

生物表面活性剂产生菌的筛选

潘冰峰 徐国梁 施邑屏 李江云 李祖义

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘 要 从 1000 份土壤和水等样品中,经富集培养、血平板分离、摇瓶培养和排油活性测定等方法筛选出 10 株能产生各种生物表面活性剂的菌株(包括细菌,酵母和霉菌)。其中一株细菌产海藻糖脂,一株细菌产鼠李糖脂,两株细菌分别产长碳链不饱和脂肪酸和壬二酸,两株酵母产生的脂多糖具有良好的乳化性能。

关键词 生物表面活性剂,菌种筛选,乳化

分类号 TQ423 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)03-0264-67

生物表面活性剂是由微生物产生的具有表面活性的两性化合物。与化学合成的表面活性剂相比,它们除具有降低表面张力、稳定乳化液和发泡等相同特性外,还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的无毒、能生物降解等特性,有利于环境保护。因此,近年来对它的研究日益增多,它们在医药、化妆品、洗涤剂和食品等工业方面具有潜在的应用价值。

微生物产生的生物表面活性剂包括许多不同的种类,如糖脂^[1~3]、脂肽^[4]、多糖-脂类复合物^[3]、磷脂、脂肪酸和中性脂^[5]等。它们主要是由利用碳氢化合物作碳源的微生物产生,用来乳化这些碳源,以利菌体的吸收,本文介绍了筛选生物表面活性剂产生菌的方法以及生物表面活性剂种类的分析方法,并筛选出 10 株产生物表面活性剂的菌株,它们分别产生糖脂、磷脂、脂肪酸和脂多糖等生物表面活性剂。

1 材料和方法

1.1 菌种筛选和培养

1.1.1 细菌富集培养基(%):硫酸铵 1,氯化钾 0.11,氯化钠 0.11,硫酸亚铁 2.8×10^{-5} ,磷酸二氢钾 0.34,磷酸氢二钾 0.44,硫酸镁 0.05,酵母膏 0.05,微量元素溶液 0.5mL,正烷烃 2mL。28℃ 振荡培养 3-5d。

1.1.2 酵母和霉菌富集培养基(%):硫酸铵 0.6,磷酸二氢钾 0.3,磷酸氢二钠 0.2,硫酸镁 0.08,硫酸亚铁 0.001,氯化钙 0.01,酵母膏 0.05,微量元素溶液 0.5mL,正烷烃 4mL。
微量元素溶液(%):硫酸锌 0.029,氯化钙 0.024,硫酸铜 0.025,硫酸镁 0.017。

1.1.3 血平板培养基(%):牛肉膏 0.3,蛋白胨 1,酵母膏 0.01,氯化钠 0.5,琼脂 1.8,羊血 5。利用生物表面活性剂能够溶血的特性^[6],将富集培养液用划线分离的方法接种于血平板上,28℃ 培养 1-2d,挑选溶血的单菌落作进一步的研究。

1.1.4 斜面培养基(%):蛋白胨 1,葡萄糖 2,酵母膏 0.01,pH5.6。从血平板上挑选的单

菌落接于斜面培养基上,28℃培养 1-2d。

1.1.5 摇瓶培养:将斜面培养的菌种接于摇瓶培养液中,28℃振荡培养 3-5d。培养基同富集培养基。

1.2 表面活性测定

1.2.1 生物表面活性剂排油活性测定:取一培养皿,加水,水面上加 0.1mL 正烷烃形成油膜。在油膜中心加摇瓶发酵液,中心油膜被挤向四周形成一圆圈,圆圈的直径与表面活性剂含量和活性成正比。圆圈直径大于 3cm 的菌株保留作进一步的研究。

1.2.2 表面张力测定:采用环法测定表面张力,仪器为 JZHY-180 界面张力仪(河北省承德市试验机厂)。

1.2.3 乳化性能测定:取一试管,加 5mL 煤油和 5mL 表面活性剂溶液(浓度与原始发酵液相同),用 XSC-200-1 型超声波发生器(上海东亚仪器厂)于 80W 处理 40s,在不同时间测量乳化液和油相体积。

1.3 生物表面活性剂化学结构分析

1.3.1 薄层层析(TLC)分析:取 1mL 发酵液离心,上清液用氯仿/甲醇(2/1, v/v)抽提后进行薄层层析,展开剂为氯仿/甲醇/水(65/15/2, v/v/v)。显色剂为:(1)苯酚-硫酸试剂:3g 苯酚和 5mL 浓硫酸溶于 95mL 乙醇中,糖脂显棕色斑点。(2)钼酸铵-高氯酸显色剂:磷脂显色剂,参见文献[7]。(3)茚三酮显色剂:0.5% 无水丙酮溶液。脂肽显红色。

