



УДК 543.544.545 : 576.851.315

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
СВОБОДНЫХ ЛИПИДОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*

Кузьменко Т. Е., Головня Р. В.

Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

Воронова Е. А.

Горьковский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Горький

Методами газожидкостной хроматографии на насадочных и капиллярных колонках с применением реакционной хроматографии и масс-спектрометрии определен состав высших жирных кислот свободно экстрагируемых липидов трех музейных штаммов *Vibrio cholerae*. В липидах холерных вибрионов впервые найдены нормальные кислоты 19:0, 20:0, 12:1, 13:1, 15:1, 19:1, 20:1; *изо*-кислоты 12:0, 13:0, 15:0, 17:0; *антеизо*-кислоты 15:0, 17:0; линолевая кислота (18:2 ω 6). Установлено, что мононенасыщенные кислоты представляют собой смеси ω-изомеров*.

Исследование состава высших жирных кислот (ВЖК) липидов холерных вибрионов стимулируется необходимостью разработки дополнительных критериев идентификации этих микроорганизмов. Как известно, спектры ВЖК широко используются в качестве таксономического признака для многих групп бактерий [1–4]. Применение их в случае *Vibrio cholerae* затруднено тем, что литературные данные [5–10] получены на разных штаммах, на культурах, выращенных в нестандартных условиях, с применением различных методик выделения и идентификации ВЖК. Таким образом, неясно, отражают ли эти данные истинную картину различий в составе ВЖК разных штаммов или обнаруженные различия — следствие нестандартности условий эксперимента.

Целью настоящей работы являлось детальное изучение состава ВЖК свободно экстрагируемых липидов трех музейных штаммов *Vibrio cholerae*, выращенных в стандартных условиях: *biotype cholerae* 569-B (Inaba), *biotype cholerae* P1-145 (Ogawa) и *biotype eltor* 18647 (Inaba).

Газохроматографический анализ проводили на набивных и капиллярных колонках с применением методов реакционной хроматографии и масс-спектрометрии. Жирные кислоты анализировали в форме метиловых эфиров (МЭЖК). Результаты ГЖХ-идентификации представлены в таблице.

На первом этапе анализ проводили по методу [11] на четырех насадочных колонках с полисилоксановыми фазами плавно изменяющейся полярности: SE-30, OV-225, SILAR 5CP, SILAR 10C. Высокая стабильность колонок в течение длительного срока работы [12] позволяет про-

* В обозначении жирной кислоты первая цифра показывает число атомов углерода, вторая — количество метилентррывающихся двойных связей, величина ω указывает на положение двойных связей в цепи, считая от концевой метильной группы.

Состав высших жирных кислот свободных липидов *Vibrio cholerae**

№ пика на рис. 1—5	Жирная кислота	ЭДЦ на OV-101	Содержание в относительных % в штаммах ***		
			569-B	P1-145	18647
1	<i>изо</i> -12:0	11,61	Следы	Следы	Следы
2	12:1	11,83	»	»	»
3	<i>н</i> -12:0	12,00	0,1	0,1	0,1
4	<i>изо</i> -13:0	12,62	Следы	Следы	Следы
5	13:1	12,82	»	»	»
6	<i>н</i> -13:0	13,00	0,1	0,1	0,1
7	<i>изо</i> -14:0**	13,64	0,2	0,2	0,2
8	14:1ω7**	13,79	0,3	0,3	0,3
9	14:1ω5	13,81	Следы	Следы	Следы
10	<i>н</i> -14:0**	14,00	1,7	2,8	2,0
11	<i>изо</i> -15:0**	14,65	Следы	Следы	Следы
12	<i>антиизо</i> -15:0	14,74	»	»	»
13	15:1ω8**	14,76	0,3	0,4	0,3
14	15:1ω6**	14,82	0,2	0,2	0,1
15	<i>н</i> -15:0**	15,00	1,9	2,7	2,2
16	Не идент.	15,43	0,1	0,1	0,1
17	<i>изо</i> -16:0**	15,64	3,2	4,2	4,4
18	16:1ω8	15,76	} ~35	} ~35	} ~35
19	16:1ω7**	15,78			
20	16:1ω6	15,80			
21	<i>н</i> -16:0**	16,00	21,3 [†]	23,0	24,2
22	<i>изо</i> -17:0**	16,64	Следы	Следы	Следы
23	<i>антиизо</i> -17:0	16,74	»	»	»
24	17:1ω8**	16,74	4,0	4,8	4,1
25	17:1ω6**	16,81	1,1	1,4	1,2
26	<i>н</i> -17:0**	17,00	3,6	4,1	3,7
27	Не идент.	17,44	0,1	Следы	0,1
28	18:2ω6**	17,61	} 1,2	} 2,3	} 1,7
29	<i>изо</i> -18:0**	17,64			
30	18:1ω9	17,72			
31	18:1ω7**	17,79	} 18,5	} 17,8	} 17,7
32	18:1ω5	17,82			
33	18:1ω3	17,87			
34	<i>н</i> -18:0**	18,00			
35	Не идент.	18,06	2,2	2,1	2,9
36	19:1ω8	18,73	0,1	0,1	0,1
37	19:1ω6	18,81	0,3	0,4	0,5
38	<i>н</i> -19:0	18,81	0,1	0,1	0,2
39	20:1ω7	19,00	Следы	Следы	Следы
39	20:1ω7	19,75	0,3	0,3	0,3
40	<i>н</i> -20:0	20,00	Следы	Следы	Следы

