

生物表面活性剂生产及应用研究进展

姚芙蓉, 李军, 张莹, 阎贺静, 朱凤妹, 周洁芳*

河北科技师范学院食品科技学院, 河北 秦皇岛 066600

姚芙蓉, 李军, 张莹, 阎贺静, 朱凤妹, 周洁芳. 生物表面活性剂生产及应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1889-1901

Yao Furong, Li Jun, Zhang Ying, Yan Hejing, Zhu Fengmei, Zhou Jiefang. Recent advances in production and applications of biosurfactants[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1889-1901

摘要: 生物表面活性剂主要是由微生物代谢产生的, 具有疏水基团和亲水基团的两亲性物质, 它们能显著降低表面与界面张力。与化学表面活性剂相比, 生物表面活性剂具有毒性低、生物兼容性好、可降解等优点, 在众多领域具有良好的应用前景, 但生物表面活性剂的高生产成本限制了商业化发展。本文旨在分析微生物表面活性剂的生产, 重点是生产过程和代谢途径的优化, 以探索产量与成本的关键因素, 为生物表面活性剂商业化发展提供解决方案。

关键词: 生物表面活性剂; 代谢途径; 发酵生产; 应用

Recent advances in production and applications of biosurfactants

YAO Furong, LI Jun, ZHANG Ying, YAN Hejing, ZHU Fengmei, ZHOU Jiefang*

School of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, Hebei, China

Abstract: Biosurfactants, amphiphilic substances with both hydrophobic and hydrophilic groups, are mainly produced by microbial fermentation, and can significantly reduce surface and interfacial tensions. Compared with chemical surfactants, biosurfactants are characterized with low toxicity, high biocompatibility, and high degradability, with the application potential in a wide range of fields. However, the high production costs hinder the commercialization of biosurfactants. This review

基金项目: 农业农村部农产品加工重点实验室开放课题(S2021KFKT-13); 国家自然科学基金(31570374); 河北省科技计划自然科学基金(C2021407039)

Supported by: Open Project of the Key Laboratory of Agricultural Products Processing of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (S2021KFKT-13); National Natural Science Foundation of China (31570374); Natural Science Foundation of Hebei Science and Technology Program (C2021407039)

*Corresponding author: E-mail: fanerous@126.com

Received: 2021-06-22; Accepted: 2021-11-08; Published online: 2022-03-23

summarize the production of biosurfactants, particularly focusing on the optimization of production processes and metabolic pathways, to explore key factors affecting yield and costs, thus providing solutions for the commercial development of biosurfactants.

Keywords: biosurfactants; metabolic pathway; fermentation production; applications

生物表面活性剂是指在特定的培养条件下,细菌、酵母菌和真菌等微生物新陈代谢过程中产生的两亲性物质^[1],其能有效地降低表面和界面张力^[2-3],成为很好的去污剂、乳化剂及扩散剂等^[4-5]。目前,市场上大部分表面活性剂都是化学合成的,然而使用化学表面活性剂会产生严重的环境污染问题。近年来,随着人们环保意识及可持续发展观念的增强,由微生物产生的生物表面活性剂受到了人们广泛的关注。同化学类表面活性剂相比,生物表面活性剂具有很多的优点:低毒/无毒、生物相容性高和可生物降解等^[6],因此生物表面活性剂在食品、化妆品、医药及环境修复等领域有很大的应用潜力^[7-11]。然而,生物表面活性剂的高生产成本仍然阻碍其工业规模的生产^[12]。本文旨在从生产工艺和代谢途径两个角度分析生物表面活性剂的生产,以降低生产成本高的主要弊端。此外,对生物表面活性剂的特性和应用进行简短的讨论。

1 生物表面活性剂分类

依据分子量的不同,Rosenberg和Ron建议将生物表面活性剂分为两类:低分子量表面活性剂和高分子量乳化剂,前者可有效降低表面和界面张力,后者有助于提高乳液的稳定性能^[13]。微生物来源的生物表面活性剂种类繁多,根据其化学组成和产生菌株的不同,生物表面活性剂大致可以分为5类:糖脂类、磷脂类、脂肽和脂蛋白类、羟基化或环形脂肪酸类、多聚或特殊表面活性剂类^[14]。表1总结了生物表面活性剂的主要种类及产生菌株。

1.1 糖脂类

糖脂类表面活性剂即糖和长链脂肪酸或羟基化脂肪酸组成的复合体,其中的糖可以是葡萄糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖、半乳糖、甘露糖和硫酸半乳糖所组成的单糖、双糖、三糖或四糖的重复单元。糖脂类的表面活性剂主要有海藻糖脂、鼠李糖脂、槐糖脂和甘露糖赤藓糖醇酯等。

糖脂类表面活性剂研究较多的是假单胞菌属产生的鼠李糖脂^[15]。其亲水基团是一分子或两分子的鼠李糖,疏水基团是一个或两个 β 羟基化的饱和或不饱和脂肪酸链。这些基团相互连接组成多种化学结构相近的同系物,主要为4种类型,分别是RhaC₁₀、RhaC₁₀C₁₀、Rha₂C₁₀和Rha₂C₁₀C₁₀。鼠李糖脂最突出的特性是其能显著降低表面张力。Aparna等报道了由假单胞菌(*Pseudomonas* sp. 2B)代谢产生的鼠李糖脂表面活性剂能够使水的表面张力由60 mN/m降至30 mN/m^[16]。此外,鼠李糖脂也能够改变固体表面的润湿性,具有乳化、破乳、消泡、洗涤、分散与絮凝、抗静电和润滑等多种功能^[17]。

鼠李糖脂合成的关键酶是鼠李糖基转移酶I和鼠李糖基转移酶II^[18]。其中,鼠李糖基转移酶I包含4个基因,即*rhlA*、*rhlB*、*rhlR*和*rhlI*。若在质粒上编码这4个基因就可以在其他宿主中进行鼠李糖脂合成基因的表达^[19]。首先,鼠李糖基转移酶I(RhlA)催化酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)与1-2个3-羟酰基脂肪酸分子酯化形成HAA^[20]。其次,鼠李糖基转移酶I(RhlB)将HAA分子与dTDP-L-鼠李糖偶联形成单鼠李糖脂^[21]。最后,鼠李糖基转移酶II(RhlC)

