

生物表面活性剂产生菌的分离培养及其产物特性研究^①

崔中利^{1*} 刘卫东¹ 齐耀程¹ 孙亮亮¹ 陈兵²

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095; 2 江苏省金湖县环境监测站 江苏金湖 211600)

摘要 从加油站受石油污染的土壤中分离到 1 株高效产生物表面活性剂的菌株,经鉴定为气生单胞菌(*Aeromonas* sp.)。并对其发酵液表面活性剂性能及稳定性进行分析,最佳条件下发酵液的表面张力可由 70.2 mN/m 降至 28.9 mN/m,对温度、pH、矿化度有较好的稳定性,维持 85 %以上油水乳化液稳定时间达到 350 h。对其发酵条件进行了优化,确定表面活性剂产生最适 C 源为 2 %甘油,以硝酸盐和铵盐作为 N 源对表面活性剂产生无影响。对其产生物表面活性剂进行提纯,经 TLC 分析初步确定该表面活性剂为糖脂类化合物。

关键词 生物表面活性剂;稳定性;发酵条件;糖脂

中图分类号 Q814.9

表面活性剂是一类重要的化工产品,在工业和日常生活中应用广泛。化学表面活性剂由于结构复杂难于生物降解,并含有大量的磷,其大量应用造成了严重的环境污染。生物表面活性剂是由微生物产生的具有表面活性的两性化合物。与化学合成的表面活性剂相比,它们除具有降低表面张力、稳定乳化液和发泡等相同特性外^[1],还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的环境友好特性,它们在医药、化妆品、洗涤剂 and 食品等工业方面具有潜在的应用价值。此外在难溶性有机化合物如 PAH、PCB、石油烃的修复中,生物表面活性剂具有重要的作用^[2, 3]。因此,近年来对它的研究日益增多。微生物产生的生物表面活性剂包括许多不同的种类^[4],如糖脂、脂肽、多糖-脂类复合物、磷脂、脂肪酸和中性脂等。它们主要是由利用碳氢化合物作为 C 源的微生物产生,用来乳化这些 C 源,以利菌体的吸收^[5~9]。本文报道了在研究 PCB 土壤污染修复过程中 1 株产糖酯表面活性剂的微生物菌株的分离及其所产表面活性剂特性。

1 材料和方法

1.1 菌种分离土壤样品

供试土壤样品采自南京市加油站内长期受汽油污染的土壤。

1.2 实验所用培养基

(1) 细菌富集培养基:硫酸铵 10.0 g,氯化钾

1.1 g,氯化钠 1.1 g,硫酸亚铁 28×10^{-4} g,磷酸二氢钾 3.4 g,磷酸氢二钾 4.4 g,硫酸镁 0.5 g,酵母膏 0.5 g,微量元素溶液 5.0 ml,正烷烃 20 ml,水 1 L。
(注:微量元素溶液(g/L):硫酸锌 0.29,氯化钙 0.24,硫酸铜 0.25,硫酸镁 0.17);正烷烃在接种后用细菌过滤器过滤除菌后加入。

(2) 发酵培养基:磷酸氢二钠 4.0 g,磷酸二氢钾 1.5 g,氯化铵 1.0 g,硫酸镁 0.2 g,柠檬酸铁铵 0.005 g,氯化钙 0.01 g,水 1 L,葡萄糖 2.0 g,pH 7.2;培养基经 115°C 灭菌 30 min,备用。

1.3 菌体在发酵液中的生长量

用分光光度仪于 600 nm 处测定。

1.4 表面张力测定

初测用 96 孔微孔板法^[10],精确测量用最大气泡法^[11];ZL-2 型表面张力测定仪由博山同业分析仪器厂生产。

1.5 表面活性物质的分离和纯化

具体步骤参见文献^[12]。

1.6 发酵液乳化性能(emulsifier activity, EA)的测定

取一刻度试管,加 4 ml 油和 4 ml 表面活性剂溶液(浓度与原始发酵液相同),用 WH2 微型旋涡混合仪混匀,在避光低温下静置,在不同时间测量乳化液和油相体积。

