

热带假丝酵母固体发酵代谢物提取方法的比较分析

聂存喜¹ 张文举^{1*} 闫理东¹ 蒋粒薪² 马贵军²

(1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003; 2. 新疆天康畜牧生物技术股份有限公司
生物添加剂分公司, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 本试验比较了几种提取微生物固体发酵代谢物的方法, 旨在筛选出一种尽可能多保留了代谢物的方法。试验采用热带假丝酵母固体发酵棉粕源底物, 以液相色谱串联质谱(LC-MS)为分析平台, 分别采用 50% 冷甲醇溶液(甲醇法)、酸性甲醇-乙腈溶液(酸性甲醇-乙腈法)和 50% 乙腈溶液(乙腈法)提取发酵代谢物。结果表明: 采用酸性甲醇-乙腈法、乙腈法和甲醇法分别提取出 1 831、1 522 和 1 262 种代谢物, 提取效率表现为酸性甲醇-乙腈法 > 甲醇法 > 乙腈法。本试验中 3 种方法相比, 酸性甲醇-乙腈法提取的代谢物种类最多, 提取效率最佳, 是微生物固体发酵代谢物提取的有效方法。

关键词: 热带假丝酵母; 固体发酵; 发酵饲料; 代谢物; 提取方法

中图分类号: S816.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2012)08-1610-05

微生物代谢组学(microbial metabolomics)是对某一时刻微生物生化网络中涉及的所有胞内、胞外有生物活性小分子代谢物进行鉴定和定量分析的一门科学^[1], 在微生物发酵饲料代谢组学分析过程中要尽可能多的保留代谢物, 这就需要一种良好的提取方法。目前, 代谢物的提取溶剂主要有冷甲醇(MeOH)、热甲醇、高氯酸、乙腈(MeCN)、碱等^[2-5], 基于这些溶剂的方法多数是针对细胞内或细胞外代谢物的提取, 对于固体发酵代谢物的提取方法报道较少^[6], 且未见固体发酵饲料的代谢物提取方法的报道。其中酸碱溶剂在提取过程中受到中和过多酸碱产生沉淀的影响而提取效率较低, 有机溶剂提取效果相对较好, 多采用甲醇和乙腈溶液。固体发酵饲料因其底物的复杂性, 以及发酵饲料胞内、胞外均存在影响动物生长、发育的物质, 对其进行代谢组学的研究提取方法是关键。因此, 本文以液相色谱串联质谱(LS-MS)为平台, 比较了 3 种方法提取热带假丝酵母固体发酵代谢物的效果, 以为微生物代谢组学研究方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: Ultimate 3000 HPLC 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司)、3200 Q-TRAP 液质联用仪(美国 Applied Biosystems 公司)、高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司)、隔水式恒温培养箱(上海博迅)、电热恒温水浴锅(上海精宏)、超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

试剂: 甲醇、甲酸和乙腈(均为美国 Fisher Scientific 公司, 色谱纯); 超纯水由纯水机制备。

1.2 提取溶剂

提取溶剂为 50% 冷甲醇溶液(甲醇法)、酸性甲醇-乙腈(AMF)溶液(甲醇:乙腈:水体积比为 2:2:1, 甲酸 0.1 mol/L, 酸性甲醇-乙腈法)和 50% 乙腈溶液(乙腈法)。

1.3 菌株与发酵过程

菌株: 热带假丝酵母 ZD-3, 由浙江大学饲料科学研究所选育和提供。

斜面培养基: 麦芽汁糖度 5 °Bé, 琼脂 2.0%,

收稿日期: 2012-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960258); 石河子大学科技成果转化引导资金专项(kjfyzh2009-cgzh01)

作者简介: 聂存喜(1984—), 男, 山西宁武人, 硕士研究生, 从事饲料资源的开发与利用。E-mail: niecunxi@sina.com

* 通讯作者: 张文举, 教授, 博士生导师, E-mail: zhangwj1022@sina.com

在 0.056 MPa 条件下,112.6 °C 灭菌 20 min。

种子培养液:麦芽汁糖度 5 °Bè,在 0.056 MPa 条件下,112.6 °C 灭菌 20 min。

基础底物:采用棉粕源生物蛋白质底物,由 58% 棉粕、5% 豆粕、9% 玉米蛋白粉、20% 玉米、8% 麦麸和 40% 水组成,112.6 °C 蒸汽灭菌 20 min。

