

微生物合成鼠李糖脂的高产优化策略研究进展

赵峰^{*1}, 董梅², 曲文豪¹

1 曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165

2 曲阜师范大学继续教育学院, 山东 曲阜 273165

赵峰, 董梅, 曲文豪. 微生物合成鼠李糖脂的高产优化策略研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 373-382

Zhao Feng, Dong Mei, Qu Wenhao. Advances in optimization strategies for microbial high production of rhamnolipids[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 373-382

摘 要: 鼠李糖脂是当前研究和应用最热门的生物表面活性剂之一, 广泛应用于石油开采、环境修复、农业等领域。与化学表面活性剂相比, 鼠李糖脂较低的合成产量导致其生产成本相对较高, 限制了鼠李糖脂的大规模推广应用。因此, 开展鼠李糖脂的高产优化调控研究, 对于推动鼠李糖脂的研究与应用具有重要意义。本文简要介绍了鼠李糖脂的生物合成与影响因素; 重点综述了鼠李糖脂的高产菌株选育、异源合成、代谢途径调控、发酵优化等高产优化策略研究进展, 分析了各种高产优化策略的优缺点, 并对当前鼠李糖脂高产优化研究提出了一些思考与展望。

关键词: 鼠李糖脂; 生物合成途径; 菌种选育; 基因改造; 发酵优化

Advances in optimization strategies for microbial high production of rhamnolipids

ZHAO Feng^{*1}, DONG Mei², QU Wenhao¹

1 School of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong, China

2 School of Continuing Education, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong, China

Abstract: Rhamnolipids, the biosurfactants extensively studied, are widely used in enhanced oil recovery, environmental pollution remediation, agriculture, etc. However, compared with chemical surfactants, rhamnolipids has low biosynthetic yield, which leads to the high production cost and limits its large-scale application. Therefore, it is of great significance to study the optimization strategies for the high production of rhamnolipids. This paper briefs the biosynthesis of rhamnolipids and its

基金项目: 国家自然科学基金(31700117); 曲阜师范大学引进人才科研启动基金(609601)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31700117); Research Start-Up Foundation for Introduced Talent of Qufu Normal University (609601)

***Corresponding author:** E-mail: zhaofeng2019@qfnu.edu.cn

Received: 2021-07-11; **Accepted:** 2021-09-26; **Published online:** 2021-11-17

influencing factors, reviews the recent advances in optimization strategies, including screening and improvement of high-yielding microbial strains, heterologous biosynthesis, biosynthetic pathway regulation, and fermentation optimization, for high production of rhamnolipids, and analyzes the advantages and disadvantages of these strategies. Finally, we put forward insights and prospects for the current research on the high production of rhamnolipids.

Keywords: rhamnolipids; biosynthetic pathway; strain improvement; gene modification; fermentation optimization

鼠李糖脂是一种糖脂类的阴离子生物表面活性剂, 由 Jarvis 和 Johnson 于 1949 年首次发现、分离和描述^[1]。鼠李糖脂是由 1 个或 2 个鼠李糖基(Rha)和 1 个或 2 个不同碳链长度的 β -羟基脂肪酸链组成的一系列同系物的总称, 主要分为单糖单脂、单糖双脂、双糖单脂和双糖双脂四大类^[2]。与化学表面活性剂相比, 鼠李糖脂具有以下优势: 环境友好, 无毒或低毒, 可生物降解, 活性高, 并且可以在极端环境中保持活性^[2-4]。

鼠李糖脂在石油开采、环境污染修复、食品、造纸、医药等领域应用潜力大, 甚至具有取代化学表面活性剂的趋势^[5-7]。鼠李糖脂能够有效降低油水界面张力、乳化原油、改变储油岩层润湿性, 是国际上公认的良好驱油剂^[8-9]。鼠李糖脂可以乳化、分散、增溶疏水性有机污染物, 并提高其生物可利用性, 促进疏水性有机污染物的去除^[10-11]。鼠李糖脂还具有一定的金属螯合能力, 用来清除土壤、污水及其他液体中的重金属^[12]。在农业应用方面, 鼠李糖脂可以用来改良土壤、增强农药及肥料作用效果^[13]、抑制农业病菌^[14-15]等。在食品方面, 鼠李糖脂可用作食品添加剂和食品保鲜剂^[16-17]。鼠李糖脂因其保湿、润滑、产生泡沫等功效和良好的细胞通透性而被应用在高档化妆品、洗发水等日化产品中^[18]。在医药领域中, 鼠李糖脂对皮肤灼伤及某些皮肤病具有良好的治疗效果^[19], 此外, 鼠李糖脂还具有一定的抑制肿瘤细胞增

