

• 工业生物技术 •

鼠李糖脂组分可控生产菌的构建及其鼠李糖脂性能

赵敏^{1,2}, 郑雅倩^{1,2}, 于海英^{1*}, 马旅雁^{1,2*}

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

赵敏, 郑雅倩, 于海英, 马旅雁. 鼠李糖脂组分可控生产菌的构建及其鼠李糖脂性能[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 786-798.
ZHAO Min, ZHENG Yaqian, YU Haiying, MA Lüyan. Construction of mono/di-rhamnolipid ratios-manipulable strains and characterization of their corresponding surfactants' activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 786-798.

摘要: 鼠李糖脂(rhamnolipids, RLs)被认为是最具有应用潜力的生物表面活性剂之一。由于其单鼠李糖脂与双鼠李糖脂的比例对其性能有着重要的影响, 因此构建鼠李糖脂组分可调控的生产菌更有利于其在不同的场景中应用。本研究通过敲除铜绿假单胞菌 PAO1 中编码鼠李糖基转移酶的基因(*rhIC*), 获得只产单鼠李糖脂的菌株; 然后通过将受阿拉伯糖诱导表达的 P_{BAD} -*rhIC* 基因以整合到染色体上的方式或在质粒上表达的方式进行回补, 得到两种类型的回补菌株。结果表明, 随着阿拉伯糖诱导浓度的增加, 回补菌株合成的鼠李糖脂中单鼠李糖脂所占的比例逐渐降低, 表面张力逐渐升高、临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)值逐渐升高和乳化能力逐渐减弱。未诱导的回补菌株可以产生少量的双鼠李糖脂, 合成的鼠李糖脂的表面性能更优, 而 0.10%阿拉伯糖诱导的鼠李糖脂表现出更好的抑菌效果。

关键词: 铜绿假单胞菌 PAO1; 单双鼠李糖脂比例; 鼠李糖基转移酶II (RhIC); 阿拉伯糖诱导

Construction of mono/di-rhamnolipid ratios-manipulable strains and characterization of their corresponding surfactants' activity

ZHAO Min^{1,2}, ZHENG Yaqian^{1,2}, YU Haiying^{1*}, MA Lüyan^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Rhamnolipids (RLs) have emerged as one of the most promising classes of

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1804104)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1804104).

*Corresponding authors. E-mail: MA Lüyan, luyanma27@im.ac.cn; YU Haiying, yuhy@im.ac.cn

Received: 2023-06-05; Accepted: 2023-10-07

biosurfactants. The ratio of mono-RL to di-RL plays a significant role in determining its performance. Therefore, strains whose production of mono-RL and di-RL are manuplable, have advantage on applications in various scenarios. In this study, we developed a *rhlC* deletion mutant strain in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, which produced primarily mono-RL. Subsequently, we generated two complemented strains by integrating the arabinose-induced P_{BAD} -*rhlC* gene, either directly into the chromosomes or expressing it on plasmids. Our results indicate that the ratio of mono-RL to di-RL synthesized by the complemented strain gradually decreased as the concentration of arabinose (the inducer) increased. Consequently, there was a decrease in emulsification ability and an increase in surface tension and critical micelle concentration (CMC) of the corresponding rhamnolipids. The complemented strains without inducer can produce a small amount of di-rhamnolipids, which enhanced the surfactant properties. Notably, the rhamnolipids induced by 0.10% arabinose exhibited the most potent antibacterial effect.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; ratio of mono- to di-rhamnolipid; rhamnosyltransferase II (RhlC); arabinose induction

生物表面活性剂是微生物在好氧或厌氧条件下生长时,在其代谢过程中分泌出来的具有一定表面活性的代谢产物。与传统的化学表面活性剂相比,生物表面活性剂具有更强的表、界面活性以及较低的生物毒性和易降解等优点^[1]。鼠李糖脂(rhamnolipids, RLs)被认为是一种最有前途的糖脂类生物表面活性剂,在3次采油、医药、环境修复和农业等领域展示出了其商业应用价值^[2-3]。

鼠李糖脂是由1-2个呈亲水性的鼠李糖分子与1-2个呈疏水性的饱和或不饱和脂肪酸长链(C₈-C₁₆)通过 β -糖苷键相连接的化学结构多样的同系物^[4]。在铜绿假单胞菌中,鼠李糖基转移酶I(rhamnosyltransferase I, RhlB)催化R-3-羟基脂肪酸(R-3-hydroxyfatty acids, HAAs)与dTDP-L-鼠李糖反应合成单鼠李糖脂(mono-RLs),单鼠李糖脂在鼠李糖基转移酶II(rhamnosyltransferase II, RhlC)的作用下与另一分子的dTDP-L-鼠李糖缩合成为双鼠李糖脂(di-RLs)^[5]。不同的铜绿假单胞菌能够产生不同比例的单、双鼠李糖脂混合物,并且其物理

化学特性不仅受同系物比例的影响,而且也受到脂肪酸碳链长度和脂肪酸饱和度的影响^[6],从而影响其应用效果^[7]。

已有研究表明鼠李糖脂同系物的比例不同,其物理化学性质有所不同。Alves等^[8]研究发现以单鼠李糖脂为主的鼠李糖脂样品(96% mono-RLs/4% di-RLs),相比于双鼠李糖脂为主(28% mono-RLs/72% di-RLs)和单、双相对平衡的鼠李糖脂样品(61% mono-RLs/39% di-RLs)具有更好的驱油性、泡沫稳定性和润湿反转性,并且在表面张力值、临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)值和乳化性能上均高于后两种鼠李糖脂。Zhao等^[9]敲除铜绿假单胞菌SG的*rhlC*基因,获得纯单鼠李糖脂样品,发现纯单鼠李糖脂表现出更好的抗菌性能和对原油的乳化能力。但这些研究对于单、双鼠李糖脂性质的比较是基于不同菌种之间进行的,每个菌种根据培养条件、碳源的不同产生的鼠李糖脂组分差异也较大^[10]。因此本研究以铜绿假单胞菌PAO1作为初始研究菌株,通过敲除鼠李糖基转移酶II RhlC,使其产生的鼠李糖脂

