



生物表面活性剂 Surfactin 生产菌株的定向改造策略

胡仿香, 李霜*

南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009

摘要: 表面活性素(Surfactin)是芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)代谢产生的脂肽类生物表面活性剂, 是由非核糖体肽合成酶(NRPS)催化而得的一种次级代谢产物。由于 surfactin 具有稳定性好、可被降解、表面活性好等理化性质以及抑菌、抗肿瘤等生物活性, 在医药、农业、食品、化妆品、石油开采等方面都具有很大的应用潜力。但是, 天然菌株产率低、生产成本高等特点限制了 surfactin 的规模化应用。本文对 surfactin 的合成机理进行了简要阐述, 并针对目前提升 surfactin 产量和改变结构组分的 4 种定向改造策略(启动子工程、强化外排分泌、改造 NRPS 结构域和脂肪酸链合成酶系)进行了综述, 最后对 surfactin 的研究方向进行了展望。

关键词: Surfactin, 脂肽, 非核糖体肽合成酶(NRPS), 启动子工程, 定向改造

脂肽(lipopeptides)是由微生物产生的一类生物表面活性剂(biosurfactant), 由亲水的肽链和亲油的脂肪烃链两部分组成, 按其结构特征大致可分为环状脂肽(cyclic lipopeptides, CLPs)与线性脂肽两类。表面活性素(surfactins)是芽胞杆菌合成的环脂肽类主要家族之一, 其余还包括伊枯草菌素(iturins)家族、丰原素(fengycins, 芬介素)家族等^[1]。

Surfactin 由日本学者 Arima 在枯草杆菌 *Bacillus subtilis* IFO3039 发酵液中首次发现, 是迄今已报道的表面活性最好的生物表面活性剂之一^[2]; 在

0.005%浓度下, 能将纯水的表面张力从 72 mN/m 降到 27.9 mN/m。相比于化学类表面活性剂, surfactin 具有低毒、易生物降解、较高的环境适应性和较高的表面活性等优点, 在农业、医药和日化等领域具有非常良好的应用前景^[3]。在微生物采油和污染物治理等环境领域, 生物表面活性剂 surfactin 有助于石油烃的乳化增溶, 可以作为微生物降解原油的增效剂^[4]。然而, surfactin 的发酵生产存在产量低和成本高等问题, 阻碍了其产业化及大规模应用。目前, 除了采用传统的诱变育种及发酵工艺优化等手段外, 一些利用基因工程定

基金项目: 国家自然科学基金(21576133), 江苏省“六大人才高峰”资助项目

*通信作者。E-mail: lishuang@njtech.edu.cn

收稿日期: 2017-12-13; 修回日期: 2018-01-23; 网络出版日期: 2018-03-21

向改造 surfactin 生产菌株的策略也应运而生。本文对 surfactin 的结构特点、合成机理及应用特性进行简述,并对目前面向 surfactin 的结构改造和产量提高的策略进行了总结,以期为推动 surfactin 的产业化提供参考。

1 Surfactin 的结构特点与合成机理

Surfactin 的亲水基团(极性基团)是由 7 个氨基酸组成的肽环,包含 2 个酸性氨基酸(Glu、Asp)和 5 个非极性氨基酸;疏水性基团(非极性基团)是由 13–15 个碳原子链长的 β -羟基脂肪酸构成;肽骨架 7 位氨基酸的羧基与脂肪酸的 β -羟基形成内酯键,构成环状脂肽(图 1)^[5]。由于脂肪酸链的长度以及氨基酸的种类和位置的改变,使得 surfactin 具有许多同系物(congeners)或异构体(isoforms)。

Surfactin 是少数具有较明确研究背景的脂肽化合物,由非核糖体肽合成酶系(nonribosomal peptide synthetases, NRPS)的多酶复合体系催化完

成。用于合成 surfactin 的 NRPS 是一个多酶复合物,包括 Srf-AA-AB-AC-AD 四个亚基,由 *srfA* 基因簇上的 4 个基因(*srfAA*、*srfAB*、*srfAC* 和 *srfAD*)编码^[6–7]。亚基 SrfAA 和 SrfAB 各包含 3 个模块, SrfAC 亚基包含 1 个模块;每一个模块负责 1 个氨基酸的整合,氨基酸的排列顺序就由模块的顺序决定。最后,由硫酯酶(thioesterase, TE;由 *srfAD* 编码)结构域负责催化环合聚肽链。整个合成过程可被分解为 4 个部分,即合成的启动、合成的起始、肽链的延伸以及环化。NRPS 催化的 surfactin 合成过程如图 2 所示。SrfAA 中的 3 个模块按顺序分别负责组装 L-Glu、L-Leu 和 D-Leu (第 3 个模块通过差向异构化酶作用将底物 L-Lue 转换成 D-Lue); SrfAB 的 3 个模块按顺序组装 L-Val、L-Asp 和 D-Leu(差向异构酶同 SrfAA 中的差向异构酶相同); SrfAC 负责组装剩下的 L-Leu 残基,由硫酯酶结构域 TE 催化第 7 位的 L-Lue 的羧基与长链脂肪酸的 β 羟基形成内酯环,并将其释放^[8]。

