

瘤胃厌氧真菌代谢产物的检测方法

Measurement of the metabolites of rumen anaerobic fungi

李与琦, 成艳芬*, 朱伟云

消化道微生物研究室, 南京农业大学, 南京, 江苏

*通讯作者邮箱: yanfencheng@njau.edu.cn

摘要: 厌氧真菌降解粗饲料所产生的各类代谢产物是维持反刍动物正常生命活动的重要物质, 准确快速地测定瘤胃厌氧真菌发酵过程中产生的代谢产物不仅可以评定饲料的营养价值, 还能评估厌氧真菌参与饲料利用的降解能力。本文介绍了快速测定厌氧真菌主要发酵代谢产物的方法。其中利用气相色谱法测定氢气、二氧化碳和乙醇浓度, 利用高效液相色谱法测定甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸浓度。

关键词: 瘤胃发酵, 厌氧真菌, 气相色谱, 高效液相色谱

材料与试剂

1. 氢气和二氧化碳测定中需要的材料与试剂

1.1 60 mL 注射器 (龙康鑫医疗器械有限公司)

1.2 20 mL 气袋 (德霖气体包装有限公司)

1.3 5 mL 进样针 (安捷伦科技有限公司)

2. 乙醇测定中需要的材料与试剂

2.1 10 μ L 自动进样针 (安捷伦科技有限公司)

2.2 2 mL 顶空进样瓶 (爱吉仁科技股份有限公司)

2.3 1.5 mL 离心管

3. 甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸测定中需要的材料与试剂

3.1 1.5 mL 离心管

3.2 色谱纯 C_2H_3N (分子量: 41.06)

3.3 分析纯 H_3PO_4 (分子量: 98)

3.4 分析纯 KH_2PO_4 (分子量: 136.09)

3.5 标品：甲酸（阿拉丁生化科技股份有限公司）、乳酸（源叶生物科技有限公司）、乙酸（源叶生物科技有限公司）、琥珀酸（索莱宝科技有限公司）、柠檬酸（源叶生物科技有限公司）

仪器设备

1. 高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司，1220 Infinity LC）
2. 气相色谱仪（安捷伦科技有限公司，7890B）
3. 二元泵或四元泵（安捷伦科技有限公司，1260 Infinity II）
4. UV-DAD 检测器（安捷伦科技有限公司，1290 Infinity II）
5. 色谱柱（安捷伦科技有限公司，ZORBAX SB-Aq 80A: 4.6×150 mm, 5 μm）
6. 氮气气瓶（南京特种气体股份有限公司）
7. 混合空气气瓶（南京特种气体股份有限公司）
8. 氢气气瓶（南京特种气体股份有限公司）
9. 微量高速冷冻离心机（赛默飞世尔科技公司，Sorvall Legend Micro 21R）

实验步骤

一、样品前处理

1. 用于测定乙醇的样品前处理
瘤胃体外发酵结束后，从血清瓶内取出 1 mL 发酵上清液，加入 0.2 mL 的偏磷酸巴豆酸混合溶液，-20 °C 冰箱保存过夜，解冻后在 4 °C 条件下 15984 g 离心 5 min，取上清液保存，测定前再 15984 g 离心 5 min，待测。
2. 用于测定甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸的样品前处理
瘤胃体外发酵结束后，从血清瓶内取出 0.6 mL 发酵上清液，加入 25% 偏磷酸 120 μL，-20 °C 冰箱过夜，解冻后，4 °C 条件下 15984 g 离心 15 min，吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中，再 15984 g 离心 15 min，取上清液过 0.22 μm 水相滤膜，待测。

二、氢气与二氧化碳的测定

1. 依次打开与气相色谱连接的氮气与混合空气气瓶，打开气相色谱开关。
2. 打开电脑，选择气相色谱联机程序。
3. 选择“氢气二氧化碳程序”，具体参数设置见下表。

58

表 1. 检测氢气二氧化碳浓度的参数设置

进样口	加热器: 250 °C
	压力: 10 psi
	总流量: 15 mL/min
	隔垫吹扫流量: 3 mL/min
	分流比: 5:1
	分流流量: 10 mL/min
色谱柱	Aglient porapak Q G3591-80135:1
柱箱	柱箱温度: 80 °C
	平衡时间: 0.5 min
	最高柱箱温度: 250 °C
	运行时间: 7.5 min
TCD 检测器	加热器: 200 °C
	参比流量: 45 mL/min
出峰时间	氢气: 2 min
	二氧化碳: 2.5 min

59

60 4. 等待程序就绪后测定样品, 用进样针抽取瘤胃体外发酵过程中从血清瓶顶部收集到
61 气袋中的气体 (1 mL), 将气体打入进样口, 与此同时按下气相色谱上的开始按键。

