微生物絮凝剂 MBFTRJ21 的絮凝机理

秦培勇[1] ,张通[2] ,陈翠仙[1]

(1. 清华大学化工系 ,北京 100084 ;2. 内蒙古工业大学化工学院 ,呼和浩特 010062)

摘要 :筛选得到的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*) 具有用量少絮凝效果好等优点 .蒽酮反应 、考玛斯亮蓝 、Elson- Morgan 反应表明 ,絮凝剂 MBFTRJ21 为粘多糖类高分子絮凝剂 ; ξ 电位测定及氢键和离子键检验结果表明 ,絮凝剂和碱泥之间的作用力为氢键 ;絮凝剂的热处理和 KIO_4 处理表明 ,其活性成分为蛋白质和糖胺 ;絮凝过程中粒度分析表明 ,絮凝过程存在架桥作用 .其絮凝机理为 :絮凝剂和碱泥在絮凝剂的活性部位 ——糖胺中的氨基以氢键的形式结合 ,然后再经过架桥作用絮凝沉淀 .

关键词 :天然碱碱泥 ; 絮凝机理 ; 微生物絮凝剂 ; 架桥作用 ; 粘多糖

中图分类号 :X703. 3 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3301(2004) 03-0069-04

Flocculating Mechanism of Microbial Flocculant MBFTRJ21

QIN Pei-yong[1] ,ZHANG Tong[2] ,CHEN Cui-xian[1]

(1. Department of Chemical Engineering , Tsinghua University , Beijing 100084 ; 2. Institute of Chemical Engineering ,Inner Mongolia Polytechnic University , Hohhot 010062)

Abstract : The bioflocculant MBFTRJ21 for nature soda was exploited in our lab ,and its flocculating mechanism was studied. The bioflocculant produced by *Lactobacillus* , has some advantages , such as less dosage , better flocculating effects , and etc. MBFTRJ21 is mainly composed of polysaccharide , which is determined by Anthrone reaction , Coomassie blue reaction and Elson- Morgan method. The acting force between bioflocculant and nature soda is hydrogen bond , which is determined by ξ electric potential , hydrogen bond and electrovalent bond determination. The bioflocculant is treated by heat and KIO4 , which indicate the active ingredient of bioflocculant is protein and osamine. Bridge occur during flocculation process , which is determined by particle size distribution. The results showed that the flocculating mechanism of MBFTRJ21 resulted from the combination of nature soda with MBFTRJ21 by hydrogen bond at the active position of glycosaminoglycan.

Key words : nature soda ; flocculating mechanism ; microbial flocculant ; bridge ; polysaccharide

微生物絮凝剂(microbial flocculant , MBF) 是由微生物产生的一类具有一定絮凝活性的生物大分子物质 .目前微生物絮凝剂已应用于多种体系[1~9] ,而应用于强碱性体系 ——天然碱碱泥絮凝的微生物絮凝剂尚未见文献报道 .

本文筛选得到的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*) 产生的絮凝剂 MBFTRJ21 具有用量少 、絮凝效果好等特点 ,尤其对天然碱碱泥 、废水 、河水和高岭土等有良好的絮凝效果 ,具有很好地开发前景 .目前 ,国内外在微生物絮凝剂絮凝机理方面 ,只是提出了一些假说 ,电中和作用 、架桥学说[10] 、Butterfield 粘质假说 、Friedman 菌体外纤维素行为学说 、离散细胞和伸展桥键之间的三维基质模型假说[11] 、病毒假说等[12] .而机理的研究对微生物絮凝剂的开发应用有着重要的意义 .因此 ,有必要对微生物絮凝剂絮凝机理进行深入地研究 .

本文对絮凝剂 MBFTRJ21 作用于内蒙古查干诺尔天然碱碱泥的絮凝机理进行了研究 ,提出了絮凝机理 ,对高效微生物絮凝剂的研究具有指导意义 .

