

## 研究报告

## 泡菜水中产生物表面活性剂酵母菌株的筛选

毕变变<sup>1,2</sup>, 邱勋瀚<sup>1,2</sup>, 曾思连<sup>1,2</sup>, 任佳丽<sup>1,2</sup>, 周波<sup>\*1,2</sup>

1 林产可食资源安全与加工利用湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004

2 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004

毕变变, 邱勋瀚, 曾思连, 任佳丽, 周波. 泡菜水中产生物表面活性剂酵母菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 153-162

Bi Luanluan, Qiu Xunhan, Zeng Silian, Ren Jiali, Zhou Bo. Screening of yeast with biosurfactant production from pickled vegetables[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 153-162

**摘要:**【背景】由微生物产生的生物表面活性剂(biosurfactant, BS)具有低毒性、高效性、生物可降解性等多种特性, 能在一定程度上缓解化学表面活性剂所造成的环境问题, 因此筛选高产、安全的 BS 生产菌株备受研究者的关注。【目的】从泡菜水中筛选能代谢合成药食两用型 BS 的微生物菌株。【方法】运用滴崩法和排油圈法从传统发酵食品泡菜水中筛选出产 BS 的菌株, 通过形态观察、生理生化鉴定、rDNA ITS 序列分析等方法确定菌株的种类, 并采用液滴塌陷直径、乳化活性和乳化稳定性鉴定 BS 的功能特性。【结果】从重庆市垫江区家用泡菜水中筛选到一株可产 BS 的曼式毕赤酵母(*Pichia manshurica*) YM-7, 该生物表面活性剂可使液滴直径提高 27.5%, 使磷酸盐缓冲液界面张力下降 49.21% (71.87 mN/m 降至 36.50 mN/m), 提取液与植物油等比例混合放置 8 d 后乳化指数可达 63.0% (空白对照放置 6 d 后降为 0)。【结论】从泡菜水中成功筛选出产表面活性剂的曼式毕赤酵母 YM-7, 其合成的表面活性剂具有良好的乳化性能, 在食品、药品和化妆品等领域具有一定的应用潜能。

**关键词:** 曼式毕赤酵母; 生物表面活性剂; 菌株筛选; 乳化性

基金项目: 长沙市自然科学基金(kq2014152); 湖南省创新型省份建设专项(2019TP1029)

Supported by: Changsha Natural Science Foundation (kq2014152); Special Project for the Construction of an Innovative Province in Hunan Province (2019TP1029)

\*Corresponding author: E-mail: zhbo78@126.com

Received: 2021-03-31; Accepted: 2021-07-05; Published online: 2021-09-07

# Screening of yeast with biosurfactant production from pickled vegetables

BI Luanluan<sup>1,2</sup>, QIU Xunhan<sup>1,2</sup>, ZENG Silian<sup>1,2</sup>, REN Jiali<sup>1,2</sup>, ZHOU Bo<sup>\*1,2</sup>

1 Hunan Key Laboratory of Forestry Edible Resources Safety and Processing, Changsha 410004, Hunan, China

2 College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

**Abstract:** [Background] Biosurfactants produced by microorganisms have many characteristics, such as low toxicity, high efficiency and biodegradability, which can alleviate the environmental problems caused by chemical surfactants. Therefore, the screening of high-yielding and safe biosurfactant-producing strains has attracted more attention. [Objective] To screen biosurfactant-producing strains for medicine and food use from pickled vegetable. [Methods] A biosurfactant-producing strain obtained from pickled vegetables by the method of drop collapse and oil displaced circle, and this strain was identified by morphological observation, physiological and biochemical identification, rDNA ITS sequence analysis. The composition and functional properties of biosurfactants were identified and determined by the method of droplet collapse diameter, emulsification activity and chemical analysis. [Results] A biosurfactant-producing strain, *Pichia manshurica* YM-7, was screened from household pickled vegetables in Dianjiang District, Chongqing. The biosurfactant increased the droplet collapse diameter by 27.5%, and decreased surface tension of phosphate buffered saline by 49.21% (from 71.87 mN/m to 36.50 mN/m). The emulsification index of the biosurfactant extracts reached 63.0% after being mixed with vegetable oil in equal proportions at 8 days (the control dropped to 0 after being placed for 6 days). [Conclusion] *P. manshurica* YM-7, an excellent biosurfactant-producing strain, was successfully screened from the pickled vegetable, and its biosurfactant has good emulsifying properties for certain application prospect in food, medicine and cosmetics industry.