由单、双混合型转变为只产单鼠李糖脂, 然后通过回补 P_{BAD} 启动子调控下的 *rhlC* 基因, 利用不同浓度的阿拉伯糖来诱导 *rhlC* 基因的表达, 从而控制双鼠李糖脂的合成, 获得不同单、双鼠李糖脂比例可调控的菌株及相应鼠李糖脂样品。同时测定具有不同单/双鼠李糖脂比例的鼠李糖脂的理化性质及其抑菌能力, 为鼠李糖脂的后续应用提供理论依据。本研究进一步将 P_{BAD} 启动子调控下的 *rhlC* 基因整合至 *rhlC* 缺失突变株的基因组 *attB* 位点上, 获得的菌株避免了抗生素的使用, 使其更适用于实际生产。本研究结果将为实现特定结构比例鼠李糖脂的生产调控和应用选择提供参考和指导, 推动鼠李糖脂产业的按需定制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种及质粒

所用菌株和质粒如表 1 所示。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 S17-1 λ pir、质粒 pRK2013、pK18Gm、pHERD20T、pSW196 和 pFLP2 均由本实验室保存。铜绿假单胞菌和大肠杆菌均利用 LB 培养基(g/L) (蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 固体培养基添加 15 g/L 的琼脂粉)进行培养。大肠杆菌的抗生素使用浓度为: 庆大霉素 10 μ g/L、氨苄青霉素 100 μ g/L; 铜绿假单胞菌的抗生素使用浓度为: 庆大霉素 100 μ g/L。

表 1 文中所用菌种及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Sources or references
Plasmids		
pRK2013	Helper plasmid for mobilization of non-self-transmissible plasmids	Lab
pK18Gm	Suicide vector used for generation for markerless deletion strain in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gm ^r	Lab
pHERD20T	For gene complementation in <i>P. aeruginosa</i> , Carb ^r	Lab
pKrhICGm	For <i>rhlC</i> deletion in <i>P. aeruginosa</i> , Gm ^r	This work
pRhIC	Plasmid pHERD20T with <i>rhlC</i> , Carb ^r	This work
pSW196	Mini-CTX <i>lacZ</i> with P_{BAD} promoter	[11]
pFLP2	FLP recombinase expressing plasmid, Ap ^r	[12]
Strains		
<i>Escherichia coli</i> strains DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺), phoA	Lab
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λ pir	thi pro hsdR hsdM ⁺ recA RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 λ pir, Gmr	[13]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains PAO1	Wild type (WT) strain	[14]
Δ <i>rhlC</i>	PAO1 with deletion in <i>rhlC</i>	This work
Δ <i>rhlC</i> /pRhIC	<i>rhlC</i> in frame deletion with pRhIC expressing araC- P_{BAD} - <i>rhlC</i>	This work
Δ <i>rhlC</i> / <i>attB</i> : <i>rhlC</i>	<i>rhlC</i> in frame deletion with araC- P_{BAD} -fur inserted at <i>attB</i> site of PAO1 chromosome	This work

Ap^r, Carb^r and Gm^r indicate resistance to ampicillin, carbenicillin and gentamycin, respectively.

1.1.2 主要试剂

氯化氢、碳酸氢钠、98%浓硫酸、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和乙酸乙酯购自北京化工厂有限责任公司；无水乙醇购自天津市康科德科技有限公司；L-(+)-阿拉伯糖和苔黑酚购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；大豆油购自益海嘉里食品营销有限公司；DNA聚合酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司；限制性内切酶购自西安佰奥莱博生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

离心机、紫外分光光度计和 PCR 仪(艾本德(上海)实验室科技有限公司)；漩涡振荡器(杭州米欧仪器有限公司)；振荡培养箱(上海昱泉仪器有限公司)；液相色谱系统(Agilent)。

1.2 单鼠李糖脂合成菌株的构建及单、双鼠李糖脂诱导合成菌株的构建

菌株构建所用载体及菌种见表 1。通过敲除鼠李糖基转移酶 II RhlC，可以获得只产生单鼠李糖脂的菌株。因此首先构建用于敲除 *rhlC* 基因的自杀性质粒 pKrhICGm：以铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的基因组为模板，分别以 *rhlC*_{cup}-F、*rhlC*_{cup}-R 和 *rhlC*_{down}-F、*rhlC*_{down}-R 为引物扩增 *rhlC* 基因的上、下游片段，回收纯化后分别用 *Bam*H I/*Xho* I 和 *Xho* I/*Hind* III 进行双酶切，回收纯化后与用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切回收的 pK18Gm 载体进行连接，转化 *E. coli* DH5 α ，利用菌落 PCR 验证和测序分析，得到自杀性质粒 pKrhICGm。利用 PAO1、助质粒 pRK2013 和自杀性质粒 pKrhICGm 进行三亲结合，在 PAO1 菌株中通过 2 次同源重组实现 *rhlC* 基因的敲除。首先在 PIA+LB+Gm^r 筛选平板上得到单交换突变株，然后通过 20%蔗糖板进行反向筛选，得到不含抗性的双交换突变株，经 PCR 验证得到 *rhlC* 基因敲除菌株。

P_{BAD} 启动子可以在阿拉伯糖诱导条件下调控基因的表达强度，因此本研究将 *rhlC* 基因置于 P_{BAD} 启动子调控之下，通过不同浓度的阿拉伯糖诱导控制 *rhlC* 基因的表达，从而控制双鼠李糖脂的合成量，获得可产生不同比例单、双鼠李糖脂的诱导合成菌株。为了验证这一设想的可行性，首先构建了 P_{BAD} -*rhlC* 基因表达载体，即以铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的基因组为模板，pHERD_rhlC-F 和 pHERD_rhlC-R 为引物，PCR 扩增包含完整 *rhlC* 基因的 DNA 片段，将该片段回收纯化后与 pHERD20T 质粒分别用 *Eco*R I/*Hind* III 进行双酶切，连接，转化 *E. coli* DH5 α ，利用菌落 PCR 验证和测序分析，得到过表达载体 prhlC，由于质粒 pHERD20T 具有阿拉伯糖诱导的 P_{BAD} 启动子，因此将 *rhlC* 基因克隆到 pHERD20T 的 P_{BAD} 启动子之后，该质粒中 *rhlC* 基因的表达受阿拉伯糖的诱导。再利用 150 mmol/L MgCl₂ 制备铜绿假单胞菌 *rhlC* 基因敲除菌株的感受态细胞，通过热激转化将 P_{BAD} -*rhlC* 基因过表达载体 prhlC 转入到敲除株的感受态细胞中，在含有庆大霉素的 LB 培养基上筛选转化子，通过 PCR 验证得到阳性转化子，从而实现了在诱导菌株中通过质粒表达方式对 *rhlC* 基因进行诱导。

