

生物表面活性剂的合成与提取研究进展*

时进钢 袁兴中 曾光明 黄国和 李建兵

(湖南大学环境科学与工程系 长沙 410082)

摘要: 生物表面活性剂 (Biosurfactant) 是由微生物产生的具有高表面活性的生物分子。相对于化学合成的表面活性剂, 生物表面活性剂对生态系统的毒性较低, 且可生物降解。因此, 生物表面活性剂开始应用于环境污染治理的各个方面。文中从生物表面活性剂生产菌的筛选、培养基的优化及生物表面活性剂的提取等方面对近年来生物表面活性剂的研究进展进行了总结, 并对未来的发展方向作了展望。

关键词: 生物表面活性剂, 合成, 提取, 进展

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0068-05

THE BIOSYNTHESIS AND ISOLATION OF BIOSURFACTANT: A REVIEW

SHI Jin-Gang YUAN Xing-Zhong ZENG Guang-Ming HUANG Guo-He LI Jian-Bing

(Dept. of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: Biosurfactant is a high surface-active agent synthesized by microorganism. Compared with chemical surfactant, biosurfactant has a low toxicity to ecological system of Earth. So biosurfactant is gradually applied to many aspects of environmental pollution control. A review is made from several aspects: screening of biosurfactant-producing microorganism, optimization of culture brooth, isolation of biosurfactant et al. In addition, on the foundation of the analysis, several suggestions about the development of biosurfactant are proposed in the end.

Key words: Biosurfactant, Biosynthesis, Isolation, Review

生物表面活性剂主要是由微生物在好氧或厌氧条件下在碳源培养基中生长时产生的。这些碳源可以是碳水化合物、烃类、油、脂肪或者是它们的混合物。生物表面活性剂可分为非离子型和阴离子型, 阳离子型较为少见。像其它表面活性物质一样, 生物表面活性剂由一个或多个亲水性和憎水性基团组成, 亲水基可以是酯、羟基、磷酸盐、或羧酸盐基团、或者是糖基, 憎水基可以是蛋白质或者是含有憎水性支链的缩氨酸。根据生物表面活性剂的结构特点, 可将其分为5类: 糖脂、脂肽、多糖蛋白质络合物、磷脂和脂肪酸或中性脂。

和传统的化学合成的表面活性剂相比, 生物表面活性剂有许多明显的优势: (1) 更强的表面和界面活性; (2) 对热的稳定性; (3) 对离子强度的稳定性; (4) 生物可降解性; (5) 破乳性。

由于这些显著特点, 使生物表面活性剂在一些方面可以逐渐代替化学合成的表面活性剂, 而且应用也越来越广泛。如微生物产生的生物表面活性剂可以增强油类提取 (MEOR); 对于被油污染的海面或土壤, 可加快油类的降解; 对重金属污染的土壤和地

* 国家自然科学基金资助项目 (No.70171055、50179011)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.70171055、50179011)

国家高技术研究发展计划项目 ("863" 项目) (No.2001AA644020)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA644020)

2000年度高等学校优秀青年教学科研奖励计划项目

收稿日期: 2001-05-10, 修回日期: 2001-06-30

下水的修复等^[1,2]。随着人们对环境问题的认识加深,从源头减少污染及治理污染的同时不产生二次污染已经成为人们的共识,因此生物表面活性剂无疑是未来发展的趋势。

1 生物表面活性剂的合成及其生产菌

生物表面活性剂已有 20 多年的发展历史,人们对产生生物表面活性剂的微生物及其产生机理已有了较多的认识。在通过发酵法生产生物表面活性剂的过程中,可以利用不同条件下的微生物细胞生产生物表面活性剂,如细胞生长相关型生物表面活性剂是细胞繁殖生长过程中的代谢产物,在各种限制条件下可利用生长细胞或休止细胞生产生物表面活性剂,或是将发酵法与生物转换结合起来通过加入一种底物前体生产生物表面活性剂。一些重要的生物表面活性剂及其生产菌如表 1^[3]。

生物表面活性剂的产生量小、结构复杂、性能也有较大差异,国内外对生物表面活性剂及其生产菌进行了多方面的研究,来提高产量、降低成本、生产出高性能的生物表面活性剂。

表 1 生物表面活性剂及其生产菌

生物表面活性剂	生产菌名称
糖脂	<i>Arthrobacter</i> sp.
糖脂、蛋白质	<i>Torulopsis petrophilum</i>
槐糖脂	<i>Torulopsis bombicola</i>
	<i>Torulopsis apicola</i>
海藻糖霉菌酸双脂	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
鼠李糖脂	<i>Pseudomonas</i> spp.
蔗糖脂	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
果糖脂	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
棒杆菌酸	<i>Corynebacterium lepus</i>
脂肪酸,甘油单、二脂	<i>Acinetobacter</i> sp.
多糖-脂肪酸混合物	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Canadia lipolytica</i>
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
中性脂	<i>Nocardia erythropolis</i>
	<i>Corynebacterium salmonicum</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
脂肽	<i>Candida petrophylum</i>
多糖-蛋白质混合物	<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>

