

代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶

孙鹏¹, 薛正莲¹, 高聪², 刘佳², 吴静², 李晓敏^{2*}, 刘立明^{2*}

1 安徽工程大学 生物与食品工程学院, 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖

2 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡

孙鹏, 薛正莲, 高聪, 刘佳, 吴静, 李晓敏, 刘立明. 代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3056-3074.

SUN Peng, XUE Zhenglian, GAO Cong, LIU Jia, WU Jing, LI Xiaomin, LIU Liming. Metabolic engineering of *Sphingomonas paucimobilis* for the production of gellan gum[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 3056-3074.

摘要:【目的】以少动鞘氨醇单胞菌为出发菌株, 通过代谢工程改造构建高产结冷胶工程菌株, 并优化发酵工艺, 为利用该菌高效合成结冷胶提供理论支撑与工艺基础。【方法】基于CRISPR-Cas9系统开发适用于少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑工具, 并利用该工具在基因组中整合组成型启动子驱动的结冷胶合成基因簇调控蛋白基因(*gelA*)和 β -1,4-葡萄糖醛酸转移酶基因(*gelK*)。在此基础上, 通过单因素试验优化了碳源、氮源、pH及溶氧等发酵工艺参数。【结果】工程菌株FMME-GG08在摇瓶培养中结冷胶产量达到10.8 g/L, 较出发菌株提升130.2%。发酵工艺优化后, 在15 L规模发酵罐中结冷胶产量达到20.1 g/L, 蔗糖转化效率为0.50 g/g。【结论】本研究不仅成功构建了结冷胶高产菌株并建立了高效发酵工艺, 为工业化生产提供了可靠技术方案, 同时所开发的基因编辑策略也为代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌等非模式微生物生产其他高价值胞外多糖提供了重要参考。

关键词: 结冷胶; 少动鞘氨醇单胞菌; 代谢工程; CRISPR-Cas9

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFA0914300)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFA0914300).

*Corresponding authors. E-mail: LI Xiaomin, xiaomin@jiangnan.edu.cn; LIU Liming, mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-12-27; Accepted: 2025-01-27; Published online: 2025-04-16

Metabolic engineering of *Sphingomonas paucimobilis* for the production of gellan gum

SUN Peng¹, XUE Zhenglian¹, GAO Cong², LIU Jia², WU Jing², LI Xiaomin^{2*}, LIU Liming^{2*}

¹ Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding, School of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Using *Sphingomonas paucimobilis* as the starting strain, a high-yield gellan gum-producing engineered strain was constructed through metabolic engineering, and fermentation process optimization was performed, providing both theoretical support and technical foundations for the efficient biosynthesis of gellan gum with this bacterium. [Methods] A CRISPR-Cas9-based gene editing system was developed for *S. paucimobilis*, and subsequently employed to genomically integrate two key gellan gum biosynthesis genes: the regulatory protein gene (*gelA*) and the β -1,4-glucuronosyltransferase gene (*gelK*), both under the control of constitutive promoters. Building upon this foundation, fermentation parameters including carbon source, nitrogen source, pH, and dissolved oxygen were systematically optimized through single-factor experiments. [Results] The engineered strain FMME-GG08 achieved a gellan gum yield of 10.8 g/L in shake-flask cultivation, representing a 130.2% enhancement over the parental strain. Following fermentation process optimization, the production level reached 20.1 g/L in 15 L scale bioreactors, with a sucrose conversion efficiency of 0.50 g/g. [Conclusion] This study not only successfully constructed a high-yield gellan gum-producing strain and established an efficient fermentation process, providing a reliable technical solution for industrial production, but also developed a genetic editing strategy that serves as an important reference for metabolic engineering of non-model microorganisms to produce other high-value exopolysaccharides.