其次，考虑到诱导菌株中存在质粒时需要在生产过程中添加抗生素，因此本研究通过质粒 pSW196 将 P_{BAD} -*rhlC* 基因整合到 *rhlC* 基因缺失突变株的染色体上，从而实现了基因的诱导是在染色体上稳定遗传的，不再需要抗生素来维持。pSW196 质粒是由具有将目的基因整合到染色体上的特异性 *attB* 位点的质粒 mini-CTX *lacZ* 衍生而来，具有阿拉伯糖诱导的 P_{BAD} 启动子。根据 *rhlC* 基因及两侧的序列设计引物 minirhlC-F 和 minirhlC-R，用菌株 PAO1 基因组为模板，PCR 扩增 *rhlC* 基因片段，连接

到 pSW196 载体 P_{BAD} 启动子之后, 得到重组载体。再根据质粒 mini-CTX *lacZ* 相关文献中的实验方法, 并用检测引物(attB2 和 CTX1; attB4 和 attB5)进行 PCR 验证, 根据文献中提供的经验值片段大小, 验证质粒整合在铜绿假单胞菌染色体 *attB* 位点^[11]。

所涉及引物见表 2。

1.3 鼠李糖脂的发酵与提取

鼠李糖脂的合成: 将在 LB 中过夜培养的铜绿假单胞菌分别以 3% 的接种量接种至 MS 培养基(100 mL 三角瓶: 20 mL MS 培养基添加 1.2 g 大豆油作为碳源), 37 °C、200 r/min 培养 2 d, 得到鼠李糖脂发酵种子液。再将种子液以 6% 的接种量接种到新的三角瓶中(250 mL 三角瓶: 50 mL MS 培养基添加 3 g 大豆油), 并添加不同浓度的阿拉伯糖(0%、0.10%、0.25%、0.50%、0.75% 和 1.00%), 37 °C、200 r/min 培养 4 d。

鼠李糖脂的提取: 首先将 15 mL 发酵液倒入 50 mL 离心管, 10 000 r/min 离心 10 min; 取 10 mL 上清, 用 6 mol/L 的 HCl 调至 pH 为 2.0 左右进行酸化, 然后加入等体积乙酸乙酯, 漩

涡振荡仪振荡 15–20 min 后 8 000 r/min 离心 10 min; 吸出有机相, 再次加入 8 mL 乙酸乙酯抽提, 合并 2 次抽提的有机相, 挥发掉有机相后获得鼠李糖脂样品。

1.4 苔黑酚法测定鼠李糖脂浓度

将鼠李糖脂样品溶解于 10 mL 0.05 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液中, 根据样品浓度进行适当稀释后, 取 200 μL 稀释样品至干净玻璃试管中, 加 1.8 mL 苔黑酚试剂(0.19% 苔黑酚, 溶剂为 53% 硫酸)。煮沸 20 min, 冷却后在 421 nm 下测定其吸光值, 根据鼠李糖标准曲线计算水解液中鼠李糖的浓度。本研究中利用液相色谱-质谱仪(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)测定 PAO1 等在大豆油为碳源时产生的单双鼠李糖脂的组成成分, 并根据其组分比例计算其换算系数为 2.3, 鼠李糖含量×2.3 即为鼠李糖脂的浓度^[15]。

1.5 薄层层析法分析鼠李糖脂的组分

准备溶解于乙酸乙酯的 5 g/L 的鼠李糖脂样品, 毛细管点样于硅胶板上, 展开剂为氯仿: 甲醇: 乙酸=6.5:1.5:0.2, 显色剂为 5% 的硫酸乙醇^[16]。

表 2 *rhlC* 基因缺失突变株和互补菌株构建及验证所用引物

Table 2 Primers used in this study to construct and identify *rhlC*-deleted mutant and its complementary strain

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
rhlCup-F	ACGTGGATCCGAGAAGTTTCACTGGAGC	570
rhlCup-R	AGCTCTCGAGTTCGCCAAGGTGTTCCA	
rhlCdown-F	AGCTCTCGAGTCGCGAAACGCATT	493
rhlCdown-R	ACGTAAGCTTCGCCAACTGATGGAAATG	
pHERD_rhlC-F	ATCTGATAAGAATTCATGGACCGGATAGACAT	1 095
pHERD_rhlC-R	GCCAGTGCCAAGCTTCGATTCGTTCTACTTCCTCG	
minirhlC-F	GGAATTCATCATGGACCGGATAGAC	988
minirhlC-R	CCCCGGGTGCGCCACTAGGCCTTGG	
attB2	GTCGCCGCCGGCGATGC	450
CTX1	CCTCGTTCCAGTTTGTTC	
attB4	CGCCCTATAGTGAGTCG	950
attB5	CGCCCCAACCTCGCTGG	

1.6 鼠李糖脂的 HPLC-MS 样品制备

将鼠李糖脂样品用 0.05 mol/L NaHCO₃ 溶液溶解稀释至 500 μg/mL, 再与乙腈等体积混合, 使乙腈的终浓度为 50%, 经 0.2 μm 滤器过滤后用于上机检测。

1.7 鼠李糖脂的表面活性能力测定

鼠李糖脂表面张力的测定采用表面张力仪进行测量, 并根据苔黑酚法定量溶液中的鼠李糖脂浓度稀释为 1 g/L 的鼠李糖脂溶液进行测量, 同时将鼠李糖脂样品进行系列稀释, 根据不同浓度鼠李糖脂样品的表面张力值, 计算该样品的临界胶束浓度(CMC)值。鼠李糖脂的乳化效果使用 E24 乳化系数来表征, 取等体积的 1 g/L 鼠李糖脂溶液与大豆油, 涡旋振荡 5 min, 静置 24 h 后测定乳化所占总体积的百分比^[17]。

