

海洋细菌脂肪酸的气相色谱分析

徐敏, 王静, 柴子涵, 牟海津

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 以副溶血性弧菌 VP-X-3 为试验对象, 利用气相色谱技术分析了其细胞脂肪酸的组成和含量, 以色谱峰的数量、色谱峰高及脂肪酸含量作为评价指标, 探讨了不同的皂化和甲酯化条件对细菌细胞脂肪酸测定结果的影响。结果表明: 皂化和甲酯化条件都对细胞脂肪酸的组成和含量产生一定的影响。较低温度皂化处理利于增加色谱峰数量和色谱峰高。甲酯化温度过高容易破坏脂肪酸, 尤其是长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的结构。高温甲酯化条件下, 时间越长, 甲酯化效果越差。试验得到较为理想的气相色谱前处理条件: 2 mol/L NaOH-甲醇溶液 2 mL, 70 °C 水浴 10 min; 10%(V/V)H₂SO₄-甲醇溶液 2 mL, 70 °C 水浴 15 min。此条件下的色谱峰的数量多达 29 种, 色谱峰高明显高于其他处理条件下的峰高。

关键词: 副溶血性弧菌; 脂肪酸; 气相色谱; 甲酯化; 皂化

中图分类号: Q93-331 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)02-0076-08

脂肪酸是生物体的基本机构成分之一, 细胞中绝大部分的脂肪酸以脂质的形式存在, 脂质是构成生物膜的重要物质^[1]。脂肪酸是细胞中一种稳定而富有的化学成分, 不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响, 是理想的菌株分型依据之一^[2]。现代微生物学研究表明, 细菌细胞中普遍存在的脂肪酸成分与细菌的 DNA 具有高度的同源性, 各种细菌具有其特征性的脂肪酸指纹图谱^[3]。在微生物脂肪酸方面的研究主要集中在利用脂肪酸作为鉴定细菌的分类依据, 并且利用脂肪酸指纹分析环境中微生物群落的组成^[4-5], 以及把脂肪酸作为指标研究寄生微生物与宿主之间的生态关系^[6]。脂肪酸甲酯(Fatty Acid Methyl Ester, FAME)谱图分析方法就是在脂肪酸可作为生物标记物的基础上发展起来的分析技术, 通过分析微生物细胞膜上磷脂脂肪酸的组分来鉴定微生物的种属、分析微生物的多样性, 是一种简便、可靠地分析方法^[7]。目前已有一种商业化的微生物 FAME 气相色谱分析系统, 即 Sherlock MIS 微生物自动鉴定系统(美国 MIDI 公司开发)。该系统操作简便, 成本消耗低, 但仍然存在一定缺陷, 如 MIDI 数据库不完善, 在细菌分类和鉴定上的应用受到一定的限制^[8]。

气相色谱技术是一种分离效能高、分析速度快、敏感性及特异性高并能和多种检测手段联用的分离分析方法, 是细菌细胞脂肪酸分析的最佳分析方法^[9]。但是, 脂肪酸的极性很强, 是一种热敏性物质,

高温下易发生聚合、脱羧和裂解等副反应。如果直接用气相色谱分析, 由于柱温过高, 容易出现固定相难以选择, 色谱峰拖尾, 保留时间难以重复, 假峰等现象^[10]。因此, 在对脂肪酸进行色谱分析之前, 一般都要进行前处理, 通常是将脂肪酸衍生为易挥发的甲酯, 经典的方法是先用碱将脂质皂化, 然后再用甲醇进行甲酯化处理^[11]。由于甲酯化的条件不同, 气相色谱测定的结果差异会比较。另外, 甲酯化的条件也会对细胞脂肪酸的组成和含量产生影响。因此, 选择合适的甲酯化条件对于菌体内脂肪酸的分析至关重要。

试验以副溶血性弧菌为研究对象, 通过气相色谱技术对菌体内脂肪酸的组成和百分含量进行分析, 探讨不同气相色谱前处理条件对其脂肪酸甲酯化效果的影响, 确定了试验条件中最佳气相色谱前处理方法。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与试剂

菌株 VP-X-3, 从海水中分离得到, 并经 16S

收稿日期: 2012-05-14; 修回日期: 2012-08-31

基金项目: 国家科技支撑计划“海洋水产食品加工技术研发与产业化示范(2012BAD28B05)资助

作者简介: 徐敏(1987-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, E-mail: minmin870918@163.com; 牟海津, 通信作者, 电话: 0532-82032290, E-mail: mousun@ouc.edu.cn

rRNA 基因序列分析鉴定为副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*); 脂肪酸标准品 Mixture Me 82(瑞典 Larodon 公司), 硫酸、氢氧化钠、甲醇和正己烷均为国产分析纯。