Keywords: gellan gum; *Sphingomonas paucimobilis*; metabolic engineering; CRISPR-Cas9

结冷胶(gellan gum)是一种由 D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸和 L-鼠李糖按 2:1:1 连接构成的线性四糖重复单元聚合物。结冷胶的葡萄糖残基通常由乙酰基和甘油酰基修饰(图 1), 平均相对分子质量约为 500 kDa^[1]。结冷胶具有良好的流变性和凝胶特性^[2], 且易于降解、安全无毒^[3], 可作为增稠剂、凝结剂、悬浮剂和成膜剂等广泛应用于食品、医药和化妆品等领域^[4-6]。

目前, 结冷胶主要通过少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)发酵生产, 少动鞘氨醇单胞菌生产菌株中的结冷胶合成途径主要包括 3 个模块: 糖核苷酸前体的合成、四糖单元的组装、四糖单元的聚合与输出(图 1), 其途径酶的编码基因成簇排列在基因组上^[7]。然而, 目前通过少动鞘氨醇单胞菌发酵法合成结冷胶的生产效率较低, 限制了其进一步规模化应

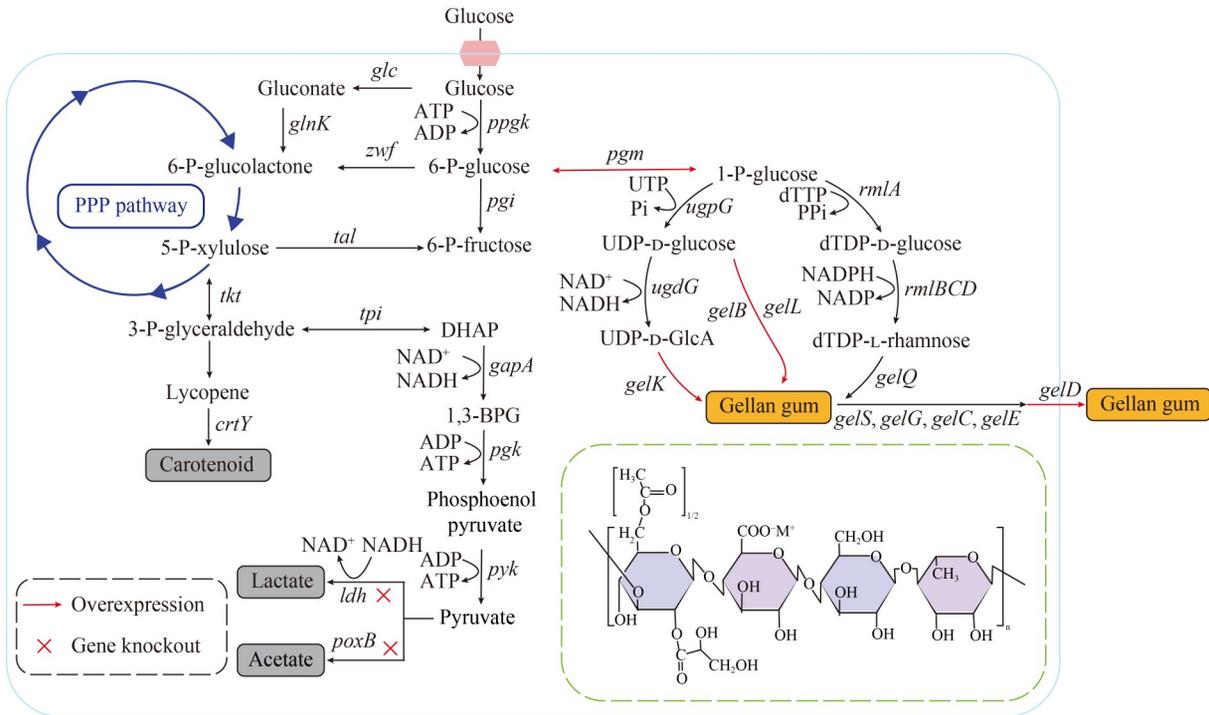


图1 结冷胶合成路径和结冷胶结构式

Figure 1 Metabolic pathway and structural formula of gellan gum.

