

研究报告

产鼠李糖脂生物表面活性剂大肠杆菌的构建与优化

巩志金^{1,2}, 彭彦峰², 张煜婷², 宋国田^{1,2}, 陈五九², 贾士儒¹, 王钦宏²

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

巩志金, 彭彦峰, 张煜婷, 等. 产鼠李糖脂生物表面活性剂大肠杆菌的构建与优化. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1050-1062.

Gong ZJ, Peng YF, Zhang YT, et al. Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1050-1062.

摘要: 目前鼠李糖脂生物表面活性剂主要由条件致病的铜绿假单胞菌生产获得, 从而影响工业应用。为了开发一种相对安全的鼠李糖脂生产菌, 将带有不同强度组成型合成启动子的鼠李糖基转移酶基因(Rhamnosyltransferase gene, *rhlAB*) 以单、中、高3种拷贝数分别在大肠杆菌 ATCC 8739 中异源表达, 实现了不同产量的鼠李糖脂异源合成。对 *rhlAB* 基因和 *rhaBDAC* 基因簇 (TDP-L-鼠李糖合成的基因簇) 进一步利用合成启动子进行组合调控, 筛选获得了最优生产鼠李糖脂工程菌——大肠杆菌 TIB-RAB226。对大肠杆菌 TIB-RAB226 进行发酵温度优化, 鼠李糖脂产量达到 124.3 mg/L, 是优化前的 1.17 倍。通过分批补料发酵, 12 h 时鼠李糖脂产量达到 209.2 mg/L。对发酵产物进行高效液相色谱-质谱联用技术分析, 共检出相对含量变化的 5 类质核比不同的鼠李糖脂同系物。本研究可为异源合成产鼠李糖脂提供重要参考。

关键词: 鼠李糖脂, 鼠李糖基转移酶, *rhaBDAC* 基因簇, 组成型合成启动子, 组合调控, 大肠杆菌

Received: November 25, 2014; **Accepted:** January 21, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA022104), Industrial Biotechnology Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 12ZCZDSY13000).

Corresponding authors: Yanfeng Peng. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: peng_yf@tib.cas.cn

Qinhong Wang. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: wang_qh@tib.cas.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA022104), 天津市科学技术委员会工业生物技术专项 (No. 12ZCZDSY13000) 资助。

Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant

Zhijin Gong^{1,2}, Yanfeng Peng², Yuting Zhang², Guotian Song^{1,2}, Wujiu Chen², Shiru Jia¹, and Qinhong Wang²

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Rhamnolipid biosurfactant is mainly produced by *Pseudomonas aeruginosa* that is the opportunistic pathogenic strain and not suitable for future industrial development. In order to develop a relatively safe microbial strain for the production of rhamnolipid biosurfactant, we constructed engineered *Escherichia coli* strains for rhamnolipid production by expressing different copy numbers of rhamnosyltransferase (*rhlAB*) gene with the constitutive synthetic promoters of different strengths in *E. coli* ATCC 8739. We further studied the combinatorial regulation of *rhlAB* gene and *rhaBDAC* gene cluster for dTDP-l-rhamnose biosynthesis with different synthetic promoters, and obtained the best engineered strain—*E. coli* TIB-RAB226. Through the optimization of culture temperature, the titer of rhamnolipid reached 124.3 mg/L, 1.17 fold higher than that under the original condition. Fed-batch fermentation further improved the production of rhamnolipid and the titer reached the highest 209.2 mg/L within 12 h. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis showed that there are total 5 mono-rhamnolipid congeners with different nuclear mass ratio and relative abundance. This study laid foundation for heterologous biosynthesis of rhamnolipid.

Keywords: rhamnolipid, rhamnosyltransferase, *rhaBDAC* gene cluster, constitutive synthetic promoter, combinatorial regulation, *Escherichia coli*

鼠李糖脂是一种由多种同族结构组成的阴离子生物表面活性剂，其亲水基团一般由 1–2 分子的鼠李糖环构成，疏水基团则由不同碳链的 β -羟基烷酸构成，分子式可表述为 Rhl-C_x、Rhl-C_x-C_y、Rhl-Rhl-C_x 或 Rhl-Rhl-C_x-C_y (Rhl 为鼠李糖；x、y 通常为 8–14)^[1]。鼠李糖脂能显著降低流动相之间的界面张力，具有优良的去垢、乳化和絮凝能力，并且无毒及可生物降解，在采油工业、化妆品、环境修复中具有巨大的应用潜力^[2]。另外，通过微生物发酵生产鼠李糖脂并水解得到鼠李糖，有望替代天然植物中提取获得的鼠李糖，成为食用型甜味剂鼠李糖的潜在来源^[3]。

目前，工业上主要采用铜绿假单胞菌发酵法生产鼠李糖脂^[4]，而铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (俗称绿脓杆菌) 被认为是三种最强人类条件致病菌之一，限制了其在工业生产中的应用^[5]。因此，人们期望利用相对安全的工业微生物进行鼠李糖脂的生产，降低其在生产中的潜在危害，拓展相关产品的应用范围^[6]。如利用伯克氏菌 *Burkholderia*^[7]、绿针假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis*^[8] 等非条件致病菌生产鼠李糖脂，但由于这些微生物遗传背景相对不清晰且缺乏简便的遗传操作技术，很难进一步提高鼠李糖脂的产量，无法满足生产要求。而大肠杆菌 *Escherichia coli* 作为

