

油脂化学

一株高效油脂降解菌的分离鉴定及其性能研究

刘婕, 杨博

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要:从餐馆隔油池废水中筛选分离得到一株能高效降解油脂的芽孢杆菌 DK-1, 经 16S rDNA 同源性序列分析, 鉴定为解淀粉类芽孢杆菌, 并进一步考察了菌株的生物量、油脂去除率、COD_{Cr} 去除率及乳化活性等性能。实验结果表明, 菌体的乳化指数为 65%, 在初始油脂质量浓度为 5 g/L, COD_{Cr} 为 55 000 mg/L 左右的模拟高含油有机废水中, 该菌株能生长并快速降解油脂, 在 48 h 内油脂去除率为 97.3%, COD_{Cr} 的去除率为 91.9%。

关键词:筛选; 鉴定; 解淀粉类芽孢杆菌; 去除率

中图分类号: Q939; X785

文献标志码: A

文章编号: 1003-7969(2010)01-0041-04

Isolation, identification and characteristics of a high effective oil - degrading strain

LIU Jie, YANG Bo

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: An oil - degrading *Bacillus* stain DK - 1 was isolated from oil trap of one restaurant. By 16S rDNA sequence homology analysis, it was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The characteristics of the strain such as biomass, oil - degrading ability, COD_{Cr} removal ability and activity of emulsification were tested. The results showed that in simulated high - oil organic wastewater where the initial oil mass concentration was 5 g /L, COD_{Cr} was about 55 000 mg/L, the strain could grow and quickly degrade oils and fats. The removal rate of oils and fats was 97.3% , and COD_{Cr} removal rate was 91.9% in 48 h.

Key words: screening; identification; *Bacillus amyloliquefaciens*; removal rate

油脂是生活废水中引起环境污染的一个重要原因, 未经处理直接排放的生活废水中的油脂与其他颗粒物聚集起来可引起下水管道堵塞甚至破裂^[1,2]。此外, 排入水体的油脂漂浮在河水、湖泊等水面上造成水体溶氧不足, 严重影响水体的生态环境。

目前用于油脂废水处理方法有物理法、化学法和生物法, 生物法因其处理效果好、成本低、无二次污染等优点逐步成为首选方法。故从自然界中筛选高效除油微生物并研究其降解工艺已成为目前油

脂废水处理的热点^[3-7]。

芽孢杆菌属因其可产生芽孢, 对环境的耐受性好、抗逆性强、无致病性等优点, 逐步成为治理环境污染的首选菌种。本文以芽孢杆菌的筛选鉴定为基础, 初步探讨了所筛分到的芽孢杆菌菌株的性能, 为菌株的实际应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 菌种样品

取自餐馆隔油池废水。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, 培养基 pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 富集培养基 K₂HPO₄ 3 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 大豆油质量浓度为 10 g/L, 培养基 pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

收稿日期: 2009-07-04; 修回日期: 2009-11-04

基金项目: 广东省科技攻关项目(2007A020100001-3)

作者简介: 刘婕(1984), 女, 硕士研究生, 主要从事油脂废水生物处理方面的研究工作(Tel) 13560142450 (E-mail) liujiej@126.com。

通讯作者: 杨博

1.2.3 驯化培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, NaCl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, 大豆油质量浓度分别为 0.25、0.5、1、2.5、5 g/L, 培养基 pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.4 选择性平板培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, NaCl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L; 大豆油质量浓度 10 g/L, pH 7.2, 琼脂 20 g/L。将上述溶液加入少许乳化剂于微波炉中加热至琼脂完全溶解后用均质机将油脂分散成很均匀的体系, 待冷却至 60 °C 左右时于超净台中倒入无菌平板中, 冷却后用紫外灯照射灭菌 30 min 以上备用。

1.2.5 高含油有机废水培养基 K_2HPO_4 0.3 g/L, NaCl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 2.5 g/L, 大豆油质量浓度 5 g/L, 培养基 pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 菌种的分离纯化

量取一定量餐馆隔油池废水于 80 °C 下放置 15 min, 之后接入富集培养基中, 待培养液中油脂降解完之后再重新接入新鲜的富集培养基中, 如此重复 3 次后再将其接入大豆油质量浓度依次升高的无机盐培养基中进行驯化。于 37 °C、200 r/min 驯化 5 个周期, 每个周期 5 d。