用^[8]。为提高生产效率以满足市场对结冷胶的需求，研究人员已通过代谢工程改造结冷胶高产菌株或优化发酵条件等方式提高结冷胶产量。构建高产菌株的代谢工程方法主要有：强化结冷胶合成路径相关基因^[9]，敲除旁支途径相关基因^[10]，强化结冷胶转运系统^[11]，异源表达透明颤菌血红蛋白^[12]等。此外，还可结合物理、化学诱变和细胞融合等传统方法^[13]进一步提升结冷胶产量。

少动鞘氨醇单胞菌作为非模式菌株，相较于大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌、枯草芽孢杆菌等工业菌株缺乏成熟的基因编辑工具，目前仅有少数研究能通过三亲本接合对少动鞘氨醇单胞菌进行基因编辑^[14-15]。然而，该方法基因编辑效率低，筛选验证过程复杂，且须多次传代才能实现基因的稳定表达^[16-18]，仍存在很大的局限性，阻碍了结冷胶生产菌种的快速更新迭代。

随着基因编辑技术的发展，微生物遗传改造的效率和精度大大超越了传统方法，每种基因编辑技术具有不同的特点。RecET-Cre/loxP 系统在多基因编辑和复杂基因组改造中表现优越，适用于更复杂的遗传工程，但其操作步骤相对繁琐且需要精细地设计^[19]；以 CRISPR-Cas9 和 CRISPR-Cpf1 为代表的 CRISPR-Cas 编辑工具同时兼具高效性与特异性，能够在短时间内实现长链 DNA 的敲除与插入，且操作相对简便，但存在潜在脱靶效应^[20-22]。引导 RNA 辅助靶向的转座元件插入 (Insert transposable elements by guide RNA-assisted TargeTing, INTEGRATE) 技术在特定插入和稳定表达方面表现出色，但其应用范围受限于特定宿主和转座子的选择^[23]。然而，上述基因编辑方法仍未应用于少动鞘氨醇单胞菌，这对代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌高效合成结冷胶产生了不利影响，因此针对

少动鞘氨醇单胞菌开发高效的基因工程操作工具变得尤为重要。

本研究首先在少动鞘氨醇单胞菌中筛选了以 CRISPR-Cas 为代表的新一代基因编辑系统, 并基于宿主特点对基因编辑系统进行特异性改造, 最终建立了适用于少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑方法。利用该方法对本实验室保藏的一株产结冷胶的少动鞘氨醇单胞菌 FMME-GG01 进行了代谢工程改造, 即对结冷胶合成路径的限速酶编码基因——结冷胶合成基因簇调控蛋白基因(*gelA*)、 β -1,4-葡萄糖醛酸转移酶基因(*gelK*)进行过表达。经过工艺优化后, 在 15 L 发酵罐中进行分批补料发酵, 以期为结冷胶的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究中使用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0。固体培养基中添加琼脂粉 20.0 g/L。

YPG 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母膏 3.0, 蛋白胨 5.0, 琼脂粉 20.0。

YM 固体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 麦芽抽提物 3.0, 酵母粉 3.0, 琼脂粉 20.0。

种子斜面培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母膏 3.0, 牛肉膏 2.0, 氯化钠 5.0, 琼脂粉 20.0。

种子培养基(g/L): 蔗糖 20.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 3.0, 氯化钠 5.0。

发酵培养基(g/L): 蔗糖 40.0, 豆粕粉 3.0, 氯化铵 1.0, 磷酸氢二钾 2.0, 七水硫酸镁 1.2, 轻质碳酸钙 1.0。

以上培养基均使用氢氧化钠调 pH 至 7.0–7.2, 蔗糖与葡萄糖的灭菌条件为 115 °C、15 min, 其余

组分均在 121 °C 条件下灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、蔗糖、氯化钠、琼脂粉、磷酸氢二钾、七水硫酸镁等试剂均购自国药集团化学试剂上海有限公司; 蛋白胨、酵母粉等试剂均购自 Oxoid 公司; 豆粕粉购自山东万得福生物科技有限公司。

