

## 一株产生脂肽的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及脂肽对原油的作用

王大威<sup>1</sup>, 刘永建<sup>1\*</sup>, 林忠平<sup>2</sup>, 杨振宇<sup>3</sup>, 郝春雷<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大庆石油学院石油工程学院, 大庆 163318)

(<sup>2</sup>北京大学生命科学学院 北京 100871) (<sup>3</sup>大庆油田勘探开发研究院 大庆 163712)

**摘要:** 从大庆油田地层水中分离到一组能高效产生生物表面活性剂的菌株, 采用 *sfp* 基因 PCR 鉴定的方法从中分离到一株芽孢杆菌 ZW-3, 该菌株能够产生大量表面活性物质, 采用细菌生理生化鉴定结合 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 通过薄层层析色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)分析其代谢产物, 初步鉴定为脂肽(Lipopeptide); 该脂肽生物表面活性剂理化性质显示它能使培养基的表面张力从 68.92mN/m 降低 25.19mN/m、原油/水的界面张力从 23.53mN/m 降低到 4.57mN/m, 与 1.8% 的 NaOH 溶液复配可以将油水界面张力降低到  $1.2 \times 10^{-3}$  mN/m, 其临界胶束浓度为 33.3mg/L( $3.24 \times 10^{-5}$  mol/L), 并具有较好的乳化活性和发泡性能, 说明该菌株代谢的脂肽生物表面活性剂在提高石油采收率中具有广泛的应用前景。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 多相分类; 脂肽; 生物表面活性剂; 理化性质; 原油

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0304-08

生物表面活性剂是 20 世纪 70 年代后期国际生物工程领域中发展起来的一个新课题, 由于其可以媲美化学合成表面活性剂的性能, 以及易降解低毒害的特点, 生物表面活性剂越来越受到重视。脂肽(Lipopeptide)表面活性剂是其中重要的一类。1968 年, Arima 等<sup>[1]</sup>首次发现 *Bacillus Subtilis* IFO3039 能够产生脂肽类生物表面活性剂, 可显著降低水的表面张力(从 72mN/m 降低到 27mN/m), 临界胶束浓度达到  $1.28 \times 10^{-5}$  mol/L, 是迄今报道的效果最好的生物表面活性剂之一, 被名为表面活性素(Surfactin)。它是由一个 LLDLLDL 共 7 个短肽手性序列的亲水基团和  $\beta$ -羟基脂肪酸的疏水基团形成的内酯环, 具有马鞍型的结构。由于其特殊的化学组成和两亲型分子结构, 表现出多种生理功能<sup>[2,3]</sup>: 帮助微生物细胞粘附于烃类物质表面进行解烃代谢; 降低表面张力, 促进微生物吸收和代谢疏水性物质, 以利于微生物在水不溶性物质中生存; 多种脂肽具有抗微生物和昆虫活性<sup>[4]</sup>。

由于脂肽及其它生物表面活性剂具备多种活性, 因此它们可以应用于石油开采、环境治理、医药、食品、化妆品、农业等众多工业领域中。

基于脂肽表面活性剂优良的功能和广泛的用途, 有必要研究快速筛选和鉴定代谢脂肽类表面活性剂的菌株的方法。但是目前关于脂肽类生物表面活性剂研究的报道还很少。本研究采用血平板、排油活性检测等方法从大庆油田地层返排水中分离到一组代谢表面活性剂的菌株, 并根据表面活性素(Surfactin)代谢过程的关键酶 *Sfp* 基因(枯草芽孢杆菌磷酸泛酰硫基乙胺转移酶基因, 其编码蛋白 SFP “枯草芽孢杆菌磷酸泛酰硫基转移酶”属于 4-磷酸泛酰硫基乙胺基转移酶超家族)设计引物, 采用 *Sfp* 基因 PCR 鉴定的方法从中分离到一株芽孢杆菌, 能够在 45℃ 下 2 天内产生大量高表面活性物质, 其发酵液可降低原油界面张力为 4.57mN/m, 采用 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),

基金项目: 国家级重大基础研究前期研究专项(2005CCA06200); 黑龙江省自然科学基金(E200523)

\*通讯作者: Tel: +86-459-6506155; E-mail: lyj@dqpi.net

作者简介: 王大威(1978-), 男, 黑龙江密山人, 博士研究生, 主要从事微生物提高原油采收率的研究。E-mail: wdw78913@163.com

收稿日期: 2007-08-31; 修回日期: 2007-11-04

结合薄层层析色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)分析其代谢产物, 确定为表面活性素(Surfactin), 并对菌株代谢的脂肽类生物表面活性剂的临界胶束浓度(CMC, critical micelle concentration)、乳化活性、降低表/界面张力能力、乳化原油稳定性及发泡性能等对原油的作用进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和材料:** *Bacillus subtilis* 菌株 ATCC21332 由中国农科院土壤肥料所菌种保藏中心购买; *Bacillus subtilis* 菌株 ZW-3 由大庆油田勘探开发研究院微生物采油研究室分离保存。地层水、原油样品(相对密度 0.8583, 粘度 19.38 mPa·s, 含蜡量 23.56%, 含沥青胶质 13.0%)取自大庆油田第一采油厂 51-斜 13 井。

