

文章编号: 1009-038X(2000)04-0322-03

谷氨酸菌体中核酸类物质的提取

段作营¹, 于瑞嵩², 毛忠贵¹, 王远义³

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106; 3. 江苏常熟莫城食品机械厂, 江苏常熟 215556)

摘要:研究了谷氨酸菌体中核酸提取的工艺条件, 获得了较好效果. 在 120 ℃, pH 9, 菌体质量浓度 10 g/dL 的条件下, 提取 2 h, 蛋白质的分离率为 90%, 核酸的提取率高达 90% 以上.

关键词:谷氨酸菌体; 核酸; 提取

中图分类号: TS201.24

文献标识码: A

Extraction of Nucleic Acids from Glutamic Acid Bacteria

DUAN Zuo-ying¹, YU Rui-song², MAO Zhong-gui¹, WANG Yuan-yi³

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Animal Husbandry & Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agriculture Science, Shanghai 201106; 3. Changshu Mocheng Food Machine Factory, Changshu 215556)

Abstract: A novel method of extracting nucleic acids from glutamic acid-producing microbes was reported in this paper. The optimum extracting conditions were as follows: 120 ℃, 2 hours, pH 9.0, and 10 g/dL for the concentration of microbial cells. Under this condition, the nucleic acids were recovered over 90% and more than 90% protein was removed.

Key words: glutamic acid bacteria; nucleic acids; extraction

我国味精产量居世界第一, 并且每年以 5% ~ 10% 的速度增长. 谷氨酸发酵菌体是味精工业的副产物, 每年产量可达 5 ~ 6 万 t (干), 过去随废水排放, 既污染环境又浪费资源. 近年来, 开始出现菌体回收技术, 部分菌体已实现了回收利用. 目前主要用作饲料蛋白添加剂, 利用价值还不高. 谷氨酸发酵菌体中除含蛋白质外, 还含有维生素、多糖、氨基酸和核酸, 若实现综合利用, 有广阔的市场前景.

谷氨酸菌体中核酸类物质提取的技术关键是菌体破碎以及核酸和蛋白质的分离. 谷氨酸菌体细胞中核酸类物质质量分数高达 10% ~ 12%, 如果不

分离会导致蛋白质中核酸质量分数过高, 影响食用安全性. 核酸还可制成价值更高的碱基、核苷、核苷酸及其衍生物等, 广泛地应用于调味料、医药、基因工程等领域. 然而目前采用的均质法、超声波法、加酶法和碱自溶等法中核酸提取率不高, 一般为 60% ~ 70%^[1,2], 从而使蛋白质中核酸质量分数过多, 达不到食用级别, 核酸中蛋白质质量分数也过多, 不利于核酸类产品的生产, 必须采取其它工艺才能将核酸分离. 这样不仅工艺复杂、运行成本增加, 还造成一定的环境污染. 本研究采用高温处理工艺, 可充分地將核酸和蛋白质分离, 并且核酸提取率高达

收稿日期: 1999-11-23 修订日期: 2000-04-20.

基金项目: 国家教育部骨干教师基金资助课题.

作者简介: 段作营 (1965-), 男, 山东菏泽人, 理学硕士, 助理研究员.

90 % 以上. 该方法不仅工艺简单可行, 而且蛋白质中核酸质量分数低, 符合食用要求.

1 材料与方法

1.1 材料

谷氨酸菌体细胞 江苏张家港味精厂提供.

1.2 测定方法

蛋白质质量分数测定 采用凯氏定氮法^[3] 核酸质量分数测定 采用定磷法^[4] 菌体干重测定采用恒重法 氨基酸质量分数测定 采用甲醛法.

1.3 工艺流程

菌体 → 菌悬液 → 升温反应 → 冷却 → 定容 → 过滤 → 测定

2 结果与讨论

2.1 温度对菌体中核酸提取率的影响

将菌体配成质量浓度为 10 g/dL 的菌悬液, 用 NaOH 调至 pH 9.0, 在不同温度下处理 2 h, 得到温度对核酸提取率的影响曲线, 见图 1.

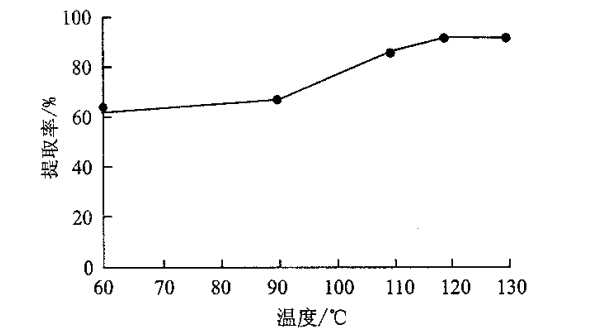


图 1 温度对核酸提取率的影响

Fig.1 The effect of temperature on nucleic acid extraction

从图 1 可以看出, 随着温度的升高, 核酸的提取率也随着提高. 在低温(60~90 °C)时, 上升趋势较慢, 在 90~110 °C 时, 上升较快, 再升温, 又趋于平缓. 到 120 °C 以上时, 基本不变. 这主要是由于提高温度增加了细胞壁的破坏程度和细胞膜的通透性. 另外, 温度升高, 还可增加核酸的溶解度以及核蛋白质的水解, 使核酸能得到最大程度的释放.

2.2 pH 对核酸提取率的影响

pH 是化学反应的关键因素, 它一方面影响细胞壁和细胞膜的通透性, 从而影响细胞内物质的透出, 另一方面还影响核酸的溶解度. pH 对核酸提取率的影响见图 2. 可知, 在该反应条件下, pH 在 9.0 左右提取率最高, 主要原因可能是在碱性条件下细胞的通透性增加, 核酸的溶解度提高.