2 提升 Surfactin 产量的定向改造技术

从各种环境中分离的产 surfactin 野生菌株的产量通常在 100–600 mg/L^[9–11];部分高产突变菌株或培养基优化后的菌株发酵水平在 1000 mg/L 左右^[12–13];此后,仅通过诱变育种或发酵优化的传统策略已经难以获得产量的大幅突破。

在提升 surfactin 产量的菌株改造方面,针对 NRPS 功能基因 *srfA* 的启动子改造和强化 surfactin 外排分泌途径的改造策略,获得了较好的成果,对 surfactin 产量的提升效果达到了 3–10 倍(表 1)。

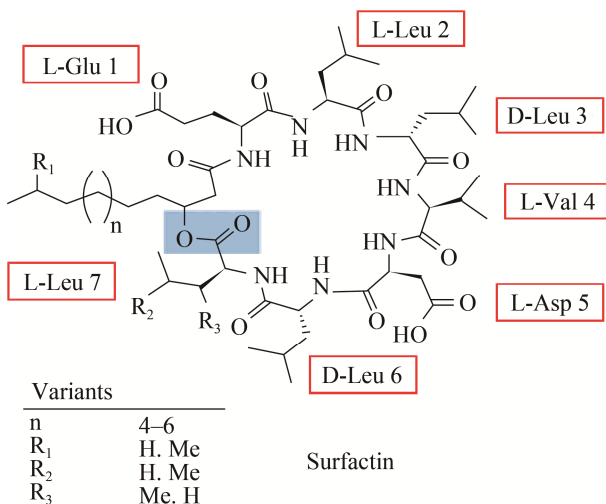


图 1. Surfactin 的结构^[40]

Figure 1. Structure of surfactin^[40].

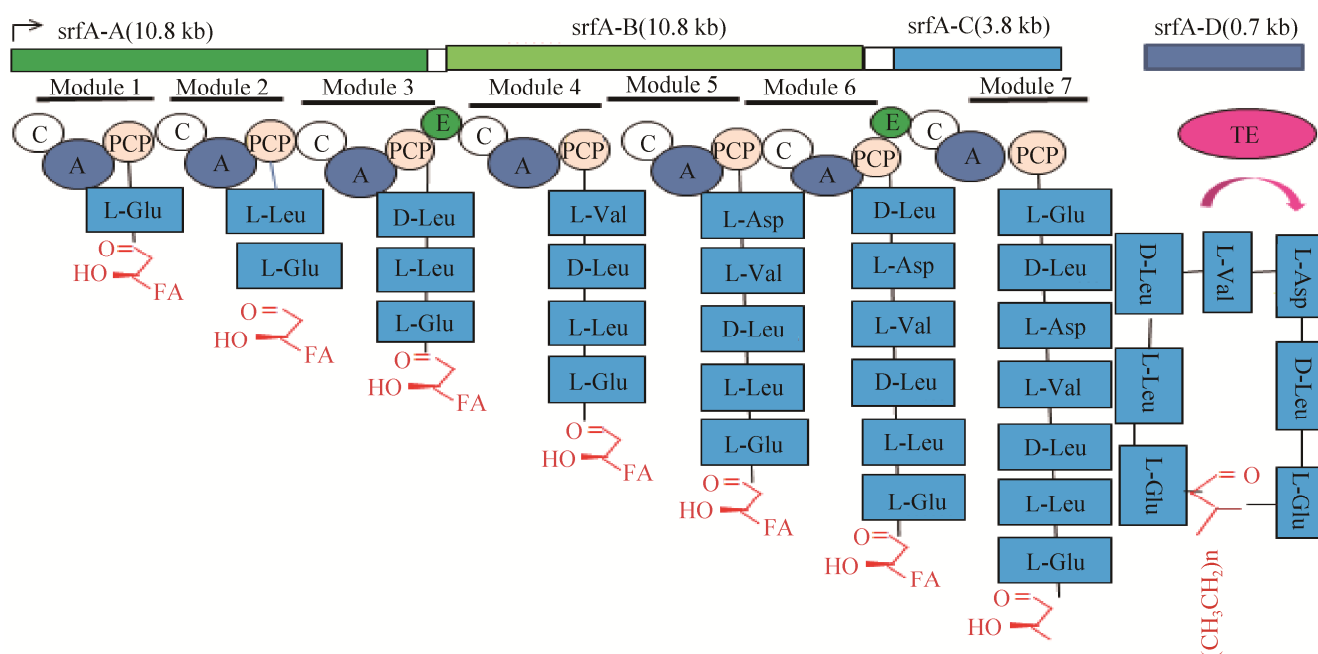


图 2. NRPS 催化的 surfactin 合成过程

Figure 2. Surfactin synthesis catalyzed by NRPS. A: anadenylation domain; PCP: peptidylcarrier protein domain; C: condensation domain; E: epimerization domain; TE: thioesterase domain.