1.3.2 质谱分析:EI-MS 分析使用 HP5989A 质谱仪。

2 结果和讨论

从土壤、污泥和污水等处获得约 1000 个样品,经过富集培养、血平板分离和斜面培养获得约 1200 株菌株。通过摇瓶培养和排油活性测定,圆圈直径大于 3cm 的菌株有 56 株。经过三次重复摇瓶培养,表面活性保持稳定、表面张力较低的菌株有 10 株(表 1)。其中细菌 5 株。酵母 3 株,霉菌 2 株。

筛选到产生物表面活性剂的菌株后,还需了解所产生物表面活性剂主要为哪一类化合物,为进一步的分离纯化和结构测定创造条件。以菌株 842 为例,我们设计了分析步骤,可以快速确定生物表面活性剂的

表 1 生物表面活性剂产生菌的筛选

Table 1 The isolation of microorganisms producing biosurfactants				
菌株 Strain	种类 Type	排油圈直径/cm Diameter	表面张力/(mN/m) Surface tension	表面活性剂 Biosurfactants
257	细菌 Bacteria	8.2	37.5	海藻糖脂 Trehaloselipids
923	细菌 Bacteria	>12	34.5	鼠李糖脂 Rhamnolipids
206	细菌 Bacteria	6.0	38.8	未定 Unidentified
829	细菌 Bacteria	5.0	39.0	脂肪酸 Carboxylic acid
842	细菌 Bacteria	4.5	38.0	壬二酸 Azelaic acid
230	酵母 Yeast	5.0	42.0	脂多糖 Lipopolysaccharide
386	酵母 Yeast	5.0	43.0	脂多糖 Lipopolysaccharide
302	酵母 Yeast	6.0	37.8	磷脂 Phospholipidside
106	霉菌 Fungus	4.6	41.9	磷脂 Phospholipids
710	霉菌 Fungus	5.0	41.0	磷脂 Phospholipids

主要类型(见图 1)。

从图 1 可见,菌株 842 发酵液具有较低的表面张力,表明发酵液中含有较多的生物表面活性剂。发酵液的丙酮沉淀部分(主要是多糖及蛋白类化合物)对表面张力的降低贡献较小。而氯仿/甲醇提取物可以有效地降低表面张力,表明菌株 842 所产生的生物表面活性剂主要是脂类化合物。经过 TLC 分析,这些脂类化合物主要由中性脂和磷脂组成。中性脂的主要成分之一经硅胶柱层析和 TLC 分离纯化及 EI-MS 确定为壬二酸(见图 2)。

运用类似的方法,可以确定菌株 923 产生的生物表面活性剂是鼠李糖脂,它们具有很好的表面活性^[8]。菌株 257 产生的表面活性剂为海藻糖脂。菌株 829 产生的表面活性剂是长碳链的不饱和脂肪酸,菌株 206 产生的表面活性剂也是脂类化合物,但不是糖脂、磷脂或中性脂,具体结构有待确定。菌株 302、106 和 710 产生的表面活性剂主要是磷脂。而菌株 230 和 386 产生