殖的效果^[20]。

虽然鼠李糖脂的特性优良、应用前景广阔, 但是较高的原料成本和较低的合成产量导致鼠李糖脂的生产成本较高, 限制了鼠李糖脂的推广应用。因此, 研究鼠李糖脂的高产调控策略将会在一定程度上降低鼠李糖脂的生产成本, 对于鼠李糖脂的推广应用具有重要的理论价值和实践价值。本文简要介绍了鼠李糖脂的生物合成及影响因素, 重点综述了鼠李糖脂的高产菌株选育、异源合成、代谢途径调控、发酵优化等内容, 并对不同高产调控策略进行了分析, 最后对鼠李糖脂的高效生物合成进行了思考与展望。

1 鼠李糖脂的生物合成及其影响因素

鼠李糖脂的主要产生菌是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[2]。该菌在自然界中广泛分布, 2000 年完成了其模式菌株 PAO1 的全基因组测序^[21]。自 1963 年 Burger 等首次提出鼠李糖脂合成反应以来, 针对铜绿假单胞菌合成鼠李糖脂的代谢途径^[2,22]、相关基因^[23-26]及调控网络^[27-30]的研究已取得了较大进展。

1.1 鼠李糖脂的生物合成途径

目前比较认可的鼠李糖脂合成途径如图 1 所示。dTDP-L-鼠李糖和 β -羟基脂肪酸是鼠李糖脂合成的 2 个前体物质, dTDP-L-鼠李糖为糖基供体, β -羟基脂肪酸为糖基受体。这 2 个前体物质都来源于铜绿假单胞菌的中心代谢途

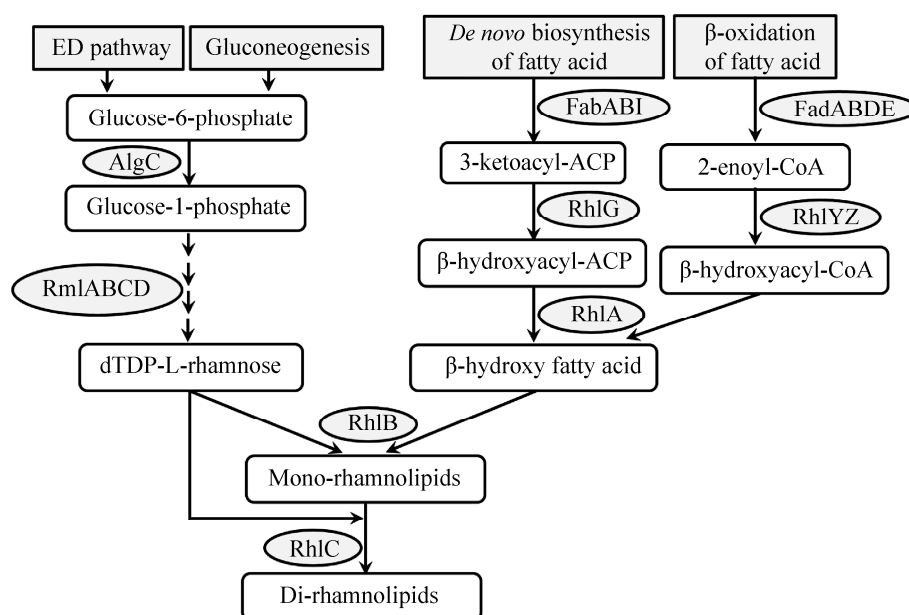


图1 铜绿假单胞菌中鼠李糖脂的生物合成途径

Figure 1 Biosynthetic pathways of rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa*.

径, dTDP-L-鼠李糖的合成来源于 ED 途径(2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸途径)和糖异生途径, β -羟基脂肪酸的合成来源于脂肪酸从头合成途径和脂肪酸 β 氧化途径。

鼠李糖基转移酶 I 是合成鼠李糖脂所必需的关键酶, 该酶是一种复合酶, 包含 RhIA 和 RhIB 这 2 个亚基, 由同一操纵子 *rhlABRI* 上的 *rhlAB* 基因编码^[23]。其中, *rhlA* 基因编码的 RhIA 是酰基转移酶, 负责 β -羟基脂肪酸的合成^[31]; 而 *rhlB* 基因编码的 RhIB 负责催化 dTDP-L-鼠李糖和 β -羟基脂肪酸合成含 1 个鼠李糖基的单鼠李糖脂^[23]; *rhlRI* 基因编码的转录调节蛋白 RhIR 和自体调节物合成酶 RhII, 通过群感效应(quorum-sensing)系统调控 *rhlAB* 基因的转录^[24,30]。*rhlC* 基因编码的鼠李糖基转移酶 RhIC 负责催化另一分子 dTDP-L-鼠李糖的鼠李糖基转移到单鼠李糖脂上合成含 2 个鼠李糖基的双鼠李糖脂^[26]。据研究报道, 细菌合成鼠李糖脂对于细菌本身具有重要的生理学作用, 例如鼠李糖脂可介导细菌自身对疏水底物的摄

