

表面活性素的发酵生产及应用

吴清平^{1,2} 蔡芷荷¹ 张菊梅¹ 周小燕¹ 姚汝华²

(广东省微生物研究所¹ 广州 510070, 华南理工大学² 广州 510642)

关键词 表面活性素, 发酵生产, 枯草芽孢杆菌

分类号 TQ423 **文献标识码** C **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-74-76

表面活性剂 (surfactant) 素有“工业味精”之称, 它在各个工业领域中具有特殊重要地位。迄今为止, 表面活性素 (surfactin) 是已发现的最强的一类生物表面活性剂 (biosurfactant), 随着环保意识日益加强, 可生物降解的表面活性剂愈来愈受到广泛关注, 作为来源于生物体又可为生物所降解, 且活性很强的表面活性素可用在洗涤剂制造、油类回收、感光乳剂稳定、植物病害控制、细胞破碎及微生物数量的快速测定等方面。人们在对其结构特性及其生物合成机制进行研究的同时, 亦从发酵的角度, 对表面活性素的生产及应用进行了不断的探讨, 并取得了长足的进步^[1-4]。本文着重介绍近年来有关表面活性素的发酵生产和应用研究方面的主要进展。

1 表面活性素产生菌选育

1968年 Arima 等首次发现枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 能够产生表面活性素以来, 表面活性素产生菌的筛选主要集中在枯草芽孢杆菌的不同菌株之间^[1,2]。近年来, 进一步的研究还表明, 除枯草芽孢杆菌外, 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 及地衣芽孢杆菌 (*B. lichemiformis*) 也能产生表面活性素^[3,4]。由于一般的表面活性素产生菌的产量较低, 因此要能达到有较好的利用价值, 通常需要对产生菌进行高产突变株的诱变选育, 和其它微生物活性物质高产菌株的选育相类似, 为了提高表面活性素产生菌的产量, 首先对较高产量的出发菌株采用物理和化学诱变方法进行诱变, 诱变剂通常采用紫外线和亚硝基胍两种^[5]。除常规方法外, 随着对表面活性素合成机理的认识和合成酶基因的定位、克隆和表达, 人们亦开始采用基因工程的手段, 构建基因工程菌株用于表面活性素的生产^[1-3,5]。表面活性素产生菌及高产突变株的粗筛, 通常采用菌

落在固体培养基上对红血细胞的溶解^[6]和菌落在含油琼脂平板上产生的乳浊晕圈来测定^[3], 复筛则需直接测定表面活性素的含量^[1,3-6]。迄今为止, 一般表面活性素产生菌的产量均小于 1.0g/L, 少的甚至在 0.1g/L 以下, 而较高产量的菌株, 在液体批次和循环发酵中可分别达到 3.5g/L 和 1.9g/L^[7], 在固体发酵中可达到 2.0g/Kg 湿重^[5]。

2 表面活性素发酵生产

表面活性素的生产通常采用合成培养基, 其中 L-氨基酸和碳源对表面活性素的生产是必需的, 发酵通常采用 pH 中性, 培养温度为 30~37°C, 表面活性素产量的高低有赖于合理的 C-N 平衡和其生物量的多少, 通常表面活性素的产量高低与其生物量多少成反比。培养基中各种元素的对比对表面活性素的生产非常重要, 1988年 Schmidt 等^[8]发现, 与 Fe²⁺ 相比较, 低浓度 (4×10⁻⁵mol/L) 的 Mn²⁺ 更易促进在葡萄糖溶液中的枯草芽孢杆菌的生长, 而提高 Mn²⁺ 浓度则菌体生长受到抑制, 但表面活性素的产量可得到提高, 当 Mn²⁺ 浓度为 4×10⁻³mol/L 时, 表面活性素达到 1.2g/L, 这时 Mn²⁺ 将和表面活性素形成盐或复合物。1991年 Sheppard 等^[9]在带有反馈抑制的连续相中观察枯草芽孢杆菌 ATCC21332 对锰的反应时发现, 铁和锰的利用率与氮的利用有密切关系, 在发酵液中 N:Fe:Mn 的摩尔比例为 920:7.7:1.0 对于菌体的生长和表面活性素的生产都是至关重要的。发酵液中增加 Mn, 菌体会减少对 N 的需求, 并导致生长受到 Fe 的制约; 在菌体受 Fe 或 N 限制, 但 Mn 存在条件下, 菌体能连续三十代