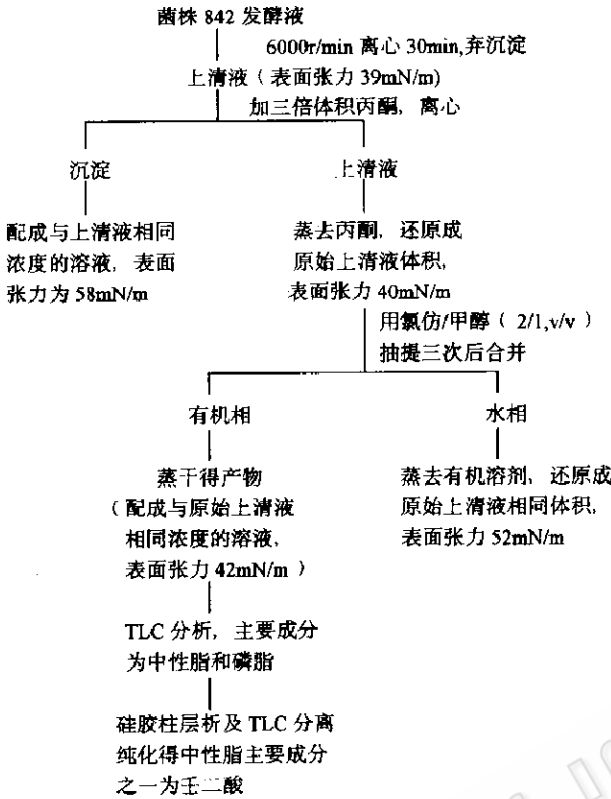


图 1 菌株 842 所产生生物表面活性剂的分析

Fig. 1 The analysis of biosurfactants produced by strain 842

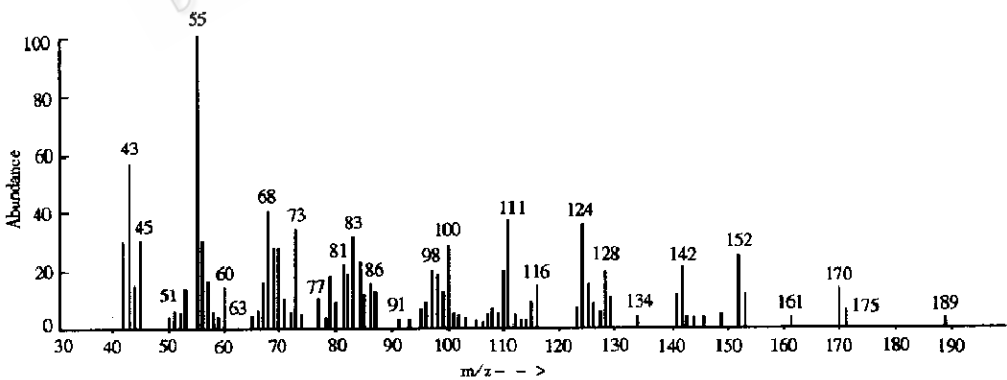


图 2 菌株 842 所产生的一种化合物的质谱分析图谱

Fig. 2 EI-MS of one product of strain 842

的表面活性剂为脂多糖类化合物,有关化学结构尚在研究中。它们具有较好的乳化性能(图 3)。菌株 230 产生的脂多糖能使乳化液保持稳定 20d 以上。上列筛选到的各种生物表面活性剂,均有良好的表面活性,可以开发应用于三次采油、食品乳化或水果保鲜等方面。

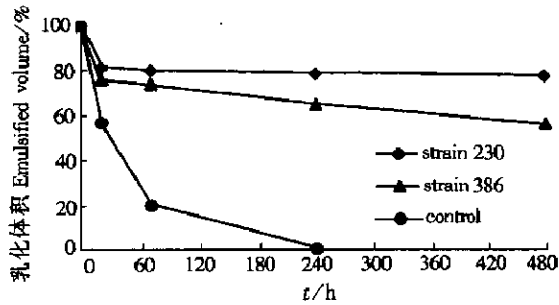


图3 菌株 230 和 386 所产脂多糖的乳化稳定性试验

Fig.3 Stability of kerosene-water emulsion formed by biopolymer from strain 230 and 386

参 考 文 献

- [1] Hommel R, Stüwer O, Stuber W *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **26**:199~205.
- [2] Inone S, Ito S. *Biotechnol Lett*, 1982, **4**:3~8.
- [3] Pines O, Gutnick D L. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**:661~663.
- [4] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **31**:488~494.
- [5] Macdonald C R, Cooper D G, Zajic J E. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**:117~123.
- [6] Catherine N M, David G C, Ronald J N. *J Ferment Technol*, 1984, **62**(4):311~314.
- [7] Egon Stahl. *Thin-Layer Chromatography, a Laboratory Handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1969.
- [8] 李祖义, 徐永珍, 李江云等. *化学学报*, 1988, **46**:264.

THE ISOLATION OF MICROBE PRODUCING BIOSURFACTANTS

Pan Bingfeng Xu Guoliang Shi Yiping Li Jiangyun Li Zuyi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract Microorganisms capable of producing biosurfactants can be isolated by a series of steps including hydrocarbon enrichment culture, hemolytic activity assay on blood agar plates and oil displacement activity assay etc. Ten strains(including bacteria, yeasts and fungi) were isolated with higher surface activity from 1000 samples from soil, sludge, waste water etc. Two strains of bacteria produced rhamnolipids and trehaloselipids respectively. One strain of bacterium produced long chain unsaturated carboxylic acid and another produced azelaic acid. Two strains of yeasts produced lipopolysaccharides with excellent emulsification property.

Key words Biosurfactants, Isolation of microbe, Emulsification property