

糖脂生物表面活性剂——甘露糖赤藓糖醇脂的研究进展

范琳琳^{1,2}, 张俊^{1,2}, 蔡瑾^{1,2}, 董亚晨^{1,2}, 徐腾洋^{1,2}, 何国庆^{1,2}, 陈启和^{1,2}

1 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058

2 浙江省食品微生物技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310058

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. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1223-1233.

Fan LL, Zhang J, Cai J, et al. Advance in glycolipid biosurfactants—mannosylerythritol lipids. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1223-1233.

摘 要: 甘露糖赤藓糖醇脂是一种糖脂类生物表面活性剂, 主要由霉菌和酵母菌等微生物发酵生产, 具有良好表面活性和特殊生物活性, 其在食品、医药、化妆品等领域有着潜在的应用前景。近年来, 其研究在国外备受关注, 而国内却鲜有报道。文中综述了甘露糖赤藓糖醇脂的发酵生产、多样性结构及活性、构效关系、生物合成途径等方面的相关研究, 对存在问题进行了分析, 并探讨了今后的研究重点。

关键词: 甘露糖赤藓糖醇脂, 生物表面活性剂, 合成途径

Advance in glycolipid biosurfactants—mannosylerythritol lipids

Linlin Fan^{1,2}, Jun Zhang^{1,2}, Jin Cai^{1,2}, Yachen Dong^{1,2}, Tengyang Xu^{1,2}, Guoqing He^{1,2}, and Qihe Chen^{1,2}

1 College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Food Microbiotechnology Research, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Mannosylerythritol lipids (MELs), mainly produced by *Ustilago* and *Pseudozyma*, are surface active compounds that belong to the glycolipid class of biosurfactants. MELs have potential application in food, pharmaceutical

Received: December 6, 2012; **Accepted:** April 24, 2013

Supported by: The New-Century Excellent Talent Supporting Program of Ministry of Education (No. NCET-12-0482).

Corresponding author: Qihe Chen. Tel: +86-571-86984346; E-mail: chenqh@zju.edu.cn

教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-12-0482) 资助。

网络出版时间: 2013-07-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130710.1618.003.html>

and cosmetics industries due to their excellent surface activities and other peculiar bioactivities. In recent years, the research field of MELs has regained much attention abroad. However, MELs are rarely studied in China. In this review, the producing microorganisms and production conditions, diverse structures, biochemical properties, structure-function relationship and biosynthetic pathways of MELs are described. Some research problems and prospects are summarized and discussed as well.

Keywords: mannosylerythritol lipids, biosurfactant, biosynthetic pathways

甘露糖赤藓糖醇脂 (Mannosylerythritol lipids, MELs) 是一种糖脂类生物表面活性剂, 与槐糖脂、鼠李糖脂相比, 是现今国内研究较少的一类糖脂。MELs 不仅具有良好的乳化性、生物降解性、较低的临界胶束浓度等^[1], 还具有许多特殊的生理活性, 如抑制微生物生长^[2]、诱导细胞变异^[3-6]、可分化人类骨髓性白血病细胞系和黑素瘤细胞^[7-9]、提高基因转染效率^[10]、与糖蛋白有较强的配位能力^[11-12]等, 可应用于环保、食品、化妆品、医药等行业。迄今报道的产生 MELs 的微生物主要有霉菌、酵母菌。采用生长细胞法^[13]、休止细胞法^[14]和固定化细胞法^[1]等不同的生产方式, MELs 产量不尽相同, 国外研究报告最高产量可达 165 g/L^[15], 因此其产业化前景受到人们的关注, 相关研究也日益得到重视。

由于缺乏对 MELs 生产菌种筛选、菌种改造的基础研究, 加之其合成量不高, 分离纯化成本高, 产业化技术不成熟等原因, 国内关于 MELs 的研究较少, 仅华兆哲^[16]、朱文昌^[17]等报道了假丝酵母生产 MELs 的研究, 主要集中在发酵生产方面。而国外对 MELs 的研究相对较多, 主要包括微生物来源、生产条件、结构、应用等各方面, 并取得了一些研究进展, 但相关研究还处于实验室阶段, 技术尚未成熟, 仅有少数产业化^[18]。有关 MELs 的生物合成机理至今尚未完全揭示。本文对 MELs 的微生物发酵生产、结构、合成途径、