一种遗传背景清晰、技术操作成熟、工业应用广泛的模式生物,具有完整的 TDP-L-鼠李糖和 β -羟基烷酸 (HAAs) 合成途径 (图 1),被认为是更具改造潜力的良好宿主菌。Wang 等利用转座体介导的染色体整合的方法,将合成鼠李糖脂的关键基因 *rhlAB* 整合入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组,并成功进行异源表达,在 IPTG 的诱导下生产鼠李糖脂,产量达到约 80 mg/L^[9]。Cabrera-Valladares 等将 *rhlAB* 基因导入大肠杆菌 *E. coli* W3110 未得到鼠李糖脂,将 *rhlAB* 基因和 *rmlBDAC* (铜绿假单胞菌鼠李糖合成基因簇) 基因簇一起导入时,鼠李糖脂产量达到 120.6 mg/L,证明了 TDP-L-鼠李糖是鼠李糖脂异源生产的一个主要影响因素^[10]。虽然鼠李糖脂在大肠杆菌中生产取得了一定程度的成功,但由于其前体物质主要来自大肠杆菌的核心代谢途径 (图 1),导致细胞不易于过量生产

鼠李糖脂^[5,11]。因此,需要通过代谢工程的策略进一步提高其前体物的表达量和平衡代谢流量,提高鼠李糖脂的产量^[12]。

本研究中我们构建了产鼠李糖脂的大肠杆菌,并利用组成型合成启动子对相应的关键基因进行了组合调控,鼠李糖脂产量得到较大提高,而且不用诱导表达,避免使用相对昂贵的诱导剂。研究首先将鼠李糖脂合成的关键基因 *rhlAB* 在 *E. coli* ATCC 8739 中进行表达优化,然后利用合成启动子与 *rhaBDAC* 基因簇进行组合调控,得到最优鼠李糖脂生产菌 *E. coli* TIB-RAB226。最后,对工程菌 *E. coli* TIB-RAB226 进行了发酵温度的优化和分批补料发酵,进一步提高了鼠李糖脂的产量。对发酵产物进行高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术分析,发现工程大肠杆菌产生的鼠李糖脂含有多种不同类型和相对丰度的鼠李糖脂同系物 (Congener)。

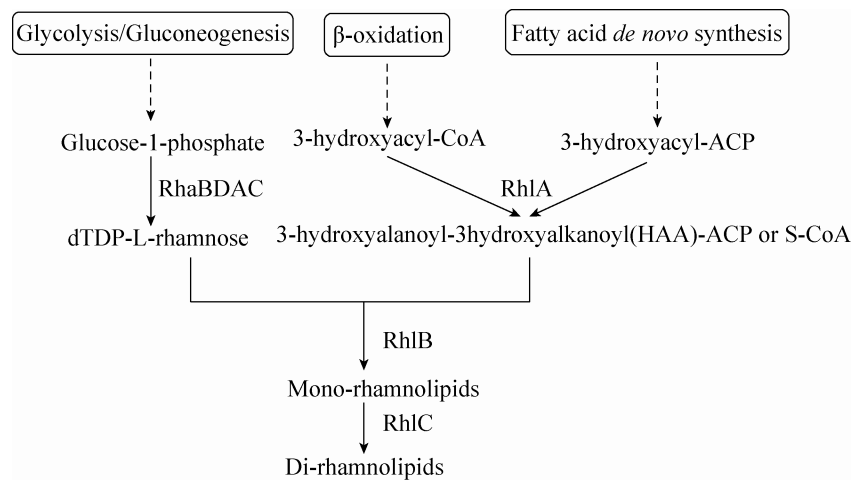


图 1 工程大肠杆菌鼠李糖脂生物合成途径

Fig. 1 Rhamnolipids biosynthetic pathway in engineered *E. coli*. *rhaBDAC*: dTDP-L-rhamnose synthesis gene cluster; *rhlA*: rhamnosyltransferase A; *rhlB*: rhamnosyltransferase B; *rhlC*: rhamnosyltransferase C; FASII: fatty acid *de novo* synthesis.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

P. aeruginosa TIB-R02 基因组 DNA 用作克隆 *rhlAB* 基因的模板。*E. coli* ATCC 8739 是构建产鼠李糖脂大肠杆菌的出发菌株。本研究所用菌株如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素购自

上海生工生物工程服务有限公司；质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司；DNA 回收试剂盒购自康为世纪公司；TransStart Fast Pfu DNA 聚合酶、DNA marker、pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶购自 NEB 公司；苏丹红 II、液体石蜡油、鼠李糖标准品购自国药集团化学试剂有限公司；其他试剂均为分析纯。

表 1 本研究的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Relative characteristics	Source
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Wild type	Lab collection
Strain for <i>rhlAB</i> gene cloning		
<i>P. aeruginosa</i> TIB-R02	Wild type	Lab collection
Engineered <i>E. coli</i> strains for expressing different copy number of <i>rhlAB</i> gene		
PSY164	ATCC 8739 harboring pEASY-164RhlAB	This study
PSY230	ATCC 8739 harboring pEASY-230RhlAB	This study
PSY346	ATCC 8739 harboring pEASY-346RhlAB	This study
PET164	ATCC 8739 harboring pET-164RhlAB	This study
PET230	ATCC 8739 harboring pET-230RhlAB	This study
PET346	ATCC 8739 harboring pET-346RhlAB	This study
PGE164	ATCC 8739 <i>ack-pta::P164RhlAB</i>	This study
PGE230	ATCC 8739 <i>ack-pta::P230RhlAB</i>	This study
PGE346	ATCC 8739 <i>ack-pta::P346RhlAB</i>	This study
Engineered <i>E. coli</i> strains for native promoter of <i>rhaBDAC</i> be replaced with synthetic promoters of different strengths		
Rha-164	ATCC 8739 with the replacement of synthetic promoter <i>P164</i>	This study
Rha-230	ATCC 8739 with the replacement of synthetic promoter <i>P230</i>	This study
Rha-346	ATCC 8739 with the replacement of synthetic promoter <i>P346</i>	This study
Engineered <i>E. coli</i> strains for combinatorial regulation of <i>rhlAB</i> and <i>rhaBDAC</i> with synthetic promoters		
Rha164-RAB164	Rha-164 harboring pET-164RhlAB	This study
Rha164-RAB230	Rha-164 harboring pET-230RhlAB	This study
Rha164-RAB346	Rha-164 harboring pET-346RhlAB	This study
Rha230-RAB164	Rha-230 harboring pET-164RhlAB	This study
Rha230-RAB230	Rha-230 harboring pET-230RhlAB	This study
Rha230-RAB346	Rha-230 harboring pET-346RhlAB	This study
Rha346-RAB164	Rha-346 harboring pET-164RhlAB	This study
Rha346-RAB230	Rha-346 harboring pET-230RhlAB	This study
Rha346-RAB346	Rha-346 harboring pET-346RhlAB	This study

