

微生物絮凝剂 ZS-7 的纯化及其结构特征研究

黎忠¹, 张修玉², 秦建桥³, 王开峰⁴

(1. 中水珠江规划勘测设计有限公司水环境与生态修复研究所, 广州 510610; 2. 环境保护部华南环境科学研究所, 广州 510655; 3. 广东省环境科学研究院, 广州 510045; 4. 嘉应学院化学与环境学院, 梅州 514015)

摘要: 采用透析、乙醇沉淀、凝胶过滤层析对微生物絮凝剂 ZS-7 进行了纯化. 经鉴定纯化后的微生物絮凝剂 ZS-7 是一种新型的糖蛋白, 其产量大约为 0.98 g/L 发酵液. ZS-7 主要由多糖和蛋白质组成, 含量分别为 91.5% 和 8.4%. 进一步的分析表明 ZS-7 中含有酸性多糖包括糖醛酸(16.4%)、丙酮酸(7.1%)和乙酸(0.5%). 采用凝胶色谱法测得 ZS-7 的相对分子质量为 6.89×10^4 . 红外光谱、X 射线能谱图和核磁共振图谱说明糖蛋白絮凝剂 ZS-7 含有羟基、氨基、羧基、甲氧基和磺酸等功能性基团. 单糖组成分析说明 ZS-7 主要由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 各单糖的摩尔比大致为: 半乳糖: 葡萄糖: 甘露糖: 鼠李糖 = 142: 2.2: 4.5: 3.4.

关键词: 微生物絮凝剂; 地衣芽孢杆菌 X14; 糖蛋白; 纯化; 结构特征

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2184-07

Study on Structural Characterization and Purification of Biofloculant ZS-7

LI Zhong¹, ZHANG Xiu-yu², QIN Jian-qiao³, WANG Kai-feng⁴

(1. Institute of Water Environment and Ecological Restoration, China Water Resources Pearl River Planning Surveying and Designing Co. Ltd., Guangzhou 510610, China; 2. South China Institute of Environmental Science, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou 510655, China; 3. Guangdong Provincial Academy of Environmental Science, Guangzhou 510045, China; 4. College of Chemistry and Environmental Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015, China)

Abstract: The biofloculant ZS-7 was purified to homogeneity by ethanol precipitation, dialysis and gel permeation chromatography (GPC). About 0.98 g of the purified biofloculant could be recovered from 1L of fermentation broth. The purified biofloculant was identified as a glycoprotein consisting of polysaccharide (91.5%) and protein (8.4%), with an approximate molecular weight of 6.89×10^4 . The major component of ZS-7 is an acid polysaccharide including uronic (16.4%), pyruvic (7.1%) and acetic acids (0.5%). It consists of galactose, glucose, mannose and rhamnose in a molar ratio of 142: 2.2: 4.5: 3.4. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Fourier transform infrared (FTIR) and NMR spectrum of the biofloculant indicate the presence of carboxyl, hydroxyl, amide, amino, methoxyl and sulfate groups.

Key words: biofloculant; *Bacillus licheniformis* X14; glycoprotein; purification; structural characterization

近年来,已经报道的微生物絮凝剂的组成和结构多种多样,主要有多糖、脂类、糖脂、糖蛋白及核酸类物质^[1]. 例如, *Aspergillus sojae* 产生的絮凝剂 AJ7002 为多肽多糖类, 主要组成为半乳糖、葡萄糖胺、2-酮葡萄糖酸及多肽成分^[2]; *Pseudomonas* sp. 产生的絮凝剂为 DNA 类^[3]; *Aspergillus parasiticus* 产生的絮凝功能成分 AHU7165 为多糖类, 相对分子质量为 3×10^5 ^[4]; R-3 mixed microbes 产生的 APR-3 为酸性多糖类, 其组成为葡萄糖、半乳糖、琥珀酸和丙酮酸, 相对分子质量为 3×10^6 ^[1]; *Rhodococcus erythropolis* 产生的 NOC-1 生物絮凝剂为多糖蛋白类^[5]; *myxobacterium Nannocystis* sp. NU-2 产生的絮凝剂 NU-2 是一种酸性多糖, 由葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 其比例为 5: 4: 1^[6]; *Klebsiella* sp. 产生的絮凝剂是一种酸性多糖, 主要由半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成, 其比例为 5: 2: 1^[7]; *Bacillus* sp.