* Положение двойной связи в моноеновых кислотах, кроме 16:1ω7, 18:1ω7 и 18:1ω9, указано предположительно.

** ГЖХ-идентификация подтверждена хроматомасс-спектрометрически.

*** Для каждого штамма представлены средние данные из трех биологических повторностей. Количества менее 0,1% считали следовыми.

водить идентификацию по величинам эквивалентной длины цепи (ЭДЦ) [13] с использованием данных, полученных на стандартных МЭЖК [14]. Таким способом во всех штаммах были идентифицированы нормальные насыщенные кислоты C₁₂—C₂₀ (четные и нечетные), насыщенные *изо*-кислоты C₁₄—C₁₈ (четные и нечетные), мононенасыщенные C₁₂—C₂₀ (четные и нечетные) и липолевая кислота, из них 19:0, 20:0, 12:1, 13:1 и 18:2ω6 предположительно.

До сих пор не было известно о присутствии в липидах *Vibrio cholerae* кислот, молекулы которых содержат более 18 атомов углерода и более одной двойной связи. Для проверки правильности идентификации этих компонентов, а также для выяснения положения двойных связей в мононенасыщенных кислотах проведен анализ образцов на капиллярных колонках со стационарными фазами OV-101 и PEG 40M. На рис. 1—3 приведены хроматограммы на OV-101, показывающие близость состава МЭЖК

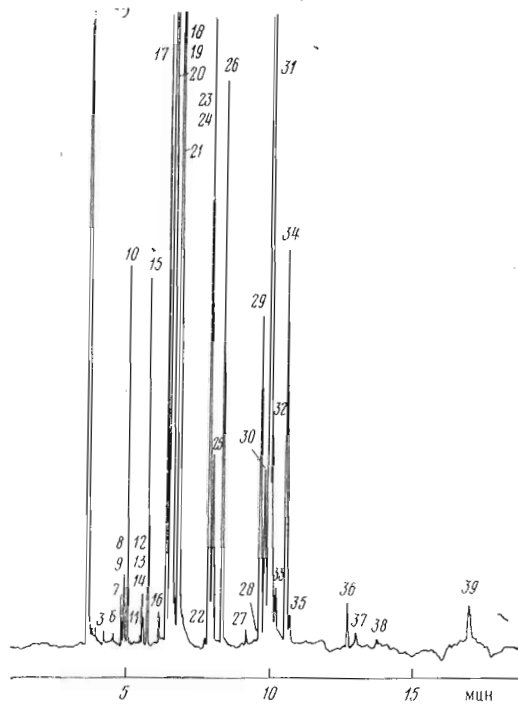


Рис. 1. Разделение МЭЖК *Vibrio cholerae* 18647 на капиллярной колонке OV-101 (0,25 мм×65 м). Температура 200° С, газ-носитель — гелий (1 мл/мин). Нумерация пиков на всех рисунках соответствует порядковому номеру кислоты в таблице.

