

一株高产表面活性剂的南极土地杆菌的分离及其特性

焦亚彬¹, 崔巍然², 欧阳晴晴¹, 成俐¹, 穆红梅¹, 李静^{*1}

1 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266100

2 潍坊学院化学化工与环境工程学院, 山东 潍坊 261061

焦亚彬, 崔巍然, 欧阳晴晴, 成俐, 穆红梅, 李静. 一株高产表面活性剂的南极土地杆菌的分离及其特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3285-3299.

JIAO Yabin, CUI Weiran, OUYANG Qingqing, CHENG Li, MU Hongmei, LI Jing. Isolation and characterization of an Antarctic strain of *Pedobacter* sp. producing surfactant[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3285-3299.

摘要: 【背景】生物表面活性剂具有毒性低、生物兼容性好和可降解等优点, 是化学表面活性剂的优良替代物。目前产生物表面活性剂的微生物多为常温菌, 从低温环境中挖掘高产新型生物表面活性剂的生产菌株具有重要的意义。【目的】从南极土壤中筛选产表面活性剂的低温微生物, 对其表面活性剂进行纯化和结构解析并评估其性能。【方法】采用排油圈法对分离自南极菲尔德斯半岛土壤样品中的细菌菌株进行筛选, 获得一株在菌苔表面产白色固体颗粒的菌株, 对菌株进行形态观察和 16S rRNA 基因序列分析以确定该菌株系统发育地位。利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分离产物, 并用核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)技术对产物的化学结构进行鉴定。采用单因素试验和响应面设计方法对发酵培养基进行优化。此外, 对产物的乳化性能及其对柴油的降解能力进行评估。【结果】得到了一株高产生物表面活性剂的耐冷土地杆菌属(*Pedobacter*) GW9-17, 其最优发酵培养基(g/L)组成为: 可溶性淀粉 18.0、胰蛋白胨 9.0、 $C_3H_3NaO_3$ 4.4、 K_2HPO_4 3.6、 $MgSO_4$ 1.2, pH 7.0±0.2。在此条件下, 按 10% (体积分数)接种量、28 °C、180 r/min 培养 7 d 后表面活性剂的浓度可达到(3.0±0.5) g/L。利用 HPLC 和 NMR 技术发现菌株 GW9-17 表面活性剂主要成分为 flavolipid-9U,9U, 表面活性剂粗提物的甲醇-水溶液(体积比 1:1)对液体石蜡油有良好的乳化能力, 菌株 GW9-17 在柴油含量为 5%时, 在 4 °C 和 28 °C 条件下对柴油的降解率分别达到 40.1%和 57.3%。【结论】从南极土壤中获得了一株高产低分子量表面活性剂的低温 *Pedobacter* sp. GW9-17, 其产物 flavolipids 具有对烷烃类污染物增溶分解的潜力, 对石油污染的低温生态修复有重要的利用潜能。

关键词: 生物表面活性剂; flavolipids; 土地杆菌; 柴油降解

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2807500)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2807500).

*Corresponding author. E-mail: lijing313@ouc.edu.cn

Received: 2022-11-02; Accepted: 2023-03-16; Published online: 2023-04-17

Isolation and characterization of an Antarctic strain of *Pedobacter* sp. producing surfactant

JIAO Yabin¹, CUI Weiran², OUYANG Qingqing¹, CHENG Li¹, MU Hongmei¹, LI Jing^{*1}

¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

² School of Chemistry, Chemical Engineering and Environmental Engineering, Weifang University, Weifang 261061, Shandong, China

Abstract: [Background] With low toxicity, good biocompatibility, and biodegradability, biosurfactants are excellent substitutes for chemical surfactants. Most of the available biosurfactant-producing bacteria are mesophilic and it is of great significance to mine efficient biosurfactant-producing strains from cryogenic environments such as the Antarctic. [Objective] To screen psychrotolerant bacteria producing surfactants from the Antarctic soil samples and analyze the chemical structures and properties of the purified surfactants. [Methods] The biosurfactant-producing bacteria from the soil samples in Fildes Peninsula, Antarctic were screened by the oil spreading method. A strain with white solid particles on the colony surface was obtained and identified based on the morphology and the phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence. The components in the product were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by nuclear magnetic resonance (NMR). The fermentation medium of the strain was optimized by single factor experiment and response surface design. The emulsifying ability of the product and the diesel oil-degrading ability of the strain were evaluated. [Results] *Pedobacter* sp. GW9-17 with high surfactant production was screened out. The optimal fermentation medium contained (g/L): soluble starch 18.0, tryptone 9.0, C₃H₃NaO₃ 4.4, K₂HPO₄ 3.6 and MgSO₄ 1.2, with pH value 7.0±0.2. The concentration of the product reached (3.0±0.5) g/L after the strain was incubated in the optimal medium at 28 °C and 180 r/min for 7 days with an inoculum amount of 10% (volume fraction). The main component of the surfactant was flavolipid-9U,9U, and the methanol-aqueous solution (the volume ratio is 1:1) of the surfactant crude extract had good emulsifying ability for liquid paraffin oil. In the medium with 5% diesel oil, the strain GW9-17 showed the diesel oil-degrading rates of 40.1% and 57.3% at 4 °C and 28 °C, respectively. [Conclusion] A psychrotolerant strain, *Pedobacter* sp. GW9-17, efficiently producing the surfactant with a low molecular weight was isolated from the Antarctic soil. The product demonstrated the potential to degrade alkane pollutants and remediate the low-temperature environment of oil pollution.

Keywords: biosurfactants; flavolipids; *Pedobacter*; diesel oil degradation

生物表面活性剂是一类由微生物产生的两亲性分子,亲水部分为鼠李糖环、槐糖环、柠檬酸分子与尸胺分子、环肽等,疏水部分为饱和或不饱和脂肪酸、支链酰基、 β -羟基脂肪酸等,常

规低分子量生物表面活性剂可分为三大类:脂肽类、糖类和 flavolipid、脂肪酸和磷脂类^[1]。生物表面活性剂在较低的浓度下具有较好的乳化和降低表面张力的活性^[2],可作为化学表面活性剂

的环境友好型替代品, 在食品工业、制药和精细化工等领域的应用潜能引起广大学者的关注, 如鼠李糖脂(rhamnolipid)在生物修复、医药应用、化妆品、日常用品和抗农害等领域有广泛应用^[3]。从石油污染土壤中分离的产鼠李糖脂菌株对污染物有明显的吸收降解作用^[4-7], 除鼠李糖脂外, 微生物来源的脂肽类表面活性剂在石油污染清理中也具有良好应用前景, 如 *Bacillus subtilis* HSO121 产生的脂肽具有有效的石油分散作用, 可促进微生物对石油的生物降解^[8]。研究表明, 在烷烃类和多环芳烃类污染的生物修复过程中, 生物表面活性剂产生菌发挥着极其重要的作用, 通过生物表面活性剂乳化碳氢化合物是碳氢化合物降解菌最重要的特性之一^[9-10]。此外, 虽然生物表面活性剂在自然界中的生理功能和作用尚无精确的定义和研究, 研究人员推测它们可能促进微生物对难溶基质的吸收和生物降解, 调节生物膜结构和表面附着/分离, 参与群体感应并可作为免疫调节剂和毒力因素发挥作用^[11]。

