

鼠李糖脂快速定量分析方法及其影响因素研究*

卢国满 刘红玉** 曾光明 黄国和 张 慧

(湖南大学环境科学与工程学院 长沙 410082)

摘要: 为探寻简单、快速的由铜绿假单胞菌生产鼠李糖脂的定量分析方法, 对比分析了蒽酮-硫酸法、L-半胱氨酸-硫酸法、苯酚-硫酸法及其影响因素。结果显示, 蒽酮-硫酸法优于其它两种方法, 并得出了其最佳测试条件。发酵液中剩余的葡萄糖、上清液对鼠李糖脂定量分析的影响可以忽略, 菌体和中层杂质对鼠李糖脂的定量分析有一定程度的影响。因而, 分析时要去除菌体。而中层杂质对定量分析的影响可以通过制备含中层杂质的鼠李糖溶液标准曲线而消除。

关键词: 鼠李糖脂; 铜绿假单胞菌; 蒽酮-硫酸法; 定量分析

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0106-06

Study on Rapid Methods for Quantitative Analysis Rhamnolipid and Its Influence Factors *

LU Guo-Man LIU Hong-Yu** ZENG Guang-Ming HUANG Guo-He ZHANG Hui

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: In order to find an easy and rapid quantitative analytical method to detect rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*, three methods, H_2SO_4 -anthrone analysis method, L-cysteine- H_2SO_4 method and phenol- H_2SO_4 method, were compared in the present paper, and the influence factors were also considered. The results showed that H_2SO_4 -Anthrone analysis method was better than the others and its optimal reaction condition was obtained. The influence to the quantitative analysis of rhamnolipid from the residual glucose and the top clean liquid layer in the ferment solution could be ignored. But the influence from the bacterial body and the middle layer of the ferment solution reached a certain degree. Thus, the bacterial body should be removed before measuring. However, the influence from the middle layer of the ferment solution could be avoided by making a standard curve which was made by using a rhamnose mixed with the middle layer ferment solution.

Key words: Rhamnolipid, *Pseudomonas aeruginosa*, H_2SO_4 -anthrone analysis method, Quantitative analysis

鼠李糖脂主要是由铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 在好氧条件下, 利用葡萄糖、甘油和烷烃等底物合成的, 它在环境生物修复、食品工业、农业以及石油开采业中的应用前景得到了广泛的认可^[1,2]。因此, 对发酵过程中鼠李糖脂产物进行快速定量分析具有重要意义。

目前, 鼠李糖脂生产过程中的定量分析方法已有多种, 主要是: (1) du Nouy 环法, 该方法通过测定气/液、液/液的界面张力来定量分析鼠李糖脂的浓度, 但只能测定鼠李糖脂的相对浓度, 若原浓度在临界胶束浓度以上时, 还需进行稀释, 给定量带

* 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2004AA649370)

湖南省自然科学基金 (No. 05JJ30021)

其他作者: 张 利

** 通讯作者 Tel: 131-8700-7189, E-mail: hylu@hnu.cn

收稿日期: 2005-11-10, 修回日期: 2006-01-18

来极大的不便^[2,3]；(2) 96 孔微板法，Bodour 等^[3]将该法应用于鼠李糖脂的定量分析中，它测定的是发酵液中全部表面活性物质的浓度，而发酵液中除了鼠李糖脂外可能还有其它的表面活性物质，因此会给实验结果带来系统误差，其实第一种方法也有此种缺陷；(3) 薄层层析法 (thin layer chromatography, TLC) 可以在溶剂体系合适的条件下得出鼠李糖脂的定量信息，但由于预处理的纯化步骤较为费时，不适合于分析优化研究中的大批样品^[4]；(4) Dézie 等^[5]利用液相色谱与质谱联用技术，对铜绿假单胞菌 57RP 生产的鼠李糖脂进行定量分析，此种方法需用苔黑酚比色法来验证和制作标准曲线，其可靠性依赖于苔黑酚比色法，同时还需要昂贵的仪器。正由于上述方法各有缺陷，目前采用较多的仍是化学定量方法，如蒽酮-硫酸法及 L-半胱氨酸-硫酸法、苯酚-硫酸法等^[6-8]。但对于发酵液中其它杂质成分对鼠李糖脂定量分析的干扰作用还未见有报道。因此，本实验对比分析了蒽酮-硫酸法、L-半胱氨酸-硫酸法和苯酚-硫酸法，并对蒽酮-硫酸法的显色条件及发酵液中其它杂质成分对其定量分析的影响进行了研究，试图发现快速、简便的分析方法，以便对大量样品进行快速定量测试。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 购自中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，保藏号为 AB93066。

