

# 一株假单胞菌产生的表面活性剂 及其乳化性能的研究

李祖义 许兴妹 李江云 施邑屏 夏寅 孙常麒

(中国科学院上海有机化学研究所)

本文探讨了假单胞菌产生糖脂的最佳条件。适宜培养基由5%正烷烃, 0.5%NaNO<sub>3</sub>和0.05%酵母膏等成分组成, 初始pH7.0。在此条件下糖脂产量可达12—15g/l, 相对于基质正烷烃的转化率是40—50%。该糖脂乳化性能优于Tween 60。

**关键词** 生物表面活性剂; 糖脂; 乳化力

许多微生物在以正烷烃为唯一碳源的培养基中生长时常产生一种同生长有关的生物表面活性剂, 而在果糖或葡萄糖中生长时, 则只能少量产生。这些生物表面活性剂均有助于培养基中烃基质的乳化, 因而能够刺激微生物对烃的摄取并得以更好地生长。微生物产生的表面活性剂种类很多, 有磷脂类、糖脂类和脂蛋白类等, 研究得最多是糖脂类化合物。此类糖脂具有很强的乳化性能<sup>[1]</sup>, 抗菌性能<sup>[2]</sup>和抗病毒活性<sup>[3]</sup>; 它可应用于食品、制药、日化等工业<sup>[4]</sup>, 另外在活性污泥处理废水中也能应用。

我们实验室以正烷烃为碳源筛选出一支假单胞菌菌株 (*Pseudomonas sp.*), 它在含正烷烃或植物油的培养基中生长, 能分泌出鼠李糖脂。本文报道其生产条件和乳化性能的研究结果。它们的化学结构和表面活化性能将另文发表。

## 材料与amp;方法

### (一) 菌种和培养条件

1. 菌种: 采用的菌株初步鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)

2. 培养基成分 (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 酵母膏0.5, NaNO<sub>3</sub> 5.1, 正烷烃30, 蒸馏水定容, pH7.0。

3. 菌体培养: 100ml培养基装于500ml三角瓶中, 接1白金耳菌量, 往复摇床 (120rpm), 30℃振荡培养1天, 此为前培养。将此培养液2ml再转接至上述100ml培养基中, 同样培养。

### (二) 糖脂提取及定性定量测定

发酵液用氯仿: 甲醇 (V:V = 2:1) 溶剂提取两次, 水洗涤后经无水硫酸钠干燥, 减压蒸干。硅胶薄层层析: E. Merck薄层板, 展开剂: 氯仿: 甲醇: 醋酸 (80:25:1)。显色剂: 蒽酮硫酸液或50%硫酸。用蒽酮法定量测定糖脂含量<sup>[5]</sup>。

### (三) 糖脂乳化性能测定

本文于1985年3月25日收到。

5ml 糖脂溶液（溶于 0.1MNaHCO<sub>3</sub> 溶液中）及 5ml 煤油用匀浆器搅拌 30 秒钟，定时测定水相、乳化相和油相体积。

## 结果与讨论

### （一）初始 pH 对这株假单胞菌菌体生长及糖脂产量的影响

培养液的初始 pH 对该菌产糖脂有很大影响。初始 pH 分别调为 4—10，加正烷烃 5%，以 0.5%NaNO<sub>3</sub> 为氮源，温度 30℃ 培养 5 天后测最终 pH，菌体和糖脂产量结果见表 1。培养液为中性时，菌体生长良好，糖脂产量也高，而在酸性或碱性时，则抑制菌体生长，糖脂产量也下降。

表 1 初始 pH 对糖脂产量的影响

Table 1 Effect of initial pH on glycolipid production

初始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	菌体干重 Cell(g/l)	糖脂产量 Glycolipid(g/l)
4	6.8	3.67	6.7
5	7.0	5.05	6.9
6	7.0	6.50	7.0
7	7.2	7.80	10.4
8	7.2	6.80	8.6
9	7.7	6.00	6.4
10	7.5	5.70	6.3

### （二）假单胞菌在不同氮源中的生长情况

用五种不同氮源来试验该菌产糖脂的情况。在培养基中分别以 NaNO<sub>3</sub>、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO、NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 作氮源，加 5% 正烷烃，pH7.0 30℃ 培养 5 天，结果见表 2。当用 NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 作氮源时，培养液的 pH 降至 5 以下，抑制菌体增殖，糖脂产量也很低。而以 NaNO<sub>3</sub> 或尿素作氮源时则菌体生长良好，糖脂产量也高。

### （三）NaNO<sub>3</sub> 浓度对糖脂产量的影响

表 2 氮源对菌体及糖脂产量的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on cell growth and glycolipid production

氮源 Nitrogen(g/l)	最终 Final pH	菌体干重 Cell(g/l)	糖脂产量 Glycolipid (g/l)
NaNO <sub>3</sub> (3.6)	7.0	5.42	7.56
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO(1.3)	6.4	4.81	8.84
NH <sub>4</sub> Cl(2.3)	5.5	2.3	0.39
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.8)	4.5	2.1	3.52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2.8)	5.0	3.5	4.8

