



УДК 547.953.02 + 576.851.151

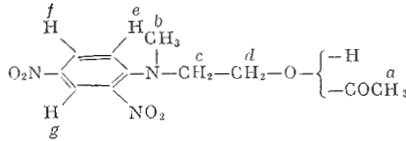
КЛЕТОЧНЫЕ ФОСФОЛИПИДЫ ОБЛИГАТНОГО МЕТАНОТРОФА  
*METHYLOSINUS TRICHOSPORIUM***Батраков С. Г., Быстрова М. Г., Нестеров А. И.,  
Садовская В. Л.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва;Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР, Пущино-на-Оке

Доминирующими клеточными фосфолипидами облигатного метанотрофа *Methylosinus trichosporium* 44, растущего в условиях непрерывного культивирования, являются N-метилфосфатидилэтаноламин (38,4% от суммы фосфолипидов), N,N-диметилфосфатидилэтаноламин (41,9%) и фосфатидилглицерин (19,6%). В качестве минорного компонента присутствует фосфолипид, вероятно представляющий собой фосфатидилхолин. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин не обнаружены. Основными ацильными компонентами фосфолипидов являются *цис*-вакценовая и *цис*-10-октадеценовая кислоты, в меньших количествах содержатся пальмитиновая и пальмитолеиновая кислоты, причем последняя локализована исключительно при C<sub>(2)</sub> глицериповых остатков липидов.

Одна из характерных особенностей ультраструктуры клеток метанокисляющих бактерий состоит в наличии сильно развитой системы внутрицитоплазматических мембран (см. [1] и цитированные в этом сообщении работы). Аналогичное строение встречается лишь у весьма немногочисленной группы прокариотов: у синезеленых водорослей [2], фотосинтезирующих [3], нитрифицирующих [4] и азотфиксирующих [5] бактерий. Хорошо известно, что липиды, главным образом фосфолипиды, — одни из основных структурных компонентов мембран. Поэтому вполне вероятно, что изучение состава фосфолипидов у микроорганизмов с необычно развитой мембранной системой может привести к интересным данным.

Тем не менее до настоящего времени липиды метанотрофов практически не изучались, и в этом отношении можно сослаться всего лишь на три работы: в 1964 г. были опубликованы результаты анализа жирных кислот и некоторых липидных фракций метанокисляющей азотфиксирующей бактерии *Pseudomonas methanitricans* [6], позднее был изучен жирнокислотный состав суммарных липидов *Methanomonas methanooxidans* [7], и наконец, недавно появилось сообщение [8] о составе нативных липидов *Methylosinus trichosporium* ОВ Зб. Авторы последней работы установили, что основными фосфолипидами исследованного ими штамма являются фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин, на долю которых приходится более 94% суммы фосфолипидов; в качестве минорных компонентов обнаружены бис-фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин и фосфатидилхолин. В связи с этими данными мы сочли интересным сообщить результаты, полученные нами при анализе фосфолипидного состава представите-

## Спектр ПМР N-метил-N-(2,4-динитрофенил)этанолamina и его O-ацетата



| Протоны | Количество Н | δ, м.д.           |                    | Структура сигнала   |
|---------|--------------|-------------------|--------------------|---|
|         |              | по спектру спирта | по спектру ацетата |   |
| a       | 3            | —                 | 2,01               | Синглет   |
| b       | 3            | 3,01              | 3,01               | »   |
| c       | 2            | 3,61              | 3,66               | Триплет (J 6 Гц)  |
| d       | 2            | 3,93              | 4,35               | » (J 6 Гц)  |
| e       | 1            | 8,17              | 8,18               | Квадруплет<br>(J <sub>He, Hf</sub> 9 Гц;<br>J <sub>He, Hg</sub> 1 Гц) |
| f       | 1            | 8,23              | 8,23               | Квадруплет<br>(J <sub>Hf, He</sub> 9 Гц;<br>J <sub>Hf, Hg</sub> 2 Гц) |
| g       | 1            | 8,67              | 8,67               | Квадруплет<br>(J <sub>Hg, Hf</sub> 2 Гц;<br>J <sub>Hg, He</sub> 1 Гц) |

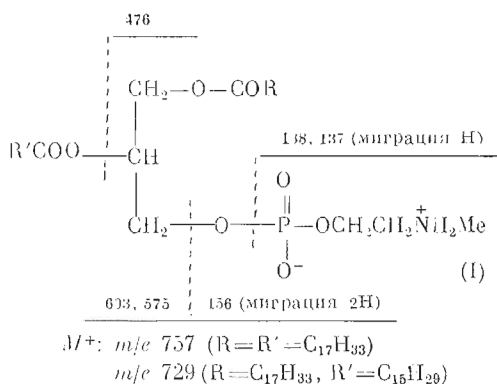
ля того же вида — облигатного метанотрофа *M. trichosporium* 44 [9], растущего в условиях непрерывного культивирования.