表 1. 不同重组菌株的 surfactin 产量

Table 1. Surfactin yields of recombinant strains

Strains	Conditions	Production/(g/L)	Reference
<i>B. subtilis</i> fmbR	Native PsrfA	0.380	[14]
<i>B. subtilis</i> fmbR-1	Replacement of PsrfA with Pspac	3.860	
<i>B. subtilis</i> THY-7	Native PsrfA	0.550	[11]
THY-7/Pg3-srfA	Replacement of PsrfA with Pg3	9.740	
<i>B. subtilis</i> 168 BBG111	Native PsrfA	1.500	[15]
BBG113	Replacement of PsrfA with PrepU	1.200	
<i>B. subtilis</i> 3A3B	Native PsrfA	0.070	[16]
JWSurf2	Replacement of PsrfA with Pveg	0.260	
<i>B. subtilis</i> DSM 10T	Native PsrfA	0.620	[16]
JWSurf3	Replacement of PsrfA with Pveg	0.040	
<i>B. subtilis</i>		0.021	[19]
<i>B. subtilis</i> (pHT43-comXphrC)	Overexpression of ComX and PhrC	0.135	
<i>B. subtilis</i> THY-7		0.550	[13]
TS589	Overexpression of THY-7-Pgrac-ycxA	1.150	
TS593	Overexpression of THY-7-Pgrac-krxE	0.930	
TS662	Overexpression of THY-7-Pgrac-yerP	1.670	

2.1 NRPS 功能基因 *srfA* 的启动子改造

SrfA 是 surfactin 合成的功能基因, 是一个长达 26.2 kb 大小的基因簇, 因此, 通过过表达该基因来强化 surfactin 的合成途径在技术上存在较大难度。该功能基因受到启动子 *Psrfa* 的调控, 而启动子的强弱可以在一定程度上决定菌株的生产能力, 因此, 启动子替换被认为是提高原始菌株产脂肽的合理手段。

启动子改造促进产量提升的典型成功案例来自于对天然高产菌株的改造结果。Sun 等^[14]通过同源重组的方法将 *B. subtilis* *fmbR* 中的启动子 *Psrfa* 替换成一个来源于 *B. subtilis* 的强诱导型启动子 *Pspac*, 得到了重组菌株 *fmbR-1*; 在 IPTG (300 $\mu\text{mol/L}$) 诱导下重组菌株 *fmbR-1* 的产量是野生型出发菌株的 10 倍, 产量达到 3.86 g/L; 在无 IPTG 添加条件下, *fmbR-1* 的产量也可以高达 5 倍左右。除了替换一些天然强启动子外, 还可以替换一些人工合成的启动子。清华大学于慧敏课题组在 surfactin 的启动子改造方面也获得了显著成果。Song 等^[11]分析了 surfactin 高产野生菌株 *B. subtilis* THY-7 的转录组数据, 发现该菌株控制 surfactin 合成的原始启动子 *Psrfa* 是一个弱启动子, 同时也发现了菌株自身的一些强启动子 (*PgroE*、*PsaB*、*PsaP*); 令人惊讶的是用强启动子 *PgroE* 替换原始启动子 *Psrfa* 后, 重组菌株不能合成 surfactin; 随后人工构建了 3 个杂合型强启动子 *Pg1*、*Pg2* 和 *Pg3* 用于改造 *B. subtilis* THY-7 菌株。杂合型启动子 *Pg1* 融合了启动子 *PgroE* 的 -35 到 -10 序列和 *PsaB* 的 RAT 诱导元件序列, 重组菌株 THY-7/*Pg1* 的产量达到了 1.44 g/L。杂合型启动子 *Pg2* 是在 *Pg1* 的基础上, 在 *PgroE* 的 -35 到 -10 序列中间融合了一段 *lacO* 操纵子序列, 重

组菌株 THY-7/*Pg2* 的产量为 5.98 g/L。杂合型启动子 *Pg3* 是根据枯草芽胞杆菌的 σ^A 因子 70(σ^A) 的 -35 到 -10 的保守序列以及点突变 *Pg2* 的 2 个碱基的基础上设计而来的, 最终重组菌株 THY-7/*Pg3* 在 5 L 发酵罐上(具有泡沫回收装置)发酵 32 h 的产量达到了 9.74 g/L, 表明改造后的菌株具有高产、高生产速率等优良性状。该重组菌株的 surfactin 产量也是目前报道的最高产量。