Gene Pulser Xcell 电穿孔仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 往复振荡培养箱, 太仓市强文实验设备有限公司; NanoDrop 分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 紫外可见分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司; 黏度计, 阿美特克-博勒飞公司; 15 L 不锈钢发酵罐, 上海百仑生物科技有限公司。

1.1.4 引物

本研究所用引物见表 2, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 基因编辑方法的建立

1.2.1 少动鞘氨醇单胞菌转化

从甘油保藏管中吸取 20 μ L 菌液, 稀释后涂布在 YM 平板上, 30 °C 恒温培养至平板上长满菌落。使用无菌水洗脱平板上的菌体, 冰浴 15 min 后, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。用预冷的 10% 甘油洗涤 3 次后, 加入 200 μ L 预冷的 10% 甘油, 重悬菌体, 分装成每管 100 μ L 的感受态细胞, -80 °C 保存备用。

向感受态细胞中加入 2 μ g 待转化质粒, 混匀后加入电击杯中, 置于冰上预冷 10 min, 将电穿孔仪电压分别设置为 1 600、1 800、2 000、2 200、2 500 V/mm 这 5 个梯度。电击结束后, 向电击杯中加入 900 μ L YPG 培养基, 转移至无菌 EP 管中, 30 °C、220 r/min 培养 1 h 后, 6 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重悬后涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素的 YM 固体培养基, 30 °C 恒温培养 48 h。

表1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109 wild-type strain	Lab stock
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> S17-1 carrying pLO3	Lab stock
<i>E. coli</i> HB101	<i>E. coli</i> HB101 carrying pRK2013	Lab stock
FMME-GG01	Wild-type <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Lab stock
FMME-GG02	FMME-GG01 carrying pBBR1- <i>pgm</i>	This study
FMME-GG03	FMME-GG01 carrying pBBR1- <i>vgb</i>	This study
FMME-GG04	FMME-GG01 carrying pBBR1- <i>gelA</i>	This study
FMME-GG05	FMME-GG01 carrying pBBR1- <i>gelK</i>	This study
FMME-GG06	FMME-GG01 carrying pBBR1- <i>gelD</i>	This study
FMME-GG07	FMME-GG01 Δ <i>ldhA</i> ::P _{<i>tac</i>} - <i>gelA</i>	This study
FMME-GG08	FMME-GG07 Δ <i>poxB</i> ::P _{<i>tac</i>} - <i>gelK</i>	This study
Plasmids		
pBBR1 MCS2	pBBR1 <i>oriV</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	Purchased from Addgene
pLO3	RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i> , Tc ^r , SacB	Lab stock
pRK2013	RP4 <i>oriT</i> , Kan ^r , <i>oriT</i> , <i>trfA</i>	Lab stock
pJYS	pSC101 <i>ori</i> , Fncpfl, P _{J23119}	Purchased from Addgene
pSPIN	pBBR1 <i>oriV</i> , Cm ^r , P _{J23119}	Purchased from Addgene
pET28a-eGFP	pET28a <i>ori</i> , Kan ^r , P _{<i>tac</i>}	Lab stock
pBBR1-101ori	pSC101 <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pBBR1-pK18ori	pK18 <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pBBR1-RK2ori	RK2 <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pBBR1-ColE1ori	ColE1 <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pBBR1-pET28aori	pET28a <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pBBR1-pVS1ori	pVS1 <i>ori</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	This study
pCas9	pSC101 <i>ori</i> , Amp ^r	Purchased from Addgene
pSGN20	pET28a <i>ori</i> , Kan ^r , SacB	Purchased from Addgene
pCas	pSC101 <i>ori</i> , Cm ^r	This study
pN20	pBBR1 <i>oriV</i> , Kan ^r , SacB	This study
pN20-ldhA	pBBR1 <i>oriV</i> , Kan ^r , SacB, N20	This study
pRecET-Cre/loxP	pBBR1 carrying lox-Cm ^r -lox, Cre	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} -eGFP	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} promoter	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>trc</i>} -eGFP	pBBR1 carrying P _{<i>trc</i>} promoter	This study
pBBR1 MCS2-P _{J23119} -eGFP	pBBR1 carrying P _{J23119} promoter	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>araB</i>} -eGFP	pBBR1 carrying P _{<i>araB</i>} promoter	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>J</i>} -eGFP	pBBR1 carrying P _{<i>J</i>} promoter	This study
pBBR1 MCS2-P ₅₁ -eGFP	pBBR1 carrying P ₅₁ promoter	This study
pLO3-eGFP	pLO3, P _{J23119} , eGFP	This study
pCpf1-eGFP	pCpf1, P _{J23119} , eGFP	This study
pSPIN-eGFP	pSPIN, P _{J23119} , eGFP	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} - <i>pgm</i>	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} - <i>pgm</i> cassette	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} - <i>vgb</i>	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} - <i>vgb</i> cassette	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} - <i>gelA</i>	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} - <i>gelA</i> cassette	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} - <i>gelK</i>	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} - <i>gelK</i> cassette	This study
pBBR1 MCS2-P _{<i>tac</i>} - <i>gelD</i>	pBBR1 carrying P _{<i>tac</i>} - <i>gelD</i> cassette	This study

