

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2015.07.2014120802

宋丹丹, 梁生康, 尚玉俊, 等. 不同碳源培养条件下假丝酵母菌产槐糖脂的结构及性能[J]. 环境化学, 2015, 34(7): 1252-1258

SONG Dandan, LIANG Shengkang, SHANG Yujun, et al. Properties of sophorolipid produced by the yeast *Candida bombicola* grown on different lipophilic carbon substrates[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(7): 1252-1258

不同碳源培养条件下假丝酵母菌产槐糖脂的结构及性能*

宋丹丹^{1**} 梁生康² 尚玉俊¹ 王秀莉¹

(1. 河南省科学院高新技术研究中心, 郑州, 450002; 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 采用不同碳源, 如油酸、菜籽油、棉籽油和煎炸废油作为假丝酵母菌(*Candida bombicola*) ATCC 22214 发酵生产槐糖脂的脂溶性碳源, 考察了在不同碳源条件下该菌株合成槐糖脂的能力、所产槐糖脂的结构及表面活性特点. 结果表明, 以油酸、菜籽油及棉籽油为脂溶性碳源时, 该菌株有着较高的槐糖脂产量, 分别为 101、73、51 g·L⁻¹; 通过高效液相色谱-高分辨质谱(HPLC-MS/MS)对以不同脂溶性碳源为发酵底物产生的槐糖脂进行分析, 发现所产槐糖脂均由乙酰基取代的内酯型和酸型槐糖脂同系物构成且以内酯型槐糖脂结构为主. 槐糖内酯中脂肪酸基的结构有所差异, 但主要以脂肪链不饱和度为 1 的十八烯酸(C18:1)结构为主. 所产槐糖脂具有较低的表面张力和临界胶束浓度(CMC), 其中最低表面张力结果一致约 36.0—37.0 mN·m⁻¹, 而 CMC 有所差异. 同时, 该槐糖脂具有良好的稳定性, 其水溶液的最低表面张力在 100 °C 下保持 2 h 基本不变, 在 0—20% 的 NaCl 盐溶液及 pH 值为 2—10 范围内均保持良好的表面活性.

关键词 槐糖脂, 假丝酵母菌, 脂溶性碳源, 高效液相色谱-高分辨质谱, 表面活性.

Properties of sophorolipid produced by the yeast *Candida bombicola* grown on different lipophilic carbon substrates

SONG Dandan^{1**} LIANG Shengkang² SHANG Yujun¹ WANG Xiuli¹

(1. High & New Technology Research Center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou, 450002, China;

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

Abstract: In the present study, sophorolipids were produced by yeast *Candida bombicola* ATCC 22214 when cultured on various lipophilic carbon substrates, such as oleic acid, rapeseed oil, cottonseed oil, and frying waste oil. The structure and surface active properties were investigated. Fed-batch fermentations of *Candida bombicola* resulted in sophorolipids yields of 101, 73 and 51 g·L⁻¹ from oleic acid, rapeseed oil, and cottonseed oil. The structures of individual sophorolipid components were quantified and identified by HPLC-MS/MS system. Results showed that the products were heterogeneous mixtures of acetylated lactonized and acidic sophorolipids, and the large majority of the sophorolipids existed in the lactonic forms. Among the lactonized sophorolipids, the predominant component is sophorolipid containing hydroxyoleic acid (C18:1) as the lipid moiety. Sophorolipids had high surface activity, such as low surface tension and CMC and good stability. The minimum surface tension of the produced sophorolipids in aqueous solution were found to be 36.0—37.0 mN·m⁻¹ regardless of the carbon substrates while disparity occurred in the CMC values. Unhindered surface activity of the sophorolipids was found at wide range of pH (2—10), temperature (heating at 100 °C for 2 h) and salt concentrations (0—20% NaCl).

2014年12月8日收稿.

* 国家自然科学基金(41371314)资助.

** 通讯联系人, Tel: 0371-65511805; E-mail: dandansong2008@163.com

Keywords: sophorolipids, *Candida bombicola*, lipophilic carbon substrate, HPLC-MS/MS, surface active property.