取, 鼠李糖脂也参与细菌的表面相关模式运动和细菌的生物膜形成^[32]。

1.2 鼠李糖脂合成的影响因素

鼠李糖脂的生物合成受多种因素的影响, 其中菌株、营养物质是影响鼠李糖脂合成产量的主要因素。能够产生鼠李糖脂的微生物主要为铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 也包括假单胞菌属的少数其他菌株和伯克氏菌属(*Burkholderia*)的一些菌株。目前铜绿假单胞菌是鼠李糖脂产量最高的生产菌, 但是从不同环境中筛选到的铜绿假单胞菌菌株具有不同的鼠李糖脂产量。因此, 菌株差异性是影响鼠李糖脂产量的一个重要因素。

碳源是微生物生长代谢的必需物质, 是影响鼠李糖脂合成的重要营养因素。通常铜绿假单胞菌利用疏水性碳源时鼠李糖脂产量较高^[33], 但是也有研究表明甘油是高产鼠李糖脂的优势碳源^[3,29]。铜绿假单胞菌还可以利用厨余废油、粗甘油、酒厂废水等废弃物发酵生产鼠李糖脂, 但是利用这些废弃物发酵生产的鼠李糖脂

产量较低^[34-35]。氮源也是影响微生物生产鼠李糖脂的营养要素。鼠李糖脂是次级代谢产物,虽然有机氮源利于菌体快速增殖,但是有机氮源不利于鼠李糖脂合成^[27]。硝酸盐是铜绿假单胞菌生产鼠李糖脂的最佳氮源^[36]。限制氮源的用量,即较高的碳氮比(C/N)更利于铜绿假单胞菌合成鼠李糖脂。磷源也影响鼠李糖脂的合成过程。dTDP-L-鼠李糖是鼠李糖脂合成的重要糖前体物质,其合成离不开磷源供给。以往认为限制磷源可以促进鼠李糖脂的合成^[29],但是 Zhao 等近期研究发现足量的磷酸盐更有利于铜绿假单胞菌高产鼠李糖脂^[37]。

环境因子(氧气、pH、温度等)对于鼠李糖脂的生物合成也有影响。一般在氧气充足、pH 6.0–7.0、30–40 °C 条件下,鼠李糖脂产生菌具有较高的鼠李糖脂产量^[38]。

当前提高铜绿假单胞菌鼠李糖脂产量的优化策略主要集中在 2 个方向:(1) 针对生产菌种的高产菌株选育、代谢调控、鼠李糖脂异源合成等;(2) 针对营养与环境条件的培养基优化与发酵工艺优化等。

2 鼠李糖脂的高产优化策略

2.1 鼠李糖脂高产菌株选育

优良的菌种是实现鼠李糖脂规模化发酵生产的关键。目前关于鼠李糖脂产生菌的资源开发主要集中在两方面:从自然界中筛选和对已有菌种进行高产选育。

当前最常见、最高产的鼠李糖脂产生菌是铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*),据报道从油藏采出液,污染土壤、水体、底泥、废弃食用油等样品中筛选出的铜绿假单胞菌具有较高的鼠李糖脂产量^[39]。微生物产生鼠李糖脂等表面活性剂,为其自身能够高效利用生境中的疏水性有机营养物质提供了便利。因此,从油藏采出液、有

机污染的土壤、水体等富含疏水性有机物的环境中较易分离筛选到鼠李糖脂高产菌株^[40]。

利用诱变育种、基因工程改造等方法对已有菌种进行选育,可以定向获得鼠李糖脂高产菌株。例如采用离子体诱变育种技术获得的诱变菌株,其鼠李糖脂产量提高了 55%^[41]。鼠李糖脂合成中 *rhlAB* 基因是最关键基因,其启动子的强度可从转录水平上控制鼠李糖脂的产量。孙瑾用铜绿假单胞菌的本源强启动子替换鼠李糖基转移酶基因原有的启动子,获得的重组菌株使鼠李糖脂产量相对原始菌株提高了 76%^[42];Zhao 等通过替换 *rhlAB* 基因的启动子并增加 *rhlAB* 基因的拷贝数,使鼠李糖脂产量提高了 83%^[43];铜绿假单胞菌大量合成鼠李糖脂需要充足的氧气供给。冯蕾等将血红蛋白基因(*vgb*)在铜绿假单胞菌 S301 中成功表达,获得的转化子 SY26 在不增加通气量的条件下鼠李糖脂产量达到 12.9g/L,比对照菌株提高了 150%^[44]。然而该研究中血红蛋白基因以质粒形式存在于细胞中,质粒的稳定性有待于评估。作者通过检索 NCBI 数据库中铜绿假单胞菌的基因组信息,发现铜绿假单胞菌中有 4 个拷贝的 16S rRNA 基因。研究表明,插入失活掉 1 个拷贝的 16S rRNA 基因不会影响菌株的正常生长代谢^[45]。将 *vgb* 基因整合到 16S rRNA 基因位点将有助于保证基因工程菌的遗传稳定性。