1.2 方法

1.2.1 培养基

每升 LB 培养基包括 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物和 10 g 氯化钠 (固体 LB 加入 1.5% 的琼脂粉); 鼠李糖脂发酵培养基为添加氨苄青霉素、硫酸卡那霉素和后期补加 1% (W/V) 葡萄糖的 LB 培养基; 氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、氯霉素终浓度分别为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.2 鼠李糖脂检测

采用排油圈法^[13]对鼠李糖脂含量进行检测, 并对方法简单改进。玻璃平皿 (D=9 cm) 中加入 25 mL 的液体 LB, 液面稳定后加入 1 mL 苏丹红 II 染红的液体石蜡。待石蜡铺开至半径为 20 mm 时, 加入 10 μL 鼠李糖脂发酵液并记录最大排油圈半径。根据排油圈半径 x (mm) 与鼠李糖脂浓度 y (g/L) 之间的线性关系 $y=0.0974x+0.12$, 计算发酵液中鼠李糖脂的含量。本实验所使用的排油圈法已经与苔黑酚-浓硫酸显色法^[9]进行对比验证, 两种方法结果一致。

1.2.3 质粒及重组片段的构建

本研究所使用的质粒、引物分别见表 2 和表 3。分别构建含不同表达强度组成型合成启动子的高拷贝数质粒 pEASY-XRhlAB (X 代表 P164、P230 和 P346 3 种低、中、高不同表达强度的组成型启动子, 启动子序列见表 3^[14]) 和中等拷贝数质粒 pET-XRhlAB, 作为鼠李糖基转移酶基因 *rhlAB* 的质粒表达载体, 构建方法如下: 1) pEASY-XRhlAB 质粒的构建: 以 *P. aeruginosa* TIB-R02 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得带有不同表达强度组成型启动子的 XRhlAB DNA 片段 (分别以 P164A-5/T7tB-3, P230A-5/

T7tB-3 和 P346A-5/T7tB-3 为引物对)。将纯化后的 XRhlAB DNA 片段与 pEASY-Blunt Zero 连接后得到 pEASY-XRhlAB 表达载体。2) pET-XRhlAB 质粒的构建: 以 pEASY-XRhlAB 为模板, 通过 PCR 扩增获得带有 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点的 XRhlAB 基因片段, 与 pET-30a(+) 载体一起经酶切、连接后得到 pET-XRhlAB 表达载体。

整合到基因组中的 XRhlAB DNA 片段构建如下: 用上述相同方法获得 XRhlAB 片段, 将 XRhlAB 片段纯化、磷酸化处理后与 pEASY-ap (带有 *ack-pta* 两端各 500 bp 同源臂序列质粒) 质粒连接获得带有 500 bp 同源臂的质粒 pEASY-XRhlAB-ap。以 pEASY-XRhlAB-ap 和 pEASY-cat-SacB-ap (*ack-pta* 两端各带有 500 bp 同源臂序列, 同源臂之间含有 *cat-SacB* 抗性基因簇的质粒) 为模板, 用引物 P1 和 P2 分别扩增获得带同源臂 XRhlAB-ap 和 cat-SacB-ap 的 DNA 片段。cat-SacB-ap、XRhlAB-ap DNA 片段分别用于第一步和第二步同源重组的片段, 将 XRhlAB DNA 片段整合进大肠杆菌基因组, 代替 *ack-pta* 基因。

用于 *rhaBDAC* 基因簇启动子替换的片段构建如下: 以质粒 pEASY-cat-SacB-ap 为模板利用引物 Sens-cat-SacB/Anti-cat-SacB 进行扩增, 获得带有 50 bp 同源臂的 *rha-cat-SacB* DNA 片段, 用于第一步同源重组。直接通过基因合成带有上述不同组成型启动子和 50 bp 同源臂的 P164-*rha*、P230-*rha* 和 P346-*rha* 片段用于第二步同源重组。

1.2.4 工程菌的构建

将 pET-XRhlAB 质粒转入 *E. coli* ATCC 8739 得到 3 种中等拷贝数质粒表达 *rhlAB* 基因

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relative characteristics	Source
pKD46	λ -Red recombinant genes under ParaBAD promoter, temperature sensitive origin	[15]
pEASY-Blunt Zero	Amp ^R , Kan ^R , pUC ori	TransGen
pET-30a(+)	Kan ^R	Novagen
pEASY-ap	Amp ^R , Kan ^R , containing 500 bp upstream and downstream homologous region of <i>ack-pta</i>	Lab collection
pEASY-cat-SacB-ap	Amp ^R , Kan ^R , Cm ^R , containing 500 bp upstream and downstream homologous region of <i>ack-pta</i> as well as <i>cat-sacB</i> selectable cassette	Lab collection
pEASY-164RhIAB	Amp ^R , Kan ^R , P164 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pEASY-230RhIAB	Amp ^R , Kan ^R , P230 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pEASY-346RhIAB	Amp ^R , Kan ^R , P346 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pET-164RhIAB	Kan ^R , P164 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pET-230RhIAB	Kan ^R , P230 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pET-346RhIAB	Kan ^R , P346 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pEASY-164RhIAB-ap	Amp ^R , Kan ^R , P164 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pEASY-230RhIAB-ap	Amp ^R , Kan ^R , P164 promoter, <i>rhlAB</i>	This study
pEASY-346RhIAB-ap	Amp ^R , Kan ^R , P164 promoter, <i>rhlAB</i>	This study

