

高温嫌气纤维素分解细菌发酵纤维素的研究

张宪武 韩静淑 林佩真 王廷惠

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

我们研究了高温嫌气纤维素分解细菌的纯粹培养, 分解纤维素的能力。在发酵过程中, 培养 15 天时, 纤维素分解率可达 53%。延长培养时间, 未见增加。培养 20 天产生的葡萄糖、醋酸、乳酸, 达到最大量, 分别为分解纤维素的 76%、12%、7%。该菌对碱性基质有良好适应性, 当培养液的 pH 增高到 8.9 时, 纤维素分解率最高, 生成的还原糖量亦较多。基质 pH 接近 9.3 时, 二者均降低, 但酸的生成量, 仍然增加; 此菌还能直接发酵加于培养基中的葡萄糖, 形成与发酵纤维素相同的有机酸组分。并用分配层析法, 对发酵液含的微量有机酸作了测定, 结果稳定。可以清楚地分离混合存在的有机酸类。

高温嫌气纤维素分解细菌, 分解纤维素的能力甚强, 而且也较迅速。因而成为研究纤维素发酵的生物化学机理的良好材料^[1]。唯因其纯系培养的获得较为困难, 故有关这方面的研究, 目前进展不快。此菌在转化纤维素的过程中, 常形成较多产物, 如累积相当量的葡萄糖、有机酸、醇等^[2-5]。但常因菌种不同, 以致在累积的产物方面, 甚不一致^[2-5]。自 Имшенецкий, A. A.^[6] 和 Hungate, R. A.^[7] 发表嫌气性纤维素分解菌的纯种验证标准以来, 各研究者以之作为检验纯种的标准。本文报道用上述两法验证的纯粹培养菌株, 研究它在发酵纤维素时生成的重要产物, 特别是糖和有机酸, 借以进一步探讨此菌的生理生化特性, 以及了解其在参与碳素循环中的作用。

材料和方法

试验采用我所丁鉴等分离得到的高温嫌气纤维素分解菌的纯种^[8]作为材料。以 Имшенецкий VL 培养基为基础培养基^[11]。其成分如下(克):

$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5, KH_2PO_4 0.5,

K_2HPO_4 0.5, MgSO_4 0.4, NaCl 0.1,

蛋白胨 5.0, CaCO_3 2.0, 滤纸 15; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{FeSO}_4$ 1%

溶液 1 滴; 自来水 1,000 毫升。在 750 毫升的培养基中加马粪浸出液 250 毫升, pH 7.0—7.4。分别探讨不同培养时间、pH 值及以葡萄糖为碳源的培养试验。种菌是在嫌气条件下, 培养于盛有上述 VL 培养基的试管中, 嫌气保存备用。当进行试验时, 先将种菌移植于装有 VL 培养基的试管内, 放入抽气瓶中, 用真空泵抽至 10^{-1} 毫米水银柱, 并于瓶底加焦性没食子酸和碳酸钠, 以吸收瓶中残留氧气。置入 58℃ 恒温箱中, 活化培养 72 小时。此后, 以 10% 接种量, 转入盛有 40 毫升 VL 培养基的 50 毫升三角瓶中。放入抽气瓶中, 同上条件, 嫌气培养 72 小时, 作为种菌。发酵培养是用上述方法培养的种菌, 按 10% 接种量, 接入盛有 200 毫升基础培养液的 300 毫升细口瓶中。在同一嫌气条件下, 于 58℃ 分别按预定的试验, 进行接种培养。在培养过程中, 应当防止空气渗入培养瓶内, 始终保持严格的嫌气。纤维素消耗量测定, 以培养前后滤纸的重量差计算。培养后的滤纸, 分别加入热水、稀盐酸、乙醇和乙醚洗涤, 除去可溶物, 空白培养条件也完全一样。并在 105℃ 烘干至恒重。培养液含还原糖以葡萄糖计, 按 Shaffer 和 Hartmann^[9] 方法测定。有机酸参照 Bulen^[10] 硅胶柱分配层析法测定。用干法装柱, 以苯-正丁醇混液为展开溶剂。并作标准酸