62 5. 单个程序运行结束, 在脱机程序中查看检测报告。

63 6. 依次进样测定直到全部样品测定结束, 测定结束后点击关机程序, 直到关机程序就
64 绪, 关闭气相色谱。

65 7. 依次关闭与气相色谱连接的混合空气与氮气气瓶。关闭联机与脱机程序, 关闭电脑。

66 8. 结果计算

67 8.1 在脱机程序中查看检测报告结果

68 表 2. 检测报告结果

#	时间	峰面积	峰高	峰宽	对称因子	峰面积 (%)
1	2.009	3446.9	895.7	0.0589	1.662	40.652

2	2.272	175.7	159.6	0.0168	0.97	2.072
3	2.518	858.3	91.8	0.1601	0.289	10.122
4	5.931	3998.3	378.1	0.1634	0.654	47.154

8.2 根据检测报告结果（峰面积）计算氢气与二氧化碳的产量

氢气百分比计算公式： $y_1 = (0.003 \times \text{峰面积} - 2.1518) / 100$

氢气产量计算公式： $y_2 = y_1 \times \text{瘤胃体外发酵过程中的产气量}$

根据氢气峰面积（3446.9）与产气量（90 mL）可知，氢气的产量为 7.37 mL。

二氧化碳百分比计算公式： $y_1 = (0.1641 \times \text{峰面积} - 53.387) / 100$

二氧化碳产量计算公式： $y_2 = y_1 \times \text{瘤胃体外发酵过程中的产气量}$

根据二氧化碳峰面积（858.3）与产气量（90 mL）可知，二氧化碳的产量为 78.71 mL。

三、乙醇的测定

- 依次打开与气相色谱连接的氮气、混合空气和氢气气瓶，打开气相色谱开关。
- 打开电脑，选择气相色谱联机程序。
- 选择“乙醇测定程序”，具体参数设置见下表。

表 3. 检测乙醇浓度的参数设置

进样口	加热器：220 °C
	压力：18.222 psi
	总流量：89.05 mL/min
	隔垫吹扫流量：3 mL/min
	分流比：15:1
	分流流量：30 mL/min
色谱柱	Aglient porapak Q G3591-80135:1
柱箱	柱箱温度：40 °C
	平衡时间：0.5 min
	最高柱箱温度：250 °C
	运行时间：21 min
TCD 检测器	加热器：230 °C
	氢气燃气流量：30 mL/min

	空气流量: 300 mL/min
出峰时间	3.7 min

4. 等待程序就绪后测定样品。
5. 单个程序运行结束，在脱机程序中查看检测报告。
6. 依次进样测定直到全部样品测定结束，测定结束后点击关机程序，直到关机程序就绪，关闭气相色谱。
7. 依次关闭与气相色谱连接的混合空气、氮气和氢气气瓶。
8. 关闭联机与脱机程序，关闭电脑。
9. 结果计算

9.1 在脱机程序中查看检测报告结果

表 4. 检测报告结果

#	时间	峰面积	峰高	峰宽	对称因子	峰面积 (%)
1	3.645	97.5	12.7	0.1082	0.291	5.000

9.2 根据检测报告结果（峰面积）计算乙醇的浓度

乙醇计算公式: $y = 15.489x + 9.104$ ，其中峰面积为纵坐标，进样浓度为横坐标。

根据公式与乙醇峰面积（97.5）可知，乙醇的浓度为 6.3 mmol/L。

四、甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸的测定

1. 高效液相色谱仪开机

1.1 首先将相应的流动相装入相应的瓶子中，开启液相各个部分电源按钮，注意从上向下依次开启电源，切勿开错顺序，电源打开后，液相开始自检并发出提示音。

1.2 电源开启后，开启电脑，首先打开液相连接软件。

1.3 液相开机后，首先进行 A、B、C、D 四个通道中气泡的排放。将机器上的排气阀打开（逆时针旋转 360°），将流速调整至 1 mL/min，B、C、D 通道比例调至 0%，A 通道为 100%，点击“purge”，开始排气泡，时间为 5 min，结束后，将 B 通道调至 100%，随后排气泡，依次进行 C 和 D 通道气泡的排放。结束后，将排气阀旋紧。

1.4 平衡基线，设置相应的流速以及流动相比比例，打开柱温箱，设置相应的柱温（25 °C）。点击打开“motor”，平衡 30 min，期间可依次清洗进样针，缓冲环等。

