

烃降解菌株 T7-2 产生的生物乳化剂及其理化性质研究

李丹 黄磊 李国强 李召雨 马挺 梁凤来* 刘如林

(南开大学生命科学学院 天津市微生物功能基因组学重点实验室 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: 从石油污染海域海底泥中筛选到的 1 株低温石油烃降解菌, 经鉴定为红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*), 命名为 T7-2。该菌株能以十六烷为碳源代谢产生一种对柴油等烃类具良好乳化作用的生物乳化剂。研究表明, 该乳化剂主要由糖类、脂类和蛋白质组成, 其比例为 55.43:31.24:12.65。进一步研究证实, 该乳化剂糖类的单糖组成为甘露糖和鼠李糖; 脂类由十碳、十二碳、十六碳及十八碳脂肪酸组成; 蛋白质由 16 种氨基酸构成。本文还对乳化剂的理化性质进行了分析, 发现它是一种性能稳定、乳化效率高、适应范围较为广泛的生物乳化剂, 对海洋污染生物修复及石油开采都具有潜在的应用价值。

关键词: 生物乳化剂, 红平红球菌, 生物修复, 烃降解菌

Study on the Bioemulsifier Produced by a Hydrocarbon-degrading Strain T7-2 and Its Physic-chemical Properties

LI Dan HUANG Lei LI Guo-Qiang LI Zhao-Yu MA Ting
LIANG Feng-Lai* LIU Ru-Lin

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300071)

Abstract: A low-temperature hydrocarbon-degrading strain T7-2, isolated from sea-mud of Bohai polluted area and identified as *Rhodococcus erythropolis*, was found to produce an extracellular, nondialyzable emulsifying agent (referred to as bioemulsifier) when grew with hexadecane as carbon source. The results showed that, this bioemulsifier which could remarkably emulsify hydrocarbons such as diesel oil, is consisted of three parts—carbohydrates, lipids and proteins, the proportion of which was 55.43:31.24:12.65. The mono-saccharide compositions were identified as mannose and rhamnose; the lipid compositions included decanoic acid, lauric acid, hexadecanoic acid and stearic acid, and the protein constituents were composed of sixteen amino acids. Besides, according to the study of the physic-chemical properties of the bioemulsifier, it possesses the obvious advantages of character stability, high function efficiency and wide adaptation range, therefore this bioemulsifier is believed to have extensive application values for bioremediation of marine oil

pollution, petroleum exploitation and etc.

Keywords: Bioemulsifier, *Rhodococcus erythropolis*, Bioremediation, Hydrocarbon degrading bacteria

微生物能够合成多种高分子量和低分子量的生物表面活性剂^[1]。低分子量表面活性剂主要是脂肪酸、糖脂类、环脂肽类和脂肽类。高分子量的生物表面活性剂如两性多聚糖、蛋白、脂多糖、脂蛋白或者这些生物高聚物的复杂混合物^[2,3]。这些高分子量的化合物能够形成稳定乳状液,而表面张力或者界面张力的降低并不是它们的最显著特性,所以通常它们被称为生物乳化剂^[4]。

生物乳化剂的分子结构由一个疏水部分和一个亲水部分构成,同时具有亲脂和亲水的性质,其疏水部分为饱和、不饱和或羟化的烃链;其亲水部分更加多样化,可简单为脂肪酸的羧基,也可复杂到糖脂的多糖基。生物乳化剂具有一般的化学合成乳化剂所无法媲美的优点——与环境的兼容性,它既无毒性,又可被生物降解,不会对环境造成不利的影 响,因此具有广阔的应用前景^[3-6]。生物乳化剂在商业上的潜在应用包括油污染土壤和水体的生物修复^[7,8],提高原油采收率,代替有机氯溶剂清理油污染管道,尤其它能够结合金属的特性已经被发现,并被强调应用于土壤修复中^[9]。

国外早在上世纪 60~70 年代就对生物乳化剂进行了广泛研究,发现许多降解烃类的微生物均能产生生物乳化剂^[10,11]。国内对生物乳化剂的研究报道较少。本文对解烃菌株 T7-2 所产生的乳化剂进行了分离纯化,并对其化学组成及理化特性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株

菌株 T7-2 由渤海石油污染海域的海底泥中筛选得到,在 5 ~30 温度范围内对烃类污染物具有良好的乳化降解作用,经鉴定为红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)^[12],本室保存。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基 (g/L): Na₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 3.48, (NH₄)₂SO₄ 4, MgSO₄ 0.7, 酵母粉 0.01, pH 7.2。接种时加入 0.5% 的工业乙醇即种子培养基;加入 0.5% 正十六烷即为乳化剂发酵培养基。

