

研究报告

一株产甘露糖赤藓糖醇脂菌株的筛选及其产物分析

薛婷婷¹ 付瑞敏^{1,2} 谷亚楠¹ 郭彦钊¹ 杜茂林¹ 陈五岭^{1*}

(1. 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 河南教育学院人口与生命科学系 河南 郑州 450046)

摘要:【目的】解决石油长链烃类物质引起的环境污染问题, 筛选可以高效降解石油烃的产糖脂类生物表面活性剂菌株。【方法】采用血平板、油平板法, 从葡萄皮表面分离到 6 株产糖脂类的真菌, 比较各菌株的排油性能, 通过 PCR 扩增合成糖脂类表面活性剂的关键基因, 筛选到一株具有 *emtl* 序列的真菌 K6。经形态学、生理生化测定和分子系统发育分析(5.8S, ITS1, ITS2)对菌株进行鉴定, 而且通过 TLC 和 HPLC 分析该菌株的代谢产物。【结果】经鉴定, 该菌为 *Pseudozyma churashimaensis*, 可产甘露糖赤藓糖醇脂。石油烃降解实验表明, 菌株 K6 具有很强的乳化性能和降解石油烃的能力, 其石油烃降解率可达 70.17%。【结论】菌株 K6 具有产生物表面活性剂和降解长链石油烃类的能力, 其对石油污染环境的生物修复具有重要的现实意义。

关键词: *Pseudozyma churashimaensis*, 糖脂, 表面活性剂, 甘露糖赤藓糖醇脂

Screening and product characterization of a mannosylerythritol lipids producing strain

XUE Ting-Ting¹ FU Rui-Min^{1,2} GU Ya-Nan¹ GUO Yan-Zhao¹
DU Mao-Lin¹ CHEN Wu-Ling^{1*}

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. Department of Population and Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: [Objective] In order to solve the environmental pollution problem caused by long chain petroleum hydrocarbons, we selected biosurfactant-producing strain that can degrade oil efficiently. [Methods] Six glycolipid-producing strains were isolated from grape skins by using oil-plate and blood-plate method. Oil-spreading test was conducted to test emulsifying ability of the strains. Strain

Foundation item: Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Fund Project (No. 2012GB2G000451); Science and Technology Plan Project in Henan Province (No. 132102310253); Key Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (No. 15B180002); Science and Technology Innovation Project in Shaanxi Province (No. 2009ZKC04-16); Youth Scientific Research Projects in Henan Institute of Education (No. 20100103)

*Corresponding author: Tel: 86-29-88303700; E-mail: 243376793@qq.com

Received: July 05, 2015; **Accepted:** September 18, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015

基金项目: 农业部科技成果与转化项目(No. 2012GB2G000451); 河南省科技计划项目(No. 132102310253); 河南省教育厅项目(No. 15B180002); 陕西省重大科技创新项目(No. 2009ZKC04-16); 河南教育学院青年科研课题项目(No. 20100103)

*通讯作者: Tel: 86-29-88303700; E-mail: 243376793@qq.com

收稿日期: 2015-07-05; **接受日期:** 2015-09-18; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-06

K6 was selected out by detecting *emtl* gene sequence related to mannosylerythritol lipids synthesis. Morphological, physiological and molecular phylogenetic studies were conducted to identify strain K6. The metabolites of strain K6 were characterized by TLC and HPLC. [Results] Strain K6 that produced mannosylerythritol lipids was identified as *Pseudozyma churashimaensis*. Moreover, its degradation rate of petroleum hydrocarbons could reach 70.17%. [Conclusion] Strain K6 has the ability to produce glycolipid biosurfactant and degrade petroleum hydrocarbons, which shows a practical significance on restoring the petroleum-contaminated environment.

Keywords: *Pseudozyma churashimaensis*, Glycolipid, Surfactant, Mannosylerythritol lipids

生物表面活性剂是由不同种微生物在一定培养条件下产生的具有表面活性物质的混合物, 由于其独特的性质(可降解能力、温和生产条件和毒性低等优点), 近几年备受关注^[1-2]。根据亲水基结构的不同主要分为糖脂类、脂肽和脂蛋白类、磷脂和脂肪酸类、聚合表面活性剂和微粒表面活性剂等五大类^[3]。甘露糖赤藓糖醇脂(Mannosylerythritol lipids, MELs)与槐糖脂^[4]和鼠李糖脂^[5]一样, 都属于糖脂类生物表面活性剂。与后两者相比, MELs 虽目前在国内研究较少, 但作为一种新型的非离子型生物表面活性剂, 它可乳化石油、降解石油烷烃类物质, 在环保领域具有广泛的应用前景。此外, MELs 杰出的免疫学特征使其在食品、医疗等行业也具有巨大的应用潜力^[6-11]。