表面活性剂产生菌多分离自石油污染土壤或海域, 一般在高于 20 °C^[12-16]的温度下进行表面活性剂性能的相关研究, 对低温环境微生物产生表面活性剂的研究则较少^[1,17-18]。低温不仅能改变石油化学性质和生物利用率, 还会减缓其生物降解速度, 北方海区是重要的石油开发区, 很多海上钻探和海底管道都位于低温环境中, 冬季发生的大量溢油事故亟须筛选低温表面活性剂高产菌。南极大陆独特的环境条件孕育了丰富的微生物资源, 是开发新物种与新颖代谢产物的重要来源。随着近年来社会生产工业化程度的提高和南极科考活动的开展, 有学者对南极相关区域中的悬浮颗粒物、表层沉积物及海洋生物展开了研究, 并在其中发现了多环芳烃污染物, 且在南极土壤污染地区分离到了碳氢化合物及多环芳

烃降解菌^[19-21]。例如, Kuc 等^[19]在南极土壤样品中发现有红球菌属(*Rhodococcus*)菌株能以长链烷烃为底物生长。因此我们推测南极大陆也是筛选和挖掘低温表面活性剂石油降解菌的重要资源宝库。

本研究旨在从南极菲尔德斯半岛土壤样品中筛选产表面活性剂的低温微生物资源, 探究其最适生长条件, 对其表面活性剂进行纯化和结构解析并评估其乳化能力及柴油降解能力, 为探究南极低温表面活性剂的菌株资源及其生物技术应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

研究分离菌株的土壤样品采集自南极菲尔德斯半岛, 经度 59.003°W, 纬度 62.210°S。

1.1.2 培养基

R2A 固体培养基(g/L): R2A 干粉 18.0, 琼脂 18.0。

R2A 液体培养基(g/L): R2A 干粉 18.0。

改良 R2A 基础培养基(g/L): 胰蛋白胨 1.5, 酸水解酪蛋白 3.0, 酵母浸粉 3.0, K₂HPO₄ 1.8, MgSO₄ 0.6, C₃H₃NaO₃ 1.8, 蛋白胨 1.5。

1.1.3 主要试剂和仪器

柴油, 中国石油化工集团有限公司; 革兰氏染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 2×*Taq* Mix 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 擎科生物科技股份有限公司。光学显微镜, 奥林巴斯有限公司; 透射电子显微镜, 捷欧路有限公司; 高效液相色谱仪, 日立有限公司; 核磁共振分析仪, 布鲁克科技有限公司; 旋转蒸发器, 赛洛捷克公司; 自动表面张力仪, 永德精密机械铸造有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 高速冷冻离心机、酶标仪和 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.2 菌株分离和筛选

取 5 g 土壤样品加入无菌生理盐水进行梯度稀释,涂布于固体 R2A 培养基,15 °C 培养 1–2 周至单菌落长出,挑选不同形态的单菌落进行划线纯化直至得到纯培养菌株。纯化菌株接种于 R2A 液体培养基中 15 °C、180 r/min 振荡培养 48 h,在培养皿中加入 20 mL 蒸馏水,滴入几滴苏丹 III 染色的柴油,待柴油均匀铺在水平面上,取一滴菌液滴在油层上,观察是否有排油圈,如果有则表明菌株产表面活性剂^[22]。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌落形态观察

挑取目标菌株单菌落于改良 R2A 培养基上进行三区划线,15 °C 培养 3 d 后进行形态观察。采用革兰氏染色试剂盒进行革兰氏染色,采用透射电子显微镜进行显微形态观察。

1.3.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA,采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Taq Mix 25 μL,超纯水 22 μL,正向引物(10 μmol/L) 1 μL,反向引物(10 μmol/L) 1 μL,模板 DNA (10 μmol/L) 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物送擎科生物(青岛)公司进行测序。测序结果经质检和拼接后提交至 EZbiocloud (www.ezbiocloud.net)进行 16S rRNA 基因序列比对,将相似性较高的标准菌株 16S rRNA 基因序列下载后导入 MEGA X 进行 ClustalW 多重序列比对,使用 *p-distance* 核酸模型构建系统发育树。

1.4 GW9-17 菌株生长曲线测定

将 GW9-17 单菌落接种于 50 mL R2A 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 作为

种子液。按 5% 的接种量接种于 R2A 液体培养基 28 °C、180 r/min 振荡培养,每隔 2 h 取样,以空白 R2A 液体培养基为对照,用酶标仪测定 OD_{600} 值。

1.5 菌株最适生长温度的探究及发酵培养基的优化

分别在 1、4、10、15、20、28 和 32 °C 下观察菌株在 R2A 固体培养基上的生长状况,确定最适生长温度,并在此最适温度下进行发酵培养基优化试验。

1.5.1 单因素优化试验

利用单因素试验方法探究不同碳源、氮源和无机盐对菌株 GW9-17 合成表面活性剂的影响。分别选取碳源(可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、甘露糖、乳糖和羧甲基纤维素钠),添加浓度为 6.0 g/L;氮源(蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏粉、胰蛋白胨、NH₃Cl 和酸水解酪蛋白),添加浓度为 9.0 g/L;无机盐及其添加量: C₃H₃NaO₃ 1.8 g/L、MgSO₄ 0.6 g/L、K₂HPO₄ 1.8 g/L 和 KCl 0.8 g/L。发酵温度 28 °C、装液量 50 mL/250 mL、接种量 10%、180 r/min 发酵 7 d。

1.5.2 最陡爬坡试验和响应面设计

确定发酵培养基成分后,根据试验显示出的响应值变化方向,在原添加量基础上设置 6 个梯度,每个梯度 3 个平行组。

根据最陡爬坡试验结果设计包含碳源、氮源和无机盐的 3 因素、3 水平、5 个中心试验点和 17 组试验的 Box-Behnken (BB) 响应面试验。采用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面分析,得到理论最优点。

1.6 表面活性剂的提取与结构鉴定

将 GW9-17 单菌落接种于 50 mL R2A 液体培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养 72 h 收集菌液,3 000 r/min 离心 5 min,用无菌水清洗白色沉淀 2–3 次,用甲醇溶解白色沉淀后 8 000 r/min 离心 5 min,取甲醇上清液过 0.22 μm 有机滤膜

后用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进一步提纯。HPLC 洗脱条件: 流动相为甲醇+1%三氟乙酸, 甲醇浓度: 0–5 min: 5%, 5–35 min: 5%–100%; 检测波长 200–600 nm; 流速 3 mL/min。在上述基础上的第二次洗脱条件: 流动相为 78%甲醇+1%三氟乙酸, 检测波长 200–600 nm, 流速 3 mL/min。收集白色沉淀的主要组分。

主要组分化学结构的鉴定: 将收集到的样品回收溶液至干后溶于二甲基亚砜(DMSO), 装入核磁管中进行核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)分析和解析结构。

1.7 表面张力与最大临界胶束值的测定

收集 30 mL 培养 7 d 的菌液 12 000 r/min 离心 15 min, 用吊环法测量上清液的表面张力值。参考 Bodour 等^[23]测定临界胶束值(critical micelle concentration, CMC)的方法, 配制 0、87.5、175、250、500、1 000 和 2 000 mg/L pH 7.0 的产物溶液, 测量并绘制出溶液浓度与表面张力的关系图, 并以此确定产物的 CMC。

