

# 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)BS-03 的诱变育种 及产鼠李糖脂类生物表面活性剂的摇瓶工艺初探\*

沈 薇 杨树林 宁长发 唐仕荣 陆 晓

(南京理工大学生物工程研究所,南京,210094)

**摘 要** 采用 UV、UV + LiCl 对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)BS-03 的野生菌株进行诱变,筛选出一株糖脂产量较高的菌株 LY4,可将产量由 4.1g/L 提高至 6.8g/L。并对其摇瓶发酵工艺进行了初步研究,较高产量(8.93 g/L)的适宜发酵条件为:植物油 6%,尿素 0.2%,一定量的无机盐,34℃,初始 pH 值为 8,搅拌转速 200~240 r/min,发酵周期 2 d。

**关键词** 糖脂,生物表面活性剂,发酵,铜绿假单胞菌

众所周知,食品加工的许多过程都必需借助表面活性剂的作用而进行,如作为乳化剂、乳化稳定剂、破乳剂、保湿剂、防腐剂等,目前所用的大多为化学表面活性剂,存在不可生物降解等缺点。而利用微生物发酵技术制备的生物表面活性剂(包括糖脂、磷脂、脂肽及脂多糖等),则具有低毒性和良好的生物降解性<sup>[1,2]</sup>。目前研究最多的是由微生物分泌到胞外的糖脂类生物表面活性剂,如由铜绿假单胞菌产的鼠李糖脂<sup>[3~5]</sup>,具有便于回收、表面活性优等特点。

南京理工大学生物工程研究所分离到 1 株产鼠李糖脂的铜绿假单胞菌 BS-03,它可使发酵液的表面张力降至 25.6 mN/m,糖脂产量为 4.1 g/L。文中研究了 UV、UV + LiCl 对菌株 BS-03 的诱变育种,并对诱变后所获最优菌株 LY4 的摇瓶发酵工艺进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 出发菌株

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)BS-03 分离自从南京炼油厂采集的油污中,自行保存。

### 1.2 培养基

斜面保藏培养基:肉汁培养基<sup>[6]</sup>。

诱变后筛选培养基:血平板<sup>[7]</sup>,蓝色凝胶平板<sup>[8]</sup>。

种子培养基(g/L):牛肉膏 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, NaNO<sub>3</sub> 1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCl<sub>2</sub> 0.002, 自来水定容至 1 L, pH 6.8~7.0。

发酵培养基(g/L):碳源(柴油、液体石蜡、植物油、甘油、葡萄糖)30,氮源((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、尿素、蛋白胨、牛肉膏)1,磷源(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1.2:1)1.6~2.4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCl<sub>2</sub> 0.002, 自来水定容至 1 L, pH 2~10。

### 1.3 诱变方法<sup>[9]</sup>

#### 1.3.1 UV 诱变方法

将细菌培养液于 8000 r/min 下离心 5 min,倾去上清液,用生理盐水调整菌体浓度至 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个/mL,取菌悬液 5 mL 于平皿(直径 9 cm)中,将平皿置于磁力搅拌器上,分别作 10、20、30、40、50 s 紫外线照射处理(紫外灯事先预热 30 min,功率为 25 W,照射距离为 30 cm),同时设立未照射组,将经紫外线处理后的菌悬液接种于新鲜的肉汁液体培养基<sup>[6]</sup>中避光培养 4 h。对上述培养液进行稀释,取各稀释度的菌悬液 0.2 mL 涂平皿,30℃ 恒温培养(用黑布包裹,避

第一作者:博士研究生。

\* 南京市科学技术委员会资助项目(No.200301045)

收稿时间:2004-07-22

免光修复),1~2 d 后计数。计算不同照射时间的相对致死率。

1.3.2 UV+LiCl 诱变方法

取适当稀释的菌悬液于含有(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)LiCl 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中浸泡 3 h 后再经紫外诱变 30 s ,大量稀释终止作用 稀释涂布 同时设立未添加组作对照 ,取各稀释度的菌悬液 0.2 mL 涂平皿 30℃ 恒温培养(用黑布包裹 ,避免光修复),1~2 d 后计数。计算不同剂量间的相对致死率。

