

海洋真菌多不饱和脂肪酸的快速检测*

卞曙光 张晓昱 张磊** 黄开勋

(华中理工大学化学系 武汉 430074)

摘要:从海水中分离了一种产 EPA 和 DHA 的真菌,并建立了微生物油脂的快速提取、甲酯化及其多不饱和脂肪酸的含量的气相色谱测定方法。结果表明:采用 $\text{CHCl}_3\text{-KOH-CH}_3\text{OH}$ 一步提取甲酯化适合于产多不饱和脂肪酸菌株的快速检测。对其油脂的提取,采用湿菌丝魏氏盐酸水解法较为合适;并用 $\text{KOH-CH}_3\text{OH}$ 法对所得油脂进行了甲酯化。最后,运用毛细管气相色谱采用外标法测定了甲酯化样品中多不饱和脂肪酸的含量,其油脂中 EPA 和 DHA 的含量分别为 7.32% 和 7.58%。

关键词:多不饱和脂肪酸, EPA, DHA, GC

中图分类号: O657.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2001)01-073-04

A FAST DETERMINATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS PRODUCED BY MARINE FUNGUS*

BIAN Shu-Guang ZHANG Xiao-Yu ZHANG Lei** HUANG Kai-Xun

(Dept. of Chemistry, Huazhong University of Sci. & Tech. Wuhan 430074)

Abstract: A fungus that is capable of producing EPA and DHA was isolated from seawater. A fast extraction and methyl esterification of microbial lipid were established as well as their content determination by capillary gas chromatography using external calibration method. The results showed that the methyl ester prepared directly from the wet mycelia treated with $\text{CHCl}_3\text{-KOH-CH}_3\text{OH}$ is less time-consuming and the method fits for the fast determination. To determine its EPA and DHA content, the wet mycelia was hydrolyzed according to Weibull's method and the lipid obtained was methyl esterified with KOH-MeOH , the results obtained by capillary gas chromatography using external calibration method were 7.32% and 7.58% respectively.

Key words: Polyunsaturated fatty acids, Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid, Gas chromatography

多不饱和脂肪酸(PUFA)是指含有两个或两个以上双键,碳链数在 16~22 的直链脂肪酸。目前,受到人们普遍关注的主要有 γ -亚麻酸(GLA),二十碳五烯酸(EPA)及二十二碳六烯酸(DHA)^[1]。研究表明, GLA、EPA 具有降血脂、降血糖、抗血栓、抗炎、抑制血小板凝聚的功能;而 DHA 则具有健脑、促进大脑发育,防止老年性痴呆及抗心血管疾病的作用。^[2]。但由于人类及其它哺乳类动物缺乏 Δ^9 以上的减饱和酶,故它们在体内不能合成,只能从饮食中摄取。通常,这些

* 武汉市科委基金资助项目(No. 996001019G)

** 现在武汉华中理工大学环境科学与工程系

收稿日期:1999-11-17, 修回日期:2000-01-05

PUFAs仅存在于某些深海鱼及某些动植物体内,由于受资源的限制,其产量不能满足人们的需求,而研究表明,某些低等海洋真菌具有合成PUFA的能力^[3,4],且微生物培养具有发酵周期快,不受条件限制等优点,故成为近年来人们研究的热点。本文从海水中分离了一种产EPA和DHA的真菌,并运用HP-6890毛细管气相色谱对其含量进行了测定。

1 材料与方法

1.1 水样来源

中国南海水样加以芝麻、瓜子、亚麻子、花生、黄豆、核桃仁并于28℃富集60d得到各分离水样。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 PUFA甲酯标准品:GLA甲酯,EPA甲酯及DHA甲酯购自Sigma公司,标准品以精制苯作溶剂配制标准溶液。注射用硫酸链霉素:华北制药股份有限公司。其它试剂均为分析纯。

1.2.2 气相色谱仪:惠普HP-6890;FID检测器;HP3398AGC Chemstation积分仪;HP-IN-NOWAX(Crosslinked Polyethylene Glycol)毛细管柱:30m×0.25mm×0.25μm。HQL150-B大振幅恒温摇床:中国科学院武汉科学仪器厂。

1.3 培养基

分离用培养基M1:NaCl 30g,KCl 1g,KH₂PO₄ 1g,(NH₄)₂SO₄ 0.2g,NaHCO₃ 0.1g,可溶性淀粉25g,酵母浸出汁2g,琼脂20g,H₂O1000mL。

分离用培养基M2:可溶性淀粉10g,葡萄糖10g,酵母浸出汁10g,花生油5g,琼脂20g,H₂O1000mL。

以上培养基经灭菌后冷却至50℃~60℃后按下法加入注射用硫酸链霉素以抑菌:取国产0.5g装链霉素(100万单位)注入无菌水5mL,溶解后取1.0mL于330mL无菌水中,按10%用量加入到上述M1,M2培养基中,并倒成平皿培养基。