2 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液: 称取 4 g 氢氧化钠于烧杯中, 加入 100 mL 水与甲醇($V:V=1:9$)的混合溶液, 振摇, 使其溶解均匀。

10% 硫酸-甲醇(V/V)溶液: 取 10 mL 硫酸缓慢加入装有 90 mL 甲醇溶液的烧杯内, 混合均匀。

2216 E 液体培养基(1 000 mL): 磷酸高铁, 0.01 g; 氯化钠, 15 g; 蛋白胨, 5 g; 酵母膏, 1 g; pH 7。

1.2 试验仪器

HZQ-C 空气浴振荡器: 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司; 冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂; 冷冻干燥机 FD-1A: 北京博医康实验仪器有限公司; 安捷伦 6890N 气相色谱仪和 5973 型质谱仪: 安捷伦科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌体培养与收集^[12-13]

将保存于 4 °C 冰箱内的副溶血弧菌 VP-X-3 在 2216E 平板上活化, 然后将活化后的菌种接种于 2216E 液体培养基中, 于 28 °C 条件下恒温振荡培养 24 h, 所得菌液以 8 000 r/min 离心 10 min, 并用 0.85% 生理盐水清洗 3 次, 收集菌体沉淀, 真空冷冻干燥 48 h 得到菌粉, 以备气相前处理使用。

1.3.2 气相色谱前处理方法

称取 100 mg 干燥后的菌体于血清瓶中, 加入 2 mL 2 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液进行皂化处理, 混合。分别在 60 °C 和 70 °C 水浴加热 10 min。取出冷却后加入 2 mL 正己烷萃取, 弃去正己烷相; 加入 10% 硫酸-甲醇溶液 2 mL, 置于水浴锅中进行甲酯化反应。反应温度为 70 °C 或 80 °C, 反应时间为 10 min 或 15 min。反应结束后冷却至室温, 加入 2 mL 正己烷, 静置, 取适量正己烷相过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤过液用于气相色谱分析及气质分析使用。具体操作条件见表 1。

1.3.3 气相色谱条件

Agilent HP-INNOWax 气相毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm, 19081N-113); 载气: 氮气; FID 检测器; 柱温: 起始温度 150 °C, 保持 5 min; 以 3 °C/min 升温至 170 °C, 保持 5 min; 以 3 °C/min 升温至 210 °C, 保持 5 min; 氮气流速: 45 mL/min; 氢气流速: 40

mL/min; 分流比: 10 : 1; 进样量: 1 μL。质谱条件: Agilent HP-5ms 气相毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm, 19091s-433), 接口温度 280 °C, EI 离子源, 电离能量 70 eV, 离子源温度 230 °C; 脂肪酸标准谱库 NIST02.L。

表 1 细菌脂肪酸的不同气相色谱前处理条件

Tab. 1 Gas chromatography pretreatments of bacterial fatty acid

编号	前处理条件	
	皂化	酯化
I	60 °C, 10 min	70 °C, 15 min
II	60 °C, 10 min	80 °C, 10 min
III	60 °C, 10 min	80 °C, 15 min
IV	70 °C, 15 min	70 °C, 15 min
V	70 °C, 15 min	80 °C, 10 min
VI	-	60 °C, 10 min
VII	-	70 °C, 15 min
VIII	-	80 °C, 10 min

注: “-”代表未经皂化处理

1.3.4 结果分析

保留时间为定性依据之一, 峰面积归一化法定量。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸气相色谱分析

图 1 是脂肪酸标准品气相色谱图; 图 2 和图 3 分别是样品的气相和气质色谱图, 前处理条件均为皂化 70 °C 10 min 及甲酯化 70 °C 15 min。样品气质色谱图(图 2)与其气相色谱图(图 3)之间存在一些差异, 相同碳原子的饱和与不饱和脂肪酸之间的位置发生颠倒。这是气相色谱柱和气质色谱柱极性不同造成的差异。前者使用的 HP-INNOWax 色谱柱极性较强, 因此极性较弱的脂肪酸先于极性较强的脂肪酸出来(如 C16 : 0、C18 : 0 等分别早于 C16 : 1、C18 : 1 出峰); 而后者使用的 HP-5ms 色谱柱极性较弱, 极性较强的物质先于极性较弱的物质出来; 此外, 非极性柱又叫沸点柱, 沸点较低的物质先出峰, 因此 C16 : 1、C18 : 1 等沸点较低的脂肪酸早于 C16 : 0、C18 : 0 等沸点较高的脂肪酸出峰。