1.2.2 培养条件: 种子液培养时间为 48 h, 发酵时间为 72 h, 均在 25 下振荡培养, 接种量 2%。

1.3 乳化活性的测定

在带刻度的磨口试管中,加入 6 mL 测试烃(0# 柴油)和 4 mL 乳化活性物质溶液,涡旋振荡器充分振荡 2 min,静置 24 h,以乳化指数(Emulsification index, EI₂₄)表示乳化剂的乳化活性^[13]。

$$\text{乳化指数 EI}_{24} = \frac{\text{乳化层高度}}{\text{液体总高度}}$$

1.4 乳化剂的分离提取及纯化

1.4.1 培养液: 8000 r/min 离心 10 min, 上清置 4 冷藏 4 h, 0.45 μm 滤膜过滤除残余十六烷, 4 冷藏 12 h, 缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 至 75% 饱和度, 4 冰箱放置 4 h~6 h, 15000 r/min 离心 30 min, 沉淀溶于 ddH₂O, 4 对蒸馏水透析过夜, 透析内液离心后, 上清经冷冻干燥后获得絮状固体即为乳化剂粗制品。

1.4.2 Sevag 法除杂蛋白^[14]: 乳化剂溶液中加入 1/3 体积的氯仿-正丁醇(4:1, V/V), 用振荡器充分振荡 3 min~5 min, 9000 r/min 离心 10 min 收集水相, 重复 3 次; 氯仿相用去离子水洗涤, 离心, 合并所有水相, 4 对蒸馏水透析 48 h, 冷冻干燥后进行柱层析纯化。

1.4.3 色谱柱层析: 1.6 cm × 100 cm, 填料: Sephadex G-100。上样量 2 mL~3 mL, 洗脱液为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(K₂HPO₄·3H₂O 45.644 g/L, KH₂PO₄ 27.2 g/L, 去离子水溶解), 连续分管收集洗脱液测其乳化活性, 收集乳化阳性成分, 冷冻干燥得纯品。

1.5 乳化剂的定性分析

1.5.1 糖定性: 将乳化剂样品溶于少量 ddH₂O, 在硅胶板上点样, 晾干, 显色剂为硫酸-萘酮溶液(2% 萘酮, 85% 浓硫酸), 110 烤箱加热 5 min~10 min 显色。

1.5.2 蛋白质定性: 硅胶板点样品后, 晾干, 用 0.1% 茚三酮溶液快速润湿后放入 110 烤箱中加热 10 min~15 min, 显色。

1.5.3 脂定性: 乳化剂样品用丁酮抽提所得物质在硅胶板上点样, 晾干后, 在钼酸铵-高氯酸溶液中快速润湿, 于 105 加热 20 min, 显色^[15]。

1.6 乳化剂的红外光谱(IR)分析

将乳化剂样品用溴化钾压片, 采用美国的 Nicolet-560E.S.P 进行红外光谱扫描, 扫描波长: 4000 cm⁻¹~400 cm⁻¹。

1.7 乳化剂单糖组分的分析

1.7.1 糖含量测定: 乳化剂糖含量按苯酚-硫酸法测定^[16]。

1.7.2 糖组分的纸层析分析: 展层剂为正丁醇: 冰乙酸: 水=4:1:5(V/V/V), 显色剂为苯胺-磷酸盐溶液=a:b=2:3(V/V)^[15]。

1.7.3 糖组分液相色谱分析: 样品处理参照杨兴斌等^[17]所述方法, 样品水解后, 经 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)衍生, 高效液相色谱(HPLC)检测。

1.8 蛋白质组分分析

使用 HITACHI L-8800 型氨基酸自动分析仪进行氨基酸组成分析, 操作过程参照仪器使用说明。

1.9 脂类组分分析

脂类含量采用二氯甲烷/甲醇法测定^[18,19]。

脂组分的甲酯化参考 So CM 等所述方法^[20]。

1.10 乳化剂理化性质分析

1.10.1 乳化剂的稀释性能: 将乳化剂样品溶于 ddH₂O 中, 稀释不同倍数后制成乳状液检测其乳化活性, 测试乳化剂作用的最低浓度。

1.10.2 乳化剂盐敏性^[21]: 配制不同 NaCl 浓度的乳状液, 进行乳化活性测定, 测试乳化剂对 NaCl 的耐受能力。

1.10.3 乳化剂酸敏性^[21]: 使用氢氧化钠或盐酸溶液调节乳化剂试液的酸碱度, 不同 pH 值条件下, 进行乳化活性测定, 确定乳化剂的酸碱耐受范围。

1.10.4 乳化剂稳定性: 将乳化剂试液室温放置, 每隔一段时间测定乳化活性, 观察乳化剂的稳定性。

1.10.5 温度对乳化剂的影响: 将乳状液置于 4、8、15、30、37、55、60、80 和 100 温度下恒温 24 h, 测定不同温度下乳状液的乳化活性。