与传统的化学合成表面活性剂相比,槐糖脂生物表面活性剂不仅具有增溶、乳化、润湿、降低表面张力等作用,而且具有无毒、可生物降解、对环境友好等特性.因而,在医药、食品、日化、石油开采,特别是在环境污染生物治理方面具有重要用途.目前,限制槐糖脂生物表面活性剂广泛应用的主要因素是生产成本过高,因此,筛选高效槐糖脂生物表面活性剂产生菌,选用廉价发酵原料,是降低其生产成本的有效途径.

研究较多的槐糖脂产生菌为假丝酵母菌(*C. bombicola*),利用水溶性碳源葡萄糖和脂溶性的长链烷烃碳源进行发酵,底物转化率可达 70%,发酵罐生产产量可达 $400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [1-3].据统计,发酵培养基成本约占生物表面活性剂合成的 30%—50%[4],槐糖脂发酵生产时,发酵碳源是主要生产原材料,因此减少碳源成本可以有效降低槐糖脂的价格,尤其是降低脂溶性碳源成本.Solaiman 等[5]发酵培养假丝酵母菌(*C. bombicola*)时,在采用葡萄糖和油酸为碳源的基础上,尝试采用大豆糖浆、豆油、牛肉油脂及亚麻籽油等廉价碳源为替代碳源,使槐糖脂生产成本得到降低.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,深入研究微生物以不同碳源合成表面活性剂的结构和性能,对槐糖脂的实际应用具有重要的指导意义.

本研究在选育槐糖脂高产菌假丝酵母菌(*C. bombicola*)的基础上,选择不同碳源油酸、菜籽油、棉籽油及煎炸废油为脂溶性碳源,考察了不同碳源培养条件下该菌株产槐糖脂能力、槐糖脂结构及表面活性特征.

1 实验部分

1.1 试验材料与仪器

葡萄糖、油酸(AR,天津市巴斯夫化工有限公司)、菜籽油和棉籽油(山东德州粮油食品商店)、煎炸废油(麦当劳快餐店)、层析硅胶(100—200 目)(青岛海洋化工厂)、乙腈(HPLC, MERCK 公司)、液质联用仪器用水为哇哈哈纯净水.

菌株为假丝酵母菌(*C. bombicola*) ATCC 22214,为笔者所在实验室保存.

高效液相色谱-高分辨质谱联用仪(HPLC-MS/MS),美国 Agilent 公司,1290 HPLC-Bruker maXis Q-TOF, JZ-200A 自动界面张力仪(承德精密试验机有限公司).

1.2 实验方法

(1) 菌株发酵培养

菌株发酵培养方法同本实验室已报道方法[6],以葡萄糖为水溶性碳源,菜籽油、棉籽油和煎炸废油为脂溶性碳源,采用摇瓶培养分批补料方式,考察该菌株利用不同碳源合成槐糖脂的性能,实验设计如表 1 所示.根据表 1 碳源的组成进行实验,在发酵 8 d 后进行槐糖脂粗产物含量的测定.

表 1 假丝酵母菌 ATCC 22214 利用不同碳源合成槐糖脂发酵培养基组成

Table 1 Composition of fermentation media for sophorolipid production by *C. bombicola*

ATCC 22214 grown on different carbon source

实验方案	水溶性碳源/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	脂溶性碳源/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	酵母粉/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿素/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	葡萄糖 60	油酸 60	8	2
2		菜籽油 60	8	2
3		棉籽油 60	8	2
4		煎炸废油 60	8	2

(2) 粗提产物的层析柱法纯化

采用液液萃取方式[6]对发酵底物进行分离提取后得到槐糖脂的粗产物,对得到的槐糖脂粗产物进行纯化:将 3 g 层析硅胶(100 目,110 °C 活化 4 h)溶于 15 mL 的乙酸乙酯:甲醇(10:1, V/V)的混合溶剂中,填充到玻璃层析柱(1.2 cm×30 cm)中,顶部再填入 1 cm 无水硫酸钠.取 0.05—0.10 g 粗产品溶到

2 mL上述混合溶剂中,添加到层析柱顶部,用40 mL上述混合溶剂按 $1.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率洗脱.合并洗脱液,通过旋转蒸发仪 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 除去溶剂,得到槐糖脂纯化产品.定量转移到1 mL色谱小瓶中,通过HPLC-MS/MS进行槐糖脂结构鉴定分析.