DP-152 产生的絮凝剂是杂多糖类, 由葡萄糖、甘露糖、半乳糖和岩藻糖组成, 其摩尔比约为 8: 4: 2: 1^[8]; *Enterobacter aerogenes* 产生的微生物絮凝剂 WF-1 是一种杂多糖, 由葡萄糖、果糖和甘露糖组成, 其摩尔比为 10.3: 5.4: 1^[9]; *Bacillus subtilis* DYU1 产生的高絮凝活性物质 DYU500 为聚谷氨酸 (PGA), 相对分子质量为 $(3.16 \sim 3.2) \times 10^6$ ^[10].

絮凝剂的结构决定了其物理特性和功能, 研究各类絮凝剂的结构, 是研究絮凝机制的重要前提, 从而可以有效地提高絮凝效率. 研究絮凝结构, 也有助于研制更有效的絮凝剂, 如能用化学方法合成具有简单结构的生物絮凝剂, 则可以大大降低絮凝剂的

收稿日期: 2009-11-05; 修订日期: 2010-01-11

基金项目: 水利部公益性行业专项科研项目 (200801065)

作者简介: 黎忠 (1978 ~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为水环境生态修复和淤泥固化/资源化处理, E-mail: lizhongshan100@yahoo.com.cn

生产成本。

本研究应用 GPC(凝胶过滤层析)、HPLC 分析、傅立叶红外光谱分析, XPS(X 射线光电子能谱仪), 紫外光谱分析、元素分析、GC-MS、NMR 等技术探讨了 *Bacillus licheniformis* X14 合成的胞外多糖类絮凝剂中糖蛋白纯品 ZS-7 的性质、组成及结构。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源

芽孢 X14 (*Bacillus licheniformis*), 本实验室筛选鉴定, 现保存于中国典型培养物保藏中心, 序列号 CCTCC AB 208260。

1.1.2 微生物絮凝剂的制备

产絮凝剂培养基: 淀粉 10 g/L、氯化铵 0.51 g/L、 K_2HPO_4 3 g/L 和 KH_2PO_4 1 g/L, 115℃ 灭菌 30 min。

培养条件: 初始 pH 值为 8.0, 接种量采用 1%, 摇床转速采用 140 ~ 160 r/min 的变速控制, 37℃ 培养 48 h 后收集发酵液。

1.2 方 法

1.2.1 絮凝活性测定方法

在 ZR4-6 型六联搅拌仪的 1 000 mL 烧杯中加入 990 mL 4 g/L 的高岭土悬浊液(高岭土配置前过 100 目筛), 快速搅拌 1 min (700 r/min) 后, 依次加入 5 mL 10% $CaCl_2$ 和 5 mL 发酵液, 再慢搅 5 min (80 r/min), 静置 5 min 后, 取 800 mL 刻度处水样于 T6 新世纪分光光度计 550 nm 处测吸光度 D_{550} , 记为 B。同上用去离子水代替发酵液作对照, D_{550} 记为 A。絮凝活性的计算公式为: 絮凝活性 = $[A - B]/A \times 100\%$ 。

1.2.2 ZS-7 的纯化

(1) ZS-7 的预处理

将发酵液在 5 000 r/min 下 4℃ 离心 15 min 去除菌体和杂质; 上清液装入透析袋去离子水中透析 48 h, 每 8 h 更换一次去离子水, 用硫酸-苯酚法检测透析液中无单糖存在, 并用旋转蒸发器浓缩至原来体积的 1/5, 再加入 3 倍体积的无水乙醇(4℃) 充分搅拌后放置于 4℃ 冰箱中过夜收集沉淀; 将沉淀重新溶解于 100 mL 去离子水中; 加入 2% 浓度为 10% 的 CPC(氯化十六烷基吡啶); 充分混合后于 65℃ 温育 10 min; 5 000 r/min 离心 5 min, 收集 CPC 多糖复合物沉淀, 并将沉淀溶于 2 mol/L 的 NaCl 中, 使成均匀的多糖溶液, 此时, 多糖与 CPC 分离; 将上清液重复

与 CPC 反应, 收集残余多糖沉淀; 在高浓度的 NaCl 和含有游离的 CPC 的多糖溶液中加入 2 倍无水乙醇, 充分混合后, 静置 20 min, 使沉淀充分析出; 5 000 r/min 离心 5 min, 将沉淀用 60% 的乙醇冲洗 3 次并收集沉淀再冷冻干燥制成多糖粗成品。

