

鼠李糖脂生物表面活性剂的研究进展*

吴虹 汪薇 韩双艳

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640)

摘要: 鼠李糖脂是一种重要的生物表面活性剂。综述了鼠李糖脂生物表面活性剂的化学结构、特性、生理学功能及其发酵生产, 特别讨论了利用廉价原料——工农业的废物, 如植物油废渣等来生产鼠李糖脂, 其不仅可降低生产成本, 还能减少工农业废渣对环境的污染, 降低其处理费用。

关键词: 生物表面活性剂, 鼠李糖脂, 铜绿假单胞菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0148-05

Recent Progress on Rhamnolipid Biosurfactant*

WU Hong WANG Wei HAN Shuang-Yan

(College of Biological Sciences and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract: Rhamnolipid, an important biosurfactant, is reviewed with respect to chemical structure, properties, physiological role and their fermentation production, especially focusing on the production with inexpensive raw materials, such as vegetable oils and residues from agro-industrial wastes. This can not only reduce the production costs, but also contribute to the reduction of environmental impact generated by the discard of residues, and the treatment costs.

Key words: Biosurfactant, Rhamnolipid, *Pseudomonas aeruginosa*

生物表面活性剂是一种由微生物合成的、结构多样的表面活性物质, 包括糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂以及中性脂质衍生物等。目前, 市场上大部分表面活性剂都是化学合成的, 然而, 使用化学表面活性剂会产生严重的环境污染问题。生物表面活性剂毒性低、可生物降解, 生物相容性好^[1]。因此, 近年来, 环境友好的生物表面活性剂的生产和使用日益受到人们的广泛关注。据估计, 到2010年, 生物表面活性剂将会占领市场10%的份额, 销售额达两亿美元^[2]。

许多微生物都能产生生物表面活性剂。目前, 国内外研究较多的是由假单胞菌产生的鼠李糖脂, 它是一类非常重要的生物表面活性剂, 不仅具有乳化、增溶、降低表/界面张力等功能, 而且毒性小、易于生物降解, 因而在石油开采、医药、食品、日化及环境保护等许多领域具有极大的应用潜力。目前, 限制鼠李糖脂在工业上广泛应用的

主要因素是其过高的生产成本, 而寻找价格低廉、来源广泛的原料作为微生物发酵生产鼠李糖脂的培养基, 可有效降低其生产成本。

1 鼠李糖脂的结构和特性

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 可利用不同碳源生成鼠李糖脂。图1为鼠李糖脂的化学结构通式, 其亲水基团一般由1~2分子的鼠李糖构成, 憎水基团则由1~2分子具有不同碳链长度的饱和或不饱和脂肪酸构成。在生物合成过程中, 这些基团之间可能相互链接而生成多种化学结构相近的同系物。研究表明, 发酵产物中一般含有4种主要的鼠李糖脂, 它们分别是 RL1 (Rha₂ C₁₀ C₁₀), RL2 (RhaC₁₀ C₁₀), RL3 (Rha₂ C₁₀) 和 RL4 (RhaC₁₀) (表1)。其中, Rha₂ C₁₀ C₁₀ 的化学名为2-O- α -L-吡喃鼠李糖基- α -L-吡喃鼠李糖基- β -羟基癸酰- β -羟基癸酸, 又称双鼠李糖脂; RhaC₁₀

* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 05006571)

通讯作者 Tel: 020-22236669, E-mail: bbbwu@scut.edu.cn

收稿日期: 2006-03-03, 修回日期: 2006-05-07

C₁₀ 为 α-L-吡喃鼠李糖苷-β-羟基癸酰-β-羟基癸酸, 又称单鼠李糖脂。随着 LC-MS 等现代分析手段的应用, 发酵产物中大量不同的鼠李糖族同系物被发现。Deziel 等^[3] 在 *P. aeruginosa* 57RP 的发酵液中检测到 28 种不同的鼠李糖脂化合物, 它们分别连着不同的脂肪酸链, 如 C₈、C₁₀ 和 C₁₂, 有的甚至含有不饱和脂肪酸链如 C_{12,1} 等, 鼠李糖环也各异。国内的梁生康等在铜绿假单胞菌 O-2-2 以正十八烷为碳源的发酵产物中共检出 21 种鼠李糖脂的同系物, 都由 1~2 分子的鼠李糖和 1~2 个含 β-羟基的碳链长度为 8~12 的饱和或不饱和脂肪酸构成^[4]。

