

doi: 10.11918/j.issn.0367-6234.2015.06.009

# 同步代谢戊糖、己糖产絮菌的选育

王 丽<sup>1,2</sup>, 苏欣颖<sup>3</sup>, 刘丽红<sup>1</sup>, 马 放<sup>1</sup>, 王爱杰<sup>1</sup>, 李笃中<sup>1</sup>, 任南琪<sup>1</sup>

(1.哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨; 2.哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 150025 哈尔滨;  
3.哈尔滨商业大学 食品学院, 150028 哈尔滨)

**摘要:** 以玉米秸秆为廉价基质,可以有效降低生物絮凝剂合成成本.用 1.7%的稀硫酸水解玉米秸秆,获得含有戊糖木糖、己糖葡萄糖的水解液,戊糖很难被微生物代谢.获得能同步代谢戊糖、己糖的产絮菌,是玉米秸秆高效转化为生物絮凝剂的关键.本研究以玉米秸秆水解液为基质选育出产絮菌 W4,探讨该菌株同步代谢戊糖、己糖的能力.结果显示,菌株 W4 经 16S rDNA 鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*,其代谢葡萄糖速率 ( $0.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 大于代谢木糖速率 ( $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),表明菌株 W4 能够同步代谢木糖、葡萄糖.菌株 W4 在木糖和葡萄糖培养基中合成生物絮凝剂的絮凝率分别为 96%和 97%.经红外光谱分析 W4 生物絮凝剂的主要成分为多糖和蛋白.

**关键词:** 生物絮凝剂; 枯草芽孢杆菌; 同步代谢; 戊糖; 己糖

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2015)06-0050-04

## Screen of bioflocculant-product strains on synchronous metabolism pentose and hexose

WANG Li<sup>1,2</sup>, SU Xinying<sup>3</sup>, LIU Lihong<sup>1</sup>, MA Fang<sup>1</sup>, WANG Aijie<sup>1</sup>, LEE Dujong<sup>1</sup>, REN Nanqi<sup>1</sup>

(1.School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;  
2.College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, 150025 Harbin, China;3. School of Food,  
Harbin University of Commerce, 150028 Harbin, China)

**Abstract:** Cornstalks, as a kind of cheap substrates, can effectively reduce the cost of bioflocculant's synthesis. With 1.7% of dilute sulphuric acid hydrolyzing cornstalks, the hydrolysate containing pentose-xylose and hexose-glucose can be produced. Pentose is difficult to be metabolized by microorganism; obtaining strains which metabolize pentose and hexose synchronously from cornstalks are the key to converse of bioflocculant. This study, based on cornstalks hydrolysate as substrate in screening flocculation Strain W4, explored its ability of synchronous metabolism pentose and hexose. The results revealed that Strain W4 was identified as *Bacillus subtilis* via 16S rDNA. The metabolic rate of glucose ( $0.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) by *Bacillus subtilis* exceeded the rate of metabolism of xylose ( $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), indicating Strain W4 can produce synchronous metabolism of xylose and glucose. The flocculation rate in synthesizing bioflocculant of Strain W4 from xylose and glucose mediums were 96% and 97% respectively. The main components of bioflocculant W4 were polysaccharide and protein through the analysis of FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy).

**Keywords:** bioflocculant; *Bacillus subtilis*; synchronous metabolism; pentose; hexose

收稿日期: 2014-04-15.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)重点项目(SQ2009AA06XK1482412).

作者简介: 王 丽(1977—),女,博士,讲师;  
马 放(1963—),男,教授,博士生导师;  
王爱杰(1972—),女,教授,博士生导师;  
李笃中(1962—),男,教授,博士生导师;  
任南琪(1959—),男,博士生导师,中国工程院院士.

通信作者: 王爱杰, waj0578@hit.edu.cn;  
李笃中, djlee@ntu.edu.tw.

