[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[7]
C02F 3/34

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98810331.1

[43]公开日 2000年12月13日

[11]公开号 CN 1276771A

[22]申请日 1998.10.14 [21]申请号 98810331.1

[30]优先权

[32]1997.10.20EP [33]EP [31]97870158.9

[86]国际申请 PCT/BE98/00152 1998.10.14

[87]国际公布 WO99/20571 英 1999.4.29

[85]进入国家阶段日期 2000.4.19

[71]申请人 雷亚尔科2001股份有限公司

地址 比利时新卢万

[72]发明人 菲利普·勒当 亨利·米歇尔

斯皮罗·阿加顿斯 菲利普·德米特南

戈登·布拉克芒

[74]专利代理机构 北京市专利事务所

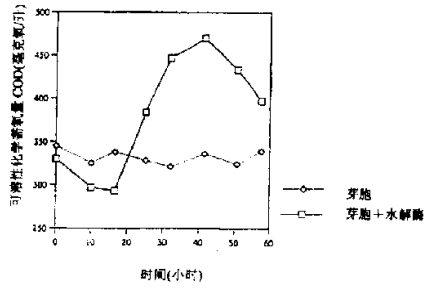
代理人 鲁 兵

权利要求书1页 说明书9页 附图页数3页

[54]发明名称 一种减少去污剂对微生物的萌发和/或生长影响的方法

[57]摘要

本发明涉及一种消除或减少去污剂对微生物的萌发和/或生长影响的方法，其特征在于往所说微生物的水培养基中加入足够量的一种或多种酶。



ISSN1008-4274

00.04.19

权 利 要 求 书

1. 一种消除或减少去污剂对存在于水培养基中微生物的萌发和/或生长影响的方法，其特征在于往所说微生物的水培养基中加入足够量的一种或多种酶。

2. 按照权利要求 1 的方法，其特征在于所说的酶选自由蛋白酶、纤维素酶、α-淀粉酶和脂肪酶组成的集合，或为它们的混合物。

3. 按照权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于所说的去污剂含有一种表面活性剂，这种表面活性剂优选自由阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、两性离子型表面活性剂和/或非离子型表面活性剂组成的集合。

4. 按照上述权利要求任意一项的方法，其中的水培养基为废水流出物。

5. 按照上述权利要求任意一项的方法，其特征在于所说的微生物为一种细菌类组。

6. 按照权利要求 5 的方法，其特征在于所说的细菌选自由属于假单胞杆菌属、芽胞杆菌属、不动杆菌属和红球菌属的菌株组成的集合。

7. 按照权利要求 1 至 4 任意一项的方法，其特征在于所说的微生物选自由真菌和微藻组成的集合。

8. 按照上述权利要求任意一项的方法，其特征在于所说的微生物为休眠芽胞。

9. 按照权利要求 1 至 7 任意一项的方法，其特征在于所说的微生物为生长分化细胞。

10. 按照上述权利要求任意一项的方法，其特征在于所加入的酶的量，为每 100 毫升含 0.001 至 1000 ppm 去污剂的水培养基中含有 1 至 5000 微克的酶。

说　　明　　书

一种减少去污剂对微生物的萌发和/或生长影响的方法

本发明涉及一种消除或减少去污剂对微生物萌发和/或生长影响的方法。该方法将会改善工业发酵过程，特别是对特定受污染污水流出物的处理。

含有一种表面活性剂或者几种表面活性剂（阳离子型、阴离子型、两性离子型和/或非离子型表面活性剂）混合物的去污剂具有广泛的工业用途，也是洗衣店、家庭和个人（如洗发水和化妆品）清洁产品中常用的成份。

含有表面活性剂线性烷基苯磺酸盐（LAS）的去污剂是当今商业上使用最广泛的去污剂。这些化合物被排放在废水中，而且通常在污水处理期间才被清除。在厨房、浴室和洗衣房的流出物中，LAS 的浓度为 35 至 125 毫克/升不等（Durand 和 Golicheff，1978）。

许多关于去污剂中表面活性剂对微生物生长的潜在抑制作用的文献报告已经发表，而结果经常是存有争议的。例如，Konopka 等（1996）报道，当 LAS 的浓度大于 40 毫克/升时，LAS 降解性微生物被抑制，而 Sigoillot 和 Nguyen（1992）报道了在 LAS 的浓度大到 700 毫克/升时，培养基被富集。

