

微生物絮凝剂的研究概况

王 镇 王孔星

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌 430071)

絮凝剂又称沉降剂, 作为一类可使液体中不易沉降的固体悬浮微粒(粒径 10^{-3} — 10^{-7} cm)凝聚、沉淀的物质, 在发酵工业后处理、食品加工、土木疏浚施工、废水处理等领域应用广泛。由于使用范围广、用量大, 其质量直接关系到生产工艺的改进、人类的健康和环境保护。现用絮凝剂存在的问题, 使研究开发具有高絮凝活性、安全、无毒、不造成二次污染的絮凝剂成为迫切而有意义的课题。目前人们已把研究目光转向微生物絮凝剂的开发和应用上来。

微生物絮凝剂是一类由微生物产生的有絮凝活性的次生代谢产物。从 Butterfield^[1]在活性污泥中筛选到絮凝剂产生菌以来, 人们对微生物胞外分泌物与微生物絮凝剂之间的关系进行了研究, 筛选到许多絮凝剂产生菌, 并在絮凝条件、机理、产絮凝剂的基因控制、絮凝剂的纯化、性质及应用等方面进行了一系列工作。国内尚未见这方面的研究报道。本文根据国外有关研究报道做一简要概述。

(一) 絮凝剂产生菌

絮凝剂产生菌是一类合成并分泌有絮凝活

性物质的微生物,种类较多,在霉菌、酵母菌、放线菌、细菌中都有。研究者们用不同的培养条件、测试标准从环境中分离絮凝剂产生菌。目前已报道的菌株^[2-5,32,33]有: *Alcaligenes latus*, *Alc. scupidus*, *Anixiella reticulata*, 赫曲霉 (*Aspergillus ochraceus*), 酱油曲霉 (*Asp. sojae*), 嗜虫短杆菌 (*Brevibacterium insectiphilium*), *Circinella sydowi*, *Corynebacterium brevicala*, *Eupenicillium crustaceus*, *Geotrichum candidum*, *Monascus anka*, 石灰壤诺卡氏菌 (*Nocardia calcarea*), *N. restrita*, 桔象虫诺卡氏菌 (*N. rhodnic*), 拟青霉 (*Paecilomyces* sp.), 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 粪假单胞菌 (*Pseudomonas faecalic*), 荧光假单胞菌 (*Ps. fluorescens*), 施氏假单胞菌 (*Ps. stutzeri*), 红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*), *Sordaria fimicola*, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*), 酒红链霉菌 (*Str. vinaceus*), 生枝动胶菌 (*Zoogloea ramigera*)等。

(二) 絮凝剂的性质及产生条件

Mckinney 首先观察了积累细胞外多糖物质和细菌絮凝之间的关系。随后, Buch, Pavoni 也从废水中发现了絮凝物质。到目前为止, 已报道的微生物产生的絮凝物质为糖蛋白^[3]、粘多糖^[3,6]、蛋白质^[7]、纤维素^[8]、DNA^[9,10]等高分子化合物。一般来说, 作为微生物絮凝剂的物质分子量多在 10^5 以上, 如 Sakka 的 *Pseudomonas* sp. C-120 产生的絮凝物质是分子量大于 2×10^6 的天然双链 DNA^[9,10]。

作为絮凝剂的物质性质、结构各异, 如 KURANE 的 *Rhodococcus erythropolis* 产生的絮凝剂 NOC-1 是多糖蛋白^[12]。Takagi 的 *Paecilomyces* sp. 产生的 PF-101 是由氨基半乳糖以 α -1, 4 键相连而成的分子量 3×10^5 道尔顿的粘多糖^[11]。经实验证明, 该粘多糖 8% 的单位是 N 端乙酰化的。有的微生物产生的絮凝物质结构更为复杂, Nakamura^[11] 的 *Aspergillus sojae* AJ7002 产生的絮凝剂就是由蛋白质、己糖胺、2-葡糖酮酸组成的分子量大于 2×10^5 的聚

