

Е. М. ГУБАРЕВ и Е. К. ЛУБЕНЕЦ

НЕКОТОРЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДОВ ДИФТЕРИЙНОГО МИКРОБА

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 11 II 1948)

В составе липидов дифтерийного микроба отсутствуют столь обычные для животных и растительных липидов структурные компоненты, как глицерин и стерины (1). Обнаружение Е. М. Губаревым и И. Л. Вакуленко в продуктах омыления ненасыщенного одноатомного высокомолекулярного спирта, названного кориновым алкоголем, дало совершенно достаточное основание для того, чтобы считать несомненным присутствие воска в составе этих липидов. Однако содержание всех алкоголей в неомыляемой фракции оказалось настолько малым, что они могут связывать в эфиры только небольшую часть жирных кислот, освобождаемых при омылении. Поэтому естественно возник вопрос, с чем связаны не входящие в состав воска жирные кислоты?

Липиды дифтерийного микроба при омылении спиртовым раствором едкого калия выделяют обильный осадок так называемой углеводной фракции, в составе которой после гидролиза обнаружены *d*-галактоза и неизвестная пентоза. Столь своеобразный состав изучаемых липидов дал повод к тому, чтобы исследовать структуру некоторых сложных соединений в них.

Результаты экспериментальных исследований

Эфирный экстракт из сухих дифтерийных микробов, содержащий всегда большое количество свободных жирных кислот, от $\frac{1}{3}$ до $\frac{2}{3}$ в различных образцах, был подвергнут разделению с целью получить из него в целом виде сложные соединения. Значительная порция эфирного экстракта, соответственно его числу кислотности, точно нейтрализована титрованным водным раствором едкого калия. Полученная смесь сильно разведена дистиллированной водой, нагрета и в горячем виде разделена фильтрованием на две фракции: 1) фракцию жирных кислот и 2) фракцию «нейтрального жира». Жирные кислоты получены в свободном состоянии путем обработки их калийных солей избытком 10% раствора соляной кислоты. Свободные кислоты экстрагированы из смеси наркотным эфиром, промыты дистиллированной водой и высушены, после чего они имеют вид белого порошка.

Фракция «нейтрального жира» — осадок после отфильтрования калийных солей жирных кислот — в свою очередь делится на две фракции: 1) растворимую в эфире и 2) не растворимую в эфире при многократной обработке этим растворителем.

В дальнейшем были исследованы как целый эфирный экстракт, так и полученные из него отдельные фракции.

Углеводная фракция. Количество углеводной фракции в целом эфирном экстракте может быть учтено, поскольку эта фракция получается без потерь. Ее содержание 12,6%. Другие фракции, получение которых связано с потерями вещества, нами количественно не учтены. Так как до гидролиза углеводной фракции она обнаруживает качественными пробами следы редуцирующих веществ, последние были определены количественно методом Хагедорна — Иенсена. Содержание редуцирующего сахара в пересчете на глюкозу 0,3%. Количество редуцирующих веществ в той же углеводной фракции после гидролиза 5% соляной кислотой, производившегося до момента максимального содержания сахара в гидролизате и определенного методом Бертрана: 1—34,1%; 2—35,7%; среднее — 34,9%. Содержание золы в углеводной фракции, найденное весовым методом: 1 — 41,9%; 2 — 41,6%; среднее — 41,7%. Поскольку предыдущими исследователями обнаружено в углеводной фракции наличие пентозы, последняя определена нами количественно весовым путем в виде фурфурол-флороглюцида по методу Кребер — Толленса. Количество пентозы в исследуемой фракции 1,62%. Количественное определение азота в той же фракции (по методу Кьельдаля) дало 0,18%. В золе качественными реакциями обнаружено присутствие кальция, фосфатов и сульфатов.