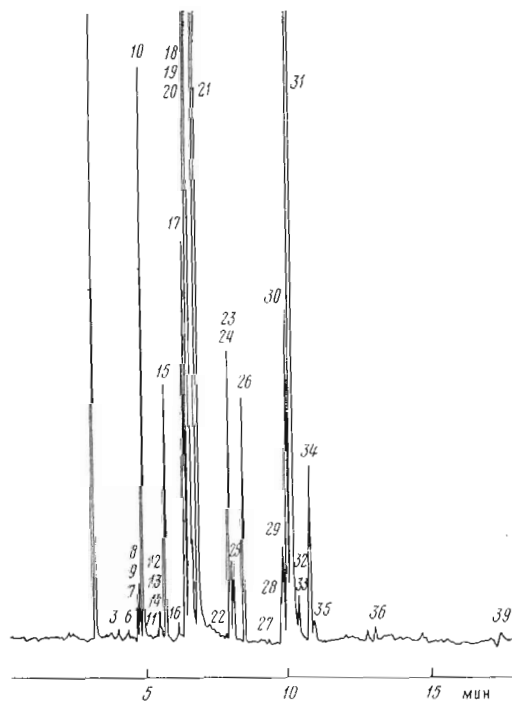


Рис. 2. Разделение МЭЖК *Vibrio cholerae* P 1-145 на капиллярной колонке OV-101 (0,25 мм×65 м). Условия — см. рис. 1

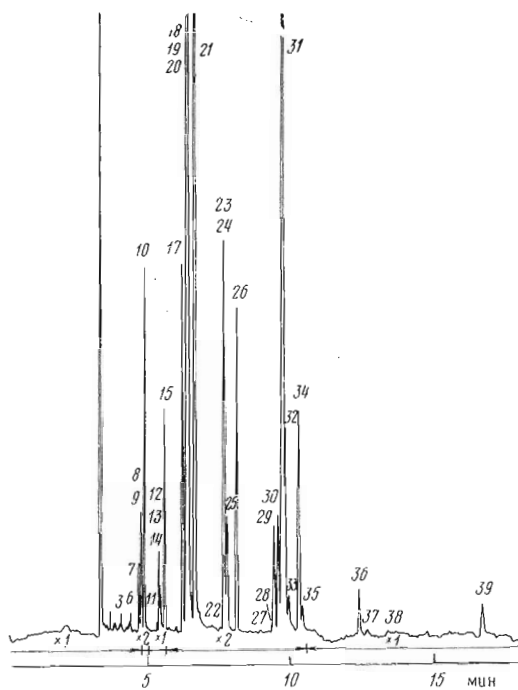


Рис. 3. Разделение МЭЖК *Vibrio cholerae* 569-B на капиллярной колонке OV-101 (0,25 мм×65 м). Условия — см. рис. 1

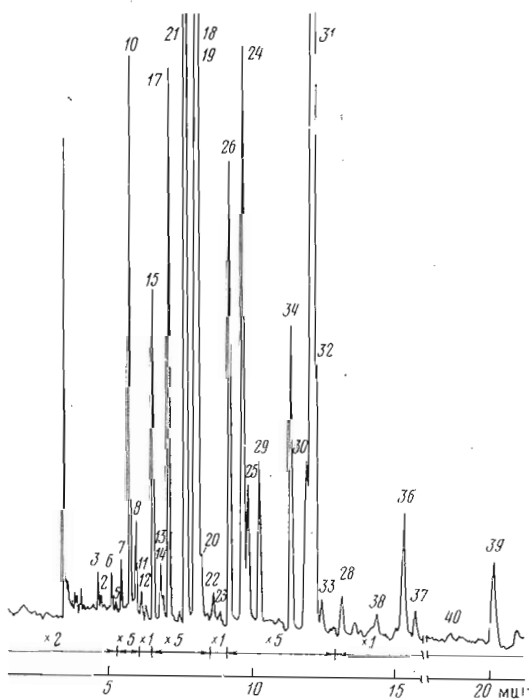


Рис. 4. Разделение МЭЖК *Vibrio cholerae* 569-B на капиллярной колонке PEG 40 M (0,32 мм×75 м). Температура 210° С, газ-носитель — гелий (1 мл/мин).