(2) Sephacryl S-500 凝胶过滤层析

使用 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的 FPLC Biological Chromatography Systems 进行凝胶过滤层析。层析柱(1.6 × 100 mm), 填料为 Sephacryl S-500, 上样量为 5 mL, 流速为 2 mL/min, 5 mL/管, 分部收集, 去离子水梯度洗脱, 280 nm 和 490 nm UV 检测。测定每管收集液的糖、蛋白质含量及絮凝率。收集絮凝活性峰 ZS-7, 将其真空浓缩、透析、冷冻干燥得到纯品 ZS-7。

(3) ZS-7 的凝胶电泳

电泳条件为温度 25℃, 恒定电压为 250 V, 电泳缓冲液为 0.025 mol/L, pH 为 12.5 的硼酸, 醋酸纤维素条带用 0.5% (质量分数) 的甲苯胺蓝染色, 再用乙醇洗涤^[11]。

1.2.3 纯化后的 ZS-7 的定量分析

多糖含量测定采用苯酚硫酸法^[12], 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[13]。糖醛酸测定采用硫酸咔唑法^[12]。丙酮酸和乙酸测定采用 Friedman 的方法^[13]。氨基糖的测定采用 Elson-Morgan 方法^[12]。元素分析采用 Vario EL CHN-OS 快速元素分析仪 (Elementar, Germany)。

1.2.4 ZS-7 的相对分子质量测定(凝胶色谱法)

将已知相对分子质量 ($M_r \times 10^3$: 5.2、11.6、23.8、48.6、148、273、410、668、1 482) 的葡聚糖标准品分别用流动相配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 进样量 20 μ L, 记录色谱图, 用 Breeze GPC 软件以标准葡聚糖相对分子质量的对数 $\log M_r$ 对洗脱体积 (Elution Volume) 进行回归处理, 得到葡聚糖标准曲线。将多糖样品用流动相配制成 1.0 ~ 2.0 mg/mL 的溶液, 进样 20 μ L, 测定多糖样品的保留时间, 利用标准曲线求出多糖相对分子量。

1.2.5 ZS-7 的单糖组成分析

精密称取多糖 5 mg, 加入 2 mol/L 的 TFA 1 mL 溶解, 封管, 沸水浴 6 h。反复加入甲醇 50℃ 减压旋蒸, 除掉多余的 TFA, 得干物, 加入肌醇 5 mg, 加水 2 mL 溶解。称取阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖及肌醇各 5 mg, 加水 2 mL 溶解。样品液及标准品液分别加入 $NaBH_4$ 各 25 mg 室温水解 2 h, 间歇振荡。用少量乙酸中和至没有气泡产生, 加甲

醇 50℃减压旋蒸反复干燥至干, 100℃烘箱干燥 15 min, 样品刮出放进带塞玻璃管, 加入 1 mL 乙酸酐 1 mL 吡啶, 密封带密封, 100℃水浴 1 h, 样品直接上 GC. 根据图谱的出峰时间对单糖成分进行鉴定, 根据峰高及峰宽计算的峰面积进行单糖摩尔比的分析.

1.2.6 ZS-7 的红外光谱分析

用 EQUINOX 55 红外光谱仪, KBr 压片法进行官能团, 糖环, 构型(糖苷键)分析. 基本操作参考唐复合物生化技术研究^[13].

1.2.7 ZS-7 的光电子能谱分析

用 ESCALab250 型 X 射线光谱仪 (XPS) 进行能谱分析, 并对重叠谱图采 XPSPeak4.1 软件进行分峰拟合.

1.2.8 ZS-7 的¹H-NMR 和¹³C-NMR 波谱分析

分析所用的仪器为德国 Bruker 公司配备的¹³C、¹H 双核超低温探头的 AVANCE400M 超导体超屏蔽傅立叶变换核磁共振波谱仪. 测定温度为 70℃, 溶剂为 D₂O, 以 DMSO-d₆ 为内标, 测定样品量为纯化样品 10 mg.

