

# 产生物表面活性剂菌种的一种快速筛选模型\*

宁长发 沈薇 孟广荣 杨树林\*\*

(南京理工大学化工学院 南京 210094)

**摘要:** 利用生物表面活性剂具有溶血性和在产生过程中能使蓝色凝胶平板变色等特性,建立了产生物表面活性剂菌种的快速筛选模型。模型用于从采自油田和炼厂的土样和水样中筛选生物表面活性剂产生菌,选出12株能产生物表面活性剂的微生物,其中1株糖脂产量为6.5 g/L,产生的糖脂配成0.5%水溶液,能在25℃将水的表面张力从71.3 mN/m降到30.5 mN/m。

**关键词:** 生物表面活性剂, 菌种筛选, 模型

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0055-04

## A Rapid Screening Model for Biosurfactant Producing Strains

NING Chang-Fa SHEN Wei MENG Guang-Rong YANG Shu-Lin

(School of Chemical Engineering of Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094)

**Abstract:** A rapid screening model for biosurfactant-producing strains is described in this paper, according as biosurfactant can make the blood-plate hemolysis and produce the blue cycles in blue-glue-plate. 12 microorganisms have been got from soil and water samples sampled from oil field and refinery using this model, and one of them can produce the glycolipid biosurfactant, which can depress the interfacial tension of water from 71.3 mN/m to 30.5 mN/m, and yield is 6.5 g/L.

**Key words:** Biosurfactant, Strain screening microbe, Model

生物表面活性剂由于具有独特的理化性质及在石油和其它工业中良好的应用前景,日益受到关注。菌种筛选工作是生物表面活性剂研制的基础<sup>[1]</sup>。本文对采自油田和炼厂的土样和水样进行富集培养,经血液琼脂培养基和蓝色凝胶平板筛选后,控制发酵液中碳、氮源比例,限制 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 含量,通过排油活性测试、薄层层析、界面张力和乳化性能分析等判断菌株产生物表面活性剂情况,并对发酵液中产物的产量进行检测,确定了一套高产菌的筛选模型,模型用于筛选生物表面活性剂产生菌,得到较好结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 土样和水样,采自江苏江都油田和南京炼油厂。

**1.1.2 细菌富集培养基 (XF):**  $(NH_4)_2SO_4$  10 g, KCl 1.1 g, NaCl 1.1 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$   $2.5 \times 10^5$  g,  $KH_2PO_4$  3.4 g,  $K_2HPO_4$  4.4 g,  $MgSO_4$  0.5 g, EDTA 1 g, 酵母粉 0.5 g, 液化

\*南京市科学技术局资助项目 (No. 宁科 2001-102)

\*\*联系人 E-mail: yangshulin@mail.njust.edu.cn

收稿日期: 2003-08-06, 修回日期: 2003-11-8

石蜡 5 mL, 用去离子水定容至 1 L。

**1.1.3 霉菌和放线菌富集培养基 (MF):**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, EDTA 1 g, 酵母粉 0.5 g, 液化石蜡 8 mL, 用去离子水定容至 1 L。

**1.1.4 血液琼脂培养基<sup>[2,3]</sup> (XQ):** 脱纤维绵羊血 50 mL, 营养琼脂 23 g, 去离子水 1 L。

**1.1.5 蓝色凝胶培养基<sup>[4]</sup> (LQ):** 十六烷基三甲基溴化铵 5 g, 次甲基蓝 0.02 g, 营养琼脂 20 g, 去离子水 1 L。

**1.1.6 斜面培养基 (XM):** 蛋白胨 8 g, 葡萄糖 16 g, 酵母粉 0.1 g, 琼脂 10 g, 去离子水 1 L, pH=5.6。

**1.1.7 发酵培养基 (FJ):** 液化石蜡 20 mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.08 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.50 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.41 g,  $\text{MgSO}_4$  0.71 g,  $\text{CaCl}_2$  0.03 g, 酵母粉 0.01 g, 去离子水定容至 1L。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌种筛选模型的建立:** 富集培养基 XF、MF 的 pH 值分别调为 7.0~7.5、5.1~5.4, XF 培养基中加入 0.2% 的制霉菌素, 将样品接入。30℃, 摇床培养 3~5 d 后, 取富集培养液平板划线法接到 XQ 培养基上, 30℃ 培养 1~2 d。挑取溶血圈较大的单菌落接入 LQ 培养基, 30℃ 培养 1~2 d。挑取蓝圈较大的菌落在斜面培养基 XM 上留种。将斜面培养基上菌株接入 FJ 培养基, 30℃, 摇床培养 7 d, 观察并监测发酵液变化。