表2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')
pBBR1-F	CTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTG
pBBR1-R	AAGCACACGGTCACACTGCTTCC
tac-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
tac-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
trc-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTA
trc-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
J23119-eGFP-F	ACTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG
J23119-eGFP-R	AGCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
araB-eGFP-F	ACTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATC
araB-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
P1-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTGGCGTGCAAATATCTCTAACGAAC
P1-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
P51-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGCCGGTAGCAAATGGGGGCCGCTTTGTAG
P51-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pBBR1-RecET-F	GCCTGGGGTGCTAATGAGTGA
pBBR1-RecET-R	GATATCGAATTCCTGCAGCCC
SacB-RecET-F	GGCTGCAGGAATTCGATATCCACATATACTGCCGTTCACT
SacB-RecET-R	AGCCGATGATTAATTGTCAATTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCCTTG
RecET-F	TTGACAATTAATCATCGGCTCG
RecET-R	TCACTGGCCAATCTCCCGGC
arac-F	GCCGGGAGATTGGCCAGTGATTATGACAACCTTGACGGCTAC
arac-R	ACGGTCAGTAAATTGGACATATGGAGAAACAGTAGAGAGTTGC
Cre-RecET-F	GCCGGGAGATTGGCCAGTGATTATGACAACCTTGACGGCTAC
Cre-RecET-R	ATCGCCATCTTCCAGCAGGCGCAC
lacI-RecET-F	CCGGAAGCATAAAGTGTAATCACTGCCCGCTTTCCAGTC
lacI-RecET-R	ACTCATTAGGCACCCCAGGCGACACCATCGAATGGCGCAAAACCT
pBBR1-ori-F	AAGGCCCGCTTGCTGGCGTTCTACCGGCGCGGCAGCGTGA
pBBR1-ori-R	GAAAAGATCAAAGGATCTTCGCGGCCACCGGCTGGCTCGCTTC
pCas9-F	ACTACTTTAGTCAGTTCGCGAGTA
pCas9-R	GGTTCCTATGGCTCTTGATCTATC
pSC101-ori-F	GATACAAGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGATTTAGCCAG
pSC101-ori-R	GCGGAAGTACTAAAGTAGTGAGTTATACACAGGGCTGGGATC
pSGN20-F	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGG
pSGN20-R	AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTAC
pJYS-F	GGCCCGGTGAACAGTTGTTCTAC
pJYS-R	CTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCC
UP-RecET-F	GCATCGTCTCGCAGACCTCGAGGCTG
UP-RecET-R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGGC
Down-RecET-F	CAGCGGCTCCAGATCGCGGAAAGGG
Down-RecET-R	CGGATCGAAGCCTATGCCGATGCCG
eGFP-RecET-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
eGFP-RecET-R	CGGTTGGGAATGTAATTCAGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
CmR-RecET-F	AGCTGAATTACATCCCAACCGC
CmR-RecET-R	CTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGCAACTTAAATGTGAAAGTGGGTC
pSPIN-ldhA-F	CGAGGTCATTTCCGGGGATCCCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
pSPIN-ldhA-R	CACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pSPIN-F	GGCAGTTATTGGTGCCCTTCTAGA