1.8 表面活性分析

1.8.1 乳化能力评估

用 50%甲醇溶液配制不同浓度的产物溶液, 浓度梯度为 0、87.5、175、250、500、1 000 和 2 000 mg/L, 将液体石蜡与产物溶液以 1:5 的体积比加入 10 mL 的离心管中, 剧烈振荡 1 min 后静置 24 h, 观察乳化效果并计算乳化率(emulsification, E)^[23]。试验重复 3 次。

$$E(\%) = \frac{h}{(H+h)} \times 100$$

式中: h 为乳化层高度; H 为油层高度。

1.8.2 柴油降解能力评估

在改良 R2A 基础培养基中分别加入 5%、10%、20%和 30%的柴油作为培养基, 以 5%的接种量接种菌株 GW9-17, 180 r/min 条件下, 分别在 4 °C与 28 °C培养 7 d, 用 10 mL 石油醚萃取培养基中未降解的柴油, 计算柴油降解率

(degradation rate, D), 试验重复 3 次。

$$D(\%) = \frac{(M_{\text{萃取}} - M_{\text{石油醚}})}{M_{\text{柴油}}} \times 100$$

式中: $M_{\text{萃取}}$ 为萃取后的油层质量; $M_{\text{石油醚}}$ 为 10 mL 石油醚的质量; $M_{\text{柴油}}$ 为加入培养基的初始柴油质量^[24]。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及形态观察

利用 R2A 固体培养基分离和初步筛选后, 获得一株菌苔表面产白色颗粒物的菌株, 菌落呈粉褐色, 饱满隆起表面湿润, 黏性较大, 编号为 GW9-17 (图 1A)。菌株 GW9-17 在 R2A 液体培养基中培养 0–24 h 时呈淡粉色, 后期慢慢转变为土黄色, 静置后有白色沉淀出现(图 1B)。革兰氏染色阴性, 显微形态观察呈杆状(图 1C)。菌液有明显的排油能力(图 1D), 说明菌株 GW9-17 能够产生表面活性剂。因表面活性剂在高于其溶解度时会从液体中析出, 所以推测此白色沉淀可能是表面活性剂沉淀物。

2.2 菌株 GW9-17 的 16S rRNA 基因序列分析

对菌株 GW9-17 进行 16S rRNA 基因测序并提交至 EZbioCloud (www.ezbiocloud.net)进行序列比对, 结果显示菌株 GW9-17 与 *Pedobacter alluvionis* DSM 19624^T 的 16S rRNA 基因序列相似度最高, 达到 98.7%。选择 15 个相似度较高的 *Pedobacter* 属标准菌株 16S rRNA 基因序列进行 ClustalW 多重比对和邻接法系统发育树构建, 有效序列长度为 1 378 bp, 标准菌株 *Mucilaginibacter polysacchareus* DRP28^T 的 16S rRNA 基因序列为外群(图 2)。系统发育树显示菌株 GW9-17 与 *Pedobacter alluvionis* DSM 19624^T 以 95%的自展值处于同一进化分支, 结合菌株 GW9-17 显微形态观察, 可初步确定菌株 GW9-17 为土地杆菌属(*Pedobacter*)菌株。

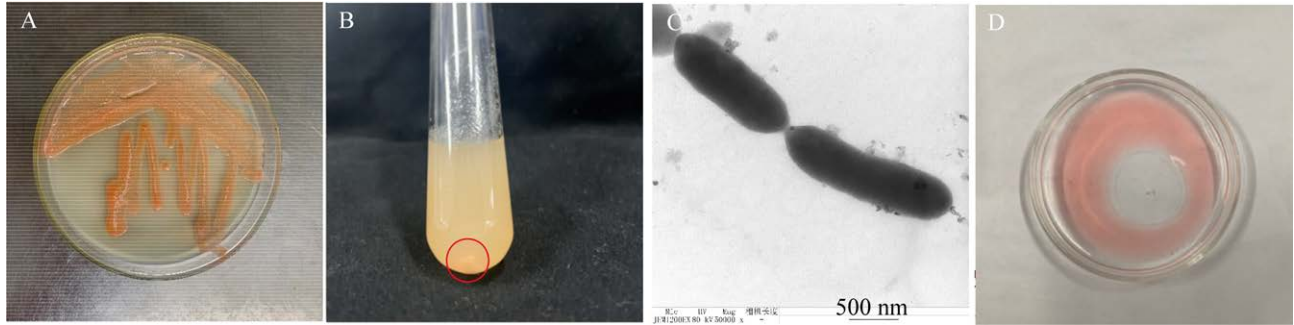


图1 菌株 GW9-17 的形态观察及筛选 A: 菌株 GW9-17 的固体培养形态. B: 菌株 GW9-17 在 R2A 液体培养基中的沉淀. C: 菌株 GW9-17 的显微形态. D: 菌株 GW9-17 菌液排油圈

Figure 1 Morphological and screening observation of strain GW9-17. A: Observation on colony morphology of GW9-17. B: Precipitation in R2A liquid medium. C: Micromorphology of GW9-17. D: Oil displaced circle of strain GW9-17 fermentation liquid.

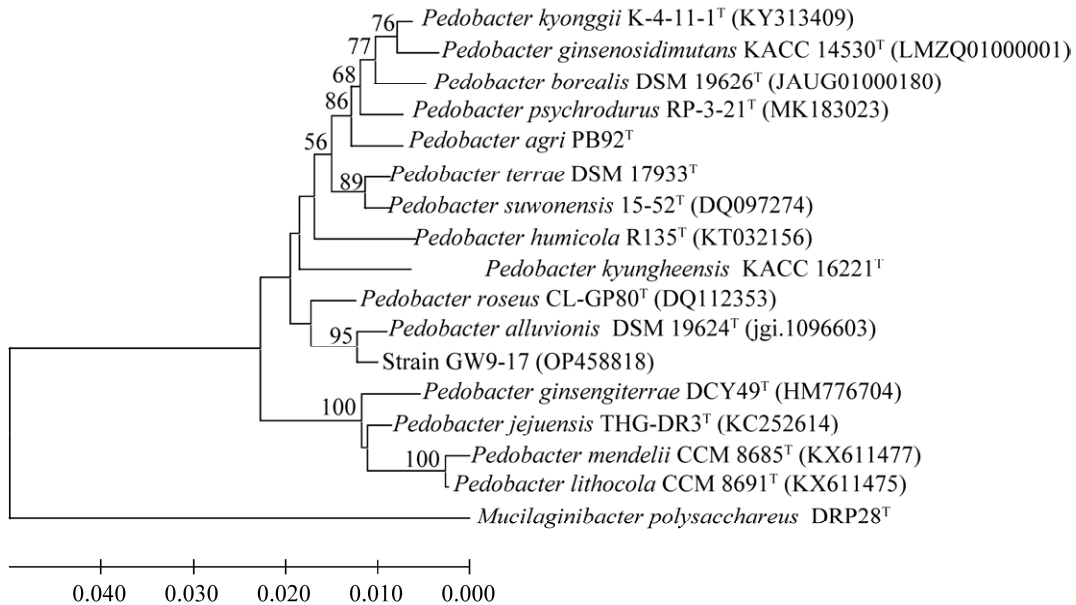


图2 菌株 GW9-17 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支点上的数字表示有 1 000 个自举重复的 bootstrap 值(仅显示大于 50% 的值); 括号内为参考菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 比例尺表示碱基替换率, 0.01 表示 1% 的替换率

Figure 2 Phylogenetic tree of strain GW9-17 based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap values are shown on nodes in percentages of 1 000 replicates, when greater than 50%. The accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of the strains are given in parentheses. Bar, 0.01 substitutions per 100 nt.