1.7 表面活性物质的化学成分分析

薄层层析(TLC)分析:将纯化的表面活性剂进行

^①中国科学院创新项目(KZCX3-SW-417),国家自然科学基金项目(40371069)和南京农业大学 SRT 项目校级重点项目(03091301)资助。

*通讯作者(czl@njau.edu.cn)

薄层层析, 展开剂为氯仿/甲醇/水(65/15/2, v/v/v)。显色剂为: ①苯酚-硫酸试剂: 3 g 苯酚和 5 ml 浓硫酸溶于 95 ml 乙醇中, 糖脂显棕色斑点。②钼酸铵-高氯酸显色剂: 磷脂显色剂, 参见文献[13]。③茚三酮显色剂: 0.5% 无水丙酮溶液。脂肽显红色。

1.8 不同因素对发酵液性能的影响

在不同温度(4°C~100°C)、pH(0.5~14.0)和矿化度(NaCl 离子浓度从 5.0×10^3 mg/L 往上直至溶液饱和)条件下, 最大气泡法分别测定发酵液各个处理各经一段时间后的表面张力。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂产生菌的筛选与鉴定

将土样以 5% 接种量接种入富集培养基中, 28°C 摇瓶振荡培养 5~7 天。从富集液中进行划线分离, 将分离得到的菌株液体试管发酵培养 3~5 天, 用 96 孔微孔板法进行表面活性剂产生菌初筛, 获得具有较强表面活性能力的菌株 10 株。用 96 孔微孔板法在无菌条件下连续测定 10 株菌发酵液中活性剂产生情况, 选出其中表面活性剂产生时间最短, 且发酵液表面张力低的菌株作为表面活性剂产生菌, 命名为 BEM-1。

BEM-1 菌种鉴定: 该菌革兰氏染色阴性, 菌体圆形或小杆状 $1.1 \mu\text{m} \times 0.6 \mu\text{m}$, 菌落白色圆形。氧化酶阴性, 接触酶阳性, vp 反应阳性, mr 阴性, 吡啶反应阳性。能够液化明胶, 还原硝酸盐, 不运动, 不水解淀粉, 产硫化氢。发酵葡萄糖产酸, 产气, 发酵乳糖不产酸, 不产气; 开管和闭管均能发酵蔗糖产酸。能利用麦芽糖, d-半乳糖。参照《常见细菌系统鉴定手册》以及《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)第 7 版将该菌鉴定为气生单胞菌属 *Aeromonas* (Kluyver and van Niel, 1936)。

2.2 BEM-1 产表面活性剂性能的测定

用最大气泡法在室温测定不同质量浓度表面活性剂溶液的表面张力, 最佳条件下发酵液的表面张力可由 70.2 mN/m 降至 28.9 mN/m。由表面张力浓度曲线求得表面活性剂临界胶束浓度^[14], 由图 1 可知表面活性剂的 CMC 值为 0.11 g/L, 和一般化学表面活性剂的 CMC 值接近^[15]。

