

专论与综述

真菌生物量指示剂麦角固醇的分离及测定方法*

习兴梅 曾光明** 郁红艳 李建兵 黄国和

(湖南大学环境科学与工程学院 长沙 410082)

摘要: 麦角固醇作为真菌细胞膜的重要组成成分, 结构稳定, 可作为真菌生长的指示物质。综述了表征真菌生物量的麦角固醇的分离及测定方法, 其中麦角固醇的萃取方法有传统的皂化回流法、快速物理萃取、超声波萃取、超临界流体萃取等, 测定方法有高效液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法、薄层色谱法等。并对这些方法的应用及在堆肥过程中运用麦角固醇估计真菌生物量的可行性进行了展望。

关键词: 真菌, 生物量, 麦角固醇, 堆肥

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0128-05

The Techniques of Isolation and Determination of Ergosterol as the Indicator of Fungal Biomass*

XI Xing-Mei ZENG Guang-Ming** YU Hong-Yan LI Jian-Bing HUANG Guo-He

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: Ergosterol is the important component of the fungal membrane, and having stable structure. This makes it a suitable indicator for growth of fungi. In the paper, isolation and determination techniques of ergosterol as the indicator of the fungal biomass were reviewed. The methods of extracting ergosterol include traditional saponification and refluxing, rapid physical disruption, rapid ultrasonication, supercritical fluid extraction and so on. The ergosterol determination methods are high performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry, and thin-layer chromatography, et al. The application of these techniques was also introduced. Finally, the paper prospected the feasibility of applying the ergosterol as the indicator of fungal biomass in composting.

Key words: Fungi, Biomass, Ergosterol, Compost

1 麦角固醇与真菌生物量

生物量是表征微生物生长状况的一项基本参数, 微生物数量的变化表现为生物量

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2004AA649370)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2004AA649370)

国家重点基础研究 973 发展计划项目 (No. 2005CB724203)

国家杰出青年科学基金 (No. 50225926、50425927)

Chinese National Science Fund for Outstanding Youths (No. 50225926, 50425927)

2000 年教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目

高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20020532017)

** 通讯作者 Tel: 0731-8822754, E-mail: zgming@hnu.cn

收稿日期: 2005-08-01, 修回日期: 2005-09-05

的变化。在固态发酵过程中,由于微生物不易从底物中分离,尤其是真菌菌丝深入培养基内部,紧密缠绕,更不易分离测定。但任何生物体都有其特定的化学组成,如果生物体某特定组分含量始终不变或各生长阶段的变化已知,选择该成分作为生物量的特定指标,通过测定该化学(生物化学)成分的含量,就可以推测细胞生物量,而麦角固醇就为这一方法提供了可能^[1,2]。

1.1 麦角固醇与真菌生物量之间的关系^[3-5] 麦角固醇的化学名称为 24 β -甲基胆固醇-5,7 烯-3 β -羟基,又名麦角甾醇,不溶于水,易溶于甲醇、乙醇、石油醚、庚烷等有机溶剂。

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成成分,大多以自由态存在于真菌细胞膜的磷脂双分子层中,少量酯化于脂肪酸中。在真菌的生长过程中,它在确保膜结构的完整性、与膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力以及物质运输方面起着重要作用。用麦角固醇来表征真菌的生物量,与其他方法相比,由于麦角固醇性质相对稳定、不受外界环境变化的影响,能够采用很多方法测定出来,因此近年来被广泛应用。据报道麦角固醇的含量通常约为 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (生物量干重);且已证明底物的组成(脱脂含量)对生物中麦角固醇的含量有较大影响,而菌体寿命和生长温度对其影响较小。

West 等^[6]将土壤麦角固醇的浓度与真菌菌丝体积和表面积联系起来,并且得出麦角固醇与真菌表面积之间的关系,在真菌生长的土壤中麦角固醇的浓度为 0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 真菌表面积。

1.2 采用麦角固醇测定真菌生物量的特点 定量真菌生物量的方法很多,但是这些方法都存在或多或少的误差,比如广泛使用的显微镜计数法,这个方法就受观测者主观因素的影响较大,而且主观上很难确定一个标准,对生物量的计数就很不准确^[7]。而麦角固醇是存在于微生物生物膜中的一种固醇类化合物,而且专一性很强,用它来表征生物量就可以克服人为计数生物数量的主观性和变化性,且比其他表征生物量的物质,如角质素、氨基葡萄糖等更具有代表性。该方法最早被用于监视谷物发霉状况。国外很多研究证明,通过测定麦角固醇来估计真菌的生物量是很有效的方法,且麦角固醇的测定便捷,可以通过仪器分离、定量,这为低菌体含量提供了一个更灵敏的方法。

虽然麦角固醇表征真菌生物量被认为是目前最为可行可靠的方法,近年来有研究发现了其不足,Zhao 等^[8]人通过研究发现,在真菌生物量迅速衰亡的过程中,生物碳似乎比内在的麦角固醇分解的速度快一些,利用麦角固醇测定估计生物量需注意这一点,可能在测定的过程中,所测的真菌生物量比实际活生物量的值稍大,但这个方法的误差与平板计数估计生物量等方法的误差相比却小了很多。