2.3 菌株 GW9-17 的生长曲线

如图 3 所示, 菌株 GW9-17 在 28 °C、180 r/min 的培养条件下培养 0–2 h 为延滞期, 2–20 h 为对数期, 20 h 后逐渐进入稳定期, 30 h 以后进入衰亡期。

2.4 菌株最适培养条件及响应面优化

2.4.1 菌株生长最适温度

在不同的温度下记录了菌株连续培养 7 d 的生长情况(表 1), 结果表明 GW9-17 为一株耐冷土地杆菌, 在 1–32 °C 均可生长, 在 4–28 °C 时

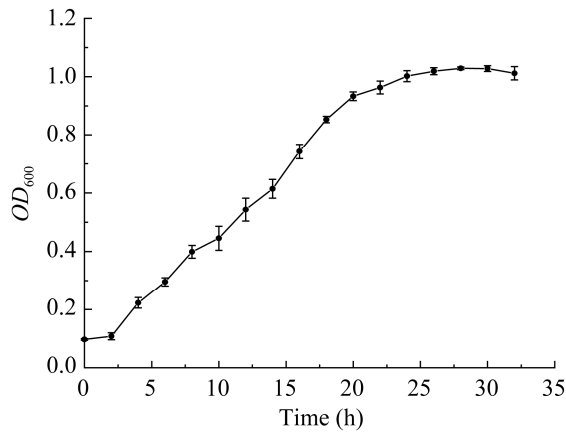


图3 菌株 GW9-17 的生长曲线
Figure 3 Growth curves of strain GW9-17.

表 1 不同温度下 R2A 固体培养基上菌株 GW9-17 生长状态

Table 1 Growth status of strain GW9-17 on R2A solid medium at different temperatures

Temperature (°C)	Growth status (culture for 7 d)
1	+
4	++
10	++
15	+++
20	+++
28	+++
32	++
37	-

+: 代表生长状态, +越多代表生长越旺盛; -: 无明显生长
+: Growth state, the more + means the more vigorous growth;
-: No obvious growth.

生长良好, 高于 37 °C 不再生长。

2.4.2 单因素试验优化结果

单因素试验优化结果显示, 可溶性淀粉为菌株 GW9-17 合成生物表面活性剂的最优碳源, 产物浓度达到 0.86 g/L (图 4)。胰蛋白胨为最优氮源, 产物浓度达到 2.39 g/L (图 5)。无机盐筛选结果(图 6)显示, 在改良基础 R2A 培养基的基础添加量上, $C_3H_3NaO_3$ 对生物表面活性剂产量影响最大, 产物浓度达到 2.21 g/L, 因此选择 $C_3H_3NaO_3$ 作为响应面试验设计的自变量; 结果

还显示同等摩尔质量的情况下, 添加 K_2HPO_4 的产量优于添加 KCl 的产量, 因此选用 K_2HPO_4 作为钾盐。

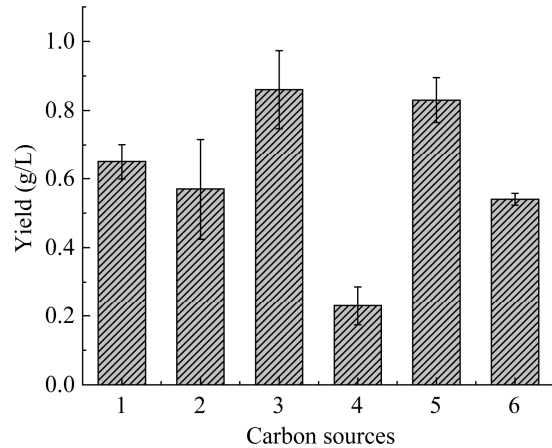


图 4 不同碳源对菌株 GW9-17 表面活性剂产量的影响 1: 蔗糖; 2: 葡萄糖; 3: 可溶性淀粉; 4: 甘露糖; 5: 乳糖; 6: 纤维素钠

Figure 4 Effect of different carbon sources on surfactant production of strain GW9-17. 1: Sucrose; 2: Glucose; 3: Soluble starch; 4: Mannose; 5: Lactose; 6: Sodium cellulose.

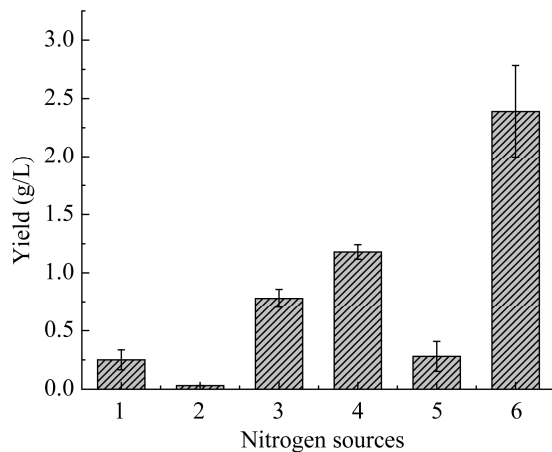


图 5 不同氮源对菌株 GW9-17 表面活性剂产量的影响 1: 牛肉膏粉; 2: NH_4Cl ; 3: 酸水解酪蛋白; 4: 酵母浸粉; 5: 蛋白胨; 6: 胰蛋白胨

Figure 5 Effect of different nitrogen sources on surfactant production of strain GW9-17. 1: Beef paste powder; 2: NH_4Cl ; 3: Acid hydrolyzed casein; 4: Yeast extract powder; 5: Peptone; 6: Tryptone.

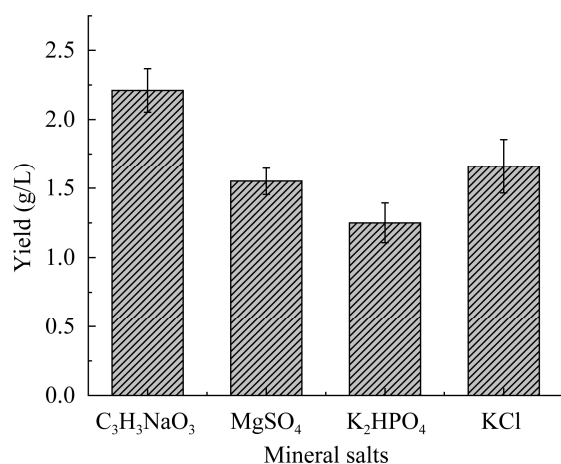


图6 不同无机盐对菌株GW9-17表面活性剂产量的影响

Figure 6 Effect of different mineral salts on surfactant production of strain GW9-17.