合物。

不同的絮凝剂产生菌产生絮凝剂的条件不同。首先, 有各自的最适生长、产絮凝剂的培养基。如产生粘多糖类絮凝剂 *R. erythropolis* 的最适碳源为葡萄糖、果糖等水溶性糖类, 最适氮源为尿素和硫酸铵^[12]。而 *Paecilomyces* sp. I-1 最适碳源为淀粉, 最适氮源为多肽或酪氨酸。一定量的 C_2^{+} 有利于絮凝剂的产生和积累^[3]。*Asp. sojae* 对絮凝剂的积累会因多糖的加入而受到限制, 但当加入其产生的絮凝剂的前体物质 2-葡糖酮酸则有利于絮凝剂的积累。其次, 培养基初始 pH 对菌产絮凝剂也有影响^[14]。本实验室的工作还显示出菌产絮凝剂最佳 pH 与其生长最适 pH 略有差异。另外, 培养基中的阳离子种类及浓度对微生物产絮凝剂也有影响。Masy 等观察了 C_2^{+} 对酵母菌产生絮凝剂的诱导作用^[10]。培养温度对微生物积累絮凝剂有明显的影响。不同絮凝剂产生菌有各自最适的培养温度。*R. erythropolis* 最适生长及产絮凝剂的温度为 30°C 。他们所做的通气量实验表明, 通气量对菌生长及产絮凝剂是一个不可忽略的因素^[12]。本实验室对四株絮凝剂产生菌进行了通气量影响实验, 发现培养后期减少通气量有利于多糖类絮凝剂的产生, 而不利于部发核酸类絮凝剂产生菌产絮凝剂。但也有些菌产絮凝剂的能力不受通气量的影响。

表 1 通气量对 *R. erythropolis* S-1 产生絮凝剂及其细胞生长量的影响^[12]

通气量 (l/min)	细菌生长量 (OD ₅₅₀)	絮凝活性 ($\frac{1}{OD_{550}}$)
0	13.9	1.63
2	10.7	0.78
4	11.7	0.68

许多研究结果表明, 微生物絮凝剂的产生与菌生长曲线有平行关系^[3,11,12,14,15]。本实验室的工作也证明了这一点。菌生长量与产生絮凝的量及所表现出的絮凝活性, 有很好的正相关性。

(三) 絮凝剂的提取与纯化

从发酵液中提取、纯化微生物絮凝剂的方法有多种。首先是依据菌的情况去菌体，霉菌的发酵液可过滤除菌体^[11,13]，细菌、酵母菌则需离心去菌体^[17]。提取絮凝剂则视发酵液的组成成分及絮凝物质的种类性质而定，采用乙醇^[3,13]、硫酸铵盐析^[2]、丙酮^[4]、盐酸胍^[9]等沉淀获得。本实验室用2倍体积95%乙醇沉淀去菌体的发酵液，得到了絮凝剂粗品。对于结构较复杂的絮凝剂的提取，则需要用酸、碱、有机溶剂反复溶解，沉淀以得到粗品^[11]。

絮凝剂的纯化：将提取到的絮凝剂粗品溶解于水或缓冲液中，通过离子交换、凝胶色谱^[11,13]纯化，透析去小分子物质，真空干燥得到粗品。也有把粗品溶解、去除不溶物、透析纯化的^[2]。

(四) 微生物絮凝剂的絮凝机理及絮凝条件

对细胞间自我絮凝及微生物絮凝剂引起的絮凝机理方面的研究，提出了许多假说，如Butterfield的粘质假说；Grabtree的利用PHB (poly-β-hydroxybutyric acid) 酯合学说；Friedman的菌体外纤维素纤维学说^[5]等。Grabtree的PHB酯合学说是根据他的生枝动胶菌积累

聚-β-羟基丁酸提出的，适用范围窄，只能解释部分产PHB的菌引起的絮凝。Friedman发现部分引起絮凝的菌体外有纤丝，认为是由于胞外纤丝聚合形成絮凝物，因此提出了菌体外纤维素纤维说，但因不能解释大部分絮凝现象，也不为人们所接受。

