

文章编号 :1009 - 038X( 2001 )03 - 0248 - 04

# 生物絮凝剂的絮凝条件

何 宁<sup>1</sup> , 李 寅<sup>1</sup> , 陆茂林<sup>2</sup> , 陈 坚<sup>1</sup>

( 1. 无锡轻工大学生物工程学院 ,江苏无锡 214036 ;2. 江苏省微生物研究所 ,江苏无锡 214063 )

摘 要 :研究了红平红球菌( *Rhodococcus erythropolis* ) CCRC 10909 产生的生物絮凝剂 REA-11 的絮凝条件. REA-11 在偏酸性范围内( pH 3.0 ~ 6.5 ) ,絮凝活性稳定 ,耐热性较强 ,热稳定范围可高达 80 ℃.  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{CaO}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$  均能不同程度地提高 REA-11 的絮凝活性. 其中 , $\text{CaCl}_2$  和  $\text{FeSO}_4$  的助凝效果较好. 在实验体系中 , $\text{CaCl}_2$  的最佳助凝浓度为 8 mmol/L ;絮凝体系中缺少  $\text{CaCl}_2$  或  $\text{CaCl}_2$  浓度过高( 大于 25 mmol/L )都会明显降低 REA-11 的絮凝活性. 助凝离子  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与絮凝剂的最适投加量存在密切关系 , $\text{CaCl}_2$  浓度的增大使 REA-11 的最适投加量呈降低趋势.

关键词 :生物絮凝剂 ;絮凝条件 ;红平红球菌

中图分类号 :Q93-3

文献标识码 :A

## Flocculating Conditions of Microbial Flocculant

HE Ning<sup>1</sup> , LI Yin<sup>1</sup> , LU Mao-lin<sup>2</sup> , CHEN Jian<sup>1</sup>

( 1. School of Biotechnology ,Wuxi University of Light Industry ,Wuxi 214036 , China ;2. Jiangsu Institute of Microbiology ,Wuxi 214063 , China )

**Abstract** : Flocculating conditions of bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* CCRC 10909 ( named REA-11 ) were investigated. The flocculating activity of REA-11 was more thermostable at pH 3.0 to 6.0. Less than 5% of its flocculating activity was lost when flocculant REA-11 was treated at 80 ℃ and pH 4.0 for 30 min. The flocculating activity of REA-11 was differently improved by the addition of  $\text{CaCl}_2$  ,  $\text{AlCl}_3$  ,  $\text{CaO}$  ,  $\text{FeCl}_3$  ,  $\text{FeSO}_4$  ,  $\text{MgCl}_2$  ,  $\text{NaCl}$  or  $\text{KCl}$  , among which  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{FeSO}_4$  were shown to be the most efficient. As a co-flocculant , the optimum concentration of  $\text{CaCl}_2$  was 8 mmol/L in this flocculating system. Either too low or too high concentration of  $\text{CaCl}_2$  ( higher than 25 mmol/L ) resulted in apparent decrease of flocculating activity. The optimum concentration of REA-11 lowered with the increase of the concentration of  $\text{CaCl}_2$ .

**Key words** : bioflocculant ; flocculating conditions ; *Rhodococcus erythropolis*

生物絮凝剂( Bioflocculant )作为一类高效、安全、无污染的新型水处理药剂已越来越引起国内外环境工程学者的重视 ,在水资源缺乏的中国 ,研制

开发新型絮凝剂具有重要的意义. 日本从 20 世纪 70 年代后期就开始了这方面的研究<sup>[1]</sup> ,而国内对生物絮凝剂的研究自 20 世纪 90 年代才刚刚起

收稿日期 2000 - 10 - 23 ,修订日期 2001 - 04 - 03.

基金项目 :教育部跨世纪人才基金项目资助课题.

作者简介 :李 寅( 1974 - ) ,女 ,山东德州人 ,发酵工程博士研究生.

步<sup>[2 3]</sup>,许多工作尚待深入开展.