2.4.3 最陡爬坡试验设计及结果

最陡爬坡试验结果(表2)显示,第2组浓度梯度情况下,菌株GW9-17的表面活性物质产量最高,达到2.8 g/L,因此选用第2组试验为中心点进行后续响应面分析试验。

表2 最陡爬坡试验设计及结果

Table 2 Design and results of steepest climbing tests

Group	Soluble starch (%)	Tryptone (%)	C ₃ H ₃ NaO ₃ (%)	MgSO ₄ (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Yield (g/L)
1	0.60	0.90	0.18	0.06	0.18	1.84
2	1.20	1.80	0.36	0.12	0.36	2.80
3	1.80	2.70	0.54	0.18	0.54	1.56
4	2.40	3.60	0.72	0.24	0.72	1.34
5	3.00	4.50	0.90	0.30	0.90	0.29
6	3.60	5.40	1.08	0.36	1.08	0.15

表3 响应面试验因素设计与水平

Table 3 Factors and levels of response surface tests design

Factor	-1	0	1
A (Soluble starch) (%)	0.60	1.20	1.80
B (Tryptone) (%)	0.90	1.80	2.70
C (C ₃ H ₃ NaO ₃) (%)	0.18	0.36	0.54

2.4.4 响应面试验结果

以产量(Y)为响应值,选择影响因素较大且添加量相对较大的可溶性淀粉(A)、胰蛋白胍(B)、C₃H₃NaO₃(C)为考察因素进行响应面试验,试验因素与水平见表3,试验设计及结果见表4,方差分析结果见表5。

对表5的试验数据进行多元二次回归拟合,建立表面活性剂产量的回归模型。回归方程为 $Y=2.20+0.23A-0.91B+0.23C-0.15AB+0.21AC-0.13BC-0.80A^2-0.49B^2-0.63C^2$ 。由表5可知,模型拟合的决定系数(R^2 值)和校正决定系数(R^2_{Adj} 值)分别为0.9956和0.9900,表明模型的拟合程度良好、可信度高。模型的 $P<0.0001$,差异极显著,失拟项 P 值为0.2882,差异不显著($P>0.05$),说明该模型可用。由表5可知,各因素对菌株GW9-17的表面活性剂产量影响的主次顺序为胰蛋白胍>可溶性淀粉>C₃H₃NaO₃,即胰蛋白胍的影响最大,其次是可溶性淀粉和C₃H₃NaO₃。由回归方程和方差分析还可知,模型中一次项A、B和C,二次项AC、A²、B²和C²对产量的影响极显著($P<0.01$),其余项影响显著($P<0.05$)。

表 4 响应面试验设计及结果

Table 4 Design and results of response surface tests

Group	A (Soluble starch) (%)	B (Tryptone) (%)	C (C ₃ H ₃ NaO ₃) (%)	Y (Yield) (g/L)
1	0.60	0.90	0.36	1.43
2	0.60	0.90	0.36	2.11
3	0.60	2.70	0.36	0.02
4	1.80	2.70	0.36	0.11
5	0.60	1.80	0.18	0.50
6	1.80	1.80	0.18	0.60
7	0.60	1.80	0.54	0.52
8	1.80	1.80	0.54	1.47
9	1.20	0.90	0.18	1.69
10	1.20	2.70	0.18	0.02
11	1.20	0.90	0.54	2.41
12	1.20	2.70	0.54	0.22
13	1.20	1.80	0.36	2.16
14	1.20	1.80	0.36	2.19
15	1.20	1.80	0.36	2.24
16	1.20	1.80	0.36	2.31
17	1.20	1.80	0.36	2.10

表 5 回归模型的方差分析

Table 5 Variance analysis of regression model

Source of variation	Quadratic sum	DOF	Mean square	F value	P value	Significance
Model	13.70	9	1.52	176.98	<0.000 1	**
A	0.41	1	0.41	47.92	0.000 2	**
B	6.59	1	6.59	766.04	<0.000 1	**
C	0.41	1	0.41	47.76	0.000 2	**
AB	0.09	1	0.09	10.29	0.014 9	*
AC	0.18	1	0.18	21.14	0.002 5	**
BC	0.07	1	0.07	7.86	0.026 4	*
A ²	2.68	1	2.68	311.94	<0.000 1	**
B ²	0.99	1	0.99	115.41	<0.000 1	**
C ²	1.68	1	1.68	195.24	<0.000 1	**
Residual error	0.06	7	0.01			
Lack of fit	0.04	3	0.01	1.79	0.288 2	
Error term	0.03	4	0.01			
Total	13.76	16				

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

此模型计算出的可溶性淀粉(A)、胰蛋白胍(B)和 C₃H₃NaO₃ (C)的最优添加量分别为 1.80%、0.90%和 0.44%, 预测的响应值为 2.3 g/L。因此,

最终确定优化培养基配方为(g/L): 可溶性淀粉 18.0、胰蛋白胍 9.0、C₃H₃NaO₃ 4.4、K₂HPO₄ 3.6 和 MgSO₄ 1.2。经过验证试验证明最优培养基配

方时的产量为(3.0±0.5) g/L。

2.5 产物的分离提纯与鉴定结果

菌株 GW9-17 发酵液中的沉淀产量可达 (3.0±0.5) g/L, 溶于 DMSO、甲醇或乙醇等有机溶剂, 微溶于水; 产物的甲醇溶液经过变梯度流动相的 HPLC 分析显示(图 7A), 白色产物为混合物, 在 33 min 出现一个主要峰, 该峰在 218 nm 有最大吸收峰; 继而对此主要峰物质进行提纯, 恒梯度流动相的 HPLC 分析显示(图 7B)在 21 min 出现一个明显单峰, 且此峰的最大吸光度为 218 nm, 初步认定此单峰为白色产物内的主要物质, 将其命名为化合物 1。

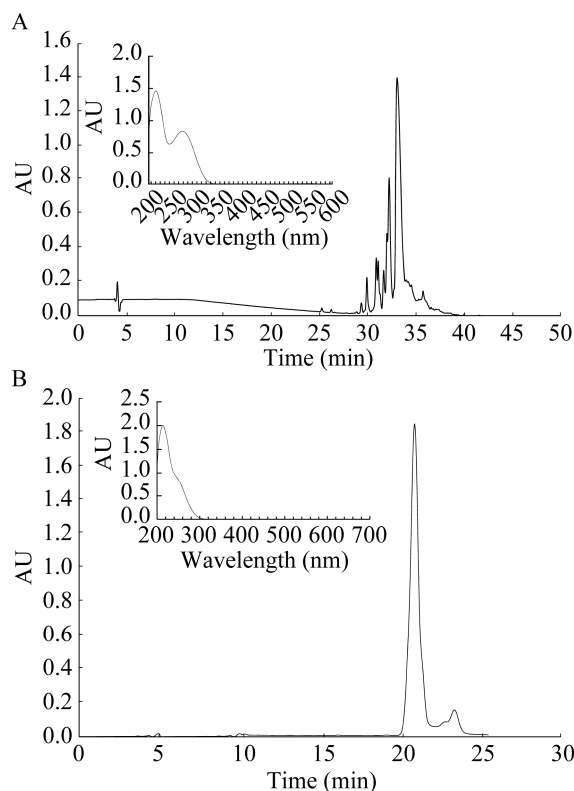


图 7 变梯度流动相(A)和恒梯度流动相(B)的 HPLC 分析图 图中左上角小图显示了相应 HPLC 分析图中主要成分的最大吸光度

Figure 7 HPLC analysis of variable gradient mobile phase (A) and constant gradient mobile phase (B). The upper left small figure shows the maximum absorbance of the main components in the corresponding HPLC analysis figure.

