

# 微生物脂多糖的产生、分离及乳化性能

施邑屏 冯青 李祖义

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

*Acinetobacter* sp. 生长在醇类、植物油或正烷烃中能产生胞外脂多糖。探讨了此菌株产生胞外脂多糖的最佳条件, 包括不同碳源, 不同氮源, 二价镁离子及添加抗菌素等对其产量的影响。脂多糖含量的测定采用了乳化比浊度的方法。研究表明, 此胞外脂多糖具有明显的乳化性及乳化稳定性, 是一种聚合的生物乳化剂。

**关键词** 生物表面活性剂; 脂多糖; 生物乳化剂

微生物胞外多糖由于具有工业应用的价值, 是国际上广泛研究的课题之一<sup>[1,2]</sup>。作为高分子聚合物, 胞外多糖通常显示了有用的物理和机械特性, 如高粘度、抗拉强度、抗剪切等。另一方面, 微生物产生的生物表面活性剂由于具有乳化、发泡、增溶、润湿等性能, 可作为乳化剂、润滑剂和润湿剂等, 广泛应用于食品、印染、日化及三次采油等工业中<sup>[3]</sup>。脂多糖作为一种聚合的生物乳化剂, 在结构上具有多糖类及表面活性剂亲水亲油两方面的性质, 是一种理想的生物乳化剂。至80年代, 国外已报道了将胞外脂多糖应用于重油的运输、重燃料油乳化液的直接燃烧、化妆品、油罐等的清洗及三次采油等方面<sup>[4,5]</sup>。

我们实验室筛选出一株不动杆菌(*Acinetobacter* sp.), 该菌能在正烷烃、原油、醇类、甘油三酯及有机酸等不同的碳源上生长。本文报道了该菌产生胞外脂多糖的最佳条件及其乳化性能的研究结果。该脂多糖详细的化学结构测定将另文发表。

## 材料与 方法

### (一) 菌种及培养条件

1. 菌种: 采用的细菌菌株初步鉴定为不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)

2. 培养基成分(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  13.8,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18,  $\text{FeSO}_4$  0.002,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.003, 不同碳源 20, 自来水 1L, pH7.2。

3. 菌体培养: 500ml 三角瓶中装入 100ml 培养基, 接种后于 30°C 往复式摇床 (120r/min) 培养 52h 或不同时间。

4. 菌体浓度测定: 发酵液适量稀释后用分光光度计 600nm 波长测定。测菌体干重时定量取 20ml 发酵液, 10,000g 离心 20min; 菌体下沉后水洗两次, 并于 100°C 烘干至恒重。

### (二) 胞外脂多糖的制备

因培养碳源的不同, 该菌产生脂多糖的提取方法有二种:

1. 硫酸铵沉淀法: 以乙醇为碳源经 48h 生长, 发酵液冷却至 4°C 后, 在搅拌下加入硫酸铵至 30% 饱和度, 放置过夜后, 倾去上清液。沉淀再悬浮于 30% 饱和度的硫酸铵溶液中, 离心后合并上清液。为进一步澄清, 将上清液通过一薄硅胶层过滤。向过滤后的上清液中再加入硫酸铵,

使溶液的硫酸铵浓度达到40%饱和度。溶液在 10,000g 下离心 15min。沉淀物溶于 100ml 水中,用乙醚抽提二次,水相用蒸馏水透析数次后冷冻干燥,得到脂多糖。

2. 庚烷抽提法:将正烷烃为碳源 的发酵液冷却至 4℃,在 10,000g 下离心 15min 除去菌体。上清液用乙醚抽提二次以除去有机杂质。再将清液经 3、1.5、1、0.8及0.45 $\mu\text{m}$  不同孔径的微孔滤膜连续过滤。滤液再用 0.2 体积的庚烷连续抽提四次。合并庚烷,减压蒸去庚烷后得到黄色浆状物,再用乙醚除去杂质。此浆状物溶于 50ml 50% 甲醇溶液中,用蒸馏水透析数次并冷冻干燥,得到脂多糖。

