

一株生物表面活性剂产生菌的分离及其特性研究

孙燕 洪青* 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 模炼油厂污泥中分离得到 1 株生物表面活性剂产生菌 C-3, 根据其生理生化特性和 16S rDNA 序列相似性分析, 将其鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。初步研究了其产生物表面活性剂的最适条件, 在以植物油为碳源、30°C、初始 pH 8、Ca²⁺ 浓度 20 mg/L、250 mL 三角瓶中装 75 mL 发酵液条件下, 最利于菌株的生长和生物表面活性剂产生。它的成分为糖脂类物质, 临界胶束浓度(CMC)为 50 mg/L, 具有很好的增溶效果。

关键词: 生物表面活性剂, 分离, 最适条件, 成分分析

Isolation and Characterization of a Biosurfactant-producing Bacterium

SUN Yan HONG Qing* LI Shun-Peng

(Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: A biosurfactant producing bacterial strain C-3 was isolated from the sludge of a petroleum refinery and identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The optimal conditions for the growth and biosurfactant production of strain C-3 were investigated. The results showed that strain C-3 could grow well and produce the largest amount of biosurfactant under the following conditions: seed-oil as sole carbon source, 30°C, initial pH 8, Ca²⁺ concentration of 20 mg/L, 75 mL medium in 250 mL Erlenmeyer flask. The biosurfactants produced by strain C-3 was identified as lipopeptides, showing high surface activity and emulsifying efficiency with critical micelle concentration (CMC) being 50 mg/L.

Keywords: Biosurfactant, Isolation, Optimal conditions, Biosurfactant analysis

生物表面活性剂(Biosurfactant)是由微生物产生的一类具有表面活性的生物大分子物质^[1], 包括糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂以及中性类脂衍生物等。与化学类表面活性剂相比, 生物表面活性剂除了具有良好的降低油水界面张力、乳化、发泡和消泡的性能外, 还具有易生物降解、对环境无毒害等优点, 因而在诸多领域, 如化妆品、食品和医药等, 以及微

生物采油中有广泛的应用潜力^[2]。据估计, 到 2010 年, 生物表面活性剂的销售额将达到 2 亿美元, 占表面活性剂市场份额的 10%左右^[3]。但目前生产表面活性剂的主要问题在于产量太低, 提取纯化费用相当可观, 目前, 生物表面活性剂的成本比化学表面活性剂的成本高 3~10 倍^[4]。所以降低生产成本、选育表面活性剂的高产菌株、优化发酵培养条件、

开发经济有效的回收工艺, 是目前研究的重点^[5]。因此, 本试验从炼油厂污泥中筛选了 1 株表面活性剂产生菌 C-3, 研究了其生理生化特性及产物特性, 并对其发酵条件进行了初步研究, 以求在优化条件下提高表面活性剂产量, 将来应用于生产实践中可以降低生产成本、提高生产效率。

1 材料与方法

1.1 培养基

细菌富集培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 5, 葡萄糖 2, KCl 1.1, NaCl 1.1, FeSO₄·7H₂O 0.028, KH₂PO₄ 1.5, K₂HPO₄ 1.5, 酵母粉 0.5, 微量元素溶液 5 mL, 可溶性淀粉 20, pH 7.5。

微量元素溶液(%): ZnSO₄ 0.029, CaCl₂ 0.024, CuSO₄ 0.025, MgSO₄·7H₂O 0.017。

发酵培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 5, 葡萄糖 2, KCl 1.1, NaCl 1.1, FeSO₄·7H₂O 0.028, KH₂PO₄ 1.5, K₂HPO₄ 1.5, 酵母粉 0.5, 微量元素溶液 5 mL, 植物油 10 mL, pH 7.5。

优化碳源培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 10, NaNO₃ 2, MgSO₄·7H₂O 0.3, KH₂PO₄ 10, Na₂HPO₄ 4, pH 7.5, 碳源视需要添加, 终浓度均为 10 g/L。