(3) 纯化产物的 HPLC-MS/MS 结构分析

采用 Agilent 1290 HPLC-Bruker maXis Q-TOF 高分辨质谱仪器,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 $2.1 \text{ mm}\times 150 \text{ mm}\times 1.7 \text{ }\mu\text{m}$.实验条件:流动相 A:0.1%甲酸 1%乙腈水溶液;流动相 B:0.1%甲酸乙腈;流速为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;等度洗脱条件为:80% B.柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量: $1 \text{ }\mu\text{L}$,UV 检测波长: 207 nm ,无分流进入质谱.质谱条件:电喷雾正离子模式;扫描范围 m/z 200—1000;毛细管电压: 4.5 kV ;喷雾气压 1.5 psi ;干燥气(N_2)流速: $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;气体温度: $180 \text{ }^\circ\text{C}$;分辨率:50000.

(4) 槐糖脂的表面活性测定

采用吊环法对不同发酵碳源条件下生成槐糖脂的最低表面张力及临界胶束浓度(CMC)进行测定,同时考察了不同加热时间(在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 20、40、60、80、100、120 min)、盐度(NaCl 浓度 2%、5%、8%、12%、15%、18%、20%)及 pH(2.00、4.00、6.00、7.00、8.00、10.00、12.00)对槐糖脂溶液最低表面张力的影响.

2 结果和讨论

2.1 不同碳源培养条件下槐糖脂产量

将脂溶性碳源采取分批补料添加(分3次,每隔1 d添加1次),得到8 d后槐糖脂粗产物的产量,具体结果见表2.可以看出,以油酸为脂溶性碳源时槐糖脂产量为 $101 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以菜籽油和棉籽油代替油酸后,槐糖脂产量有所降低,但仍保持较高的槐糖脂产量,分别为 73 、 $51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Solaiman 等^[7]采用大豆油、动物油脂及亚麻籽油代替油酸后,槐糖脂产率也有所降低.在使用煎炸废油为脂溶性碳源时,槐糖脂产量较低,这可能是由于在煎炸过程中产生了对菌体生长有害的毒性物质.然而,根据中国粮油公布的油品价格,产单位质量的槐糖脂需要这几种脂溶性碳源的成本相差不大.因此,在实际生产中,可以根据当地实际条件选择价格低廉易得的脂溶性碳源.

表2 不同碳源培养条件下槐糖脂产量

Table 2 Yields of sophorolipid production with different carbon sources

水溶性碳源	脂溶性碳源	培养时间/h	槐糖脂产量/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
葡萄糖	油酸	196	101
葡萄糖	菜籽油	196	73
葡萄糖	棉籽油	196	51
葡萄糖	煎炸废油	196	22

2.2 槐糖脂同系物结构的 HPLC-MS/MS 鉴定

应用层析硅胶柱将菌株以菜籽油为脂溶性碳源的发酵粗产物进一步纯化后,利用 HPLC/ESI-TOF/MS 分析了该菌株所产糖脂同系物的结构.图1给出了该糖脂同系物的 HPLC/ESI-TOF/MS 总离子流图.表3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.各个组分的详细分析过程同本实验室已发表文章^[6],通过对不同保留时间各组分的质谱碎片的分析结果进行总结,详细结果如表4所示.从结果中可以判断该提取物中含有7种槐糖脂同系物,除保留时间为3.0、6.7、6.9 min的3种组分为自由酸型外,其余均为内酯型结构.这和 Solaiman 等^[7]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酯的形式存在.也有研究发现假丝酵母(*C. bombicola*)在以葡萄糖和油酸为碳源时产生的槐糖脂同系物中,内酯型结构约占95%^[8].

