

石蜡酯杆菌 B126 产生的糖脂的理化性质

薛燕芬 王修垣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过纸层析、硅胶薄层层析和气相色谱分析表明, 石蜡酯杆菌 (*Caseobacter paraffinicum*) B126 至少产生两种糖脂, 其主要产物是海藻糖脂。它由海藻糖和两种以上的脂肪酸(十六碳酸和十八碳酸)所组成。其表面张力和界面张力(对重液体石蜡)分别为 28~29 和 1~2mN/m, 临界胶束浓度(CMC)较低, 为 64mg/L。

关键词 石蜡酯杆菌 B126, 海藻糖脂, 生物表面活性剂

糖脂是生物表面活性剂中重要的一类。细菌产生的糖脂有鼠李糖脂^[1]、海藻糖脂^[2]和各种单糖、二糖及三糖脂等^[3]。糖脂的表面活性高, 可作为润湿剂、乳化剂等应用于食品、制药, 日化和石油工业中^[4~6]。本文报道了石蜡酯杆菌 (*Caseobacter paraffinicum*) B126 所产糖脂的一些理化性质。

1 材料和方法

1.1 菌种

石蜡酯杆菌 B126。

1.2 培养基

培养基组成见文献[7]。

1.3 培养条件

250ml 三角瓶装 50ml 培养基, 接种后置 200r/min 旋转摇床上培养 4d。

1.4 药品

Dowex 50 为强酸性离子交换树脂, Dowex 1 为强碱性离子交换树脂, 均为美国 Dow Chemical Co. 产品。SE30 为硅橡胶, 美国 General Electric 产品。

1.5 产物的提取

将发酵液用磁力搅拌器搅拌 20min, 用 10% H₂SO₄ 调 pH 至 6.0, 加入 2 倍体积的氯仿/甲醇(2:1, V/V)混合液, 搅拌 15min。萃取两次, 合并有机相; 水洗, 45℃ 减压蒸馏去溶剂, 得粗产物 A。将 A 溶于一定体积的氯仿中, 过硅胶柱, 先后分别用正-己烷, 氯仿、氯仿/甲醇(8:1, V/V)和甲醇洗脱, 收集并蒸去各种溶剂, 得产物 B; 再重复此流程, 得产物 C。

1.6 产物的分析

1.6.1 纸层析和硅胶薄层层析: 展开剂为(1)石油醚; (2)氯仿-甲醇-水(65:25:4,

V/V); (3) 正-己烷: 乙醚: 醋酸 (80: 20: 1, V/V); (4) 正-丁醇-醋酸-水 (4: 1: 2, V/V)。显色剂为 (1) α -萘酚 (蓝灰色, 糖显色); (2) 苯胺-磷酸 (糖显色, 海藻糖不显色); (3) 2', 7' -二氯荧光黄 (黄色荧光, 脂显色); (4) 铬酸-硫酸 (黑色, 有机物显色)。硅胶 G 为青岛海洋化工厂产品, 粒度 10~40 μ m。

1.6.2 糖脂的皂化: 糖脂-乙醚液加 1mol/L NaOH-乙醇液, 置 90℃ 水浴中 1h, 加水并酸化后用乙醚萃取。醚相为脂肪酸样品, 干燥后用 HCl-CH₃OH 使甲酯化, 用气相色谱进行分析。水相过离子交换柱 (Dowex 50 和 Dowex 1) 脱盐。洗脱后, 减压浓缩得糖样品。

1.6.3 气相色谱: 用带有氢火焰检测器的 GC-7AG 型气相色谱仪 (Shimadzu) 进行测定。固定相为 5% SE30 的填充柱, 柱温 190℃, 气化温度 240℃, N₂ 的流速为 40ml/min。

1.7 测定方法

1.7.1 表面张力和界面张力: 用 ST-1 型 (Shimadzu) 表面张力仪在 45℃ 测定, 界面张力为相对正-十六烷^[8]。

1.7.2 乳化性能: 取重液体石蜡 (锦西炼油五厂) 5ml, 加发酵液或提纯的产物溶液 5ml, 于 50W 超声波处理 40s, 定时测定乳化相、油相和水相的体积变化^[9]。

1.7.3 临界胶束浓度 (CMC): 将纯化产物溶于乙醚, 加一定量的 0.1mol/l NaHCO₃ 后, 除去乙醚, 测各种稀释度的表面张力^[10]。

1.7.4 糖脂含量: 用硫酸酚法测定^[11]。还原糖含量用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[12]。二者均以葡萄糖作标准物。

表 1 糖的纸层析鉴定

Table 1 Paper chromatographic identification of saccharides

糖样 Sugar	R _f 值 R _f value	显 色 剂 Spray reagent	
		α -萘酚 α -naphtol	苯胺-磷酸 Aniline-phosphat
鼠李糖 Rhamnose	0.44	+	+
蔗糖 Sucrose	0.21	+	+
乳糖 Lactose	0.13	+	+
纤维二糖 Cellulose	0.14	+	+
麦芽糖 Maltose	0.11	+	+
棉子糖 Raffinose	0.11	+	+
甘露糖 Mannose	0.32	+	+
果糖 Fructose	0.33	+	+
葡萄糖 Galactose	0.24	+	+
半乳糖 Galactose	0.22	+	+
海藻糖 Trehalose	0.14	+	-
样品 Sample	0.14	+	-