Rouse 等（Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 第 24 卷，第 4 期，第 325～370 页，1994）报道，表面活性剂与细胞膜脂和酶的空间和构象的相容性会影响有机化合物的微生物降解。

对于特定受污染的水流出物的处理来说，使用纯培养物或者确定的微生物聚生体是一种广泛传播的技术。经常报道的细菌有属于假单胞杆菌属、芽胞杆菌属、不动杆菌属和红球菌属的菌株（Chitra 等，1996；Zissi 和 Lyberatos, 1996; 俄罗斯专利申请 96441455.44；Iliuta, 1997; 法国专利申请 FR-97154177.14）。真菌和微藻类在该领域中也有许多用途（Feijoo 等，1995；Travieso 等，1996；Pena 等，1996；Ahn 等，1996；俄罗

斯专利申请 RU-97152804.14 ）。

主要应用包括重金属的清除（ Macaskie 等， 1997 ）、酚类化合物的降解或沉淀（ Borja 等， 1995 ）、森林工业流出物沉淀的处理（ Jaspers 和 Penninckx ， 1996 和国际专利申请 PCT/BE93/00014 ）以及脂肪、油和动物脂的降解（ Wakelin 和 Forster ， 1997 ）。

芽胞杆菌属包括多种工业上的重要菌种，在发酵工业中它们通常被用作宿主（ Arbige 等， 1996 ）。使芽胞杆菌成为发酵生产的优选微生物之一的各种原因有：芽胞杆菌属中的大多数成员是非致病菌，相对容易进行基因操作，培养简单以及能够分泌多种酶（包括蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和其它降解酶）的良好分泌器。此外，芽胞杆菌能够形成孢子，这种特征对于商用菌种的调节和长期保存是很有用的。

Adney 等（ Biotechnology and Applied Biochemistry ，第 11 期，第 387 ～ 400 页， 1989 ，）描述了在城市固体垃圾的厌氧消化中胞外水解酶的检测方法。该文献描述了在将城市固体垃圾碾碎后，填入稳定的实验室规模浸煮器中，取其上清液，可以在痕量水平检测到 α -淀粉酶和蛋白酶。该文献还描述了通过使用一种去污剂的提取方法，可以使污泥颗粒中纤维素酶、β -葡糖苷酶、α -葡糖苷酶、蛋白酶和 α -淀粉酶的活性恢复，但其水解酶活性很低。

美国专利 US-4,940,539 描述了用于处理含有动物脂和外来物质的废水的装置，用含有大量的酶混合物（ 2500 单位/毫升蛋白酶、 200 单位/毫升淀粉酶、 10 单位/毫升脂肪酶、 5 单位/毫升纤维素酶）和细菌芽孢（ 50 × 10^6 细菌芽孢/毫升）的水组合物来处理废水。这些酶和细菌芽胞作用于废水中的动物脂、脂肪和其它物质，使总的固体物质实质性减少和可溶性固体物质增加以及废水 BOD （生物需氧量）水平实质性降低。

同样地，美国专利 US-5,468,375 描述了一种用于在废水进入城市污水处理设施前消除或减少家庭生活污水中污泥固体物质的量的装置。在所说的装置中，往污泥处理池的废水中加入了大量的细菌和酶的混合物。所说的前处理减轻了城市污水处理设施的负担，从而减轻了该设施超容量的危险。

美国专利 US-4,237,003 描述了一种液体垃圾的生物纯化过程，该处理过程在有革兰氏阳性菌产生的胞外酶的存在下，使用大量的厌氧菌，然后分离所说的革兰氏阳性菌和其中所含的胞内酶。与现有技术相比，按照所说方法的厌氧处理过程能减少污泥的产量和缩短滞留时间。

国际专利申请 WO95/15924 报道，在污水处理过程中发现芽胞杆菌亚种分泌的胞外酶与真菌的纤维素酶联合应用能够协同降解纤维素、碳水化合物、脂肪和蛋白质，该组合物包括一种芽胞杆菌的亚种培养物和一种真菌纤维素酶。

