

生物乳化剂产生菌及其产乳化剂条件初步研究*

李习武 刘志培** 刘双江

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 从胜利油田原油污染土壤边分离得到一株能降解多种石油芳烃和烷烃且能产生物乳化剂的细菌 Em1, 经生理生化及 16S rRNA 基因序列分析鉴定为赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*)。对菌株 Em1 产生乳化剂的条件进行了研究, 结果表明, 该菌株在以正十六烷为碳源时能较快速产乳化剂, 其最佳条件为: 正十六烷 10 g/L, 酵母抽提物 1 g/L, 初始 pH 值为 7, 30℃ 下 200 r/min 摇床培养。在此条件下, 发酵 1d 后, 培养液的表面张力即降到最低值, 约 30 mN/m, 而乳化能力达 100%; 乳化剂浓度则在第 5d 达到最大, 为 68 倍的 CMC; 经初步研究该乳化剂为脂类物质。

关键词: 赤红球菌, 生物乳化剂, 石油污染, 石油烃降解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0039-05

BIOSYNTHESIS OF EMULSIFIER BY A NEWLY ISOLATED *RHODOCOCCLUS RUBER* STRAIN Em1

LI Xi-Wu LIU Zhi-Pei* LIU Shuang-Jiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: A bacterial strain Em1 isolated from contaminated soil of Shengli oil field was identified as *Rhodococcus ruber* according to its phenotype, physiological and chemical properties, and its 16S rRNA gene sequence. This strain could degrade various polycyclic aromatic hydrocarbons as well as alkanes in petroleum, and produce bioemulsifier. The results indicated that strain Em1 could produce bioemulsifier efficiently when n-hexadecane was used as sole carbon source. The optimal conditions for the synthesis of bioemulsifier were as followed: 10g/L of n-hexadecane, 1g/L of yeast extract, media initial pH 7, and cultivation was carried out at 30℃ on a rotary shaker at 200 rpm. Under these conditions the surface tension of culture decreased to the lowest value, around 30 mN/m, after 1 day, and the emulsifying capacity was 100%. The concentration of bioemulsifier reached to the highest value, around 68 times of CMC, after 5 days' cultivation. The results also showed that the bioemulsifier produced by this strain should be lipid.

Key words: *Rhodococcus ruber*, Bioemulsifier, Petroleum contamination, Degradation of hydrocarbons

生物乳化剂是一类由生物产生的具有表面活性的化合物, 其分子结构由一个疏水部分和一个亲水部分构成, 同时具有亲脂和亲水的性质, 其疏水部分为饱和、不饱和或羟化的烃链; 其亲水部分更加多样化, 可简单如脂肪酸的羧基, 也可复杂如糖脂的多聚糖基。疏水部分和亲水部分的结合可通过酯键、酰胺键或糖苷键^[1]。生物乳化剂根据亲水基团的性质可分为: 糖脂、脂蛋白、脂肪酸、磷脂和中性脂^[2]。生物乳化剂具有减小表面张力、稳定乳化、增加泡沫等作用。它们的表面活性作用以及对热、pH 的稳定性均与化学合成的乳化剂相当, 而且还具有一般的化学合成乳化剂所无法媲美

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 资助项目) (No. 2002AA601150)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA601150)

** 联系人 Tel: 010-62554043, E-mail: liuzhipei@hotmail.com

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-04-21

的优点——与环境的兼容性,即它没有毒性,并可被生物降解,因此它们不会对环境造成不利的影响。正因为具有这些优点,生物乳化剂在石油开采、环境治理以及食品饮料、化妆品生产等领域具有广阔的应用前景。国外早在上世纪60~70年代就对生物乳化剂进行了广泛的研究,研究发现,许多降解烃类的微生物能产生生物乳化剂,尤以 *Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Achromobacter*、*Arthrobacter*、*Brevibacterium*、*Corynebacterium*、*Candida*、*Rhodotorula* 等属为最^[1]。有的微生物只在利用烃类等疏水性碳源时产生生物乳化剂,有一些微生物则只在利用水溶性碳源时产生生物乳化剂,还有一些微生物则在两类碳源上都可产乳化剂^[1],并分离得到了一些生物乳化剂。而我国在这方面的研究基础却很薄弱,鲜有报道^[3,4]。

本实验室从胜利油田土壤样品中分离得到一株能降解多种石油芳烃和利用正十六烷为碳源产生物乳化剂的细菌 Em1 菌株,本文主要对其进行了鉴定,研究了该菌株产乳化剂的条件,同时初步研究了该生物乳化剂的化学性质。