1.10.6 乳化剂对不同底物的乳化作用: 试验乳化剂作用正烷烃及芳香烃底物时的乳化活性。

2 结果与讨论

2.1 T7-2 菌株的乳化活性

T7-2 解烃菌在以烃为碳源的生长代谢过程中, 可产生对烃具有良好乳化作用的乳化活性物质, 从而加速菌体细胞对烃的摄取过程, 并对烃类物质产生降解作用。将 T7-2 菌株发酵液和 0# 柴油混合体系涡旋振荡 2 min 静置 24 h 后, 可观察到明显稳定的乳化层(图 1A), EI₂₄ 达 70% 以上。该结果表明, T7-2

产生的乳化活性物质具有良好的乳化性能; 可将石油烃完全乳化, 并形成稳定的乳状液。在相同的实验条件下, 水与 0# 柴油体系涡旋振荡 2 min, 仅静置 2 min 便恢复到初始的油水分离状态(图 1B)。



图 1 T7-2 发酵液对柴油的乳化作用

Fig. 1 Emulsification of diesel oil by T7-2 fermentation liquor

2.2 乳化剂的分离及纯化

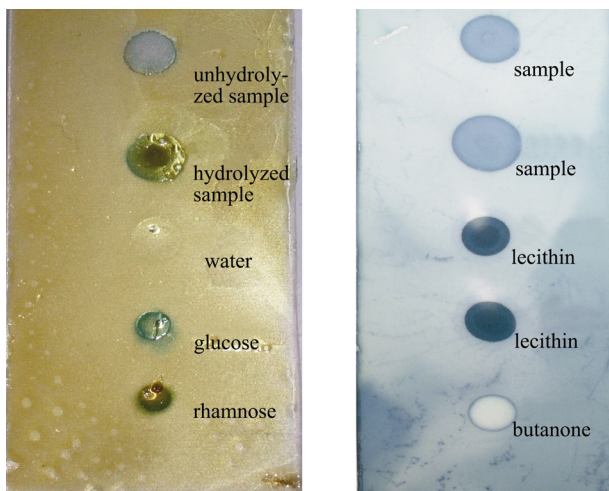
依照 1.4 所述方法对 T7-2 解烃菌发酵液进行了乳化剂的提取并获得粗制品 1.24 g/L。将乳化剂粗制品进行色谱柱层析纯化, 冷冻干燥后得乳化剂纯化样品 370 mg/L, 供乳化剂分析之用。

2.3 乳化剂的定性分析

2.3.1 乳化剂样品的薄层分析: 采用不同的特异性显色方法对乳化剂样品的化学组分进行薄层定性分析, 结果见图 2。乳化剂经酸水解后的样品点样于硅胶板, 用硫酸-蒽酮显色后呈蓝绿色, 说明乳化剂样品中含有糖类成分(图 2a); 用茚三酮显色未水解样品呈淡淡的橙色, 水解后的乳化剂样品呈紫黄色, 说明乳化剂样品中含有蛋白质组分(图 2b)。乳化剂样品的丁酮抽提物用钼酸铵-高氯酸显色呈蓝-黑色斑点, 说明乳化剂样品中含有脂类物质(图 2c)。

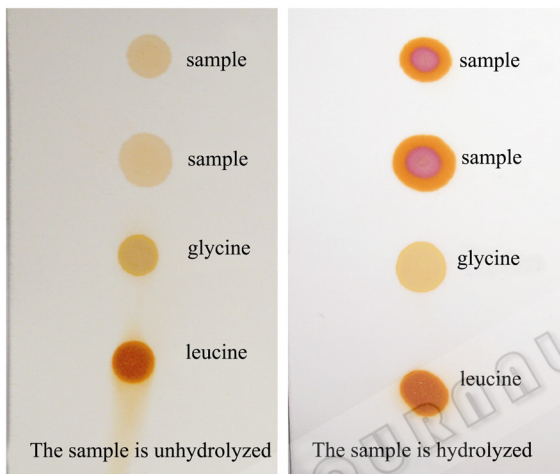
通过特异性显色法的薄层定性分析表明, T7-2 解烃菌产生的乳化剂化学组分是由糖类、脂类及蛋白质(肽)三部分化学成分构成。

