

一株产絮凝剂芽孢杆菌的分离及成份分析

马晓娜 惠明 牛天贵*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 从超高压灭菌的哈密瓜汁中筛选出一株具有高絮凝活性的芽孢杆菌。经形态及生理生化指标测试, 初步确定该菌株为 *Bacillus* sp. B₅₃。对此菌产生的絮凝活性成分纯化后经高效液相色谱、薄层层析分析表明该絮凝活性物质是聚 γ -谷氨酸, 产量达到 12.48g/L, 该物质仅由谷氨酸组成, 在 212nm 处有最大吸收峰, 电泳结果表明 *Bacillus* sp. B₅₃ 所产聚 γ -谷氨酸是分子量集中在 440~669kD 之间的多分子量聚集体, 该絮凝剂有效地絮凝各种无机和有机的介质, 高岭土和 Ca(OH)₂ 效果明显。

关键词: 微生物絮凝剂, 芽孢杆菌, 聚 γ -谷氨酸

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0026-06

The Isolation of a Flocculant-Producing *Bacillus* and Identification of Microbial Flocculant

MA Xiao-Na HUI Ming NIU Tian-Gui

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: This paper mainly discussed a bacterial strain with high flocculating activity isolated from cantaloupe juice. The strain was named *Bacillus* sp. B₅₃ based on colony morphology, physiological and biochemistry experiments. The new flocculant was purified and shown to be a homopolymer of glutamic acid by HPLC analysis and thin layer chromatography, and presumed to be Poly γ -glutamic acid (γ -PGA). γ -PGA 12.48g/L was achieved in shake flask. The purified material showed a absorption peak at 212nm, and was only composed of L-Glu. The MW could be detected through SDS-PAGE, and its MW was about a molecular mass between 440kD with 669kD. This bioflocculant efficiently flocculated various organic and inorganic suspensions. It's flocculating effect on kaolin and Ca(OH)₂ was superior to others.

Key words: Microbial flocculant, *Bacillus* sp., Poly γ -glutamic acid

传统絮凝剂一般可分为 3 类: ①无机絮凝剂, 如硫酸铝、聚合氯化铝、硫酸亚铁等; ②有机合成高分子絮凝剂, 如聚氧化乙烯、聚苯乙烯磺酸盐以及聚丙烯酰胺衍生物、聚乙烯亚胺等; ③天然生物高分子絮凝剂, 如脱乙酰壳多糖、褐藻胶和微生物絮凝剂等^[1]。这些絮凝剂广泛应用于工业生产过程包括工业废水处理、工业用水处理以及食品生产和发酵工业等^[2], 其中许多无机絮凝剂和有机合成高分子絮凝剂由于其良好的絮凝效果和较低成本, 已经被广泛应用。然而, 人们已经发现它们在使用过程中存在着较大的不安全性和潜在的二次污染的问题^[3]。如无机絮凝剂中的铝离子容易引起老年痴呆症, 铁盐絮凝剂对设备的腐蚀作用及易形成某些难絮凝沉淀的化合物; 某些有机合成絮凝剂对人体健康会有不良的影响。因此一种对环境及健康问题安全且生物可降解的絮凝剂的研究迫在眉睫。近年来, 由微生物生产的生物高分子的应用已有研

* 联系人 Tel: 010-62346294, E-mail: niutianguai@163.com

收稿日期: 2004-03-05, 修回日期: 2004-06-10

究, 这些生物高分子由于可降解性和降解后中间产物对人体和环境无毒无害而被广泛接受。目前, 已经报道的不同微生物产生的生物絮凝剂主要有蛋白质、多糖和糖蛋白^[4], 如 *Rhodococcus erythropolis* S-1, *Nocardia amarae* YK-1, *Pacilomyces* sp. 产生蛋白类絮凝剂; *Alcaligenes latus* B-18, *Alcaligenes cupidus* KT201 和 *Bacillus* sp. DP-152 生产多糖类絮凝剂; *Arcuadendron* sp. TS-4 和 *Arathrobacter* sp. 产生糖蛋白絮凝剂^[5], 但对芽孢菌产生絮凝剂的研究不多^[6]。本实验室从传统食品中筛选到一株具有高絮凝活性的细菌, 经初步鉴定为 *Bacillus* sp., 并对其絮凝剂成分进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离样品: 超高压灭菌哈密瓜汁 (500MPa, 20min 处理)、豆豉、腐乳、腊肉等。