血平板培养基: 购于南京便诊商务科技公司。

1.2 菌株的分离

称取污泥 10 g, 加入 90 mL 无菌水, 摇床振荡 2 h; 静置 30 min 后取上清液 10 mL 接种到装有 90 mL 富集培养基的摇瓶中, 于 30°C、160 r/min 的恒温摇床上振荡培养 3 d, 以此摇瓶中的培养菌液作为菌种, 在同样条件下进行二次转接培养。将二次培养菌液做适当稀释, 取适当稀释度的菌悬液在血平板上进行平板涂布分离, 选择透明圈较大的菌株在平板上划线纯化得到单菌落, 用接种针挑取单菌落接种于血平板上, 30°C 培养 24 h, 观察菌落, 若周围出现透明圈, 则初步认定该菌株具有产表面活性剂的能力。再对菌株进行排油圈实验, 将菌株接种到摇瓶培养基中(成分同富集培养基), 30°C、160 r/min 振荡培养 3 d~5 d。取一培养皿, 加水, 水面上再加 0.1 mL 石蜡油形成油膜, 在油膜中心加摇瓶发酵液, 中心油膜被挤向四周形成一圆圈, 圆圈直径与表面活性剂含量和活性成正比。观察圆圈直径大小, 直径>3 cm 的菌株保留做进一步研究^[6-9]。

1.3 菌株的鉴定

通过形态学、生理生化实验及其 16S rDNA 的相似性分析, 参考文献^[10]将菌株初步鉴定到属。基因

组DNA采用CTAB法提取^[11]。16S rDNA扩增引物为细菌 16S rDNA通用引物, 正向引物: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (*E. coli* 27F), 反向引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (*E. coli* 1492R)。PCR产物(1.5 kb左右)采用V-Gene公司的凝胶回收试剂盒切胶回收, 连接至pMD18-T Vector, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆测序, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。将测序结果与GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及其Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>)上的相关16S rDNA序列进行同源性比对分析, 采用BioEdit、MEGA 3.0 等软件进行系统进化分析, Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 1000 次随机抽样, 计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发育树的置信度。

1.4 表面张力测定

采用环法测定表面张力, 仪器用 JYW-200 表面张力仪(河北省承德市鼎盛试验机公司)。

1.5 表面活性剂的提取和成份鉴定

取培养后菌株发酵液, 10000 r/min 离心 20 min 去除菌体; 上清液用 12 mol/L 浓 HCl 调 pH 至 2.0, 出现絮状沉淀, 4°C 静置过夜, 10000 r/min 离心 30 min 收集沉淀。用 pH 2.0 的 HCl 洗涤一次, 随后将该沉淀溶于 1 mol/L NaOH 溶液, 使最终 pH 值为 7.0, 冷冻干燥, 得浅褐色疏松状固体表面活性剂粗品。将粗品置 CH₂Cl₂ 中抽提, 后减压蒸干, 1 mol/L NaOH 溶液溶解, 形成多泡液体; 再用 Whatman No.4 滤纸过滤, 滤液再次加 HCl 调 pH 至 2.0, 将得到的沉淀离心, 真空冷冻干燥去除残留水分, 即得成品^[12-14]。对提纯得到的产物进行红外光谱(FT-IR)分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离和鉴定

经富集培养, 血平板、排油圈法初筛, 摇瓶发酵测定表面张力复筛, 从扬子石化炼油厂工业污泥中筛选出 1 株菌株, 命名为菌株 C-3, 其可将水的表面张力从 75.2 mN/m 降至 33.2 mN/m。菌株 C-3 为杆状, 大小为(0.5~0.8)μm×(1.5~3.0) μm, 革兰氏阴性, 能运动, 有极生鞭毛, 不产芽孢(图 1)。LB 固体平板上 30°C 培养 48 h, 菌落呈淡黄色、圆形、不透明、边缘平整、表面湿润光滑。菌株生理生化特性见表 1。

