

# 石蜡酪杆菌 B126 产生糖脂的适宜条件

薛燕芬 王修垣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

生物表面活性剂的研制是从本世纪 70 年代发展起来的。由于可产生表面活性剂的微生物种类、生物表面活性剂的类型及可作为其底物的原料较多,一些产品的性能与化学合成的相当,可降解性较大、比较安全,而日益受到注意<sup>[1]</sup>。乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) RAG-1 产生的生物乳化剂 Emulsan 的商品化<sup>[2]</sup>和生物表面活性剂在各种工业、尤其是石油工业中的可用性<sup>[3~5]</sup>,也促进了该领域的发展。

糖脂是一类重要的生物表面活性剂。我们分离筛选到一株糖脂产生菌,鉴定为一新种:石蜡酪杆菌 (*Caseobacter paraffinicum*) B126。本文报道该菌产生糖脂的适宜条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

石蜡酪杆菌 (*Caseobacter paraffinicum* n. sp.) B126。

### 1.2 基础培养基和培养条件

筛选该菌株的基础培养基组成 (g/L) 为: NaNO<sub>3</sub> 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 1.0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.25, CaCl<sub>2</sub> 0.1, 酵母膏 1.0, 重液体石蜡 40 ml; pH7.0~7.5。分装入 250ml 三角瓶各 50 ml, 0.06 MPa 30 min 灭菌。

将营养琼脂斜面上 24 h 的培养物制成悬浮液接种,置 200 r/min 旋转摇床上培养 4 d。

### 1.3 测定方法

1.3.1 表面张力和界面张力: 用 Shimadzu ST-1 型表面张力仪在 45℃ 测定,界面张力为相对正十六烷<sup>[6]</sup>。

1.3.2 残留碳源: 取发酵液 5 ml 加乙醚 10 ml 萃取。吸出乙醚相,取样用 GC-7AG 型气相色谱仪 (Shimadzu) 分析,以正-二十二烷作内标物。

1.3.3 残留氮源: 将发酵液 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液,用二磺酸酚法测 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量<sup>[7]</sup>。

1.3.4 生物量: 取发酵液 0.5 ml 加 1 mol/L NaOH 9.5 ml, 置沸水浴中 15 min 后,用 Lowry 法定蛋白量<sup>[8~9]</sup>。

1.3.5 糖脂: 硫酸酚法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 起始 pH

从图 1 可见,在 pH7.5 左右糖脂产量最高,表面张力和界面张力最低。pH 低于 7 或高于 8 均会导致糖脂产量明显下降。

### 2.2 温度

用 TN-3F 型温度梯度摇床 (Toyo Kagaku Sangyu Kaisha, Ltd.) 试验的结果表明,该菌的最适生长温度为 30~32℃,产生糖脂的最适温度为 30℃ 左右(图 2)。

### 2.3 碳源的影响

2.3.1 不同碳源: 加量均为 4% (w/v)。结果表明,该菌在重液体石蜡为碳源的生长优于醋酸钾、葡萄糖、蔗糖和水溶性淀粉为碳源的,其发酵液的表面张力和界面张力明显较低。

