

生物表面活性剂脂肽的发酵生产 及抑菌应用研究进展*

梅雨薇 杨子云 于 樊 龙旭伟**

(南京理工大学 南京 210094)

摘要 表面活性素(surfactin)是一种环脂肽型生物表面活性剂,具有卓越的表/界面活性,能够显著降低水的表面张力,表现出良好的抗真菌、抗病毒、抗肿瘤、杀虫和抗支原体等生物活性,在医药、农业、食品、日化、石油开采等领域具有很大的应用潜力,但高昂的成本和缺乏竞争力的应用领域使其难以真正地实际应用起来。多年来,大量的研究工作在于促进其工业化应用。综述了 surfactin 的结构、特性及发酵生产,同时系统的比较和总结了 surfactin 在抑菌方面的应用研究。

关键词 表面活性素 芽孢杆菌 生物表面活性剂 抑菌

中图分类号 Q815

表面活性素(surfactin)是一类环脂肽型生物表面活性剂,又称脂肽或者表面活性素,具有良好的表/界面活性,是研究最多也是表面活性最强的生物表面活性剂之一。Surfactin 最早于 1968 年由 Arima 等^[1]在枯草芽孢杆菌培养液中发现,目前在发酵液内发现的 surfactin 主要包含 4 种同系物,均表现出良好的生理活性^[2]。随着研究的深入,surfactin 被发现能够溶解(破坏)血液红细胞、原生质体和原生质球,且具有抗菌、抗病毒、抗支原体等生物活性。此外,与化学表面活性剂相比,surfactin 具有低毒、易生物降解、良好的环境相容性等优点,在医药、农业、食品、化妆品、石油开采等方面可替代化学表面活性剂,具有很大的应用潜力。然而目前 surfactin 的发酵生产存在产量低和规模小等问题,导致其生产成本高昂,无法与化学表面活性剂竞争。因此构建 surfactin 的高产菌株,优化发酵生产工艺以提高 surfactin 的产量是当前需要解决的首要问题。此外,进一步开拓 surfactin 独特的应用领域使其可与化学表面活性剂形成竞争也是当前的热点问题。

本文将介绍 surfactin 的结构和理化性质,综述 surfactin 的发酵生产和抑菌应用等方面的研究现状,分析现存的问题,并对未来的发展方向进行展望。

收稿日期:2019-12-14 修回日期:2020-01-16

* 国家自然科学基金(51778293)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:xuweilong@njut.edu.cn

1 Surfactin 的结构与理化性质

Surfactin 是一种两亲性环状脂肽,由 7 个氨基酸残基组成的肽环与链长为 13 ~ 16 个碳原子的 β -羟基脂肪酸链以内酯键结合而成,如图 1 所示^[3-5]。由于脂肪酸链的长度及氨基酸的种类和位置的不同,surfactin 具有许多的同系物或异构体^[6]。目前发现广泛存在于发酵液中的 surfactin 大多为 C13、C14、C15、C16 四种不同长度脂肪链的脂肽混合物,肽环中的疏水性氨基酸残基一般位于 2、3、4、6 和 7 位,而谷氨酸和天冬氨酸残基分别位于 1 位和 5 位,给分子引入两个负电荷^[7]。此外,有学者发现 surfactin 结构中的 β -羟基脂肪酸的碳原子数也有为 12 ~ 17 个的,同时 C 端的 L-Leu 也可被 L-Ile、L-Val 所取代^[8]。因环化要求、手性序列和良好的分子内相互作用,surfactin 具有紧密的拓扑结构,在水相和水/气界面上,surfactin 采用“马鞍”拓扑结构,也称为 β -片结构^[9-10]。高分辨磁共振结合分子成像技术测定的 surfactin 三维结构表明^[9],在分子残基的一侧,残基 2 和残基 6 在酸性谷氨酸-1 和天冬氨酸-5 侧链附近相互作用,形成一个小的极性结构域。在另一侧,残基 4 与脂链的连接构成了一个主要的疏水域,其中包括残基 3 和残基 7 的侧链^[9, 11]。Surfactin 的三维结构进一步说明了 surfactin 的双亲性和强表面活性。

在液体中,surfactin 趋向集中于该液体和另一相的界面(气/液、液/液、液/固),形成紧密的吸附层从而降低表面张力^[8]。当溶液中的 surfactin 达到一定浓度时,疏水基团受到水的排斥力会自动向内聚集,亲水基团朝外与水接触从而形成胶团,此时的 surfactin 浓度称为临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)。作为表面活性最强的生物表面活性剂之一,surfactin 可显著地将水的表面张力从 72mN/m 降至 27mN/m,并且其 CMC 极低,仅为 8 ~ 25mg/L,其亲水亲油平衡

(hydrophile lipophilic balance, HLB) 值为 14,具有良好的乳化活性,尤其是针对 O/W 型的乳液,显著优于绝大多数化学表面活性剂。同时,surfactin 有良好的耐盐特性,可在盐度高达 21% 的环境中仍保持活性;5 ~ 80℃ 的温度范围和 pH 8.0 ~ 13.0 的范围内保持其表面活性^[12],还具有抗菌、抗病毒、抗支原体、抗肿瘤及溶血等生物活性^[13-15],可用做农药或抗生素,表现出显著化学表面活性剂所不具有的独特性能。

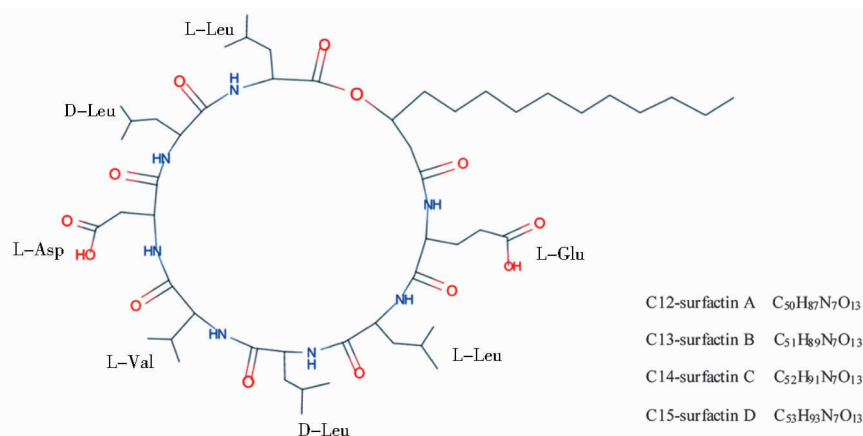


图1 Surfactin 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of biosurfactant surfactin

