

# 微生物絮凝剂及其产生菌的研究新进展

毛艳丽<sup>1,2\*</sup> 闫永胜<sup>1</sup> 刘瑞群<sup>3</sup> 罗世田<sup>3</sup> 邓月华<sup>1</sup> 张育北<sup>3</sup>

(1. 江苏大学 化学化工学院 镇江 212013)

(2. 平顶山工学院 平顶山 467001)

(3. 平顶山市建设工程质量监督站 平顶山 467001)

**摘要:** 介绍了近几年来国内外微生物絮凝剂及其产生菌的一些发展概况, 列举了近几年一些研究较深入的胞外生物高聚物絮凝剂的物质属性和化学组成。重点讨论了胞外生物高聚物絮凝剂的成分分析、絮凝机理以及影响絮凝活性的因素, 详细综述了絮凝剂产生菌的遗传学和代谢机理方面的研究进展, 文章最后提出微生物絮凝剂的发展趋势和研究方向。

**关键词:** 胞外生物高聚物絮凝剂, 絮凝机理, 絮凝剂产生菌, 絮凝基因, 代谢机理

## Research Progress of Biofloculant and Flocculant-producing Bacteria

MAO Yan-Li<sup>1,2\*</sup> YAN Yong-Sheng<sup>1</sup> LIU Rui-Qun<sup>3</sup>

LUO Shi-Tian<sup>3</sup> DENG Yue-Hua<sup>1</sup> ZHANG Yu-Bei<sup>3</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

(2. Pingdingshan Institute of Technology, Pingdingshan 467001)

(3. Construction Engineering Quality Supervise Station of Pingdingshan Construction Committee, Pingdingshan 467001)

**Abstract:** The development survey of Extracellular Biopolymeric Flocculants (EBFs) and flocculant-producing bacteria were introduced; some EBFs discovered in recent years were listed with their properties and chemistry components. Components analyses and mechanisms of flocculation and the factors might influence the activity of EBFs were given emphasis to discuss, genetics and metabolic mechanism study on flocculant-producing bacteria were summarized in detail, and the development and study tendency of microbial flocculant were put forward.

**Keywords:** Extracellular biopolymeric flocculants, Mechanisms of flocculation, Flocculant-producing bacteria, Flocculent gene, Metabolic mechanism

微生物絮凝剂是一类由微生物在生长过程中产生的, 可以使水体中不易降解的固体悬浮颗粒、菌体细胞及胶体粒子等凝集、沉淀的特殊高分子聚合物, 易于分离, 沉降效率高, 可降解, 其降解产物对环境无毒无害, 不会产生二次污染, 是一种高效安

全的絮凝剂。微生物的絮凝作用最先由法国的 Louis Pasteur 在 1876 年研究酵母菌 *Levure casseeuse* 时发现。20 世纪 80 年代后期, 日本在微生物絮凝剂开发上取得了引人瞩目的成果, 仓根隆一郎等从土壤中筛选到红平红球菌的 S-1 菌株, 并制成了 NOC-1

\* 通讯作者: ✉ maoyanli89240165@sina.com

收稿日期: 2008-01-29; 接受日期: 2008-04-24

微生物絮凝剂。此后，许多国家的科学工作者对微生物絮凝剂及其絮凝剂产生菌进行了大量的研究工作，取得了许多标志性的研究成果，为微生物絮凝剂的工业应用展示了良好的前景。

1 微生物絮凝剂的种类

按照来源不同，微生物絮凝剂主要可分为3类：①直接利用微生物细胞的絮凝剂。如某些细菌、放线菌、真菌和酵母。②利用微生物细胞壁提取物的絮凝剂。如酵母细胞壁的葡聚糖、甘露聚糖、蛋白质和N-乙酰葡萄糖胺等成分均可用作絮凝剂。③利用微生物细胞代谢产物的絮凝剂。微生物细胞分泌到细胞外的代谢产物主要成分为多糖及少量多肽、蛋白质、脂类及其复合物。这种分泌到细胞外的具有絮凝活性的高聚物称为胞外生物高聚物絮凝剂(Extracellular Biopolymeric Flocculants, 简称EBF)。