**Keywords:** *Pichia manshurica*; biosurfactant; strain screening; emulsification

生物表面活性剂(biosurfactant, BS)是一种主要由微生物(细菌、真菌、酵母)产生的表面活性化合物,包括糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂和大分子聚合物等<sup>[1]</sup>。与化学合成的表面活性剂相比,BS不仅具有低毒性、生物可降解性、乳化性、抑菌性、抗生物膜性等多种优良性能<sup>[2]</sup>,而且在极端温度、pH值和盐度下也能够保持较强的稳定性,同时,BS在相对较低的浓度下也具有优于化学表面活性剂的应用性能<sup>[3]</sup>。目前,BS被报道在生物医学、食品和化妆品工业中都具有广泛的应用前景<sup>[4]</sup>。由于BS的诸多

优点,使得挖掘选育稳定、高产的BS生产菌株逐渐成为国内外学者的研究目标。

随着国内外学者对BS研究的深入,能代谢生成BS的各种来源的菌株不断被挖掘。目前发现能代谢合成BS的菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)、分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus* sp.)等<sup>[5]</sup>。相对于细菌而言,现报道有关生产BS的真菌种类稀少,主要集中在酵母菌(yeast)和曲霉菌

(*Aspergillus* sp.)。酵母菌是槐糖脂的主要生产菌, 包括假丝酵母(*Candida bombicola*)<sup>[6]</sup>、球拟酵母(*Torulopsis bombicola*)<sup>[7]</sup>和丝孢酵母(*Trichosporon asahii*)<sup>[8]</sup>。

已有许多 BS 的研究和专利报道<sup>[9]</sup>, 主要集中在 BS 的成分组成<sup>[4]</sup>、应用特性<sup>[10]</sup>、发酵优化<sup>[11-12]</sup>等方面。阻碍其工业化生产和应用的根本原因在于难以获得具有卓越 BS 生产能力的工业菌株, 无法实现菌株产量突破性的提升<sup>[1]</sup>, 其次是菌株本身的安全性受到质疑。因此选用遗传背景清晰的益生菌是降低其安全隐患和提升市场接受度的有效方法。益生菌的筛选最重要的一点就是严格把控菌种来源, 从安全无公害的基质中分离所需菌株, Fracchia 等<sup>[5]</sup>从白菜中分离得到乳杆菌 CV8LAC (*Lactobacillus* sp. CV8LAC), 该菌株所产的 BS 可使水的表面张力从 70.92 mN/m 降到 47.68 mN/m; Zakaria<sup>[13]</sup>从埃及乳制品中分离得到 10 种乳酸杆菌, 从中提取的 BS 表现出较高的抗菌和抗黏附性能; Madhu 等<sup>[14]</sup>从一种以大米为原料的发酵产品中分离得到植物乳杆菌 CFR2194 (*Lactobacillus plantarum* CFR2194), 该菌株所产的 BS 表现出优越的乳化性能, 对食源性致病菌具有较好的抑制作用。本文通过测定排油圈直径、液滴直径和乳化指数, 从中国传统发酵食品泡菜中筛选出具有较强产 BS 能力的酵母菌株, 并对该菌株进行生理生化鉴定和 rDNA ITS 序列分析以确定其种类。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

泡菜水取自重庆市垫江区永安镇(30°21'13.26"N, 107°30'44.22"E)。

#### 1.1.2 培养基

基础培养基(g/L): 牛肉膏 8.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 4.0, 葡萄糖 20.0, 乙酸钠 5.0, 柠檬酸氢二铵 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, MnSO<sub>4</sub> 0.04。pH 7.0–7.5。

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)固体培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母粉 10.0, 葡萄糖 20.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0–20.0。pH 7.0–7.2。

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 葡萄糖 10.0, NaCl 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0。pH 7.0–7.2。

培养基所需试剂均为分析纯, 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 菌株筛选

#### 1.2.1 富集培养

将泡菜水样品按 3% (体积分数)的接种量接种到基础培养基, 在 30 °C、150 r/min 条件下摇瓶培养 3 d。

#### 1.2.2 滴崩法平板初筛

将富集培养液涂布在 YPD 固体培养基上, 30 °C 培养 24 h 后, 挑取单菌落进行划线, 30 °C 培养 48 h, 利用 BS 能够降低油界面张力的特性, 分别滴一滴植物油在菌苔和无菌生长的 YPD 固体培养基上静置 30 s, 观察植物油的扩展情况, 选取油滴扩展状态良好的菌株进行下一步验证。