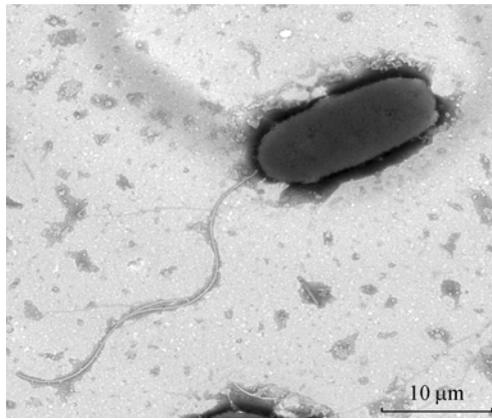


图1 菌株 C-3 电镜照片(×4000)
Fig. 1 Electronic micrograph of strain C-3(×4000)

通过将菌株 16S rDNA序列(GenBank 登录号 EU862322)与GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 及其Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>)上的相关 16S rDNA序列进行同源性比对分析,发现与C-3 序列同源性最高的绝大多数为假单胞菌属的菌株,选取相关菌株的 16S rDNA序列

表1 菌株 C3 的生理生化特征 Table 1 Physiological and biochemical characteristics of C-3			
Physiological and biochemical characteristics	Results	Physiological and biochemical characteristics	Results
Gram stain	-	Catalase test	+
M.R. test	-	Use of nitrate	+
V.P. test	+	H ₂ S production	-
Indole test	-	NH ₃ production	-
Gelatin liquefaction test	+	Sucrose fermentation	+
Phenylalanine dehydrogenase test	-	Maltose fermentation	+
Citrate test	+	Lactose fermentation	+
Starch hydrolysis test	-	Glucose fermentation	+
Cellulose hydrolysis test	-	Mannitol fermentation	+

注: +: 利用或呈阳性反应; -: 阴性反应。
Notes: +: Positive; -: Negative.

