

拉曼被孢霉产  $\gamma$ -亚麻酸后处理工艺的研究\*

李莉莉, 潘力, 罗立新

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州, 510640)

**摘 要** 研究了  $\gamma$ -亚麻酸的后处理方法及测定前样品的预处理, 包括菌丝体干燥方式对菌体得率和  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 含量的影响, 低温结晶法浓缩纯化油脂中的 GLA 及样品预处理对测定结果的影响。

**关键词** 拉曼被孢霉,  $\gamma$ -亚麻酸, 干燥, 低温结晶, 甲酯化

$\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 学名为顺式-6,9,12-十八碳三烯酸, 具有多种重要的生理活性作用。它作为人体前列腺素和其他花生酸的前体物质, 一旦缺乏会引起机体生理失调而导致多种疾病。临床已将其应用于心血管疾病、炎症、癌症及糖尿病等多种疾病的治疗, 获得了较为理想的疗效。近年来, 由于其清除自由基、抗氧化及减肥等功能, 在保健品及美容化妆品领域深受人们青睐。随着人们对微生物生产 GLA 研究的增多以及工业化的应用, 迫切需要一种快速高效的 GLA 的测定方法及后处理工艺。实验中研究了菌丝体干燥方式对菌体得率和 GLA 含量的影响; 低温结晶法浓缩纯化油脂中的 GLA 及样品预处理对测定结果的影响等 3 个方面, 拟得到微生物发酵后准确检测含量的测定方法及后处理工艺, 为微生物发酵生产 GLA 提供相对准确有效的评价手段和理想的产品<sup>[1~3]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

拉曼被孢霉 (*Mortierella ramaniana*), 购于日本生物技术研究所有微生物菌种保藏中心。

$\gamma$ -亚麻酸甲酯、十七烷酸甲酯及 14%  $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  溶液, 均购于 Sigma 公司, 其他试剂均为色谱纯或分析纯试剂。

### 1.2 仪器及测试条件<sup>[4]</sup>

电子分析天平, 德国 Statorious 公司; 旋转蒸发器, 杭州托普仪器有限公司; GC-2010 气相色谱仪, 日本岛津公司。气相色谱条件: HP-FFAP 强极性色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ), 氢离子火焰检测器 (FID), 十七烷酸甲酯为内标物。初始柱温 180 $^{\circ}\text{C}$ , 以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 196 $^{\circ}\text{C}$ , 再以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  继续升至 206 $^{\circ}\text{C}$ ,

恒温 15 min。载气采用高纯氮气, 流量 65 mL/min; 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ; 检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$ ; 分流比 30:1; 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3 样品预处理<sup>[5,6]</sup>

将摇瓶发酵液真空抽率, 并用蒸馏水洗涤 3 次, 抽干后放于烘箱 (一定温度) 烘至恒重, 或真空冷冻干燥 16 h。干菌丝体用研钵 (或球磨机) 磨成粉末, 按菌粉: 石油醚 (30-60) = 1:20 (W/V) 的比例, 放于索氏抽提器, 抽提 24 h (每小时 4~6 个循环), 然后真空旋转蒸发去除石油醚。将油脂溶于一定比例的正己烷中 (V/V), 35 $^{\circ}\text{C}$  回流至油脂溶解, 分装后分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ , -10 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ , -78 $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中, 冷冻 24 h, 分别于 4 $^{\circ}\text{C}$ , -10 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中, 10 000rpm 离心 10 min, 得晶体和液体油脂, 取液体油脂进行分析。

### 1.4 GC 分析前对油样进行甲酯化处理

甲酯化方法 1<sup>[7]</sup>: 取准确称量的样品于 10 mL 具塞试管, 加  $\text{CH}_3\text{OH}$  溶液 2 mL, 再加入 14%  $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  液 0.5 mL, 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴甲酯化 20 min, 取出, 冷水冷却, 加入 2 mL 正己烷, 振摇, 加入饱和 NaCl 溶液 2 mL, 取上层清液分析。

甲酯化方法 2<sup>[8]</sup>: 取准确称量的样品于 10 mL 具塞试管, 加 0.5mol/L  $\text{KOH-CH}_3\text{OH}$  溶液 2 mL, 在 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴中皂化 15 min, 待油脂溶解, 冷至室温, 加 14%  $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  溶液 2 mL, 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴甲酯化 2 min, 冷却至室温, 加入正己烷 2 mL, 振摇, 加入饱和 NaCl 溶液 2 mL, 取上层清液进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 干菌体的处理方式

由图 1 可以看出, 干菌丝得率从 120 $^{\circ}\text{C}$  到 60 $^{\circ}\text{C}$  随着烘干温度的上升而下降, 符合干燥中随着温度上升平衡含水量降低的原理。但真空冷冻干燥除外, 因为冷冻干燥是在真空条件下进行的, 所以干菌体中平衡