**1.1.2 标准品:** Surfactin 标准品购自德国 Fluka 公司 (Sigma)

**1.1.3 培养基:** 1 细菌种子培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 硫酸镁 2.0; 2 细菌发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, 硫酸铵 6.0, 硫酸镁 0.3, 氯化钙 0.08, 酵母粉 0.6, 磷酸二氢钾 2.0, 磷酸氢二钠 8.0, 初始 pH7.2。

### 1.2 菌株的分离

**1.2.1 富集培养:** 将油水样和油土样按 3%的接种量分别接种到富集培养基中, 120r/min, 根据大庆油田地质温度 45℃下振荡培养 3d。

**1.2.2 血平板筛选:** 利用生物表面活性剂能够溶血的特性, 将富集培养液用划线和涂布分离方法接种于血平板上, 37℃培养 24~48h, 挑选溶血圈大且透明的单菌落接种斜面上, 作进一步研究。

**1.2.3 复筛摇瓶培养:** 将初筛的菌株活化培养后接种于摇瓶培养基中, 120r/min, 37℃振荡培养 3d, 发酵液离心后进行复筛和表面活性的测定。

**1.2.4 生物表面活性剂排油活性测定:** 取一直径 150mm 培养皿, 加 30mL 煤油, 在煤油中心慢慢加入 0.1mL 的摇瓶发酵液, 中心煤油被挤向四周形成一圆圈, 圆圈直径与表面活性剂含量成正比。将驱油圈直径大于 4 cm 的菌株保留作进一步的研究。

### 1.3 *sfp* 基因的 PCR 扩增<sup>[5]</sup>

提取细菌基因组 DNA, 以其为模板 PCR 扩增 *sfp* 基因。扩增引物按照 Feng-Chia Hsieh<sup>[6]</sup>报道的引物 f(5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3')和 r(5'-TTATA-

AAAGCTCTTCGTA-3')(上海生工生物工程有限公司合成), PCR 体系采用 20μL, 条件: 94℃ 10min; 94℃ 1min, 46℃ 30s, 72℃ 1min, 25 个循环; 72℃ 10min。扩增的 PCR 产物连接到载体 PMD18-T(TAKARA)上, 转化 *E.coli* DH5α。序列测定由北京三博远志生物公司完成。

### 1.4 细菌鉴定及生理生化分析

生理生化实验方法参见文献[7]。DNA 提取参照 Marrtur<sup>[8]</sup>的方法。采用熔点法<sup>[9]</sup>( $T_m$  值法)测定 (G+C)mol%含量。以细菌基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rDNA, 扩增引物采用细菌通用引物 B14926(5'-CCGGATCCAGAGTTTGATCCTGGTCAG AACGAACGCT-3')和 B14927(5'-CGGGATCCTACG-CCTACCTTGTACGACTTCACCC-3')(上海生工生物技术有限公司合成)。PCR 反应体系选用 20 μL 反应体系, 条件: 94℃ 10min; 94℃ 45s, 55℃ 60s, 72℃ 70s, 30 个循环; 72℃ 10min。扩增的 PCR 产物连接到载体 PMD18-T(TAKARA)上, 转化 *E.coli* DH5α。提取有 16S rDNA 插入的质粒并测序, 序列测定由北京三博远志公司完成。

将菌株 ZW-3 的 16S rDNA 序列输入 GenBank 核酸序列数据库进行比对, 采用 MEGA4.0 软件进行 16S rDNA 同源性分析。

### 1.5 脂肽生物表面活性剂的分离及鉴定

脂肽表面活性剂的提取和高效液相色谱分析方法参照文献[10]; 薄层层析分析方法参照文献[11]。

纯化样品采用高效液相色谱进行检测, 流动相 A(40%乙腈 + 60% 10mmol/L 醋酸铵, pH6.9), 流动相 B(乙腈), 进行梯度洗脱, 0~10 min 内 B 相由 10% 变到 25%, 流动相 1.0mL/min、反相 C18 柱、紫外 215nm 检测即可。

### 1.6 脂肽生物表面活性剂的理化性质

脂肽生物表面活性剂临界胶束浓度(CMC)测定方法见文献[12]。脂肽生物表面活性剂乳化活性的测定方法参照文献[13]。采用 TVT2 滴体积界面张力仪和旋滴界面张力仪分别对地层水、培养基、发酵液于 45℃下测定界面张力。

取去离子水、细菌培养基、ZW-3 菌株发酵液各 10ml 分别和等体积原油于 30ml 乳化管中, 用 Ployron 均质机 10000r/min 均质混合 1min, 45℃放置, 最初 2h 观察一次, 放置 7 天观察乳化液分离效果以测定脂肽发酵液乳化原油的稳定性。

利用泡沫发生器分别使发酵液和化学发泡剂-十

二烷基磺酸钠起泡在 20℃和 50℃下测定两者的半衰期以确定脂肽发酵液泡沫稳定性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌种发酵液排油活性测定

