

## 用两步展开薄层层析定性鉴定糖脂

薛燕芬 王修垣

(中国科学院微生物研究所, 北京)

生物表面活性剂, 由于其独特的理化性质及其具有在石油和其它工业中应用的前景, 而日益受到注意。糖脂是其中重要的一类<sup>[1,2]</sup>。在研究微生物生产糖脂的工作中, 通常采用一步展开薄层层析法定性鉴定糖脂<sup>[3-5]</sup>。我们在工作中发现, 这种方法有些缺陷, 并在此基础上发展出两步展开薄层层析, 得到了满意的结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株

细菌菌株 B126 和 74-26 为本所油田微生物学研究组的保藏菌株。

#### (二) 培养基和培养条件

培养基 (g/L): 混合氮源 2.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{CaCl}_2$  0.1, 酵母膏 1.0, 液体石蜡 4%, 自来水 1L, pH 7.2—7.5。250ml 三角瓶装 50ml 培养基, 0.5 kg/cm<sup>2</sup> 30min 灭菌。

培养条件: 将种龄约 24h 的肉汁蛋白胨斜面培养物用无菌水洗下制成悬浮液, 等量接种。接种物置 220r/min 旋转摇床上 30℃ 培养 4 天。

#### (三) 测定方法

总糖用蒽酮法<sup>[6]</sup>, 表面张力和界面张力用日本岛津表面张力仪 ST-1 在 45℃ 下测定。界面张力是在发酵液对十六碳烷下测得的。

#### (四) 产物的提取和定性鉴定

发酵液用三氯甲烷: 甲醇 (V/V = 2:1) 溶剂提取, 减压蒸干, 得粗产品, 作为待分析样品。

参考糖脂是一种槐糖脂 (Lactonic sophorolipid), 由 Prof. Dr. Wagner 惠赠, 其化学结构见文献 [8]。

糖脂的定性鉴定用硅胶薄层平板进行。硅胶 G 为青岛海洋化工厂产品, 粒度 10—40 $\mu\text{m}$ 。展开剂: (1) 石油醚, (2) 氯仿: 甲醇: 水 (65:15:2, V/V)。一步展开用 (2), 两步展开依次用 (1)

和 (2)。显色剂:  $\alpha$ -萘酚——蓝灰色, 显糖; 2, 7-二氯荧光黄——黄色荧光, 显脂; 茚三酮——蓝紫色, 显氨基酸; Zinadze 试剂——蓝色, 显磷; 铬酸-硫酸溶液——黑色, 显有机物。

### 结 果 和 讨 论

#### (一) 发酵液的表面活性

发酵 4 天后测定细菌菌株 B126 和 74-26 发酵液的表面张力、界面张力和总糖, 结果列于表 1。

表 1 两株细菌发酵液的特性

细菌菌株	表面张力 (mNm)	界面张力 (mNm)	总 糖 (g/L)
B126	36	1—5	0.3—0.4
74-26	37	1—5	0.7—0.8

#### (二) 表面活性物质的定性鉴定

从表 1 看出, 在两株菌具有表面活性的发酵液中, 总糖含量分别为 0.3—0.4 和 0.7—0.8 g/L。因此, 发酵液中的表面活性物质很可能是糖脂。

我们采用提取糖脂的方法, 用三氯甲烷: 甲醇 (V/V = 2:1) 溶剂从发酵液中提出粗产物, 进行下列分析。

最初, 我们采用文献 [3—5] 中常用的单向一步展开层析法定性鉴定产物, 展开剂为氯仿: 甲醇: 水 (65:15:2)。结果表明, 试样的显色点呈弧形, 色泽不清晰, 分辨力较差; 对照的显色点却很清晰。这表明, 试样中的杂质可能有干扰。因此, 研究一种适于在样品纯度不高的情况下定性鉴别糖脂的方法显然是有意义的。

