

双菌深层发酵纸浆纤维产生单细胞蛋白及 5'-单核苷酸的研究

吴永强 景国安 费锦鑫

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

马德良

(苏州造纸厂, 苏州)

产黄纤维单胞杆菌 (*Cellulomonas flavigena* 372-24D) 和腐臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida* 372-24M) 可利用纸浆 (含 73.7% 纤维素) 作唯一碳源进行混合发酵。经过五天振荡培养, 纸浆纤维素分解 98%。每消耗一克纸浆可产生 0.17 克菌体蛋白质。氨基酸组份分析表明, 此种蛋白质中含 5.4% 赖氨酸、7.5% 精氨酸、9.1% 亮氨酸和 8.4% 缬氨酸等。将发酵液 pH 调至 10, 60℃ 保温 20 分钟, 菌体内核糖核酸 (RNA) 含量减少一半左右, RNA 降解成单核苷酸。发酵液经过纯化可获得四种单核苷酸结晶。经纸层析、纸电泳和紫外吸收光谱鉴定, 它们分别为 5'-腺苷酸 (5'-AMP)、5'-尿苷酸 (5'-UMP)、5'-胞苷酸 (5'-CMP) 和 5'-鸟苷酸 (5'-GMP)。本文并对双菌纤维素发酵过程的生理生化变化进行了研究。

纤维素是储存量最大的碳水化合物, 如何利用纤维素作碳源和能源直接进行发酵的研究已引起人们的注意。Han 等人^[1] 1968 年分离到一株纤维单胞杆菌, 它分解预处理甘蔗渣活性较强, 以后他们又从甘蔗渣中分离出一株粪产碱杆菌, 利用混合发酵, 加速菌体生长, 提高菌体密度^[2]。近年来, 在利用微生物发酵纤维素生产单细胞蛋白的研究方面有较快的进展^[3,4]。

我们曾分离到一株产黄纤维单胞杆菌及一株伴生菌^[5], 它们能在碱处理稻草粉为唯一碳源的基础盐培养基上协同生长。本文报道摇瓶中双菌分解纸浆的效率、菌体蛋白质的得率及蛋白质的营养价值, 提出用纤维素发酵液直接自溶降低菌体核酸含量, 并从发酵液中回收四种单核苷酸的方法。文章还阐述了双菌发酵纤维素的生理生化过程。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

产黄纤维单胞杆菌 (*Cellulomonas flavigena* 372-24D) (简称 D 菌) 和腐臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida* 372-24M) (简称 M 菌)。

(二) 培养基及培养条件

见前报^[5]。基质纤维素采用纸浆 (含 73.7% 纤维素)。

(三) 测定方法

1. 纤维素失重测定

见前报^[5]。

2. 菌体回收方法

(1) 菌体丙酮粉: 发酵液经 1500 转/分离心 5 分钟, 弃残渣, 缓慢倒入 10 倍体积 -10℃ 丙酮

本文于 1978 年 9 月 21 日收到。

本工作承施教耐副教授指教。苏州造纸厂古寿宝、汤震和范仁佩等同志协助进行 50 升罐发酵。中国科学院上海生化所协助分析菌体蛋白氨基酸组份。

中,菌体沉淀后,用布氏漏斗抽滤,将干涸物真空干燥后称重。

(2) 三氯乙酸 (TCA) 沉淀菌体: 将弃残渣的发酵液加入适量 50% TCA, 使最终浓度为 5%, 加热至沸, 冷却, 2500 转/分离心 20 分钟, 弃上清液, 95℃ 烘干菌体, 称重。

(3) 酸沉淀菌体: 发酵液弃残渣后, 用 6 当量盐酸调至 pH 1.5, 测定悬浮液总体积, 从中取 5 毫升, 3500 转/分离心 30 分钟, 弃上清液, 95℃ 烘干菌体, 称重。

3. 菌体蛋白质含量测定

(1) 称菌体丙酮粉 100 毫克, 均匀悬浮于 50 毫升容量瓶中, 样品经稀释 10 倍后, 配成一当量氢氧化钠悬浮液, 100℃ 加热 10 分钟, 菌体溶解, 按 Lowry 法^[6]测定蛋白质含量。