(待续)

(续表2)

Primers name	Primers sequence (5'→3')
pSPIN-R	GGATCCCCGGAAATGACCTCGAGG
eGFP-pSPIN-F	CATATCGTCAATTATTACCTCCACG
eGFP-pSPIN-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
UP-cas-F	GCATCGTCTCGCAGACCTCGAGGCTG
UP-cas-R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGGC
Down-cas-F	CAGCGGCTCCAGATCGCGGAAAGGG
Down-cas-R	CGGATCGAAGCCTATGCCGATGCCG
eGFP-cas-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
eGFP-cas-R	CTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pN20-ldhA-F	GGAAAACCTGTTCCGCGCCTTGTGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
pN20-ldhA-R	AAGGCGCGGAACAGTTTTCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
pJYS101-ldhA-F	AAGGCGCGGAACAGTTTTCCCGGATCTACAACAGTAGAAATTCGGATCCAT
pJYS101-ldhA-R	CCGGGGAAAACCTGTTCCGCGCCTTATTTAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCG
UP-ldhA-500-F	CACCACCGAGTTGATTTCCCTGGATGC
UP-ldhA-500-R	CGTGAGCCTTCCTTTCGTTGCCGCG
Down-ldhA-500-F	TCAGCCCGCCGCTTCTCGAACGTC
Down-ldhA-500-R	GTTTCGAGGAGTTCCTCCACGAAGC
eGFP-pJYS-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
eGFP-pJYS-R	CTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pLO3-F	TCTAGAGTCGACTGTTTAAACCTGCAG
pLO3-R	GAGCTCGAATTAAGGATCTAGGTGAAG
UP-pLO3-F	CACCTAGATCCTTTAATTCGAGCTCAATAGCCGGCGATGTTGAGCAGCCC
UP-pLO3-R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGG
Down-pLO3-F	TCAGCGGCTCCAGATCGCGGAAA
Down-pLO3-R	TTTAAACAGTCGACTCTAGAACACCTATTACAGCGACACGC
eGFP-pLO3-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
eGFP-pLO3-R	CTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pBBR1-pgm-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
pBBR1-pgm-R	AGGTCGACGGTATCGATAAGGCTTTCGTCGGGATGACAGAAGTAGG
pBBR1-vgb-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
pBBR1-vgb-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTCGAGTTACTCGACGGCCTG
pBBR1-gelA-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
pBBR1-gelA-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCGCCCAGCGACAAGCATGGTTAAC
pBBR1-gelK-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
pBBR1-gelK-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGTTGTAGTGCGGGATGACGACGCTG
pBBR1-gelD-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG
pBBR1-gelD-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGGTGTGCCTCGTCCGCTGCCATCATTG
pN20-poxB-F	CATGCACGCGATCCGCGTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
pN20-poxB-R	CGACGCGGATCGCGTGCATGACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
UP-poxB-F	GACCGTAGCAGCGTTGATGACCGAC
UP-poxB-R	GAGCCGATGATTAATTGTCAAGCTCAGCCGCTCGGCGAGCTGCTG
Down-poxB-F	GTCGTATCCCGCACTACAATCAGCCGGTGCGGCCTTGCGCCTCTTC
Down-poxB-R	GAGCGACGAGCCCTTCTGCTG

1.2.2 复制子筛选

六个不同来源的复制子 pSC101ori、pK18 ori、RK2ori、ColE1ori、pET28aori 和 pVS1ori

由苏州金唯智生物科技有限公司合成。使用引物对 pBBR1-F/R 以质粒 pBBR1 MCS2 为模板，PCR 获得线性化质粒片段。PCR 反应体系(50 μL):