1.1 菌株的筛选及改良 生物表面活性剂的生产首先依赖于生产菌,不同的生产菌产生不同的生物表面活性剂。如何快速而有效地筛选和分离出生物表面活性剂生产菌,是人们研究很多的一个问题。已有许多方法通过测量液体和空气或两种液体之间的界面力来确定生物表面活性剂的浓度,从而判定出生物表面活性剂生产菌的存在。这些方法包括毛细上升法、威廉米吊片法、环法、泡压法及悬滴法。近年来,不少文献报道了一些快速的生物表面活

性剂产生菌的筛选方法。如液滴轴线对称分析法(ADSA-P)和比色法等方法。Jain 等曾报道了一种液滴分散法,可以定性地确定生物表面活性剂产生菌的种类。Bodour 等^[4]对这种方法进行了改进,使液滴分散法既可以定性地筛选出生物表面活性剂生产菌,又可以定量地测定出生物表面活性剂的浓度。测定是在一个有 96 个微槽的碟子上进行,每个微槽内都覆盖一薄层油,然后加入 5 μ L 的样品液滴,一分钟后观察,可以通过液滴的聚集、轻微分散或完全散开来判断表面活性物质的量。这种方法和常用的环法相比有许多优势:需要很少的样品量(5 μ L),能够测量较大的有效浓度范围,而且不需要特殊的设备。

另外,通过致突变等手段筛选高产菌株是一种有效地获取生物表面活性剂生产菌的途径。通常可采用紫外灯照射或加入致突变剂等方法来使一些菌株发生变异。*Bacil-*

lus licheniformis JF-2 能在好氧和厌氧条件下产生生物表面活性剂, 并且能生活在含 10% 的 NaCl、温度高至 50℃、pH 值从 4 到 9 的油层环境中, 这些特点非常适合用于微生物法提高石油采收率。但和 *Bacillus subtilis* 相比, 由 *B. licheniformis* JF-2 产生的生物表面活性剂的产量却少的多。因此, 通过改变 *B. licheniformis* JF-2 的性状来增加生物表面活性剂的产量是十分必要的。Sung-chyr Lin 等^[5]在这方面进行了有益地尝试, 他们在研究中向 2mL 的 *B. licheniformis* JF-2 培养液中加入诱变剂 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG), 使其浓度达到 0.1mg/mL, 得到的悬浮液在 42℃ 的温度下培养 10min, 然后将培养液用预冷却的新鲜的矿物盐水稀释 20 倍, 随后进行一系列的筛选过程, 最后得到一株变异体 *B. licheniformis* KGL11, 它产生的生物表面活性剂的浓度为 390mg/L, 是 *B. licheniformis* JF-2 产生的生物表面活性剂的浓度的 12 倍, 且生物表面活性剂的种类相同。

1.2 培养条件的优化 在微生物的培养过程中可以通过控制发酵条件及各种营养物质的量, 使生产菌最有效的产生生物表面活性剂。Surfactin 是一种由 *Bacillus subtilis* 产生的脂肽类生物表面活性剂。Yu-hong Wei 等^[6]研究发现, 在铁离子富集的培养基中, Surfactin 的产量会大大提高, 同时导致了生物量的增加。进一步研究发现, 当用 1.7mmol/L 的硫酸铁加入到不同铁离子起始浓度或发酵的不同阶段的培养基中时, Surfactin 的浓度都会增加到几百 mg/L。但随着铁离子的加入, 培养基就会出现酸化现象, 当 pH 降低到 5 以下时, 由于沉淀作用, Surfactin 在培养基中消失。然而, 如果通过各种手段 (如加入碱) 避免了这种酸化现象, Surfactin 产量就会增加到 3,500 mg/L。这个浓度要比所有曾报道过的通过基因改良获得的菌种产量都要高。Davis 等^[7]对 *Bacillus subtilis* ATCC21332 产生的生物表面活性剂 Surfactin 的产量和氮的代谢情况的关系进行了研究。在一个用硝酸铵作为氮源的培养基中, 当铵被消耗完以后, 在厌氧条件下, 微生物就会利用硝酸根作为氮源。研究发现, 在这种厌氧且硝酸根受限制的培养基中, 生物表面活性剂的产量比其它条件下都要高。