2 Surfactin 的发酵生产研究现状

2.1 发酵 surfactin 的菌株及其改造

Surfactin 主要由许多革兰氏阳性菌如芽孢杆菌、乳酸杆菌和链霉菌生产,少量的革兰氏阴性菌如假单胞菌和沙雷氏菌也能产生 surfactin^[16],其中枯草芽孢杆菌是生产 surfactin 能力最强的微生物。枯草芽孢杆菌是一种嗜温、好氧、产芽孢的杆状细菌,其生理特征多样,分布广泛,较易分离培养^[17-18]。该菌广泛分布于土壤及腐烂有机物中,对人畜无毒、无害,不污染环境,能产生多种抗生素和酶,具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力^[19-20]。如表 1 所示,大量的枯草芽孢杆菌被证明可用于发酵生产 surfactin,但大多数菌株的产量都极低(< 1g/L)。相比而言,*B. subtilis* ATCC 21332 是目前报道中产量最高的野生菌,在合适的发酵培养条件下,其产量可达 6.45g/L^[21]。尽管如此,这样的产量远无法满足实际生产需要。因此,近年来大量的研究者对不同的野生菌进行了不同的分子改造以提高其产量。

B. subtilis THY-7 是一种从土壤中分离出的

surfactin 生产菌,surfactin 产量仅为 0.55g/L。清华大学的 Jiao 等^[30]利用转录组学分析,从 *B. subtilis* THY-7 的基因组中鉴定并克隆了 4 个强启动子,*PgroE*、*Pcdd*、*PrpLK* 和 *PsspE*。通过筛选,发现 *PgroE* 为最佳启动子,并通过单交叉同源重组取代天然 THY-7 surfactin 合酶(*sfA*)启动子。然而,所得的含有 *PgroE* 取代的工程菌株并不能合成 surfactin。因此,他们接着用蔗糖诱导型启动子 *PsacB* 和 *PsacP* 代替 *PsfA*,所得工程菌株的 surfactin 产量分别为 1.09g/L 和 0.22g/L。随后他们人工构建了 3 个杂合型强启动子 *Pg1*、*Pg2* 和 *Pg3* 用于进一步改造 THY-7 菌株。杂合型启动子 *Pg1* 融合了启动子 *PgroE* 的-35 ~ -10 序列和 *PsacB* 的核糖核酸终止剂(RAT)诱导元件序列,重组菌株 THY-7/*Pg1* 的产量提升到 1.44g/L。杂合型启动子 *Pg2* 是在 *Pg1* 的基础上在 *PgroE* 的-35 ~ -10 序列中间融合了一段 *lacO* 操纵子序列,重组菌株 THY-7/*Pg2* 的产量显著增加至 5.98g/L。杂合型启动子 *Pg3* 是根据枯草芽孢杆菌的 sigma 因子 70(σ A)的-35 ~ -10 的保守序列以及点突变 *Pg2* 的 2 个碱基的基础上设计而来的,最终重组菌株

表 1 不同菌株生产 surfactin 的产量
Table 1 Yield of surfactin produced by different strains

Microorganism	Scale	Surfactin yield(g/L)	Reference
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	500ml flask	0.33	[22]
<i>B. amyloliquefaciens</i> MT45	500ml flask	1.04	[23]
<i>B. subtilis</i> CWS1	500ml flask	0.99	[24]
<i>Bacillus subtilis</i> MZ-7	250ml flask	0.28	[25]
<i>Bacillus subtilis</i> BS5	250ml flask	0.3	[26]
<i>Bacillus subtilis</i> E8	3.7L	0.75	[27]
<i>B. subtilis</i> SPB1	250ml flask	0.72	[28]

Microorganism	Surfactin yield (g/L)	Strain modifications	Surfactin yield(g/L)	Reference
<i>B. subtilis</i> fmbR	0.38	Replacement of <i>Psrfa</i> with <i>Pspac</i>	3.86	[29]
<i>B. subtilis</i> THY-7	0.55	Replacement of <i>Psrfa</i> with <i>PgroE</i>	0	[30]
		Replacement of <i>Psrfa</i> with <i>PsacB</i>	1.09	
		Replacement of <i>Psrfa</i> with <i>PsacP</i>	0.22	
		Replacement of <i>Psrfa</i> with Pg1	1.44	
		Replacement of <i>Psrfa</i> with Pg2	5.98	
		Replacement of <i>Psrfa</i> with Pg3	9.74	
		Replacement of <i>Psrfa</i> and Pg3	8.2	
<i>B. subtilis</i> THY-15	1.2	Introduce <i>VHb</i> gene	10.2	[31]
<i>B. subtilis</i> 168	0	Introduce <i>srfa</i> gene	0.4	[32]
		Deleting the biofilm formation-related genes	1.4	
		Deleting the nonribosomal peptide synthetase/polyketide synthase pathways	1.7	
		Over-expressing potential self-resistance associated proteins	3.8	
		Engineering the branched-chain fatty acid biosynthesis pathway	8.5	
		Enhancing <i>srfa</i> transcription	12.8	

THY-7/Pg3 在 5L 发酵罐上(具有泡沫回收装置)发酵 32h 的产量达到了 9.74g/L。可见,通过启动子的系列改造,THY-7 工程菌表现出高产、高生产速率等优良性状。

B. subtilis THY-15^[33]是由于慧敏等从土壤中筛选出的另一株好氧型革兰氏阳性菌,可在 50℃、pH 为 5.7、7% NaCl 的条件下生长,在优化培养基中 surfactin 产量可达 1.2g/L。为了进一步提高其产量, Wang 等^[31]以 THY-15 作为亲本菌株,进行单交叉同源重组,用 IPTG 诱导的强启动子 *Pg3* 取代染色体中的 surfactin 合成酶启动子 *Psrfa*,获得新的菌株 THY-15/Pg3-*srfa*, surfactin 的产量显著增加至 8.2g/L。但在 5L 发酵罐中进一步培养工程菌 THY-15/Pg3-*srfa* 时,由于发酵过程中严重起泡导致溶解氧不足,最终产量只有 5.6g/L。为了解决这个问题,他们找到了一种细菌血红蛋

白——透明颤菌血红蛋白(VHb)^[34],VHb 存在于专性需氧细菌透明颤菌中,能够在缺氧条件下改善呼吸和能量代谢。在天然微需氧启动子的驱动下,将 pHTKanR-VHb 携带的 *VHb* 基因导入 THY-15/Pg3-*srfa* 中,获得了一种新的工程菌 THY-15/Pg3-*srfa*(*VHb*),新的工程菌在摇瓶里的产量为 10.2g/L,比非 *VHb* 工程菌的产量高了 25%,在发酵罐中的产量为 8.6g/L,尽管未能超过在摇瓶中的产量,但有很大程度的改善。发酵罐中的产量偏低,这与发酵过程中严重的泡沫问题分不开。Surfactin 作为表面活性非常优越的生物表面活性剂,在发酵生产过程中,伴随着通气和搅拌,不可避免地会带来严重的泡沫问题。这些泡沫大量的积聚会导致溶解氧量下降,不利于细菌生长,从而导致产量下降。于慧敏等通过引入 *VHb* 基因使问题得到了改善,也降低了消泡成本。