但是，上述文献都没有描述或说明少量的酶可用来消除或减少去污剂，尤其是含有表面活性剂的去污剂对微生物的萌发或生长的影响，从而改进受污染的水流出物的处理。

本发明的目的在于提供一种消除或减少去污剂对水培养基中的微生物，尤其是细菌的萌发和/或生长影响的方法。

本发明的另一个目的是提供一种不需要使用昂贵的和有毒性的产品和处理过程的方法。

本发明的再一个目的是提供一种方法，该方法通过消除或减少所说去污剂的影响，附加改进所说微生物的工业发酵过程，特别是处理含有所说去污剂的特定受污染的水流出物。

本发明涉及一种方法，在该方法中，向可能进行遗传改造的微生物的水培养基中加入一种或多种足够量的酶来消除或减少去污剂，尤指那些含有表面活性剂（优选于由含有阳离子型、阴离子型、两性离子型和/或非离子型表面活性剂的表面活性剂组成的集合）的去污剂对所说水培养基中所说微生物萌发和/或生长的影响。

特别是，所说的酶选自由蛋白酶、纤维酶、α-淀粉酶和脂肪酶组成的集合，或为它们的混合物。

水培养基是指任何一种包含营养素（例如碳、氮和黄磷源，矿物组份如钠、钾，...）的水培养基，这些营养素天然允许所说培养基中的微生物萌发和/或生长。

根据本发明，所说的水培养基是指一种废水流出物（其中含有的最大

百分比的去污剂能完全抑制其中的微生物）。

根据本发明的一个优选实施方案，这种有可能进行遗传改造的微生物是一种菌株，它优选于由属于假单胞杆属、芽胞杆菌属、不动杆菌属和红球菌组成的集合。

根据本发明的另一个优选实施方案，所说的微生物选于由真菌（包括酵母）和微藻类组成的集合。

“消除或减少去污剂的影响”是指所说的酶的能力能够允许和/或促进水培养基中微生物的萌发和/或生长，这种水培养基中含有去污剂的浓度，能完全抑制所说微生物的萌发和/或生长；所述酶的容量，还能缩短微生物的生长延滞期，此后人们可以在所说的水培养基中测定所说微生物的密度的增加；此外，所述酶的容量还能/或促进或加速水培养基中所说微生物生长。

“足够量的一种或多种酶”是指在每 100 毫升含 0.001 至 1000 ppm（百万分之一，10^{-6}）去污剂（优选含有一种表面活性剂）的水培养基中含有 1 至 5000 微克酶，优选在每 100 毫升含 0.1 至 500 ppm 去污剂（优选含有一种表面活性剂）的水培养基中含有 10 至 500 微克酶，更优选在每 100 毫升含 0.5 至 250 ppm 去污剂（含有一种表面活性剂的优选）的水培养基中含有 50 至 400 微克酶。与本技术中描述的已知方法和装置中常用的量相比，本发明方法所说酶的用量特别低。

按照本发明的一个优选实施方案，水培养基中的微生物以休眠芽胞的形式和/或生长分化细胞的形式存在。

本发明的发明人意外地发现，按照微生物的野生型、微生物的存在形式（休眠芽胞或生长分化细胞）以及去污剂和存在于水培养基中去污剂的量（见附图 2），本发明的方法能调节酶的加入量。

有利的是，当微生物是以生长分化细胞的形式存在时，按照本发明方法的酶用量可以更低。

本发明的发明人还意外地发现，由于所说的水流出物中可能天然含有以休眠芽胞或生长分化细胞形式存在的微生物，所以按照本发明的方法能很容易而且低费用地改善特定受污染水流出物的微生物工业发酵过程。

因此，所说的微生物将能萌发和/或生长以及分泌新的酶，这些酶将提高微生物对去污剂抑制效应的保护性能。

因此，按照本发明的方法通过微生物改善工业发酵过程，特别是改善含有所说微生物的特定受污染的水流出物的处理，或者为了加速所说的发酵过程，往其中加入了微生物（以休眠芽胞或生长分化细胞的形式）的特定受污染的水流出物的处理。

另外，按照本发明的方法能够与一种或多种本技术领域中熟练技术人员悉知的以及在科技文献中已经记载的特定受污染水流出物的处理方法联用。例如，所说的方法可以与纸浆、冶金和化学工业中使用的重金属消除方法、酚类化合物降解方法、森林工业流出物的处理方法联用。

按照本发明的一个特定实施方案，在洗衣店、家庭或个人（洗发剂、化妆品）清洁用固体或液体去污剂中加入足够量的酶。

有利的是，在清洗期间或清洗后，所说的酶在所说的去污剂中应保持活性（通过载体或佐剂）状态，以便保持所说酶的活性，即减少表面活性剂（存在于去污剂中）对上面所述水培养基中微生物的萌发和/或生长的抑制作用的特性。

