

一株球拟酵母菌产生的胞外糖脂

李祖义 施邑屏 夏寅 许兴妹 李江云

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

Torulopsis sp. 生长在碳水化合物、植物油或正烷烃中能产生胞外糖脂, 为获得高产量糖脂, 一些限制因素是必需的, 例如氮源的限制能使糖脂产量明显增加。用葡萄糖培养后得到的休止细胞再悬浮于磷酸缓冲液或蒸馏水中, 以植物油或正烷烃作碳源, 则每 10g 干菌能产 22g 糖脂。

关键词 糖脂; 生物表面活性剂; 休止细胞

近年来, 国际上对微生物产生的表面活性剂进行了大量的研究。酵母菌产生的表面活性剂一般是糖脂化合物, *Torulopsis* sp.^[1] 和 *Candida bogoriensis*^[2] 在培养液中能分泌槐糖脂, *Rhodotorula* sp.^[3] 能产生聚醇脂, *Ustilago Zeae*^[4] 可产生带三羟基十六烷酸的糖脂。糖脂的实用价值也越来越受到人们的重视, 它可作为羧基脂肪酸的来源。另外, 糖脂经过改性后作为润湿剂、乳化剂, 能应用于食品、制药、印染、日化等工业^[5, 6]。

我们筛选出一株 *Torulopsis* sp., 它在含葡萄糖或植物油的培养液中生长, 能分泌出糖脂, 用摇瓶试验探索了菌体生长与糖脂产生的关系, 用发酵罐试验进行了代谢调节。还用休止细胞在发酵罐中进行糖脂生产, 产量达 20g/l 左右, 该糖脂的化学结构另文发表。

材料及方法

(一) 菌种及培养条件

菌种初步鉴定为 *Torulopsis* sp.。用于筛选的基本培养基 (g): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, NaNO_3 2.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 酵母膏 1, 不同量碳源, 自来水 1 l, pH 6.5。摇瓶培养: 500ml 三角瓶中装 100ml 培养基, 接种后于 28°C 振荡培养 (120 rpm)。发酵罐培养: 5 l 自控玻璃发酵罐, 装培养液 2.5 l, 500rpm, 通风 2.5 l/min。

(二) 糖脂提取及定性定量测定

发酵液用二倍体积的氯仿, 甲醇 (V: V = 2:1) 溶剂提取, 水洗并经无水硫酸钠干燥, 减压蒸干。硅胶 (E. Merck) 薄层层析, 展开剂: 氯仿: 甲醇: 醋酸为 80: 25: 1, 显色剂为萘酚硫酸液或 50% 硫酸。用萘酚法定量测定糖脂含量^[7]。

(三) 休止细胞制备

将菌培养于下列培养基 (g): 葡萄糖 30, 牛肉汁 10, 蛋白胨 10, NaCl 3, 加水至 1 l, pH 7.0, 28°C 振荡培养 4 天, 离心收集菌体, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤两次, 再放于 0.1M 磷酸缓冲液中振荡 4h, 再离心收集之。

本文于 1985 年 2 月 25 日收到。

结果与讨论

(一) *Torulopsis* sp. 生长细胞产生糖脂

Torulopsis sp. 在以葡萄糖和各种植物油作碳源时能很好地生长, 生长后期能产生较多的糖脂, 而在含正烷烃的培养基中生长不理想。据S.Ito报道^[8], 在培养液中加入适量的槐糖甲酯能促进菌体迅速生长。图1是该菌在含10%葡萄糖的培养液