第一作者: 硕士研究生 (潘力副教授为通讯作者)。

\* 国家科委“九五”重点科技攻关项目 (96-C03-01-04)

收稿日期: 2007-01-19, 改回日期: 2007-03-26

水的量较非真空的低一些。不同条件下处理的菌体虽然都达到了恒重状态,但菌体的含水量是不同的。测定结果表明从 100℃ 到 60℃ 干菌体的得率无显著性差异,但是从 120℃ 到 60℃,就有了显著性的差异。

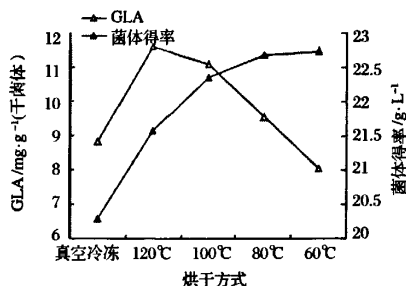


图1 烘干方式对菌体得率和 GLA 在单位菌体中含量的影响

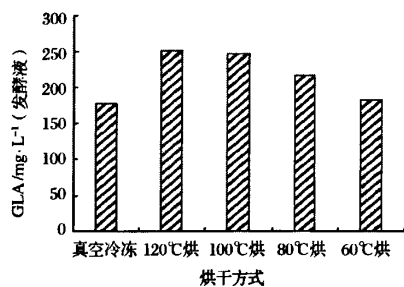


图2 烘干方式对 GLA 在单位发酵液中含量的影响

结合图1和图2可以看出,在100℃和120℃处理的样品,其GLA的含量(包括GLA在单位菌体和单位发酵液中的含量)没有显著的差异,但高温短时烘干的样品较低温长时烘干样品的GLA含量要明显的高。原因如下:其1,在相对低的温度干燥时菌体仍然具有活性,菌体在没有其他碳源的情况下,会消耗其自身的油脂,导致菌体中油脂含量明显下降,但是高温干燥就可迅速杀灭菌体中的活性酶(该类脂肪酶可在大于80℃的条件下迅速失活),使得菌体中油脂不被分解<sup>[9]</sup>。其2,在相对低的温度下处理时,对样品作用时间比较长,使得对菌丝体内油脂的破坏(如氧化)较高温短时要严重。其中真空冷冻菌丝体中GLA的含量并不高,尽管真空冷冻的温度很低(大约-30℃),但是脂肪酶应该还具有活性,并且冷冻干燥的时间较长16 h,就使得酶对菌体作用的时间较长,因此GLA的含量较低。

## 2.2 GLA的浓缩纯化

菌体发酵得到的GLA在油脂中的含量较低,有必要对油脂进行浓缩。国内对脲包法的报道较多<sup>[10,11]</sup>,但有研究表明,脲包过程中会产生可致癌的

氨基甲酸甲酯或氨基甲酸乙酯,不适合药品和食品添加<sup>[12]</sup>。其他浓缩方法各有其难以克服的缺点,都不适合工业化。而低温结晶操作过程简单,对设备要求容易满足。

结晶过程中溶剂的选择很重要,其中油脂在溶剂中的溶解度是选择溶剂的主要考虑因素。丙酮分离性能好,但低温时对油脂的溶解能力差,并且丙酮易吸水,分离过程中丙酮中水分含量会增加,使油脂的溶解度急剧变化,改变其分离性能。正己烷做溶剂时,尽管结晶析出温度低,结晶生成的速度慢,但是正己烷对油脂的溶解度大。同时考虑到溶剂残留对样品的毒性,实验中选择正己烷为溶剂。

### 2.2.1 结晶温度和时间的选择

实验中选择了4℃, -10℃, -20℃, -78℃,由图3可以看出,4℃结晶的效果很差,回收率和浓缩倍数都较低;-10℃比-20℃的效果略差,-20℃跟-78℃结晶效果没有显著性差异。其中结晶析出的脂肪酸主要为饱和脂肪酸和少量的低不饱和脂肪酸(如油酸)。其后对结晶时间进行了实验(-20℃),选择了结晶1 d, 2 d, 3 d,结果表明,结晶时间对-20℃的结晶没有显著性的影响(数据在这里没有给出)。