生物絮凝剂是无毒、无二次污染、环境友好型的净水剂,具有潜在的应用价值<sup>[1]</sup>,限制其工业应用的主要因素是制备成本高.为降低成本,一方面要选育高效的产絮菌株,另一方面要开发廉价的产絮基质.秸秆作为主要的农业废弃物,除少部分用于牲畜饲料、造纸、纺织外,大部分被原位焚

烧,既浪费资源,又污染环境.因此,将秸秆类农业废弃物作为产絮基质既解决了秸秆资源化问题又降低了生物絮凝剂的成本<sup>[2]</sup>.但是秸秆类木质纤维素需经预处理才能被微生物利用.本研究利用稀酸将玉米秸秆水解为戊糖和己糖<sup>[3]</sup>.己糖葡萄糖很容易被微生物利用,而戊糖木糖很难被微生物利用.因此,选育同步代谢戊糖、己糖的产絮菌,是解决以玉米秸秆水解液为基质合成生物絮凝剂的关键.本研究以玉米秸秆水解液为基质选育高效产絮菌,研究菌株同步代谢戊糖、己糖合成生物絮凝剂的效能,并进行生物絮凝剂的成分分析.

## 1 实验

### 1.1 玉米秸秆的预处理

玉米秸秆取自黑龙江郊区,自然风干,用粉碎机将玉米秸秆粉碎,过40目筛.称取玉米秸秆粉末100 g放入烧杯中,加入1.7%(体积分数)的稀 $H_2SO_4$ ,搅拌混合均匀.在大烧杯上覆盖PVC塑料薄膜,留一定缝隙,放入高压灭菌锅中汽爆2 h.然后将汽爆后的悬浊液离心,上清液中加入 $Ca(OH)_2$ 调节pH至7.0,去除水解液中过量的 $H_2SO_4$ .

### 1.2 产絮菌的选育

从水厂污泥中用倍比稀释法选育菌株,培养基成分:玉米秸秆水解液含还原糖7.072 g,5 g  $K_2HPO_4$ ,2 g  $KH_2PO_4$ ,0.2 g  $MgSO_4$ ,0.1 g NaCl,0.5 g 酵母膏,0.5 尿素,蒸馏水1 000 mL.

### 1.3 菌体干质量

发酵液离心,弃上清,菌体用蒸馏水清洗,离心,重复3次,105℃烘干至恒质量.

### 1.4 絮凝率的计算

于六联搅拌仪的1 000 mL搅拌杯中加入5 g高岭土、自来水1 000 mL、W4发酵液10 mL和10%的 $CaCl_2$ 溶液1.6 mL,用NaOH将溶液pH调至7.5,快搅160 r/min、慢搅40 r/min使之充分混合,静置20 min后,取液面下10 cm处上清液,用721分光光度计于波长550 nm处测定吸光度(B).以蒸馏水代替发酵液液作空白对照,于波长550 nm处测定吸光度(A).通过絮凝率 $F$ 来表示絮凝活性,即<sup>[4]</sup>

$$F = (B - A) / B \times 100\%. \quad (1)$$

### 1.5 絮凝剂的提取

1) 离心.将用秸秆水解液培养的W4发酵液置于4℃超速大容量离心机离心,转速5 000 r/min、时间10 min,并收集上清液备用.

2) 醇提.将1)中上清液加入3倍体积4℃预

冷的无水乙醇,静止24 h,弃上清,并于5 000 r/min离心15 min收集沉淀备用;将该沉淀溶于去离子水中,重复该步骤2次.

3) 纯化.将絮凝剂溶液分装到透析袋中并置于盛有去离子水的大烧杯中,于4℃恒温放置48 h(每隔4 h换一次去离子水).

4) 重复步骤2).

5) 冻干.将步骤4)收集的沉淀-70℃冷冻后放入冻干机,冻干36 h制备成冻干粉<sup>[5]</sup>.

## 1.6 红外光谱分析

将冻干粉与KBr以一定比例于研钵中混合均匀、压片,于FT-IR红外分光光度仪(Avatar 360型,美国Nicolet公司出品)25℃下扫描4 000~400  $cm^{-1}$ 内的吸收峰.根据结果分析W4生物絮凝剂的官能团结构.

