槐糖脂生物表面活性剂的结构特征及理化性质初探^{*}

宋丹丹¹² 梁生康^{12**} 王江涛¹²

(1. 中国海洋大学化学化工学院,青岛,266100; 2. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室,青岛,266100)

摘 要 通过摇瓶培养实验,考察了假丝酵母菌(*Candida bombicola*) ATCC 22214 以葡萄糖和油酸双底物为碳 源,采用一次加料培养和分批补料培养方式进行发酵制备槐糖脂的过程,并利用高效液相色谱/电喷雾飞行时 间质谱联用仪确定了所产槐糖脂的结构,初步研究了其主要的理化性质.结果表明,一次加料培养中,该菌株 生长稳定期的中期即 120 h 时槐糖脂产率最高,达 45 g·L⁻¹,分批补料培养方式中,196 h 时糖脂产率达到 101g·L⁻¹. 所产糖脂由 7 种乙酰基取代的含有 17-羟基十八烯酸或十八烷酸的内酯型和酸型槐糖脂同系物构 成,其中,保留时间为 45.46 min 的 17-L-[(2´-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烯酸-I´A"-内酯-6´ β "二乙酸酯和保留时间 48.35 min 的17-L-[(2´-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烷 酸 -I´A"-内酯-6´ β "二乙酸酯比例较高,分别达 27.38% 和 21.53%.该生物表面活性剂具有良好的表面活性和 乳化能力 临界胶束浓度较低,为36.5 mg·L⁻¹.

关键词 槐糖脂,发酵,高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱,表面张力,乳化性能.

生物表面活性剂是微生物在一定条件下产生的集亲水性和亲油性结构于一体的代谢产物,不仅具 有增溶、乳化、润湿、发泡、分散、降低表面张力等表面活性剂的通用性能,而且还具有低毒或无毒、易于 生物降解、对环境友好等特性^[1],同时,其制备过程多为微生物发酵,原料多来自天然农副产品,不会构 成对环境的污染.目前已经在石油开采、医药、食品、化妆品、环境保护等领域部分替代化学合成表面活 性剂得到应用^[2-4]. 槐糖脂是目前研究较多的生物表面活性剂,其基本结构为槐糖键上连接不同长度碳 链的饱和或不饱和脂肪酸,一般分为内酯型和自由酸型两种^[5],作为一类性能优良的生物表面活性剂, 槐糖脂近年来受到人们的广泛关注,在石油开采、日用化工和环保等领域都显示出良好的应用前景.而 限制槐糖脂生物表面活性剂广泛应用的因素是价格较高.

目前 槐糖脂的研究工作主要集中在选取低廉的生产原料及提高产率方面^[6-8].研究表明,假丝酵 母菌(*Candida bombicola*)能够以多种水溶性和非水溶性底物为碳源在胞外分泌槐糖脂类生物表面活性 剂,前者包括葡萄糖、乳清蛋白等,后者包括豆油,葵花油,橄榄油等^[9].近期研究表明,以水溶性和非水 溶性的混合底物为碳源发酵培养时,可以得到较高产率的槐糖脂^[10].而底物不同,所得到的槐糖脂类生 物表面活性剂结构和性能可能不同,因此,深入研究微生物以特定底物合成生物表面活性剂的过程以及 所产表面活性剂结构和性能,对促进生物表面活性的广泛应用具有重要意义.

本研究通过摇瓶培养实验,以葡萄糖和油酸为双碳源,分别采用一次加料培养和分批补料培养方式,考察了假丝酵母菌(C. bombicola)产槐糖脂的发酵过程,并利用高效液相色谱/电喷雾飞行时间质谱 联用仪确定了所产槐糖脂的结构,初步研究了其主要的理化性质.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

1100 型高效液相色谱/G1969A 型电喷雾飞行时间质谱联用仪(HPLC/ESI-TOF/MS) 并配有二极管 阵列(DAD) 检测器(美国 Agilent 公司)、JZ-200A 自动界面张力仪(承德精密试验机有限公司)、透析袋 (3.4 cm × 40 cm,截留分子量 14000 美国)、乙腈(色谱纯,Merck 公司)、Milli-Q 超纯水(自制)、吐温 80

²⁰¹⁰年10月10日收稿.

^{*} 山东省自然科学基金项目(Y2008B28);中国海洋大学与中海石油环保服务有限公司攻关项目(2006004)资助.

^{**}通讯联系人,电话:0532-66781815; E-mail: liangsk@ouc.edu.cn

(天津大茂化学试剂厂)、烷基糖苷(上海发凯化工有限公司)、鼠李糖脂发酵液(大庆沃太斯化工有限公司)、油酸(天津巴斯夫化工有限公司)等.