表 1 生物表面活性剂的类型及产生菌株

Table 1 Types of biosurfactants and producing strains

Class	Biosurfactant/bioemulsifier	Microorganism
Glycolipids	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1
		<i>P. aeruginosa</i> GL1
		<i>P. putida</i> Z1 BN
		<i>Pseudomonas</i> sp. 2B
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
		<i>Bacillus thailandensis</i> E264
		<i>Serratia rubidaea</i> SNAU02
		<i>Torulopsis bombicola</i>
		<i>T. apicola</i>
	Sophorolipids	<i>Wickerhamiella domericqiae</i>
		<i>Candida antarctica</i>
		<i>Candida</i> sp. SY 16
		<i>Kurtzmanomyces</i> sp. 1-11
Mannosylerythritol lipids	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>B. thuringiensis</i> CMB26	
	<i>B. licheniformis</i> IM 1307	
Lipopeptides	Surfactin	<i>Acinetobacter</i> sp.
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T
		<i>Capnocytophaga</i> sp.
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
Phospholipids	Phospholipids	<i>A. calcoaceticus</i> A2
		<i>A. radioresistens</i> KA-53
		<i>Candida lipolytica</i>
		<i>Mycobacterium thermoautotrophium</i>
		<i>Klebsiella</i> sp.
		<i>Pseudomonas marginalis</i>
Fatty acid	Fatty acid	
Polymeric biosurfactants	Emulsan	
	Biodispersan	
	Alasan	
Liposan		
Protein complex		
Polysaccharide		
Particulate surfactant		

将第二个鼠李糖基团转移到单鼠李糖脂上,形成双鼠李糖脂^[22]。目前已发现在铜绿假单胞菌中存在 4 种群体感应系统:LasR-LasI 型、RhIR-RhII 型、PqsR 调控的喹诺酮系统和 IQS 型系统,它们紧密相连,通过复杂的相互作用调控鼠李糖脂合成基因的表达,群体感应系统的信号因子对鼠李糖脂生物合成的调控机制已有相关研究^[18]。

1.2 脂肽和脂蛋白类

在生物表面活性剂中,微生物脂肽是一类

由脂肪酸和肽组成的两亲性物质,其具有良好的表面活性,能增加细菌对水不溶性烃类物质的摄取,从而加速烃类物质的生物降解过程,此外,其还可以与部分重金属结合,移除被污染的土壤和沉积物中的重金属^[23]。按照脂肽的结构特征可以分为两大类:环状脂肽和线形脂肽。环状脂肽是指分子中具有环状结构的一类脂肽,肽链 C-端氨基酸的羧基与肽或脂肪酸中的氨基或羟基相连,构成环状结构;线形脂肽

是指氨基酸依次连接成线状、首尾不相连且无环状结构的一类脂肽，其脂肪酸与肽链 N-端的 α -氨基或其他羟基相连，有直链结构和支链结构之分^[24]。

表面活性素(surfactin)是一类环脂肽型生物表面活性剂，又称脂肽，具有良好的表面/界面活性。枯草芽孢杆菌产生的表面活性素是以 4 种氨基酸和 β -羟基脂肪酸为前体，非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPS)负责合成。NRPS 是多酶复合体系，由 27 kb 的 *urfA* 基因簇(*urfAA*、*urfAB*、*urfAC* 和 *urfAD*)组成。这个基因簇由 7 个模块组成，每个模块负责一种氨基酸的识别与缩合^[25]。模块包含多个结构域：缩合结构域(C 结构域)、腺苷酰化结构域(A 结构域)、硫醇化结构域(T 结构域)、差向异构化结构域(E 结构域)和硫酯化结构域(TE 结构域)^[26]。磷酸泛酰巯基转移酶的编码基因 *sfp* 在枯草芽孢杆菌的 surfactin 合成中起重要作用。辅酶 A 的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺(Ppant)长臂在磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTase)的催化作用下，从辅酶 A 结合到 T 结构域(负责共价中间物的固定)中的丝氨酸残基上，使得肽基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)由无活性的脱辅基形式转化为有活性的全蛋白形式^[27]。T 功能域的 PCP 在未连接 Ppant 长臂时是无活性的，只有通过连接 Ppant 长臂被活化后，surfactin 的合成才能启动。因此，在缺乏 *sfp* 基因或者 *sfp* 基因有缺陷不能行使其正常功能的情况下，surfactin 不能合成^[28]。同时，surfactin 的合成也存在着群体感应，当细胞浓度达到一定值时，芽孢杆菌信息素 ComX 与膜蛋白组氨酸激酶 ComP 结合，发生自磷酸化反应，再磷酸化调控蛋白 ComA，从而结合到 *urfA* 基因簇的启动子位置，起始转录^[29]。激活因子(competence stimulating factor, CSF)为一种信号肽，也影响 *urfA* 基因簇的表达，其是通过跨膜

运输到达胞外，并依据浓度的高低，与至少两种不同的外膜受体结合。此外，通过基因敲除的实验证实调控因子 DegU 和 CodY 分别对表面活性素的合成起正向和反向调控作用。其他的调控因子如 AbrB、Spx 等对表面活性素的调控机理还需要进一步的研究^[30]。

1.3 聚合类表面活性剂

聚合类表面活性剂通常具有较高的分子量，因而黏度较大，具有抗剪切的能力。Alasan、liposan 和 emulsan 是最常见的高分子量生物表面活性剂，具有很好的乳化活性，对一些油类物质、有机试剂和烃类物质均表现出很好的乳化活性，其中 emulsan 在 0.001%–0.010%浓度范围内均可以形成稳定的乳状液^[31]。

醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) RAG-1 产生的胞外聚合物 emulsan 是研究较早的一类表面活性剂，其是由阴离子的杂多糖和脂肪酸组成^[32]。虽然 emulsan 降低表面/界面张力的能力不显著，但其具有牢固附着在油水界面的特性，用相对少量的 emulsan 就能使 O/W 型乳状液稳定。因此，emulsan 可用于稠油的运输、油罐的清洗和原油的回收等方面。