**1.2.2 发酵液的排油活性测定<sup>[5]</sup>:** 取 90 mm 培养皿加水, 并滴加 0.4 mL 正二十烷, 待形成油膜后, 分别将各发酵液滴加于油膜中心, 选择排油圈 3 cm 以上的菌株作下一步研究。

**1.2.3 发酵液乳化性能测定<sup>[6]</sup>:** 取相同体积 (各 5 mL) 的发酵液与 9# 煤油混合, 预热、振荡乳化 40 s, 冷至室温, 在不同时间测定两相体积变化。

**1.2.4 薄层色谱分析:** 各发酵液离心后, 上清液用氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 抽提后进行薄层层析, 展开剂用正丁醇/乙酸/水 = 16/4/8。显色剂为: ① 苯酚-硫酸; 糖脂显棕色; ② 钼酸铵-高氯酸: 磷脂显灰棕色; ③ 0.5% 茚三酮丙酮溶液, 脂肽显红色<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 发酵液表面张力测定:** 采用环法测定发酵液表面张力, 仪器为山东同业仪器厂生产 DT-102 型全自动界面张力仪。

**1.2.6 代谢产物的提取和纯化:** 发酵液 4,000 r/min 离心, 上清液用磁力搅拌器搅拌 20 min, 用 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调 pH=6, 以氯仿/甲醇 (2:1, v/v) 分两次萃取, 合并有机相, 55℃ 浓缩, 再过硅胶柱, 用正己烷、氯仿、氯仿/甲醇等依次洗脱, 收集并蒸去溶剂, 重复得纯品<sup>[8,9]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 筛选培养基的确定

在菌种筛选过程中, 培养基的选择十分重要。微生物产生的表面活性剂能使血液琼脂培养基中的红细胞发生溶血现象, 因而可直观的看到溶血圈的产生, 但溶血圈不规则, 且在培养过程中, 血液中的某些成份或杂菌常常也会产生类似的溶血圈。而微生物产生的胞外生物表面活性剂能在不易染杂菌的蓝色凝胶培养基上产生深蓝色晕圈, 并可根据晕圈大小判断产量, 但在这种培养基上菌落生长较慢, 不便作为筛选培养基

单独使用。表1是联合使用这两种培养基时菌种产表面活性剂情况。

表1 筛选菌种产表面活性剂情况

菌号	溶血圈	蓝色晕圈 (直径 cm)	排油圈 (直径 cm)	发酵液表面 张力 (mN/m)
1	+	-	-	47.3
2	+	0.25	4.2	36.9
3	+	0.68	8.5	26.5
4	+	0.18	3.5	39.5
5	+	0.30	3.8	38.5
6	+	0.31	4.2	37.1
7	+	-	-	42.8
8	+	0.34	5.0	32.6
9	+	0.41	5.2	32.5
10	+	0.65	6.5	31.8
11	+	-	-	51.5
12	+	0.67	6.0	32.0
13	+	-	-	55.3
14	+	0.22	3.5	39.7
15	+	0.35	4.5	35.5
16	+	0.42	5.0	32.5

注: 空白发酵液表面张力为 46.7mN/m.

## 2.2 发酵培养基的确定

根据文献[11], 细胞的碳、氮源比例决定着菌体代谢过程中生物表面活性剂的产量, 当碳多于氮时, 氮源消耗尽后细胞会停止生长, 但碳仍会在细胞内经糖解和氧化作用生成脂肪酸, 脂肪酸与氨基酸、糖苷等结合后就生成了糖脂类等生物表面活性剂。因而碳及氮比例既要保证细胞的大量繁殖和快速生长, 又要保证产物的过量生成。另外,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  等含量配比都会很大程度的影响生物表面活性剂的生物合成。1.1.7 的发酵培养基是在考察了大量文献资料和前人工作的基础上确定的, 是筛选工作成功的基础。