1.8 鼠李糖脂抑菌作用测定

利用抑菌圈法测定不同阿拉伯糖浓度诱导条件下所产生的鼠李糖脂的抑菌能力。被测试菌株为一株革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 和两株革兰氏阳性菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) A186 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) RN4220。鼠李糖脂浓度为 1 g/L, 挖孔法进行抑菌实验。利用灭菌的 200 μL 枪头宽头在培养基(60 mL LB+40 mL 水琼脂混菌)表面插入并取出上层水琼脂, 再滴加 50 μL 鼠李糖脂样品(1 g/L)。正置放于 37 °C 培养箱, 过夜培养。

2 结果与分析

2.1 不同阿拉伯糖诱导浓度对鼠李糖脂组分的影响

鼠李糖脂的合成包括 3 个关键基因 *rhlA*、*rhlB* 和 *rhlC*, 当 *rhlC* 基因缺失后, 菌株只能合成单鼠李糖脂。因此当将 *rhlC* 基因置于 P_{BAD} 启动子调控之下的质粒 pRhIC 转入到 *rhlC* 基因

缺失突变株中, 通过不同的阿拉伯糖浓度(0%、0.10%、0.25%、0.50%、0.75%和 1.00%)诱导时, 由于 *rhlC* 基因的表达量不同, 就可以产生具有不同单/双鼠李糖脂比例的鼠李糖脂(图 1)。通过薄层层析分析野生型 PAO1、 $\Delta rhlC$ 突变株, 以及不同阿拉伯糖浓度诱导条件下获得的鼠李糖脂样品的组成, 结果如图 1 所示, R_f 值约为 0.9 的斑点为单鼠李糖脂, R_f 值约为 0.6 的斑点为双鼠李糖脂^[18], 在野生型菌株 PAO1 中以双鼠李糖脂为主(右一), 而在 $\Delta rhlC$ 突变株中只产生单鼠李糖脂(左一), 随着阿拉伯糖诱导浓度的增加, 0%、0.10%、0.25%、0.50%、0.75%和 1.00% (左二到右二), 单鼠李糖脂的占比逐渐减少。并且在诱导浓度为 0%时(即未诱导时), 由于质粒的本底表达, 因此产生的鼠李糖脂样品中也出现了少量的双鼠李糖脂, 而当阿拉伯糖的诱导浓度 $\geq 0.25\%$ 时, 产生的鼠李糖脂样品以双鼠李糖脂为主。

2.2 鼠李糖脂可控菌株合成的单、双鼠李糖脂的表面性能测定

鼠李糖脂为一种阴离子生物表面活性剂, 具

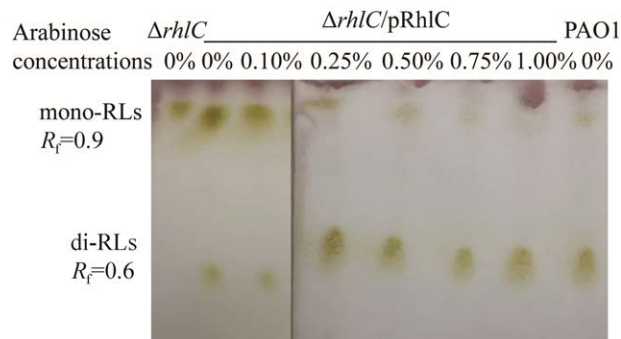


图 1 野生型菌株 PAO1、 $\Delta rhlC$ 突变株以及在不同阿拉伯糖诱导浓度下 $\Delta rhlC$ 突变株回补菌株合成的鼠李糖脂的薄层层析分析

Figure 1 Thin-layer chromatographic analysis of rhamnolipids synthesized by wild-type strain PAO1, $\Delta rhlC$ mutant strain and complemented strains induced by different arabinose concentrations.

有表面活性剂的所有表面活性表征。表面活性剂的水溶液，当其浓度达到一定阈值时，溶液的物理化学性能即发生突变，该浓度阈值即被称为表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)。表面活性剂稀溶液随浓度增加，表面张力急剧降低，当达到 CMC 值后，再增加浓度，表面张力不再改变或改变很小。根据这一特性测量 50–500 mg/L 一系列浓度梯度的不同诱导条件下的鼠李糖脂样品，结果如表 4 所示，鼠李糖脂的 CMC 值约为 28–39 mg/L，而已知化学表面活性剂的 SDS、SDBS 和油酸钠的 CMC 值分别为 2 200、488、365 mg/L。可见，鼠李糖脂的 CMC 值是远低于化学表面活性剂的，较低浓度的鼠李糖脂即可很好地改变溶液的表面性能。在阿拉伯糖诱导条件下，回补菌株的双鼠李糖脂比例逐渐增加，鼠李糖脂水溶液的 CMC 值和表面张力呈现出增加的趋势，乳化能力呈现出降低的趋势(表 3)，而未经阿拉伯糖诱导的回补菌株表现出相对较低的表面张力、CMC 值和相对较强的乳化性能。乳化能力是表征表面活性剂表面活性的另一个指标，已有研究表明，鼠李糖脂的乳化性能受到自身浓度以及结构组成的双重影响。本研究采用 500 mg/L 的鼠李糖脂测定其乳化性能，该浓度远远大于

表 3 鼠李糖脂性能测定结果

Table 3 The properties of rhamnolipids

RLs from strain	Surface tension (mN/m)	CMC (mg/L)	Emulsifying activity
$\Delta rhIC$	30.3	30.1	70.8
0% ara	31.1	27.9	84.2
0.10% ara	31.8	31.6	75.0
0.25% ara	31.8	35.1	57.1
0.50% ara	32.4	36.5	57.1
0.75% ara	33.7	34.5	54.6
1.00% ara	36.1	39.1	54.2
PAO1	32.4	37.5	55.4

样品的 CMC 值，以排除浓度带来的影响。由此推测，含有少量双鼠李糖脂的单鼠李糖脂具有更好的表面性能。

2.3 鼠李糖脂可控菌株合成的单、双鼠李糖脂的抑菌能力测定

鼠李糖脂样品的抑菌能力是根据其抑菌圈的大小来判断的。本研究选用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌作为测试菌，分别测定野生型菌株 PAO1、*rhlC* 基因缺失突变株和 0%、0.10%、1.00%阿拉伯糖诱导条件下产生的鼠李糖脂的抑菌能力。结果如表 4 所示，鼠李糖脂样品对于革兰氏阴性菌大肠杆菌无抑菌效果，而对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌则表现出了较好的抑菌效果。