广东省重点科技攻关资助项目

1998-02-08收稿, 1998-06-21修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

保持其表面活性素的产量不下降。异柠檬酸脱氢酶活性和表面活性素产量相关关系研究的结果表明,当还原性增加时异柠檬酸脱氢酶活性下降,表面活性素就可以合成,因此,表面活性素的合成和低水平的异柠檬酸脱氢酶活性相关,降低异柠檬酸脱氢酶的活性可以通过降低 O_2 浓度,增加生长率和在生产培养基中加入柠檬酸或 NH_4NO_3 来实现^[10]。另外,在圆柱形反应器中,生物表面活性剂对氧传递的影响研究还发现,小量的化学合成的表面活性剂如 SDS 等及由枯草芽孢杆菌所产生的表面活性素都将导致体积 O_2 传递系数的急剧下降^[11]。

迄今为止表面活性素的发酵生产仍处于实验室阶段,小试生产方法归纳起来主要有常规圆柱形反应器批量发酵法、连续发酵法、液体两相发酵法^[12]、搅拌罐反应器自循环发酵法、固体发酵法及固定化酶法等六种。批量发酵法简单方便、容易控制和操作,因此在研究中用得较为广泛;而为了提高设备的利用率,在表面活性素发酵的研究中,连续发酵法亦受到重视;另外,随着进一步研究的深入,发现发酵中随着表面活性素产量的增加,会严重影响体积 O_2 传递系数后,两相发酵法和搅拌罐反应器自循环发酵法被建立用来解决这一关键问题,前者可以在发酵过程中,对表面活性素进行随程提取,以减少水相中表面活性素的含量,尽量减少表面活性素对发酵的反馈抑制,后者则能通过发酵过程中,对泡沫进行处理,以实现随另一种随程提取,减少发酵液中表面活性素的含量。在探索液体深层发酵的同时,以豆腐渣为原料进行的表面活性素固体发酵法研究也取得了良好进展,此法除可变为室外,还能较好地减少表面活性素对发酵的反馈抑制。固定化酶法则是随着表面活性素的代谢机制的深入而建立起来的表面活性素生产方法,此法在转化时不需进行有氧发酵,因此能有效地避免表面活性素对有氧发酵的反馈抑制作用。

3 表面活性素的提取和测定

表面活性素的提取过程比较简单,可以采用化学提取法^[13]、色谱法及超滤法等三种方法从发酵液或固体发酵料中提纯,其中常用的方法为化学提取法,具体过程为首先离心除去发酵液中的菌体,加入浓盐酸将 pH 调至 2,然后收集沉淀,并用二氯甲烷进行提取,溶剂可以通过减压而去除。再进一步的纯化可以通过重

结晶来获得,具体是先将二氯甲烷提取物溶于蒸馏水中,并用 NaOH 将 pH 值调至 7,然后用滤纸将溶液过滤后,用浓 HCl 将 pH 调至 2,最后采用离心将溶液中的白色固体以小球体状收集起来^[13]。

对发酵液中的表面活性素含量的测定,主要采用薄层层析法^[6,13]和高效液相色谱法(HPLC)^[5]。在薄层层析法中,采用硅胶制作薄层平板,展开剂采用氯仿-甲醇-水(65:25:4),平板点样风干并在展开剂中展开后,取出平板在其上喷浓 H_2SO_4 ,最后将平板置于 110℃ 下加热 45min 后,取出来即可作直观测定。在高效液相色谱法中,发酵液先经过离心,然后采用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤,最后注射入 HPLC 中进行测定。检测采用紫外检测器,测定波长为 205nm,流动相乙腈:10g/L 醋酸 = 4:1,柱子为 4.6mm Φ × 250mm ODS-2 反相疏水柱,柱温 30℃,流速 1.5mL/min。

4 表面活性素的用途

微生物产生的一系列表面活性剂都具有较强的表面活性,可显著地降低水的表面张力,表面活性素是其中活性最强的生物表面活性剂,具有广泛的潜在用途^[1,14,15]。

(1) 在工业方面,可大量应用于石油回收,溢油控制、洗涤剂制造及感光乳剂的稳定。另外,还能作为乳化剂及消泡剂等应用于纺织、医药、食品及化妆品的生产。

(2) 在农业方面,可制造杀菌剂,用以植物病害的控制,由于表面活性素对细胞的破碎没有严格的专一性和选择性,因此对植物病原菌有广谱的杀灭作用。另外,在表面活性素溶液中加入一定量的 iturin 后,对植物病原菌的杀灭具有极大的增强作用。

