

被孢霉菌丝体脂肪酸组成的气相色谱 - 质谱分析

吕 晴¹, 余德顺², 雷邦星³

(1. 贵州工业大学 理化分析中心, 贵州 贵阳 550003; 2. 中国科学院地球化学研究所 超临界流体技术研究中心, 贵州 贵阳 550002; 3. 贵州大学 虫生真菌研究室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 采用气相色谱 - 质谱对采自云南白马雪山土壤中并经分离和发酵培养的被孢霉菌株 SM96 的菌丝体油脂中脂肪酸组成进行了定性分析和峰面积相对含量测定, 共检测出 30 种脂肪酸, 其中多不饱和脂肪酸含量为 62.4%, 主要为亚油酸、 α -亚麻酸(ALA), 还有少量的 γ -亚麻酸、二十碳三烯酸、花生四烯酸和二十碳五烯酸(EPA)等, 结果表明该菌株能产生 EPA。

关键词: 被孢霉; 菌丝体; 脂肪酸; 气相色谱 - 质谱; 多不饱和脂肪酸

中图分类号: O657.63; Q949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2003)02 - 0022 - 03

近 20 年生物化学、药理学、营养学的研究表明: 多不饱和脂肪酸(PUFAs)如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)具有降低血脂, 预防心血管疾病发生和促进大脑发育等特殊生理功效^[1], 是目前新药开发的热点。PUFAs 在动植物中广泛存在, 主要商业来源为海洋鱼油, 另外一些微生物如细菌、真菌和藻类也能产生 PUFAs^[2,3]。目前, 对植物油、鱼油、海洋生物的脂肪酸测定已有许多相关文献^[4,5], 而对真菌脂肪酸组成测定的报道则较为鲜见。作者采用气相色谱 - 质谱联用技术, 对采自云南白马雪山土壤中并经贵州大学虫生真菌实验室利用微生物转化技术发酵培养的被孢霉 SM96 的菌丝体脂肪酸组成进行了系统的分析研究, 为利用微生物发酵生产 EPA 和 DHA 以及寻求 EPA 和 DHA 的新来源提供了科学依据和较有价值的资料。

1 实验部分

1.1 材料及试剂

被孢霉 SM96 菌丝体由贵州大学虫生真菌实验室提供。0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液, 苯 - 石油醚(体积比 1:1)混合溶液(试剂均为分析纯), EPA 甲酯标准品(纯度 $\geq 99\%$, Sigma 公司)。

1.2 仪器及测试条件

HP6890/HP5973 气相色谱 - 质谱联用仪(美国惠普公司); 国产索氏萃取器(500 mL)。

气相色谱条件: 色谱柱为 HP-INNOWAX 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m 弹性石英毛细管柱; 柱初温 190 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 以 6 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C, 然后恒温至完成分析; 汽化室温度 250 $^{\circ}$ C; 载气为高纯 He(99.999%); 柱前压 62.6 kPa; 载气流速 1.4 mL/min; 进样量 1 μ L; 分流比 60:1。质谱条件: 离子源为 EI 源; 离子源温度 230 $^{\circ}$ C; 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C; 电子能量 70 eV; 发射电流 34.6 μ A; 倍增器电压 1 576 V; 接口温度 260 $^{\circ}$ C; 溶剂延迟 2 min; 质量范围 10 ~ 550 u。

1.3 菌丝体脂肪酸的甲酯化

将菌丝体真空干燥、粉碎后置滤纸筒内于索氏萃取器中, 用石油醚回流萃取后, 用蒸馏法回收溶剂得菌丝体油脂。称取上述油脂约 100 mg 于 10 mL 具塞试管中, 加入苯 - 石油醚(体积比 1:1) 2 mL, 再加入 0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL, 振荡后置于 50 $^{\circ}$ C 水浴约 15 min, 取出后沿管壁加入蒸馏水使有机层上升至试管上部, 静置分层后, 取上层清液 1 μ L 作气相色谱 - 质谱分析。