当前, 国内外关于 MELs 及其产生菌的报道较少, 缺乏对 MELs 产生菌的筛选及改造等研究。基于此, 本研究结合多种筛选方法以期获得产 MELs 的目标菌株: (1) 前人报道 MELs 产生菌广泛存在于果皮、蔬菜等植物叶片中^[9], 因此通过血平板、油平板等方法从葡萄皮表面分离到 6 株产糖脂真菌; (2) 根据 MELs 合成过程中的关键基因 *emtl* (合成 MELs 必需的基因, 编码的糖基转移酶催化甘露糖和赤藓糖醇发生缩合反应)设计引物, 对所筛菌株进行基因检测, 并结合 TLC 和 HPLC 对该菌株所产代谢物进行分析, 确定糖脂类型; (3) 对菌株所产糖脂的乳化性能和降解石油烃能力进行测定, 为该菌在环保领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

葡萄样品是由陕西渭南渭北葡萄种植园惠赠

的巨峰、户太 8 号和红地球 3 种葡萄。

1.2 培养基

YM 琼脂培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 3.0, 麦芽浸出粉 3.0, 琼脂 20.0, 加入链霉素和氯霉素各 0.05, 加蒸馏水至 1 L, 调节 pH 7.2。

无机盐溶液参见文献[12]。血平板、油平板参见文献[13]。种子培养基参见文献[14]。发酵培养基(g/L): 磷酸二氢钾 3.0, 硝酸钠 6.0, 硫酸镁 2.0, 酵母粉 10.0, 氯化钠 5.0, 牛肉膏 3.0, 加蒸馏水至 1 L, 调节 pH 7.2。

所有培养基 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

常用培养基所需试剂皆为分析纯, 购于天津市科密欧化学试剂有限公司; PCR 扩增引物、DNA 提取试剂盒, 购于上海生工有限公司。

WZY-1 表面张力仪, 上海衡平制造厂生产; C1000 Thermal Cycler PCR 仪, Bio-Rad 公司; SF-TDL-5A 离心机; 上海菲恰尔分析仪器有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株筛选: 将葡萄皮切碎, 在 YM 培养基上 25 °C 培养 48 h。挑取生长旺盛的菌落经过反复分离纯化得到单菌落, 用血平板^[15]筛选具有产表面活性剂能力的菌株。用油平板进一步筛选, 排除溶菌酶的干扰, 只有产生表面活性剂才能够乳化碳氢化合物形成噬油斑。挑取有噬油斑的菌落接种于 YM 液体培养基中 25 °C 恒温培养 2 d。取 2 mL 菌液接种到种子培养基中, 25 °C、200 r/min 摇床培养 3 d。再将种子菌液加到发酵培养基中, 25 °C、200 r/min 摇床培养 5 d。

1.4.2 表面张力测定: 将培养 5 d 后的发酵液

4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 WZY-1 表面张力仪在 25 ℃ 测定其表面张力。以不加菌种的发酵培养基作对照。每组实验均做 3 组平行。

1.4.3 *emtl* 基因的 PCR 扩增及测序: 使用上海生工有限公司的 DNA 提取试剂盒提取功能菌株的总 DNA, 以 DNA 为模板进行 PCR, 使用引物 5'-ATGAAGTTTACGGAATTTA-3' 和 5'-TTTTATAAGTTATTAATACG-3' 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L)为: 模板 DNA (50 mg/L) 1 μ L, 引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, 加双蒸水至 25 μ L。反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环。目的片段经 Sanprep 柱式 PCR 试剂盒(上海生工有限公司)纯化后, 提交至上海生工进行序列测定。

1.4.4 ITS1、ITS2、5.8S 基因序列测定和分子系统发育分析: 使用上海生工有限公司的 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 以提取的基因组 DNA 为模板, 使用通用引物^[16]ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3'), 扩增核糖体间隔区 ITS1 区、5.8S rRNA 基因以及 ITS2 区的基因序列。将扩增出来的目的核酸片段送至上海生物工程技术服务有限公司纯化后进行测序。所得序列运用 BLAST 在 GenBank 数据库中分别进行同源比对, 并采用 MEGA 5.05 软件构建系统发育树。

1.4.5 糖脂的定性分析: 经培养后的发酵液 10 000 r/min 离心 20 min 取上清液, 用等体积的乙酸乙酯萃取糖脂。用薄层色谱法(TLC)^[17]分析乙酸乙酯的提取物, 用氯仿-甲醇-NH₄OH (65:15:2, 体积比)作为展开剂。喷洒茺酮-硫酸后 90 ℃ 烘箱加热 5 min 显色, 若显绿色或蓝色则为糖脂^[15]。