生物活性等方面研究进行总结, 并讨论和展望了其今后的研究方向, 以期对 MELs 的系统研究提供参考。

1 MELs 的微生物发酵生产

生产 MELs 的表面活性剂的微生物很多是从植物叶和变质水果^[19]、工厂废水^[20]、深海中^[21]等筛选获得。其培养酵母的 YM 琼脂培养基含有 1.0% 葡萄糖, 0.5% 蛋白胨, 0.3% 酵母浸出粉, 0.3% 麦芽浸出粉, 2.0% 琼脂, 有时也添加链霉素、氯霉素等抗生素。种子培养基主要为 4% 葡萄糖, 0.3% NaNO₃, 0.03% MgSO₄, 0.03% KH₂PO₄, 0.1% 酵母浸出粉 (pH 6.0), 在 25 °C 摇床培养 (150 r/min) 2d^[19,22-24]。将 1 mL 种子菌液加到含有 30 mL 发酵培养基的 300 mL 三角瓶中, 在 28 °C 下摇床 (150 r/min) 培养 7d。发酵培养基成分为 4% 碳源, 0.3% NaNO₃, 0.03% MgSO₄, 0.03% KH₂PO₄, 0.1% 酵母浸出粉 (pH 6.0)。微生物可利用碳源的种类很多, 采用廉价的工农业废弃物, 如糖蜜、秸秆、地沟油等作为发酵基质, 不仅可以降低生产成本, 而且可以实现综合利用工农业产品副产物的目的, 有望获得新型的 MELs 衍生物。

表 1 总结了目前已报道的几种具有生产 MELs 的微生物发酵条件、产物组成、生产水平和表面性质。从表 1 可以看出, 不同的微生物合

表 1 生产 MELs 的微生物发酵条件及不同产物组成和性质

Table 1 Microorganisms, fermentation conditions, various homologs and properties of MELs

Microorganisms	Conditions	MEL homologs	CMC (mol/L)	Surface tension (mN/m)	Yield (g/L)
<i>Candida antarctica</i> ^[2]	Soybean oil, batch culture	MEL-A	2.7×10^{-6}	28.4	40.0
<i>Candida antarctica</i> ^[14]	n-alkanes, batch culture	MEL-A, -B, -C			140.0
<i>P. aphidis</i> DSM 14930 ^[15]	Soybean oil, fed batch	MEL-A, -B, -C			165.0
<i>P. churashimaensis</i> sp. nov. ^[19]	Glucose, in shake flask	MEL-A2	1.7×10^{-6}	29.2	
<i>P. shaxiensis</i> ^[22]	Glucose, in shake flask	MEL-C	3.6×10^{-4}	33.8	
<i>P. aphidis</i> DSM 70725 ^[23-24]	Soybean oil, fed batch	MEL-A, -B			75.0
<i>Ustilago maydis</i> DSM 4500 and ATCC 1482 ^[25]	Sunflower oil, batch culture	MEL-A			30.0
<i>Ustilago scitaminea</i> NBRC32730 ^[26]	Sugarcane juice, in jar fermenter	MEL-B	3.7×10^{-6}	25.2	25.1
<i>Candida</i> sp. SY16 ^[27]	Soybean oil	MEL-A	1.5×10^{-6}		
<i>P. rugulosa</i> NBRC 10877 ^[28]	Soybean oil and erythritol, fed batch	MEL-A, -B, -C			142.0
<i>P. hubeiensis</i> KM-59 ^[29]	Soybean oil, batch culture	MEL-C	6.0×10^{-6}	25.1	76.3
<i>P. tsukubaensis</i> JCM 103241 ^[30]	Soybean oil, in shake flask	MEL-B			30.0
<i>P. hubeiensis</i> SY62 ^[31]	Glucose and olive oil fed batch	MEL-A, -B, -C	1.1×10^{-5}		129±8.2
<i>P. aphidis</i> and <i>P. graminicola</i> ^[32]	Soybean oil, in shake flask	MELs, CL			
<i>P. parantarctica</i> ^[33]	Olive oil and mannitol	MML	2.6×10^{-6}	24.2	18.2

成的 MELs 类型不同。同一菌种在不同的发酵条件下,得到的 MELs 产物类型和水平也不尽相同。采用补料分批培养的方法可以有效提高产物产量。基于前人研究基础,本课题组筛选并获得了假丝酵母 *Pseudozyma aphidis*, 并对植物油进行生物转化合成糖脂,得到了不同类型的 MELs,其中以 MEL-A 为主。

MELs 分离方法主要采用有机溶剂萃取法,以等体积的乙酸乙酯萃取发酵液,将有机相旋转蒸发获得粗品。尽管溶剂萃取法简单、易操作,但溶剂用量大、成本高,对环境污染严重。而将吸附法与有机溶剂萃取法结合使用,或者辅以热处理等方法,可以得到较好的分离效果。Rau 等^[24]采用了离子交换树脂吸附、有机溶剂萃取、

100 °C~121 °C 加热发酵液富集产物等不同方法分离 MELs。其中热处理会使 MELs 不断转化为固相,产物富集率达 93%,纯度为 87%。此方法简单、成本低,较适合工业化生产应用。MELs 的纯化一般采用液相制备,或采用硅胶柱层析方法,这样可以获得纯度较高的产品,但会造成产物及试剂的浪费,并不适合大量制备。