絮凝剂的絮凝活性是评价其是否具有工业化应用潜力的重要指标.因此,确定生物絮凝剂的最佳絮凝条件是进一步研究絮凝机理和推广应用生物絮凝剂的基础.絮凝剂的絮凝活性不同程度地受到许多因素的影响,包括絮凝剂分子本身的性质和絮凝的外部条件.作者对红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) CCRC 10909 产生的一种胞外生物絮凝剂( REA-11 )进行了絮凝条件的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *R. erythropolis* CCRC10909 ,购自韩国菌种保藏中心.

1.1.2 发酵培养基( g/L ) 碳源 10 ,氮源 1 ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 ,  $\text{NaCl}$  0.1 ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 pH 8.0.

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 于新鲜斜面上取一环菌 ,接至装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中 ,26 ℃ ,120 r/min 振荡培养 12 h.

1.2.2 摇瓶培养 按 5% 接种量 ,将培养 12 h 种子液接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中 ,26 ℃ ,120 r/min 振荡培养.

1.3 测定方法

1.3.1 REA-11 样品的制备 取 *R. erythropolis* CCRC 10909 的 48 h 发酵液 ,于 7 000 r/min 下离心 20 min ,取上清液用于絮凝剂的性质和絮凝条件的研究.

1.3.2 REA-11 粗提品的制备 取 *R. erythropolis* CCRC 10909 的 48 h 发酵液 ,于 7 000 r/min 下离心 20 min ,弃去沉淀.向上清液中加入 3 倍体积的乙醇 ,4 ℃ 静置 20 h 后 ,离心( 7 000 r/min ,20 min ) ,以蒸馏水溶解沉淀 ,离心( 7 000 r/min ,20 min ) ,弃去不溶物 ,取上清液透析 24 h ,冷冻干燥 ,即得到 REA-11 粗提品.

1.3.3 絮凝活性测定方法 取 40 mL 10 g/L 高岭土溶液加至 50 mL 刻度试管中 ,再顺序加入 2.5 mL 10 g/L  $\text{CaCl}_2$  溶液和适量待测样品 ,以蒸馏水加至该刻度 ,将试管上下翻转若干次 ,迅速倒入比色杯中 ,静置 5 min 后 ,于 550 nm 处测定吸光度.以空白培养基代替待测样品作对照.絮凝活性计算如下( 以絮凝率表示 ) :絮凝率( Flocculating Rate , F. R. ) =  $(B - A) / B \times 100\%$  .其中 ,*A* 为待测样品的吸光度值 ,*B* 为对照组的吸光度值.

1.3.4 絮凝活性分布实验 取 *R. erythropolis* CCRC 10909 不同培养时间的发酵液 10 mL ,3 000 r/min 离心 15 min ,留上清液备用.菌体细胞以蒸馏水洗涤 2 次后 ,制成细胞悬浮液.分别测定发酵原液( 含细胞 ) ,上清液以及细胞悬浮液的絮凝活性.

1.3.5 REA-11 的 pH 稳定性实验 将 REA-11 溶液的 pH 值分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0 ,冰箱放置 24 h 后 ,测定发酵液的残余絮凝活性.

1.3.6 REA-11 的温度稳定性实验 将 *R. erythropolis* CCRC 10909 的除菌体发酵液 pH 值分别调至 3.0、4.0、5.0、6.5、8.5、10.0 ,再将不同 pH 值的溶液分别于 4 ℃、35 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃处理 30 min ,恢复至室温后测定各溶液的残余絮凝活性.

1.3.7 细胞干重测定 取发酵液 5 mL ,10 000 r/min 离心 5 min ,蒸馏水洗涤菌体 2 次 ,105 ℃ 干燥至恒重后称重 ,计算出细胞干重.

2 结果与讨论

2.1 絮凝活性的分布

生物絮凝剂的絮凝活性分布随菌株不同而异<sup>[4 5]</sup>.图 1 为 *R. erythropolis* CCRC10909 合成的絮凝剂的分布情况.