用 Neighbour-Joining method 构建系统发育树(图 2)。由图 2 可见, 菌株 C-3 位于 *Pseudomonas* 分支上, 与

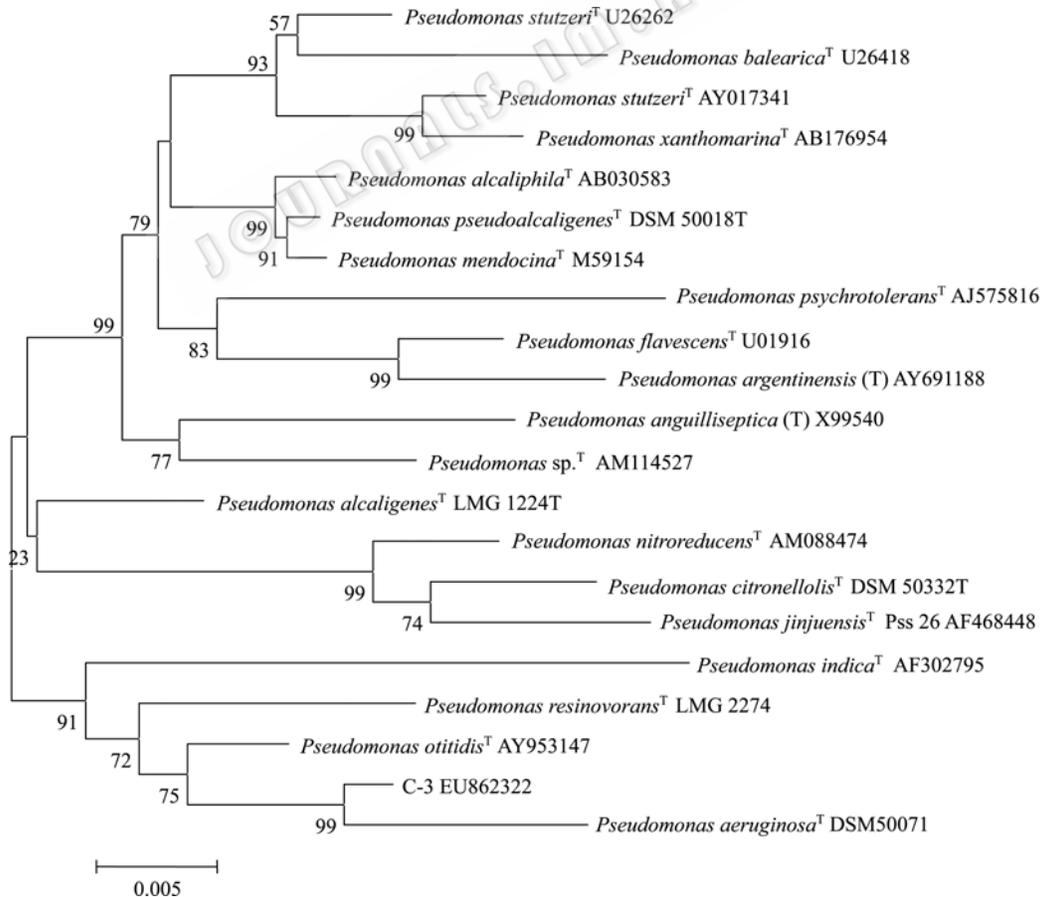


图2 根据菌株 C-3 及其相关菌株的 16S rDNA 构建的系统发育图
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by the neighbor joining approach based on the 16S rDNA of strain C-3 and related strains

假单胞菌属模式种 *Pseudomonas aeruginosa* 同源性达 98.4%, 结合表型特征、生理生化特性, 将菌株 C-3 初步鉴定为铜绿假单胞菌。

2.2 菌体生长与发酵液表面张力的关系

菌体生长和培养液表面张力值之间的关系如图 3 所示, 菌株的生长量与发酵液表面张力呈反向相关, 表面张力随着菌体生长而下降, 菌体浓度达到最大时, 表面张力达到最低, 且在整个稳定期, 发酵液的表面张力变化不大。菌株 C-3 生长的延迟期为 4 h, 4 h 后进入对数生长期直至 48 h, 在 48 h, 菌体浓度达到最大, 与之相应的培养液的表面张力达到最小。

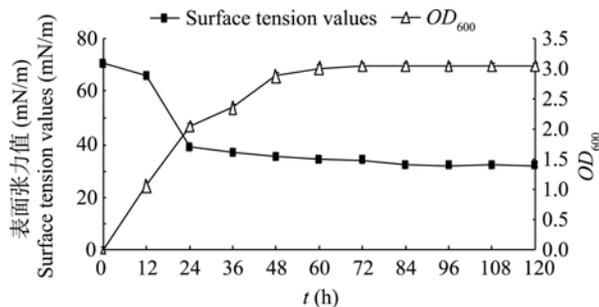


图 3 菌株 C-3 的生长曲线和表面张力曲线

Fig. 3 The relationship between growth of strain C-3 and surface tension

2.3 不同碳源对菌体生长和产表面活性剂的影响

在优化碳源培养基中分别加入 10 g/L 的碳源(乳糖、糊精、麦芽糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、植物油)。接种 C-3 菌株进行培养。图 4 结果显示, C-3 在几种碳源中都能够很好的生长, 在以蔗糖和葡萄糖作为碳源时, 表面张力明显大于另外几种碳源。当以植物油作为碳源时, 表面张力达到最低值 32.1 mN/m, 推测原因是 C-3 作为表面活性剂产生菌, 在利用植物油作为碳源时, 可以同时利用亲油性碳源和亲水性营养源, 诱导了表面活性剂的合成。而葡萄糖对某些适应性酶的合成具有抑制作用^[15], 作为碳源反而不利于表面活性剂的产生。

