

# 枯草芽孢杆菌利用脂肪酸酯和氨基酸合成脂肽

黄翔峰<sup>1,2</sup>, 黄薇<sup>1,2</sup>, 刘佳<sup>1,2</sup>, 陆丽君<sup>1,2</sup>

(1. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092; 2. 同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

**摘要:** 利用脂肪酸酯为碳源培养枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) ATCC 6633 合成脂肽的研究结果表明: 6 种食用油脂为碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633 均可合成脂肽。以食用油脂主要成分三油酸甘油酯为碳源时, 谷氨酸作用下脂肽产量可从  $95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  提高到  $183.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用稳定性同位素技术发现菌体主要利用三油酸甘油酯水解产物甘油进行菌体和脂肽合成, 谷氨酸的添加提高了脂肪酸酯利用率, 促进碳源流向脂肽合成, 谷氨酸则流向菌体合成, 从而使生物量和脂肽产量提高。

**关键词:** 脂肽; 脂肪酸酯; 食用油脂; 氨基酸; 稳定性同位素

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

## Utilization of Fatty Acid Ester and Amino Acids by *Bacillus Subtilis* to Synthesize Lipopeptide

HUANG Xiangfeng<sup>1,2</sup>, HUANG Wei<sup>1,2</sup>, LIU Jia<sup>1,2</sup>, LU Lijun<sup>1,2</sup>

(1. College of Environmental Science & Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** The investigation mainly focused on the utilization of fatty acid ester by *B. subtilis* ATCC 6633 to synthesize lipopeptide. The results show that lipopeptide can be synthesized by using 6 kinds of edible oil as carbon source. When olein, the main composition of edible oil, was chosen as the carbon source, the yield of lipopeptide was enhanced from  $95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $183.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  under the action of glutamic acid (Glu). Through stable isotope probing, it was confirmed that glycerol, the hydrolysis product of olein, was of better use by the bacteria. With Glu addition, the utilization rate of fatty acid ester was improved and more carbon source was used to synthesize lipopeptide, while Glu was mainly used to synthesize the bacteria, thus biomass and the yield of lipopeptide were enhanced.

**Key words:** lipopeptide; fatty acid ester; edible oil; amino acid; stable isotope probing

生物表面活性剂(Biosurfactants)是微生物代谢合成的集亲水基和疏水基结构于一体的两亲化合物<sup>[1]</sup>, 具有低毒、高效、易降解等优势。生物表面活性剂能够降低表面张力、发泡、破乳等, 在生物修复、石油开采、原油运输、食品加工、医药及化妆品等行业具有较大的潜在价值<sup>[2]</sup>。生物表面活性剂主要有糖脂、脂肽和脂蛋白、脂肪酸和磷脂、聚合物和全胞表面本身等 5 大类<sup>[3]</sup>。与糖脂、磷脂等其他类型的生物表面活性剂相比, 脂肽(Lipopeptide)的表面活性更为卓越。1968 年, 脂肽最早被发现存在于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的代谢产物中<sup>[4]</sup>, 是目前研究最为广泛的生物表面活性剂之一。目前已发现的脂肽同系物有 20 多种, 如表面活性素(Surfactin)、地衣芽孢素(Lichenysin)、伊枯草菌素(Iturin)和芬芥素(Fengycin)等<sup>[5]</sup>。其中活性最高的 Surfactin 主要是由枯草芽孢杆菌及短小芽孢杆菌代谢合成<sup>[4,6]</sup>。Surfactin 具有独特的表面活性和生物活性, 它能将水的表面张力从  $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  降到  $27 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ <sup>[7]</sup>, 具有抑制凝血纤维蛋白凝块, 溶解血红细胞及某些细菌原生质体等特性<sup>[8]</sup>。

