

文章编号: 1673 - 9620 (2007) 02 - 0023 - 03

生物表面活性剂检测方法的研究^{*}

傅时波, 李尔炆

(江苏工业学院 化学工程系, 江苏 常州 213164)

摘要: 生物表面活性剂的检测方法主要有: 液滴坍塌法、排油圈法和血平板法。由于排油圈法具有简单、快速的特点, 在实验室中常常被应用, 但各批次实验之间由于油膜厚度不同, 导致结果可比性差。研究发现排油圈直径不仅与生物表面活性剂浓度有关, 还与油膜厚度相关。实验数据利用 SAS 8.0 软件进行二元线性回归, 得到预测模型: $Y = -100.05 + 2391.49X_1 + 154.19X_2$, $R^2 = 0.9685$, 得到的预测方程能有效预测表面活性剂浓度的大小, 提高了各批次实验之间结果的可比性。

关键词: 生物表面活性剂; 检测; 排油圈法; 预测方程

中图分类号: Q 939.1

文献标识码: A

Study of Method to Detect Biosurfactant

FU Shi - bo, LI Er - yang

(Department of Chemistry Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213164, China)

Abstract: There are three main methods, drop collapse, oil spreading, and blood agar lysis, to detect biosurfactant production. The oil spreading technique is an easy and quick method. It is frequently applied in the laboratory. However, because the thickness of different test is dissimilar, the results of oil spreading are unable to contrast. The study showed that the curve of the diameter of clear zone was in linear correlation with the concentration of the biosurfactant and the thickness of oil. All data were processed with software SAS 8.0. The gained predicting equation was $Y = -100.05 + 2391.49X_1 + 154.19X_2$, $R^2 = 0.9685$. The gained predicting equation of regression could predict the concentration of biosurfactant. The result commensurability of each set of experiment was enhanced.

Key words: biosurfactant; screening; oil spreading; predicting equation

生物表面活性剂是集亲水基和疏水基结构于一分子内的两亲化合物, 同一般化学合成的表面活性剂一样, 生物表面活性剂具有显著降低表面张力、稳定乳状液、较低的临界胶束浓度等特点; 此外, 还具有可生物降解、无毒或低毒、不致敏、可消化等优点。近些年来, 随着人们对环境保护意识的增强, 环境治理力度的加大, 生物表面活性剂的开发和应用倍受重视, 在石油开采、环境治理、食

品工业、造纸工业、生物医药等领域应用越来越广泛, 而且逐渐向其它领域渗透^[1]。

在分离筛选表面活性剂产生菌的过程中, 生物表面活性剂产量的检测非常重要。目前, 表面活性剂的检测方法主要有: 液滴坍塌法、排油圈法和血平板法。血平板法的缺点是, 如果血平板制作不好则不易发现溶血圈, 直接影响到实验结果的观察。另外, 该方法也不能用于需要烃类物质才产生表面

* 收稿日期: 2006 - 09 - 25

作者简介: 傅时波 (1981 -), 男, 浙江温州人, 硕士研究生; 联系人: 李尔炆。

活性剂的微生物的筛选, 因为烃类物质能与血细胞发生反应, 而影响筛选结果, 而且溶血活性也可能与微生物存在溶血酶有关, 而不是因为微生物产生了生物表面活性剂^[2]。液滴坍塌法, 虽然精度较高, 但操作繁琐, 且不宜检测低剂量表面活性剂^[3,4]。长江大学张凡等^[5]研究的排油圈法, 在 $500 \sim 3\,000 \text{ mg L}^{-1}$ 表面活性剂的范围内可以检测。本研究欲解决低浓度表面活性剂产量的检测难题。尤其是在菌种的初筛过程中, 其表面活性剂产量往往比较低。

1 材料与方法

1.1 材料

液体石蜡; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 配成标准样品, 质量浓度分别为 0、50、100、150、200、250、300 mg L^{-1} 。

1.2 排油圈法

在一个玻璃平皿 ($D = 9 \text{ cm}$) 中加入 20 mL 的蒸馏水, 然后加入 1 mL 的液体石蜡, 待液体石蜡均匀分布于水面上后, 在石蜡油膜的中央加入 10 μL 标准样品, 进行排油圈直径测定, 实验在室温 ($t = 25^\circ\text{C}$) 下进行。

