

# 一株石油降解菌产表面活性剂条件的优化<sup>①</sup>

高小鹏, 姜 钊, 高秀梅, 张卫花

(延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000)

**摘要:** 利用 Minitab 软件, 采用 Plackett-Burman 设计、选择了温度、转速、pH、加油量、时间 5 个因素对一株石油降解菌 CT-6(*Pseudomonas aeruginosa*)产表面活性剂的条件进行了优化。结果表明: 当温度为 35℃、加油量为 4%、pH 为 8.0、转速为 213 r/min、培养时间为 152 h 时, 产生的表面活性剂排油效果最好, 排油圈达 6.4 cm, 乳化性能达 92%, 细胞表面疏水性达 41%, 比优化前分别提高了 35.9%、29.6%、64%。

**关键词:** 表面活性剂; Minitab 软件; 产生条件; 优化

**中图分类号:** X172

生物表面活性剂(Biosurfactant)是微生物在一定条件下产生的具有表面活性的代谢产物<sup>[1]</sup>, 具有降低表面张力、稳定乳化液等特性, 还具有无毒、可自然降解、生态安全及高表面活性和生理活性等优点<sup>[2]</sup>, 在石油、环保、食品工业等领域广泛应用<sup>[3]</sup>。目前, 有关生物表面活性剂产生菌已经有大量报道, 并对生物表面活性剂的结构和类型也都有了较深层次的研究<sup>[4]</sup>, 但对微生物产表面活性剂的条件优化却鲜有报道。本试验采用 PB 设计、Box-Behnken 试验以及响应面分析对一株石油降解菌产表面活性剂的条件进行优化, 以期有效提高微生物产表面活性剂的活性, 为表面活性剂的生产 and 广泛应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 试验菌株** 试验用石油降解菌 CT-6 由延安大学生命科学学院微生物实验室提供。

**1.1.2 试验油样** 试验所用原油采自延长油田股份有限公司七里村采油厂第三采油大队。

**1.1.3 培养基** LB 培养基, 发酵培养基<sup>[5]</sup>。

### 1.2 试验方法

排油圈的测定参照文献<sup>[6]</sup>; 乳化性能的测定参照文献<sup>[7-10]</sup>; 细胞表面疏水性的测定参照文献<sup>[11]</sup>。

### 1.3 试验设计

**1.3.1 Plackett-Burman 设计** 根据发酵过程中的

影响因素, 本试验选取温度、转速、pH、加油量、时间 5 个因素进行考察, 接种量为 8%。选用  $n=12$  的 PB 试验设计, 每个因素分别选高低两水平, 响应值为排油圈大小。每组试验重复 3 次, 同时设对照组。

**1.3.2 最陡爬坡试验** 根据 PB 试验结果, 确定影响显著的因子, 以试验值变化的梯度方向为爬坡方向, 各自变化的步长由效应值大小而定(效应值越大步长越大), 设置最陡爬坡试验, 其他因素不变。每组重复 3 次, 目的为下一步进行的 Box-Behnken 试验找到中心组合点。

**1.3.3 Box-Behnken 设计** 以爬坡所得的数据组合为中心进行 Box-Behnken 试验设计, 其他因素不变。根据中心组合原理, 设计 3 因素 3 水平 15 试验点的试验, 同样每组重复 3 次, 取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 影响发酵条件的主要因素确定

PB 试验设计及结果见表 1。

对表 1 进行 pareto chart 图分析及水平和主效应分析, 见图 1、表 2。

由 pareto 图及主效应分析可知: pH、时间两因素对试验结果影响达到极显著水平, 转速达到显著水平, 其他两因素没有达到显著性。因此, 选取 pH、时间和转速作为主因素进行下一步试验。

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL01-18)、延安市科技计划项目(2011ks-38)、陕西省教育厅科研计划项目(12JK0845)和延安大学大学生科技创新训练计划项目(D2011-40) 资助。