目前研究者多采用亲水性碳源如葡萄糖、蔗糖等碳水化合物培养脂肽<sup>[9]</sup>, 但是其生产成本较高, 因而许多研究者已关注于使用工农业废弃物代替培养基组分以降低生产成本。采用废弃食用油脂作为碳源合成脂肽不仅可以降低脂肽生产成本, 还可以实现废弃食用油脂的资源化利用, 因而具有一定的应用前景和研究价值。目前, 利用废弃食用油脂作微生物发酵碳源生产脂肽已有报道。Lee 等人<sup>[10]</sup>从废豆油中筛选得到了一株 *Klebsiella* sp. Y6-1 菌, 该菌产

收稿日期: 2013-07-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(0400219208)

第一作者: 黄翔峰(1974—), 男, 教授, 博士生导师, 工学博士, 主要研究方向为水体污染控制与环境微生物。E-mail: hxf@tongji.edu.cn

通讯作者: 陆丽君(1982—), 女, 讲师, 工学硕士, 主要研究方向为水体污染控制与环境微生物。E-mail: lulijun@tongji.edu.cn

生的脂肽质量浓度为  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时可使发酵液表面张力降低到  $32 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Thavasi 等人<sup>[11]</sup>采用豆油饼作碳源在发酵罐中培养 *Corynebacterium kutscheri*, 培养 120 h 时生物量达到最大, 得到的脂肽具有乳化机油、原油、豆油、煤油等多种物质的能力. N. Vedaraman 等人<sup>[12]</sup>采用废弃煎炸葵花油、废弃煎炸米糠油分别培养合成的 Surfactin 产量达到  $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $550 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

由于脂肽分子是由 1 条脂肪酸链和 1 条由多种氨基酸组成的肽链构成的, 因而许多研究者还考察了在培养基中添加氨基酸对脂肽合成的影响. Yakimov 等人<sup>[13]</sup>的研究发现氨基酸对脂肽的合成具有调控作用, 在培养基中添加谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp), 可使脂肽产量提高 2 倍和 4 倍. Makkar 等人<sup>[14]</sup>研究了在 *B. subtilis* 的蔗糖培养基中加入不同氨基酸, 结果发现, 天门冬氨酸(Asp)、门冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、缬氨酸(Val)和赖氨酸(Lys)都能使产量提高 60% 左右. 以上研究表明废弃食用油脂可以合成脂肽, 氨基酸对脂肽合成具有一定影响, 但是对于脂肪酸酯为碳源时氨基酸对合成脂肽同系物组成和菌体利用脂肪酸酯的影响尚不明确.

本文采用食用油脂的主要组分脂肪酸酯为碳源合成脂肽, 考察氨基酸作用下 *B. subtilis* ATCC 6633 合成脂肽的产量、性能及同系物组成, 并采用稳定性同位素技术, 分析添加谷氨酸前后菌体利用脂肪酸酯合成脂肽的途径, 以期为提高脂肪酸酯利用率, 优化食用油脂乃至废弃食用油脂为碳源合成脂肽提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株培养

*B. subtilis* ATCC 6633 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心, 保存于  $4^\circ\text{C}$  的琼脂斜面上.

培养条件: 将 *B. subtilis* ATCC 6633 从平板上接种一环菌体于  $100 \text{ mL}$  营养肉汤培养基中, 于  $28^\circ\text{C}$ ,  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下培养 24 h. 再以体积分数为 5% 的接种量接种于  $100 \text{ mL}$  发酵培养基中, 培养条件为: 温度  $28^\circ\text{C}$ 、摇床转速  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 摇床培养 5.5 d.

### 1.2 培养基组成

营养肉汤培养基: 牛肉浸膏  $5.0 \text{ g}$ , 蛋白胨  $10.0 \text{ g}$ , 酵母膏  $5.0 \text{ g}$ ,  $\text{NaCl}$   $5.0 \text{ g}$ , 葡萄糖  $10.0 \text{ g}$ , 蒸馏水

$1 \text{ L}$ ,  $\text{pH}=7.0$ .

改良的基础无机盐培养基(MMSM 培养基)<sup>[15]</sup>:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $4.0 \text{ g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $4.1 \text{ g}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   $14.33 \text{ g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.2 \text{ g}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.0139 \text{ g}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.8 \text{ mg}$ , 乙二胺四乙酸(EDTA)  $1.3 \text{ mg}$ , 蒸馏水  $1 \text{ L}$ ,  $\text{pH}=7.0$ . 碳源组成为植物油和三油酸甘油酯, 按体积比投加 4%.