根据标准品与气相色谱比对以及气质分析的结果, 样品中大多数脂肪酸得到鉴定。图 3 反映了副溶血弧菌细胞膜内脂肪酸组成的情况, 可以看到: 副溶血弧菌细胞内存在 C12-C18 饱和脂肪酸、C14-C18

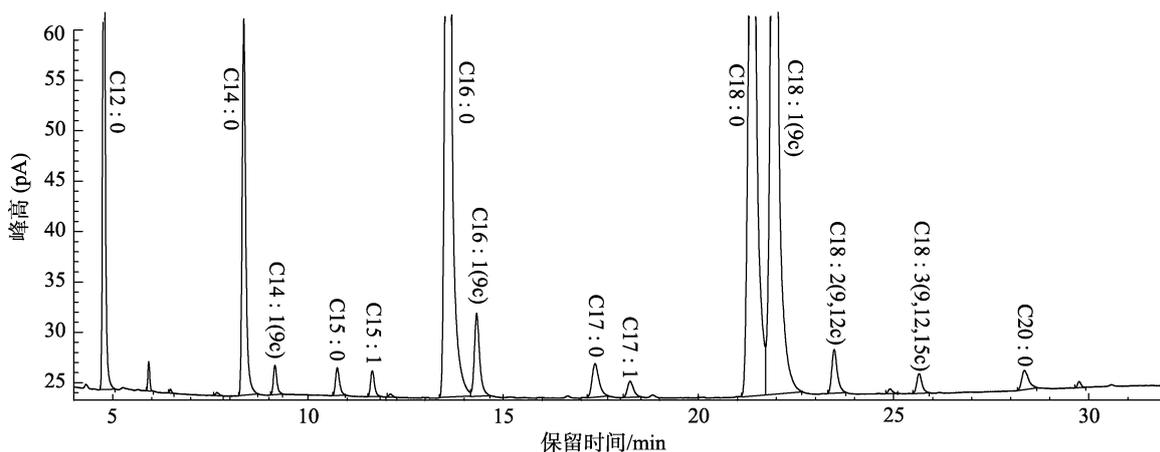


图 1 标准品脂肪酸气相色谱图

Fig. 1 GC chromatogram of standard fatty acids

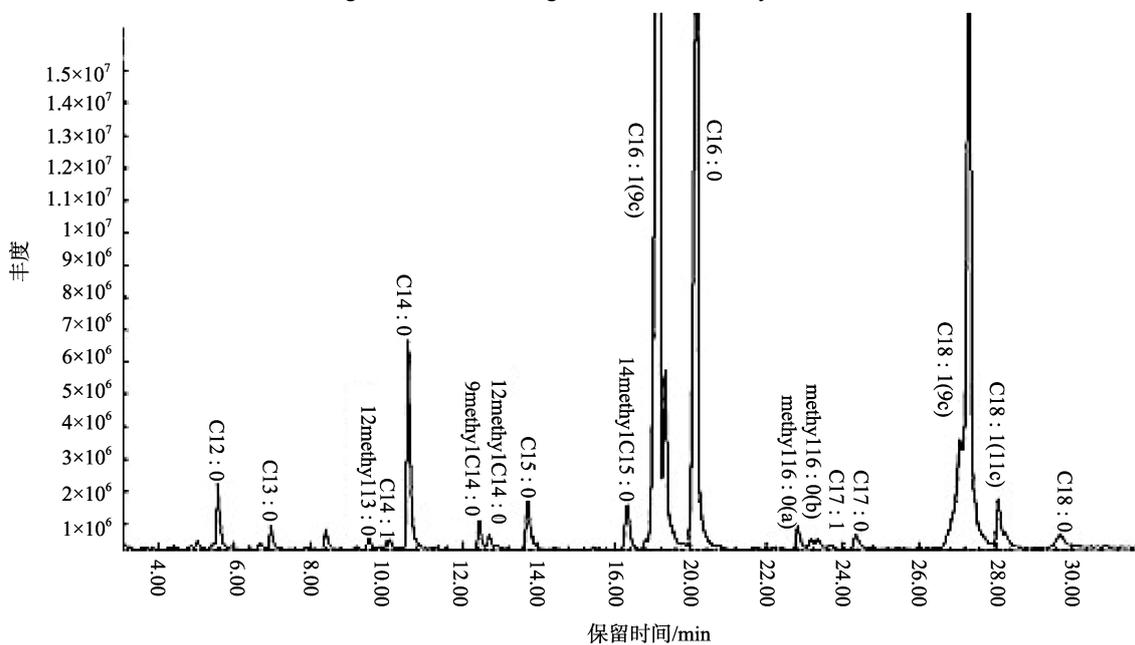


图 2 样品气质色谱图

Fig. 2 GC-MS chromatogram of sample fatty acids

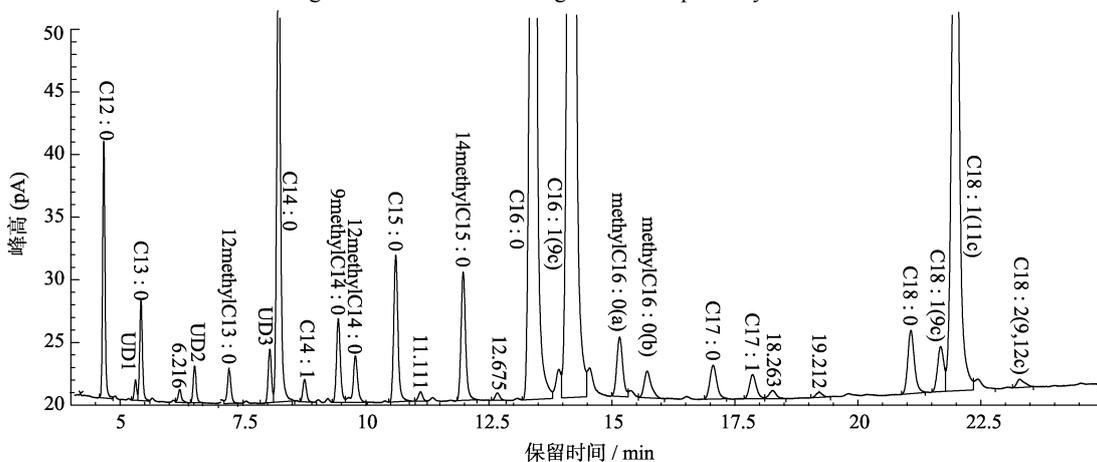


图 3 样品气相色谱图

Fig. 3 GC chromatogram of sample fatty acids

注: UD1、UD2 和 UD3 代表未被鉴定的脂肪酸, 保留时间分别为 5.32、6.52 和 8.05 min; a 和 b 分别代表不同碳原子上的甲基取代基。

单不饱和脂肪酸和 C13-C16 支链脂肪酸, 总的百分含量分别在 35.46% ~ 37.60%、53.61% ~ 56.82%和 5.27% ~ 6.67%。另外还有少量的多不饱和脂肪酸, 其百分含量低于 0.60%。