将热带假丝酵母接入斜面培养基,30 °C 培养 72 h,挑取 1 环菌苔接入 5 mL 种子培养液,在试管中 30 °C、150 r/min 摇动培养 24 h(1 级菌种);取 1 mL 1 级菌种接入 20 mL 种子培养液,在 100 mL 三角瓶中 30 °C、150 r/min 摇动培养 20 h(2 级菌种);再取 8 mL 2 级菌种接入 100 g 基础底物中,在 500 mL 三角瓶中 30 °C 恒温静止培养 48 h,每组 3 个重复。发酵结束后,立即液氮冷冻淬灭,−80 °C 保存。发酵原料为同批次,严格控制条件,同批次采用恒化器培养。发酵前后均在无菌条件下混匀,采样时在液氮条件下混匀并快速称取,以尽可能保证所取样品的代表性。

1.4 提取方法

本方法参考 Tokuoka 等^[6]米曲霉固体发酵代谢物提取方法,略有调整。

甲醇法:1) 1 g 样品在液氮条件下研钵磨碎,溶于 10 mL 50% 甲醇溶液(−20 °C),在冰上放置 30 min;2) 离心(−20 °C、10 000 r/min)5 min,去除残留碎片,上清液溶于 10 倍体积的冷水(4 °C)中,用 0.22 μm 针筒式滤器过滤,−80 °C 保存待分析。

酸性甲醇−乙腈法:将甲醇法中的 50% 甲醇溶液用酸性甲醇−乙腈溶液替换,之后的操作同甲醇法步骤 2)。

乙腈法:1 g 样品在液氮条件下研钵磨碎,溶于 10 mL 50% 乙腈溶液(4 °C),立刻进入沸腾程序(5 min,70 °C),煮沸后的操作同甲醇法步骤 2)。

上述样品进样前用相应方法的提取溶剂 20 倍稀释,涡旋混匀,13 200 r/min 离心 2 min,取上清液 150 μL 在液相色谱串联质谱平台上运行。

1.5 液相色谱串联质谱分析条件

色谱条件:采用 AAA C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm),柱温为 30 °C,进样量为 5 μL,流速为 0.75 mL/min,流动相 A 为 0.1% 甲酸,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序:0 ~ 1.0 min,10% 流动相 B;1.0 ~ 5.5 min,30% 流动相 B;5.5 ~ 8.0 min,80% 流动相 B;8.0 ~ 15.0 min,95% 流动

相 B;15.0 ~ 20.0 min,10% 流动相 B。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI);正离子扫描,分子质量扫描范围为 50 ~ 1000 u;气帘气(CUR)速度 20.0 L/min,喷雾电压(IS)为 5 500.00 V,离子化温度为 580 °C,辅助气 1 压力(GS1)为 3.8×10^5 Pa,辅助气 2 压力(GS2)为 4.1×10^5 Pa,碰撞气(CAD)中级(medium),去簇电压(DP)为 50.0 V,射入电压(EP)为 10.0 V。

1.6 数据统计与分析

液相色谱串联质谱分析的数据利用 Analyst 1.4.2 软件转化,将得到的原始数据导入 Marker-view 1.1 软件中进行峰识别和匹配。峰识别和匹配后得到的数据采用 SIMCA-P 11.5 软件进行偏最小二乘法判别(PLS-DA)分析,计算模型变量重要性投影(VIP)值,VIP 值越大的变量对分类的贡献越大,即在不同类间的区别最显著。

代谢物的相对含量采用 SPSS 16.0 统计软件 one-way ANOVA 进程进行方差分析,LSD 法进行多重比较,试验数据以平均值 ± 标准差表示,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

代谢物提取个数、种类的鉴别均以未发酵的底物作对照;差异代谢物的指认采取检索 Metlin、KEGG 数据库结合文献[7–8]描述方法进行。

2 结果与分析

2.1 3 种提取方法提取效果的比较

将提取代谢物数据通过 PLS-DA 分析,3 种提取方法可以得到明显区分(图 1),分布的差异说明不同方法提取的代谢物在种类、数量和浓度均存在差异。将经过同样处理的未发酵底物与发酵底物进行 PLS-DA 分析,计算 VIP 值,VIP 值 > 1.5 的变量数为发酵与未发酵的差异代谢物种数,酸性甲醇−乙腈法、乙腈法和甲醇法分别提取出代谢物 1 831、1 522 和 1 262 种,最大 VIP 值分别为 2.035 1、2.114 1 和 1.726 1(表 1)。

