

糖脂产生菌的筛选及发酵液的表面活性研究

陈 静¹, 张云端¹, 宋 欣²

1(山东轻工业学院食品与生物工程学院, 山东济南, 250353);

2(山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东济南, 250100)

摘 要 从来源不同的土样和污水中, 分离得到 1 株酵母菌 Y_{2A}。摇瓶发酵培养, 发现该菌发酵液具有很好的排油活性, 并且能将发酵液的表面张力从 72 mN/m 降为 37.4 mN/m。薄层层析、紫外光谱、红外光谱分析以及菌种鉴定, 表明该菌是 1 株未见报道的糖脂产生菌拟威克酵母(*Wickerhamiella domercqiae*) Y_{2A}。该糖脂在 pH 2~8, 12% 盐浓度和 120℃ 下仍然保持良好的表面活性, 并且对原油有较好的乳化能力。

关键词 菌种筛选, 糖脂, 表面活性

生物表面活性剂是 1960 年代发展起来的一种新型的活性物质。其结构类型多样, 如糖脂、脂肽、聚糖脂和聚蛋白脂等。由于具有稳定性好、抗盐能力强、受温度影响小、无毒、成本低和能被生物降解等优点, 现已在工业生产的各个领域, 如石油开采业、土壤修复、医药、纺织、食品和化妆品等得到了广泛的应用^[1~3]。

文中对糖脂产生菌进行了筛选, 并研究了 pH、盐浓度、温度对发酵液表面活性的影响及发酵液对原油的乳化能力, 为菌株在食品工业、石油工业 and 环境保护等方面的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样 品

来自于油田、植物油厂、炼油厂、菜市场、污水、食品厂、油菜田的土样和水样 50 个。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基(%)

菜子油 2.0 (v/v), KH₂PO₄ 0.1, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, (NH₄)₂SO₄ 0.4, 酵母粉 0.2。

1.2.2 平板和斜面培养基(%)

葡萄糖 2.0, 酵母粉 1.0, 蛋白胨 2.0, 琼脂 2.0。

1.2.3 发酵培养基(%)

葡萄糖 5.0, 菜子油 5.0 (v/v), KH₂PO₄ 0.1, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, (NH₄)₂SO₄ 0.4, 酵母粉 0.2。

1.3 试剂和仪器

菜子油为食用级, 其他试剂均为分析纯试剂;

GF254 薄层层析硅胶板, 青岛江山化学试剂有限公司; 界面张力仪, 承德市试验机厂; 旋转蒸发仪, 上海申胜生物技术有限公司; 紫外扫描仪, 日本岛津; NEXUS470 型傅立叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司。

1.4 方 法

1.4.1 初 筛

样品于已灭菌的富集培养基中, 30℃, 150 r/min 培养 2~3 d。将富集培养液在平板培养基上划线分离, 30℃ 培养 1~2 d。挑取单菌落于斜面培养基上, 30℃ 培养 2 d。

1.4.2 复 筛

将初筛得到的菌种接种于发酵培养基中, 30℃, 150 r/min 培养 4 d。取发酵液测定排油活性、表面张力。

1.4.3 油膜破裂法测发酵液表面活性^[4,5]

1.4.4 发酵液表面张力测定^[5]

1.4.5 薄层层析分析

发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取后进行薄层层析分析。展开剂为三氯甲烷/甲醇/水(65/15/2)^[6], 显色剂为 α-萘酚试剂^[7], 糖脂显紫红色斑点。

1.4.6 紫外光谱分析

发酵液经乙酸乙酯萃取, 减压干燥, 得粗提产物, 然后用色谱纯乙腈溶解, 从 100~700 nm 进行全波段扫描。

1.4.7 红外光谱分析

利用 KBr 压片法对粗提产物进行红外光谱分析。

1.4.8 发酵液对原油的乳化能力

取原油分别与等体积自来水和发酵液漩涡混合 30 s, 静置 5 min。取 1 滴于载玻片上, 盖上盖玻片,

第一作者: 博士, 讲师(张云端副教授为通讯作者)。
收稿日期: 2007-01-30, 改回日期: 2007-04-17

于显微镜下观察。

2 结果

2.1 初筛和复筛

初筛得到 200 多株菌,复筛后具有排油活性且圆圈直径 >6 cm 的菌株有 10 株。经重复实验,排油活性稳定且表面张力较低的菌株有 4 株,见表 1。

表 1 不同菌株发酵液的排油圈直径和表面张力

菌株	排油圈直径/cm	表面张力/ $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$
7-1	9	50.4
8-2	7	51.4
25	6	37.3
Y_{2A}	>9	37.4