всех трех исследованных штаммов. На рис. 4 в качестве примера показана хроматограмма МЭЖК *Vibrio cholerae* 569-В на капиллярной колонке с фазой PEG 40М.

ГЖХ-анализ разных по величине проб МЭЖК всех трех штаммов позволил установить следующее:

1. Наряду с известными из литературы нормальными кислотами 12:0—18:0 [7, 8] свободные липиды *Vibrio cholerae* содержат следовые количества кислот n -19:0 и n -20:0, которые идентифицированы сравнением со стандартными МЭЖК при анализе больших проб, перегружающих колонки по основным компонентам.

2. Кроме известных ранее моноеновых кислот 14:1, 16:1, 17:1, 18:1 в смесях ВЖК трех штаммов *Vibrio cholerae* присутствуют в небольших количествах кислоты 12:1, 13:1, а также 15:1, 19:1, 20:1, составляющие по 0,3—0,5%. Они идентифицированы по величинам ЭДЦ, линейно зависящим от числа атомов углерода в гомологических рядах МЭЖК [15]. Кроме того, их строение подтверждено анализом на колонке с PEG 40М, с которой они элюируются после соответствующих насыщенных (см. рис. 4). Полное исчезновение при гидрировании пиков ненасыщенных ВЖК с возрастанием пиков кислот n -12:0, 13:0, 15:0, 19:0, 20:0 также подтверждает структуру этих веществ.

3. Большинство мононенасыщенных кислот, входящих в состав свободных липидов *Vibrio cholerae*, не индивидуальны, а представлены смесями ω -изомеров. Известно, что порядок выхода ω -изомеров не зависит от полярности колонки [15]. Таким образом, сходство участков хроматограмм, соответствующих моноеновым МЭЖК, на колонках OV-101 и PEG 40М доказывает, что эти кислоты действительно присутствуют в виде смесей ω -изомеров (ср., например, группы пиков № 30—33, соответствующие ω -изомерам 18:1 на рис. 3 и 4).

Чем ближе положение двойных связей и сильнее различия в количественных соотношениях изомеров, тем труднее их разделить хроматографически. Так, в случае кислоты 16:1 о неиндивидуальности пика № 18—20 (рис. 1, 3) можно судить лишь по его аномальной ширине, а на рис. 2, 4 изомер 16:1 ω 6 отделен от основного компонента 16:1 ω 7 в виде плеча.

Положение двойных связей в МЭЖК 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, 18:1 ω 9 определено с помощью внутренних стандартов. Для остальных моноенов положение ненасыщенности определено предположительно, на основании приближенно линейной зависимости величин ЭДЦ от числа атомов углерода в гомологических рядах кислот с одинаковым значением ω [15]. Точное масс-спектрометрическое определение связано с необходимостью выделения изомеров в чистом виде и получения производных, что в данном случае сопряжено с большими трудностями. Как видно из данных таблицы, в семействах моноеновых кислот с четным числом атомов углерода основной изомер содержит двойную связь в положении ω 7, а в нечетных — ω 8.

4. Помимо найденных ранее четных *изо*-кислот 14:0—18:0 [7, 8] у *Vibrio cholerae* обнаружены нечетные *изо*-кислоты 13:0—17:0, а также *антеизо*-кислоты — 15:0 и 17:0, присутствующие в количествах, меньших 0,1%. *Изо*-Кислоты идентифицированы по величинам ЭДЦ до и после гидрирования (см. рис. 5), которое проводили в делителе потока перед капиллярной колонкой по методу [16], разработанному для анализа микроколичеств природных смесей МЭЖК. При гидрировании исчезают мононенасыщенные кислоты, маскирующие *антеизо*-15:0 и 17:0 (№ 12, 23). Из колонки с фазой PEG 40М *антеизо*-кислоты элюируются в индивидуальном виде (см. рис. 4) и идентифицируются с помощью внутренних стандартов. *антеизо*-Кислоты, которые, как известно [2, 17], характерны для грамположительных бактерий, в вибрионах найдены впервые.