### (三) 脂多糖的定性与定量测定

1. 脂多糖的定性:采用了紫外,红外光谱分析,元素分析以及水解后的还原糖测定等方法,对脂多糖的结构进行了定性测定。

2. 脂多糖的定量测定——乳化力分析试验:在125ml 的三角瓶中,分别加入 3—100 $\mu\text{g/ml}$  的脂多糖溶液1ml、7.4ml 的 Tris-Mg 缓冲液 (0.02mol/L Tris-HCl, pH7.2, 辅加 10 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ )、0.1ml 的正十六烷:二甲基萘 (1:1 v/v) 或其他烃类。在 30℃ 往复式摇床上振荡 1h (125r/min, 冲程 3cm)。在分光光度计 620nm 下测定此脂多糖乳化液的乳化浊度。发酵原液要经适当地稀释使光密度适中。无脂多糖的对照组乳化试验光密度为 0.02至0.03。试验样品应减去空白数。如待测样品为含菌体的发酵液时,应离心除去细胞,取上清液经适当稀释后再作以上乳化力分析试验。试验中乳化力作为脂多糖浓度的函数<sup>[8]</sup>。

(四) 添加抗菌素对脂多糖产生的影响

生长至对数期 (15—22h) 的菌体、

经离心、水洗,再用新鲜的原发酵培养基洗一次,离心后,悬浮于相同体积的原新鲜培养基中,使光密度与原菌体光密度相似,再分装入加有不同浓度抗菌素的摇瓶中,培养 6 至 10h。取出分别测定菌体浓度和脂多糖乳化力光密度,比较不同抗菌素对脂多糖产生的影响。

### (五) 脂多糖的乳化试验

在试管中分别加入5ml煤油及5ml脂多糖的水溶液或发酵液,预热至55℃后,在 XSC-200-1型超声波仪上,80W,40秒作超声处理,定时测定乳化相、水相及油相的体积。

## 结果与讨论

### (一) 胞外脂多糖的定量测定——标准乳化力分析

图 1 为标准乳化力分析测定胞外脂多

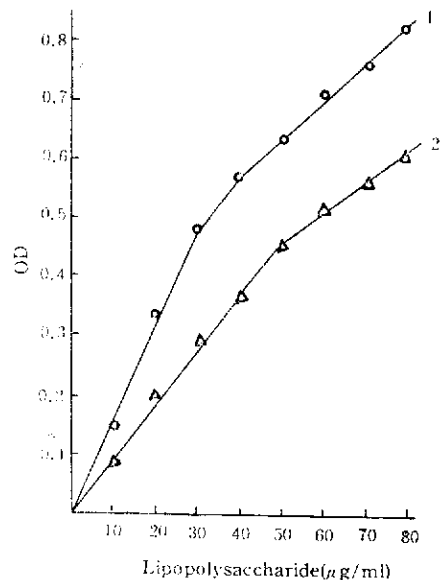


图 1 标准乳化力分析

Fig.1 Standard emulsifier assay

1. 正十六烷:2-甲基萘 (v:v = 1:1) 作油相, Using hexadecane:2-methylnaphthalene (v:v = 1:1) as oil phase
2. 汽油作油相 Using gasoline as oil phase

糖含量的结果。可以看出, 待分析的脂多糖的浓度范围在 10—100 $\mu\text{g/ml}$  时光密度为宜。作为油相, 用十六烷加 2-甲基萘的乳化效果优于汽油。文献也报道, 单独用直链烃的乳化力没有用这两种混合物的乳化力高<sup>[7]</sup>。

## (二) 各种碳源对菌体生长及胞外脂多糖产量的影响

在液体培养基中加入不同的碳源, 包

表 1 碳源对菌体生长及脂多糖产量的影响  
Table 1 Effect of carbon sources on cell growth and lipopolysaccharide production

碳源 Carbon Source	菌体干重 Cell (g/L)	乳化力光密度 OD of emulsifying activity	脂多糖产量 Lipopoly- saccharide (g/L)
葡萄糖 Glucose	0	0	0
油酸 Oleic acid	8.7	0.09	0.18
正烷烃 n-Paraffin	5.6	0.23	0.46
甲醇 Methanol	0	0	0
乙醇 Ethanol	7.2	0.79	1.58
十四醇 Tetradecyl alcohol	1.7	0.05	0.10
糠油 Bran oil	2.1	0.02	0.04
茶油 Tea oil	7.1	0.09	0.18
菜油 Rape oil	9.9	0.82	1.64
蓖麻油 Castor oil	4.9	0.11	0.22
乙酸铵 Ammonium acetate	0.7	0.07	0.14
乙酸钠 Sodium acetate	0.4	0.08	0.16

