

微生物絮凝剂产生菌 NX-2 的筛选和合成条件的研究*

姚俊 姜岷 桑莉 徐虹

(南京工业大学制药与生命科学学院,南京 210009)

摘要 从土壤中筛选分离到 1 株高效絮凝剂产生菌 NX-2,鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。在含谷氨酸和葡萄糖的培养基中培养,其发酵产物粘度高,对高岭土、活性炭等固体悬浮颗粒具有显著的絮凝作用,而缺少谷氨酸和额外碳源则不能产生絮凝活性。NX-2 培养并产生絮凝活性的碳源可采用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、可溶性淀粉和果糖,氮源采用酵母膏、蛋白胨等有机氮源或铵盐等无机氮源。通过核磁共振等手段对分离提纯的样品进行结构表征,鉴定其为 γ -聚谷氨酸。

关键词 生物絮凝剂 枯草芽孢杆菌 絮凝 筛选

具有分泌絮凝剂能力的微生物称为絮凝剂产生菌,至今发现的具有絮凝性的微生物包括霉菌、细菌、放线菌和酵母菌等,微生物絮凝剂是微生物的代谢产物,组成和结构可以是多糖、蛋白质、糖蛋白^[1],如 *Alcaligenes cupidus* KT201^[2]、*Alcaligenes latus* B-16^[3]为多聚糖类絮凝剂,*Nocardia amarae* YK1^[4]、*Aspergillus sojae* AJ7002^[5]为蛋白质类絮凝剂,*Rhodococcus erythropolis* S-1 合成的 NOC-1^[6,7]为糖蛋白类絮凝剂。与传统的无机和有机高分子絮凝剂相比,微生物絮凝剂是一种可生物降解的天然生物高分子絮凝剂,对人体无害,不存在二次污染,具有广阔的应用前景。

实验室筛选到 1 株絮凝剂产生菌枯草杆菌 NX-2,并对其合成絮凝剂的条件、絮凝剂的组成和性质进行了深入研究。

1 材料和方法

1.1 菌种的筛选和鉴定

污泥和土壤样品经稀释后涂布于分离培养基中,37℃ 培养 2 d 后检出高粘度、生长快的菌落。将分离得到的菌种接种到发酵培养基中,于旋转式摇床上(转速 220 r/min),37℃ 培养 24 h 后检测发酵液的絮凝活性。挑取高效菌株用

于下一步试验。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 分离培养基

葡萄糖 1%,酵母膏 0.5%,谷氨酸钠 0.5%, KH_2PO_4 0.05%, MgSO_4 0.01%,琼脂 2%,pH7.0。

1.2.2 基础培养基

酵母膏 0.5%, KH_2PO_4 0.05%, MgSO_4 0.01%,pH7.0。

1.2.3 种子培养基

葡萄糖 2%,酵母膏 0.5%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, MgSO_4 0.025%,谷氨酸钠 1%,pH7.0。

1.2.4 发酵培养基

葡萄糖 3%,酵母膏 0.8%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, MgSO_4 0.025%,谷氨酸钠 1%,pH7.5。

1.2.5 培养条件

取 1 环菌体接种于种子培养基(500 mL 三角瓶装液量 50 mL),在转速 220 r/min,32℃ 条件下振荡培养 15 h,然后按 1% 接种量接种于发酵培养基培养。

1.3 产物的提取

离心去除发酵液所含细胞,上清液用 3 倍体积的乙醇进行沉淀,得粘性沉淀物,干燥得粗品,将粗品溶于蒸馏水后过夜透析,透析液经冷

第一作者:硕士研究生(徐虹教授为本文通讯作者)。

* 本课题得到江苏省高技术基金(No. BG.2001043)和国家“864”项目(No. 2002AA327030)开放课题资助

收稿时间 2003-11-04,改回时间 2004-02-16

冻干燥得产品。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞浓度的测定

将发酵液稀释 25 倍后于 721 分光光度计 660 nm 处读取吸光值。

1.4.2 多糖测定

硫酸-苯酚法。

1.4.3 氨基酸测定

HITACHI 655 氨基酸分析仪测定。

1.4.4 絮凝活性的测定

絮凝活性测定方法为:将 0.5 g 高岭土(平均粒度 4 μm)置于 100 mL 烧杯中,加入 100 mL 蒸馏水,搅拌均匀后加入 0.1 mL 发酵液,搅匀后静置 3 min,即刻用 721 型分光光度计在 550 nm 处测定其上清液的光密度。同时以不加絮凝剂的高岭土悬浮液作为对照。通过絮凝率来表示絮凝活性,公式如下:

$$\text{絮凝率} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

式中, A 为对照上清液的光密度值; B 为样品上清液的光密度值。

1.4.5 以核磁共振进行结构表征

采用 Bruker Avance 400 高分辨率魔角旋转核磁共振仪(HR/MAS NMR),工作频率 400.13MHz。¹H-NMR 和¹³C-NMR 均以 D₂O 为溶剂。

1.5 絮凝活性分布实验

取不同发酵时间的发酵液 10 mL, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用, 菌体细胞以蒸馏水洗涤 2 次, 制成细胞悬浮液。分别测定发酵原液、上清液和细胞悬浮液的絮凝活性。

2 结果和讨论

2.1 筛选结果

从污泥、土壤中分离筛选出多种生长快, 产生粘性的菌株, 培养后其中 1 株的发酵液的絮凝活性最高, 经中科院微生物研究所鉴定, 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 专利保藏号为 CGMCC0833, 命名为 NX-2。

在普通肉汁琼脂平板上, 当培养基较为潮湿时, 菌落湿润、圆整, 表面光滑, 边缘整齐; 干

燥时, 菌落粗糙皱褶, 中央凹陷, 边缘不规则; 当向培养基中添加少量谷氨酸时, 菌落扩展明显, 经 2 d 培养, 菌落直径达 15~25 mm, 表面呈“木耳状”。倒置培养时, 菌落悬挂达 1 cm 以上, 挑起成很长的丝, 如图 1 所示。

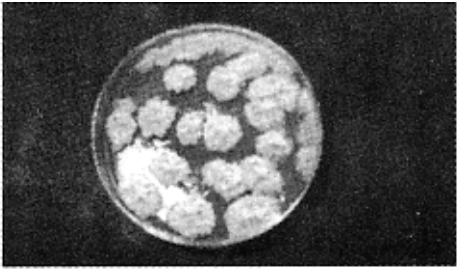


图 1 NX-2 的菌落形态

2.2 NX-2 合成絮凝剂的培养特征

2.2.1 菌体生长和絮凝剂合成特征

图 2 为 NX-2 的菌体生长与培养液絮凝活性曲线。

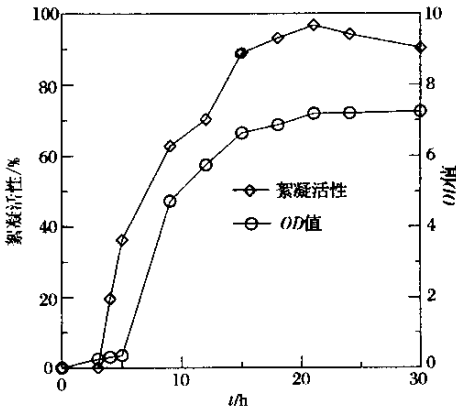


图 2 NX-2 菌体生长与絮凝活性曲线

由图 2 可知, 絮凝活性随着培养时间延伸而增强, 说明絮凝剂在菌体生长过程中产生并积累。在 10~21 h 处于对数生长期, 絮凝活性在此期间增加最为迅速, 在 21 h 时絮凝活性达到 93.1%, 21 h 后絮凝活性有所下降, 可能因为解絮凝酶^[3,5]的存在或生长期后期营养物质基本耗尽, 絮凝剂作为一种有机大分子被菌体利用吸收。这与 *Alcaligenes latus*^[3]、*Aspergillus sojae* AJ7002^[5]、*R. erythropolis* CCRC 109019^[8]合成絮凝剂的过程类似。以上研究表明, 培养液的絮凝活性与菌体的生长过程相

偶联,最好是在对数生长期后期或静止期的早期收获絮凝剂。

2.2.2 絮凝活性的分布

NX-2 培养液的絮凝活性分布如图 3 所示,整个发酵过程中,发酵原液(含菌体)上清液的絮凝活性一直处于较高水平,而菌体细胞的絮凝活性一直很低,当发酵液的絮凝活性达到最高时,大约 90% 以上的絮凝活性存在于上清液中。由此可见,NX-2 产生的絮凝剂大部分存在于胞外的培养液中。