По данным работ [6, 7], в мутантных штаммах *Vibrio cholerae* с морщинистыми колониями обнаружены большие количества циклопропано-

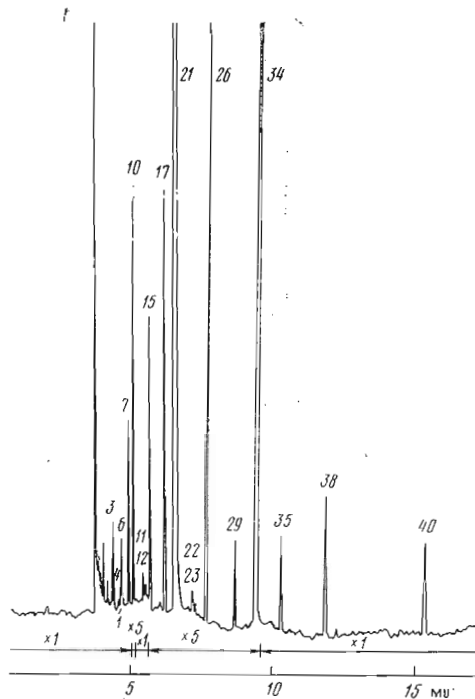


Рис. 5. Разделение МЭЖК *Vibrio cholerae* 569-B после гидрирования (условия гидрирования см. в тексте). Капиллярная колонка OV-101 (0,25 мм×65 м). Температура 200° С, газ-носитель – водород (1 мл/мин)

вых кислот $\Delta C_{17:0}$ и $\Delta C_{19:0}$, в то время как в родительских формах с гладкими колониями они не найдены. Для выяснения вопроса о присутствии циклопропановых кислот смеси МЭЖК из *Vibrio cholerae* в наших опытах бромировали по методике [18]. Сравнение хроматограмм, полученных после гидрирования (см. выше) и бромирования, показало, что циклопропановые кислоты в свободных липидах *Vibrio cholerae* не содержатся.

Во всех случаях, когда позволяло содержание веществ в пробе и характер разделения, ГЖХ-идентификацию подтверждали хромато-масс-спектрометрически в режиме электронного удара. Для 18 компонентов, помеченных в таблице звездочкой, строение подтверждено наличием соответствующих молекулярных ионов и характерной фрагментацией [19, 20]. Среди них линолевая кислота 18:2 ω 6, молекулярный ион которой (M^+294) обнаружен на фоне масс-спектра МЭЖК *изо*-18:0 во всех образцах. До сих пор присутствие полиненасыщенных кислот в бактериальных липидах является предметом обсуждения. Большинство авторов считают, что кислоты, содержащие более одной двойной связи, не свойственны бактериальной клетке. Тем не менее в работе [8] сообщается о присутствии линолевой кислоты в морских вибрионах, псевдомонадах и ряде других бактерий. В настоящей работе впервые доказано, что линолевая кислота входит в состав липидов холерных вибрионов, причем содержание ее в штамме P1-145 (рис. 2, пик № 28) достигает 0,2–0,3%.

Пики № 16 (ЭДЦ 15,43), № 27 (ЭДЦ 17,44) и № 35 (ЭДЦ 18,06) не идентифицированы. На основании величин ЭДЦ и результатов гидрирования можно предполагать, что МЭЖК № 16 и 27 относятся к одному гомологическому ряду, содержат в цепи соответственно 16 и 18 атомов углерода и полярную функциональную группу, нестойкую при гидрировании. Компонент № 35 при гидрировании, по-видимому, превращается в насыщенное соединение с ЭДЦ 18,38. Это дает основание предположить, что исходная кислота содержит 19 углеродных атомов, двойную связь или

другую, неустойчивую при гидрировании функциональную группу и разветвление в положении 11–13 [20]. Невысокое содержание этих компонентов в смеси не позволило получить для них четкие масс-спектры и соотнести пики на колонках с OV-101 и PEG 40M, что дало бы дополнительную информацию об их строении.