2.3.2 乳化剂的红外光谱分析: 将乳化剂样品采用溴化钾压片后在 4000 cm⁻¹~400 cm⁻¹ 区间内扫描, 红外光谱分别在 3422 cm⁻¹、2923 cm⁻¹、1654 cm⁻¹、1255 cm⁻¹、1080 cm⁻¹ 显示出特征性吸收峰(图 3); 其中, 3422 cm⁻¹ 出现吸收宽峰, 这是 O-H 伸缩振



a. 硫酸-蒽酮显色

c. 钼酸铵-高氯酸显色



b. 茚三酮显色

图2 乳化剂样品化学组分定性显色图

Fig. 2 Qualitative analysis of bioemulsifier by staining

a: 硫酸-蒽酮显色; b: 茚三酮显色; c: 钼酸铵-高氯酸显色

a: Sulfuric acid-anthrone colouring; b: Ninhydrin colouring; c: Ammonium molybdate-perchloric acid colouring

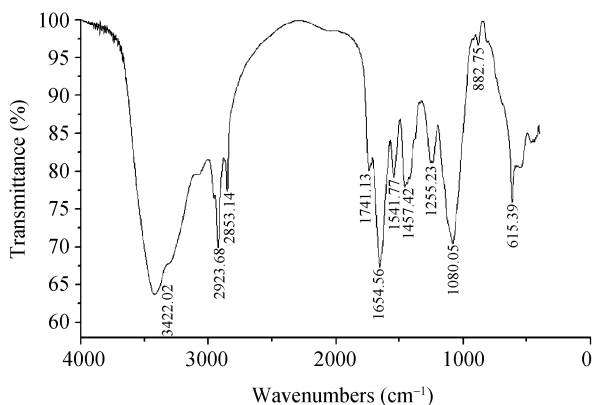


图3 乳化剂样品红外吸收谱图

Fig. 3 IR spectrum analysis of bioemulsifier

动; 2923 cm^{-1} 为C-H伸缩振动区是糖类的特征峰; 1654 cm^{-1} 为酰胺羰基吸收, 1255 cm^{-1} 为C-H变角振动, 1080 cm^{-1} 处有吸收峰, 这是C-O伸缩振动。

红外光谱系分子的收缩振动和变形振动产生的。不同化合物中同一化学键或基团的吸收谱带的位置大致相同, 变化范围较窄。吸收峰越大, 表示吸收得越多。分子中含有多-OH和RCO-NHR为糖蛋白的特征官能团。由此可进一步推断, 乳化剂样品中含有糖蛋白化学组分。

2.4 乳化剂单糖组分的分析

2.4.1 糖的定量分析: 将乳化剂样品配成浓度为 0.04 mg/mL 、 0.06 mg/mL 、 0.08 mg/mL 的溶液, 经苯酚-硫酸反应处理后测定吸光度分别为 0.257 、 0.349 、 0.503 , 依据图4拟合的标准曲线, 计算乳化剂样品中的糖浓度分别为 0.0234 mg/mL 、 0.0313 mg/mL 、 0.0445 mg/mL , 糖的含量为 $(0.0234/0.04+0.0313/0.06+0.0445/0.08)/3 \times 100\% = 55.43\%$ 。

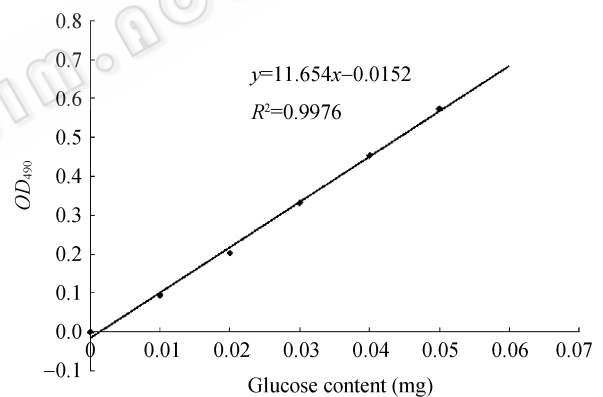


图4 苯酚硫酸法测定糖含量标准曲线(葡萄糖为标准)

Fig. 4 Standard curve of sugar content determination by phenol-sulfuric acid method with glucose as standard

2.4.2 乳化剂中单糖组分的纸层析: 经水解后的乳化剂样品进行单糖组分的纸层析分析(图5)。根据图5结果所示, 乳化剂水解后含有两种单糖, 其 R_f 值分别与L-鼠李糖和D-甘露糖最接近, 初步推测乳化剂的单糖组分可能为L-鼠李糖和D-甘露糖。

2.4.3 单糖组分的高效液相色谱分析: 将乳化剂样品水解, 柱前衍生后用HPLC分析单糖组分, 在样品的HPLC图谱中主要显示2个峰(图6B), 出峰时间分别为 15.512 min 和 18.919 min , 其出峰时间与标准单糖的甘露糖和鼠李糖基本相同(图6A), 因此