2 结果与讨论

2.1 微生物絮凝剂 ZS-7 的纯化

图 1 为 ZS-7 进行凝胶过滤层析时的洗脱曲线, 从中可知絮凝活性峰和蛋白质, 多糖峰同时出现, 说明微生物絮凝剂 ZS-7 中多糖和蛋白质可能是结合在一起. 凝胶电泳实验结果(图 2 为单一蓝色色斑)和 HPLC 分析[图 3(a)中图形的对称分布]进一步说明了 ZS-7 的纯度, 所以, 纯化后的 ZS-7 为糖蛋白类絮凝剂.

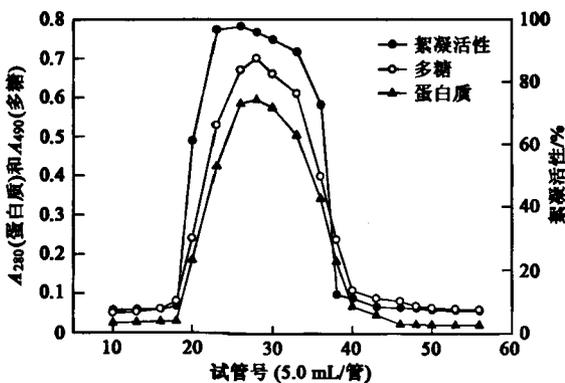


图 1 ZS-7 用 Sephacryl S-500 层析时的凝胶色谱图
Fig. 1 Gel permeation chromatogram of ZS-7 with Sephacryl S-500



(a) 47.5 μg (b) 28.6 μg

图 2 ZS-7 的醋酸纤维素薄膜电泳结果

Fig. 2 Results of cellulose acetate film electrophoresis of ZS-7

2.2 纯化 ZS-7 的定量分析

微生物絮凝剂 ZS-7 粗产品(经过上述的预处理)的产量大约为 1.26 g/L 发酵液, 纯化后产量大约为 0.98 g/L 发酵液, 其定量分析结果如表 1 所示.

表 1 ZS-7 的组成分析/%

Table 1 Composition analysis of ZS-7/%

项目	多糖	蛋白质	糖醛酸	丙酮酸	乙酸	氨基糖
含量	91.5	8.4	16.4	7.1	0.5	3.2

由表 1 可知, 糖蛋白类絮凝剂 ZS-7 主要由多糖和蛋白质构成, 其含量分别为 91.5% 和 8.4%, 说明糖蛋白类絮凝剂 ZS-7 的主要的成分是多糖. 进一步的分析说明 ZS-7 中含有酸性多糖包括糖醛酸(16.4%)、丙酮酸(7.1%)和乙酸(0.5%). 同时 ZS-7 中还含有 3.2% 的氨基糖. 元素分析显示 ZS-7 中 C、H、O、N 和 S 所占质量分数分别为 32.1%、6.2%、55.1%、5.3% 和 1.3%.

2.3 纯化 ZS-7 的分子量的测定

采用凝胶色谱法对纯化后的糖蛋白 ZS-7 进行相对分子质量的测定. 用瑞典 Pharmacia 葡聚糖 Dextran 系列作为标准品, 图 3 是根据标准葡聚糖洗脱体积(V_e)和 $\log M_r$ 绘制的标准曲线, 其函数关系式为 $\log M_r = 61.5 - 10.1V + 0.607V^2 - 0.0125V^3$, $R^2 = 0.999324$. 样品 ZS-7 的保留时间为 24.05 min, 转化为体积后代入标准曲线中可求得 ZS-7 的重均分子质量和数均分子质量分别为 6.89×10^4 和 5.70×10^4 . 经计算其聚合度(M_w/M_n)为 1.21, 意

