

# 表面张力曲线法测定生物表面活性剂的浓度

李安华<sup>1,2,3,4,5</sup> 孙国萍<sup>2,3,4</sup> 许玫英<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园 广东 广州 510650)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

(3. 广东省微生物菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(4. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(5. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要:** 介绍一种利用表面张力曲线测定生物表面活性剂发酵液浓度的方法, 通过测定不同浓度鼠李糖脂标准溶液的表面张力, 制作浓度和表面张力的 x-y 散点图, 再根据希斯科夫斯基经验公式利用 Origin 软件做 x-y 散点图的拟合曲线, 得到该公式的相关参数, 然后利用该经验公式, 通过测定稀释后待测发酵液的表面张力, 可求得原发酵液的鼠李糖脂浓度。和常用的方法相比, 该方法具有快速、简单、准确和测定成本低的优点。

**关键词:** 鼠李糖脂, 生物表面活性剂, 表面张力, 浓度测定

## Determination of the Concentration of Biosurfactants Using a Surface Tension Curve Method

LI An-Hua<sup>1,2,3,4,5</sup> SUN Guo-Ping<sup>2,3,4</sup> XU Mei-Ying<sup>2,3,4\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(4. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(5. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** In this study, we present the development of a new method for biosurfactants detection. A relation between surface tension and concentration of rhamnolipid was plotted in an x-y scatter by Origin using empirical formula. So the concentration of crude fermentation fluid was determined measuring surface tension of the diluted fermentation fluid with the fitted equation. This method is rapid, simple, accurate and low-cost compared to currently used methods.

**Keywords:** Rhamnolipid, Biosurfactants, Surface tension, Concentration determination

生物表面活性剂一般通过微生物发酵产生, 它具有化学合成的表面活性剂所不具有的优点, 如环

境友好性, 低毒性, 易降解, 原料可再生等特点, 因此在环境污染治理、石油开采、医疗、食品等方面

基金项目: 广东省粤港关键领域重点突破项目(No. 2008A030700003); 广东省省部产学研合作引导项目(No. 2009B090300299); 广东省科技计划项目(No. 2007A032400003)

\* 通讯作者: Tel: 86-20-87684471; 信箱: xumy@gdim.cn

收稿日期: 2010-01-03; 接受日期: 2010-03-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

有广泛的应用前景<sup>[1]</sup>。

在生物表面活性剂的菌种筛选、培养基的优化和发酵条件摸索的研究中,都离不开浓度的测量,而生物表面活性剂的浓度测定比较复杂,以鼠李糖脂为例,如采用蒽酮-硫酸法(或苔黑素法),将糖脂和多糖水解后,对单糖的量进行定量的间接方法<sup>[2-3]</sup>,该方法样品前处理复杂、耗时,而且操作浓硫酸又有危险性,如用临界胶束浓度稀释法(CMD),用表面张力仪确定发酵液张力到最低点的稀释倍数,得到发酵液表面活性剂浓度是 CMC (临界胶束浓度)的倍数,估算出发酵液中生物表面活性剂的浓度<sup>[4-5]</sup>,这种方法需要测定多个值来确定 CMC,较费时间,误差较大,而且结果不能直接反映浓度。因此鼠李糖脂浓度测定需要一种简便,快速的方法。本研究通过测定不同浓度鼠李糖脂的表面张力,做 x-y 散点图,然后利用 Origin 做 x-y 散点图的希斯科夫斯基经验公式非线性拟合<sup>[6]</sup>,得到浓度和表面张力关系公式,再通过测定稀释后待测的发酵液的表面张力,代入表面张力关系公式,求得原发酵液中鼠李糖脂的浓度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

表面张力仪(200A)购置于承德精密试验机厂,产鼠李糖脂的铜绿假单胞菌和产表面活性素枯草芽孢杆菌为本实验室保存,十二烷基磺酸钠(SDS)和十二烷基苯磺酸钠(SDBS)均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 鼠李糖脂标准溶液的配制:**将铜绿假单胞菌发酵液用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0,过夜沉淀后,用体积比 2:1 的氯仿-甲醇抽提 3 次,抽提液用旋转蒸发仪 50°C 抽真空浓缩,得褐色粘稠液体,此为鼠李糖脂粗品,用适量水稀释,并用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,然后用蒽酮-硫酸法测鼠李糖脂粗品溶液中鼠李糖浓度,鼠李糖浓度乘以经验常数 3.2 即为鼠李糖脂的浓度。此已知浓度的溶液作为鼠李糖脂标准溶液进行表面张力曲线的制作。

