

高产花生四烯酸产生菌干菌体中 脂肪酸成分的气相色谱-质谱分析

王相勤* 姚建铭 袁成凌 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室,合肥 230031)

摘 要 将高产花生四烯酸(AA)脂肪酸产生菌的干菌体经三氟化硼-甲醇方法甲酯化后,用毛细管气相色谱和质谱进行分析。结果表明干菌体中含有饱和与不饱和脂肪酸,其中不饱和脂肪酸中以花生四烯酸的含量(70.20%)最高,另外还含有少量的亚油酸和 γ -亚麻酸等不饱和脂肪酸,同时给出了各个脂肪酸组分的相对含量。

关键词 花生四烯酸高产菌,脂肪酸,气相色谱-质谱联用

1 引 言

多不饱和脂肪酸由于其独特的生物活性,引起了人们极大的兴趣。花生四烯酸(AA)是属于 $n-6$ 系列的重要不饱和脂肪酸,它和 EPA 都是花生酸代谢的重要中间产物;同时 AA 还是许多二十烯酸衍生物的直接前体,如前列腺素 E_2 (PGE_2)、前列环素 (PGI_2)、血栓素 A_2 (TxA_2) 和白三烯等。而作为前体的 AA,经酶促转化合成可大大降低前列腺素类药物的生产成本,为前列腺素药物的生产、应用开辟了广阔的前景,它们在营养学和医学上的地位早已为世为瞩目^[1-3]。80 年代以来,人们相继发现某些丝状真菌及微藻类含有花生四烯酸。由于微生物生长速度快,油脂及 AA 含量高,且发酵生产具有可控性强,产量、质量稳定等优点,有可能大大降低生产成本,因此吸引了国内外众学者致力研究。尽管利用微生物发酵生产 AA 国内外已有报道,但 AA 的含量均不高^[4,5]。为此,我们利用独特的离子束生物技术对原花生四烯酸产生菌进行诱变改良而筛选到一株 AA 高产菌,然后采用毛细管气相色谱-质谱联用的方法,对高产 AA 产生菌的干菌体中脂肪酸进行了定性和相对百分含量测定,为该菌的应用开发提供了参考。

2 实验部分

2.1 主要仪器和试剂

Auto-System XL 气相色谱仪, Tuto-Mass Spectrograph 质谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司产品)。毛细管色谱柱为 SE-54 型(30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m), 美国 SULPECO 公司产品。

三氟化硼、乙醚、氢氧化钾、甲醇、石油醚(30 ~ 60 $^{\circ}$ C)等均为分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 菌体中脂肪酸的甲酯化 称取 0.3 g 的干菌体,加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 1 mL,边震荡边在 60 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 min;再加入三氟化硼-甲醇溶液(1:2V/V)1 mL,边震荡边在 60 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 min;然后加入 1 mL 石油醚,充分震荡,加入 1 mL 饱和食盐水,取最上层清液(石油醚层)注入毛细管色谱仪进行分析。

2.2.2 毛细管气相色谱-质谱分析 色谱分析条件:FID 检测器温度 280 $^{\circ}$ C,进样口温度 250 $^{\circ}$ C,氮气作载气,柱头压力 100kPa,分流比 1:30,进样量 1.0 μ L,程序升温条件为:起始温度 80 $^{\circ}$ C,以 4 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C,保温 10 min。离子源为 EI 源,能量 70eV。在此条件下进样 1 μ L,记录总离子流图及质谱图。

3 结果与讨论

3.1 总离子流图(图 1)

2000-03-27 收稿;2000-08-02 接受

本文系安徽省地方攻关项目资助课题(85-722-22-01)

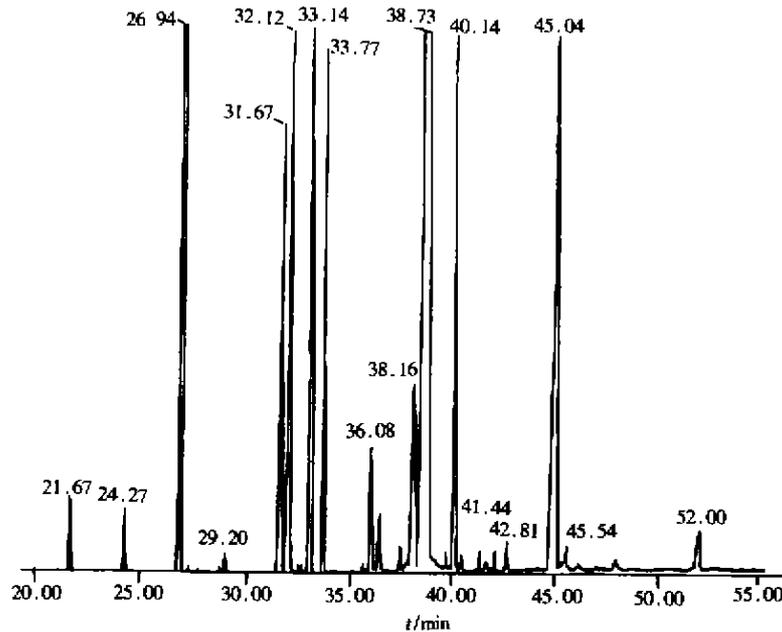


图 1 脂肪酸甲酯分离图

Fig.1 The total ion current chromatogram of methyl fatty acids

上述所采用的毛细管气相色谱程序升温条件, 可以将 $C_{12} \sim C_{24}$ 饱和与不饱和长链脂肪酸甲酯全部分离。检出的脂肪酸结果表明, 该菌油中主要含不饱和脂肪酸 79.438%, 其中尤以 AA (保留时间 38.73 min) 的含量 (70.201%) 最高, 另外还含有 1.576% 的 γ -亚麻酸及 3.985% 的亚油酸等。