B. subtilis 168 具有明确遗传和发酵背景,非致病性且能够有效吸收外源 DNA 易于转化,被用作遗传操作的模式生物,但其本身不产 surfactin。江南大学的 Wu 等^[32] 选择了 *B. subtilis* 168 作为初始宿主,采用系统代谢工程方法构建 surfactin 的高产菌。(1)他们将从中国白酒培养物中分离出的高产菌株 *B. amyloliquefaciens* MT45 的完整 *sf* 基因整合到 *B. subtilis* 168 中使其具有合成 surfactin 的能力,得到的重组菌株编号为 168S1,产量为 0.4g/L。(2)他们尝试删除了一些多糖、淀粉样蛋白相关基因 *epsA-O*、*tasA-sipW-yqxM*^[35-36],以及非核糖体/未知聚酮合成酶操纵子 *pps*、*dhb*、*pks*,使得能量、前体和底物重新分配到 surfactin 生产中,这使 surfactin 产量进一步增加了 3.3 倍。(3)由于 surfactin 本身对枯草芽孢杆菌有一定的抑制作用,不利于 *B. subtilis* 168 的 surfactin 产量进一步提高。因此他们通过替换人工构建的启动子 P43 来过表达 *B. subtilis* 168 潜在的抗性相关蛋白,以此来改善细胞对 surfactin 的耐受性。他们同时过表达了疑为 surfactin 输出物的 *SurC* 和潜在的与自身抗性相关的 *AcrB*^[37],以及双组分系统 *liaIHGFSR* 操纵子^[38],进一步将 surfactin 产量提高了 8.5 倍。(4)徐岩等通过改造支链脂肪酸生物合成途径增加前体支链脂肪酸的供应,将 surfactin 产量提高至 8.5g/L,比初始菌株的产量提高了 20.3 倍。(5),由于细胞生长偏好糖酵解途径,他们通过增强 *srfA* 转录使乙酰辅酶 A 从细胞生长途径转移到 surfactin 生物合成,最终 surfactin 产量增加至 12.8g/L,产率为 65.0mmol/mol 蔗糖(理论产率的 42%)。该研究将代谢途径模块化使非生产菌株成为高产菌株,为 surfactin 的高产发酵奠定了良好的基础。

2.2 发酵培养基及发酵参数优化

2.2.1 发酵培养基的影响 优化培养基是提高发酵产物产量的一种重要手段,也是大量工业发酵过程中普遍采用的方法之一。枯草芽孢杆菌产 surfactin 的培养基主要包括碳源、氮源和微量元素三部分,这些成分是维持菌株生长代谢的物质基础,对 surfactin 的产量影响较大。

碳源,如葡萄糖、甘露醇、蔗糖和植物油等都能用于生产 surfactin,又以糖类碳源更加适合 surfactin 的发酵生产。Al-Ajlani 等^[25] 和 Liu 等^[39] 考察了一系列糖质原料对枯草芽孢杆菌产 surfactin 的影响,包括葡萄糖、蔗糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、可溶性淀粉和糊精。两组实验结果均表明,当蔗糖或葡萄糖作为碳源

时,surfactin 产量较高,但两者的差别较小。因此,基于成本考虑,葡萄糖被广泛用于 surfactin 的发酵生产。此外,进一步的研究表明,培养基中葡萄糖浓度在 20 ~ 40g/L 较为适宜,葡萄糖浓度过高会导致发酵液 pH 显著下降,不利于 surfactin 的代谢合成^[7, 40]。

为了进一步提高发酵过程的经济性,近年来也有很多学者尝试用廉价的农业废弃物或下脚料作为原料(碳源)来生产 surfactin,如表 2 所示。例如,Zhu 等^[41] 用 *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 以稻草和大豆粉为主要原料进行固态发酵制备 surfactin,在 250ml 的培养瓶中,最佳培养条件为培养基中含有 5g 豆粉、4g 稻草、2% (m/m) 麦芽糖和 2.65% (m/m) 甘油, pH 为 7, 15.96% 的接种量,26.9℃ 培养 48h。随后在 50L 发酵罐中用最佳条件,产率仅为 15.03mg/g 原料。Zhi 等^[23] 利用废酒糟(DGS)作为原料,将具有显著水解酶活性的 *B. amyloliquefaciens* X82 与可生产 surfactin 的 *Bacillus amyloliquefaciens* MT45 共培养,最大产量达到 3.4g/L,是单独培养的 1.5 倍。尽管如此,但这些发酵过程中的产量都极低,且碳源残留量较多,对后续 surfactin 的分离和废水处理均会带来不利影响。因此,大规模的 surfactin 发酵仍以糖质原料为佳。

枯草芽孢杆菌代谢合成 surfactin 过程中可利用的氮源分为有机氮源(包括尿素、胰蛋白胨、酪蛋白胰酶消化物、酪蛋白水解物、牛肉提取物和酵母提取物)和无机氮源[包括 NH_4Cl 、 NaNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]。Abdel-Mawgoud 等^[40] 评价了一系列有机氮源(草酸铵、尿素、酵母提取物、蛋白胨、胰蛋白胨、玉米浆)和无机氮源 [NaNO_3 、 KNO_3 、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 对 surfactin 产量的影响,结果表明 NaNO_3 是生产 surfactin 的最佳氮源,且 NaNO_3 浓度为 5 ~ 10g/L 时, *Bacillus subtilis* BS5 的 surfactin 产量提高了 1.6 倍,达到 0.75g/L。更多的文献也认为 NaNO_3 是最有利于 surfactin 发酵生产的氮源。此外,培养基中的 C/N 对 surfactin 的产生也有具有显著的影响。Ghribi 和 Ellouze-Chaabouni^[28] 通过调节 C/N 来优化 surfactin 的发酵产量,发现 C/N 为 7 时 *Bacillus subtilis* SPB1 合成的 surfactin 的产量提高了 1.2 倍左右。

此外,微量元素通过参与多酶合成系统,也会影响 surfactin 的生物合成,其中 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 对枯草芽孢杆菌合成 surfactin 具有重要影响^[48-50]。Wei 等^[51] 用 Taguchi method 研究了 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+}

表 2 不同芽孢杆菌利用农工业废渣生产 surfactin 的产量

Microorganism	Agro-industrial waste	Addition of agro-industrial waste	Surfactin yield	Reference
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173	Rice straw and soybean flour	5g soybean flour, 4g rice straw, 2% maltose and 2.65% glycerol	15.03mg/gds	[41]
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2423	Rice mill polishing residue	Total carbohydrate ; 4.76g/L	4.17g/kg residue	[42]
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2423	Waste frying sunflower oil	50g/L	14.9mg/g	[43]
	Waste frying rice bran oil	50g/L	11mg/g	
<i>Bacillus subtilis</i>	Hydrolysis of olive mill waste	5%	26.5mg/L	[44]
<i>B. amyloliquefaciens</i> MT45 and <i>B. amyloliquefaciens</i> X82	Distillers' grains	200g/L	3.4g/L	[23]
<i>Bacillus subtilis</i> 37	Feather hydrolysate waste and glutamate mill waste	FHW (1% , V/V) GMW (4% , V/V) ,	0.523g/L	[45]
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448	Okara	50%	3.3g/kg dry solids	[46]
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Rehydrated whey powder	10% ~20%	0.18 ~0.29g/L	[47]