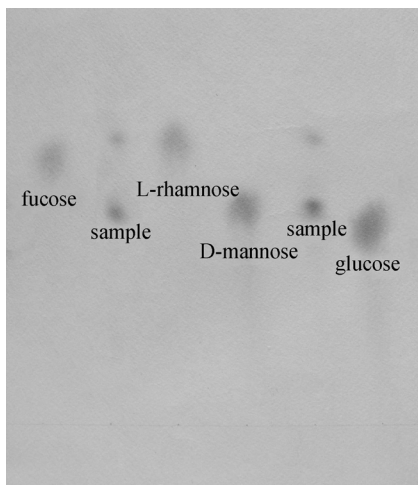


图5 乳化剂样品中糖组分的纸层析
Fig. 5 Paper chromatography of monosaccharide in sample of bioemulsifier

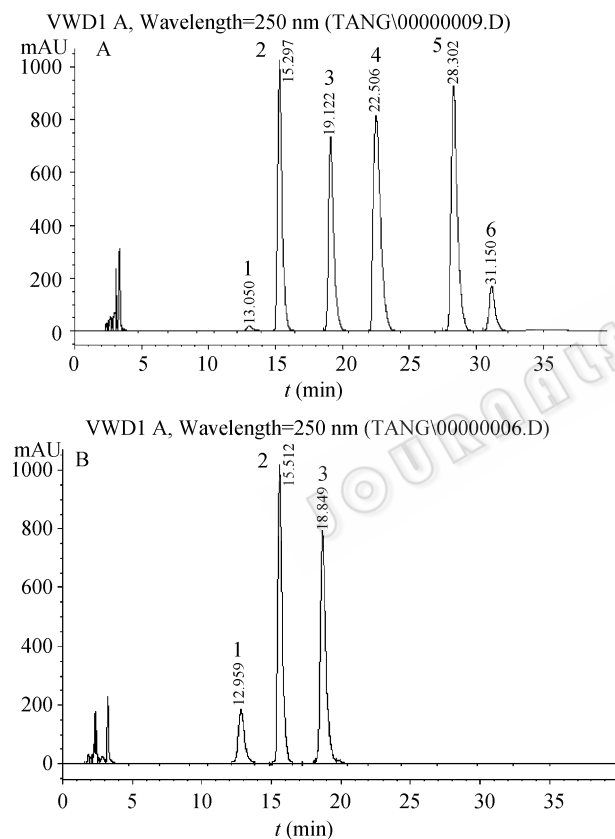


图6 糖衍生物的液相色谱分析
Fig. 6 HPLC analysis of the mixed standard monosaccharides and PMP derivatives acid hydrolysates bioemulsifier
A: 标准单糖混合物衍生物: 1, PMP; 2, 甘露糖; 3, 鼠李糖; 4, 葡萄糖醛酸; 5, 葡萄糖; 6, 半乳糖
B: 样品衍生物: 1, PMP; 2, 甘露糖; 3, 鼠李糖
A: Standard monosaccharide mixture derivative: 1, PMP; 2, Mannose; 3, Rhamnose; 4, Glycuronic acid; 5, Glucose; 6, Galactose
B: Sample derivative: 1, PMP; 2, Mannose; 3, Rhamnose

根据标准糖出峰时间推断, T7-2 菌株所产乳化剂的单糖组分为甘露糖和鼠李糖。采用积分的方法(即面积归一法)计算出乳化剂样品在液相色谱图中甘露

糖和鼠李糖所占的峰面积比例为 52.09%和 47.91%。由此表明乳化剂样品中所含单糖组分为甘露糖和鼠李糖, 且所占比例基本相同, 各占 50%左右。

2.5 氨基酸组分分析

乳化剂样品经 6 mol/L HCl 在 110 °C 下水解 24 h 后进行氨基酸分析, 结果见表 1。

表 1 结果表明 T7-2 解羟菌所产乳化剂的蛋白组分是由 16 种氨基酸组成。其中极性氨基酸有门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸, 总含量为 5.59 g/100 g; 非极性氨基酸有异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸, 总含量为 7.06 g/100 g。样品中蛋白质总含量为 12.65 g/100 g, 即乳化剂含量的 12.65%。