在下面的实施例中将参照附图详细描述本发明，这些附图作为本发明的非限制性说明。

图 1 代表在不同浓度的十二烷基苯磺酸盐的存在下，接种休眠芽胞（A）和生长细胞（B）的培养物的细菌生长随时间的变化情况。

图 2 代表导致完全抑制微生物生长的表面活性剂的浓度。

图 3 代表废水改良琼脂培养基上的细菌计数，培养基中废水/蒸馏水的比例如下：100:0（培养基 A）、50:50（培养基 B）、10:90（培养基 C）、培养基 D 参照平板计数琼脂培养基配制。

图 4 代表接种芽胞或芽胞和水解酶混合物的废水培养基的可溶性 COD（化学需氧量）随时间的变化情况。

为了开发一种用于城市废水处理的生物技术过程，本发明的发明人目前已经研究了芽胞杆菌属不同菌株的潜在性能。

他们意外地发现减少阴离子型、阳离子型、两性离子型和非离子型表

面活性剂对芽胞杆菌菌株混合物的萌发和生长抑制效应是可能的。

这种细菌聚生体在用家庭生活废水配制的和含有表面活性剂的液体和琼脂固体化培养基上的行为已有报道。

材料和方法

菌株

本研究所用的细菌聚生体包括芽胞杆菌属的不同菌株。

酶

本项工作中所用的商用酶是枯草芽胞杆菌蛋白酶、纤维素酶、α-淀粉酶和脂肪酶，产品说明书由 Realco 公司（Louvain-Ia-Neuve,比利时）提供。

表面活性剂

本研究试验过的商用表面活性剂有：Protectol KLC 80®、Plurafac LF 400®、Lutensol TO 89®和 Lutensol GD 50® (从德国 Ludwigshafen 的 BASF 获得)，Elfapur N 90®、Elfan NS 242®和十二烷基苯磺酸盐（从德国 Duren 的 AKZO Chemie 获得）和 Betaine ABB® (从比利时布鲁塞尔的 Mosselman 获得)。

培养基和培养条件

按照 Leitch 和 Collier(1996)描述的方法制备用于抑制阈测定的合成液体培养基。

家庭生活废水样品是在 Braine-Alleud(比利时)取自于悬在 Legere Eau 河上的管道末端，经高压消毒后，测定得到下列参数：总 COD=820 毫克氧/升；可溶性 COD=330 毫克氧/升； pH=7.2 。

酪蛋白氨基酸、Bacto Agar®和 Plate Count Agar®从 Difco(底特律，MI，美国)获得。

液体培养物在室温（20 ± 1°C）下用 250 毫升圆锥烧瓶进行操作，圆锥烧瓶内装 125 毫升培养基，摇床震荡，速度固定在 150 rpm （转每分钟）。

通过浊度测定（在 600 纳米处的 OD 值）来监测细菌的生物量随时间的变化情况。

化学需氧量（COD）

用 NBN-T91-201 标准测定化学需氧量（ COD ）。

非离子性表面活性剂浓度

按照 Rodier(1978)描述的比色法测定非离子型表面活性剂的浓度。Elfapur N 90®(壬基酚)用于制作标准曲线。被检测废水样品中非离子性表面活性剂的浓度为 3.2 （± 0.4 ） ppm 。

结果

表面活性剂对微生物的萌发和生长的抑制作用

用于试验的是 7 种广泛应用的表面活性剂，包括阴离子型（ A^-）、阳离子型（ C^+）、两性离子型（ AO ）和非离子型（ NI ）的化合物。含有 0 到 200 ppm 表面活性剂的 Leitch 和 Collier 培养基接种生长细胞或者接种休眠芽胞。

图 1 显示在十二烷基苯磺酸盐的存在下，细菌的生物量随时间的变化情况。对于从接种芽胞开始的培养物，至少在接种最初的 50 小时内， 1 ppm 的表面活性剂就足以延长细菌生长延滞期约 4 小时，而 10 ppm 的表面活性剂则可以完全抑制细菌生长（图 1A ）。当接种生长细胞时，这种抑制作用被大大地降低：最低浓度的表面活性剂没有显著作用，而最大浓度的表面活性剂延长细菌生长延滞期也仅约 10 小时（图 1B ）。