(2) 称取 TCA 沉淀的或酸沉淀的湿菌体, 经适当稀释后, 配成一当量氢氧化钠悬浮液, 用上述方法测定蛋白质含量。同时测定湿菌体含水量。

4. 菌体蛋白氨基酸组分分析

菌体蛋白经 6 当量盐酸 110℃ 水解 24 小时, 用柴田 AA-600 型氨基酸组分测定仪分析游离氨基酸含量。

5. 菌体核酸抽提

按 Morse 法^[7]。

6. RNA 含量测定

用苔黑酚反应^[8]。用酵母 RNA 作标准曲线。

7. DNA 含量测定

用二苯胺显色反应。用小牛胸腺 DNA 作标准曲线。

8. 单核苷酸分析

(1) 纸层析: 溶剂系统: 异丁酸: 1NNH₄OH: 0.1M EDTA=100:60:1.6 华特曼 1 号滤纸, 上行 48 小时, 取出晾干, 在紫外光显影灯下确定样品位置。

(2) 纸电泳: 缓冲液 0.05M pH 3.5 柠檬酸-柠檬酸钠溶液, 电压梯度 20 伏/厘米, 泳动 3 小时, 晾干, 在紫外光显影灯下确定位置。

(3) 紫外吸收光谱测定: 称取一定量样品, 用不同 pH 水溶液稀释至 0.2 毫克/毫升, 用日立 356 型双光路分光光度计测紫外吸收图谱, 并计数光密度比值和最大吸收值处的波长。

9. 纤维素酶活力测定

CMC 酶活力以产生的还原糖量来表示^[9]。

10. 可溶性糖测定

吸取 3 毫升发酵液, 加 0.25—1 毫升中性醋酸铅溶液, 离心弃菌体沉淀, 上清液中加 0.02—0.04 克草酸钠去除多余铅盐, 滤液用蒽酮法测定可溶性糖。

11. 纤维素液化分解直观效果观察

发酵液用小烧杯取样, 摇匀后装入 15 × 150 毫米试管中, 高度 10 厘米, 静置 24 小时后, 测纤维残渣高度。

结果与讨论

(一) 纸浆纤维素失重

在含 5% 纸浆 (干重) 的基础培养基

表 1 D 菌与 M 菌混合发酵纸浆纤维素失重

纤维素失重			纤维素原重量 (克)	发酵后剩余纤维素重量 (克)	纤维素失重 (%)
处 理					
第 一 批	1	对照	1.1092		—
	2	双菌		0.0162	98.5
	3	双菌		0.0179	98.4
	4	双菌		0.0251	97.7
第 二 批	5	对照	1.0879		—
	6	对照	1.1036		—
	7	双菌		0.0157	98.6
	8	双菌		0.0149	98.6
	9	双菌		0.0160	98.5
	10	双菌		0.0213	98.1
第 三 批	11	对照	1.1001		—
	12	对照	1.1003		—
	13	双菌		0.0139	98.7
	14	双菌		0.0146	98.7
	15	双菌		0.0159	98.6
	16	双菌		0.0243	97.8
	17	双菌		0.0141	98.7
	18	双菌		0.0081	99.2
平均值					98.5

注: 双菌发酵培养基, 32±1℃, 振荡培养五天。

中,接入D和M菌,培养五天后,纸浆纤维素分解率可高达98%(见表1)。

据初步观察,双菌对于苇浆、进口木浆、麦草浆、废纸浆、粗浆都有较好的分解效果。

(二) 菌体蛋白质得率

30毫升发酵液内含纸浆1.5001克,其中纸浆纤维素为1.1011克,经发酵后,纤维素转化成大量菌体。用丙酮沉淀回收菌体,并测定丙酮粉中蛋白质含量,结果表明,每利用一克纸浆可得到0.16克菌体蛋白质。若发酵液未经过离心弃纤维残渣,则菌体丙酮粉的重量增加,但其蛋白质含量下降,总蛋白质回收仍为纸浆重量的百分之十六左右。

发酵液用TCA,或用酸沉淀菌体,都得到相似结果(见表2)。

表2 双菌发酵后菌体蛋白质得率

蛋白质回收 回收方法	克蛋白/30 毫升发酵液	克蛋白/克 纸浆	克蛋白/ 公斤纸浆 纤维素
丙酮粉法	0.24	0.16	220
酸沉淀法	0.26	0.18	240
TCA 沉淀法	0.25	0.17	230
平均值	0.25	0.17	230