1.4 实验步骤

1.4.1 定性分析 取上层清液 1 μ L, 用气相色谱 - 质谱联用仪分析鉴定, 通过 HP MSD 化学工作站检索 NIST 98 标准质谱图库和 WILEY 质谱图库, 并结合人工解析, 确认了菌丝体的各脂肪酸成分。另取适量 EPA 甲酯标准品, 用石油醚配制成标准溶液后, 同样条件下进样 1 μ L 作对照。

1.4.2 相对含量分析 通过 HP MSD 化学工作站数据处理系统, 按峰面积归一化法求得各脂肪酸在菌丝体油脂中的相对含量。

收稿日期: 2002 - 05 - 24; 修回日期: 2002 - 12 - 28

基金项目: 中国科学院 - 上海浦东高新技术种子资金资助项目(PKZ)

作者简介: 吕 晴(1973 -), 女, 贵州贵阳人, 讲师, 硕士。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

按上述步骤进行实验, 由 HP MSD 化学工作站给出菌丝体脂肪酸的总离子流图, 如图 1 所示。所鉴定的菌丝体油脂中的 30 种脂肪酸成分及其相对含量列于表 1。菌丝体油脂中 EPA 甲酯和标准 EPA 甲酯的质谱图见图 2。

表 1 被孢霉 SM96 菌丝体的脂肪酸组成^{*}
Table 1 Components of fatty acids in mycelium of *Mortierella fungus* SM96^{*}

No	t_R /min	Compound	Molecular formula	Relative molecular mass	Relative content %	Match quality %
1	2.152	Tetradecanoic acid(十四酸, 肉豆蔻酸)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0.45	99
2	2.570	Pentadecanoic acid(十五酸)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	0.16	98
3	3.123	Hexadecanoic acid(十六酸, 棕榈酸)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	9.58	99
4	3.258	[E]-7-Hexadecenoic acid(反-7-十六碳烯酸)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	0.33	97
5	3.295	[Z]-7-Hexadecenoic acid(顺-7-十六碳烯酸)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	0.34	96
6	3.534	Heptadecanoic acid(十七酸)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.46	99
7	3.755	14-Methyl-hexadecanoic acid(14-甲基-十六酸)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.18	95
8	4.032	[Z,Z,Z]-7,10,13-Hexadecatrienoic acid (全顺式-7,10,13-十六碳三烯酸, ω 3)	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	250	0.64	93
9	4.130	16-Methyl-heptadecanoic acid(16-甲基-十七酸)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	0.12	95
10	4.529	Octadecanoic acid(十八酸, 硬脂酸)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	4.65	99
11	4.756	[Z]-9-Octadecenoic acid(顺-9-十八碳烯酸, 油酸)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	15.0	99
12	4.793	[E]-9-Octadecenoic acid(反-9-十八碳烯酸, 反油酸)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	1.92	98
13	5.180	[Z,Z]-9,12-Octadecadienoic acid (顺,顺-9,12-十八碳二烯酸, 亚油酸)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	14.9	99
14	5.272	[Z,Z]-11,14-Octadecadienoic acid(顺,顺-11,14-十八碳二烯酸)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	0.52	93
15	5.438	[Z,Z,Z]-6,9,12-Octadecatrienoic acid (全顺式-6,9,12-十八碳三烯酸, γ -亚麻酸, ω 6)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	1.35	99
16	5.856	[Z,Z,Z]-9,12,15-Octadecatrienoic acid (全顺式-9,12,15-十八碳三烯酸, α -亚麻酸, ω 3)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	39.1	99
17	6.077	Eicosanoic acid(二十酸, 花生酸)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	1.98	99
18	6.329	[Z]-11-Eicosenoic acid(顺-11-二十碳烯酸)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.42	91
19	6.556	[E]-11-Eicosenoic acid(反-11-二十碳烯酸)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.37	95
20	7.004	Heneicosanoic acid(二十一酸)	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	0.14	99
21	7.054	[Z,Z]-8,11-Eicosadienoic acid(顺,顺-8,11-二十碳二烯酸)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	0.20	94
22	7.361	[Z,Z,Z]-7,10,13-Eicosatrienoic acid (全顺式-7,10,13-二十碳三烯酸, ω 7)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	0.71	95
23	7.619	[Z,Z,Z,Z]-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid (全顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸, 花生四烯酸, ω 6)	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304	1.06	99
24	7.754	[Z,Z,Z]-9,12,15-Eicosatrienoic acid (全顺式-9,12,15-二十碳三烯酸, ω 5)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	0.95	93
25	8.079	[Z,Z,Z]-11,14,17-Eicosatrienoic acid (全顺式-11,14,17-二十碳三烯酸, ω 3)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	0.90	99
26	8.374	[Z,Z,Z,Z]-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (全顺式-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸, EPA, ω 3)	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302	2.05	99
27	8.749	Docosanoic acid(二十二酸, 山嵛酸)	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	0.16	99
28	9.289	Tricosanoic acid(二十三酸)	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	0.08	98
29	10.063	[Z]-11-Docosenoic acid(顺-11-二十二碳烯酸)	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	0.35	97
30	11.421	Tetracosanoic acid(二十四酸, 木焦油酸)	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368	0.93	99