液体培养基:20%土豆浸出汁,2%蔗糖。

1.4 海洋微生物的分离及培养

将各富集水样分别以10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵稀释度接至M1,M2培养基上,于28℃生长,不断分离和纯化单菌落,直至得到纯种。经12.5×40倍生物显微镜观察,选取含脂肪颗粒大而密的菌种。

将分离得到的菌种接至100mL土豆培养基中,于150r/min,28℃下培养48h,20℃24h,15℃24h,并于0℃~5℃下冬化24h。菌丝收获后抽滤,并用蒸馏水冲洗3遍。

1.5 产PUFA的菌株的气相色谱定性检测

1.5.1 样品的甲酯化(CHCl₃-KOH-CH₃OH直接酯化法):取抽干的湿菌丝1g于具塞试管中,加入4mL CHCl₃和2mL 0.5mol/L KOH-CH₃OH,剧烈震荡2min,并于50℃水浴保持10min(充N₂保护),剧烈震荡2min,加入3.6mL双蒸水,再剧烈震荡1min。过滤,静置分层,取下层CHCl₃层分析。

1.5.2 气相色谱分离条件:对脂肪酸甲酯的分离,在HP-6890上采用二阶程序升温法:150℃ Δ =15℃/min 200℃(持续15min) Δ =2℃/min 240℃(持续2min)。进样口温度260℃,检测器温度260℃。H₂流速:30mL/min,空气流速:150mL/min,N₂流速:30mL/min,柱流速:1mL/min(常流),尾吹:29mL/min,分流比100:1,进样量1μL。

2 结果

2.1 海洋真菌 PUFA 的气相色谱鉴定

图1(a),(b)分别为 GLA、EPA、DHA 甲酯标准品和南海 M1 核 10^{-2} 号菌株样品的气相色谱图谱。可以看出,南海水样通过核桃仁富集后以 10^{-2} 稀释度所分离得到的菌丝中含有 EPA 及 DHA。

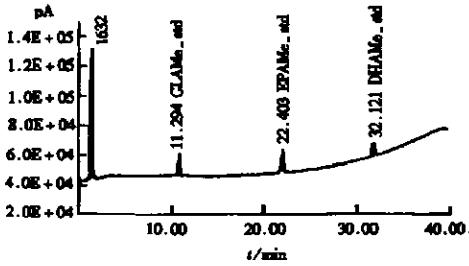


图1(a) GLA 和 DHA 甲酯标准品气相色谱图谱

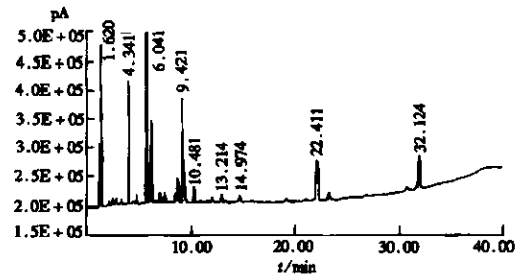


图1(b) 分离菌株甲酯样品的气相色谱图谱

2.2 不同提取方法对油脂得率的影响

先将抽干的湿菌丝于 -50°C , $10\sim 20\text{Pa}$ 冷冻干燥至恒重并研磨,对所得的菌丝按以下方法抽提:(A)于 Soxhlet 脂肪提取器中以 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}(2:1)$ 回流提取 24h;(B)以石油醚(bp: $30^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$)回流提取 24h;(C)以无水乙醚回流提取 24h;(D)魏氏盐酸水解法^[5]水解后以石油醚萃取;(E)直接取含水量约 80%的湿菌丝以魏氏盐水解法提取。各所得提取液以 N_2 吹干,并计算油脂得率。所得结果见图 2。干菌丝以氯仿/甲醇(2:1)提取,虽得率较高,所得油脂主要为棕色的固体油渣,而非流动状的油脂,因而杂质较多;

而以石油醚或乙醚提取,油脂提取率较低;干菌丝魏氏水解法由于其水解过程较为剧烈而使菌丝水解后颜色明显变黑。由于多不饱和脂肪酸很容易被氧化,故油脂中多不饱和脂肪酸有可能被氧化;而以含水量较高的湿菌丝魏氏水解法水解则在很大程度上避免了其氧化,且菌丝无需干燥,操作时间短,适合于含多不饱和脂肪酸的油脂的快速提取。