2 结果

2.1 产物纯化

按上述的产物提取程序,得到产物 A、B 和 C。用两步展开薄层层析法^[13]检测结果(图 1)表明,粗产物 A 在 $R_f=0.62$ 处的大斑点对 α -萘酚、2',7'-二氯荧光黄和 UV 均呈正反应,说明该菌可产生糖脂类表面活性剂。此外,还含有另一种含量较少的糖脂和非极性脂。粗产物 A 经硅胶柱层析,收集氯仿-甲醇的洗脱部分,得产物 B。TLC 检测结果(图 1-B)表明,大部分非极性脂已被除去,但仍有杂质。再重复作柱层析,得到产物 C。TLC 检测(图 1-C)表明,产物 C 只显示一个斑点,为纯品,用于下列分析。

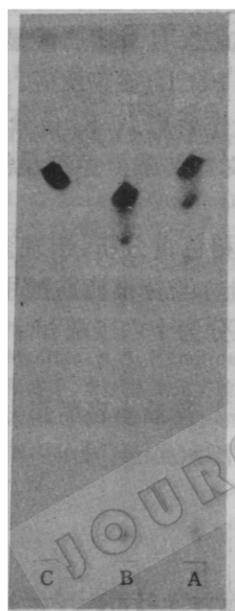


图 1 产物的两步展开硅胶薄层层析

Fig. 1 Two-step-developed TLC of products with different purities

A. 粗产物; B. 经硅胶柱纯化一次的产物; C. 经硅胶柱纯化二次的产物。

A. Raw product; B. Product from silica gel column filtration of A; C. Product from silica gel column of B. Developed with (1) petroleum ether, (2) chloroform: methanol: water (65: 25: 4). Detected by α -naphthol.

2.2 糖脂的组份分析

将糖脂皂化后的醚相和水相分别进行脂肪酸和糖的分析。

2.2.1 糖的鉴定: 按材料和方法中所叙程序得到糖样, 进行纸层析。展开剂为正丁醇-乙酸-水 (4: 1: 2, V/V), 显色剂为 α -萘酚和苯胺-磷酸。结果(表 1)指出, 样品的 R_f

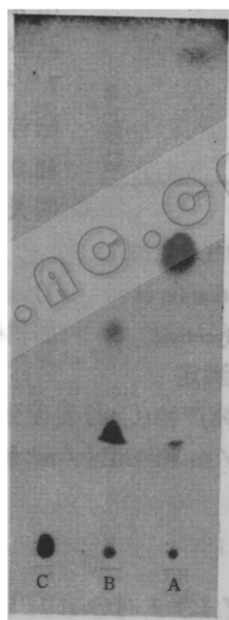


图 2 糖脂脂肪酸的 TLC

Fig. 2 TLC of fatty acids of glycolipid

A 为脂肪酸甲酯; B 为脂肪酸; C 为糖脂。

A. Methylated fatty acids; B. Fatty acids; C. Glycolipid.

Developed by n-hexane-ether-acetic acid (80: 20: 1), detected with chromic acid-sulphuric acid.

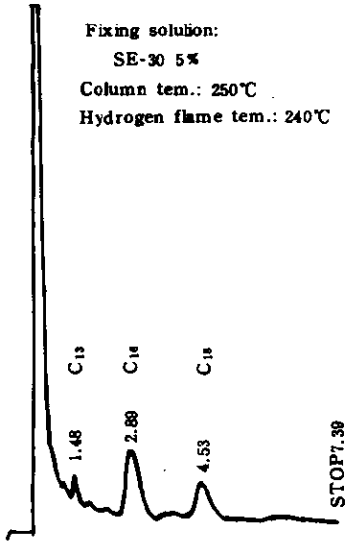


图3 脂肪酸甲酯的气相色谱

Fig.3 Gas chromatogram of fatty acids of glycolipid

2.3 糖脂性能的测定

不同浓度的纯产物(C)的表面张力测定结果(图4)表明,其最小表面张力和界面张力分别为 28mN/m 和 1mN/m ; 临界胶束浓度(CMC)值为 64mg/L 。

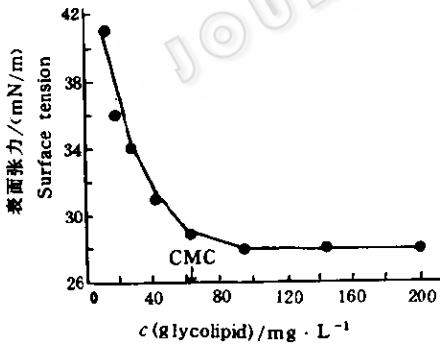


图4 不同浓度的糖脂的表面张力

Fig.4 Surface tension of glycolipid

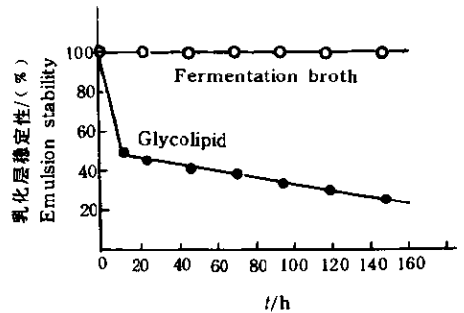


图5 发酵液或糖脂对重液体石蜡-水乳化液的稳定性

Fig.5 Stability of heavy paraffin oil-water emulsion by culture broth or glycolipid