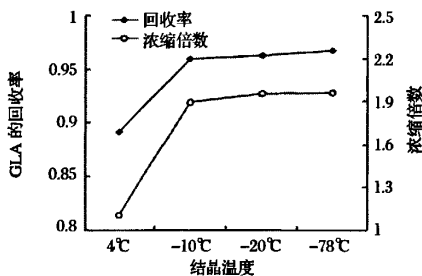


图3 结晶温度对结晶效果的影响

### 2.2.2 油脂在结晶体系中所占的体积比例及结晶次数对结晶的影响

为了节省工业生产中的设备及试剂的投资,有必要优化结晶体系中加入有机溶剂的量。同时为了得到纯度更高的GLA,实验了二次结晶。由图4可以看出,比例为10%,无论是一次还是二次结晶,较其他比例的同次结晶,回收率最高,浓缩倍数也最高。当比例为50%时,回收率很低,这是因为在结晶过程中油脂与溶剂的比例太小,在结晶析出的过程中有很多就是油与溶剂的混合物,不能使得固体结晶体与液体非结晶体彻底分开。

工业生产中,结晶时要求冷却的速度很慢(1~1.7℃/min),以便有足够的晶体形成时间,产生粗大

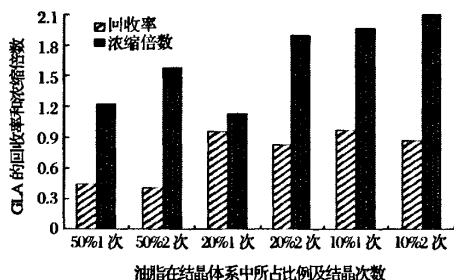


图4 溶剂用量和结晶次数对结晶的影响

的晶型以有利于分离。如果冷却速度很快,形成的晶型细小,不利于分离,特别是当用过滤的方法分离晶体与非晶体时,对晶型大小的影响更为明显<sup>[13]</sup>。同时也可以考虑在适当的时候加入晶核(如十四烷酸等饱和脂肪酸),以得到更利于分离的晶型。

### 2.3 气相色谱分析前样品的预处理

在采用气相色谱分析时,要先将样品甲酯化,因为脂肪酸甲酯的性质较脂肪酸(特别是长链脂肪酸)稳定,且挥发性好,分析中不易损失。

#### 2.3.1 甲酯化方法及甲酯化样品形式的选择

催化剂在很大程度上决定了甲酯化的效率,有研究表明,BF<sub>3</sub>(可用BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH溶液或BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O溶液)的甲酯化效率较高,并且如果用碱甲酯化,碱与脂肪酸生成皂,有时很难转化为脂肪酸甲酯,此皂进入毛细管柱会降低柱效,影响分离效果。其次,文献中报道的甲酯化有的有皂化,有的无皂化,直接甲酯化。实验中比较了有皂化与无皂化对测定结果的影响,结果表明有皂化是无皂化甲酯化效率的1.948倍。这是因为菌体中油脂95%是以甘油三酯的混合物存在的,先使甘油三酯皂化能使接下来的甲基化更容易一些。如果没有皂化,那么甘油三酯直接在催化剂的作用下转化为脂肪酸甲酯的难度加大,效率变低。关于是用油脂甲酯化还是用干菌体甲酯化的问题,由实验结果可知,用油甲酯化的效率是菌体的1.836倍。原因就是菌体甲酯化要先破壁把油脂萃取出(不同脂质的溶出有个先后过程),然后才能进行甲酯化反应,同时对于甲酯化过程中油脂的萃取也存在一定的不彻底性,导致酯化效率最低。

#### 2.3.2 优化甲酯化样品的量

尽管已知用菌体直接甲酯化效率较用油脂低,但是因为迄今为止还没有一个快速而准确的测定菌体中GLA含量的方法,对于育种工作者来说,用菌体直接甲酯化无疑是一个很好的选择,能用菌体之间的比较来说明GLA含量的相对高低。同时减少了提

取油脂的过程,使复筛快捷而准确。

分别取10 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg进行甲酯化比较,由图5可知,10~30 mg GLA的含量没有显著性的变化,但是30~100 mg GLA的量明显变低。所以在甲酯化其他条件不变的前提下,甲酯化样品量在30 mg甲酯化就能较为完全。但是因为随着甲酯化样品量的减少,甲酯化过程中的操作误差会加大,所以甲酯化样品的量一般也不要太小。同时由上面的甲酯化样品形式的比较已知,油脂甲酯化比用菌丝体要容易,所以可以断定,在此甲酯化条件下,取30 mg油样也能够甲酯化完全。