2.2 薄层层析分析

薄层层析分析表明,7-1、8-2、25 号菌株没有显示紫色斑点,说明此 3 株菌不产生糖脂或产量太低。而不同点样量的 Y_{2A} 菌株有紫色斑点显示,说明该菌产生糖脂,见图 1。



图 1 薄层层析图

2.3 紫外及红外光谱分析

在 180~700 nm 扫描,发现在 260 和 280 nm 处无吸收峰,证明无核苷酸及蛋白质存在。红外光谱分析进一步验证为一典型的糖脂化合物^[8],结果见图 2,表 2。

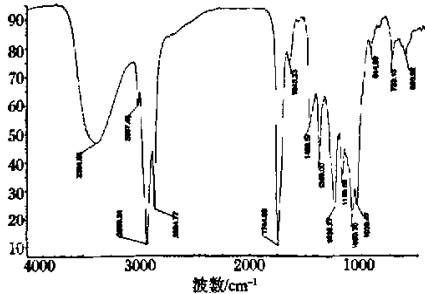


图 2 红外光谱图

表 2 粗提物含有的官能团

波数	官能团	波数	官能团
3384	-OH(醇羟基)	1456	-COOH
2926	-CH ₂ (亚甲基)	1239	-CoAc
2854	-CH ₂	1169	C-O-C
1744	-C=O	1080	糖基
1643	C=C		

2.4 菌株 Y_{2A} 的鉴定

2.4.1 细胞形态和大小

单个细胞为椭圆形, $(2.5 \sim 3) \mu\text{m} \times (5 \sim 6) \mu\text{m}$, 出芽生殖,多数 1 端出芽,少数 2 端出芽,芽体发生在母细胞一端,母细胞与子细胞之间的腰约 $0.5 \mu\text{m}$ 宽。

在固体平板上培养,菌落较小,直径约 1.5 mm,菌落光滑、湿润、凸起,浅黄褐色^[9]。

2.4.2 BIOLOG 技术鉴定结果

根据 Biolog 鉴定原理,72 h 的相似指数只要 >0.5 ,即判定为同种。 Y_{2A} 与 *Wickerhamiella domercqiae* 的相似指数为 0.63,而且概率也高,见表 3,所以判定 Y_{2A} 为 *Wickerhamiella domercqiae*,并命名为 *Wickerhamiella domercqiae* Y_{2A} ^[10]。

表 3 BIOLOG 技术鉴定结果

培养时间/h	菌种	概率	相似指数
24	NID	—	—
48	NID	—	—
72	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	100	0.63

2.5 盐浓度、pH、温度对发酵液表面活性的影响

发酵液以 1:20 稀释。分别用以下方法处理发酵液,用 HCl 和 NaOH 溶液调节 pH;加入 NaCl;在不同温度下加热发酵液。测定不同 NaCl 浓度、pH、及不同温度处理时发酵液的表面张力。由表 4 可以看出,pH2~8,发酵液能够保持良好的表面活性;并且稳定性较好,基本不受温度和盐浓度的影响。

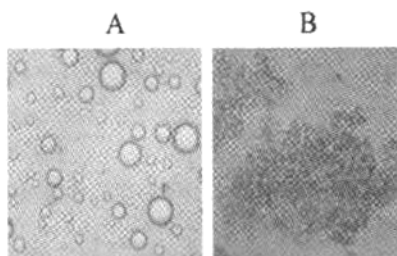
表 4 不同因素对发酵液表面张力的影响

NaCl 浓度 /(%) (质量)	表面张力 / $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	pH 值	表面张力 / $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	温度 / $^{\circ}\text{C}$	表面张力 / $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$
0	39.3	2	39.3	50	39.1
3	39.8	4	39.3	60	39.3
6	40.1	6	39.1	70	39.1
9	39.1	8	41.4	80	39.6
12	39.8	10	41.2	90	39.1
15	41.2	12	49.1	100	39.5
18	41.5			110	39.4
21	41.9			120	39.3

