

生物絮凝剂的最新研究进展及其应用*

何 宁^{1**} 李 寅² 陈 坚² 李清彪¹

(厦门大学化学工程与生物工程系 厦门 361005)¹

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)²

摘要: 从絮凝剂的来源和分子组成两方面对生物絮凝剂进行了系统分类, 综述了生物絮凝剂产生菌的筛选模型以及生物絮凝剂在水处理和发酵工业中的应用, 详细阐述了目前国内、外提出的几种不同的生物絮凝剂絮凝机理, 进而在此基础上剖析了目前生物絮凝剂研究工作中仍然存在的问题, 并提出生物絮凝剂今后的主要研究方向。

关键词: 生物絮凝剂, 絮凝机理, 水处理, 发酵, 应用

中图分类号: TQ929+.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0104-05

Recent Investigations and Applications of Bioflocculant*

HE Ning^{1**} LI Yin² CHEN Jian² LI Qing-Biao¹

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Xiamen University, Xiamen 361005)¹

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)²

Abstract: Bioflocculant was first systematically classified from the point of origins and molecular structure. Screening models of bioflocculant-producing strains were presented together with the potential applications of bioflocculant in the field of water treatment and fermentation industry. Different flocculating mechanisms of bioflocculant were also detailed. Problems now still existing in current studies and practical applications of bioflocculant were discussed finally in this paper followed by the description of the main research focus of bioflocculant in the future.

Key words: Bioflocculant, Flocculating mechanism, Water treatment, Fermentation, Application

生物絮凝剂 (Bioflocculant) 是利用生物技术, 通过微生物发酵、提取、精制而得到的一种新型、高效、廉价的水处理药剂^[1]。自从 70 年代, 日本学者在研究酞酸酯生物降解过程中发现了具有絮凝作用的微生物培养液以来, 日本在生物絮凝剂这一领域的研究工作一直处于遥遥领先的地位^[2-4]。我国关于生物絮凝剂的研究工作只是 90 年代后才刚刚涉足, 目前仍处于起步阶段。尽管如此, 我国的研究者在这一领域仍然取得了一定的成绩, 并且已经有越来越多的人开始认识到生物絮凝剂的开发潜力及其必要性, 正在积极投入到这方面的工作中, 前景可喜^[5-8]。

本文主要从生物絮凝剂产生菌的筛选、生物絮凝剂的分子组成、性质、絮凝机理以及应用等方面对国内外已经和正在研究的生物絮凝剂进行系统全面综述, 并在此基础上对目前生物絮凝剂研究中仍然存在的问题进行了分析论证, 提出可能的解决方案。

* 国家自然科学基金资助 (No. 20176042)

福建省青年科技人才创新项目 (No. 2002J044)

** 通讯作者 Tel: 0592-2183088, E-mail: hening@xmu.edu.cn

收稿日期: 2004-05-17, 修回日期: 2004-07-09

1 生物絮凝剂产生菌的筛选模型

尽管国内外学者已经开发鉴定出多种不同类型的生物絮凝剂,但到目前为止,絮凝剂产生菌的筛选仍未有一个统一的模型,盲目性较大。在此,作者总结国内外文献报道,将絮凝剂产生菌菌株筛选的几种有效方法归纳如下:①菌落粘稠、粗糙,细胞具有荚膜;②菌株具有降解芳香族或烷烃类物质(如酚、煤油等)的能力;③向筛选培养基中加入 EDTA 等螯合剂用于分离离子依赖型絮凝剂合成菌株;④以水解酶(如蛋白酶 E,蛋白酶 K,胰蛋白酶和纤维素酶等)处理获得絮凝剂合成菌。

2 生物絮凝剂的种类

2.1 按化学组成分类 (1) 蛋白质: *Asp. sojae* AJ7002 合成的絮凝剂的主要活性成分是蛋白质和己糖胺;生物絮凝剂 NOC-1 也是一种蛋白质,并且该蛋白质分子中含有较多的疏水氨基酸。(2) 多糖:目前已经鉴定的生物絮凝剂有很多种属于多糖类物质。*Alcaligenes cupidus* KT201 代谢产生的 Al-201 即是一种由葡萄糖、乳糖、葡糖醛酸和乙酸(摩尔比:6.34:5.55:1.0)组成的生物絮凝剂;*Paecilomyces* sp. I-1 产生的 PF-101 絮凝剂则是由氨基半乳糖以(1,4 糖苷键相连而成的粘多糖^[2]。(3) 脂类:Kurane 首次从 *R. erythropolis* S-1 的培养液中分离到了一种脂类絮凝剂,这是目前发现的唯一的脂类絮凝剂^[9]。该絮凝剂分子中含有葡萄糖单霉菌酸酯(GM),海藻糖单霉菌酸酯(TM),海藻糖二霉菌酸酯(TDM) 3 种组分。(4) DNA:高分子量的天然双链 DNA 是 *Pseudomonas* C-120 菌体细胞凝集的直接原因。光合细菌——*Rhodovulum* sp. PS88 的絮凝活性与该菌分泌到胞外的 DNA 亦直接相关。