通过排油圈实验从大庆油田油水样中分离到具有良好驱油活性的 8 株菌株, 分别命名为 ZW-1 ~ ZW-8, 在 8 个菌株中, ZW-3 的排油圈最大, 其直径可达 6 cm, 有必要进行进一步的研究。

### 2.2 菌种发酵液表面张力的测定

采用 TVT2 滴体积界面张力仪对 8 株具有较强驱油活性的菌株的发酵液的表面张力进行测定, 结果见表 1, 从表中可以看到 ZW-3、ZW-6 菌株发酵液具有较强的降低表面张力的能力, 分别将表面张力从 68.32mN/m 降低到 25.19mN/m 和 29.51mN/m, 由于 ZW-3 的排油圈最大, 表面张力降得最低, 故选定 ZW-3 菌株作进一步研究。

表 1 菌种发酵液表面张力的测定

Table 1 Surface tension determined under fermenting liquids

Sample number	Surface tension/(mN/m)
Aseptic water	68.92(0.0795)
Bacterial fermentation culture medium	68.32(1.6471)
ZW-1	42.82(0.3125)
ZW-2	36.56(0.0872)
ZW-3	25.19(0.2544)
ZW-4	31.59(0.2147)
ZW-5	45.25(0.3102)
ZW-6	29.51(0.0614)
ZW-7	33.48(0.3145)
ZW-8	47.24(0.2514)

Note: Standard Deviations( $\sigma-1$ ), n=5

### 2.3 *sfp* 基因的 PCR 扩增

*sfp* 基因 PCR 产物电泳(图 1)显示 8 株生物表面活性剂代谢菌株中, ZW-3 在 675 bp 处有条带, 与正

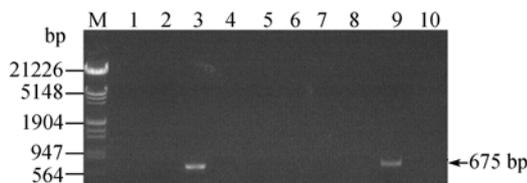


图 1 *Sfp* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR product profiles of *Sfp* gene. M.  $\lambda$ DNA/Hind III + EcoR I; 1. ZW-1; 2. ZW-2; 3. ZW-3; 4. ZW-4; 5. ZW-5; 6. ZW-6; 7. ZW-7; 8. ZW-8; 9. *Bacillus subtilis* ATCC 21332; 10. Distilled water.

对照菌株一致, 可以初步判定为枯草芽孢杆菌, 但需要做系统发育学的进一步分析。

### 2.4 菌株 ZW-3 的形态及生理生化鉴定

ZW-3 菌株平板生长菌落呈圆形, 菌落粗糙, 不透明, 无闪光, 扩张, 污白色, 细胞杆状, 大小为  $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$ 。经鉴定表明, 该菌株呈革兰氏阳性, 杆状, 能形成芽孢, 厌氧条件不生长, 甲基红试验阳性, 硝酸盐还原试验阳性, 葡萄糖培养能产酸不产气, 可液化明胶, 水解淀粉, 水解酪素。ZW-3 基因组 DNA 中(G+C)mol%的含量为 42.2%。

### 2.5 系统发育学分析

将菌株 ZW-3 的 16S rDNA 测序结果与 Genbank 中现有的菌种的 16S rDNA 基因序列进行比对, 选择 BLAST 比对结果中相似度最高的 24 条 16S rDNA, 利用 MEGA4.0 软件进行多重序列比对绘制进化树, 图 2 表明 ZW-3 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同源性最高, 为 99.7%, 因此结合生理生化特性初步判定 ZW-3 是枯草芽孢杆菌, 拟命名为枯草芽孢杆菌 ZW-3(*Bacillus subtilis* ZW-3)。

### 2.6 脂肽生物表面活性剂的薄层层析结果

通过 *sfp* 基因的 PCR 扩增、系统发育学分析确定 ZW-3 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 同时菌种发酵液表面张力的测定也显示该菌株具有较强降低表面张力的能力, 说明其代谢了表面活性物质, 根据文献[10]所知枯草芽孢杆菌代谢多为脂肽类生物表面活性剂, 鉴于脂肽类生物表面活性剂所具有的良好特性, 因此试采用文献[10]中的方法对 ZW-3 菌株的代谢产物进行纯化, 将纯化后的物质进行薄层层析, 使用氯仿/乙酸为展开剂, 以 Surfactin 标准样为对照, 层析结果如图 3 所示, 样品与 Surfactin 相当, 并且只呈现 1 个斑点, 证明样品被纯化, 菌株代谢产物初步鉴定为表面活性素(Surfactin)。

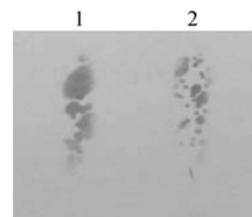


图 3 脂肽生物表面活性剂的薄层层析

Fig. 3 The thin-layer chromatogram of Surfactin. 1. Standard of Surfactin; 2. Lipopeptide from *B. subtilis* fermented broth.

