

专论与综述

生物表面活性剂对微生物生长和代谢的影响

钱欣平¹ 阳永荣 孟 琴

(浙江大学联合化学反应工程研究所 杭州 310027)

摘要: 综述了生物表面活性剂在微生物生长和代谢过程中的影响。根据其分子结构特征,系统分析了生物表面活性剂通过与难溶底物和微生物细胞之间的相互作用促进烷烃摄取的机理,利用该机理可以合理解释生理现象。生物表面活性剂还在参与细胞代谢活动的过程中发挥特殊功能。

关键词: 生物表面活性剂, 糖脂, 鼠李糖脂, 烃类发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0075-04

生物表面活性剂是生物(主要是微生物)生成的低分子量表面活性剂,包括糖脂、多糖脂、脂肽、脂蛋白以及中性类脂衍生物等。它们的分子结构由两部分组成,一部分是疏油亲水的极性基团,如单糖、聚糖、氨基酸、肽和磷酸基等,另一部分是由疏水亲油的碳氢链组成的非极性基团,如饱和或非饱和的脂肪醇及脂肪酸等。正是由于具有这种既亲油又亲水的两亲性分子结构,生物表面活性剂才能具有分散、加溶、润湿、渗透等性能,但它们的生理功能还不是很清楚^[1]。

虽然大多数的生物表面活性剂被看作是次级代谢产物,但它们对微生物的生长却具有重要作用。例如,烃类的难溶性使得摄取烃类的微生物在生长过程中往往伴随着生物表面活性剂的生成,它们的作用主要是使烃类在水溶液中有效扩散,并渗入细胞内部被同化分解。另一方面,生物表面活性剂可以通过调节细胞表面的疏水性能来影响微生物细胞与烃类之间的亲和力。除此之外,很多生物表面活性剂具有杀菌活性,并在细菌滑动穿越界面的活动中以及适应恶劣环境的代谢过程中发挥特殊作用。几乎所有这些生物功能均与它们的两亲性分子特征相关。

1 促进难溶底物的分散与吸收

烃降解酶往往嵌入于细胞质膜中或存在于细胞内,烃类底物必须通过外层亲水细胞壁进入细胞内,才能被烃降解酶作用。因此,烃的疏水性是限制烃被摄取的主要因素,而生物表面活性剂的作用正是促使烃被动扩散进入细胞内部。

生物表面活性剂促进烃吸收的作用在许多实验中均得到证实^[2]。例如,1, 500mg/L的十八烷烃在300mg/L鼠李糖脂的作用下,扩散浓度提高了4个数量级,使20%的十八烷烃在84h内被*P. areuginosa*降解,而在没有鼠李糖脂存在的情况下,仅有5%的十八烷烃被利用。另外,*P. areuginosa*的一株缺陷型菌株无法利用石蜡进行生长,合成的鼠李糖脂明显较少,但加入少量鼠李糖脂可以修复它利用石蜡的能力。

实验发现^[3],低浓度的鼠李糖脂促进十八烷烃扩散的能力明显优于高浓度的鼠李糖脂。研究鼠李糖脂浓度与十六烷烃生物降解速率的关系曲线,结果在1~50 mg/L范

围内与 50 ~ 500 mg/L 范围内, 呈现出两种不同的线性关系, 在较低的浓度范围内, 十八烷烃可以被更快地利用。分析认为^[4], 生物表面活性剂可以通过两种途径来提高有机物的生物可利用率。一种途径在较低浓度下, 显著降低界面张力, 使烷烃得以有效扩散, 增大油/水界面面积, 从而便于细胞与较大油滴之间的直接接触。另一种途径是利用表面活性剂的增溶作用, 即当活性剂浓度大于临界胶束浓度 (CMC) 时, 自由单体浓度不再增加, 而是形成胶团, 将有机物分子加溶在胶团中, 然后被细胞吸收并降解。表面活性剂的浓度进一步增加时, 溶液的表面张力几乎不再下降, 而溶液中的胶团数目和尺寸却随之增加。表面活性剂的浓度越大, 胶团形成得越多, 难溶物也就溶解得越多。另外, 微生物在烃类培养基中生长时, 细胞结构明显不同^[5]: 胞内发生烷烃的累积, 在它们的外面有一层特殊的膜状复合物; 细胞的外表面变得不规整, 出现褶皱。根据以上事实推测, 在生物表面活性剂的作用下, 细胞壁的外表面出现一种特殊的吸收系统, 将加溶了难溶底物的胶团直接运至与膜结合的酶系统或运入细胞内部。