此外,某些菌的代谢物—PHB,聚 γ -谷氨酸,多聚磷酸盐,以及本课题组自筛菌株谷氨酸棒杆菌合成的多聚半乳糖醛酸等在特定条件下亦具有较强的絮凝活性^[10]。

2.2 按照生物絮凝剂的来源分类 (1) 利用微生物细胞壁提取物的絮凝剂:絮凝酵母的絮凝机理就在于细胞外壁的甘露聚糖与细胞表面蛋白结合引起细胞凝集^[11]。另外,酵母细胞壁的葡聚糖,N-乙酰葡萄糖胺,丝状真菌细胞壁多糖等对许多微生物细胞及其它带负电荷的粒子都具有极强的絮凝力。(2) 利用微生物细胞代谢产物的絮凝剂^[12]:*Zoogloea ramigera* 的胞内聚合物 PHB, *Saaran ventriculi* EC-1 产生的附着于细胞外表面的胞外纤维都是这些细胞具有絮凝活性的直接原因。

目前国内外学者研究开发的生物絮凝剂大多属于脱离菌体细胞游离于发酵液中的絮凝物质(如 Kurane 开发的 NOC-1;Takagi 研制的 PF-101 等)。与细胞的内源代谢物相比,此类生物絮凝剂往往因为具有更为广阔的应用领域而受到重视。

3 生物絮凝剂的分子组成与性质

近年来,国内外研究者借助各种技术手段对多种絮凝剂的组成与性质进行了较为详细的分析。现将部分生物絮凝剂的分子组成与性质归纳如表 1 所示。

某些生物絮凝剂的分子组成会随培养条件的改变而发生变化。*Mycobacteria* 和 *Nocardia* 合成的絮凝剂分子中霉菌酸的碳链长度及不饱和度会随培养温度的变化而变化;*Rhodococcus rhodochrous* 则能够通过改变培养基中的碳源而改变含霉菌酸的絮凝剂的分子结构。由此, Kurane^[9]曾设想,利用微生物的这一特性可以为通过改造分子结构,

构造更高活性的生物絮凝剂提供了有利条件。

表 1 目前已鉴定的部分生物絮凝剂的结构与性质

絮凝剂产生菌	絮凝剂分子组成	絮凝剂性质
<i>Aspergillus sojae</i>	20.9% 半乳糖胺, 0.3% 葡萄糖胺,	分子量 $>2 \times 10^6$; 活性范围: pH <4.0 , 30 ~ 80℃;
AJ7002	35.3% 2-酮葡萄糖酸, 27.5% 蛋白质	絮凝最适浓度 100 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$
<i>Paecilomyces</i>	PF-101: 半乳糖胺	分子量 3×10^5 ; 等电点 pH8.5
sp. I-1	其中, 80% 为 N-未取代半乳糖胺; 8% 为 N-乙酰化半乳糖胺	
<i>Alcaligenes</i>	Al-201: 42.5% 葡萄糖, 36.38% 半乳糖,	分子量 $>2 \times 10^6$
<i>cupidus</i> KT201	8.52% 葡萄糖醛酸, 10.3% 乙酸组成 的多聚糖	
<i>Rhodococcus</i>	多肽和甘油酯的复合体;	分子量 $>10^6$; 酸性 pH、阳离子存在下有
<i>erythropolis</i> S-1	脂质组成: GM, TM, TDM	活性; 100℃/15min, 活性降低约 50%; 对蛋白酶敏感
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Pestan: 葡萄糖, 葡萄糖胺, 葡萄糖醛酸, 鼠	浓度为 1mg/mL 时, 活性最高; 70℃ 以下稳定
KCTC 8637P	李糖 (100; 35; 1.5; 1.3; mol/mol)	

4 生物絮凝剂的分子生物学研究^[11]

Stewart 和 Russell 曾经对啤酒酵母细胞的絮凝基因进行过比较系统的研究, 他们发现, 某些啤酒酵母的絮凝作用是受到胞内的 *FLO1* 基因的控制, 该基因位于染色体 I 上, 并与与其相距 38 centimorgan 的 *adel* 基因相连。其后, MiKi 在此基础上提出了酵母细胞的絮凝机制模型。Sinskey 将两株 *E. coli* 作为供体菌株, 应用三亲接合手段 (triparental mating) 将野生菌株 *Zoogloea ranigera* 115 体内的 cosmid *pLAFR3* 基因组引入不具絮凝活性的 *Z. ranigera* F. 16-M 突变株中, 从而使后者在液体培养液中生长时也具有了絮凝活性。这项成果目前已经获得了专利。

