

解脂假丝酵母 716 发酵十三烷的产物分析

庞月川

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 本文介绍了 716 菌株发酵十三烷产生的代谢产物中一元酸部分, 用 5% 聚乙二醇 20M 和 3% SE-30 两个色谱柱相配合, 进行气相色谱定性、定量的方法。

关键词 解脂假丝酵母; 发酵产物; 色谱分析

微生物发酵代谢产物, 都是混合物, 利用气相色谱技术对其分离、定性、定量, 具有快速、简单、灵敏度高优点。

目前从色谱手册和一些文章中, 经常见到脂肪酸的色谱分析条件的报道, 对石油发酵中脂肪酸的系统定性、定量, 国内却很少报道。

解脂假丝酵母是很重要的一类工业用微生物, 分析发酵液中各种代谢产物, 对了解它们的代谢途径及机理, 有重要价值。本文介绍 716 菌株发酵十三烷的代谢产物中一元酸在气相色谱上的定性、定量分析。

材料和方法

(一) 材料

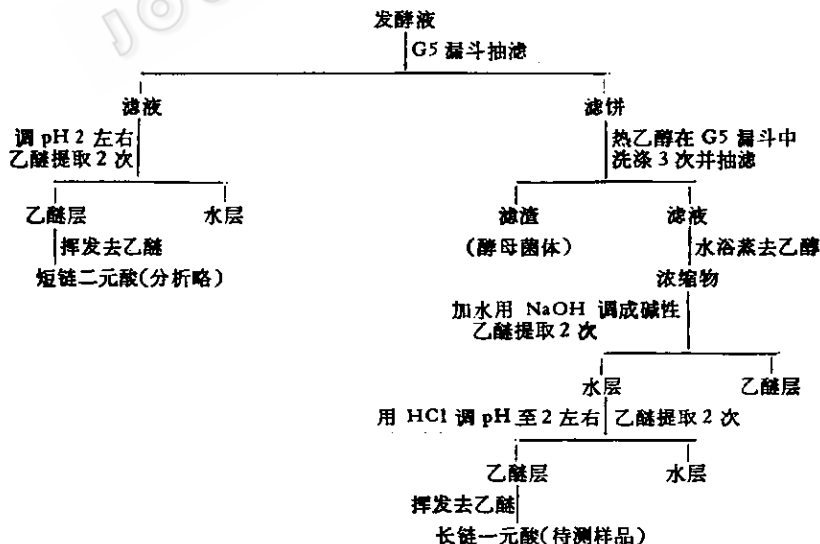
1. 实验用仪器是日本岛津厂生产的 GC-7A 气相色谱仪。氢焰离子化检测器。色谱柱是 3% SE-30 和 5% 聚乙二醇 20M 填充柱, 内径 3mm, 柱长分别为 2m 和 1.5m。担体是用 100—120 目的 chromosobr W。N₂ 气作载气。

标准样品: C_{10:0}—C_{18:0} 偶碳数的一元酸、C_{18:1}、C_{18:2}、C_{18:3} 酸。

2. 培养基成份(%): Na₂HPO₄·12H₂O 0.8, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 尿素 0.2, C₁₃ 烷 10.0, 自来水, pH 7.0。

(二) 方法

1. 样品的提取: 从一定量发酵液中提取样品的过程如下:



2. 气相色谱的定性

方法之一。

① 保留时间定性: 色谱中最常用的定性

② 碳数规律作图: 由于标准样中仅有偶

碳数的饱和一元酸,通过碳数规律作图,确定样品中是否有奇碳数的饱和一元酸。

③ 氢化加氢: 样品使稀的高锰酸钾水溶液退色,可以认定,其中有不饱和酸,而标准样仅有 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 酸,对其他碳数的不饱和酸的定性,没有标准样,又不具备碳数规律作图的条件,通过加氢把样品中不饱和酸变成相应的饱和酸进行分析。氢化加氢的方法如下:

取酯化后的样品,加入 2ml 无水乙醇,再加入 0.05g 的钨炭,在磁力搅拌下通入氢气,(氢气由启普发生器中锌和盐酸反应产生)反应 4—5 小时后乙醚提取浓缩。

④ 双柱定性: 在气相色谱分析中,也有不同物质,在同样的条件下分析,得到相同的保留时间的结果。为进一步证明定性结果的正确与

否,用双柱来检验。选用的色谱柱是 5% 聚乙二醇 20M 极性柱和 3% SE-30 非极性柱相配合。

3. 定量方法: 采用峰面积的归一化法计算。

结 果

(一) 定性结果

首先把待测样品和标准样分别酯化成相应的甲酯,通过色谱分析,所得保留时间分别列入表 1 和表 2 内。通过碳数规律作图(图 1),求得的奇数碳饱和一元酸甲酯的保留时间也列入表 1。待测样的定性结果如下:

1. 饱和一元酸的定性: 酯化后的样品在 5% 聚乙二醇 20M 色谱柱上分析,得到如图 2

表 1 一元酸甲酯标准样的保留时间值

标准酸甲酯样	5% 聚乙二醇 20M			3% SE-30		
	保留时间 V_r (分)	调整保留时间 V'_r (分)	$\lg V'_r$	保留时间 V_r (分)	调整保留时间 V'_r (分)	$\lg V'_r$
$C_{10:0}$	1.32	1.02	0.01	1.36	1.06	0.03
$C_{11:0}$	1.56	1.26	0.10	1.70	1.40	0.15
$C_{12:0}$	1.96	1.66	0.22	2.28	1.98	0.29
$C_{13:0}$	2.47	2.17	0.34	3.04	2.74	0.44
$C_{14:0}$	3.15	2.85	0.45	4.10	3.80	0.58
$C_{15:0}$	4.09	3.79	0.58	5.65	5.35	0.73
$C_{16:0}$	5.45	5.15	0.71	7.78	7.48	0.87
$C_{17:0}$	7.06	6.76	0.83	10.79	10.49	1.02
$C_{18:0}$	9.21	8.91	0.95	14.75	14.45	1.16
$C_{18:1}$	10.39					
$C_{18:2}$	11.86					
$C_{18:3}$	14.33					

根据公式: $t_M = \frac{t_{n+i} + t_{n-i} - t_n}{t_{n+i} + t_{n-i} - 2t_n}$ 求得 $t_M = 0.3\text{min}$; t_{n-i} 、 t_n 、 t_{n+i} 分别为第一、二、三个同系物的保留时间

表 2 未知样各峰的保留时间值

5% 聚乙二醇 20M	峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	保留时间 V_r (分)	1.59	1.96	2.47	4.10	5.47	5.92	7.05	7.69	10.40	12.40
3% SE-30	峰号	1	2	3	4	5+6		7	8	9	10
	保留时间 V_r (分)	1.71	2.28	3.05	5.76	7.63		10.53	10.79	12.68	14.54