2.3 菌丝油脂中多不饱和脂肪酸含量的气相色谱测定

取 M1 核 10^{-2} 号分离菌株湿菌丝以魏氏盐酸水解法所得油脂 $30\sim 100\text{mg}$ 于 25mL 具塞试管中,加入 2mL 石油醚(bp: $30^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$)/苯(1:1, v/v)混合试剂,轻摇使溶解后加入 2mL 0.5mol/L $\text{KOH}-\text{CH}_3\text{OH}$ 于室温酯化 $10\sim 15\text{min}$ 以后水洗,静置分层后取上层有机层进样分析。

分别以 GLA 甲酯,EPA 甲酯及 DHA 甲酯标准溶液的气相色谱峰面积对其浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)作图。表 1 为 3 种脂肪酸甲酯标准品的线性回归结果。从线性回归结果来看,线性关系较好,线性范围为($50\sim 2000\mu\text{g}/\text{mL}$),线性相关系数 >0.998 。

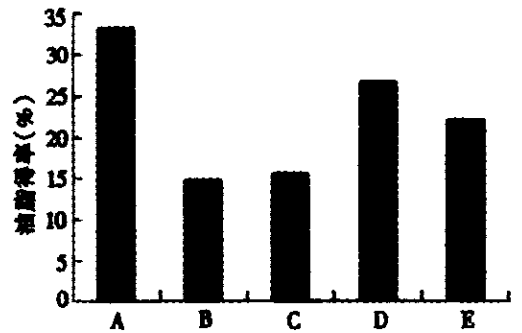


图2 不同提取方法对油脂得率的影响
A、B、C、D、E 菌株的不同提取方法

由标准曲线计算的油脂中 EPA 和 DHA 含量分别为: $(7.32 \pm 0.25)\%$ 和 $(7.58 \pm 0.30)\%$, ($n=3$)。

3 讨论

在对产生多不饱和脂肪酸的菌株分离和筛选过程中,菌丝的充分干燥,油脂的提取将是一个很大的工作量。由于 PUFA 极易被空气所氧化,一般都要对其充 N_2 或加入抗氧化剂保护。而对湿菌丝采用 $CHCl_3$ -KOH- CH_3OH 法一步抽提甲酯化,快捷、方便,且避免了菌丝在干燥及提取过程中可能的氧化。而在测定油脂中 PUFA 的含量时,则需将油脂抽提出来,经典的方法是取干燥研磨的菌丝于 Soxhlet 脂肪提取器中以非极性有机溶剂抽提,而对收获后的湿菌丝直接采用魏氏盐酸水解法来提取其油脂,菌丝无需干燥,所需时间较短,且油脂提取率较高,适合于微生物油脂的提取。

对油脂的甲酯化,主要有酸催化和碱催化两种。使用三氟化硼/甲醇催化时,尽管反应时间较短,但 BF_3 有毒,昂贵且反应体系制备麻烦,操作不方便^[6];使用硫酸-甲醇法通常需较长时间(16h)^[7];而使用石油醚-苯-氢氧化钾-甲醇体系,反应时间短(10~15min),且在常温就可反应,尤其适合含多不饱和脂肪酸的油脂的甲酯化。

HP-6890 为惠普公司的最新产品,性能稳定,操作使用方便,在所用色谱条件下,样品中各组分达到了最佳的分离。测定其多不饱和脂肪酸含量时采用外标法而不考虑内标法,主要是因为微生物所产的脂肪酸成分复杂,各种饱和、不饱和和脂肪酸都可能存在,故很难选取一个样品中不含而又与被测组分结构相似的固定内标。而外标法建立了标准曲线后,只要保持色谱条件一致,不必每次都作标准曲线,操作方便,且结果的可信度及精密较高。

表 1 脂肪酸甲酯标准品的线性回归结果

标准品	线性回归方程	相关系数 r
GLA 甲酯	$Y = -52253.15 + 1074.00x$	0.9984
EPA 甲酯	$Y = 14887.36 + 1800.28x$	0.996
DHA 甲酯	$Y = -13980.48 + 1428.69x$	0.9987

参 考 文 献

- [1] Dyerberg J. *Nutrition Reviews*, 1986, 44(4):125~138.
- [2] 铃木修. *油化学*, 1988, 37(12):1081~1096.
- [3] Cohen Z, Heimer Y. *American Oil Chemists' Society*, 1992, 238~273.
- [4] Kendrick A, Ratledge C. *Lipids*, 1992, 27:15~20.
- [5] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编著. *食物营养成分测定法(第三版)*. 北京:人民卫生出版社, 1990, 29~30.
- [6] Ke-Shun. *Jaocs*, 1994, 71(11):1179~1187.
- [7] Christie W W. *Lipid Analysis*, Oxford: Pergamon Press, 2nd ed., 1982.