2001 年，Nakar 等确认了 emulsan 合成的基因簇，其是由 20 个开放阅读框所组成，共 27 kb，称之为 *wee* 基因簇^[33]。Emulsan 的合成是由氨基糖前体合成而起始(UDP-D-半乳糖胺、UDP-2,4-氨基-6-脱氧-D-葡萄糖胺和 UDP-N-乙酰甘露糖醛酸)，随后在一系列糖基转移酶和酰基转移酶的作用下进行组装，WeeD 和 WeeG 可能转移糖前体到脂载体上面。WeeC 和 WeeI 同其他细菌的乙酰转移酶有较高的相似性，推测这两个蛋白参与多糖骨架的转乙酰作用。最后是聚合和输出的过程。Wzx 蛋白负责重复单元的易位。另外一个膜蛋白 Wzy 可能参与到周质空间内多糖重复单元的聚合。*wee* 簇上面 3 个反方向表达的基

因 *wza*、*wzb* 和 *wzc* 可能负责多糖运输到胞外^[34]。目前关于 *wee* 基因簇的基因功能研究鲜有报道, 其调控机制也未阐明。

2 生物表面活性剂的合成调控

虽然生物表面活性剂具有化学表面活性剂无法比拟的优点, 但生物表面活性剂的高生产成本仍然阻碍其工业规模的生产, 由于原材料通常较昂贵, 工艺产量直接影响到生产成本。因此提高生物表面活性剂的产量、降低生产成本是实现生物表面活性剂商业化发展的关键。

2.1 发酵工艺

2.1.1 发酵培养基底物

随着对生物表面活性剂需求的不断增长, 研究人员正在寻找可再生、廉价的废物材料作为底物, 包括工农业废物和食物残渣等, 这将大大降低生物表面活性剂的生产成本, 同时降低废物的处理成本和减少环境污染^[35]。

工农业废物: 目前以玉米浆、糖蜜、木薯废料、甘蔗渣等工农业废料为原料生产生物表面活性剂的菌株有铜绿假单胞菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和热带念珠菌等^[36]。从水稻、小麦、马铃薯等作物中提取淀粉, 会产生大量的废水, 其中含有大量的淀粉和谷壳, 可以作为底物生产生物表面活性剂^[37]。枯草芽孢杆菌可以利用马铃薯废物作为碳源生产脂肽^[35]。

植物油的加工会产生大量废物, 如高浓度的脂肪、油和其他相关化合物。这些废物较难降解, 可以导致土壤和水的污染^[38]。Pérez-Armendáriz 等探索了铜绿假单胞菌利用废菜籽油作为低成本和环境友好的基质, 生产鼠李糖脂的潜力, 结果表明, 利用废菜籽油获得的产量与使用菜籽油获得的产量相似, 甚至略高, 证实了废菜籽油作为铜绿假单胞菌生产鼠李糖脂的碳源具有很大的潜力^[39]。

食物残渣: 在果汁加工和蔬菜加工时会产生大量废物, 如苹果皮、香蕉皮、橙子皮、胡萝卜皮等, 这些废物可用作生物表面活性剂生产的底物^[40]。*Acinetobacter calcoetius* 利用苹果汁废物作为底物生产的生物表面活性剂可显著降低表面张力^[41]。对铜绿假单胞菌进行的类似研究表明, 当铜绿假单胞菌在富含苹果汁的矿物质培养基中生产鼠李糖脂时, 其表面张力可降低至 29.5 mN/m^[42]。此外, 香蕉皮也可以作为唯一碳源, 被 *Halobacteriaceae archaeon* 用于生产脂肽^[43]。

2.1.2 发酵参数优化

生产过程参数如碳源、氮源、温度、pH、金属离子和搅拌速度等影响了表面活性剂生产菌株的生长和发酵, 这些参数之间的相互影响也会影响微生物表面活性剂的生产动力学。Gudiña 等研究表明, 枯草芽孢杆菌在含有 10% 玉米浸粉的培养基中, 生物表面活性剂的产量约为 1.3 g/L, 当培养基中同时添加铁 4.1 g/L、锰 4.4 g/L、镁 3.5 g/L 时, 产量可提高到 4.8 g/L^[44]。Su 等对菌株 RAG-1 的 emulsan 分批发酵进行了响应面优化实验, 结果表明碳源、氮源和无机盐是菌株生产表面活性剂的主要影响因素, 进一步确定了培养基成分的最佳组成: 乙醇 9.16 g/L, KH₂PO₄ 8.2 g/L, K₂HPO₄ 23.32 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5.77 g/L 和 MgSO₄·7H₂O 0.354 g/L; 菌株 RAG-1 在此优化条件下发酵培养 80 h 后, 表面活性剂产量达到 73.312 mg/L, 提高了 1.48 倍^[45]。此外, 有报道增加供氧的叶轮系统和结构合适的反应器, 包括搅拌塔反应器、外部循环式反应器、鼓泡柱或气升式反应器等^[46-47], 在发酵中后期增加搅拌速率, 可以提高好氧菌株合成与释放表面活性剂的能力, 然而设备能耗显著增加。

2.2 表面活性剂生产菌株的定向改造

在生物表面活性剂生产技术的改进研究中,

传统的优化方法取得了一定进展,但是总体上生物表面活性剂的产量仍未达到工业化的需要。对生物表面活性剂代谢途径进行解析,寻找新的突破点,被认为是开发新一代微生物表面活性剂生产技术的有力方法。近年来,国内外开始运用代谢工程的策略提高生物表面活性剂的生产,主要包括删除支路代谢途径、增加前体的供应、启动子工程、构建底盘生物和改善生物表面活性剂的跨膜运输等^[48]。