3.2 质谱分析

实验中给出了所有脂肪酸甲酯的质谱图, 其中花生四烯酸的质谱图见图 2 (上方为花生四烯酸甲酯样品的质谱图, 下方为花生四烯酸甲酯的标准质谱图)。

各脂肪酸的含量按归一化法计算结果见表 1, 其中饱和与不饱和脂肪酸之比为 1.028:3.972。

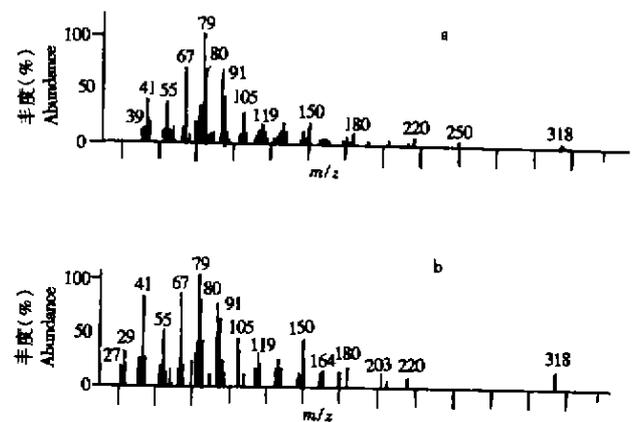


图 2 花生四烯酸的质谱图

Fig.2 The mass spectra of arachidonic acid

a. 花生四烯酸甲酯样品的质谱图 (mass spectrum of sample); b. 花生四烯酸甲酯的标准质谱图 (mass spectrum of arachidonic acid)。

表 1 干菌体中各脂肪酸的组成成分

Table 1 Fatty acid composition of dry thallus

脂肪酸 Fatty acid	保留时间 t_R (min)	含量 Content (%)	脂肪酸 Fatty acid	保留时间 t_R (min)	含量 Content (%)
肉豆蔻酸 Myristic acid	21.67	0.221	γ -亚麻酸 γ -Linolenic acid	33.77	1.576
十五碳酸 Pentadecanoic acid	24.27	0.174	花生酸 Arachidic acid	36.08	0.049
棕榈酸 Palmitic acid	26.94	6.315	花生四烯酸 Arachidonic acid	38.73	70.201
硬脂肪 Stearic acid	31.67	2.236	二十二碳酸 Behenic acid	40.14	2.657
油酸 Oleic acid	32.12	3.676	二十四碳酸 Lignoceric acid	45.04	5.302
亚油酸 Linoleic acid	33.14	3.985	其它脂肪酸 Others		3.806

致谢 合肥经济技术学院的刘百战老师提供了色-质谱测试帮助,特致谢。

References

- 1 Piomeli D, Volterra A, Siegelbaum S A, Dale N, Kandel E R, Schwartz J H, Belandetti F. *Nature*, 1987, 328:38 ~ 43
- 2 Qin Xiaowei(秦小卫), Translated by Zheng Maorong(郑茂荣). *Abroad dermatology Fascicule*(国外皮肤病学分册), 1998, 24(3):135 ~ 137
- 3 Zhu Fake(朱法科), Lin Weitie(林伟铁), Bao Shixiang(鲍时翔), Yao Ruhua(姚汝华). *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1999, 29(2):1 ~ 4
- 4 Yang Ge(杨革), Wang Yuping(王玉萍), Li Xiangtai(李翔太). *Fungus System*(菌物系统), 1998, 17(1):86 ~ 90
- 5 Ding Li(丁力), Wu Baojie(吴葆杰), Zhang Youmei(张柚美). *Chinese Pharmaceutical Journal*(中国药学杂志), 1993, 28(12):713 ~ 717

The Analysis of Fatty Acids of Dry-Thallus High-Yield of Arachidonic Acid Producing Strain by Gas Chromatography and Mass Spectrometry

Wang Xiangqin*, Yao Jianming, Yuan Chengling, Yu Zengliang

(Center of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract A high-yield arachidonic acid producing strain (*Mortierella alpina*) was selected with ion implantation. After treating the dry-thallus of high-yield arachidonic acid-producing strain with $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{CH}$ solution, the fatty acid in dry-thallus of arachidonic acid producing strain were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry. The result showed that there were saturated and unsaturated fatty acids in the dry-thallus. The relative content of arachidonic acid is 70.2% in the all fatty acids. In addition, there were oleic acid, linoleic acid and γ -linolenic acid in the dry-thallus.

Keywords Arachidonic acid high-yield strain, fatty acid, gas chromatography, mass spectrometry

(Received 27 March 2000; accepted 2 August 2000)