2 麦角固醇的萃取与测定方法

麦角固醇的测定总体可分为两个步骤,一是对样品中麦角固醇进行萃取;二是对萃取所得的麦角固醇借助仪器进行分析。

Seitz 等^[9]人于 1977 年最先提出对麦角固醇的分析方法,包括 4 个主要的步骤:(1)最初的萃取;(2)皂化;(3)破碎与气化干燥;(4)测定。

2.1 样品中麦角固醇的萃取方法

2.1.1 传统的萃取方法^[10]: 萃取土壤中麦角固醇的常用方法是:取一定量的土壤样品,加入一定体积的甲醇-乙醇混合液和一定量的 KOH,置于水浴中加热回流 90min,

得到的产物用甲醇冲洗,再加入水清洗,然后用己烷破碎后萃取,萃取相蒸馏后通入氮气干燥,再将所得物质重新溶解于正己烷-异丙酮混合液中,待仪器分析。由于该方法分析麦角固醇需要耗费大量的时间,从而使得这一分析方法的应用受到了限制。

2.1.2 改进的萃取方法:一些科研工作者为了提高萃取效率、简化操作过程、节省时间,对传统的萃取方法进行了修正。如:采用减少土壤样品的颗粒度、增加样品与溶剂的比例或加入氢氧化钾等措施,甚至有些人还提出可以省略皂化,将萃取和破碎合为一步。

下面对麦角固醇的改进的萃取方法做简单的介绍:

(1) 快速物理萃取^[11]:前人的研究证明物理破碎是一种有效的溶解土壤中微生物细胞的方法,采用该方法萃取麦角固醇的过程就是:取一定量的土壤样品,加入一些玻璃珠(起球磨作用),再加入一定量的甲醇,高速振荡,旋流,再静置沉淀,取上层液离心,用滤膜将离心后所得上层液过滤,待分析。Ping gong 等人的研究证明,采用快速物理萃取方法使得短时间内同时测定很多的样品成为可能。

(2) 超声波萃取^[12]:操作过程为:称量一定量的土壤样品,加入一定量的甲醇-乙醇混合液,一定温度下避光静置 2h,再加入按照一定比例配制的正己烷-异丙醇混和液,在“冰浴”条件下采用超声波在一定的强度下破碎,静置沉淀,离心,取上层液测定即可。

采用超声波萃取麦角固醇的实验证明,在超声波环境下土壤样品在乙醇萃取剂中能够得到较理想的分散,超声波破坏物质聚集,能将麦角固醇从真菌菌丝中较好地释放出来。且该萃取方法的效率很高,是传统萃取方法的五倍。

(3) 加酶提取^[13]:称取一定量的样品,加入蒸馏水,再分别加入纤维素酶、果胶酶、中性蛋白酶贮备液,控制一定的浓度,置于水浴中恒温酶解,升温灭酶,冷却后加入醇碱溶液,待测。

(4) 其他:除上述方法以外,麦角固醇的萃取方法还有超临界流体萃取^[14]、微波辅助萃取^[15]等方法。

2.2 麦角固醇的检测方法 麦角固醇被广泛地用于环境样品菌种生物量的测定,主要是采用高压液相色谱法,其次由于麦角固醇具有高度的感光性和特殊性,可以采用气相色谱-质谱、液相色谱-质谱法等测定其含量。

2.2.1 高效液相色谱法 (HPLC)^[3-5,16,17]:高效液相色谱是 20 世纪 60 年代末发展起来的一种新型微量分离分析技术,具有快速、高效、灵敏等诸多优点,且对样品的回收比较容易,而且是定量的。

采用高效液相色谱对麦角固醇进行测定,需要将待测样品中的麦角固醇萃取出来,选取一个合适的色谱柱,流动相为甲醇-水,采用一定的流速,检测波长一般为 282nm,且采用外标法按峰面积进行定量。

另外选取一定量的麦角固醇纯品,用乙醇溶解配制一系列浓度的麦角固醇,在已经建立色谱条件下出谱,以峰面积均值为纵坐标,样品浓度为横坐标,作标准曲线,然后对萃取后的样品进行 HPLC 分析,计算峰面积与标准曲线比较,得出所测麦角固醇的浓度。

2.2.2 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)^[18,19]:通常采用气相色谱—质谱法测定有机土壤中的麦角固醇,要求样品在分析之前进行预处理,包括一系列复杂过程:样品的水

解、水解后洗涤纯化和萃取。

测定需要的条件是:气相色谱-质谱联用仪、毛细管色谱柱、载气等,加入内标,采用一定的分流比、柱温、离子源轰击电压、进样温度、离子源温度,将萃取后得到的麦角固醇由气相色谱仪分离,由气体载体将分离物质送至气相色谱-质谱之间的接口,接口除去载气,并将待测物质离子化,送入质谱仪进行检测。定量采用(SIM法)标准与内标峰面积比值对标准液浓度作标准曲线。