但是, 在模式菌株或其他菌株中也存在启动子改造的失败案例。Coutte 等^[15]用组成型启动子 *PrepU* 替换了 *B. subtilis* 168 衍生菌株 BBG111 的 *Psrfa* 后, 得到突变菌株 BBG113 的 surfactin 产量却有所下降。随后 Wilenbacher 等^[16]的研究发现, 用一个强的组成型启动子 *Pveg* 分别替换产 surfactin 能力弱的菌株 3A3B 和产 surfactin 能力强的 DSM 10T 的原始启动子 *Psrfa*, 产生重组菌 JWSurf2 和 JWSurf3; 结果发现重组菌 JWSurf2 的 surfactin 产量高于原始菌 3A3B, 而 JWSurf3 的产量却远低于原始菌 DSM 10T。

由此我们可知, 通过定向改造产 surfactin 菌株的启动子 *Psrfa* 并不都会导致 surfactin 产量的提高, 这可能与菌株自身产 surfactin 能力的强弱以及菌株特性有关。对野生型 surfactin 生产菌株进行启动子改造前, 有必要对菌株的转录组进行分析, 有针对性地改造或构建适合该菌株的强启动子或杂合启动子, 有助于提高成功率。同时, 也要考虑到野生芽胞杆菌的遗传操作系统存在很多不确定性, 大大增加了分子改造的难度; 选择和构建合适的遗传操作方法是成功的基础。

2.2 Surfactin 外排分泌途径的改造

目前, surfactin 是如何通过细胞膜排出体外的并不是十分清楚。脂肽特别是 surfactin 可以增加

生物膜的透性和解离程度,使生物膜结构失去稳定性。据文献报道 surfactin 的浓度对细胞膜的影响十分关键, surfactin 的外排可能就是跨膜运输的结果;跨膜运输按所用能量不同,可以分为两类:一类是依赖于 ATP,另一类是依靠质子动力 (proton motive force, PMF)^[21]。

Surfactin 的分泌受到一些外排蛋白的影响。Tsuge 等^[22]报道了枯草芽胞杆菌中的跨膜蛋白编码基因 *yerP* 可以编码与 RND/RND(抗性,结瘤和细胞分裂)家族外排泵同源的依赖于 PMF 的跨膜蛋白;该基因有助于枯草芽胞杆菌抵御 surfactin 对自身细胞的伤害,与野生型相比, *yerP* 缺失型菌株的 surfactin 产量大大减少。Xu 等^[13]报道 *B. subtilis* THY-7 野生菌中 surfactin 的外排模式主要依赖于质子动力(PMF),而 THY-7 菌株中的跨膜蛋白基因 *ycxA* 由于移码突变造成功能丧失,不能转运 surfactin。因此,他们在 THY-7 菌株中分别表达了 3 个 PMF 驱动的跨膜蛋白编码基因 *ycxA*、*krsE* 和 *yerP*,结果发现与 THY-7 菌株相比,强化 surfactin 外排途径的重组菌株产量分别提高了 89%、52%和 145%。对于菌株的外排系统的改造,首先要知道该菌株外排的方式以及外排性能的优劣,通过强化表达的方式来增加细胞中参与 surfactin 外排的跨膜蛋白,对于这些外排蛋白是如何促进 surfactin 流通的机理仍需进一步的研究。

2.3 改造 *urfA* 的转录调控基因

Surfactin 的合成需要功能基因簇 *urfA* 的转录表达;但是特别之处在于,基因簇 *urfA* 中(*urfAB*)还包含了感受态调控基因 *comS*,使得功能基因 *urfA* 的转录水平受到信息素 ComX 和感受态刺激因子 Phr 的调控。人们推测 surfactin 与细胞感受态之间的关联性,可能在于 surfactin 改变膜结构

有助于吸收外源 DNA 片段^[17]。

B. subtilis 编码了 8 个 Phr 感受态刺激因子 (PhrA、PhrC、PhrE、PhrF、PhrG、PhrH、PhrI 和 PhrK)和 11 个天冬氨酸磷酸酯磷酸酶蛋白 (RapA 到 RapK)。Phr 刺激因子可以抑制对 *urfA* 负调控的 Rap 蛋白(RapC, RapF 和 RapK)的活性。ComX 与膜结合的组氨酸激酶 ComP 相互作用,其在受到刺激后自磷酸化,然后将其磷酸基团转移到调控蛋白 ComA 中的丝氨酸残基,磷酸化的 ComA 与 *urfA* 的启动子区域结合,激活 RNA 聚合酶的活力,使 *urfA* 开始转录。因此, *B. subtilis* 通过信息素和刺激因子 ComX 和 PhrC 基于细胞群体感应机制(quorum sensing, QS)调控 surfactin 合成^[18]。Jung 等^[19]在 *B. subtilis* 中过表达 *comX* 和 *phrC* 基因,得到重组菌 *B. subtilis*(pHT43-*comXphrC*)的 surfactin 产量大幅提高,是对照菌株的 6.7 倍。Wang 等^[20]突变了 *B. subtilis* 的 ComX 反应调节受体基序中的 3 个非天冬氨酸残基,结果使 surfactin 的合成能力大大下降。