根据显色斑点计算 R_f 值(R_f =原点到底层斑点中心的距离/原点到溶剂前沿的距离)。以 *P. antarctica* T-34 所产生的纯 MEL-A、MEL-B 和 MEL-C 作为标样。

1.4.6 纯化糖脂: 分离浓缩含有糖脂的乙酸乙酯提

取物。浓缩的糖脂溶于氯仿中, 用硅胶柱(HG/T 2354-92, 200 目; 青岛海洋化学品有限公司)层析法进行纯化, 使用氯仿/丙酮(10:0-0:10, 体积比)混合溶剂梯度洗脱^[18]。纯化的糖脂用于后续实验。

1.4.7 高效液相色谱定量糖脂: 使用高效液相色谱法-低温蒸发光散射检测分析法, Inertsil C₁₈ 硅胶柱 (5 μ m \times 4.6 mm \times 250 mm), 检测器 (ELSD-LT, Shimadzu), 不同浓度比的氯仿和甲醇 (从 100:0-0:100, 体积比) 以 1 mL/min 的流量梯度洗脱^[19]。以 *P. antarctica* T-34 所产 MEL 为标样^[20], 根据标准曲线得出糖脂含量。

1.4.8 糖脂结构分析: 纯化的糖酯 GL-1 和 GL-2 分别在 30 ℃ 溶于 CD₃OD 溶液, ¹H 核磁共振(NMR) 用 Varian INOVA 400 (400 MHz) 成像, 以纯的 MEL-A 作参考。

1.4.9 石油降解率的测定: 取一环菌株 K6 接种于 500 mL 液体发酵液中, 30 ℃、200 r/min 培养 48 h。K6 发酵液接入石油含量 4 g/L^[21]的无机盐溶液中, 接种量为 5%, 30 ℃、200 r/min 摇床培养。每隔 2 d 取样, 采用崔丽虹等^[22]的方法计算降解率。

2 结果与分析

2.1 产糖脂类生物表面活性剂的菌株筛选

根据产糖脂类生物表面活性剂的能力筛选新的菌株, 从 3 个品种的葡萄皮中分离得到的 K4、K5、K6、K7、K8 和 K9 共 6 株菌株。血平板和油平板检测结果显示 6 株菌都可产生糖脂, 但根据噬油斑的大小可以看出, K6 糖脂的产量相对较大。测定培养 5 d 后各自培养液的表面张力(表 1)。如表 1 所示, 菌株 K6 和 K9 的发酵液表面张力较小, 因此将 K6 和 K9 挑选出来进行后续研究。

2.2 *emtl* 基因扩增

将菌株 K6 和 K9 的基因组 DNA 作为模板, 分别进行 PCR 扩增, 以产 MEL 的菌株 *P. antarctica* T-34 为阳性对照, 以蒸馏水为阴性对照。结果发现只有菌株 K6 可以扩增出 371 bp 的特异性条带(图 1), 电泳结果显示与阳性对照菌株 *P. antarctica*

表 1 6 株菌发酵液的表面张力
Table 1 Surface tension of fermentation broth

Strains	Surface tension (mN/m)
CK	63.23
K4	37.19
K5	34.44
K6	28.67
K7	33.58
K8	35.04
K9	29.81

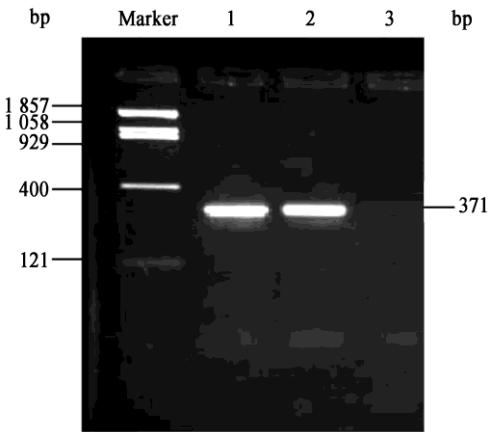


图 1 菌株 K6 的 *emtl* 基因 PCR 扩增结果
Figure 1 The PCR amplification result of *emtl* in strain K6
Note: 1: *P. antarctica* T-34; 2: K6; 3: Distilled water.