2 MELs 的多样化结构与构效关系

2.1 MELs 的结构和非对映体构型

MELs 的结构主要以 4-O-β-D-吡喃甘露糖-内消旋-赤藓糖醇作为亲水基部分,以脂肪链或糖基上的乙酰基为疏水部分。已报道的 MELs 有 4 种不同的结构类型^[34],根据糖基上乙酰基的数

目及位置不同分别为 MEL-A (含有 2 个乙酰基)、MEL-B (C-6 位含有乙酰基)、MEL-C (C-4 位含有乙酰基) 和 MEL-D (不含乙酰基), 其结构如图 1 所示。

由于赤藓糖基的碳原子手性不同, 酰基基团在甘露糖或者赤藓糖醇或者两者上的位置和数量不同, 以及脂肪酸链长和饱和度差异, MELs 的结构呈现出多样性, 有多种非对应异构体的存在。Fukuoka 等^[35]研究了 *Pseudozyma crassa* 生产的新型胞外 MELs 非对映体, 发现其结构类似于已知的 MEL-A、MEL-B 和 MEL-C, 但赤藓糖醇的立体构型完全不同, 为 4-O-β-D-吡喃甘露糖-(2R,3S)-赤藓糖醇结构, 并且在甘露糖基部分含有短链脂肪酸 (C₂ 或 C₄) 和长链脂肪酸 (C₁₄, C₁₆ 或 C₁₈), 与有中链脂肪酸的 MELs 相比, 具有不同的性质。由 *Pseudozyma tsukubaensis* 发酵得到的 MELs, 糖基部分为 1-O-β-D-吡喃甘露糖-D-赤藓糖醇, 确定后的结构是 1-O-β-(2',3'-二-O-酰基-6'-O-酰基-D-吡喃甘露糖)-D-赤藓糖醇。这与已知的 MEL-B 具有相反的构型, 结构如图 2 所示^[36]。由 *Pseudozyma antarctica* 和 *Pseudozyma rugulosa* 以大豆油为碳源, 发酵生产得到一种疏

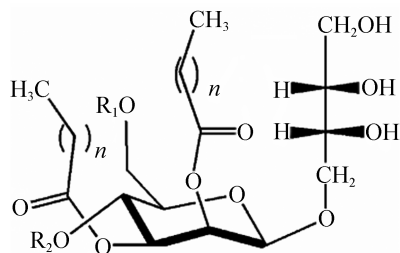


图 1 MEL 的结构^[34]

Fig. 1 Structure of MEL^[34]. MEL-A: R₁=R₂=Ac; MEL-B: R₁=Ac, R₂=H; MEL-C: R₁=H, R₂=Ac, n=6-10; MEL-D: R₁=R₂=H, n=4-14.

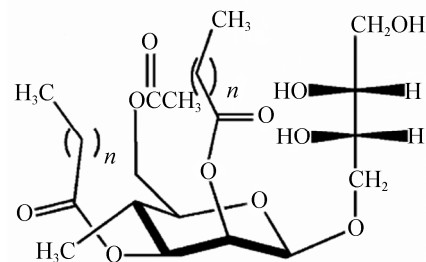


图 2 由 *P. tsukubaensis* 生产 MEL-B 非对应异构体^[36]
Fig. 2 Diastereomer of MEL-B from *P. tsukubaensis*^[36].
n=6-12.

水性较强的含有 3 个乙酰基的 MEL^[37]。从甘蔗分离出的新型菌种 *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov. 发酵生产出的 MEL-A2 也是含有 3 个乙酰基的 MEL^[19]。这些新型产物的发现丰富了 MELs 的结构种类, 其相关性还有待进一步探讨。

2.2 MELs 的构效关系

物质的化学结构决定其理化性质, 进而决定其功能活性。迄今有关 MELs 构效关系的研究仍较少。

Fukuoka 等^[38]前期用脂肪酶将已知的 MELs 水解, 得到了新型 MEL-D, 与未被水解的 MELs 相比, MEL-D 具有较高的临界胶束浓度 (CMC=1.2×10⁻⁵ mol/L) 和亲水性, 具有很好的降低表面张力的活性 (在临界胶束下的表面张力为 24.5 mN/m)。

作为一种非离子表面活性剂, MELs 在高浓度的条件下会自组装成三维有序的溶致液晶相, 包括稳定性囊泡、单分子层、多层脂质体、海绵状结构等^[10,39-40]。这种特殊的结构靠糖基之间的氢键维持体系稳定。MELs 的液晶结构能够赋予其润湿性质, 其多层脂质体能够促进 MELs 与细胞膜的融合, 有利于活性物质作用于细胞。