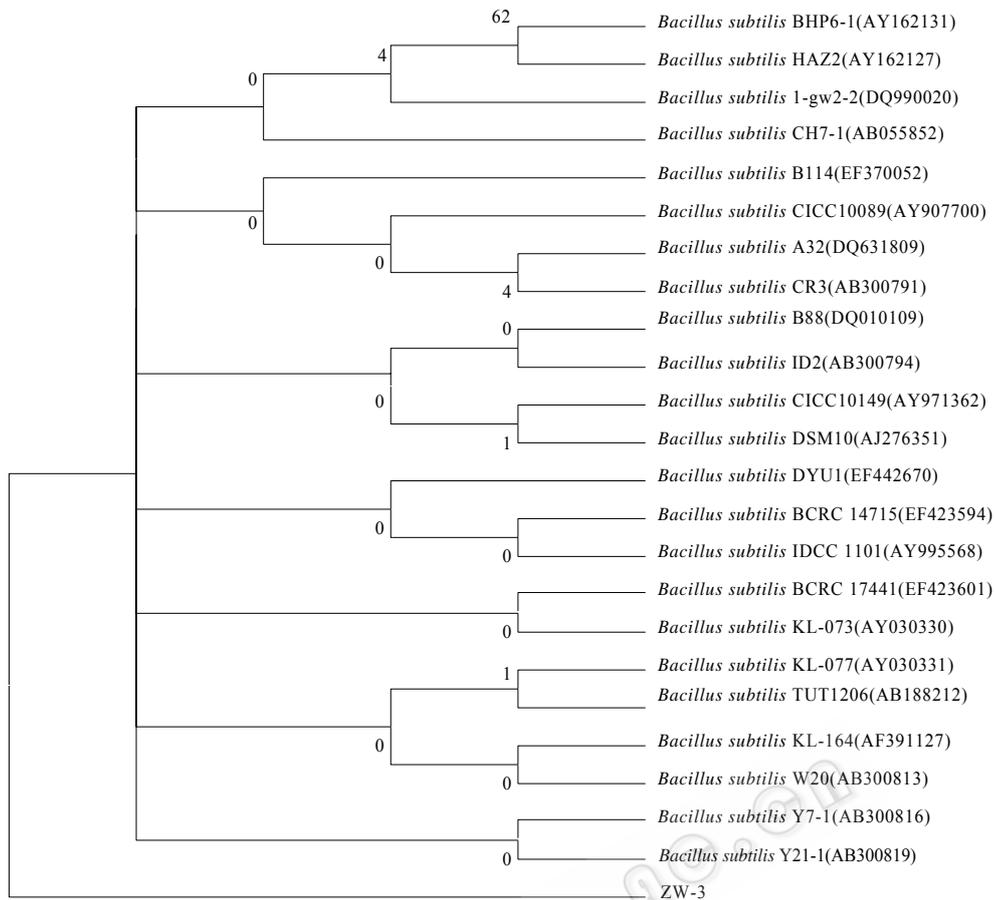


图2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 ZW-3 和相关属菌种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ZW-3 and related bacterial species. The tree was constructed according to 16S rRNA gene sequence with MEGA4.0 software.

## 2.7 脂肽生物表面活性剂的 HPLC 检测结果

细菌发酵液经纯化后得到脂肽纯品采用 HPLC 与标准品进行检测。由图 4 可见, 脂肽经 HPLC 分离后出现了 3 个主要的峰, 保留时间分别为 6.212min、7.769min、9.727min, 标准品 HPLC 结果在 6.136、7.643、9.586min 处也各有 3 个峰, 根据文献[11]说法, 这 3 个峰可能是表面活性素(Surfactin)的同系物, 因此初步认定纯化样品中保留时间为 6.212、7.769、9.727min 的峰为表面活性素

(Surfactin), 采用 HPLC 对从发酵液中提纯的脂肽生物表面活性剂的含量进行测定, ZW-3 的脂肽产率为 111.6mg/L, 在已报道的文献中是较高的。

## 2.8 脂肽生物表面活性剂的理化性质及对原油的作用

**2.8.1 脂肽表面活性剂临界胶束浓度(CMC)的测定:** 实验结果表明, 随着脂肽浓度的增加, 界面张力逐渐下降, 当稀释 30 倍时, 即脂肽浓度为 33.3 mg/L 时, 界面张力降到最低为 3.4 mN/m, 再继续增加浓度界面

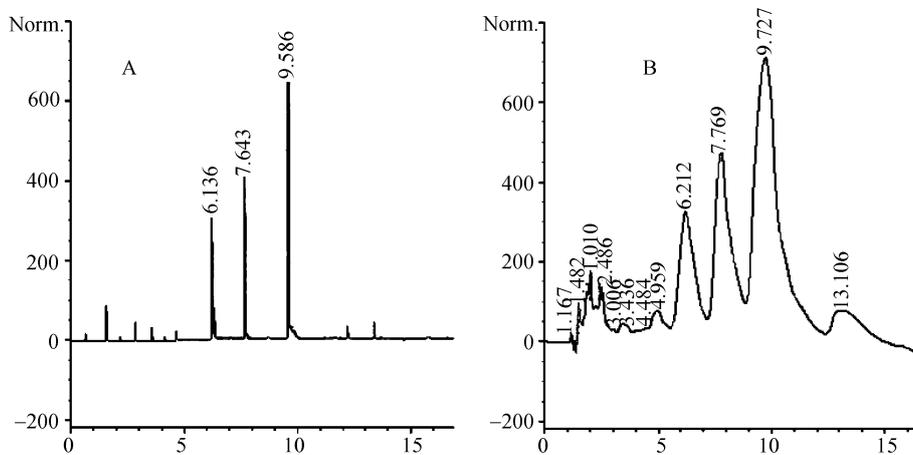


图4 脂肽生物表面活性剂的 HPLC 检测

Fig. 4 HPLC Examination of Surfactin. A: Standard of Surfactin; B: Lipopeptide from *B. subtilis* fermented broth.