本工作测定了所研究的 7 种表面活性剂化合物对微生物生长（在接种最初的 50 小时内没有生长）产生完全抑制作用的浓度，并对接种生长细胞或是芽胞的值进行了比较（图 2 ）。当表面活性剂浓度为 1 到 50 ppm 时，除一种非离子表面活性剂 Lutensol GD 50® 没有抑制作用外，试验的其它化合物均能抑制芽胞的萌发和后续的生长。当培养基中接种生长细胞时，可观察到所试验的全部表面活性剂的抑制阈都有显著的提高。

微生物在废水改良琼脂培养基上的生长

用废水和蒸馏水按以下比例制备不同的琼脂固体化培养基： 100:0 （培养基 A ）、 50:50 （培养基 B ）和 10:90 （培养基 C ）。

所有的培养基每升含酪蛋白氨基酸 2 克、葡萄糖 2 克和 Bacto Agar® 15 克。在每批培养皿上接种适量体积的芽胞悬浮液或经稀释的生长细胞悬浮液使得每平板含有 100 cfu （菌落形成单位）。

图 3 显示了在 37°C 经过 24 小时孵化后计数的细菌菌落数。结果表示为在相同条件下接种和培养的平板计数琼脂培养基（培养基 D）上生长的菌落数的百分比。

对于含有未经稀释的废水培养基（培养基 A），不论接种物的性质如何，均可以观察到细菌生长被完全抑制。对于只接种生长细胞的培养基 B，这种抑制作用大大地降低了。对于最大稀释度的培养基（培养基 C），在接种芽胞和接种生长细胞组之间没有观察到显著差别。

水解酶的加入

在液体废水培养基上（250 毫升圆锥烧瓶内装有 125 毫升灭菌废水）接种 5×10^6 芽胞或者同量的芽胞加上中性枯草杆菌蛋白酶（390 微克）、纤维素酶（115 微克）、α-淀粉酶（235 微克）和脂肪酶（155 微克）。测定培养基的可溶性 COD（化学需氧量）随时间的变化情况（图 4）。当接种物只含有芽胞时，没有观察到培养基可溶性需氧量有显著的变化。再在培养基中加入水解酶，经过 18 小时的细菌生长延滞期后，可溶性 COD（化学需氧量）随时间的变化表现为钟态曲线。通过在平板计数琼脂培养基上的菌落计数测定在室温下培养 60 小时以后存活的细胞数。接种芽胞的培养基和接种芽胞与水解酶混合物的培养基的值分别为每 125 毫升 5×10^6 和 6×10^7cfu（菌落形成单位）。这些结果表明在培养基中再加入水解酶后，开始出现不溶性有机物质的溶解（反映在可溶性化学需氧量的增加），随后它被生长细胞消耗（反映在可溶性化学需氧量的减少和细菌密度的增加）。

在表面活性剂的浓度为 1 到 50 ppm，也就是接近于那些报道的家庭生活废水中的表面活性剂浓度时，除了一种非离子型表面活性剂 Lutensol GD 50 没有抑制作用外，受试的其它化合物均抑制芽胞萌发和芽胞杆菌的后续生长。芽胞萌发比细胞生长更易受表面活性剂的影响，当接种生长细胞时，抑制阈大大提高。

形成本研究所使用的聚生体的菌种在未经稀释过的废水琼脂培养基上不能生长。表面活性剂的存在可能是这种抑制作用的主要原因，因为正如前面测定受试的不同表面活性剂抑制阈时所观察到的，芽胞比生长细胞

对这种抑制更敏感。

当在液体废水培养基上接种芽胞时，还可以观察到芽胞完全没有生长。在所描述的实验条件下，似乎可以完全保存芽胞的完整性，因为在培养 60 小时后，计数的存活细胞数与刚开始接种的芽胞数完全一致。

在废水培养基中加入水解酶使芽胞得以萌发和后续生长的事实，构成本研究最显著的观察结果。这种意外的作用可能是由于（ i ）芽胞萌发的一种肽酶催化的活化作用和/或（ ii ）因为所加入水解酶的水解作用使一些大分子（例如蛋白质、多糖、甘油三酯）水解成为更小的分子（例如氨基酸、葡萄糖、甘油、脂肪酸）使有机物质容易被细胞吸收。