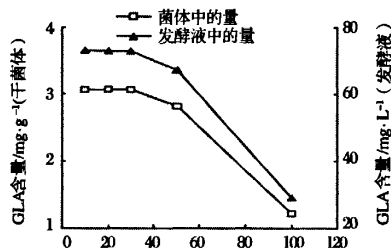


图5 取样量对甲酯化效果的影响

## 3 结论

烘干温度为120℃时, GLA在单位发酵液中的含量最高, 100℃略低于120℃, 在实际生产中常常在考虑成本的基础上结合产品效果, 选择100℃烘干。在结晶中油脂在结晶体系中所占的体积比例为10%, 结晶1d得到的回收率最高, 在此条件下的二次结晶中得到产品纯度最高(2.091倍), 菌体直接发酵得到的GLA约占油脂的含量5%, 所以即使在浓缩倍数最高的条件下, 也只能提高到约10%。当然也可以选择多次结晶得到更纯的GLA但是要牺牲回收率作为代价。在工业生产中一般在考虑成本的条件下, 利用单一方法的互补性, 将多种方法结合, 得高纯度GLA<sup>[14]</sup>, 迄今为止还没有一个较好的适合工业化的高纯度浓缩方法, 理想的富集方法有待于进一步的研究。

## 参考文献

- 1 Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 70: 560~569
- 2 Ristic V, Ristic Cx Role and importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the prevention and therapy of atherosclerosis[J]. Med Pregl. 2003, 56: 50~53
- 3 Grynbery A. Heart and nutrition; which fatty acids for

- which cardiac function? [J]. Arch MalCoeur Vlais, 2003, 96:7~12
- 4 J L Cuil-Guerrero, P Capmpra-Madrid, El-Hassan Belarbi.  $\gamma$ -Linolenic acid purification from seed oil sources by argentated silica gel chromatography column[J]. Process Biochemistry, 2000, 36:341~354
  - 5 李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6):72~75
  - 6 Juan Carlos López-martínez, Pablo Campra-Madrid, José Luis Guil-Guerrero.  $\gamma$ -Linolenic Acid Enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* Seed Oils and Fatty Acids by Low Temperature Crystallization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 97(5):294~298
  - 7 蔡双莲, 李敏, 吴雪伟. 真菌深黄被孢霉及其提取物对高脂血症的作用[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3):375~377
  - 8 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000
  - 9 王永华, 杨博, 杨继国. 被孢霉中脂肪酶对  $\gamma$ -亚麻酸油脂的影响[J]. 中国油脂, 2004, 29(11):51~53
  - 10 田强, 刘丽丽. 豚包法富集被孢霉菌丝油  $\gamma$ -亚麻酸工艺条件的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2005, 25(2):26~28
  - 11 刘凤霞, 薛刚, 高秋华, 等.  $\gamma$ -亚麻酸包合工艺优化研究[J]. 中成药, 2005, 27(7):761~763
  - 12 Canas B I, Yurawecz M P. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids [J]. Am Oil Chem Soc, 1999, 76:537
  - 13 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 31~41
  - 14 Han Xi-jiang, Xu Ping, Meng Xiang-li. Preparation of High-Purity Linolenic Acid from Oil of *Lithospermu Erythrorhizon* by Urea Inclusion and Column Chromatography [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2004, 13(1):53~57

## Research on Post-processing of $\gamma$ -Linolenic Acid (GLA) Produced by *Mortierella ramanniana*

Li Lili, Pan Li, Luo Lixin

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** The post-processing and the pretreatment of sample before analysis of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) produced by *Mortierella ramanniana* were studied, including the effects of drying methods on the yield of dried biomass and the composition of GLA in the lipid, GLA enrichment from lipid by low temperature crystallization and the pretreatment of sample before analyzed by chromatography.

**Key words** *Mortierella ramanniana*,  $\gamma$ -linolenic acid, drying, low temperature crystallization, methylation

信息窗

### 日本开发乙醇膜法提浓新技术

为了从发酵液中生产接近100%纯度的乙醇, 常规工艺采用二步蒸馏法操作, 该操作占总能量需求近55%。因此, 改进浓缩步骤是降低生产生物乙醇成本的关键。

日本东京大学化学系统工程系与日本食品研究院、日本农业与食品研究组织合作, 开发了新的阻隔膜法技术。

乙醇通过该阻隔膜的流量主要取决于浓度, 该膜好似一个机械阀门, 当进料中的乙醇浓度高于约8%时, 乙醇通过膜的流量高, 但如果浓度低于8%则流量为零。这一表现是由于聚合物的膨胀或收缩而引起, 膨胀或收缩使膜上的孔打开或关闭。当发酵液中的乙醇浓度高于8%~10%时, 发酵就减速, 阻隔膜则在高浓度之前, 用于快速除去乙醇产品。

研究人员将该阻隔膜(用于去除产品乙醇, 以保持最佳发酵速率)与沸石型全蒸发膜(将产品物流浓缩至80%)组合起来, 然后再采用下游脱水膜将乙醇浓缩至超过99.5%。预计这一组合膜工艺消耗的能量为蒸馏所需能量的1/3左右, 用此工艺可连续生产纯乙醇。

目前, 该阻隔膜已经组装并经使用验证。下一步是在发酵装置中验证整个的连续浓缩过程。