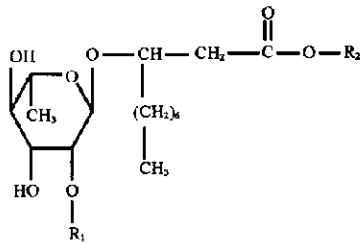


图 1 鼠李糖脂的化学结构通式

表 1 4 种主要鼠李糖脂同系物

鼠李糖脂的类型	R ₁	R ₂	名称
Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	L-α-rhamnopyranosyl	β-羟基癸酸	RL1
RhaC ₁₀ C ₁₀	H	β-羟基癸酸	RL2
Rha ₂ C ₁₀	L-α-rhamnopyranosyl	H	RL3
RhaC ₁₀	H	H	RL4

研究表明, 当 *P. aeruginosa* 在液体培养基中培养时, 主要产生两种形式的鼠李糖脂, 即单鼠李糖脂 RhaC₁₀C₁₀ 和双鼠李糖脂 Rha₂C₁₀C₁₀。*P. aeruginosa* 57B1 在含 14 到 17 个碳烷烃培养基中主要生成双鼠李糖脂 Rha₂C₁₀C₁₀, 而 *P. aeruginosa* KY4025 在正烷烃中培养时则主要生成单鼠李糖脂 RhaC₁₀C₁₀。当 *Pseudomonas* sp. DSM 2847 休止细胞在正烷烃于 37℃ 培养时, 其代谢物中除 RhaC₁₀C₁₀ 和 Rha₂C₁₀C₁₀ 外, 还同时含有 RhaC₁₀ 和 Rha₂C₁₀^[2]。一般地, 培养液中其他不同碳链长度的鼠李糖脂同系物只占产物中的一小部分。

鼠李糖脂是一种阴离子表面活性剂, 它们不仅溶于甲醇、氯仿和乙醚, 在碱性水溶液中也表现出良好的溶解特性。然而鼠李糖脂最突出的特性是它的表面活性, 如能显著降低水的表面张力,

改变固体表面的润湿性, 具有乳化、破乳、消泡、洗涤、分散与絮凝、抗静电和润滑等多种功能。

一般地, 鼠李糖脂表面活性剂能使水的表面张力从 72 mN/m 降至 30 mN/m 左右, 使油水界面张力从 43 mN/m 降低至 1 mN/m 左右。在不同组成的培养基及培养条件下, 不同菌株生产得到的鼠李糖脂各同系物组成及含量均各异, 因此表面性质也各有差别。双鼠李糖脂 Rha₂C₁₀C₁₀ 表现出的临界胶束浓度 (CMC, 5 mg/L) 低于单鼠李糖脂 RhaC₁₀C₁₀ 的临界胶束浓度 (40 mg/L), 而亲水性更强的鼠李糖脂 RhaC₁₀ 和 Rha₂C₁₀ 的 CMC 则为 200 mg/L^[5]。Haba 等^[6] 报道了一种含有 18.95% 不饱和和疏水碳链 C_{12,1} 和 C_{14,1} 的鼠李糖脂混合物的 CMC 值为 108 mg/L, 大大高于其相应饱和化合物的 CMC 值, 表明鼠李糖脂的不饱和度与其临界胶束浓度 CMC 相关。相类似地, Benincasa 等^[7] 在含 31% 不饱和脂肪酸的鼠李糖脂混合物中测得的 CMC 值为 120 mg/L。富含 Rha₂C₁₀C₁₂ 和 Rha₂C₁₀C_{12,1} 的表面活性剂比高含量 Rha₂C₁₀C₁₀ 的表面活性剂具有更低的临界胶束浓度 (分别为 37 mg/L 和 53 mg/L) 及更高的表面张力 (分别为 36mN/m 和 31 mN/m), 这可能是由于长链脂肪酸增大了分子的疏水性, 导致其在更低的浓度下聚集成胶束。鼠李糖脂同系物的组成、比例、不饱和键的多少、烷基链的长度以及亲水基团的大小都能影响它们的表面活性。如果能弄清每种鼠李糖脂同系物对其表面性质的影响, 就有可能获得所需性质的鼠李糖脂产物。

