochem. 1999. V. 30. P. 1581–1583.
41. *Wraige E.J., Belt S.T., Masse G., Robert J.M., Rowland S.J.* // Org. Geochem. 1997. V. 28. P. 497–505.
42. *Belt S.T., Cooke D.A., Robert J.M., Rowland S.J.* // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. P. 4755–4758.
43. *Warton B., Alexander R., Kagi R.* // Org. Geochem. 1997. V. 27. P. 465–476.
44. *Harwood J.L., Pettitt T.P., Jones A.L.* // Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria / Eds L.J. Rogers, J.R. Gallon. Oxford: Claderon Press, 1988. P. 49–67.
45. *Herout V.* // Progress in Phytochemistry / Eds L. Reinhold, Y. Liwschitz. London: Intersci. Publ., Wiley and Sons, 1970. V. 2. P. 143–199.
46. *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology / Eds D.W. Stanley-Samuelson, D.R. Nelson.* Univ. Nebraska Press, 1993.
47. *Core R.J., Henning J.A., Gardea-Torresdey J.* // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. P. 2932–2936.
48. *Battery R.G., Kamm J.A.* // J. Agric. Food Chem. 1980. V. 28. P. 978–981.
49. *Ali M.F., Billen J.P., Jackson B.D., Morgan E.D.* // Biochem. Syst. Ecol. 1989. V. 17. P. 469–477.
50. *Bagneres A.G., Billen J.P., Morgan E.D.* // J. Chem. Ecol. 1991. V. 17. P. 1633–1639.
51. *van Smeerdijk D.G., Boon J.J.* // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 1987. V. 11. P. 377–402.
52. *Volkman J.K., Barnett S.M., Blackburn S.I.* // Org. Geochem. 1999. V. 30. P. 307–318.
53. *Dor I., Ehrlich A.* // Marine Ecol. 1987. V. 8. P. 93–205.
54. *Kissin Y.V., Feulmer G.P., Payne W.B.* // J. Chromatog. Sci. 1986. V. 24. P. 164–169.
55. *Johns R.B., Brady B.A., Butler M.S., Dembitsky V.M., Smith J.D.* // Org. Geochem. 1994. V. 21. P. 1027–1035.
56. *Смирнов М.Б.* // Нефтехимия. 1990. Т. 30. С. 46–54.
57. *Курашова Е.К., Мусаев И.А., Смирнов М.Б., Симанюк Р.Н., Микая А.И., Иванов А.В., Санин П.И.* // Нефтехимия. 1989. Т. 29. С. 206–220.
58. *Мусаев И.А., Курашова Е.К., Симанюк Р.Н., Полякова А.А., Ермакова Л.С., Смирнов М.Б., Санин П.И.* // Нефтехимия. 1985. Т. 25. С. 76–82.
59. *Killops S.D., Al-Juboori M.A.H.A.* // Org. Geochem. 1990. V. 15. P. 147–160.
60. *Warton B., Alexander R., Kagi R.* // Org. Geochem. 1998. V. 29. P. 593–604.
61. *Summons R.E.* // Org. Geochem. 1987. V. 11. P. 281–289.

Branched Alkanes and Other Apolar Compounds Produced by the Cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* from the Negev Desert

V. M. Dembitsky^{1, 3#}, I. Dor², I. Shkrob^{2, 3}, and M. Aki³

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, School of Pharmacy, P.O. Box 12065, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 91120 Israel

² Division of Environmental Science, Graduate School of Applied Science, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 91904 Israel

³ Group of Natural Lipids, P.O. Box 39074, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 91390 Israel

Gas chromatography–mass spectrometry on serially coupled capillary columns with different polarity of stationary phases showed that the soil cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* from the Negev desert produces an unusual mixture of 4 normal and more than 60 branched alkanes, as well as a number of fatty acids, cyclic and unsaturated hydrocarbons, aldehydes, alcohols, and ketones. The dominant compounds were heptadecane (12%), 7-methylheptadecane (7.8%), hexadecanoic acid (6.5%), (Z)-9-hexadecenoic acid (5.6%), 4-ethyl-2,2,6,6-tetramethylheptane (2.8%), (Z)-9-octadecenoic acid (2.8%), and 4-methyl-5-propylnonane (2.7%).

Key words: alcohols, aldehydes, branched alkanes, fatty acids, gas chromatography–mass spectrometry, ketones, soil cyanobacteria, *Microcoleus vaginatus*

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: (+972) 2675-8635; fax: (+972) 2641-0740; e-mail: dvalery@cc.huji.ac.il

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.