#### 1.2.3 排油圈法复筛

利用排油圈法检测菌株产物的表面活性, 将初筛得到的菌株分别接入基础培养基, 30 °C、150 r/min 培养 48 h, 10 °C、8 000 r/min 离心 5 min 得到菌体沉淀, 在蒸馏水中洗涤 2 次后悬浮在 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中, 在 25 °C、120 r/min 条件下洗脱 4 h, 再次离心后得到的

上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤得到 BS 粗提液<sup>[15-16]</sup>, 将得到的 BS 粗提液进行排油圈实验并测量排油圈直径, 每个排油圈实验重复 3 次, 选择具有最大排油圈直径的菌株做进一步研究。

### 1.3 菌株形态学观察及生理生化实验

利用光学显微镜和扫描电子显微镜观察菌株形态及细胞表面三维立体结构, 并对其进行生理生化检验<sup>[17]</sup>。

### 1.4 菌株系统发育树的构建

根据测序结果将菌株的 rDNA ITS 序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 将结果导入 MEGA-X 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

### 1.5 BS 的提取及分析

#### 1.5.1 BS 的提取纯化

将筛选菌株按 2% 的接种量接种到 1 L 基础培养基中, 在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下摇瓶培养 48 h, 10  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 5 min 得到菌体沉淀, 用蒸馏水洗涤 2 次, 悬浮在 100 mL pH 7.0 的 0.01 mol/L 的 PBS 中, 在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 条件下洗脱 4 h, 再次离心后取上清液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌即得 BS 粗提液。将 BS 粗提液分装到 9 个试管中, 每个试管 10 mL, 再将每个试管的 pH 值分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 经实验观察, 液体开始出现浑浊的 pH 值为 4.0, 从而判断该提取液等电点在 pH 4.0 左右, 离心后将沉淀冷冻干燥放置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用<sup>[14]</sup>。

#### 1.5.2 表面活性分析

表面活性分析实验所用 BS 粗提液提取方法参见 1.5.1。

排油圈法<sup>[18]</sup>: 取直径为 9 cm 的培养皿, 加 40 mL 蒸馏水并在水面滴加 200  $\mu\text{L}$  的液体石蜡, 形成油膜后在中央滴加 100  $\mu\text{L}$  的 BS 粗提液, 测量排油圈直径, 实验重复 3 次。

液滴塌陷直径测定<sup>[19]</sup>: 用胶头滴管吸取 BS 粗提液, 将其滴在石蜡板上, 以 PBS 缓冲液为对照, 利用生物表面活性剂可降低水的界面张力从而使液滴塌陷, 记录塌陷后的液滴直径, 实验重复 3 次。

表面张力测定: 用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液进行菌体洗涤和产物洗脱得到 BS 粗提液, 以 PBS 缓冲液为对照, 采用吊片法利用表面张力仪测定 BS 粗提液表面张力, 实验重复 3 次。

乳化稳定性测定<sup>[20]</sup>: 分别移取 3 mL 的 BS 粗提液和 3 mL 植物油于试管中, 剧烈振荡 2 min, 静置观察乳液析出情况, 测量静置 1、2、3、4、6、8 d 后的乳液高度, 计算乳化指数(emulsification index, EI)并以此衡量其乳化稳定性, 实验重复 3 次。

$$\text{乳化指数(EI)} = \frac{\text{乳化液高度}}{\text{液面总高度}} \times 100\%。$$

#### 1.5.3 遗传稳定性实验

将需要检测的目标菌株在 YPD 固体培养基上划线培养, 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h, 连续培养 5 代后进行发酵实验, 重复共计 5 次。

### 1.6 数据分析

实验所有数据均采用 IBM SPSS Statistics V25 软件进行分析, 实验数据均以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式表示, 每个实验重复 3 次, 统计比较采用组内  $t$  检验,  $P < 0.05$  为显著差异。采用 OriginPro V8 软件绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物表面活性剂生产菌株的筛选