张力不再下降, 因此, 脂肽的临界胶束浓度(CMC 值)约为 33.3mg/L( $3.24 \times 10^{-5}$ mol/L)。由图 5 的曲线也可以看出脂肽水溶液的浓度在 33.3mg/L 时界面张力有一个突变点(根据 CMC 的定义: 在 CMC 浓度以下表面活性剂不再聚集成胶束, 从而表面张力或界面张力会突然开始上升), 因此, 也可以确定 ZW-3 菌株产生的脂肽生物表面活性剂的 CMC 值约为 33.3mg/L( $3.24 \times 10^{-5}$ mol/L)。如此低的 CMC 值说明该脂肽表面活性剂在稀释浓度下是很有效的, 因为它在很低的浓度时就可以达到临界胶束浓度, 从而使界面张力降到最低, 这对表面活性剂的使用是非常有利的。

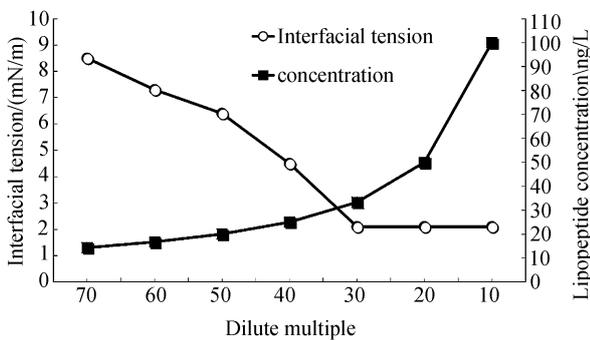


图 5 脂肽表面活性剂的 CMC 值

Fig. 5 CMC of the lipopeptide biosurfactant.

**2.8.2 脂肽表面活性剂乳化活性和降低表面张力能力的测定:** 将脂肽发酵液进行系列稀释, 测定不同稀释度发酵液的乳化活性和降低表面张力能力, 结果如表 2 所示, 该脂肽乳化能力较强, 其原液乳化活性为 2.89U, 随着稀释度的升高, 溶液乳化活性逐渐下降, 当稀释 10 倍时乳化活性为 1.36U, 仍能达到有关文献报道<sup>[15]</sup>的生物表面活性剂发酵原液乳化活性水

表 2 不同稀释度的发酵原液乳化活性测定值

Table 2 The emulsifying value of different dilutions of lipopeptide

Dilutions of lipopeptide solution	Emulsifying value/U	Surface tension/(mN/m)
0	0	68.36(0.0746)
1	2.89(0.0825)	25.04(0.2541)
2 <sup>-1</sup>	2.54(0.1295)	25.10(0.3328)
3 <sup>-1</sup>	2.12(0.5374)	25.13(0.3004)
5 <sup>-1</sup>	1.56(0.3621)	25.60(0.2328)
10 <sup>-1</sup>	1.36(1.3541)	26.15(0.2741)
50 <sup>-1</sup>	0.33(0.8546)	57.91(1.9079)
100 <sup>-1</sup>	0.15(0.1124)	67.51(0.1686)

Standard Deviations( $\sigma-1$ ), n=5

平; 同时该脂肽具有很强的降低表面张力的能力, 其原液可将表面张力从 68.36mN/m 降低到 25.04mN/m, 即使稀释 10 倍时还可以降低表面张力到 26.15mN/m。以上结果说明该脂肽生物表面活性剂具有很好的乳化活性和降低表面张力能力, 在微生物采油、环境生物修复和食品工业等领域将有广阔的应用前景。

**2.8.3 脂肽表面活性剂降低界面张力能力的测定:** 采用 TVT2 滴体积界面张力仪对大庆油田地层水、培养基、发酵液以及稀释溶液的油水界面张力进行测定, 结果如图 6 所示, 菌株发酵液与地层水和培养基比较, 将油水界面张力分别从 27.88mN/m 和 23.53mN/m 降低到 4.57mN/m, 即使稀释 10 倍, 仍可以达到 12.16mN/m, 说明该脂肽表面活性剂具有较强的降低油水界面张力的能力。

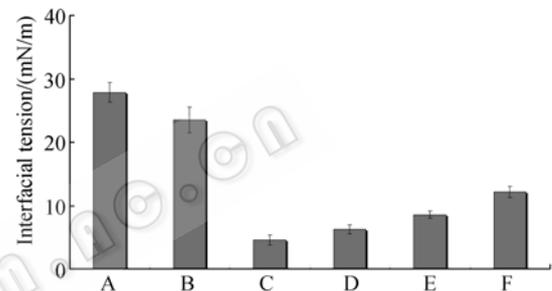


图 6 菌株 ZW-3 发酵液界面张力测定

Fig. 6 Interfacial tension determined under fermenting liquids.