目前普遍为人们所接受的学说是离子键、氢键结合学说^[5]。该学说可解释大多数微生物絮凝剂引起的絮凝现象，以及一些因素对絮凝的影响并为一些实验所证实。该学说认为：尽管微生物絮凝剂的性质不同，但对液体中固体悬浮颗粒的絮凝有相似之处，它们通过离子键、氢键的作用与悬浮物结合。由于絮凝剂的分子量较大，一个絮凝剂分子可同时与几个悬浮颗粒结合。在适宜条件下，迅速形成网状结构而沉积，从而表现出絮凝能力。Calleja发现温度高于50℃，3mol/L盐酸胍或5mol/L尿素的存在可以使絮凝的酵母解絮凝，认为氢键参与了细胞间的结合。对于*Pseudomonas C-120*产生的絮凝剂引起的絮凝，2mol/L可以解絮，而絮凝团对5mol/L尿素则不敏感，证明离子键参与了絮凝过程^[9,10]。Kakii等人的工作也证明了氢键及离子键对絮凝的参与^[18]。

表2 *Asp. sojae* AJ7002产生的絮凝剂对微生物细胞的絮凝作用
(絮凝剂浓度30ppm, 微生物细胞浓度2mg/ml)

微生物名称	最适絮凝 pH	絮凝率 (%)
<i>Brevibacterium lactofermentum</i> No. 2256	3.0-7.0	100
<i>Aeromonas salmoniada</i> AJ2926	3.5	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AJ2781	3.5	100
<i>Serratia marcescens</i> AJ2703	3.5-4.5	100
<i>Enterbacter cloacae</i> AJ2662	3.0	100
<i>Citrobacter freundii</i> AJ2619	3.5-4.0	84
<i>Alcaligenes faeacilis</i> AJ2556	5.0	100
<i>Erwinia herbicola</i> AJ2134	3.0	84
<i>Micrococcus luteus</i> AJ1003	4.7-8.0	67
<i>Staphylococcus aureus</i> AJ1056	4.5	100
<i>Bacillus subtilis</i> AJ1235	4.7-8.0	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ4005	3.0-5.0	100
<i>Endomycopsis capsularis</i> AJ4271	3.0-5.0	87
<i>Lipomyces starkeyi</i> AJ4279	3.0-5.0	100
<i>Phodotorula ghctinis</i> AJ4386	3.0-5.0	78

氢键、离子键是分子间的作用力。因此外界的环境因素如 pH、温度、离子种类、离子强度等对微生物絮凝剂活性的表现均有影响。一些絮凝剂在不同 pH 下对同种被絮凝物所表现出的絮凝活性不同。这是由于 pH 影响微生物絮凝剂及悬浮颗粒表面电荷的性质、数量, 因而影响絮凝剂活性的表达^[3]。不同絮凝剂对 pH 的变化敏感程度不同。同一种絮凝剂对不同的被絮凝物有不同的最适 pH (表 2)^[4]。Nakamura 用 7 种微生物产生的絮凝剂进行的实验表明: 在中性偏酸范围内, 这些絮凝剂对微生物细胞絮凝效果较好; 而在碱性范围内对高岭土絮凝效果好。这些结果也证实了作为聚电解质性质的絮凝剂是通过形成化学键而使微生物细胞或高岭土成为网状絮凝物的。外界环境因素: 温度对部分絮凝剂活性的表达也有影响。高温可使生物高分子变性, 空间结构改变, 某些活性基团不再能与悬浮颗粒结合, 因而表现出絮凝活性的下降。*R. erythropolis* S-1 产生的絮凝剂是蛋白质, 高温下可变性, 在一个开放系统中 100℃ 处理 15' 可使其活性下降 50%。也有的絮凝剂对温度不敏感。如 *Paecilomyces* sp. 1-1 产生的絮凝剂活性不随温度改变而变化。这是由于该絮凝剂由三部分组成, 高温下变性的蛋白质部分的作用是加大絮凝剂的分子量。高温处理蛋白质变性但分子量不变。而其表现絮凝活性的主要部分聚己糖胺高温处理后结构不改变, 仍能以化学键的方式与被絮凝物结合, 因此它的活性不随温度变化而变化。