鼠李糖脂不仅能乳化碳氢化合物, 而且还能稳定其乳化体系。Haba 等^[6] 发现不同的铜绿假单胞菌上层培养液均能乳化煤油, 并使其稳定保持 3 个月。研究表明, 鼠李糖脂能稳定长链烷烃化合物、芳香族化合物、天然油脂、煤油、椰子油和橄榄油的乳化液, 24 h 之后仅丧失 5%~25% 的稳定性。

鼠李糖脂的另外一个重要特性是它的抗菌性。已经报道有好几种鼠李糖脂混合物具有抗菌和抗真菌的效果^[6,7]。此外, 鼠李糖脂还能有效控制植物 *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* 和 *Plasmopara lactucae-radices* 以及有害的海藻花类 *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum dentatum* 和

Gymnodinium sp. 病原体孢子的扩散^[8]。这些生物特性的深入研究将会带领鼠李糖脂进入高附加值的产业。

2 鼠李糖脂的生理学功能

鼠李糖脂在微生物细胞中有着多种不同的功能。一般地, 由于它能降低界面的表面张力, 使底物更容易被利用和代谢, 因此, 其作为表面活性剂的主要作用是使微生物能在水不溶性底物中生长。生物表面活性剂不仅能乳化碳源, 还能使微生物细胞粘附到烃类上。可降解烃类的微生物细胞被吸附到水不溶性底物上, 分泌表面活性物质, 使之能利用该碳源生长。

鼠李糖脂表面活性剂能使细胞表面变得更加疏水, 增加细胞与微溶性底物之间的直接物理作用。研究发现鼠李糖脂不仅能显著增加烃类化合物的溶解度, 还能改变细胞表面的性质, 增加它的疏水性。导致假单胞菌细胞表面疏水性增加的机理可能是由于细胞膜脂多糖以鼠李糖脂的形式释放出来, 甚至当鼠李糖脂在较低的浓度时(低于CMC)。生物表面活性剂的其他功能还包括它们与微生物发病机制的关系、抗菌活性、微生物对界面的吸附和解吸的调控、结合重金属以及生物膜的形成等^[2]。

3 鼠李糖脂的发酵生产

鼠李糖脂的生产一般采用发酵法, 其中包括生长细胞法, 代谢控制的细胞生长法, 休止细胞法和加入前体法^[9]。生长细胞法是底物的消耗、细胞的生长、表面活性剂的生成同步进行的一种方法, 其优点是底物的存在诱导细胞体内产生大量的酶, 从而提高细菌的转化活力, 但发酵过程易被杂菌污染, 而且还要求底物对细胞的生长不能有抑制作用。代谢控制的细胞生长法是通过限制一种或几种培养基成分以获得较高产率, 通常限制培养基中的氮源和多价离子可使细胞在稳态期产生过量的鼠李糖脂; 休止细胞法首先将正在培养的、处于生长期的细胞通过离心或过滤的方式从培养液中分离出来, 悬浮在缓冲液中保持其活性或进行固定化, 再加入底物进行转化合成表面活性剂, 该法由于细胞的生长和底物的转化在不同的条件下进行, 副产物较少, 分离提纯较容

易, 可降低产物的回收成本, 而且采用固定化细胞进行转化可以提高其操作稳定性和在反应器中进行连续化生产; 加入前体法是向培养基中加入表面活性剂的前体, 诱导微生物发酵产生表面活性剂, 其优点是可以刺激细胞产生鼠李糖脂。常用的发酵方法是代谢控制法和休止细胞法, 而发酵法的关键是首先筛选出性能优良的高产菌株, 然后再进行培养条件的优化来提高产量、降低成本。