对 *Bacillus subtilis* ATCC21332 产生 surfactin 的影响。在没有 Mg^{2+} 或 K^{+} 时,surfactin 的产量下降到 0.4g/L,当不存在 Mg^{2+} 或 Fe^{2+} 时,产量也下降到 0.6g/L 左右。然而,当 Fe^{2+} 或 Mn^{2+} 中只有一个缺失时,surfactin 产量比原始培养基产量提高了 80%,这表明这些金属离子之间可能存在一些协同作用。Wei 等进一步优化了 Mn^{2+} [22] 和 Fe^{2+} [52] 的加入量,与不添加 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的培养基相比,添加 0.01mmol/L Mn^{2+} 可使 surfactin 产量由 0.33g/L 提高到 2.6g/L,添加 4.0mmol/L 的 Fe^{2+} , surfactin 产量高达 3 000mg/L 细胞浓度,surfactin 产量分别增加 8 倍和 10 倍,surfactin 的产率可提高到 24mg/(L·h)。

2.2.2 发酵操作参数的优化 除了培养基成分外,发酵过程中的操作参数也会显著影响 surfactin 的产生,主要影响因素包括温度、pH、转速、通气量等。

不同的生产菌株适宜的培养温度各不相同,大多数枯草芽孢杆菌能在 25~37℃ 的温度生长,但其代谢产生 surfactin 所需的温度却因菌株的不同而不同。Sen 和 Swaminathan [53] 发现,*Bacillus subtilis* DSM 3256 产生 surfactin 的最佳温度为 37.4℃。Banat [54] 则发现各种嗜热芽孢杆菌在 40℃ 以上也可以生产 surfactin,且不影响 surfactin 的表面活性。不同温度对同一菌株的产量也有很大影响。例如,Abdel-Mawgoud 等 [40] 优化了 *Bacillus subtilis* BS5 的培养条件,发现当培养温度为 25℃ 或 35~45℃ 时,surfactin 产量仅为 0.8~1.0g/L,而在 30℃ 时,surfactin 产量可提高到 1.5g/L。可见,温度的调节对发酵产量的影响较大。此外,培养基的 pH

也对 surfactin 合成有较大影响,Abdel-Mawgoud 等 [40] 的实验结果表明,在 pH 为 6.75 时,*Bacillus subtilis* BS5 生产 surfactin 的量最高,为 2.25g/L。

Surfactin 的发酵生产过程为好氧过程,因此溶解氧传质是 surfactin 生产工艺优化和扩大的关键参数之一。Yeh 等 [3] 的实验结果表明,快速搅拌提高溶解氧浓度对枯草芽孢杆菌生产 surfactin 有积极影响,搅拌转速在 200r/min 时,surfactin 的产量最高,可达 3.5g/L。Ghrib 和 Ellouze-Chaabouni [28] 在 2.6L 发酵罐规模下对 *Bacillus subtilis* SPB1 生产 surfactin 所需溶解氧进行了研究。为了阐明氧化代谢在 surfactin 生产中的影响,他们在整个发酵过程中使用了不同的通气曲线。结果表明,随着溶解氧提高到 30%,菌株生长和 surfactin 的生产都得到了明显改善。在此条件下,surfactin 的产量达到 4.922g/L,相应的生物量约为 24.61mg/10¹⁰ CFU。然而,随着溶解氧的进一步增加,surfactin 的产量会显著降低,当溶解氧分别为 40% 和 60% 时,surfactin 的产量降为 4.230g/L 和 2.609g/L。这是因为搅拌速率和通气量过大会造成发酵液中泡沫堆积,大量泡沫堆积会阻碍氧的传递,导致生物量减少,发酵周期缩短,从而使 surfactin 的产量降低 [3]。此外,严重的泡沫问题还会带来染菌、产物和菌体的丢失等一系列问题。可见,虽然高的通气搅拌有利于 surfactin 的产量提升,但是严重的泡沫问题限制了传质并会带来一系列严重的不利影响。因此,surfactin 发酵过程中的泡沫控制是决定其产量和规模进一步放大的关键壁垒,但目前尚缺乏有效的手段。

此外,在发酵液中添加少量固体多孔载体(如活性炭或膨胀黏土)也可显著提高枯草芽孢杆菌的 surfactin 产量。例如,往培养基中加入 25g/L 活性炭,可使 surfactin 产量提高到 3.6g/L,比无载体液体培养的 surfactin 产量高出 36 倍^[3]。Kan 等^[24]在发酵开始时加入 2g/L 的镁铝层状双氢氧化物(Mg-Al LDH)可使 *Bacillus subtilis* CWS1 的 surfactin 产量提高至 3.789g/L,他们认为 Mg-Al LDH 对细菌有轻微毒害作用,因此刺激存活的细胞分泌更多的 surfactin 来保护自身。Chang 等^[55]在 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 培养物中添加 4g/L 的 Mg-Fe LDH(Mg/Fe 摩尔比为 2:1)时 surfactin 产量可达 5.280g/L,较之添加前提高 5 倍。他们的研究表明:虽然 Mg-Al LDH 在一定程度上会抑制细菌的生长,但 Mg-Al LDH 释放的铁盐同时也更有利于 surfactin 的合成。因此,尽管菌浓度较低,但是 surfactin 的产量却更高,有利于底物转化率的提高。

还有研究表明,接种物的菌龄和接种量也会影响菌株迟滞期的持续时间、比生长率、生物量,从而影响最终的产量。Ghribi 和 Ellouze-Chaabouni^[28]通过调节接种量,考察了不同初始 OD_{600} 对 surfactin 产量的影响。结果表明:当初始 OD_{600} 为 0.15 时 surfactin 的产量最佳,可达 2.04g/L,比优化前提高了 2.55 倍。Sen 和 Swaminathan^[56]进行了两阶段接种物的计算机辅助响应面建模、优化和分析。由此得到的 *Bacillus subtilis* DSM 3256 最佳接种量分别为:原代接种年龄和接种量分别为 56h 和 5.5%(V/V)、次代接种年龄和接种量分别为 4.5h 和 9.5%(V/V)。结果表明,一个较长的一级接种年龄和较低的一级接种量及较短的二级接种年龄和较高的二级接种量构成了提高 surfactin 产量的最佳组合。