2 胞外生物高聚物絮凝剂(EBF)的微观结构

微生物絮凝剂的结构各异，已知的絮凝剂微观

立体结构有两种：(1) 纤维状。从苦味诺卡氏菌 *Nocardia amarae* 提取的絮凝剂蛋白质中含有75%的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸，该絮凝剂可以形成丝绸一样的纤维，是絮凝体形成过程中的颗粒间联结物。(2) 球状。从酱油曲霉 *Aspergillus sojiae* 中获得的絮凝剂中有聚己糖胺、蛋白质、2-葡糖酮酸等3种成分<sup>[1]</sup>。2-葡糖酮酸的作用是维持絮凝剂成球形，一旦丧失2-葡糖酮酸成分后，絮凝剂的微观结构就发生变化，而且絮凝行为模式也由非离子型絮凝剂的絮凝模式转变为阳离子型絮凝剂的絮凝模式。絮凝剂的微观立体结构受絮凝剂化学成分的影响，絮凝模式与微观形状有关。

3 胞外生物高聚物絮凝剂(EBF)的化学组成和化学结构

近年来，国内外研究者借助各种技术手段对多种絮凝剂的组成与性质进行了较为详细的分析，现简要介绍几种EBF物质属性、化学组成和相对分子质量如表1所示。

表1 EBF的化学组成、物质属性和相对分子质量				
Table 1 The chemical composition、material property and relative molecular weight of EBF				
絮凝剂产生菌 Flocculant-producing bacteria	絮凝剂 Flocculant	絮凝剂化学组成 Chemical composition	物质属性 Material property	相对分子质量 Relative molecular weight
<i>Bacillus</i> sp. DP-152 <sup>[2]</sup>	DP-152	葡萄糖、甘露糖、半乳糖、海藻糖(摩尔比为8:4:2:1)	多糖类	>2×10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus megaterium</i> A25 <sup>[3]</sup>	BP 25	含葡萄糖和甘露糖两种单糖，其摩尔比为4:1，连接键型包括α-1,6糖苷键和α-1,3糖苷键	多糖类	1×10 <sup>6</sup>
<i>Alcaligenes cupidus</i> KT201 <sup>[4]</sup>	AL-201	葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸(摩尔比为6.34:5.55:1.0)	多聚糖	>2×10 <sup>6</sup>
<i>Nocardia anerieuek</i> sp. <sup>[5]</sup>	Fix	主要为多肽，含25.6%甘氨酸、13.8%丙氨酸、12.3%丝氨酸	蛋白质类	>2×10 <sup>6</sup>
<i>Rhodococcus erythropolis</i> <sup>[6]</sup>	NOC-1	蛋白质,并含有疏水氨基酸(丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、天冬氨酸)	蛋白质类	7.5×10 <sup>5</sup>
<i>R.erythropolis</i> S-1 <sup>[7]</sup>		葡萄糖单霉菌酸酯(GM)、海藻糖、单霉菌酸酯(TM)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)	脂类	>1×10 <sup>6</sup>

从表1可以看出，目前已知的微生物絮凝剂大多为多糖类和蛋白质类物质，也有少数絮凝剂为脂类、DNA等其他生物大分子。Kazuo Sakka与Hajime Takahashi研究发现，高分子量的天然双链DNA是假单胞菌 *Pseudomonas* strain C-120 菌体细胞凝集的直接原因。Watanabe从泰国的虾养殖场的池底污泥中分离到一株具有絮凝活性的光合细菌

*Rhodovulum* sp. PS88，其絮凝活性与该菌分泌到胞外的DNA有直接关系<sup>[8]</sup>。*Rhodococcus rhodo-*

*chrous* 则能够通过改变培养基中的碳源而改变含霉菌酸的絮凝剂的分子结构。由此，可以设想，利用微生物的这一特性可以为通过改造分子结构，构造更高活性的生物絮凝剂提供了有利条件。

4 胞外生物高聚物絮凝剂(EBF)絮凝作用机理

关于微生物絮凝剂的絮凝机理理论，先后提出过许多学说，主要有“吸附架桥”学说、Grabtree

的利用 PHB(Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid)酯合学说、Friedman“菌体外纤维素纤丝”学说、Butterfield 粘质假说、离和伸展桥键之间的三维基质模型假说等。目前较为普遍接受的是“吸附架桥”学说。国内马放等人对复合型生物絮凝剂絮凝机理研究中发现复合型微生物絮凝剂的絮凝机理主要包括电中和作用和吸附架桥作用<sup>[9]</sup>；阮敏等人对多粘类芽孢杆菌 GA1 所产絮凝剂的絮凝机理研究中发现絮凝剂对高颗粒物浓度废水有很好的处理效果，其絮凝机理主要是吸附架桥作用<sup>[10]</sup>。