研究发现 MEL-A 有 2 个临界胶束浓度, 并

在高浓度下,能够自组织形成 L_3 海绵状结构,而 MEL-B 在高浓度时能够形成 L_α 的薄层状结构^[41]。MEL-A 与免疫球蛋白有强亲和性,而 MEL-B 几乎没有此功能^[42]。由此可以看出,乙酰基基团与 MELs 的自组装结构形成有关,决定着生物活性功能的发挥。Fukuoka 等^[43]对比研究了具有相似脂肪酰基的同源 R-型 (MEL-BD) 和 S-型 (MEL-B BD) 4 种 MELs 异构体的界面性质和自组装性质。其中 R-型 MELs 显示出了较高的临界胶束浓度和亲水性,并且容易形成相对较大的囊泡结构。对比 4 种 MEL-水体系的二元相图、水相行为以及异构体在不同浓度范围内自组装成的单分子层结构,发现 R-型 MELs 的单相范围比 S-型 MELs 宽,随着层间距的伸展,R-型 MELs 的极层聚集了更多的水分子。可见,MELs 糖基构型的差异影响其界面性质、自组装和水合作用。这是首次详细报道 MELs 的结构与功能的相关性,主要是对糖基的不同构型及由此调控的表面性质差异进行了研究,MELs 的构效关系还有待深入探讨。基于已报道的 MELs 具有酸碱不稳定性特征以及水溶性差的性质,对其进行分子结构修饰或改造就显得尤为必要。笔者尝试利用不同的分子修饰技术对发酵生产得到的 MELs 进行分子结构及生物活性改性,以期深入研究其构效关系,并得到高效活性产物,扩大其应用范畴(结果待发表)。

3 MELs 的特殊活性及其应用

MELs 不仅具有多变的结构,还具有特殊的性质,有良好的生物相容性、生物降解性、无毒等特质,MELs 应用前景将更加广泛。

3.1 基因转染的载体

由于具有热力学稳定性、自组装性质以及与细胞膜的融合性质,MEL-A 可以显著提高基因转染效率,能够加速阳离子脂质体-DNA 复合体与细胞膜的融合,有利于复合物进入细胞,这为用于基因治疗的非病毒载体的开发奠定了理论基础。Ding 等^[44]研究了 MEL-A 和 Tween80 对 A549 细胞和小鼠肺部 MHAPC-脂质体(与 PCMV-luc DNA 的复合物)基因转染的影响,结果发现 MEL-A 显著提高了体外 MHAPC-脂质体的基因转染率。MEL-A 不饱和脂肪酸比例对基因转染率也有影响^[45]。

3.2 诱导细胞变异和细胞凋亡

MELs 具有诱导细胞变异和细胞凋亡的活性。Zhao 等^[9]首次报道了 MELs 能够以剂量依存方式明显抑制小鼠黑色素瘤 B16 的生长。当 MELs 浓度在 $10 \mu\text{mol/L}$ 或者更高时,能够引起 B16 cells 染色体凝聚、DNA 断裂、二倍体 G1 周期阻滞等,出现细胞凋亡现象。MELs 还能够诱导黑色素瘤细胞的变异表达,影响酪氨酸酶活性和黑色素的分泌,加速细胞凋亡和变异;能够诱导白血病细胞株 HL60 发生形态学的变异,并抑制丝氨酸和苏氨酸在完整细胞内的磷酸化作用,其机制可能是 MELs 对细胞质膜的直接特异性作用^[5]。除此之外,MELs 可以抑制肥大细胞分泌炎症因子^[46]。MELs 的这种特殊活性,有望应用于抗炎症、抗肿瘤新药的研发。

3.3 抗氧化性及修复功能

研究生物表面活性剂潜在的抗氧化活性和对细胞的修复功能等具有重要意义。Takahashi 等^[47]研究了 MELs 的 3 种不同成分 (MEL-A,-

B,-C) 清除自由基和清除超氧化阴离子的活性,发现这3种成分在体外细胞试验中都显示出不同的抗氧化性。在进一步的体外试验中发现,MEL-C 作用于培养的人纤维细胞,对 H_2O_2 引起的氧化应激表现出比熊果苷更高的保护活性。MEL-B 能够清除自由基。MELs 的抗氧化活性可能与其结构因素有关。但其机理尚不清楚,还有待进行体外、体内细胞活性评价。

研究表明,MELs 对 SDS 损伤的皮肤细胞和受损毛发具有修复作用,可以使受损的细胞恢复再生能力^[48-49]。这可能是由于 MELs 的单分子层结构较容易吸附在受损细胞的表层,为其锁水功能提供屏障,以修复细胞。