1 实验材料与方法

1.1 絮凝剂的提取及性质的测定

用接种环接种一环本实验室筛选的菌种 TRJ21 到灭菌的培养基 G(葡萄糖 20g ,蛋白胨 0.5g ,酵母膏 0.5g ,脲 0.5g ,$(NH_4)_2SO_4$ 0.5g , KH_2PO_4 5.0g , $MgSO_4$ 0.2g , NaCl 0.1g , H_2O 1.0L , pH8.0) 中 ,在 30 ℃ 、150r/ min 条件下摇床培养 72h .再向发酵液中加入 2 ~ 3 倍的蒸馏水稀释 ,用转速约为 10 000r/ min 的高速离心机离心约 30 min .除去菌体(沉淀) ,浓缩上清液 .再向浓缩液中加入 2 ~ 3 倍体积的丙酮使絮凝剂沉淀 .将沉淀用乙醚洗涤 2 ~ 3 次 ,然后将其真空干燥 5 ~ 6h ,即得絮凝剂粗品 .将粗品上 Sephadex G-100 柱 ,用 TE 缓冲液作为洗脱液洗脱 ,在 280nm 下检测洗脱液吸光度 ,收集出峰时的洗

收稿日期 :2003-07-07 ;修订日期 :2003-09-01
基金项目 :国家自然科学基金资助项目(29766003)
作者简介 :秦培勇(1976 ~) ,男 ,河南省邓州市人 ,博士生 , Email : qpy01 @mails .tsinghua .edu .cn

脱液[1].

用蒽酮反应[2]测定糖;用考玛斯亮蓝法[3]测定蛋白质;用 6 mol/L HCl[2,4]将纯品水解 12h,Elson-Morgan 法[2]测己糖胺.

1.2 絮凝过程 ξ 电位的测定

称取一定量的碱泥,向其中加入不同量的絮凝剂,摇匀.静止一段时间后,用 DMP-1 型微电泳仪测其 u、I、Λ_0,然后代入下式计算其 ξ 电位:

$$\xi = \frac{cu\Lambda_0 B}{I}$$

式中,c:不同温度下 ξ 电位与淌度的比值[10^{-6} mV/(S·V·cm)];u:电泳速度(μm/s);B:电场校正系数;I:电流(A);Λ_0:电导率($\Omega^{-1}\cdot cm^{-1}$).

1.3 氢键和离子键的检验

分别用 2 mol/L EDTA、3 mol/L HCl 和 5 mol/L 尿素处理絮凝沉淀,轻轻摇匀,静止一段时间后观察现象.

1.4 絮凝剂中活性成分的检测

(1)絮凝剂中蛋白质活性的检验 将絮凝剂配成溶液,在不同温度下加热 30 min,然后做絮凝实验,检测絮凝活性.

(2)絮凝剂中糖胺的活性测定 在 5 ℃条件下,将絮凝剂加入 0.2 mol/L KIO_4 溶液中,测它的絮凝活性随时间的变化.

1.5 絮凝过程中粒度分布随絮凝剂加量的变化

称取定量的碱泥,放入沉降仪中,加入蒸馏水搅匀.根据粒度分布情况在一定时间间隔内,吸取 10 mL 溶液测其浓度.时间 t 可用下式计算:

$$t = \frac{1.8\times10^9\mu}{g(\rho_1-\rho_2)}\times\frac{H}{d^2}$$

式中,t:颗粒直径为 d 时的沉降时间(s);μ:水在试验温度时的粘度(Pa·s);H:沉降高度(cm);ρ_1:碱泥比重(g/cm^3);ρ_2:在试验温度下的水密度(g/cm^3);d:颗粒直径(μm);g:重力加速度($980cm^2/s$);

1.6 絮凝颗粒的电镜分析

将天然碱用煮沸过的 50 ℃蒸馏水溶解,在高速离心机中于 8 000r/min 下分离.吸去上清液,沉淀物反复用 pH=11 的极稀 NaOH 溶液洗涤、离心分离,直到上清液不含氯离子,脱除电解质为止.将沉淀物移出,于 50 ℃红外线下干燥.为了排除沙粒的干扰,用 400 目的筛子除去沙粒.向碱泥中加入蒸馏水,并加入足量的絮凝剂,去上清液,将沉淀用浓度为 20%、30%、50%、70%、90%和无水乙醇进行系列脱水,然后在室温下风干.进行电镜观察.

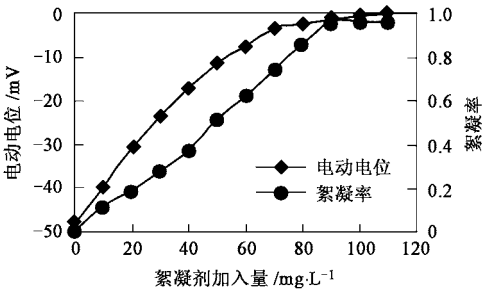
2 结果与讨论

2.1 MBFTRJ21 的结构分析

实验结果表明,蒽酮反应、考玛斯亮蓝、Elson-Morgan 均呈阳性反应,说明絮凝剂是由糖、蛋白质、糖胺复合组成的粘多糖.

