

尿素包合法提取酵母中不饱和脂肪酸的研究

赵丰丽, 陈 睿, 卢翠文

(广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘 要: 研究了实验室筛选出的高产油脂酵母菌(*Candida Yeast*-1-1)产脂的最佳条件, 在此基础上, 通过多因素正交试验得出尿素包合法提取酵母油脂中不饱和脂肪酸的最佳方法。试验结果表明, 在温度为 30℃, 摇床转速 120r/min 的条件下, 酵母菌产脂的最佳培养基为: 0.02% 的 $MnCl_2$ 、0.03% 的 $FeSO_4$ 、0.3% 的 $(NH_4)_2SO_4$ 、3% 的葡萄糖、pH6.5; 油脂提取的最佳尿素包合条件为: 尿素和脂肪酸的比例为 3:1, 回流时间 30min, 冷却析出温度 0℃。

关键词: 不饱和脂肪酸; 尿素包合法; 正交试验

Study on Extracting Yeast Saturated Fatty Acids with Urea Inclusion Method

ZHAO Feng-li, CHEN Rui, LU Cui-wen

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The fat-producing optimum conditions of high-yield yeast (*Candida Yeast*-1-1) were studied in this experiment. An optimum method of yeast fat urea inclusion complex of saturated fatty acids using multi-criteria cross experiment was obtained. The optimized liquid fermentation mediums are as follows: 0.02% $MnCl_2$, 0.03% $FeSO_4$, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 3% $C_6H_{12}O_6$ and pH6.5, at 120r/min and 30℃. The optimum extracting conditions of yeast fat urea inclusion complex are: ratio of urea and fatty acids (3:1), refluxing time (30min) and cooling temperature (0℃).

Key words unsaturated fatty acids; urea inclusion method; orthogonal test

中图分类号: Q547

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0142-04

收稿日期: 2006-06-06

作者简介: 赵丰丽(1961-), 女, 副教授, 研究方向为发酵工程及其功能性制品。

2.3.3 样品分析测定

按样品供试液制备方法制得五味子叶不同生长时期样品各五批, 用标准曲线法测定总黄酮的含量, 结果见表 5。

表 5 样品含量结果
Table 5 Total flavones content in samples

样品	总黄酮含量(mg/g)	RSD (%)
7 月份叶	6.0285	0.61
8 月份叶	8.0714	0.45

3 结 论

通过研究得到五味子叶总黄酮最佳提取工艺为: 乙醇浓度 75%, 提取时间 60min, 料液比 1:35, 提取温度 85℃, 在最佳的提取工艺条件下测得 7 月、8 月五味

子叶中总黄酮含量分别为 6.0285mg/g 及 8.0714mg/g。根据以上的结果与分析可知, 五味子叶中含有丰富的黄酮类化合物, 本文详细探讨了五味子叶中总黄酮的提取工艺, 为开发利用该资源提供有益的参考。

参考文献:

- [1] 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, 2005: 44.
- [2] SLADKOVSKY R, SOLICH P, OPLETAL L. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* Baill. by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24: 1049-1054.
- [3] 尹海波, 康廷国, 潘荣琛, 等. 老鹳草属两种老鹳草总黄酮的含量比较[J]. 中药材, 2006, 26(6): 541-542.
- [4] 蔡健, 王薇. 黄瓜叶中总黄酮含量的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 194-197.

不饱和脂肪酸是人体必需的脂肪酸,是合成人体内前列腺素和凝血噁烷的前驱物质,它不仅能保持细胞膜的相对流动性,使胆固醇酯化,降低血中胆固醇和甘油三酯,而且能降低血液粘稠度,改善血液微循环,提高脑细胞的活性,增强记忆力和思维能力等。目前国内外报道的从油脂中提取不饱和脂肪酸的方法主要有超临界CO₂萃取法^[1]、分子蒸馏法^[2]等。尿素包合法^[3]是近年来兴起的从油脂中提取不饱和脂肪酸的一种有效方法,在动植物油中得到了一定应用。而在微生物中的应用则较少,尤其在酵母菌中的应用国内还没有报道。尿素包合法是利用饱和脂肪酸比不饱和脂肪酸较易与尿素形成稳定的络合物而将二者分离的一种方法。该法操作简单方便,试剂便宜,不用在高温下进行,能较完全地保留不饱和脂肪酸的生理活性,且尿素包合物形成后即可保护不饱和脂肪酸双键不受空气氧化,是一种理想的分离不饱和脂肪酸的方法。我们将其应用于酵母油脂中不饱和脂肪酸的分离提取,取得了较好的结果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种与试剂