细胞群体感应贯穿了 surfactin 合成的整个过程, ComX 似乎是提高 surfactin 生产能力的一个关键因素,然而,对于该基因调控网络的研究并不多。目前,有关 QS 调控基因与 surfactin 合成能力的研究中所使用菌株的生产能力普遍较低,我们还无法了解在高产菌株中这些 QS 调控基因及其调控方式是否有改变。

3 改造 Surfactin 分子结构的组合生物合成技术

组合生物合成技术(combinatorial biosynthesis),即通过基因工程技术,有目的地改变天然产物的

生物合成途径,形成可预测的新结构产物^[23]。组合生物合成技术在环脂肽类抗生素结构改造中发挥了重要作用,这些人为产生的新结构化合物按照研究者的预期表现出新的功能或活性。

3.1 合成具有不同肽环模块的 surfactin 新结构分子

非核糖体肽合酶的组合生物合成研究策略包括模块定点突变、替换、插入、删除、模块“洗牌”等。Koglin 等^[24]通过对 surfactin 合成酶系 NRPS 蛋白晶体结构的解析及分子模拟的研究,逐渐阐明了各个功能模块存在选择特异性的原因。经过大量的序列比对和同源建模分析,研究者总结出决定腺苷结构域(A domain)底物选择性的“密码子”——10个氨基酸残基,为定点突变提供了经验指导,这样就可以将 NRPS 特定位置的氨基酸突变为其他氨基酸。例如:通过定点突变技术,将模块 C-A_{Glu}-PCP 中的 Lys239 突变为 Gln239;生化分析和发酵产物显示,该模块腺苷结构域的识别氨基酸由 Glu 变为 Gln;此外,识别 Asp 的腺苷结构域也可以突变成识别 Asn,由此策略,研究者获得了数个 surfactin 的结构类似物^[25]。还有研究学者通过对 NRPS 的改造,使得模块能对带有特别功能团的非天然氨基酸进行识别和活化。如针对识别苯丙氨酸的腺苷化结构域的突变和改造,使得识别底物拓展为带有叠氮或炔基官能团的非天然芳香族氨基酸,从而使得以叠氮-炔基 Husigen 环加成反应为代表的“点击化学”(click chemistry)极大地丰富了肽模块的多样性^[26]。

通过基因工程的手段将目标腺苷结构域进行无义突变,这样合成的肽链上就缺失了特定氨基酸。比如,在保证读码框不变的情况下,研究者将 surfactin 基因簇模块 2 缺失,获得一个相应位

置 Leu 缺失的缩环产物,即六肽 surfactin 新分子。六肽 surfactin 对红细胞的毒性降低,抑菌能力增强;但由于自身结构的不稳定等原因导致了六肽 surfactin 产量只有野生菌株的 5%–10%,发酵浓度仅 25–50 mg/L^[27]。NRPS 的模块删除还可以做到极致,即仅保留谷氨酸作为亲水基团,形成产物为 β -羟基脂酰谷氨酸(FA-Glu),已有的研究表明,新化合物 FA-Glu 较商业化表面活性剂肉豆蔻酰谷氨酸具有更低的临界胶束浓度(CMC)和更高的水溶性^[28]。但是 FA-Glu 的产量仍较低,是野生型菌株 surfactin 产量的 15%左右,发酵浓度仅 200–250 mg/L^[29]。Jiang 等^[30]用温敏型质粒分别敲除了 *B. subtilis* PB2-L1 中的产 surfactin 的 NRPS 模块 SrfAA-Leu、SrfAB-Asp 和 SrfAB-Leu,结果产生了 3 种六肽结构的 surfactin 新化合物,分别缺少 Leu-3、Asp-5 和 Leu-6;与原来的 surfactin 相比,前两者可以减少毒性,后者具有更强的抗真菌活性,但新结构 surfactin 产物的积累浓度极低,只有 0.82–1.35 mg/L。

组合生物合成技术在开发 surfactin 新结构及拓展其应用方面,既存在机遇也存在挑战。改造 NRPS 区域可以产生具有新活性的新型结构分子,但是 NRPS 结构复杂性远远超出人们的想象,模块的完整性、链接区多样化导致了人们的实际操作过程并不理想。通过基因改造策略实现生物合成基因簇突变后,经常不生产结构类似物,或者改造过的 NRPS 催化效率大大降低、产量大大减少。

3.2 Surfactin 中脂酰基结构的改造

相比于已经深入研究的 NRPS 催化 surfactin 肽环结构的合成,surfactin 分子中脂酰基结构的合成途径研究则显得很单薄。Surfactin 中脂肪链的