大多数的研究考察单因素对发酵过程的影响,但实际上大量影响因素之间会存在交互影响,因此一些研究者在优化发酵时会综合考虑多个因素以得到最佳的培养条件。Fan 等^[57]用响应曲面法得到培养 *B. amyloliquefaciens* B15 的最佳条件为:葡萄糖 36.28g/L,酵母提取物 12.77g/L,装液量 100ml,初始 pH 6.82,转速 225r/min,37℃ 培养 51.69h,最终 surfactin 产量提高了 23.19%。陈亮等^[58]用响应面法优化得到 *Bacillus subtilis* LM2303 最优发酵工艺条件为培养 39h、温度 31℃、转速 173r/min、接种量 5%、装液量 100ml/250ml。在最优发酵条件下,surfactin 产量是优化前的 1.6 倍。也有采用如最陡爬坡法^[59]、PB 设计^[60]、人工神经网络

络模型^[61]等方法对 surfactin 发酵过程中的参数进行优化。

上述大量的研究从菌株改造、发酵培养基优化和发酵调控等角度对 surfactin 的发酵生产进行了系列优化,使 surfactin 的发酵产量从 1g/L 提升至 12g/L,为进一步实现 surfactin 的发酵生产奠定了良好的基础。但目前的发酵仍为实验室摇瓶或者小罐发酵生产规模,还无法满足实际的应用需要。此外,更加重要的是,surfactin 发酵生产过程中的严重泡沫问题限制了其产量进一步提升和发酵规模的放大,已成为限制 surfactin 生产规模的关键技术壁垒。因此,在现阶段,surfactin 的发酵生产成本还远无法与化学表面活性剂形成竞争。

3 Surfactin 的抑菌作用

Surfactin 由于具有诸多优良特性,在医药、农业、食品、日化、石油开采等领域具有良好的应用前景。但是大多数的应用领域在于替代化学表面活性剂,在目前的发酵生产现状下,surfactin 尚无法与化学表面活性剂进行竞争,无法真正实现工业化应用。

3.1 Surfactin 的生物活性

近年来,大量的研究表明,surfactin 具有普通化学表面活性剂所不具备的良好生物活性。这与其能显著降低生物膜表面张力和界面张力的能力有关^[61]。此外,surfactin 特殊的水力学空间结构(如图 1 所示,较大的亲水头部和较小的疏水尾部),可以插入到脂质双分子层,溶解流动的磷脂层,螯合一价和二价阳离子,通过通道形成或类似洗涤剂的机制来改变细胞膜的通透性^[62],从而破坏细胞膜的完整性或使细胞质等内容物泄漏(图 2)。也有研究表明,surfactin 在不同电导水平下可以在生物膜中形成与电压无关的通道,这些通道可能干扰膜的完整性和 Ca^{2+} 、 K^{+} 等离子的渗透性,从而导致细胞膜破裂^[63-64]。Carrillo 等^[65]的研究进一步表明,surfactin/脂质值高于 0.92 时能够使脂质膜溶解,内容物泄漏,而 Vollenbroich 等^[66]发现 surfactin 浓度为 50 μ mol/L 时,可以使支原体脂质双分子层和膜系统完全解体。

3.2 Surfactin 的抑菌活性

由于广泛且优良的生物活性,surfactin 表现出良好的广谱抑菌活性,不仅对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、霉菌等多种细菌或真菌具有抑菌作用,而且对病毒、支原体和原虫等也具有显著的抑制效果^[13, 67]。研

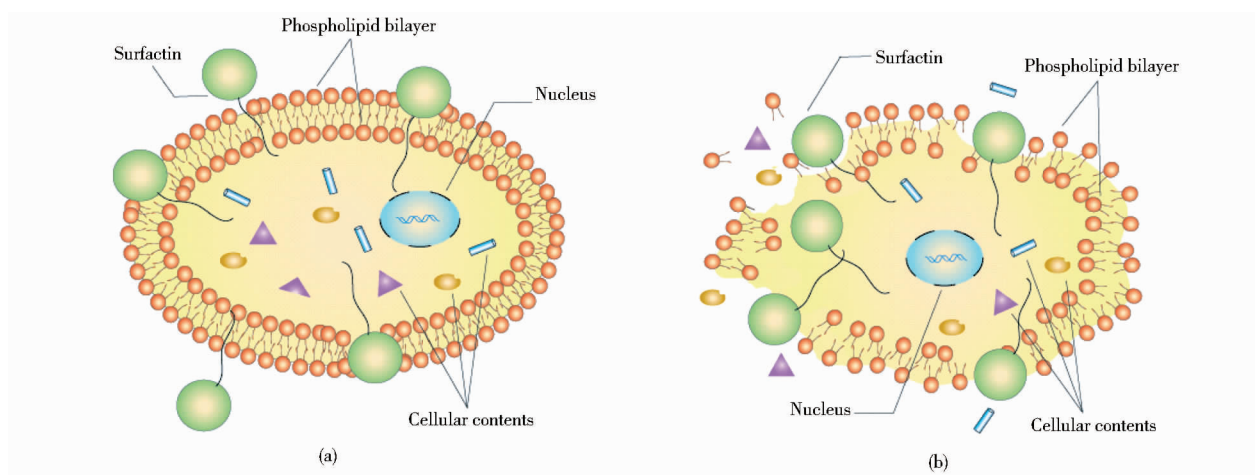


图2 Surfactin 破坏细胞膜机制图

Fig. 2 The mechanism of destroying cell membrane treated by surfactin

(a) Schematic diagram of inserting into cell membrane (b) Schematic diagram of destroying cell membrane

究表明, surfactin 对病原菌作用的细胞靶位点主要是细胞膜。Yuan 等^[68]发现 surfactin 在 15 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时可以抑制猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 和传染性肺炎病毒 (TGEV) 的增殖, 他们用类似 surfactin 的荧光脂肽证明了 surfactin 可以插入到病毒包膜中从而降低包膜形成的速度。Liu 等^[69]的研究结果表明, surfactin 会降低微生物的黏附性, 同时还会破坏微生物的细胞膜。因为 surfactin 会显著降低 *S. aureus* 碱性多糖和自身诱导因子 2 的合成, 同时降低 *icaA* 和 *icaD* 的表达, 导致合成生物膜的中间体减少, 从而使生物膜的合成速率减慢甚至无法合成生物膜。也有研究认为, 脂肽可能通过影响酶的活性来改变细胞代谢, 或是与病原菌染色体 DNA 发生相互作用, 导致 DNA 的复制、转录、表达功能受抑制, 影响细菌蛋白质的合成, 进而导致病原菌繁殖受阻^[13]。

3.3 Surfactin 的抑菌应用

3.3.1 农业生物防治中的应用 如表 3 所示, surfactin 可以抑制多种植物病原菌, 最小抑制浓度 (MIC) 和最小致死浓度 (MBC) 都较低, 显著优化大多数化学表面活性剂。更为重要的是, surfactin 可生物降解, 不会带来二次污染, 对环境友好, 因此近年来越来越多的学者开始关注 surfactin 在农业方面的抑菌应用。Krishnan 等^[70]在体外用 surfactin 处理植物病原菌 *Fusarium moniliforme* ITCC 4916, 发现其抑菌效果比化学合成的多菌灵更显著, 用 surfactin 处理过的感染玉米粒发芽率也远高于对照组。进一步的研究表明, surfactin 处理