T-34 一致，初步确认是 *emtl* 基因，将 PCR 产物纯化后送至上海生物工程技术服务有限公司测序，所得序列与 NCBI 公布的 *emtl* 基因相似性高达 99%，确定 K6 具有 *emtl* 基因。因此将 K6 挑选出来进行后续研究。

2.3 菌株 K6 的鉴定

形态学研究结果表明，菌株 K6 的菌落形态中间平滑，边缘处有放射状菌丝，整体呈粉红色。生长初期菌落形态与酵母相似，两端芽殖。随着菌株的老龄化，菌落看起来似马蹄纹形状。通过显微观察，菌体呈梭状，大小不一；菌丝透明有隔芽分生孢子，出现短的气生菌丝链，部分气生菌丝有分枝。由于气生菌丝的出现，其菌落表面会出现绒毛。

将所获菌株 K6 的 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 基

因序列提交至 NCBI (登录号：KR233973)，将其同临近种属进行比对分析，应用 BioEdit 7.0 进行多重比较，分析其同源性，构建系统发育树，结果如图 2 所示，经分析，所得序列与 *Pseudozyma churashimaensis* 显示了 99% 的一致性，根据其系统进化特征，可确定菌株 K6 为 *Pseudozyma churashimaensis*。

2.4 糖脂定性分析

将菌株 K6 在分别以葡萄糖、蔗糖、半乳糖、果糖、甘露糖为碳源的培养基中 25 ℃ 培养 5 d，产物由乙酸乙酯萃取，然后用 TLC 分析。所得结果如图 3 所示，每种糖作为碳源均出现了两个糖脂条带，且其迁移率为 GL-1 ($R_f=0.66$) 和 GL-2 ($R_f=0.61$)，这与标准的 MEL-A ($R_f=0.67$) 和 MEL-B ($R_f=0.59$) 非常相似，初步判定其为 MELs 的同系物。

2.5 糖脂的定量分析

所得糖脂样品经 HPLC 与标样进行比对，在同一洗脱条件下，所得结果如图 4 所示。图 4A 中标样 MEL-A 在保留时间 8.27 min 出现特征峰，而图 4B 显示 GL-1 和 GL-2 都是在保留时间 8.39 min 出现特征峰，该峰位于标准峰附近。因此推测 GL-1 和 GL-2 是 MEL-A 的同系物。采用 HPCL 对糖脂粗品中 MEL-A (GL1+GL2) 的产量进行测定，测得菌株 K6 中 MELs 的产量为 3.6 ± 0.2 g/L。

2.6 糖脂结构分析

为确定糖脂(GL-1 和 GL-2) 的结构，将纯化后的糖脂用核磁共振(NMR)法分析研究。GL-1 和 GL-2 的 ^1H 核磁共振波谱出现一个与 *P. antarctica* T-34 产生的已知 MEL-A 类似的峰(图 5)。GL-1 和 GL-2 亲水部分的化学键如下：甘露糖的 H-1' 峰在 4.73 处，H-2' 的峰在 5.52 处，H-3' 的峰在 5.07 处，H-4' 的峰在 5.26 处，H-5' 的峰在 3.70 处，H-6' 的峰在 4.22 处，赤藓糖醇的 H-1-3 的峰大约在 3.68–3.80 之间，H-4 的峰在 3.84 和 4.01。另外，在 2.10 (d) 和 2.05 (e) 处的两个峰是甘露糖部分 C6' 和 C4' 位置上的乙酰基。

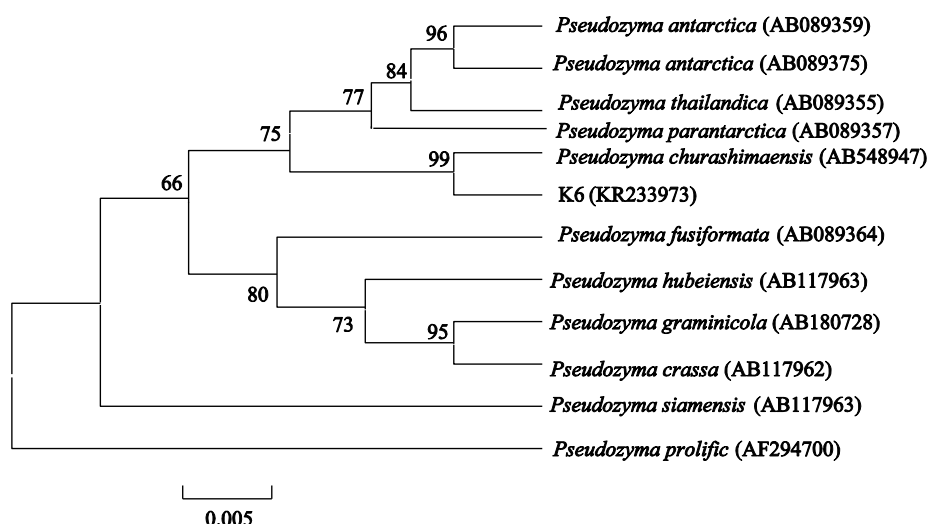


图 2 菌株 K6 系统进化树

Figure 2 The phylogenetic tree of strain K6

注：参与比对的序列的 GenBank 登录号列于括号中，分支处标注有自展值，标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences were shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.