Липофильно высушенные клетки *C. trichosporium* 44 содержат ~ 10% липидов, извлекаемых смесью хлороформа с метанолом (2 : 1). Предварительный анализ этих липидов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в различных системах растворителей показал, что в их составе находятся три фосфолипида, общее содержание которых (по липидному фосфору) превышает 98% всей фосфолипидной фракции. Два из них, (I) и (II), имели цвиттерийонный характер; третий, (III), — кислотного характера — при ТСХ не отличался от фосфатидилглицерина. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин полностью отсутствовали. Поскольку эти результаты отличались от описанных в работе [8], мы выделили каждый из указанных фосфолипидных компонентов (I—III) в хроматографически индивидуальном состоянии и детально охарактеризовали его структуру. С этой целью суммарные клеточные липиды микроорганизма вначале подвергали разделению при помощи ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе [10]. Два фосфолипида — (I) и (II) — при этом элюировались совместно малополярной нейтральной системой растворителей (хлороформ — метанол, 9 : 1), что подтверждало их цвиттерийонный характер; третий компонент — (III) — вымывался только основной системой растворителей, откуда можно было заключить, что он обладает кислотными свойствами. Липиды (I) и (II) затем разделяли и очищали при помощи хроматографии на колонке с силикагелем; аналогично проводили очистку фосфолипида (III).

**Фосфолипид (I).** Этот компонент давал на хроматограммах положительный тест с молибдатным реагентом на фосфолипиды [11] и с нингидрином. В условиях кислотного гидролиза он распадался на жирные кислоты, глицерин, неорганический фосфат (в молярном соотношении 2 : 1 : 1) и аминокислоты. Последний был идентифицирован в виде N-2,4-динитрофенильного производного как N-метилэтаноламин методами ПМР-спектроскопии (см. табл. 1) и масс-спектрометрии (см. «Экспериментальную часть»). Мягкий щелочной метанолиз расщеплял фосфолипид на метиловые эфиры жир-

ных кислот и единственный водорастворимый продукт, распадающийся при жестком кислотном гидролизе, по данным ТСХ на целлюлозе, на глицерин, *N*-метилэтаноламин и неорганический фосфат. При гидролизе фосфолипазой С липид (I) в качестве липофильных продуктов дал только 1,2-диглицериды, идентифицированные при помощи ТСХ с заведомым образом, а в форме ацетатов — также методом масс-спектрометрии (см. [12, 13]). Под действием фосфолипазы А<sub>2</sub> липид отщеплял свободные жирные кислоты и превращался в соответствующий лизо-липид.

Описанные результаты структурного анализа фосфолипида (I) показывают, что он является производным 3-*sn*-фосфатидовой кислоты и скорее всего представляет собой *N*-метилфосфатидилэтаноламин. Этот вывод был окончательно подтвержден масс-спектром нативного липида, полученным методом десорбции полем. В области высоких значений массовых чисел спектра присутствовали пики гомологичных молекулярных ионов с *m/e* 757 и 729 (а также ионов  $[M + 1]^+$  с *m/e* 758 и 730), соответствующих соединениям (I) с комбинацией жирноацильных остатков: C<sub>18:1</sub>—C<sub>18:1</sub> и C<sub>18:1</sub>—C<sub>16:1</sub> (т. е. R=R'=C<sub>17</sub>H<sub>33</sub> и R=C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, R'=C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>,



см. схему). Как будет показано ниже, эти жирные кислоты практически исчерпывают собой состав ацильных компонентов всех фосфолипидных фракций. Более интенсивными в указанной области спектра были пики «диглицеридных» фрагментов с *m/e* 603 и 575, возникающих при расщеплении связи C<sub>(3)</sub>—O диглицеридного остатка и локализации заряда на этом остатке. Разрыв той же связи, но при локализации заряда на фосфат-содержащем фрагменте и миграции двух атомов водорода к этому фрагменту приводит к иону с *m/e* 156. Максимальную интенсивность в масс-спектре имели пики фосфатных фрагментов с *m/e* 138 и 137, последний из которых образуется с миграцией атома водорода. Помимо перечисленных ионов заметной интенсивностью обладал также пик фрагмента  $[M - RCOO']^+$  с *m/e* 476, ему сопутствовали пики ионов  $[M - RCOO' + H]^+$  и  $[M - RCOO' + 2H]^+$ . Все рассмотренные данные позволяют однозначно охарактеризовать фосфолипид (I) как 3-*sn*-фосфатидил-*N*-метилэтаноламин.