通常根据抑菌圈的直径大小来判断鼠李糖脂的抑菌效果，抑菌圈直径越大说明被测试菌株对鼠李糖脂越敏感：抑菌圈直径>15 mm 为高度敏感；10–15 mm 为中度敏感；<10 mm 为低度敏感；无抑菌圈则为不敏感^[19]。0.10%阿拉伯糖诱导的菌株产生的鼠李糖脂表现出最佳的抑菌效果，枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌都表现出了对其高度的敏感性。但是随着阿拉伯

表 4 鼠李糖脂的抑菌能力

Table 4 Antibacterial activity of rhamnolipids

Rhamnolipids (RLs)	Inhibition zone of S.a (mm)	Inhibition zone of B.s (mm)	Inhibition zone of E.c (mm)
RLs from strain $\Delta rhIC$	17.5	14.5	0.0
RLs from strain 0% ara	15.0	13.5	0.0
RLs from strain 0.1% ara	18.0	15.8	0.0
RLs from strain 1% ara	11.5	10.0	0.0
RLs from strain PAO1	10.2	9.0	0.0

S.a stands for *Staphylococcus aureus*, B.s stands for *Bacillus subtilis*, E.c stands for *Escherichia coli*.

糖浓度的进一步增加,产生的鼠李糖脂的抑菌效果逐渐减弱。已有的研究表明,单鼠李糖脂因为具有较高的疏水性、较低的临界胶束浓度(CMC)和较低的亲水-亲油平衡(hydrophilic lipophilic balance, HLB),能够更有效地阻碍细菌的相互作用,从而表现出更好的抑菌能力^[10],但 0.10%阿拉伯糖诱导产生的带有微量双鼠李糖脂的结果优于纯单鼠李糖脂,再一次验证了鼠李糖脂中的单/双鼠李糖脂比例对其应用的重要性,并且作为一种有效且环保的杀菌剂,具有适宜的单双鼠李

糖脂比例的鼠李糖脂也更具有竞争力。

2.4 鼠李糖脂可控菌株合成的单、双鼠李糖脂组分的 HPLC-MS 分析

通过薄层层析结果(图1)只能定性地鉴定出单、双鼠李糖脂,因此本研究进一步通过 HPLC-MS 分析了不同鼠李糖脂样品的具体组分,用 0.75%和 0%阿拉伯糖诱导浓度产生的鼠李糖脂样品分别代表多双鼠李糖脂样品和多单鼠李糖脂样品,与野生型 PAO1 和 *rhlC* 基因缺失株产生的鼠李糖脂进行对比。结果如表 5 所

表 5 鼠李糖脂的 HPLC-MS 结果

Table 5 The HPLC-MS results of rhamnolipids

Rhamnolipid	Retention time (min)	Pseudo-molecular ion	Relative abundance (%)				
			WT	$\Delta rhlC$	0%	0.10%	0.75%
<mono-RLs>							
Rha-C8-C8	10.84	447	0.03	0.10	ND	0.04	ND
Rha-C8	12.49	305	0.02	0.07	ND	0.07	ND
Rha-C8-C10	12.48	475	0.65	3.52	3.69	5.01	1.49
Rha-C10-C8							
Rha-C10	13.84	333	0.22	2.35	ND	0.45	ND
Rha-C10-C10	13.92	503	14.59	76.20	69.90	66.60	32.61
Rha-C10-C12:1	14.96	529	1.92	6.11	7.33	6.12	1.64
Rha-C12:1-C10							
Rha-C12	15.42	361	0.00	0.02	ND	0.29	ND
Rha-C12-C10	15.43	531	0.65	11.63	12.08	10.23	2.40
Rha-C10-C12							
<di-RLs>							
Rha-Rha-C8-C8	10.70	593	0.17	ND	ND	ND	ND
Rha-Rha-C8-C10	12.04	621	3.61	ND	0.18	0.68	2.19
Rha-Rha-C10-C8							
Rha-Rha-C8-C12:1	12.74	647	0.97	ND	0.03	ND	0.36
Rha-Rha-C12:1-C8							
Rha-Rha-C10-C10	13.01	649	53.54	ND	5.98	3.88	52.89
Rha-Rha-C10	13.24	479	0.03	ND	ND	2.42	ND
Rha-Rha-C12:1	13.91	505	0.61	ND	ND	ND	ND
Rha-Rha-C12:1-C10	14.13	675	8.33	ND	ND	ND	ND
Rha-Rha-C12-C10	14.45	677	12.66	ND	0.80	3.87	6.33
Rha-Rha-C10-C12							
Rha-Rha-C12:1-C12	15.05	703	1.09	ND	ND	ND	ND
Rha-Rha-C10-C14:1							
Rha-Rha-C12-C12	15.62	705	0.88	ND	ND	ND	ND
Rha-Rha-C12	16.23	507	0.04	ND	ND	0.31	ND
<Ratio of mono-RLs to di-RLs>			15:68	100:0	93:7	89:11	21:34

ND stands for not detected.

示, 根据已有文献报道的不同鼠李糖脂组分的质荷比^[16], 本研究在野生型菌株 PAO1 合成的鼠李糖脂样品中共鉴定出多达 19 种鼠李糖脂同系物, 并利用峰面积归一化法分析鼠李糖脂同系物的相对丰度。

其中野生型 PAO1 和 0.75%阿拉伯糖诱导产生的鼠李糖脂主要为双鼠李糖脂, 尤其是 Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ 的鼠李糖脂, 相对丰度最高, 均大于 52%, $\Delta rhIC$ 突变株合成的鼠李糖脂全部为单鼠李糖脂, 其中相对含量最高的一类为 Rha-C₁₀-C₁₀, 达到 76.20%, 回补菌株在 0%、0.10%和 0.75%的阿拉伯糖浓度诱导条件下, 合成的鼠李糖脂同系物仍以 C₁₀-C₁₀ 为主, 双鼠李糖脂合成量逐渐增加, 单鼠李糖脂所占比例逐渐降低, 但同系物的种类较 PAO1 明显减少, 更有利于产品的纯化。