括正烷烃、醇类、植物油、脂肪酸以及醋酸盐等, 试验了该菌胞外脂多糖的产量。

表 1 结果表明, 以乙醇及菜油为碳源时, 菌体及胞外脂多糖的产量都较高; 而以油酸作碳源时, 菌体生长好但脂多糖产量较低。此外, 该菌还不利用葡萄糖及甲醇。为了使胞外脂多糖的分离比较容易, 采用水溶性碳源乙醇较为理想。

Gutnick 等报道, 用乙醇为碳源和用正烷烃为碳源时, 该菌产生的脂多糖在结构上有差异, 前者羟基脂肪酸及脂肪酸酯的含量较高, 且乳化性能较好<sup>[8]</sup>。

## (三) 各种氮源对菌体生长及胞外脂多糖产量的影响

表 2 氮源对菌体生长和脂多糖产量的影响  
Table 2 Effect of nitrogen sources on cell growth and lipopolysaccharide production

氮源 Nitrogen Source (g/L)	最终 pH Final pH	菌体 干重 Cell (g/L)	乳化力 光密度 OD of emulsif- ying activity	脂多糖含量 Lipopoly- saccharide (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (4.0)	6.50	7.2	0.80	1.60
NaNO <sub>3</sub> (5.00)	7.20	1.9	0.24	0.48
NH <sub>4</sub> Cl (3.23)	6.65	5.2	0.63	1.26
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4.0)	6.70	4.6	0.69	1.38
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (1.79)	7.15	3.1	0.33	0.66
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (2.40)	6.75	3.4	0.31	0.62

用乙醇作碳源, 在摇瓶液体培养基中加入含氮量相等的 6 种不同氮源, 试验 *Acinetobacter* sp. 胞外脂多糖的产量。

从表 2 结果可看出, 该菌体在液体培养基中对以上 6 种氮源都能利用并产生胞外脂多糖, 其中以 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作氮源胞外脂多糖的产量最佳。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及 NH<sub>4</sub>Cl 的效果也较好, 而对 NaNO<sub>3</sub> 的利用较差。

## (四) 二价镁离子对脂多糖产量的影响

试验了在以乙醇为碳源的液体培养基

中,添加不同量的 $Mg^{2+}$ 对菌体生长及胞外脂多糖产量的影响。图2结果表明, $Mg^{2+}$ 对该菌的菌体生长及胞外脂多糖产量的影响较大。 $MgSO_4$ 浓度在100mg/L时胞外脂

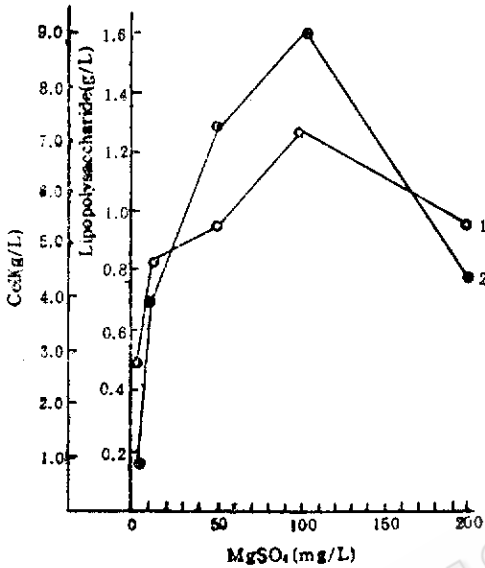


图2 二价镁离子对脂多糖产量的影响

Fig.2 Effect of divalent magnesium cation on lipopolysaccharides production

1. 菌体干重Cell 2. 脂多糖Lipopolysaccharide  
多糖的含量约为 $MgSO_4$  10mg/L时的2.3倍。但当 $MgSO_4$ 的含量较高时(200mg/L),菌体及胞外脂多糖的产量则下降。