**Фосфолипид (II).** ИК-спектр этого компонента в отличие от спектра фосфолипида (I) не содержал полос поглощения связей N—H аминогруппы. При ТСХ в различных системах растворителей липид (II) не отличался от *N,N*-диметилфосфатидилэтанолamina, полученного деметилированием яичного лецитина тиофенолятом натрия [14]. На хроматограммах липид (II) давал положительную реакцию с реагентом на фосфолипиды [11], но не обнаруживался нингидрином. После инкубации хроматограмм в парах иодистого метила этот липид давал характерное для четвертичных аммониевых солей окрашивание с реактивом Драгендорфа, хотя до такой обработки тест с указанным реактивом был отрицательным. При действии иодистого метила липид (II) превращался в вещество, не отличающееся при ТСХ от яичного лецитина. В результате кислотного гидролиза этого

Жирнокислотный состав фосфолипидов *M. trichosporium* 44 (%)

| Жирные кислоты             | N-Метилфосфатидилэтанолламин (I)<br>(38,4%) * |                    | N,N-Диметилфосфатидилэтанолламин (II)<br>(41,9%) * |                    | Фосфатидилглицерин (III)<br>(19,6%) * |                    |
|----------------------------|---|--------------------|--|--------------------|---------------------------------------|--------------------|
|                            | общие<br>кислоты                              | ФА <sub>2</sub> ** | общие<br>кислоты                                   | ФА <sub>2</sub> ** | общие<br>кислоты                      | ФА <sub>2</sub> ** |
| Пальмитиновая              | 1,5   | —                  | 1,8  | —                  | 1,9                                   | —                  |
| Пальмитолеиновая           | 8,8   | 17,4               | 12,1   | 23,3               | 3,6                                   | 7,0                |
| <i>ψ</i> ис-Вакценовая     | 21,5  | } 82,6             | 23,4   | } 76,1             | 30,0                                  | } 93,7             |
| <i>n</i> -10-Октадеценовая | 68,2  |                    | 62,7   |                    | 64,5                                  |                    |

\* Относительное содержание липида в суммарной фосфолипидной фракции (по фосфору).

\*\* Жирные кислоты, отщепляемые при гидролизе фосфолипазой А<sub>2</sub>.

вещества были получены жирные кислоты, глицерин, неорганический фосфат (в молярном соотношении 2 : 1 : 1) и холин. Мягкий щелочной метанолиз того же вещества привел к образованию метиловых эфиров жирных кислот и единственного водорастворимого продукта, идентичного по хроматографическому поведению  $\alpha$ -глицерофосфорилхолину, продукту щелочного дезацилирования яичного лецитина [15]. В результате гидролиза фосфолипазой А<sub>2</sub> липид (II) полностью распадался на свободные жирные кислоты и лизо-липид, а при гидролизе фосфолипазой С в качестве липофильных продуктов были получены только 1,2-диглицериды. Эти данные однозначно характеризуют фосфолипид (II) как 3-*sn*-фосфатидил-N,N-диметилэтанолламин.

**Фосфолипид (III).** По хроматографической подвижности компонент (III) не отличался от фосфатидилглицерина, полученного переэтерификацией с глицерином яичного лецитина в присутствии фосфолипазы D [16]. На хроматограммах он давал положительные реакции с реагентом на фосфолипиды [11] и с периодатом — реактивом Шиффа [17]; последнее указывало на наличие в молекуле липида  $\alpha$ -гликольной группировки. В условиях жесткого кислотного гидролиза фосфолипид (III) распадался на жирные кислоты, глицерин и неорганический фосфат в молярном соотношении 2 : 2 : 1, а при щелочном метанолизе давал метиловые эфиры жирных кислот и единственный водорастворимый продукт, который при помощи хроматомасс-спектрометрии его триметилсилилового (TMS) производного был идентифицирован как бис-глицерофосфат [18]. Фосфолипаза А<sub>2</sub> расщепляла липид (III) на свободные жирные кислоты и лизо-липид, при гидролизе же фосфолипазой С липофильными продуктами оказались только 1,2-диглицериды. На основании описанных результатов анализа компонент (III) был идентифицирован как 3-*sn*-фосфатидилглицерин.