表2表明,用三种不同方法,所得的结果一致,每消耗一百克纸浆可得到菌体蛋白质约17克;30毫升发酵液可回收菌体蛋白质250毫克左右。

(三) 菌体蛋白质的氨基酸组分

经盐酸水解后的菌体蛋白,用柴田AA-600型氨基酸组分测定仪分析,上样浓度5.7毫克/毫升,用量0.05毫升。菌体蛋白质的氨基酸组分如下。

产黄纤维单胞杆菌及腐臭假单胞杆菌都是腐生菌,它们混合通风发酵时,分解纸浆纤维素完全,蛋白质得率较高,并含有大

表3 菌体蛋白质的氨基酸组分

氨基酸	含量(微克分子)	占总氨基酸百分数(%)
赖氨酸	0.052	5.41
组氨酸	0.015	2.00
精氨酸	0.049	7.54
天冬氨酸	0.093	10.65
苏氨酸	0.067	8.86
丝氨酸	0.048	4.33
谷氨酸	0.111	14.00
脯氨酸	0.059	5.83
甘氨酸	0.096	6.11
丙氨酸	0.140	10.74
缬氨酸	0.083	8.35
异亮氨酸	0.083	4.29
亮氨酸	0.081	9.12
苯丙氨酸	0.033	4.68
总氨基酸		99.9

量必需氨基酸,这在打开蛋白质饲料的新来源上可能有一定价值。但是由于细菌菌体较小,在扩大试验中如何收集菌体还是问题。

(四) 菌体自溶与菌体内 RNA 的分解

微生物单细胞蛋白作为动物蛋白饲料必须降低菌体核酸含量。我们发现纤维素发酵液直接自溶,可以借菌体内核糖核酸酶分解RNA,并将形成的单核苷酸分泌至体外。为了选择最适自溶条件,比较了核苷酸产量与自溶时间、温度和pH值之间的关系(见图1、2、3)。

发酵液弃残渣后,经1600转/分离心收集菌体,用0.03M pH10碳酸缓冲液配成5%浓度,在不同温度下,和同一温度不同保温时间,测缓冲液在260毫微米处光密度的变化。从图1、2可见自溶时间不能

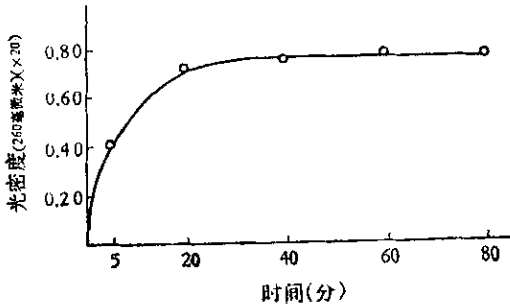


图1 自溶时间与核苷酸产量的关系

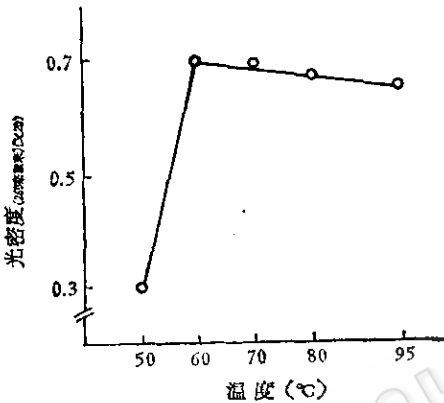


图2 自溶温度与核苷酸产量的关系

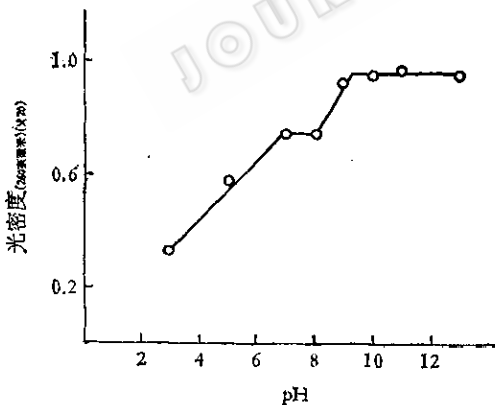


图3 自溶 pH 与核苷酸产量的关系

少于 20 分钟。起初核苷酸产量随自溶时间延长明显增加,保温时间超过 30 分钟,核苷酸不再增加。自溶温度以 60—70℃ 最好。发酵液用蒸馏水稀释一倍,用氢氧化钠或盐酸调至不同 pH, 60℃ 保温