1.1.2 培养基: (1) 斜面培养基: 蛋白胨 5g, 牛肉膏 3g, 琼脂 20g, 定容至 1L, pH 值 7.4。(2) 种子培养基: 蛋白胨 1.5g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 定容至 1L, pH 7.4。(3) 发酵培养基: 柠檬酸 12g, 谷氨酸 20g, 氯化铵 7g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCl_2 0.15g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04g, 定容至 1L, pH 7.0。

1.2 筛选方法

将菌种样品连续富集培养 2~3 次后涂布于相应的平板, 选择表面光滑且带粘性的单菌落经平板反复划线 37℃ 恒温培养 24h, 观察生长情况, 经多次划线分离直至得到纯菌^[7]。将分离纯化得到的菌分别接种到盛有 50mL 灭菌发酵培养基的 300mL 摇瓶中, 在 37℃, 200r/min 条件下摇床培养 96h, 取发酵液测其絮凝活性后, 选取具有絮凝活性的菌株作为初筛菌株, 采用平行发酵培养, 将具有优良絮凝活性的菌株作为复筛菌种。

1.3 菌株的生理生化鉴定

个体形态特征、菌落形态特征、运动性和生理生化观察测定参照参考文献的方法进行。鉴定方法按文献中的方法进行^[8,9]。

1.4 絮凝实验

在 100mL 量筒中加入 80mL 蒸馏水, 5 mL 1% 的 CaCl_2 , 2mL 发酵液, 然后加水至 100mL。用分析天平称高岭土 0.4g, 放入 150mL 烧杯中, 将量筒中的液体倒入烧杯中, 调节 pH 至 7, 同时搅拌 2min, 静置 5min, 以吸管吸取液面下 1cm 深度的液层于 752 型紫外分光光度计 570nm 处测定吸光度, 以不加发酵液的吸光度为对照来确定菌发酵液的絮凝活性^[10]。

1.5 生物絮凝剂的提纯

分离得到的菌株接种于发酵培养基中 37℃, 200r/min 条件下摇床培养 72h 后, 将发酵液经 12,000r/min, 30 min 离心, 取上清液, 加入 4 倍体积的乙醇, 搅动后置于低温过夜, 再 12,000r/min, 离心 30min 收集沉淀物, 用去离子水洗涤沉淀物 2 次合并上清液, 再用 4 倍体积乙醇沉淀, 此沉淀物用 pH6.98 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液溶解, 加入 5 倍体积预冷的丙酮, 12,000r/min, 30 min 离心, 分离沉淀, 反复 3 次收集沉淀。将沉淀物倒入截留分子量 8,000~12,000 透析袋内, 在电磁搅拌器上透析 40min, 每 10min 换水 1 次, 之后将沉淀物冷冻干燥, 得纯品^[5]。

1.6 生物絮凝剂的成分分析

1.6.1 薄层层析: (1) 选用硅胶 G 制板 (10cm × 15cm × 0.3mm), 薄层在 110℃ 活化 1h 后, 取经纯化的样品制成 10g/L 的溶液点样。选用展开剂正丁醇: 乙酸: 水 (体积比 2:1:1), 上行展开后, 以无水乙醇: 浓硫酸 (体积比 1:1) 显色, 于干燥箱中 100℃ 烘干 15min。 (2) 取经纯化的样品, 用 6mol/L HCL 在 110℃ 水解 24h, 加入等体积 6mol/L NaOH 中和水解液, 用蒸馏水稀释成 1g/L 溶液。选用硅胶 G 制板 (10cm × 15cm × 0.3mm), 110℃ 活化 1h 后分别用标准 L-谷氨酸和不同时间水解稀释液点样, 选用下列展开剂展层: 正丁醇: 80% 甲酸: 水 (15:3:2), 展层完毕后自然干燥, 茚三酮喷雾显色。