的工程菌 PET164、PET230、PET346；将 pEASY-XRhIAB 质粒转入 *E. coli* ATCC 8739 得到 3 种高拷贝数质粒表达 *rhlAB* 基因的工程菌 PSY164、PSY230、PSY346；另外，通过两步同源重组的方法^[16-17]将 XRhIAB DNA 片段整合到 *E. coli* ATCC 8739 基因组替换 *ack-pta* 基因，得到 3 株以单拷贝数表达 *rhlAB* 基因的工程菌 PGE164、PGE230 和 PGE346。上述 9 株菌用于 *rhlAB* 基因异源表达合成鼠李糖脂的研究。

将 *E. coli* ATCC 8739 基因组中 *rhaBDAC* 基因簇的原始启动子用上述不同强度的启动子替换，构建以不同强度表达 *rhaBDAC* 基因簇的工程菌 Rha-164、Rha-230 及 Rha-346。将质粒 pET-164RhIAB、pET-230RhIAB 及 pET-346RhIAB 分别导入菌株 Rha-164、Rha-230 及 Rha-346，得到 9 种组合菌株 (Rha164-RAB164、Rha164-

RAB230、Rha164-RAB346、Rha230-RAB164、Rha230-RAB230、Rha230-RAB346、Rha346-RAB164、Rha346-RAB230 和 Rha346-RAB346)，用于 *rhlAB* 基因和 *rhaBDAC* 基因簇组合调控研究。

1.2.5 工程菌的筛选及发酵温度优化

将构建的工程菌接种于含氨苄青霉素、硫酸卡那霉素的 LB 试管中，200 r/min、30 °C 培养 24 h，通过鼠李糖脂产量对菌株进行筛选。利用筛选得到的最优工程菌 *E. coli* TIB-RAB226 进行发酵温度的优化，将菌株 *E. coli* TIB-RAB226 依次接种于温度为 26、28、30、32、34 和 36 °C 的摇瓶培养基中，200 r/min，培养 12 h，检测菌体生长及鼠李糖脂产量确定最优的发酵温度。

1.2.6 鼠李糖脂的补料发酵及产物分析

为了进一步提高鼠李糖脂的产量, 采用摇瓶补料的方式对菌株 *E. coli* TIB-RAB226 进行补料发酵实验。将种子液培养至 $OD_{600}=3$, 以 5% 的接种量接种至 LB 培养基, 28 °C、200 r/min 培养 16 h, 每 2 h 测定细胞生长密度、

鼠李糖脂产量及 pH, 并在 8 h 时进行补加 1% 葡萄糖补料实验。将发酵产物用萃取液 (氯仿: 乙醇=2: 1) 萃取后吹干有机溶剂得到鼠李糖脂样品, 用于高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析。LC-MS 分析方法参照 Wang 等^[9]所用方法并简单修改, 色谱柱为 Genmini C18 柱 (100 mm×

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer for P164RhLAB gene cloning with restriction enzyme cutting site of <i>Bam</i>H I and <i>Eco</i>R I	
Sens-petRAB- <i>Bam</i> H I	AATCGCGGATCCTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
Anti-petRAB- <i>Eco</i> R I	ACCGGAATTCTCAGGACGCAGCCTTCAG
Primer for integration of <i>rhlAB</i> gene at <i>ack-pta</i> site	
P1	AAACGGATCGCATAACGC
P2	CCGTATTTTCGATCCTGAG
Sens-cat-SacB-yz	TAGCGGTGCGATGATAATG
Anti-cat-SacB-yz	TCGCTTGAGGTACAGCGAA
Sens-RAB-yz	GGCAATATAGGTCACCAGGACG
Anti-RAB-yz	CACAACCGCACAGTATCGCTTG
Primer for replacement of promoter at <i>rhaBAD</i>C gene cluster site	
Sens-BDAC-yz	ATGGGTTATATGCAGGCGTTTCG
Anti-BDAC-yz	CTGCATCGCAAATATCCGCATG
Sens-cat-SacB	ACGGCAGTGAAGATTCGTGGCGAAAGTAATTTGTTGC GAATTTCTCGCCGTTGCAAAGCTGCGGATGATGACG
Anti-cat-SacB	GACGAACTACAGCAGAACCAATAAATCCTGCGCCACCA GTAACAAGTATCTTCATTACGCTCTATGGCTCCCTGAC
Primer for XRhLAB gene cloning	
P164A-5	<u>TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTG</u> <u>ATATAATGAGCCCGTGTTCATGAAAAGTTTAA</u> <u>ACCAGGAAACAGCTATGCGGCGCGAAAGTCTGTTGG</u>
P230A-5	<u>TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTG</u> <u>ATATAATGAGCCTGAGGTGGCTTATTATTCGTTTAA</u> <u>ACCAGGAAACAGCTATGCGGCGCGAAAGTCTGTTGG</u>
P346A-5	<u>TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTG</u> <u>ATATAATGAGCCTCTCGCCCACCAATTCGGTTTAA</u> <u>ACCAGGAAACAGCTATGCGGCGCGAAAGTCTGTTGG</u>
T7tB-3	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAAAGCT TTCAGGACGCAGCCTTCAGCCATCG

The underlined is the sequence of synthetic promoter corresponding to the primer name.