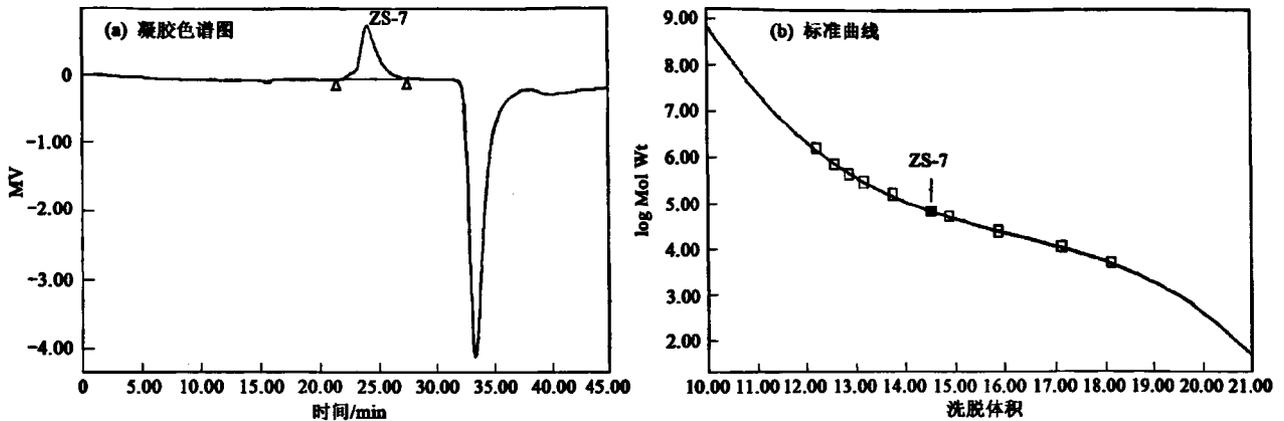


图3 ZS-7 测定分子量的凝胶色谱图和分子量标准曲线

Fig. 3 Gel permeation chromatogram of ZS-7 for M_r measurement and calibration curve of pullulan standards

味着糖蛋白 ZS-7 是一种接近均相的杂多糖,跟前面单糖组成分析的结果吻合。

2.4 纯化 ZS-7 的单糖组成及摩尔比分析

纯化后的糖蛋白 ZS-7 的单糖组成分析如图 4 所示。

由图 4 可知,纯化多糖 ZS-7 主要由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖单糖组成,各单糖的出峰时间分别为:鼠李糖 5.63 min、甘露糖 8.92 min、葡萄糖 9.05 min 和半乳糖 9.17 min。通过计算,在纯化多糖中各单糖的摩尔比大致为:半乳糖:葡萄糖:甘露糖:鼠李糖 = 142:2.2:4.5:3.4。这也就说明半乳糖可能是微生物絮凝剂的基本骨架,葡萄糖,甘露糖和鼠李糖可能为组成该多糖的支链结构。

2 151、1 654、1 540、1 457、1 415、1 240、1 076、882 及 784。如图 5 所示。

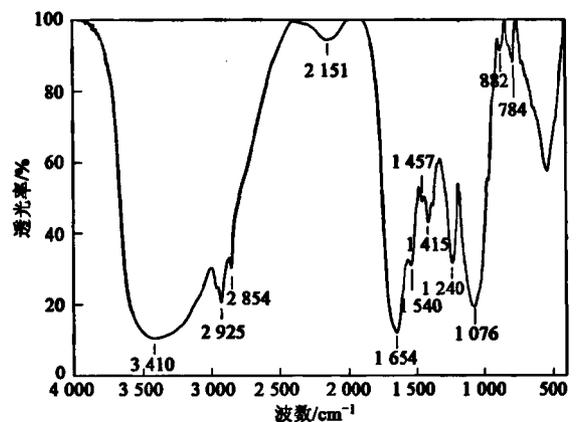


图5 ZS-7 的红外光谱图

Fig. 5 Infrared spectrum of purified ZS-7

由光谱可知,3 410 cm^{-1} 峰为羟基和氨基的强吸收峰。2 925 cm^{-1} 和 2 854 cm^{-1} 的两处弱吸收峰为 C—H 的伸缩振动。2 151 cm^{-1} 处的吸收峰为脂肪族的 C—H。1 654 cm^{-1} 处的吸收峰为酰胺基团中 C=O 的伸缩振动^[14]。1 540 cm^{-1} 处的吸收峰归属于氨基的弯曲振动。1 415 cm^{-1} 处的吸收峰可能为羧基中的 C=O 对称伸缩振动,说明 ZS-7 含有羧基基团。1 457 cm^{-1} 为 CH_3 的弯曲振动和 CH_2 的剪式振动。1 240 cm^{-1} 处的吸收峰为 S=O 对称伸缩振动意味着 ZS-7 中含有硫酸根基团^[15]。1 076 cm^{-1} 处强的吸收峰显示 C—O 伸缩振动说明存在甲氧基。882 cm^{-1} 和 784 cm^{-1} 处的吸收峰为甘露糖糖苷键的吸收峰。综上所述,糖蛋白类絮凝剂中含有羟基、氨基、羧基、甲氧基和硫酸根基团等有利于絮凝的基团。