生物表面活性剂胶团加溶难溶有机物的现象十分复杂, 在不同条件下可以形成多种胶团结构, 胶团的大小与形状主要取决于表面活性剂的分子结构与浓度^[6]。疏水基碳原子数的增加将导致表面活性剂的亲油性增加, 在水溶液中的胶团尺寸相应增加, CMC 也下降。在活性剂浓度刚刚超过 CMC 时, 胶团大多呈球状, 极性基处在胶团外壳与水直接接触; 当活性剂在溶液中的浓度为 10 倍于 CMC 或更高时, 从能量角度来讲形成球状是不利的, 这时棒状胶团具有更高的热力学稳定性; 当活性剂的浓度更高时, 就会形成巨大的层状胶团。另一方面, 活性剂分子中亲水头部与疏水尾部的相对大小决定了胶团的形状。头部较大者易形成球状, 头部较小、尾部较短者易形成棒状, 而具有较长尾部的活性剂往往形成胶囊状胶团。

除了表面活性剂本身的性质与浓度之外, 温度、无机盐、离子强度以及 pH 等均可以对 CMC 和胶团性质产生影响, 进而影响烃类的分散及生物降解^[7]。例如, pH 通过影响溶液中表面活性剂的聚集形式来影响烃类的扩散。在 pH7.0, 烷烃被插入胶团粒子中, 烷烃的扩散最充分; 在 pH7.0 ~ 6.0, 表面活性剂形成层状胶团, 烷烃的扩散程度急剧下降; 在 pH6.0 ~ 5.5, 表面活性剂形成胶囊状胶团, 烷烃的扩散程度再次提高。

微生物在生长过程中, 往往生成多种结构型式的表面活性剂, 这可能是微生物适应环境能力的表现^[8]。由于环境对胶团的性质会产生影响, 微生物便通过调节多种活性剂的组成分布, 来保证烷烃得到最大程度的分散。如鼠李糖脂具有脂肪酸型和甲酯型两种存在形式: 脂肪酸型的疏水端含有羰基基团, 它携带的一个负电荷增强了鼠李糖脂和水的作用, 减弱了和烷烃的作用, 因此其水溶性很好, 但在降低界面张力方面不是很有效; 相反, 甲酯型的疏水端多一个碳原子, 形成胶团的尺寸较大, 具有较低的 CMC, 可以产生更低的表面和界面张力。这样微生物就可以通过调节脂肪酸型和甲酯型两种形式鼠李糖脂的浓度, 兼顾水溶性和亲油性两个矛盾, 最大程度地适应各种不同环境。

2 调节细胞表面与难溶底物之间的亲和力

一些菌种合成的生物表面活性剂对其它菌种在烃类培养基中的生长没有影响甚至产生抑制作用; 烷烃的生物降解不仅取决于生物表面活性剂的性质与用量, 还与细胞的性质和浓度密切相关; 理想的分散状况并不总是对应着较高的生物降解速率^[9]。这

些说明生物表面活性剂在微生物摄取烃类的过程中,不仅仅具有分散烃类的能力,还应该从细胞、生物表面活性剂、烃三个方面来分析。

油滴与细胞的直接接触常常是主要的烃吸收机制,而细胞表面的疏水性是决定细胞与烃类液滴接触的关键性质。烷烃的快速降解者具有较高的细胞疏水性,对烃类具有更高的亲和性,可以更加有效地利用烃类。而生物表面活性剂可以提高慢速降解者的细胞疏水性,并直接影响生物降解速率。

生物表面活性剂分子可以利用它们的亲水基或疏水基锚定于微生物细胞表面,将另一端暴露在外面,形成控制细胞表面疏水性或亲水性的调节膜。微生物也可以分泌生物表面活性剂于外部介质中,通过改变吸附界面的特性来调节细胞与界面之间的亲和力。如将疏水界面转换为亲水性质,使其只能与亲水细胞发生相互作用。吸附于界面上的微生物能够通过释放细胞表面的全部或部分表面活性剂来实现脱附,这些表面活性剂将被留在界面上或介质中^[10]。

3 其它生理功能

生物表面活性剂并不一定要在难溶性烷烃诱导作用下才能合成^[2]。例如:*Bacillus subtilis* 只能利用水溶性基质产生生物表面活性剂;而 *T. apicola* 产生的糖脂没有刺激菌种在烃类基质中生长的能力;不能利用十六烷烃生长的缺陷型菌株,当在葡萄糖培养基中生长时,却可以产生两倍数量的鼠李糖脂,而乳化作用在这一培养过程中显然是不必要的。这些现象意味着生物表面活性剂除了可以促进难溶底物的摄取,还有其它生理功能。

生物表面活性剂往往具有抗菌活性。如 Itoh 实验室分离得到的鼠李糖脂具有一定的抗菌、抗病毒和抗枝原体的性能^[11]。这可能仍与它们的两亲性分子特征直接相关。即利用生物表面活性剂溶解异源细胞膜的主要成分来实现杀菌功能,或者通过改变环境的界面性质,使环境更有利于自身的生存。