1.2 菌种培养

斜面培养基:固体 GYP 培养基^[9];种子培养基: GYU 培养基^[9];发酵培养基^[10].其中一次加料培养 油酸单独灭菌后一次性加入,分批补料培养油酸添加分3次,每2d加入一次.菌株为假丝酵母菌 (*C. bombicola*) ATCC 22214.

1.3 槐糖脂的发酵制备

从保藏菌种的斜面培养基上刮取一环菌苔接入 100 mL 已灭菌的种子培养基中 30 ℃ 200 r•min⁻¹ 下活化 24 h,然后按 5% (*V/V*) 的接种量接入 100 mL 已灭菌的种子培养基中 30 ℃ 200 r•min⁻¹下培养 48 h,形成菌悬液,再将此菌悬液按 5% (*V/V*) 的比例接种到盛有 200 mL 发酵培养液的 500 mL 锥形瓶 中,置于摇床 30 ℃ 200 r•min⁻¹下培养,定时取 10 mL 发酵液,分别测定 pH、菌体生物量及糖脂含量.其 中,pH 值以精密 pH 试纸测定,发酵离心收集到的菌体细胞恒重后,以菌体干重表示生物量,上清液用 等体积的乙酸乙酯萃取 2 次后 40 ℃下减压蒸馏除去有机溶剂,称重得到糖脂粗提物含量.

1.4 槐糖脂的提取和纯化

培养 14 d 后的发酵液在 15 ℃ 2000 r•min⁻¹下离心除去菌体后,上清液先用正己烷萃取 2 次,以除 去未被利用的油酸,然后用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,减压蒸馏除去有机溶剂后得到糖脂粗产品.该 粗产品进一步用硅胶填充的透析袋纯化,即将 55 g 已活化的硅胶装到透析袋(3.4 cm × 40.0 cm,截留 分子量 14000) 中,将 1 g 粗槐糖脂样品和等量的已活化的硅胶混溶于乙酸乙酯中并添加到透析袋的顶 部,用 100 mL 氯仿/甲醇(95:5, V/V) 混合溶剂洗脱 1 h,将带有颜色的硅胶剪切下来,乙酸乙酯萃取 2 次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏除去溶剂后转移到色谱小瓶进行 HPLC/ESI-TOF/MS 测定.

1.5 HPLC/ESI-TOF/MS 分析条件

色谱柱: Diamonsil C18 柱,规格为150 mm×4.6 mm×5 μm. 柱温为30 ℃,进样量为1 μL 检测波长 为 UV 207 nm,流动相 A: 0.5% 甲酸水溶液; 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱条件: 0 min,50% B; 5 min, 50% B; 30 min 60% B; 50 min,100% B; 60 min,100% B. 流速为0.4 mL•min⁻¹. 无分流进入质谱. 质谱 采用电喷雾正离子模式; 扫描范围: m/z 200—900; 毛细管电压: 3.5 kV; 喷雾气压: 344.5 kPa; 干燥气 体: 高纯 N₂,气体流速: 11.0 mL•min⁻¹; 气体温度: 350 ℃; 裂解电压: 100 V; 锥孔电压: 65 V; 参比溶液: m/z 121.05、922.01; 分辨率: 9500 ± 500 (922.01).

1.6 槐糖脂的理化性质测定

表面张力和临界胶束浓度(CMC)的测定以吊环法常温下测定;乳化能力的测定参照文献[11]的方法,以0^{*}柴油为测试材料,并与鼠李糖脂、烷基糖脂和吐温80的乳化性能相比较.

2 结果与讨论

2.1 菌株产糖脂的发酵动态

图 1 表示菌株 ATCC 22214 以葡萄糖和油酸混合底物为碳源一次加料培养发酵时,菌细胞生物量随时间的变化,以及相应的发酵液 pH 和糖脂含量的动态变化. 在 172 h 的发酵时间内,菌细胞生物量基本呈现先升高、保持稳定然后再降低的 "S"型曲线,其中 0—72 h 为指数增长期,然后进入稳定生长期,144 h 时进入衰亡期,菌体细胞开始自溶. 随着菌体细胞的生长,发酵液 pH 值由 6.0 左右逐步下降到 4.0 左右,这与菌细胞在利用底物生长过程中产酸有关. 槐糖脂产率基本随着菌细胞生物量的增大而增大 72 h 时快速增大到 40 g•L⁻¹左右,然后缓慢增长,在稳定生长期的中后期 120 h 时达到最高值 45 g•L⁻¹左右,这表明获取糖脂的最佳时期是稳定生长期的中后期. 而采用分批补料培养时,培养 196 h 后糖脂产率达到 101 g•L⁻¹,较一次加料培养提高了 1.2 倍,这与 Kim 等人^[10]的研究结果基本一致,他们以葡萄糖和菜籽油为双碳源在 30 ℃时利用菌株 ATCC 22214 发酵制备槐糖脂,发现糖脂产率在菌细胞稳定生长期的后期达到最高.