1 材料与方法

1.1 样品和培养基

样品采自胜利油田油井边原油污染土壤,如无特殊说明,Em1 菌株产乳化剂时所用的碳源为正十六烷,无机盐培养基组成为 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NH_4NO_3 1 g, $CaCl_2$ 0.02 g, $FeCl_3$ 0.001g,定容至 1L。

1.2 菌株鉴定

菌株的生理生化鉴定,参照文献 [5] 进行。另外采用了 16S rDNA 序列测定的方法,以通用引物 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1541r (5'-AAGGAGGTGATC-CAGCC-3') PCR 扩增其 16S rDNA,扩增产物送上海基康公司测序,16S rDNA 序列送入 RDP 数据库进行分析。

1.3 乳化剂活性的测定

乳化剂的活性通常以其表面活性(表面张力的下降)和乳化能力表示。表面张力的测定采用山东淄博科森公司的 Auto-tensiometer ZL-2 型表面张力测定仪,稀释培养液直至培养液中乳化剂的浓度达到 CMC(临界胶团浓度)以下,培养液的表面张力骤降,用这一稀释倍数表示培养液中的乳化剂浓度^[6]。培养液的乳化能力及乳化稳定性的测定参照文献 [7]。

1.4 乳化剂的分离纯化^[8]

将乳化剂发酵液 250 mL 于分液漏斗中静置 1 h,取上层约 50 mL 培养液以等体积的甲醇、氯仿混合物(V/V=1:1)萃取 2min,10,000 r/min 离心 10 min,取有机相真空抽吸使溶剂挥发,将剩余物溶于少量正己烷做柱层析。采用 $\phi 26mm \times 300mm$ 的层析柱,填料为硅胶 GF₂₅₄,洗脱程序为:正己烷 100 mL→氯仿 100 mL→氯仿、甲醇、浓盐酸混合物(V/V=5:1:0.01) 100 mL→氯仿、甲醇混合物(V/V=5:2) 200 mL,收集 4 种洗脱组分,真空抽吸使溶剂挥发,分别取 4 种剩余物少许溶于 20 mL 蒸馏水中至终浓度 1,000 mg/L,采用山东淄博科森公司的 Auto-tensiometer ZL-2 型表面张力测定仪测定其表面张力。

1.5 乳化剂化学性质的初步分析

糖类组份的定性检测采用 α -萘酚法^[9];蛋白质的检测采用 Bradford 法^[10]。采用

Bruker Tensor 27 红外光谱仪溴化钾薄片发测定样品的红外光谱。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离筛选

取 5 mL 由石油污染土壤制备的菌悬液，加入 100 mL 含 1 g/L 的原油为碳源的无机盐培养液中驯化 2~3 次，每次 1 周；自最后的驯化培养液中采用 LB 培养基平板分离得单菌落，检测所得各菌株产生物乳化剂的能力以及对多环芳烃的降解能力。最终在所得的 32 株细菌中筛选得到菌株 Em1，该菌不仅能以十六烷为碳源产乳化剂，还能降解苯、萘、蒽、菲、芘和二苯噻吩以及多种烷烃。

2.2 菌株 Em1 的鉴定

菌株 Em1 在 LB 平板上菌落呈圆形，边缘整齐，凸出，橙色。菌体呈短杆状，有球杆变化。接触酶、硝酸盐还原皆为阳性，抗酸染色阴性，不产芽孢，其他生理生化特征也与 *Rhodococcus ruber* 标准菌株相近，此外该菌株还能利用鼠李糖。

菌株 Em1 的 16S rRNA 基因的序列在 GenBank 中的登录号为 AF529079，经同源性分析比较，与菌株 *Rhodococcus ruber* DSM43338^T 的序列相似性为 99%，因此鉴定所分离的菌株 Em1 为赤红球菌。

2.3 菌株 Em1 产乳化剂的条件

分别研究了不同碳源浓度、酵母抽提物浓度、初始 pH 值、通气量对乳化剂产生的影响，基本培养条件是：30℃ 下 200 r/min 摇床培养 48h。

2.3.1 碳源的影响：选取葡

萄糖作为亲水性碳源的代表，正十六烷作为疏水性碳源的代表，试验碳源对菌株 Em1 产乳化剂的影响。以葡萄糖为碳源时，菌株 Em1 不产乳化剂。以正十六烷为碳源，

当浓度小于 2 g/L 时，菌株 Em1 也不产乳化剂，当浓度在 2~10 g/L 时，菌株 Em1 都能较好地产乳化剂。当浓度为 10 g/L 时，培养液中的乳化剂浓度达到最高，为 68 倍。