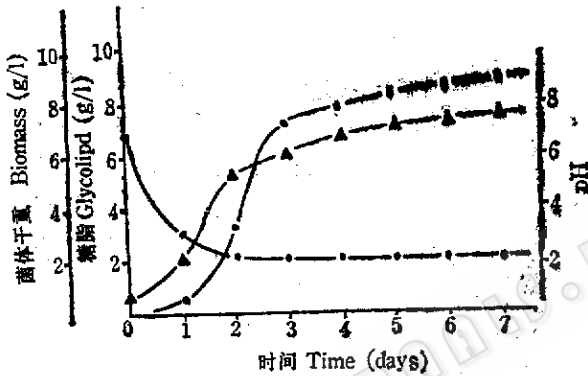


图 1 *Torulopsis* sp. 在不同时间糖脂产生情况
Fig. 1 Time course of glycolipid production

培养条件 Culture conditions: 10% 葡萄糖

Glucose, pH 5.4, 30°C

—○— pH, —▲— 菌体干重 Biomass,
—●— 糖脂 Glycolipid

中菌体生长及糖脂产生的情况。4天后糖脂产量能达8g/l左右。表1是该菌在各单独植物油或与葡萄糖(50%)相混作碳源培养, 产生糖脂的情况。该菌以豆油、菜油作碳源能够很好生长, 并产生较多的糖脂。但该菌在混合碳源培养时, 糖脂增加不明显。Cooper认为混合碳源比单一碳源要好^[9], 这可能是菌种不同的原因。图2是该菌以豆油作碳源在发酵罐培养时产生糖脂的情况, 发酵过程中氮源起着调节作用。菌体生长到40h左右氮源已消耗完,

表 1 不同碳源对糖脂产生的影响
Table 1 Effect of carbon source on glycolipid production

碳源 Carbon source	糖脂 Glycolipid (g/l)
葡萄糖 Glucose 10%	7.20
葡萄糖 Glucose 5% + 菜油rape oil 5%	5.80
葡萄糖 Glucose 5% + 豆油bean oil 5%	6.25
葡萄糖 Glucose 5% + 正烷烃n-paraffin 5%	6.10
葡萄糖 Glucose 5% + 红花油 safflower oil 5%	5.75
正烷烃 n-Paraffin 10%	4.00
豆油 Bean oil 10%	9.80
菜油 Rape oil 10%	8.20
红花油 Safflower oil 10%	5.0

培养条件 Culture conditions: pH 5.4, 30°C,
4天 4days

此时糖脂开始迅速增加, 豆油是逐渐分批流加, 4天后糖脂产量能达22g/l。

(二) *Torulopsis* sp. 休止细胞生产糖脂

从图2可以看出限制氮源的流加能促进糖脂的增加, 这点启发我们探讨利用休止细胞生产糖脂的可能性。

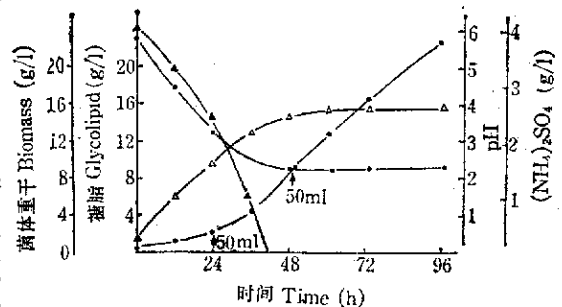


图 2 以豆油为碳源在发酵罐培养时的产糖脂过程
Fig. 2 Fermentation of *Torulopsis* sp.

in a medium containing bean oil

培养条件 Culture conditions: pH 6.0, 28°C,
rpm 500, (NH₄)₂SO₄ 4 g/l

—○— pH, —△— 菌体干重 Biomass,
—●— 糖脂 Glycolipid, —▲— (NH₄)₂SO₄,

↑ 加豆油 Added bean oil

1. 休止细胞培养液筛选：利用休止细胞生产糖脂，首先考虑它能否悬浮于一种最简单的培养液中，加入碳源就能产生糖脂。我们分别以葡萄糖和豆油为碳源，将一定量的休止细胞分别悬浮于缓冲液、生理水、蒸馏水中，观察产糖脂的能力，见表2。*Torulopsis* sp. 在不同缓冲液或

表2 不同培养液对*Torulopsis* sp. 休止细胞产糖脂的影响

Table 2 Effect of culture solution on the glycolipid production by resting cells of *Torulopsis* sp.