离子种类、离子强度对微生物絮凝剂活性影响很大。一定浓度的二价阳离子可在絮凝剂分子与悬浮颗粒间以离子键结合而促进絮凝发生。不同二价离子促进絮凝的效果有差异, 并多以 Ca^{2+} 的促进效果为佳^[2,3,7,13,17-19]。一价阳离子如 Na^+ , K^+ 等不能同时与悬浮颗粒及絮凝剂键合, 只能与其中之一结合而不利于絮凝作用的发生^[17]。高离子强度下, 大量离子占据了絮凝剂分子的活性位点, 并把絮凝剂分子与固

体悬浮颗粒隔开而抑制絮凝。

(五) 絮凝剂产生菌的基因控制

有关絮凝剂产生菌产絮凝剂的基因控制, 絮凝剂在菌体内形成方式、分泌途径等尚不是很清楚。目前人们只对某些细菌、酵母菌中与絮凝有关的基因及其产物、絮凝微生物细胞壁的成分、结构进行了研究, 以期揭开微生物产生絮凝剂的机制。就目前的研究情况来看与絮凝有关的基因在酵母菌中是在染色体上, 也就是说酵母染色体参与酵母絮凝的基因控制。据报道: FL01^[17,23]、FL05^[20]、FL08^[21,26]、tup1^[22,30] 都是定位于染色体上与絮凝有关的基因。

Miki 等的工作证明: FL01 位于 *Saccharomyces cerevisiae* 第一条染色体上距离 *ade138* 厘米处^[17,23], FL01 基因可被位于其它染色体上的一些基因抑制而失去表达能力。SFL1 是已知的 FL01 的一个抑制基因, 它编码一个含 767 个氨基酸的蛋白质。但 SFL1 到底如何抑制 FL01 的表达还不清楚^[17,23]。Fujita 等人找到了另一个絮凝抑制基因 SFL2^[24,25], 已证实 SFL2 编码一个含 669 个氨基酸的蛋白质, 他们还 SFL2 进行了物理图谱及互补分析, 所有这些工作对揭示微生物产絮凝剂的基因控制有一定的贡献。

Yamashita 等人以 *Saccharomyces distaticus* 为研究对象, 对 FL08 进行了定位, 他们的工作显示, FL08 位于该菌第八条染色体上的 Arg4 旁。FL08/fo 的表达受 MAT_a/MAT_α 的抑制^[26]。

Saito 的研究工作显示: 絮凝微生物与絮凝剂产生菌之间有一定关系^[27]。他们用蛋白酶 K 处理絮凝微生物的细胞壁, 从细胞壁上切下一个 3.7 万道尔顿的蛋白质, 该蛋白是使絮凝微生物细胞对悬浮细胞絮凝的主要因素之一。该蛋白如何在菌体内形成, 怎样在细胞壁上定位以及它与菌分泌出胞外的絮凝剂分子在形成机制上有何相似之处有待进一步研究。