以各种浓度 NaNO<sub>3</sub> 作氮源来观察对糖脂产量的影响见图 1。

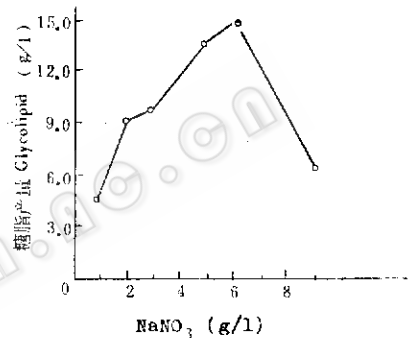


图 1 NaNO<sub>3</sub> 浓度对糖脂产量的影响

Fig.1 Effect of NaNO<sub>3</sub> concentration on glycolipid production

用 5% 正烷烃作碳源，pH7.0，温度 30℃，培养 5 天。随着 NaNO<sub>3</sub> 浓度的增加，糖脂的产量增加。NaNO<sub>3</sub> 浓度为 6g/l 时，糖脂产量最高，但 NaNO<sub>3</sub> 浓度再升高，则糖脂产量就有下降的趋势。

### （四）各种碳源对菌体生长及糖脂产量的影响

除了用正烷烃作碳源外，还试验了各种不同植物油、糖类、甘油及乙醇作为碳源，观察菌体生长和糖脂产生情况。各种碳源浓度均为 3%，NaNO<sub>3</sub> 为 0.5%，初始 pH 为 7.0，温度 30℃ 培养 5 天。结果见表 3。

该菌在正烷烃和植物油中生长良好，糖脂产量也高，在乙醇中生长一般，糖脂产量 5g/l；而在葡萄糖或蔗糖中生长就

表3 各种碳源对糖脂产量的影响  
Table 3 Effect of carbon source on glycolipid production

碳源 Carbon source	豆油 Bean oil	菜油 Rape oil	糠油 Bran oil	正烷烃 n-Paraffin	甘油 Glycerol	乙醇 Ethanol	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose
糖脂产量(g/l) Glycolipid	5.6	6.6	6.0	6.0	2.6	5.0	0.8	0.4
菌体干重 Cell (g/l)	5.7	6.7	6.0	6.0	2.7	5.0	0.8	0.16

差，糖脂产量很低。

### (五) 正烷烃基质浓度对糖脂产量的影响

分别以浓度为2.5%、5.0%、7.5%、10%、15%的正烷烃作为基质、pH7.0，温度30℃培养5天，观察菌体及糖脂的产生情况，得出图2 基质浓度以5—7.5%为好，基质浓度再升高，则糖脂产量反而会下降。

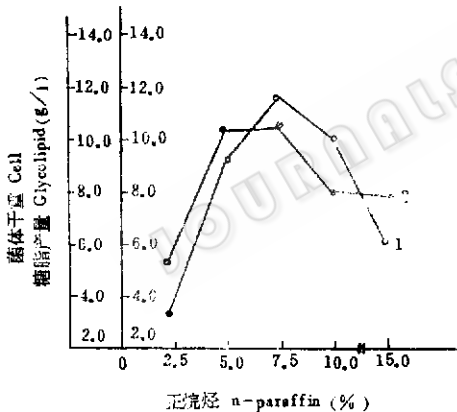


图2 正烷烃基质浓度对菌体生长和糖脂产量的影响  
Fig. 2 Effect of n-paraffin concentration on cell growth and glycolipid production  
1. 菌体干重Cell 2. 糖脂产量Glycolipid

### (六) 菌体生长曲线及对应糖脂产量

以上述最适条件来培养菌体，观察菌体生长曲线及相对应的糖脂产量，见图3。

糖脂产量随着菌体生长而增加，在对数期（3—5天）糖脂增长最快，而6天以后，菌体和糖脂都有减少的趋势。

(七) 有机营养源对糖脂产量的影响  
培养微生物一般要选用最适有机营养

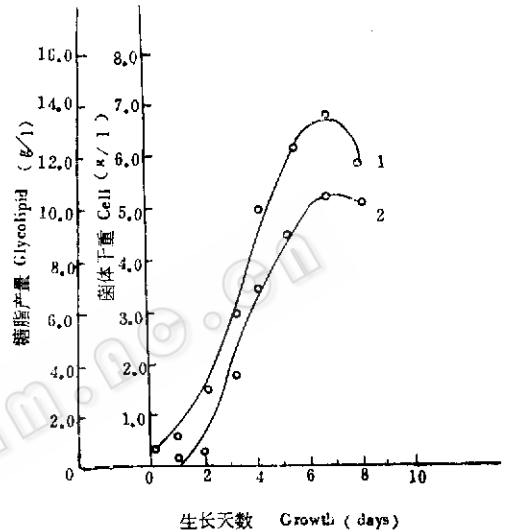


图3 菌体生长曲线和糖脂产量  
Fig. 3 Time course of glycolipid production  
1. 菌体干重Cell 2. 糖脂产量Glycolipid