其中, C14 : 0、C16 : 0、C16 : 1(9c)和 C18 : 0(7c)为其优势脂肪酸, 4 种优势脂肪酸百分含量在 80%以上。此外, 还有部分脂肪酸未能被鉴定, 如保留时间为 5.32 min、6.52 min 和 8.05 min 的脂肪酸, 还需通过其他方式进一步确认。

2.2 气相前处理条件对色谱峰数量的影响

图 4 反映了不同前处理条件下色谱峰数量的变化。从图中看出, 不同的前处理条件, 色谱峰的数量存在一定的差异。尤其是IV前处理条件下, 色谱峰的数量最多, 达到 29 种。气相色谱图中色谱峰(除溶剂峰)的数量反映脂肪酸的种类, 色谱峰数量愈多, 对于深入分析脂肪酸的组成有重要的意义, 也利于利用特征性的色谱峰对某些细菌进行准确的鉴定。

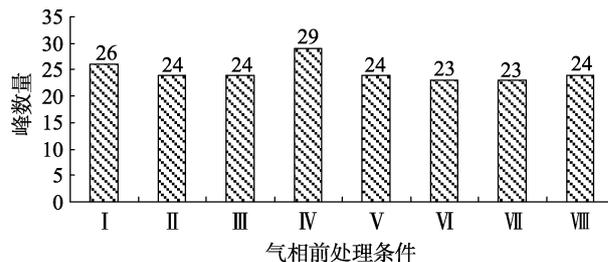


图 4 不同气相前处理条件对峰数量的影响

Fig. 4 The quantity of peaks under different gas chromatography pretreatments

2.3 气相前处理条件对色谱峰高的影响

在气相色谱各项条件都相同的情况下, 色谱峰高可以从侧面反映出脂肪酸在不同气相前处理条件下甲酯化的程度。8 种前处理条件中, 采用 70 °C 15 min(I、IV和VII)甲酯化条件的色谱峰高处于一种优势地位, 尤其是IV中色谱峰明显高于其他处理条件下的色谱峰, 这种色谱峰高的优势现象说明 70 °C 甲