另外, 对于大规模的生产来说, 选择经济合理的培养底物也是十分重要的。Sandra L Fox 和 Greg Bala^[8]报道了用土豆加工过程中的废物作碳源培养 *Bacillus subtilis* ATCC21332 生产生物表面活性剂的可行性。这种方法解决了土豆加工工厂的废物处理问题, 同时也降低了生物表面活性剂的生产费用。

1.3 对新型生物表面活性剂研究与开发 随着研究的不断深入, 一些新型的、具有优良特性的生物表面活性剂不断出现。蔗糖酯 (Sucrose ester 简称 SE) 是一种新型的多元醇型非离子表面活性剂, 它可以作为食品添加剂, 能改善口感; 用做洗涤剂的活性剂能除去水果、蔬菜上的残存的农药, 而本身却很少残留。赵裕蓉等^[9]采用解烃棒状杆菌 (*Corynebacterium hydrocarbolestus*) 为生产菌, 在以蔗糖为唯一碳源的培养基中培养, 通过紫外分光光度法、气相色谱、薄层色谱等一系列方法对产物蔗糖酯进行了定性和定量的检测。张翠竹等^[10]从大港炼油厂污水中筛选到一株地衣芽孢杆菌 NK-X₃, 在含糖的培养基中培养可产生一种脂肽类生物表面活性剂, 该生物表面活性剂在 pH 值为 4 ~ 12 的范围内和 4,000 mg/L 的高钙离子浓度及 15% 的高盐浓度下仍维持表面活性, 更为显著的特点是在 120℃ 高温下不失活, 这些特点有利于原油的增采和输送。Wolf-Rainer Abraham 等^[11]从 *Alcanivorax borkumensis* 的烷烃培养基中分离并鉴定了一系列极性脂类生物表面活性剂, 这些生物表面活性剂是含有脂肪酸支链的阴离子糖脂, 在结构上有

10种不同的衍生物,主要是4个 β 羟基脂肪酸支链的链长(C_6 , C_8 , C_{10})及位置不同。

2 生物表面活性剂的提取

目前,生物表面活性剂工业规模的应用与合成的表面活性剂相比并不具有优势,主要是由于生物表面活性剂的生产费用较高,而产物的提取或称下游的处理费用占生产费用的大部分。而生物表面活性剂在发酵液中的低浓度和两性性常妨碍其有效分离。随着研究的不断深入,一些传统的方法不断完善,新的方法不断出现。

2.1 萃取 溶剂萃取是一种常用的提取方法,被许多研究者采用。常用的有机溶剂有甲醇、乙醇、戊烷、丙酮、氯仿、二氯甲烷,这些溶剂既可以单独使用,也可以混合使用。氯仿和甲醇以不同比例的混合溶液是一种比较有效的萃取液,它可以使萃取剂的极性与目标提取物的极性相协调。Mata-Sandoval等^[12]在对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* UG2)产生的鼠李糖脂(*rhamnolipid*)生物表面活性剂的提取过程中采用了氯仿-甲醇(2:1)的萃取剂,取得了很好的效果。但对于大规模的生产来说,需要大量的氯仿做溶剂,这在经济上是不合理的。而且,氯仿是一种高毒性的有机氯化物,对人体和环境都有害。因此,寻找一种既便宜又低毒性的生物表面活性剂萃取剂是十分必要的。Marias, Kuyukina等^[13]对生物表面活性剂的萃取剂进行了研究,他们用甲基-叔丁基醚萃取*Rhodococcus*产生的生物表面活性剂,通过和其它常用的溶剂相比较,认为用甲基-叔丁基醚做萃取剂可以取得较高的产品产率(10g/L),高效率(临界胶束浓度为130~170mg/L),同时产品具有良好的表面活性(表面张力和界面张力分别为29和0.9mN/m)。甲基-叔丁基醚具有低毒、可生物降解、易回收、不易燃及不易爆炸等优良特性。因此,对于大规模的生物表面活性剂生产也是良好的萃取剂。

2.2 超滤 超滤是用于从发酵液中提取生物表面活性剂的一种新方法。它是在压力的作用下让不易过滤的样品通过膜。这种方法速度快、回收率高,在国外应用较为广泛^[3, 14]。Sung-chyr Lin等^[14]用分子量截止值(MWCO)为30,000D的超滤膜对*Bacillus licheniformis*的变异体产生的生物表面活性剂进行了提取分析,同时还使超滤和高效液相色谱相结合,设计了一套对生物表面活性剂的提取、分析方法。由于生物表面活性剂在临界胶束浓度(CMC)以上时形成微胶束,使得超滤膜截取的分子量比生物表面活性剂的分子量大两个数量级,而向培养液中加入一定量的甲醇,胶束就会分散,生物表面活性剂就会通过滤膜。这样让原培养液、超滤滤液、及在培养液中加入甲醇后的超滤滤液分别通过高效液相色谱,得到3张色谱图。在原培养液色谱图中出现的峰,如在滤液的色谱中消失,而在加入甲醇的滤液的色谱图中又出现,则可证明这个峰是生物表面活性剂的峰。而那些只在培养液的色谱图中出现的峰就不是生物表面活性剂的峰。这种方法可以排除生物大分子(如蛋白质等)的干扰,因为生物大分子在甲醇的作用下不会裂解。