2.5 染色体上回补表达 *rhIC* 基因对单、双鼠李糖脂合成的影响

利用不同浓度的阿拉伯糖诱导质粒表达的 *rhIC* 基因虽然可以合成不同比例的单、双鼠李糖脂, 但在生产过程中需要添加抗生素以维持质粒的稳定性。因此本研究随后又利用 pSW196 质粒构建了在染色体上诱导表达 *rhIC* 基因用于合成单、双鼠李糖脂。构建原理为利用 pSW196 载体上的 *attP* 位点与 pFLP2 载体上表达的针对 FRT 位点的同源重组酶, 分别前后进行 2 次同源重组, 在 *rhIC* 突变株的基因组 *attB* 位点上插入可用 P_{BAD} 诱导表达的 *rhIC*, 原理如图 2 所示, 并利用 *attB2* 和 CTX1、*attB4* 和 *attB5* 引物对两次同源重组结果分别进行 PCR 验证(表 2), 得到 $\Delta rhIC/attB::rhIC$ 突变株的染色体回补菌株 $\Delta rhIC/attB::rhIC$ 。

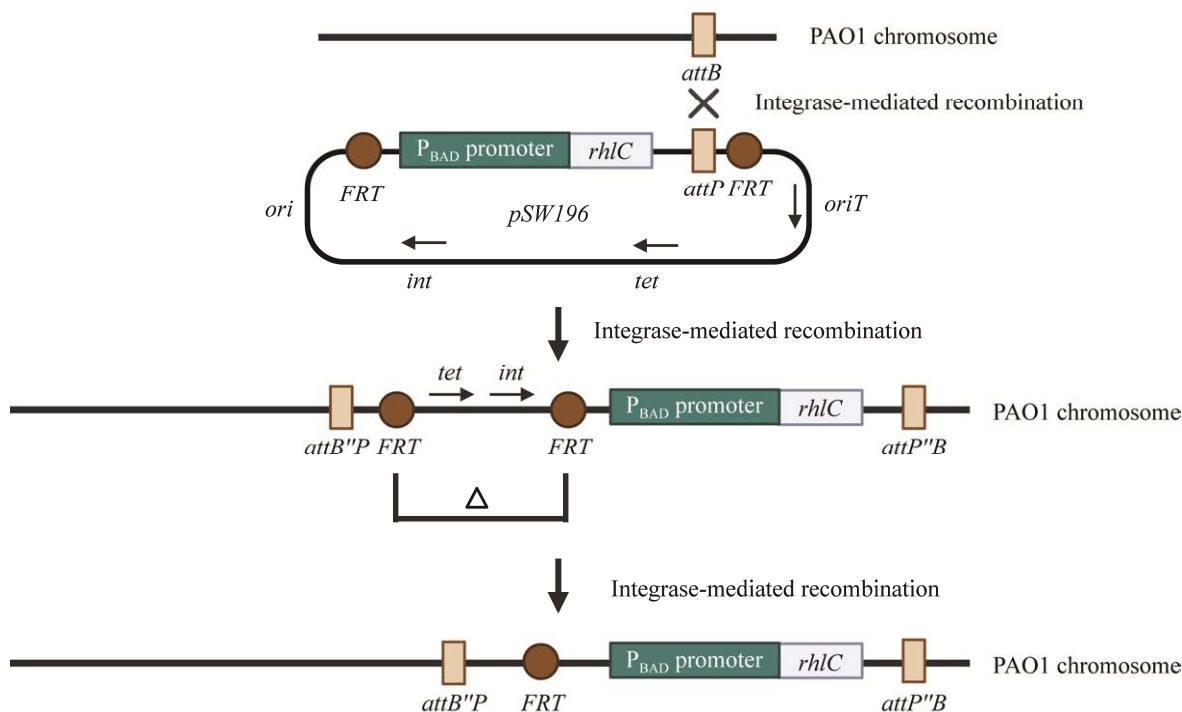


图 2 $\Delta rhIC/attB::rhIC$ 突变株构建示意图

Figure 2 Schematic diagram of the construction of mutant strain $\Delta rhIC/attB::rhIC$. The *rhIC* gene with a P_{BAD} promoter was inserted into the *attB* site of the chromosome of strain PAO1.

利用 0%、0.10%、0.25%、0.50%、0.75% 和 1.00% 阿拉伯糖浓度来诱导 $\Delta rhIC/attB::rhIC$ 菌株，并利用薄层层析来验证其产物中单双鼠李糖脂的比例(图 3)。从图 3 可以看出，随着阿拉伯糖浓度的增加，单双鼠李糖脂的比例与用质粒回补 $rhIC$ 时具有相同的趋势，即双鼠李糖脂占比逐渐变大，证明在染色体上回补 $rhIC$ 基因同样可以获得需要的单双鼠李糖脂比例。而且与利用质粒进行回补相比更具有优势的是，利用染色体进行回补时，诱导体系中可以不使用抗生素，进而在实际应用中减少生产成本和避免环境污染。

2.6 不同鼠李糖脂组分对其乳化性能的影响及鼠李糖脂产量测定

从上述质粒诱导的各项性能可以看出，利用阿拉伯糖诱导时，其乳化性能的差别较大，所以将染色体诱导菌株产生的鼠李糖脂的乳化性能与质粒诱导菌株产生的鼠李糖脂的乳化性

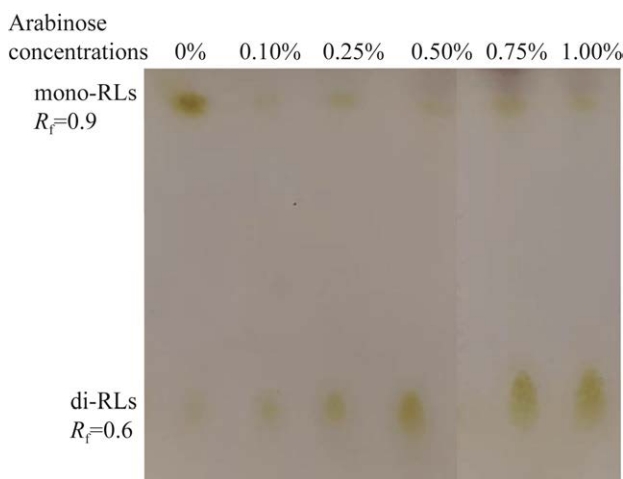


图 3 在不同浓度阿拉伯糖诱导条件下 $\Delta rhIC$ 突变株染色体回补菌株合成的鼠李糖脂的薄层层析分析

Figure 3 Thin-layer chromatographic analysis of rhamnolipids synthesized by strains complementing the $rhIC$ gene at the $attB$ site under induction using varying arabinose concentrations.