长度一般为 C₁₃–C₁₅, 通常以 C₁₄ 和 C₁₅ 组分为主 (60%–80%), 脂肪酸组分的结构差异也会对物理化学性质和生物活性产生显著的影响。在抗真菌活性和表面活性方面, 构型性能为 *straight(n)* 强于 *iso* 强于 *anteiso*; 在发泡能力方面 C₁₄-surfactin 强于 C₁₃ 和 C₁₅^[31]。随着 surfactin 脂肪链长度的增加, 其表面活性显著增强^[32]。甚至, surfactin 脂肪酸组分比 surfactin 总产量对表面活性的影响作用更大, *iso*-奇数脂肪酸异构体比 *n*-偶数脂肪酸异构体具有更高的排油圈活力^[33]。本课题组的研究表明 surfactin 在同等工作浓度下, C₁₅-surfactin 组分含量越高, 其油砂清洗效率和原油驱替效率越高^[34]。因此, 在对 surfactin 的结构多样性研究中, 定向改造或强化特定碳链组分的 surfactin 产物对于促进 surfactin 的应用同样具有重要意义。

糖脂类生物表面活性剂如鼠李糖脂或槐糖脂, 其疏水结构也都是中长链的脂肪酸; 糖脂的疏水结构脂酰基链长及不饱和度与菌株特性有关, 也与发酵原料有关, 糖脂的优势发酵底物通常是油脂或脂肪酸^[35–36]。但是, 向培养基中添加油脂或游离脂肪酸并不能促进 surfactin 合成, 反而起抑制作用^[37], 这也使得我们推测 surfactin 中的脂肪酸结构可能来源于从头合成途径。

有关 surfactin 脂肪酸结构的早期研究是通过改变培养基中氨基酸组分来实现, 如在 *B. subtilis* T89-42 菌株的培养基中添加 Arg、Gln 或 Val 可以增加偶数 β-羟基脂肪酸组分(C₁₄, C₁₆), 而添加 Cys、His、Ile、Leu、Met、Ser 或 Thr 可以增加奇数 β-羟基脂肪酸组分(C₁₃, C₁₅)^[38]。此后, 人们通过改造或强化某些氨基酸合成途径, 也引起了 surfactin 产物的脂肪酸组分变化。Coutte 等^[39]通过强化 L-Leu 的代谢途径, 使得 *B. subtilis* 168 衍生

菌株中 surfactin 产量提高了 1.6–20.9 倍; 其中, 敲除 *codY* 基因以后, 不仅让 surfactin 的产量达到最高, 还使得 surfactin 的结构组分发生了变化: 对照菌株中 C₁₃ 和 C₁₄ 的组分分别是 39.7% 和 21.2%, 而敲除了 *codY* 以后的比例分别为 26.5% 和 40.6%。后来, Coutte 等^[31]在研究支链氨基酸代谢途径时发现, 在敲除了负责支链氨基酸最后一步降解的基因 *lpdV* 后, 带有直链 C₁₄ 的 surfactin 比例提高了 2.5 倍。

显然, 利用外源添加氨基酸组分或内部改造氨基酸合成途径还难以实现对 surfactin 脂肪酸结构的定向控制; 针对脂肪酸结构的改造, 还需要深入理解 surfactin 的底物 3-羟基脂肪酸如何参与 NRPS 的合成启动。Steller 等^[40]的研究表明, 在 surfactin 的合成起始步骤中, 底物 3-羟基脂肪酸在脂酰 CoA 连接酶(fatty acyl CoA ligases, FACLs)作用下与辅酶 A (CoA) 结合后, 以 3-羟基脂酰 CoA 的激活形式参与第一个氨基酸 Glu 的酰化作用。他们对枯草芽胞杆菌中 4 个 FACLs (LcfA、YhfL、YhfT 和 Yngl) 进行敲除实验发现, 单一敲除只能导致 surfactin 的产量降低 38%–55%, 同时敲除 2–3 个基因时 surfactin 产量约为 20%–65%, 同时敲除 4 个基因时产量下降了 84%。这一结果表明 surfactin 合成途径中, 催化脂肪酸形成脂酰 CoA 激活形式的 FACLs 可能存在多个基因或多个同工酶。

NRPS 的合成起始模块 *srfA*-A1 的 C domain 对底物脂酰 CoA 的选择性对于 surfactin 合成的起始更为重要。Kraas 等^[40]采用 3-羟基肉豆蔻脂酰 CoA、棕榈脂酰 CoA、癸脂酰 CoA、3-羟基丁脂酰 CoA 为 surfactin 合成起始模块的供体, 结果表明 C domain 选择 3-羟基肉豆蔻酰 CoA 为底物进

行酰化反应,不催化没有羟基化的脂肪酰 CoA 进行酰化反应。这一结果表明 NRPS 合成起始模块 srfA-A1 的 C domain 有可能成为脂肪酰结构改造的重要靶标,通过解析合成起始模块 srfA-A1 中 C domain 的底物选择性机制,就有可能进一步通过突变来获得能催化特殊结构脂酰基底物的起始模块。