20 分钟,离心后测上清液光密度,试验表明,在 pH3 时光密度最低, pH9—12 时光密度最高(见图 3)。

菌体自溶以后,菌体内核酸含量起了变化。取两组 pH10 发酵液,一组在 60℃ 保温 20 分钟,另一组在室温放置,然后分别测上清液核苷酸量,以及菌体 DNA、RNA 量,其结果如表 4 所示。由表 4 可知,菌体内 DNA 含量基本不变,而 RNA 减少,发

表 4 菌体自溶后 RNA、DNA 含量变化

项 目	发酵液核苷酸	菌体 RNA	菌体 DNA
处 理	光密度($\times 10$) (260 毫微米)	微克	微克
自溶组	0.461	228	70
未自溶组	0.195	445	70

酵液中核苷酸增加。因此,自溶过程主要是菌体内 RNA 被分解,并以小分子核苷酸形式分泌至培养基中。初步估计,含一公斤纸浆的发酵液,用蒸馏水稀释一倍,并用氢氧化钠调 pH 至 10, 60℃ 保温 20 分钟,菌体 RNA 减少 8 克左右,约占菌体 RNA 总量的二分之一。

自溶后,可从发酵液抽提单核苷酸(见表 5)。用 5000 毫升三角瓶装 500 毫升发酵液,双菌发酵四天,按上述自溶条件自溶,自溶液调 pH 1.5。通过 769 活性碳柱,核苷酸被吸附,洗碳柱后,用乙醇胺溶液洗脱,浓缩,经氢型阳离子交换层析分离核苷酸,最后可获得各种单核苷酸结晶。从三升发酵液试验中,每消耗一公斤稻草粉可获得 5.4 克三种单核苷酸结晶,在 7 升发酵液试验中,收得 8.8 克三种结晶。

(五) 四种单核苷酸鉴定

1. 纸层析

将华特曼一号滤纸剪成 43.8×23.2 厘米,1 毫克/毫升的溶液点样 20—25 微升,用异丁酸溶剂系统上行 46 小时,取出晾

表 5 核苷酸收得率

编号	发酵液体积 (升)	培养基稻草 粉量(克)	5'-AMP		5'-GMP		5'-CMP	
			毫克	克/公斤稻草粉	毫克	克/公斤稻草粉	毫克	克/公斤稻草粉
1	3	72.36	111	1.53	191.6	2.65	85.1	1.18
2	7	213	645	3.03	605	2.84	625	2.93

表 6 四种核苷酸层析比值

	5'-AMP		5'-GMP		5'-CMP		5'-UMP	
	样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品
比值 (R_f)	0.64	0.64	0.37	0.37	0.60	0.60	0.38	0.38

表 7 四种核苷酸电泳移动距离

	5'-AMP		5'-GMP		5'-CMP		5'-UMP	
	样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品
移动距离(厘米)	8.8	8.8	10.02	10.02	8.1	8.1	12.4	12.4