Кроме рассмотренных выше трех доминирующих фосфолипидов (I—III) суммарные клеточные липиды *M. trichosporium* 44 содержали в виде следов липид, который по подвижности при ТСХ не отличался от яичного фосфатидилхолина и подобно ему давал положительные реакции с реагентом на фосфолипиды [11] и с реактивом Драгендорфа. Однако охарактеризовать более определенно этот компонент не удалось ввиду его малых количеств.

**Жирнокислотный состав фосфолипидов (I—III).** Газохроматографический, а также комбинированный ГЖХ-масс-спектрометрический анализ жирных кислот, полученных как при кислотном гидролизе, так и при щелочном метанолизе фосфолипидов (I—III), показал, что жирнокислотный спектр каждого из них ограничивается лишь тремя типами кислот: *n*-C<sub>16:0</sub>, *n*-C<sub>16:1</sub> и *n*-C<sub>18:1</sub>, причем последний доминировал во всех фосфолипидных фракциях (табл. 2). Для определения положения двойной связи в молекулах ненасыщенных компонентов метиловые эфиры жирнокислотных фракций, полученных после деградации фосфолипидов, подвергали

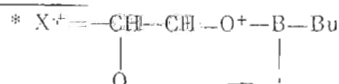
гидроксильированию осмиевым ангидридом [19], а образовавшиеся диокси-эфиры анализировали в виде ТМС-эфиров [20] и бутилборатов [21] методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Во всех случаях на хроматограммах можно было наблюдать три пика, соответствующих производным диокси-эфиров.

В масс-спектре наиболее летучего из ТМС-эфиров пик при максимальном значении  $m/e$  — 431 — отвечал иону  $[M - Me]^+$ , соответствующему ТМС-производному метилового эфира диоксигексадекановой кислоты, а наибольшую интенсивность имели пики с  $m/e$  187 и 259, принадлежащие фрагментам  $C_6H_{13}CH=OSiMe_3$  и  $Me_3SiO^+=CH(CH_2)_7COOMe$ . Отсюда можно сделать вывод, что присутствующая в фосфолипидах гексадеценонная кислота содержит двойную связь при атоме  $C_{(9)}$  и, следовательно, представляет собой пальмитолоиновую кислоту. Этот вывод подтверждается наличием в масс-спектре соответствующего бутилбороната интенсивных пиков характерных ионов:  $C_6H_{13}X^+$  с  $m/e$  211 и  $X^+(CH_2)_7COOMe$  с  $m/e$  283\* (ср. [21]) (*цис*-конфигурация двойных связей в ненасыщенных кислотах вытекает из данных ИК-спектров, в которых отсутствуют характерные для *транс*-олефинов полосы поглощения при  $970\text{ см}^{-1}$ ).

Два других ТМС-эфира представляли собой производные  $C_{18}$ -диоксикислот, поскольку в их масс-спектрах пики ионов  $[M - Me]^+$  находились при  $m/e$  459. В спектре более летучего из них максимальными были пики фрагментов  $C_6H_{13}CH=O^+SiMe_3$  с  $m/e$  187 и  $Me_3SiO^+=CH(CH_2)_9COOMe$  с  $m/e$  287, а в масс-спектре второго — пики ионов  $C_7H_{15}CH=O^+SiMe_3$  с  $m/e$  201 и  $Me_3SiO^+=CH(CH_2)_8COOMe$  с  $m/e$  273. Очевидно, что в липидах исследованного микроорганизма присутствуют две моноеновых  $C_{18}$ -кислоты, в одной из которых двойная связь находится при атоме  $C_{(11)}$  — *цис*-вакценовая кислота, а в другой — при атоме  $C_{(10)}$ . Результаты масс-спектрометрического анализа ТМС-эфиров  $C_{18}$ -кислот были подтверждены измерением масс-спектров соответствующих бутилборонатов. В спектре производного первой из указанных кислот наблюдались характерные интенсивные пики фрагментов:  $C_6H_{13}X^+$  с  $m/e$  211 и  $X^+(CH_2)_9COOMe$  с  $m/e$  311; в масс-спектре второго бутилбороната аналогичные ионы —  $C_7H_{15}X^+$  и  $X^+(CH_2)_8COOMe$  — имели  $m/e$  225 и 297.