挑取单菌落划线培养形成菌苔, 在菌苔上进行滴崩法实验, 可观察到菌苔上油滴有明显的扩展现象(图 1A), 以此为指标筛选出 8 株阳性菌, 命名为 YM-1-YM-8。为进一步确定菌株产生物表面活性剂能力的大小, 将初筛得到的

菌株分别接入基础培养基进行发酵培养, 结果表明 YM-7 菌株表面活性剂提取液的排油圈直径最大达到 $(5.10 \pm 0.10)$  cm, 与其他所选菌株排油圈直径存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 因此选择该菌株做进一步研究(图 1B)。

## 2.2 YM-7 菌株的鉴定

### 2.2.1 YM-7 菌株的形态及生理生化鉴定

YM-7 菌株菌落呈亮白色、圆形、隆起, 表

面粗糙, 无晕环。细胞大小为 $(3.0-5.0) \mu\text{m} \times (5.0-8.0) \mu\text{m}$ 的规则短杆状(图 2), 通过扫描电子显微镜观察, 该菌株可产生芽体, 呈帽形, 而且细胞表面附着有白色物质(图 3)。

对 YM-7 菌株进行生理生化鉴定, 结果表明, 该菌株不可产生淀粉酶和明胶酶, 可产生过氧化氢酶, 能分解蛋白胨中的色氨酸生成吡啶, 不能利用柠檬酸作为碳源, 并且 YM-7 菌

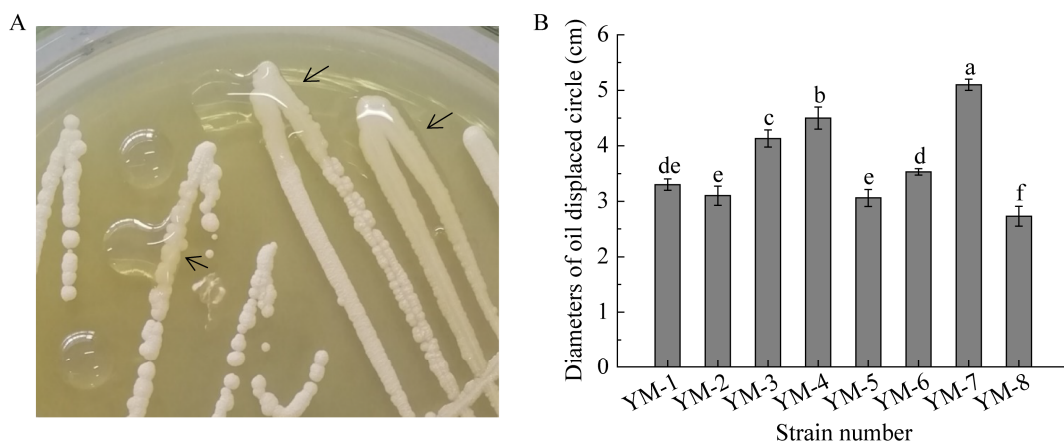


图 1 可产生物表面活性剂的菌株的筛选 A: 油滴在菌苔上的扩展现象; →: 指向油滴扩展显著区域。B: 初筛菌株的排油圈直径; a-f: 不同字母表示数据之间存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 相同字母表示数据之间不存在显著性差异( $P > 0.05$ )

Figure 1 Screening of strains with the capable of producing surfactants. A: The spread of oil droplets on lawn; →: There is a marked expansion of the oil droplets on the lawn. B: Diameters of oil displaced circle of primary screening strains; a-f: There are significant differences between the data represented by different letters ( $P < 0.05$ ) and there is no significant difference between the data represented by the same letter ( $P > 0.05$ ).

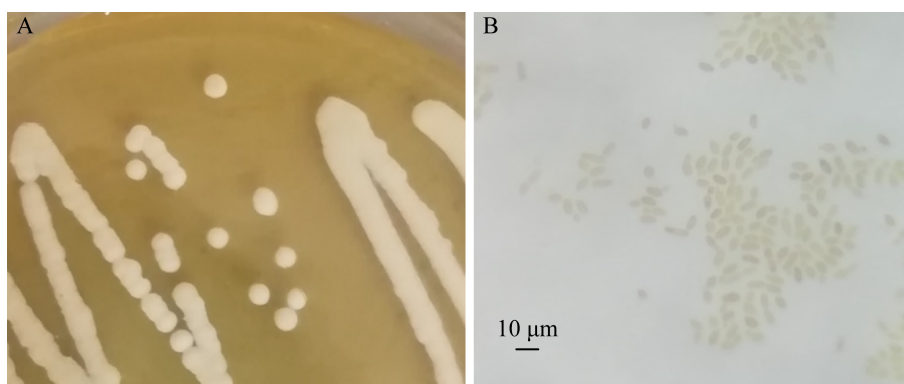


图 2 YM-7 菌株的菌落和细胞形态 A: 菌落图片; B: 显微镜下细胞形态(400×)

Figure 2 Colony morphology and cell morphology of YM-7 strain. A: Colony picture; B: Cell morphology under a microscope (400×).