2.2 鼠李糖脂的异源宿主合成

在铜绿假单胞菌中,鼠李糖脂的合成受到复杂的调控,如群体感应系统、全局调控系统等^[28-29,46],使得鼠李糖脂的规模化生产调控充满挑战性。鼠李糖脂的异源宿主合成可以避开铜绿假单胞菌中的复杂调控系统^[47-48]。dTDP-L-鼠李糖和 β -羟基脂肪酸是鼠李糖脂合成的前体物质; β -羟基脂肪酸起源于脂肪酸的从头合成和 β -氧化途径^[2,29]。dTDP-L-鼠李糖是合成革兰氏

阴性菌细胞壁脂多糖的一个重要组分, 即催化6-磷酸葡萄糖转变成L-鼠李糖的代谢途径普遍存在于革兰氏阴性菌中^[47-48]。因此, 将鼠李糖基转移酶RhlAB的编码基因*rhlAB*导入革兰氏阴性宿主菌中, 有望实现鼠李糖脂的异源宿主合成。

Ochsner等将*rhlAB*基因在荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、食油假单胞菌(*P. oleovorans*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功表达, 但是这4种异源生产菌的最高鼠李糖脂产量仅为60 mg/L^[49]。Cabrera-Valladares等在大肠杆菌(*E. coli*)中共表达铜绿假单胞菌的*rhlAB*基因和*rmlBDAC*操纵子基因, 所构建基因工程菌的鼠李糖脂产量也仅达到0.12 g/L^[50]。Wang等利用转座子介导的染色体整合技术将*rhlAB*基因整合到受体菌的染色体上, 构建的重组菌株铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PEER02可以产生1.9 g/L的鼠李糖脂^[51]。郝东辉将*rhlABRI*操纵子导入假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) JH4中进行异源表达, 鼠李糖脂产量仅为101.8 mg/L^[52]。Cha等利用接合转移的方法使*rhlABRI*基因在恶臭假单胞菌(*P. putida*) 1067中成功表达, 基因工程菌*P. putida* 1067 (pNE2)

的鼠李糖脂产量可达7.2 g/L^[47]。Wittgens等将*rhlAB*基因导入恶臭假单胞菌(*P. putida*) KT2440中, 基因工程菌*P. putida* KT2440 pVLT33_ *rhlAB*可产生14.9 g/L鼠李糖脂^[53-54]。Tavares等将铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1的*rhlAB*基因导入到久留里伯克霍尔德菌(*Burkholderia kururiensis*)中进行异源表达, 基因工程菌的鼠李糖脂产量比野生型菌株PAO1提高了600%^[55]。Zhao等将*rhlABRI*基因以质粒形式在施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)中成功表达, 基因工程菌*P. stutzeri* Rhl的鼠李糖脂产量达到1.68 g/L^[48]。巩志金等将携带有组成型启动子的*rhlAB*基因在大肠杆菌(*E. coli*) ATCC 8739中表达, 重组菌的鼠李糖脂产量仅为124.3 mg/L^[56]。上述研究中构建的基因工程菌, 虽然实现了鼠李糖脂的异源生产, 但是鼠李糖脂的产量不尽人意, 还需要对异源合成鼠李糖脂的宿主菌开展进一步的优化调控研究。