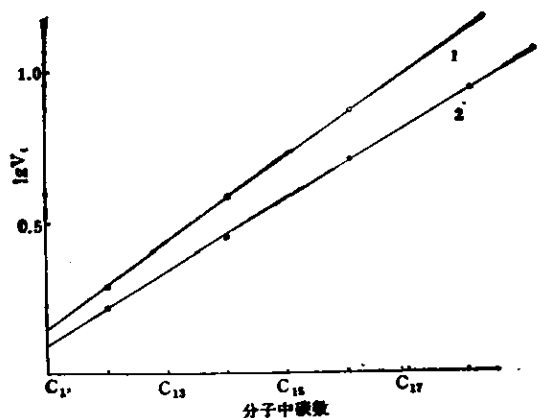


图1 碳数规律图

1. 3% SE-30 柱; 2. 5% 聚乙二醇 20M

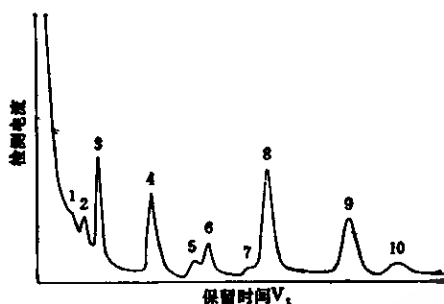


图2 未知样在 5% 聚乙二醇 20M 柱上的分析

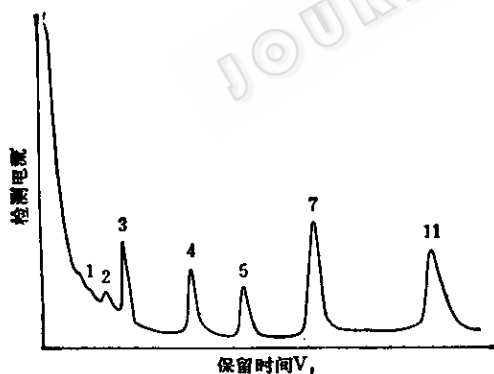


图3 加氢后的样品在 5% 聚乙二醇柱上的分析

的谱图。各峰的保留时间见表 2, 与表 1 中数据比较, 初步认定 2、5 号峰分别是 $C_{12:0}$ 、 $C_{16:0}$ 酸甲酯的峰; 1、3、4、7 号峰分别是 $C_{11:0}$ 、 $C_{13:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{17:0}$ 酸甲酯的峰。

2. 不饱和酸的定性: 从表 1 和表 2 中保留

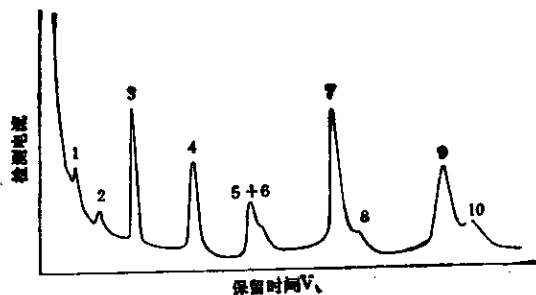


图4 未知样在 3% SE-30 柱上的分析

时间对照, 可认定未知样品 $C_{18:2}$ 酸甲酯是存在的 (图 2 中 10 号峰), $C_{18:0}$ 酸甲酯和 $C_{18:1}$ 酸甲酯在此柱上分不开, 9 号峰需要进一步定性。

氢化加氢法对其他碳数的不饱和酸甲酯的定性结果如下:

加氢后的样品通过气相色谱分析, 得到图 3 的谱图, 它和图 2 比较, 其区别是: 图 2 中的 6、8、9、10 号峰在图 3 中消失了; 5、7 号峰增高了; 在图 3 中增加了一个新峰 (11 号峰)。据此可以得到如下的结论: 在图 3 中消失的峰应该是不饱和酸甲酯的峰。增高的峰应该是不饱和酸甲酯变成相应的饱和酸甲酯与原样品中已有的相同的饱和酸甲酯叠加的结果, 新产生的 11 号峰恰好在 $C_{18:0}$ 酸甲酯的位置上, 说明它是由十八不饱和酸甲酯加氢得到的。图 2 中 9 号峰的消失说明其中有 $C_{18:1}$ 酸甲酯, 但是否有 $C_{18:0}$ 酸甲酯还不能肯定。根据 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 酸甲酯的保留时间顺序, $C_{18:1}$ 酸甲酯在前, $C_{18:3}$ 酸甲酯在最后, 可以推测饱和酸甲酯的保留时间在相同碳数的不饱和酸甲酯之前。据此可判断图 2 中 6 号峰是 C_{16} 不饱和酸甲酯, 8 号峰是 C_{17} 不饱和酸甲酯。根据 6、8 号峰和仅有的 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 酸甲酯的保留时间进行碳数规律作图, 二者恰与 $C_{18:1}$ 酸甲酯在一条直线上, 这说明它们是同系物。即: 6、8 号峰分别是 $C_{16:1}$ 酸甲酯和 $C_{17:1}$ 酸甲酯。