经过提纯的化合物 1 为黄色油状化合物, 低分辨阳离子质谱 ESIMS 于 m/z 667.69 处发现 $[M+H]^+$ 峰, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 数据(表 6) 推测该化合物的分子式为 $C_{34}H_{60}N_4O_9$, 表明含有 7 个不饱和度。1D-NMR 数据显示化合物 1 含有 4 个甲基、7 个亚甲基、4 个羰基、1 个羧基、2 个次甲基、1 个季碳和 2 个双键, 与已知化合物 flavolipid-9U,9U (图 8) 的核磁数据一致, 确定化合物 1 为已知化合物。Flavolipid-9U,9U 为一种低分子量表面活性剂, 为 Bodour 等^[23]发现并鉴定发表, 具有极强的极性和良好的乳化能力, 极性部分由 1 个柠檬酸和 2 个尸胺分子构成, 非极性部分为 2 个含 6–10 个碳原子的酰基支链。我们将菌株 GW9-17 合成的这类以 flavolipid-9U,9U 为主成分的生物表面活性剂统称为 flavolipids。

表 6 化合物 1 的 1H (600 MHz) 和 ^{13}C (125 MHz) NMR 数据分析

Table 6 1H (600 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data for compound 1 (DMSO- d_6 , TMS, δ ppm)

No.	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	175.5	
2	74.0	
3	43.7	2.43, 2.51–2.53, m
4	167.0	
6	38.9	2.94–2.97, q(6.4)
7	29.2	1.33, ov.
8	24.0	1.17–1.20, m
9	26.3	1.48, ov.
10	47.7	3.47, t(6.9)
12	165.8	
13	120.5	6.49, d(14.3)
14	145.7	6.61–6.66, m
15	32.4	2.13, q(7.1)
16	26.3	1.36, ov.
17	38.5	1.11, m
18	27.8	1.49, ov.
19	23.0	0.81, d(6.7)

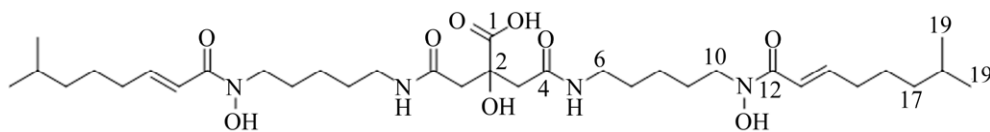


图 8 Flavolipid-9U,9U 的结构图

Figure 8 Structure of flavolipid-9U,9U.

2.6 表面张力和 CMC 的测定结果

经吊环法测量, *Pedobacter* sp. GW9-17 的培养液上清液的表面张力降低到 42.5 mN/m。表面活性剂溶液浓度与溶液的液体表面张力关系图如图 9 所示, 测定出生物表面活性剂 flavolipids 的 CMC 为 112.59 mg/L。

2.7 GW9-17 产物 flavolipids 的乳化能力

对不同浓度 flavolipids-50% 甲醇溶液进行乳化能力的评估的结果显示 50% 的水-甲醇溶液对液体石蜡油虽有一定的乳化能力, 静置 24 h 后乳化指数达到 30%, 但 flavolipids 浓度分别为 62.5、125 和 250 mg/L 时乳化能力明显提高, 静置 24 h 后乳化指数达到 100%, 而当 flavolipids 浓度达到 1 000 mg/L 和 2 000 mg/L 时, 对液体石蜡的乳化呈现抑制作用, 静置 24 h 后乳化指数分别降到 10% 和 0% (图 10 和图 11)。

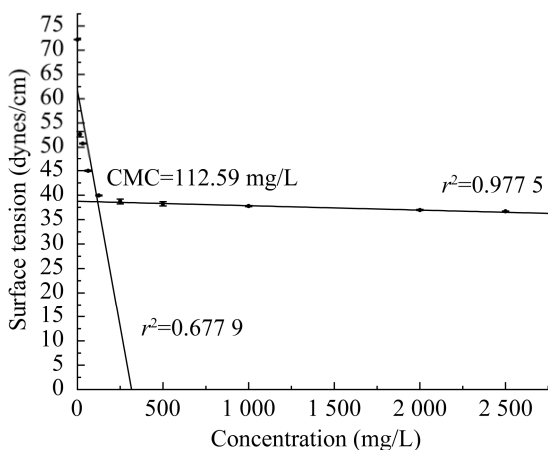


图 9 Flavolipids 的临界胶束浓度

Figure 9 The CMC of flavolipids.

2.8 菌株 GW9-17 降解柴油能力的评估

通过质量差法计算得出的柴油降解率如图 12 所示, 从结果可以看出在 28 °C 和 4 °C 情况下, 随着柴油浓度的上升, 菌株 GW9-17 对其降解率也随之下降, 在 5% 的柴油含量下降解率最高, 28 °C 的平均降解率达到了 57.3%, 4 °C 的平均降解率达到了 40.1%。

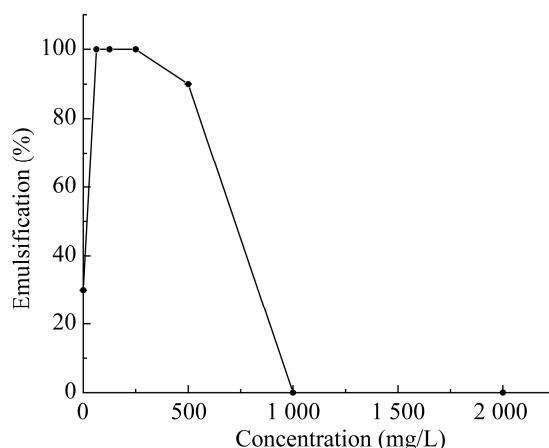


图 10 不同浓度 flavolipids-50% 甲醇溶液的乳化能力

Figure 10 Emulsifying capacity of 50% methanol solution of flavolipids with different concentrations.

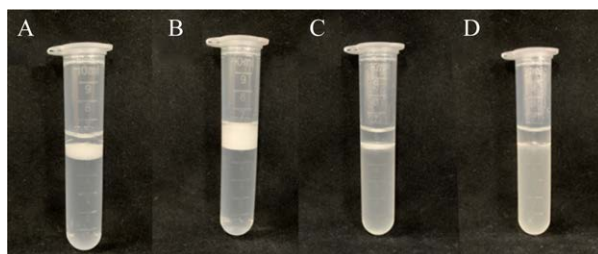


图 11 不同浓度 flavolipids-50% 甲醇溶液静置 24 h 后的乳化效果对比

Figure 11 Emulsifying capacity contrast of 50% methanol solution of flavolipids with different concentration after standing for 24 h. A: 0 mg/L. B: 62.5 mg/L. C: 1 000 mg/L. D: 2 000 mg/L.