2.2 3 种提取方法提取效率的比较

从上述差异代谢物中选取 9 种共有峰变量,以代谢物的峰面积来比较其相对含量。由表 2 可见,酸性甲醇−乙腈法较乙腈法而言,亚麻酸、阿魏酸、二肽、甜菜醛、三肽、烟酸和半胱氨酸 7 种代谢物相对峰面积增加,说明这些物质的相对含量都有所提高,且二肽、甜菜醛和半胱氨酸相对含量差异达到显著水平($P < 0.05$),硬脂酸相对含量显

著降低 ($P < 0.05$), 磷酸胆碱相对含量有所降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。酸性甲醇-乙腈法较甲醇法而言, 磷酸胆碱相对含量显著降低 ($P < 0.05$), 亚麻酸、二肽、甜菜醛、三肽、烟酸和半胱氨酸 6 种代谢物相对含量都有所提高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。乙腈法与甲醇法相比, 亚麻酸、硬脂酸、三肽和烟酸 4 种代谢物相对含量有所提高, 其中硬脂酸相对含量差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 二肽、甜菜醛和半胱氨酸相对含量均显著降低 ($P < 0.05$)。

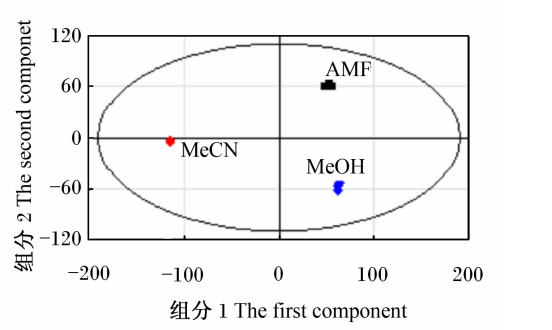


图 1 PLS-DA 分析得分图

Fig. 1 The score plot of PLS-DA analysis

表 1 差异代谢物种数				
Table 1 The kinds of differential metabolites				
项目 Items	酸性甲醇-乙腈法 AMF method	乙腈法 MeCN method	甲醇法 MeOH method	
VIP 值 > 1.5 VIP value > 1.5/种	1 831	1 522	1 262	
VIP 最大值 VIPmax	2.035 1	2.114 1	1.726 1	

表 2 9 种差异代谢物相对含量							
Table 2 Relative contents of the nine kinds of differential metabolites							
项目 Items	峰面积 Peak area			峰面积比 Ratio of peak areas			P 值 P-value
	酸性甲醇-乙腈法 AMF method	乙腈法 MeCN method	甲醇法 MeOH method	酸性甲醇-乙腈法/乙腈法 AMF method/MeCN method	酸性甲醇-乙腈法/甲醇法 AMF method/MeOH method	乙腈法/甲醇法 MeCN method/MeOH method	
亚麻酸 Linolenic acid	6.57 ± 0.15	6.61 ± 0.04	6.51 ± 0.12	1.05	1.14	1.08	0.561
硬脂酸 Stearic acid	5.66 ± 0.05 ^b	6.61 ± 0.15 ^a	5.97 ± 0.27 ^{bc}	0.11	0.43	4.01	0.002
阿魏酸 Ferulic acid	6.31 ± 0.30	6.03 ± 0.41	6.34 ± 0.32	1.63	0.91	0.56	0.524
二肽 Dipeptide	6.67 ± 0.07 ^a	6.33 ± 0.17 ^c	6.56 ± 0.04 ^{ab}	2.10	1.31	0.62	0.023
磷酸胆碱 Phosphocholine	5.92 ± 0.06 ^b	6.03 ± 0.17 ^{ab}	6.25 ± 0.12 ^a	0.74	0.46	0.61	0.045
甜菜醛 Betaine aldehyde	6.53 ± 0.06 ^a	6.03 ± 0.17 ^c	6.50 ± 0.15 ^{ab}	3.43	1.03	0.30	0.001
三肽 Tripeptide	6.22 ± 0.18	6.14 ± 0.24	6.08 ± 0.08	1.17	1.46	1.25	0.643
烟酸 Niacin	7.18 ± 0.18	7.08 ± 0.18	7.04 ± 0.15	1.29	1.42	1.11	0.584
半胱氨酸 Cysteine	7.82 ± 0.08 ^a	6.71 ± 0.19 ^c	7.74 ± 0.24 ^{ab}	12.33	1.05	0.09	0.001