1.4 测定方法

1.4.1 生物量测定

用干重法测定。将一定体积的培养液在 8000 r/min 下离心 20 min ,收集细胞 ,洗涤 ,60~65℃ 干燥 称重。

1.4.2 鼠李糖脂含量的测定

鼠李糖的测定采用苯酚-硫酸法 测定出鼠李糖的含量乘以相关系数 3 ,记为鼠李糖脂的产量<sup>[10]</sup>。

1.4.3 表面张力的测定

采用吊环法 ,仪器为 DT-102 型全自动界面张力仪(博山同业分析仪器厂)。

2 结果与讨论

2.1 诱变筛选结果

2.1.1 UV 诱变

将不同致死率下得到的菌悬液通过血平板(观察菌落周围溶血圈的大小 ,溶血圈越大产量越高)蓝色凝胶平板(观察菌落周围蓝色晕圈的大小 ,蓝色晕圈越大产量越高)及摇瓶试验(直接测定糖脂产量)的复筛确定每个致死率下正变幅度较大的菌株 ,并最终确定 UV 诱变后产糖脂量最高的菌株 结果见表 1。

表 1 不同剂量的 UV 对菌株及糖脂产量的影响

菌株编号	剂量 /s	原糖脂产量 /g·L <sup>-1</sup>	诱变后糖脂产量/g·L <sup>-1</sup>	致死率 /%	最大正变幅度/%
ZY1	10	4.1	4.3	57	5
ZY2	20		4.6	69	12
ZY3	30		5.5	75	35
ZY4	40		4.9	86	19
ZY5	50		4.7	93	14

从结果可知 ,不同剂量的 UV 处理有一定的正诱变效果 ,菌株 ZY3 的糖脂产量达到 5.5 g/L ,正诱变幅度最大。

2.1.2 UV+LiCl 诱变

以菌株 ZY3 继续进行 UV+LiCl 的复合诱变 ,复筛的方法同 2.1.1 结果如表 2 所示。

表 2 不同剂量的 LiCl 对菌株糖脂产量的影响

菌株编号	剂量 /s	原糖脂产量 /g·L <sup>-1</sup>	诱变后糖脂产量/g·L <sup>-1</sup>	致死率 /%	最大正变幅度/%
LY1	0.1	5.5	5.8	43	6
LY2	0.2		6.0	49	10
LY3	0.3		6.2	56	13
LY4	0.4		6.8	65	23
LY5	0.5		5.7	76	3

由表 1 和表 2 可知 ,UV+LiCl 处理的变异株 LY4 的糖脂产量可达到 6.8 g/L ,UV 和 UV+LiCl 诱变使总体正变幅度达到 65.8%。同时对菌株 LY4 的摇瓶发酵工艺进行了初步研究。

2.2 发酵培养基的优化

2.2.1 碳 源

铜绿假单胞菌能利用多种碳源生产鼠李糖脂 ,包括水溶性碳源(葡萄糖、甘油、乙醇等)和水不溶性碳源(植物油、柴油、液体石蜡、稠环芳烃等)<sup>[11]</sup>。实验中选取了柴油、液体石蜡、植物油、甘油、葡萄糖作为微生物的碳源进行发酵培养 ,添加量为 1%。磷源( $\text{Na}_2\text{HPO}_4:\text{KH}_2\text{PO}_4=1.2:1$ )2.2 g/L , $\text{MgSO}_4$  0.01 g/L , $\text{CaCl}_2$  0.002 g/L ,接种后培养 7 d ,测定其糖脂产量 ,结果见图 1。