Как можно видеть, липиды *M. trichosporium* 44 содержат довольно обширный набор жирных кислот. Это типично для микроорганизмов с развитой внутренней цитоплазматической мембранной системой. Они продуцируют главным образом моноеновые  $C_{16}$ - и  $C_{18}$ -кислоты (см., например, [2—5, 7] и цитированные в этих сообщениях работы). Аналогичный факт отмечен и для штамма *M. trichosporium* OB 3b [8], который синтезирует практически только две указанные кислоты (содержание кислоты  $C_{18:1}$  в фосфолипидах 83% и более). К сожалению, в перечисленных сообщениях отсутствует полная структурная характеристика ненасыщенных кислот — не определена локализация двойной связи в их молекулах. Последнее же представляет интерес и с точки зрения биогенеза жирных кислот названной выше группой микроорганизмов, и с таксономической точки зрения (см. [22]).

Пальмитиновая и *цис*-вакценовая кислоты широко распространены в природе, в том числе и в микробных липидах [23, 24]; 10-октадеценонная кислота встречается довольно редко. Она найдена лишь в липидах некоторых бактерий [25], причем было установлено, что образование этой кислоты происходит путем прямого дегидрирования стеариновой кислоты, а не является следствием изомеризации «обычных» моноеновых  $C_{18}$ -кислот. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что в *M. trichosporium* 44 локализация двойной связи у гексадеценонной и октадеценонных кислот раз-



лична. Возможно, это связано с тем, что биосинтез жирных кислот с различной длиной углеводородной цепи осуществляется в клетках отдельными высокоспецифичными энзиматическими системами.

Представляет интерес позиционное распределение жирных кислот в молекулах фосфолипидов (I—III). Оказалось, что лизо-липиды, образующиеся в результате гидролиза фосфолипидов фосфолипазой  $A_2$ , практически не содержат пальмитолеиновой кислоты. Как известно, этот фермент отщепляет ацильные остатки только из положения 2 остатка глицерина [26], следовательно, пальмитолеиновая кислота в молекулах липидов (I—III) должна быть локализована исключительно при атоме  $C_{(2)}$  указанного остатка.

Изученный нами штамм *M. trichosporium* имеет характерный для грам-отрицательных бактерий фосфолипидный состав [22], не совсем обычно лишь полное отсутствие фосфатидилэтаноламина. Однако, поскольку этот липид — биогенетический предшественник N-метил- и N,N-диметилфосфатидилэтаноламинов [27], можно предположить, что клетки микроорганизма в отличие от *M. trichosporium* ОВ 3b [8] содержат высокоактивные энзимы, осуществляющие быстрое N-метилирование фосфатидилэтаноламина. В условиях ассимиляции метана этот процесс, видимо, протекает особенно легко, так как первоначальные продукты превращения углеводорода (см. [28]) при соответствующем катализе, вероятно, могут служить метилирующими агентами.

В заключение следует отметить, что, хотя фосфолипидный состав бактерий, безусловно, является ценным хемотаксономическим критерием [22], тем не менее, как показывает приведенное в настоящем сообщении сравнение фосфолипидов двух представителей одного вида, при использовании этого критерия необходимо учитывать возможность той или иной структурной модификации отдельных липидов даже у близкородственных организмов.

### Экспериментальная часть

Для ионообменной хроматографии липидов использовали DEAE-целлюлозу (Reanal, Венгрия) в ацетатной форме [10]. Для адсорбционной хроматографии на колонках применяли силикагель марки КСК (100—150 меш) Воскресенского химкомбината, предварительно обработанный ранее описанным способом [29]. ТСХ проводили на силикагеле той же марки, используя микрометод Светашева и Васильевского [30]. При анализе фосфолипидов хроматограммы проявляли в следующих системах: 1) хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4; 2) хлороформ — метанол — конц.  $NH_4OH$ , 65 : 25 : 4; 3) хлороформ — метанол — ацетон —  $CH_3COOH$  — вода, 50 : 15 : 20 : 10 : 5; 4) хлороформ — метанол —  $CH_3COOH$  — вода, 90 : 40 : 12 : 2; для малополярных веществ использовали системы: гексан — эфир —  $CH_3COOH$ , 85 : 15 : 1; гексан — эфир, 1 : 1; гексан — эфир, 85 : 15. Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием 50%  $H_2SO_4$  с последующим нагреванием пластинок при  $\sim 200^\circ$ , 0,3% раствором нингидрина в спирте с последующим нагреванием (10—15 мин) при  $100^\circ$ , реактивом на фосфолипиды [11], периодатом — реактивом Шиффа [17], антроновым реагентом [31], реактивом Драгендорфа.