2.3 泡沫分离 微生物的发酵过程中都会产生泡沫现象,产生表面活性物质的过程中尤其显著。泡沫是由于快速搅动及向好氧微生物培养液中充氧而产生的,在表面活性物质存在的情况下稳定下来。泡沫会使产品、营养成分及细胞流失。为了抑制泡沫的产生就必须加入一些化学抑泡剂,这不仅增加了费用、减弱氧的传递,而且还会对微生物产生负面影响。但如果利用这些泡沫来回收表面活性物质,可能是一种既经济又合理的方法。Davis等^[15]对这方面进行了研究。他们用泡沫分离法对一类生物表面活性

剂 Surfactins 进行了提取和浓缩,证明了泡沫分离是一种有效的生物表面活性剂分离方法。而且使泡沫分离和发酵过程相结合,建立了连续的生产过程。

3 展望

近些年来,生物技术迅猛发展,而且不断向其它工业领域渗透。生物表面活性剂的产生发展就是一个最好的例证。它不仅在一些领域逐步代替化学合成的表面活性剂,而且突破了传统的表面活性剂的应用领域。生物表面活性剂的研究在我国处于起步阶段,在发达国家也是新兴领域,其工业化水平较低,技术不成熟,但有很大的发展潜力。

生物表面活性剂潜在的应用领域不断被拓宽,但它能不能成功地应用取决于生物表面活性剂能不能以经济的生产费用大规模地生产。目前,生产技术的改善已使生物表面活性剂的生产效率和使用效率有了很大的提高,今后应以经济可行性为方向,进行以下各方面的研究。

培养基的优化研究。对于特定的生产菌株,建立各种营养因素(C、N、P等)及底物的增加和产量及生产费用之间的关系模型,从而确定最经济的培养条件。

进行废物资源化的研究。开发出可被生物表面活性剂生产菌利用的有机废物培养基,结合菌种的筛选与优化,建立一套利用有机废物的生物表面活性剂生产体系。

通过菌种改良提高产量,利用当代基因工程技术,进行优良基因的组合,改造出高效菌种。

开发出简单、高效的生物表面活性剂分离、提取技术,并使其产业化,降低生产成本。

在有机废水及有机垃圾的生物处理过程中,向反应器中接种生物表面活性剂生产菌,控制反应条件,使其更有效的处理难降解物质。

参考文献

- [1] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. *Engineering Geology*, 2001, **60**: 193 ~ 207.
- [2] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. *Journal of Hazardous Materials*, 2001, **85**: 111 ~ 125.
- [3] Garti N. *Colloids and Surfaces*, 1999, **152**: 125 ~ 146.
- [4] Bodour A A, Miller ~ Maier R M. *J Microbiol Methods*, 1998, **32**: 273 ~ 280.
- [5] Lin S C, Lin K G, Lo C C. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **23**: 267 ~ 273.
- [6] Wei Y H, Chu I M. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **22**: 724 ~ 728.
- [7] Davis D A, Lynch H C, Varley J. *Enzyme Microb Technol.*, 1999, **25**: 322 ~ 329.
- [8] Fox S L, Bala G A. *Biosource Technology*, 2000, **75**: 235 ~ 240.
- [9] 赵裕蓉, 王宁玲. *北京化工大学学报*, 1996, **23** (4): 6 ~ 10.
- [10] 张翠竹, 梁凤来, 张心平, 等. *油田化学*, 2000, **17** (2): 172 ~ 176.
- [11] Abraham W R, Meyer H, Yakimov M. *Biochimica et biophysica Acta*, 1998, **1393**: 57 ~ 62.
- [12] Mata-Sandoval J C, Karns J, Torrents A. *Journal of Chromatography A*, 1999, **864**: 211 ~ 220.
- [13] Kuyukina M S, Ivshina I B, Philp J C. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **46**: 149 ~ 156.
- [14] Lin S C, Chen Y C, Lin Y M. *Journal of Chromatography A*, 1998, **825**: 149 ~ 159.
- [15] Davis D A, Lynch H C, Varley J. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **28**: 346 ~ 354.