峰面积为实际面积数值以 10 为底的对数值 (lg); 峰面积比 > 1 表示代谢物相对含量提高, < 1 表示降低。同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无字母肩标差异不显著 ($P > 0.05$)。

Peak area is logarithm (base 10) of value of actual area (lg); ratio of peak areas > 1 means that the relative content of metabolites is improved, while < 1 means that it is reduced. In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

3 讨论

在代谢物提取中, 淬灭过程要防止胞内代谢物的泄露^[9], 淬灭可采取不同的方法^[10-11], 然而就本试验来讲, 提取的代谢物既有胞内的也有胞

外的, 选择的是液氮冷冻淬灭法。在代谢物提取方法选择上, 目前也没有标准的代谢物提取方法, Maharjan 等^[2]研究了酸、碱、冷甲醇、热甲醇、热乙醇和甲醇-氯仿 6 种提取方法对大肠杆菌 (*E. coli*) 代谢物谱的影响, 结果表明冷甲醇方法

得到了更多的代谢物。Rabinowitz 等^[4]研究发现甲醇-乙腈溶液能使三磷酸盐的降解达最小,减少高能代谢物的丢失及其向低能衍生物的转化,从而提高代谢物的提取量,指出了甲醇-乙腈溶液是提取代谢物的首选。Tokuoka 等^[6]对米曲霉固体发酵的 11 种提取方法进行了比较,结果表明 50% 乙腈溶液在 70 ℃ 水浴 5 min,淬灭和提取效果最佳。用酸和碱提取得到的产物中能检测到很少的峰且产率很低,主要是因为分析前需要中和酸碱,稀释影响了代谢物的浓度,且产生的沉淀很难移除,增加了样品中的盐浓度,用热乙醇提取时部分丙酮酸、核酸和磷酸糖类遭到破坏^[2,12],鉴于以上,本文选择了酸性甲醇-乙腈溶液、50% 冷甲醇溶液、50% 乙腈溶液 3 种溶剂。

代谢组学的兴起为其研究提供了强有力的工具,然而一种好的提取方法是研究的基础,提取方法要求尽可能多的提取出代谢物。发酵饲料的提取物中包括发酵底物中的物质和酵母在发酵过程中的代谢物,尽管在发酵底物选择了相同批次和产地的原料,发酵条件也进行了严格的控制,但是发酵底物的复杂性也会影响到发酵后产物的提取。研究表明,微生物发酵蛋白饲料具有提高动物的消化率、促进动物生长等作用^[13],其中发酵过程中产生的氨基酸、脂肪酸、维生素、芳香类物质等代谢物是其主要作用因子,这些小分子物质也正是研究者们所关注的焦点,它们在动物的生长、发育等过程中发挥着重要作用,如:亚麻酸是动物必需脂肪酸,阿魏酸是一种芳香物质,也可作为食品添加剂;微生物分解蛋白质产生的小分子二肽和三肽,比单一的氨基酸更易吸收,可促进氨基酸的吸收、蛋白质合成与沉积、矿物元素的吸收与利用,还具有免疫、抗氧化等生物活性;甜菜醛则是合成甜菜碱的前体物质,甜菜碱作为甲基供体参与动物体内甲基代谢;磷酸胆碱是合成磷脂酰胆碱必需的物质,烟酸也是动物代谢过程所必需的维生素。为此,本试验以相同条件处理的未发酵底物为对照,以差异代谢物的个数作为提取效果的初步评价指标。

PLS-DA 分析可找到引起 2 组间差异的主要代谢物的保留时间和质荷比(m/z),由于变量较多,图较复杂,所以选择 VIP 值 > 1.5 代表的保留时间和 m/z 对应的变量作为提取的代谢物,这些代谢物主要为酵母代谢物(包括胞内和胞外代谢

物)。不同提取方法提取代谢物的种数表现为酸性甲醇-乙腈法 $>$ 乙腈法 $>$ 甲醇法。此外,VIP 值的大小表示在这些差异代谢物中贡献的大小,值越大说明区别越明显,VIP 值表现为乙腈法 $>$ 酸性甲醇-乙腈法 $>$ 甲醇法。酸性甲醇-乙腈法比乙腈法提取代谢物种数,但 VIP 值却差异不大。酸性甲醇-乙腈法提取代谢物种数和 VIP 值都优于甲醇法。就提取效率而言,酸性甲醇-乙腈法提取的代谢物相对含量高于另外 2 种方法。造成各种方法提取的效果的差异可能主要是提取溶剂的极性和温度,本试验中酸性甲醇-乙腈溶液和 50% 甲醇溶液均为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,而 50% 乙腈为 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$,且在提取过程中进行了水浴加热,具体的原因有待进一步研究。