乳化性能是乳化剂的另外一个重要指标。乳化效果测定结果表明 (图 2), BEM-1 发酵液能维持煤油与水乳化液 85 % 以上的乳化稳定性达 14 天以上,

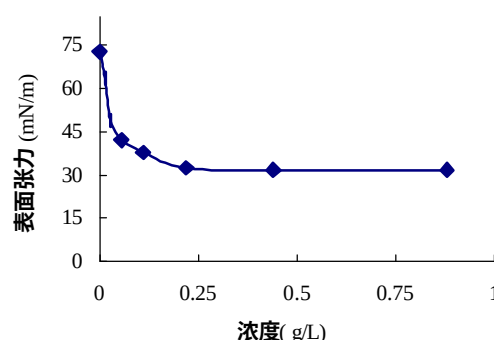


图 1 BEM-1 产表面活性剂的 CMC 测定

Fig. 1 CMC of the biosurfactant

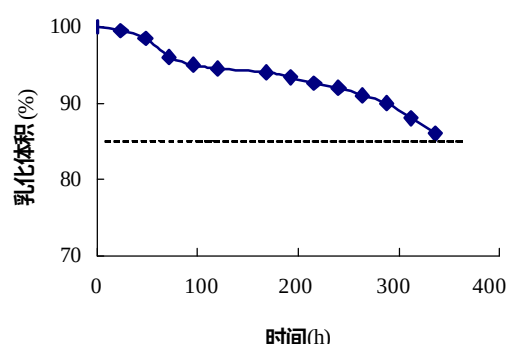


图 2 发酵液的乳化效果

Fig. 2 Stability of oil-water emulsion formed by fermentation

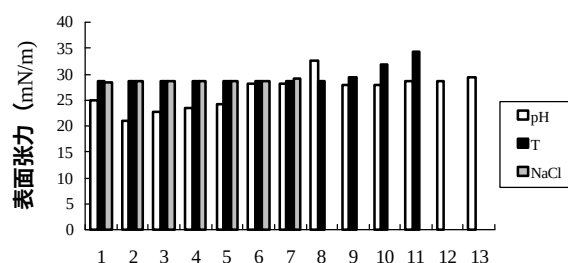


图 3 环境条件对表面活性剂稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH, temperature, and NaCl concentration on stability of the biosurfactant

图例说明: pH 从 1-13 分别为 0.5, 1, 2, 3.5, 4.5, 5, 6, 7.5, 8.5, 9, 11, 12, 14
温度 (T) 从 1-11 分别为 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C
NaCl 浓度从 1-7 分别为 5, 10, 30, 200, 250, 300, 350 g/L

说明其所产表面活性剂性能良好。

2.3 环境条件对 BEM-1 所产表面活性剂性能的影响

一般表面活性剂的性能受到环境条件的影响。我们测定了 pH、温度和盐度等因素对 BEM-1 所产表面活性剂的影响。将发酵液的 pH 分别调至 0.5~14 处理一段时间, 测定不同 pH 发酵液的表面张力。当 pH 值降低到 0.5 以下以及 pH 值升高到 14 时, 发酵液的表面张力略有上升, 但是变化不大, 表明发酵液的性质随 pH 影响不大, 结果见图 3 (pH)。当 pH<5 时发酵液为无色, 但是当 pH>7 且逐渐增大时

发酵液的颜色开始逐渐变黄。在 40℃~100℃的条件下,温度对发酵液表面张力的影响不大(图 3,T 系列)。

用 NaCl 将发酵液的矿化度分别调至 $5.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^5$ mg/L 直至饱和,测定具有不同矿化度发酵液的表面张力。图 3 (NaCl) 的数据表明,矿化度对发酵液的表面张力几乎没有影响,当发酵液中 NaCl 已达饱和时,发酵液的表面张力也没有迅速变大。

2.4 发酵条件的优化

用生长谱法选出该菌能利用的 C 源和 N 源,在参考筛选培养基的基础上,正交法设计不同 C、N 源浓度水平的发酵液培养基。接种培养一段时间后,观察发酵液的乳化情况,用 96 微孔板结合最大气泡法测其表面张力,同时测定菌体的生长量,选出表面张力最小且乳化效果最好且产生活性剂的时间最短的发酵条件。实验结果表明在一定浓度 C 源条件下,同浓度的硝酸盐和同浓度的铵盐的发酵效果几乎相同,可采用原培养基中的 N 源做发酵的最佳 N 源。由图 4 可以看出,在相同 C 源浓度下,甘油的发酵效果最好。不同浓度甘油的发酵液,发酵 72 h 后的菌的生长情况和活性剂产生情况见图 5。结果表明甘油浓度在 20 g/L 时,菌的生长量和活性剂的