3.0 mm, 3 μ m), 流动相 A 为水: 乙腈=98: 2, B 为水: 乙腈=10: 90, A 和 B 中均含 1%乙酸。梯度洗脱条件为 0–1 min, 8%; 1–51 min, 60%; 51–61 min, 60%; 61–62 min, 8%; 62–67 min, 8%。流速为 0.5 mL/min, 进样体积为 10 μ L。质谱条件: 对鼠李糖脂样品采用阴离子模式, 电喷雾毛细管喷嘴电离电压 4.2 kV, 雾化气和干燥气均为氮气, 喷雾气压力为 1.0 Pa, 干燥气温度 180 $^{\circ}$ C、流速为 5.0 L/min, 质谱扫描范围为 100–1 000 (m/z)。

2 结果与分析

2.1 *rhlAB* 基因的异源表达合成鼠李糖脂

rhlAB 基因编码的鼠李糖基转移酶既能够催化生成 β -羟基烷酸 (HAAs), 又能将 HAAs 与 TDP-L-鼠李糖结合生成鼠李糖脂, 是生产鼠李糖脂的关键酶 (图 1)。同时, 基因的拷贝数和启动子强度是影响工程菌代谢产物生产的重要因素。本实验以不同拷贝数形式表达带有 3 种表达强度启动子的 *rhlAB* 基因, 通过基因拷贝数和启动子强度对 *rhlAB* 基因的表达进行调控, 获得合适的表达形式。实验结果如图 2 所示, 对照组发酵液中未检测到鼠李糖脂 (数据未列出)。不同拷贝数之间的菌株产量差别明显; 相同拷贝数之间以不同强度启动子表达 *RhlAB* 基因的菌株产量差别较小。以上研究表明基因拷贝数在 *rhlAB* 基因表达调控中占主导作用, 而启动子强度的影响较小。含中等拷贝数质粒表达 *rhlAB* 基因的菌株, 鼠李糖脂产量明显高于以单拷贝数在基因组中表达 *rhlAB* 基因的菌株和以高贝数质粒表达 *rhlAB* 基因的菌株, 表明中等拷贝数的 pET-30a(+) 质粒更适合与不同强度的组成型启动子结合表达 *rhlAB* 基因, 实现鼠李糖脂

在大肠杆菌中的异源合成。因此, 选择带不同启动子强度表达 *rhlAB* 基因的中等拷贝数质粒 pET-164*RhlAB*、pET-230*RhlAB* 和 pET-346*RhlAB* 作为 *rhlAB* 基因的表达载体并进行进一步的表达调控。

2.2 *rhlAB* 基因与 *rhaBDAC* 基因簇的启动子组合调控

rhaBDAC 基因簇控制表达的 TDP-L-鼠李糖是鼠李糖脂合成的主要前体物质和限制因素, 本实验中我们用不同强度启动子表达 *rhaBDAC* 基因簇, 并将其与带不同启动子的 *rhlAB* 基因进行组合调控, 实验结果如图 3 所示, 对照菌株为 PET164、PET230 及 PET346, 鼠李糖脂平均产量分别为 71、62 和 56 mg/L。在相同条件下含 P230 启动子的 *rhaBDAC* 基因簇分别与 pET-164*RhlAB*、pET-230*RhlAB* 和 pET-346*RhlAB* 质粒进行组合调控得到的菌株

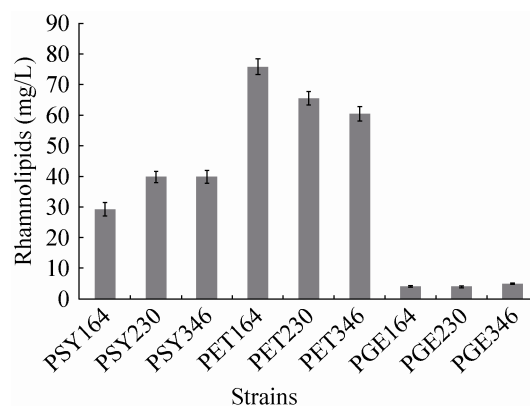


图2 *rhlAB* 基因以不同形式在大肠杆菌表达时鼠李糖脂的产量

Fig. 2 The rhamnolipid production in *E. coli* with different expressions of *rhlAB*. Strains with high-copy-number expression of *rhlAB*: PSY164, PSY230, PSY346; strains with medium-copy-number expression of *rhlAB*: PET164, PET230, PET346; strains with single-copy-number expression of *rhlAB*: PGE164, PGE230, PGE346.

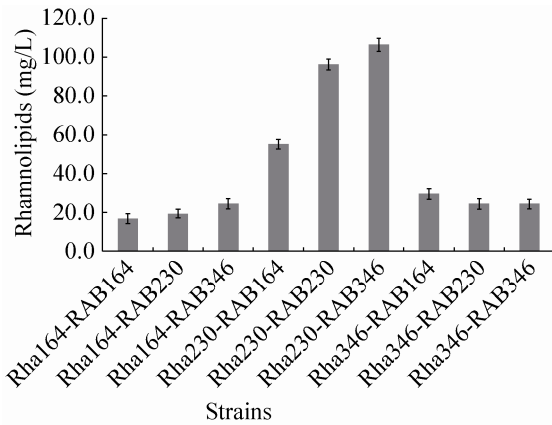


图3 不同强度启动子组合调控对大肠杆菌合成鼠李糖脂产量的影响

Fig. 3 Effects of combinatorial regulation of key genes on rhamnolipid production in *E. coli* by synthetic promoters with different strengths.