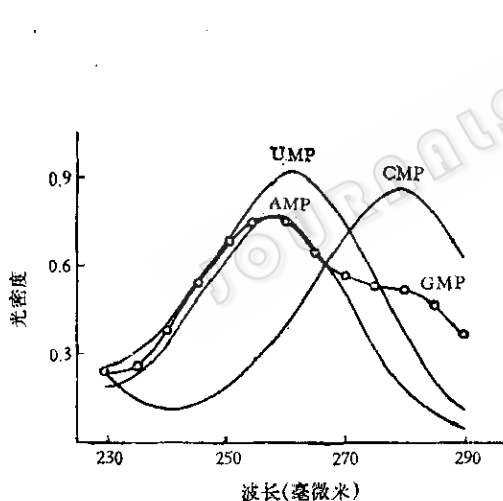


图 4 在 0.1N HCl 中四种样品紫外吸收光谱图

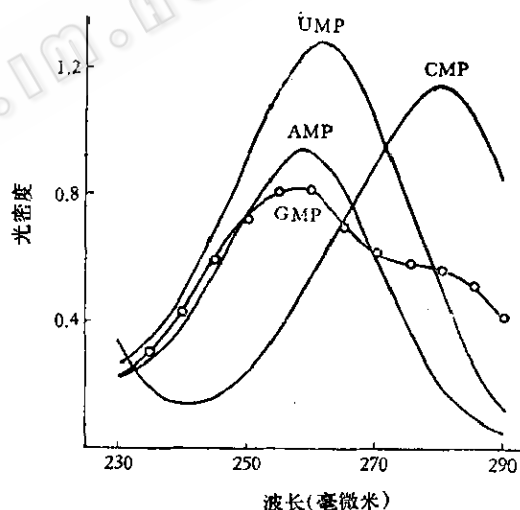


图 5 在 0.1N HCl 中四种标准 5'-单核苷酸紫外吸收光谱图

干,在紫外光显影灯下看到样品及标准样品均为一个斑点,比值见表 6。

2. 纸电泳

取华特曼一号滤纸,点样 1 毫克/毫升的溶液 20 微升,滤纸为 31.2×17.8 厘米,电压 600 伏特,电流 20 毫安,泳动 2.5 小时,取出滤纸 55°C 烘干,样品泳动位置与

标准样品相同(见表 7)。

3. 紫外光谱吸收特征

作四种样品的紫外吸收光谱图,并求出不同波长下光密度比值及最大吸收峰值。见图 4、5 及表 8、9。

综上所述可知,自溶以后产生的四种单核苷酸分别为 5'-腺苷酸、5'-胞苷酸、

表 8 四种核苷酸紫外吸收特征

核苷酸	光密度比值 pH 值	A250/A260			A280/A260			A290/A260		
		2.0	7.0	12	2.0	7.0	12	2.0	7.0	12
5'-AMP		0.84	0.75	0.81	0.24	0.19	0.14	0.034	0.011	0.006
5'-CMP		0.42	0.82	0.83	2.09	1.05	0.95	1.65	0.41	0.33
5'-GMP	pH1.0 0.91	1.11	0.89	pH1.0 0.69	0.66	0.57	pH1.0 0.53	0.17	0.089	
5'-UMP		0.74	0.86	0.81	0.47	0.45	0.37	0.013	0.086	0.061

表 9 四种核苷酸最大吸收峰值

核苷酸	pH	波长 λ_{max}	5'-AMP		5'-CMP		5'-UMP		5'-GMP	
			样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品	样品	标准样品
	2.0		256	257	279	280	261	262	pH1.0 256	256
	7.0		259	259	271	271	261	261	255	252
	12		259	259	271	271	261	261	258	258