2.3.2 酵母抽提物的影响：酵母抽提物的浓度在 0~3 g/L 时，菌株 Em1 可产乳化剂，其浓度在 1 g/L 时，培养液中的乳化剂浓度达到最高。

2.3.3 初始 pH 值的影

响：在最适碳源浓度、酵母抽提物浓度条件下，调节培养基的初始 pH 值为 3~10，结果表明，pH

值为 6、7 时，菌株 Em1 可产乳化剂，且以 pH 值为 7 时，培养液中的乳化剂浓度最高；pH 值为 3~5 时，菌株 Em1 几乎不生长；pH 值为 8~10 时，菌株 Em1 生长良好，但不产乳化剂。

2.3.4 通气量的影响：分别在 500 mL 的三角瓶中装入 50、100、250 mL 培养液，以代表不同的通气量，摇床转速为 200r/min，试验表明，在所试验范围内，通气量对产生的

表 1 碳源对菌株 Em1 产乳化剂的影响

底物及浓度	葡萄糖	正十六烷	正十六烷	正十六烷	正十六烷
	10 g/L	1 g/L	2 g/L	5 g/L	10 g/L
乳化剂浓度	0 倍 CMC	0 倍 CMC	21 倍 CMC	51 倍 CMC	68 倍 CMC

表 2 酵母抽提物对菌株 Em1 产乳化剂的影响

酵母抽提物浓度	0.2 g/L	0.5 g/L	1 g/L	3 g/L	5 g/L
乳化剂浓度	21 倍 CMC	31 倍 CMC	68 倍 CMC	21 倍 CMC	0 倍 CMC

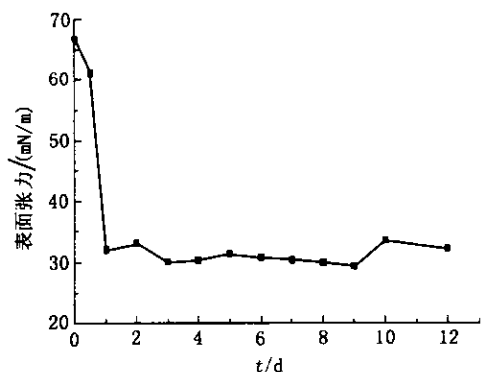


图1 培养液的表面张力随时间变化曲线

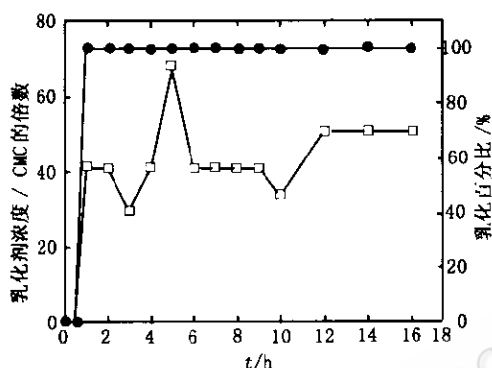


图2 培养液的乳化剂浓度和乳化能力随时间变化曲线

—□— 乳化剂浓度, —●— 乳化百分比

乳化剂的浓度无明显影响。

2.4 乳化剂的发酵

采用上述最佳条件, 即正十六烷浓度 10 g/L, 酵母抽提物的浓度 1 g/L, pH 值为 7, 在 500 mL 的三角瓶中装入 100 mL 培养液, 摇床转速为 200 r/min, 30℃ 下培养。测定了培养液的表面张力、乳化剂浓度和乳化能力随时间变化曲线, 结果见图 1、图 2。在发酵 1d 后, 培养液的表面张力即降到最低值 (图 1), 而乳化能力达 100% (图 2); 说明此时培养液中乳化剂浓度已达 CMC 以上, 且该乳化剂的乳化能力极强; 乳化剂浓度则在第 5d 达到最大, 为 68 倍的 CMC。

2.5 乳化剂的化学性质

对通过柱层析分离得到的 4 种组分的表面张力测定结果表明, 第 3 种组分有表面活性, 在浓度为 1,000 mg/L 时可使纯水的表面张力降低至 29.3 mN/m; α -萘酚实验和 Bradford 比色实验结果表明, 该组分不含糖类和蛋白质; 而该组分的红外光谱结果见图 3, 从图上可以看出, 该组分在波数为 1744.38 cm⁻¹ 处有一强吸收峰, 表明该组分含有羧基, 目前发现的乳化剂, 按其化学性质分类, 除了糖脂和脂蛋白外, 还有脂肪