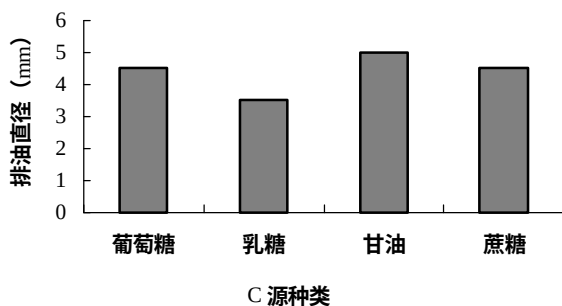


图 4 不同 C 源发酵液的效果

Fig. 4 Effect of carbon sources on production of biosurfactant

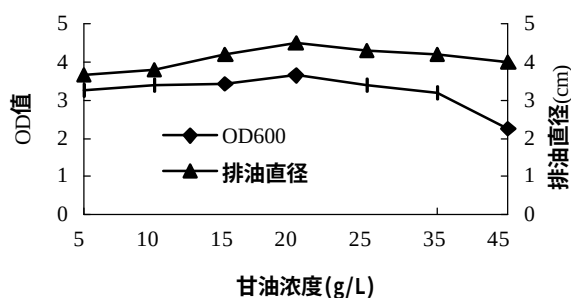


图 5 不同浓度甘油的发酵情况

Fig. 5 Effect of glycerol concentration on production of biosurfactant

产生均较多。在以 NH_4^+ 为 N 源, 2 % 甘油为 C 源条件下, 菌株 BEM-1 产表面活性剂能力最强。

2.5 生物表面活性剂提取化学结构分析

表面活性物质的分离和纯化: 将发酵液 8000 r/min, 4℃ 离心 20 min 处理 2 次除菌体。将上清液用 12 mol/L 的盐酸调至 pH 2.0, 出现絮状沉淀, 4℃ 静置过夜; 再离心处理 (10000 r/min, 30 min, 4℃), 倒掉上清液, 用尽量少的 pH 为 2.0 的盐酸溶液将离心管中的沉淀洗下, 用 1 mol/L 的 NaOH 将沉淀的 pH 调至 7.0, 冷冻干燥, 得到黄褐色疏松状的固体, 即表面活性剂粗产品。将粗产品用 CH_2Cl_2 萃取, 减压蒸馏, 用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶解, 用滤纸过滤, 再用 12 mol/L 的盐酸将滤液的 pH 调至 2.0, 再次出现沉淀, 4℃、10000 r/min 离心 30 min, 得淡黄色沉淀, 冷冻干燥即为纯化的表面活性剂。发酵液中生物表面活性剂的产量为 2.1 g/L。

采用毛细管定量上样纯化的表面活性剂 10 μL , 展开 30 min 后干燥用苯酚硫酸显色, 在 Rf 值 0.67 处出现棕色斑点, 表明 BEM-1 所产生物表面活性剂的主要成分为糖脂类化合物。

3 讨论

生物表面活性剂由于其良好表面活性性能和环境可容纳性, 在精细化工及难降解有机化合物生物修复中具有重要的应用前景。生物表面活性剂的应用取决于能否分离到性能良好的产生菌。在表面活性剂产生菌的筛选中常用血平板作为选择培养基, 存在着成本高、制备难等问题。本文采用一种 96 孔微孔板法筛选策略, 成功的分离到多株表面活性剂产生菌。该法的基本程序是把预先处理干净的 96 酶标板编号, 并在每个孔中滴加 2 μL 矿物油, 涂匀并盖上盖子浸润 1 h, 让油和塑料板充分接触, 然后每孔滴加 5 μL 发酵液上清液, 不同处理之间滴加蒸馏水做对照。1~2 分钟后, 记录液滴扩散直径。用浓度和表面张力对应关系已知的阴离子表面活性剂如十二烷基硫酸钠测定一系列直径和浓度相对应的数据, 并依之作出标准曲线, 可以测定待测溶液中表面活性剂的浓度。96 孔微孔板法具有快速、可以进行半定量分析的特性, 在产生物表面活性剂菌株的筛选中具有重要的应用价值。