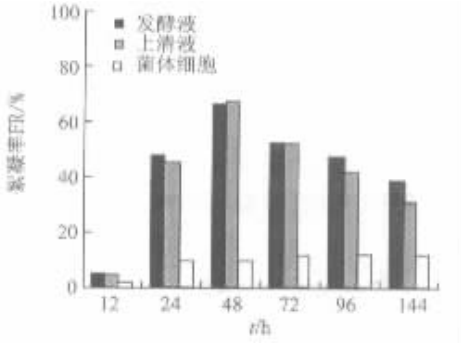


图 1 *R. erythropolis* CCRC 10909 的絮凝活性分布  
Fig.1 Activity distribution of bioflocculant produced by *R. Erythropolis* CCRC 10909

由图 1 可知 ,整个发酵过程中 ,发酵原液( 含菌体 ) ,上清液( 除菌体 ) 以及菌体细胞均具有絮凝活性 ;但菌体细胞的絮凝活性一直处于较低的水平( 絮凝率小于 20% ) ,而发酵液及上清液的絮凝活性维持在较高水平 ;尤其当发酵液的絮凝活性达到最高值时 ,大约 80% 以上的絮凝物存在于上清液中.由此可见 ,*R. erythropolis* CCRC10909 产生的絮凝剂大部分分泌至胞外培养基中 ,但在不同的生长阶段其絮凝活性的分布比例略有不同 ,这可能与菌体所处的生长状态、环境 pH 值等外界条件有关.因

此,将以 REA-11 的除菌体发酵液作为絮凝剂性质的研究对象.

2.2 pH 对絮凝活性的影响

不同 pH 的发酵液于 4 ℃放置 24 h 后的残余絮凝活性变化规律如图 2 所示,生物絮凝剂 REA-11 在 pH 3.0~6.0 的范围内能维持较强的絮凝活性(絮凝率大于 80%),而当 pH 降至 2.0 或升高至 8.0 以后,絮凝活性明显下降.

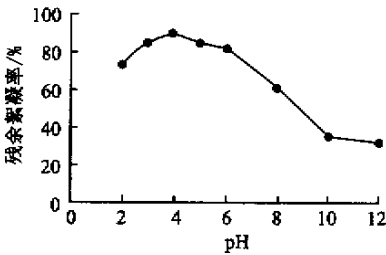


图 2 pH 对 REA-11 絮凝活性的影响

Fig.2 The pH stability curve for the flocculating activity of REA-11

2.3 温度对絮凝活性的影响

温度对生物絮凝剂的活性表达也有很重要的影响.如日本研制的生物絮凝剂 NOC-1 在开放系统中 100 ℃处理 15 min,活性下降约 50%<sup>[6]</sup>.但也有些生物絮凝剂对温度变化不敏感<sup>[7]</sup>.

不同 pH 条件下温度变化对 REA-11 絮凝活性的影响如图 3 所示,REA-11 在其 pH 稳定范围内(pH 3.0~6.0)具有较强的耐热性,80 ℃处理 30 min 絮凝活性未见明显下降.但当处理温度升高至 100 ℃后,REA-11 的絮凝活性急剧降低. REA-11 在 pH 大于 8.0 时,其热稳定性范围变窄,当热处理温度升高至 80 ℃时,絮凝活性就几乎降至 0.

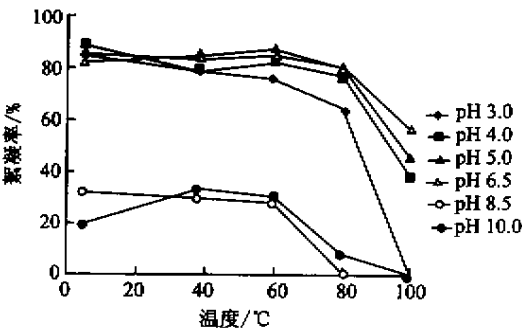


图 3 温度对 REA-11 絮凝活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the flocculating activity of REA-11

2.4 絮凝体系中离子种类及离子强度对絮凝活性的影响

絮凝体系中的离子通常能够改变絮凝剂分子和悬浮颗粒的表面电荷,从而影响絮凝活性.不同

离子对 REA-11 絮凝活性的影响如图 4 所示,  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{CaO}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$  均能不同程度地提高 REA-11 的絮凝活性,其中,  $\text{CaCl}_2$ 和  $\text{FeSO}_4$  的助凝效果最好,其次为  $\text{AlCl}_3$ .考虑到  $\text{FeSO}_4$  会给被处理物带入颜色,可能影响最终的净化效果,因此,将以  $\text{CaCl}_2$  作为 REA-11 的助凝离子.