酸、中性脂和磷脂, 但红外光谱上未见中性脂和磷脂类物质主要官能团的吸收峰, 故

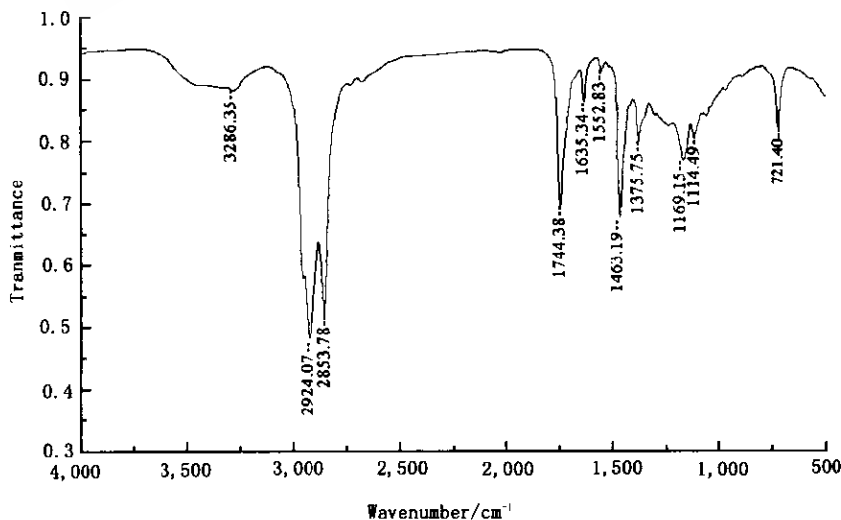


图3 乳化剂粗品的红外吸收图谱

该组分应为脂肪酸类物质(有关该乳化剂的纯化、化学性质和结构鉴定将另文发表)。

与同属的 *Rhodococcus erythropolis* 不同, *Rhodococcus ruber* 产乳化剂直到近年来才受到广泛关注^[11], 研究表明, *Rhodococcus ruber* 所产的乳化剂多为糖脂^[12], 而本报道中菌株 Em 所产的乳化剂是不含糖类的; 此外, 与其它文献[3]中报道的相比, 菌株 Em 产乳化剂时能较快地降低培养液的表面张力, 下降幅度也较大。

3 结论

试验结果表明, 产乳化剂的菌株 Em1 为赤红球菌 *Rhodococcus ruber*。该菌产乳化剂的最佳条件为: 正十六烷 10 g/L, 酵母抽提物 1 g/L, 初始 pH 值为 7, 30℃ 下 200 r/min 摇床培养。在发酵 1d 后, 培养液的表面张力即降到最低值, 约 30 mN/m, 而乳化能力达 100%; 乳化剂浓度则在第 5d 达到最大, 为 68 倍的 CMC; 初步研究显示乳化剂为脂肪酸类物质。

致谢 表面张力的测定由中科院过程工程研究所魏晓芳、苏延磊协助完成, 在此表示感谢!

参考文献

- [1] Haferburg D, Hommel R, Claus R, *et al.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 1986, **33**: 53 ~ 93.
- [2] Hommel R K. Biodegradation, 1990, **1**: 107 ~ 119.
- [3] 张翠竹, 张心平, 梁凤来, 等. 南开大学学报, 2000, **33** (4): 41 ~ 45.
- [4] 孙炳寅, 徐志伟. 生物技术, 1994, **4** (4): 1 ~ 6.
- [5] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1989, volume 2.
- [6] Hommel R, Stüwer O, Stuber W, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol. 1987, **26**: 199 ~ 205.
- [7] Bosch M P, Robert M, Mercadé M E, *et al.* Tenside Surfactants Detergents, 1988, **25** (4): 208 ~ 211.
- [8] Kretschmer A, Bock H, Wagner F. Appl Environ Microbiol, 1982, **44** (4): 864 ~ 870.
- [9] 北京大学化学系有机化学教研室编. 《有机化学习题》. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [10] 李建武等合编. 《生物化学实验原理和方法》. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [11] Ivshina I B, Kuyukina M S, Philp J C, *et al.* World J Microbiol Biotechnol. 1998, **14**: 711 ~ 717.
- [12] Philp J C, Kuyukina M S, Ivshina I B, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol. 2002, **59**: 318 ~ 324.