2.3 鼠李糖脂的代谢途径调控

在铜绿假单胞菌中存在一些与鼠李糖脂生物合成途径竞争利用前体物质的代谢旁路^[27]。竞争利用糖前体物质的代谢旁路途径如图2所

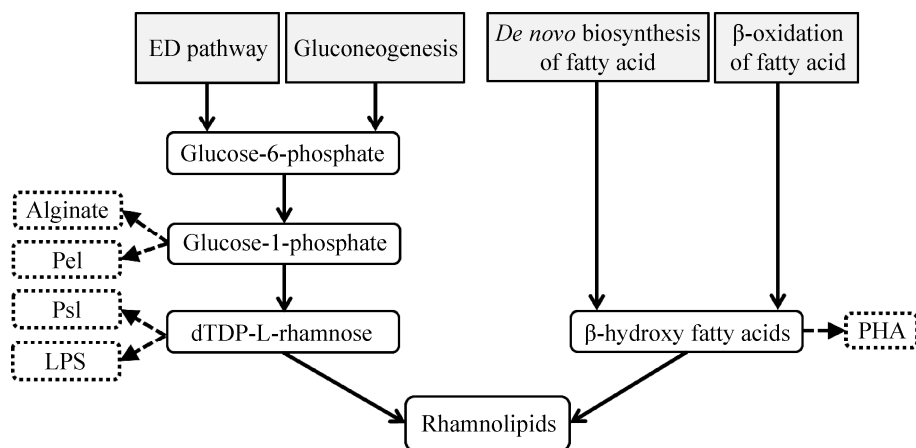


图2 铜绿假单胞菌中合成鼠李糖脂的糖前体和脂前体竞争代谢途径

Figure 2 Competent metabolic pathways of sugar and lipid precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.

示, 主要包括脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的合成途径、海藻酸(alginate)的合成途径以及胞外多糖 Pel (Pel polysaccharides, Pel)和胞外多糖 Psl (Psl polysaccharides, Psl)的合成途径^[27]。LPS 是细胞壁的重要组成成分, 海藻酸对菌体起到黏附、保护的作用。胞外多糖 Pel 和 Psl 是铜绿假单胞菌在特殊条件下形成生物膜的主要组成部分。选择性阻断糖前体的竞争途径有望提高铜绿假单胞菌的鼠李糖脂产量。Lei 等分别敲除胞外多糖 Psl 和 Pel 的关键基因 *pslAB* 和 *pelA*, 敲除菌株 SGΔ*pslAB* 的鼠李糖脂产量比野生型菌株提高了 21.0%, 而敲除菌株 SGΔ*pelA* 的鼠李糖脂产量比野生型菌株降低了 39.8%, 说明 Psl 合成途径是鼠李糖脂高产调控中需要选择性阻断的代谢旁路^[57]。

与鼠李糖脂的合成竞争脂前体物质的代谢旁路主要为聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)合成途径。PHA 和鼠李糖脂这 2 种物质的脂类基团均由脂肪酸代谢途径得来, 并共用 β -羟基脂肪酸为其各自的前体物质^[58]。Wittgens 等在恶臭假单胞菌(*P. putida*) KT2440 中异源表达来自铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1 的 *rhlAB* 基因, 同时敲除宿主菌中的 *phaC1* 基因降低 PHA 的合成, 最终使鼠李糖脂产量较原始菌株提高了 7 倍^[53]。Choi 等研究发现分别敲除铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中 PHA 合成的相关基因 *phaC1* 和 *phaC2*, 这 2 个敲除菌株的鼠李糖脂产量未明显增加^[59]。因为 *phaC1* 和 *phaC2* 是铜绿假单胞菌中表达 PHA 合酶的 2 个等位基因, 单纯敲除掉 *phaC1* 基因或者 *phaC2* 基因并不能完全阻断 PHA 的合成途径。Lei 等通过敲除铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中 PHA 合成的关键基因 *phaC1DC2*, 敲除菌株的鼠李糖脂产量比野生型菌株提高了 25.3%, 同时敲除胞外多糖 Psl 的关键基因 *pslAB* 和 PHA 合成

的关键基因 *phaC1DC2*, 双敲除菌株的鼠李糖脂产量比野生型菌株提高了 69.7%^[57]。

目前, 关于阻断鼠李糖脂合成代谢旁路提高鼠李糖脂产量的研究相对较少, 还需进一步研究鼠李糖脂合成的代谢旁路, 明确其对菌体生长代谢的意义以及与鼠李糖脂合成的关系, 为通过选择性阻断代谢旁路来提高鼠李糖脂产量奠定理论基础。

2.4 鼠李糖脂的发酵优化

通过培养基组分优化和发酵工艺调整可以在一定程度上提高鼠李糖脂的产量, 从而相应地降低生产成本。在鼠李糖脂的发酵优化方面已有大量的研究报道, 主要集中在廉价底物选用、培养基配方优化^[37,60]、新型发酵工艺探索^[61-62]这 3 个方面。

筛选评价可生物利用的废弃物或者下脚料作为鼠李糖脂发酵生产的底物可变废为宝, 同时还能降低鼠李糖脂的原料投入成本。廉价且鼠李糖脂产率高的底物一直是鼠李糖脂发酵优化中所追求的。例如研究报道铜绿假单胞菌以废弃油为底物时鼠李糖脂产量可达 12.3 g/L^[34]。在获得鼠李糖脂产生菌后, 培养基优化是快速有效提高菌株鼠李糖脂产量的优化方法。Gong 等通过响应面法进行培养基优化使铜绿假单胞菌 SKY 的鼠李糖脂产量达到 39.8 g/L^[61]; 张澄利用响应面法优化后的培养基将铜绿假单胞菌 Zs1 的鼠李糖脂产量提高了 3.74 倍, 达到 49.4 g/L^[63]。研发新的发酵工艺已成为鼠李糖脂发酵优化过程中的重要一环。Santos 等将铜绿假单胞菌的前发酵液循环利用补充鼠李糖脂合成调控的信号分子, 使菌株的鼠李糖脂产量提高了 3.8 倍^[62]; Camilios-Neto 等利用含甘油浸渍的固体培养基进行铜绿假单胞菌的固体发酵, 避免了泡沫的产生, 鼠李糖脂产量提高到 45.4 g/L^[64]。