A: Aseptic water; B: Culture medium; C: Bacterial fermentation fluid; D: Dilutes two times; E: Dilutes five times; F: Dilutes ten times.

在石油开发中, 碱(氢氧化钠、碳酸钠)与表面活性剂二元复合驱(Alkali-Surfactant, AS)是一项应用广泛、且廉价的提高采收率技术。该技术的机理在于原油中的酸性物质(如羧酸)可以与碱中和, 在油水界面形成活性物质, 同时外加的表面活性剂与之产生协同效应进一步产生超低界面张力( $<10^{-2}$ mN/m), 从而提高原油采收率。在研究工作中, 将表面活性剂与不同浓度的碱进行复配测定其降低油水界面张力的能力是表征表面活性剂在提高原油采收率中作用的重要参数。因此为研究菌株 ZW-3 代谢的脂肽表面活性剂的性能, 获得超低界面张力, 实验使用旋滴界面张力仪对发酵液/原油的界面张力进行测定, 1.5h 观察油滴拉长情况。根据大庆油田原油的具体特点, 加入浓度 0.8%、1.0%、1.3%、1.5%、1.8%、2.0%(Wt/V)的 NaOH 溶液与发酵液复配进行分析。

从图 7 中可以看到 f5 和 f6 两个组合分别达到  $1.2 \times 10^{-3} \text{mN/m}$  和  $1.4 \times 10^{-3} \text{mN/m}$ , 是超低界面张力, 尽管后期界面张力会恢复, 但也可维持在  $3.5 \times 10^{-2} \text{mN/m}$  这样较低的水平, 说明该脂肽对降低界面张力具有较强的能力, 同时和碱的加入成一定的线性关系, 在微生物提高原油采收率中具有一定的应用价值。

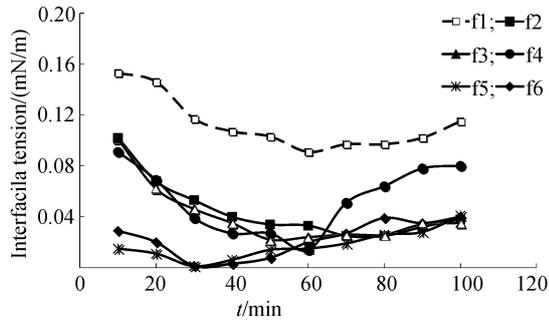


图 7 发酵液与碱复配界面张力的关系

Fig. 7 Interfacial tension determined under fermenting liquids mixed with alkali. f1: 0.8%, f2: 1.0%, f3: 1.3%, f4: 1.5%, f5: 1.8%, f6: 2.0% NaOH

**2.8.4 脂肽表面活性剂对原油的乳化作用:** 脂肽发酵液乳化原油的稳定性实验显示, 去离子水、细菌培养基与原油形成的乳化液在 1~2min 内迅速分离开, 而 ZW-3 菌株发酵液与原油形成的乳化液体积在最初的 10h 内变化比较快, 35h 以后, 体积基本稳定在 11mL 左右, 继续观察没有明显变化, 从乳化管的外观看, 加入该脂肽生物表面活性剂的原油对瓶壁的脱附能力及溶解性增强, 油水能够形成均匀的乳化液, 粘度下降, 说明 ZW-3 菌株发酵液具有良好的乳化效果。

使用电子显微镜观察 ZW-3 菌株发酵液乳化管中的油水混合情况, 可以看到图 8 中乳化液既有油包水(W/O)的形式, 也有水包油(O/W)的形式, 但主要是水包油(O/W)的形式, 以上事实说明该脂肽的乳化能力较强, 最后可以形成稳定的水包油的乳化液。这些特性有利于原油的增采、输送以及原油污染的清除。

**2.8.5 脂肽表面活性剂的发泡性能:** 菌株 ZW-3 脂肽发酵液的发泡性能与化学合成的十二烷基磺酸钠比较测定结果见表 3, 结果表明, 菌株 ZW-3 发酵液的泡沫稳定性在 20℃比十二烷基磺酸钠略差, 50℃时远远好于十二烷基磺酸钠。由于采油的地层温度一般较高, 性能优良的发泡剂应该在高温下保持稳定。ZW-3

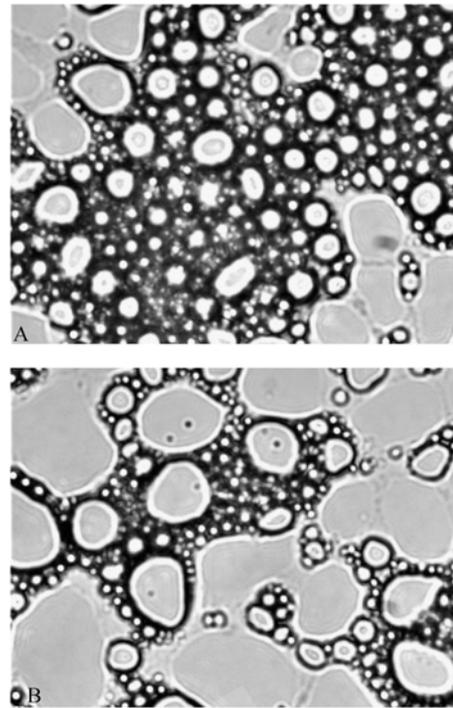


图 8 ZW-3 菌株发酵液对原油的乳化作用

Fig. 8 The Photos of crude oil-water emulsion formed by fermenting liquids (10×40). A: 12h; B: 72h.