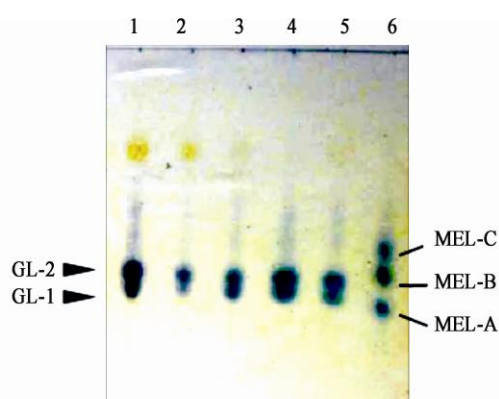


图 3 TLC 结果

Figure 3 The results of TLC

注：1：甘露糖；2：果糖；3：半乳糖；4：蔗糖；5：葡萄糖；6：标样。

Note: 1: Mannose; 2: Fructose; 3: Galactose; 4: Sucrose; 5: Glucose; 6: Standard sample.

比较光谱图发现糖脂 GL-1 和 GL-2 存在差异。例如，GL-1 和 GL-2 均在 2.18 (c)处有峰；GL-1 在 2.44 (a)和 2.24 (b)处分别有一个峰，而 GL-2 只在 2.24 (b)处出峰。这可能是由于两者结构中某个基团差异导致，具体研究后续报道。

2.7 菌株 K6 对石油的降解率测定及降解过程中表面张力的变化

生物表面活性剂对石油等疏水性化合物的增溶起到很好的促进作用，它们通过降低液体表面张力，从而促进微生物对这些疏水性化合物的吸收，并加快烃类物质的降解。以实验室内不产表面活性剂的石油降解菌 H5 为对比，通过测定两株菌表面张力的变化和该过程中菌株对石油的降解情况，以考察表面活性剂菌株石油降解能力的影响，所得结果如图 6 所示。

从图 6 可以看出，K6 菌株降低液体表面张力和降解石油的能力明显高于 H5，这是由于菌株 K6 产生的表面活性剂减小了石油烃和水的界面张力，增加了石油烃的溶解性，使石油烃类物质更容易进入微生物细胞膜内，进而在酶的作用下被降解^[23]。