Как прежде установлено (1), воднорастворимая часть углеводной фракции представляет собой сложный углевод, образующий при гидролизе галактозу. Но этот углевод не может быть отнесен к полисахаридам коллоидального типа, поскольку он легко кристаллизуется при упаривании концентрированного водного раствора. Кристаллы имеют кубическую форму. Это вещество свободно проходит через коллоидную мембрану при диализе.

Фракция свободных жирных кислот. Число нейтрализации: 1 — 104,85; 2 — 105,06; среднее — 104,95. Средний молекулярный вес, вычисленный по числу нейтрализации, 523. Ацетильное число: 1—126,5; 2—127,3; среднее — 126,9. Иодное число: 1—42,2; 2—43,7; среднее — 42,9.

Фракция «нейтрального жира», растворимого в эфире. Вещество представляет собой полужидкую коричневую массу с т. пл. 18°. При определении числа омыления обнаружилась весьма трудная омыляемость этой фракции: максимальное число омыления получено только после 8-часового кипячения с 5-кратным количеством 2N раствора едкого калия в спирте. Полученное число омыления 125,9. Ацетильное число 96,12. Иодное число: 1 — 43,2; 2 — 44,2; среднее — 43,7.

Исследуемый «нейтральный жир», не обладая совершенно редуцирующими свойствами до гидролиза, обнаруживает наличие редуцирующего сахара после гидролиза. Учитывая трудную омыляемость «жира» и в целях количественного определения содержащегося в нем сахара, гидролиз нами проведен следующим образом. Навеска «жира» 0,9472 г обрабатывалась 5-кратным объемом 0,5N спиртового раствора едкого

Таблица 1

Продолжительность гидролиза в мин.	Содержание сахара в % (глюкоза)	Продолжительность гидролиза в мин.	Содержание сахара в % (глюкоза)
15	4,90	120	—
30	5,22	135	7,18
45	5,70	150	7,54
60	5,70	165	8,07
75	—	180	6,59
90	6,96	195	4,75

калия 30 мин. при кипячении на водяной бане с обратным холодильником. После того добавлено 7,5 мл 5% раствора серной кислоты в спирте. Кислотный гидролиз велся 4 часа. Затем спирт был выпарен с добавлением воды небольшими порциями и вся смесь переведена в мерную колбочку с доведением объема до 50 мл. После гидролиза количество редуцирующих веществ, определенное методом Хагедорна — Иенсена, достигло 2,26%. Взято 5 мл полученной смеси, эта порция разбавлена до 50 мл 5% водным раствором серной кислоты, разлита в стеклянные ампулы и подверглась обработке в кипящей воде, откуда ампулы брались через каждые 15 мин. для определения сахара по методу Хагедорна — Иенсена. Табл. 1 показывает ход гидролиза.

Таким образом, максимальное количество редуцирующего сахара, полученное при гидролизе «нейтрального жира», 8,07%. Гидролизат исследуемого вещества дает положительные реакции на пентозу.

Фракция «нейтрального жира», не растворимого в эфире. Вещество представляет собой белый, блестящий, аморфный порошок, имеющий т. пл. 115°. Вещество не растворимо не только в эфире, но также в спирте и воде, при нагревании и на холоду. При гидролизе вещества разведенной серной кислотой образуется редуцирующий сахар и жирные кислоты, которые экстрагированы из смеси наркотным эфиром, тщательно отмыты от серной кислоты водой, а после удаления растворителя получены в виде белого порошка. Число нейтрализации жирных кислот, определенное путем титрования, 114, откуда средний молекулярный вес 491.

Ввиду малого количества полученного нами вещества не удалось установить количественное содержание сахара в нем. Гидролиз этого «жира» происходит так же трудно, как и в предыдущем случае. При щелочном гидролизе нельзя рассчитывать на количественное получение сахара, поскольку последний легко разрушается при нагревании в щелочной среде. Кислотное омыление в данном случае еще труднее, чем в отношении «жира», растворимого в эфире, и максимальное количество редуцирующего сахара в гидролизуемой смеси здесь достигало лишь 2,29%.