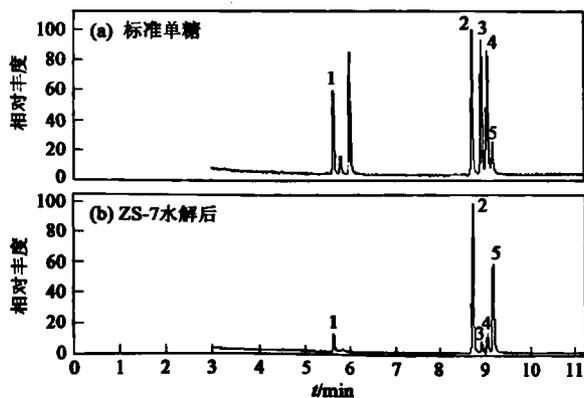


图4 标准单糖的气相色谱图和 ZS-7 水解后的气相色谱图

Fig. 4 GC profiles of standard monosaccharide and ZS-7 hydrolysate

2.5 远红外光谱扫描

样品用 KBr 压片法,在 500~4 000 cm^{-1} 范围内获得红外光谱,主要吸收强峰 3 410、2 925、2 854、

2.6 XPS 波谱分析

为了进一步了解 ZS-7 中的官能团结构,进行了 X 射线光电子能谱分析。

全谱扫描图谱[图 6(a)]显示了存在于 ZS-7 表面的 3 种主要元素(C、N 和 O)。C 1s 扫描光谱如图 6(b)所示,284.6、286.0、287.5 和 288.7 eV 显示了 ZS-7 中 C 在 C—C、C—OH/C—N、O=C—N 和 O=C—OH 基团的结合能^[16]。图 6(c)显示了

N 1s 扫描光谱,399.8 eV 和 401.6 eV 为氮原子在 NH/NH₂ 质子化氮原子的结合能。因为样品是在 pH = 5 时制备,所以峰 401.6 eV 为氨基/酰胺基质子化时的结合能。O 1s 扫描光谱如图 6(d)所示,530.9、532.0 和 532.9 eV 为 O 在 O=C—OH、O=C—NH₂ 和羟基基团中的结合能。这些结果和红外光谱分析的结果很吻合,进一步证实了糖蛋白絮凝剂中含有 OH、NH₂、COOH 和 OCNH 等基团。