表 1 乳化剂中各种氨基酸的含量
Table 1 Amino acid contents of the bioemulsifier

氨基酸种类 (Types of amino acid)	含量(%) (Content)
门冬氨酸(Asp)	0.74
苏氨酸(Thr)	0.73
丝氨酸(Ser)	1.16
谷氨酸(Glu)	1.25
甘氨酸(Gly)	1.81
丙氨酸(Ala)	0.83
缬氨酸(Val)	1.08
蛋氨酸(Met)	0.26
异亮氨酸(Ile)	0.79
亮氨酸(Leu)	1.11
酪氨酸(Tyr)	0.33
苯丙氨酸(Phe)	0.48
赖氨酸(Lys)	0.58
组氨酸(His)	0.03
精氨酸(Arg)	1.10
脯氨酸(Pro)	0.37

注: 表中数据为质量百分数

Note: The data in the table is the mass percent

2.6 脂类分析

按韩菊等所述二氯甲烷/甲醇法测定其含量^[18,19], 称取乳化剂样品 0.1431 g 做脂类提取, 提取物干燥后称重为 0.0447 g, 则乳化剂样品中脂类含量为 $0.0447/0.1431 \times 100\% = 31.24\%$ 。

乳化剂样品经甲酯化后进行 GC-MS 分析, 见图 7。图 7 结果表明甲酯化的乳化剂样品中存在正癸酸甲酯、十二酸甲酯、十六酸甲酯和十八酸甲酯。该结果证实 T7-2 解羟菌株所产乳化剂的脂类是由 4

种脂肪酸组成, 它们分别是正癸酸(十碳脂肪酸)、十二碳脂肪酸、十六碳脂肪酸及十八碳脂肪酸; 根据峰面积得出 4 者所占的比例分别为: 64.50%, 6.53%, 22.80%和 5.79%。

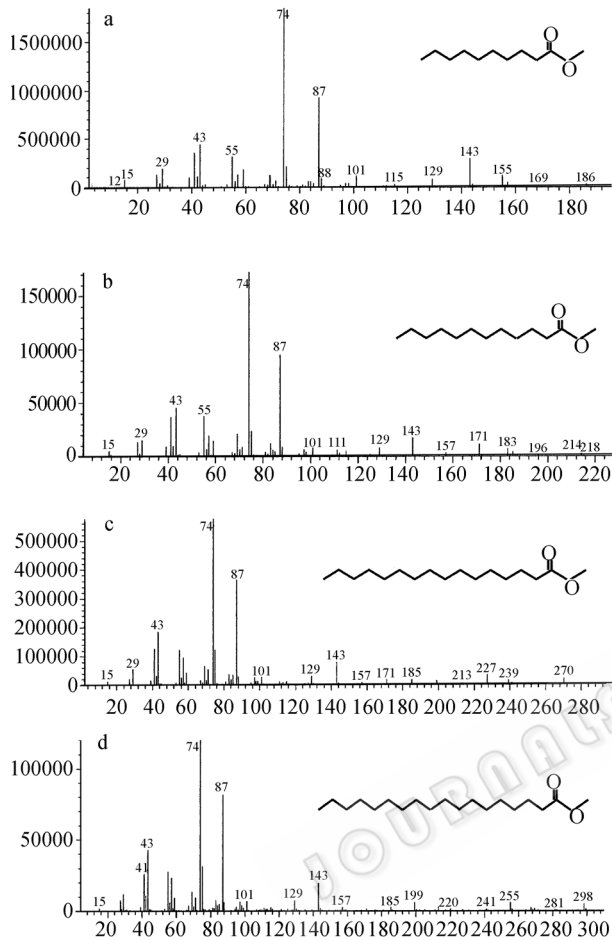


图 7 乳化剂的脂肪酸甲酯质谱图

Fig. 7 MS spectra of fatty acid methyl esters

a: 正癸酸甲酯; b: 十二酸甲酯; c: 十六酸甲酯; d: 十八酸甲酯
a: Methyl ester of decanoic acid; b: Methyl ester of dodecanoic acid; c: Methyl ester of hexadecanoic acid; d: Methyl ester of octadecanoic acid

2.7 乳化剂理化性质分析

2.7.1 乳化剂的稀释特性: 将乳化剂样品配制成 0.37 mg/mL 作为原液, 进行梯度稀释。分别制成为原液浓度 1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12 和 1/13 的乳状液, 测定其乳化活性。结果如图 8 所示, 乳化剂稀释为 1/8 即 0.04625 mg/mL 时仍有将近 60% 的乳化活性, 在稀释到 1/10 即 0.037 mg/mL 时还保留有大于 30% 的乳化活性, 说明 T7-2 解烃菌株所产的乳化剂作用浓度低, 乳化效