能进行比较(图 4)。发现两者趋势基本一致，均为诱导浓度 0% 时的乳化效果最佳，且随着诱导浓度的增加，乳化性能下降。同时对两种方式的诱导菌株与野生型菌株 PAO1 的单、双鼠李糖脂产量进行了比较(图 5)，发现在染色体上回补的可诱导菌株的产量略低于利用质粒回补诱导的菌株，这可能是由于在抗生素的选择压力下，铜绿假单胞菌倾向于产生更多鼠李糖

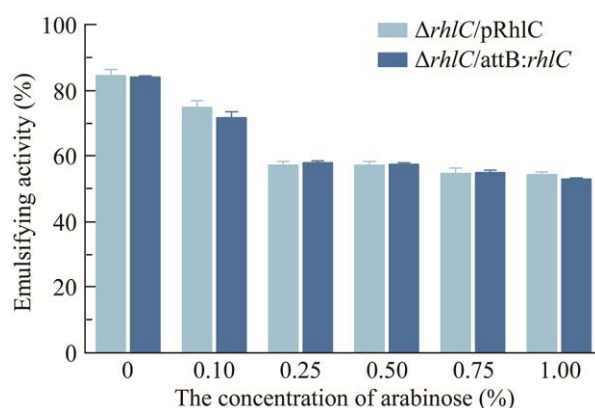


图 4 鼠李糖脂乳化性能比较

Figure 4 Comparison of emulsifying properties of rhamnolipids.

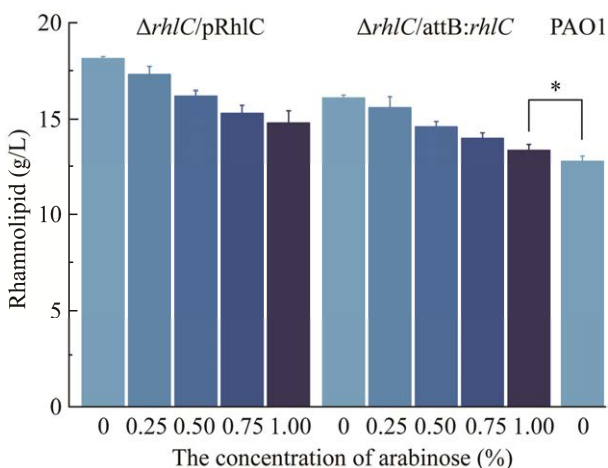


图 5 发酵液中的鼠李糖脂浓度

Figure 5 The concentration of rhamnolipids in the fermentation broth. t -test of unpaired unequal variance was performed for testing differences between groups. *: $P<0.05$.

脂来保护自身。并且随着阿拉伯糖诱导浓度($\leq 1\%$)的增加,诱导菌株鼠李糖脂的产量有所降低,说明阿拉伯糖浓度对于菌体生长代谢也有一定的影响,但是诱导菌株的鼠李糖脂的产量都高于野生型 PAO1 菌株的产量,证明了其在可以产生不同单双比例鼠李糖脂的同时具有更好的应用开发前景。

3 讨论与结论

鼠李糖脂作为一类具有许多潜在应用的生物表面活性剂,在近几年引起了广泛的关注。同时,随着对鼠李糖脂的不断探索,其可应用的领域愈发广泛,例如研究表明鼠李糖脂对白血病、宫颈癌、乳腺癌和膀胱癌细胞具有细胞毒性,可以起到一定的抗癌抗肿瘤功效,在医学发展抗癌药物时具有重要地位^[20-21]。鼠李糖脂还可以在在一定程度上抑制乳制品中生物被膜的形成,从而延长乳制品的保质期^[22]。鼠李糖脂还具有免疫调节活性,可以使动物无法在体内分泌促炎因子,同时因为鼠李糖脂本身具有十分稳定的化学性质,使其可以合成用于药物递送的纳米颗粒^[23]。

利用铜绿假单胞菌生产的鼠李糖脂往往含有不同比例的单双鼠李糖脂,并且该比例受到来自菌株和培养条件的双重控制,不同的生产菌株以及多样的生产条件会影响鼠李糖脂的成分和结构,例如,在同样使用甘油作为碳源培养时,*P. aeruginosa* MN1 产生的鼠李糖脂的单双比例为 76.48:23.52,而 *P. aeruginosa* GL1 则为 69:31^[24];不同的碳源和氧气供应也会影响鼠李糖脂产品的结构和组成^[25]。因此目前调控铜绿假单胞菌合成特定比例的单双鼠李糖脂产品基本都选择了利用不同的菌株或者使用多种培养条件,还有一些研究利用薄层层析分离再提纯的方法。但是不同的菌株产生的鼠李糖脂

的同系物的种类有所不同,而脂肪酸链的差异对性能的影响也十分显著,所以利用不同菌的鼠李糖脂来代表不同比例进行研究,有一定的局限性^[26]。本研究在野生型菌株 PAO1 的基础上敲除第 2 个鼠李糖基转移酶 *RhIC*,从而获得单一合成单鼠李糖脂的突变菌株。通过将 *rhlC* 基因置于阿拉伯糖启动子调控下发现,不同的诱导浓度可以形成不同比例的单双鼠李糖脂,并且其组成也更接近于 *rhlC* 基因突变株所产生的鼠李糖脂,鼠李糖脂同系物的种类远远低于野生型菌株。这不仅可以控制单双鼠李糖脂的比例,也能更好地反映单、双鼠李糖脂对表面性能的影响,排除了菌株的影响,同时也简化了生产步骤,从而在实际使用过程中具有可选择性。