在 6 个平皿上分别进行排油圈实验, 结果如下 (见表 1)。

表 1 排油圈实验结果

Table 1 Results of oil spreading tests

(SDS) / (mg/L)	油膜直径/cm					
	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
0	0	0	0	0	0	0
50	0.2	0.3	0.35	0.4	0.5	0.6
100	0.7	0.8	0.85	0.9	1.0	1.1
150	1.0	1.1	1.20	1.3	1.4	1.5
200	1.3	1.4	1.50	1.6	1.7	1.8
250	1.5	1.6	1.65	1.7	1.8	1.9
300	1.8	1.9	2.00	2.1	2.2	2.3

1.3 统计学处理

实验数据用 Statistical Analysis System (SAS) 软件进行回归分析^[6,7], 建立表面活性剂浓度与油膜厚度及排油圈直径关系的预测模型。

2 结果与分析

2.1 不同油膜直径, 油膜厚度的计算公式

每次排油圈实验, 加入的石蜡油体积均为

1 mL, 但是不同实验中, 油膜稳定后所形成的直径大小并不稳定, 时大时小, 这样就导致油膜的厚度不稳定。由表 1 可见, 相同质量浓度的表面活性剂在不同直径的油膜上所形成的排油圈直径差别较大。而国内外研究通常仅考虑排油圈直径与表面活性剂浓度呈线性相关^[4,5]。本实验欲研究油膜厚度的影响。油膜可视为一个椭圆绕 Y 轴旋转一周而成的旋转体, 其侧面图如图 1 所示。

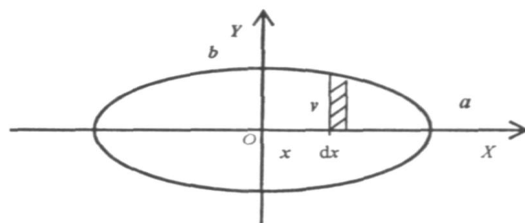


图 1 油膜侧面图

Fig. 1 Side view of velum of oil

根据图 1 所示, 得出油膜体积的积分公式:

$$V = 2 \int_0^a x \cdot y \, dx \quad (1)$$

椭圆公式:

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1 \quad (2)$$

根据公式 (1)、(2) 可以得到:

$$\begin{aligned} V &= 2 \int_0^a x \cdot b \sqrt{1 - \frac{x^2}{a^2}} \, dx = \\ &= 2b \int_0^a \sqrt{1 - \frac{x^2}{a^2}} \, dx = \\ &= 2ba^2 \int_0^1 \sqrt{1 - u^2} \, du \left(u = \frac{x}{a} \right) = \\ &= \frac{4}{3} ba^2 \left[1 - \frac{x^2}{a^2} \right]^{\frac{3}{2}} \bigg|_0^a = \frac{4}{3} b \cdot a^2 \quad (3) \end{aligned}$$

当 $a = b$ 时, 即为正常的球体, 公式 (3) 就可化为: $V = \frac{4}{3} a^3$, 与球的体积公式相符。

根据公式 (3) 得出:

$$b = \frac{3V}{4a^2} \quad (4)$$

式中: a - 表示油膜半径, cm; b - 表示油膜中心厚度的一半, cm; V - 表示石蜡油体积, cm^3 。

根据公式 (4) 可以计算出 b 的值。

2.2 回归预测模型

将表 1 中的数据按公式 (4) 转换得到的实验数据输入电脑, 利用 SAS 软件分析, 以生物表面活性剂浓度 (Y) 为因变量, 以油膜厚度的一半

(X_1) 和排油圈直径 (X_2) 为自变量建立回归方程, 得到的回归方程为: $Y = -100.05 + 2391.49 X_1 + 154.19 X_2$; 决定系数: $R^2 = 0.9685$, $P < 0.001$, 表明该模型回归效果较好, 各回归系数达到极显著水平。