作者简介: 高小鹏(1976—), 男, 陕西洛川人, 硕士, 讲师, 主要从事资源与环境微生物学研究。E-mail: gaopengyd@163.com

表 1 PB 试验设计及试验结果  
Table 1 PB design and test results

组别	转速 (r/min)	温度 (°C)	pH	加油量 (%)	培养时间 (h)	排油圈 (cm)
1	200	30	6.5	3	192	2.8
2	180	35	6.5	3	144	3.7
3	180	30	8.0	4	192	2.8
4	200	30	8.0	4	144	6.3
5	180	35	8.0	3	192	3.3
6	200	35	8.0	3	192	4.5
7	200	30	8.0	3	144	5.8
8	180	30	6.5	3	144	3.0
9	180	35	8.0	4	144	6.2
10	180	30	6.5	4	192	2.8
11	200	35	6.5	4	144	5.3
12	200	35	6.5	4	192	3.3

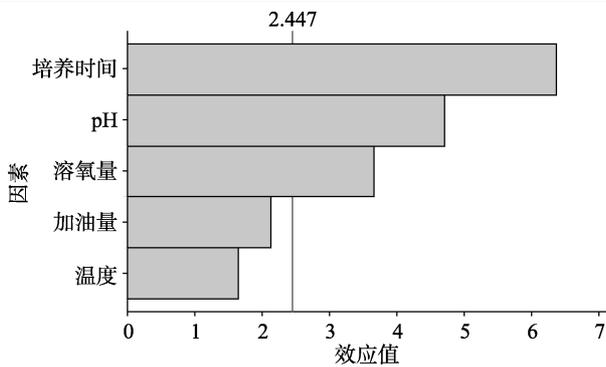


图 1 试验结果 pareto chart 图  
Fig. 1 Pareto chart of test results

表 2 Plackett-Burman 试验因素水平及其主效应分析  
Table 2 Plackett-Burman experiment factor levels and main effect analyses

编号	因素	低水平	高水平	T 值	P 值	重要性 排列
1	转速(r/min)	180	200	3.65	0.011	3
2	pH	6.5	8	4.71	0.003	2
3	温度(°C)	30	35	1.65	0.150	5
4	加油量(%)	3	4	2.12	0.078	4
5	培养时间(h)	144	192	-6.36	0.001	1

2.2 通过最陡爬坡设计选出因素影响试验设计的中心点

通过图 1 及表 2 的结果,再用 Minitab 的主效应分析中效应值的大小及正负确定爬坡试验的方向和步长。根据表 2 效应值温度和初始加油量分别选取最大值,分别为 35°C 和 4%,接种量为 8%,设计及结果见表 3。

从表 3 的试验结果来看,最佳结果应处于第 3 组,故以第 3 组为后续试验响应面设计的中心点。

2.3 Box-Behnken 试验

在爬坡试验的基础上,以转速 200 r/min、pH7.5、

时间 144 h 为中心,其他条件不变,同时上下各取一水平进行 Box-Behnken 试验,试验设计及结果见表 4。

表 3 最陡爬坡试验及结果  
Table 3 Steep hills experiment and results

组别	pH	转速(r/min)	时间(h)	排油圈(cm)
1	8.5	220	96	2.8
2	8.0	210	120	4.2
3	7.5	200	144	6.1
4	7.0	190	168	5.4
5	6.5	180	192	3.0

表 4 Box-Behnken 试验设计表及结果  
Table 4 Design of Box-Behnken experiment and results

运行序	时间(h)	PH	转速 (r/min)	排油圈 (cm)
1	-1	1	0	4.0
2	0	1	1	6.2
3	0	0	0	6.0
4	0	-1	1	3.7
5	0	-1	-1	3.6
6	0	0	0	6.3
7	0	1	-1	4.0
8	-1	0	-1	3.4
9	0	0	0	6.1
10	1	1	0	5.4
11	1	0	1	5.8
12	-1	-1	0	3.2
13	1	0	-1	4.4
14	-1	0	1	4.8
15	1	-1	0	4.1

2.3.1 二次回归拟合及方差分析 将 Box-Behnken 试验结果用 Minitab 软件进行回归拟合后得到编码回归方程为： $Y = 6.133 + 0.538E + 0.625C + 0.638A - 0.867E^2 - 1.092C^2 - 0.667A^2 + 0.525AC$ , 其中, Y 为排油圈(cm); E 为时间(h); C 为 pH; A 为转速(r/min)。对回归方程进行回归方差分析,结果见表 5。

从以上数据可知本试验存在显著的线性影响,又存在显著的交互作用影响和二次项影响。失拟  $P = 0.384 > 0.05$ ,失拟不显著,说明数据中没有异常点,不需要引入更高次数的项,模型适当。