培养液 Culture solution	碳源 Carbon substrates	糖脂产量 g/l Glycolipid
Na ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄ 缓冲液 Buffer	葡萄糖 Glucose	3.2
	豆油 Bean oil	7.1
生理水 0.9% NaCl	葡萄糖 Glucose	2.8
	豆油 Bean oil	5.4
蒸馏水 Distilled water	葡萄糖 Glucose	2.7

培养条件 Culture condition: 菌体浓度 Biomass conce. 10g/l, 基质浓度 Substrate conce. 20g/l, T = 30°C

培养天数 Culture time: 3 days

生理水、蒸馏水同样能产生糖脂，而且产量相差甚微，这表明它对碳源代谢及产糖脂生理条件不严，以葡萄糖为碳源在生理盐水中培养3天，糖脂产量即达2.8g/l，而以豆油为碳源，产量能达5.4g/l，这为廉价工业化生产糖脂提供了有利条件。

2. 休止细胞在不同缓冲液中生产糖脂：从图2看出，生长细胞在pH降至3时，糖脂开始迅速增加，我们将休止细胞悬浮于不同pH的缓冲液中，观察糖脂最佳产生所需pH，见图3。pH 3缓冲液是糖脂产生的最佳pH。酸性pH培养有利于发酵控制，且可防止杂菌污染。

3. 休止细胞利用不同碳源生产糖脂：为了考虑碳源价廉及来源，我们将

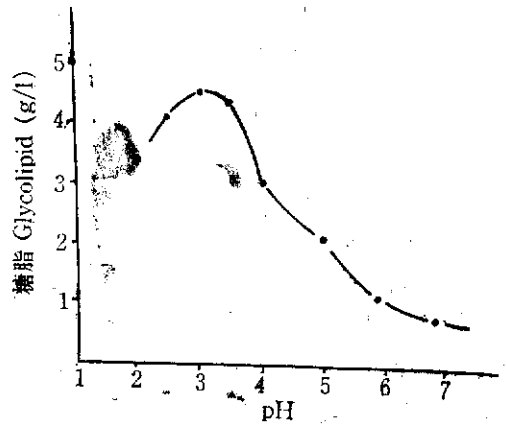


图3 pH对*Torulopsis* sp. 休止细胞产生糖脂的影响

Fig.3 Effect of pH on the glycolipid production by resting cell of *Torulopsis* sp.

培养条件 Culture condition: 0.1M 磷酸缓冲液 Phosphate buffer, 菌体浓度 Biomass conce. 10g/l, 葡萄糖浓度 Glucose conce. 30g/l, T = 30°C, 培养时间 Culture time 4 days

Torulopsis sp. 休止细胞培养于各种碳源：糖类、植物油及正烷烃，观察生产糖脂情况，见表3。植物油对细胞生长是很好的碳源，对休止细胞生产糖脂也是好的原料，其中糠油、豆油、茶油、红花油产糖脂最佳，产量能达10g/l，而菜油、棉子油作原料产量仅达6g/l，正烷烃中十八烷、十六烷较佳、低碳烷烃不理想，葡萄糖及糖蜜作原料，糖脂产量不太高，一般在4g/l左右。因此工业化生产糖脂，利用价廉来源广的植物油作原料是可取的。

4. 休止细胞发酵罐生产糖脂：*Torulopsis* sp. 休止细胞以5%豆油作碳源在缓冲液发酵罐中培养，4天后糖脂产量达22g/l，比生长细胞产生糖脂略快，见图4。

由*Torulopsis* sp. 产生的胞外糖脂已分离纯化，有关它的化学结构、表面活性性能测定，在糖脂上接上各种甲氧基、乙

表 3 *Torulopsis* sp. 休止细胞利用不同碳源产生糖脂

Table 3 Glycolipid production by resting cells of *Torulopsis* sp. with various substrates