驯化结束后, 取一定量涂布于以大豆油为唯一碳源的选择培养基平板上。待菌落长出后, 挑取生长旺盛单菌落点接入选择培养基平板上。培养 48 h 后挑取透明圈稍大的菌落进行多次重复划线分离, 直至得到纯菌种。纯化后的菌株贮存于 4 °C 冰箱中备用。

1.4 菌株 16S rDNA 鉴定

采用酚-氯仿-异戊醇法提取细菌 DNA 为 PCR 扩增的模板, 应用 Oligo5.0 设计引物对, 分别命名为 P16sF1 和 P16sR1, 该引物对可扩增出全长的 16S rDNA 序列, 预期扩增片段大小为 1.5~1.6 kbp。

P16sF1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT;

P16sB1: TACGGCTACCTTCTTACGACTCACCCC。

PCR 程序: 94 °C 预变性 5 min; 循环体采用 94 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 30 个循环; 最后一次延伸 10 min, 于 4 °C 保存。PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳验证后直接进行测序, 测序结果应用 Blast 软件与 Genbank 上序列进行同源性的比较。

1.5 菌体乳化活性的测定

用接种环从菌种斜面上挑取一定的菌体接种于 LB 培养基中, 在 37 °C、200 r/min 摇床中振荡培养 24 h 后于 6 000 r/min 冷冻离心 10 min 后收集上清

液备用。然后在带刻度的磨口试管中, 加入 4 mL 大豆油和 6 mL 上清液, 涡旋振荡器充分振荡 2 min, 室温静置 24 h 后测量乳化层高度, 以乳化指数 (Emulsification index) 表示乳化物质的乳化活性, 如乳化指数大于 50%, 则表示该乳化液稳定^[8]。

乳化指数 = 乳化层高度 / 有机相总高度 × 100%

1.6 模拟高含油废水中菌株性能的测定

用接种环从菌种斜面中接入少量菌体于 LB 培养基中培养 10~12 h 后接种于 1.2.5 所述培养基中, 该培养基初始大豆油质量浓度为 5 g/L, 初始 COD_{Cr} 约为 55 000 mg/L, 每隔 8 h 取样检测培养液中的菌体生物量、残油含量和 COD_{Cr} 降解情况。

1.6.1 菌体生物量的测定 菌体生物量的测定采用 UV7200 型分光光度计于 600 nm 处测得的吸光度 $OD_{\text{菌体}}$ 表示, 通过菌液所产生的 $OD_{\text{菌液}}$ 值减去油脂乳化产生的上清液的 $OD_{\text{上清液}}$ 值计算而得, 即 $OD_{\text{菌体}} = OD_{\text{菌液}} - OD_{\text{上清液}}$ 。

1.6.2 残油含量的测定 残油含量的测定采用紫外分光光度法^[9]。

1.6.3 COD_{Cr} 的测定 COD_{Cr} 的测定参照国家标准 GB 11914—1989 的重铬酸钾法。

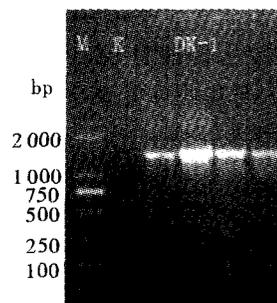
2 结果与讨论

2.1 菌种分离纯化

从餐馆隔油池废水中经富集、驯化、分离、纯化后分离到一株油脂降解菌, 命名为 DK-1。

2.2 菌株 16S rDNA 鉴定结果

以所提取的基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增后其产物的电泳图如图 1。图 1 表明, PCR 结束后经过琼脂糖凝胶电泳检测出了预期条带。扩增产物直接测序, 所得结果运用 Blast 软件进行分析, 结果表明该序列与解淀粉类芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的同源性为 97%, 故确定为解淀粉类芽孢杆菌。