总之,相比已经深入研究的 NRPS 催化的 surfactin 肽环结构,其脂肪酸结构组分的合成及调控机制还存在很多未知区域;获得特定脂酰基结构的 surfactin 新化合物仍然没有很好的解决方案。我们推测通过强化脂肪酸的从头合成途径,改造脂酰 CoA 连接酶 FACLs 和合成起始模块 C domain 的底物选择性,有望创造或强化特定脂酰结构的 surfactin 组分。

4 前景展望

Surfactin 由于具有多种生物活性,使其在基础研究和工业应用领域受到广泛重视,但是当前的 surfactin 发酵工艺及成本控制方面仍不能满足工业应用的需求。在发酵工艺方面,控制发酵过程中产生的泡沫仍然是未来研究中的挑战,亟需从工艺及装备等多个方面来解决 surfactin 由于表面活性带来的发酵液泡沫溢出及营养液流失等问题^[41]。此外,寻找廉价的生物质原料也是降低发酵成本、促进 surfactin 工业化应用的有效手段。如本课题组利用富含木糖的玉米芯酸解液和富含氨基酸的羽毛酸解废液、味精废液等廉价有机氮源发酵制备 surfactin,不仅降低了原料成本,还促进了农业废弃物的资源化利用^[42]。

在生产菌株方面,获得高产、高转化率和高生产速率的优良菌株是促进 surfactin 产业化的关

键因素。其中,通过定向改造技术获得优良菌株或新结构化合物是推动 surfactin 产业化和拓展 surfactin 应用领域的关键技术。随着 NRPS 的结构解析以及组合生物合成技术在 NRPS 结构改造中的应用,定向改造脂肽 surfactin 的短肽部分获得了技术支撑;与之相比,surfactin 的脂肪酰结构依然缺乏可定向调控的技术手段,分析 surfactin 结构中脂肪酸前体的从头合成途径及参与 surfactin 合成的方式,不但可以促进 surfactin 前体的合成并提升产量,也将有助于开发定向调控酯酰结构的 surfactin 新化合物。

参考文献

- [1] Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 473050.
- [2] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31(3): 488–494.
- [3] Chen WC, Juang RS, Wei YH. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 103: 158–169.
- [4] Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167(1/3): 609–614.
- [5] Henkel M, Geissler M, Weggenmann F, Hausmann R. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(7): 1600561.
- [6] Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical Reviews*, 2005, 36(24): 715–738.
- [7] Yeh, E, Kohli RM, Bruner SD, Walsh CT. Type II thioesterase restores activity of a nrps module stalled with an

- aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *ChemBioChem*, 2004, 5(9): 1290–1293.
- [8] Shen QT, Chen XL, Sun CY, Zhang YZ, Jiang WH. Dissecting and exploiting nonribosomal peptide synthetases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(4): 243–249.
- [9] Liu XY, Ren B, Gao H, Liu M, Dai HQ, Song FL, Yu ZY, Wang SJ, Hu JC, Kokare CR, Zhang LX. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS One*, 2012, 7(5): e34430.
- [10] Zhu LY, Xu Q, Jiang L, Huang H, Li S. Polydiacetylene-based high-throughput screen for surfactin producing strains of *Bacillus subtilis*. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88207.
- [11] Jiao S, Li X, Yu HM, Yang H, Li X, Shen ZY. *In situ* enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 832–842.
- [12] Yi GB, Liu Q, Lin JZ, Wang WD, Huang H, Li S. Repeated batch fermentation for surfactin production with immobilized *Bacillus subtilis* BS-37: two-stage pH control and foam fractionation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2017, 92(3): 530–535.
- [13] Li X, Yang H, Zhang DL, Li X, Yu HM, Shen ZY. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(1): 93–103.
- [14] Sun HG, Bie XM, Lu FX, Lu YP, Wu Y, Lu ZX. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(8): 1003–1006.
- [15] Coutte F, Leclère V, Béchet M, Guez JS, Lecouturier D, Chollet-Imbert M, Dhulster P, Jacques P. Effect of pps disruption and constitutive expression of srfA on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 480–491.
- [16] Willenbacher J, Mohr T, Henkel M, Gebhard S, Mascher T, Syldatk C, Hausmann R. Substitution of the native srfA promoter by constitutive P_{veg} in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 14–17.
- [17] Deleu M, Lorent J, Lins L, Basseur R, Braun N, Kirat KE, Nylander T, Dufrêne YF, Mingeot-Leclercq MP. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(2): 801–815.
- [18] Tsuge K, Ohata Y, Shoda M. Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(12): 3566–3573.
- [19] Cosby WM, Vollenbroich D, Lee OH, Zuber P. Altered srf expression in *Bacillus subtilis* Resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(6): 1438–1445.
- [20] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 12(1): 141–172.
- [21] Jung J, Yu KO, Ramzi AB, Choe SH, Kim SW, Han SO. Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(9): 2349–2356.
- [22] Wang X, Luo C, Chen Z. Three non-aspartate amino acid mutations in the ComA response regulator receiver motif severely decrease surfactin production, competence development and spore formation in *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*, 2009, 25(S1): S365–S366.
- [23] Baltz RH. Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 3(10): 748–758.
- [24] Koglin A, Löhr F, Bernhard F, Rogov VV, Frueh DP, Strieter ER, Mofid MR, Güntert P, Wagner G, Walsh CT, Marahiel MA, Dötsch V. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature*, 2008, 454(7206): 907–911.
- [25] Eppelmann K, Stachelhaus T, Marahiel MA. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotic. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9718–9726.
- [26] Kries H, Wachtel R, Pabst A, Wanner B, Niquille D, Hilvert