**1.2.2 表面张力标准曲线制作:**测量前,先对铂金环和样品杯进行清洗处理,并以重蒸水为标准品,测量其表面张力是否在 72.75 左右。将鼠李糖脂标准溶液从低到高进行稀释,稀释后的样品用漩涡搅拌器混匀,倒入测量杯中静止 10 min,让表面

活性剂在溶液表面吸附接近平衡,然后再进行测量。每个稀释度测量 3 次,取平均值。做浓度与表面张力的 x-y 散点图,只取表面张力高于 CMC 30 mN/m、低于 45 mN/m 范围内的点,用 Origin 软件做希斯科夫斯基经验公式的非线性拟合,得到相关公式。

希斯科夫斯基经验公式:

$$\delta = \delta_0 - \delta_0 \times b \times \ln(1 + c/a)$$

其中  $\delta$  为表面活性剂溶液表面张力,  $\delta_0$  为纯水的表面张力,  $c$  为溶液的浓度,  $a$ 、 $b$  为待定参数。

**1.2.3 样品的测定:**待测的发酵液离心后,取适量上清到 50 mL 离心管中,用适量双蒸水稀释,然后用漩涡搅拌器混匀,倒入测量杯中静止 10 min,测量 3 次表面张力,并取平均值。将测量值带入已知的相关公式,可得到稀释后的浓度,再乘以稀释倍数可得到原溶液的浓度。

**1.2.4 已知浓度的发酵液配制:**将无菌体的铜绿假单胞菌发酵液用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0,离心除去鼠李糖脂沉淀,取上清调 pH 至 7.0,加入鼠李糖脂,配制成已知浓度的鼠李糖脂发酵液。

## 2 结果与分析

### 2.1 鼠李糖脂表面张力标准曲线

通过已知浓度鼠李糖脂溶液,做浓度与表面张力的关系曲线,由图 1 可知,在一定的浓度范围内,随着鼠李糖脂浓度的升高,溶液的表面张力逐渐降低,表面活性剂的表面张力和浓度存在相关性,这种关系可通过希斯科夫斯基经验公式来表示。对图 1 用 Origin 软件做希斯科夫斯基经验公式的非线性拟合,

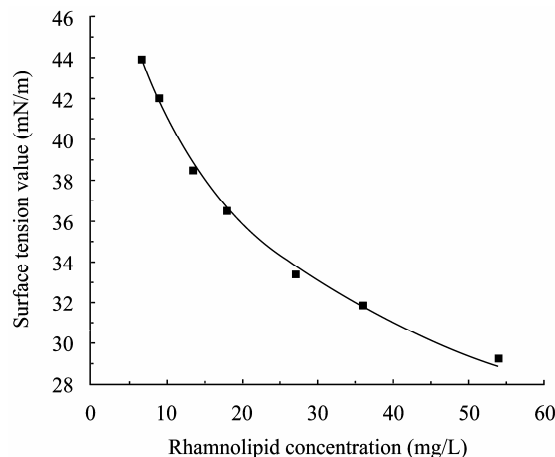


图 1 鼠李糖脂表面张力标准曲线图

Fig. 1 Standard curve for rhamnolipid surface tension

得到拟合公式:  $\delta = 72.75 - 72.75 \times 0.09926 \times \ln(1 + c/0.12345)$ , 相关系数 0.9954。该公式可用于测量发酵液表面活性剂浓度, 通过测定稀释后发酵液的表面张力, 使其表面张力在 30–45 mN/m 的测定范围内, 然后将测定的表面张力值代入已知的经验公式或 Origin 软件, 得到稀释后的发酵液浓度, 乘以稀释倍数即可得到原发酵液的浓度。

2.2 表面张力曲线法的验证

表面张力曲线法验证是分别通过对已知浓度的鼠李糖脂溶液和鼠李糖脂发酵液进行测定, 以蒽酮-硫酸法为参照。由表 1 可知, 对比表面张力曲线法和蒽酮-硫酸法测定标准溶液的结果, 蒽酮-硫酸法的平均误差在 2%左右, 而表面张力曲线法的平均相对误差在 4%左右, 说明对于纯溶液的测定, 蒽酮-硫酸法测定精度要优于表面张力曲线法, 分别将蒽酮-硫酸法和表面张力曲线法的测定值与标准溶液做  $t$  检验,  $P > 0.05$ , 两种方法的测定值和标准溶液在统计学上没有显著区别, 均可作为测定鼠李糖脂纯溶液浓度的方法。