## 1.7 木糖、葡萄糖的测定

样品液中木糖、葡萄糖的测定采用高效液相色谱法(HPLC).样品液于10 000 r/min离心10 min,上清液经0.22  $\mu m$ 微孔滤膜过滤后转入色谱瓶中,以5 mmol/L的硫酸为流动相,流速为0.6 mL/min,用伯乐糖柱外标法定量<sup>[6]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 选育菌株

以玉米秸秆水解液为基质,选育出7株絮凝菌,分别命名为W1、W2、W4、W5、W6、W7、W11,其絮凝率均在78%以上<sup>[7]</sup>.其中絮凝菌W4的菌落大、湿润光滑,絮凝率达 $(94 \pm 2.2)\%$ ,因此,以絮凝菌W4作为研究对象.分子生物学测序结果用BLAST软件与GenBank中的16S rDNA序列进行同源性比对(见表1),W4与枯草芽孢杆菌同源性为100%,因此,将W4鉴定为枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*.为了降低生物絮凝剂的成本,玉米秸秆在预处理过程中省去了传统的清洗过程,水解液中可能会残留农药成分,所筛选的产絮菌W4既能利用玉米秸秆水解液合成生物絮凝剂,又耐受水解液中的抑制物(糠醛、香兰素、农药),减少了菌株耐受抑制物的驯化过程.

### 2.2 菌株W4生长特性

将菌株W4分别接种于木糖、葡萄糖培养基中,考察其代谢木糖、葡萄糖合成自身营养物质、供菌体生长的能力.如图1所示,菌株W4在葡萄糖培养基中24 h能完成对数生长,在木糖培养基中35 h完成对数生长,W4代谢葡萄糖的能力大于代谢木糖的能力.推测是因为菌体代谢木糖和葡萄糖均需要葡萄糖转移酶的参与,将木糖或葡

萄糖从菌体细胞外转移到菌体细胞内,而葡萄糖转移酶与葡萄糖的结合能力大于与木糖的结合能力,因此,葡萄糖更容易被转移到菌体细胞内,被菌体利用<sup>[8]</sup>.菌株 W4 在葡萄糖培养基和木糖培

养基中均发生二次生长的现象,推测是细胞到达衰亡期后,释放出大量无机盐等营养物质,这些物质被细胞再次利用,出现二次生长现象.

表 1 菌株 W4 16S rDNA 基因序列比对结果

菌株	基因登录号	相似度/%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquesorum</i> KCTC 13429 <sup>(T)</sup>	AMXN01000021	100
<i>Bacillus tequilensis</i> 10b <sup>(T)</sup>	HQ223107	99.92
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i> NRRL B-23049 <sup>(T)</sup>	CP002905	99.84
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> NCIB 3610 <sup>(T)</sup>	ABQL01000001	99.84
<i>Brevibacterium halotolerans</i> DSM 8802 <sup>(T)</sup>	AM747812	99.68
<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1 <sup>(T)</sup>	JH600280	99.60
<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3 <sup>(T)</sup>	JH600273	99.60
<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 <sup>(T)</sup>	EU194897	99.51
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	AJVF01000043	99.44
<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070(T)	AB021181	99.20
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	AE017333	98.88

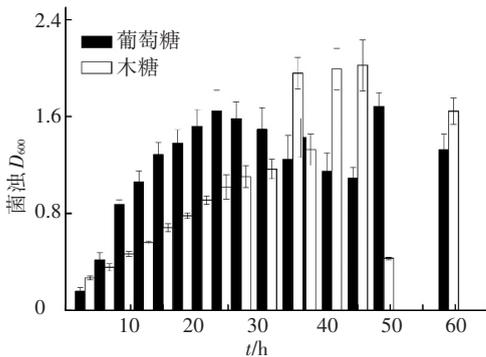


图 1 菌株 W4 生长特性

### 2.3 W4 代谢木糖、葡萄糖特性

木糖和葡萄糖能够为 W4 菌体生长、代谢、合成生物絮凝剂提供必要的营养物质.图 2 为 W4 消耗木糖、葡萄糖的规律.可以看出,W4 消耗葡萄糖的速率( $0.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )大于消耗木糖的速率( $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).菌株 W4 在 24 h 消耗葡萄糖 90%,60 h 消耗木糖 87%.菌株 W4 消耗葡萄糖的速率大于消耗木糖的速率,解释了菌株 W4 在葡萄糖培养基中的生长速度快于在木糖培养基中的生长速度的原因.