3.1 碳源 研究发现生物表面活性剂能由烃类物质和疏水性底物来诱导产生, 因此, 一般地, 疏水性碳源比亲水性碳源更适合生产鼠李糖脂。当 *P. aeruginosa* UC2 在疏水性底物如玉米油、猪油、长链醇中生长时, 鼠李糖脂产率为 100 ~ 165 mg/g 底物, 而当以亲水性物质, 如葡萄糖、琥珀酸为底物时, 鼠李糖脂产率仅为 12 ~ 36 mg/g 底物^[2]。沈薇等^[10]在优化 *Pseudomonas aeruginosa* BS-03 的突变株 LY4 生产鼠李糖脂的发酵条件时发现, 在所采用的五种碳源(柴油、液体石蜡、植物油、甘油、葡萄糖)中, 6% 植物油为最适宜的碳源, 鼠李糖脂的产量最高。

3.2 氮源 氮源在由微生物生产生物表面活性剂的过程中起到非常重要的作用。限制氮源不仅可以调节鼠李糖脂的产量, 而且对产物中鼠李糖脂的组成也有影响。在 *Pseudomonas* sp. DSM 2874 的培养过程中, 如果先对生长细胞限制氮源, 后添加硝酸钠作为氮源, 就可以观察到鼠李糖脂生成。而如果在该菌的休止细胞培养液中加入各种氮源, 则会减少鼠李糖脂的产量, 同时, 粗产物中鼠李糖脂的组成亦会随着限制的氮源而改变。*P. aeruginosa* DSM 2659 在 C/N 控制于 16/1 ~ 18/1 时, 鼠李糖脂的产量最大, 而当 C/N 低于 11/1 时, 未观察到鼠李糖脂的合成。当 *P. aeruginosa* 44T1 在橄榄油中培养时, 硝酸盐是最好的氮源, 最利于鼠李糖脂的合成。大多数报道表明, 鼠李糖脂的生产一般采用硝酸钠做为氮源。

3.3 多价离子 限制多价阳离子能诱导产生过量的生物表面活性剂。当以 *P. aeruginosa* DSM 2659 生产鼠李糖脂时, 如果限制 Mg、Ca、K、Na 和其他微量元素的盐的浓度, 可以获得更高的产率。研究表明限制铁离子的含量同样能获得鼠李糖脂的过量生产。当 *P. aeruginosa* ATCC 10145 在限制

氮源的条件培养时,如果限制磷的含量,鼠李糖脂的产量比仅仅限制氮源提高 4~5 倍^[11]。

3.4 其他影响因素 环境因素和生长条件,如温度、pH、搅拌和供氧率都会影响生物表面活性剂的生产。*Pseudomonas* sp. 生产鼠李糖脂的最佳 pH 值范围为 6.0~6.5,当 pH 高于 7.0 时,产量迅速减少。*P. aeruginosa* UG2 在中性条件鼠李糖脂的产量较酸性条件下高。假单胞菌在 25℃~40℃ 范围内均能产鼠李糖脂,但最适温度为 35℃~37℃。当以葡萄糖为底物时,*P. aeruginosa* 44T1 生产鼠李糖脂的最适温度为 37℃。*Pseudomonas* sp. DSM 2874 在正烷烃上生长时,不同的培养温度会影响产物鼠李糖脂粗产品中所含 4 种化合物的组成比例。*Pseudomonas* sp. DSM 2874 的休止细胞在菜籽油中分批补料培养时,产物鼠李糖脂的成分和培养过程的条件紧密相连,最高产量可达 45 g/L^[12]。

总的说来,鼠李糖脂表面活性剂产生的类型、质量和数量主要受到碳源、培养基中氮源及离子浓度、培养条件(如 pH、温度、通风量、发酵方式)以及所选择的菌种的影响。因此,在鼠李糖脂的生产过程中必须通盘考虑以上因素的影响。