## 2.3 发酵液表面张力定性、定量及乳化性能分析

表面张力和乳化能力是衡量菌株产生物表面活性剂能力和产物活性稳定性的重要指标。表1可以看出, 按1.2.2进行发酵液排油活性测定的方法能方便的定性检验出发酵液中生物表面活性剂的产生情况。这种定性分析方法操作简单, 节省样品, 并且结果可靠, 所以用于筛选生物表面活性剂产生菌可以极大的简化筛选操作。经发酵液表面张力测定后, 共选出12株发酵液表面张力很低的菌株。对这些菌株进行乳化能力测试, 筛选出3株细菌。图1是各菌株在25℃静止24h发酵液的乳化层变化情况。

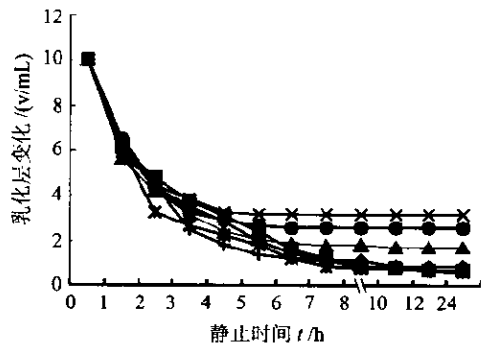


图1 菌株乳化能力比较

◆ 2, ■ 12, ▲ 10, ✕ 3,  
■ 16, ● 9, — 15

## 2.4 发酵液 TLC 鉴定及产物浓度与表面张力关系测定

对初筛得到菌株进行薄层色谱分析, 发现其中一株的发酵液显示糖脂斑点, 如图

2, 可判断为糖脂类生物表面活性剂。该菌菌落半透明, 亮、圆、隆起, 革兰氏染色 G<sup>-</sup>, 经初步鉴定为假单胞菌。图 3 是发酵产物经提纯后, 25℃ 纯水稀释后浓度与表面张力关系图, 当配成 0.5% 水溶液, 发酵产物仍能使水表面张力从 71.27 mN/m 降低到 30.5 mN/m。

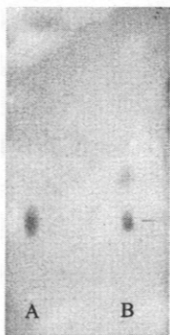


图 2 发酵液 TLC 图

A 为鼠李糖脂标样, B 为样品

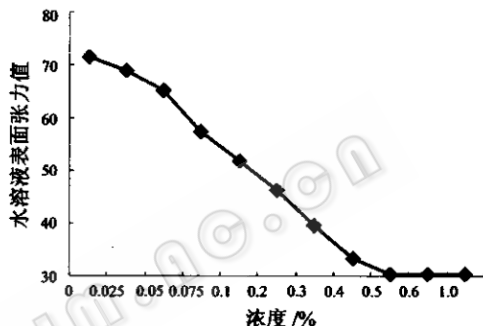


图 3 产物浓度与表面张力关系

## 2.5 表面活性剂产量分析

发酵 7 d 后, 测定菌株发酵液中生物表面活性剂含量, 产量为 6.5 g/L。

## 参考文献

- [1] 方云, 夏永梅编译. 生物表面活性剂. 北京: 中国轻工出版社, 1990. 12~19.
- [2] Koch K A. *J Bacteriol*, 1991, 173 (13): 4212~4219.
- [3] Hideharu Y, Shinichiro Y, Kenji O, *et al.* *Sekiyu Akkaishi*, 2000, 43 (1): 59~69.
- [4] Catherine N M, David G C, Ronald J N. *J Ferment Technol*, 1984, 62 (4): 311~314.
- [5] Jain D K, Thompson D L C, Lee H, *et al.* *J Microbiol Methods*, 1991, 13: 271~279.
- [6] Cooper D G, Goldenberg B G. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 224~229.
- [7] Jitendra D D, Ibrahim M B. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61 (1): 47~64.
- [8] 薛燕芬, 王修垣. *微生物学报*, 1996, 36 (2): 121~125.
- [9] Abalos A, Maximo F. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, 77: 777~784.
- [10] 程光胜, 李玲阁译. *微生物学实验法*. 北京: 科学出版社, 1981. 196~200.
- [11] Davis D A, Lynch H C, Varley J. *Enzym Microbial Tech*, 1999, 25: 322~329.