表 3 菌株发酵液的发泡性能

Table 3 Foaming property of fermenting fluids			
Surfactant	20℃ half life period /min	50℃ half life period /min	Foam appearance
Strain ZW-3 fermentation fluid	336	35	Tiny and compact
Sodium dodecylsulphonate	348	16	The size is different

发酵液泡沫致密, 发酵成本低, 易于生物降解, 不会造成污染, 说明菌株 ZW-3 的发酵液作为油田开采调剖工艺中的发泡剂也是非常有前景的。

### 3 结论

#### 3.1 脂肽生物表面活性剂代谢菌株的快速筛选

近年来, 人们一直采用血平板法和扩油圈法筛选代谢脂肽生物表面活性剂的菌株, 但这样不仅工作效率低下, 且不能有效将代谢脂肽的微生物从中区分开。脂肽的生物合成是由表面活性素合成酶基因操纵子(*srf* operon)复合多酶体系催化进行的, *Sfp* 基因(枯草杆菌磷酸泛酰巯基转移酶基因)位于 *srf* 操纵子的下游, 片段长 4kb, 是参与脂肽代谢的第二调控元件, 换言之, *sfp* 基因在脂肽的合成中是必不可少的。所以在本研究中, 我们针对 *sfp* 基因序列设计了

探针, 通过 *sfp* 基因 PCR 从一组生物表面活性剂代谢菌株中筛选到一株代谢脂肽的菌株 ZW-3, 实验发现 *sfp* 基因 PCR 结果稳定, 重复性强, 说明它是严格保守的基因序列, 进一步利用 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定 ZW-3 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 并利用 HPLC 鉴定代谢物为脂肽类表面活性剂, 从而建立了一套快速分离检测代谢脂肽类生物表面活性剂的枯草芽孢杆菌的方法。

### 3.2 脂肽生物表面活性剂的 CMC 值及乳化活性

实验结果表明, 本文报道的脂肽生物表面活性剂其 CMC 值约为 33.3mg/L, 低于很多其他的生物表面活性剂和化学合成表面活性剂, 临界胶束浓度(CMC)可以看作生物表面活性剂在水的溶解度或者是该表面活性剂要求达到最大表面活性的最小的浓度, 因此如此低的 CMC 值说明 ZW-3 菌株代谢的脂肽生物表面活性剂具有较高的表面活性剂; 同时其发酵液乳化活性为 2.89U, 稀释 10 倍后, 乳化活性为 1.36U, 仍能达到有关文献报道的生物表面活性剂原液乳化活性水平, 说明该脂肽生物表面活性剂具有很好的乳化活性, 为其商业开发提供了保证。

### 3.3 脂肽生物表面活性剂对原油作用的研究

该脂肽表面活性剂具有较强的降低表/界面张力的能力, 发酵液可将表面张力从 68.92mN/m 降低到 25.19mN/m, 油水界面张力由 27.88mN/m 降低到 4.57mN/m, 与 1.8%(WT/V)的 NaOH 溶液复配可以将油水界面张力降低到  $1.2 \times 10^{-3}$  mN/m 这样超低的界面张力水平, 可以和大多数目前在石油开发中应用的化学合成表面活性剂媲美; 同时对原油具有较强的乳化作用和发泡性能。相对于化学表面活性剂, 生物表面活性剂具有可生物降解、减少污染、无毒或低毒、具有更好的环境相容性的特点, 生物表面活性剂与化学合成表面活性剂复合配伍进行石油开发, 降低化学表面活性剂用量, 进而降低成本和减少环境污染已经成为今后微生物采油技术的重要研究方向, 因此, 该脂肽表面活性剂的应用领域将非常广, 是一种在微生物采油中很有应用前景的生物表面活性剂。

## 参 考 文 献

[1] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1968, 31(3): 488-494.

- [2] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotech*. 1999, 51(5): 553-563.
- [3] Tullin EE, Amaki Y, Nagasawa T, et al. A *Bacillus stearothermophilus* esterase produced by a recombinant *Bacillus brevis* stabilized by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol. Biochem*. 1993, 57(4): 856-857.
- [4] Lin SC, Sharma MM, Georgiou G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Biotechnology progress*. 1993, 9(2): 138-145.
- [5] Sambrook J. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] Hsieh FC, Li MC. Rapid Detection and Characterization of Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. *Current Microbiology*. 2004, 49: 186-191.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol*, 1969, 3: 208-218.
- [9] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*, 1962, 5: 109-118.
- [10] Cooper DG, Macdonald CR. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol*. 1981, 42(3): 408-412.
- [11] 吕应年, 杨世忠, 牟伯中. 脂肽的分离纯化与结构研究. 微生物学通报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2005, 32(1): 67-73.
- [12] MacDonald CR, Cooper DQ, Zajic LE. Surface-active lipids from *Nocardia ertheropolis* grown on hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*. 1981, 41: 117-123.
- [13] Jain DK, Collins-Thompson DL. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods*. 1991, 13: 271-279.
- [14] Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Ferment Technol*, 1984, 62: 311-314.
- [15] Lin SC, Lin KG, Lo CC. Enhanced biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* mutant. *Enzyme microbial technol*. 1998, 23: 267-273.