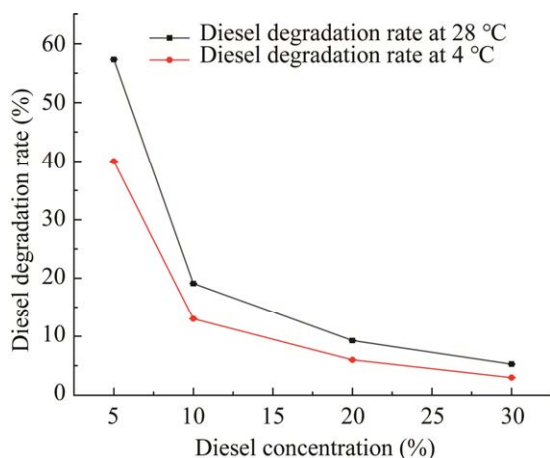


图 12 菌株 GW9-17 对不同浓度柴油的降解率
Figure 12 The degradation rate of strain GW9-17 to different concentrations of diesel oil.

3 讨论

极端环境和极端环境微生物是新颖代谢产物的重要来源,目前极端环境微生物合成的表面活性剂引起了研究人员的极大关注。南极地区气候酷寒干燥、强紫外(UV)辐射和季节性光照与温度波动等恶劣的极端环境条件孕育了宝贵的微生物资源和极具研究价值的代谢产物,已有研究显示合成表面活性剂是极地微生物的一个普遍特点^[25], 极地土壤和沉积物微生物群落中近50%成员具有产生生物表面活性剂的能力,因此从南极低温环境中筛选挖掘高产或新型表面活性剂生产菌株,对提高生物表面活性剂的生物技术潜力及支持环境友好型生物表面活性剂的推广具有重要意义。

本研究通过排油圈筛选从南极土壤中分离获得一株土地杆菌属(*Pedobacter*)菌株 GW9-17, 可产低分子量表面活性剂 flavolipids, 经培养条件优化后目标产物产量可达(3.0±0.5) g/L; 菌株 GW9-17 flavolipids 的 CMC 为 112.59 mg/L, flavolipids-50%甲醇溶液中对石蜡油有较好的乳化性, 菌株 GW9-17 对柴油也有一定的降解作

用。这是首次在南极环境中分离并鉴定到低分子量生物表面活性剂 flavolipids, 本研究中菌株 GW9-17 表面活性剂主要组分与 flavolipid-9U,9U 具有相同的化学结构, flavolipid-9U,9U 最早由 Bodour 等^[23]从源自亚热带森林土壤的 *Flavobacterium* sp. MTN11 (现命名为 *Pedobacter kyonggii*)中分离并鉴定。土地杆菌属(*Pedobacter*)为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)鞘氨醇杆菌科(*Sphingobacteriaceae*)成员, 在自然环境广泛分布, Sigurbjörnsdóttir 等^[26]在亚-北极陆生地衣样品中分离筛选到 4 株可合成表面活性剂的 *Pedobacter* 菌株, 但对菌株的生长特性、产物类型和结构尚未有进一步研究。目前南极环境来源的生物表面活性剂研究也相对较少, 研究人员在南极海水、土壤和苔藓等样品中分离到少量产表面活性剂的微生物, 包括产脂肽的 *Bacillus* sp., 产糖脂类表面活性剂的 *Pseudomonas* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.、*Pantoea* sp.、*Rhodococcus* sp.和 *Nocardia* sp.等原核微生物, 真核微生物有产甘露醇赤藓糖醇脂类表面活性剂的 *Moesziomyces antarcticus*^[1]。本研究中菌株 GW9-17 为首次从南极环境中分离获得的产表面活性剂土地杆菌属菌株, 经 16S rRNA 基因序列比对确定为 *Pedobacter alluvionis*, 且在 4–28 °C 生长良好, 扩充了低温表面活性剂合成菌株资源。

菌株 GW9-17 在固体和液体培养时产物为固体颗粒形式, 微溶于水, 这一点与 *Flavobacterium* sp. MTN11 产物 flavolipids 具有明显差别, 我们推测有两点原因, 菌株 MTN11 产物 flavolipids 产量很低, 仅达到 0.05–0.1 g/L^[23], 而 GW9-17 产物初始产量为(2.0±0.5) g/L, 经发酵条件优化后可达(3.0±0.5) g/L, 高浓度生物表面活性剂易从培养基中析出沉淀。另外一个可能的原因则是, Bodour 等^[27]研究发现 *Bacillus subtilis* HAZ2

和 GA1-5 都可合成同一类脂肽表面活性剂,但其表面张力降低能力有显著差别,显示这两株菌产生的表面活性剂混合物组分不同的,也有学者指出不同类型的表面活性剂混合时会显著降低其临界胶束值^[28]。尽管菌株 GW9-17 和 MTN11 都可以合成 flavolipids 类表面活性剂,但两株菌的 16S rRNA 基因序列系统发育关系较远(图 2),因此我们推测两株菌所产的表面活性剂具有不同的组分,从而表现出溶解性及临界束胶值(CMC)的差异。菌株 MTN11 的 flavolipids 产物包括 37 个组分^[23],目前菌株 GW9-17 产物尚未完全解析出各个组分的结构,后续仍需要对 GW9-17 产物中其他组分继续进行纯化及化学结构解析。

在 Bodour 等^[23]的研究中,菌株 MTN11 产物 flavolipids 是一种良好的乳化剂,对 10%柴油的乳化能力可达到 100%,本研究中 flavolipids-50%甲醇溶液也对液体石蜡有 100%的乳化效果,但在浓度达到 1 g/L 时乳化指数开始明显下降,针对这种现象也有学者做过类似的研究。Peng 等^[29]发现当表面活性剂 Tween-80 和 Triton X-100 的浓度达到 5 g/L 后,其对多环芳香烃的溶解率并未增加反而降低,我们推测 flavolipids 具有相似的性质,从而导致随着浓度升高而对液体石蜡油的乳化效果降低的现象。

有学者推测低温生物表面活性剂可以支持微生物群落代谢,通过提高环境中复杂营养物质的增溶性和动员(mobilization)作用,从而提高微生物对复杂生物聚合物水解产生的疏水残基的生物利用度^[1],因此对低温土壤中碳和养分的周转具有重要的生态作用。此外生物表面活性剂对保护微生物适应低温环境也有重要作用,Kitamoto 等^[30]发现南极酵母菌 *Candida antarctica* T-34^T 合成的生物表面活性剂二酰基甘露糖基赤藓糖醇能够明显地抑制冰浆中冰晶

颗粒的聚集和生长。有学者在亚北极地区的地衣中分离出产表面活性剂的土地杆菌属,并推测这些产表面活性剂的细菌在地衣共生中具有非常重要的生态意义^[26]。我们推测菌株 GW9-17 产物 flavolipids 的生态功能是在低温下有助于菌株更好地利用环境中烷烃和多芳烃等复杂碳源,以及抗冰晶颗粒凝聚作用,而非抑制其他微生物的生长。Bodour 等^[27]指出生物表面活性剂结构或组成的微小差异也会对其在环境、临床使用或工业应用中的活性产生重大影响,因此,南极耐冷菌 *Pedobacter* sp. GW9-17 表面活性剂产物的性质和潜在应用特性尚待进一步深入研究和全面分析,以补充和完善南极低温土地杆菌属生物表面活性剂合成及性能等方面的信息。