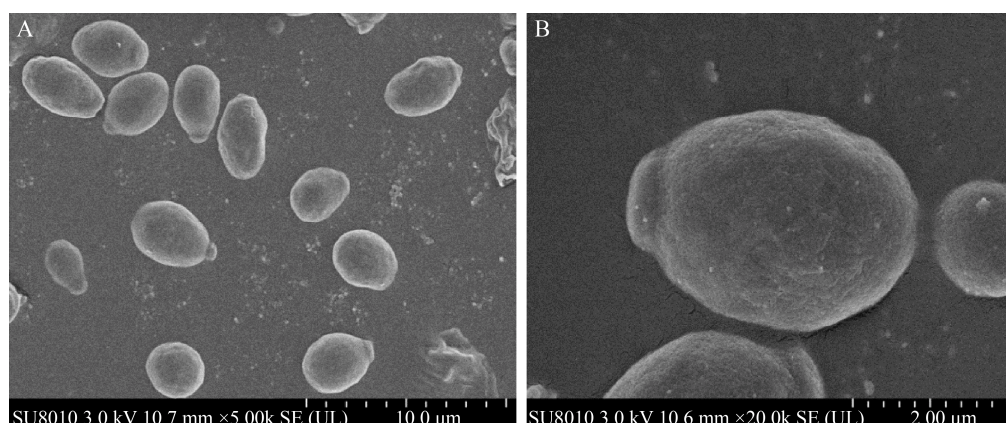


图3 YM-7菌株的扫描电镜图

Figure 3 SEM of strain YM-7. A: 5 000×; B: 20 000×.

株发酵不产气, 分解葡萄糖产生非丙酮酸的酸性物质, 在1%的醋酸中仍可生长, 具有较强的酸耐受性(表1)。

### 2.2.2 YM-7菌株系统发育树的建立

采用PCR扩增技术得到YM-7菌株的rDNA ITS基因序列, 在GenBank登录号为MZ959801。根据测序结果将菌株的rDNA ITS序列在NCBI上进行BLAST分析, 结果表明YM-7菌株与曼式毕赤酵母菌(*P. manshurica*)的相似性为99%,

通过软件MEGA-X对菌株YM-7构建系统发育树(图4), 该菌株与曼式毕赤酵母在系统发育树上处于同一分支, 可初步鉴定菌株YM-7为曼式毕赤酵母菌属, 拟命名为曼式毕赤酵母菌YM-7 (*P. manshurica* YM-7)。

### 2.3 YM-7菌株生长曲线及产物表面活性鉴定

#### 2.3.1 YM-7菌株生长曲线

YM-7菌株产物的提取主要针对胞壁结合或分泌到细胞表面的BS, 因此通过对菌株生长曲线的测定判断达到最大生物量所需时间, 从而确定最低培养时间, 尽可能提高目标菌株次级代谢产物的产量。YM-7菌株在8–42 h呈现出持续性的增长, 在48 h达到最大值, 因此最佳发酵培养时间应不低于48 h(图5)。

#### 2.3.2 YM-7菌株产物对液滴塌陷直径的影响

根据BS能够降低液体表面张力的特性, 通常采用测定表面张力、排油圈直径和液滴塌陷直径的方式对菌株产物的表面活性进行表征, 其中液滴塌陷直径能够更简便直观地展示菌株产BS的能力。将菌体生物表面活性剂粗提液滴在石蜡板上, 静置2–3 min, 经过测量, BS粗提液的液滴直径达到 $(10.20 \pm 0.26)$  mm, 而对照组

表1 菌株YM-7生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification results of strain YM-7

Test items	YM-7
Sugar decomposition test (acid production)	+
Sugar decomposition test (gas production)	–
Indole test	+
V-P test	–
Methyl red test	–
Starch hydrolysis test	–
Citrate utilization test	–
Contact enzyme test	+
Gelatin liquefaction test	–
1% acetic acid growth test	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.