## 5 胞外生物高聚物絮凝剂(EBF)絮凝活性的影响因素

### 5.1 EBF 絮凝活性的内在影响因素

一般来说，相对分子量大的 EBF 在絮凝过程中有更多的吸附点和更强的桥联作用，因此有更高的絮凝活性。克氏杆菌 *Klebsiella* sp. S11<sup>[11]</sup>产生的絮凝剂分子量超过  $2 \times 10^6$ ，协腹产碱杆菌 *haloalkalophilic Bacillus* sp. I-450<sup>[12]</sup>产生的絮凝剂分子量达到  $2.2 \times 10^6$ 。一些特殊基团由于在絮凝剂中充当颗粒物质的吸附部位或维持一定的空间结构，对絮凝活性有很大的影响，用高锰酸钾处理 Asp 絮凝剂的己糖胺多聚物部分，使其氧化而释放出氧，活性就消失<sup>[13]</sup>。絮凝活性也与细胞表面疏水性有关，处于对数生长后期的细胞，表面疏水性增强，其絮凝活性升高。处理污水可降低微生物絮凝剂的细胞表面疏水性，其絮凝性能会明显下降，而聚合阳离子却可增强细胞表面的疏水性，从而可提高细胞的絮凝活性<sup>[14]</sup>。

### 5.2 EBF 絮凝活性的外在影响因素

在结构中以蛋白质或者缩氨酸为主链的的絮凝剂通常不具有热稳定性，如芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. PY-90<sup>[15]</sup>和 *N. amarae*<sup>[16]</sup>的絮凝物都在高温下降低甚至丧失絮凝活性。但那些由糖类构成的絮凝剂则是热稳定性的，例如由 *Aspergillus sojae*<sup>[17]</sup>和枯草芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DP-152 分泌的絮凝剂都是热稳定性的，在沸水中加热 15 min 后还能保留最初絮凝活性的 50%以上。

不同絮凝剂 pH 值的变化敏感程度不同，*Bacillus* sp. PY-90 在酸性条件(pH 3~5)下的絮凝活性很高<sup>[15]</sup>，拟青霉菌属 *Paecilomyces* sp. 的絮凝产物在

pH 值为 4~7.5 范围内具有最大活性。这是由于 pH 值影响胶体颗粒表面电荷和微生物絮凝剂的性质、数量，从而影响它们之间的靠近和吸附行为。

一定浓度的金属离子可以加强絮凝剂分子与悬浮颗粒以离子键结合而促进絮凝，容易受金属离子影响的多数是蛋白质型的微生物絮凝剂。各种金属离子对于絮凝机理不同的微生物絮凝剂的影响并不一致，*Bacillus* sp. PY-90 产生的絮凝剂 PGA 絮凝高岭土的絮凝活性通过增加  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度而产生，PGA 的絮凝活性在  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 2 mmol/L~8 mmol/L 范围内最高。相反，相应地  $\text{Al}^{3+}$ 、或者  $\text{Fe}^{3+}$  的浓度增加 0.2 mmol/L~0.5 mmol/L 会导致絮凝活性急剧下降。

## 6 微生物絮凝剂产生菌的研究进展

### 6.1 微生物产絮凝剂的遗传学研究

微生物产生絮凝剂的能力是微生物基因组中的絮凝基因表达的结果。对絮凝基因的研究主要是从研究啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的凝集现象开始的，在啤酒酵母中，国外学者目前至少发现 FLO1、FLO2、FLO4、FLO5、FLO8、FLO3、FLO6、FLO7、fsul1、fsul2、TUP1、flox、Lup1、amp2 等 14 个絮凝基因。其中，显性基因 FLO1、FLO2 和 FLO4、FLO8 是等位基因，FLO5 与 FLO1 是不等位的显性基因。另外，隐性基因 FLO6 和 FLO7 可能是 FLO1 的等位基因<sup>[18,19]</sup>。FLO1 基因位于 1 号染色体上 adeDNA 片段 37 nm 处，有显性表达絮凝性的功能。Watari 等对 FLO1 基因进行了克隆与序列分析，完整的 FLO1 基因的开放阅读框由编码 1537 个氨基酸蛋白的 4611 bp 组成。FLO1 蛋白的显著特征是含有 4 种重复序列和大量的丝氨酸和苏氨酸，其 N-和 C-端区域呈疏水性，含有膜结构区域，表明 FLO1 蛋白是一种整合膜蛋白<sup>[20]</sup>。FLO1 的基因表达受到亲株细胞接合型(MAT)遗传信息的控制，在接合型为 MATa/MATa 或 MAT<sup>-</sup>/MAT<sup>-</sup> 的二倍体细胞中，FLO1 絮凝基因均能显性表达，使二倍体细胞富有絮凝性。而在 MATa/MAT<sup>-</sup> 接合型的二倍体中，FLO1 絮凝基因处于隐性或半隐性状态。作为 FLO1 的非等位基因，由 FLO5 絮凝基因构建出的新菌株所分泌的絮凝素成分不同于 FLO1，FLO5 表达产物对糜蛋白酶稳定，FLO1 表达产物却易被糜蛋白