实验室筛选出的高产油脂酵母命名为: *Candida Yeast-1-1*。

乙醚(AR)、甲醇(AR)、95%乙醇、四氯化碳(AR)、10%碘化钾、1%淀粉溶液(溶于饱和氯化钠溶液中)。

汉诺斯溶液:取12.2g碘,放入1500ml锥形瓶内,加入1000ml冰醋酸,边加边摇,同时加热,使碘溶解冷却后再加溴约3ml。

0.1N标准硫代硫酸钠溶液:将结晶硫代硫酸钠50g溶于经煮沸后冷却的双蒸水中,氢氧化钠1.6g(硫代硫酸钠溶液在pH9~10最稳定)稀释到2000ml。

1.1.2 仪器与设备

超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、恒温干燥箱、高速冷冻离心机、分析天平、回流浸提装置、旋转蒸发仪、电热恒温水浴锅、冰箱。

1.2 方法

1.2.1 酵母产脂最佳培养基的研究

在温度为30℃,摇床转速为120r/min的条件下,通过单因素和多因素正交试验研究了pH、碳源、氮源、葡萄糖浓度、金属微量元素等对酵母(*Candida Yeast-1-1*)产脂能力的影响,以确定最佳培养基的组成。

1.2.2 酵母脂肪的提取

把培养的酵母培养液以5000r/min离心分离,干燥后破壁预处理,用索氏提取法^[4]提出脂肪。本实验主要

研究了利用化学方法对酵母细胞破碎率的影响,从而找出酵母细胞最佳破碎方法。

1.2.3 游离脂肪的制备

取10g脂肪于150ml三角烧瓶中加入4g NaOH和30ml 95%乙醇60℃回流2h,皂化完毕后将溶液倒入温热的饱和食盐中,冷却后加入50ml乙醚萃取两次,弃去乙醚层以除去不皂化物,然后在水层中加入20%的盐酸溶液,于沸水浴中加热,至上层出现透明油状物,用50ml乙醚萃取两次,用旋转蒸发仪分离出游离脂肪酸。

1.2.4 酵母油脂中不饱和脂肪酸的尿素包合

尿素中加入无水甲醇,加热回流,待尿素完全溶解后加入预热到50℃的游离脂肪酸,再回流40min左右(65~70℃),室温冷却,析出大量的尿素包合物,然后在不同温度条件下研究尿素包合物完全析出的最佳条件。

1.2.5 碘值的测定

将上述尿素包合物的固相加入15%的稀盐酸,固液比为1:3,置于50℃的水浴中搅拌,至尿素包合物完全溶解后,用乙醚萃取出饱和脂肪酸,再用旋转蒸发仪分离出不饱和脂肪酸,然后测定其碘值^[5]。

2 结果与分析

2.1 酵母液体培养条件的研究

通过单因素试验研究了pH、碳源、氮源、葡萄糖浓度、金属微量元素对酵母(*Candida Yeast-1-1*)产脂能力的影响,在此基础上以FeSO₄、ZnSO₄、KNO₃、葡萄糖浓度、pH作为酵母产脂培养的试验因素,以酵母用苏丹黑染色后的吸光度(520nm)为试验指标^[6],利用L₈(4×2⁴)进行正交试验,其因素水平表见表1。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

因素	A MnCl ₂ (%)	B FeSO ₄ (%)	C (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	D 葡萄糖(%)	E pH
1	0.02	0.02	0.3	2	5.5
2	0.03	0.03	0.4	3	6.5

通过对正交试验结果的极差分析可知,产脂培养基的最佳培养基条件为:A₁B₂C₁D₂E₂即0.02%的MnCl₂、0.03%的FeSO₄、0.3%的(NH₄)₂SO₄、3%的葡萄糖、pH6.5。

2.2 酵母脂肪提取的研究

2.2.1 细胞破碎条件对酵母脂肪提取的影响

酵母的破碎方法主要包括物理方法与化学方法,物理方法有高压匀浆破碎法^[7]、超声波破碎法^[8-9]。化学方法最常用的是酸-热和碱-热破碎方法^[10]。物理方法对破

碎酵母量的要求比较严格, 不适和破碎较大量样品。由于提取的目标产物——脂肪能与碱发生皂化反应, 但不与酸反应, 且高温条件下不分解, 所以可以用化学方法中的酸—热破碎方法。本实验采用酸—热破碎方法对酵母细胞进行破碎, 其脂肪含量用索氏提取法提取, 综合考虑各方面的因素, 盐酸浓度的选取范围和结果见图 1。