3 思考与展望

鼠李糖脂在石油工业、环境修复、农业、食品、医药等领域有着广阔的应用前景,然而,与化学表面活性剂相比,较高的原料成本和相对较低的合成产量导致鼠李糖脂的生产成本较高,限制了鼠李糖脂的推广应用。目前高产菌株选育和发酵优化是提高鼠李糖脂产量、降低生产成本的主要策略。有关鼠李糖脂的菌种选育、异源宿主合成、发酵优化、信号分子调控等研究已相继开展,但是通过调控生产菌的代谢通量提高鼠李糖脂产量的研究还相对较少。Lei 等研究已证实选择性阻断竞争前体物质的代谢旁路可以有效提高铜绿假单胞菌的鼠李糖脂产量^[57]。进一步明确铜绿假单胞菌中与鼠李糖脂合成相偶联的代谢途径,挖掘鼠李糖脂合成负调控因子,解析负调控因子对鼠李糖脂合成的调控机制,对未来鼠李糖脂高产调控具有重要的科学意义。

随着高通量测序技术的飞速发展及各种组学技术的日趋成熟,为准确揭示微生物细胞内特定生物学过程机理提供了可靠的技术保障。我们认为需加强基因组学、转录组学、蛋白质组学以及代谢组学等技术在鼠李糖脂高产调控中的运用,全面考虑目标菌株所有基因的表达、转录等过程,基于基因组等组学信息构建目标菌株的代谢网络模型,应用全基因组水平代谢建模指导鼠李糖脂产生菌的代谢改造。同时,综合运用基因编辑技术、合成生物学技术对现有菌种资源进行改造,以期获得能够利用廉价的底物、生长快速且鼠李糖脂产率高的优良生产菌株。

目前,鼠李糖脂高产优化调控研究绝大多数是从单一角度优化鼠李糖脂产量,如单纯进行发酵优化或者只针对某一基因开展菌种改造。然而,选择合适的底盘微生物,同时进行选择性阻断代谢旁路、增加鼠李糖脂合成关键

基因的拷贝数、引入血红蛋白基因 *vgb* 等基因改造研究,可使基因工程菌的鼠李糖脂产量有很大的提高空间。另外,新型发酵工艺,尤其是固体发酵也是提高鼠李糖脂产量的一个很好的优化策略。未来研发鼠李糖脂合成关键酶的固定化酶和非水介质酶催化等酶工程技术,利用体外酶法合成鼠李糖脂也将有望实现鼠李糖脂的高效生产。鼠李糖脂作为一种应用型微生物代谢产物,其高产优化调控研究是一项值得跨学科研究人员协同合作开展的工作,对其他微生物应用产品的合成调控也具有借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Jarvis FG, Johnson MJ. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1949, 71(12): 4124-4126
- [2] Soberón-Chávez G, González-Valdez A, Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(1): 136-146
- [3] Chong HQ, Li QX. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-12
- [4] Varjani S, Rakholiya P, Yong Ng H, Taherzadeh MJ, Hao Ngo H, Chang JS, Wong JWC, You SM, Teixeira JA, Bui XT. Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: status and perspectives[J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124213
- [5] 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)
- [6] Drakontis CE, Amin S. Biosurfactants: formulations, properties, and applications[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2020, 48: 77-90
- [7] 杜瑾, 郝建安, 张晓青, 王静, 张雨山. 微生物合成鼠李糖脂生物表面活性剂的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(4): 5-11
Du J, Hao JA, Zhang XQ, Wang J, Zhang YS. Research progress in biosynthesis of rhamnolipid biosurfactant[J]. Chemistry & Bioengineering, 2015, 32(4): 5-11 (in Chinese)
- [8] Zhao F, Li P, Guo C, Shi RJ, Zhang Y. Bioaugmentation