表 2 不同气相前处理条件对色谱峰高的影响

Tab. 2 The effect of different pretreatments on peak heights

脂肪酸名称	定性方法	峰高(pA)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
十二碳酸甲酯	S*	13.24	4.62	2.73	20.50	3.74	3.37	9.06	7.08
UD1		1.03	0.40	0.26	1.62	0.34	0.00	0.00	0.00
十三碳酸甲酯	M*	5.24	1.69	1.02	7.98	1.37	1.25	2.99	2.34
UD2		1.91	0.69	0.87	2.93	0.61	0.00	0.00	0.00
12-甲基-十三碳酸甲酯	M*	1.71	0.51	0.33	2.60	0.43	2.83	3.45	3.07
UD3		2.79	1.27	1.24	4.26	1.10	0.00	0.00	0.00
十四碳酸甲酯	S*	27.46	7.59	4.89	40.56	6.14	21.66	30.87	26.41
十四碳一烯酸甲酯	S*	1.14	0.40	0.24	1.80	0.32	1.48	1.81	1.64
9-甲基-十四碳酸甲酯	M*	4.45	1.16	0.81	6.69	0.93	4.82	6.04	5.09
12 甲基-十四碳酸甲酯	M*	2.50	0.66	0.49	3.71	0.53	3.45	4.30	3.68
十五碳酸甲酯	S*	7.50	1.96	1.36	11.71	1.67	3.82	4.55	3.85
14-甲基-十五碳酸甲酯	M*	6.83	1.66	1.13	10.26	1.38	9.74	11.65	9.72
十六碳酸甲酯	S*	82.17	18.80	12.92	117.03	15.75	96.28	115.28	92.39
9-十六碳烯酸甲酯	S*	139.08	33.73	22.15	180.14	27.21	126.37	156.76	134.80
a-甲基-十六碳酸甲酯	M*	3.03	0.66	0.48	4.73	0.58	3.23	3.93	3.03
b-甲基-十六碳酸甲酯	M*	1.40	0.31	0.24	2.12	0.27	1.82	2.14	1.70
十七碳酸甲酯	S*	1.64	0.35	0.26	2.69	0.31	1.24	1.51	1.16
十七碳一烯酸甲酯	S*	1.18	0.30	0.21	1.93	0.24	0.88	1.11	0.93
十八碳酸甲酯	S*	3.10	0.64	0.46	5.03	0.56	4.49	5.37	3.53
9-十八碳烯酸甲酯	S*, M*	2.20	0.53	0.38	3.60	0.46	2.37	2.98	2.07
11-十八碳烯酸甲酯	S*, M*	42.35	8.91	6.04	63.82	7.27	39.52	48.07	38.06
9,12-十八碳二烯酸甲酯	S*	0.41	0.00	0.19	0.66	0.22	0.52	0.64	0.45

注: M*: 通过气质色谱鉴定; S*: 通过气相图谱与标准品比对鉴定; UD1、UD2 和 UD3 代表未被鉴定的脂肪酸

酯化 15 min 对于细胞脂肪酸前处理来说是一种比较好的选择。而当甲酯化温度升至 80 °C(II、III和V)时, 色谱峰高呈现降低趋势, 说明高温容易破坏某些脂肪酸的结构, 不利于甲酯化反应的进行。在这 3 种(II、III和V)前处理方法中, 80 °C 15 min(III)甲酯化时的色谱峰高尤其低, 而且是所有前处理方式中色谱峰高最低的(除保留时间为 6.52 min 的脂肪酸), 说明时间对甲酯化也有影响, 长时间的甲酯化容易对脂肪酸造成不同程度的破坏, 削弱甲酯化的效果。

2.4 气相前处理条件对脂肪酸百分含量的影响

不同的气相前处理方式使脂肪酸的百分含量发生规律性的变化(表 3)。甲酯化条件相同(如 I 和IV;

II和V), 当皂化温度由 60 °C升至 70 °C时, 脂肪酸百分含量没有发生显著变化, 说明已有的皂化温度对脂肪酸百分含量的影响并不突出。II、III和 V 的甲酯化温度都是 80 °C, 在脂肪酸百分含量方面存在一定的共性: 在这 3 种前处理条件下, C15 及其以下的短链脂肪酸百分含量相对较高, 而高于 C15 的较长链的脂肪酸百分含量却呈下降趋势。此现象说明较高温度(如 80 °C)的甲酯化反应, 长链脂肪酸的结构容易受到破坏。而III与II、V 相比, 脂肪酸百分含量偏低, 说明高温甲酯化时间对脂肪酸百分含量也有一定的影响, 时间越长, 越容易导致脂肪酸结构的破坏, 不利于长链脂肪酸甲酯化反应的进行。从不饱和脂肪酸总量可以看出, I 和IV不饱和脂肪酸总量相对较高, 而III最低, 说明长时间高温下的甲酯