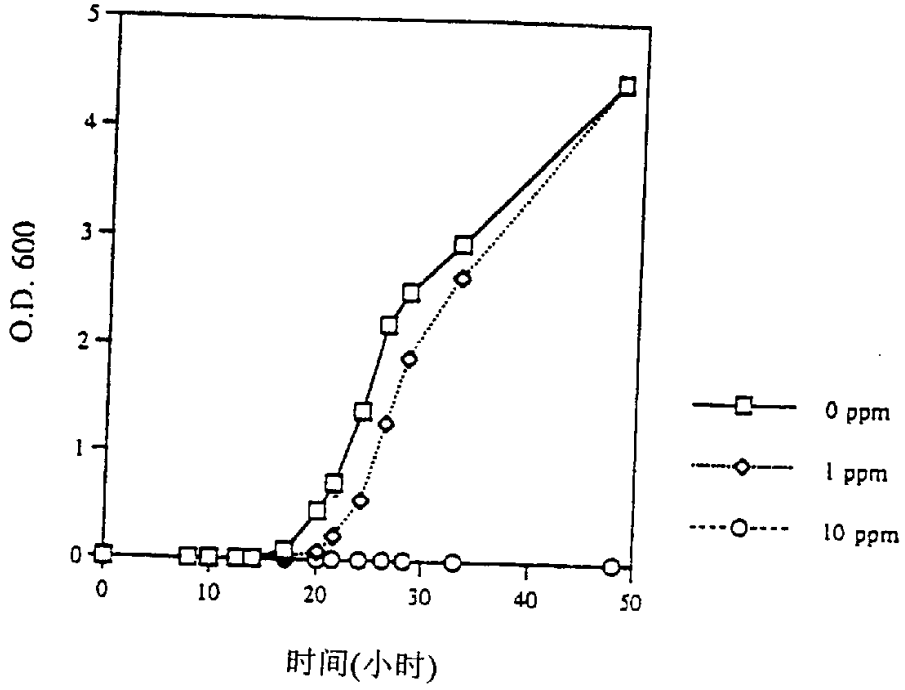

O.D. 600
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
时间(小时)
0 ppm
1 ppm
10 ppm