本文于 1994 年 8 月 19 日收到。

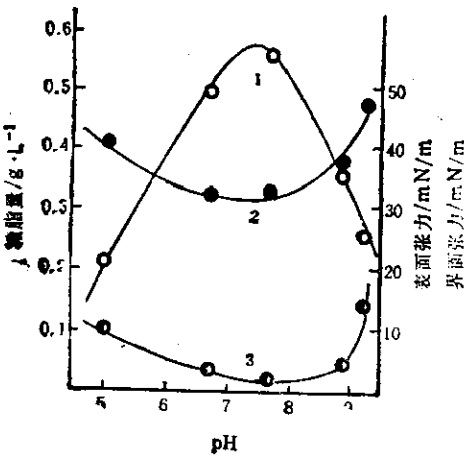


图 1 pH 的影响  
1.糖脂量; 2.表面张力; 3.界面张力。

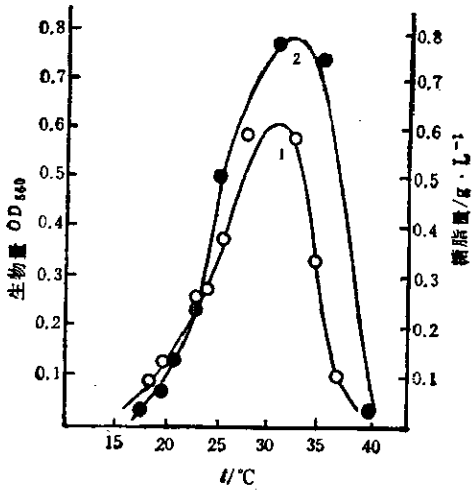


图 2 温度的影响  
1.糖脂量; 2.生物量。

2.3.2 单一正链烷烃: 重液体石蜡为混和烷烃,为查明最适宜的正链烷烃,进行了单一烷烃的试验(烷烃浓度 4%, v/v)。结果指出,该菌可利用正十二烷~正二十四烷作底物,而以十六烷最好,糖脂产量高,表面张力低(图 3)。

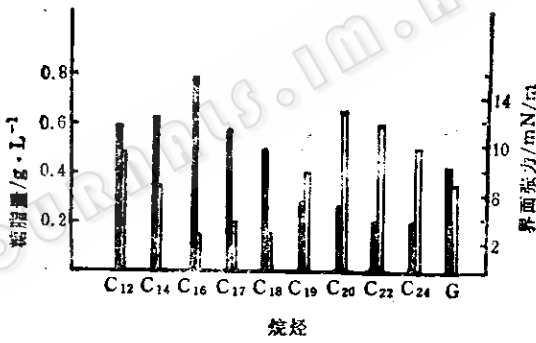


图 3 正链烷烃的比较  
■糖脂量; □界面张力; G: 重液体石蜡。

2.3.3 碳源浓度: 不同浓度的正十六烷和重液体石蜡的比较结果表明,前者的最适浓度为4%,后者则为6% (图 4)。

2.4 氮源的影响

以 2% NaNO<sub>3</sub> 的含氮量为标准,测定了 5 种氮源对该菌产糖脂的影响。从表 1 可见,以 NaNO<sub>3</sub> 为氮源,糖脂产量最高;以铵盐为氮源,糖脂产量则较低。

表 1 不同氮源的影响

氮 源	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl
糖脂量 (g/L)	0.56	0.73	1.06	0.54	0.50
表面张力 (mN/m)	32	33	35	32	31
界面张力 (mN/m)	1	4	4	2	1
最终 pH	5.0	6.0	7.0	4.5	4.5

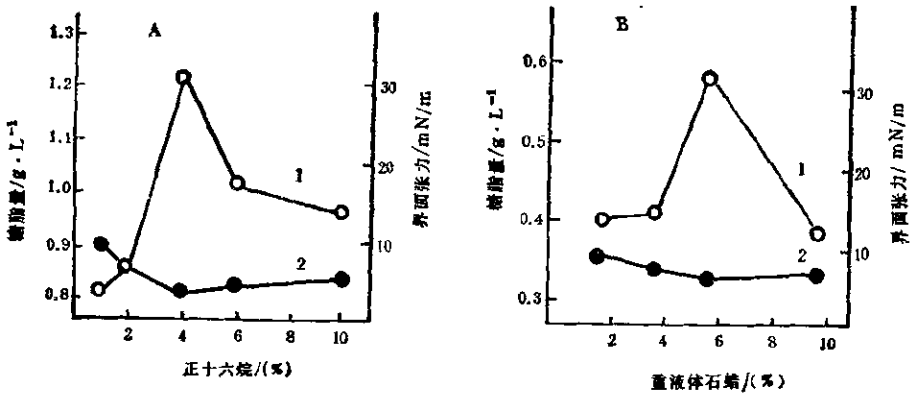


图4 正十六烷(A)和重液体石蜡(B)的最适浓度  
1. 糖脂量; 2. 界面张力。

## 2.5 培养基组成

培养基的成分及其用量对于不同微生物合成不同产物的重要性是不同的, 并且有协同作用。因此, 在上述试验的基础上, 对正十六烷、硝酸钠、硫酸镁、磷酸二氢钾、EDTA 和 pH 等因子采用多因素正交优选法  $L_{16}(4^4 \times 3^2)$  正交表<sup>[11]</sup>确定适宜培养基的组成。

根据试验结果, 采用直观分析, 作出因素和指标的关系图(图5), 从而确定了该菌合成糖脂的适宜培养基 (g/L):  $\text{NaNO}_3$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3H<sub>2</sub>O 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 酵母膏 2.0, EDTA 0.0015, 正十六烷 10 ml, pH7.0~7.5。