表 3 不同气相前处理条件对脂肪酸百分含量的影响

Tab. 3 The effect of different pretreatments on fatty acid contents

脂肪酸名称	百分含量(%)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
十二碳酸甲酯	2.01	2.77	2.39	1.85	2.71	0.47	1.04	0.96
UD1	0.15	0.24	0.23	0.15	0.23	0.00	0.00	0.00
十三碳酸甲酯	0.91	1.15	1.02	0.83	1.11	0.20	0.39	0.36
UD2	0.34	0.51	0.93	0.33	0.53	0.00	0.00	0.00
12-甲基-十三碳酸甲酯	0.34	0.42	0.38	0.33	0.43	0.54	0.55	0.60
UD3	0.51	0.98	1.39	0.52	1.02	0.00	0.00	0.00
十四碳酸甲酯	5.81	6.69	6.27	5.55	6.43	4.41	5.16	5.28
十四碳一烯酸甲酯	0.23	0.33	0.29	0.24	0.33	0.30	0.31	0.33
9-甲基-十四碳酸甲酯	1.00	1.08	1.13	0.99	1.03	1.07	1.12	1.10
12-甲基-十四碳酸甲酯	0.59	0.61	1.20	0.64	0.59	0.78	0.82	0.82
十五碳酸甲酯	1.76	1.90	1.92	1.84	1.91	0.89	0.86	0.87
14-甲基-十五碳酸甲酯	1.74	1.75	1.77	1.75	1.75	2.51	2.41	2.43
十六碳酸甲酯	24.04	22.61	22.65	23.88	22.80	28.98	28.07	27.09
9-十六碳烯酸甲酯	41.25	41.16	39.39	39.47	40.48	39.47	39.54	41.27
a-甲基-十六碳酸甲酯	1.06	0.89	0.94	1.05	0.94	1.08	1.10	0.97
b-甲基-十六碳酸甲酯	0.54	0.53	0.64	0.57	0.58	0.69	0.66	0.63
十七碳酸甲酯	0.59	0.53	0.58	0.70	0.55	0.48	0.46	0.44
十七碳一烯酸甲酯	0.44	0.43	0.42	0.50	0.43	0.34	0.35	0.35
十八碳酸甲酯	1.11	1.01	0.93	1.25	0.96	1.69	1.62	1.29
9-十八碳烯酸甲酯	0.70	0.69	0.70	0.85	0.72	0.82	0.82	0.69
11-十八碳烯酸甲酯	14.19	12.93	12.81	15.53	12.91	14.39	13.90	13.48
9,12-十八碳二烯酸甲酯	0.15	0.00	0.58	0.20	0.57	0.24	0.18	0.19
SFA	36.25	36.67	35.75	35.90	36.46	37.11	37.60	36.28
UFA	56.97	55.55	54.19	56.78	55.44	55.56	55.10	56.31
BCFA	5.27	5.27	6.05	5.34	5.33	6.67	6.65	6.55

注: UD1、UD2 和 UD3 代表未被鉴定的脂肪酸; SFA、UFA 和 BCFA 分别代表饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸和支链脂肪酸含量

化更容易对不饱和脂肪酸造成破坏。未经皂化组(VI, VII, VIII)的支链脂肪酸含量较皂化组偏高,可能的原因是副溶血弧菌胞内的支链脂肪酸以脂质形式存在的比例相对较少,皂化作用对其百分含量的影响相对较小。

3 讨论

综合考虑色谱峰的数量,色谱峰高和脂肪酸百分含量这三个因素,在此次试验中选取的皂化和甲酯化的条件中,得到理想的气相前处理条件: 2 mol/L NaOH-甲醇溶液 2 mL, 70 °C 水浴, 10 min; 10% H₂SO₄-甲醇溶液 2 mL, 70 °C 水浴, 15 min。在此条件处理下,副溶血弧菌细胞脂肪酸的气相色谱峰数量和高度均达到最大值。