2.2.1 删除支路代谢

通过选择性阻断代谢旁路,增加糖基和脂肪酸前体的含量可以显著提高鼠李糖脂的产量。羟基链烷酰氧基链烷酸(hydroxyalkanoxyalkanoic acid, HAA)和 dTDP-鼠李糖是鼠李糖脂合成中两种必需的前体。在铜绿假单胞菌中,胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的合成与 dTDP-鼠李糖的合成竞争共同的 dTDP-D-葡萄糖前体,因此敲除 EPS 合成的关键基因来阻断它的合成,可以为鼠李糖脂合成通路提供更多的糖基前体^[49]。聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)合成和鼠李糖脂合成共用 β -羟基脂肪酸前体。Funston 等分别敲除了 *Burkholderia thailandensis* E264 的 PHA 合成基因 *phbA*、*phbB* 和 *phbC*,与野生型菌株(1.28 g/L)相比,缺失 *phb* 基因的菌株产生的鼠李糖脂产量最高为 3.78 g/L^[50]。

2.2.2 增加前体供应

鼠李糖脂的生物合成与鼠李糖和脂肪酸合成等中枢代谢途径有关,有限数量的前体会阻碍鼠李糖脂的产生^[51]。在大肠杆菌 DJ208 中异源表达鼠李糖脂合成基因时,II 型脂肪酸生物合成(FAS II)途径作为上游途径,为鼠李糖脂的合成提供脂肪酸前体。过表达 FAS II 中的内源基因 *fabD*、*fabB*、*fabG*、*fabA* 和 *fabI*,结果表明,大肠杆菌 DJ208-*fabG* 积累的鼠李糖脂[(0.57±0.02) g/L]较高于大肠杆菌 DJ208 [(0.45±0.01) g/L]^[52]。大肠杆

菌中的 3-酮酰基-ACP 还原酶(FabG)可以生成羧基酰基-ACP 和羧基酰基-CoA,它们是 Rh1A 作用的脂肪酸前体,因此,过表达 *fabG* 基因可以促进鼠李糖脂的合成^[51]。

2.2.3 启动子工程

启动子工程被认为是用于提高生物表面活性剂产量的有效工具。解淀粉芽孢杆菌 LL3 具有完整的脂肽 A 合成途径,然而菌株发酵生产脂肽 A 的产量极低,无法检测,推测是由于 *itu* 操纵子的转录水平较低。实验将强的组成型启动子 P_{C2up} 插入到 *itu* 操纵子的上游,强化脂肽 A 生物合成基因的转录,其产量提高到了 37.35 mg/L。随后进行了培养条件的响应面优化实验,探究了碳源、氮源、pH 和温度对脂肽 A 产量的影响,脂肽 A 的产量提高到 99.73 mg/L。此外,研究者还检测了调控因子对产物的影响,增加调控因子 *degQ* 表达水平,脂肽 A 的产量提高至 113.1 mg/L^[53]。该研究将代谢途径模块化使非生产菌株成为高产菌株,为脂肽 A 的高产发酵奠定了良好的基础。

枯草芽孢杆菌 THY-7 是从土壤中分离鉴定的一株表面活性素生产菌株,其表面活性素的产量为 0.55 g/L。Jiao 等通过转录组分析获得了 4 个强启动子 P_{groE} 、 P_{cdd} 、 P_{rplK} 和 P_{sspE} ,将最强启动子 P_{groE} 替换天然表面活性素启动子后,所得的工程菌株并不能合成表面活性素。随后,设计实验将蔗糖诱导型启动子 P_{sacB} 和 P_{sacP} 代替原启动子,工程菌的表面活性素产量分别为 1.09 g/L 和 0.22 g/L。为进一步获得高产表面活性素菌株,Jiao 等继续开发嵌合启动子 P_{g2} 和 P_{g3} ,其中 P_{g3} 的活性最高。在 5 L 发酵罐中,菌株 THY-7/ $P_{g3-srfA}$ 代谢产生了 9.74 g/L 的表面活性素,远高于野生型菌株 THY-7 的产量(0.55 g/L),菌株 THY-7/ $P_{g3-srfA}$ 最大生产率为 0.30 g/(L·h),最大产率达到 0.14 g 表面活性素/g 蔗糖^[54]。

2.2.4 构建底盘生物

基因组减小是构建功能底盘生物和各种细胞工厂的有效技术。删除一些不必要的基因组区域可以构建高效代谢调节网络和优越细胞生理特征的底盘生物^[55]。Zhang 等删除了解淀粉芽孢杆菌 LL3 中 4.18% 非必要基因, 与原始菌株 NK-1 相比, 基因组减小菌株 GR167 表现出更快的生长速度、更高的转化效率、更高的细胞内还原能力和更强的异源蛋白表达能力^[48]。底盘菌株 GR167 作为表面活性素的生产菌株, 其基因组中还存在其他次级代谢产物合成的基因簇, 这可能会增加细胞的代谢负担和目标产物的纯化成本^[56]。因此首先删除次级代谢产物 γ -PGA 生物合成基因簇, 结果显示, 当删除 γ -PGA 合成簇(*pgsBCA*)后, 表面活性素 *surfA* 基因簇转录水平显著上调; 在此基础上, 同时删除 *iturin* 和 *fengycin* 的生物合成基因簇, 菌株 GR167ID (Δ *itu*, Δ *fen*)的表面活性素产量提高了 10%, 产率(产量/细胞干重)提高了 56%^[48]。

3 生物表面活性剂的应用

生物表面活性剂是以碳水化合物、植物油等可再生的资源为原料, 通过不同微生物生产代谢获得。与化学合成的表面活性剂相比, 具有可生物降解、耐酸碱、抗菌性和生物相容性好等优点^[6]。同时生物表面活性剂也具有降低表面张力和界面张力、乳化及增加泡沫等特点^[3]。因此生物表面活性剂在食品、医药、环境修复、石油、农业等领域有着广泛的应用潜力, 在未来有逐步替代化学合成表面活性剂的趋势。

3.1 食品领域

生物表面活性剂是常见的一类食品添加剂, 其主要作用是增稠、润滑、乳化和消泡等。黄原胶是鞘氨醇单胞菌发酵产生的一种高分子多糖物质, 在食品中主要是作为增稠稳定剂, 饮料中

添加黄原胶可以增加饮料的稠度, 提升饮料的稳定性和颗粒悬浮性^[57]。最近, 从海洋细菌-阴沟肠杆菌的代谢产物中提取的表面活性剂在酸性环境中仍有很好的增粘特性, 因此在富含酸性食品的增粘方面具有很大的潜力^[58]。添加鼠李糖脂表面活性剂可以改善面团的稳定性, 提高烘焙产品的质地和延长保存期^[59]。尽管生物表面活性剂具有乳化、稳定和抗粘连等作用, 具有在食品领域应用的潜力, 但目前关于其在食品中应用的报道较少。