后, *F. moniliforme* 的 DNA 发生了降解, 某些蛋白质减少甚至缺失, 胞内抗氧化剂还原型谷胱甘肽酶 (GSH) 含量显著降低, 因此他们认为 surfactin 抑制 *F. moniliforme* 是由于破坏了其抵抗活性氧 (ROS) 的诱导或其他一些机制。Park 等^[2]发现 *Bacillus velezensis* GH1-13 分泌的 surfactin 对植物生长有促进作用, 而对 *Gibberella moniliformis*、*Fusarium fujikuroi*、*Bipolaris oryzae* 和 *Colletotrichum gloeosporioides* 等植物病害菌有较强的拮抗作用, 结果表明 surfactin 可以明显抑制这些真菌菌丝的生长。Paraszkiewicz 等^[71]测试了 6 种枯草芽孢杆菌产生的生物表面活性剂, 最终发现只有 surfactin 出现群集运动并形成生物膜, 进一步的抑菌实验表明 surfactin 可以限制番茄灰霉病菌和黄曲霉的生长, 产生纤维素酶和菊粉酶, 并促进黄瓜种子萌发。

3.3.2 医学领域的应用 群集运动和生物膜形成是细菌在表面定植和增加医院感染可能性的关键原因^[78], 各种医院感染, 如与使用中心静脉导管、导尿管、人工心脏瓣膜、语音假体和矫形器械有关的感染, 显然与附着在生物材料表面的生物膜有关。而 surfactin 具有抗黏附性, 能抑制病原微生物与固体表面或感染部位的黏附^[79-81]。为了测试 surfactin 对医学相关物体的影响, Mireles 等^[82]在透明的乙烯基导尿管中培养了 *S. enterica*、*E. coli* 和 *Proteus mirabilis*, 研究表明使用 surfactin 溶液对导管进行预涂, 可明显抑制这些病原微生物在导管表面形成生物膜, 可以有效减少感染。Hwang 等^[83]评价了 *B. subtilis* complex BC1212 合成的

表 3 Surfactin 对不同菌株的 MIC 和 MBC 值

Table 3 MIC and MBC values of surfactin against different strains

Microorganism	Inhibited-strain	MIC(g/L)	MBC(g/L)	Reference
<i>B. subtilis</i> MSH1	<i>Shigella dysenteriae</i>	0.15	0.2	[72]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	0.25	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC65389	0.032	0.128	[69]
<i>B. subtilis</i> MB198, MB245, MB199, and MB200	<i>Candida albicans</i> SC5314	>0.1		[39]
<i>Bacillus safensis</i> F4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> S61	6.25		[73]
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	1.56		
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3.125		
<i>B. subtilis</i> AM1	<i>Legionella bozemanii</i> ATCC 33217	0.001		[74]
<i>B. subtilis</i> PB2-L1	<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC3893	0.05		[75]
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	>0.5		[76]
<i>Bacillus subtilis</i> pB2	<i>Staphylococcus aureus</i> AS1.2465	0.02		[77]

surfactin 单独或与多种抗菌药物联合应用对猪肺炎支原体的杀灭率及抗真菌效果。他们的研究表明:所有的 surfactin 同系物(surfactin A、B、C 和 D)的 MIC 均为 64μg/ml, surfactin C 与大肠杆菌素(COL)、诺氟沙星(NFX)、土霉素(OTC)、链霉素(SM)和硫霉素(TIA)共同使用可显著降低 Pathogenic *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)的存活率,表现出良好的增效作用。这表明 surfactin 或许可作为支原体感染的预防或治疗助剂。

3.3.3 食品领域的应用 Nitschke 等^[84]研究了 surfactin 影响食物致病菌 *Listeria monocytogenes*、*Enterobacter sakazakii* 和 *Salmonella Enteritidis* 在不锈钢和聚丙烯表面的黏附,用结晶紫染色技术对细菌黏附进行定量,结果表明 surfactin 预处理可显著降低所有菌株的黏附力。章栋梁^[85]发现 surfactin 添加量为 471.56mg/kg肉、943.12mg/kg 肉和 1 886.24mg/kg 肉时均对肉丸在 4℃储藏过程有一定保鲜效果。与对照组相比,三种添加量的 surfactin 能明显减缓肉丸中乳酸菌和假单胞菌属的生长繁殖,肉丸储藏至第 9 天菌落总数不超标,挥发性盐基氮值仍小于 20mg N/100g 肉,维持鲜肉水平,此外脂肪氧化(TBARS 值)也远低于对照组和 Nisin 组, pH 相对较低,感官指标也表明 surfactin 具有一定的护色功效,能减缓因微生物作用而产生的恶臭味。

上述研究表明,来源于微生物发酵的 surfactin 具有绿色、无毒、易降解等良好特性,而且表现出卓越的抑菌活性,相比化学表面活性剂而言,在农业、医药和食

品等领域具有独特的应用优势,表现出良好的潜在应用前景。但是目前的发酵工艺及分离工艺尚不能满足工业化应用对产能和产品品质的要求。

4 结论与展望

Surfactin 在多领域表现出良好的应用前景,如可用于环境生物修复、抗菌药物的开发,然而, surfactin 产量低和分离纯化成本高导致的高昂生产成本限制了其广泛的应用。大量的研究工作关注在 surfactin 产生菌株的改造上,经过系列的基因组学分析和对菌株进行改造, surfactin 的产量可高达 10g/L 以上,但目前仍处于摇瓶或者实验室小罐发酵的水平。因此,以后的研究重点还需关注开发新的发酵策略,优化培养基成分或优化发酵参数,以进一步提高 surfactin 的产量和底物的转化率。更加重要的是, surfactin 发酵生产的代谢调控及规模放大也需引起关注,尤其是影响发酵放大的严重泡沫问题。此外, surfactin 的生物活性作用机制,其在细胞间通信、发病机制、运动和生物膜形成中的自然作用以及它对人体细胞的影响和毒性还需进一步研究,以期进一步开发有价值的应用。

参考文献

[1] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun, 1968, 31 (3): 488-494.