Rha230-RAB164、Rha230-RAB230 和 Rha230-RAB346 鼠李糖脂产量均高于其他组合调控的菌株,说明 P230 启动子更适合替代 *rhaBDAC* 基因簇原始启动子与 pET-164RhlAB、pET-230RhlAB、pET-346RhlAB 质粒进行基因的组合调控,来提高鼠李糖脂的产量。9 种组合菌株中 Rha230-RAB346 的产量最高,达到 106.6 mg/L。因此,选择含 P230 启动子的 *rhaBDAC* 基因簇和含 P346 启动子的中等拷贝数质粒 pET-346RhlAB 的菌株 Rha230-RAB346 进行下一步优化实验,并将 Rha230-RAB346 命名为大肠杆菌 TIB-RAB226。

2.3 产鼠李糖脂大肠杆菌 TIB-RAB226 发酵温度优化

虽然宿主、载体和克隆基因是影响重组菌产物合成的主要因素,但是其所处的环境条件也是一个不可忽略的因素,尤其是环境温度的变化,不仅影响代谢过程中各种关键酶的活性及副产物的积累,而且还与质粒拷贝数的变化

息息相关。因此,在发酵过程中需要采用一定的温度控制策略来改善代谢产物的合成与积累^[18]。我们对大肠杆菌 TIB-RAB226 的发酵温度进行了优化,结果表明最适鼠李糖脂生产温度为 28 °C,鼠李糖脂最高产量可达到 124.3 mg/L (图 4),与 30 °C 相比产量提高 1.17 倍。当温度进一步升高或低于 28 °C 时,鼠李糖脂的产量都逐渐下降,36 °C 时鼠李糖脂产量下降为 64.1 mg/L,与 28 °C 时最高产量相比下降约 46.1%,降幅明显。

2.4 产鼠李糖脂大肠杆菌 TIB-RAB226 的分批补料发酵

为了进一步优化鼠李糖脂的合成,对大肠杆菌 TIB-RAB226 进行了分批补料发酵实验,测定了生产过程中细胞密度、鼠李糖脂产量及 pH 变化情况,结果如图 5 所示。发酵前 8 h 菌体在 LB 培养基中生长,鼠李糖脂产量和菌体生物量同步增加,pH 逐渐变碱性。当培养至 8 h 左右细胞生长开始进入稳定期,pH 由 7.0 升至 8.5,细胞生长趋于稳定, $OD_{600}=3.47$,鼠李糖脂的生产速率减小,产量达到 111.7 mg/L。此时

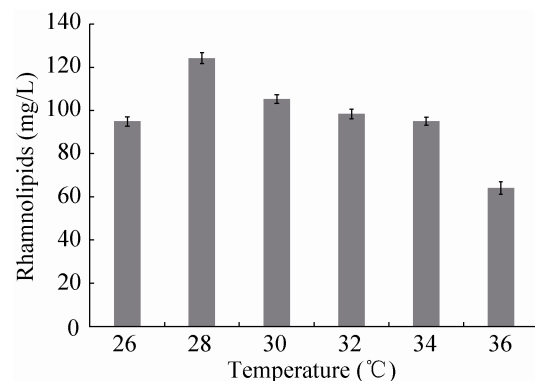


图4 不同温度对工程菌鼠李糖脂合成的影响

Fig. 4 Effects of different temperatures on rhamnolipid production in engineered *E. coli*.

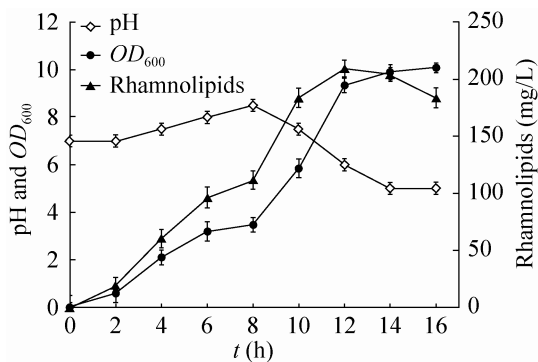


图5 大肠杆菌 TIB-RAB226 的分批补料发酵生产
Fig. 5 Fed-batch of *E. coli* TIB-RAB226 for improving rhamnolipid production.

向培养基中补加 1% 的葡萄糖并继续发酵生产。在 8-12 h 阶段鼠李糖脂产量快速增加，在 12 h 左右鼠李糖脂达到最高产量 209.2 mg/L，是补料前的 1.87 倍。此时，由于补加葡萄糖后发酵液中逐渐积累副产物乙酸导致 pH 降至 6 左右，工程菌生长缓慢并停止合成鼠李糖脂。发酵至 16 h 时细胞生物量达到 $OD_{600}=10.1$ ，并趋于稳定，pH 降至 5 左右，此时乙酸积累达到 1.7 g/L，导致菌体生长基本停止，无法进行进一步的补料实验。因此，要进一步改善鼠李糖脂的合成，需要对工程菌进行进一步的遗传改造，阻断副产物乙酸的合成与积累。

2.5 LC-MS 对产物中鼠李糖脂的结构分析

对工程菌生产的鼠李糖脂分离纯化进行了 LC-MS 分析，结果显示大肠杆菌合成的鼠李糖脂含有 5 类质核比 (m/z) 的鼠李糖脂同系物 (图 6)，其中 m/z 为 333.1908 和 503.3215 鼠李糖脂分别在 30.8 min 和 61.9 min 被分离，为 Rhl-C10 和 Rhl-C10-C10。另外， m/z 为 531.4、475.3、529.3 的离子峰分别在 34.3、52.4 和 55.9 min 被分离，根据相关研究结果^[9,19-20]，上

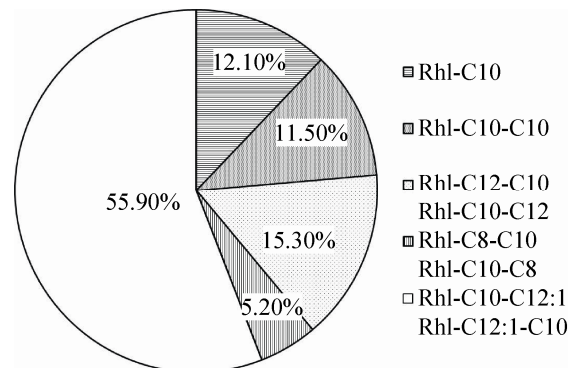


图6 大肠杆菌 TIB-RAB226 合成的鼠李糖脂同系物的相对含量

Fig. 6 Relative abundance of rhamnolipid congener produced by *E. coli* TIB-RAB226.