采用气相色谱-质谱方法定性参数增加,定性可靠,灵敏度较高,能够克服由于复杂混合物不同分子种类的不完全溶解所引起的缺点。

2.2.3 其它:麦角固醇的测定还有大气压化学电离与质谱联用法(ACPI-MS-MS)^[20]、质谱法^[21]、液相色谱法^[22]、薄层色谱法(TLC)^[16]等。

由于麦角固醇对光、热和氧较不稳定,应避光、冷藏。在萃取样品和测定的过程中都需要注意避光,并且尽快测定。

3 应用与展望

麦角固醇是绝大部分存在于真菌细胞膜中的物质,可以用其有效地表征生物量。研究建立简便、准确、可靠的真菌麦角固醇的测定方法,对于研究真菌具有十分重要的意义。

近年来,关于麦角固醇测定方法及应用有系列报道。在测定单一菌种方面,国内的谢和金、卢毅等采用高效液相色谱法测定酵母中的麦角固醇^[17];孙佰申、周立平等采用高效液相色谱法测定红曲霉发酵样品中的麦角固醇^[23],证明高效液相色谱测定菌类麦角固醇迅速,准确。国外, Montgomery 等^[5]采用超声波萃取-HPLC 测定麦角固醇来估计土壤中的真菌生物量,取得了较好的效果。

堆肥是利用自然界广泛分布的细菌、放线菌、真菌等微生物,有控制地促进可降解有机物向稳定的腐殖质转化的微生物学过程。堆肥过程中微生物种类复杂,要单独研究真菌类的作用和量化真菌数量都是比较困难的。由于麦角固醇是存在于真菌细胞膜中占主导的物质且结构稳定,且堆肥系统与土壤系统有相似性,鉴于此,我们可以将这一方法引入堆肥过程,通过测定堆肥中真菌麦角固醇的含量,找到麦角固醇与真菌生物量之间的线性关系,进而可以得知真菌的数量,以此定量堆肥中真菌生物量。如 Morten 等^[24]利用麦角固醇结合磷脂酸 18:2 ω 6, 9 估计堆肥过程中的生物量,效果明显,为研究堆肥中真菌生物量提供了一个可行的方法。

参考文献

- [1] 路秀玲, 赵树欣. 天津轻工业学院学报, 2000, 4: 57~62.
- [2] 韩北忠, 王家槐. 中国酿造, 2001, 3: 6~10.
- [3] 何秀萍, 张博润. 微生物学通报, 1998, 25 (3): 166~169.
- [4] Cecilia M L, Eddie V W, Lars J T. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59: 253~262.
- [5] Montgomery H J, Monreal C M, Young J C, et al. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32: 1207~1217.
- [6] West A W, Grant W D, Sparling G P, et al. Soil Biology & Biochemistry, 1987, 19: 607~612.
- [7] Peter D S, Timothy B P, Neal S E. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27 (8): 1091~1097.
- [8] Zhao X R, Lin Q, Brookes P C. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37: 311~317.
- [9] Seitz L M, Mohr H E, Burroughs R, et al. Cereal Chemistry, 1977, 54: 1207~1217.
- [10] Benthall H, Harris J A, Birch P, et al. Journal of Applied Ecology, 1992, 29: 711~718.

- [11] Ping G, Xin G, Ernst W. *Applied Soil Ecology*, 2001, **17**: 285 ~ 289.
- [12] Ruzicka S, Norman M D P, Harris J A. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, **27** (9): 1215 ~ 1217.
- [13] 李惠珍, 许旭萍, 谢华玲. *中国食用菌*, 1998, **17** (4): 37 ~ 39.
- [14] Young J C, Games D E. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1995, **41**: 577 ~ 581.
- [15] Young J C. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1993, **43**: 2904 ~ 2910.
- [16] Thomas L, Jorgen A, Helle W R. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1026**: 301 ~ 304.
- [17] 谢和金, 卢毅, 邱永梅, 等. *生物工程进展*, 2000, **20** (4): 75 ~ 76.
- [18] Bengt O A, Anita S, Lennart L. *Journal of Chromatography B*, 1995, **666**: 77 ~ 84.
- [19] Kristian F N, Jorgen O M. *Journal of Chromatography A*, 2000, **898**: 227 ~ 234.
- [20] Toh T H, Prior B A, Merwe M J. *Analytical Biochemistry*, 2001, **288**: 44 ~ 51.
- [21] John V H, Kerry M P, Brij V, *et al.* *Journal of Chromatography A*, 2002, **958**: 149 ~ 156.
- [22] Abramson D, Smith D M. *Journal of Stored Products Research*, 2003, **39**: 185 ~ 191.
- [23] 孙佰申, 周立平, 陈旭峰, 等. *中国食品添加剂*, 2004, **2**: 89 ~ 92.
- [24] Morten K, Erland B. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, **36**: 57 ~ 65.