1.6.2 紫外吸收光谱测定: 取经纯化后的样品, 用超纯水配制成浓度为 10g/L 的溶液, 用 TECHCOMP UV7500 进行紫外扫描。

1.6.3 官能团测定: 取经纯化后的样品, 用超纯水配制成浓度为 10g/L 的溶液, 分别用双缩脲试剂、茚三酮、 α -萘酚、间苯二酚、葱酮等显色剂进行生化反应, 观察反应变化。

1.6.4 高效液相色谱分析: (1) 酸水解: 将样品 2g 加入磨口水解管中, 然后加入 100mL 6mol/L HCL, 抽真空, 待真空达到要求后维持 10min 后封口, 110℃ 水解 24h, 冷却将水解液移至 250mL 容量瓶中, 用超纯水洗涤水解管 3 次定容, 用两层滤纸过滤取滤液待分析氨基酸含量。 (2) 色谱条件: (a) 固定相: Lichro CART superpher CH-8, DUH250X AMM ID (Merk Darmastand, F. R. G); (b) 流动相: A 液中乙腈: 醋酸钠 = 20:80, B 液中乙腈: 醋酸钠 = 70:30, A 液和 B 液各加入 3 滴优级纯三乙胺 (醋酸钠缓冲液, 3mL 冰醋酸于 1,000 mL 容量瓶, 重蒸水定容, 终浓度为 0.3%, 用 30% NaOH 调节 pH 4.2); (c) 荧光检测器: 波长 Ex = 260nm, Em = 310nm。 (3) 柱前衍生: 吸取 1mL 消化液或标准液于 25mL 磨口烧瓶中, 在旋转蒸发仪上蒸干 (60℃), 再加 1mL 重蒸水在旋转蒸发仪上旋转蒸干反复 2 次, 最后加 2mL 标准内标溶液 (牛磺酸), 在 10mL 试管中顺序加入 0.4mL 硼酸钠缓冲液 (0.5mol 硼酸, 用 NaOH 调 pH 7.7), 0.1mL 标准或样本溶液和 0.6mL FMOC (g-Fluorenyl methylchloroformate) 溶液 (155mg FMOC 溶于 40mL 丙酮, 冰箱保存), 摇动试管 40s 后加入 2mL 正戊烷 (Rathburn Chemicals, HPLC 级) 提取过量的 FMOC, 重复提取 3 次吸取衍生后的样品液 0.1mL 置于另一试管中, 加入 1.0mL 洗脱液 A 进行稀释, 此溶液可进样 20 μ L。

1.6.5 絮凝剂分子量的初步测定: SDS-PAGE 法。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离筛选

从传统食品样品中分离、筛选得到 56 种絮凝剂产生菌, 絮凝效率达 60% 以上者有 12 株。这些絮凝剂产生菌其中一株细菌 B₅₃, 所产絮凝剂活性尤为突出, 可达 90% 以上, 因此对其进行鉴定及特性的研究。

2.2 菌株初步鉴定

2.2.1 形态特征及运动性: 菌株 B₅₃ 在肉胨平板上菌落呈圆形, 颜色为乳白色, 直径 3~4mm, 表面光滑, 边缘整齐, 突出。个体较大, 细胞形状为杆状, 革兰氏阳性, 芽孢中生, 不膨大, 经运动性观察, 该菌株具有运动性。

2.2.2 生理生化特征:对菌株 B₅₃进行了部分生理生化反应特征的鉴定,具体见表1。结合个体形态特征、菌落形体特征及生理生化试验,参照伯杰细菌鉴定手册(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第八版,菌株 B₅₃为芽孢杆菌,暂时定为 *Bacillus* sp. B₅₃。

表1 菌株 B₅₃生理生化试验结果

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
葡萄糖	+	葡萄糖产气	-
麦芽糖	+	运动性	+
棉子糖	+	厌氧生长	-
乳糖	+	淀粉水解试验	+
木糖	+	酪阮	+
蔗糖	+	硝酸盐还原	+
甘露醇	+	H ₂ O ₂ 酶试验	+
阿拉伯糖	+	卵磷脂酶	+
2% NaCl	+	柠檬酸盐试验	+
5% NaCl	+	石蕊牛奶还原	+
7% NaCl	+	V-P 试验	+
10% NaCl	-	明胶液化试验	+