2.3 不同碳源发酵培养产槐糖脂结构分析

以不同碳源发酵所产槐糖脂进行 HPLC-MS/MS 测定分析,其中以葡萄糖为水溶性碳源,将脂溶性碳源菜籽油发酵产物组成作为参照,分别将脂溶性碳源油酸、棉籽油及煎炸废油混合进行发酵所产槐糖

脂的 HPLC-MS/MS 测定结果与其对比,结果见表 5.对不同碳源发酵所产槐糖脂进行综合分析,发现均为酸型和内酯型槐糖脂的混合物且对应的主要产物均为内酯型槐糖脂;同时,均含有脂肪链不饱和度为 1 的十八烯酸(C18:1)或不饱和度为 0 的十八烷酸(C18:0)结构的槐糖脂,这一结果和很多研究者的研究结果一致^[7-9].其中脂肪链为不同结构脂肪酸基的槐糖内酯分子结构如表 6 显示,可以看出以不同脂溶性碳源为发酵底物对应的槐糖内酯中脂肪酸基的结构有所差异,但主要以脂肪链不饱和度为 1 的十八烯酸(C18:1)结构为主,同时含有 C18:0 和 C18:2 结构.以油酸(结构为 C18:1)为第二碳源时,可以看出产物中同时含有 C18:0 和 C18:2 结构的内酯产物,Nunez 等^[10]曾指出假丝酵母菌(*C. bombicola*)会自然产生这两种同系物,本研究进一步论证了此结论.

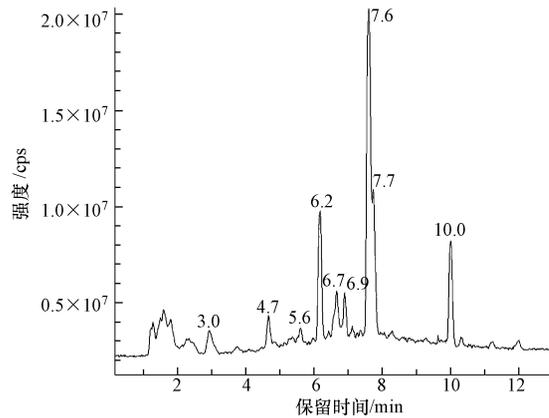


图 1 假丝酵母菌 ATCC 22214 所产槐糖脂的 HPLC /ESI-TOF /MS 总离子流图

Fig.1 Total ion liquid chromatogram of sophorolipids produced by *C. bombicola* ATCC 22214

表 3 以葡萄糖和菜籽油为发酵碳源下假丝酵母菌(*C. bombicola*) ATCC 22214 产槐糖脂同系物及各组分的结构和相对含量

Table 3 Structure and relative abundance of the sophorolipid homologues produced by *C. bombicola* ATCC 22214 with the carbon source of goucose and rapeseed oil

糖脂名称	保留时间/min	糖脂类型	分子离子(m/z)	质量分数/%	主要离子碎片(m/z)
L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烯酸-6',6"-二乙酸酯	3.0	酸型	707.3830	3.98	729.37, 707.38, 589.25, 503.32
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6'-乙酸酯	4.7	内酯型	647.3626	2.86	669.34, 647.36, 485.31, 467.30
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6"-乙酸酯	5.6	内酯型	647.3620	3.69	669.34, 647.36, 443.30
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	6.2	内酯型	687.3576	13.85	709.34, 687.36, 669.35, 651.34
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-6"-乙酸酯	6.7	酸型	663.3579	6.33	685.34, 663.36, 645.35, 627.34, 483.30
18-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烯酸-6"-乙酸酯	6.9	酸型	663.3573	4.21	685.34, 663.36, 645.35, 627.34, 483.30
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-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	7.6	内酯型	689.3747	53.66	711.36, 689.37, 671.36, 653.35, 485.31, 467.30
18-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O-]-十八烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	7.7	内酯型	689.3743	-	711.36, 689.37, 671.36, 653.35, 485.31, 467.30
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-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	10.0	内酯型	691.3891	10.51	713.37, 691.39, 673.38, 655.37

表4 槐糖脂二级质谱碎片信息(m/z)分析

Table 4 MS/MS data [M+H]⁺ ions (m/z) of sophorolipids

槐糖脂质谱碎片	保留时间/min								
	3.0	4.7	5.6	6.2	6.7	6.9	7.6	7.7	10.0
[M+Na] ⁺	729.37	669.34	669.34	709.34	685.34	685.34	711.36	711.36	713.37
[M+H] ⁺	707.39	647.36	647.36	687.36	663.36	663.36	689.37	689.37	691.39
[M+H-H ₂ O] ⁺	589.25	—	—	669.35	645.35	645.35	671.36	671.36	673.38
[M+H-2H ₂ O] ⁺	—	—	—	651.34	627.34	627.34	653.35	653.35	655.37
[M+H-2CH ₃ CO] ⁺	623.25	—	—	—	—	—	—	—	—
[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	—	485.31	—	—	—	—	—	—	—
[M+H-C ₈ H ₁₂ O ₆] ⁺	503.32	—	443.30	483.30	459.30	459.30	485.31	485.31	487.33
[M+H-2C ₈ H ₁₂ O ₆] ⁺	299.26	—	—	297.24	—	—	299.26	299.26	301.27