[2] Park G, Nam J, Kim J, et al. Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant

- pathogens. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2019, 40 (7): 704-709.
- [3] Yeh M S, Wei Y H, Chang J S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. Biotechnology Progress, 2010, 21 (4): 1329-1334.
- [4] Chen W C, Juang R S, Wei Y H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. Biochemical Engineering Journal, 2015, 103: 158-169.
- [5] Yang H, Li X, Li X, et al. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407 (9): 2529-2542.
- [6] 杨子云, 马科锋, 何禹锟, 等. Surfactin 的生产及在石油工业的应用研究进展. 生物加工过程, 2018, 16(1): 67-74.
Yang Z Y, Ma K F, He Y K, et al. Advances in production of surfactin and its application in petroleum industry. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(1): 67-74.
- [7] 朱玲燕, 刘强, 刘洋, 等. 培养基组分对枯草芽孢杆菌产表面活性素的影响. 生物加工过程, 2015, 13 (5): 8-13.
Zhu L Y, Liu Q, Liu Y, et al. Optimization of culture medium for high production of surfactin c15 component by *Bacillus subtilis*. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13 (5): 8-13.
- [8] 崔艳红, 黄现. 生物表面活性剂——表面活性素. 生物技术, 2006, 20 (52): 1695-1699.
Cui Y H, Huang X. Surfactant from microbial——surfactin. Biotechnology, 2006, 20 (52): 1695-1699.
- [9] Peypoux F, Bonmatin J, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51 (5): 553-563.
- [10] Bonmatin J M, Genest M, Labbé H, et al. Solution three-dimensional structure of surfactin: A cyclic lipopeptide studied by ¹H-nmr, distance geometry, and molecular dynamics. Biopolymers; Original Research on Biomolecules, 1994, 34 (7): 975-986.
- [11] Bonmatin J M, Labbé H, Grangemard I, et al. Production, isolation and characterization of [Leu 4]-and [Ile 4] surfactins from *Bacillus subtilis*. Letters in Peptide Science, 1995, 2 (1): 41-47.
- [12] Fei D, Zhou G W, Yu Z Q, et al. Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. Journal of Surfactants and Detergents, 2020, 23 (1): 109-118.
- [13] 翟少伟, 李剑, 史庆超. 抗菌脂肽 Surfactin 的抗菌活性及应用. 动物营养学报, 2015, 27 (5): 1333-1340.
Zhai S W, Li J, Shi Q C. Antimicrobial lipopeptide surfactin: antimicrobial activity and applications. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27 (5): 1333-1340.
- [14] 曹小红, 焦润芝, 王春玲, 等. *Bacillus natto* TK-1 产脂肽的结构鉴定及其诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究. 中国生物工程杂志, 2009, 29(2): 54-58.
Cao X H, Jiao R Z, Wang C L, et al. The structural identification and antitumor activity on MCF-7 cells of surfactin from *Bacillus subtilis* TK-1. China Biotechnology, 2009, 29(2): 54-58.
- [15] Yuan L, Zhang S, Peng J, et al. Synthetic surfactin analogues have improved anti-PEDV properties. PLoS One, 2019, 14 (4): e0215227.
- [16] Kosaric N, Sukan F V. Biosurfactants. Boca Raton: CRC Press, 2014: 83.
- [17] 赵朋超, 王建华, 权春善, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽生物合成的研究进展. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (10): 108-113.
Zhao P C, Wang J H, Quan C S, et al. Progress on biosynthesis of antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis*. China Biotechnology, 2010, 30 (10): 108-113.
- [18] 宋萍, 戚小灵, 胡懿, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产脂肪酶的合成培养基. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (8): 100-105.
Song P, Qi X L, Hu Y, et al. Optimization of lipase production conditions by *Bacillus subtilis* using surface methodology. China Biotechnology, 2010, 30 (8): 100-105.
- [19] Chen Y, Liu S A, Mou H, et al. Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 871.
- [20] Alvarez F, Castro M, Príncipe A, et al. The plant - associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112 (1): 159-174.
- [21] Yeh M S, Wei Y H, Chang J S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, 2006, 41 (8): 1799-1805.
- [22] Wei Y H, Chu I M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters, 2002, 24 (6): 479-482.
- [23] Zhi Y, Wu Q, Xu Y. Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. Bioresource Technology, 2017, 235: 96-103.
- [24] Kan S C, Lee C C, Hsu Y C, et al. Enhanced surfactin production via the addition of layered double hydroxides. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017, 80: 10-15.
- [25] Al-Ajlani M M, Sheikh M A, Ahmad Z, et al. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. Microbial Cell Factories, 2007, 6 (1): 17.
- [26] Abdel-Mawgoud A M, Aboulwafa M M, Hassouna A H.

- Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 150 (3): 289-303.
- [27] Gong G, Zheng Z, Chen H, et al. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food Technology and Biotechnology*, 2009, 47 (1): 27-31.
- [28] Ghribi D, Ellouze-Chaabouni S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 2011: 653654.
- [29] Sun H, Bie X, Lu F, et al. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55 (8): 1003-1006.
- [30] Jiao S, Li X, Yu H, et al. In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114 (4): 832-842.
- [31] Wang Q, Yu H, Wang M, et al. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. *Process Biochemistry*, 2018, 70: 36-44.
- [32] Wu Q, Zhi Y, Xu Y. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 87-97.
- [33] Yang H, Yu H, Shen Z. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42 (8): 1139-1147.
- [34] 董玉国, 王丽华, 徐瑞, 等. 根癌农杆菌介导透明颤菌血红蛋白基因 (*vgb*) 在短密青霉菌中的克隆表达. *高校化学工程学报*, 2015, 29 (1): 133-137.
- Dong Y G, Wang L H, Xu R, et al. Cloning and expression of *vgb* gene in *Penicillium brevicompactum* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediates transformation (ATMT). *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2015, 29 (1): 133-137.
- [35] Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, et al. A Self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell*, 2015, 161 (4): 946-946.
- [36] López D, Vlamakis H, Losick R, et al. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 2009, 23 (14): 1631-1638.
- [37] Li X, Yang H, Zhang D, et al. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42 (1): 93-103.
- [38] Zhi Y, Wu Q, Xu Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40976.
- [39] Liu X, Ren B, Gao H, et al. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS One*, 2012, 7 (5): e34430.
- [40] Abdel-Mawgoud A M, Aboulwafa M M, Hassouna N A H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 150 (3): 305-325.
- [41] Zhu Z, Zhang F, Wei Z, et al. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 2013, 127: 96-102.
- [42] Gurjar J, Sengupta B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. *Bioresource Technology*, 2015, 189: 243-249.
- [43] Vedaraman N, Venkatesh N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2011, 28 (2): 175-180.
- [44] Ramírez I M, Vaz D A, Banat I M, et al. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. *Bioresource Technology*, 2016, 205: 1-6.
- [45] Chen C, Lin J, Wang W, et al. Cost-effective production of surfactin from xylose-rich corn cob hydrolysate using *Bacillus subtilis* BS-37. *Waste and Biomass Valorization*, 2019, 10 (2): 341-347.
- [46] Slivinski C T, Mallmann E, De Araújo J M, et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 2012, 47 (12): 1848-1855.
- [47] Cagri-Mehmetoglu A, Kusakli S, Van De Venter M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95 (7): 3643-3649.
- [48] 黄翔峰, 詹鹏举, 彭开铭, 等. 培养基中铁离子对枯草芽孢杆菌 CICC 23659 发酵产脂肽的影响研究. *中国生物工程杂志*, 2013, 33 (6): 52-61.
- Huang X F, Zhan P J, Peng K M, et al. Study on the influence of iron dosage in the medium on fermentation of lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* CICC 23659. *China Biotechnology*, 2013, 33 (6): 52-61.
- [49] Wei Y H, Wang L F, Changy J S, et al. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *Journal of Bioscience &*