Водорастворимые продукты деградации липидов анализировали при помощи ТСХ на целлюлозе Avicel (Merck, ФРГ) в системах: *n*-пропанол — этилацетат — вода, 7 : 1 : 2; изопропанол — вода — конц.  $NH_4OH$ , 7 : 2 : 1; фенол, насыщенный водой, — этанол —  $CH_3COOH$ , 50 : 5 : 6. Вещества обнаруживали опрыскиванием раствором аммиаката серебра [32], нингидриновым реагентом, реактивом Драгендорфа, периодатом — реактивом Шиффа [17].

Содержание фосфора в сумме липидов и в отдельных липидных фракциях определяли по методике [33]. О количественном соотношении фосфо-

липидных фракций судили по относительному содержанию в них фосфора, который определяли микрометодом Светашева и Васьяковского [30, 34]. Кислотный гидролиз и щелочной метанолиз фосфолипидов проводили стандартными способами [35]. Для ферментативного гидролиза использовали фосфолипазу  $A_3$  змеиного яда (*Naja naja oxiana*) [36] и фосфолипазу С из *Bacillus cereus* [37]; гидролиз осуществляли в условиях, описанных в работе [29]. Жирные кислоты, а также производные оксикислот анализировали при помощи ГЖХ и комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии [29]. Количественное соотношение изомерных  $C_{18:1}$ -кислот определяли по данным ГЖХ ТМС-эфиров продуктов их гидроксигликозирования.

ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в пленке вещества, спектры ПМР — на приборе XL-100 (Varian, США) в дейтерохлороформе с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта при рабочей частоте 100 МГц. Масс-спектры измеряли на приборе Varian MAT CN-5 DF, снабженном комбинированным источником для ионизации электронным ударом, полем и десорбции полем. Масс-спектрометрию с ионизацией электронным ударом проводили при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3 кВ. Для получения масс-спектров методом десорбции полем в качестве эмиттера использовали вольфрамовую проволоку диаметром 10 мкм, активированную по обычной методике [38]. Нанесение образцов на эмиттер осуществляли погружением последнего в раствор фосфолипида в смеси хлороформ — метанол (9 : 1). Ток нагрева эмиттера 15 мА, напряженность поля 10 кВ.

**Выращивание культуры.** Культуру *Methylosinus trichosporium* 44 выращивали в непрерывном режиме в лабораторном ферментере с рабочей емкостью 1 л в атмосфере метан — воздух (1 : 2) при 30° на минеральной среде следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4$  — 1,  $Na_2HPO_4$  — 1,6,  $KNO_3$  — 1,  $MgSO_4$  — 0,2,  $CaCl_2$  — 0,02, микроэлементы по Пфеннигу [39] — 1 мл/л; pH 6,8—6,9. Фосфаты стерилизовали отдельно от остальных компонентов и вносили в основную среду перед засевом ферментера культурой бактерий. Использовали метан из городской газовой сети, который освобождали от одоранта пропусканием через насыщенный раствор щелочи. Клетки отделяли центрифугированием, промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали.

**Экстракция клеточных липидов.** 39 г сухой биомассы перемешивали со смесью хлороформ — метанол (2 : 1, 3 раза по 400 мл) по 2 ч. Объединенный экстракт упаривали в вакууме досуха при температуре < 30°, остаток растворяли в 50 мл указанной смеси растворителей и раствор оставляли на сутки при 0—2°. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток освобождали от нелипидных примесей фильтрованием через сефадекс G-25 [40]. Получили 4,1 г (10,3% от веса сухих клеток) суммарных клеточных липидов.

**Ионообменная хроматография липидов.** На колонку с 50 г DEAE-целлюлозы наносили раствор 1,2 г суммы клеточных липидов в 15 мл смеси хлороформ — метанол (9 : 1). Элюировали последовательно четырьмя системами растворителей: 700 мл вышеуказанной смеси (фракция А), 600 мл хлороформа с метанолом, 7 : 3 (Б), 400 мл метанола (В) и 600 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), насыщенной конц. водным аммиаком (Г). Элюаты анализировали в системах растворителей 1—4. Фракция А (980 мг) состояла из малополярных нейтральных липидов и фосфолипидов (I) и (II). Фракция Г (190 мг) содержала главным образом фосфолипид (III). Фракции Б и В практически не содержали липидов.