2.2 絮凝过程中絮凝剂用量与 ξ 电位的关系

絮凝剂不同的加量下,电动电位的变化结果如图 1 所示.



(测定温度为 20 ℃,c=14.13,B=0.0931)

图 1 电动电位随絮凝剂加入量的变化曲线

Fig.1 Effect of the quantity of MBF on zeta-potential

从图 1 可以看出,天然碱碱泥所带的电荷为负电荷,其 ξ 电位的绝对值随絮凝剂加入量的加大而减小,同时絮凝率提高.在絮凝剂加入量达到 100 $mg\cdot L^{-1}$ 时,ξ 电位已接近 0.在絮凝剂加入量达到 90 $mg\cdot L^{-1}$ 时,絮凝率已基本上达到最高值.这是由于絮凝剂能压缩碱泥胶粒表面双电层,使其 ξ 电位降低,从而使胶粒的斥力势能减小,引力势能逐渐大于斥力势能,造成胶粒的稳定性下降,形成絮块沉降下来.实验表明在絮凝剂加入量达到 90 $mg\cdot L^{-1}$ 时,ξ 电位已达到足够小,使得胶体脱稳,形成沉淀;但当 ξ 电位接近于 0,继续增加絮凝剂浓度,ξ 电位并不改变为正值,这说明除静电排斥外,还有某种特殊的吸附作用.根据 2.1 的测定结果,推测这种特殊的吸附作用可能是絮凝剂和碱泥之间形成了氢键.

2.3 氢键和离子键的检验结果

为了验证特殊吸附作用的存在,进行了化学分析.实验现象如表 1 所示.

表 1 不同化学试剂对絮凝沉淀的处理效果

Table 1 Effect of reagent on flocculation

试剂种类	EDTA	HCl	尿素
现象	无明显的解絮现象	无明显的解絮现象	絮块大量分解

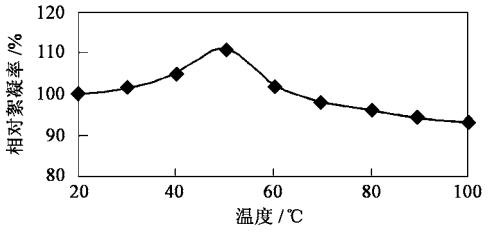
从上面的实验现象可以看出,絮凝沉淀对 EDTA和 HCl 不敏感,而对尿素非常敏感,这说明絮凝剂与碱泥之间的结合可能是靠氢键力结合的.因

为 EDTA 和 HCl 能强烈和碱泥结合而破坏离子键,而尿素可以和碱泥之间形成氢键,从而破坏絮凝剂和碱泥之间的氢键,使沉淀发生解絮现象.

2.4　絮凝剂中活性成分的检测

2.4.1　絮凝剂中蛋白质的活性

热处理后,絮凝率随热处理温度的变化关系如图 2 所示.



(以 20 ℃时的絮凝率为 1)

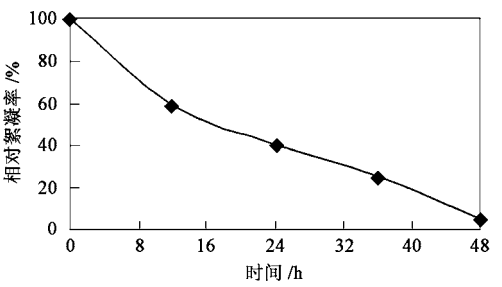
图 2　相对絮凝率随温度的变化曲线

Fig.2　Effect of temperature on flocculating activity

从图 2 可以看出,在温度低于 50 ℃时,其絮凝活性随温度的升高而略有提高.这主要是因为温度升高,粒子热运动加快,粒子间的相互作用增强,使得形成沉淀的速度加快.在温度高于 50 ℃时,其絮凝活性随温度的升高而略有降低,主要是由于蛋白质在絮凝过程中起大分子量的作用,温度升高蛋白质被破坏,而使絮凝活性略有下降.这和文献[4]相符.