Экспериментальная часть

Для исследования взяты коллекционные штаммы *Vibrio cholerae* Всесоюзного саратовского института «Микроб», указанные выше. Культуры выращивали на 3% агаре со щелочной (рН 7,8) 1% пептоновой водой в течение 24 ч при 37° С и собирали в стационарной фазе роста. Выделение липидов проводили согласно [21]. Клетки смывали физиологическим раствором, биомассу отделяли центрифугированием, дважды промывали физиологическим раствором, суспендировали в смеси хлороформ–метанол, 2:1, и выдерживали при 4° С 8 дней, в течение которых контролировали стерильность массы. Раствор липидов отделяли центрифугированием и упаривали в токе азота. Из 10 г биомассы получали 150–200 мг липидов.

Гидролиз липидов проводили 0,5 н. NaOH в метаноле при кипячении на водяной бане в течение 15 мин. Кислоты метилировали 13% раствором трехфтористого бора в метаноле согласно [22]. Образцы МЭЖК хранили при –10° С в запаянных ампулах.

Газохроматографический анализ проводили на хроматографе Pye Unicam 104, модель 64, с пламенно-ионизационным детектором. Использовали стеклянные колонки 0,4×150 см, наполненные 3% SE-30 на газохроме Q(100–120 меш) и 5% OV-225 на хромосорбе W, AW DMCS(80–100 меш), а также колонки (0,4×210 см), наполненные 3% SILAR 5CP и 10% SILAR 10C [14], обе на хромосорбе W, AW(80–100 меш). Газ-носитель – азот (45–60 мл/мин), температура колонки 200° С, температура детектора и испарителя 230° С. Анализ на стеклянных капиллярных колонках с фазами OV-101 (0,25 мм×65 м), PEG 40M (0,32 мм×75 м) проводили при температурах 200 и 210° С соответственно, газ-носитель – гелий (1 мл/мин). Температура детектора и испарителя 230° С, соотношение потоков, поступающих в колонку и на сброс, 1:100. Объем проб смесей МЭЖК – 0,1 мкл.

Использовали инертные носители, стационарные фазы и стандартные метиловые эфиры жирных кислот фирм Applied Science Laboratories, Supelco, Sigma (США) и Werner Gunter (ФРГ).

ГЖХ-идентификацию МЭЖК проводили по величинам эквивалентных длин цепи [12] и с помощью внутренних стандартов. Величины ЭДЦ (средние из 3–7 измерений) рассчитывали по формуле

$$\text{ЭДЦ}_x = n + \frac{\lg t'_{n+1} - \lg t'_x}{\lg t'_{n+1} - \lg t'_n},$$

где n и $(n+1)$ – число атомов углерода в молекулах метиловых эфиров нормальных насыщенных жирных кислот, между которыми на хроматограмме находится пик компонента x ; t' – исправленное время удерживания компонента. Для расчета величин ЭДЦ использовали ряд нормальных насыщенных МЭЖК C_{11} – C_{20} .

Количество содержание МЭЖК в относительных процентах определяли при анализе на капиллярной колонке OV-101 до и после гидрирования по формуле

$$C_x = \frac{S_x}{\sum_x S_x} \cdot 100,$$

где $S_x = h_x t_x$ — величина, пропорциональная площади пика (т. е. количеству) компонента x ; h_x и t_x — высота и время удерживания пика, соответствующего компоненту x [23].

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре MS 9 (AEI, Англия) со струйным сепаратором в режиме электронного удара с энергией 50 эВ. Температура ионного источника 200° С, давление $2 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст., температура сепаратора 150° С. Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке (0,25 мм \times 25 м) с OV-101+OV-17 при программировании температуры от 150 до 225° С со скоростью 1°/мин и скорости потока газа-носителя (гелия) 1 мл/мин. Соотношение потоков, поступающих на сброс и в капиллярную колонку, 20 : 1. Проба — 0,1 мкл раствора смеси МЭЖК в хлороформе.

Гидрирование смесей МЭЖК проводили по методу [16] в слое катализатора (1% Pt на хромсорбе W; 20 мг), помещенном в делителе потока непосредственно перед капиллярной колонкой. Пробу 0,1 мкл смеси МЭЖК в растворителе или без него вводили шприцем на слой катализатора, нагретый в блоке испарителя до 230° С. Скорость потока водорода через катализатор ~100 мл/мин. Реакция проходит мгновенно; продукты гидрирования с током водорода после сброса (100 : 1) поступают в капиллярную колонку.