述 3 种离子峰可能是另外 3 类单鼠李糖脂同系物，且均各含有 2 种分子量相同的鼠李糖脂同系物，分别为 Rhl-C12-C10 或 Rhl-C10-C12，Rhl-C8-C10 或 Rhl-C10-C8，Rhl-C10-C12:1 或 Rhl-C12:1-C10。另外，根据 LC-MS 总离子流图的峰面积，估算该大肠杆菌合成的 5 类鼠李糖脂同系物的相对含量如图 6 所示，其中 Rhl-C10-C12:1 或 Rhl-C12:1-C10 组分比例最大，相对丰度达到约 55%。

3 讨论

目前，主要通过铜绿假单胞菌发酵法生产鼠李糖脂^[4]，但是铜绿假单胞菌较强的条件致病性限制了其在工业生产中的应用。人们也尝试通过很多非致病微生物来生产鼠李糖脂^[6,21]，而大肠杆菌作为一种“一般认为安全 (GRAS)”的模式生物，具有清晰的遗传背景、成熟的遗传操作技术及广泛的工业应用，是异源合成鼠李糖脂合适的选择。我们将鼠李糖脂合成的关键基因 *rhlAB* 在 *E. coli* ATCC 8739 中成功异源表

达,并对相关基因利用不同强度的组成型合成启动子进行组合调控,得到一株鼠李糖脂产量较高的大肠杆菌工程菌 TIB-RAB226。利用 LB 培养基并补加 1%葡萄糖发酵,在 12 h 左右鼠李糖脂产量达到最高的 209.2 mg/L。与之前报道的利用大肠杆菌产鼠李糖脂的文献^[4-5]相比,鼠李糖脂的产量大幅提高。并且由于利用了组成型合成启动子进行关键基因的组合调控,使得该工程菌在生产鼠李糖脂时不需要相对昂贵的 IPTG 诱导物,为简化生产和降低成本奠定了基础。

基因的拷贝数是影响基因异源表达的主要因素^[22-23]。在我们的研究中,*rhlAB* 基因以单拷贝数形式在大肠杆菌中表达时,鼠李糖脂的产量很低,可能的原因是当在基因组中单拷贝数表达 *rhlAB* 基因时产生的鼠李糖基转移酶较少,导致其催化产生的鼠李糖脂较少。含中等拷贝数表达 *rhlAB* 基因的菌株鼠李糖脂产量明显高于高拷贝数表达 *rhlAB* 基因的菌株,推断一个可能的原因是以高拷贝数质粒表达外源基因时,目的基因表达量可能不再由质粒的拷贝数决定,而是由转录和翻译水平决定,导致拷贝数与表达量之间为非正相关关系,鼠李糖脂的产量不高。另一个可能的原因是 *rhlAB* 基因以高拷贝数在大肠杆菌表达时会增加菌体的代谢负担,导致产率和转化率降低,不利于鼠李糖脂的积累。

在 *rhaBDAC* 和 *rhlAB* 组合调控中,*rhaBDAC* 与带中等强度的启动子表达时获得了最高鼠李糖脂产量,这有两种可能的原因:一、在此组合调控条件下,TDP-L-鼠李糖的产生与消耗达到动态平衡,更有利于鼠李糖脂的生产;二、在 *rhaBDAC* 表达使用 P230 启动子合成 TDP-L-

鼠李糖的量最高,更适应合成鼠李糖脂的需要,这些可以通过分析基因的转录表达、前体物 TDP-L-鼠李糖和 HAA 的量等来进一步研究。通过发酵温度的优化发现 *rhlAB* 基因在大肠杆菌表达实现鼠李糖脂合成的最适温度为 28 °C,我们推测一方面可能是在此温度下鼠李糖脂合成相关途径的代谢流量更加平衡,另一方面可能是鼠李糖脂及其前体合成相关酶活性提高,更有利于鼠李糖脂的合成。LC-MS 分析显示我们的大肠杆菌 TIB-RAB226 合成的均为单鼠李糖脂,这与之前的报道一致^[6,24],原因是大肠杆菌中缺乏鼠李糖基转移酶 2 基因 (*rhlC*) 无法将 TDP-L-鼠李糖结合到单环鼠李糖脂中形成双环的鼠李糖脂。不过来自我们的工程大肠杆菌的产物中,其同系物的相对丰度与 Wang 等^[9]的还有一定的差异,Wang 等在发酵产物中未检测到 Rhl-C10-C12:1 或 Rhl-C12:1-C10 类型的鼠李糖脂,而 Rha-C10-C10 类型的鼠李糖脂含量较高,这可能是由出发宿主菌的不同造成的。

另外, β -羟基烷酸 (HAAs) 的代谢通量也会直接影响鼠李糖脂的生物合成,是鼠李糖脂合成的另一个关键前体物质,其代谢合成主要受脂肪酸合成途径 (FAS-II) 和 β -氧化途径的影响^[25-26],我们下一步工作将对 β -羟基烷酸合成途径中相关酶进行代谢调控,进一步提高大肠杆菌合成鼠李糖脂的能力。