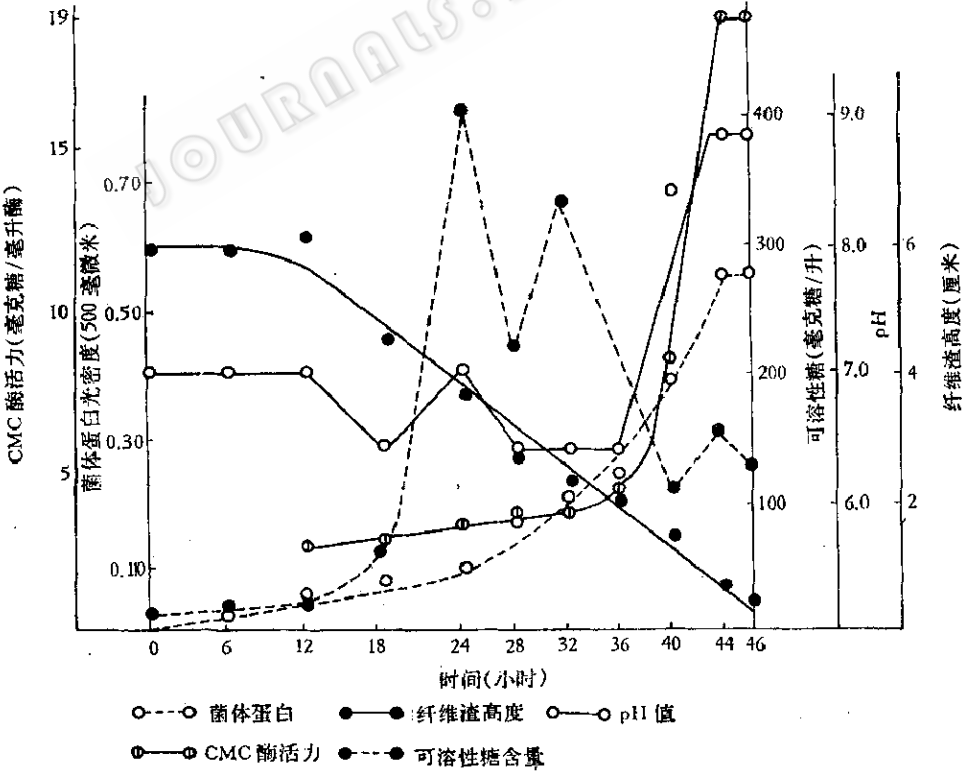


图 6 双菌深层发酵纤维素生理生化过程

5'-鸟苷酸和 5'-尿苷酸。

(六) 双菌发酵纸浆纤维素过程中生理生化变化

用 50 升罐进行纸浆发酵,经过不同时间,取样测定发酵液中纤维素酶活力,可溶性糖量、菌体蛋白量、纸浆残渣量和 pH 值等。结果见图 6。

上述资料表明,纤维细菌可产生胞外纤维素酶,将纸浆纤维素转化成可溶性糖,供双菌生长繁殖。随着纤维素迅速被分解利用,菌体生长达到对数生长期,发酵 46 小时左右,纤维素几乎完全分解,生长进入稳定期,此时发酵液中可溶性糖急剧减少, pH 上升,CMC 酶活亦达到最高水平。

M 菌是伴生菌,它不能利用纤维素,但在双菌发酵中却起重要作用。由于 D 菌利用纤维二糖,葡萄糖都产酸,在其生长过程中也形成一些有机酸,故使发酵液 pH 下降,若无 M 菌伴生, pH 可一直降低到 6 以下,使 D 菌停止生长。混合发酵时, M 菌同时生长起来,发酵液 pH 可一直维持在 6.5—7。这给 D 菌以适宜的生长 pH 纤维素被迅速液化分解。发酵后期,纤维素基

质越来越少,菌体消耗大量可溶性糖,生长旺盛,菌体密度大大升高。

经过 46 小时,发酵结束,发酵液 pH 在 8.8—9.0,稍微提高 pH 至 10,即可进行自溶过程。

参 考 文 献

- [1] Han, Y. W.: *Appl. Microbiol.*, 16: 1140—1145, 1968.
- [2] Srinivasan, V. R.: *Cellulases and Their Application*, American Chemical Society, Washington, 1969, 447—460.
- [3] Srinivasan, V. R.: *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, M. Bailey, ed., Helsinki, 1975, 393—405.
- [4] Rockwell, P. J.: *Single Cell Proteins from Cellulose and Hydrocarbons*, Noyes Data Corp. New Jersey, U. S. A., 1976, 4—136.
- [5] 中国科学院植物生理研究所: *微生物学报*, 18: 2, 147—152, 1978.
- [6] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [7] Morse, M. L.: *J. Bacteriology*, 58: 317—326, 1949.
- [8] Chargaff, E. & Davison, J. N.: *The Nucleic Acid: Chemistry and Biology*, Academic press, N. Y. Vol. I, 1955, P 301.
- [9] 中国科学院植物生理研究所: *微生物学报*, 18: 1, 27—38, 1978.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN AND 5'-MONONUCLEOTIDES BY *CELLULOMONAS* *FLAVIGENA* AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* IN SUBMERGED CULTURE FROM PAPER PULP

Wu Yung-qiang, Jing Guo-an, Fei Jin-xin

(*Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai*)

Ma De-liang

(*Shuchou paper Mill, Shuchou*)

Fermentation was carried out using a mixed culture of two bacteria, *Cellulomonas flavigena* 372-24D and *Pseudomonas putida* 372-24 M. The medium contained basal salts with paper pulp (73.3% cellulose) as sole carbon source. The cellulose of paper pulp was decomposed to the extent of 98% after 5-day incubation on a reciprocal shaker. The cell protein yield was about 0.17 g protein per gram of paper pulp used. It was shown that the cell protein contained 5.4% lysine, 7.5% arginine, 9.1% leucine, and 8.4% valine by analysis of the amino acid composition. After adjust-

ing the pH of the culture broth to 10 and temperature to 60°C, the internal RNA was degraded to mononucleotides. Approximately one-half of the cell ribonucleic acid could be removed within 20 minutes. The products were isolated from culture broth, purified and crystallized. They were identified as 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, and 5'-UMP by paper chromatography, paper electrophoresis and UV absorption spectroscopy. The physiological and biochemical changes during cellulose fermentation by mixed culture were also studied.