2.3 生物絮凝剂的成份和结构分析

2.3.1 纯化:在成份分析前,对 B₅₃的培养液进行提纯,所得产物为白色絮状物,薄层层析色谱试验表明,有一个斑点,从而证明提纯产物的纯度较高且只含有一种物质(图略)。

2.3.2 成分分析:(1)紫外扫描分析 将提纯产物 0.02g 溶于 10mL 蒸馏水,在 200~600nm 范围内扫描,结果发现只有一条峰,且最大吸收波长为 212nm (图1)。由于该物质在 260~280nm 没有吸收,表明该物质没有典型的肽链结构。(2)生化反应分析 对此提纯产物进行糖、蛋白质的显色反应,结果表明该絮凝剂糖类颜色反应阴性,蛋白质/氨基酸的特征反应阴性,即用于蛋白质/氨基酸鉴定的茚三酮反应、双缩脲反应等均无颜色变化。因而,可以定性地判断出其有效成分既非多糖又不是蛋白质。(3)高效液相色谱和薄层色谱分析 对此絮凝剂进行常规盐酸水解消化后,经处理后进行液相色谱分析(图2),其中第一个峰为内标物即牛磺酸,第3条为溶剂峰即FMOC,可

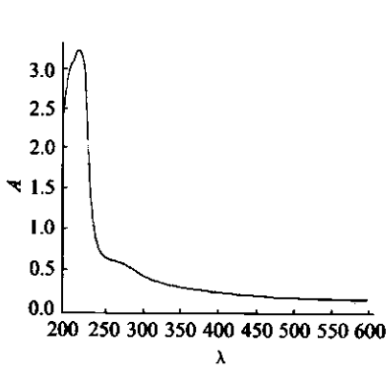


图1 紫外扫描分析

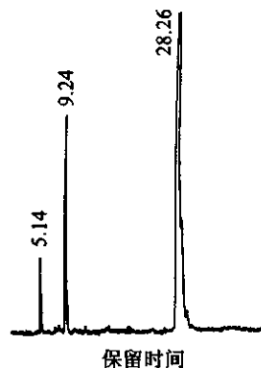


图2 高效液相色谱图

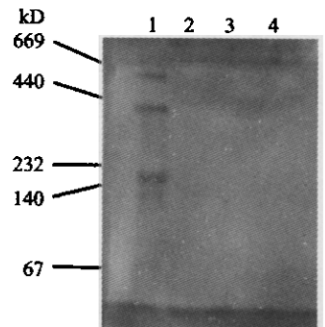


图3 电泳图及分子量分析

见此絮凝剂的水解产物只含有一种氨基酸，第二个峰与谷氨酸的出峰时间相同，同时对照薄层色谱展层分析（图略），水解物也只显示一个斑点，另外随着水解时间的延长，斑点的颜色逐渐加深，也说明此水解物只有一种物质组成，且迁移率与谷氨酸相同，由图推断此水解物为谷氨酸。（4）分子量范围断定：图3中1号泳道为高分子量标准蛋白，2、3、4号均为样品重复，由图可见此絮凝剂分子量并非由单一分子量的物质组成，而是分子量在440~669kD的分散体组成。

以上分析表明，此生物絮凝剂没有典型的蛋白质肽链结构，也不是一种环状多肽，又不是糖类物质，且水解物中逐渐释放出谷氨酸，由于谷氨酸与谷氨酸的键合方式与肽键不同，根据谷氨酸的结构推断该物质是谷氨酸由 γ -酰氨键聚合而成，因此可证明它是聚 γ -谷氨酸。

2.4 生物絮凝剂聚 γ -谷氨酸的生产

发酵过程中絮凝剂 γ -PGA的产生过程，pH值的变化，粘度及细胞的生长情况如图4和图5所示。絮凝剂的积累，培养基的粘度及细胞的生长在96h均达到最大值，培养96h后培养基中絮凝剂的产量达12.48g/L，培养基的pH值的变化在0~24h基本保持不变，随着时间的延长逐渐降低，在72h时达到最低为5.5，之后有所回升。