**Выделение индивидуальных фосфолипидов (I) и (II).** На колонку с 40 г силикагеля наносили раствор фракции А в 5 мл хлороформа. Колонку промывали 400 мл хлороформа, после чего вымывание продолжали смесью хлороформа с метанолом (10 : 1, 9 : 1, 8 : 1 ... 1 : 1, по 300 мл). Собирали элюаты по 15 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системах 1 и 2. Хлороформный элюат содержал только малополярные нейтр-

ральные липиды (350 мг). Элюаты, полученные при вымывании смесями хлороформа с метанолом (8 : 1 и 7 : 1), содержали 181 мг хроматографически индивидуального фосфолипида (I);  $R_f$  0,55 (в системе 1), 0,35 (2), 0,56 (3) и 0,59 (4). Смесями тех же растворителей (3 : 1 и 2 : 1) элюировали 212 мг хроматографически чистого фосфолипида (II);  $R_f$  0,48 (в системе 1), 0,63 (2), 0,58 (3) и 0,43 (4).

*Очистка фосфолипида (III).* Раствор фракции Г в 5 мл хлороформа наносили на колонку с 20 г силикагеля. Колонку промывали 200 мл хлороформа, после чего хроматографирование продолжали, как описано выше. Элюаты, полученные при вымывании смесями хлороформа с метанолом (8 : 1 — 4 : 1), содержали 161 мг хроматографически индивидуального фосфолипида (III);  $R_f$  0,57 (в системе 1), 0,29 (2), 0,61 (3) и 0,77 (4).

*Ацетаты диглицеридов.* 1,2-Диглицериды (3—4 мг), полученные в результате гидролиза фосфолипида (I), (II) и (III) фосфолипазой С, ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (8—10 ч при 20°), смесь упаривали в вакууме при температуре < 40°, остаток высушивали при 30°/0,02 мм и анализировали при помощи масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом.

*N-Метил-N-(2,4-динитрофенил)этаноламин.* а) К раствору 15 мг фосфолипида (I) в 1 мл хлороформа добавляли 0,1 мл сухого триэтиламина и затем 25 мг 2,4-динитрофторбензола. Смесь оставляли на 1 ч при 20°, после чего упаривали, остаток растворяли в 2 мл хлороформа и раствор наносили на колонку с 8 г силикагеля. Колонку промывали 30 мл смеси хлороформ — метанол — конц. водный аммиак (9 : 1 : 0,1), затем 30 мл смеси тех же растворителей в соотношении 9 : 1 : 0,18 элюировали 16 мг хроматографически индивидуального 3-*sn*-фосфатидил-N-метил-N-(2,4-динитрофенил)этанолamina,  $R_f$  0,32 в последней указанной смеси растворителей. Полученное производное фосфолипида нагревали 15 ч в запаянной ампуле с 1 мл 2 н. HCl при 105°. При охлаждении смесь разбавляли 3 мл воды, промывали гексаном (3 × 3 мл), нейтрализовали бикарбонатом натрия и экстрагировали эфиром (5 × 4 мл). Экстракт упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл смеси бензол — ацетон (10 : 1) и наносили на колонку с 5 г силикагеля. Колонку промывали 20 мл той же смеси растворителей, после чего 20 мл системы бензол — ацетон (3 : 1) элюировали хроматографически индивидуальный N-метил-N-(2,4-динитрофенил)этаноламин,  $R_f$  0,42 в последней системе растворителей.

Масс-спектр:  $m/e$  241 ( $M^+$ ), 210 ( $M - CH_2OH$ ), 194 ( $M - NO_2 - H$ ), 164 ( $M - CH_2OH - NO_2$ ), 136 ( $M - CH_2OH - 2NO_2$ ).

Спектр ПМР см. табл. 1.

б) 10 мг фосфолипида (I) гидролизovali 2 н. HCl в вышеописанных условиях. Гидролизат разбавляли 3 мл воды и экстрагировали гексаном (4 × 3 мл). К водной фазе добавляли бикарбонат натрия до pH ~ 8 и затем раствор 15 мг 2,4-динитрофторбензола в 2 мл этанола. Смесь встряхивали 3 ч при 20° и экстрагировали эфиром (5 × 5 мл). Экстракт промывали 2 мл воды, упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл смеси бензол — ацетон (10 : 1) и наносили на колонку с 5 г силикагеля. Вымывали последовательно смесями бензол — ацетон: 10 : 1, 8 : 1, 6 : 1 и 5 : 1 (по 15 мл). Последней смесью растворителей элюировали хроматографически индивидуальный N-метил-N-(2,4-динитрофенил)этаноламин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тюрин В. С., Гальченко В. Ф. (1976) Микробиология, 45, 503—506.
2. Gantt E., Conti S. F. (1969) J. Bacteriol., 97, 1486—1493.
3. Oelze J., Drews G. (1972) Biochim. et biophys. acta, 265, 209—239.
4. Murray R. G. E., Watson S. W. (1965) J. Bacteriol., 89, 1594—1609.
5. Robrish S. A., Marr A. C. (1962) J. Bacteriol., 83, 158—168.
6. Davis J. B., Coty V. F., Stanley J. P. (1964) J. Bacteriol., 88, 468—472.
7. Smith U., Ribbons D. W. (1970) Arch. Microbiol., 74, 116—122.
8. Weaver T. L., Patrick M. A., Dugan P. R. (1975) J. Bacteriol., 124, 602—605.