3 讨论

本研究通过血平板、油平板、液体表面张力检测与 PCR 相结合的方法，筛选出一株产甘露糖赤藓糖醇脂(MELs)的菌株。在实验中建立了完整的筛选

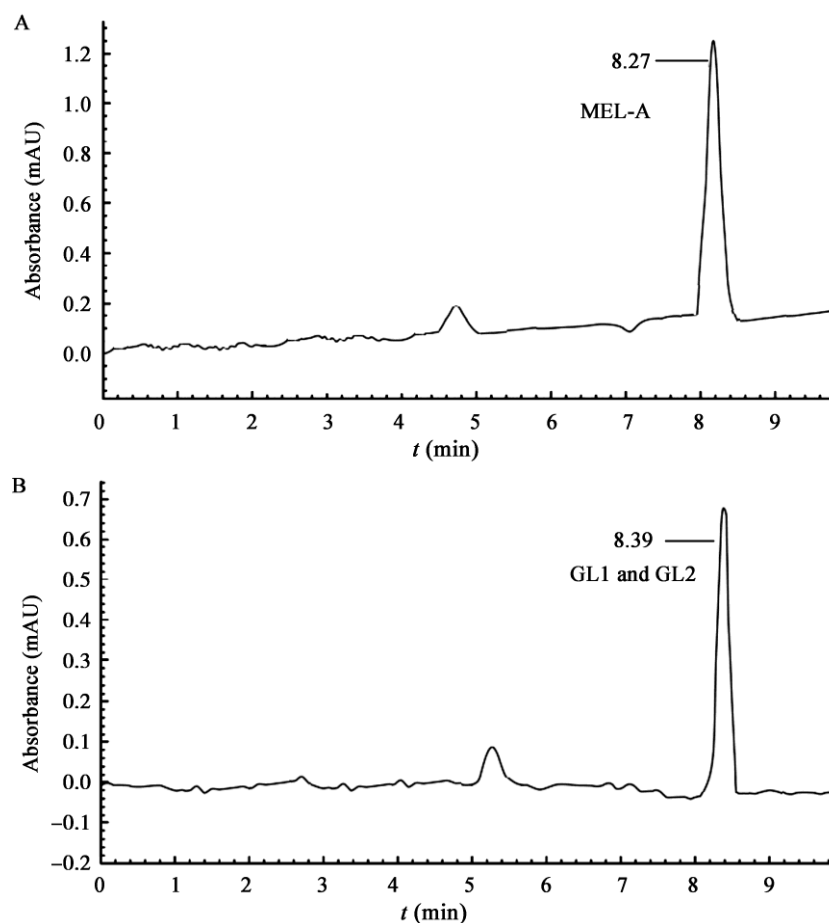


图4 MEL-A 标样和菌株 K6 发酵液高效液相色谱图

Figure 4 HPLC spectra of standard MEL-A and fermentation broth of strain K6

和鉴定体系。所选筛选和鉴定体系涵盖宏观和微观两个方面,相对比单纯的用排油圈或检测液体表面张力的传统方法,本法更为全面,所得结果可信度更高。本研究先后采用了 TLC 定性和 HPLC 定量相结合的鉴定方法,对所选菌株的代谢产物进行了分析,最终鉴定菌株所产物质为 MEL-A 的同系物,其产量为 3.6 ± 0.2 g/L。对所选菌株的表面活性和降解石油烃的能力进行了研究,其对石油的降解率为 70.17%。章慧等^[24]从炼油厂附近石油污染土壤中筛选出的产表面活性剂的菌株其产量为 2.27 g/L,对石油的降解率为 54.7%;杨乐^[25]从新疆油田土壤中筛选出的高效烃降解菌,其生物表面活性剂的产量为 2.25 g/L,对石油烃的降解率为 63.78%。对比

发现,本研究筛选出的 K6 菌高产、高效,在石油环保领域具有很大的发展潜力。

大量研究表明,糖脂类生物表面活性剂在石油污染环境的生物修复中起着至关重要的作用。与一般化学表面活性剂相比,糖脂类生物表面活性剂既可以有效降低液体表面张力,还具有无毒和生物可降解^[26]等特点。当前,国外学者对 MELs 展开了部分研究。Konishi 等^[27]探索了 MELs 产生菌的最适生长条件;Faria 等^[28]研究了 MELs 的产生及转化过程。而国内针对糖脂类生物表面活性剂的研究主要集中于鼠李糖脂和海藻糖脂,对甘露糖赤藓糖醇脂的研究较少。本研究分离、筛选出一株 MELs 产生菌 K6,并对菌株的代谢产物进行定性、定量和降

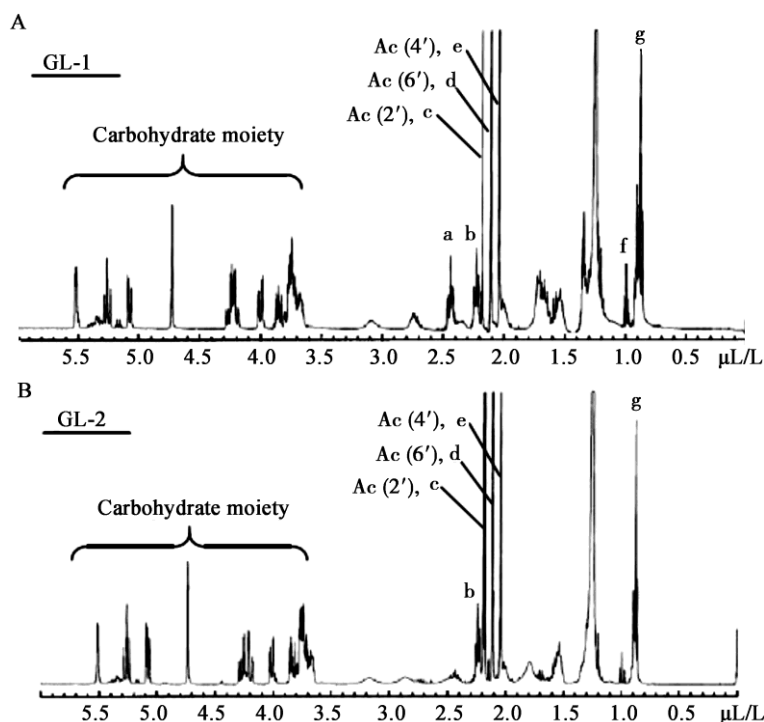


图5 GL-1 和 GL-2 的 ^1H 核磁共振谱
Figure 5 ^1H NMR spectra of GL-1 and GL-2

Note: A: GL-1; B: GL-2.