图 1a

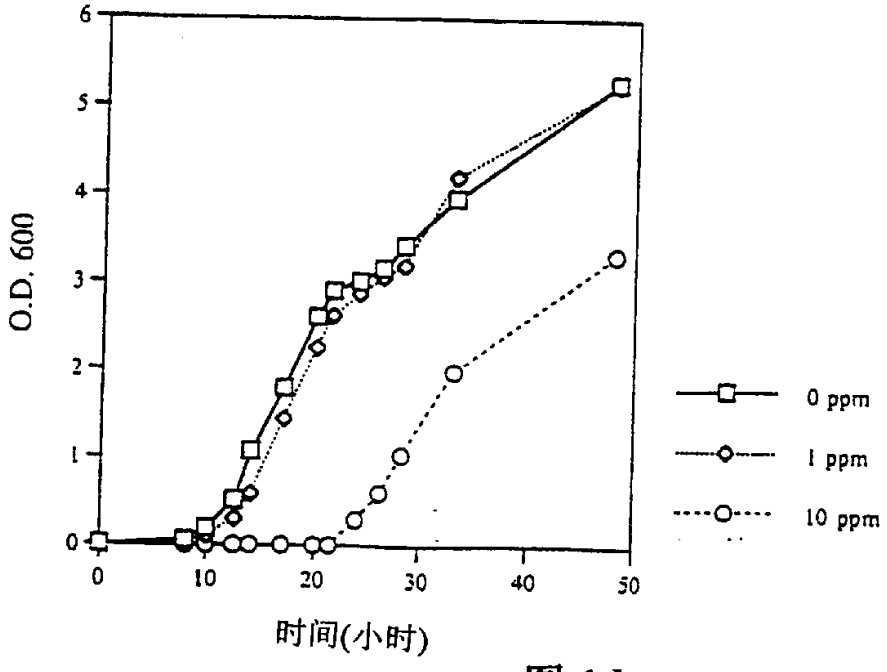

O.D. 600
0
1
2
3
4
5
6
0
10
20
30
40
50
时间(小时)
0 ppm
1 ppm
10 ppm

图 1 b

90-04-19

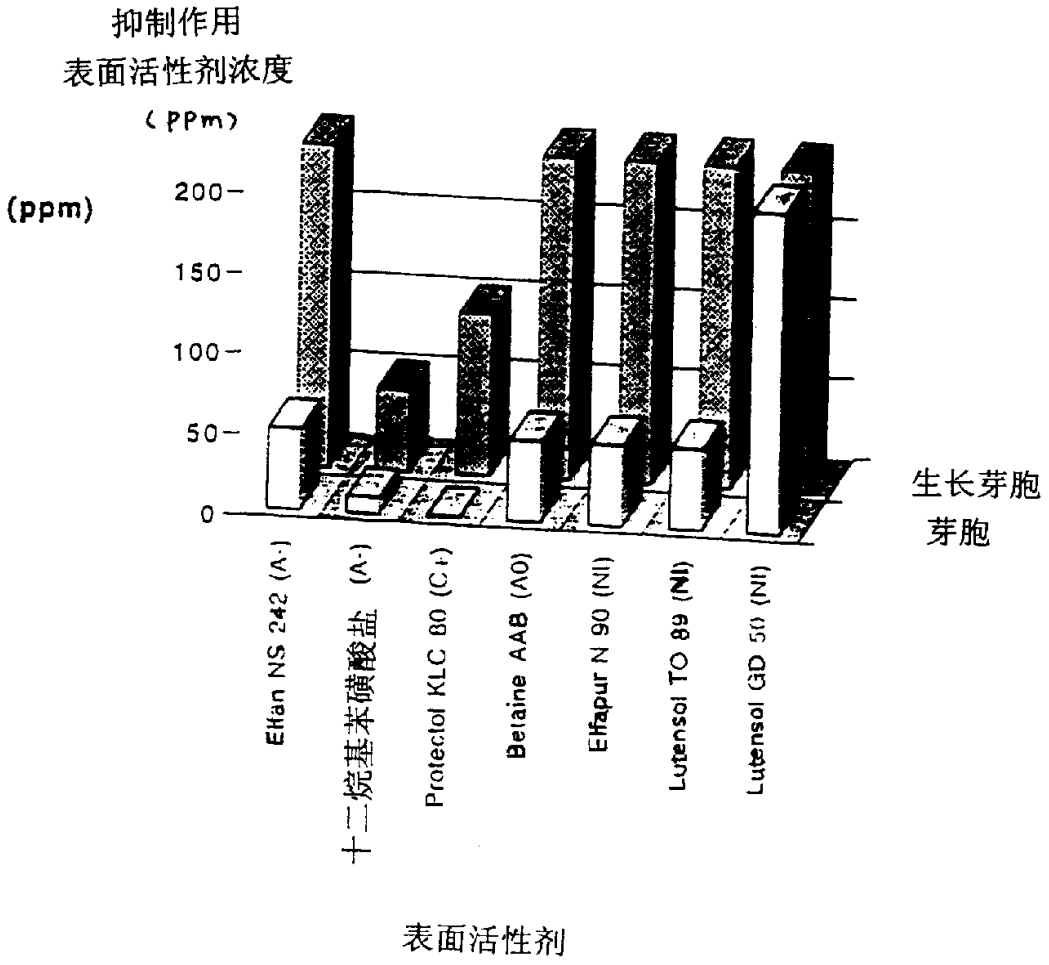

抑制作用
表面活性剂浓度
(ppm)
(ppm)
200
150
100
50
0
生长芽胞
芽胞
Efan NS 242 (A-)
十二烷基苯磺酸盐 (A-)
Protectol KLC 80 (C+)
Betaine AAB (AO)
Effapur N 90 (NI)
Lutensol TO 89 (NI)
Lutensol GD 50 (NI)
表面活性剂