Обсуждение результатов

Исследованная нами углеводная фракция липидов (осадок, выпадающий при омылении эфирного экстракта спиртовой щелочью) содержит около 35% углеводов и около 42% минеральных веществ. Таким образом, свыше 20% всей фракции принадлежит неизвестным веществам. Однако, после того как мы познакомились с весьма трудной омыляемостью своеобразных сложных эфиров углеводов с высшими жирными кислотами, можно предположить, что омыление не идет до конца и вместе с углеводами и минеральными веществами выпадают в осадок вышеописанные «жиры».

Наиболее важным итогом настоящего исследования мы считаем открытие в липидах дифтерийного микроба двух новых соединений, легко отделенных друг от друга и являющихся сложными эфирами жирных кислот с нередуцирующими сахарами.

Первый из этих «жиров», растворимый в эфире, вероятно, представляет собой нередуцирующий дисахарид галактозы, гидроксильные группы которого полностью связаны остатками жирных кислот. В пользу такого предположения говорят следующие факты. Средний молекулярный вес жирных кислот этого вещества 379 (вычислено по числу омыления за вычетом содержания сахара), откуда молекулярный вес всего соединения, состоящего из 8 остатков жирных кислот и одного остатка дисахарида, должен равняться 3328. Теоретическое содержание сахара в таком соединении должно равняться 10,3%. Экспериментально найден-

ное количество равняется 8,07%. Если принять во внимание неизбежное частичное разрушение сахара при длительном гидролизе, то едва ли можно ожидать лучшего совпадения. Однако следует заметить, что в случае трисахарида или тетрасахарида найденное содержание сахара в таком «жире» было бы почти так же близко к теоретическому. Следовательно, наличие именно дисахарида является лишь предположением, нуждающимся в дальнейших доказательствах. Одно несомненно, что углевод, входящий в состав исследованного вещества, является кристаллизующимся, диализуемым соединением.

Невыясненным остается вопрос о роли другого углеводного компонента — пентозы. Последняя содержится в том же эфирно-растворимом «жире», но ее содержание весьма незначительно по сравнению с количеством галактозы. Входит ли пентоза в состав сложного углевода вместе с галактозой или самостоятельно образует сложный углевод, дающий сложные эфиры с жирными кислотами, неизвестно. Таким образом, мы еще не знаем, можно ли считать исследованное вещество однородным или оно является смесью двух «жиров».

Во втором, эфирно-нерастворимом «жире», так же как и в первом, несомненно доказано наличие сложного эфира нередуцирующего углевода с жирными кислотами.

Андерсон с сотрудниками (², ³) обнаружил дисахарид трегалозу, образующую сложные эфиры с жирными кислотами в составе микобактерий туберкулеза и лепры. Обнаруженные нами теперь вещества, состоящие из других углеводов и жирных кислот, в составе коринебактерий свидетельствуют о распространенности подобных «жиров» в микробном царстве. Сложные эфиры углеводов с высшими жирными кислотами мы предлагаем называть микрозидами. Эти соединения, как вещества, построенные только из двух компонентов — сахара и жирных кислот, должны быть отнесены к простым липидам. Среди последних нам известно только два класса соединений — жиры и воски, различающиеся между собой спиртовыми компонентами (глицерин в жирах и высшие одноатомные спирты в восках). Едва ли следует доказывать отличие сахаров не только от одноатомных спиртов, но и от глицерина. Выделение микрозидов в особый класс липидов тем более оправдано, что они резко отличаются от жиров и восков своим высоким молекулярным весом и другими физическими и химическими свойствами.

Ростовский н/Д институт
эпидемиологии и микробиологии

Поступило
15 I 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. М. Губарев и И. Л. Вакуленко, Биохимия, **10**, 285 (1945). ² R. J. Anderson and E. Chergaff, J. Biol. Chem., **84**, 703 (1929). ³ R. J. Anderson, R. Reeves and J. Crowder, *ibid.*, **121**, 669 (1937).