氨基酸培养基: 在 MMSM 培养基中分别投加  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val). 培养基高温高压灭菌后氨基酸经过滤灭菌投加.

$[1,1,1-^{13}\text{C}_3]$ -三油酸甘油酯标记及  $\text{L}-(\text{U}-^{15}\text{N})$ -谷氨酸标记 MMSM 培养基: 标记后的培养基碳源和氨基酸组成如表 1, 其他营养成分保持和 MMSM 培养基一致. 同位素标记三油酸甘油酯中油酸羧基上的碳源子, 即标记  $^{13}\text{C}$  均来自于三油酸甘油酯羧基上的碳.

表 1  $[1,1,1-^{13}\text{C}_3]$ -三油酸甘油酯及  $\text{L}-(\text{U}-^{15}\text{N})$ -谷氨酸添加质量浓度

Tab.1 Mass concentration of  $[1,1,1-^{13}\text{C}_3]$ -olein and  $\text{L}-(\text{U}-^{15}\text{N})$ -glutamic acid  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

碳源			标记谷氨酸
三油酸甘油酯	标记三油酸甘油酯	甘油	
16	4	20	0
36	4	0	0
36	4	0	1

### 1.3 生物量的测定

菌体生物量采用干重法表示, 即: 在  $4^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下将全培养液离心 10 min, 去除上清液得到湿菌体, 并用正己烷洗涤菌体细胞表面残余油相, 再用蒸馏水洗涤两次后再次离心将此菌体置于新芝 SCIentz-10N 型真空冷冻干燥机中, 于  $-50^\circ\text{C}$  下冷冻干燥 24 h, 得到菌体干粉, 称重.

### 1.4 Surfactin 产量的测定

在  $4^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下将发酵液离心 10 min, 去除菌体. 移取  $2 \text{ mL}$  上清液至样品瓶中, 冷冻干燥, 用  $2 \text{ mL}$  色谱纯甲醇溶解, 过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜后, 取  $1 \text{ mL}$  入色谱瓶中, 进入高效液相色谱(HPLC)系统, 得到 Surfactin 的出峰图, 根据峰面积计算 Surfactin 含量.

HPLC 系统为 Waterse2695 型仪器, 配 Water 2489 紫外/可见光检测器; 色谱柱为 Kromasil 公司的 Kromasil C18(填料粒度为  $5 \mu\text{m}$ , 柱长  $\times$  柱内径为  $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ); 流速,  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温,  $35^\circ\text{C}$ ; 检测波长,  $205 \text{ nm}$ ; 流动相 A 为水(含体积比

为 0.05% 三氟乙酸), 流动相 B 为乙腈. 洗脱程序, 0~30 min, 体积比分别为 A 10% 和 B 90%. 本研究中 HPLC 方法改进自 Yu-Hong Wei 和 I-Ming Chu 的方法<sup>[16]</sup>.

### 1.5 表面张力的测定

采用 DT-102 型表面张力仪测定离心去除菌体后破乳上清液(投加  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸铵破乳 3~4 h, 在  $4^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下将清液离心 10 min, 去除上层油脂)的表面张力, 每次测试平行 3 次. 一般认为表面张力低于  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  的样品即具有较强的表面活性<sup>[17]</sup>.

### 1.6 排油活性的测定

排油圈操作步骤为向加水的排油缸中滴加 250  $\mu\text{L}$  石蜡, 使其在水面中央形成圆形油滴, 取 250  $\mu\text{L}$  破乳后上清液于油滴中心部位一次性加入(移液枪不与油滴表面接触), 读取油滴被排开形成的排油圈直径<sup>[17]</sup>.

### 1.7 食用油脂组成分析

对培养基中碳源脂肪酸酯组分采用气相色谱质谱联用仪(GC-MS(Thermo Focus DSQ))进行分析, 测试方法参见文献<sup>[18]</sup>.

