

四种真菌油脂提取方法的比较研究*

李植峰 张 玲 沈晓京 赖炳森 孙树秦

(解放军北京军医学院生化教研室 北京 100071)

摘要: 采用索氏法、超临界 CO₂ 萃取法、酸热法和有机溶剂法分别提取雅致枝霉、拉曼被孢霉、少根根霉、崎雌腐霉和橙黄红酵母的油脂, 从样品要求、最小样品量、仪器要求、处理样品能力及油脂得率等方面对 4 种提取方法进行综合评价, 并对索氏法、超临界 CO₂ 萃取法和酸热法提取的雅致枝霉油脂的脂肪酸组成进行气相色谱分析。索氏法的油脂得率最高, 但耗时较长; 超临界 CO₂ 萃取法和酸热法的油脂得率相近, 较索氏法略低, 但酸热法更为简便, 单位时间内样品处理能力强; 有机溶剂法提取效果最差。我们建立的酸热法是一种适合油脂及多不饱和脂肪酸高产菌株筛选的简便、有效的真菌油脂提取方法。

关键词: 真菌, 油脂, 提取方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0072-04

A COMPARATIVE STUDY ON FOUR METHOD OF FUNGI LIPID EXTRACTION

LI Zhi-Feng ZHANG Ling SHEN Xiao-Jing LAI Bing-Sen SUN Shu-Qin

(Department of Biochemistry, Beijing Military Medical College, Beijing 100071)

Abstract: Lipids of *Thamnidium elegans*, *Monterella ramanninace*, *Rhizopus arrhizus*, *Pythium irregulare* and *Rhodotorula aurantiaca* were extracted by Soxhlet extraction, supercritical-CO₂ fluid extraction, acid-heating extraction and organic solvent extraction, respectively. Four extraction methods were evaluated on sample treatment, minimum sample quantity, requirements of apparatus, ability of treating sample and content of lipid. The components of fatty acids were analysed by gas chromatography. Soxhlet extraction can acquired maximum lipid content, but it took the most time. Supercritical-CO₂ fluid extraction and acid-heating extraction has a same lipid content which was lower than that of Soxhlet extraction. Acid-heating extraction was the most handy, and its ability to treat sample in a hour was the most powerful. Organic solvent extraction was less efficient. Acid-heating extraction was a simple and efficient method of fungi lipid extraction fitting to breed mutant strains that highly producing lipid and polyunsaturated fatty acids.

Key word: Fungi, Lipid, Extraction method

自 1985 年日本首先采用微生物发酵生产 γ -亚麻酸, 真菌已成为生产多不饱和脂肪酸的一种重要新资源^[1]。野生型菌株油脂及多不饱和脂肪酸含量均较低, 必须经诱变育种, 才能筛选到高产菌株。由于菌株筛选是一种大量而繁重的工作, 采用一种简便、快速、有效的真菌油脂提取方法无疑会事半功倍。我们在多不饱和脂肪酸高产菌株的筛选工作中, 建立了一种新的真菌油脂提取方法——酸热法, 本文将其与油脂提取常用的索氏提取法、有机溶剂法及超临界 CO₂ 萃取法进行了比较研究。

* 军队九五医药卫生科研基金资助课题 (96D069)

收稿日期: 2000-09-15, 修回日期: 2001-01-23

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 雅致枝霉 (*Thamnidium elegans*)、拉曼被孢霉 (*Mortierella ramanninace*)、少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*)、畸雌腐霉 (*Pythium irregulare*)、橙黄红酵母 (*Rhodotorulla aurantiaca*), 均购自中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心。

1.1.2 试剂及标准品: 各种化学试剂均为国产分析纯; 15种脂肪酸甲酯标准品购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 酸热法: 发酵液离心集菌, 菌体沉淀按每克菌 6mL 的比例加入 4mol/L 盐酸, 振荡混匀, 室温放置 30min 后, 沸水浴 3min, -20℃ 速冷, 加入 2 倍体积氯仿: 甲醇 (1:1) 提取液, 充分振荡后, 5000r/min 离心 5 min, 取氯仿层, 加等体积 0.1% 氯化钠溶液, 混匀, 5000r/min 离心 5 min, 取氯仿层, 挥发除去氯仿即得油脂。

1.2.2 索氏提取法: 发酵液离心集菌, 菌体沉淀于 100℃ 烘干, 研成粉末后装入索氏提取器, 石油醚加热回流提取 6h, 旋转蒸发去除石油醚即得油脂^[2]。