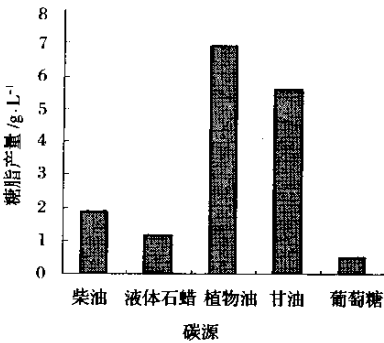


图 1 不同碳源对糖脂产量的影响

由图 1 可知 ,在所测定的碳源中 ,植物油和

甘油能使菌株产生大量的糖脂,液体石蜡所产糖脂含量最少。这说明这株铜绿假单胞菌能同时利用水溶性和水不溶性碳源进行糖脂生物表面活性剂的生产。

2.2.2 氮 源

以 1% 的植物油为碳源,研究了添加 0.2% 的不同氮源( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、尿素、蛋白胨、牛肉膏)对糖脂产量的影响,实验结果见图 2。各种氮源(有机氮和无机氮)对菌株产糖脂量无显著影响。

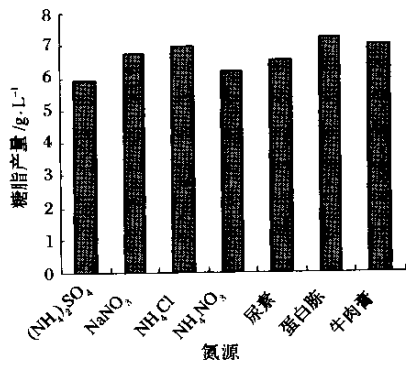


图 2 不同氮源对糖脂产量的影响

2.2.3 磷 源

磷源对微生物的生长非常重要,同时在发酵液中同时又可作为 pH 缓冲剂。实验中测定了该菌在磷源( $\text{Na}_2\text{HPO}_4:\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.2:1$ )浓度分别为 1.6、1.8、2.0、2.2 和 2.4 g/L 的培养液中产生糖脂的变化。

如图 3 所示当磷源含量为 2.0 g/L 时,糖脂的产量最高,但磷源对糖脂产量影响不大。

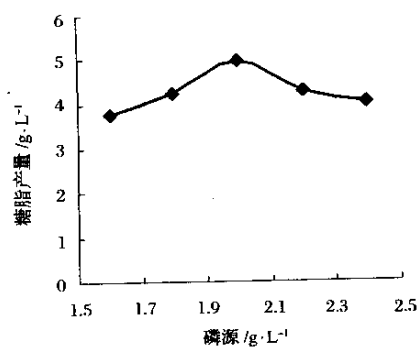


图 3 磷源含量对糖脂产量的影响

2.3 发酵条件的优化

2.3.1 接种菌龄的确定

接种液中种子的活力直接对发酵的效果产生影响,适宜的菌龄应选择在对数生长后期,因为处于这一时期的菌种对新的培养环境的适应期缩短,接种后能迅速生长,有利于缩短发酵周期。为寻找最佳接种菌龄,测定了该菌株的生长曲线(如图 4 所示)。

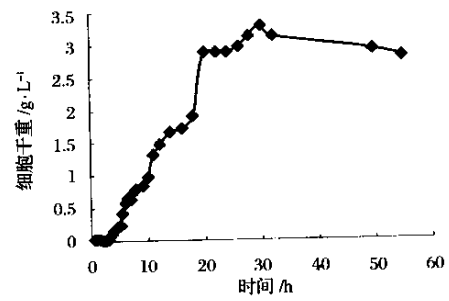


图 4 菌株 LY4 的生长曲线

从图 4 得到,菌株发酵 20 h 左右达到了稳定期,因此选用发酵 16 h 处于对数生长后期的发酵液作为接种液。

2.3.2 发酵液初始 pH 值对糖脂产量的影响

在最佳的碳、氮和磷源的条件下,研究了不同初始 pH 下的发酵培养基对糖脂产量的影响,其结果见图 5。

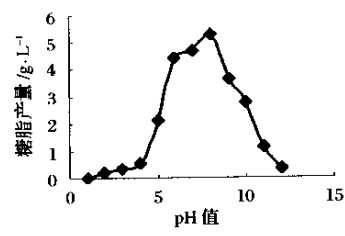


图 5 发酵液初始 pH 值对糖脂产量的影响

从图 5 可看出,菌株 BS-03 在初始 pH 为 2~12 之间时,均能产糖脂。但是当发酵液的初始 pH 值偏高或偏低时,菌株的糖脂产量不高。在微碱性(pH 7~8)环境下,产糖脂量较多。这说明该菌株需要在稍碱性的初始 pH 条件下才能大量合成糖脂。