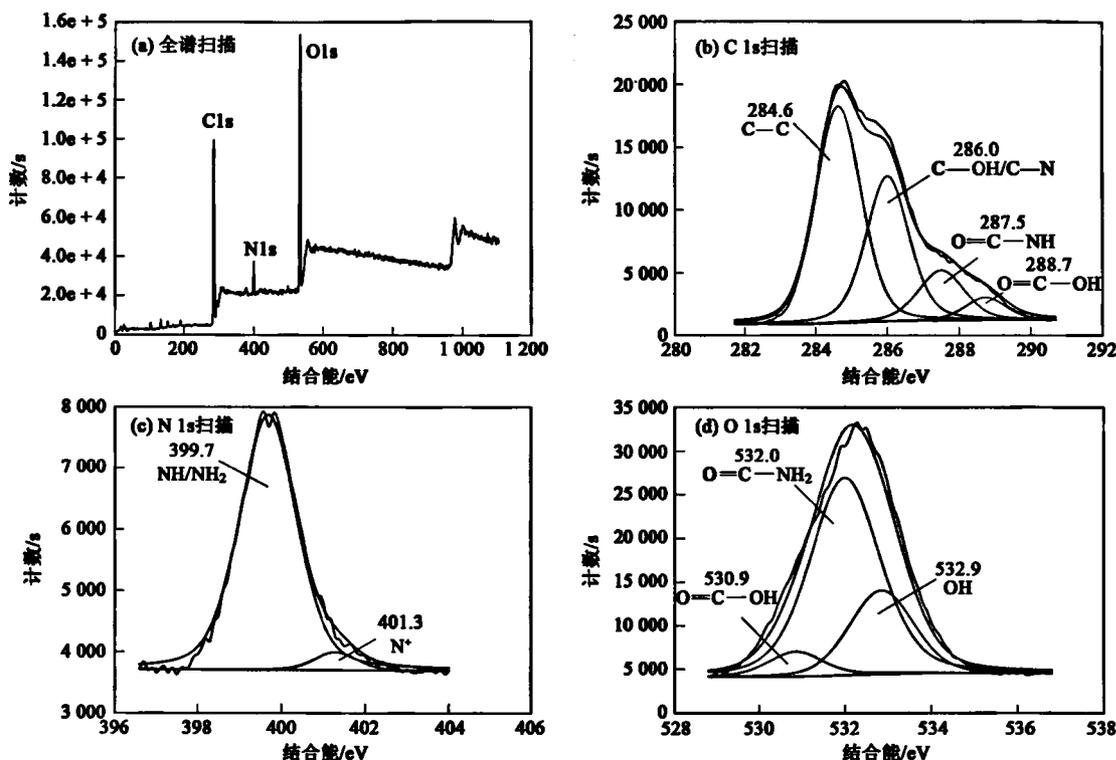


图 6 ZS-7 的 X 射线能谱图

Fig. 6 XPS spectrum of ZS-7

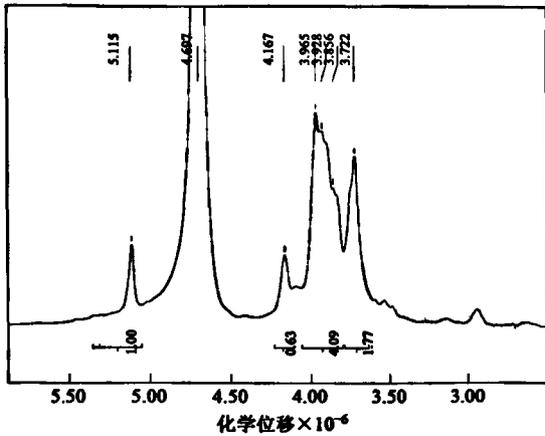
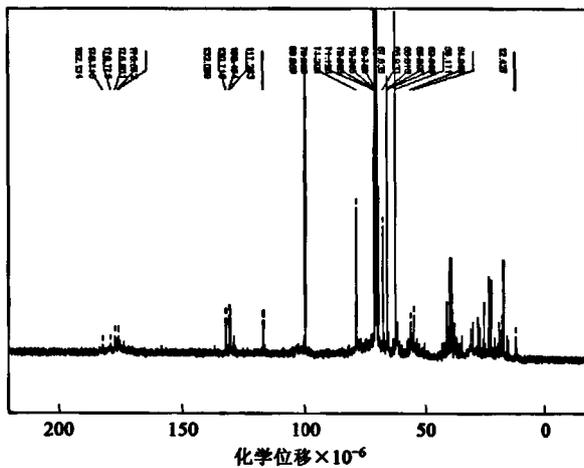
2.7 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 波谱分析

由 ¹H-NMR(图 7)的波图谱可以看出,共振信号主要在化学位移 $(3.7 \sim 4.2) \times 10^{-6}$,表明纯化的糖蛋白样品中单糖间的连接主要为 α -型糖苷键 5.12×10^{-6} 处为 α -半乳糖吡喃残基的端基质子的特征峰。此外,重水的化学位移出现在 4.70×10^{-6} 。

由 ¹³C-NMR(图 8)可以看出,非端基碳原子的信号集中在 $(2.7 \sim 78.8) \times 10^{-6}$ 。甲基和甲氧基的碳原子信号出现在 12.4×10^{-6} 和 54.6×10^{-6} 。99.9 $\times 10^{-6}$ 处为 α -半乳糖吡喃残基的端基碳的特征峰。化学位移在 $(175.6 \sim 176.8) \times 10^{-6}$ 和 $(178.7 \sim 182.1) \times 10^{-6}$ 分别为羰基和羧基中碳原子信号。其它的单糖由于含量比较低(葡萄糖、甘露糖和鼠李糖),信号峰不明显。从核磁共振分析结果显示纯化

后的 ZS-7 为一种接近均相的糖蛋白。

众所周知,聚合物的摩尔质量和功能性基团是决定其絮凝活性的关键因素^[17]。据报道,在蛋白质类微生物絮凝剂中,氨基和羧基是有效的絮凝基团^[18]。相对于相对分子质量小的微生物絮凝剂而言,相对分子质量大的微生物絮凝剂具有更多的吸附位点,更强的架桥作用和更高的絮凝活性^[17]。在本研究中,红外光谱、X 射线能谱图和核磁共振图谱显示了微生物絮凝剂 ZS-7 存在羧基、羟基、氨基、酰胺基、甲氧基和硫酸根这些有利于絮凝的基团^[19]。而且,元素分析微生物絮凝剂 ZS-7 中氮和氧的含量明显高于前人报道的微生物絮凝剂氮和氧的含量,表明 ZS-7 有许多含氮原子和氧原子有助于絮凝的功能性基团存在。