4 生物合成途径

了解 MELs 的生物合成途径以及相关酶的基因表达对于产量提高或单一组分的获得都具有重要意义。关于 MELs 的生物合成途径已有部分研究报道,但迄今尚未完全明确。此外,由于霉菌和酵母菌的脂肪酸代谢不同,胞内脂质和胞外脂类的代谢合成不一致,导致其合成 MELs 的代谢途径也不同。近几年主要推测出的途径有南极假丝酵母 *Candida antarctica* 的“缩链途径”以及黑粉菌 *Ustilago maydis* 的基因合成途径。

4.1 MELs 的“缩链途径”

微生物以正构烷烃为底物合成胞内脂类的途径有3条,即 β -氧化+*de novo*、链加长途径、整合掺入途径。*Candida antarctica* 生产胞外 MELs 比较特殊,主要因为中链脂肪酸的含量很高。在研究中发现,当添加链长为 C_n 的脂肪醇

或脂肪酸时,发酵产物的脂肪链为 C_{n-2} 、 C_{n-4} 、 C_{n-6} 等不同的链长。由此推测,合成途径中涉及 β -氧化。另外,无论在细胞生长条件下还是休止条件下,添加的强抑制剂 2-溴辛酸、MELs 的产量都受到限制,且添加的浓度越高,产量减少程度越大。添加抑制 *de novo* 途径的浅蓝菌素,对 MELs 产量没有影响。因此可以得出,*Candida antarctica* 生产 MELs 时,中链脂肪酸合成途径与 *de novo* 途径无关,而 β -氧化途径起关键性作用。 β -氧化使 MELs 合成途径中的长链缩短,以便进入乙酰 CoA 循环^[1,50-51]。“缩链途径”与常见的微生物合成脂类的途径具有不同之处。推测的 *Candida antarctica* T-34 “缩链途径”如图3所示,其合成机制尚不完全清楚,但“缩链途径”的提出为其他产糖脂微生物的代谢途径研究奠定了基础。

4.2 MELs 的基因合成途径及调控

Ustilago maydis 能够发酵生产黑粉酶酸及 MELs,有关其结构及性质的鉴定已有大量研究,但其生物合成途径及基因调控机理研究较少。Hewald 等^[52]首次分析了 *Ustilago maydis* 的2个基因: *emt1* 和 *cyp1*,这2个基因在真菌胞外糖脂合成中起着重要作用。*emt1* 是合成 MEL 所必需的,能够为一种类似于大环内酯类抗菌素的原核糖基转移酶的蛋白指定遗传代码,并通过 GDP-甘露糖的转移催化合成 MELs。敲除 *cyp1* 后,黑粉酶酸便不能合成。*cyp1* 能够编码与植物脂肪酸羟化酶高度相关的细胞色素 P450 单氧酶,引导合成突变体 15,16-二羟基十六烷酸。

Hewald 等^[53]还系统研究了 *Ustilago maydis* 合成 MELs 相关的糖基转移酶、*emt1* 基因簇排布

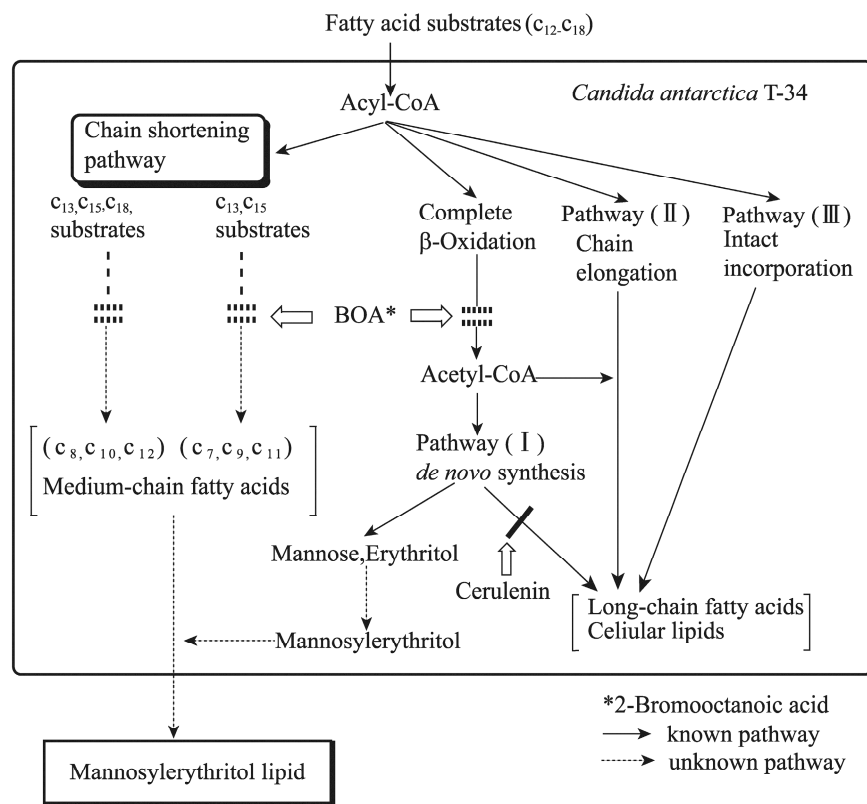


图3 推测的 *Candida antarctica* T-34 “缩链途径”^[51]

Fig. 3 Presumptive biosynthetic pathway of MEL in *Candida antarctica* T-34^[51].