2.3.2 响应面分析及最优条件的确定 通过回归方程绘制分析图,响应面分析见图 2。由响应面分析图可知,3 因素对 Y 的影响都是非线性的,因为表面图发生明显弯曲。

对该结果进行 RSA 分析,结果如图 3 所示。由 RSA 分析可以确定优化的 3 因素(转速、pH、时间)的最优点分别为(213.1 r/min, 8.0, 152 h),预测最佳排油圈大小为 6.58 cm。

表 5 方差分析表  
Table 5 Variance analysis table

来源	自由度	顺序偏差平方和	调整后偏差平方和	平均后偏差平方和	F 值	P 值
回归	9	17.56	17.56	1.952	57.68	0.000
线性	3	8.688	8.688	2.896	85.59	0.000
平方	3	7.712	7.712	2.571	75.98	0.000
交互作用	3	1.165	1.165	0.388	11.48	0.011
残差误差	5	0.169	0.169	0.034		
失拟	3	0.123	0.123	0.041	1.750	0.384
纯误差	2	0.047	0.047	0.023		
合计	14	17.73				

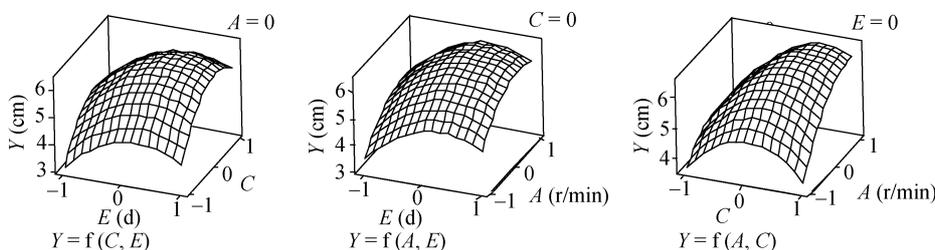


图 2 响应面立体分析

Fig.2 The three-d imensional analysis of response surface

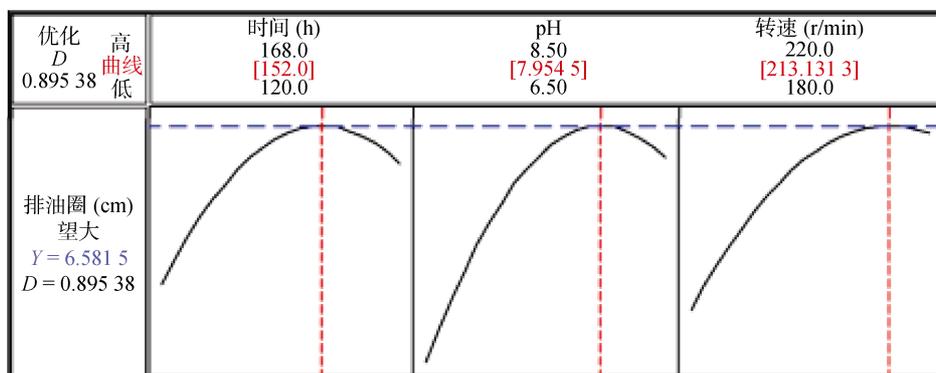


图 3 表面活性剂产生条件最优化分析图

Fig. 3 Optimization analysis of produce conditions of surface active agent

### 2.4 优化试验结果验证

以优化后的条件进行验证，其结果见表 6。由表 6 可知，优化后，排油圈的大小、乳化活性以及细胞表面疏水性分别提高了 35.9%，29.6%，64.0%，优化结果明显，而且和预测值基本相符。

### 3 讨论

本试验利用 Minitab 软件中的中心组合设计对产生表面活性剂的菌株 CT-6 的发酵条件进行优化，经

表 6 优化前后表面活性剂活性  
Table 6 Surfactants activities before and after optimization

	排油圈(cm)	乳化活性(%)	表面疏水性(%)
优化前	4.1	71	25
优化后	6.4	92	41

过方差分析、回归分析、RSA 分析和验证试验，得到了发酵的最佳水平，温度为 35℃，加油量为 4%，pH 为 8.0，转速 213.1 r/min，时间 152 h。优化后排油圈、乳化活性、细胞表面疏水性分别提高了 35.9%，29.6%，64.0%，表面活性剂活性得到了显著提高。