碳源 Carbon source	糖脂产量 (g/l) Glycolipid	碳源 Carbon source	糖脂产量 (g/l) Glycolipid
豆油 Bean oil	10.1	油酸 Oleic oil	3.9
糠油 Bran oil	11.0	正烷烃 n-Paraffin	5.9
茶油 Tea oil	10.5	十二烷 Dodecane	1.0
红花油 Safflower oil	8.9	十四烷 Tetradecane	3.4
菜油 Rape oil	6.7	十五烷 Pentadecane	5.6
棉子油 Cotton seed oil	5.9	十六烷 Hexadecane	8.1
葡萄糖 Glucose	4.0	十八烷 Octadecane	9.8
蔗糖 Sucrose	3.2		

培养条件 Culture condition: 0.1M 磷酸缓冲液
Phosphate buffer, pH 3.0, 菌体浓度 Biomass conce.
10g/l, 基质浓度 Substrate conce. 30g/l,
T = 30℃, 培养时间 Culture time 3 days

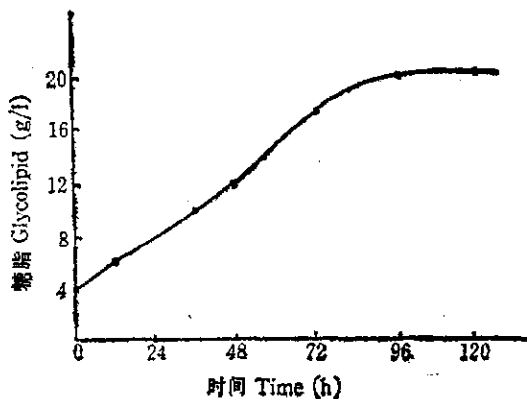


图 4 *Torulopsis* sp. 休止细胞以 5% 豆油为碳源的发酵罐试验

Fig. 4 Glycolipid production by resting cells of *Torulopsis* sp. with 5% bean oil

发酵条件 Fermentation conditions: 5 l 发酵罐
Fermenter, 0.1M 磷酸缓冲液 Phosphate buffer,
菌体浓度 Biomass conce. 10g/l, T = 30℃

氧基等改善其表面活性性能等结果, 我们将另文发表。

参 考 文 献

- (1) Inoue, S. and Ito S.: *Biotechnol. Lett.*, 4:3, 1982.
- (2) Tulloch, A. P. et al.: *Can J. Chem.*, 46:3337-3351, 1968.
- (3) Tulloch, A. P. et al.: *Can J. Chem.*, 46:1523, 1968.
- (4) Harkins, R. H.: *Canadian Journal of Research*, 28(c), 213, 1950.
- (5) Cooper, D. G., and Zajic, J. E.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 26:229, 1980.
- (6) Cooper, D. G. et al.: *J. Bacteriol.*, 137:795, 1979.
- (7) Hodge, J. E., and Hofreiter, B. T.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1:390, 1962.
- (8) Ito, S. et al.: *Age. Biol. Chem.*, 44:2221, 1980.
- (9) Cooper, D. G., and Paddock, D. A.: *Appl. Environ Microbiology*, 47:173, 1984.

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR GLYCOLIPIDS BY *TORULOPSIS* SP

Li Zuyi Shi Yiping Xia Ying Xu Xingmei Li Jiangyun

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica)

A culture of *Torulopsis* sp. is able to produce a large amount of extracellular glycolipids when it is grown on carbohydrate, vegetable oil or water-insoluble alkanes. The growth limiting conditions are necessary to obtain high yield of glycolipids, for example, nitrogen deficiency causes a burst of glycolipids production. The resting cells of this yeast is able to produce large amount of extracellular glycolipids when incubated with vegetable oil or alkanes, in a phosphate buffer or distilled water without any nitrogen source. In a typical experiment nearly 22g/l of glycolipids are formed from 50g of oil by cells corresponding to 10g of dry mass.

Key words

Glycolipid; biosurfactant; resting cells