### 1.8 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 同位素丰度测试

采用标记三油酸甘油酯为碳源、谷氨酸为培养基组分对培养得到的 Surfactin、菌体和剩余碳源进行收集, 采用 MAT-271 气体同位素质谱计进行测试, 测试方法参见文献<sup>[19]</sup>. 参数调节: MAT-271 离子源发射电流为 0.040 mA, 电子能量为 98.60 eV, 阱电压为 133.15 V, 离子源稳定为  $160^\circ\text{C}$ , 高压为 10 kV, 接收器为法拉第筒.

## 2 结果与讨论

### 2.1 食用油脂为碳源合成 Surfactin

以玉米油(CO)、花生油(PNO)、菜籽油(RPO)、芥花油(CNO)、芝麻油(SSO)、山茶油(CMO)等 6 种植物油为碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633, 考察不同种类植物油对脂肽合成的影响. 6 种植物油培养 *B. subtilis* ATCC 6633 得到的培养基清液表面张力均在  $36 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  以下, 排油活性都大于 8 cm, 说明合成的脂肽具有较强的表面活性, 与其他研究者利用植物油合成脂肽的结论类似. Kamel Eddouaouda 等人<sup>[20]</sup>采用植物油和橄榄油培养脂肽产生菌——葡萄球菌 1E, 得到的发酵液表面张力都在  $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  以下, 排油活性都为 8 cm. Reis, F. 等人<sup>[21]</sup>采用

$20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  大豆油作碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633 得到 Surfactin, 发酵液表面张力为  $35.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . 从图 1 可知, 6 种植物油为碳源时, 生物量为  $0.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 低于葡萄糖为碳源时得到的生物量. 但是 PNO, CO 和 SSO 培养得到的 Surfactin 产量高于葡萄糖培养时所得, SSO 培养获得的 Surfactin 质量浓度最大, 为  $164 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 说明某些食用油脂相比葡萄糖可以提高脂肽产量, 而 Surfactin 产量的差异可能源于不同食用油脂的脂肪酸酯组成不同. 本研究对 6 种植物油进行 GC-MS 分析, 结果发现其主要由不同饱和度的偶数碳链脂肪酸酯组成, 其中油酸是植物油的主要成分. 因此在后续研究中, 以油酸作为碳源, 主要考察氨基酸作用下菌体利用脂肪酸酯合成脂肽的情况.

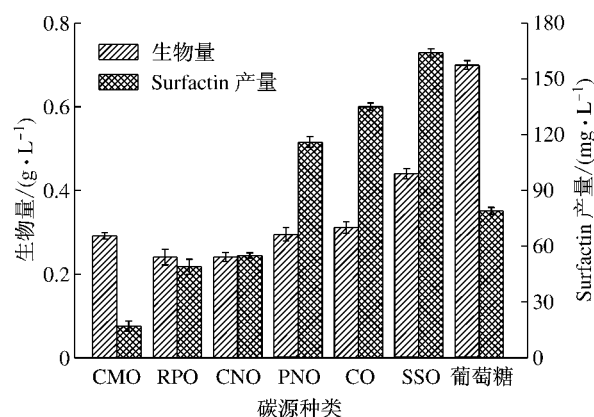


图 1 食用油脂种类对生物量和 Surfactin 产量的影响

Fig.1 Effects of edible oil on biomass and yield of Surfactin

### 2.2 氨基酸作用下脂肪酸酯为碳源合成 Surfactin

以食用油脂主要成分三油酸甘油酯为碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633, 考察三油酸甘油酯为碳源时氨基酸对 Surfactin 合成的影响. 根据 Surfactin 的肽链端氨基酸数量组成为天门冬氨酸(Asp):谷氨酸(Glu):缬氨酸(Val):亮氨酸(Leu)=1:1:1:4<sup>[15]</sup>, 因此在培养基中分别投加  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的这 4 种氨基酸, 考察其对 Surfactin 产量、性质及同系物组成的影响.