指出, *emt1* 有 5 个基因开放阅读框。*mac1*、*mac2* 和 *mat1* 是新发现的蛋白质, 包含编码乙酰基和乙酰基转移酶短序列。突变分析显示 *mac1* 和 *mac2* 与 MELs 的合成及酰基化有关, 敲除 *mat1* 会引起 MEL-D 的分泌。*mat1* 在大肠杆菌中的过表达显示, 这种酶可作用为乙酰辅酶A依赖的乙酰转移酶, 有选择性表达, 能够同时乙酰化 MELs 的 C-4 和 C-6 位羟基。推测的生物合成途径如图 4 所示。图中所示 MELs 合成途径共 3 步: 第一步是糖基转移酶 *emt1* 催化甘露糖和赤藓糖醇发生缩合反应, 生成二糖; 第二步是酰基转移酶将短链和中长链脂肪酸连在糖基的 R-2 和 R-3 位置上; 最后一步是酰基转移酶 *mat1* 催化糖基的 C-4

和 C-6 位发生乙酰化反应。可见, *mac1*、*mac2* 和 *mat1* 是合成 MELs 的关键基因。

此外, 在研究担子菌 *Pseudozyma antarctica* 合成 MELs 途径中还发现, 编码 *P. antarctica* 线粒体 ATP/ADP 载体的基因 *PaAAC1* 参与酵母菌胞外糖脂的生物合成^[54]。论文作者围绕 *Pseudozyma aphidis* DSM70725 酵母代谢合成 MEL-A 的途径解析, 通过蛋白质组学和代谢途径分析发现该糖脂合成受糖基转移酶调控比较显著, 深入研究还在进行中。有关 MELs 生物合成途径还难以有定论, 推测出的代谢途径可为其生物合成途径及调控机制阐释提供理论依据。

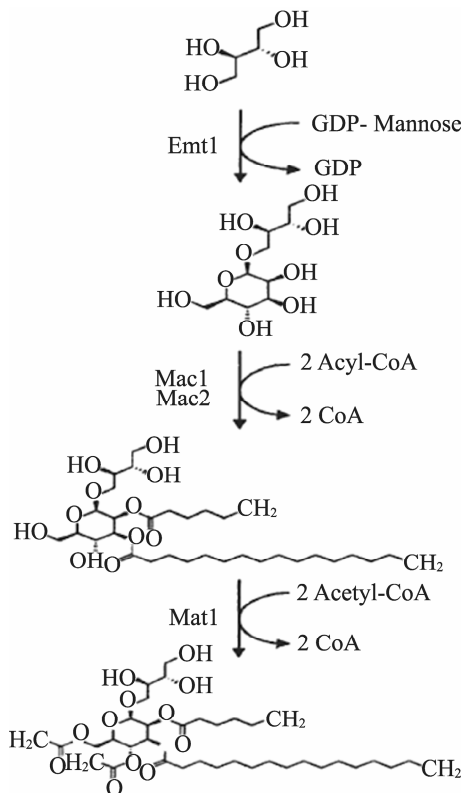


图4 推测的 MELs 合成途径^[53]

Fig. 4 Proposed biosynthetic route for mannosylerythritol lipids^[53].

5 总结与展望

与化学合成表面活性剂相比,生物表面活性剂具有独特的优势。MELs 又以其良好的表面活性、多样的药理活性而备受青睐。数十年来,国外学者已对其发酵工艺、结构性质和生物学活性等方面展开了研究,并取得显著进展。然而, MELs 发酵生产至今尚未全面产业化,主要瓶颈在于其基础和应用研究不足。后续的研究重点有望从以下几个方面入手。

筛选新型发酵菌种:采用基因工程技术改良现有菌株,筛选高产菌株或获得突变体,优化发酵工艺,以提高产物产量。优化补料分批培养条

件,逐步实现工业化生产 MELs。同时改进提纯工艺,借助色谱技术并联用多种分离纯化手段,以减少有机试剂的用量,降低成本。

研究产 MELs 微生物的细胞代谢途径:综合运用酶学、分子生物学、组学技术、化学计量学和化学生物学等手段分析合成过程中的关键酶种类及其作用,阐明代谢过程中调控 MELs 产生的候选酶和关键酶,以提高某单一组分的合成量。