而对于发酵液的测定, 由于发酵液中含有菌体代谢或菌体裂解而产生的单糖、多糖, 或培养基中用糖类作为碳源, 从而干扰测定, 导致蒽酮-硫酸法不能直接测定, 需要提取粗品后, 再测定, 但粗品的提取效率不到 90%, 并且由于操作原因, 不同提取批次会产生提取误差, 累计到后面会导致蒽酮-硫酸法测定有较大的误差, 从表 2 可知, 对于发酵液的测定, 蒽酮-硫酸法的平均相对误差为 12.50%, 做  $t$  检验,  $P < 0.05$ , 说明测定结果不能直接反映溶液的浓度, 需要对数据进行矫正。对于表面张力曲线法, 不需要提取粗品, 可直接测定, 测定的结果相对误差仍在 4%左右, 做  $t$  检验,  $P > 0.05$ , 没有显著差别。对于发酵液的测定, 表面张力曲线法不论是简便性还是准确性来说, 都要优于蒽酮-硫酸法。

表面张力曲线法还可作为测定提取率的方法。通过测定提取前和提取后的表面张力, 可以得到提取前后浓度差别, 进而可知鼠李糖脂的提取率。因此通过表面张力曲线法可以比较不同方法或批次的提取效率, 来考察提取方法和操作过程的优劣。

表 1 表面张力曲线法与蒽酮-硫酸法对标准溶液的测定  
Table 1 Determination of standard solution concentration using the surface tension curve method and the sulfuric acid-anthrone method

测定方法 Measuring methods	鼠李糖脂标准溶液 Rhamnolipid standard solution (g/L)								
	1	3	5	7	10	16	20	25	30
The sulfuric acid-anthrone method (g/L)	1.01	3.08	4.95	7.27	10.26	16.41	20.28	25.46	30.52
Relative error (%)	1.00	2.67	1.00	3.86	2.60	2.56	1.40	1.84	1.73
The surface tension curve method (g/L)	1.05	3.12	5.19	7.22	10.43	15.27	20.69	26.31	30.87
Relative error (%)	5.00	4.00	3.80	3.14	4.30	4.56	3.45	5.24	2.90

表 2 表面张力曲线法与蒽酮-硫酸法对发酵液的测定  
Table 2 Determination of fermentation fluid concentration using the surface tension curve method and the sulfuric acid-anthrone method

测定方法 Measuring methods	已知浓度鼠李糖脂发酵液 Rhamnolipid fermentation fluid of known concentration (g/L)								
	1	3	5	7	10	16	20	25	30
The sulfuric acid-anthrone method (g/L)	0.86	2.47	4.43	6.10	8.35	14.51	17.49	23.46	26.37
Relative error (%)	14.00	17.60	11.40	12.90	16.50	9.31	12.55	6.16	12.10
The surface tension curve method (g/L)	1.04	3.15	5.07	7.29	10.63	16.48	20.57	26.14	31.43
Relative error (%)	4.00	5.00	1.40	4.14	6.30	3.00	2.85	4.56	4.77

由于发酵液中存在盐离子,而盐离子会对表面活性剂的表面张力产生影响,因此考察了不同浓度的 NaCl 对不同浓度的鼠李糖脂溶液表面张力影响,模拟发酵液中盐离子对表面张力的影响。由图 2 可知,10 g/L 的 NaCl 溶液对表面张力有一定的影响,而 1 g/L NaCl 浓度与 0.1 g/L NaCl 浓度的表面张力曲线基本上重叠,说明当 NaCl 浓度低于 1 g/L 时,其测定的表面张力不受盐浓度的影响。一般发酵液的盐浓度要大致相当于 10 g/L 的 NaCl 溶液,而在进行发酵液的表面张力法测定时,需要对发酵液稀释 50 倍以上,其测定时的盐浓度远低于 1 g/L,因此发酵液中的离子浓度对表面张力法的测定影响不大。