注:以上结果均为 3 次测量的平均值。

2.6 发酵液对原油的乳化性能

与原油混合后发现,发酵液与原油形成乳状液并在很长一段时间内保持稳定;而水与原油混合,短时间内很快分层。各取1滴在显微镜下观察,见图3,发现水与原油混合,油以油滴状存在,并且油滴之间很快会合形成大的油滴;而发酵液与原油混合,发生了乳化作用,部分发酵液进入原油,形成油水乳状液。



A: 不含发酵液; B: 含发酵液

图3 发酵液的乳化活性

3 讨论

生物表面活性剂与化学合成的表面活性剂相比,具有相同的特性,又具有自身的优点^[11]。生物表面活性剂的种类繁多,而糖脂是目前研究较多的一类^[12]。文献报道的糖脂产生菌主要是假单胞菌属(*Pseudomonas*)和假丝酵母属(*Candida*)的一些菌株^[9],筛选新型的糖脂产生菌对于研究糖脂产生菌的多样性具有非常重要的意义。本文筛选到1株目前未见报道的糖脂产生菌,发现该菌株发酵液具有较好的表面活性,并且发酵液表面活性基本不受盐浓度、pH和温度的影响,为该糖脂在食品、化工、石油

等行业的应用提供理论基础。

参考文献

- 1 刘波,张红梅. 鼠李糖脂应用于三次采油的实验研究[J]. 油气采收率技术, 1997, (4): 20~25
- 2 徐志伟,尤勤,孙炳寅. 生物表面活性剂的工业应用[J]. 生物技术, 1995, (5): 6~8
- 3 Rosenberg E, Ron E Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 154~162
- 4 潘冰峰,徐国梁,施邑屏,等. 生物表面活性剂产生菌的筛选[J]. 微生物学报, 1999, 39: 264~267
- 5 Jain D K, Collins Thompson D L, Lee H Trevors J T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 1991, 13: 271~279
- 6 Asmer H J, Lang S, Wagner F, et al. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids[J]. JAOCS, 1988, 65: 1460~1466
- 7 Klekner V, Kosaric N, Zhou QH. Sophorose lipids produced from sucrose[J]. Biotechnol Letters, 1991, 13: 345~348.
- 8 Hu Y M, Ju L K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 29: 593~601
- 9 Kurtzman C P, Fell J W. The yeast, a taxonomic study[M]. The Netherlands: Elsevier, 1998. 45~104
- 10 Praphailong W, Gestel M V, Fleet G H, et al. Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts[J]. Lett Appl Microbiol, 1997, 24: 455~459
- 11 张天胜. 生物表面活性剂及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- 12 Bento F M, Camargo F O, Okeke B C, et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil[J]. Microbiological Research, 2005, 160: 249~255

Screening a Strain Producing Glycolipids and Studying the Surface Activity of Culture Broth

Chen Jing¹, Zhang Yunrui¹, Song Xin²

1(College of Food and Biologic Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China)

2(State Key Laboratory of Microbiol Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

ABSTRACT A yeast strain Y_{2A} was isolated from samples from soil and wastewater. After fermentation, the culture broth of Y_{2A} had good oil film-collapsing activity and the surface tension was decreased from 72mN/m to 37.4mN/m. Furthermore, the strain was identified as glycolipids-producing *Wickerhamiella domercqiae* Y_{2A} by TLC, UV and infrared spectra analysis. Our data also demonstrated that the NaCl concentration (<12%), pH (2~8) and high temperature (<120℃) did not affect the surface tension of Y_{2A} culture broth. And the culture broth can emulsify the crude oil.

Key words screening, glycolipids, surface activity