1.5 平衡结束后，打开紫外灯，打开基线检测（monitor baseline），基线平稳后（约 15 min），可进行后续操作。

2. 液相方法的建立

2.1 建立仪器方法（Instrument Method），详细参数设置见下表^[1]。

表 5. 建立仪器方法（Instrument Method）

Run Time	20 min
Detectors	FID 和 UV
Solvents	%A:磷酸二氢钾
	%B:甲醇
	%C:乙腈
	%D:10%甲醇
General Settings	Draw Speed: 2.000 µl/s
	Draw Delay: 2.000 s
	Dispense Speed: 10.000 µl/s
	Dispense Delay: 2.000 s
	Dispense to waste speed: 30.000 µl/s
	Sample Height: 2.000 mm
	Wash Volume: 100.000 µl
	Wash Speed: 20.000 µl/s
Column Temperature	25 °C

2.2 建立处理方法（Processing Method），选择基本定量（Basic Quantitative）即可。

2.3 建立结果报告（Report Template），选择“Default”模板即可。

2.4 建立序列表（Sequence），详细参数设置见下表。

表 6. 建立序列表（Sequence）

Pattern for Injection Name	Organic acids#n
----------------------------	-----------------

Number of Vitals	87
Injections per Vial	1
Start Position	RA1
Injection Volume	20.000

3. 样品测定

首先修改测定的样品名称，先测标准品，再测样品。标品需要在“Type”中将稀释不同梯度的标准品设置为校正标准品，并设置标品梯度等级，最低浓度等级为 1，按照浓度依次升高，样品无需修改。设置完成后即可开始运行测定。各有机酸具体的保留时间见下表。

表 7. 有机酸的保留时间

有机酸	保留时间
甲酸	6.96 min
乳酸	10.62 min
乙酸	11.56 min
柠檬酸	20.54 min
琥珀酸	26.14 min

4. 液相关机

测定结束后，首先停止泵（点击 **motor** 至 **off**），关闭柱温箱加热器，将 A 通道的磷酸盐溶液换成超纯水，比例调至 100%，然后开启泵，冲洗 40 min，随后将 A 通道调至 0%，将 B 通道（乙腈）调至 100%，冲洗 30 min，结束后关闭紫外灯，10 min 后，停泵，关闭仪器电源（从下向上依次关闭）。

5. 结果计算(以甲酸为例)

5.1 绘制甲酸标准曲线

表 8. 甲酸各标准品的浓度与峰面积

浓度	保留时间	峰面积
1 g/L	6.9660	7.56
2 g/L	6.9660	17.79

2.5 g/L	6.9660	21.32
3.3 g/L	6.9660	31.16
5 g/L	6.9660	50.27
10 g/L	6.9660	101.29
20 g/L	6.9660	210.24

以峰面积为纵坐标，进样浓度为横坐标，进行线性回归，绘制标准曲线：

$$y = 10.688x - 4.1203 \quad (R^2 = 0.9998)。$$

5.2 根据峰面积和标准曲线计算样品浓度

表 9. 甲酸样品检测报告

Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %
甲酸	6.9660	34.26	357.444	11.30	14.87

由标准曲线和峰面积可知，甲酸浓度为 3.59 g/L。

溶液配方

- 配置 1 L 的 20 mM KH_2PO_4 盐溶液：称取 2.7218 g KH_2PO_4 于 1 L 烧杯中，加入 800 mL 超纯水溶解后，用 20 mM H_3PO_4 调整 pH 值为 2.4，定容至 1 L 的容量瓶。
- 流动相：

A: 20 mM KH_2PO_4 盐溶液，C: 乙腈

A: C=1: 99 (v/v)
- 25% 偏磷酸：称取 25 g 的偏磷酸，溶于超纯水，定容至 100 mL 容量瓶。
- 巴豆酸溶液：在 100 mL 的偏磷酸溶液中加入 0.6464 g 的巴豆酸，定容到 100 mL。
- 标品的配置：分别称取甲酸 20 mg，乳酸 20 mg，乙酸 20 mg，琥珀酸 20 mg，柠檬酸 20 mg，加 1 mL 双蒸水溶解，作为标准原液，将标准原液稀释 2、4、6、8、10、20 倍，建立标准曲线，上机前必须用 0.22 μm 的水相滤膜进行过滤。

致谢

感谢国家自然科学基金委（31772627）支持。

感谢南京农业大学消化道微生物实验室李袁飞等所做的研究工作，对本实验提供了很大的帮助。

157 **参考文献**

- 158 1. 李袁飞,孙美洲,成艳芬,朱伟云. (2017) [高效液相色谱法研究瘤胃甲烷菌共存对厌氧真菌代谢产生有](#)
 159 [机酸特性的影响](#). 动物营养学报, 29(04):1198-1204.