9. Гальченко В. Ф., Шишкина В. Н., Тюрин В. С., Троценко Ю. А. (1975) *Микробиология*, **44**, 844—849.
10. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. (1963) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 425—454.
11. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. (1968) *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
12. Lauer W. M., Aasen A. J., Graff G., Holman R. T. (1970) *Lipids*, **5**, 861—868.
13. Aasen A. J., Lauer W. M., Holman R. T. (1970) *Lipids*, **5**, 869—874.
14. Stoffel W. (1975) *Methods of Enzymology*, vol. 35, *Lipids, Part B*, pp. 533—541, N. Y.
15. Dawson R. M. C., Hemington N., Davenport J. B. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 497—501.
16. Dawson R. M. C. (1967) *Biochem. J.*, **102**, 205—210.
17. Shaw N. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **164**, 435—436.
18. Fenselau C., Duncan J. H. (1971) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **48**, 333A.
19. McCloskey J. A., McClelland M. J. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 5090—5093.
20. Argoudelis C. J., Perkins E. G. (1968) *Lipids*, **3**, 379—381.
21. Brooks C. J. W., Maclean I. (1971) *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 18—24.
22. Shaw N. (1974) *Adv. Appl. Microbiology*, vol. 17 (Perlman D., ed.), pp. 63—108, Acad. Press, New York and London.
23. Goldfine H. (1973) *Adv. Microbiol. Physiol.*, vol. 8 (Rose A., Tempest D., eds.), pp. 1—58, Acad. Press Inc., N. Y.
24. Рубан Е. Л. (1977) *Микробные липиды и липазы*, ч. 1, «Наука», М.
25. Dart R. K., Kaneda T. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **218**, 189—194.
26. De Haus G. H., van Deenen L. L. M. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **106**, 315—325.
27. Kates M. (1966) *Ann. Rev. Microbiol.*, **20**, 13—44.
28. Hutchinson D. W., Whittenbury R., Dalton H. (1976) *J. Theor. Biol.*, **58**, 325—335.
29. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **337**, 29—40.
30. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) *J. Chromatogr.*, **67**, 376—378.
31. Eichberg J. J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 91—100.
32. Хайс И. М., Мацек К. (1962) *Хроматография на бумаге*, с. 720, Изд-во иностр. лит., М.
33. Gerlack E., Deuticke B. (1963) *Biochem. Z.*, **337**, 477—479.
34. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) *J. Chromatogr.*, **65**, 451—453.
35. Кейрс М. (1975) *Техника липидологии*, гл. 7, «Мир», М.
36. Salach J. I., Seng R., Tisdale II., Singer T. P. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 340—347.
37. Haverkate F., van Deenen L. L. M. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **106**, 78—92.
38. Schulten H. R., Beckey H. D. (1972) *Org. Mass Spectrom.*, **8**, 885—895.
39. Pfenning M. (1965) *Zbl. Bacteriol. Parasitenk., Infektionskh. und Hyg. Abt. I*, 601.
40. Wuthier R. E. (1966) *J. Lipid Res.*, **7**, 558—561.

Поступила в редакцию  
6.V.1977

## CELL PHOSPHOLIPIDS OF OBLIGATORY METHANOTROPH *METHYLOSINUS TRICHOSPORIUM*

BATRAKOV S. G., BYSTROVA M. G., NESTEROV A. I.,  
SADOVSKAYA V. L.

*M. M. Shenyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;  
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,  
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The major cell phospholipids of the obligatory methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* 44 have been characterized as N-methyl phosphatidylethanolamine (38.4% of the total phospholipids), N,N-dimethyl phosphatidylethanolamine (41.9%), and phosphatidylglycerol (19.6%). Neither nonmethylated phosphatidylethanolamine, nor phosphatidylserine were detected. *cis*-Vaccenic acid as well as *cis*-octadecen-10-oic acid were the predominant acyl components of the phospholipids, palmitic and palmitoleic acids being encountered in considerably lower amounts. The latter was found only at C<sub>(2)</sub> position of glycerol moiety. The phospholipid composition given above differs markedly from that of *M. trichosporium* OB 3b reported earlier in literature.