5 生物絮凝剂的絮凝机理

5.1 “桥联作用”机理 对于游离于产生菌胞外的絮凝剂的絮凝机理, 目前较为普遍接受的是“桥联作用”机理。该学说认为, 大分子生物絮凝剂的絮凝过程是几个物理化学过程共同作用的结果:

(1) 吸附架桥作用: 絮凝剂大分子借助离子键、氢键和范德华力, 同时吸附多个胶体粒子, 在颗粒间产生架桥现象, 从而形成一种网状三维结构沉淀下来 (图 1)。Levy 以吸附等温线和 (-) 电位测定证明环圈项圈藻 PCC-6720 所产絮凝剂对膨润土絮凝过程确以“桥联”机制为基础^[13]。

(2) 电中和作用: Levy 在研究 *Cyanobacterium phormidium* Strain J1 产生的絮凝剂 F-J1 时指出^[13], 在胶体颗粒的絮凝过程中, 电中和效应也是不容忽视的。溶液中带有多个电荷的多价电解质能够与颗粒表面带的相反电荷发生中和, 从而减弱颗粒间彼此的相互排斥力, 促进颗粒的絮凝沉降, 为絮凝剂的架桥提供了有利条件。

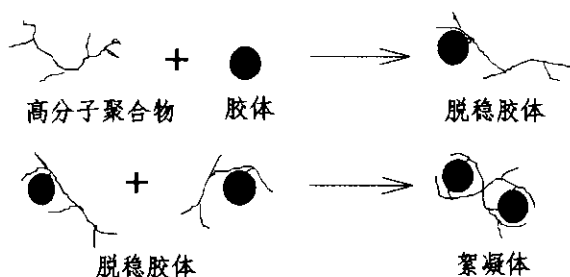


图 1 高分子聚合物的吸附架桥机理

(3) 卷扫作用(网捕作用): 形成小粒絮体的絮凝剂在重力作用下沉降的过程中, 犹如一个过滤网下降, 迅速卷扫水中胶粒产生沉淀。卷扫作用基本是一种机械作用。

R. 艾克斯则将絮凝剂的架桥-絮凝反应过程归结为 3 个阶段: ①聚合物在液相中分散; ②聚合物于界面处吸附; ③-a 界面处吸附的聚合物压缩而产生保护作用或“胶溶作用”; ④-b 部分覆有聚合物的颗粒相互碰撞, 形成架桥。

其中, ③-a 和④-b 互相竞争, 二者竞争的结果取决于絮凝剂的浓度。当溶液中聚合物浓度高时, 会发生胶溶作用, 以致无法实现架桥。艾克斯的架桥絮凝反应过程从机理的角度对“絮凝剂的最适浓度”问题作出解释。

5.2 “类外源絮凝素”假说 “类外源絮凝素”假说很好地解释了酵母菌的絮凝机理: 絮凝酵母细胞壁上的特定表面蛋白与其它酵母细胞(絮凝和非絮凝细胞)表面的甘露糖残基之间的专一性结合引起絮凝。

5.3 “菌体外纤维素纤丝”学说 “菌体外纤维素纤丝”学说则主要是针对纤维素类絮凝剂的絮凝机理提出的, 由于部分引起絮凝的产生菌体外有纤丝, 因而该学说认为是由于胞外纤丝聚合形成絮凝物。“类外源絮凝素”假说和“菌体外纤维素纤丝”假说对非游离态生物絮凝剂的作用机理作出合理解释。

总之, 絮凝过程是一个复杂的过程, 为了更好地解释机理, 需要对特定絮凝剂和胶体颗粒的组成、结构、电荷、构象及各种反应条件对它的影响进行更深入的研究。

6 生物絮凝剂的应用

生物絮凝剂作为一类新型絮凝剂, 其广谱的絮凝活性, 可生物降解性及应用安全性显示了它在水处理和发酵工业等方面的应用前景。

6.1 水处理 生物絮凝剂在水处理方面主要用于废水脱色、澄清、膨胀污泥的复性、乳浊液的油水分离等。由于以上各点在许多综述报道中均有所涉及, 这里不再赘述。

6.2 发酵工业 生物絮凝剂表现出的对微生物细胞广谱良好的絮凝沉降效果为其在发酵工业后处理中的实际应用奠定了基础。利用絮凝剂来沉降菌体细胞可使能耗大大减少, 而且操作简单, 因而可望成为取代传统的离心或过滤方法的新手段^[2]。