M.DNA Marker; K. 阴性对照; DK-1. 菌株编号

图 1 DK-1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.3 菌株的乳化活性

油脂因其比重小、疏水等性质, 使得其大部分均

聚集、漂浮于水体表面,形成油层或油滴,限制微生物对其的利用。DK-1能产生具有良好乳化作用的生物表面活性剂,能将油脂乳化使其均匀分散于水体中,故能加大其对油脂的接触面积,更好地降解油脂。经测定DK-1乳化指数为65%,表明DK-1产生的生物活性物质有较好的乳化效果,使该菌株能更好地利用、降解油脂。

2.4 菌体生物量的变化

菌体在培养体系中生物量的变化如图2。图2表明菌体接种后适应性好,繁殖能力强,菌体生物量在前40h呈现持续上升的趋势,无明显的延滞期,在40h时其 $OD_{菌体}$ 值达18.36,在40h后菌体生物量达到稳定状态,菌体生物量不再增加。

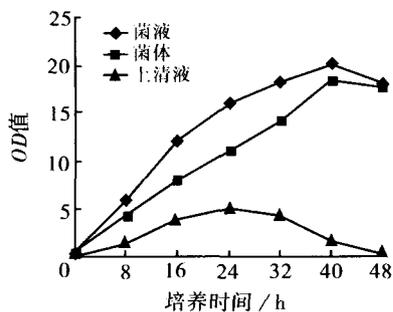


图2 菌体生物量的变化

2.5 油脂去除率随时间的变化(见图3)

微生物对油脂的去除主要依靠自身分泌出的脂肪酶水解乳化体系中的油脂分子成为可被吸收利用的小分子,进而被进一步降解来完成的。图3表明,随着时间的延长,菌株的油脂去除率相应增加,在前8h对油脂的去除速率较慢,在8~16h时迅速增加,在48h时其去除率达97.3%。

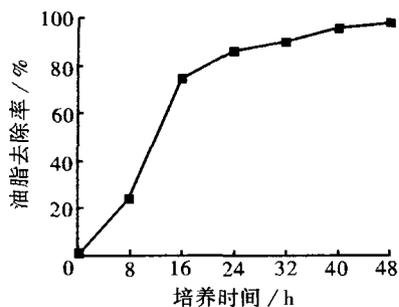


图3 油脂去除率随时间的变化

2.6 COD_{Cr} 随时间的变化(见图4)

油脂、蛋白质等大分子物质是引起水体中 COD_{Cr} 增加的主要成分。图4表明,DK-1对高含油废水中的 COD_{Cr} 去除有明显效果。在48h时,经离心后上清液的 COD_{Cr} 降为4492 mg/L,对 COD_{Cr} 去除率达91.9%。

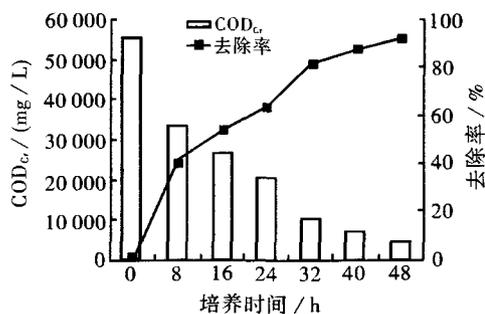


图4 COD_{Cr} 随时间的变化

3 结论

从餐馆隔油池废水中分离到一株高效油脂降解菌DK-1,经16S rDNA鉴定确定为解淀粉类芽孢杆菌。经实验表明,当油脂质量浓度为5 g/L时,菌体能迅速生长繁殖,到40h时其菌体的 $OD_{菌体}$ 值达18.36,培养48h后其油脂去除率为97.3%, COD_{Cr} 的去除率为91.9%。且该菌能产生具有良好乳化效果的生物表面活性剂,使得培养液能迅速被乳化成白色均匀的体系,其乳化指数为65%,表明该物质能产生稳定的乳化效果。但其产生的表面活性剂的成分尚未确定,还需进一步的研究。由于该菌自身能乳化油脂,因此在除油过程中无需额外投加乳化剂或表面活性剂,在一定程度上降低了油脂废水的处理成本,故该菌对于油脂废水的处理具有较好的应用前景,如将其与其他无乳化活性的降油菌联合使用,可进一步缩短处理时间,提高油脂废水处理效率。

参考文献:

- [1] TORU M, AKIRA M, TOSHIO I, et al. Effect of fatty oil dispersion on oil-containing wastewater treatment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 118: 255-258.
- [2] MONGKOLTHANARUK W, DHARMSTHITI S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50(2): 101-105.
- [3] SHOKROLLAHZADEH S, AZIZMOHSENI F, GOLMOHAMMAD F, et al. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6127-6133.
- [4] CAMMAROTA M C, FREIRE D M G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(17): 2195-2210.
- [5] DANALEWICH J R, PAPAGIANNIS T G, BELYEA R L, et al. Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal[J]. Water Res, 1998, 32(12): 3555-3568.