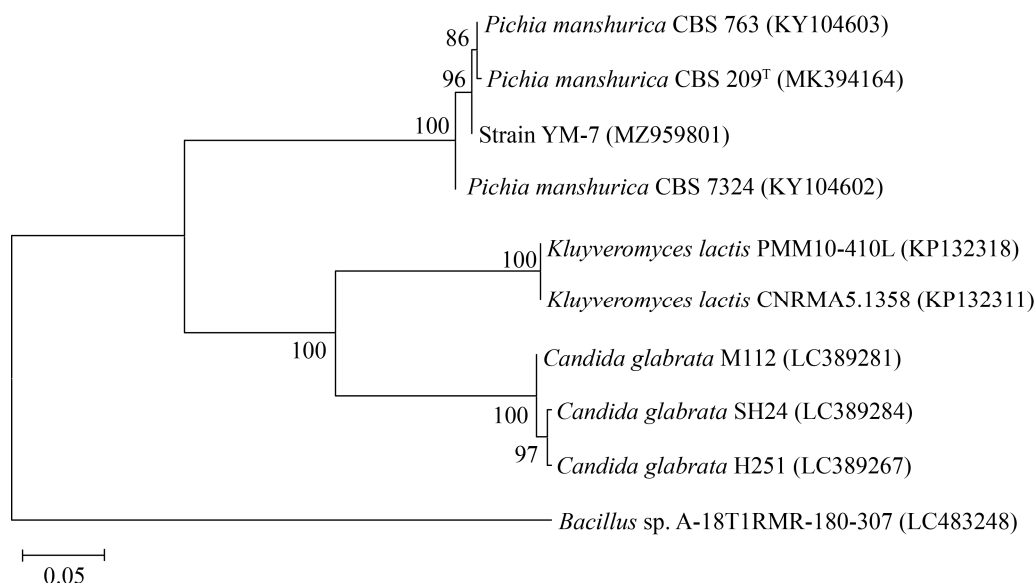


图4 菌株 YM-7 的系统发育树 <sup>T</sup>: 模式菌株; 括号内序列号: 该菌株在 GenBank 上的注册号; 分支点数字: 自展值; 比例尺: 遗传距离

Figure 4 Phylogenetic tree of strain YM-7. <sup>T</sup>: Type strain; Serial number in parentheses: The registration number of the strain on GenBank; Branch point numbers: Bootstrap value; Scale: Genetic distance.

的 PBS 缓冲液为  $(8.00 \pm 0.17)$  mm, 液滴直径提高了 27.50% (图 6), 结果表明, YM-7 菌株产物可显著降低液体的界面张力。

### 2.3.3 YM-7 菌株产物对液滴表面张力的影响

用 PBS 缓冲液进行菌体洗涤和洗脱后得到的 BS 粗提液表面张力为  $(36.50 \pm 0.19)$  mN/m,

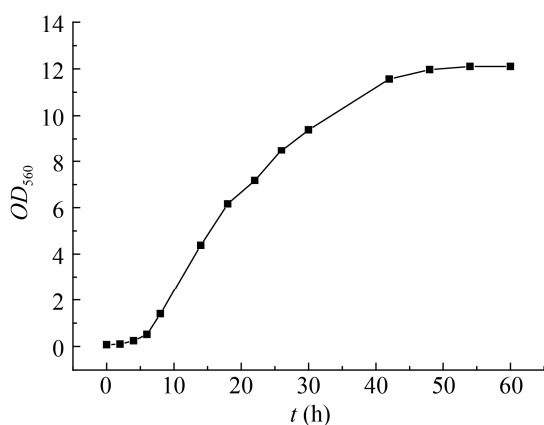


图5 YM-7 菌株生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain YM-7.