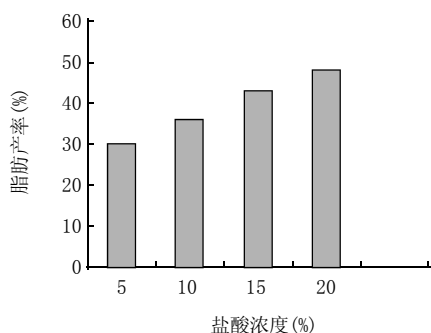


图 1 盐酸浓度的选取范围和结果
Fig.1 Effects of hydrochloric acid density on the leaven fats extraction

图 1 结果显示, 盐酸的含量对酵母破碎率有显著影响, 随着盐酸含量的增加, 酵母破碎率增加, 其粗脂肪产率不断提高, 以 20% 盐酸的脂肪提取率为最高, 脂肪含量达 48%。

2.2.2 提取方法对酵母脂肪提取率的影响

常用的酵母脂肪提取方法主要有干法(索氏抽提法)和湿法(氯仿—甲醇法^[11])两种。本实验探讨了两种方法对酵母脂肪提取的影响, 结果见表 2。

表 2 两种酵母脂肪提取方法的结果
Table 2 Results of two kinds of leaven fats extraction method

提取方法	脂肪产率(%)	溶剂回收率	操作步骤	提取时间
索氏抽提法	48	高	相对简单	长
Polch提取法	41	低	较多	短

表 2 结果显示, 索氏提取法虽提取时间较长, 但操作步骤相对简单、溶剂回收率高, 脂肪产率也较高, 所以本实验采用索氏法提取法。

2.3 尿素包合法提取酵母油脂中的不饱和脂肪酸的研究

2.3.1 尿素包合法提取酵母油脂中不饱和脂肪酸的正交试验

综合考虑在尿素包合法中对试验结果影响的因素, 本试验选取尿素: 脂肪酸(A)、回流时间(B)、冷析时间(C)三个因素为试验因素, 以所得的不饱和脂肪酸的碘值为试验指标, 进行三因素三水平的正交试验, 其因素水平见表 3, 试验结果及极差分析见表 4, 方差分析见表 5。

表 4、表 5 的极差分析和方差分析结果显示, 尿素

表 3 因素水平表
Table 3 Factors and levels of orthogonal test

因素	A 尿素: 脂肪酸	C 回流时间(min)	B 析出温度(℃)
1	1:1	30	-5
2	2:1	60	0
3	3:1	90	5

表 4 正交试验结果及极差分析
Table 4 Results of orthogonal test and range analysis

因素	A 尿素: 脂肪酸	B 回流时间(min)	C 析出温度(℃)	空列	碘值
1	1	1	1	1	135
2	1	2	2	2	150
3	1	3	3	3	160
4	2	1	2	3	178
5	2	2	3	1	182
6	2	3	1	2	167
7	3	1	3	2	201
8	3	2	1	3	179
9	3	3	2	1	185
\bar{K}_1	148.333	171.333	160.333	167.333	
\bar{K}_2	175.667	170.333	171.000	172.667	
\bar{K}_3	188.333	170.667	181.000	172.333	
R_j	40.000	1.000	20.667	5.334	

表 5 方差分析
Table 5 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	Fa	显著性
A(尿素: 脂肪酸)	2507.556	2	46.821	19.000	*
B(回流时间)	1.556	2	0.029	19.000	
C(析出温度)	640.889	2	11.967	19.000	
空列	53.556	2	1.000	19.000	
误差 e	53.56	2			

与脂肪酸的比值对不饱和脂肪酸碘值的影响最大, 极差分析中的极差值达到 40.00, 方差分析结果呈显著性, 两者的分析结果是一致的。冷却析出温度也对试验结果影响比较大, 但没有达到显著水平, 回流温度影响不大。因素的主→次顺序是: A C B。从表 4 直接看, 7 号试验所得的不饱和脂肪酸碘值最大, 在此条件下碘值可达到 201。极差分析结果表明最佳提取条件是: $A_3B_1C_2$, 但它没有出现在正交试验的 9 次试验中, 因此, 还需要做验证试验。

2.3.2 尿素包合法提取酵母油脂中的不饱和脂肪酸的验证实验

将正交试验的极差分析最佳提取条件与直接看最好条件进行验证实验, 其结果见表 6。

表 6 验证实验结果
Table 6 Results of verify experiment

编号	重复 1	重复 2	重复 3	碘值平均值
极差分析最佳结果 $A_3B_1C_2$	218	212	215	216
直接看最佳结果 $A_3B_1C_3$	210	200	196	202

表6结果显示,极差分析最佳结果在验证试验中碘值高,直接看最佳结果仍与正交试验中的结果相似。因此,最佳提取条件是极差分析最佳结果: $A_3B_1C_2$,在此条件下,所测得的碘值平均值为216。