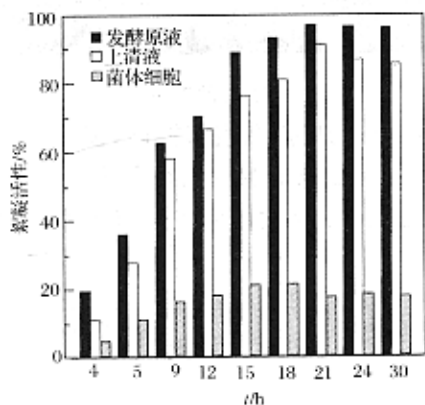


图 3 NX-2 培养液絮凝活性分布

2.3 营养条件对生物絮凝剂合成的影响

2.3.1 不同碳源对 NX-2 合成絮凝剂的影响

实验中发现,谷氨酸是 NX-2 培养和絮凝活性产生必不可少的成分。实验中还研究了不同额外碳源对生物絮凝剂合成的影响(图 4)。

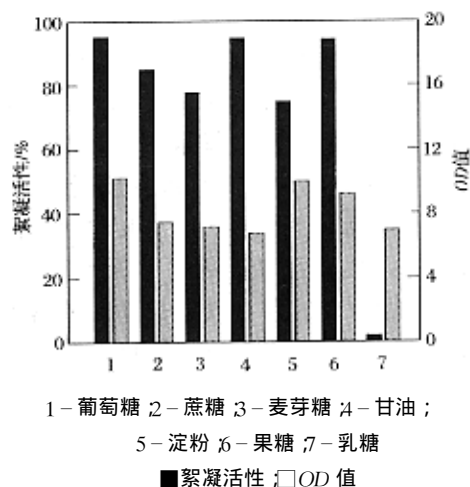


图 4 碳源对絮凝剂合成的影响

培养基中不添加额外碳源,菌体生长较差,且无絮凝活性生成。在含葡萄糖的培养基中,培养液得到了较高的絮凝活性,以麦芽糖、果糖、蔗糖、淀粉和甘油作为碳源,也显示了较高的絮凝活性。而加入乳糖,则出现了与其他糖类不同的情况,此时菌体较好地生长,但培养液几乎无絮凝活性。由于葡萄糖作为单一碳源时,絮凝活性高,且成本经济,因此选择发酵培养基的碳源为葡萄糖。

2.3.2 不同氮源对絮凝剂合成的影响

不添加氮源,菌体生长和絮凝活性均处于极低水平。按 0.8% 浓度添加 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 和酵母膏、蛋白胨、牛肉膏以及玉米浆,作为氮源,考察对发酵液絮凝活性的影响(图 5)。

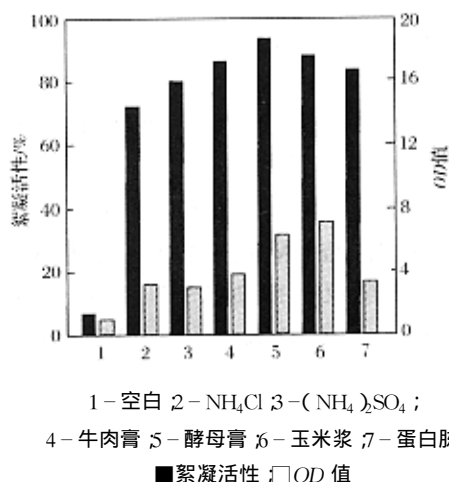


图 5 氮源对絮凝剂合成的影响

试验结果表明,加入有机氮源后,除尿素不产生絮凝活性外,其余均能使菌体培养液获得较高的絮凝活性,以酵母膏作为单一氮源时,发酵液的絮凝活性最高,达 93.8%,因此选择发酵培养基的氮源为酵母膏。而无机氮源中采用铵盐,如 NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,培养液也获得了较好的絮凝活性,但采用 NaNO_3 ,菌体几乎不生长,也不生成絮凝活性。无机氮源的优势在于使得发酵后的发酵液色泽浅,利于产物纯化,且价格低廉,这对降低生产成本有益。