2.4 温度对菌体生长和表面活性剂产生的影响

在发酵培养基中, 接种菌株 C-3 进行培养, 培养温度分别选取 20°C、25°C、30°C、37°C, 结果如图 5 所示, 从 20°C~37°C, 菌株 C-3 均能很好生长, 并产生表面活性剂, 说明其对温度有较好的适应能力。30°C 为 C-3 的最适生长温度, 产生的表面活性剂剂量最大, 发酵液表面张力值最低达到 32.4 mN/m。

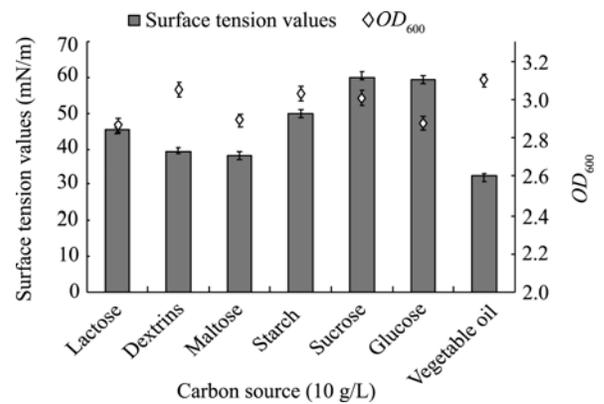


图 4 碳源对表面张力和菌株 C-3 菌体生长的影响

Fig. 4 Effect of carbon source on growth of strain C-3 and surface tension of the culture

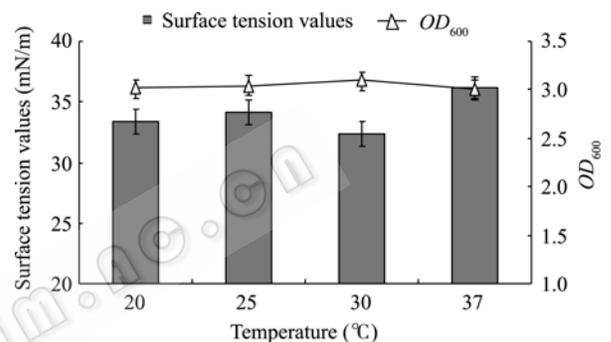


图 5 温度对表面张力和菌株 C-3 菌体生长的影响

Fig. 5 Effect of temperature on growth of strain C-3 and surface tension of the culture

2.5 pH 值对菌体生长和表面活性剂产生的影响

将发酵培养基的初始 pH 值分别调至 2、4、5、6、7、8、9、10、11、12, 接种菌株 C-3 进行培养。结果如图 6 所示, C-3 在 pH 2 时, 生长受到抑制, 而在 pH 4~12 之间, 生长良好, 发酵液表面张力显著下降, 并且菌株生长量和发酵液表面张力值变化不

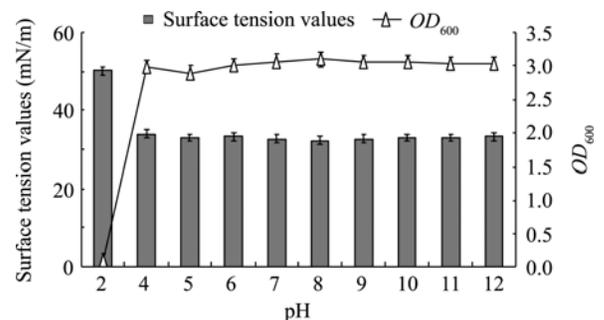


图 6 pH 对表面张力和菌株 C-3 菌体生长的影响

Fig. 6 Effects of pH on the on growth of strain C-3 and surface tension of the culture

大,说明菌株 C-3 具有很宽的 pH 适应范围,并且所产表面活性剂产量稳定。在后续研究中选择 pH 8 作为菌株的最适合 pH。

2.6 通气量对菌体生长和表面活性剂产生的影响

在 250 mL 三角瓶中分别加入 25 mL、50 mL、75 mL、100 mL、125 mL、150 mL 发酵培养基,接种 C-3 菌株进行培养。结果如图 7 所示,在装液量为 75 mL 时,C-3 生长情况最好,发酵液表面张力值最低,在其他装液量条件下,菌体生长浓度略有下降,表面张力有所上升,说明菌株 C-3 对通气量有一定的要求。