2.4 影响碘值测定因素的探讨

在碘值测定时,由于卤素加成反应是可逆反应,只有在卤素绝对过量时,该反应才能进行完全。所以,脂肪吸收的碘量不应超过汉诺斯溶液所含碘量的一半。在测定时,若瓶内混合液的颜色很浅,表示脂肪用量过多,应重新称取少量的脂肪重作。而且,滴定时要用力振荡混合均匀。如振荡不够,四氯化碳层呈现紫色或红色,则需继续用力振荡使碘全部进入水层,这样才能使碘值测定准确。

2.5 实验中所用溶剂的回收

实验所用的有机溶剂主要有乙醚、四氯化碳、95%乙醇、甲醇等,采用旋转蒸发仪进行回收。

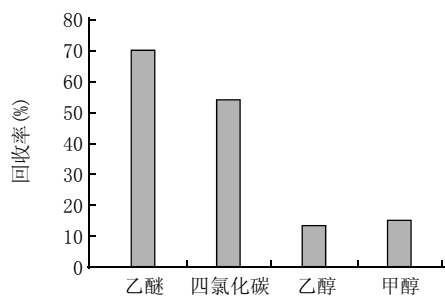


图2 溶剂回收结果

Fig.2 Recovery results of the melting agent

图2结果显示,本实验中所用的几种试剂回收中以乙醚的回收率为最高达到70%,四氯化碳稍低为54%,而乙醇和甲醇在试验中是作为反应物的,其回收率都不高,回收率均不足15%;在实验中用量最大的乙醚回收率最高,主要原因是乙醚沸点很低,直接加热到40~50℃就可分离出来,如果在回收中能够减少乙醚挥发和及时处理,其回收率则可达80%以上。

3 结论

3.1 实验最终确定的产脂酵母(*Candida Yeast-1-1*)的最佳液体培养基在温度为30℃,摇床转速为120r/min的条件下为:0.02%的 $MnCl_2$ 、0.03%的 $FeSO_4$ 、0.3%的 $(NH_4)_2SO_4$ 、3%的葡萄糖、pH6.5;最佳不饱和脂肪酸的尿素包含条件为:尿素和脂肪酸比为3:1,回流时间30min,冷却析出温度0℃。以上优化条件提取不饱和脂肪酸的效果最佳。

3.2 尿素包合法在酵母菌不饱和脂肪酸提取的过程中效果良好,而且所用设备简单,溶剂易回收,因此,适合应用于微生物不饱和脂肪酸的提取。此外,还能广泛应用于油脂工业、精细化工、食品、医药工业等,是一种很有前途的分离不饱和脂肪酸的方法。

参考文献:

- [1] 马海乐. 生物资源的超临界流体萃取[M]. 安徽: 科技出版社, 2000.
- [2] 龚春晖. 分子蒸馏技术及其在油脂工业中的应用[J]. 西部粮油科技, 2000, 25(6): 23-25.
- [3] DUREA C, MIYAUCHI D T, SUMEIWED W N. The fractionation of marine-oil fatty acids with UREAL[J]. JAOCs, 1995, 32: 481.
- [4] 天津轻工业学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [5] 张逸, 工兴国, 何东平. PUFA油脂的制备及微胶囊化工艺的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(10): 25-27.
- [6] THAKUR M S, PRAPULLA S G, KARANTH N G. Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudanblack b[J]. Enzyme Microb Technol, 1989(11): 252-254.
- [7] 孙海翔, 尹卓容, 马美范. 高压均质破碎啤酒酵母细胞壁的研究[J]. 食品工业科技, 2002(2): 66-67.
- [8] 刘国诠. 生物工程下游技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 65-92.
- [9] 毛忠贵. 生物工程下游技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 21-23.
- [10] 姚洪文, 范玉梅, 郭素格. 纳米级微生物细胞破碎机在酱油生产中的应用[J]. 中国酿造, 2005(5): 30-34.
- [11] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917.

信息

科学家发现新细菌蛋白可轻松转换血型

据国外媒体报道,一个研究小组称他们发现了一种新技术可以轻松的将A型、B型或者AB型血转换为O型血,而且这种转换得到的血液可以安全的使用在受血人身上,这项研究成果已经被发表在了最新一期的《自然生物化学》杂志上。

科学家们称,他们发现了一种细菌蛋白可以改变血液中的红血球上附着的糖分子的类型,从而过到改变血液类型的目的。这一研究成果对于全球严重缺血的现况无疑是一个福音,同时它也有助于防止由于输入了不同类型的血液而导致病人的死亡。