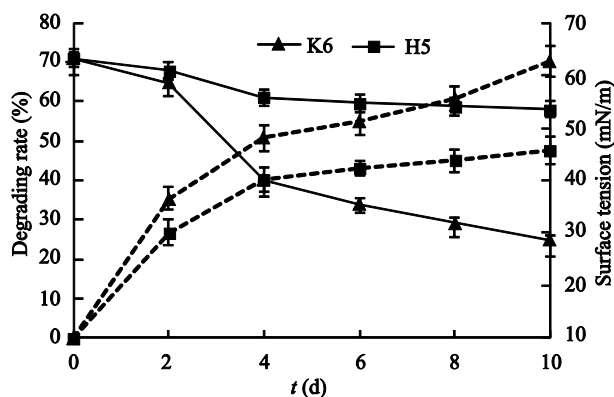


图6 菌株 K6 和 H5 降解石油烃的能力

Figure 6 The ability of strain K6 and H5 on degrading petroleum hydrocarbon

注: 虚线代表降解率; 实线代表表面张力。

Note: The dotted lines stand for degrading rate; The solid lines stand for surface tension.

解石油特性等研究。研究结果表明, 菌株 K6 MELs 产率高, 且能够有效降解石油烃。然而菌株生产表面活性剂还需要一定的环境条件, 培养基 C/N、pH 和培养温度等都对其 MELs 的合成有重要影响^[29], 因此下一步研究将着重于其生产糖脂的工艺优化及井场中试, 以期更好地发挥其在石油污染环境中的生物修复作用。

参考文献

- [1] He HY, Lu LX, Yao LL, et al. Properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2011, 30(3): 607-615 (in Chinese)
何海洋, 陆利霞, 姚丽丽, 等. 糖脂类生物表面活性剂的性质及其潜在应用进展[J]. 化工进展, 2011, 30(3): 607-615
- [2] Wang YJ, Bi SN, Zuo YH, et al. Isolation and antifungal activity of a biosurfactant-producing bacterium[J]. Microbiology China, 2012, 39(3): 353-360 (in Chinese)
王彦杰, 毕思宁, 左豫虎, 等. 一株表面活性剂产生菌的分离及抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 353-360
- [3] Shi QS, Chen YB, Ouyang YS. Glycolipids biosurfactants via microorganisms synthesis[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2006, 14(20): 1-5 (in Chinese)
施庆珊, 陈仪本, 欧阳友生. 微生物合成的糖脂类生物表面