3.2 医药领域

糖脂和脂肽类生物表面活性剂具有抗菌、抗真菌、抗病毒、抗肿瘤等生物活性, 在医药领域具有应用潜力。研究发现铜绿假单胞菌 AT10 产生的鼠李糖脂对大肠杆菌、微球菌、粪便产碱杆菌、弓形粘质沙雷菌、牛分枝杆菌和表皮葡萄球菌有明显抑制作用, 对黑曲霉、球孢白僵菌, 以及具有植物致病性的灰葡萄孢菌、茄根霉具有显著的抗真菌活性^[60]。海洋环状芽孢杆菌产生的生物表面活性剂, 对革兰氏阳性和革兰氏阴性病原体以及半致病性微生物菌株(包括多重耐药菌(multidrug-resistant, MDR)菌株在内)有显著的抗菌作用^[61]。Christova 等发现菌株 BN26 可产生一种糖脂(trehalose lipid, THL), 通过 MTT 法测试了其癌细胞系 BV-173、KE-37(SKW-3)、HL-60、HL-60/DOX 和 JMSU-1 的细胞毒性作用, 结果表明, THL 对人肿瘤细胞系具有浓度依赖性的抗增殖活性, 并通过诱导部分寡核小体 DNA 片段化来介导细胞死亡^[62]。此外, 还有研究表明槐糖脂具有广谱的抗菌活性, 它还有很好的抗肿瘤活性^[63]。陈静等研究表明, 内酯型双乙酰槐糖脂可以使肿瘤细胞 K562 细胞形态受损、裂解, 从而抑制肿瘤细胞生长^[64]。Ribeiro 等实验证实槐糖脂对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有抑制作用, 并且可以减弱癌细胞的迁移^[65]。

这些研究使生物表面活性剂可作为预防和治疗相关疾病的替代方案^[66]。

3.3 环境修复

生物表面活性剂可增强污染物在水相中的分散性和溶解性,从而提高微生物对疏水性底物的利用,加速生物降解过程,大量研究证实了生物表面活性剂在环境修复中的应用潜力^[61]。Moldes 等研究表明戊糖乳杆菌能够有效减少污染土壤中 58.6%–62.8%的辛烷,其自身产生的表面活性剂有效地促进了该物质的降解过程^[67]。同样 Noordman 等证实了鼠李糖脂可以促进菌株对烃的摄取,进而加速了菌体对烷烃的生物降解过程^[68]。Zhou 等筛选的嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) A-2 能够以原油作为唯一碳源生产乳化剂,其具有较强的细胞表面疏水性,能够降解重质原油中 C₁₄–C₂₉的正烷烃和多环芳烃的萘、甲基化菲和 C₂-芴和苯并[b]芴,并偏好降解中长链烷烃,当以 C₂₈为唯一碳源培养时,菌株对其降解率高达 89.83%,菌株 A-2 可以应用于被石油污染的生物修复^[69]。Nogueira 等研究了嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) UCP 1601 生产的生物乳化剂对大豆油和机油黏度的影响。结果表明,两种化合物的黏度均显著下降,大豆油的黏度从 380.1 cP 下降到 21.6 cP,机油的黏度从 148.9 cP 下降到 46.9 cP^[70]。Sun 等研究了 *Pseudomonas* sp. CQ2 生产的生物表面活性剂对重金属污染的土壤有修复作用,ATR-FTIR 结果表明,生物表面活性剂中的羧基官能团可以螯合重金属,有效去除土壤中的 Cd、Cu 和 Pb^[71]。

3.4 石油工业

微生物提高原油采收率(microbial enhanced oil recovery, MEOR)是利用微生物在油藏中生长繁殖及其代谢过程中产生的生物表面活性剂、有机酸及气体等来提高油藏中的残余原油采收率。

其中生物表面活性剂可以降低油/水界面张力、改变油藏的润湿性及乳化原油,因此可以显著提高原油的流动性,增加原油的采收率^[72]。Liu 等探究了地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) L20 生产的生物表面活性剂在原油开采中的应用,该生物表面活性剂在 pH 4.0–11.0、85 °C 高温、25% NaCl 溶液中可以保持稳定的乳化活性,岩心驱油实验表明添加生物表面活性剂后,原油采收率提高了 19.58%,且产出液也呈现了乳化现象,证实生物表面活性剂的润湿和乳化机制在 MEOR 工艺中发挥了重要作用^[73]。同样 Alvarez 等研究的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) AB2.0 可以产生脂肽类生物表面活性剂,其可以显著降低表面/界面张力,改变岩石润湿性,当添加到砂柱中时,回收液相中的石油烃浓度提高了 24 倍^[74]。目前,MEOR 的现场应用效果出现不一致、不稳定的现象,因此还需持续优化与完善现场配套技术,扩大试验规模,提升现场效果^[75]。

4 瓶颈与展望

尽管生物表面活性剂有广泛的应用潜力,与化学表面活性剂相比有许多的优势。但是由于生物表面活性剂生产成本高的劣势,使其商业化发展受到阻碍。

目前生物表面活性剂的生产多采用糖类(葡萄糖、蔗糖、淀粉)、烷烃类(十二烷、十四烷、十六烷)、油类(玉米油、葵花籽油、菜籽油)作为发酵的碳源,成本较高。据报道,微生物发酵生产鼠李糖脂的基质成本占了鼠李糖脂总生产成本的近 20%^[76]。为了降低基质成本的影响,可以采用成本较低的可再生废物为基质,如工农业废料、水果和蔬菜废料、植物油加工废料等。Jadhav 等研究证实,铜绿假单胞菌可以利用葵花籽油废物合成鼠李糖脂^[77]。然而,这类基质可能是不同物质的混合物,因此有必要了解使用这些底物时