表5 假丝酵母菌 ATCC 22214 以不同碳源为底物发酵产槐糖脂同系物及各组分结构和相对含量

Table 5 Structure and relative abundance of the sophorolipid homologues produced by *C. bombicola* ATCC 22214 with the different low cost carbon sources

糖脂名称	糖脂类型	分子离子/ (m/z)	不同碳源对应各组分百分数/%		
			葡萄糖、 煎炸废油	葡萄糖、 棉籽油	葡萄糖、 油酸 ^[6]
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳二烯酸-6',6"-二乙酸酯	酸型	705.3692	√(5.48)	无	无
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6'-乙酸酯	内酯型	647.3626	√(4.49)	无	无
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6"-乙酸酯	内酯型	647.3620	无	无	无
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	687.3576	√(22.40)	√(28.66)	无
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳烯酸-6'-乙酸酯	酸型	663.3579	√(12.07)	√(36.94)	√(27.21)
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳烯酸-6',6"-二乙酸酯	酸型	707.3830	√(6.43)	无	无
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八碳烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	689.3747	√(38.61)	√(20.60)	√(34.96)
<i>L</i> -[(2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>O</i>]-十八烷酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	691.3891	√(10.50)	√(13.80)	√(37.84)

表6 槐糖内酯分子中脂肪酸基的组成

Table 6 Distribution of sophorolipid lactones

水溶性碳源	脂溶性碳源	槐糖内酯中脂肪酸基的组成相对丰度/%		
		C18:2	C18:1	C18:0
葡萄糖	油酸	27.2	35.0	37.8
葡萄糖	菜籽油	21.4	67.5	11.1
葡萄糖	棉籽油	45.4	32.7	21.9
葡萄糖	煎炸废油	35.4	50.8	13.8

综上所述结果表明,疏水链中含有一个不饱和键的槐糖脂(C18:1型结构)是假丝酵母菌(*C. bombicola*)的主要产物,这和Chen等^[11]发酵槐糖脂时采用同位素标记法验证的结构一致,他们发现在槐糖脂的主要产物中,内酯型槐糖脂中C18:1型结构约占内酯槐糖脂的77%,酸型槐糖脂中C18:1型结构约占酸型槐糖脂的85%。

2.4 不同脂溶性碳源培养条件下产槐糖脂的表面活性

考察了不同碳源培养条件下菌株所产槐糖脂的表面活性.结果见表7,可以看出4种不同碳源培养条件下所产槐糖脂溶液的最低表面张力在36—37 mN·m⁻¹之间,这与采用十六烷酸、十八烷酸、十八烯

酸及十八碳二烯酸为碳源发酵产槐糖脂的结果一致^[12],因为不同底物发酵所产槐糖脂的脂肪酸链均为这几种脂肪酸链的混合物.而 CMC 却有所不同,主要是由于在不同脂溶性碳源培养条件下所产槐糖脂中脂肪酸链的组成比例不同,槐糖脂的 CMC 受不同脂肪醇羟基影响较为显著^[13].

表 7 不同碳源培养条件下假丝酵母菌 ATCC 22214 生产槐糖脂的表面活性

Table 7 Surface-active properties of sophorolipids produced by *C. bombicola* ATCC 22214 with the different low cost carbon sources

	脂溶性碳源			
	油酸	菜籽油	棉籽油	煎炸废油
最低表面张力/($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)	36.1	37.0	36.9	37.0
CMC/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	36.5	30.1	43.6	38.3