- of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through *in situ* biosurfactant production without air injection[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 295-302
- [9] Zhao F, Shi RJ, Cui QF, Han SQ, Dong HP, Zhang Y. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2017, 157: 124-130
- [10] Liu GS, Zhong H, Yang X, Liu Y, Shao BB, Liu ZF. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(4): 796-814
- [11] Dobler L, Ferraz HC, Araujo De Castilho LV, Sengenito LS, Pasqualino IP, Souza Dos Santos AL, Neves BC, Oliveira RR, Guimarães Freire DM, Almeida RV. Environmentally friendly rhamnolipid production for petroleum remediation[J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126349
- [12] Lopes CSC, Teixeira DB, Braz BF, Santelli RE, Castilho LVA, Gomez JGC, Castro RPV, Seldin L, Freire DMG. Application of rhamnolipid surfactant for remediation of toxic metals of long- and short-term contamination sites[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2021, 18(3): 575-588
- [13] Chen JW, Wu QH, Hua Y, Chen J, Zhang HW, Wang H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 8309-8319
- [14] Zhao F, Yuan ML, Lei LY, Li CY, Xu XM. Enhanced production of mono-rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124605
- [15] Crouzet J, Arguelles-Arias A, Dhondt-Cordelier S, Cordelier S, Pršić J, Hoff G, Mazeyrat-Gourbeyre F, Baillieul F, Clément C, Ongena M, et al. Biosurfactants in plant protection against diseases: rhamnolipids and lipopeptides case study[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 1014
- [16] 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
- [17] Chen S, Ma YC, Dai L, Liao WY, Zhang L, Liu JF, Gao YX. Fabrication, characterization, stability and re-dispersibility of curcumin-loaded gliadin-rhamnolipid composite nanoparticles using pH-driven method[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106758
- [18] Irfan-Maqsood M, Seddiq-Shams M. Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants[J]. *Industrial Biotechnology*, 2014, 10(4): 285-291
- [19] Sana S, Datta S, Biswas D, Auddy B, Gupta M, Chattopadhyay H. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp.[J]. *Wound Medicine*, 2018, 23: 47-52
- [20] Yi G, Son J, Yoo J, Park C, Koo H. Rhamnolipid nanoparticles for *in vivo* drug delivery and photodynamic therapy[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, 19: 12-21
- [21] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964
- [22] Burger MM, Glaser L, Burton RM. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238(8): 2595-2602
- [23] Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(31): 19787-19795
- [24] Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(7): 2044-2054
- [25] Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2000, 146 (11): 2803-2814
- [26] Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(3): 708-718
- [27] Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M, Hausmann R, et al. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(7): 2865-2878

- [28] Suh SJ, Invally K, Ju LK. Rhamnolipids: pathways, productivities, and potential[A]//Biobased Surfactants[M]. Amsterdam: Elsevier, 2019: 169-203
- [29] Dobler L, Vilela LF, Almeida RV, Neves BC. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting[J]. New Biotechnology, 2016, 33(1): 123-135
- [30] Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PNAS, 1995, 92(14): 6424-6428
- [31] Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids[J]. Microbiology, 2003, 149(8): 2005-2013
- [32] Chrzanowski Ł, Ławniczak Ł, Czaczyk K. Why do microorganisms produce rhamnolipids?[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(2): 401-419
- [33] Zhao F, Han SQ, Zhang Y. Comparative studies on the structural composition, surface/interface activity and application potential of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* using hydrophobic or hydrophilic substrates[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122269
- [34] 张婧波, 吴剑荣, 蒋芸, 杨迪, 詹晓北. 以抽油烟机废油为原料发酵产鼠李糖脂的研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(5): 195-200
- Zhang JB, Wu JR, Jiang Y, Yang D, Zhan XB. Fermentative production of rhamnolipid using waste oil from range hood as substrate[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(5): 195-200 (in Chinese)
- [35] Zhao F, Jiang H, Sun HC, Liu C, Han SQ, Zhang Y. Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge[J]. RSC Advances, 2019, 9(6): 2885-2891
- [36] Moussa TAA, Mohamed MS, Samak N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2014, 31(4): 867-880
- [37] Zhao F, Zhou JD, Han SQ, Ma F, Zhang Y, Zhang J. Medium factors on anaerobic production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* SG and a simplifying medium for *in situ* microbial enhanced oil recovery applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(4): 54
- [38] Zhao F, Shi RJ, Ma F, Han SQ, Zhang Y. Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 39
- [39] Sun SL, Wang YX, Zang TT, Wei JY, Wu HZ, Wei CH, Qiu GL, Li FS. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Bioresource Technology, 2019, 281: 421-428
- [40] Gámez OR, Rodríguez AA, Cadre JV, Gómez JGC. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from contaminated soils with oily wastes[J]. Journal of Environmental Treatment Techniques, 2017, 5: 5-11
- [41] 李南臻, 王刚, 万玉军, 庾有朋, 罗丽娟, 岳晓敏. 产鼠李糖脂铜绿假单胞菌的选育及其发酵条件的优化研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 1-8, 17
- Li NZ, Wang G, Wan YJ, Tuo YP, Luo LJ, Yue XM. Breeding of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* and optimization of fermentation conditions[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2018, 54(1): 1-8, 17 (in Chinese)
- [42] 孙瑾. 鼠李糖脂高产菌株的诱变筛选及遗传改造[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2015
- Sun J. Mutation breeding and genetic modification of rhamnolipid producing strain[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong University, 2015 (in Chinese)
- [43] Zhao F, Cui QF, Han SQ, Dong HP, Zhang J, Ma F, Zhang Y. Enhanced rhamnolipid production of *Pseudomonas aeruginosa* SG by increasing copy number of *rhlAB* genes with modified promoter[J]. RSC Advances, 2015, 5(86): 70546-70552
- [44] 冯蕾, 谭之京, 胡鸢雷, 杨新平, 陈竞, 秦新政, 唐娴, 林忠平. 含血红蛋白基因(VHb)的铜绿假单胞菌重组菌的构建及鼠李糖脂表达条件的研究[J]. 工业微生物, 2012, 42(3): 78-82
- Feng L, Tan ZJ, Hu YL, Yang XP, Chen J, Qin XZ, Tang X, Lin ZP. Construction of recombinant strain containing *Vitreoscilla* hemoglobin gene (VHb) of *Pseudomonas aeruginosa* and its rhamnolipid expressing conditions[J]. Industrial Microbiology, 2012, 42(3): 78-82 (in Chinese)
- [45] Amador E, Martín JF, Castro JM. A *Brevibacterium lactofermentum* 16S rRNA gene used as target site for homologous recombination[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 185(2): 199-204
- [46] Han L, Liu P, Peng Y, Lin J, Wang Q, Ma Y. Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(1): 139-150
- [47] Cha MS, Lee N, Kim M, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1