2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (p520) 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 4 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。将该片段与不同复制子片段经同源重组连接后转化 *E. coli* JM109, 获得重组质粒 pBBR1-101ori, pBBR1-pK18ori, pBBR1-RK2ori, pBBR1-ColE1ori, pBBR1-pET28aori 和 pBBR1-pVS1ori。将重组质粒分别转化 FMME-GG01 感受态, 涂布在含有 50 mg/L 卡那霉素的 YM 固体培养基上, 根据转化子数量, 确定最佳复制子。

1.2.3 启动子筛选

根据本实验室前期研究经验, 选取 6 个启动子 P_{tac} 、 P_{trc} 、 P_{J23119} 、 P_{araB} 、 P_I 和 P_{51} , 删除其中的诱导调控序列, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。分别使用引物对 tac -eGFP-F/R、 trc -eGFP-F/R、 $J23119$ -eGFP-F/R、 $araB$ -eGFP-F/R、 P_I -eGFP-F/R、 P_{51} -eGFP-F/R, 以不同启动子基因和 eGFP 为模板进行融合 PCR。PCR 反应体系(50 μ L): 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (p520) 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 启动子模板 4 μ L, eGFP 模板 2 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。构建不同启动子驱动的 eGFP 表达框。使用引物对 pBBR1-F/R 以质粒 pBBR1 MCS2 为模板, PCR 获得带有 eGFP 表达框同源臂的线性化质粒片段, 将该片段与各 eGFP 表达框经同源重组连接后转化至 *E. coli* JM109, 获得重组质粒 pBBR1 MCS2- P_{tac} -eGFP、pBBR1 MCS2- P_{trc} -eGFP、pBBR1 MCS2- P_{araB} -eGFP、pBBR1 MCS2- P_{J23119} -eGFP、pBBR1 MCS2- P_I -eGFP、pBBR1 MCS2- P_{51} -eGFP, 并分别转化至 FMME-GG01 感受态, 涂布在含有 50 mg/L 卡那霉素的 YM 固体培养基上, 挑取单菌落接种至 YPG 液体培养基, 根据菌液荧光强度/ OD_{600} 比值确定启动子强度。

1.2.4 基因编辑系统的构建与评估

分别使用 pSC101 和 pBBR1 MCS2 质粒复制子, 替换 INTEGRATE、CRISPR-Cpf1、RecET-Cre/loxP、CRISPR-Cas9 这 4 种基因编辑系统质粒原有的复制子序列, 构建可以在少动鞘氨醇单胞菌中使用的基因编辑系统。选用 *ldhA* 基因作为中性位点, 利用 P_{tac} 启动子驱动的 eGFP 荧光蛋白基因整合框, 评估各编辑系统的编辑效率。

1.3 重组菌株的构建

1.3.1 关键基因筛选

根据先前研究, 选择 5 个参与结冷胶合成的基因, 以少动鞘氨醇单胞菌结冷胶基因组为模板, 分别使用对应的引物对扩增, 经同源重组克隆至 pBBR1 MCS2 质粒, 获得重组表达质粒 pBBR1 MCS2- P_{tac} -pgm、pBBR1 MCS2- P_{tac} -vgb、pBBR1 MCS2- P_{tac} -gelA、pBBR1 MCS2- P_{tac} -gelK 和 pBBR1 MCS2- P_{tac} -gelD, 并分别转化至 FMME-GG01 感受态, 构建重组菌株 FMME-GG02-FMME-GG06。