4 用廉价原料生产鼠李糖脂

目前,为了扩大微生物表面活性剂的应用范围,必须降低其生产成本。采用可替代的低成本底物生产是降低成本的一个重要途径。工农业废物及城市垃圾中含有高含量的碳水化合物和油脂,可以满足鼠李糖脂生产的需要,因此,可以其为培养基来生产鼠李糖脂。这些原料的优点是来源广泛,价格便宜,而且为生产厂家减轻处理污染的经济负担。但在利用工农业废物作为底物时,需要平衡其碳水化合物和油脂含量以提供细胞生长的最适条件。

每年食用油的生产过程中产生大量的废渣,包括残留的动植物油脂、皂角等,这些物质是鼠李糖脂生产中最常用的低成本原料。橄榄油厂的污水(OOME)是地中海地区国家的一种主要农业污染物,它是一种黑色液体,其中含有高浓度的有价值的有机化合物,如糖、氮化合物、胶质、多酚和残留油脂。研究发现 *P. aeruginos* IAMM 可利用 OOME 来生产鼠李糖脂,仅需在 OOME 中添加 2.5 g/L 的硝酸钠作为氮源,表面活性张力有明

显的下降,从 42 mN/m 降到 30 mN/m。此外,植物油生产过程中的皂角也可以作为生产鼠李糖脂的底物。当以葵花籽油皂角作为 *P. aeruginosa* LBI 生产鼠李糖脂的碳源时,摇瓶培养中的鼠李糖脂产量为 12 g/L,而在生物反应器中的产量可达到 16 g/L^[13]。*P. aeruginosa* AT10 可利用大豆油炼油厂的污水生产鼠李糖脂,最终产率可达 9.5 g/L。生产分两个阶段进行,第一阶段,产生了 3.54 g/L 的鼠李糖脂,单位体积生产力为 0.06 g/L/h。在第二个阶段,生产力增加了 0.22 g/L/h,且大部分产物分泌到培养基中(5.64 g/L)。

酿酒厂废水和乳清废水也可以用来生产鼠李糖脂。Dubey 和 Juwarkar^[14]报道了 *P. aeruginosa* BS2 利用合成培养基和工业废物如酿酒厂废水和乳清废水来生产生物表面活性剂。研究发现这些废水都是 *P. aeruginosa* BS2 生长和繁殖的良好底物。经过 96 h 的培养,酿酒厂废水和乳清废水中的鼠李糖脂最大产量分别为 0.9 g/L 和 0.92 g/L。由于大肠杆菌能利用乳糖,可将大肠杆菌的乳糖基因 Lac ZY 克隆到 *P. aeruginosa* PAO-1 和 PG-201 中,这样它们就能在含有乳糖的培养基和乳清中生长,降低其表面张力并累积鼠李糖脂。

Rahman 等^[15]考察了能够产生生物表面活性剂和降解原油的细菌在油污染环境中的分配。结果表明,碳氢化合物的污染点是这种细菌的潜在来源。*P. aeruginosa* sp. DS10-129 以甘油和葡萄糖为碳源,鼠李糖脂的最大产量为 7.5 g/L,表面张力从 68 mN/m 降低到 29.4 mN/m,该菌株在原油中也能良好地生长。

5 展望

尽管鼠李糖脂的大规模生产已经实现^[2],为了促进其广泛应用,今后仍需进一步研究以新的可替代廉价原料为底物,降低成本,生产对环境低毒性以及具有很好表面活性的产品。利用工农业废物作为底物是一种环境友好的选择,它不仅能降低治理环境污染的成本,还能增加这些废物的经济价值,具有很好的发展前途。很多廉价的碳源,如植物油生产中的废渣都已被利用,但由于废物的组成变化大,甚至存在干扰生产的物质,因此,使用这些废物为原料在生产方法和分析检