4 结论

从南极土壤中获得一株高产 flavolipids 的土地杆菌 GW9-17,Flavolipids 有良好的乳化能力。菌株 *Pedobacter* sp. GW9-17 作为一株高产 flavolipid-9U,9U 的菌株,具有较高的规模化生产价值,对低温环境下石油污染土壤的生态修复具有重要的利用潜能。

REFERENCES

- [1] GUTNICK DL, BACH H. Biosurfactants[M]//MURRAY MY. Comprehensive Biotechnology. Second Edition. Burlington: Academic Press, 2011: 699-715.
- [2] PERFUMO A, BANAT IM, MARCHANT R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(3): 277-289.
- [3] SEKHON RANDHAWA KK, RAHMAN PKSM. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 454.
- [4] POURFADAKARI S, GHAFARI S, TAKDASTAN A, JORFI S. A salt resistant biosurfactant produced by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* (AHV-KH10) and its application for bioremediation of

- diesel-contaminated sediment in saline environment[J]. Biodegradation, 2021, 32(3): 327-341.
- [5] AHMADI M, NIAZI F, JAAFARZADEH N, GHAFARI S, JORFI S. Characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain R₄ and its application for remediation pyrene-contaminated soils[J]. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 2021, 19(1): 445-456.
- [6] AN CJ, HUANG GH, WEI J, YU H. Effect of short-chain organic acids on the enhanced desorption of phenanthrene by rhamnolipid biosurfactant in soil-water environment[J]. Water Research, 2011, 45(17): 5501-5510.
- [7] 李德雨, 商奥, 张迪, 江海龙, 王文星. 一株糖脂表面活性剂产生菌的筛选及干酪根降解[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2606-2614.
- LI DY, SHANG A, ZHANG D, JIANG HL, WANG WX. Screening of a glycolipid biosurfactant-producing strain for kerogen biodegradation[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2606-2614 (in Chinese).
- [8] FENG JQ, GANG HZ, LI DS, LIU JF, YANG SZ, MU BZ. Characterization of biosurfactant lipopeptide and its performance evaluation for oil-spill remediation[J]. RSC Advances, 2019, 9(17): 9629-9632.
- [9] ZHANG X, LIU X, WANG Q, CHEN X, LI H, WEI J, XU G. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triquetus*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 87: 99-105.
- [10] IMRON MF, KURNIAWAN SB, TITAH HS. Potential of bacteria isolated from diesel-contaminated seawater in diesel biodegradation[J]. Environmental Technology & Innovation, 2019, 14: 100368.
- [11] ABDEL-MAWGOUD AM, LÉPINE F, DÉZIEL E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1323-1336.
- [12] KHADEMOLHOSSEINI R, JAFARI A, MOUSAVI SM, HAJFARAJOLLAH H, NOGHABI KA, MANTEGHIAN M. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process[J]. RSC Advances, 2019, 9(14): 7932-7947.
- [13] THAVASI R, JAYALAKSHMI S, BALASUBRAMANIAN T, BANAT IM. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 917-925.
- [14] DADRASNIA A, ISMAIL S. Biosurfactant production by *Bacillus salmalaya* for lubricating oil solubilization and biodegradation[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12(8): 9848-9863.
- [15] PORNUNTHORNTAWEE O, WONGPANIT P, RUJIRAVANIT R. Rhamnolipid biosurfactants: production and their potential in environmental biotechnology[J]. Biosurfactants, 2010, 672: 211-221.
- [16] MARTÍNEZ-TOLEDO A, RODRIGUEZ-VAZQUEZ R, ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ CA. Culture media formulation and growth conditions for biosurfactants production by bacteria[J]. International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources, 2018, 10(3): 117-125.
- [17] TRIPATHI L, IRORERE VU, MARCHANT R, BANAT IM. Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource[J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(11): 1441-1457.
- [18] SCHULTZ J, ROSADO AS. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications[J]. Extremophiles, 2020, 24(2): 189-206.
- [19] KUC V, VÁZQUEZ S, HERNÁNDEZ E, MARTINEZ-ALVAREZ L, PRIMITZ JV, PATRICIO MCW, RUBERTO L. Hydrocarbon-contaminated antarctic soil: changes in bacterial community structure during the progress of enrichment cultures with different *n*-alkanes as substrate[J]. Polar Biology, 2019, 42(6): 1157-1166.
- [20] CURTOSI A, PELLETIER E, VODOPIVEZ CL, MAC CORMACK WP. Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica[J]. Antarctic Science, 2009, 21(4): 329-339.
- [21] 马迎飞. 南极土壤中多环芳烃(PAHs)降解菌的研究: 分离、鉴定和降解基因的检测[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2004.
- MA YF. Study on PAHs—biodegrading bacteria in Antarctic soil: isolation, characterization and degrading genes detection[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2004 (in Chinese).
- [22] GARGOURI B, CONTRERAS MD, AMMAR S, SEGURA-CARRETERO A, BOUAZIZ M. Biosurfactant production by the crude oil degrading *Stenotrophomonas* sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2017,

- 24(4): 3769-3779.
- [23] BODOUR AA, GUERRERO-BARAJAS C, JIORLE BV, MALCOMSON ME, PAULL AK, SOMOGYI A, TRINH LN, BATES RB, MAIER RM. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 114-120.
- [24] 周敏, 陈吉祥, 杨智, 王永刚, 李文新, 胡巍, 孙尚琛. 芽孢杆菌 ZG0427 表面活性剂性质及对石油降解菌的作用[J]. 安全与环境学报, 2017, 17(6): 2376-2381. ZHOU M, CHEN JX, YANG Z, WANG YG, LI WX, HU W, SUN SC. Characterization and its effect on oil-degradation bacteria of biosurfactants produced by a *Bacillus* sp. ZG0427[J]. Journal of Safety and Environment, 2017, 17(6): 2376-2381 (in Chinese).
- [25] VOLLÚ RE, JURELEVICIUS D, RAMOS LR, PEIXOTO RS, ROSADO AS, SELDIN L. Aerobic endospore-forming bacteria isolated from Antarctic soils as producers of bioactive compounds of industrial interest[J]. Polar Biology, 2014, 37(8): 1121-1131.
- [26] SIGURBJÖRNSDÓTTIR MA, VILHELMSSON O. Selective isolation of potentially phosphate-mobilizing, biosurfactant-producing and biodegradative bacteria associated with a sub-arctic, terricolous lichen, *Peltigera membranacea*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(6): fiw090.
- [27] BODOUR AA, DREES KP, MAIER RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3280-3287.
- [28] LI Z, WANG W, ZHU L. Effects of mixed surfactants on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in crops and the bioremediation of contaminated farmlands[J]. Science of the Total Environment, 2019, 646: 1211-1218.
- [29] PENG S, WU W, CHEN J. Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: influencing factors and removal effectiveness[J]. Chemosphere, 2011, 82(8): 1173-1177.
- [30] KITAMOTO D, YANAGISHITA H, ENDO A, NAKAIWA M, NAKANE T, AKIYA T. Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage[J]. Biotechnology Progress, 2001, 17(2): 362-365.