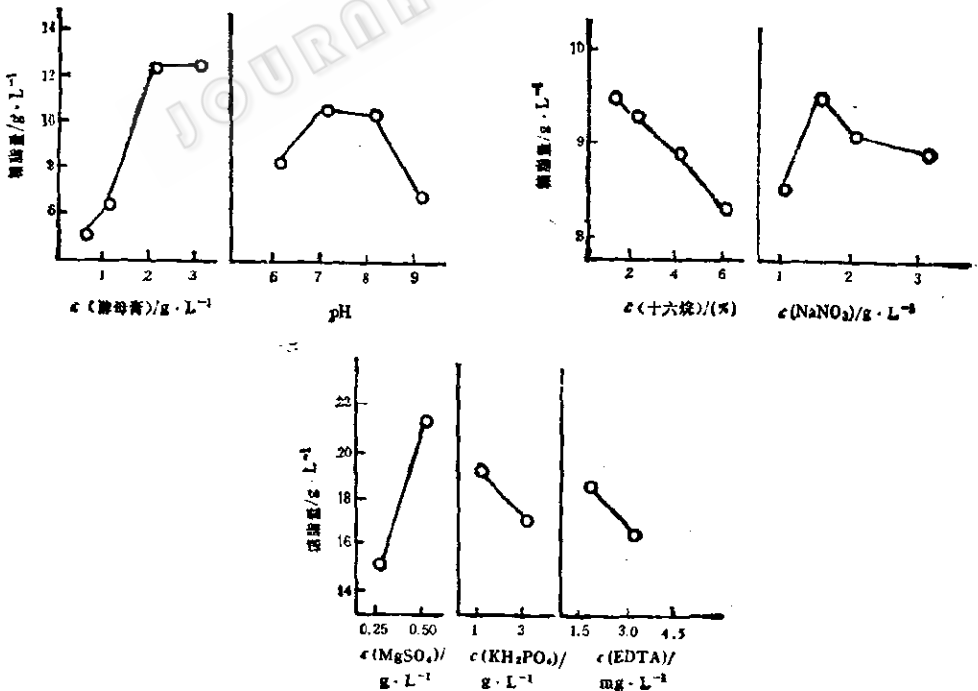


图5 多因素正交试验

## 2.6 发酵动态

用上述适宜培养基测定石蜡酯杆菌合成糖脂的发酵动态。从图 6 可见,生物量的增长和产物的形成基本上平行,并在 48 h 达到最高。此时,糖脂产量为 3.7 g/l,然后缓慢下降。发酵液的表面张力和界面张力下降很快,至 24 h 即分别从 45 mN/m 和 20 mN/m 降至 35 mN/m 和 3 mN/m。底物正十六烷逐渐被利用,而氮源  $\text{NaNO}_3$  在 48 h 已几乎消耗殆尽。发酵液的 pH 变化虽有波动,但基本上是向稍偏碱性发展。