- D. Reprogramming nonribosomal peptide synthetases for “clickable” amino acids. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(38): 10105–10108.
- [27] Mootz HD, Kessler N, Linne U, Eppelmann K, Schwarzer D, Marahiel MA. Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(37): 10980–10981.
- [28] Reznik GO, Vishwanath P, Pynn MA, Sitnik JM, Todd JJ, Wu J, Jiang Y, Keenan BJ, Castle AB, Haskel RF, Smith TF, Somasundaran P, Jarrell KA. Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1387–1397.
- [29] Marti ME, Colonna WJ, Reznik G, Pynn M, Jarrell K, Lamsal B, Glatz CE. Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactant by *Bacillus subtilis* on soybean co-products. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 95: 48–55.
- [30] Jiang J, Gao L, Bie XM, Lu ZX, Liu HX, Zhang C, Liu FX, Zhao HZ. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 31.
- [31] Dhali D, Coutte F, Arias AA, Auger S, Bidnenko V, Chataigné G, Lalk M, Niehren J, Sousa JD, Versari C, Jacques P. Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C₁₄ isoform. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(7). DOI: 10.1002/biot.201600574.
- [32] Li Y, Zou AH, Ye RQ, Mu BZ. Effects of molecular structure on surfactin micellization activity. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2011, 27(5): 1128–1134. (in Chinese)
李翌, 邹爱华, 叶汝强, 牟伯中. 表面活性素分子结构对其胶束化行为的影响. *物理化学学报*, 2011, 27(5): 1128–1134.
- [33] Youssef NH, Duncan KE, McInerney MJ. Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7690–7695.
- [34] Liu Q, Lin JZ, Wang WD, Huan H, Li S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 93: 31–37.
- [35] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1323–1336.
- [36] van Bogaert INA, Saerens K, de Muynck C, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ. Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(1): 23–34.
- [37] Yao SL, Lu ZX, Hao TY, Lv FX, Bie XM. Effect of amino acids and carbon backbone precursors on surfactin biosynthesis. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(2): 139–145. (in Chinese)
姚树林, 陆兆新, 郝天怡, 吕凤霞, 别小妹. 氨基酸和碳架物质前体对 surfactin 生物合成的影响. *南京农业大学学报*, 2014, 37(2): 139–145.
- [38] Liu JF, Yang J, Yang SZ, Ye RQ, Mu BZ. Effects of different amino acids in culture media on surfactin variants produced by *Bacillus subtilis* TD7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(8): 2091–2100.
- [39] Coutte F, Niehren J, Dhali D, John M, Versari C, Jacques P. Modeling leucine’s metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(8): 1216–1234.
- [40] Kraas FI, Helmetag V, Wittmann M, Strieker M, Marahiel MA. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(8): 872–880.
- [41] Inès M, Dhouha G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 2015, 71: 100–112.
- [42] Chen C, Lin JZ, Wang WD, Huang H, Li S. Cost-effective production of surfactin from xylose-rich corncob hydrolysate using *Bacillus subtilis* BS-37. *Waste and Biomass Valorization*, 2017: 1–7. DOI: 10.1007/s12649-017-0052-5.

Directed modification of strains for surfactin production

Fangxiang Hu, Shuang Li*

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Technology University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Abstract: Surfactin, a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus* strains, is one of the most surface-active biosurfactant. It is assembled by nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) as secondary metabolites in microorganism. Due to its good stability, biodegradability and excellent surface activity in extreme environments, surfactin is gaining increasing attention as a valuable chemical with great potential in medicine, agriculture, food, cosmetics and microbial enhanced oil recovery. However, the low yields and high production costs of natural strain largely limit the large-scale industrial applications of surfactin. This article briefly summarizes the mechanism for surfactin biosynthesis, and reviews the main strategy for improving the yield and changing structure of surfactin including promoter engineering, enhancing efflux system, modifying NRPS domain and engineering fatty acid synthetases. At last, we discussed the prospect of the research on surfactin in the future.

Keywords: surfactin, lipopeptides, NRPS, promoter engineering, directed modification

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21576133) and by the Jiangsu Province Projects

*Corresponding author. E-mail: lishuang@njtech.edu.cn

Received: 13 December 2017; Revised: 23 January 2018; Published online: 21 March 2018