1.2.3 超临界 CO₂ 萃取法 (SCF-CO₂ 法): 美国 DIONEX 公司 SFE—723 型超临界萃取仪。发酵液离心集菌, 菌体沉淀于 100℃ 烘干, 研成粉末后装入萃取管, 萃取压为 40MPa, 选用 250mL/min 限流管。萃取室温度 45℃, 分离室温度 5℃。萃取时间 50min^[5]。

1.2.4 有机溶剂法: 发酵液离心集菌, 菌体沉淀按每克菌体 3mL 的比例加入氯仿: 甲醇 (1:2) 提取液, 充分振荡 2 min, 再加入 1mL 氯仿, 振荡混匀, 加 1.5mL H₂O, 振荡混匀后 5000r/min 离心 5 min, 取氯仿层, 加等体积 0.1% 氯化钠溶液, 混匀, 5000r/min 离心 5 min, 取氯仿层, 挥发除去氯仿即得油脂^[3]。

1.2.5 油脂中脂肪酸的气相色谱分析: 0.2g 油脂加入皂化液 (0.5mol/L KOH-甲醇) 2mL, 混匀, 于 60℃ 水浴皂化至油珠消失, 冷却后加入甲酯化液 (14% 三氟化硼-甲醇) 2mL, 于 60℃ 水浴甲酯化 30min, 冷却后加入正己烷 1mL, 饱和氯化钠 1mL, 离心后取上清液, 即可用 AutosystemXL 气相色谱仪 (美国 Perkin-Elmer 公司) 分析油脂组成。FAMEwax 石英毛细管色谱柱 (30 × 0.32 × 0.25)。检测器为氢火焰离子检测器 (FID)。进样口温度 225℃, 检测器温度 250℃, 分流比 10: 1, 线速 30cm/min, 衰减 16。程序升温条件为: 柱温 190℃, 维持 1min, 以 0.3℃/min 升至 191℃, 再以 4℃/min 升至 225℃, 维持 15min。

2 结果

2.1 4种方法提取雅致枝霉油脂的综合情况比较

我们以雅致枝霉为材料, 对 4 种方法提取油脂的综合情况进行了比较研究。从表 1 的结果可以看出, 索氏法提取油脂的得油率最高, 但其耗时最长, 样品需要量也较大; 酸热法与 SCF-CO₂ 法油脂得率相近, 但酸热法单位时间内处理样品的能力远高于 SCF-CO₂ 法, 且样品无需烘干处理; 有机溶剂法虽简便、快速, 但油脂得率较低。

表1 4种方法提取雅致枝霉油脂的综合情况比较

提取方法	样品	最小样品量 (mg)	仪器要求	处理样品能力	油脂得率 (%)
索氏法	干粉	2000	较高	1份/6h	9.18
酸热法	干湿均可	50	低	10份/1h	7.76
SCF-CO ₂ 法	干粉	50	高	1份/1h	7.23
有机溶剂法	干湿均可	50	低	20份/1h	4.68

2.2 索氏法、酸热法及 SCF-CO₂ 法提取的油脂的脂肪酸组成分析

采用气相色谱对油脂得率较高的索氏法、酸热法及 SCF-CO₂ 法提取的油脂的脂肪酸组成进行分析, 3种方法获得的油脂的脂肪酸组成及含量差别不大, 结果见表2。经与标准脂肪酸甲酯的保留时间比较, 索氏法及 SCF-CO₂ 法提取的油脂含12种已知脂肪酸, 且均含少量未知成分; 酸热法提取的油脂含11种已知脂肪酸, 缺少C_{20:3}, 且无未知成分。索氏法及 SCF-CO₂ 法提取的油脂中, C_{18:1}含量较酸热法提取的油脂高, 但酸热法提取的油脂中营养必需脂肪酸 (C_{18:2}、C_{18:3} (γ)、C_{18:3} (α)) 含量 (41.98%) 较索氏法 (36.36%) 及 SCF-CO₂ 法 (35.96%) 提取的油脂明显偏高。

表2 不同方法提取的雅致枝霉油脂的脂肪酸组分比较

油脂脂肪酸组成	索氏法 (%)	酸热法 (%)	SCF-CO ₂ 法 (%)
C _{12:0}	0.29	0.23	0.35
C _{14:0}	1.62	1.40	1.59
C _{16:0}	15.09	14.71	14.87
C _{18:0}	2.97	3.11	2.94
C _{18:1}	42.74	38.11	43.43
C _{18:2}	18.35	20.79	18.60
C _{18:3} (γ)	17.81	20.60	17.28
C _{18:3} (α)	0.20	0.59	0.08
C _{20:0}	0.20	0.08	0.07
C _{20:1}	0.36	0.30	0.20
C _{20:2}	0.02	0.09	0.30
C _{20:3}	0.11	0.00	0.05
未知组分	0.24	0.00	0.16