图 7 ZS-7 的¹H-NMR 图Fig. 7 ¹H-NMR spectrum of ZS-7图 8 ZS-7 的¹³C-NMR 图Fig. 8 ¹³C-NMR spectrum of ZS-7

3 结论

(1) 采用透析、乙醇沉淀、CPC 反应、Sephacryl S-500 凝胶过滤层析等纯化工艺获得了一种新型的糖蛋白类微生物絮凝剂 ZS-7。

(2) 对纯化后的微生物絮凝剂 ZS-7 进行了定量和系列结构特征分析。结果表明 ZS-7 为一种新型的糖蛋白。其主要由多糖和蛋白质组成,含量分别为 91.5% 和 8.4%。进一步的分析说明 ZS-7 中含有酸性多糖包括糖醛酸(16.4%)、丙酮酸(7.1%)和乙酸(0.5%),同时 ZS-7 中还含有 3.2% 的氨基糖。采用凝胶色谱法测得 ZS-7 的相对分子质量为 6.89×10^4 。红外光谱、X 射线能谱图和核磁共振图谱说明糖蛋白絮凝剂 ZS-7 含有羟基、氨基、羧基、甲氧基和磺酸等功能性基团。单糖组成分析说明 ZS-7 主要由

鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,各单糖的摩尔比大致为:半乳糖:葡萄糖:甘露糖:鼠李糖 = 142:2.2:4.5:3.4。

参考文献:

- [1] Kurane R, Matsuyama H. Production of a bioflocculant by mixed culture[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 1589-1594.
- [2] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ-7200[J]. *Agric Biol Chem*, 1976, **40**(3): 619-624.
- [3] Sakka K, Takahashi H. DNA as a flocculation factor in *Pseudomonas* sp. [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**(2): 2869-2876.
- [4] Takada H, Araki Y, Ito E. Structure of poly galactosamine produced by *Aspergillus parasiticus* [J]. *J Biochem*, 1981, **89**: 1265-1274.
- [5] Takeda M, Kurane R, Nakamura K. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**(10): 2263-2264.
- [6] Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU-2 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**(4-5): 517-522.
- [7] Dermlim W, Prasertsan P, Doelle H. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(5): 698-703.
- [8] Suh, H H, Moon S H, Kim H S, et al. Production and rheological properties of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 1998, **8**(6): 618-624.
- [9] Lu W Y, Zhang T, Zhang D Y, et al. A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the trona suspension [J]. *Biochem Eng J*, 2005, **27**(1): 1-7.
- [10] Wu J Y, Ye H F. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate [J]. *Process Biochem*, 2007, **42**(7): 1114-1123.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 10.
- [12] Chaplin M F, Kennedy J F. *Carbohydrate Analysis* [M] (2nd ed). New York: Oxford University Press, 1994.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [14] Shriner R L, Hermann C K F, Morrill T C, et al. *The Systematic identification of organic compounds* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1998. 158-161.
- [15] Yim J H, Kim S J, Ahn S H, et al. Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Cyrodinium impudicum* KG03 [J]. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(2): 361-367.
- [16] Deng S B, Yu G, Ting Y P. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal [J]. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2005, **44**(4): 179-186.

- [17] Salehzadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants - Recent trends and biotechnological importance [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(5): 371-385.
- [18] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al.* Purification and characterization of liquid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58: 1977-1982.
- [19] Zajic J E, Knetting E. Flocculant from paraffinic hydrocarbons. *Developments industrial microbiology* [M]. Washington, D C: American Institute of Biological Science, 1970. 87-98.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过8 000字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).作者投稿时请先登陆我刊网站(www.hjcx.ac.cn)进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面给出的提示信息投稿即可.

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题.

4. 中文摘要不少于 300 字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用 1, 1.1, 1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1), (2)……表示,后缩 2 格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:
期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页-止页.

图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页-止页.

会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页-止页.

学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.

报告:作者.论文名[R].出版地:出版单位,出版年.

专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.对未刊稿件一般不退,请作者自留底稿.

12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市 2871 信箱;邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail: hjcx@rcees.ac.cn;网址: www.hjcx.ac.cn