W4 对木糖、葡萄糖的消耗符合二阶动力学方程,即  $ds/dt = -ks^2 + bs + c$ ,利用实验数据进行拟合,W4 代谢葡萄糖的模型为

$$y = 0.054 1x^2 - 4.994 8x + 111.76. \quad (2)$$

W4 代谢木糖的模型为

$$y = -0.029x^2 + 0.267x + 91.546. \quad (3)$$

该组消耗动力学模型能很好地拟合实验数据,模拟计算值和实际值之间的拟合度.葡萄糖拟合度  $R^2 = 0.956 6$ ;木糖拟合度  $R^2 = 0.980 5$ ,说明拟合度很好,能够用该组模型预测菌株 W4 对葡萄糖和木糖的消耗.

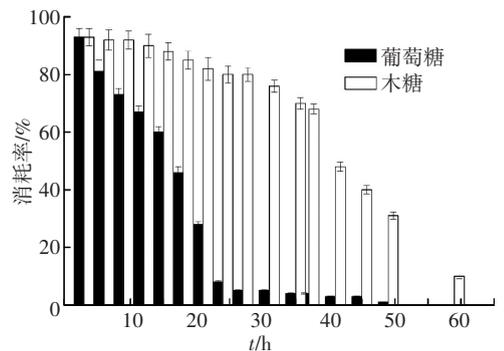


图 2 菌株 W4 消耗木糖、葡萄糖特性

### 2.4 菌株 W4 絮凝特性

由图 3 可知,W4 在木糖和葡萄糖中絮凝率分别为 97%和 96%,W4 代谢木糖的能力低于代谢葡萄糖的能力,但是在木糖培养基中的絮凝效能却高达 97%.W4 在木糖培养基中的这种低消耗高絮凝的特性,使菌株 W4 具有利用木质纤维素类廉价基质合成生物絮凝剂的应用潜力.同时表明 W4 在木糖培养基中,吸收的营养物质主要用于生物絮凝剂的合成,不是为菌体生长提供能量.W4 在葡萄糖培养基中合成的生物絮凝剂的絮凝效率略低于在木糖培养基中的絮凝率,主要是因为营养物质的流向不同,葡萄糖主要流向 W4 细胞生长,木糖主要流向生物絮凝剂的合成.在葡萄糖培养基中,当菌株 W4 培养时间达 60 h,絮凝效率明显提高,表明此时吸收的营养物质主要用于合成生物絮凝剂.

### 2.5 W4 合成生物絮凝剂的主要成分

W4 生物絮凝剂经提纯、冻干、制备成干粉,红外光谱(FIRT)分析结果如图 4 所示.W4 合成的生物絮凝剂的红外光谱谱图在  $3300 \text{ cm}^{-1}$  处显示出较宽的频带<sup>[9]</sup>,主要是由 H—O 羟基振动引

起的,在  $2900\text{ cm}^{-1}$  处的小振动峰主要是 C—H 收缩振动引起的,是糖类的特征峰。在  $1700\text{ cm}^{-1}$  附近明显的特征峰是由仲酰胺基 (—NHC=O—) 中的 C=O 键振动引起的,是蛋白质的特征峰<sup>[10]</sup>。说明 W4 生物絮凝剂的主要成分是蛋白质和多糖。在絮凝过程中, W4 生物絮凝剂成分中的蛋白质起到主要的絮凝作用,蛋白质的负电基团—COO<sup>-</sup> 吸附水中带正电的颗粒,通过电荷中和作用形成较大的絮体,絮体在重力的作用下形成沉淀,进而完成水体的净化。