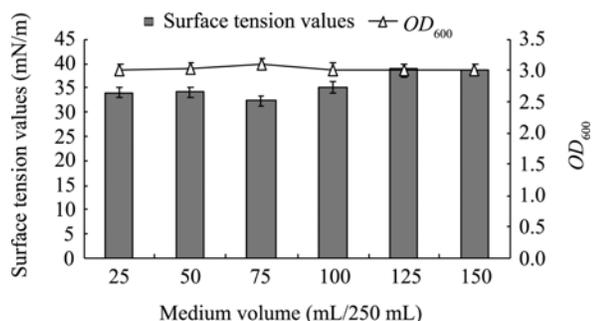


图 7 通气量对表面张力和菌株 C-3 菌体生长的影响

Fig. 7 Effects of oxygen on growth of strain C-3 and surface tension of the culture

2.7 金属离子对菌体生长和表面活性剂产生的影响

在 LB 培养基中分别加入各种金属离子(Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+}),使其终浓度均为 20 mg/L。其它培养条件不改变,测定培养液表面张力值及菌体生长状况,结果如图 8 所示, Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 能够促进菌株 C-3 的生长及产生表面活性剂,其中, Ca^{2+} 的效果最为明显,可使培养液表面张力降至 31.9 mN/m。 Zn^{2+} 对菌株 C-3 的生长和产表

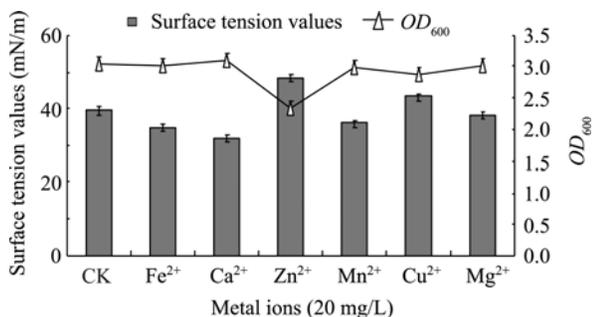


图 8 金属离子对表面张力和菌株 C-3 菌体生长的影响

Fig. 8 Effects of metal ions on growth of strain C-3 and surface tension of the culture

面活性剂有明显抑制作用, Mg^{2+} 对菌体生长及产表面活性剂基本没有影响。

2.8 生物表面活性剂的提取与乳化性能测定

前面的研究表明,以植物油为碳源、30°C、初始 pH 8、 Ca^{2+} 浓度 20 mg/L、250 mL 三角瓶中装 75 mL 发酵液条件下,菌株产生的生物表面活性剂活性最高。提取在该条件下生产的生物表面活性剂,获得的产物为淡黄色粉状物质,产量为 4.13 g/L。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。将发酵液与液体石蜡混合后,每隔 12 h 检测乳化体积的变化,连续监测 72 h,结果发现发酵液能完全乳化液体石蜡并可以维持 48 h,48 h 后乳化体积仍能达到 80% 以上。5 d 后观察,乳化体积仍可维持在 50% 以上,说明菌株 C-3 产生的表面活性剂乳化性能稳定,具有很好的增溶效果。

2.9 生物表面活性剂的 FT-IR 分析结果

生物表面活性剂红外光谱扫描图(图 9)显示,在 3359 cm^{-1} 处有强吸收带,表明分子中有大量羟基存在。 $2855\text{ cm}^{-1}\sim 2926\text{ cm}^{-1}$ 之间和 $1455\text{ cm}^{-1}\sim 1317\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收带为碳链上 C-H 键的伸缩振动吸收带。 1052 cm^{-1} 为 C-O-C 键振动吸收带,说明分子中有一个五元环状内酯结构和糖苷键存在。 1734 cm^{-1} 为 C=C 的伸缩振动吸收带,表明分子中有不饱和双键。推测该物质为糖与环脂结合形成的不饱和糖脂类物质。