Kakka 发现絮凝能力是微生物非必需的, 从絮凝菌中得到的非絮凝突变子在生长程度、形态、生理上与絮凝亲本均无不同^[28]。Henry

报道了一株由质粒控制絮凝性状的细菌，质粒消除后絮凝能力丧失，菌生长良好^[29]。

有关絮凝剂产生菌的基因控制方面的研究工作还不深入，要揭示微生物产絮凝剂性状的遗传控制，还需深入研究。

(六) 微生物絮凝剂的应用

微生物产生的絮凝剂具有絮凝范围广、絮凝活性高、安全无害，不污染环境等特点，对悬浊液有较强的絮凝作用；通过絮凝可使被处理液澄清。如 *R. erythropolis* 产生的絮凝物质可以使悬浮在液体中的微生物细胞 (*E. coli*, 酒精酵母)，活性污泥、高岭土、泥水浆、河底沉积物、粉煤灰、木炭等很好的絮凝^[2]。*Pacilomyces* sp. 1-1 产生的絮凝剂几乎可以凝集水溶液中所有固悬物，而且作用条件粗放，不受离子强度、pH 及温度的影响，因此可以广泛使用^[3]。微生物絮凝剂的高效性从图 1 中 *Asp. sojae* AJ7002 产生的絮凝剂与无机絮凝剂。合成高分子絮凝剂及自然界絮凝物质对活性污泥沉积速度的比较上显示出来^[4]。同等用量下，与现用各类絮凝剂相比，*Asp. sojae* AJ7002 产生的絮凝剂对活性污泥的絮凝速度最快，而且絮凝沉淀比较容易用滤布过滤。用聚丙烯酰胺、藻蛋白酸钠，400ppm 以上的量就会使絮凝沉淀粘稠而不易过滤。*Pacilomyces* sp. 1-1 产生的絮凝剂絮凝活性也很高，发酵液稀释 α^9 后仍可对 *E. coli* 细胞表现出絮凝活性。微生物絮凝剂的高效、低用量、絮凝范围广、絮凝物易过滤等特点使之具有很大的应用潜力，可替代现用低絮凝活性的自然界絮凝物质，如脱乙酰壳多糖、瓜尔豆胶、精氨酸钠、明胶等。

微生物絮凝剂对含高浓度有机物、有色的液体也有很好的絮凝作用。通过絮凝可降低被处理液的 COD 及色度。如在畜产废水中最难处理的固液分离后的猪粪尿污水中加入 *R. erythropolis* S-1 产生的絮凝剂 0.5mg，10 分钟后，可使污水总有机碳由 1420ppm 降至 425ppm，总氮由 420mg/l 降至 215mg/l，可使污水脱色脱臭，得到几近无色透明的液体（污

水 OD₆₆₀ 值可由 8.60 降至 0.02 左右)^[2]。

微生物絮凝剂的安全性也可得到保证。给小鼠、豚鼠注射 *R. erythropolis* 的细胞及培养液，均不致病^[2]。安全性方面的实验显示微生物絮凝剂完全可能用于食品、医药等行业的发酵后处理。无机絮凝剂如明矾、聚合氯化铝、氯化铁、活性硅氧等，在实际应用中会给被处理液带入大量无机离子，需增加脱盐、去离子工序，过量的无机离子不仅影响产品的风味、口感，也不利于人体健康；合成高分子絮凝剂如聚丙烯酰胺衍生物、聚乙烯啶、聚乙烯亚胺等，不易被降解，易造成二次污染而且其单体有致突变性。用高效、安全、不污染环境的微生物絮凝剂替代它们，可以改进生产工艺，而且也有利于人类身体健康和环境保护。

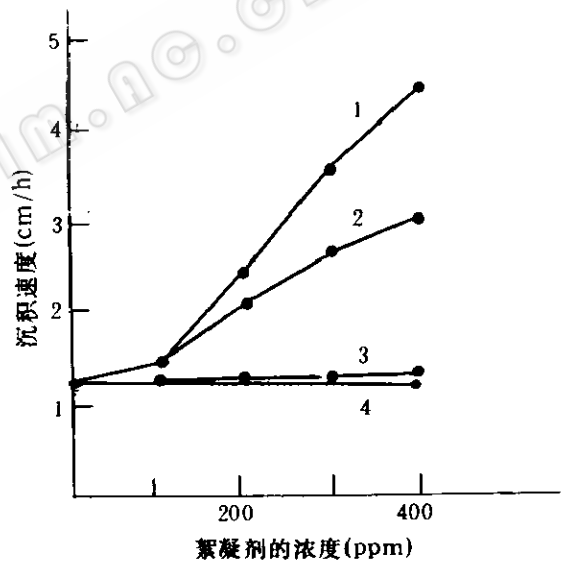


图 1 *Asp. sojae* AJ7002 产生的絮凝剂与现用絮凝剂对活性污泥的沉积速度比较^[4]

- 1. *Asp. sojae* AJ7002 产生的絮凝剂
- 2. FeCl₃ 3. 聚丙烯酰胺 4. 藻蛋白酸钠

另外，许多絮凝剂产生菌可降解自然界中或人工合成的高分子物质。如 *Nocardia erythropolis* 可降解塑料生产中的酞酸酯，在降解人工合成的高聚物同时，产生絮凝剂^[30]。*Corynebacterium hydrocarboclastus* 可以利用煤油生长并产生絮凝剂，使膨胀污泥活性得到恢