本文于 1979 年 9 月 20 日收到。

的回收试验。层析硅胶，是按 Isherwood^[11] 法自制，代替原法中所用 Mallinckrodt 制进口硅胶，效果良好。并用纸上层析法鉴定从柱中溶出的有机酸组分^[12]。此外，尚用 Feigl^[13] 的点滴试法，进一步加以确证。发酵液处理，按赤司景^[14] 方法进行。其中，挥发酸用水蒸汽蒸馏收集制备^[14,15]。不挥发酸是将蒸馏后的残留液，经过适当浓缩，再用乙醚抽出制备^[15]。

结果和讨论

(一) 标准有机酸的分离及其回收率

为了验证所采用的方法，首先对已知酸，进行了分离测定。试验结果列于表 1、图 1。

从表 1 结果可以看出，在适当的展开溶剂下，上述各酸均能清楚地得到分离，酸之回收率亦较为理想。仅甲酸、丁酸的回

收率略低，分别为 80.0% 和 92.6% 外，其余各酸均达 95% 以上，这和高井^[16] 发表的结果，是一致的。

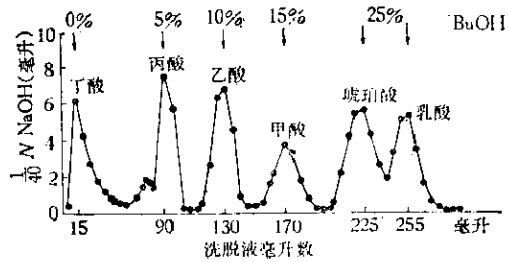


图 1 标准有机酸的洗脱曲线

(二) 不同培养时间培养液中糖和有机酸的累积及纤维素分解作用

为了考察不同培养时间的培养液中糖、有机酸及纤维素分解的关系，我们进行了 5—25 天的连续培养试验。结果列于

表 1 标准有机酸的分离及其回收率*

有机酸种类	溶剂组成		区分号数	馏出液流出容积		测 定 值		
	苯：正丁醇 (V/V)	使用液量 (毫升)		区分号数	毫 升	加入量 (毫克当量)	回收量 (毫克当量)	回收率(%)
丁 酸	100:0	60	2—12	3	15	0.544	0.504	92.6
丙 酸	95:5	50	13—22	18	90	0.558	0.531	95.0
乙 酸	90:10	50	23—29	26	130	0.575	0.570	99.1
甲 酸	85:15	50	30—40	34	170	0.480	0.384	80.0
琥珀酸	75:25	100	41—48	45	225	0.711	0.698	98.2
乳 酸			49—55	51	255	0.518	0.517	99.8

* 硅胶柱制备条件：8 克硅胶 (0.315 毫米和 0.16 毫米以上粗粒) 加 0.5 N H₂SO₄ 5.5 毫升，混匀后，干装至直径为 1.1 厘米的 50 毫升滴定管制成的层析柱中。供试之有机酸钠盐，加 1 克硅胶，加入 0.5 N H₂SO₄ 0.5 毫升，6 N H₂SO₄ 0.5 毫升，充分混匀后，装于柱之顶端，上加脱脂棉，并加入纯苯渗透全柱。展开剂：苯：正丁醇，100:0 60 毫升；95:5 50 毫升；90:10 50 毫升；85:15 50 毫升；75:25 100 毫升。使用前，加入 0.5 N H₂SO₄ 使之饱和平衡。流速：5 毫升/5 分钟，每洗脱 5 毫升为一区分，收集后以酚红为指示剂，以 (1/40) N NaOH 滴定之。标准有机酸洗脱曲线见图 1。