率高, 是一种很有实际应用价值的乳化剂。

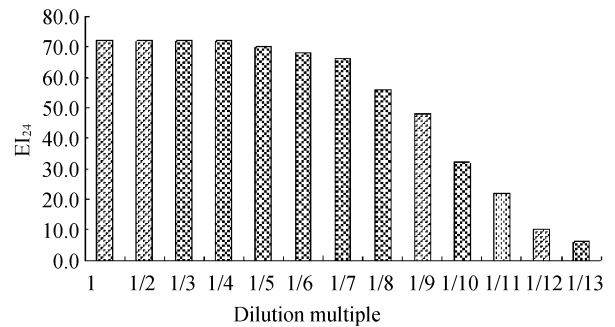


图 8 乳化剂的稀释性能

Fig. 8 The experiment of dilution property of emulsion

2.7.2 乳化剂的盐敏性: 将乳化剂样品配制成 0.37 mg/mL 的乳状液, 分别测定其在 NaCl 浓度为 0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%和 5.0%时的乳化活性, 结果见图 9。图 9 结果表明, T7-2 解烃菌株产生的生物乳化剂可以适应 5% 的高盐浓度仍保持大于 70% 的乳化活性, 这可能与菌株原来所处环境有关。该菌株能在海洋这种高盐环境中生长代谢, 所产乳化剂可用于海洋石油开采和海洋石油污染的生物修复等领域。

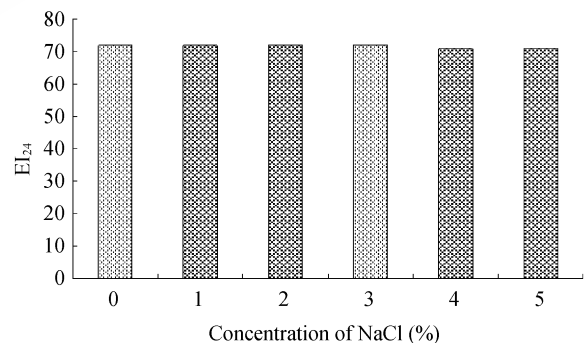


图 9 NaCl 对乳化效果的影响

Fig. 9 Effect of Sodium chloride on emulsification activity

2.7.3 乳化剂的酸敏性: 将乳化剂样品配制成 0.37 mg/mL 的乳状液, 分别测定其在 pH 2、4、6、8、10 和 12 条件下的乳化活性(图 10)。图 10 结果表明, T7-2 解烃菌所产的乳化剂在 pH 4~pH 8 环境下表现出良好的乳化性能, 乳化活性均可达到 70% 以上; 在 pH 低于 4 或者高于 8 时乳化活性稍有下降。海洋环境 pH 一般在 6~8 之间, 在这种环境条件下该菌株所产生的乳化剂适宜海洋滩涂污染的生物修复。

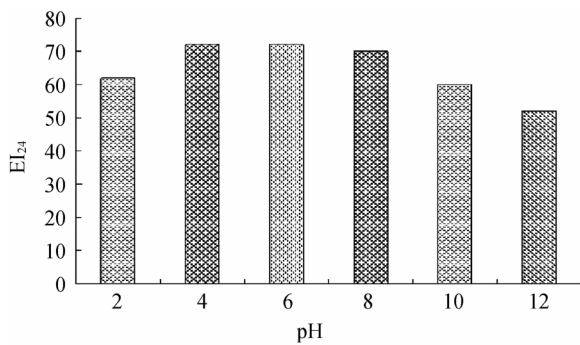


图 10 pH 对乳化效果的影响
Fig. 10 Effect of pH on emulsification activity

2.7.4 乳化剂的稳定性: 将乳化剂作用柴油后形成的乳状液置室温 1 d、5 d、10 d、15 d、20 d、30 d、50 d 及 100 d, 观察乳状液的稳定性。结果表明, 乳状液放置 30 d 仍然保持 70% 以上的乳化状态, 放置 50 d 乳化状态可保持在 65% 以上, 放置 100 d 也仅下降 30% 左右, 可见该乳化剂稳定性能良好。

2.7.5 温度对乳化剂活性的影响: 将乳化剂作用柴油形成的乳状液分别放置于 4、8、15、30、37、45、55、60、80 和 100 下 24 h, 测定的乳化活性见图 11。图 11 结果表明, 乳化剂在 4~45 范围内均有 70% 以上的乳化活性, 并显示出对石油烃乳化作用的稳定性。当温度高于 45 时乳化活性会逐步降低, 温度达到 100 时乳化剂活性几乎全部丧失。T7-2 菌株属低温烃降解菌^[12], 该结果进一步说明, 该菌株适宜海洋温度环境烃降解研究。