无水葡萄糖 (在 80℃ 温度下烘干至恒重)、鼠李糖、浓硫酸、蒽酮等均为分析纯。

1.2 鼠李糖脂的制备

种子扩大培养：将铜绿假单胞菌接种于种子培养基中，37℃ 下摇床 (200 r/min) 培养 24 h，4℃ 下保存备用。种子培养基配方：牛肉膏 2.0 g，蛋白胨 5.0 g，NaCl 5.0 g，定容至 1 L，pH 7； 1×10^5 Pa 下高压蒸汽灭菌 20 min。

铜绿假单胞菌发酵培养：将种子扩大培养液接种于发酵培养基上，接种量为 3% (v/v)，37℃ 下摇床 (转速 200 r/min) 培养 48 h。发酵培养基配方：葡萄糖 18.0 g，NaNO₃ 2.0 g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.5 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g，FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g，KH₂PO₄ 1.5 g，定容至 1 L，pH 6.5； 0.7×10^5 Pa 灭菌 30 min。

鼠李糖脂的制备及发酵液组分分离：参考 Shi^[9]，步骤如下：(1) 去菌体：调节发酵培养液的 pH 值至 8.0，于 10,000 r/min 转速下离心 10 min 除去菌体；(2) 分层：将离心后的发酵液的 pH 值用 36% 的 HCl 调至 2.0，添加氯仿、甲醇至离心液：氯仿：甲醇 = 3：2：1 萃取，剧烈振荡 15 min 后静置分层；(3) 分别收集下层、中层和上清液。下层为鼠李糖脂层，置真空旋转蒸发器中，于低压、50℃ 条件下干燥，得到鼠李糖脂；上清液，置于通风柜挥发有机溶剂数天后备用；中层较混浊，主要为杂质，冷冻干燥后待用。

1.3 分析方法

水解参考文献 [8]。

L-半胱氨酸-硫酸法参考文献 [6]。

苯酚-硫酸法参考文献 [7]。

蒽酮-硫酸法^[8]：置试管于冰浴中，加入 0.2% 蒽酮-硫酸显色剂 [硫酸强度为 V (H₂SO₄) / V (H₂O) = 85/15] 4.0 mL，沿着管壁缓慢滴加 1.0 mL 试样并不断振荡散

热, 冷却后置沸水浴中加热 15 min, 冷却 20 min 后进行光谱扫描 (300 nm ~ 800 nm)。

摩尔最大吸光系数 确定: 精确配制 50.0 mg/L 的鼠李糖标准溶液, 测定不同波长下溶液的 OD 值。按下式计算 $\varepsilon_{\max}^{[10]}$: $\varepsilon_{\max} = \frac{\text{鼠李糖的分子量}}{0.05} \times \text{最大吸收波长下的吸光度}$ 。

吸光度 (OD) 测定及数据处理: 取 5 个 50.0 mg/L 鼠李糖标准溶液为平行样, 每个样每隔 0.5 h 重复测 2 次, 结果取平均值; 计算初始吸光度的 \bar{x} 、 s 、 $s-\bar{x}$ 值 (\bar{x} 为 5 次测得的平均吸光度, s 为标准偏差, $s-\bar{x}$ 为相对标准偏差)。

变异度 = $\frac{\text{各个时刻的吸光度值} - \text{初始吸光度值}}{\text{初始吸光度值}} \times 100\%$ 。

鼠李糖标准曲线的制备: 精确配制鼠李糖溶液系列浓度梯度: 0.0, 30.0, 60.0, 90.0, 120.0, 150.0, 180.0 mg/L, 测定各溶液的 OD 值并绘制标准曲线。

发酵液各组分对鼠李糖脂溶液测定的影响: 将铜绿假单胞菌发酵液的各组分 (上清液, 中层杂质) 分别水解后, 分别添加到系列浓度梯度的鼠李糖标准溶液中, 测定溶液的 OD 值, 其含中层杂质或上清液水解液的鼠李糖溶液所含中层杂质或上清液浓度与它们在发酵液中浓度相等; 制备含上述同等量的中层杂质水解液的鼠李糖系列溶液 (浓度为 10.0、15.0、20.0 mg/L) 来测定标准曲线的最小检测量; 制备含上述同等量的中层杂质水解液的未知浓度鼠李糖溶液, 再添加一定量的鼠李糖, 使其浓度增加 20.0 mg/L 和 40.0 mg/L, 计算标准曲线的回收率采用公式: 回收率 = $\frac{\text{加标准试样测定值} - \text{试样测定值}}{\text{加标量}} \times 100\%$ 。