Бромирование смесей МЭЖК проводили по модифицированной методике [18]. 20 мг смеси МЭЖК растворяли в 1 мл абсолютного эфира, прибавляли 1 мл раствора брома в эфире (1 : 5) и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Эфир и избыток брома отгоняли в вакууме, остаток обрабатывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Продукты реакции экстрагировали гексаном (3 раза по 3 мл), экстракт промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод, высушивали над молекулярными ситами 4 Å, упаривали. Продукты бромирования анализировали на капиллярной колонке с фазой OV-101.

Авторы выражают благодарность А. Л. Самусенко за приготовление капиллярных колонок и С. В. Витту за помощь в выполнении хромато-масс-спектрометрического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свияк К. М., Васюренко З. П. (1974) Изв. АН СССР. Сер. биол., 5, 715–727.
2. Reidmann M. (1972) Chem. Ztg., 96, 618–622.
3. Kramzar G. R., Lynch D. L. (1976) Microbios, 17, 7–16.
4. Lechevalier M. (1977) CRC Crit. Revs. Microbiol., 5, 109–210.
5. Brian B. L., Gardner E. W. (1966) Texas Rept. Biol. Med., 24, 568–575.
6. Buford L., Brian B. L., Gardner E. W. (1968) J. Bacteriol., 96, 2181–2182.
7. Buford L., Brian B. L., Gardner E. W. (1968) J. Inf. Dis., 118, 47–53.
8. Raziuddin S., Ambegaohar S. D. (1976) Ind. J. Biochem. and Biophys., 13, 376–377.
9. Oliver J. D., Colwell R. R. (1973) Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 442–458.
10. Raziuddin S. (1977) Ind. J. Biochem. and Biophys., 14, 163–166.
11. Головня Р. В., Уралец В. П., Кузьменко Т. Е. (1977) Ж. аналит. химии, 32, 340–346.
12. Головня Р. В., Кузьменко Т. Е., Уралец В. П., Самусенко А. Л. (1978) Прикл. биохимия и микробиол., 14, 609–614.
13. Miwa T. K. (1963) J. Amer. Oil Chem. Soc., 40, 309–313.
14. Golovnya R. V., Uralets V. P., Kuzmenko T. E. (1976) J. Chromatogr., 121, 118–121.
15. Ackman R. G. (1972) Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids (Holmann K. T., ed.), vol. XII. pp. 3–167.
16. Kuzmenko T. E., Samusenko A. L., Uralets V. P., Golovnya R. V. (1979) High Res. Chromatogr. and Chromatogr. Commun., 1, 43–44.
17. Kaneda T. (1967) J. Bacteriol., 93, 894–903.
18. Brian B. L., Gardner E. W. (1968) Appl. Microbiol., 16, 549–552.
19. Odham G., Stenhagen E. (1972) Biochemical Applications of Mass-Spectrometry (Waller C. R., ed.), Wiley Interscience, N. Y.—London.
20. Apon J. M. B., Nicolaidis N. (1975) J. Chromatogr. Sci., 13, 467–473.
21. Кейтс М. (1975) Техника липидологии, гл. I и II, «Мир», М.

22. Metcalfe L. D., Schmitz A. A. (1961) Anal. Chem., 33, 363-364.
23. Коган Л. А. (1975) в кн.: Количественная газовая хроматография, с. 85, «Химия», М.

Поступила в редакцию
23.V.1979

После доработки
18.VI.1979

A COMPOSITION OF HIGHER FATTY ACIDS OF *VIBRIO CHOLERAE* FREE LIPIDS

KUZMENKO T. E., GOLOVNYA R. V., VORONOVA E. A.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow; Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Gorki*

The higher fatty acid composition of free lipids in the 3 *Vibrio cholerae* reference strains was determined by gas-liquid chromatography on packed and capillary columns using the reaction chromatography and mass spectrometry. The normal acids 19:0, 20:0, 12:1, 13:1, 15:1, 19:1, 20:1, *iso*-acids 12:0, 13:0, 15:0, 17:0, *anteiso*-acids 15:0, 17:0 and linoleic acid 18:2 ω 6 were found for the first time in *Vibrio cholerae* lipids. The monounsaturated acids were shown to be a mixture of the ω -isomers.