### (五) 抗菌素存在下胞外脂多糖的产生

为了研究抗菌素是否能抑制该菌的蛋白质合成及其对胞外脂多糖的产生是否有刺激作用,进行了本试验。

从表3结果可以看出,除青霉素外,其他抗菌素,如四环素、氯霉素以及土霉素等对该菌菌体蛋白质的合成有一定的抑制作用。而青霉素、土霉素对胞外脂多糖的产生没有刺激作用,氯霉素则对胞外脂多糖的产生有明显的刺激作用,能明显增加该菌胞外脂多糖的产生,四环素也有一定的作用。

表3 抗菌素对脂多糖产量的影响

Table 3 Effect of antibiotics on lipopolysaccharide production

抗菌素 Antibiotic	添加浓度 Final concn. (mg/ml)	菌体浊度 Cell turbidity	乳化力光密度 OD of emulsifying activity
未加 None		0.53	0.23
四环素 Tetracycline	0.05	0.28	0.44
青霉素 Penicillin	0.10	0.51	0.18
氯霉素 Chloromycetin	0.05	0.34	0.78
土霉素 Terramycin	0.10	0.35	0.15

### (六) 菌体生长过程中胞外脂多糖的产生

*Acinetobacter* sp. 用乙醇作碳源,

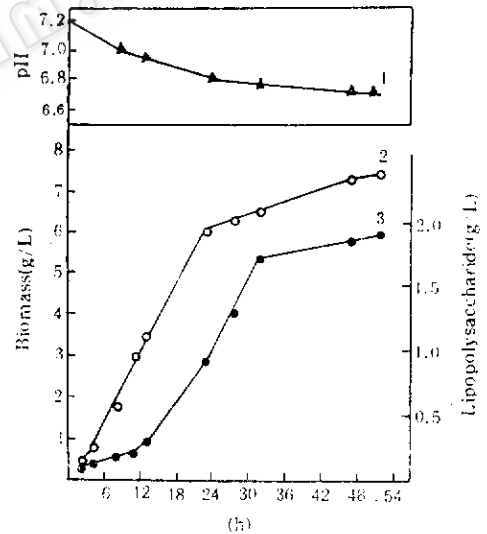


图3 以乙醇为碳源胞外脂多糖的生产

Fig. 3 Production of extracellular emulsifier during growth of *Acinetobacter* sp. on ethanol medium

1. pH 2. 菌体干重Biomass 3. 脂多糖Lipopolysaccharide

Emulsifying activity was determined on the culture supernatant fluid after centrifugation at 9000 g for 20 min. The standard emulsifier assay (Fig.1) was used with hexadecane-2-methylnaphthalene as a substrate in Tris-Mg buffer

在不同生长时期菌体生长、pH 变化及胞外脂多糖产生的测定结果见图 3。实验在 5L 大摇瓶装液 1L 进行的。pH 在开始的 24h 内，从 7.2 降至 6.8，以后的 26h 中，pH 变化不明显，基本维持恒定。胞外脂多糖含量的增长与菌体生长曲线紧密相关。培养约 48h，脂多糖产量可达 1.9g/L，菌体干重为 7.2g/L。

采用正烷烃为碳源时，在生长过程中观察到发酵液良好的乳化作用，但菌体产量及胞外脂多糖的产量（分别约 5.6g/L 和 0.46g/L）都明显低于以乙醇为碳源的培养物。

**(七) 细菌脂多糖的乳化力和乳化稳定性**

试验证明，此菌的胞外脂多糖具有较强的乳化力和乳化稳定性。以正烷烃或植物油作碳源时可观察到该菌能很快形成稳定的乳状液。Zosim 等<sup>[7]</sup>也研究了此类脂

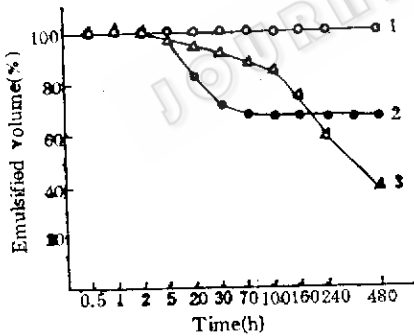


图 4 脂多糖和油酸对煤油-水乳化液的稳定性试验  
Fig.4 Stability of kerosene-water emulsion formed by lipopolysaccharide and oleic acid