REFERENCES

- [1] Abdel-Mawgoud AM, Lepine F, Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(5): 1323-1336.
- [2] Ławniczak Ł, Marecik R, Chrzanowski Ł, et al. Contributions of biosurfactants to natural or

- induced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2327–2339.
- [3] Linhardt RJ, Bakhit R, Daniels L, et al. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 33(3): 365–368.
- [4] Rodrigo SR, Alyson GP, Bianca CN, et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Bioresour Technol*, 2011, 102(11): 6377–6384.
- [5] Han L, Liu P, Peng Y, et al. Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery. *J Appl Microbiol*, 2014, 117(1): 139–150.
- [6] Müller MM, Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(2): 251–264.
- [7] Häußler S, Domke T, Nimtz M, et al. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*, 1998, 66(4): 1588–1593.
- [8] Gunther IV, Nuñez A, Fett W, et al. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(5): 2288–2293.
- [9] Wang Q, Fang X, Bai B. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 98(4): 842–853.
- [10] Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, et al. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(1): 187–194.
- [11] Ochsner UA, Hembach T, Fiechter A, et al. Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1996, 53: 89–118.
- [12] Müller MM, Kügler JH, Henkel M. Rhamnolipids-next generation surfactants? *J Biotechnol*, 2012, 162(4): 366–380.
- [13] Bi SN, Wang YJ, Zuo YH. Improvement and application of oil spreading to detect biosurfactant. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*, 2009, 21(6): 58–60 (in Chinese).
- 毕思宁, 王彦杰, 左豫虎. 生物表面活性剂排油圈检测方法的改进和应用. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2009, 21(6): 58–60.
- [14] Lu J, Tang J, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.
- [15] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [16] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 355–366.
- [17] Jantama K, Zhang X, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 881–893.
- [18] Zhao CG, Xie XX, Cheng LK, et al. Effect of temperature on the process of *Escherichia coli* L-tryptophan fermentation. *Lett Biotechnol*, 2009, 20(4): 534–537 (in Chinese).
- 赵春光, 谢希贤, 程立坤, 等. 温度对大肠杆菌 L-色氨酸发酵过程的影响. *生物技术通讯*, 2009, 20(4): 534–537.
- [19] Lotfabad TB, Abassi H, Ahmadkhaniha R, et al. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 81(2): 397–405.
- [20] Zhong H, Zeng GM, Yuan XZ, et al. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 447–455.
- [21] Dubeau D, Déziel E, Woods D, et al. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol*, 2009, 17(9): 263–275.
- [22] Lin Y, Sun X, Yuan Q, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2014, 23: 62–69.
- [23] Youngquist JT, Schumacher MH, Rose JP, et al. Production of medium chain length fatty alcohols

- from glucose in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2013, 20: 177–186.
- [24] Jeiry T, Ana EE, Gloria S. Rhamnolipids: production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2010, 112(10): 1082–1087.
- [25] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E, et al. A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem Biol*, 2014, 21(1): 156–164.
- [26] Déziel E, Lépine F, Milot S, et al. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 2003, 149(8): 2005–2013.

(本文责编 陈宏宇)

我刊编委杨克迁研究员课题组在Kinamycin的生物合成研究方面取得重要进展

Kinamycin 类抗生素，包括 Kinamycin、Fluostatin 和 Lomaiviticin，具有显著的抑菌以及抗肿瘤活性。从结构上看这类化合物包括 3 个典型特征：高度氧化的 A 环、苯并茛的 B 环，以及 B 环的重氮基团取代。据报道这 3 个官能团都与其药物活性有关，但合成机制未知。

杨克迁课题组首先阐明了 Kinamycin 的 B 环缩环机制。体内的遗传学实验使研究人员分离到香豆素类和三聚化的苯并茛类化合物，有力地证明了 B 环氧化开环后醛酸中间体的存在，并且促使研究人员首次提出缩环过程经历苯并茛中间体。体外酶学实验确认了氧化酶 AlpJ 与 AlpK 连续反应催化葱醌向苯并茛酮结构转化。另外生物信息学分析发现氧化酶 AlpJ 与 AlpK 的同源蛋白编码基因在 Lomaiviticin 和 Fluostatin 基因簇内也保守排布，进而得出推论，它们负责相应化合物的 B 环缩环反应。

同类抗生素 Fluostatin 和 Lomaiviticin 的 A 环在结构上与 Kinamycin 差异显著，本研究大胆假设它们经历相似的变形过程。通过体内遗传学实验，首次扩展了合成 Kinamycin 的生物合成基因簇并且选择了能起到承上启下作用的环氧化物作为生物合成机理研究的突破点。进一步通过体内遗传学实验和体外酶学实验证明了环氧化物水解酶 Alp1U 的功能，对应 Lomaiviticin 合成基因簇内的 Lom6 也确认为环氧化物水解酶。该研究直接说明了在 Lomaiviticin 中也存在环氧化物中间体以及相应的环氧化物酶和水解后的四羟基中间体，进而推导出 Lomaiviticin 的 A 环变形新机制。这对于阐明 Lomaiviticin 二聚化的合成机理有指导意义。

上述研究结果分别发表在 *Chemical Communications* 和 *Nature Communications* 上。杨克迁课题组的博士研究生王斌和微生物所任晋玮博士为第一篇文章的并列第一作者。博士研究生王斌和郭芳为第二篇文章的并列第一作者。杨克迁研究员和范可强副研究员为通信作者。研究得到了国家自然科学基金项目和“973”的资助。同时该研究还得到了法国洛林大学的 Bertrand Aigle 博士，微生物所李莉媛博士以及任晋玮、艾国民和王文昭等老师的大力帮助。

论文链接：

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cc/c5cc01986a/unauth#!divAbstract>

<http://www.nature.com/ncomms/2015/150702/ncomms8674/full/ncomms8674.html>

(摘编自：中国科学院微生物研究所网站)