本试验中有机溶剂提取能够检测到更多数量的峰,用甲醇和乙醇的提取效率也很高,与在酵母^[14]和大肠杆菌^[2]代谢物提取研究得到结果一致。本试验结果表明,采取酸性甲醇-乙腈法提取效率较高,优于甲醇法和乙腈法。代谢物的溶解性和它们的极性相关,更多的极性溶剂将会溶解更多的极性化合物。由于不同微生物在不同的生长条件下代谢物的差异较大,一种好的提取方法也都是相对而言的,标准的提取方法很难建立,因而针对实际研究需要采用不同的提取方法。

4 结 论

本试验条件下 3 种方法相比,酸性甲醇-乙腈法提取的代谢物种类最多,提取效率最佳,是微生物固体发酵代谢物提取的有效方法。

参考文献:

- [1] OLDIGES M, LÜTZ S, PFLUG S, et al. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 495-511.
- [2] MAHARJAN R P, FERENCI T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 313(1): 145-154.
- [3] 梅辉,戴军,刘文卫,等.高效液相色谱-串联质谱法分析大肠杆菌代谢组中样品提取方法的比较[J]. 分析化学, 2011, 39(4): 534-539.
- [4] RABINOWITZ J D, KIMBALL E. Acidic acetonitrile

- for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(16): 6167 – 6173.
- [5] WINDER C L, DUNN W B, SCHULER S. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures; an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(8): 2939 – 2948.
- [6] TOKUOKA M, SAWAMURA N, KOBAYASHI K, et al. Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae* [J]. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2010, 110(6): 665 – 669.
- [7] HØJER-PEDERSEN J, SMEDSGAARD J, NIELSEN J. The yeast metabolome addressed by electrospray ionization mass spectrometry; initiation of a mass spectral library and its applications for metabolic footprinting by direct infusion mass spectrometry [J]. *Metabolomics*, 2008, 4(4): 393 – 405.
- [8] BIJLSMA S, BOBELDIJK I, VERHEIJ E R, et al. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(2): 567 – 574.
- [9] CANELAS A B, RAS C, PIERICK A T, et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics [J]. *Metabolomics*, 2008, 4(3): 226 – 239.
- [10] HILLER J, FRANCO-LARA E, PAPAIOANNOU V, et al. Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(8): 1161 – 1167.
- [11] SPURA J, REIMER L C, WIELOCH P, et al. A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast [J]. *Analytical biochemistry*, 2009, 394(2): 192 – 201.
- [12] VILLAS-BOAS S G, HOJER-PEDERSEN J, AKESON M, et al. Global metabolite analysis of yeast; evaluation of sample preparation methods [J]. *Yeast*, 2005, 22: 1155 – 1169.
- [13] 余冰, 傅娅梅, 叶楠等. 固态发酵对复合蛋白质饲料营养价值改善效果的研究 [J]. *动物营养学报*, 2009, 21(4): 546 – 553.

A Comparison of Extraction Methods for Metabolites in Solid Fermentation with *Candida tropicalis*

NIE Cunxi¹ ZHANG Wenju^{1*} YAN Lidong¹ JIANG Lixin² MA Guijun²

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Brand of Bio-Additive, Xinjiang Tecon Animal Science Bio-Technology Co., Ltd., Urumqi 830011, China)

Abstract: In order to find a good extraction method that can keep metabolites as many as possible, several extraction methods for solid fermentation metabolites were compared in this study. Substrates with cottonseed meal were fermented by *Candida tropicalis*, and the analysis of metabolites was carried out using the liquid chromatographic-mass spectrometry (LC-MS) platform. Three different extraction solutions, including 50% cold methanol solution (MeOH method), acidic methanol-acetonitrile solution (AMF method) and 50% acetonitrile solution (MeCN method), were used. The results showed that the number kinds of metabolites extracted by methods of AMF, MeCN and MeOH were 1 831, 1 522 and 1 262, respectively; extraction efficiency was shown as AMF method > MeOH method > MeCN method. Among the three methods in this experiment, AMF method is an effective method for metabolites extraction in solid fermentation, and acts better on both kinds of metabolites and extraction efficiency. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(8): 1610-1614]

Key words: *Candida tropicalis*; solid fermentation; fermented feed; metabolites; extraction methods