2.10 临界胶束浓度(CMC)的测定结果

将提取的表面活性剂分别稀释至 10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 和 200 mg/L 后,测不同质量浓度的表面活性剂溶液的表面张力,结果发现,当溶液浓度低于 50 mg/L 时,随着浓度增加,水的表面张力相应降低,当样品浓度高于 50 mg/L 时,增加样品浓度不能使水的表面张力进一步降低(图 10),表明样品的临界胶束浓度约为 50 mg/L。最低可使水的表面张力降至 33.5 mN/m。经过计算,菌株 C-3 所产生物表面活性剂的 CMC 值为 50 mg/L,比一般化学表面活性剂的 CMC 值(SDS 2120 mg/L,吐温 20600 mg/L)低 1~2 个数量级^[16],因此生物表面活性剂比一般的化学表面活性剂在性能方面更优越。

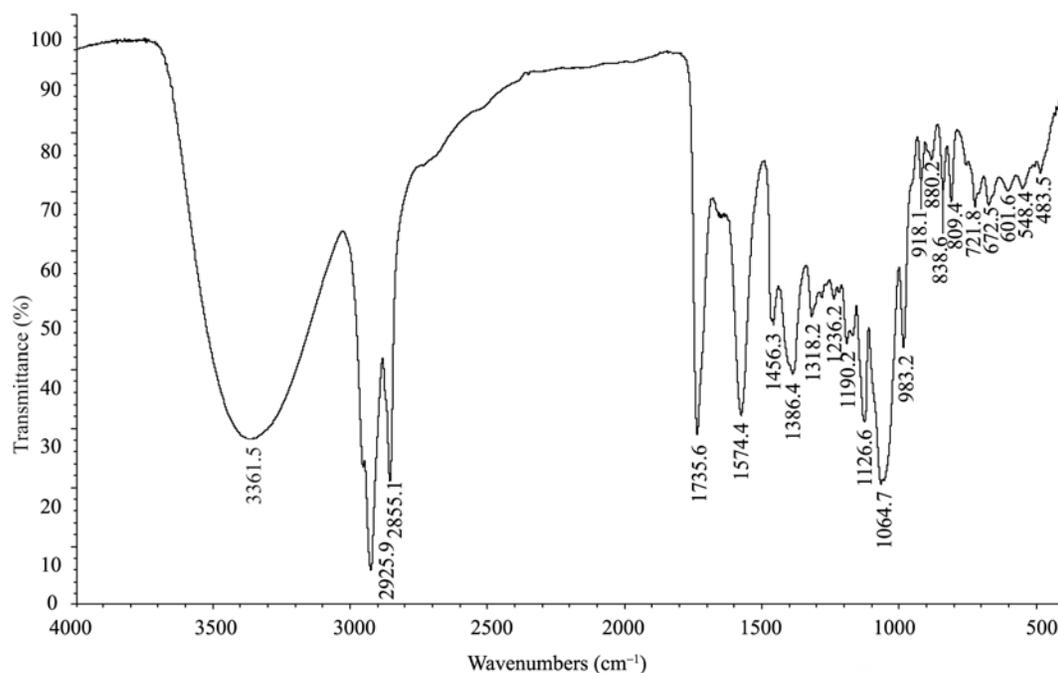


图 9 菌株 C-3 产生的生物表面活性剂的红外吸收光谱图

Fig. 9 FT-IR profile of biosurfactant from strain C-3

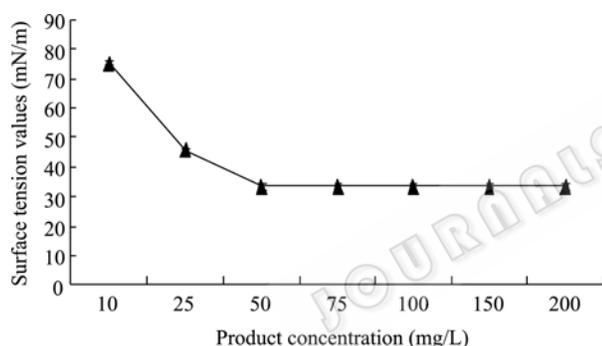


图 10 临界胶束浓度的测定

Fig. 10 The mensurment of CMC

3 结论

从扬子乙烯炼油厂废水中筛选出 1 株能够高效产生表面活性剂的菌株 C-3。经形态观察、生理生化特性测定及其 16S rDNA 序列和系统进化树的分析,初步鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

以植物油作为碳源可以显著提高菌株 C-3 的生长和表面活性剂的产生;在 20°C~37°C, pH 4~12 范围内,菌株 C-3 生长和产生表面活性剂的能力较强;在容量为 250 mL 三角瓶中装液量为 75mL, 适量加入 Ca²⁺ 的条件下, C-3 产生表面活性剂的能力最强。

初步提取 C-3 发酵产物, 产量为 4.13 g/L。用红

外光谱法(FT-IR)检测推断产物为具有亲水性糖基和亲油性环脂类碳链的不饱和糖脂类物质。C-3 菌株产物的 CMC 值为 50 mg/L。

综上所述, 本研究菌株 C-3 对于环境有很好的适应性, 并且产表面活性剂的性能稳定, 产量上也具有一定优势, 适合应用于生产实践中, 具有良好的推广前景。

参考文献

- [1] Georgiou G, Lin SC, Sharma MM. Surface-active compounds from microorganisms. *Nature Biotechnology*, 1992, **10**: 60-65.
- [2] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbio Mol Biol Rev*, 1997, **61**(1): 47-64.
- [3] Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, 2005, **21**: 1593-1600.
- [4] Mulligan CN, Gibbs BF. Factors influencing the economics of biosurfactants. In N. Kosaric(ed), *Biosurfactants: production, properties*, Marcel Dskker. Inc, New York, 1993: pp.329-371.
- [5] 吴清平, 蔡芷荷, 张菊梅. 表面活性素的结构特征及其

- 生物合成机理. 微生物学通报, 1998, 25(6): 351-353.