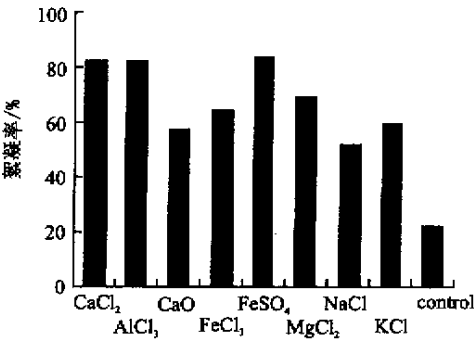


图 4 离子对 REA-11 絮凝活性的影响

Fig. Effect of different ions on the flocculating activity of REA-11

絮凝体系中  $\text{CaCl}_2$  的浓度对 REA-11 的絮凝活性影响较大( REA-11 的质量浓度为 8.2 mg/L ),如图 5 所示.其最佳助凝浓度为 8 mmol/L,此时形成的絮凝颗粒最大,絮凝速度也最快.絮凝体系中  $\text{CaCl}_2$  浓度过高( 大于 25 mmol/L )则会使 REA-11 的絮凝活性明显下降.

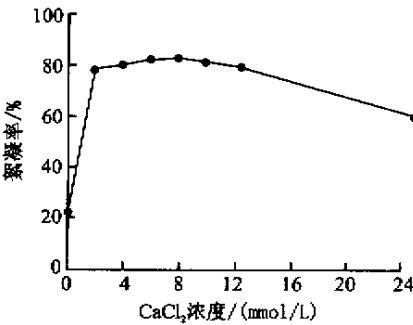


图 5  $\text{CaCl}_2$  浓度对 REA-11 絮凝活性的影响

Fig.5 Effect of the concentration of  $\text{CaCl}_2$  on the flocculating activity of REA-11

2.5 絮凝剂加入量对絮凝活性的影响

絮凝剂作为絮凝体系的主体,其投加量的多少直接关系到最终的絮凝效果. REA-11 的不同投加量对絮凝活性的影响如图 6 所示,当 REA-11 的投加量为 1 mL( 含絮凝剂粗提品 8.2 mg/L )时,絮凝活性达到最大,投加量低于或高于 8.2 mg/L,絮凝活性均有不同程度的降低. REA-11 的最佳投加量为 8.2 mg/L.据分析<sup>[8]</sup>,絮凝剂的最佳加入量大约

是固体颗粒表面吸附大分子化合物达到饱和时的一半吸附量 ,因为此时大分子在固体粒子上的架桥几率最大 .

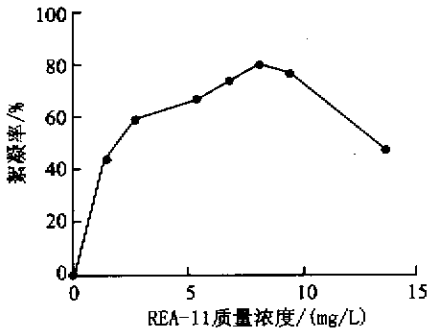


图 6 REA-11 加入量对絮凝活性的影响

Fig.6 Effect of the concentration of REA-11 on the flocculating activity of REA-11

需要指出的是 ,絮凝剂的最适加入量是一相对值 ,如改变被处理物的浓度、种类或絮凝体系的离子强度等条件都可能引起其最适投加量的改变 .

### 2.6 絮凝体系中离子浓度与絮凝剂投加量的关联作用

实验中发现 ,絮凝体系中的助凝离子浓度与絮凝剂的投加量之间存在密切关系 .如图 7 所示 ,随  $\text{CaCl}_2$  浓度从 5 mmol/L 增加到 8 mmol/L 和 12.5 mmol/L 时 ,REA-11 的最适投加量逐渐降低 ,由 13.7 mg/L 分别降至 8.2 mg/L 和 5.5 mg/L . Levy<sup>[8]</sup> 在研究蓝藻细菌 ( *Cyanobacteria* ) 合成的生物絮凝剂 F-J1 时也曾发现了类似的规律 ,他认为 ,  $\text{CaCl}_2$  的作用是增加絮凝剂在固体颗粒表面的吸附量 ,因而  $\text{CaCl}_2$  浓度的提高将有助于增加絮凝剂的有效吸附量 ,从而降低其实际投加量 .