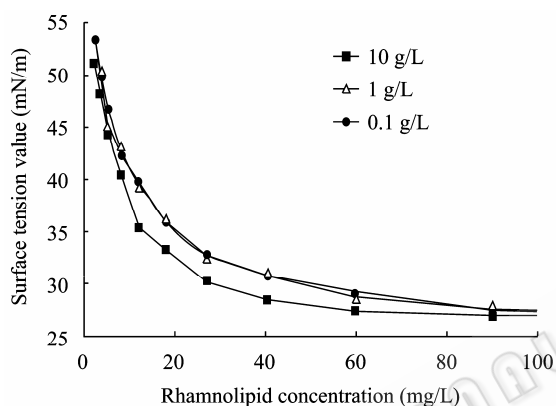


图 2 NaCl 浓度对鼠李糖脂表面活性影响

Fig. 2 Effects of NaCl concentration on rhamnolipid surface tension

### 2.3 其他表面活性剂浓度与表面张力的关系

由于不同表面活性剂的化学结构差异较大,表面活性剂浓度与表面张力的关系也不尽相同,但是在低于临界胶束浓度的范围内,随着浓度的升高,表面张力相对降低的趋势是一致的。通过对枯草芽孢杆菌产生的表面活性素、SDBS、SDS 做表面张力曲线图,并采用希斯科夫斯基经验公式进行非线性拟合,分别得到 3 种表面活性剂浓度与表面张力的经验公式。

图 3 为表面活性素张力拟合曲线,拟合公式:  $\delta = 72.75 - 72.75 \times 0.1602 \times \ln(1 + c/0.3059)$ , 相关系数 0.98246。由于表面活性素的 CMC 值较小,相应的稀释后浓度测定范围在 2–11 mg/L,浓度过低,易导致稀释取样误差和表面吸附误差,同时表面张

力曲线参数  $b$  值较大( $b = 0.1602$ ),表面张力对于浓度对数变化敏感,造成了相关系数较小,在浓度测定误差较大。

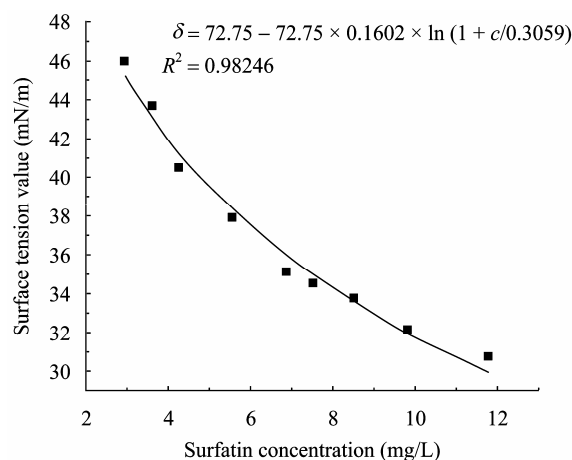


图 3 表面活性素表面张力标准曲线图

Fig. 3 Standard curve of surfactin surface tension

图 4 是 SDBS 张力拟合曲线,拟合公式:  $\delta = 72.75 - 72.75 \times 0.1027 \times \ln(1 + c/0.15497)$ , 相关系数 0.99312。曲线参数  $b = 0.1027$  和鼠李糖脂的值相当,其相关系数较高,测定误差较小。

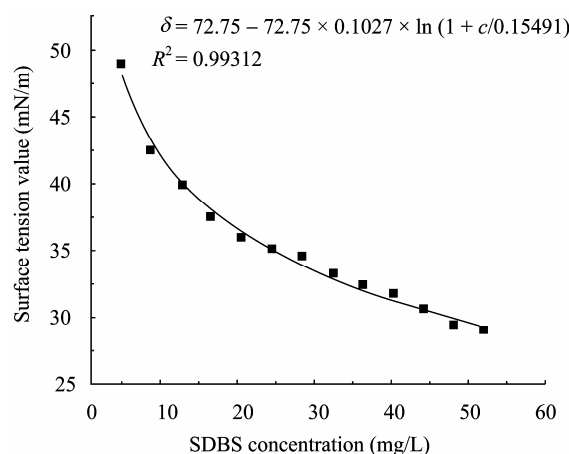


图 4 SDBS 表面张力标准曲线图

Fig. 4 Standard curve of SDBS surface tension

图 5 是 SDS 张力曲线,拟合公式:  $\delta = 72.75 - 72.75 \times 0.17773 \times \ln(1 + c/40.37)$ , 相关系数 0.98665。SDS 的 CMC 超过 1400 mg/L,是其他表面活性剂的几十倍,说明 SDS 的表面活性能力较弱,使用时比其他表面活性剂用量要多。其拟合曲线参数  $b = 0.17773$ ,说明表面张力对浓度对数变化相对敏感。