而 PBS 缓冲液为  $(71.87 \pm 0.10)$  mN/m, 表面张力下降 49.21%, 研究结果表明 YM-7 菌株代谢生成的 BS 能够显著降低液体表面张力。

### 2.3.4 YM-7 菌株产物的乳化稳定性

以 PBS 缓冲液为空白对照, YM-7 菌株产物的乳化指数在 1-3 d 从 100% 下降至 93.5%, 下降幅度小, 在 3-8 d 下降速率增加, 但与对照组相比仍可保持较高乳化水平且稳定性良好 (图 7)。

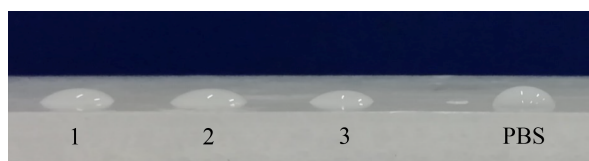


图6 液滴塌陷直径测定 1-3: YM-7 菌株产生的生物表面活性剂

Figure 6 Droplet collapse diameter determination. 1-3: YM-7-derived biosurfactant.

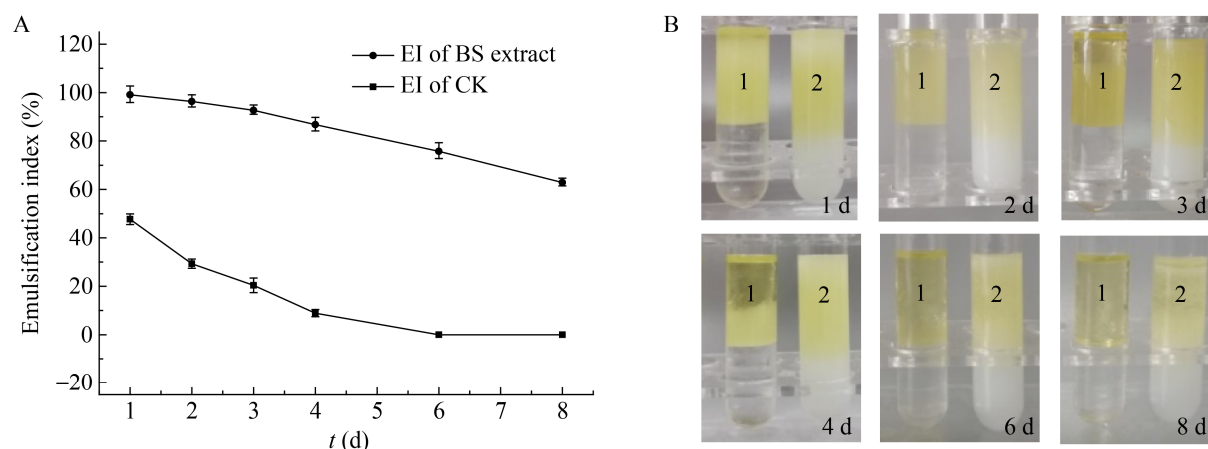


图7 YM-7菌株生物表面活性剂乳化稳定性 A: YM-7菌株生物表面活性剂乳化稳定性。B: 乳化稳定性真实效果图; 1: 磷酸盐缓冲液; 2: 生物表面活性剂粗提液

Figure 7 Surfactant emulsion stability of strain YM-7-derived biosurfactant. A: Surfactant emulsion stability of strain YM-7. B: Physical picture of surfactant emulsification stability (1 and 2 are phosphate buffered saline and BS extracts respectively).

### 2.3.5 遗传稳定性结果分析

将诱变得到的产生物表面活性剂菌株接种到 YPD 固体培养基上, 30 °C 培养 2 d, 按照 1.5.1 的方法进行液态发酵和生物表面活性剂的提纯, 连续传代 5 次, 测定提取液的排油圈直径和乳化指数, 测定方法同 1.5.2。结果表明, YM-7 菌株具有较稳定的产生物表面活性剂能力, 排油圈直径保持在 5.0 cm 左右, 而且乳液静置 3 d 后乳化指数保持在 85% 左右。

## 3 讨论与结论

基于生物表面活性剂低毒性、高效性、生物可降解性等优点, 挖掘选育稳定、高产生物表面活性剂的生产菌株一直是国内外学者的研究热点。本文通过富集培养, 采用滴崩和排油圈等方法, 首次从重庆泡菜水中分离得到可产表面活性剂的曼式毕赤酵母菌 (*P. manshurica*) YM-7, 并对其代谢合成的表面活性剂的乳化性能进行分析, 结果表明筛选获

得的曼式毕赤酵母菌 YM-7 代谢合成的生物表面活性剂粗提液可显著降低液体的表面张力, 表现出优良的乳化性能, 其中放置 8 d 后的乳化指数为 63.00%, 表面张力降低 49.21%。