3. 双柱定性检验: 未知样在 3% SE-30 柱上分析, 得到如图 4 的谱图, 保留时间分别列于表 2。对照图 3 和图 4 可以看出它们有两点区别。第一点是它们的分离效果不同, 根据这一

表3 一元酸甲酯相对 C_{16:0} 酸甲酯的校正因子

标准酸甲酯	C _{10:0}	C _{11:0}	C _{12:0}	C _{13:0}	C _{14:0}	C _{15:0}	C _{16:0}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
(f _w) 相对校正因子	1.15	1.09	1.05	1.02	1.01	1.01	1.00	0.97	0.96	0.96		1.03

表4 未知样中各组份的相对百分含量

组份(甲酯)	C _{11:0}	C _{12:0}	C _{13:0}	C _{15:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}
相对百分含量 (%)	0.46	3.70	11.78	14.83	2.83	6.59	1.55	26.88	10.70	16.73	3.94

点不同,解决了5%聚乙二醇20M柱所未能解决的问题。即:图4中在C_{18:0}酸甲酯的位置上有一个明显的峰可以证实图2中9号峰是由C_{18:0}、C_{18:1}酸甲酯的叠加;第二点区别是两个柱子的保留时间顺序不同。前者是饱和酸甲酯的保留时间在相同碳数的不饱和酸甲酯之前。后者则相反。尽管它们有此区别,但在3%SE-30柱上重复在5%聚乙二醇20M柱子上的定性步骤,二者的结果是吻合的。

(二) 定量

通过样品的酸碱滴定,可求出一定量发酵液中总的一元酸百分含量。色谱分析只要求出各组分的相对百分含量即可。

1. 相对校正因子的测定:由于样品中各组份不是同系物,为了考察它们的相对校正因子的差别,测定了一元酸甲酯对C_{16:0}酸甲酯的相对校正因子,结果见表3。

2. 样品中各组份的定量计算:用归一化法计算。结果见表4。

表4中C_{18:0}酸甲酯和C_{18:1}酸甲酯的定量过程是:从图2中得到 $A_9 = 41825$ $A_{10} = 9335$ 。

$$A_9 + A_{10} = 51160$$

$$\frac{A_9}{A_9 + A_{10}} = \frac{41825}{51160} = 0.82 \quad (1)$$

从图3中得到 $A'_9 = 106123$ $A'_{10} = 50151$
 $A'_9 + A'_{10} = 106123 + 50151 = 156274$ 。

$$\frac{A'_{10}}{A'_9 + A'_{10}} = \frac{50151}{156274} = 0.32 \quad (2)$$

从(1)>(2)进一步证明 A_9 是 C_{18:0} 和 C_{18:1}

酸甲酯峰面积的加合。

$$(2):(1) = \frac{0.32}{0.82} = 0.39 \quad (3)$$

C_{18:0} 酸甲酯的相对百分含量为:

$$27.44\% \times (3) = 27.44\% \times 0.39 = 10.70\%$$

C_{18:1} 酸甲酯的相对百分含量为:

$$27.44\% - 10.70\% = 16.74\%$$

二元酸的分析略。

从分析代谢产物的结果,(见表4)对716菌可作如下的推论:

1. 代谢产物中一元酸的生成表明,该菌具有一端甲基氧化的能力。

2. 奇数碳基质除产生奇数碳一元酸外还有偶数碳一元酸的生成表明,该菌除有 β -氧化途径外,尚存在脂肪酸的 α -氧化途径。

3. 产物中相当数量的不饱和一元酸的生成表明,该菌具有一定的脱氢能力。

4. 所产生一元酸中,大部分是比碳链基质长的酸,表明该菌碳链加长机制相当活跃。

讨 论

1. 样品中还有微量的C₁₁以下的酸和C₁₉以上的酸,在本文中没计算在内;

2. 由于标准样不全,相当一部分一元酸的保留时间和相对校正因子是通过作图估计的,个别校正因子或保留时间数据会有些出入。

参 考 文 献

- [1] 吉林化学公司研究院编:气相色谱实用手册,化学工业出版社,北京,1980年。