- 活性剂[J]. 精细与专用化学品, 2006, 14(20): 1-5
- [4] Song DD, Liang SK, Wang JT. Structure characterization and physico-chemical properties of sophorolipid biosurfactants[J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(8): 1474-1479 (in Chinese)
- 宋丹丹, 梁生康, 王江涛. 槐糖脂生物表面活性剂的结构特征及理化性质初探[J]. 环境化学, 2011, 30(8): 1474-1479
- [5] Jiang PP, Guo CL, Dang Z, et al. Interrelationships of rhamnolipids, hydrophobic substrate and degrading bacteria[J]. Environmental Science, 2011, 32(7): 2144-2151 (in Chinese)
- 姜萍萍, 郭楚玲, 党志, 等. 鼠李糖脂与疏水底物及其降解菌的相互作用[J]. 环境科学, 2011, 32(7): 2144-2151
- [6] Zhu SM, Yu SJ, Yang LS. Mannosylerythritol lipid—a new biosurfactant[J]. China Food Additives, 2005(1): 64-69, 52 (in Chinese)
- 朱思明, 于淑娟, 杨连生. 甘露糖赤藓糖醇脂——一种新的微生物表面活性剂[J]. 中国食品添加剂, 2005(1): 64-69, 52
- [7] Zhao XX, Geltinger C, Kishikawa S, et al. Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis[J]. Cytotechnology, 2000, 33(1/3): 123-130
- [8] Im JH, Yanagishita H, Ikegami T, et al. Mannosylerythritol lipids, yeast glycolipid biosurfactants, are potential affinity ligand materials for human immunoglobulin G[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, 65(3): 379-385
- [9] Fan LL, Zhang J, Cai J, et al. Advance in glycolipid biosurfactants—mannosylerythritol lipids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(9): 1223-1233 (in Chinese)
- 范琳琳, 张俊, 蔡瑾, 等. 糖脂生物表面活性剂——甘露糖赤藓糖醇脂的研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1223-1233
- [10] Gu XN, Chen H, Li SS, et al. Biosurfactant production and its application in the environmental pollution control[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(6): 155-162, 233 (in Chinese)
- 顾信娜, 陈辉, 李珊珊, 等. 生物表面活性剂的产生及其在环境污染治理中的应用[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(6): 155-162, 233
- [11] Chen J, Hua ZL, Lun SY. Application of biosurfactants in environmental biotechnology[J]. Environmental Science, 1996, 17(4): 84-87 (in Chinese)
- 陈坚, 华兆伦, 伦世仪. 生物表面活性剂在环境生物工程中的应用[J]. 环境科学, 1996, 17(4): 84-87
- [12] Du ML, Fu RM, Gu YN, et al. Isolation, identification and breeding of petroleum-degrading bacteria in oilfield produced water by UV-plasma complex mutagenesis[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1001-1009 (in Chinese)
- 杜茂林, 付瑞敏, 谷亚楠, 等. 油田采出水石油降解菌分离、鉴定及高通量选育复合诱变菌株[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1001-1009
- [13] Ye HS, Sheng XF, Jiang CY, et al. The isolation of biosurfactant-producing bacteria and their effect on the availability of lead in soil[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(10): 1631-1636 (in Chinese)
- 叶和松, 盛下放, 江春玉, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及其对土壤重金属铅的活化作用[J]. 环境科学学报, 2006, 26(10): 1631-1636
- [14] Huang L, Li D, Sun D, et al. Isolation and identification of a low temperature hydrocarbon-degrading strain and its degradation characteristics[J]. Environmental Science, 2007, 28(9): 2101-2105 (in Chinese)
- 黄磊, 李丹, 孙丹, 等. 1株低温石油降解菌的分类鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(9): 2101-2105
- [15] Wang Y. Production of rhamnolipid bio-surfactants separation of pseudomonas[J]. Surface Technology, 2006, 35(5): 69-70 (in Chinese)
- 王琰. 鼠李糖脂表面活性剂的制备及产生菌的筛选[J]. 表面技术, 2006, 35(5): 69-70
- [16] Yan Y, Li WP, Gao WJ, et al. Application of rDNA ITS sequence analysis in fungus identification[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 18(10): 1958-1961 (in Chinese)
- 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 18(10): 1958-1961
- [17] Pan BF, Xu GL, Shi YP, et al. Screening of biological surfactant producing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(3): 264-267 (in Chinese)
- 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 264-267
- [18] Morita T, Konishi M, Fukuoka T, et al. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(2): 305-313
- [19] Rau U, Nguyen LA, Schulz S, et al. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(5): 551-559
- [20] Fukuoka T, Morita T, Konishi M, et al. Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(7): 1111-1118
- [21] Zheng JX, Peng Q, Zhang JY, et al. Study on characteristics of degradation of petroleum degradation bacteria produce surfactants[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 30(1): 5-7 (in Chinese)
- 郑金秀, 彭祺, 张甲耀, 等. 产表面活性剂的石油降解菌降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(1): 5-7
- [22] Cui LH, Guo P, Li BM, et al. The screening and identification of total petroleum hydrocarbon degrading bacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(9): 143-147 (in Chinese)
- 崔丽虹, 郭萍, 李宝明, 等. 石油降解菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2009(9): 143-147
- [23] Hao DH. Studies on the screening or MEOR microbial strain, rhamnolipid performance, and rhamnolipid transferase gene cloning and expression[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2008 (in Chinese)
- 郝东辉. 采油微生物筛选、鼠李糖脂产脂性能及关键酶基因克隆与表达研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2008
- [24] Zhang H, Guo CL, Lu GN, et al. Screening and fermentation optimization of a biosurfactant-producing oil-degrading bacterium[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(11): 2185-2191 (in Chinese)
- 章慧, 郭楚玲, 卢桂宁, 等. 具有产表面活性剂功能石油降解菌的筛选及其发酵条件优化[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(11): 2185-2191
- [25] Yang L. Screening of biosurfactant-producing bacteria for degradation of petroleum hydrocarbon and its degradation conditions[J]. Environmental Engineering, 2015, 33(6): 153-157 (in Chinese)
- 杨乐. 产表面活性剂解脂菌的筛选及其降解条件研究[J]. 环境工程, 2015, 33(6): 153-157
- [26] Liu L, Liu LL, Liu JH. The research progress of glycolipid biosurfactants[J]. West Leather, 2009, 31(13): 33-37 (in Chinese)
- 刘伦, 刘浪浪, 刘军海. 糖脂类生物表面活性剂的研究进展[J]. 西部皮革, 2009, 31(13): 33-37
- [27] Konishi M, Nagahama T, Fukuoka T, et al. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(6): 702-705
- [28] Faria NT, Marques S, Fonseca C, et al. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048^T[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 71: 58-65
- [29] Zhang N, Zheng QS, Liu L, et al. Isolation of oil-degrading bacteria with biosurfactant production and its fermentation condition optimization[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(4): 133-137 (in Chinese)
- 张娜, 郑青松, 刘玲, 等. 产表面活性剂石油降解菌的筛选及发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4): 133-137