通过气相色谱和气质色谱检测得到:副溶血弧菌 VP-X-3 细胞内存在 29 种脂肪酸,其中检测到少量的支链脂肪酸和多不饱和脂肪酸,脂肪酸的类型和组成可以作为鉴定副溶血弧菌的特定指标。气相色谱图中的各个色谱峰代表了不同种类的脂肪酸,对于分析海洋细菌脂肪酸的组成情况来说,脂肪酸的种类越多,越有利于对细菌特性及鉴定进行深入分析。较低温度皂化处理的样品,经过气相检测得到的色谱峰数量相对较多,可能是因为细胞中的脂肪酸多以脂质的形式存在,甲酯化之前先通过皂化处理,有利于处于脂质形式的脂肪酸释放出来,提高自由脂肪酸的种类和含量,从而提高甲酯化的效率。甲酯化反应中甲醇处于沸腾状态有利于提高甲酯化效率,但温度过高,反而会削弱甲酯化效率^[14]。在高温条件下进行甲酯化反应,色谱峰高处于明显的劣势,且 15 个碳以下的长链脂肪酸的百分含量也发生不同程度的下降,这可能是因为高温容易破坏脂肪酸(尤其是长链脂肪酸)或脂肪酸甲酯,影响甲酯化反应的进行。此外,在高温条件下的甲酯化反应中,时间越长,对甲酯化反应越不利。气相色谱是一种灵敏度很高的分析仪器,能够将气相前处理给脂肪酸组成和含量造成的细微差异准确呈现出来,这些细小的差异为研究皂化和甲酯化条件及其他外界因素对脂肪酸组成和含量造成的影响提供了可能性。

细菌中的脂肪酸结构因存在奇数碳原子、支链或者各种官能团(如-OH、三键、环状结构)而变得更加复杂。细菌中的脂肪酸多不饱和的种类比较少,主要是奇数的、带支链的,主链上有环丙基或羟基的脂肪酸,如 iC15:0、C15:0、iC16:0、C16:1w7t、

C17:0、cyC17:0、cyC19:0、C18:1w7 脂肪酸的含量可作为细菌生物量的指标^[15]。此次副溶血弧菌的脂肪酸分析中得到大量种类的支链脂肪酸,如 C13、C14、C15 和 C16 的支链脂肪酸(总百分含量在 4.0%~6.0%),它们的存在对于细菌来说具有重要的意义。相关文献^[16]报道支链脂肪酸是细菌和动物脂质的常见组成成分,由于它们类似于双键容易被氧化,在细胞膜中有提高脂质流动性的作用。Kaneda^[17]在文中亦指出由直链脂肪酸组成的细胞膜的流动性水平通过单不饱和脂肪酸来调节,而含有支链脂肪酸的细菌细胞膜的流动性水平却主要受 12(和 13)methylC14:0 影响。此外,支链脂肪酸在细菌分类学上具有重要的价值,它的含量和组成通常可以作为一种分类标记。如杆菌中,某些细菌仅含有 iso 结构(支链甲基在倒数第二位碳原子上)的支链脂肪酸,而另外一些细菌却存在 anteiso 结构(支链甲基在倒数第三位碳原子上)的支链脂肪酸^[16]。在 Maria 等^[18]对深海弧菌分离株脂肪酸组成进行的研究中,副溶血弧菌细胞膜内检测出大量羟基脂肪酸(如 12C、13C 和 15C),这与本试验结果存在一定差异。出现这种差异的原因可能有几个方面:首先,二者采用的菌株不同,不同菌株之间脂肪酸存在差异;其次,细胞组成受到生长阶段、培养基成分、温度等因素有关,作为细胞膜重要组成成分的脂类也会受到影响^[19]。前者研究中使用的是 BHI、TSBA、TSA 和 LB 四种培养基,而此次试验中使用的是 2216E 培养基;另外,气质采用的脂肪酸标准谱库 NIST02.L 对羟基脂肪酸的识别不灵敏,甚至无法鉴定羟基脂肪酸,即使副溶血弧菌细胞内存在羟基脂肪酸也无法得到准确的识别。Lambert 等^[20]在对弧菌属脂肪酸进行分析时,采用皂化(100 °C 30 min)和甲酯化(100 °C 15 min)结合方法进行气相前处理,在副溶血弧菌细胞膜上也检测到少量羟基脂肪酸。而本文也使用过 100 °C 进行皂化试验(文中未列出),效果相当不理想。出现这种现象的原因还有待于进一步研究。宋莉等^[21]利用气相色谱-质谱分析霍乱弧菌中脂肪酸的组成并用以鉴定霍乱弧菌,采用两种方法进行脂肪酸气相前处理:一种 80 °C 甲酯化 18 h,另一种皂化(60 °C 20 min)和甲酯化(60 °C 2 min)相结合,在这两种前处理方法中,前者甲酯化温度较高,时间太长,容易导致脂肪酸甲酯结构破坏;后者甲酯化温度较低,时间太短,可能会导致脂肪酸不完全反应,菌体内的部分脂肪酸可能不能得到准确的检测。