- [6] 时进刚, 袁兴中, 曾光明, 等. 生物表面活性剂的合成与提取研究进展. 微生物学通报, 2003, 30(1): 68-72.
- [7] 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选. 微生物学报, 1999, 39(3): 264-267.
- [8] Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods*, 1998, 32: 273-280.
- [9] Lin SC, Lin KG, Lo CC. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 23: 267-273.
- [10] Holt SG, Kriey NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. New York: Williams and Wilkins, 1998.
- [11] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 1995.
- [12] 张翠竹, 梁凤来, 张心平, 等. 一种脂肽类生物表面活性剂的理化性质及其对原油的作用. 油田化学, 2000, 17(2): 172-176.
- [13] 张翠竹, 张心平, 梁凤来, 等. 一株地衣芽孢杆菌产生的生物表面活性剂. 南开大学学报, 2000, 33(4): 41-45.
- [14] Cooper DG, Macdonald CR, Duff SBJ. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42(3): 408-412.
- [15] Zhang Y, Miller RM. Effect of rhamnolipid structure on solubilization and biodegradation of n-Alkanes. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(6): 2247-2251.
- [16] 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.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究;农业微生物学研究;工业微生物学研究;医学微生物学研究;食品微生物学研究;环境微生物学研究;微生物功能基因组研究;微生物蛋白组学研究;微生物模式菌株研究;微生物工程与药物研究;微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,2000年再获中国科学院优秀期刊三等奖,2001年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,更换了彩色封面,纸张改用铜版纸,由原来的小16开本改为标准大16开本(210×297),发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2009年的每册定价为48元,全年576元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel:(010)64807511; E-mail:tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; Http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号:2-817; 国外发行代号:BM413