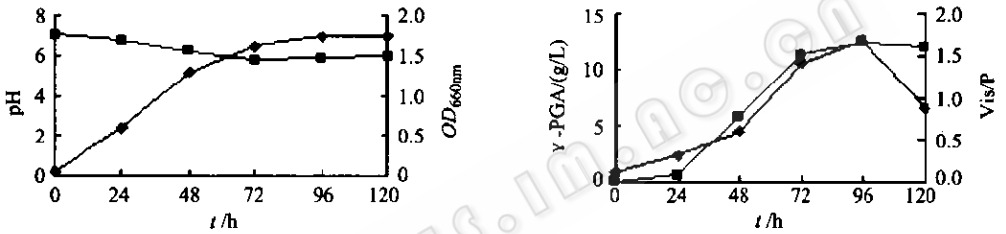


图4和图5 *Bacillus* sp. B₅₃ 的产生絮凝剂 γ -PGA发酵过程曲线

左图：■ γ -PGA, ◆ Vis, 右图：■ pH, ◆ OD₆₆₀

2.5 絮凝效果试验

由表2可见，所有检测的絮凝介质均表现了一定的絮凝活性，但是不同的絮凝介质絮凝活性不尽相同。与其他相比较，活性炭、高岭土、Ca(OH)₂、Mg(OH)₂都能够被有效的絮凝，即在添加2mL 0.6g/L的PGA的情况下絮凝活性都达到了50%以上，而高岭土、Ca(OH)₂表现了更强的絮凝效果，分别达到了96.35%和97.21%。而其他的悬浮介质相对来说絮凝活性较低。与其他人报道的相比较对于无机的絮凝介质尤其是对高岭土和Ca(OH)₂具有明显的优势。

表2 絮凝剂对各种悬浮颗粒的絮凝活性

各种絮凝介质	絮凝活性 (%)
土壤	9.63
活性炭	51.32
高岭土	96.35
Ca(OH) ₂	97.21
Mg(OH) ₂	87.1
纤维素	46.74
C. M. 纤维素	21.5
酿酒酵母	33.33
大肠杆菌	17.42

3 结论

本研究是利用发酵食品作为絮凝剂菌种筛选来源,可确保絮凝剂对环境及人类健康的无毒无害特性,同时初步鉴定此菌为 *Bacillus* sp. B₅₃,并且经鉴定此絮凝剂为聚 γ -谷氨酸,其产量可达到12.48g/L,与其他微生物产生的絮凝剂相比产量较高,此菌有进一步鉴定和改造的价值。另外,聚 γ -谷氨酸对无机型悬浮颗粒的絮凝活性较高,有应用的优势。

具有絮凝能力的微生物种类很多,在自然界中分布广泛,但是利用芽孢杆菌生产聚谷氨酸作为微生物絮凝剂的研究很少,具有良好的应用前景。目前生产该絮凝剂还存在成本高,产量低的缺点,不能适应工业化生产的需要,今后的研究工作主要是选择廉价的培养基及合适的絮凝条件,使其能够应用于工业生产中。

参考文献

- [1] Shih I L, Van Y T, Yeh L C, *et al.* *Bioresource Technology*, 2001, **78**: 267 ~ 272.
- [2] 江 锋,黄晓武,胡 勇. 给水排水, 2002, **28** (8): 83 ~ 90.
- [3] 江 锋,黄晓武,胡 勇. 给水排水, 2002, **28** (9): 88 ~ 91.
- [4] 李智良,张本兰,裴 健. 应用与环境微生物学报, 1997, **3** (1): 67 ~ 70.
- [5] Ashiuchi M, Kamei T. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 764 ~ 769.
- [6] 胡筱敏,邓述波,牛力东,等. 环境科学研究, 2001, **14** (1): 36 ~ 40.
- [7] 王 镇,王孔星. 微生物学报, 1995, **35** (2): 121 ~ 129.
- [8] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1983.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [10] 卢文玉,张 通,张冬艳,等. 工业微生物, 2002, **32** (2): 10 ~ 12.
- [11] 杨 军,陈 坚,曲音波,等. 高分子材料科学与工程, 2002, **18** (4): 133 ~ 136.
- [12] Yasuhiro I, Keitarou K, Yoshifumi I. *JARQ*, 2002, **36** (3): 169 ~ 175.