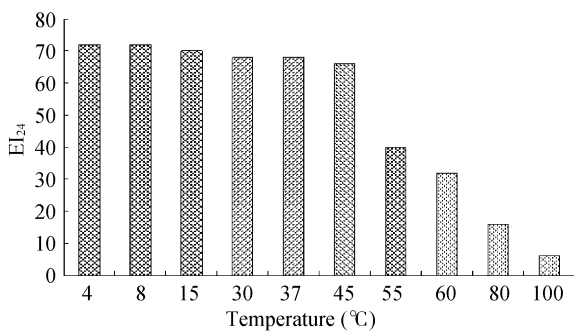


图 11 温度对乳化剂活性的影响
Fig. 11 Effect of temperature on emulsification activity

2.7.6 乳化剂对不同底物的乳化作用: 将乳化剂样品配制成 0.37 mg/mL 的溶液, 与不同烃的底物混合形成的乳状液, 静置 24 h, 测定乳化活性, 结果见图 12。由图 12 显示 T7-2 解烃菌产生的乳化剂对正

构烷烃和芳香烃均有良好的乳化效果, 但对低碳数正构烷烃及芳香烃具有更强的乳化作用。

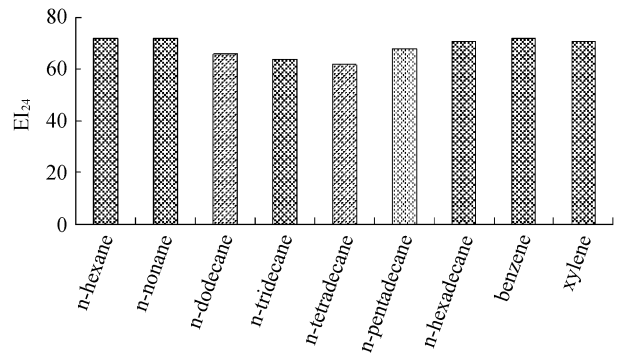


图 12 乳化剂对不同烃的乳化效果
Fig. 12 Effect of substance on emulsification activity

3 结论

(1) 对低温烃降解菌 T7-2 所产生生物乳化剂进行了分离纯化及化学组分分析, 确定该生物乳化剂以糖、脂类和蛋白为主要成分, 其中含糖类物质为 55.43%, 含脂类物质为 31.24%, 含蛋白类物质为 12.65%。该乳化剂的糖类由 2 种单糖组构成, 脂类由 4 种脂肪酸组成, 蛋白质则由 16 种氨基酸构成。

(2) 对所产生生物乳化剂的理化性质进行了分析, 结果表明乳化剂性能稳定, 耐受 pH、温度、盐度等的范围均较宽, 在海洋石油污染的生物修复方面具有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**: 47-64.
- [2] Rosenberg E, Ron EZ. High- and low- molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52**: 154-162.
- [3] Anita Suresh Kumar, Kalpana Mody, Bhavanath Jha. Evaluation of Biosurfactant/Bioemulsifier Production by a Marine Bacterium. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2007.
- [4] Bognolo G, Bognolo G. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, **152**: 41-52.
- [5] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, **53**: 495-508.

- [6] Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**: 915–929.
- [7] 聂麦茜, 张志杰, 雷萍. 优势短杆菌对多环芳烃的降解性能. *环境科学*, 2001, **23**(6): 83–85.
- [8] 李习武, 刘志培, 刘双江. 新型复合生物乳化剂的性质及其在多环芳烃降解中的作用. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 373–377.
- [9] Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 2001, **60**: 193–207.
- [10] Haferburg D, Hommel R, Claus R, et al. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1986, **33**: 53–93.
- [11] 李习武, 刘志培, 刘双江. 生物乳化剂产生菌及其产乳化剂条件初步研究. *微生物学通报*, 2003, **30**(6): 39–43.
- [12] 黄磊, 李丹, 孙丹, 等. 1株低温石油烃降解菌的分类鉴定及降解特性研究. *环境科学*, 2007, **28**(9): 2101–2105.
- [13] Cooper David G, Goldenberg Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53**(2): 224–229.
- [14] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究. *天津化工*, 2000, p. 3.
- [15] 翟永信, 陆冰真. 薄层层析法在食品分析中的应用. 北京: 北京大学出版社, 1991, p. 231.
- [16] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 北京: 科学出版社, 1998, p.76.
- [17] 杨兴斌, 赵燕, 周四元, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成. *分析化学研究简报*, 2005, **33**(9): 1287–1290.
- [18] 韩菊, 罗敏, 高文惠. 食品中脂质提取方法研究进展. *河北工业科技*, 2000, **17**(1): 38–41.
- [19] 韩菊, 段文仲. 二氯甲烷代替氯仿提取脂肪的可行性研究. *分析化学*, 1998, **26**: 1164–1167.
- [20] So CM, Young LY. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(12): 5532–5540.
- [21] Leonie Asfora Sarubbo. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2006, **9**(4): 400–406.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。