细菌细胞内脂肪酸的组成受到很多因素的影响,因此在分析脂肪酸时,需要对培养基成分、培养条件、气相前处理条件等因素进行标准化,否则会影响测定结果的准确性和重复性。气相前处理条件的优化工作有利于菌体细胞膜上脂肪酸组成的精确检测和分析以及利用脂肪酸的特征来对不同种属的海洋细菌进行归类。

参考文献:

- [1] 张国赏, 吴文鹃, 潘仁瑞. 气相色谱-质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用[J]. 合肥联合大学学报, 2000, 10(4): 92-96.
- [2] 陈经雕, 邓小玲, 柯昌文, 等. 广东省布鲁氏菌菌株脂肪酸成分[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(2): 131-139.
- [3] 刘志辉, 蔡杏珊, 竺澎波, 等. 应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(6): 403-406.
- [4] Buyer J S, Drinkwater L E. Comparison of substrate utilization assay and fatty acid analysis of soil microbial communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30: 3-11.
- [5] Steinberger Y, Zelles L. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climatic transect in the Judean desert[J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, 28(3): 292-300.
- [6] 戴传超, 余伯阳, 徐增莱. 环境因子对乌柏内生真菌生长及脂肪酸的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(9): 1525-1528.
- [7] 王秋红, 蓝江林, 朱育箐, 等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用[J]. 福建农业学报, 2007, 22(2): 213-218.
- [8] 宋红梅, 李波, 李丽婕, 等. 气相色谱法分析沙门氏菌脂肪酸组成的研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(22): 4324-4326.
- [9] Ozbek A, Aktas O. Identification of three strains of *Mycobacterium* species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling[J]. The Journal of International Medical Research, 2003, 31(2): 133-140.
- [10] 张金廷. 脂肪酸及其深加工手册[M]. 北京: 工业出版社, 2002: 362.
- [11] 汤逢. 油脂化学[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1985: 166-167.
- [12] 王静, 黄磊, 陆益梅, 等. 3种海洋细菌脂肪酸组成特性的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41: 252-258.
- [13] Paul W, James B D, Sherill K C, et al. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify *Francisella tularensis*[J]. Journal of AOAC International, 2007, 90(2): 465-469.
- [14] 张迎春, 蔡冰, 郭国宁, 等. 烟草中非挥发性有机酸的甲酯化条件优化及定量分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 788-793.
- [15] 王秋红. 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [16] Body D R. Branched-chain fatty acids. Handbook of Chromatography[M]. Boca Raton: CRC Press, 1984, 1: 241-275.
- [17] Kaneda T. *Iso*-Fatty and *anteiso*-fatty acids in bacteria-biosynthesis, function, and taxonomic significance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55: 288-302.
- [18] Maria H, Markus F, Paul W. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 943-950.
- [19] 朱育箐, 苏明星, 黄素芳, 等. 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸组成的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1158-1165.
- [20] Lambert M A, Hickman-Brenner F W, Farmer J J, et al. Differentiation of *Vibrionaceae* species by their cellular fatty acid composition[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33(4): 777-792.
- [21] 宋莉, 杨修军, 李青, 等. 气相色谱-质谱检测霍乱弧菌的方法研究[J]. 中国医学检验杂志, 2000, 1(1): 27-29.

Analysis of Cellular Fatty Acid Composition of Marine Bacteria by Gas Chromatography

XU Min, WANG Jing, CHAI Zi-han, MOU Hai-jin

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: May,14,2012

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Fatty acid; Gas chromatography; Methyl esterification; Saponification

Abstract: The composition and percentage of fatty acids in *Vibrio parahaemolyticus* VP-X-3 were analyzed by gas chromatography. With quantity, peak height and percentage of fatty acids showed in the chromatography as the standard, the saponification and methyl esterification conditions were also investigated to give an optimum pre-treatment method. The results indicated that both saponification and methyl esterification influenced fatty acids composition and percentage. The peak quantity and height were increased by lowering saponification temperature. Too high methyl esterification temperature would easily damage fatty acids, especially the structure of long-chain fatty acids and unsaturated fatty acids. The esterification effect would be worse with longer esterification time at higher esterification temperature. The optimum gas chromatography pretreatments were as follows: saponification, 2 mL 2 mol/L NaOH-methanol, water bath at 70 °C for 10 min; methyl esterification, 2 mL 10% H₂SO₄-methanol, water bath at 70 °C for 15 min. On the chromatogram of GC, the quantity of chromatographic peak was as many as 29, and the peak height was distinctly higher than those with other different pretreatments.

(本文编辑: 康亦兼)