为此, 选用了极性小的石油醚: 乙醚: 醋酸 (80:20:1) 作展开剂, 一步展开。结果表明, 杂质

本文于 1988 年 4 月 29 日收到。

跑到前沿,而对照和试样中的糖脂却滞留在原点。这可能是由于展开剂的极性太弱所致。

继而采用了两步展开:先用石油醚作展开剂,将干扰的杂质走出后吹干,再用氯仿:甲醇:水展层,得到了良好的结果(图 1)。不仅对照糖脂,而且两个试样显色点的形状和色泽都很好。试样的显色点与对照糖脂点一样,对  $\alpha$ -萘酚、2,7-二氯荧光黄和 UV 均呈阳性;对茚三酮和

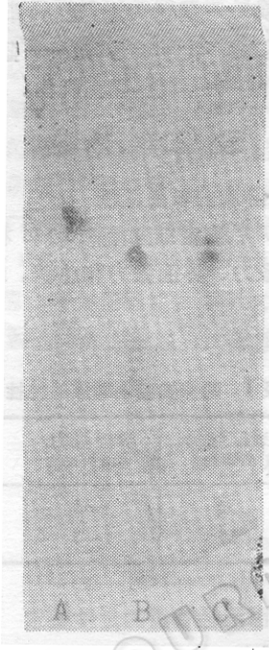


图 1 两步展开的硅胶薄层层析  
展开剂: 1. 石油醚, 2. 氯仿:甲醇:水;  
用  $\alpha$ -萘酚检测  
A. Lactonic sophorolipid (对照)  
B. B126; C. 74-26

表 2 两步展开硅胶薄层层析定性  
鉴定糖脂的可重复性

样 品	R <sub>f</sub>				标准误差
	1	2	3	4	
对 照	0.62	0.626	0.610	0.60	0.61±0.01
B126	0.58	0.560	0.530	0.56	0.56±0.02
74-26	0.59	0.565	0.535	0.56	0.56±0.02



图 2 五个样品两步展开的薄层层析  
A. B126; B. 74-26; C. 对照;  
D. 75-110; E. B22; F. B92

Zinadze 试剂呈阴性。从而证明,菌株 B126 和 74-26 产生的表面活性剂均为糖脂。

此法的可用性不仅为同一样品的重复鉴定(表 2)所证实,也为不同样品的鉴定所证实(图 2),从而为定性鉴定粗产物中糖脂的存在提供了一种简便可靠的方法,节省了纯化样品所需的人力、物力和时间。

### 参 考 文 献

- [1] Cooper, D. G. et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 26: 229—253, 1980.
- [2] Parkinson, M.: *Biotech. Adv.*, 3: 65—83, 1985.
- [3] Cooper D. G. et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, 47: 173—176, 1984.
- [4] Idem: *ibid.*, 46: 1426—1429, 1983.
- [5] Kretsch, A. et al.: *Adv. Biotech.*, 3: 475—479, 1981.
- [6] 李祖义等: *生物工程学报*, 2(1): 47—51, 1986.
- [7] Morris, D. L.: *Science*, 107: 254, 1948.
- [8] Gbbbert, U. et al.: *Biotechnology Letters*, 6(4): 225—230, 1984.
- [9] 洪筱坤等: *层析理论与应用*, 上海科学技术出版社, 上海, p. 99, 1981.

## QUALITATIVE ANALYSIS OF THE GLYCOLIPID BY THE TWO-STEP-DEVELOPED TLC

Xue Yanfen Wang Yiuyuan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A method for qualitative analysis of the glycolipid by the two-step-developed silica gel TLC was elaborated. After the thin plate was developed with petroleum ether and dried, the second step development was performed with chloroform:methanol:water (65:25:5), detected by  $\alpha$ -naphthol. This method is applicable to

qualitative analysis of crude glycolipid and gives a better result than that of the one-step-developed TLC for it.

### Key words

Glycolipid; Silica gel TLC; Biosurfactant