鼠李糖脂溶液的定量分析: 将制备的鼠李糖脂溶于 0.05 mol/L 的 NaHCO_3 溶液中配制成浓度为 5.93 g/L 的母液; 再将母液用蒸馏水配制成 0.49、0.99、1.48、1.98、2.47 g/L 的鼠李糖脂浓度梯度溶液或该浓度梯度溶液中含有中层杂质和上清液 (其中层杂质浓度为它在原发酵液中浓度的 2 倍, 而上清液浓度则相等)。上述所配制的溶液经水解之后, 测定 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 测定方法的选取

鼠李糖脂的分子结构中同时含有亲水性基团——鼠李糖和疏水性基团——脂链。由于脂肪酸链的长度常有变化, 因此, 在鼠李糖脂的定量分析中, 通常是分析鼠李糖脂水解液中鼠李糖的含量。

本实验以蒸馏水为空白对照, 采用蒽酮-硫酸法、L-半胱氨酸-硫酸法及苯酚-硫酸法, 分别将 20、80、140 mg/L 的鼠李糖溶液于 UV-5050 上进行光谱扫描。结果显示: 从出峰波长的稳定性和出峰处的吸光度大小来看, 蒽酮-硫酸法明显优于另外两种方法。因此, 本实验选定蒽酮-硫酸法, 并对该方法的可靠性及其影响因素进行了探讨。

2.2 显色时间对鼠李糖溶液 OD 值的影响

为确定鼠李糖显色时间对吸光度的影响, 测定了显色时间 0 ~ 5.5 h 内, 50.0 mg/L 鼠李糖标准溶液的吸光度值。变异度结果显示: 在 30 min 内吸光度基本不变, 随后溶液 OD 值的变异度开始缓慢升高, 但在 5.5 h 内仍然小于 0.025%, 说明蒽酮-硫酸法显

色反应速度快,能在短时间内达到平衡,且稳定性较好。实际分析测定时,在 30 min 内测定比较合适。

2.3 最佳显色反应条件的确定

在显色剂溶液配制中硫酸强度、萘酮用量、水浴加热时间等因素对出峰情况影响较大^[10],因此采用 3 因素、3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交表来安排 9 组实验,每组实验重复 3 次,以蒸馏水作为空白对照,在 UV-5050 上进行光谱扫描。以 553 nm 处的吸光度与 800 nm 处的吸光度之差作为考察指标。正交表头设计见表 1 和方差分析见表 2。

表 1 正交表头设计

因素	水平		
	1	2	3
A [H ₂ SO ₄ /H ₂ O (V/V)]	75:25	85:15	100:0
B [显色剂用量]	4	7	10
C [沸水浴加热时间]	10	15	20

表 2 方差分析表

方差来源	A	B	C
F 值	76.0	5.4	10.6
F 临界值	$F_{0.01}=99$	$F_{0.05}=19$	$F_{0.1}=9$
优方案	A_3	B_1	C_3

从表 2 中数据可知, $F_{0.05} < F_A < F_{0.01}$ 、 $F_{0.1} < F_C < F_{0.05}$ 、 $F_B < F_{0.1}$,说明因素 A、C 在此次正交实验中起关键作用;但因素 A 对指标影响更显著,因此在实验过程中要严格控制 A、C 两因素的操作过程,特别是 A 因素。经过正交优化,结果得出测定 1.0 mL 样品时,优方案是 $A_3B_1C_3$,即 $V(H_2SO_4)/V(H_2O) = 100/0$; 0.2% 萘酮-硫酸试剂用量 4.0 mL;沸水浴加热时间 20 min。与原来的反应条件相比,此优化方案中硫酸强度增强和沸水浴加热时间增加,萘酮-硫酸试剂用量不变;得到的 553 nm 处 OD 值由原来 0.614 增加到 0.807。实验中得到的最佳显色条件刚好是第 7 组的反应条件,所以无需对优化组与 9 组中的最优组做对比实验。优方案的摩尔最大吸光系数的计算结果为 3×10^3 ,说明此方法的灵敏度较高。

2.4 发酵液中其它杂质成分对鼠李糖脂定量分析的影响

铜绿假单胞菌代谢过程中合成的物质不仅包含了鼠李糖脂,可能还含有其它物质,因此发酵液中可能含有鼠李糖脂以及其它杂质成分,这些成分包括剩余的培养基、菌体和其它代谢产物。另外,水解过程中添加的试剂及水解产物对鼠李糖脂的定量分析都可能产生干扰,本试验分析了主要杂质对定量分析的影响。