0%和 0.10%阿拉伯糖诱导时,回补菌株仅产生少量的双鼠李糖脂,但其表面活性和抑菌效果均优于纯单鼠李糖脂,说明了少量的双鼠李糖脂组分可以提升其性能。其中 0%阿拉伯糖的诱导产生的鼠李糖脂表现出了更好的表面活性能力,而 0.10%诱导的则表现出了更优的抑菌能力,所以探索最佳的单双鼠李糖脂比例,以便突出鼠李糖脂的某一种特性,使其能更有效地应用于不同领域。同时,为了排除质粒带来的抗生素的干扰,利用铜绿假单胞菌基因组上的 *attB* 位点将 P_{BAD} -*rhlC* 基因整合到染色体上,在不同阿拉伯糖浓度诱导下,同样可以合成单、双鼠李糖脂,并且不需要使用抗生素,产量也无较大影响,不仅节省了成本,而且减少了环境污染。诱导菌株在能达到产生不同比例单双鼠李糖脂的预期的同时,其鼠李糖脂的产量也优于野生型铜绿假单胞菌 PAO1,使其在实际应用中具有更大的价值。

本研究的结果将为特定比例的鼠李糖脂的生产调控和应用选择提供启示和指导,在实际生

产使用中, 可以尝试不同的诱导表达载体, 结合不同的鼠李糖脂生产株或者培养条件, 得到不同单双鼠李糖脂比例的鼠李糖脂同系物产品。

REFERENCES

- [1] KUMAR A, SINGH SK, KANT C, VERMA H, KUMAR D, SINGH PP, MODI A, DROBY S, KESAWAT MS, ALAVILLI H, BHATIA SK, SARATALE GD, SARATALE RG, CHUNG SM, KUMAR M. Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(9): 1472.
- [2] MÜLLER MM, KÜGLER JH, HENKEL M, GERLITZKI M, HÖRMANN B, PÖHNLEIN M, SYLDATK C, HAUSMANN R. Rhamnolipids-next generation surfactants?[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 162(4): 366-380.
- [3] HENKEL M, MÜLLER MM, KÜGLER JH, LOVAGLIO RB, CONTIERO J, SYLDATK C, HAUSMANN R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(8): 1207-1219.
- [4] 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.
- [5] CHONG HQ, LI QX. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 137.
- [6] SOLAIMAN DKY, ASHBY RD, GUNTHER NW, ZERKOWSKI JA. Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4333-4342.
- [7] ROBINEAU M, le GUENIC S, SANCHEZ L, CHAVERIAT L, LEQUART V, JOLY N, CALONNE M, JACQUARD C, DECLERCK S, MARTIN P, DOREY S, AIT BARKA E. Synthetic mono-rhamnolipids display direct antifungal effects and trigger an innate immune response in tomato against *Botrytis cinerea*[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): 3108.
- [8] ALVES LIMA ROCHA V, de CASTILHO LVA, de PAULA VIEIRA de CASTRO R, TEIXEIRA DB, MAGALHÃES AV, de AVILA ABREU F, CYPRIANO JBS, GOMEZ JGC, FREIRE DMG. Antibiofilm effect of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on carbon steel submitted to oil produced water[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, 37: e3131.
- [9] ZHAO F. Enhanced production of mono-rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124605.
- [10] 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): 1-11.
- [11] BAYNHAM PJ, RAMSEY DM, GVOZDYEV BV, CORDONNIER EM, WOZNIK DJ. The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(1): 132-140.
- [12] HOANG TT, KARKHOFF-SCHWEIZER RR, KUTCHMA AJ, SCHWEIZER HP. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants[J]. *Gene*, 1998, 212(1): 77-86.
- [13] KRISTENSEN CS, EBERL L, SANCHEZ-ROMERO JM, GIVSKOV M, MOLIN S, de LORENZO V. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(1): 52-58.
- [14] HOLLOWAY BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 1955, 13(3): 572-581.
- [15] 盖立学, 宋考平. 基于糖显色法测定鼠李糖脂的比例、含量[J]. *生物技术*, 2010, 20(2): 33-37.
GAI LX, SONG KP. Ratio and content of rhamnolipid determined using sugar development process[J]. *Biotechnology*, 2010, 20(2): 33-37 (in Chinese).
- [16] JIANG JJ, JIN MJ, LI XY, MENG Q, NIU J, LONG XW. Recent progress and trends in the analysis and identification of rhamnolipids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(19): 8171-8186.
- [17] ERAQI WA, YASSIN AS, ALI AE, AMIN MA. Utilization of crude glycerol as a substrate for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas*

- aeruginosa*[J]. Biotechnology Research International, 2016, 2016: 3464509.
- [18] KASPAR T, SCHWEIGER A, DROZ S, MARSCHALL J. Colonization with resistant microorganisms in patients transferred from abroad: who needs to be screened?[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2015, 4(1): 1-7.
- [19] ALMBLAD H, RANDALL TE, LIU F, LEBLANC K, GROVES RA, KITTICHOTIRAT W, WINSOR GL, FOURNIER N, AU E, GROIZELEAU J, RICH JD, LOU YF, GRANTON E, JENNINGS LK, SINGLETARY LA, WINSTONE TML, GOOD NM, BUMGARNER RE, HYNES MF, SINGH M, et al. Bacterial cyclic diguanylate signaling networks sense temperature[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1986.
- [20] CHRISTOVA N, TULEVA B, KRIL A, GEORGIEVA M, KONSTANTINOV S, TERZIYSKI I, NIKOLOVA B, STOINEVA I. Chemical structure and *in vitro* antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN₁₀[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 676-689.
- [21] RAHIMI K, LOTFABAD TB, JABEEN F, MOHAMMAD GANJI S. Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on MCF-7 human breast cancer cells[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 181: 943-952.
- [22] E SILVA SS, CARVALHO JWP, AIRES CP, NITSCHKE M. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7864-7873.
- [23] 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(23): 8309-8319.
- [24] 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): 1-15.
- [25] SAMADI N, ABADIAN N, AHMADKHANIHA R, AMINI F, DALILI D, RASTKARI N, SAFARIPOUR E, MOHSENI FA. Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN₁ and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Folia Microbiologica, 2012, 57 (6): 501-508.
- [26] 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.

(本文责编 陈宏宇)