物。我们用酵母膏、玉米浆、蛋白胨、牛肉汁、麦芽汁进行比较，观察它们对菌体生长及糖脂产量的影响。它们的浓度为0.05%，酵母膏采用不同的浓度：0.01、0.025、0.05、0.1%等四种。加正烷烃3%、pH7.0，温度30℃，培养5天，结果见图4。

这些有机营养物能刺激菌体生长及糖脂的形成，其中酵母膏比其他的效果要好，一般采用0.05%浓度就能达到令人满意的效果。

### (八) 糖脂的乳化性能

该糖脂具有较强的乳化性能，用它溶于0.1MNaHCO<sub>3</sub>，配成0.05%浓度，经30秒钟搅拌，则成乳化液，此乳化液很稳定，

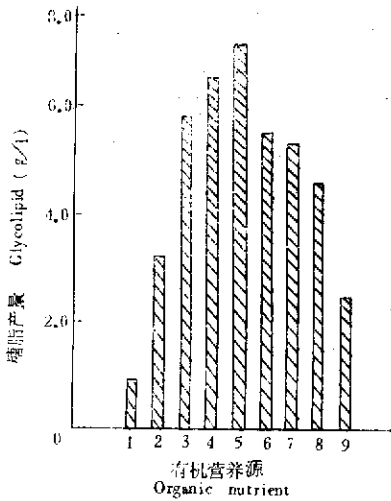


图4 有机营养源对糖脂产量的影响

Fig. 4 Effect of organic nutrient on glycolipid production

1. 不加 No nutrient;
- 2, 3, 4, 5: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1% 酵母膏 Yeast extract;
6. 玉米浆 Corn steep liquor;
7. 牛肉膏 Meat extract;
8. 蛋白胨 Peptone;
9. 麦汁 Malt extract

与 Tween60 相比较, 具更高的乳化稳定性, 结果见图 5。

由于此糖脂具强的乳化性能, 所以该菌在正烷烃中生长时, 很快形成乳状液,

菌体生长迅速。当正烷烃培养基中加入此糖脂时, 就能刺激菌体生长。有关这方面的结果将另文发表。

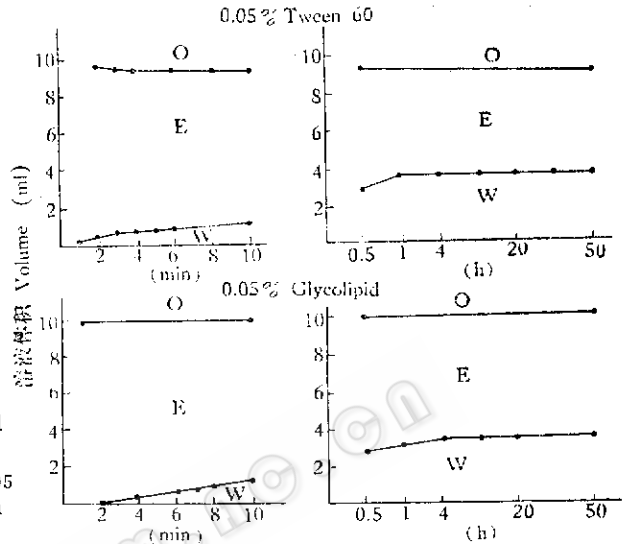


图5 糖脂与吐温60的乳化性能比较

Fig. 5 Emulsifying power of glycolipid and Tween 60 O, 油相 Oil phase; E, 乳化相 Emulsion phase; W, 水相 water phase

### 参 考 文 献

- (1) Hisatsuka, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35:686, 1971.
- (2) Jarris, F. G. and Johnson, M.J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 71:4124, 1949.
- (3) Itoh, S. et al.: *J. Antibiotics*, 24:855, 1971.
- (4) Cooper, D.G. and Zajic, J.E.: *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 26, edited by D. Perlman, Academic Press, New York, 1980, p. 229.
- (5) Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T.: *Method in Carbohydrate Chemistry*, vol. 1, edited by L. Hestler and J.N. Bemiller, Academic Press, New York, 1962, p. 390.

## FORMATION OF BIOSURFACTANT BY *PSEUDOMONAS* SP. AND ITS EMULSIFYING POWER

Li Zuyi Xu Xingmei Li Jiangyun Shi Yiping Xia Ying Sun Changchi  
(Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Cultural conditions for a *Pseudomonas* sp. were studied with regard to the production of glycolipids. It was demonstrated that the most suitable

medium contained n-paraffin (5%) as carbon source,  $\text{NaNO}_3$  (0.5%) as nitrogen source and yeast extract (0.05%) as organic nutrient. The initial pH of 7.0 proved to be optimal. Most of the surfactant was produced in the late exponential phase of growth. Under these conditions, the yield of glycolipids was 12—15 g per liter which corresponded to 40—50% of the weight of n-paraffin consumed. The glycolipids were shown to have excellent emulsifying power.

### Key words

Biosurfactant; glycolipid; emulsifying power

JOURNALS.IM.AC.CN