* ω 3 表示第 1 个双键位于羧基反侧的第 3 个碳原子上, 其余类推 (ω 3 indicates that the first double bond of the unsaturated fatty acid lies on the third carbon atom of the reverse of the carboxyl, the rest by analogy)

2.2 讨论

由表 1 可知, 被孢霉 SM96 的菌丝体油脂中, 多不饱和脂肪酸含量为 62.4%, 其中主要为亚油酸、 α -亚麻酸(ALA), 还有少量的 γ -亚麻酸、二十碳三烯酸、花生四烯酸和二十碳五烯酸(EPA)等。菌丝体中的 EPA 甲酯的保留时间(8.374 min, 图 1)和标准 EPA 甲酯的保留时间(8.406 min, 图略)非常吻合; 另外, 从图 2 可看出两张质谱图相似度极高。因此, 可确认菌丝体油脂中确实含有 EPA。本实验所用的被孢霉菌株 SM96, 是从采自云南白马雪山土壤的菌种标本中分离出来后, 利用紫苏油作前体物发酵培养而得。紫苏油脂肪酸组成为棕榈酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸, 不加紫苏油的情况下同样条件发酵培养所得的被孢霉 SM96(空白样)的菌丝体油脂中不饱和脂肪酸主要为油酸、亚油

酸、花生四烯酸等, 无 ω_3 系列的 ALA 和 EPA^[6]。可见, 用富含 ALA 的紫苏油作前体物发酵培养所得的菌丝体油脂中, 脂肪酸组成远比空白样复杂, 产生了多种多不饱和脂肪酸如二十碳二烯酸、二十碳三烯酸、二十碳五烯酸 (EPA) 等。测定结果表明: 作为发酵前体物的紫苏油中的 ALA, 在真菌发酵过程中的确有少量转化成了 EPA^[3], 但也有少量生成了副产物——全顺式-11, 14, 17-二十碳三烯酸, 而大部分 ALA 尚未发生转化。虽然菌丝体中 EPA 含量较少, 且不含 DHA, 但可通过优化发酵条件以培养出含 EPA 或 DHA 更多的具有商业价值的菌株。

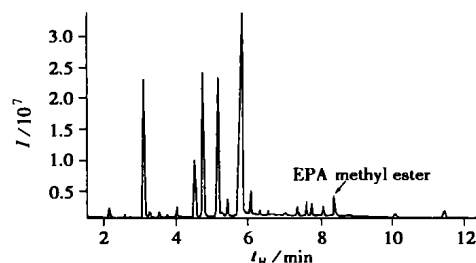


图 1 被孢霉 SM96 菌丝体油脂脂肪酸甲酯的总离子流图

Fig. 1 TIC of methylated fatty acid compounds in mycelium oil of *Mortierella* fungus SM96