1. 0.1% 油酸 + 10% 无细胞脂多糖发酵液  
0.1% oleic acid + 10% cell free lipopolysaccharide fermentation broth
2. 50% 无细胞脂多糖发酵液 50% cell free lipopolysaccharide fermentation broth
3. 0.1% 油酸 0.1% oleic acid

多糖化合物良好的乳化力和乳化稳定性。

将脂多糖的发酵液或脂多糖产物溶于水作为水相，以煤油作油相，用超声波乳化法试验了脂多糖及其发酵液的乳化力与乳化稳定性，结果见图 4 和图 5。

图 4 结果表明，在 0.1% 油酸中加入 10% 的无细胞脂多糖发酵液，可明显增加乳化稳定性。而脂多糖发酵液本身也具有较好的乳化性能。

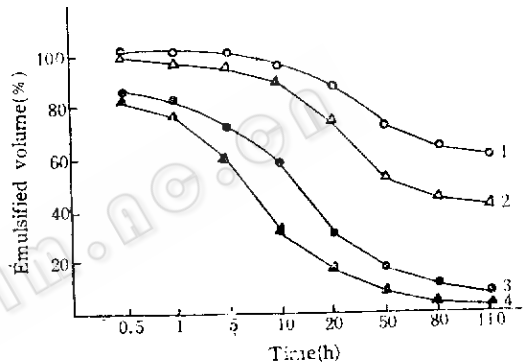


图 5 糖脂和脂多糖对煤油-水乳化液的稳定性试验  
Fig.5 Stability of kerosene-water emulsion formed by glycolipids and lipopolysaccharide

1. 0.1mg/ml 鼠李糖脂 + 0.01mg/ml 脂多糖  
0.1mg/ml Rhamnolipids + 0.01mg/ml lipopolysaccharide
2. 0.05mg/ml 鼠李糖脂 + 0.01mg/ml 脂多糖  
0.05mg/ml Rhamnolipids + 0.01mg/ml lipopolysaccharide
3. 0.1mg/ml 鼠李糖脂  
0.1mg/ml Rhamnolipids
4. 0.05mg/ml 鼠李糖脂  
0.05mg/ml Rhamnolipids

图 5 结果表明，在低浓度的生物表面活性剂——鼠李糖脂或槐糖脂的水溶液中添加微量的脂多糖，可明显提高其乳化相比例，显示了这种细菌脂多糖良好的乳化性能与乳化稳定性。

## 参 考 文 献

- [1] Gabriel, A.; *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*, edited by Berkeley, R.W. Academic Press, London, 1979, p.191.
- [2] Finnerty, W.R. and Singer, E.; *Biotechnology*, 1:47, 1983.
- [3] 李祖义; *有机化学*, 3:177, 1986.
- [4] 日本公开特许公报, 昭62-149799, 1987.
- [5] Gutnick, D.L.; *Proceedings Biotech.*, Washington, D.C. p.645, 1984.
- [6] Zuckerberg, A. et al.; *Appl. Environ. Microbiology*, 37:414, 1979.
- [7] Zosim, Z. et al.; *Biotech. Bioeng.*, 24:281, 1982.
- [8] U.S.P. 4,395,353, 1983.

## THE PRODUCTION, SEPARATION AND EMULSIFYING PROPERTIES OF THE MICROBIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

Shi Yiping      Fong Qin      Li Zuyi

(*Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica*)

When *Acinetobacter* sp. grows on a variety of carbon sources such as alcohols, vegetable oils or hydrocarbons, the exolipopolsaccharide can be produced. In this report, the best conditions for production of this exolipopolsaccharide, including different carbon sources, nitrogen sources, divalent magnesium ion as well as the addition of antibiotics were discussed. The content of the exolipopolsaccharide was determined by a emulsification turbidimetry assay. The investigation indicates that this exolipopolsaccharide has obvious emulsifying ability and emulsion stabilizing activity. It is a polymeric bioemulsifier.

### Key words

Biosurfactant; lipopolysaccharide; bioemulsifier