为了研究槐糖脂的稳定性,考察了不同加热时间、盐度和 pH 对浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 槐糖脂溶液最低表面张力的影响,测定结果如图 2 所示.可以看出,槐糖脂溶液在沸水中加热 2 h 后,其表面张力几乎没有发生变化,表明槐糖脂有很好的热稳定性;在盐浓度为 0—20% 范围均保持较高的表面活性,而 Ghosvand 等^[14]报道了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* PTCC 1696)产生物表面活性剂在 4%—8% 的盐浓度范围内保持较高表面活性,说明槐糖脂对高盐条件有很强的耐受性;在 pH 2—10 范围内,槐糖脂表现出较高的表面活性,当 pH 值为 12 时,其表面张力明显升高,达 $40.3 \pm 0.08\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$,此时槐糖脂溶液中原有的规则絮状形态消失,溶液呈现清澈透明状态,可能是破坏了槐糖脂形成的特殊胶束结构.

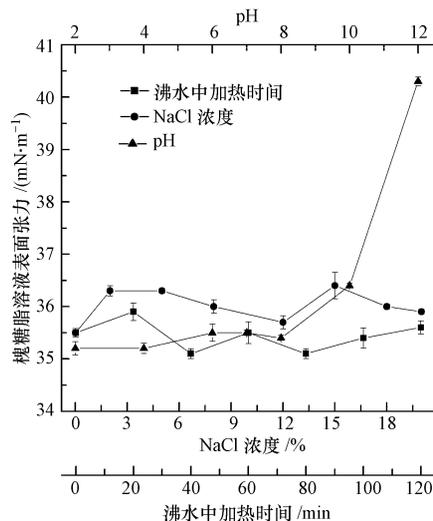


图 2 不同加热时间、盐度和 pH 条件对槐糖脂溶液($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)表面张力的影响

Fig.2 Effect of heating time, salt concentration, and pH on surface tension of sophorolipid solution with the concentration of sophorolipid $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

3 结论

以油酸、菜籽油及棉籽油为脂溶性碳源时,假丝酵母菌 ATCC 22214 有着较高的槐糖脂产量,合成的槐糖脂均由乙酰基取代的含有 L-羟基十八烯酸的内酯型和酸型槐糖脂同系物构成且以内酯型槐糖脂为主.以不同脂溶性碳源为发酵底物对应的槐糖内酯中脂肪酸基的结构有所差异,但主要以脂肪链不饱和度为 1 的十八烯酸(C18:1)结构为主.所产槐糖脂具有较低的表面张力和临界胶束浓度(CMC),其中最低表面张力约 $36.0\text{—}37.0\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$,而 CMC 有所差异.同时,该槐糖脂具有良好的稳定性,其表面活性可在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下保持 2 h 基本不变,并可在 0—20% 的 NaCl 盐溶液及 pH 值为 2—10 范围内均保持良好的表面活性.

参 考 文 献

- [1] Pekin G, Vardar-Sukan F, Kosaric N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2005, 5(4): 357-362
- [2] Hu Y, Ju L K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29(10): 593-601
- [3] Van B I N A, Zhang J X, Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(4): 821-833
- [4] Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, et al. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(6): 686-691
- [5] 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
- [6] 宋丹丹, 梁生康, 王江涛. 槐糖脂生物表面活性剂的结构特征及理化性质初探[J]. *环境化学*, 2011, 30(8): 1474-1479
- [7] Solaiman D K Y, 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
- [8] Ratsep P, Shah V. Identification and quantification of sophorolipid analogs using ultra-fast liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 78(3): 354-356
- [9] Hu Y, Ju L K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 87(3): 263-272
- [10] Nunez A, Ashby R, Foglia T A, et al. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization[J]. *Chromatographia*, 2001, 53(11): 673-677
- [11] Chen M, Dong C, Penfold J, et al. Adsorption of sophorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate, at the air/water interface[J]. *Langmuir*, 2011, 27(14): 8854-8866
- [12] Ashby R D, Solaiman D K Y, Foglia T A. Property control of sophorolipids: Influence of fatty acid substrate and blending [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(6): 1093-1100
- [13] 宋丹丹, 梁生康, 王江涛, 等. 稳态荧光探针法研究槐糖脂生物表面活性剂的胶束化行为[J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(8): 2171-2175
- [14] Ghojavand H, Vahabzadeh F, Roayaei E, et al. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696) [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, 324(1-2): 172-176