对比不同菌株以水溶性糖和非水溶性植物油为双底物摇瓶发酵产槐糖脂的产率(表1)可以看出, 尽管培养时间有所差异,本研究中所采用的假丝酵母菌(C. bombicola) ATCC 22214 的产率高于其它菌 株,因而在大规模工业发酵制备槐糖脂中具有良好的应用潜力.

Table 1 Comparison of sophorolipid yield by Erlenmeyer flask						
菌株	碳源	培养时间/h	糖脂产量 /(g•L ⁻¹)	参考文献		
Candida Bombicola ATCC 22214	葡萄糖、油酸	120	45	本研究		
Wickerhamiella domerc qiae $\mathbf{Y}_{2\mathbf{A}}$	葡萄糖、菜籽油	150	41	[12]		
Candida sp NRRL Y–27208	葡萄糖、油酸	96	20	[13]		
Candida Stellata NRRL Y-1446	葡萄糖、油酸	96	12	[13]		
Candida Riodocensis NRRL Y-27859	葡萄糖、油酸	96	8	[13]		

表1 摇瓶培养槐糖脂产率对比

2.2 槐糖脂生物表面活性剂组分鉴定

在柱层析初步纯化菌株 ATCC 22214 利用葡萄糖和油酸双碳源产槐糖脂的基础上 利用 HPLC/ESI-TOF/MS 分析了该菌株所产糖脂同系物的结构. 图 2 给出了该糖脂同系物的 HPLC/ESI-TOF/MS 总离子 流图. 表 2 则给出了各组分的分子离子峰、相应的离子碎片及相对含量. 该提取物中含有 7 种槐糖脂同 系物 除保留时间为 39.94 min 和 41.28 min 的两种组分为自由酸型外 其余都为内酯型. 这和 Solaiman 等人的研究结果基本一致 ,他们发现假丝酵母(*C. bombicola*) 在以大豆糖浆和油酸为共基质生长时 ,所 产槐糖脂主要是以内脂的形式存在^[14].





其中,保留时间为45.46 min 峰的丰度最高,达27.38%,其质谱碎片见图3.其中,质荷比(m/z)为689.38 的碎片为二乙酰基取代的内酯型槐糖脂的分子离子峰,结构式见图3.m/z 711.36 为[M+Na⁺] 峰,m/z 671.37 和 m/z 653.36 分别为[M+H⁺] 失去1 个水分子和2 个水分子得到的,m/z 485.31 和 m/z 467.30分别为[M+H⁺] 峰失去一个己糖环和再失去1 个水分子得到的.上述分析表明,保留时间

为 45.46 min 的组分为二乙酰基取代的内酯型槐糖脂 即为 17-L-[(2´-O-A-D-吡喃葡萄糖基-A-D-吡喃葡 萄糖基) -0-]-十八烯酸-1´ A"-内酯-6´ 6"二乙酸酯. 表 2 中保留时间为 43.10 min 的峰的主要离子碎片 和保留时间为 45.46 min 组分的相同 ,推测二者互为同分异构体 ,这可能是由于糖环的差向异构引起 的 更确切的结构还需更多的分析手段来确定.

保留时间 主要离子 质量分数 糖脂名称 糖脂类型 分子离子 /min 1% 碎片(m/z) 17-L-[(2´-O-β-D-吡喃葡萄糖基β-D-吡喃葡萄糖 709.34,687.36,669.35, 39.94 酸刑 663 36 16.06 基) -0-]-十八烯酸-6"-乙酸酯 663.36,483.30 17-L-[(2´-O-B-D-吡喃葡萄糖基-B-D-吡喃葡萄糖 709.34,687.36, 41.28 酸型 663.36 11.15 基)-0-]-十八烯酸-6′-乙酸酯 669.35,663.36,485.32 711.36,689.38,321.24, 43.10 689.38 7.58 内酯型 17-L-[(2´-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖 281.25 基)-0-]-十八烯酸-1、4"-内酯-6、6"二乙酸酯 711.36,689.38,671.37, 45.46 内酯型 689.38 27.38 653.36,485.31,467.30 713.37,691.39,673.38, 48.35 内酯型 691.39 21.53 301.35 17-L-[(2´-O-B-D-吡喃葡萄糖基-B-D-吡喃葡萄糖 713.37,691.39,301.14, 50.43 691.39 7.98 内酯型 基)-0-]-十八烷酸-1´ 4"-内酯-6´ 6"二乙酸酯 297.24,279.23 713.37,691.39,673.38, 51.24 内酯型 691.39 8.33 301.34