复^[31]。针对不同污水采用特定的絮凝剂产生菌,用于污水生化处理系统,可在降解有机物降低BOD的同时使固悬物凝聚沉淀,这是其它类型絮凝剂无法比拟的。最近多聚电解质性质的微生物絮凝剂在从发酵液中回收微生物细胞,工业上的固悬物与液体的分离、污水处理等方面投入使用,效果很好,完全可以逐步推广并代替现用的各类絮凝剂。

微生物絮凝剂高效、安全、不污染环境,在医药、食品加工、发酵后处理、污水处理等众多领域有很大的应用潜力。鉴于目前的研究状况,今后的研究工作可把筛选高效絮凝剂产生菌、寻找产絮凝剂的控制基因,利用现代分子生物学技术把获得的高效絮凝基因转化到一些有一定可应用酶活或能降解污染物的微生物中,组建工程菌,找出现有微生物絮凝剂的最佳应用场所等作为研究方向。通过对絮凝剂的产生、絮凝特点、絮凝机理等方面的研究使微生物絮凝剂更好,更广泛地应用于生产实践。

参 考 文 献

- Butterfield C T et al. : *U. S. Public Health, Rep.* , 50: 671, 1935.
- Kurane R et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 50 (9): 2301-2307, 1986.
- Takagi H et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 49 (11): 3151-3157, 1985.
- Nakamura J et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 40 (2): 377-383, 1976.
- (日)有马启等:生物净化环境技术,第19-37页,化学工业出版社,北京,1980年。
- Tago Y et al. : *Appl. Env. Microbiol.* , 34: 308, 1978.
- Endo T et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 40 (11): 2289-2295, 1976.
- Napoli C et al. : *Appl. Microbiol.* , 30 (1): 123-131, 1975.
- Sakka K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 45 (12): 2869-2876, 1981.
- Sakka K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 46 (7): 1775-1781, 1982.
- Nakamura J et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 40 (3): 619-624, 1976.
- Kurane R et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 50 (9): 2309-2313, 1986.
- Takagi H et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 49 (11): 3159-3164, 1985.
- Sakka K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 45 (2): 497-504, 1981.
- Nakamura J et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 40 (7): 1341-1347, 1976.
- Masy C L et al. : *Can. J. Microbiol.* , 37 (4): 295-303, 1991.
- Miki B A et al. : *J. Bacteriol.* , 150 (2): 878-889, 1982.
- Kakii K et al. : *J. Ferment Technol.* , 63 (3): 263-270, 1985.
- Kakii K et al. : *J. Ferment. Bioeng.* , 69 (4): 224-227, 1990.
- Russell I et al. : *J. Inst. Brew.* 85: 95-98, 1979.
- Yamashita I et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 48 (1): 131-135, 1984.
- Liphe P N et al. : *J. Bacteriol.* , 159: 797-799, 1984.
- Miki B A et al. : *J. Bacteriol.* , 150 (2): 890-899, 1982.
- Fujita A et al. : *Gene* , 85 (2): 321-328, 1989.
- Fujita A et al. : *Gene (AMST)* , 89 (1): 93-100, 1990.
- Yamashita I et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 47 (12): 2889-2896, 1983.
- Saito K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 54 (6): 1425-1432, 1990.
- Kakka K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 48 (2): 377-382, 1984.
- Herry K K et al. : *Biotechnol. Prog.* , 6 (1): 7-12, 1990.
- Kurane R et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 43 (3): 421-427, 1979.
- Zajic J E and E Knetting: *Developments in Industrial Microbiology*, American Institute of Biological Science, Washington D. C. , p. 87-98, 1971.
- Kurane R et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 55 (4): 1127-1129, 1991.
- Toeda K et al. : *Agric. Biol. Chem.* , 55 (11): 2793-2799, 1991.

(1992-10-09 收稿)