2.4.1 葡萄糖对鼠李糖脂定量分析的影响:葡萄糖是铜绿假单胞菌发酵培养基的唯一碳源,也是唯一的有机物组分,必须明确发酵液中剩余的葡萄糖是否对鼠李糖脂的定量分析有干扰。实验采用萘酮-硫酸法,分别对 50.0、250.0、500.0 mg/L 葡萄糖标准溶液,20.0、100.0 mg/L 鼠李糖标准溶液,及其混合液进行光谱(300~800 nm)分析。结果显示:葡萄糖的最大吸收峰为 625 nm,而鼠李糖的最大吸收峰为 553 nm,两者之差大于 50 nm,满足混合液显色反应的要求^[10],而且混合液对鼠李糖标准液的吸收峰波长没有影响。因此可以断定,培养基中残留的葡萄糖对鼠李糖的定量分析产生的干扰可以忽略。

2.4.2 菌体对鼠李糖脂定量的影响:实验分析了铜绿假单胞菌发酵液离心去除菌体前后溶液 OD 值的变化。结果发现,含有菌体的发酵液出峰波长零散,变化范围大。说明菌体对鼠李糖脂定量分析的影响大。其原因主要是菌体对光的吸收干扰所致。

将离心前后的铜绿假单胞菌发酵液在 553 nm 下测定的吸光度值代入图 2 中所示的鼠李糖 OD 值曲线,换算得到溶液中鼠李糖的浓度(图 1)。图 1 显示,实验测得含有

菌体的发酵液中鼠李糖浓度远远低于去除菌体后的离心液中鼠李糖的浓度。其原因可能是发酵液中的菌体,在水解或(和)显色反应过程中,与鼠李糖发生化学反应,从而降低了溶液的吸光度。因此必须除去菌体后,才能进行鼠李糖脂的定量分析。

2.4.3 上清液对鼠李糖脂定量的影响:在鼠李糖溶液中添加上清液后,溶液的OD值结果(图2)显示,曲线的斜率和相关系数稍有降低,分别为0.0003和0.0162,但未达显著水平。因此,两条曲线的拟合性较好。

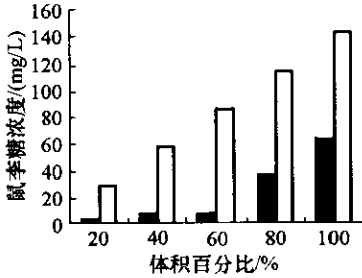


图1 发酵液和离心液中鼠李糖浓度

■ 发酵液, □ 离心液

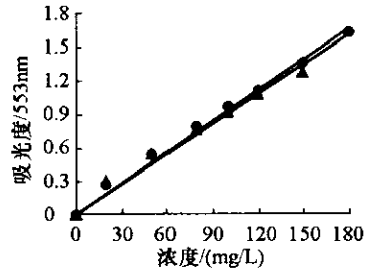


图2 上清液对鼠李糖定量影响曲线

● 鼠李糖 OD 值曲线 ($y = 0.0093x$, $r^2 = 0.9907$), ▲ 含上清液时鼠李糖溶液 OD 值曲线 ($y = 0.009x$, $r^2 = 0.9745$)

对比分析添加上清液前后鼠李糖溶液的光谱图,发现上清液的存在并没有改变显色反应的颜色和鼠李糖最大吸收峰的波长。因此推断,上清液对鼠李糖脂的定量分析基本上没有影响。

2.4.4 中层杂质对鼠李糖脂定量的影响:在鼠李糖溶液中添加中层杂质后,结果(图3)显示,混合溶液的吸光度值显著降低了,因此中层杂质的存在影响着鼠李糖的定量结果。

2.5 鼠李糖脂溶液的定量分析

2.5.1 鼠李糖标准曲线:鼠李糖 OD 值曲线见图2 ($y = 0.0093x$, $r^2 = 0.9907$),经重现性实验,计算可得 $x = 0.4652$ 、 $s = 0.0004$ 、 $s-x = 0.09\%$,可见该标准曲线的重现性非常好,且精度较高。

在553nm下测OD值,制得含中层杂质水解液时鼠李糖溶液标准曲线 ($y = 0.0088x - 0.0145$, $r^2 = 0.9968$)。浓度为10.0、15.0、20.0 mg/L的试样,经实验测定得到的OD平均值代入该标准曲线中,得到它们的计算值与实际值之间的相对误差分别为10%、0.3%和0.1%,可见该标准曲线的最小检测浓度为15.0 mg/L。未知浓度的试样,再添加一定量的鼠李糖溶液,使其浓度增加20.0 mg/L和40.0 mg/L,经实验测定并计算得其回收率分别为100%和101.2%,说明该标准曲线的回收率很理想。