MELs 的生物活性应用研究:进一步从细胞水平、分子水平等深入研究 MELs 抗肿瘤活性、抗菌活性、抗氧化性等生物细胞代谢中的作用;研究不同衍生物的结构及性质及其应用于医药、化妆品、食品等行业中的实际价值,加速其产业化步伐。

REFERENCES

- [1] Zhu SM, Yu SJ, Yang LS. Mannosylerythritol lipid—a new biosurfactant (review). *China Food Additives*, 2005, 1: 64–70 (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. *中国食品添加剂*, 2005, 1: 64–70.
- [2] Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T, et al. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol*, 1993, 29: 91–96.
- [3] Wakamatsu Y, Zhao X, Jin C, et al. Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK-related signal cascade. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 374–383.
- [4] Isoda H, Kitamoto D, Shinmoto H, et al. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of

- human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61: 609–614.
- [5] Isoda H, Shinmoto H, Kitamoto D, et al. Differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids*, 1997, 32: 263–271.
- [6] Isoda H, Nakahara T. Mannosylerythritol lipid induces granulocytic differentiation and inhibits the tyrosine phosphorylation of human myelogenous leukemia cell line K562. *Cytotechnology*, 1997, 25: 191–195.
- [7] Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, et al. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Res*, 1999, 59: 482–486.
- [8] Zhao X, Geltinger X, Kishikawa S, et al. Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis. *Cytotechnology*, 2000, 33: 123–130.
- [9] Zhao X, Murata T, Ohno S, et al. Protein kinase Ca plays a critical role in mannosylerythritol lipid induced differentiation of melanoma B16 Cells. *J Biol Chem*, 2000, 276: 39903–39910.
- [10] Kitamoto D. Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembling properties. *Yakugaku Zasshi*, 2008, 128: 695–706.
- [11] Im JH, Nakane T, Yanagishita H, et al. Mannosylerythritol lipid, a yeast extracellular glycolipid, shows high binding affinity towards human immunoglobulin G. *BMC Biotechnol*, 2001, 1: 5.
- [12] Im JH, Yanagishita H, Ikegami T, et al. Mannosylerythritol lipids, yeast glycolipid biosurfactants, are potential affinity ligand materials for human immunoglobulin G. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 65: 379–385.
- [13] Kim HS, Jeon JW, Park YI, et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(3): 225–229.
- [14] Kitamoto D, Ikegami T, Suzuki GT, et al. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(20): 1709–1714.
- [15] Rau U, Nguyen LA, Roeper H, et al. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Biochem Biotech*, 2005, 68: 607–613.
- [16] Hua ZZ, Chen J, Zhu WC. Study on the production of biosurfactant and biodegradation of n-alkanes by *Candida Antarctica*. *Nanjing University: Nat Sci Ed*, 1998, 32(4): 149–154 (in Chinese).
华兆哲, 陈坚, 朱文昌. 假丝酵母(*Candida antarctica* WSH112)生产生物表面活性剂及降解正构烷烃的研究. *南京大学学报: 自然科学*, 1998, 32(4): 149–154.
- [17] Zhu WC, Chen J, Hua ZZ, et al. Microbial production of mannosylerythritol lipids. *Ind Microbiol*, 1998, 28(1): 32–37 (in Chinese).
朱文昌, 陈坚, 华兆哲, 等. 甘露糖赤藓糖醇脂的微生物生产. *工业微生物*, 1998, 28(1): 32–37.
- [18] Fukuoka T, Yanagihara T, Imura T, et al. The diastereomers of mannosylerythritol lipids have different interfacial properties and aqueous phase behavior, reflecting the erythritol configuration. *Carbohydr Res*, 2012, 351: 81–86.
- [19] Morita T, Ogura Y, Takashima M, et al. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *J Biosci Bioeng*, 2011, 112(2): 137–144.
- [20] Monteiro AS, Coutinho J, Junior AC, et al. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. *J Basic Microb*, 49(6): 553–563.
- [21] Konishi M, Fukuoka T, Nagahama T, et al. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calypptogena soyoae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(2): 169–175.
- [22] Fukuoka T, Morita T, Konishi M, et al. Characterization of new types of

- mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced from soybean oil by a basidiomycetous yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *J Oleo Sci*, 2007, 56: 435–442.
- [23] Ongghena M, Geens T, Goossens E, et al. Analytical characterization of mannosylerythritol lipid biosurfactants produced by biosynthesis based on feedstock sources from the agrofood industry. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(5): 1263–1275.
- [24] Rau U, Nguyen LA, Roeper H, et al. Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis*. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2005, 107: 373–380.
- [25] Spoeckner S, Wray V, Nimtz M, et al. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biot*, 1999, 51:33–39.
- [26] Morita T, Ishibashi Y, Hirose N, et al. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci Biotech Biochem*, 2011, 75(7):1371–1376.
- [27] Kim HS, Yoon BD, Choung DH, et al. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl Microbiol Biot*, 1999, 52: 713–721.
- [28] 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. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 73: 305–313.
- [29] Konishi M, Morita T, Fukuoka T, et al. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59. *Appl Microbiol Bio*, 2008, 78: 37–46.
- [30] Morita T, Konishi M, Fukuoka T, et al. Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *FEMS Yeast Res*, 2007, 7: 286–292.
- [31] Konishi M, Nagahama T, Fukuoka T, et al. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(6): 702–705.
- [32] Morita T, Fukuoka T, Imura T. Accumulation of cellobiose lipids under nitrogen-limiting conditions by two ustilaginomycetous yeasts, *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma hubeiensis*. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(1): 44–49.
- [33] Morita T, Fukuoka T, Konishi M, et al. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 83: 1017–1025.
- [34] Joseph IA, Sumit B, Parasu VU, et al. Mannosylerythritol lipids: a review. *J Indian Microbiol Biotech*, 2008, 35: 1559–1570.
- [35] Fukuoka T, Kawamura M, Morita T, et al. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma crassa*, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants. *Carbohyd Res*, 2008, 343: 2947–2955.
- [36] Fukuoka T, Morita T, Konishi M, et al. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. *Carbohyd Res*, 2008, 343: 555–560.
- [37] Fukuoka T, Morita T, Konishi M, et al. Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1111–1118.
- [38] Fukuoka T, Yanagihara T, Imura T, et al. Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D and its aqueous phase behavior. *Carbohyd Res*, 2011, 346: 266–271.
- [39] Imura T, Hikosaka Y, Worakitkanchanakul W, et al. Aqueous-phase behavior of natural glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid A: sponge, cubic, and lamellar phases. *Langmuir*, 2007, 23:

- 1659–1663.
- [40] Kitamoto D, Morita T, Fukuoka T, et al. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr Opin Colloid In*, 2009, 14(5): 315–328.
- [41] Imura T, Ohta N, Inoue K, et al. Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembled structures. *Chem-Euro J*, 2006, 12: 2434–2440.
- [42] Ito S, Imura T, Fukuoka T, et al. Kinetic studies on the interactions between glycolipid biosurfactant assembled monolayers and various classes of immunoglobulins using surface plasmon resonance. *Colloid Surfaces B*, 2007, 58: 165–171.
- [43] Fukuoka T, Yanagihara T, Imura T, et al. The diastereomers of mannosylerythritol lipids have different interfacial properties and aqueous phase behavior, reflecting the erythritol configuration. *Carbohydr Res*, 2012, 351: 81–86.
- [44] Ding WX, Izumisawa T, Hattori Y, et al. Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection *in vitro* and in the mouse lung. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(2): 311–315.
- [45] Inoh Y, Furuno T, Hirashima N, et al. The ratio of unsaturated fatty acids in biosurfactants affects the efficiency of gene transfection. *Int J Pharm*, 2010, 398(1-2): 225–230.
- [46] Morita Y, Tadokoro S, Sasai M, et al. Biosurfactant mannosyl-erythritol lipid inhibits secretion of inflammatory mediators from RBL-2H3 cells. *BBA-Gen Subjects*, 2011, 1810(12): 1302–1308.
- [47] Takahashi M, Morita T, Fukuoka T, et al. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. *J Oleo Sci*, 2012, 61(8): 457–464.
- [48] Morita T, Kitagawa M, Suzuki M, et al. Yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: the recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells. *J Oleo Sci*, 2009, 58: 639–642.
- [49] Morita T, Kitagawa M, Yamamoto S, et al. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair. *J Oleo Sci*, 2010, 59(5): 267–272.
- [50] Kitamoto D, Nemoto T, Yanagishita H, et al. Fatty acid metabolism of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Am Chem Soc*, 1993, 42: 346–358.
- [51] Kitamoto D, Yanagishita H, Kand H, et al. Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica*: Effect of β -oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(9): 813–818.
- [52] Hewald S, Josephs K. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 3033–3040.
- [53] Hewald S, Linne U, Scherer M, et al. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microb*, 2006, 72: 5469–5477.
- [54] Morita T, Ito E, Fukuoka T, et al. The role of *PaAAC1* encoding a mitochondrial ADP/ATP carrier in the biosynthesis of extracellular glycolipids, mannosylerythritol lipids, in the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*. *Yeast*, 2010, 27: 379–388.

(本文责编 郝丽芳)