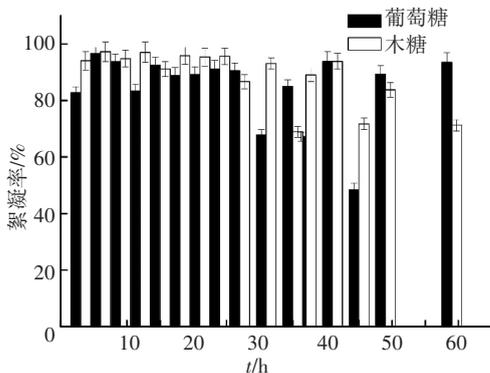


图3 菌株 W4 絮凝特性

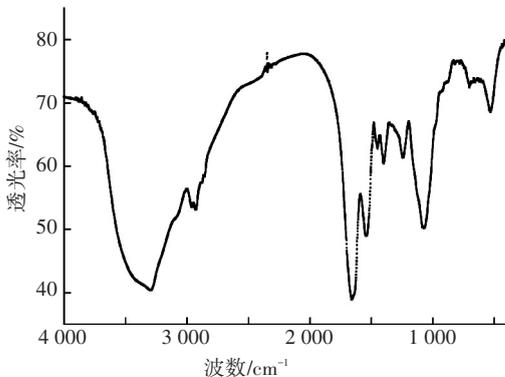


图4 红外光谱谱图

### 3 结 论

1) 以玉米秸秆酸水解液 (木糖、葡萄糖) 为底物,选育出高效絮凝剂产生菌 W4,经分子生物学 16S rDNA 鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),絮凝高岭土的能力达 94%。

2) 菌株 W4 能同步代谢戊糖木糖、己糖葡萄糖。菌株 W4 在葡萄糖培养基中的生长速度大于在木糖培养基中的生长速度,代谢葡萄糖的速率 ( $0.27\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 大于代谢木糖的速率 ( $0.14\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),但菌株 W4 在两者中合成生物絮凝剂的絮凝效能相当。菌株 W4 能利用少量的木糖达到较高的絮凝效果,成为开发木质纤维素类廉价基质合成生物絮凝剂优质菌种。

3) 菌株 W4 *Bacillus subtilis* 合成的生物絮凝剂的主要成分是蛋白质和多糖。

4) 枯草芽孢杆菌是有益菌,其胞外聚合物是很好的生物药品,在食品领域也有应用,本研究再次拓宽了枯草芽孢杆菌的应用范围。将来的研究工作将致力于 W4 利用秸秆进行续批式发酵及连续发酵。

### 参考文献

- [1] XING Jie, YANG Jixian, MA Fang, et al. Study on the optimal fermentation time and kinetics of biofloculant produced by bacterium F2 [J]. *Advanced Materials Research*, 2010, 114:2379–2384.
- [2] ZHAO Guang, MA Fang, WEI Li, et al. Using rice straw fermentation liquor to produce biofloculants during an anaerobic dry fermentation process [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 113:83–88.
- [3] 曹广丽. 高效利用玉米秸秆的产氢菌种及产氢性能研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2010.
- [4] WANG Lili, MA Fang, QU Yuanyuan, et al. Characterization of a compound biofloculant produced by mixed culture of *Rhizobium radiobacter* F2 and *Bacillus sphaericus* F6 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27:2559–2565.
- [5] 王薇. 产絮菌合成生物絮凝剂特性及絮凝成分解析 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2009.
- [6] REN Nanqi, CAO Guangli, WANG Aijie, et al. Dark fermentation of Xylose and Glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33: 6124–6132.
- [7] WANG Li, MA Fang, LEE D J, et al. Biofloculants from hydrolysates of corn stover using isolated strain *Ochrobactium ciceri* W2 [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 145:259–263.
- [8] LÍVIAN R V, MAGALI C C, TATIANE C O, et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38:2986–2997.
- [9] 苏新颖. MBR 膜污染解析及 MFC-MBR 耦合系统膜污染控制研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2013.
- [10] YUAN Shijie, SUN Ming, SHENG Guoping, et al. Identification of key constituents and structure of the extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45:1152–1157.

(编辑 刘 彤)