由图 2 可知, 不添加氨基酸的三油酸甘油酯对照培养基得到的发酵液排油活性为 9 cm, Surfactin 产量为  $95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 添加 Glu, Asp, Leu 和 Val 以后的培养基发酵液排油活性均有所提高, 但只有 Glu 对 Surfactin 产量有显著的促进作用, 将 Surfactin 产量提高到  $183.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 而在以葡萄糖等亲水性碳源培养脂肽时, Glu, Asp, Val 等其他氨基酸对脂肽产量均有促进作用<sup>[13-15]</sup>, 这种对脂肽产量的不同

影响,推测是碳源的不同导致其被菌体利用程度的不同引起的.目前的研究认为,谷氨酸在不同碳源条件下都对脂肪产量具有促进作用与其在代谢循环过程中的重要位置有关,其可能加速了培养基中的氮素代谢,促进了 Surfactin 的合成<sup>[22]</sup>.

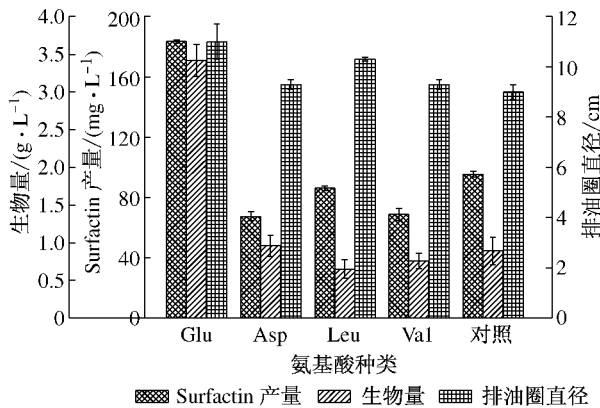


图2 不同氨基酸对生物量、Surfactin 产量和排油活性的影响

Fig.2 Effects of amino acids on biomass, yield of Surfactin and oil spreading activity

Surfactin 同系物组成对 Surfactin 的性质有较大影响.有研究表明,C15-Surfactin 是其同系物组成中生物活性较强的组成部分,对 Surfactin 的杀虫活性<sup>[23]</sup>及触发植物防御机制的性质<sup>[24]</sup>等都有一定影响.从图3的 Surfactin 同系物组成可以发现,三油酸甘油酯为碳源培养得到的 Surfactin 主要是 C14-Surfactin 和 C15-Surfactin,与文献报道一致<sup>[25]</sup>. Glu 和 Asp 对于 Surfactin 同系物组成的影响较小,而 Leu 则提高了 C15-Surfactin 的产量.正如文献报道,培养基中添加不同氨基酸对于 Surfactin 同系物的组成确实有一定影响,Jin-Feng Liu 等人<sup>[25]</sup>曾在 Surfactin 产生菌 *B. subtilis* TD7 的蔗糖培养基中加入 1 g·L<sup>-1</sup> 不同的氨基酸,发现 Asp 和 Glu 的加入对 Surfactin 同系物的组成没有显著影响,而 Leu 的加入引起了 Surfactin 同系物组成中 C15-Surfactin 的剧增,与本研究的结果相一致.分析原因,Leu 可能是 C15 碳链长度脂肪酸链的合成前体<sup>[26]</sup>,所以表现出了对 C15-Surfactin 含量的促进作用.结合图2、图3分析, C15-Surfactin 的含量与发酵液排油活性具有很好的线性相关性( $R^2=0.919$ ).说明氨基酸作用下脂肪酸酯培养得到的脂肪中 C15-Surfactin 的含量确实会影响脂肪性质.