2.5.2 鼠李糖脂溶液的定量分析:将制备的鼠李糖脂溶液和含中层杂质和上清液的鼠李糖脂溶液水解后显色,分别以蒸馏水和含中层杂质溶液显色之后的溶液为空白,测得它们的出峰波长变化范围为 553 ± 3 nm。将它们的平均吸光度值分别代入鼠李糖 OD 值曲线(图2)和含中层杂质水解液时鼠李糖标准曲线 ($y = 0.0088x - 0.0145$, $r^2 = 0.9968$)中,所得的值见图4。由图4中可以直观看出,两者所测得的鼠李糖浓度值相近。尽管含中层杂质和上清液的鼠李糖脂溶液所含中层杂质浓度比含中层杂质浓度时鼠李糖标准曲线中所用溶液的中层杂质浓度高一倍,但图4中显示中层杂质含量的增

大对测定结果无影响。因此,铜绿假单胞菌发酵液中鼠李糖脂的浓度可以不经萃取分离,去除菌体后直接测定溶液的 OD 值,再根据含中层杂质水解液的鼠李糖标准曲线来计算鼠李糖的浓度。

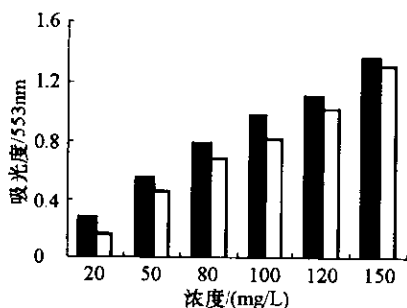


图3 中层杂质对鼠李糖定量影响

■ 鼠李糖溶液, □ 含中层杂质水解液时鼠李糖溶液

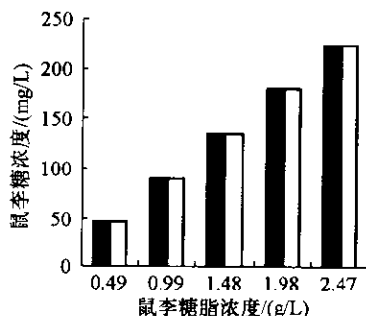


图4 水解液显色对比

■ 无杂质, □ 含杂质

3 结论

(1) 在对鼠李糖脂进行定量分析时, 蒽酮-硫酸法优于 L-半胱氨酸-硫酸法及苯酚-硫酸法。

(2) 蒽酮-硫酸法的最佳测试条件为: 在试管中加 0.2% 的蒽酮-浓硫酸为显色剂 4.0 mL, 沿试管壁滴加样品 1.0 mL, 冷却后沸水浴加热 20 min, 之后于 30 min 内在 553 nm 处测定溶液的 OD 值。

(3) 发酵液中剩余的葡萄糖、上清液对鼠李糖脂定量分析的影响可以忽略, 菌体和中层杂质对鼠李糖脂的定量分析有一定程度的影响, 因而, 分析时要去除菌体。而中层杂质对定量分析的影响可以通过制备含中层杂质水解液的鼠李糖溶液标准曲线而消除。

参考文献

- [1] 时进钢, 袁兴中, 曾光明, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (1): 68~72.
- [2] Schenk T, Schuphan I, Schmidt B. Journal of Chromatography A, 1995, 693: 7~13.
- [3] Bodour A A, Miller-Maier R M. Journal of Microbiological Methods, 1998, 32: 273~280.
- [4] 石杰. 仪器分析. 郑州: 郑州大学出版社, 2003. 1: 372.
- [5] Déziel E, Lépine F, Milot S, et al. Journal of Microbiological Methods, 2000, 1485: 145~152.
- [6] 钱欣平, 孟琴. 分析测试学报, 2000, 19 (5): 41~44.
- [7] Monticone V, Mannebach M H, Treiner C. Langmuir, 1994, 10: 2395~2398.
- [8] 浦跃武, 张浩嘉, 梁世中, 等. 华南理工大学学报, 2000, 28 (4): 26~29.
- [9] Shi J G, Yuan X Z, Zhang S F, et al. Metals Society of China, 2004, 14 (1): 66~70.
- [10] 胡传训. 定量分析化学. 成都: 四川大学出版社, 2002. 1: 141.