

# 甲烷氧化菌中过量核酸的脱除\*

连莉文 周绍英 李连武 伍岳宗

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

微生物菌体可作为蛋白质饲料的来源, 而核酸含量过高的微生物菌体是不适合做饲料的。因此考查它们的核酸含量并寻找适宜的核酸脱除方法, 是非常重要的。我们选育的“761-2”甲烷氧化菌, 其核酸含量较高, 以干重计为10—12%, 所以进行了脱除核酸的研究, 现报道如下。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 菌株: 甲烷氧化菌 761-2。

2. 培养条件: 在200升自吸式发酵罐上, 采用分批式和半连续式培养。碳源为四川产的天然气, 甲烷含量为96%以上。

### 二、核酸脱除的方法

将新鲜的发酵液, 在pH10.5, 70℃低速搅拌的条件下, 进行降解。核糖核酸的大分子被降解成为5'-单核苷酸, 渗出细胞外。然后以等电点法回收菌体蛋白, 水洗后喷雾干燥, 得脱核酸的产品。

### 三、测定方法

1. 菌体核酸总量的测定: 采用紫外吸收法<sup>[1]</sup>。

2. 菌体核糖核酸含量的测定: 采用苔黑酚

法<sup>[2]</sup>。

3. 自溶上清液中单核苷酸定性分析: 采用柱层析-紫外吸收光谱法测定<sup>[3]</sup>。

4. 5'-核苷酸的定量分析: 采用过碘酸氧化法<sup>[3]</sup>。

5. 蛋白质含量测定: 采用常规半微量凯氏定氮法。

6. 氨基酸分析: 用氨基酸自动分析仪测定酸水解蛋白质后的氨基酸样品<sup>[4]</sup>。

7.  $\alpha$ -苯并芘含量测定: 采用常规的荧光法。

8. 有毒元素分析: 采用常规方法, 由四川省卫生防疫站提供。

## 实验结果

### 一、核酸脱除方法的选择

根据蛋白质饲料的要求, 在去除菌体核酸的过程中, 要尽量避免营养成分的损失, 而不增加有毒元素。我们比较了以下几种工业上常用的去除核酸方法, 结果见表1。

根据这一结果, 我们选用升温自溶法处理微生物菌体。

\* 承中国科学院生物物理研究所申同健、李楠茜二同志审阅; 紫外分光光度计分析数据由本所熊贻惠、康伯美同志提供。

表1 几种脱除核酸方法的比较

脱除方法	脱除率(%)	蛋白质收率(%)	处理时间(小时)
碱法	70	50-60	1
一步酸法	70	50-60	1
盐法	70-80	70-80	2
外源酶法	70-80	80	1
常温自溶法	70	—	16以上
升温自溶法	50-60	80	1

## 二、微生物菌体自溶与 pH、温度、时间的关系

1. 与 pH 的关系: 实验表明, 自溶最适 pH 为  $10.0 \pm 0.5$ , 当 pH 小于 9 时核酸脱除率下降, pH 大于 11 时, 核糖核酸含量下降。结果见图 1。

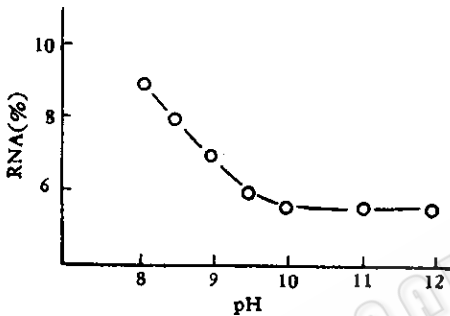


图1 自溶 pH 与核糖核酸含量的关系

2. 与温度的关系: 实验表明, 自溶温度小于  $40^\circ\text{C}$  时, 整个过程需 16 小时以上, 温度大于  $75^\circ\text{C}$  时, 脱核糖核酸效果明显下降, 而最适温度为  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ , 见图 2。