生物表面活性剂是一类能显著降低表面张力、提高乳化活性的物质，在工业生产和日常生活中的应用越来越广泛。然而，目前生物表面活性剂的应用不如合成表面活性剂广泛，其中一个重要原因是生物表面活性剂产量、活性太低<sup>[12]</sup>，而影响生物表面活性剂产量和活性的主要因素是生产菌种及其发酵条件，本试验通过优化提高了石油降解菌 CT-6 产生表面活性剂的活性，为生物表面活性剂高产、高活性生产奠定了基础。

现在对发酵条件的优化很多，部分试验<sup>[13-14]</sup>采用

单因素法来选择因子和正交试验法来优化。而将中心组合设计和响应面分析结合使用的优化方法较少,由于单因素不考虑因素之间的交互作用,正交试验只能在预先设计好的水平中选择,不能按照各因素的趋势找出某一条件下真正的最佳水平值。而本试验利用中心复合设计、响应面分析和 RSA 分析的方法找到各因素的最佳水平值,在优化设计与方法上得到了进一步的改善。

#### 参考文献:

- [1] Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants[J]. Environ. PoHut., 2005, 133(2): 183-198
- [2] Dhariwal A, Mohrdieck M, Leitermann F. Effect of emulsified feeding of oily substrate via submerged ceramic membranes on surfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* fermentation[J]. Bioprocess Biosyst Eng., 2008, 31: 401-409
- [3] 包木太, 范晓宁, 曹秋芳, 马爱青, 郭省学. 稠油降黏开采技术进展[J]. 油田化学, 2006, 23(3): 284-292
- [4] Noordman WH, Wachter JHJ, de Boer GJ, Janssen DB. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(2): 195-212
- [5] 杨乐, 李春, 鲁建江, 王开勇. 石油降解菌的筛选及其降解能力的初步研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2007, 25(4): 484-487
- [6] 毕思宁, 王彦杰, 左豫虎. 生物表面活性剂排油圈检测方法的改进和应用[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2009, 21(6): 58-60
- [7] 魏晓芳, 张忠智, 郭绍辉, 苏幼明, 罗一菁. 代谢表面活性剂菌处理含油污泥的研究[J]. 环境污染与防治, 2007, 29(1): 53-56
- [8] 潘斌峰, 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[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 264-267
- [9] 翟丽丽, 侯红漫, 靳艳, 张卫. *Pseudomonas palleroni* S6X 产脂肽生物表面活性剂的分离纯化及研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(3): 48-50
- [10] 冷凯良, 楚晓珉, 张辉珍, 李兆新, 尚德荣, 李晓川. 微生物对石油烃降解代谢产物的分析方法研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 57-61
- [11] 姜萍萍, 党志, 卢桂宁, 易筱筠, 杨琛, 郭楚玲. 鼠李糖脂对假单胞菌 GP3A 降解苊的性能及细胞表面性质的影响[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 485-491
- [12] Kim HS, Yoon BD. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16[J]. Applied Microbiological Biotechnology, 1999, 52: 713-721
- [13] 齐永强, 王红旗, 刘敬奇. 土壤石油微生物降解影响因子的正交实验分析[J]. 地球学报, 2003, 24(3): 279-284
- [14] 钱晓勇, 刘国庆, 宗凯, 张黎利. 一株生物表面活性剂产生菌筛选及其条件优化[J]. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 2009, 37(13): 5 848-5 850

## Optimizing Surfactant Produce Conditions for An Oil-degrading Stain

GAO Xiao-peng, JIANG Zhao, GAO Xiu-mei, ZHANG Wei-hua  
(College of Life Science, Yanan University, Yanan, Shaanxi 716000, China)

**Abstract:** The experiment was conducted with minitab software and applied Packett-Burman design with five factors, including temperature, pH, inoculate capacity, rotational speed and the initial amount of oil to optimize the surfactant produce conditions of oil degrading strain CT-6 (*Pseudomonas aeruginosa*). The results showed that when the temperature was 35°C, the original amount of oil 4.0%, pH 8.0, rotational speed 213 r/min, incubation time 152 h, the activity of surfactant which produced by strain CT-6 was best, the exhibit circle was 6.4 cm, emulsification performance reached 92%, cells hydrophobic was 41%, increased by 35.9%, 29.6%, 64.0%, respectively.

**Key words:** Surfactant, Minitab software, Produce conditions, Optimization