2.3 回归方程的验证

根据预测模型计算出的预测值与实际值比较后

表 2 表面活性剂浓度 (SDS) 的回归模型预测值与实际值比较

Table 2 Comparison of the concentration of SDS between real and predicted value by regression model					
实际值/ (mg L^{-1})	油膜直径/cm	油膜厚度一半/cm	排油圈直径/cm	预测值/ (mg L^{-1})	误差
100	5.5	0.031 57	0.8	98.9	0.011 0
110	7.5	0.016 99	1.1	110.2	- 0.001 8
150	6.5	0.022 60	1.3	154.5	- 0.030 0
165	7.8	0.015 70	1.5	168.8	- 0.023 0
200	6.5	0.022 60	1.6	200.7	- 0.003 5
220	7.5	0.016 99	1.8	218.1	0.008 6
250	6.0	0.026 53	1.8	241.0	0.036 0
300	5.5	0.031 57	2.1	299.3	0.023 0

表 3 相同表面活性剂浓度 (SDS) 下的回归模型预测值与实际值比较

Table 3 Comparison of the fixed concentration of SDS between real and predicted value by regression model					
实际值/ (mg L^{-1})	油膜直径/cm	油膜厚度一半/cm	排油圈直径/cm	预测值/ (mg L^{-1})	误差
100	5.5	0.031 57	0.80	98.9	0.011
100	6.0	0.026 54	0.90	102.2	- 0.022
100	6.5	0.022 60	0.95	100.5	- 0.005
100	7.0	0.019 49	1.00	100.8	- 0.008
100	7.2	0.018 43	1.00	98.2	0.018
100	7.5	0.016 99	1.05	102.5	- 0.025

3 结 论

排油圈法是检测表面活性剂的主要方法之一, 操作简单, 结果准确。研究发现: 排油圈实验, 每次形成的油膜直径不等, 所以油膜厚度不同; 油膜体积相同时, 不同油膜厚度对表面活性剂形成的排油圈大小有明显的影响; 预测模型使得在不同油膜厚度下的排油圈实验结果具有可比性; 相同质量浓度表面活性剂 (100 mg L^{-1}) 的测定误差在 $-0.025 \sim 0.018$ 之间。

此预测模型是在直径为 9 cm 的平皿中加入 20 mL 蒸馏水与 1 mL 石蜡油的体系中得出的, 并且其适用范围是 $50 \sim 300 \text{ mg L}^{-1}$ 低质量浓度的表面活性剂检测。若表面活性剂质量浓度超出该体系的检测范围, 可以根据本研究的方法设计出适合高质量浓度表面活性剂的检测体系, 如可以增加或减少石蜡油的体积来改变检测范围, 使得欲检测的表面活性剂质量浓度落在该范围之内, 可以提高精度。说明本研究方法具有实际参考价值。并且本实

验发现, 预测值与实际值之间的差异很小。在表面活性剂浓度相差 10 % 下, 通过预测方程能够被区分开来 (表 2); 相同质量浓度的表面活性剂在不同油膜厚度条件下, 通过预测方程计算, 其误差也很小 (表 3)。结果说明, 该模型对预测表面活性剂浓度大小是有效的。

验在室温 ($t = 25$) 下进行, 室温变化所造成的影响有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 左晶, 王学川. 生物表面活性剂的应用 [J]. 化学工业与工程技术, 2005, 26 (2): 23 - 26.

[2] Mulligan C N, Cooper D G, Neufeld R J. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons [J]. Ferment Technol, 1984, 62: 311 - 314.

[3] Jain D K, Collins - Thompson D L, Lee H, et al. A drop - collapsing test for screening surfactant - producing microorganisms [J]. Microbiol Methods, 1991, 13: 271 - 279.

[4] Noha H Y, Kathleen E D, David P N, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms [J]. Microbiol Methods, 2004, 56: 339 - 347.

[5] 张凡, 余跃惠. 排油圈法对生物表面活性剂的定性定量 [J]. 化学工程师, 2005, 112 (1): 14 - 16.

[6] 朱军. 线性模型分析原理 [M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999.

[7] 洪楠, 侯军. SAS for windows 统计分析系统教程 [M]. 第一版. 北京: 电子工业出版社, 2001.