- biosurfactant in *Pseudomonas putida*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(7): 2192-2199
- [48] Zhao F, Shi R, Zhao J, Li G, Bai X, Han S, Zhang Y. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(2): 379-389
- [49] 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
- [50] Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(1): 187-194
- [51] Wang QH, Fang XD, Bai BJ, Liang XL, Shuler PJ, Goddard WA III, Tang YC. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98(4): 842-853
- [52] 郝东辉. 采油微生物筛选、鼠李糖脂产脂性能及关键酶基因克隆与表达研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2008
- Hao DH. Studies on the screening of MEOR microbial strain, rhamnolipid performance, and rhamnosyltransferase gene cloning and expression[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2008 (in Chinese)
- [53] Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 80
- [54] Beuker J, Barth T, Steier A, Wittgens A, Rosenau F, Henkel M, Hausmann R. High titer heterologous rhamnolipid production[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 1-7
- [55] Tavares LFD, Silva PM, Junqueira M, Mariano DCO, Nogueira FCS, Domont GB, Freire DMG, Neves BC. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 1909-1921
- [56] 巩志金, 彭彦峰, 张煜婷, 宋国田, 陈五九, 贾士儒, 王钦宏. 产鼠李糖脂生物表面活性剂大肠杆菌的构建与优化[J]. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1050-1062
- Gong ZJ, Peng YF, Zhang YT, Song GT, Chen WJ, Jia SR, Wang QH. Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(7): 1050-1062 (in Chinese)
- [57] 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
- [58] Germer A, Tiso T, Müller C, Behrens B, Vosse C, Scholz K, Froning M, Hayen H, Blank LM. Exploiting the natural diversity of RhlA acyltransferases for the synthesis of the rhamnolipid precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(6): e02317-19
- [59] Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho YH, Yoon SC. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative ¹³C NMR analysis of the products in wild-type and mutants[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 151(1): 30-42
- [60] Zhao F, Mandlaa M, Hao J, Liang X, Shi R, Han S, Zhang Y. Optimization of culture medium for anaerobic production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl for microbial enhanced oil recovery[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(2): 231-237
- [61] Gong ZJ, He QH, Che CC, Liu JF, Yang G. Optimization and scale-up of the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state fermentation using high-density polyurethane foam as an inert support[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(3): 385-392
- [62] Santos ASD, Pereira NJr, Freire DMG. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1[J]. PeerJ, 2016, 4: e2078
- [63] 张澄. 铜绿假单胞菌产鼠李糖脂发酵条件优化与产物性质研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2018
- Zhang C. Optimization of fermentation conditions by *Pseudomonas aeruginosa* and studies on characters of rhamnolipid[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2018 (in Chinese)
- [64] Camilios-Neto D, Bugay C, Santana-Filho AP, Joslin T, Souza LM, Sassaki GL, Mitchell DA, Krieger N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(5): 1395-1403