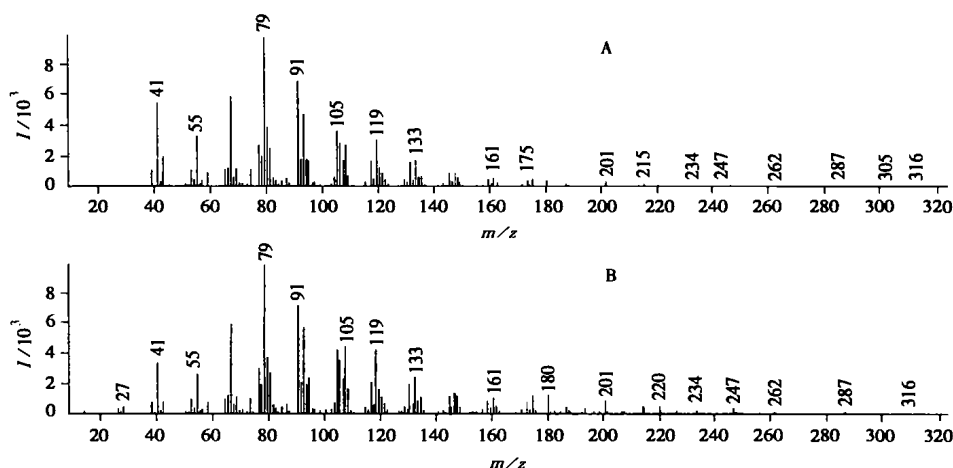


图 2 菌丝体中 EPA 甲酯(A)和标准 EPA 甲酯(B)的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of eicosapentaenoic acid methyl ester in *Mortierella* fungus mycelium oil(A) and standard eicosapentaenoic acid methyl ester(B)

参考文献:

- [1] 余文三. 多不饱和脂肪酸的研究概况[J]. 国外医学, 卫生学分册, 1998, 11(4): 61-63.
- [2] 张羽航, 林炜铁, 鲍时翔. 微生物发酵生产多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 1998, 23(1): 42-45.
- [3] SHIMIZU S, KAWASHIA H, AKIMOTO K, *et al.* Microbial conversion of an oil containing α -linolenic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid[J]. J Am Oil Chem Soc, 1989, 66(3): 342-347.
- [4] 张学杰, 李法曾, 程传格. 栎树种油中脂肪酸组成的气相色谱-质谱分析[J]. 分析测试学报, 2000, 19(4): 46-47.
- [5] 吴惠勤, 张桂英, 程志青. 甲鱼油脂肪酸组成的研究[J]. 分析测试学报, 1997, 16(2): 33-35.
- [6] 雷邦星. 转化植物油生产多不饱和脂肪酸的真菌菌株的选择以及发酵条件的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2000.

Analysis of Fatty Acids in *Mortierella* Fungus Mycelium by GC-MS

LÜ Qing¹, YU De-shun², LEI Bang-xing³

(1. Physical & Chemical Analysis Research Center, Guizhou University of Technology, Guiyang 550003, China; 2. Research Center of Supercritical Fluid Technology, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 3. Laboratory of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang 550002, China)

Abstract: The components of fatty acids in mycelium oil of *Mortierella* fungus, which picked from the Baima Snow Mountain in Yunnan Province, were analyzed by GC-MS. 30 fatty acids were identified and their relative contents were determined by normalization method of area, of which polyunsaturated fatty acids accounted for 62.4%, and they mainly comprised linoleic acid, α -linolenic acid and eicosapentaenoic acid(EPA). The results indicated that the *Mortierella* fungus could produce EPA.

Key words: *Mortierella*; Mycelium; Fatty acids; GC-MS; Polyunsaturated fatty acids