菌株的生长动力学和产率情况。同时,也必须考虑这些基质的运输成本及生产前的预处理成本。

生物表面活性剂的产量还需要进一步的提升。发酵方面:进一步对生物表面活性剂的发酵条件进行优化,构建高密度细胞培养工艺,以提高生物表面活性剂的产率和碳源转化率,探索适合特定生物表面活性剂的发酵工艺,如连续发酵模式,缩短过程中辅助时间,实现生物表面活性剂的高效生产^[78]。代谢途径方面:依据 Moutinho 等的理论计算鼠李糖脂的最大理论产量为 0.47 g 生物表面活性剂/g 葡萄糖,这意味着生产过程中只有不到一半的碳源被利用生成鼠李糖脂,其他碳源物质转移到与目标产物无关的其他途径上^[76]。因此了解碳代谢流并利用代谢工程进行相应的代谢路径重建十分重要。目前对于改进生物表面活性剂生产的代谢工程仍处于初步研究中,需要深度解析发酵菌株的基因组序列,分析菌株发酵生产的代谢流、调控生物表面活性剂的生产、增加前体的供应量、删除竞争旁路;此外,除了传统的代谢工程手段,合成生物学的合理设计也是优化细胞代谢以减少底物支出的关键策略。

生物表面活性剂的提取及纯化成本也是限制其商业化发展的关键因素,如槐糖脂的下游处理过程中,产品的纯化成本占总生产成本的 60%–80%^[79]。因此选择成本更低以及损耗更低的分离纯化方法尤为重要。目前分离纯化的工艺很多,酸沉淀、硫酸铵沉淀、溶剂萃取、泡沫分离、树脂吸附和超滤等,采用多种分离纯化方法交替使用更为有效^[78]。Lohitharn 等的专利表明鼠李糖脂的回收率可达到 80%,具体方法是首先发酵液酸化处理(pH 2.1),然后用固体碱(主要是氢氧化钠)中和提取^[80]。

此外,还需要进一步挖掘耐极端条件的新型生物表面活性剂以适应不同的应用领域。本课题组长期致力于微生物产生物表面活性剂在高温

油田开采中的应用。由于原油的储层高温的限制,并不适合微生物的生长和表面活性剂的产生,因此,挖掘合适的高产生物表面活性剂菌株应用于 MEOR 技术仍旧是一个挑战。极端微生物是具有独特性质的新型生物表面活性剂的重要来源,目前,关于嗜热微生物产表面活性剂的研究较少,与中温菌株相比,嗜热微生物具有较高的传质速率、更快的反应速度及降低杂菌污染可能性等优势。Cordova 等分离的嗜热菌株地芽孢杆菌(*Geobacillus*) LC300 在木糖培养基中生长速率为 1.52 h⁻¹,比 *E. coli* MG1655 在木糖培养基中的生长速率(0.4 h⁻¹)高 3.8 倍^[81]。嗜热菌株 *G. stearothermophilus* A-2 产生的表面活性剂是一种新型的糖蛋白类乳化剂,其不仅能够乳化纯烷烃和芳香烃化合物,而且还可以乳化混合的烷烃和多环芳烃物质如柴油、橄榄油和原油。此外,该乳化剂具有较强的乳化稳定性,耐热(4–100 °C)、耐碱(pH 7.0–14.0)和耐盐(5%–30%),尤其突出的是,其乳化层在室温下可以保持稳定 12 个月,而乳剂层中油滴的粒径在微米级别内几乎未观察到变化^[82]。由于消费者对可持续产品和工业应用的需求,对耐极端条件的环境友好型表面活性剂的兴趣逐渐增加。因此,有必要挖掘极端微生物产生的表面活性剂,探索它们在工业中的多样化用途。

5 结论

随着人们环保意识的增强,生物表面活性剂的需求在逐年递增,生物表面活性剂在食品增稠、环境修复和抗菌药物开发等领域有良好的应用前景。高生产成本是将生物表面活性剂逐步代替化学表面活性剂从而进行商业化推广的主要障碍,因此,改进生物表面活性剂生产的研究重点可以放在低成本的基质、高效的发酵工艺和改造生产菌株代谢流技术上。

REFERENCES

- [1] Adebajo SO, Akintokun AK, Bolaji SE. Biosurfactants producing bacteria from oil-polluted soil in Abeokuta, Ogun State[J]. Ife Journal of Science, 2018, 20(2): 287
- [2] Najimi S, Nowrouzi I, Khaksar Manshad A, Mohammadi AH. Experimental study of the performances of commercial surfactants in reducing interfacial tension and wettability alteration in the process of chemical water injection into carbonate reservoirs[J]. Journal of Petroleum Exploration and Production Technology, 2020, 10(4): 1551-1563
- [3] Ravindran A, Sajayan A, Priyadharshini GB, Selvin J, Kiran GS. Revealing the efficacy of thermostable biosurfactant in heavy metal bioremediation and surface treatment in vegetables[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 222
- [4] Nadaf S, Kumbar VM, Killedar S, Torvi AI, Hoskeri JH, Shettar AK. Microbial Biosurfactants as Cleaning and Washing Agents[A]. Inamuddin, Ahamed MI, Prasad R. Microbial Biosurfactants[M]. Singapore: Springer, 2021: 293-314
- [5] Silva IA, Veras BO, Ribeiro BG, Aguiar JS, Campos Guerra JM, Luna JM, Sarubbo LA. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier[J]. PeerJ, 2020, 8: e9064
- [6] Hu XM, Subramanian K, Wang HM, Roelants SLKW, To MH, Soetaert W, Kaur G, Lin CSK, Chopra SS. Guiding environmental sustainability of emerging bioconversion technology for waste-derived sophorolipid production by adopting a dynamic life cycle assessment (dLCA) approach[J]. Environmental Pollution, 2021, 269: 116101
- [7] Ribeiro BG, Guerra JMC, Sarubbo LA. Biosurfactants: production and application prospects in the food industry[J]. Biotechnology progress, 2020, 36(5): e3030
- [8] Markande AR, Patel D, Varjani S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments[J]. Bioresource Technology, 2021, 330: 124963
- [9] Bezerra KGO, Silva IGS, Almeida FCG, Rufino RD, Sarubbo LA. Plant-derived biosurfactants: extraction, characteristics and properties for application in cosmetics[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 34: 102036
- [10] Marchut-Mikołajczyk O, Drożdżyński P, Polewczyk A, Smulek W, Antczak T. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 40
- [11] Ibanez JG, Rincón ME, Gutierrez-Granados S, Chahma M, Jaramillo-Quintero OA, Frontana-Urbe BA. Conducting polymers in the fields of energy, environmental remediation, and chemical-chiral sensors[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(9): 4731-4816
- [12] Dolman BM, Wang FJ, Winterburn JB. Integrated production and separation of biosurfactants[J]. Process Biochemistry, 2019, 83: 1-8
- [13] Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(2): 154-162
- [14] Thakur S, Singh A, Sharma R, Aurora R, Jain SK. Biosurfactants as a novel additive in pharmaceutical formulations: current trends and future implications[J]. Current Drug Metabolism, 2020, 21(11): 885-901
- [15] Thakur P, Saini NK, Thakur VK, Gupta VK, Saini RV, Saini AK. Rhamnolipid the glycolipid biosurfactant: emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 1
- [16] Aparna A, Srinikethan G, Smitha H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 95: 23-29
- [17] 付丽欢. 基于生物表面活性剂鼠李糖脂的生物油/柴油燃料体系的微乳化机理研究[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2016
- Fu LH. Biosurfactant rhamnolipid enhanced microemulsification of synthetic bio-oil in diesel[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2016 (in Chinese)
- [18] 段海荣, 魏赛金, 黎循航. 铜绿假单胞菌中鼠李糖脂生物合成的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(9): 43-51
- Duan HR, Wei SJ, Li XH. Advances in rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* research[J]. China Biotechnology, 2020, 40(9): 43-51 (in Chinese)
- [19] Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A, Witholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3503-3506
- [20] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1997, 61(1): 47-64
- [21] Déziel E, Lépine F, Milot S, He JX, Mindrin MN, Tompkins RG, Rahme LG. Analysis of *Pseudomonas*

- aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication[J]. PNAS, 2004, 101(5): 1339-1344
- [22] Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(3): 708-718
- [23] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 553-563
- [24] 刘楠. 关于环状脂肽类物质的结构和生物特性分析[J]. 河南化工, 2010, 27(4): 43-44
Liu N. Structural and biological analysis of cyclic lipopeptides[J]. Henan Chemical Industry, 2010, 27(4): 43-44 (in Chinese)
- [25] Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products[J]. Natural Product Reports, 2003, 20(3): 275-287
- [26] Koglin A, Löhr F, Bernhard F, Rogov VV, Frueh DP, Strieter ER, Mofid MR, Güntert P, Wagner G, Walsh CT, et al. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase[J]. Nature, 2008, 454(7206): 907-911
- [27] Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases[J]. Biochemistry, 1998, 37(6): 1585-1595
- [28] Weber T, Marahiel MA. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases[J]. Structure, 2001, 9(1): R3-R9
- [29] Oslizlo A, Stefanic P, Dogsa I, Mandic-Mulec I. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing[J]. PNAS, 2014, 111(4): 1586-1591
- [30] 王聪亚. 枯草芽孢杆菌高产表面活性素菌株的构建[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2019
Wang CY. Construction of the *Bacillus subtilis* strains for high surfactin production[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2019 (in Chinese)
- [31] Roy A. A review on the biosurfactants: properties, types and its applications[J]. Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications, 2018, 8(1): 1-14
- [32] Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(3): 402-408
- [33] Nakar D, Gutnick DL. Analysis of the *wee* gene cluster responsible for the biosynthesis of the polymeric bioemulsifier from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1[J]. Microbiology: Reading, England, 2001, 147(Pt 7): 1937-1946
- [34] Nesper J, Hill CMD, Paiment A, Harauz G, Beis K, Naismith JH, Whitfield C. Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype k30: structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein *wza*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(50): 49763-49772
- [35] Mohanty SS, Koul Y, Varjani S, Pandey A, Ngo HH, Chang JS, Wong JWC, Bui XT. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 120
- [36] Joshi GS, Banat IM, Joshi SJ. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR)[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 14: 23-32
- [37] Gurjar J, Sengupta B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423[J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 243-249
- [38] Jadhav JV, Pratap AP, Kale SB. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid[J]. Process Biochemistry, 2019, 78: 15-24
- [39] Pérez-Armendáriz B, Cal-Y-Mayor-Luna C, El-Kassis EG, Ortega-Martínez LD. Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 61
- [40] Sharma P, Gaur VK, Kim SH, Pandey A. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources[J]. Bioresource Technology, 2020, 299: 122580
- [41] Rocha MVP, Oliveira AHS, Souza MCM, Gonçalves LRB. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(12): 1295-1299
- [42] Rocha MVP, Souza MCM, Benedicto SCL, Bezerra MS, Macedo GR, Pinto GA, Gonçalves LRB. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007: 185-194
- [43] Chooklin CS, Maneerat S, Saimmai A. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant

- production by *Halobacteriaceae* archaeon AS65[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(2): 624-645
- [44] Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 59
- [45] Su WT, Chen WJ, Lin YF. Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(2): 271-279
- [46] Beun JJ, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor[J]. Water Research, 2002, 36(3): 702-712
- [47] Chisti MY, Moo-Young M. Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations[J]. Chemical Engineering Communications, 1987, 60(1/6): 195-242
- [48] Zhang F, Huo KY, Song XY, Quan YF, Wang SF, Zhang ZL, Gao WX, Yang C. Engineering of a genome-reduced strain *Bacillus amyloliquefaciens* for enhancing surfactin production[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 223
- [49] Lei LY, Zhao F, Han SQ, Zhang Y. Enhanced rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* SG by selectively blocking metabolic bypasses of glycosyl and fatty acid precursors[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(6): 997-1002
- [50] Funston SJ, Tsaousi K, Smyth TJ, Twigg MS, Marchant R, Banat IM. Enhanced rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* transposon knockout strains deficient in polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(23/24): 8443-8454
- [51] Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(1): 187-194
- [52] Du J, Zhang AJ, Hao JA, Wang J. Biosynthesis of di-rhamnolipids and variations of congeners composition in genetically-engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(7): 1041-1048
- [53] Dang YL, Zhao FJ, Liu XS, Fan X, Huang R, Gao WX, Wang SF, Yang C. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 68
- [54] Jiao S, Li X, Yu HM, Yang H, Li X, Shen ZY. *In situ* enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(4): 832-842
- [55] Li Y, Zhu XJ, Zhang XY, Fu J, Wang ZW, Chen T, Zhao XM. Characterization of genome-reduced *Bacillus subtilis* strains and their application for the production of guanosine and thymidine[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 94
- [56] Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, Fehér T, Pósfai J, Blattner FR, Pósfai G. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome[J]. Genome Research, 2002, 12(4): 640-647
- [57] 张丽静, 王远亮, 王传花. 黄原胶在食品工业中的应用[J]. 农产品加工, 2020(22): 77-79
- Zhang LJ, Wang YL, Wang CH. The application of xanthan gum in food industry[J]. Farm Products Processing, 2020(22): 77-79 (in Chinese)
- [58] Iyer A, Mody K, Jha B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(1/2): 220-222
- [59] Khanna S, Pattnaik P. Production and functional characterization of food compatible biosurfactants[J]. Application Food Science Journal, 2019, 3(1): 1-4
- [60] De S, Malik S, Ghosh A, Saha R, Saha B. A review on natural surfactants[J]. RSC Advances, 2015, 5(81): 65757-65767
- [61] Shekhar S, Sundaramanickam A, Balasubramanian T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2015, 45(14): 1522-1554
- [62] Christova N, Lang S, Wray V, Kaloyanov K, Konstantinov S, Stoineva I. Production, structural elucidation, and *in vitro* antitumor activity of trehalose lipid biosurfactant from *Nocardia farcinica* strain[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(4): 439-447
- [63] Zhang XJ, Ashby R, Solaiman DKY, Uknalis J, Fan XT. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 2076
- [64] 陈静, 刘冉, 刘跃文, 刘新利. 内酯型双乙酰槐糖脂对肿瘤细胞 K562 的抑制作用[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 377-380

- Chen J, Liu R, Liu YW, Liu XL. Inhibition of K562 cancer cells by lactic diacetyl-sophorolipid[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(2): 377-380 (in Chinese)
- [65] Ribeiro IAC, Faustino CMC, Guerreiro PS, Frade RFM, Bronze MR, Castro MF, Ribeiro MHL. Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Journal of Molecular Recognition: JMR, 2015, 28(3): 155-165
- [66] Drakontis CE, Amin S. Biosurfactants: formulations, properties, and applications[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2020, 48: 77-90
- [67] Moldes AB, Paradelo R, Vecino X, Cruz JM, Gudiña E, Rodrigues L, Teixeira JA, Domínguez JM, Barral MT. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 961842
- [68] Noordman WH, Janssen DB. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4502-4508
- [69] Zhou JF, Gao PK, Dai XH, Cui XY, Tian HM, Xie JJ, Li GQ, Ma T. Heavy hydrocarbon degradation of crude oil by a novel thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain A-2[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 126: 224-230
- [70] Nogueira IB, Rodríguez DM, Da Silva Andradade RF, Lins AB, Bione AP, Da Silva IGS, De Oliveira Franco L, De Campos-Takaki GM. Bioconversion of agroindustrial waste in the production of bioemulsifier by *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 and application in bioremediation process[J]. International Journal of Chemical Engineering, 2020, 2020: 9434059
- [71] Sun WY, Zhu BK, Yang F, Dai M, Sehar S, Peng CS, Ali I, Naz I. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas* sp. CQ2 and its application for remediation of heavy metal contaminated soil[J]. Chemosphere, 2021, 265: 129090
- [72] Ashish, Debnath (Das) M. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C. tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018, 170: 40-48
- [73] Liu Q, Niu JJ, Yu Y, Wang CY, Lu SJ, Zhang SW, Lv J, Peng B. Production, characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* L20 for microbial enhanced oil recovery[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 307: 127193
- [74] Alvarez VM, Guimarães CR, Jurelevicius D, De Castilho LVA, De Sousa JS, Da Mota FF, Freire DMG, Seldin L. Microbial enhanced oil recovery potential of surfactin-producing *Bacillus subtilis* AB2.0[J]. Fuel, 2020, 272: 117730
- [75] Niu JJ, Liu Q, Lv J, Peng B. Review on microbial enhanced oil recovery: mechanisms, modeling and field trials[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2020, 192: 107350
- [76] Moutinho LF, Moura FR, Silvestre RC, Romão-Dumaresq AS. Microbial biosurfactants: a broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and technological assessment of rhamnolipid production[J]. Biotechnology Progress, 2021, 37(2): e3093
- [77] Jadhav JV, Anbu P, Yadav S, Pratap AP, Kale SB. Sunflower acid oil-based production of rhamnolipid using *Pseudomonas aeruginosa* and its application in liquid detergents[J]. Journal of Surfactants and Detergents, 2019, 22(3): 463-476
- [78] 唐玉景, 龙旭伟. 槐糖脂的生物合成、发酵及分离纯化[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1123-1142
- Tang YJ, Long XW. Biosynthesis and downstream processing of biosurfactant sophorolipids[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1123-1142 (in Chinese)
- [79] Roelants S, Solaiman DKY, Ashby RD, Lodens S, Van Renterghem L, Soetaert W. Production and applications of sophorolipids[J]. Biobased Surfactants, 2019: 65-119
- [80] Lohitharn N, Derr D. Production of rhamnolipid compositions: US9884883[P]. 2018-02-06
- [81] Cordova LT, Long CP, Venkataramanan KP, Antoniewicz MR. Complete genome sequence, metabolic model construction and phenotypic characterization of *Geobacillus* LC300, an extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing bacterium[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 74-81
- [82] Zhou JF, Li GQ, Xie JJ, Cui XY, Dai XH, Tian HM, Gao PK, Wu MM, Ma T. A novel bioemulsifier from *Geobacillus stearothermophilus* A-2 and its potential application in microbial enhanced oil recovery[J]. RSC Advances, 2016, 6(98): 96347-96354