2.4.2　絮凝剂中糖胺的活性

KIO_4 溶液处理后,其相对絮凝率随时间的变化如图 3 所示.从图 3 可以看出,其相对絮凝率随 KIO_4 溶液处理时间的增加而迅速降低.在 24h 后,其相对絮凝率只有 40.4 %;在 48h 后,絮凝剂几乎没有絮凝活性.在处理过程中,发现有刺激性气味产生,经 pH 试纸检验为 NH_3,推测絮凝剂中的糖胺被氧化,使絮凝剂中有絮凝活性的氨基部分丧失,从而使絮凝活性大大降低.



(以未经处理的絮凝活性为 1)

图 3　相对絮凝率随处理时间的变化曲线

Fig.3　Inactivity of MBF treated with KIO_4

2.5　絮凝过程中粒度分布随絮凝剂加量的变化关系

在沉降法粒度分析中,于一定条件下测定粒子在水中的沉降速度,再按斯托克斯定律计算出的粒子直径是当量直径,即相当于同样沉降速度的光滑圆球的直径.絮凝剂浓度分别为 0、10 mg·L^{-1}、30 mg·L^{-1}和 50 mg·L^{-1}时碱泥的粒度分布结果如图 4 所示.

从图4可以看出,随着絮凝剂量的增加,小颗粒

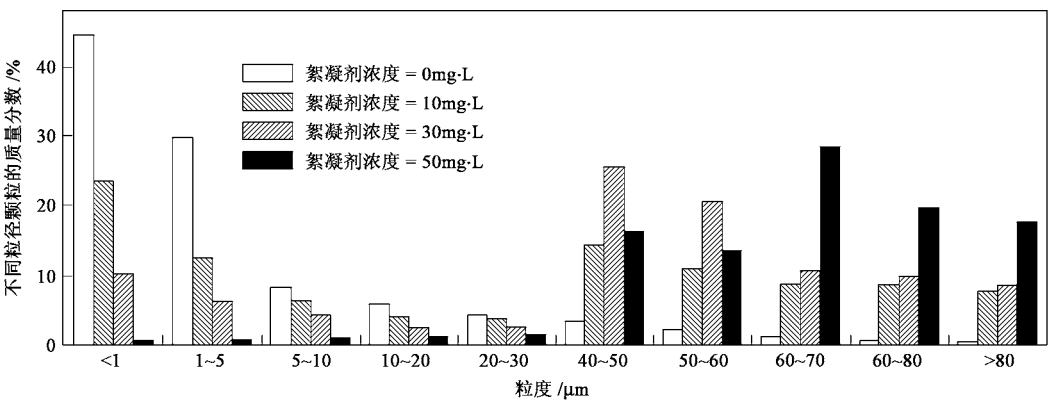


图 4　不同絮凝剂浓度对碱泥粒度分布的影响

Fig.4　Effect of concentration of MBF on the distribution of granularity of nature soda

比例减少,而大颗粒所占的比例增加.在絮凝过程中,一些中等颗粒的微粒在絮凝剂量加大后,其比例也有所减少.这说明小颗粒微粒在加入絮凝剂后,形成颗粒较大的微粒,又通过架桥作用,使颗粒粒径增大,从而迅速沉降下来.因为单个的絮凝剂和碱泥之间的结合,不可能达到如此大的粒度,因此在絮凝过程中,存在着架桥作用.

2.6　絮凝前后碱泥形态结构的变化

碱泥和经絮凝后碱泥的扫描电镜分别如图 5、图 6 所示.从图 6 可以看出,在同样的放大倍率下,絮凝前碱泥以具有棱角的不规则片状物松散地分布;絮凝后,絮凝剂以弧形条状结构与粘土紧紧地包埋在一起.每个絮凝剂分子上结合很多的微粒,而一些微粒又和不同的絮凝剂分子紧紧地交织在一起.

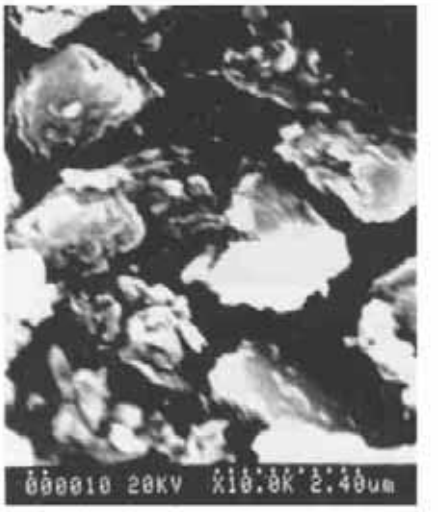


图 5 倍率为 10 000 碱泥的扫描电镜

Fig .5 Scan electron micrograph of trona(× 10 000)