表 2 ATCC 22214 菌株所产槐糖脂同系物及各组分的结构和相对含量

Table 2 Structure and relative abundance of the sophorolipid homologues produced by the ATCC 22214 strain

保留时间为 39.94 min 组分的质谱图见图 4 其中 m/z 709.34 为酸型一乙酰取代的槐糖脂的 [M+ 2Na-H]⁺的峰 ,m/z 685.34 为[M + Na-H]⁺的峰 ,m/z 663.36 为分子离子峰 ,m/z 483.30 为一乙酰取代 槐糖脂分子失去乙酰基取代糖环的碎片峰,推测该组分为17-L-[(2´-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡 萄糖基) -0-]-十八烯酸-6"-乙酸酯, 而保留时间为41.28 min 的组分的质谱碎片与该组分相似,其中 m/z 485.32为一乙酰取代槐糖脂分子失去一个没有被取代的糖环之后再失去一个水分子的碎片峰,推 断结构式为 17-L-[(2´-O-B-D-吡喃葡萄糖基-B-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烯酸-6´-乙酸酯,这两种组分 互为同分异构体.



而保留时间为 51.24 min 组分中的 m/z 713.37、691.39、673.38 分别为二乙酰基取代的内酯型槐糖 脂分子的基础上相应地加上两个氢的碎片 m/z 301.34 为去掉糖环后的亲油基团上加两个氢片段的质 谱碎片 因此推测该组分为保留时间为 45.46 min 组分中的亲油基团发生加氢加成反应所生成的. 而保 留时间为 48.35 min 和 50.43 min 的组分主要离子碎片和与保留时间为 51.24 min 的组分相同,推测这 3种组分互为同分异构体,推测也可能是糖环差微风异构引想的,更确切的结构还需要更深一步的 研究.

2.3 槐糖脂的表面活性及乳化性能

不同浓度槐糖脂溶液的表面张力测定结果(图5)表明,其水溶液表面张力随槐糖脂浓度的增大而 快速减小 到 34.9 mN·m⁻¹后基本保持不变,说明浓度已达到临界胶束浓度(CMC)以上. 从图 5 可以求 算出该糖脂的 CMC 为 36.5 mg·L⁻¹,明显低于假丝酵母菌 C. Bombicola ATCC 22214 以蔗糖和黄豆 油^[6]、葡萄糖和黑豆油^[15]和葡萄糖和菜籽油^[16]为底物发酵时所产槐糖脂的 CMC 值,这一方面是由于 该菌株利用不同底物所产生的槐糖脂结构和组成有所差异,另一方面也与测定 CMC 值时所用槐糖脂的 纯度有关.

80

70

50

40

30

0 30

表面张力 /(mN·m⁻¹) 60

> 槐糖脂浓度/(mg·L⁻¹) 图 5 不同浓度槐糖脂溶液的表面张力

 $60 \quad 90 \quad 120 \quad 150 \quad 180 \quad 210 \quad 240 \quad 270 \quad 300$

Fig. 5 Surface tension of sophorolipid solutions

不同种类相同浓度的表面活性剂对 0[#]柴油的乳化性能测试结果见表 3. 从表 3 可以看出 槐糖脂对 0^{*}柴油乳化率最高 接近 100% 其次为化学合成表面活性剂吐温 80,为 30% ,再次为鼠李糖脂发酵液, 为17% 烷基糖苷最低 乳化率仅为10%.这主要是和几种表面活性剂的亲水亲油平衡值(HLB)有关. 一般认为 适合作 O/W 乳化剂的 HLB 值范围在 10—13 之间[17]. 槐糖脂的 HLB 值介于 9—12 之间(表 3) 结合乳化率数据,说明槐糖脂适宜于作乳化剂.

Table 3 Emulsification activities and HLB values of the surfactant solutions						
表面活性剂	槐糖脂粗产品	吐温 80	鼠李糖脂发酵液	烷基糖苷		
乳化率/%	98	30	17	10		
HLB 值	9—12	15	22—24	16		

表3 不同表面活性剂的乳化效率和亲水亲油平衡值

3 结论

假丝酵母菌(C. bombicola) ATCC 22214 菌株以葡萄糖和油酸为双碳源分批补料培养合成槐糖脂的 产率较高 达 101 g·L⁻¹. 所产糖脂为二乙酰基取代的槐糖内脂及其同系物 具有良好的表面活性和乳化 活性.