### 2.3 谷氨酸作用下菌体利用脂肪酸酯合成 Surfactin 的途径

微生物对三油酸甘油酯的利用一般经过脂肪酶

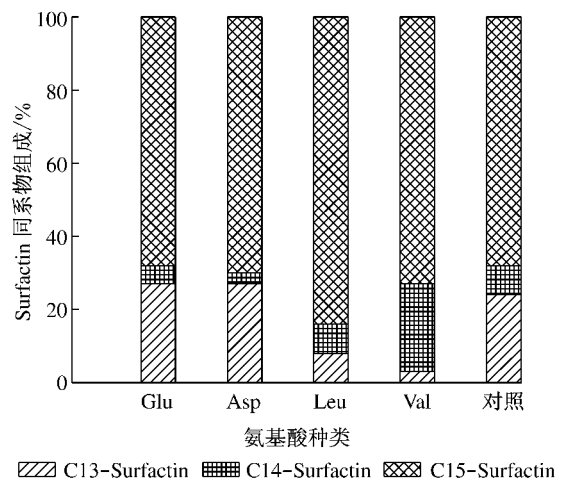


图3 不同氨基酸对 Surfactin 同系物组成的影响

Fig.3 Effects of amino acids on Surfactin homologous composition

水解成甘油和油酸后进入各自的利用途径.为了进一步探究添加氨基酸前后菌体对脂肪酸酯的利用途径,分别采用甘油 40 g·L<sup>-1</sup>、油酸 40 g·L<sup>-1</sup>、三油酸甘油酯 40 g·L<sup>-1</sup>以及甘油 20 g·L<sup>-1</sup>与三油酸甘油酯 20 g·L<sup>-1</sup>按 1:1 体积比混合作为碳源培养菌体.4 种碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633 得到的培养基清液表面张力均在 35 mN·m<sup>-1</sup> 以下,三油酸甘油酯和混和碳源培养时得到的培养基清液排油活性大于 8 cm,表面活性较好.从图4可知,油酸单独做碳源培养时,菌体很难利用油酸,而甘油单独作为碳源时可以合成 Surfactin.将三油酸甘油酯与甘油混合以后,培养得到的生物量比三油酸甘油酯作单一碳源时提高了 2 倍以上,达到了 2.29 g·L<sup>-1</sup>, Surfactin 产量也提高了 50% 左右,达到了 143 mg·L<sup>-1</sup>,推测菌体更倾向于利用三油酸甘油酯的水解产物甘油进行菌体和 Surfactin 的合成.

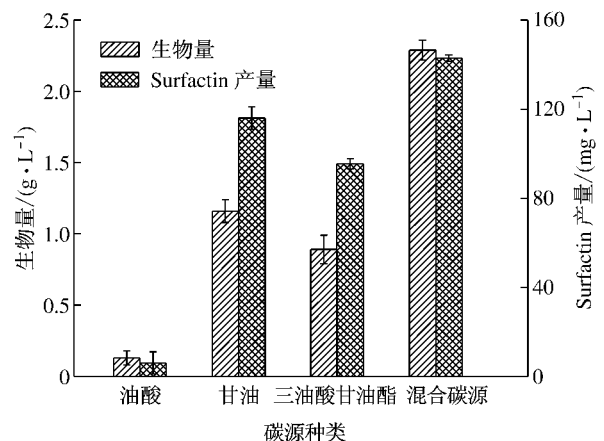


图4 碳源种类对生物量和 Surfactin 产量的影响

Fig.4 Effects of carbon source on biomass and yield of Surfactin

稳定性同位素示踪法被广泛应用于环境微生物学领域研究菌体对碳源利用情况<sup>[27]</sup>以及微生物代谢情况<sup>[28]</sup>等,为了验证菌体对三油酸甘油酯的利用途径,采用稳定性同位素示踪法对三油酸甘油酯中油酸羧基上的碳原子进行<sup>13</sup>C 标记. 实验结果如表 2 所示. 在培养基中不添加氨基酸时,采用 40 g · L<sup>-1</sup> 三油酸甘油酯作为惟一碳源,培养 5.5 d 后剩余碳源中的<sup>13</sup>C 丰度为 1.78%,较未利用前碳源中<sup>13</sup>C 丰度 1.62%有所提高,而标记<sup>13</sup>C 均来自于三油酸甘油酯羧基上的碳,结合本节初培养得到的数据,验证了 *B. subtilis* 主要利用三油酸甘油酯水解产物甘油进行菌体和 Surfactin 的合成. 当采用 20 g · L<sup>-1</sup> 三油酸甘油酯与 20 g · L<sup>-1</sup> 甘油的混合物作碳源时,剩余碳源中的<sup>13</sup>C 丰度为 2.36%,较未利用前碳源中<sup>13</sup>C 丰度 1.79%提高了 32%,合成的菌体和 Surfactin 中<sup>13</sup>C 丰度分别为 1.91%和 1.66%,与初始碳源相比的提高幅度优于三油酸甘油酯单独培养时,说明甘油的加入有利于菌体自身和 Surfactin 的合成. 通过本研究发现,脂肪酸酯水解后更易被菌体利用,建议在实际利用食用油脂及废弃油脂合成脂肽时将其进行水解预处理,使菌体更好地利用脂肪酸酯,达到提高脂肽产量及实现废弃食用油脂的减量化和资源化的双重目的.