图 6 倍率为 10 000 经絮凝后碱泥的扫描电镜

Fig .6 Scan electron micrograph of flocculation(× 10 000)

3 MBFTRJ21 的絮凝机理

通过上述实验可以导出 MBFTRJ21 的絮凝机理:

絮凝剂中糖胺中的胺基和碱泥之间形成氢键.每个絮凝剂分子可以和多个碱泥颗粒结合,而一些颗粒可以同时和不同的絮凝剂分子结合,这样便形成了架桥作用,从而形成大颗粒迅速沉降下来.蛋白质本身不具有絮凝活性,但其在絮凝过程中起着大分子量的作用,其结构的破坏对絮凝活性影响不大.絮凝机理可用图 7 表示.

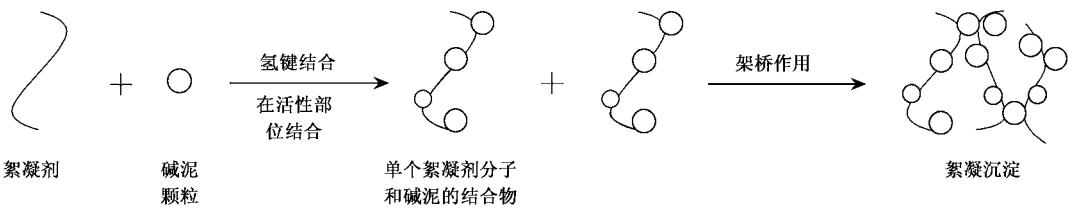


图 7 絮凝机理示意图

Fig .7 Schematic diagram of flocculating mechanism

4 结论

絮凝剂 MBFTRJ21 为粘多糖类高分子絮凝剂;活性成分为蛋白质和糖胺;絮凝剂和碱泥之间的作用力为氢键;絮凝过程存在架桥作用.絮凝机理为:絮凝剂和碱泥在絮凝剂的活性部位——糖胺中的氨基以氢键的形式结合,然后再经过架桥作用絮凝沉淀.

参考文献:

[1] 王镇,王孔星,等.几种微生物絮凝剂的裂解气相色谱分析[J].微生物学通报,1994,**21**(6):343 ~ 347.

[2] Takagi H, Kadowaki K. Purification and Chemical Properties of a Flocculant Produced by Paecilomyces[J]. Agr. Biol. Chem., 1985, **49**(11):3159 ~ 3164.

[3] 陆茂林,施大林,王蕾,等.微生物絮凝剂的制备及絮凝条件的研究[J].食品与发酵工业,1997,**23**(3):26 ~ 28.

[4] Nakamura J, Miyashiro S, Hirosa Y. Purification and Chemical Analysis of Microbial Cell Flocculant Produced by *Aspergillus sojae* AJ7002[J]. Agr. Biol. Chem., 1976, **40**(3):619 ~ 624.

[5] He Ning, Li Yin, Chen Jian, Lun Shiyi. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated Corynebacterium glutamicum [J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, **11**(2 ~ 3):137 ~ 148.

[6] Vijayalakshmi S P, Raichur A M. The utility of *Bacillus subtilis* as a bioflocculant for fine coal[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, **29**(4): 265 ~ 275.

[7] Shih I L, Van Y T, *et al*. Production of a biopolymer flocculant from Bacillus licheniformis and its flocculation properties[J]. Bioresource Technology, 2001, **78**(3): 267 ~ 272.

[8] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance[J]. Biotechnology Advances, 2001, **19**(5):371 ~ 385.

[9] Wang Zhen, Wang Kongxing, Xie Yumin. Bioflocculant-Producing Microorganisms[J]. Chinese Science Abstracts Series B, 1995, **14**(3), 40.

[10] Raichur A M, Misra M, *et al*. Flocculation and flotation of coal by adhesion of hydrophobic Mycobacterium phlei[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, **8**(1 ~ 2): 13 ~ 24.

[11] Nakaura J, Miygeyshi S, Hirose Y. Modes of flocculantion of yeast cells with flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ7002 [J]. Agr. Biol. Chem., 1976, **40**(8):1565 ~ 1571.

[12] 张博润,等.酵母絮凝机理研究进展及应用前景[J].微生物学通报,1996,**23**(5):307 ~ 311.