2.3.3 其他条件对糖脂产量的影响

在上述试验的基础上,对碳氮比、温度、转速、时间及接种量等因子采用多因素正交优选

法( $L_5^5$ )以确定适宜的培养条件。根据试验结果,采用直观分析作出因素和指标的关系图(图

6)。适宜的培养条件:34℃,C/N为30:1,接种量6%,200~240 r/min,发酵周期为2 d。

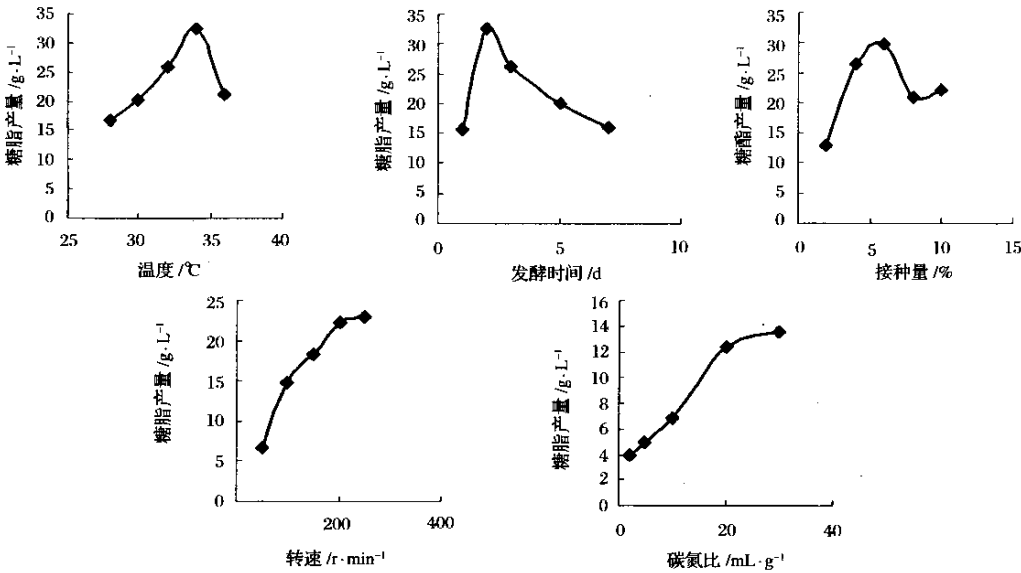


图 6 多因素正交试验

2.4 发酵动态

在优化后的条件下测定菌株 LY4 合成鼠李糖脂的发酵动态曲线。表面张力在最初的 3~4 h 内就可将发酵液起始表面张力从 52.6 mN/m 降至 25.6 mN/m,此时菌体处于延滞期,因此在菌体大量生长之前已经诱导生成了糖脂类表面活性剂以利于增加植物油与菌体的接触面积,使其更好地利用植物油。在整个发酵过程中,pH 始终维持在 7~8 之间,说明微碱性发酵液环境适合菌体产生大量的产物。整个发酵周期只有 2 d。