2.3.3 谷氨酸对絮凝剂合成的影响

NX-2 在缺乏谷氨酸培养时,不生成絮凝活

性 表明谷氨酸是 NX-2 合成絮凝剂的必要成分。谷氨酸对发酵液絮凝活性的影响如图 6 所示,在谷氨酸浓度为 1% 时菌体生长最好,随培养基中谷氨酸浓度的增加,絮凝剂积累增多,絮凝活性逐步增加,谷氨酸浓度高于 3% 时培养液的絮凝活性稳定在 90 % 以上。

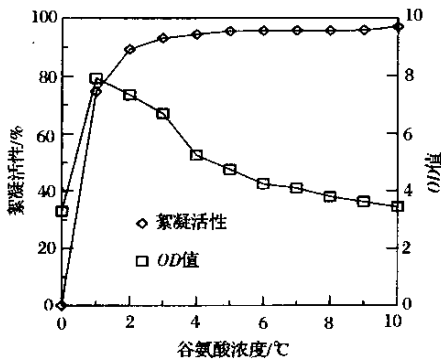


图 6 谷氨酸对絮凝剂合成的影响

2.3.4 碳源浓度和氮源浓度对絮凝剂合成的影响

表 1 为碳源和氮源浓度对絮凝剂合成的影响。

表 1 碳源和氮源浓度对菌体生长和絮凝剂合成的影响

	碳氮源浓度		絮凝活性	残糖
	/g·L ⁻¹	OD (A660/25)		
葡萄糖	20	0.323	82.5	0.275
	40	0.337	89.9	23.65
	60	0.325	90.5	51.15
	80	0.301	91.2	58.9
酵母膏	5	0.220	84.2	15.95
	8	0.260	89.6	11.83
	10	0.288	80.3	9.32
	15	0.258	70.2	8.25
谷氨酸钠	10	0.317	74.6	9.63
	20	0.294	89.2	1.38
	30	0.28	92.1	0.55
	60	0.25	91.6	0

由表 1 可知,酵母膏在适宜用量下(5~10 g/L)菌体生长较好,培养液的絮凝活性也处于较高水平,但酵母膏浓度过高抑制菌体生长,且不利于絮凝剂的合成;谷氨酸在适宜浓度下(1~3g/L)菌体生长较好,谷氨酸浓度高于 3% 以后,絮凝剂的合成趋于稳定(图 6)。葡萄糖

浓度控制在 20~40g/L 时,絮凝剂的合成稳定,且利用率高,残糖量低。

2.3.5 培养基组分的正交实验与结果分析

表 2 正交实验设计与结果分析

因素	谷氨酸钠	葡萄糖	酵母膏	絮凝活性	OD 值
	/g·L ⁻¹	/g·L ⁻¹	/g·L ⁻¹		
1	10	20	5		
2	20	40	10		
3	30	60	15		
	A	B	C		
	A	B	C	絮凝活性 /%	OD 值 (A660/25)
1	1	1	1	53.6	0.267
2	1	2	2	81.1	0.374
3	1	3	3	89.0	0.304
4	2	1	2	91.3	0.329
5	2	2	3	84.5	0.329
6	2	3	1	87.9	0.283
7	3	1	3	42.5	0.330
8	3	2	1	91.5	0.309
9	3	3	2	88.2	0.329
ΣK _{F1}	223.7	187.4	233		
ΣK _{F2}	263.7	257.1	260.6		
ΣK _{F3}	222.2	265.1	216		
ΣK ₀₀₁	0.945	0.926	0.859		
ΣK ₀₀₂	0.941	1.012	1.032		
ΣK ₀₀₃	0.960	0.916	0.963		
R _F	41.5	77.7	44.6		
R _{OD}	0.019	0.096	0.173		

正交实验表明(表 2),适当提高酵母膏用量可促进菌体生长,为絮凝剂的合成打下基础;葡萄糖用量对絮凝剂合成的影响较大,提高葡萄糖用量可增加絮凝剂的产量,但葡萄糖用量不宜过高,否则利用率低,残糖量增加。此外可适当增加谷氨酸用量,促进絮凝剂的合成。