2.3 4种方法提取不同真菌油脂的效果比较

为更好地评价4种方法提取真菌油脂的效果, 我们又分别采用4种方法提取了拉曼被孢霉、少根根霉、崎雌腐霉和橙黄红酵母的油脂。从表3的油脂得率结果看, 索氏法提取任何一种真菌油脂的油脂得率都最高; 酸热法和 SCF-CO₂ 法的效果相近, 较索氏法的效果稍差; 有机溶剂法仅在提取橙黄红酵母的油脂时接近酸热法的效果, 对霉菌的提取效果很差。

表3 4种方法提取不同真菌油脂的比较

提取方法	油脂得率 (%)				
	雅致枝霉	拉曼被孢霉	少根根霉	崎雌腐霉	橙黄红酵母
索氏法	9.18	46.96	16.23	12.58	6.67
酸热法	7.76	44.08	15.82	11.96	5.72
SCF-CO ₂ 法	7.23	43.87	15.39	12.29	6.13
有机溶剂法	4.58	28.52	8.77	9.04	5.64

3 讨论

4种真菌油脂提取方法中,有机溶剂法最为简便易行,但油脂提取效果最差,原因是细胞破碎能力差,故而不能有效提取细胞内油脂。酵母菌的细胞壁较霉菌脆弱,易于被破坏,故有机溶剂法提取酵母菌油脂的效果较提取霉菌好。在多不饱和脂肪酸高产菌株的诱变筛选中,菌株油脂含量是菌株取舍的重要指标之一,有机溶剂法显然不适合菌株筛选之用。在工业大生产中,经球磨机或高压匀浆处理后的破碎菌体,可以考虑采用有机溶剂浸提油脂。

索氏法是油脂提取中最常用的方法。该方法油脂得率最高,但耗时也最长,样品需先经烘干处理,样品的需要量也大。高产菌株的诱变筛选中,多采用摇瓶小量发酵,每批样品处理量很大,索氏法难于满足菌株初筛的要求。如在高产菌株的复筛及培养条件的优化时,索氏法因其准确高效的特点,可考虑作为首选方法。

SCF-CO₂法是新一代化工分离技术,因其可在常温下操作,有效防止提取物氧化分解,无溶剂残留,安全性高等特点在生理活性物质的提取、分离上获得广泛应用。在真菌油脂的提取中,已有不少采用SCF-CO₂法的报道^[4]。我们的研究表明,SCF-CO₂法提取真菌油脂的效果虽较索氏法略差,但油脂的脂肪酸组成及含量相近,且样品需要量小,样品处理能力较索氏法大为提高。采用该方法的主要限制因素是需具有专门的仪器设备,但对具有仪器设备的单位,在菌株的筛选中,SCF-CO₂法不失为一种较理想的油脂提取方法。

酸热法是我们参考胡萝卜素提取的方法建立的一种新的油脂提取方法^[6]。该方法处理菌体,主要是利用盐酸对细胞壁中糖及蛋白质等成分的作用,使原来结构紧密的细胞壁变得疏松,再经沸水浴及速冻处理,使细胞壁进一步被破坏,有机溶剂可有效地浸提出细胞中的油脂。酸热法将细胞破碎与油脂提取结合在一起,提取能力大大加强,油脂提取效果与SCF-CO₂法相近。该方法操作简便、快速,样品不需任何处理,单位时间内可处理大量样品,极为适合菌株筛选之用。该方法提取的油脂中,营养必需脂肪酸含量较索氏法及SCF-CO₂法提取的油脂高,可能是酸热处理可使细胞膜中富含多不饱和脂肪酸的脂类更多的被提取出来。该方法提取的油脂的脂肪酸组成中,较索氏法及SCF-CO₂法提取的油脂缺少C_{20:3},是否提示其对二十碳以上的长链脂肪酸提取能力有限,尚需进一步的实验研究。

参考文献

- [1] 钟 辉, 张 峻, 邢来君, 等. 微生物学通报, 1994, 21 (4): 237~239.
- [2] 李超编著. 食品分析原理与技术, 北京: 科学技术文献出版社, 1987, 第一版, 2~11.
- [3] 胡正芝译. 食品中营养素的分析, 北京: 轻工业出版社, 1987, 第一版, 209~211.
- [4] Jarzabski A B, Malinowski J J. Biochem, 1995, 30 (4): 343~352.
- [5] 尹卓容. 食品与发酵工业, 1996, 4: 21~26.
- [6] 杨 文, 吉春明. 微生物学通报, 1995, 22 (1): 58~59.