本研究首次从发酵食品泡菜水中分离获得产生物表面活性剂的曼式毕赤酵母菌, 在一定程度上保证了其产物的安全性, 扩充了产生物表面活性剂的菌种类型。将生物表面活性剂作为乳化剂、保湿剂、洗涤剂用在食品和化妆品工业中, 对于提高和保持食品的营养价值、质地外观以及提升化妆品和药品的递送效率具有重要意义<sup>[9,21]</sup>。同时, 虽然通过优化培养基和环境条件可提高产物产量<sup>[22]</sup>, 但实现生物表面活性剂精准高效的工业化生产需通过相关的遗传手段构建工业底盘才能从根本上解决问题, 本研究筛选获得的曼式毕赤酵母菌属于遗传背景非常清楚的单细胞真核生物, 为工程化具有卓越表面活性剂生产能力且遗传稳定的工业菌株创制提供了可能。目前已通过苯酚硫酸法、茚三酮显



色法、双缩脲法初步判定生物表面活性剂粗提液中含有糖类、氨基酸、多肽类物质,但化学法结果易受粗提液中杂质影响而呈阳性,需进一步将粗提液分离纯化并采用更精确手段进行结构表征。后期研究将侧重于该菌株所产生物表面活性剂的提取纯化、结构鉴定和安全性探究,研究菌株最佳发酵条件和外部环境胁迫对其产量的影响,以及如何通过分子生物学手段构建高产生物表面活性剂的工程菌,为其今后工业化、规模化生产奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Das P, Mukherjee S, Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2008, 25(1): 165-186
- [2] Saravanan V, Vijayakuma S. Biosurfactants-types, sources and applications[J]. *Research Journal of Microbiology*, 2015, 10(5): 181-192
- [3] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(1): 47-64
- [4] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(5): 495-508
- [5] Fracchia L, Cavallo M, Allegrone G, Martinotti MG. A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers[J]. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010: 827-837
- [6] Casas JA, García De Lara S, García-Ochoa F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21(3): 221-229
- [7] Kim SY, Oh DK, Lee KH, Kim JH. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(1): 23-26
- [8] Preethy C, Nilanjana D. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil[J]. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2010, 2(12): 6942-6953
- [9] Nguyen TTL, Edelen A, Neighbors B, Sabatini DA. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: formulation and potential applications[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, 348(2): 498-504
- [10] Roongsawang N, Hase KI, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactorsynthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(9): 869-880
- [11] Haba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(3): 379-387
- [12] Nitschke M, Pastore GM. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2): 336-341
- [13] Zakaria Gomaa E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by *Lactobacilli* isolates, biofilm formation and aggregation ability[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2013, 59(6): 425-436
- [14] Madhu AN, Prapulla SG. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(4): 1777-1789
- [15] Cornea CP, Roming FI, Siciua OA, Voaides C, Zamfir M, Grosu-Tudor SS. Biosurfactant production by *Lactobacillus* spp. strains isolated from Romanian traditional fermented food products[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2016, 21(2): 11312-11320
- [16] Augustin M, Hippolyte MT. Screening of biosurfactants properties of cell-free supernatants of cultures of *Lactobacillus* spp. isolated from a local fermented milk (Pendidam) of ngaoundere (Cameroon)[J]. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2012, 2(5): 974-985
- [17] 王大威, 刘永建, 林忠平, 杨振宇, 郝春雷. 一株产生脂肽的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及脂肽对原油的作用[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 304-311

- Wang DW, Liu YJ, Lin ZP, Yang ZY, Hao CL. Isolation and identification of surfactin producing *Bacillus subtilis* strain and its effect of surfactin on crude oil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(3): 304-311 (in Chinese)
- [18] 胡孝丛. 产生物表面活性剂菌株的筛选及发酵条件的优化[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2010
- Hu XC. Screening of biosurfactant-producing bacterial strains and optimization of culture conditions[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2010 (in Chinese)
- [19] Tahmourespour A, Salehi R, Kasra Kermanshahi R. *Lactobacillus acidophilus*-derived biosurfactant effect on GTFB and GTFC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(1): 330-339
- [20] Lima ÁS, Alegre RM. Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2009, 52(2): 285-290
- [21] Sarubbo LA, Farias CBB, Campos-Takaki GM. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*[J]. Current Microbiology, 2007, 54(1): 68-73
- [22] Sen R, Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21(2): 141-148