6.3 重金属的富集 *Bacillus cereus* 被成功地用于黄金、白钨矿以及其它矿物质等贵重稀有金属类化合物的富集提取。除此之外, 很多絮凝剂产生菌都具有吸附重金属离子的能力, 如处于非生长状态的 *Zoogloea* 115 能吸附高浓度重金属 (Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+}) (300 ~ 800 mg/L); *P. denitrificans* 和 *Z. filipendula* 也具有吸附多种重金属离子的能力。尽管目前此类文献报道仍然较少, 但将生物絮凝剂用于重金属的富集这一领域却具有很大的可开发空间。

7 目前生物絮凝剂研究中仍存在的问题

尽管生物絮凝剂独特的优越性已经显示了其广阔的应用前景,但到目前为止,生物絮凝剂在实际生产中尚未得到推广应用。生产成本过高一直成为障碍其推广的主要原因。

(1) 原材料价格高:对一般的絮凝剂产生菌来讲,葡萄糖和果糖通常是絮凝剂合成的最佳碳源,而酵母膏和牛肉膏,酪蛋白,酪氨酸往往是絮凝剂合成的最适氮源,这些高价值原材料的使用使絮凝剂的合成成本大幅提高。因此,为了降低生物絮凝剂合成成本,必须寻找廉价原料来代替高价原料,开发低成本培养基,这也成为近几年来国外众多絮凝剂工作者的主要研究目标。

(2) 絮凝剂产量低,絮凝活性弱:生物絮凝剂产量低,絮凝活性弱是导致其生产成本过高的根本原因。产生这种现象的主要原因有:①菌株自身潜力不够,产絮凝剂能力弱;②未赋予菌株絮凝剂合成的最佳营养条件(主要指培养基组成);③未处于絮凝剂合成的最佳发酵条件(通气量, pH, 温度等);④未达到最佳的絮凝条件。

因此,要想提高生物絮凝剂活性或产量,降低其生产成本,除了充分挖掘高产菌株自身的潜力,同时还需要对生物絮凝剂的发酵过程以及絮凝剂分子本身的结构特性、絮凝机制等方面进行系统研究,生物絮凝剂絮凝机理的研究将有助于控制其最佳絮凝条件,充分发挥生物絮凝剂的絮凝能力。更重要的,从分子生物学的角度深入研究控制生物絮凝剂合成与分解代谢的基因组成才是提高其产量的最根本途径。采用代谢工程的手段实现絮凝剂产量的大幅度提高将成为今后生物絮凝剂领域最主要的研究方向之一。作者及其课题组成员目前正在进行这一领域的研究工作^[14,15]。

参考文献

- [1] 陈元彩,肖 锦. 环境科学进展, 1999, 7 (3): 84 ~ 89.
- [2] Takagi H, Kadowaki K. Agric Biol Chem, 1985, 49 (11): 3159 ~ 3164.
- [3] Kurane R, Toeda K, Takeda K, et al. Agric Biol Chem, 1986, 50: 2309 ~ 2313.
- [4] Kurane R, Nohata Y. Agric Biol Chem, 1991, 55: 1127 ~ 1129.
- [5] 庄源益,戴树桂,李 彤,等. 水处理技术, 1997, 23 (6): 349 ~ 353.
- [6] He N, Li Y, Chen J, et al. Biochem Eng J, 2002, 11: 137 ~ 148.
- [7] 卢文玉,张 通,张冬艳,等. 微生物学通报, 2002, 29 (2): 17 ~ 21.
- [8] 叶晶菁,谭天伟. 微生物学通报, 2001, 28 (4): 31 ~ 35.
- [9] Kurane R, Hatanochi K, Kakuno T, et al. Agric Biol Chem, 1995, 59: 1652 ~ 1656.
- [10] 何 宁,李 寅,陈 坚. 化工学报, 2002, 53: 1022 ~ 1027.
- [11] Miki B L A, Poon N H, James A P, et al. J of Bacteriology, 1982, 150 (2): 878 ~ 889.
- [12] Cratree K, McCoy E, Boyle W C, et al. Appl Microbiol, 1965, 13 (2): 218 ~ 226.
- [13] Levy N, Bar-Or Y, Magdassi S. Colloids and Surfaces, 1990, 48: 337 ~ 349.
- [14] He N, Li Y, Chen J. Biores Technol, 2004, 94: 99 ~ 105.
- [15] Li Y, He N, Guan HQ Chen J. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 63: 200 ~ 206.