将 *C.paraffinicum* B126 的发酵液和纯糖脂产品(C)溶液作水相、重液体石蜡作油相,用超声波乳化法测定其乳化性能。结果(图5)表明,发酵液的乳化能力和稳定性均好,在 20d 之后,乳化层仍稳定;而纯糖脂溶液的乳化稳定性较差,在 20h 时,乳化层下

值与海藻糖和纤维二糖的相当;但样品和海藻糖对苯胺不显色,纤维二糖对苯胺显褐色。由此可见,样品为海藻糖。为进一步证实此结果,将糖样进行水解。如果是海藻糖,则水解为 2mol 葡萄糖,还原性将增加。用 3,5-二硝基水杨酸测定的结果表明,样品水解前后还原糖浓度/总糖浓度由 $0.023/3.24$ 增加到 $0.825/2.4$,还原性增加。从而确定,该糖脂的糖组分是海藻糖。

2.2.2 脂肪酸的鉴定:将样品的脂肪酸和脂肪酸甲酯作 TLC 检测,展开剂为正己烷-乙醚-醋酸(80:20:1),用铬酸-硫酸显色。脂肪酸样品显示两个斑点(图2-B), R_f 值分别为 0.4 和 0.22,且对脂肪酸显色剂(2',7'-二氯荧光黄/ AlCl_3 / FeCl_3)显正反应。脂肪酸甲酯样品(图2-A)显示两个主要斑点, R_f 值分别为 0.54 和 0.9。在 $R_f=0.2$ 附近,对脂肪酸显色剂呈淡粉色,说明大部分脂肪酸已被酯化。

将脂肪酸甲酯进行气相色谱分析,出现多个峰(图3),说明含多个脂肪酸组分。与标准脂肪酸甲酯的 GC 图谱比较确定,两个主要组分为十六碳酸和十八碳酸。

降 50%, 之后缓慢下降, 在 20d 左右, 乳化层基本消失。

3 讨论

综上所述, *C. paraffinicum* B126 与报道的许多糖脂产生菌^[14]一样, 产生的糖脂并不是单一的。该菌至少产生两种糖脂。对其中的主产物的理化性质分析表明, 该糖脂为海藻糖脂, 由海藻糖和两种(十六碳酸和十八碳酸)以上的脂肪酸所组成。此糖脂能使表面张力和界面张力(对重液体石蜡)分别降至 28~29mN/m 和 1~2mN/m, 其 CMC 值也较低, 为 64mg/L。

参 考 文 献

- [1] Edward J R, Hayashi J A. *Arch biochem biophys*, 1965, 111: 415.
- [2] Rapp P, Bock H, Wray V *et al. J Gen Microbiol*, 1979, 115: 491.
- [3] Li Z Y, Lang S, Wagner F *et al. Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 601.
- [4] Cooper D G, Zajic J E. *Appl Microbiol*, 1980, 26: 229~253.
- [5] Wagner F, Rapp P, Bock H *et al. U.S. Patent* 4, 286, 660.
- [6] Cooper D G, James E, Gracey D E F, *J Bacteriol*, 1979, 137: 795~801.
- [7] 薛燕芬, 王修垣, 微生物学报, 1995, 35(6): 465~469.
- [8] Akit J, Cooper D G, Manninen K I *et al. Current Microbiol*, 1981, 6: 145~150.
- [9] Zosim Z, Gutnick D, Rosenberg E. *Biotech Bioeng*, 1982, 24: 281.
- [10] MacDonald C R, Cooper D G, Zajic J E. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 117~123.
- [11] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al. Anal Chem*, 1956, 28: 350~356.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1982. 9~11.
- [13] 薛燕芬, 王修垣, 微生物学报, 1989, 29(1): 75~77.
- [14] Kosaric N, Cairns W L, Gray N C C. *Biosulfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. 25~32.

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF A GLYCOLIPID PRODUCED BY *CASEOBACTER PARAFFINICUM* B 126

Xue Yanfen Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Results of paper chromatography, silica gel GLC and gas chromatography analyses showed that at least two kinds of glycolipids were produced by *C. paraffinicum* B126, and its staple product was a trehalose lipid composed of trehalose and more than two different fatty acids (hexadecanoic acid and octadecanoic acid). Its surface and inter-face tension (against heavy paraffin oil) were 28~29 and 1~2 mN/m, respectively. Its CMC value was as low as 64 mg/L.

Key words Trehalose lipid, *Caseobacter paraffinicum* B126, Biosurfactant