由于在不同的絮凝条件下 ,REA-11 的最佳絮凝效果几乎相同 (絮凝率达到 80% 左右) ,因此 ,通

过增加絮凝体系中无机离子的浓度来减少生物絮凝剂的用量 ,亦不失为一条降低生物絮凝剂应用成本的有效途径 .

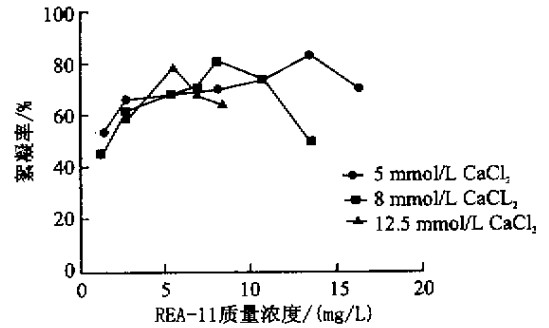


图 7 絮凝体系中离子浓度与絮凝剂最适投加量的变化关系曲线

Fig.7 The relationship between the concentration of ions and bioflocculant in the flocculating system

综上所述 ,生物絮凝剂的絮凝活性受到多种外部条件的影响 ,而且这些外部条件相互关联 ,相互制约 .

## 3 结 论

1) REA-11 的最适 pH 活性范围为 pH 3.0 ~ 6.0 ,在该 pH 稳定范围内 ,REA-11 耐热性较强 ,热稳定范围可高达 80 ℃ . REA-11 的 pH 和温度稳定范围均较宽 ,为实际应用提供了有利条件 .

2)  $\text{CaCl}_2$  为该絮凝体系的最佳助凝离子 ,其最适助凝浓度为 8 mmol/L ( REA-11 投加量 8.2 mg/L ) .

3) 助凝离子  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与絮凝剂的最适投加量存在密切关系 ,  $\text{CaCl}_2$  浓度的增大使 REA-11 的最适投加量减少 .

## 参考文献 :

- [ 1 ] JUNJI N ,SHIGEYOSHI M ,YOSHIO H . Conditions for production of microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7004 [ J ] . *Agric Biol Chem* ,1976 ,40 ( 7 ) :1341 ~ 1347 .
- [ 2 ] 王镇 ,王孔星 ,谢裕敏等 . 几株絮凝剂产生菌的特性研究 [ J ] . *微生物学报* ,1995 ,35 ( 2 ) :121 ~ 129 .
- [ 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 ] RYUICHIRO Kurane ,KAZUKI Toeda ,KIYOSHI Takeda , *et al.* Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis* [ J ] . *Agric Biol Chem* ,1986 ,50 ( 9 ) :2309 ~ 2313 .

( 上接第 251 页 )

- [ 5 ] JUN-ichi Koizumi ,MINORU Takeda ,RYUICHIRO Kurane ,*et al.* Synergetic flocculation of the bioflocculant FIX extracellularly produced by *Nocardia amarae*[ J ]. **J Gen Appl Microbiol** ,1991 37 :447 ~ 454.
- [ 6 ] 吕向红.微生物絮凝剂[ J ]. 化工环保 ,1995 ,15( 4 ) :211 ~ 218.
- [ 7 ] HIROAKI Takagi , KIYOSHI Kadowaki. Flocculant Production by *Paecilomyces* sp. Taxonomic Studies and Culture Conditions for Production[ J ]. **Agric Biol Chem** ,1985 49( 11 ) 3151 ~ 3157.
- [ 8 ] 陈宗淇 戴闽光.胶体化学[ M ].北京 :高等教育出版社 ,1984.
- [ 9 ] LEVY N ,VAR-OR Y ,MAGDASSI S. Flocculation of Bentonite Particles by a Cyanobacterial Bioflocculant[ J ]. **Colloids and Surfaces** ,1990 48 337 ~ 349.
- [ 10 ] JIN S ,GI S ,SANG O L ,*et al.* Bioflocculant Produced by *Aspergillus* sp. JS-42[ J ]. **Biosci Biotech Biochem** ,1996 ,60( 2 ) 325 ~ 327.

( 责任编辑 朱 明 )