2.3.6 培养基初始 pH 与装液量对 NX-2 合成絮凝剂的影响

不同发酵装液量与培养基初始 pH 对 NX-2 合成絮凝剂的影响如图 7 和图 8 所示,装液量在 30mL 时菌体生长情况最好,装液量在 60mL 时培养液的絮凝活性最高,培养基初始 pH 在 7 时菌体的生长情况最好,初始 pH 在 7.5 时培养液的絮凝活性最高。

2.4 NX-2 合成絮凝剂组成分析与结构表征

1L 发酵液提取粗品约 20 g。对高岭土的

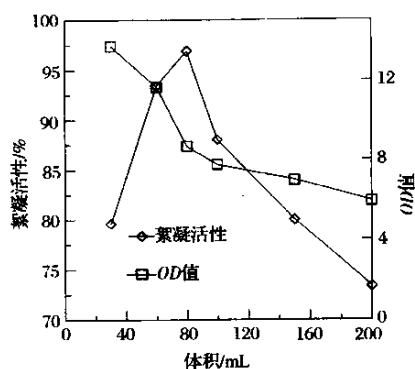


图7 装液量对絮凝剂合成的影响

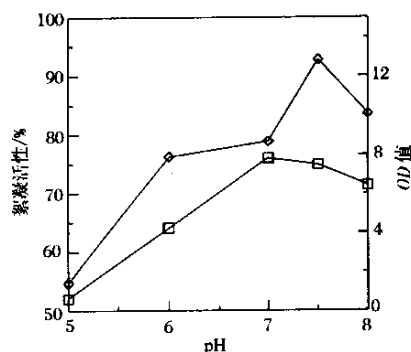


图8 不同初始 pH 对絮凝剂合成的影响

絮凝活性实验证明,投加 0.1 mL 发酵液的絮凝活性折合粗品投加后浓度 20 mg/L,说明具有絮凝活性的物质基本包含在粗品中。将分离纯化得到的样品用 6 mol/L HCl 于 121℃ 水解 4 h,水解产物无任何絮凝活性,说明样品中具有絮凝活性的物质水解失活,其结构可能是多糖或蛋白类的高分子。硫酸-苯酚法分析样品不含多糖。用氨基酸分析仪分析水解后氨基酸的组成,只出现 1 个谷氨酸峰,证明产物是谷氨酸的同聚物。

产物用 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定 (400MHz D_2O),谱图如图 9、图 10 所示。氢谱的化学位移 $\delta_{4.07}(\alpha\text{-H})$, $\delta_{1.87}$, $\delta_{2.00}(\beta\text{-H}_2)$, $\delta_{2.29}(\gamma\text{-H}_2)$,且 H 质子峰面积积分接近 1:2:2,和谱图右上角的分子式相符。碳谱的化学位移 $\delta_{27.3}(\beta\text{-CH}_2)$, $\delta_{32.7}(\gamma\text{-CH}_2)$, $\delta_{55.3}(\alpha\text{-CH}_2)$, $\delta_{175.5}(\text{CONH}_2)$, $\delta_{178.9}(\text{COOH})$,这和 $\gamma\text{-PGA}$ 结构相符。

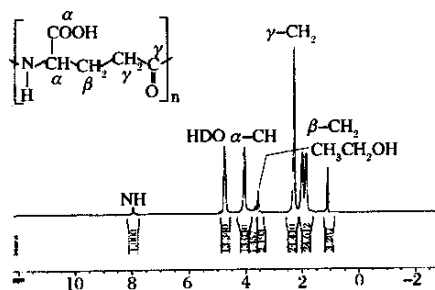


图9 产物的 $^1\text{H-NMR}$ 的谱图

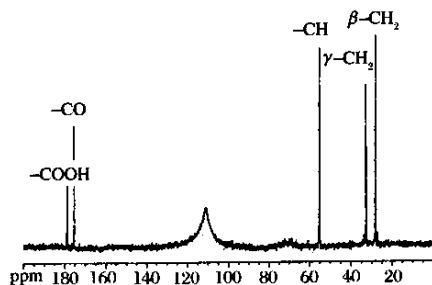


图10 产物的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图

3 结 论

NX-2 和以往文献报道的微生物絮凝剂产生菌相比具有一些明显的优越性:生产周期短,只需 21h 即可达最高絮凝活性,远低于文献报道的微生物絮凝剂产生菌的生产周期(如 *Alcaligenes cupidus*^[2], *Rhodococcus erythropolis*^[6] 产生最高絮凝活性需 2~3 d)培养的最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母膏,考虑成本可采用廉价的蔗糖与无机氮源。