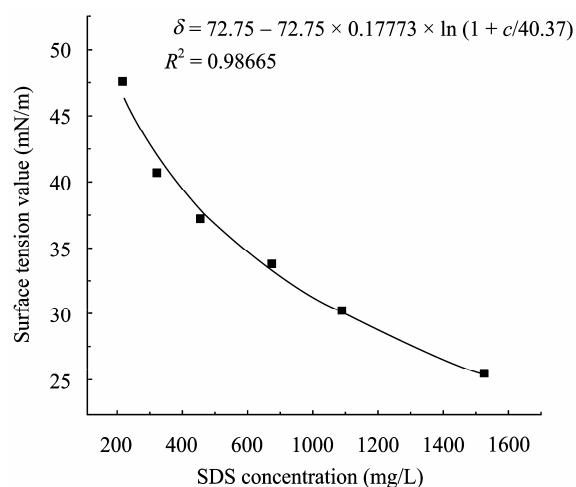


图5 SDS 表面张力标准曲线图

Fig. 5 Standard curve of SDS surface tension

通过3个表面活性剂的浓度-表面张力的非线性拟合,得到了相应的拟合公式,其相关系数在0.98以上,有较高的可信度,可用来通过测定表面张力确定表面活性剂的浓度。该方法应用范围广,可应用到包括生物表面活性剂在内的其他表面活性剂的浓度测量。

### 3 讨论

低浓度时,表面活性剂容易造成取样误差和测定干扰,因此要尽量利用高浓度范围的关系曲线进行拟合,所以选取表面张力在30–45 mN/m的范围作为测定的有效范围,相应的鼠李糖脂浓度范围在略低于CMC的一段浓度范围。表面张力曲线法对表面张力的测定精度要求较高,如测量时温度要保持恒定,测量器具要先用丙酮清洗,然后水洗或灼烧。表面张力和浓度的非线性拟合关系很多,有指数拟合<sup>[7]</sup>、对数拟合(希斯科夫斯基经验公式)、多项式拟合<sup>[8]</sup>、以及表面张力-稀释倍数积分值线性关系<sup>[9]</sup>等,而希斯科夫斯基经验公式中具有水的表面张力和表面活性剂浓度,更能体现表面活性剂和水之间的相互作用关系,因而拟合度更高。通过Origin进行非线性拟合,有拟合度高、结果可靠、处理简单等优点。由于降低溶液表面的表面张力是表面活性剂的基本性质,因此表面张力曲线法不仅可确定浓度大小,还代表表面活性的强弱。

与测定表面张力的其他方法相比较,表面张力曲线法具有很多优点。与萘酮-硫酸法相比,表面张力曲线法可直接测定发酵液,省去了复杂提取操作

和危险试剂的使用,节约试剂损耗,缩短测定时间,同时避免了提取过程对测定结果造成的误差。表面张力曲线法和CMD法相似,都是通过测定表面张力来确定浓度,但是CMD法的测定浓度结果只是一个CMC的倍数,结果不直接反映浓度,临界胶束浓度主观判定,会产生一定误差,而且测定稀释梯度多,工作量大。而表面张力曲线法,最多通过测定两个稀释度,就可得到具体的浓度值,与CMD法相比,有更高的准确度和更少的工作量。

表面张力曲线法适用性广,可用于生物表面活性剂和化学合成的表面活性剂的浓度测定。不论对于发酵液,还是纯溶液的测定都有较高的精确度。表面张力曲线法简单,易于操作,没有试剂消耗,测定成本低,值得在生物表面活性剂的研究中推广应用。

### 参考文献

- [1] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**(1): 47–64.
- [2] Jeong HS, Lim DJ, Hwang SH, *et al.* Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in polyvinyl alcohol beads. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(1): 35–39.
- [3] Heyd M, Kohnert A, Tan TH, *et al.* Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **391**(5): 1579–1590.
- [4] Sen R, Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**(4): 358–363.
- [5] Ochoa-Loza FJ, Noordman WH, Janssen DB, *et al.* Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. *Chemosphere*, 2007, **66**(9): 1634–1642.
- [6] 傅献彩, 陈瑞华. 物理化学(下册). 第3版. 北京: 人民教育出版社, 1980: 429.
- [7] 曹红燕, 李建平, 董超, 等. 最大气泡法测定溶液表面张力的实验探讨. *实验技术与管理*, 2006, **23**(8): 39–41.
- [8] 王瑞芳. 最大泡压法测溶液表面张力实验数据的计算机处理. *华南农业大学学报*, 2001, **22**(2): 92–94.
- [9] 卢国满, 刘红玉, 曾光明, 等. 表面活性剂浓度与表面张力-稀释倍数积分值的关系研究. *分析科学学报*, 2007, **23**(2): 133–136.