生物表面活性剂的过量合成往往需要培养基中含有大量的碳源,以及一些限制性条件,如限制性氮源、限制性 Mg^{2+} 等^[12]。从代谢的角度分析,培养基中碳比氮多时,细胞生长将持续到氮源耗尽。当细胞不再生长,需氮的生物合成反应亦不再进行时,碳仍可运入细胞,在细胞中经糖解或烃氧化,发生脂肪酸的累积。但当胞内脂肪酸浓度大于某一极限量时,细胞就不再能忍受其毒性。因此,脂肪酸与糖苷、氨基酸、磷酸基等结合,从而生成了各种生物表面活性剂。也就是说,生物表面活性剂是微生物调节自身代谢过程的一种产物。

以石蜡等烃类作为发酵基质的微生物在限制性生长条件下和代谢转换过程中,生物表面活性剂常常作为碳源和能量的储备物质发生累积,当细胞处于极度饥饿状态时,它们又会被氧化分解^[13]。这类物质包括海藻糖脂、脂肽、脂肪酸等。而且微生物不能利用鼠李糖脂进行生长,但是它在生长后期也会发生降解,具体原因还不清楚。

另一方面,生物表面活性剂对微生物的生长并不总是有利的。在中性环境中,低浓度的阴离子型表面活性剂与烃结合形成的复合物带有负电,它与带负电的细胞壁产生静电排斥,从而强烈抑制细胞与烃的亲合,反而抑制了细菌的生长^[8]。另外,细胞与生物表面活性剂分子长期接触,不仅会对膜结构造成一定的破坏,还将引起膜活性的改变,干扰正常的摄取同化机制。

借助于代谢工程和基因工程的相关知识, 确定具体的生物合成路径将有助于了解生物表面活性剂的生理功能。生物表面活性剂中脂肪酸部分的合成单体或者是乙酰 CoA 或者是烃的氧化中间体, 乙酰 CoA 是关键的综合中间体。在研究鼠李糖脂合成的相关基因时, 利用分子克隆及核苷酸序列分析技术, 首先选育出鼠李糖脂合成的缺陷型菌株, 分离得到鼠李糖脂生物合成的相关基因, 然后将其与野生型菌株的基因实行基因互补。分析发现, 当鼠李糖脂的合成单体 (TDP-鼠李糖和相应的脂肪酸) 在细胞内已经存在时, 鼠李糖脂的最终合成将被鼠李糖苷转移酶所催化。这类酶共有两种, 负责催化四种鼠李糖脂的生成。而鼠李糖苷转移酶由 *rhIAB* 基因编码, 与 *rhIAB* 基因位于同一个操纵子上的 *rhIR* 基因和 *rhII* 基因顺序排列, 负责调控 *rhIAB* 基因的表达。*RhIR* 调控蛋白的活性受细胞密度以及由 *RhII* 蛋白形成的一种自诱导剂的影响。*rhII* 基因缺陷的变异菌株不能合成鼠李糖脂^[14]。

目前, 关于生物表面活性剂合成的分子生物学研究只是处于初期阶段, 进一步的遗传学和酶学研究将有助于详细了解它们生物合成的调控机理, 从而最终确定它们的生理功能。

参 考 文 献

- [1] Lang S, Wullbrandt D. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 22 ~ 32.
- [2] Lin S C. *J Chem Tech Biotechnol*, 1996, **66**: 109 ~ 120.
- [3] Zhang Y, Miller R M. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 3276 ~ 3282.
- [4] Beal R, Betts W B. *J Appl Microbiol*, 2000, **89**: 158 ~ 168.
- [5] Angelova B, Schmauder H P. *J Biotech*, 1999, **67**: 13 ~ 32.
- [6] 徐燕莉. 表面活性剂的功能. 北京: 化学工业出版社, 2000, 48 ~ 54.
- [7] Champion J T, Gilkey J C, Lamparski H, *et al.* *J Col Interf Sci*, 1995, **170**: 569 ~ 574.
- [8] Zhang Y, Miller R M. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 2247 ~ 2251.
- [9] Zhang Y, Miller R M. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 2101 ~ 2106.
- [10] Thomas R N. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 151 ~ 166.
- [11] Itoh A, Honda H, Tomita F, *et al.* *J Antibiot*, 1971, **24**: 855 ~ 859.
- [12] Davis D A, Lynch H C, Varley J. *Enzym Microbial Tech*, 1999, **25**: 322 ~ 329.
- [13] Lillie S H, Pringle J R. *J Bacteriol*, 1980, **43**: 1384 ~ 1394.
- [14] Ochsner U A, Reiser J, Fiechter A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 3503 ~ 3506.