表 2 两种碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633 得到的<sup>13</sup>C 丰度

Tab.2 <sup>13</sup>C abundance of *B. subtilis* ATCC 6633 cultivated by two kinds of carbon sources %

测试对象	碳源	
	三油酸甘油酯	甘油加三油酸甘油酯
Surfactin	1.38±0.01	1.66±0.03
菌体	1.39±0.02	1.91±0.02
剩余碳源	1.78±0.02	2.36±0.01
初始碳源	1.62±0.01	1.79±0.01

为了探究三油酸甘油酯为碳源时 Glu 对菌体利用脂肪酸酯合成 Surfactin 的影响,在<sup>13</sup>C 标记惟一碳源三油酸甘油酯的基础上再添加<sup>15</sup>N 标记的 1 g · L<sup>-1</sup> Glu. 结果发现,添加 Glu 以后, *B. subtilis* ATCC 6633 的生物量提高了近 3 倍, Surfactin 产量提高了 1 倍, Surfactin 同系物组成基本没有变化,与 2.2 节的数据结果相吻合. 投加 Glu 前后菌体、Surfactin、剩余碳源中的标记<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 的含量测定结果如表 3 所示. 发现在投加 Glu 后,剩余碳源中的<sup>13</sup>C 丰度从 1.78%减少到 1.63%,而 Surfactin 和菌体中的<sup>13</sup>C 丰度分别提高了 5 倍以上,说明谷氨酸促进了碳源流向 Surfactin. 此外,大部分的 N 源流向了菌体本身,推测在 Glu 存在的条件下,菌体更倾向

于利用 Glu 进行自身的合成. Glu 易被菌体利用的原因,推测是因为菌体可以经过主动运输作用吸收谷氨酸,提高了菌体细胞的合成速率. 同时, Glu 还可与菌体新陈代谢过程中经脱氨基作用生成的一部分氨结合,成为谷氨酰胺(Gln)为菌体利用,提高了菌体对氮源的利用率,加速了培养过程中的氮素代谢.

表 3 谷氨酸投加前后培养 *B. subtilis* ATCC 6633 得到的<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 丰度

Tab.3 Comparison of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N abundance with and without the action of glutamic acid %

测试对象	未添加 Glu		添加 1 g · L <sup>-1</sup> Glu	
	<sup>13</sup> C 丰度	<sup>15</sup> N 丰度	<sup>13</sup> C 丰度	<sup>15</sup> N 丰度
Surfactin	1.38±0.01	0.69±0.01	9.02±0.03	1.16±0.01
菌体	1.39±0.02	0.39±0.01	7.32±0.02	29.32±0.03

### 3 结论

(1) *B. subtilis* ATCC 6633 可以利用脂肪酸酯和氨基酸合成脂肽. 摇床培养条件为:温度 28 ℃、转速 130 r · min<sup>-1</sup>, 培养时间 5.5 d, 芝麻油和谷氨酸是无机盐发酵培养基的最适碳源和氮源, 芝麻油为碳源投加体积分数为 4%时,得到的脂肽产量最高;谷氨酸作氮源投加质量浓度为 1 g · L<sup>-1</sup>时,产量亦达到最高.