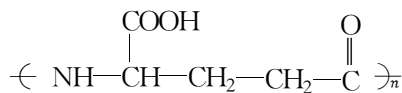


图11 $\gamma\text{-PGA}$ 的结构式

NX-2 合成的生物絮凝剂经结构表征鉴定为 γ -聚谷氨酸 ($\gamma\text{-PGA}$),属于聚氨基酸,主链为 nylon-4 结构(图 11)。单体结构具有一个游离的羧基,独特的线性长链结构能起到架桥絮凝作用^[9,10]。 $\gamma\text{-PGA}$ 是一种优异的绿色生物高分子絮凝剂,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 王 镇,王孔星,谢裕敏. 几株絮凝剂产生菌的特

性研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(2):121~129

2 Toeda K, Kurane R. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201 [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55:2793~2799

3 Kurane R, Nohata. Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus* [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55:1127~1129

4 Takeda M Koizumi. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae* [J]. Ferment Bioeng, 1992, 74:408~409

5 Jun Ji Nakamura, Shigeyoshi Miyashiro, Yoshio Hirose. Condition for production of microbial cell flocculant by *Asperillus sojae* AJ7002[J]. Agri Biol Chem, 1976, 40(7):1341~1347

6 Takeda M Kurane. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55:2663~2664

7 Kurane R, Takeda K, Suzuki T. Screening for and characteristics of microbial flocculants[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50:2301~2307

8 何宁, 李寅, 陈坚等. 营养和环境条件对生物絮凝剂合成的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 5(7):483~488

9 Levy N. Physio-chemical aspects in flocculation of bentonite suspensions by a *Cyanobacterial bioflocculant* [J]. Water Research, 1992, 26(2):249~254

10 Salehizadeh H, Vossoughi M Aalenzadehi. Some investigations on bio-flocculant producing bacteria [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 5:39~44

The Screening of a Flocculant-producing Bacterium NX-2 and Its Characteristics

Yao Jun Jiang Min Sang Li Xu Hong

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing, 210009)

ABSTRACT A flocculant-producing bacterium strain NX-2 was screened and identified to *Bacillus subtilis*. A medium containing glutamic acid was indispensable to the production of flocculant by NX-2. The highly flocculating activity in kaolin and active carbon suspension was obtained using glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources. Ammonium salts was a suitable and economical nitrogen source. The flocculating activity was released mostly in the supernatant of culture broth. The flocculant purified from supernatant using ethanol precipitation was determined to be poly- γ -glutamic acid using amino acid analyzer and NMR.

Key words microbial flocculant, *Bacillus subtilis*, flocculating, screening

信息窗

科学家从食品废料中提取营养物质获成功

澳大利亚科学家成功从食品加工废料中提取追加价值产品应用到药品和保健增补剂当中。研究员处理的可循环废料中的乳清主要来自奶酪制造商,这一副产品通常被转化为低价值乳糖、乳清粉或作为废料丢弃。

关于食品废料的提取过程涉及4个阶段离子交换、毫微过滤、套色版和结晶化。通过这一技术,公司可以开辟全球功能性食品和营养市场,价值900亿美元,而且还在持续增长。该技术可以为从食糖、葡萄酒、水果和蔬菜加工废料中提取有价值物质如缩氨酸、低聚果糖、天然香料、色素、抗菌蛋白、酚抗氧化剂、食糖、有机酸和矿盐扫清道路。目前工作小组正在寻求伙伴来拓展研究,探寻潜力。

日本出现瓶装咖啡

日本近几年的经济不景气,为了扩大星巴克的销售,星巴克公司决定在日本推出瓶装咖啡。已在美国食品店及便利店上市的瓶装咖啡被星巴克公司看好,受可口可乐的启发,他们认为这种产品在日本应有广阔的前景。目前,星巴克公司已联合在当地有较大销售网络的企业将共同推出新品——瓶装咖啡。新品上市后将率先在星巴克的咖啡店及零售店出售,一段时间后才会投放到自动售货机上。