蔷薇果黄酮类物质对油脂的抗氧化作用

张春兰, 叶林, 吴晓军, 张利莉

(塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:以蔷薇果为原料, 研究黄酮类提取物对菜籽油和猪油的抗氧化性。结果表明: 蔷薇果中黄酮类提取物对菜籽油及猪油均有一定的抗氧化作用, 在一定添加范围内其作用具有剂量效应关系; 柠檬酸、V_C 对蔷薇果黄酮类提取物抗氧化效果都有一定的增效作用。

关键词:蔷薇果; 黄酮类化合物; 抗氧化作用

中图分类号: TQ641; TS202

文献标志码: A

文章编号: 1003-7969(2010)01-0044-03

Antioxidation effect on edible oils of flavonoids extracted from rose hips

ZHANG Chunlan, YE Lin, WU Xiaojun, ZHANG Lili

(College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: The flavonoids were extracted from rose hips, and the antioxidation of flavonoids in rose hips on rapeseed oil and lard was studied. The result showed that the flavonoids had good antioxidation effects on rapeseed oil and lard, and the effects had dose-dependent. The citric acid and vitamin C exhibited synergistic effects to the flavonoids.

Key words: rose hips; flavonoids; antioxidation

油脂氧化是食品工业中经常遇到的、严重影响食品品质的主要问题之一。黄酮类化合物是一类天然的、具有抗氧化活性的化合物, 广泛存在于植物体内, 因其同时具有高效性和安全性而成为研究的热点。野蔷薇 (*Rosa* spp) 是一种多年生落叶小灌木, 新疆地域广大, 蔷薇灌木果类资源极其丰富^[1,2]。蔷薇果实中含有丰富的营养成分及生物活性物质, 其中黄酮类化合物含量较高^[3]。本文对蔷薇果实

中黄酮类物质的抗氧化性进行研究, 为进一步综合开发新疆野生蔷薇资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

蔷薇果, 采自新疆阿拉尔。菜籽油, 市售; 猪油, 市售新鲜猪板油切成小块, 经熬炼、过滤后备用。

芦丁 (Sigma 公司), 生化试剂; 异辛烷、冰乙酸、碘化钾、硫酸、可溶性淀粉、硫代硫酸钠、重铬酸钾、无水乙醇、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、二丁基羟基甲苯 (BHT)、没食子酸丙酯 (PG)、V_C 等均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

RE-201D 旋转蒸发器, SHB-B95A 型循环水式多用真空泵, 756 型紫外可见分光光度计, DHG-9030A 电热恒温鼓风干燥箱, AR2140 电子天平。

收稿日期: 2009-07-04

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (项目批准号 NCEF06-0917); 新疆高校科研计划创新研究群体基金项目 “新疆特色资源生物活性物质的研究 (XJEDU2005G07)”

作者简介: 张春兰 (1979), 女, 讲师, 研究生, 主要从事食品科学及天然产物方面的研究工作 (E-mail) zcl790225@163.com。

通讯作者: 张利莉, 教授。

[6] MARSHALL K R, HARPER W J. The treatment of wastes from dairy industry [M]//BARNES D. Food and Allied Industries, 1984; 296-376.

[7] LOPERENA L, FERRARI M D, DIAZ A L, et al. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters [J]. Bioresource Tech-

nology, 2009, 100(5): 1762-1766.

[8] LIU Y, BUCKLEY J S. Evolution of wetting alteration by adsorption from crude oil [J]. SPE Formation Evaluation, 1997, 12(1): 5-11.

[9] 沈叔平, 汪小梅. 废水中动植物油脂的紫外分光光度测定法 [J]. 中国环境监测, 1994, 10(3): 4-7.