表 2 *Clostridium thermocellum* 纯培养在不同培养时间的纤维素的分解及糖、有机酸的积累 (VL 培养基 200 毫升，培养温度 58℃)

试验号数	培养时间 (天)	纤维素分解量(克)	纤维素分解率(%)	培养液中所含还原糖(克)	培养液中所含有机酸量(克)			还原糖量	生成的有机酸量
					甲 酸	乙 酸	乳 酸	分解纤维素量(%)	分解纤维素量(%)
1	5	0.87	31.34	0.35	迹量	0.147	0.104	40.22	28.85
2	10	1.34	48.79	0.78	迹量	0.155	0.091	58.20	18.35
3	15	1.49	53.13	1.06	迹量	0.163	0.093	71.14	17.18
4	20	1.47	52.02	1.12	迹量	0.173	0.100	76.19	18.57
5	25	1.49	52.54	1.07	迹量	0.152	0.098	71.81	17.44

表 2。

从表 2 的结果可以看出,糖、酸的生成量,从 5 天至 20 天培养中,都处于增加阶段。20 天以后,趋于平衡,无显著增长。纤维素的分解,亦出现类似的情况。从 5 天至 15 天,分解率显著增高,此后,逐渐地亦趋于平衡。这里我们还可以看到,纤维素分解以及糖、酸形成的最适阶段,是在 15 天至 20 天的培养时间。当延长培养时间,培养液中的还原糖和有机酸的生成量,略有降低。

(三) pH 值对纤维素的分解及培养液中糖、酸积累的影响

高温菌的纯培养,对介质的酸性反应极为敏感。在酸性介质中发育不良,对纤维素的分解进行甚为迟缓,不能形成无定形物沉集于容器的底部。为了降低酸积累的毒害影响,通常均在纤维素发酵培养基中,添加适当的盐类(碳酸钙、碳酸铵或其他盐类),用以中和基质的酸度。为了了解此菌在纤维素发酵时的最适 pH,我们进

行了中性及碱性反应的纤维素发酵试验。所得结果列于表 3。表 3 的试验结果表明,提高培养液的 pH 值,纤维素的分解亦愈增加。在此碱性反应范围内,糖、酸的生成也同样地增加。在 pH 8.9 时,纤维素分解率最高,生成的糖量亦较多。当基质的 pH 接近 9.3 时,二者均降低,但酸的生成量,仍然增加。这里可能由于培养液碱度的提高,有利于纤维素发酵阶段的旺盛进行所致。而在中性反应时,纤维素分解及糖、酸的生成,均较低。从试验结果可以看到,此菌对碱性环境,具有良好的适应性。

(四) *Clostridium thermocellum* 纯培养对葡萄糖的发酵实验

高温嫌气纤维素细菌对纤维素的分解,可以分为两个阶段^[1],纤维素的水解阶段与形成的水解产物的发酵阶段。为了确定供试菌的这一重要事实,我们进行了在培养基中添加适当量的葡萄糖,来代替 VL 基础培养基中的纤维素作为碳源的试验,结果列于表 4。试验结果表明,此菌可以

表 3 pH 值对纤维素分解及培养液中还原糖、有机酸的积累的影响 (培养温度 58℃, 培养时间 15 天)

试验号数	培养液的 pH 值	纤维素分解量(克)	纤维素分解率(%)	培养液中所含的还原糖量(克)	培养液中所含的有机酸量(克)			还原糖量 纤维素分解量(%)	有机酸量 纤维素分解量(%)
					甲酸	乙酸	乳酸		
1	7.05	1.13	39.26	0.72	微量	0.114	0.077	63.71	16.90
2	7.57	1.46	51.34	0.94	微量	0.145	0.097	64.38	16.57
3	8.18	1.68	58.24	1.15	微量	0.145	0.142	68.45	17.08
4	8.95	1.95	67.99	1.28	微量	0.170	0.133	65.64	15.53
5	9.30	1.82	63.93	1.15	微量	0.208	0.149	63.18	19.61