本研究筛选到了 1 株产糖脂类生物表面活性剂的细菌 *Aeromonas* sp. BEM-1, 所产表面活性剂性能稳定, 在极端的温度、pH 和矿化度条件下表面活性

性能保持不变(图3、4、5)。BEM-1 所产表面活性剂在 PCB 等难降解有机污染物的修复中具有潜在应用价值。同时其优良的产表面活性剂特性为研究生物表面活性剂合成途径和生产生物表面活性剂提供了良好的菌种材料。

参考文献

- 1 方云, 夏咏梅. 生物表面活性剂. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, 143
- 2 Makkar RS, Rockne KJ. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Toxicol. Chem., 2003, 22 (10): 2280 ~ 2292
- 3 Prabhu Y, Phale PS. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 61(4): 342 ~ 351
- 4 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 李江云, 李祖义. 生物表面活性剂产生菌的筛选. 微生物学报, 1999, 39 (3): 265 ~ 267
- 5 陈宝梁, 朱利中, 林斌, 陶澍. 阳离子表面活性剂增强固定土壤中的苯酚和对硝基苯酚. 土壤学报, 2004, 41 (1): 148 ~ 151
- 6 刘世亮, 骆永明, 曹志洪, 丁克强, 蒋先军. 多环芳烃污染土壤的微生物与植物联合修复研究进展. 土壤, 2002, 34 (5): 257 ~ 265
- 7 张超兰, 徐建民, 姚斌. 阿特拉津污染胁迫下土壤微生物生物量对外源有机无机物质的响应. 土壤学报, 2004, 41 (2): 323 ~ 326
- 8 黄敏, 肖和艾, 黄巧云, 李学垣, 吴金水. 有机物料对水旱轮作红壤磷素微生物转化的影响. 土壤学报, 2004, 41 (4): 584 ~ 589
- 9 Chilima J, Huang Changyong, Wu Cifang. Microbial biomass carbon trends in black and red soils under single straw application: Effect of straw placement, mineral N addition and tillage. Pedosphere, 2002, 12 (1): 59 ~ 72
- 10 Adria A Bodour, Raina M, Miller-Maier. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. Journal of Microbiological Methods, 1998, 32 (3): 273 ~ 280
- 11 孙尔康, 徐维清, 邱金恒. 物理化学实验. 南京: 南京大学出版社, 1998, 110 ~ 115
- 12 Cooper DG, Macdonald CR. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Appl. Environ. Microbiol., 1981, 42 (3): 408 ~ 412
- 13 Egon Stahl. Thin layer chromatography: a laboratory handbook. Springe Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1969, 259 ~ 260
- 14 Macdonald CR, Cooper DG, Zajic JE. Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbon. Appl. Environ. Microbiol., 1981, 41: 117 ~ 123
- 15 梅建凤, 闵航. 生物表面活性剂及其应用. 工业微生物, 2001, 31 (1): 54 ~ 57

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERISTICS OF THE BIOSURFACTANT

CUI Zhong-li¹ LIU Wei-dong¹ QI Yao-cheng¹ SUN Liang-liang¹ CHEN Bing²

(1 Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 2 Environment Quality Inspection Station of Jinhu County, Jinhu, Jiangsu 211600)

Abstract A strain of bacteria able to produce biosurfactant was isolated from oil-polluted soils. It was identified as *Aeromonas* sp.. The biosurfactant in fermentation broth was able to reduce the surface tension of water from 70.2mN/m to 28.9mN/m and showed great stability against temperature, pH and mineralization. The biosurfactant could stabilize the broth over 85% for 350h. The optimal carbon source for fermentation of the biosurfactant was 2.0% glycerol. NO₃⁻ or NH₄⁻ as nitrogen source had no difference for biosurfactant production. The biosurfactant was extracted from fermented broth and analysed by TLC. Analytic results showed that this biosurfactant was a kind of glycolipid.

Key words Biosurfactants, Stability, Fermentation condition, Glycolipid