图 2

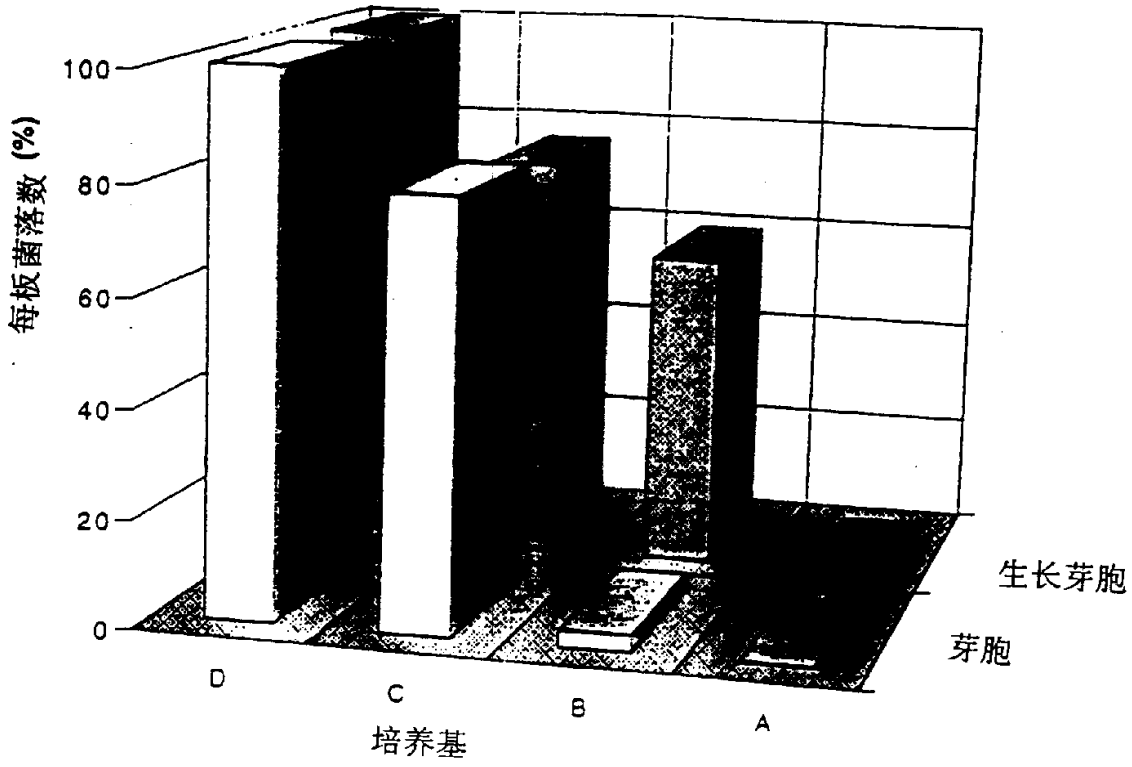

每板菌落数 (%)
100
80
60
40
20
0
D
C
B
A
培养基
生长芽胞
芽胞

图 3

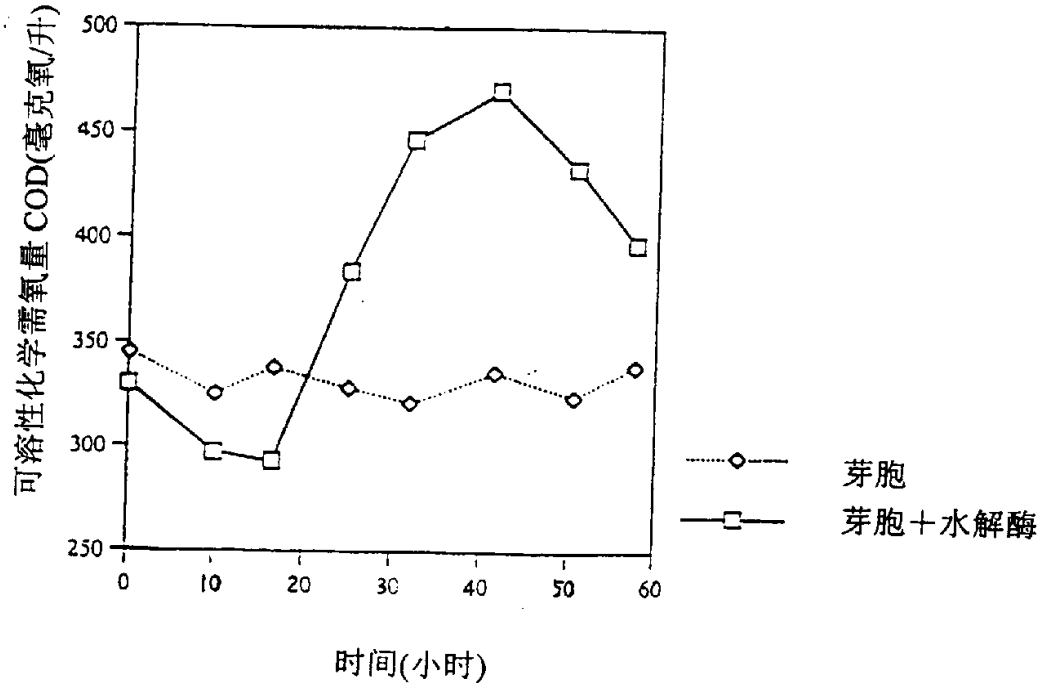

可溶性化学需氧量 COD(毫克氧/升)
500
450
400
350
300
250
0
10
20
30
40
50
60
时间(小时)
芽胞
芽胞＋水解酶

图 4