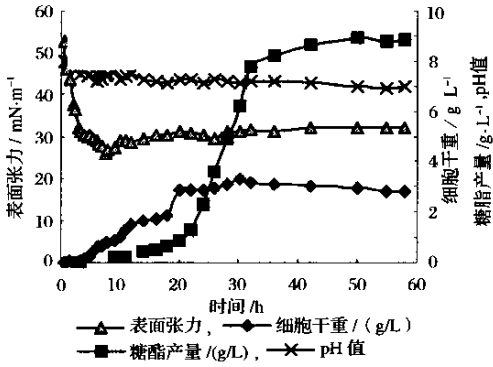


图 7 菌株 LY4 发酵动态曲线

3 结 论

以产糖脂类生物表面活性剂的铜绿假单胞菌野生菌株为出发菌株,对其进行 UV 和 UV+LiCl 的诱变,筛选得到 1 株产量提高了 65.8%(6.8 g/L)的菌株 LY4。对菌株 LY4 的摇瓶工艺条件优化可使产量进一步提高至 8.93 g/L。其最佳工艺条件为:植物油 6%,尿素 0.2%,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.11%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.09%,MgSO<sub>4</sub> 0.01,CaCl<sub>2</sub> 0.002,34℃,初始 pH 值为 8,搅拌转速 200~240 r/min,发酵周期 2 d。该菌株的筛选及发酵条件的确定为进一步工业化应用研究奠定了基础。

参 考 文 献

1 芳 云,夏咏梅. 生物表面活性剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992. 7~16

2 Siegmund Lang. Biological amphiphiles( microbial bio-surfactants) [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2002( 7) :12~20

3 Turkovskaya O V , Dmitrieva T V , A Yu Muratova.

A biosurfactant - producing *Pseudomonas aeruginosa* strain[ J ]. Applied Biochemistry and Microbiology , 2001 ,37( 1 ):71~75

4 Benincasa M ,Contiero J ,Manresa M A et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source[ J ]. Journal of Food Engineering 2002 ,54 283~288

5 Eloria Z Ron ,Eugene R. Biosurfactants and oil bioremediation[ J ]. Current Opinion in Biotechnology , 2002 ,13 249~252

6 诸葛键,王正祥. 工业微生物实验技术手册[ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1994. 109~110

7 K Koch A. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants [ J ]. J Bacteriol , 1991( 13 ):4212~4219

8 Siegmund I ,Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar[ J ]. Biotechnol Tech , 1991 ( 5 ):265~268

9 杜连祥. 工业微生物实验技术[ M ]. 天津 :天津科学技术出版社 ,1992. 280~289

10 Dubois M. Gilles K A ,Hamilton J K. Anal Chem , 1956 ,28 350~356

11 钱欣平 ,阳永荣 孟 琴. 利用不同碳源合成生物表面活性剂的研究[ J ]. 日用化学工业 , 2002 , 32 ( 1 ):15~17

**Breeding and Primary Study on Biotechnology of *Pseudomonas Aeruginosa* BS - 03 Producing Rhamnolipid Biosurfactant in Flask**

Shen Wei Yang Shulin Ning Changfa  
Tang Shirong Lu Xiao

( Biotechnology Institute of Nanjing University of Science and Technology , Nanjing , 210094 )

**ABSTRACT** The strain BS - 03 ( *Pseudomonas aeruginosa* ) was mutagenized with UV and UV + LiCl. The best mutant LY4 , which glycolipid yield increased from 4.1 g/L to 6.8 g/L , and its biotechnology was studied. Suitable conditions for the highest yield( 8.93 g/L ) were as follow : 6% plant oil , 0.2% urea with certain amount of inorganic salts. Fermentation temperature of 34℃ , initial pH of 8 , stirring revolution of 200~240 r/min and fermentation period of 2d were used in our study.

**Key words** glycolipid , biosurfactant , fermentation , *Pseudomonas aeruginosa*

· 广 告 ·

**多种 密度、浓度计 总有一款适合您**

我厂专业生产多种型号的溶液密度计和溶液浓度计 ,可广泛地适用于酿造生产、食品加工与发酵等工业生产过程中 ,对包括酸、碱、盐在内的多种溶液的密度或浓度的自动在线检测。还有供室内使用的台式密度计( 特别推荐 )。

**上海浦东新区三海智能仪表厂**

厂址 :上海张江高科技园区 电话 :021 - 58377810

网址 :www.sanhai.com 3721网络实名 :密度计、溶液浓度计