(2) 在以三油酸甘油酯为碳源培养 *B. subtilis* ATCC 6633 时, *B. subtilis* ATCC 6633 更倾向于利用三油酸甘油酯水解产物甘油进行菌体和 Surfactin 的合成,建议在利用脂肪酸酯合成脂肽时先将其进行水解预处理,以提高脂肪酸酯合成脂肽的产量.

(3) 在培养基中投加 Glu 时对 Surfactin 产量有明显促进作用,且提高了菌体对脂肪酸酯的利用率,碳源主要流向 Surfactin, Glu 则被菌体作为氮源利用进行自身合成.

(4) 通过研究枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 利用脂肪酸酯合成脂肽,有利于指导利用废弃食用油脂合成脂肽的研究,在降低培养基生产成本的同时实现废弃食用油脂的减量化和资源化. 后续可进一步进行培养基中组分的优化,以防止发酵液中过量营养成分带来的二次污染问题. 此外,可研究废弃油脂中其他组分如重金属等对脂肽合成的影响,进一步提高废弃油脂合成脂肽的效率.

### 参考文献:

- [1] Joshi S, Bharucha C, Jha S, et al. Biosurfactant production

- using molasses and whey under thermophilic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(1):195.
- [2] Banat I M, Makkar R S, Cameotra S S. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(5):495.
- [3] Banat I M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil-recovery and oil pollution remediation—a review[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 51(1):1.
- [4] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31(3):488.
- [5] Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, et al. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72(8):2061.
- [6] Morikawa M, Ito M, Imanaka T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1* [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74(5):255.
- [7] Ohno A, Ano T, Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus-subtilis* in solid-state fermentation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(2):209.
- [8] Shaligram N S, Singhal R S. Surfactin—a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(2):119.
- [9] Najafi A R, Rahimpour M R, Jahanmiri A H, et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 163(3):188.
- [10] Lee S C, Lee S J, Kim S H, et al. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp Y6-1 isolated from waste soybean oil[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7):2288.
- [11] Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, et al. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(6):686.
- [12] Vedaraman N, Venkatesh N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2011, 28(2):175.
- [13] Yakimov M M, Fredrickson H L, Timmis K N. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50 [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1996, 23:13.
- [14] Makkar R S, Cameotra S S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2002, 5(1):11.
- [15] Cooper D G, Macdonald C R, Duff S J, et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(3):408.
- [16] Wei YH, Chu I M.  $Mn^{2+}$  improves surfactin production by *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(6):479.
- [17] Huang XF, Liu J, Lu LJ, et al. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3):1358.
- [18] Nitschke M, Costa S, Haddad R, et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI [J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(5):1562.
- [19] Reber S D, Cordes G T. Modifications to the Finnigan MAT 271 mass spectrometer in the inorganic gas analysis lab[R]. Washington D C: Sandia National Labs, 1995.
- [20] Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, et al. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(4):408.
- [21] Reis F, Servulo E F C, De Franca F P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 113:899.
- [22] Greiner M, Winkelmann G. Fermentation and isolation of herbicolin A, a peptide antibiotic produced by *Erwinia herbicola* strain A 111 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34(5):565.
- [23] Assie L K, Deleu M, Arnaud L, et al. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain)[J]. *Mededeligen*, 2002, 67(3):647.
- [24] Jourdan E, Henry G, Duby F, et al. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Plant—Microbe Interactions*, 2009, 22(4):456.
- [25] Liu J F, Yang J, Yang S Z, et al. Effects of different amino acids in culture media on surfactin variants produced by *Bacillus subtilis* TD7 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(8):2091.
- [26] Hourdou M L, Besson F, Michel G. Studies on the biosynthesis of beta-amino acids, the lipid moiety of iturins A, in *Bacillus subtilis*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(2):207.
- [27] Christensen B, Gombert A K, Nielsen J. Analysis of flux estimates based on C-13-labelling experiments[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(11):2795.
- [28] Klapa M I, Aon J C, Stephanopoulos G. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(17):3525.