基于此结果可以认为,在 50~60 h 终止发酵是适宜的。

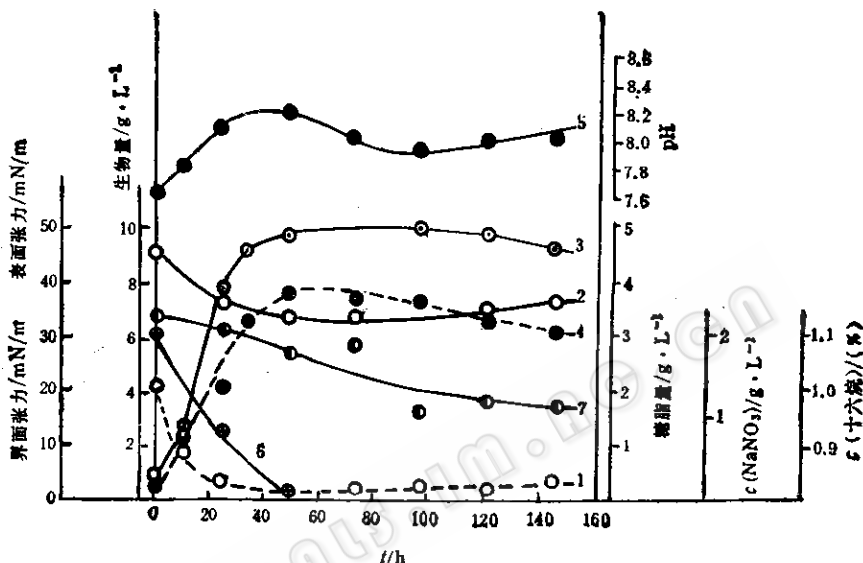


图 6 发酵动态曲线

1. 界面张力; 2. 表面张力; 3. 生物量; 4. 糖脂量; 5. pH; 6.  $\text{NaNO}_3$ ; 7. 十六烷。

## 3 讨论

在生物表面活性剂的生产中,培养基的组成和培养条件都可能对产物的产率和组成发生重大的影响,而其重要性则依菌种的不同而异<sup>[12~15]</sup>。前已报道,*C. paraffinicum* B126 是生物表面活性剂产生菌的新成员。因此,不仅对该菌产生糖脂的培养条件,而且采用多因素正交试验调整培养基各组分的含量,使之达到综合平衡,从而使产物的产量由 0.36 g/L 提高到 3.7 g/L,为最初产量的 10 倍,对底物转化率为 78%。

试验结果表明,碳、氮源的种类和浓度,酵母膏和  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度及起始 pH,对该菌产生糖脂的影响较大。该菌在以烃类为底物时,培养液的表面张力和界面张力明显低于 KAc 等底物。这表明,非水溶性的烃类对微生物合成生物表面活性剂具有诱导和促进作用,与大多数文献报道的结果相一致。

$\text{NaNO}_3$  是石蜡酯杆菌 B126 合成糖脂的适宜氮源,用铵盐作氮源则产量较低。这可能是由于该菌产生糖脂的适宜 pH 为中性偏碱,而铵盐被消耗后,培养基的 pH 变为偏酸性所致。

应该指出的是,该菌的糖脂发酵周期较短,为 50~60 h。扩大试验正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Kosaric N, Cairns W L, Gray N C C. Biosurfactants and Biotechnology. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. 1~19.
- [2] Gutnick D L, Rosenberg E, Belsky I *et al.* U. S. Patent 4,395,354. 1983.
- [3] Wagner F, Rapp P, Bock H *et al.* U. S. Patent 4,286,660. 1981.

- [4] Wagner F, Behrendt V, Bock H *et al.* Production and chemical characterization of surfactants from *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas* sp. Mub grown on hydrocarbons, In: Zajic JE *et al.* ed. Microbial Enhanced Oil Recovery. Oklahoma: PennWell, Tulsa, 1983.
- [5] Li Z Y, Lang S, Wagner F *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**:601.
- [6] Akit J, Cooper D G, Manninen KI *et al.* *Current Microbiol*, 1981, **6**:145~150.
- [7] 中国医学科学院卫生研究所. 水质分析法. 北京: 人民卫生出版社, 1972, 148.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 165~166.
- [9] Suzuki T, Tanaka K, Kinoshita S. *Agr Biol Chem*, 1969, **33**:190~195.
- [10] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al.* *Anal Chem*, 1956, **28**:350~356.
- [11] 俭济斌. 多因素试验正交优选法. 北京: 科学出版社, 1976, 12.
- [12] Suzuki T, Tanaka K, Matsura I *et al.* *Agr Biol Chem*, 1969, **33**:1619.
- [13] Gerson D F, Zajic J E. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1979, **45**:81.
- [14] Itoh S, Suzuki T. *Agr Biol Chem*, 1974, **38**:1443.
- [15] Syldatk C, Lang S, Matulovic U *et al.* *Z Naturforsch*, 1985, **40c**:61.

## SUITABLE CONDITIONS FOR GLYCOLIPID PRODUCTION BY *CASEOBACTER PARAFFINICUM* B126

Xue Yanfen

Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** A suitable medium for the glycolipid synthesis by *C. paraffinicum* n. sp. B126 was elaborated using the orthogonal design of experiment, and composed of (g/L):  $\text{NaNO}_3$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, yeast extract 2.0, EDTA 0.0015, n-hexadecane 10ml; pH 7.0~7.5. The inoculum age and amount were 48~72h and 5% (v/v), respectively. Cultures in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml medium were incubated on a rotary shaker at 200 r/min. and 30°C for 50~60h. The surface and intersurface (against n-hexadecane) tension of the culture broth were 33 mN/m and 1~3 mN/m, respectively. The glycolipid yield was 3.7 g/L and 9 times higher than that in the primitive screening medium. The conversion rate of added n-hexadecane was 48%.

**Key words** *Caseobacter paraffinicum* B126, Suitable conditions for glycolipid production, Biosurfactant