## Isolation and identification of surfactin producing *Bacillus Subtilis* strain and its effect of surfactin on crude oil

Dawei Wang<sup>1</sup>, Yongjian Liu<sup>1\*</sup>, Zhongping Lin<sup>2</sup>, Zhenyu Yang<sup>3</sup>, Chunlei Hao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Petroleum Engineering College, Daqing Petroleum Institute, Daqing 163318, China)

<sup>2</sup> College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

<sup>3</sup> Daqing Exploration & Development Institute, Daqing 163712, China)

**Abstract:** Strains producing biological surfactants were isolated from formation water of Daqing oil field, Heilongjiang Province, China. From which a lipopeptide producing strain ZW-3 was screened out by PCR of the *sfp* gene. The morphology, cultural characteristics, physiological, biochemical properties and chemotaxonomy of strain ZW-3 were studied. The strain is rod shaped (0.7 ~ 0.8  $\mu\text{m}$  × 2 ~ 3  $\mu\text{m}$ ), gram-positive, spore-forming and aerobic bacteria. Its (G+C) content was determined to be 42.2 mol%. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence demonstrated that it was closely related to the genus *Bacillus subtilis*, and the metabolites of strain ZW-3 was analyzed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography, the result indicated that the biosurfactant strain ZW-3 produced was surfactin. It could reduce surface tension of bacterial fermentation culture medium and water/oil- interfacial tension from 68.82 mN/m to 24.88 mN/m and from 23.53 mN/m to 4.57 mN/m, respectively, and its mixture with 1.8% NaOH could reduce water/oil- interfacial tension to an ultra low level ( $1.2 \times 10^{-3}$  mN/m), Its critical micelle concentration (CMC) was tested to be 33.3 mg/L ( $3.24 \times 10^{-5}$  mol/L) at 25°C, and it had excellent emulsifying (2.89U) and foaming property. All these results showed that this biosurfactant had great potential in pharmaceuticals, environmental protection, cosmetic, oil recovery and many other application fields.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; polyphasic taxonomy; lipopeptide; biosurfactant; physico-chemical properties; crude oil

Supported by the Chinese Science and Technology Ministry Important Foundation (2005CCA06200) and the Heilongjiang province Natural sciences Fund Project (E200523)

\*Corresponding author. Tel: +86-459-6506155; E-mail: lyj@dqpi.net

Received: 31 August 2007/ Revised: 4 November 2007

### 《微生物学报》发表的论文荣获“第五届中国科协期刊优秀学术论文奖”

为了提高学术期刊质量,鼓励科技工作者发表高质量的学术论文,促进学科发展和人才成长,自2003年起,中国科协每年举办一次期刊优秀论文评选活动。2007年《微生物学报》编辑部推荐中国农业大学生物学院李峰等的论文参加第5届评比活动【李峰,李颖,姜伟,王珍芳,李季伦.趋磁螺菌遗传操作体系的建立及磁小体缺失突变株的筛选.2004,44(4):440-444】,经专家评审委员会评审,此文荣获第5届中国科协期刊优秀学术论文奖。

2004年中国科学院微生物研究所陈远童等人的论文获得了第2届优秀学术论文奖【陈远童,庞月川,郝秀珍.微生物发酵生产十三碳二元酸的研究.39(3):279-281】。

每年中国科协评奖数量都有所增加,不限制编辑部论文的数量。《微生物学报》编辑部希望能有更多的作者参与此项活动,今后我们将积极报名参加这项活动大力向科协推荐,使本刊成为广大作者真正的朋友。以下为参评的具体要求(有意参加者请先发e-mail告知编辑部。欢迎参与!)

1. 评选范围: 评选当年前6年内发表在本刊的学术论文。

2. 参评论文要求: 具有科学性、创新性和探索性,论点明确、论据可靠,论证严谨,结论正确。

3. 论文推荐途径: 采用“编辑部推荐”和“作者个人自荐”两种方式。有意自荐者,可通过中国科协网站 <http://www.cast.org.cn> 下载“自荐表”。

4. 参评材料:

(1) 纸质材料(要求用A4纸): 论文完整页码的复印件; 有关论文的获奖和引用的证明材料,一式两份; 填写好的自荐表,一式两份。请作者在每年7月10日前将上述3份材料邮寄到本刊编辑部,信封上请注明:优秀论文评比。

(2) 电子文件(由编辑部和学会准备): 论文的电子文件(与发表期刊一致的PDF格式电子文件; 学会统一填写的上报论文登记表。