酶降解<sup>[21]</sup>。

Ishida Fujii K 等把 *Saccharomyces cerevisiae* 396-9-6V 的 FLO1 基因导入 1 株无絮凝性菌株的 URA3 位点上, 使其获得了絮凝性(FSC27 菌株), 再引入 URA3 的菌株 FSCU-18 的絮凝性能及产率比原菌株都好<sup>[22]</sup>。刘春秀等<sup>[23]</sup>通过诱变、絮凝基因的克隆表达及杂交等育种技术成功构建了高生物量、耐高糖、强絮凝的优良面包酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* ZLTH-58。上述实验证明生物絮凝受遗传因子控制, 我们应着手应用遗传工程的方法将絮凝基因转入活性污泥和其他在发酵工程中广泛应用的微生物中, 从而获得生物活性和絮凝能力均佳的优良微生物。

## 6.2 微生物产絮凝剂的代谢机理、发酵培养研究

目前絮凝剂产生菌的研究主要是菌种的选育、发酵条件优化上, 由于各种微生物产生的絮凝物质成分各异, 其代谢的途径机理也不同。国内, 李寅等<sup>[24,25]</sup>筛选得到的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) CCTCC M201005 能合成一种以半乳糖醛酸为主要结构单元的蛋白聚糖类生物絮凝剂(REA-11)。研究发现: REA-11 的合成开始于 1-磷酸葡萄糖, 在 UDP(尿苷二磷酸)-磷酸化酶的作用下转化为 UDP-葡萄糖, 接着 UDP-葡萄糖在 UDP-半乳糖异构酶的作用下转化为 UDP-半乳糖, 然后在 UDP-半乳糖脱氢酶的作用下进一步转化 UDP-半乳糖醛酸, 最后在葡萄糖基转移酶和聚合酶的作用下聚合形成絮凝剂 REA-11 聚半乳糖醛酸。何宁<sup>[26]</sup>对 REA-11 的发酵条件也进行了研究, 提出谷氨酸棒杆菌合成 REA-11 分批发酵过程的溶氧控制模式, 实现了高细胞生长速率和高产物产率的统一。马放等人<sup>[27]</sup>将得到的 2 株芽孢杆菌进行混合发酵培养, 采用富含纤维素的秸秆作为初始底物, 以纤维素降解菌进行前期发酵, 利用代谢产物作为后续混合絮凝剂产生菌的发酵原料。

## 7 研究展望

鉴于目前国内外的研究状况, 微生物絮凝剂的主要发展趋势体现在以下几个方面: 寻找快速有效的絮凝剂产生菌筛选方法, 将研究范围从目前占主导地位的中温好氧菌扩展到其他种类的微生物, 并从系统发育学的角度对菌种筛选进行预测; 从

生产工艺的角度出发, 选用廉价的工业废料作为培养基以降低培养基配制成本, 建立高效生化反应器, 优化发酵的运行条件, 使微生物絮凝剂的生产真正实现产业化水平; 加强对微生物絮凝剂的物质结构特性、絮凝特性和絮凝机理以及它在处理不同水质废水时的共性与特性的研究; 对絮凝基因进行更加深入的研究, 并利用现代分子生物学技术获得的高效絮凝基因, 通过转基因技术, 构建高产絮凝剂的工程菌; 将微生物絮凝剂拓展到概念更广的生物絮凝剂研究范畴, 例如 Haruhiko Yokoi 研究发现, 在厌氧条件下肠杆菌 *Enterobacter* sp. BY-29 能够同时产生氢和絮凝剂<sup>[28]</sup>; 加强微生物产絮凝剂代谢机理的研究, 通过对代谢途径和相关酶促反应的分析, 提供适宜的培养条件, 对絮凝剂的产生进行更加有效的调控。

相信随着微生物絮凝剂以及絮凝剂产生菌研究的不断深入, 微生物絮凝剂必将冲破发展的瓶颈, 实现工业化生产, 真正取代无机絮凝剂和有机合成絮凝剂, 成为高效、环保的新一代絮凝剂。