- Bioengineering, 2003, 96 (2): 174-178.
- [50] Huang X, Liu J N, Wang Y, et al. The positive effects of Mn^{2+} on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29 (2): 381-389.
- [51] Wei Y H, Lai C C, Chang J S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, 2007, 42 (1): 40-45.
- [52] Wei Y H, Wang L F, Chang J S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 2004, 20 (3): 979-983.
- [53] Sen R, Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47 (4): 358-363.
- [54] Banat I M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 1993, 15 (6): 591-594.
- [55] Chang P H, Li S Y, Juang T Y, et al. Mg-Fe layered double hydroxides enhance surfactin production in bacterial cells. *Crystals*, 2019, 9 (7): 355.
- [56] Sen R, Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21 (2): 141-148.
- [57] Fan X, Zhu H, Guo D, et al. Optimization of lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* B15 using response surface methodology. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2015, 4 (28): 15-19.
- [58] 陈亮, 毛晶晶, 宇光海, 等. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* 抗菌脂肽发酵工艺条件. *食品科技*, 2015, 40(4): 17-21.
- Chen L, Mao J J, Yu G H, et al. Optimization of fermentation conditions for enhanced antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus subtilis* LM2303 using response surface methodology. *Food Science & Technology*, 2015, 40(4): 17-21.
- [59] 刘丽. 耐盐短杆菌 Y-1-4 产脂肽类生物表面活性剂的研究. 青岛: 青岛科技大学, 2016.
- Liu L. The study on lipopeptid biosurfactant productong by breibactreium halotolerans Y-1-4. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2016.
- [60] 戴超. 脂肽类生物表面活性剂的提取工艺及其乳化性的研究. 南京: 南京农业大学, 2013.
- Dai C. Study on extraction process and emulsifying properties of lipopeptide biosurfactant. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [61] Dhanarajan G, Mandal M, Sen R. A combined artificial neural network modeling-particle swarm optimization strategy for improved production of marine bacterial lipopeptide from food waste. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 84: 59-65.
- [62] Deleu M, Lorent J, Lins L, et al. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828 (2): 801-815.
- [63] Ostroumova O S, Malev V V, Ilin M G, et al. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir*, 2010, 26 (19): 15092-15097.
- [64] Fan H Y, Nazari M, Raval G, et al. Utilizing zeta potential measurements to study the effective charge, membrane partitioning, and membrane permeation of the lipopeptide surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, 1838 (9): 2306-2312.
- [65] Carrillo C, Teruel J A, Aranda F J, et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, 1611 (1-2): 91-97.
- [66] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, et al. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (1): 44-49.
- [67] Horng Y B, Yu Y H, Dybus A, et al. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB Express*, 2019, 9 (1): 188.
- [68] Yuan L, Zhang S, Wang Y, et al. Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses. *Journal of Virology*, 2018, 92 (21): e00809-00818.
- [69] Liu J, Li W, Zhu X, et al. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (11): 4565-4574.
- [70] Krishnan N, Velamar B, Velu R K. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 155: 101-107.
- [71] Paraszkievicz K, Bernat P, Siewiera P, et al. Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225: 802-809.
- [72] Isa M H M, Shannaq M A H F, Mohamed N, et al. Antibacterial activity of surfactin produced by *Bacillus subtilis* MSH1. *Transactions on Science and Technology*, 2017, 4 (3-3): 402-407.
- [73] Abdelli F, Jardak M, Elloumi J, et al. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic

- strain *Bacillus safensis* F4. Biodegradation, 2019, 30: 287-300.
- [74] Loiseau C, Schlusshuber M, Bigot R, et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99 (12): 5083-5093.
- [75] Jiang J, Gao L, Bie X, et al. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. BMC Microbiology, 2016, 16 (1): 31.
- [76] Lima W G, Parreira A G, Nascimento L A A, et al. Absence of antibacterial, anti-candida, and anti-dengue activities of a surfactin isolated from *Bacillus subtilis*. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 2018, 9 (1): 27.
- [77] Gao L, Han J, Liu H, et al. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110 (8): 1007-1018.
- [78] Shaligram N S, Singhal R S. Surfactin: a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48 (2): 119-134.
- [79] Singh A K, Sharma P. Disinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* strain SDS21. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 185: 110514.
- [80] De Araujo L V, Guimarães C R, Da Silva Marquita R L, et al. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. Food Control, 2016, 63: 171-178.
- [81] Biniarz P, Baranowska G, Feder-Kubis J, et al. The lipopeptides pseudofactin II and surfactin effectively decrease *Candida albicans* adhesion and hydrophobicity. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108 (2): 343-353.
- [82] Mireles J R, Toguchi A, Harshey R M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. Journal of Bacteriology, 2001, 183 (20): 5848-5854.
- [83] Hwang M, Kim M H, Gebru E, et al. Killing rate curve and combination effects of surfactin C produced from *Bacillus subtilis* complex BC1212 against pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24 (10): 2277-2282.
- [84] Nitschke M, Araújo L, Costa S, et al. Surfactin reduces the adhesion of food - borne pathogenic bacteria to solid surfaces. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49 (2): 241-247.
- [85] 章栋梁. Surfactin 工业分离纯化工艺及其对肉品的防腐保鲜效果. 南京: 南京农业大学, 2013.
- Zhang D L. Study of the industrial process for the separation and purification of surfactin and its effect on meat preservation. Nanjing :Nanjing Agricultural University, 2013.

Recent Progress on Fermentation and Antibacterial Applications of Surfactin

MEI Yu-wei YANG Zi-yun YU Fan LONG Xu-wei

(Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract Surfactin is a kind of cyclic lipopeptide biosurfactant mainly synthesized by many *Bacillus subtilis* strains. Surfactin is well-accepted as one of the most powerful biosurfactants, presents excellent surface activities, can significantly reduce the surface tension force of water to below 27mN/m at a concentration of 10-30mg/L. In addition, surfactin has great biological activities like: anti-fungal, anti-virus, anti-tumor, insecticidal and anti-mycoplasma, and thus has of great applications potential in the fields of medicine, agriculture, food, cosmetics and petroleum industries. However, its real industrial applications were limited by the high production cost and lack of specific application yields. Many efforts have been done towards the improvement of surfactin production. The recent progresses on surfactin production, and its applications as an antibacterial agent have been reviewed.

Key words Surfactin *Bacillus* Biosurfactant Antibacterial