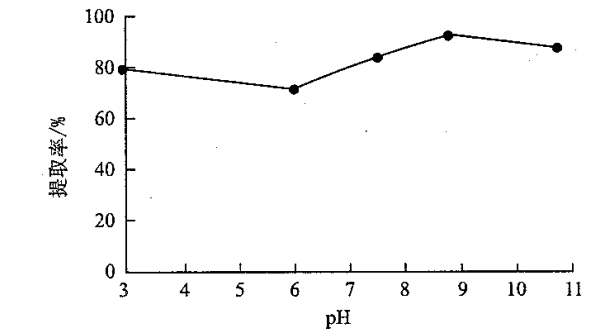


图 2 pH 对核酸提取率的影响

Fig.2 The effect of pH on nucleic acid extraction

2.3 提取时间对核酸提取率的影响

在菌体质量浓度为 10 g/dL, 温度为 120 °C、pH 9.0 的条件下, 考察提取时间对核酸提取率的影响, 结果见图 3.

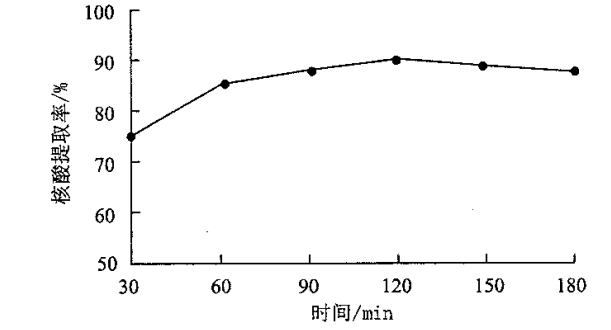


图 3 时间对核酸提取率的影响

Fig.3 The effect of time on nucleic acid extraction

由图 3 可知, 随着提取时间的延长, 核酸提取率逐渐增加. 120 min 时, 反应达到平衡, 核酸提取率最高. 时间再延长, 核酸提取率基本维持不变, 因此将提取时间定为 120 min.

2.4 蛋白质的分离情况

蛋白质的分离情况见表 1.

表 1 蛋白质、核酸的分离情况

Tab.1 The isolation of nucleic acid from protein g		
项目	蛋白质质量	核酸质量
菌体	7.25	1.06
离心法上清液	0.56	0.996
过滤法清液	0.58	0.996
离心固形物	6.69	0.064
过滤固形物	6.67	0.064

注: 反应条件为温度 120 °C, pH 9.0, 反应时间 120 min, 菌体质量浓度 10 g/dL.

从表 1 可看出, 90 % 以上的蛋白质留在渣中, 而核酸在渣中的残留量却很低, 核酸与蛋白质分离

率很高.这主要是因为在高温情况下,蛋白质基本上变性而沉淀,而核酸在此条件下仍能较好地溶解在清液中.

2.5 提取核酸降解程度的验证

核酸是由核苷酸通过磷酸二酯键连接而成,核苷酸又是由碱基、核糖、磷酸组成,因此,核酸在不同条件下可以被降解成碱基、核苷、核苷酸或寡核苷酸等不同产物.为此,对提取的核酸是否降解和降解的程度进行了研究.在核酸提取液中加入核酸沉淀剂,通过测定沉淀前后核酸量的变化来推断核酸的水解程度,结果见表 2.

表 2 不同 pH 下的核酸提取率和沉淀率
Tab.2 The yield and sediment rate of nuclei acid at various pH values

pH (反应前)	pH (反应后)	核酸提取率/ %	核酸沉淀率/ %
3	3.1	84.0	69.6
5	4.4	88.8	83.4
7	4.8	92.3	89.6
9	5.2	94.2	86.6
10	7.3	93.1	97.5
11	8.6	94.1	89.3

注 反应条件为菌体质量浓度 10 g/dL,温度 120 ℃,时间 2 h.

从表 2 可以看出,在起始 pH>7 时,核酸提取率大于 90%,核酸沉淀率也较高,说明在本实验条件下,核酸比较稳定.随着 pH 的增高,核酸的水解率逐渐减少.在 pH 接近中性(指反应后)时,核酸水解率为 2.5%,即基本不水解,再提高 pH,水解率逐渐增加,所以在提取核酸时应尽量保证提取后反应液的 pH 为中性.

另外,将上清液调至 pH 2 左右,有大量核酸沉淀,这进一步证明了高温处理并未破坏核酸.

3 结 语

1) 在弱碱性条件下,用高温提取核酸的方法代替通常所采用的碱性自溶法,不仅核酸的提取率大大提高,而且核酸与蛋白质的分离也较彻底.这为谷氨酸菌体的进一步综合利用打下了良好的基础,同时该方法还可用于其它微生物核酸类物质的提取.

2) 经实验,初步确定最佳工艺条件为:温度 120 ℃,时间 2 h,pH 9,菌体的质量浓度为 10 g/dL.在此条件下,核酸最高提取率可达 93.4%.

参考文献

[1] 吴振强,余若黔,罗宁等.谷氨酸菌体核酸释放条件的优化研究[J].华南理工大学学报,1997,25(9) 67~71.
[2] 王霜,吴振强,余若黔等.谷氨酸菌体破碎条件的优化研究[J].生物技术,1997,7(5) 26~30.
[3] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:人民教育出版社,1982.
[4] 蔡武城,袁厚积.生物物质常用分析法[M].北京:科学出版社,1982.

(责任编辑:李春丽)