## 参考文献

- [1] Nakamura J. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculants produced by *Aspergillus sojae* AJ7002. *Agri Biol Chem*, 1976, **40**(3): 619-624.
- [2] Suh H, Kwon G, Lee C, et al. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **184**(2): 108-112.
- [3] 刘紫鹃, 徐桂云, 刘志培, 等. 絮凝剂 BP25 的化学组成及其结构研究. *微生物学报*, 2001, **41**(3): 348-352.
- [4] 何宁, 李寅, 陈坚, 等. 生物絮凝剂的最新研究进展及其应用. *微生物学通报*, 2005, **32**(2): 104-108.
- [5] Salehizadeh H, Shojaosadati SA. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 2001, **19**: 371-385.
- [6] Ryuichiro K. Environmentally friendly products and processes for the 21st century. *Studies in Environmental Science*, 1997, **66**: 759-769.
- [7] Kurane R, Matsuyama H. Production of a bioflocculant by mixed culture. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 235-238.
- [8] 陶然, 杨朝晖, 曾光明, 等. 微生物絮凝剂及其絮凝微生物的研究进展. *微生物学杂志*, 2005, **25**(4): 82-88.
- [9] 马放, 张金凤, 远立江, 等. 复合型生物絮凝剂成分分析及其絮凝机理的研究. *环境科学学报*, 2005, **25**(11):

- 1491–1496.
- [10] 阮敏, 杨朝晖, 曾光明, 等. 多粘类芽孢杆菌 GA1 所产絮凝剂的絮凝性能研究及机理探讨. 环境科学, 2007, **28**(10): 2336–2341.
- [11] Dermlim W, Prasertsan P, Doelle H. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52** (5): 698–703.
- [12] Kumar CG, Joo HS, Choi JW. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from *haloalkalophilic Bacillus* sp. I-450. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **34**: 673–681.
- [13] Kurane R. Development and utilization of microbial flocculant. *Bio Ind*, 1988, **5**(10): 741–749.
- [14] 郑怀礼主编. 生物絮凝剂与絮凝技术. 北京: 化学工业出版社, 2004, pp.186–187.
- [15] Yokoi H, Natsuda O, Hirose J, *et al*. Characteristics of biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY- 90. *Ferment Bioeng*, 1995, **79**: 378–380.
- [16] Takeda M, Koizumi J, Matsuoka H, *et al*. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. *Ferment Bioeng*, 1992, **47**: 408–409.
- [17] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Modes of flocculation of yeast cell with flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ -7002. *Agric Biol Chem*, 1976, **40**: 619–624.
- [18] Ichiro Y, Sakuza F. Isolation of Glucoamylase non producing mutants in the yeast *saccharomyces diastaticus*. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**(1): 131–135.
- [19] Ichiro Y, Sakuza F. Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene FLO8 in the yeast *saccharomyces*. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**(12): 2889–2896.
- [20] 张博润, 任健, 刘玉方. 酵母菌絮凝机理研究进展及应用前景. 微生物学通报, 1996, **23**(5): 307–311.
- [21] 刘楠, 王冬立, 何秀萍, 等. 酵母新絮凝特性的研究进展及应用展望. 食品与发酵工业, 2007, **33**(1): 89–91.
- [22] Ishida F. Breeding of flocculant industrial alcohol yeast strains by self-cloning of the flocculation gene FLO1 and repeated batch fermentation by transformants. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1998, **44**(5): 347–353.
- [23] 刘春秀, 何秀萍, 蒋思欣, 等. 絮凝性强的优良面包酵母菌株的选育. 微生物学报, 2003, **43**(5): 659–665.
- [24] Li Y, He N, Guan H, *et al*. A novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 produced by *Corynebacterium glutamicum*: a proposed biosynthetic pathway and experimental confirmation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**: 200–206.
- [25] 何宁, 李寅, 陈坚. 新型生物絮凝剂 REA - 11 的代谢模型建立与代谢网络分析. 化工学报, 2005, **56**(4): 681–688.
- [26] 何宁, 李寅, 陈坚, 等. 谷氨酸棒杆菌合成新型生物絮凝剂分批发酵过程的溶氧控制模式. 环境科学学报, 2004, **24**(3): 492–497.
- [27] 马放, 刘俊良, 李淑更, 等. 复合型微生物絮凝剂的开发. 中国给水排水, 2003, **19**(4): 1–4.
- [28] Haruhiko Y, Tomoteru A, Jun H, *et al*. Simultaneous production of hydrogen and bioflocculant by *Enterobacter* sp. BY-29. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, **17**: 609–613.

## 新辟栏目介绍

## 显微世界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片, 带您走进显微镜下的微生物世界, 希望在阅读期刊相关科学新进展的同时, 给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。