(3) 在医疗卫生方面,可用于高效细胞破碎和微生物数量快速测定。表面活性素可高效地将细菌和真菌的细胞破碎,其中的 ATP 可以随之释放出来与荧光素酶和荧光素系统反应产生荧光,ATP 的量与细胞的数量相关,因此测定荧光就能推算出细胞的数量达到快速测定的目的。此外,表面活性剂还能用于杀菌剂、杀虫剂效果的监测,以及发酵工业发酵过程的细胞数量随程监控等方面。

目前表面活性素还未用作大规模的商业用途,其主要原因是生产成本过高,要解决这一问题可从下面两个方面来考虑:

(1) 选育高产突变株: 要提高表面活性素的产量, 其最重要的手段之一是提高生产菌种的产量, 目前采用常规化学物理诱变是提高菌种产量的有效方法, 但诱变选育前一定要把出发菌株筛选好, 并建立起高效的高产菌株筛选模型。由于表面活性素的调控机理及合成途径日趋清楚, 因此构建高产基因工程菌亦可作为一种重要方法。

(2) 改进发酵方法: 表面活性素能显著地降低发酵液的表面张力和减少发酵液中的溶氧值, 因此在发酵生产过程中, 随着表面活性素的产生和积累, 其对表面活性素发酵的反馈抑制作用相当明显, 要提高表面活性素的产量, 改善这种条件, 减少抑制是相当必要的。

要解决表面活性素在发酵过程中的反馈抑制作用, 对表面活性素进行随程提取是解决这个问题的一种比较合理可行的方法, 随程提取一般有三种方法, 第一种是浮选分离或泡沫分离, 第二种是用离子交换树脂或其它合适的吸附剂吸附分离, 第三种是在培养液中加入烯烃, 以实现萃取分离。浮选分离、泡沫分离及吸附剂吸附分离要注意防止杂菌对发酵的污染及选择较合适的大容量吸附材料; 而烯烃萃取分离一定要注意其对菌体的毒性。采用固定化酶及固定化细胞生产方法, 能较好地解决这种反馈作用, 但提高其转化效率是这一技术能否成功应用的关键。

另外, 在表面活性素的研究中, 除了要对其合成机制进一步探索外, 如何使表面活性素发挥最大的表面活性剂作用亦是一个十分重要的工作。

参 考 文 献

- [1] Ohno A, Ano T, Shoda M. *Biotechnol Lett*, 1992, 14(2):1165~1168.
- [2] 吴清平, 蔡芷荷, 张菊梅等. *微生物学通报*, 1998, 25(6): 351~353.
- [3] Morikawa M, Ito M, Imanaka T. *J Ferment Bioeng*, 1992, 74(5):255~261.
- [4] Lin S C, Minton M A, Sharma M M *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1):31~38.
- [5] Ohno A, Ano T, Shoda M. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47(2):209~214.
- [6] Galli G, Rodriguez F, Cosmina P *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1205(1):19~28.
- [7] Carrera P, Cosmina P, Grandi G. *Eur Pat Appl EP* 463393, 1992.
- [8] Schmidt M, Lang S, Wagner F. *DECHEMA Biotechnol Conf. Braunschweig*, 1987, 333~337.
- [9] Sheppard J D, Cooper D G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 35(1):72~76.
- [10] de Roubin M R, Mulligan C N. *Can J Microbiol*, 1989, 35(9):854~859.
- [11] Sheppard J D, Cooper D G. *J Chem Technol Biotechnol*, 1990, 48(3):325~336.
- [12] Drouin C M, Cooper D G. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40(1):86~90.
- [13] Cooper D G, Macdonald C R, Duff S J B *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42(3):408~412.
- [14] Sivesind T M, Dimond R L, Schumm J W. *Eur Pat Appl EP* 441469, 1991.
- [15] Ishigami Y, Matsuzaki S, Niwa Y *et al.* *Shikizai Kyokaiishi*, 1993, 66(11):649~654.