表 4 *Clostridium thermocellum* 纯培养对葡萄糖的发酵 (58℃, 培养 10 天)

培养液中添加的葡萄糖浓度(克/100 毫升)	糖消耗率(%)	有机酸生成量(克/100 毫升)		酸对发酵葡萄糖之比(%)
		乙酸	乳酸	
1.5	11.68	0.077	0.051	80.63
	12.16	0.094	0.051	83.22
2.0	15.90	0.105	0.047	50.65
	15.90	0.109	0.055	52.90

直接发酵加入培养基中的葡萄糖,同时也形成与发酵纤维素时相同的有机酸组分;发酵葡萄糖比发酵纤维素较为缓慢。在10天的培养时间中葡萄糖的发酵率分别是所给糖浓度的11%;15%。但在纤维素基质中仅培养5天,纤维素分解率为31%。

参 考 文 献

- [1] A. A. Имшенецкий 著, 马麟祥、陈慎、叶维青译:《纤维素微生物学》, 科学出版社, 北京, 1958, 第170页。
- [2] Scott, S. W. et al.: *I. E. C.*, **22**: 731—735, 1930.
- [3] Tetrault, P.: *Ctbl. Bakt. 2 Abt.*, **81**: 28, 1930.
- [4] Veldhuis, M. K. et al.: *I. E. C.*, **28**: 430, 1936.
- [5] Virtanen, I. Artturi: *Nature.*, **158**: 795, 1946.
- [6] A. A. Имшенецкий.: *Микробиология.*, **8**:129 1939.
- [7] Hungate, R. E.: *J. Bact.*, **48**: 499, 1944.
- [8] 丁奎等: 微生物学报, **9**(2):173—177, 1963年。
- [9] Shaffer, P. A. and A. F. Hartman: *J. Biol. Chem.*, **45**: 365—390, 1920.
- [10] Bulen, W. A. et al.: *Anal. Chem.*, **24**: 187, 1952.
- [11] Isherwood, F. A.: *Biochem. J.*, **40**: 688, 1946.
- [12] Stark, J. B. et al.: *I. E. C. Anal. Ed.*, **23**: 413—415, 1951.
- [13] Feigl, F.: *Spot Tests In Organic Analysis*, 5th ed., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1956, pp. 342—348.
- [14] 赤司景: 日本农芸化学会志, **34**:1040—1053, 1960.
- [15] A. H. Белозерский, Н. И. Проскураков 著, 曹宗晃、顾孝诚、吴相钰译:《植物生物化学实验指导》, 高等教育出版社, 北京, 1956, 第321页。
- [16] 高井康雄: 日本土壤肥科学杂志, **28**: 435—438, 1958.

STUDIES ON FERMENTATION OF CELLULOSE BY THERMOPHILIC BACTERIA

Zhang Xianwu Han Jingshu Lin Peizhen wang Tinghui

(Institute of Forestry and Pedology, Chinese Academy of Science, Shenyang)

The decomposition of cellulose by a pure culture of *Clostridium thermocellum* was studied and the products of decomposition were identified. Time course study of cellulose decomposition showed that about 53% of the cellulose was decomposed after 15 days while prolonged incubation gave no increase. The amount of reducing sugar (as glucose), acetic acid and lactic acid produced attained maximum after 20 days which were about 76%, 12%, 7% of the cellulose decomposed respectively. Increase the pH of the medium up to 8.9 followed by an increase in the rate of decomposition of cellulose

and the accumulation of reducing sugar. Further increase in the pH caused a decline in both the rate of decomposition of cellulose and the accumulation of glucose. Similar results were obtained with organic acids produced except that their amount of accumulation increased up to pH 9.3. This organism could also utilize glucose with the production of the same organic acids as it did with cellulose. Good separation of the mixed organic acids produced in the fermentation broth was obtained by using silica gel partition chromatography and the results were reproducible.