测过程中产生了新的问题, 必须结合多门学科, 包括化学、生物学以及工程技术等来解决这些问题。此外, 对鼠李糖脂进行结构修饰, 生产符合特定需求、具有特殊性质的高附加值鼠李糖脂分子, 扩大鼠李糖脂表面活性剂的潜在用途也是今后研究努力的方向。

参考文献

- [1] 时进钢, 袁兴中, 曾光明, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (1): 68 ~ 72.
- [2] Nitschke M, Costa S G V A O, Contiero J. Biotechnol Prog, 2005, 21: 1593 ~ 1600.
- [3] Deziel E, Lepine F, Milot S, et al. Biochim Biophys Acta, 2000, 1485: 145 ~ 152.
- [4] 梁生康, 王修林, 陆金仁, 等. 精细化工, 2005, 22 (7): 499 ~ 502.
- [5] Rahman K S M, Rahman T J, McClean S, et al. Biotechnol Prog, 2002, 18: 1277 ~ 1281.
- [6] Haba E, Abalos A, Jauregui O, et al. J Surfactants Deterg, 2003, 6: 155 ~ 161.
- [7] Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, et al. Antonie van Leeuwenhoek, 2004, 85: 1 ~ 8.
- [8] Wang X, Gong L, Liang S, et al. Harmful Algae, 2005, 4: 433 ~ 443.
- [9] 李祖义, 杨勤萍. 表面活性剂, 2002, 15: 6 ~ 8.
- [10] 沈薇, 杨树林, 宁长发, 等. 食品与发酵工业, 2004, 30 (12): 26 ~ 30.
- [11] Chayabutra C, Wu J, Ju L K. Biotechnol Bioeng, 2001, 72: 25 ~ 33.
- [12] Trummer K, Effenberger F, Syldatk C. Eur J Lipid Sci Technol, 2003, 105: 563 ~ 571.
- [13] Benincasa M, Contiero J, Manresa A, et al. J Food Eng, 2002, 54: 283 ~ 288.
- [14] Dubey K, Juwakar A. World J Microbiol Biotechnol, 2001, 17: 61 ~ 69.
- [15] Rahman K S M, Rahman T J. Acta Biotechnol, 2003, 23: 335 ~ 345.

• 科技信息 •

探寻黄金的微生物技术

黄金係有色金属物, 170 多元/克。蕴藏在含硫化矿物的岩石中, 分布非常广泛, 在海域中, 也有在金矿场的矿渣、尾矿及矿液中有残留, 甚至在某些植物或昆虫组织中也有存在, 不过其含量甚微。就地壳物质而言, 平均每吨含黄金量只有 0.0001 盎司 (1 金盎司 = 31.1035g), 这样含量稀少的黄金要找到它, 就像是“大海捞针”之难, 而微生物技术的应用可打开探寻黄金便利之门。(1) 一种蜡状杆菌 (*Bacillus cereus*) 对黄金有特殊的敏感性和结合力, 研究者把它形容为有敏感“嗅觉”之功能。如果将这种细菌作为一种“指示菌”探寻黄金矿床或黄金物是可行的话, 那只要观察该菌的分布、增殖以及与黄金发生颜色反应则可是否有黄金作为判断, 应该说, 这种细菌方法有一定参考价值。(2) 新发现一种细菌即 *Ralstonia methallidurans*, 对金块形成和土壤金沙检测有一定价值。T. Reith 及其同事在澳大利亚金沙、金块的形成找到与该菌有密切关系的有力证据。发现该菌胞内有金积累, 该菌胞膜外“镀”一层金。这充分表明: ①黄金形成与该菌密切相关, 从金矿样品中可以看出, 80% 的金矿粒都有该菌存在, 它促进黄金形成; ②这种菌对黄金有良好吸附作用和很强的亲和力, 为提取黄金带来便利条件; ③该菌对黄金有很好沉降作用, 有利于提金, 对环境的净化和解毒作用 (注: 浓度较高重金属对人、生物都有害)。然而, 该菌对黄金形成和代谢机理需做进一步探究。现代生物技术有效运用对提高菌种对黄金高亲和力、吸附力和代谢活力可能发挥重要作用。

柯 为