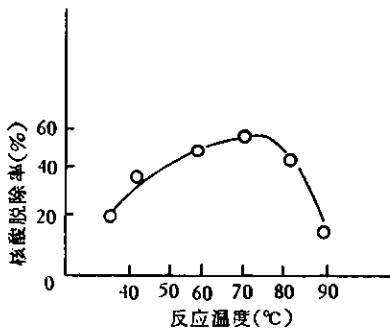


图2 反应温度与核酸脱除率的关系

3. 与时间的关系: 实验说明, 自溶脱核糖核酸时间以 60 分钟为宜, 延长时间, 脱除率未

见明显提高, 而核糖核酸降解物的得率却下降, 见图 3。

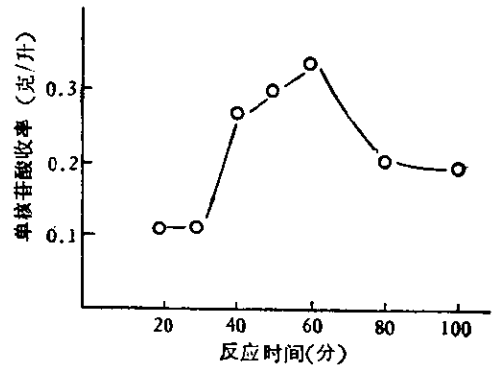


图3 反应时间与单核苷酸收率的关系

## 三、升温自溶法脱除核酸效果的考查

1. 核苷酸类物质的确定: 菌体自溶后的上清液以活性碳处理, 测其紫外吸收光谱, 结果表明测定样品的紫外吸收峰形基本符合核苷酸类物质的特有峰形。

2. 菌体自溶前后核酸的变化: 用升温自溶法处理菌体后, 测定处理前后及上清液中的核酸含量, 结果见表 2。

表2 菌体自溶前后核酸的变化\*

结果 样品名称	核酸含量(%)	
	处理前	处理后
上清液	2	66
菌体	98	44

\* 实验基准为: 菌体内核酸含量为 10.7%, 每升发酵液含有干菌体 10 克。

表 2 表明, 菌体内核酸脱除率为 66%。

## 四、升温自溶法处理菌体过程中蛋白质的损失

测定自溶前后样品中的粗蛋白质含量及其氨基酸组成。结果说明, 粗蛋白质含量平均由 48.5% 降为 41.5%, 其氨基酸组成见表 3。

表 3 说明, 升温自溶的脱除核酸方法, 蛋白质的损失小于 20%, 几种必需氨基酸的损失小。

表3 脱除核酸前、后蛋白质中氨基酸的组成

结果 项目		氨基酸								
		天门冬	苏	丝	谷	甘	丙	半胱	缬	蛋
含量(%)	处理前	5.35	2.68	2.24	5.98	3.02	3.93	0.30	3.20	1.40
	处理后	4.28	2.11	1.75	4.79	2.42	3.09	0.33	2.66	1.24

结果 项目		氨基酸								
		异亮	亮	酪	苯丙	赖	组	精	脯	色
含量(%)	处理前	2.42	3.88	1.96	2.17	2.96	0.90	1.44	1.44	0.29
	处理后	1.97	3.22	1.55	1.81	2.33	0.70	2.06	1.19	0.36

五、升温自溶法脱除核酸过程中有毒物质的变化

取处理前后的样品，分别测定其有毒物质

的含量，结果见表4。

表4说明，经升温自溶处理后，蛋白质中的有毒物质的含量一般下降，只有铅的含量上升，但均未超过饲料要求的范围。

表4 有毒物质含量的分析

结果 (ppm)		毒物							
样品		汞	砷	铅	硒	铜	苯丙吡	硅	黄曲霉毒素
处理前		0.09	1.25	1.25	0.000007	0.0045	0.002	0.23	<5ppb
处理后		0.04	0.75	8.00	0.000011	0.0027	0.0017	0.17	<5ppb

讨 论

“761-2”氧化甲烷菌中的过量核酸，经升温自溶法脱除后，基本达到饲料用的要求。而上清液经活性炭处理后，经离子交换，测收集液的紫外吸收光谱，其比值基本符合各类5'-核苷酸，因此有可能进行综合利用，提高经济效果。这些有待进一步的工作。

参 考 文 献

[1] S. Ohta, et al.: *Appl. Microbiol.*, 22(3): 415-

421, 1971.

[2] Erwin Chargaff and J. N. Davidson: *The Nucleic acids*, Academic press INC., publishers, New York, Vol 1, 1955, 黄德民译, 1963年第一版, 科学出版社, 北京, p.368.

[3] G. Schmidt: Periodate oxidation of Ribonucleic Acids and their Derivatives, *Methods in Enzymology*, Vol. 12 B, (ed. by Lawrence Grossman,) Academic press New York and London, 1968, 230.

[4] J. P. F. DMELLO: *J. Appl. Bact.*, 35(1): 145-148, 1972.