考文献 参

- [1] Banat I M, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 427-444
- [2] Maingault M. Pharmaceutical and cosmetic compositions containing sophorolipids [P]. Canada Patent , No. CAN 126 242874 , 1997
- [3] Schippers C, Gessner K, Muller T, et al. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 83(3): 189-198

- [4] Rau U, Hammen S, Heckmann R, et al. Sophorolipids: a source for novel compounds [J]. Industrial Crops and Products, 2001, 13(2):
- 85-92 [5] Dekoster C G , Heerma W , Pepermans H A M , et al. Tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of
- Candida bombicola sophorolipids and product formed on hydrolysis by cutinase [J]. Analytical Biochemistry , 1995 , 230(1): 135–148 [6] Daverey A , Pakshirajan K. Production , characterization , and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost
- fermentative medium[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(3): 663-674
- [7] Solaiman D K Y, Ashby R D, Zerkowski J A, et al. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by Candida bombicola [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(9): 1341–1347
- [8] Shah V, Jurjevic M, Badia D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production [J]. Biotechnology Progress, 2007, 23(2): 512-515
- [9] Daverey A, Pakshirajan K. Production of sophorolipids by the yeast Candida bombicola using simple and low cost fermentative media [J]. Food Research International, 2009, 42(4): 499–504
- [10] Kim Y B, Yun S H, Kim E K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture [J]. Bioresource Technology , 2009 , 100(23): 6028-6032
- [11] Cooper D G, Goldenberg B G. Surface-active agents from two bacillus species [J]. Applied and Environment Microbiology , 1987 , 53(2): 224–229
- [12] 陈静,宋欣,曲音波,等.拟威克酵母产生表面活性剂的发酵条件[J].应用与环境生物学报,2006,12(1):122-124
- [13] Kurtzman C P , Price N P J , Ray K J , et al. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the Starmerella (Candida) bombicola yeast clade [J]. FEMS Microbiology Letters , 2010 , 311(2): 140–146
- [14] Solaiman D K, Ashby R D, Nunez A, et al. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(15): 1241–1245
- [15] Kim H S, Kim Y B, Lee B S, et al. Sophorolipid production by Candida bombicola ATCC 22214 using a corn-oil processing byproduct [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology , 2005, 15(1): 55–58
- [16] Otto R T, Daniel H J, Pekin G, et al. Production of sophorolipids from whey II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999, 52(4): 495-501
- [17] 赵国玺. 表面活性剂物理化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1991: 470-472

STRUCTURE CHARACTERIZATION AND PHYSI-CHEMICAL PROPERTIES OF SOPHOROLIPID BIOSURFACTANTS

SONG Dandan^{1 2} LIANG Shengkang^{1 2} WANG Jiangtao^{1 2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao, 266100, China;

2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Qingdao, 266100, China)

ABSTRACT

The process of sophorolipids biosynthesis by yeast *Candida bombicola* ATCC 22214 from the mixture of glucose and oleic acid was evaluated by batch fermentation and fed-batch fermentation in the shake Erlenmeyer flask. The chemical composition of the sophorolipids mixture was identified by high performance liquid chromatography (HPLC) method combined with positive ion electrospray-time of flight-mass spectrometry (ESI-TOF/MS). The yield of the biosurfactant reached its maximu of 45 g·L⁻¹ in the middle of the steady phase of the strain growth (i. e. 120 h) in batch culture , and it reached 101 g·L⁻¹ in fed-batch culture. The biosurfactant mixture contained seven homologues of acetylated lactonic and acid sophorolipids with saturated and unsaturated C18 fatty acid moieties. The content of two major components , 17-L-[(2´-O- β -D-glucopyranosyl)- σxy -]-octadecenoic acid H´ A''-lactone-6´ β'' -diactate and 17-L- [(2´-O- β -D-glucopyranosyl)- σxy -]-octadecanoic acid H´ A''-lactone-6´ β'' -diactate was 27. 38% and 21. 53% , respectively. The sophorolipid biosurfactant exhibited high surface-activity and good emulsification capacity and a low critical micelle concentration of 36.5 mg·L⁻¹.

Keywords: sophorolipid , fermentation , high performance liquid chromatography-electrospray ionizationtime of flight-mass spectrometry , surface tension , emulsification activities.