1.3.2 基因组编辑

利用改造的 CRISPR-Cas9 系统进行基因组编辑, 分别选取 *ldhA* 和 *poxB* 作为中性位点, 将 *gelA* 和 *gelK* 基因整合至 FMME-GG01 基因组中。以 *gelA* 基因为例, 使用引物对 UP-*ldhA*-500-F/R 和 Down-*ldhA*-500-F/R 分别扩增 *ldhA* 基因上下游各 500 bp 序列; 使用引物对 UP-*ldhA*-500-F/Down-*ldhA*-500-R 进行融合 PCR 构建 *gelA* 整合框。将整合框片段与质粒 pN20-*ldhA* 按 3:1 比例混合, 转化至含有 pCas 质粒的 FMME-GG01 感受态, 涂布于含有 33 mg/L 氯霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 YM 固体培养基, 30 °C 培养 48 h, 挑选单菌落进行菌落 PCR 验证。验证正确的转化子进一步通过在培养基中添加 15% 的蔗糖去除 pN20-*ldhA* 质粒, 42 °C 培养 24 h 去除 pCas 质粒, 获得重组菌株 FMME-GG07。利用同样的方法构建重组菌株 FMME-GG08。

1.4 重组菌株发酵

1.4.1 种子培养

从 FMME-GG01 甘油中保藏划线于种子斜面，30 °C 培养 24 h。使用 10 mL 无菌水洗斜面，取 1 mL 转接至种子培养基，30 °C、140 r/min 培养 12–16 h。再取 1 mL 种子液转接至新的种子培养基，30 °C、140 r/min 培养 6–8 h。

1.4.2 摇瓶发酵

将 10 mL 种子液转接至装有 90 mL 发酵培养基的 500 mL 带挡板摇瓶中，28 °C、150 r/min 往复振荡摇床培养 60 h。在发酵 18–20 h 时补加 2 mL 500 g/L 蔗糖。

1.4.3 15 L 罐补料分批发酵

15 L 发酵罐初始装液量为 9.45 L，将 1.05 L 种子液接种到发酵罐中。发酵初始条件控制为：温度 28 °C，转速 300 r/min，pH 7.5，通气量 1 vvm。发酵罐中的溶氧通过搅拌转速 (300–1 000 r/min) 自动维持在 30% 以上。在发酵 18–20 h 时补加 10 g/L 蔗糖。整个发酵过程中通过自动添加质量浓度为 30% 的 NaOH 将培养基 pH 维持在 7.0。

1.4.4 相关参数测定

取 10 mL 发酵液，用去离子水稀释 5 倍，沸水浴 10 min，23 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清。加入 3 倍体积无水乙醇，4 °C 过夜沉淀，离心收集上清用于残糖测定，收集沉淀置于预烘干并称重的锡箔纸上，在 65 °C 烘箱中烘干至恒重，计算结冷胶产量^[24]。

将去除结冷胶的发酵液利用冷冻干燥仪冻干，加入等体积去离子水将样品重新溶解，采用苯酚硫酸法测定残糖^[25]。

取 35 mL 发酵液置于 50 mL 离心管中，使用黏度计测定黏度，测试条件为 4 号转子、25 °C、10 r/min^[26]。

以内参基因 *gyrB* 为参照，利用实时荧光定量 PCR 检测合成途径中关键基因的表达情况^[27]。

2 结果与分析

2.1 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的建立

由于少动鞘氨醇单胞菌产生大量结冷胶包裹在菌体表面，在制备感受态细胞过程中，使用离心法无法有效去除菌体表面的多糖，显著影响了感受态细胞的转化效率。为解决这一问题，本研究从平板中使用无菌水将菌体洗脱下来，有效分离了菌体与其分泌的结冷胶多糖。此外，电击法被证实为最有效的转化方法^[28]，本研究使用梯度电压进行电击试验，结果显示 (图 2)，当电击电压为 2 500 V/mm 时，转化子数量最多。

目前，除 pBBR1 MCS2 质粒外，尚无可用于少动鞘氨醇单胞菌的质粒元件。根据调研，选择了 6 个不同来源的复制子，其中 pSC101 ori、pET28a ori、ColE1 ori 和 pK18 ori 均为大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中常用的质粒复制子^[29–32]，RK2 ori 和 pVS1 ori 为假单胞菌中常用的质粒复制子^[33–34]。将不同的复制子分别克隆至 pBBR1，替代其原有复制子，并转化至少动

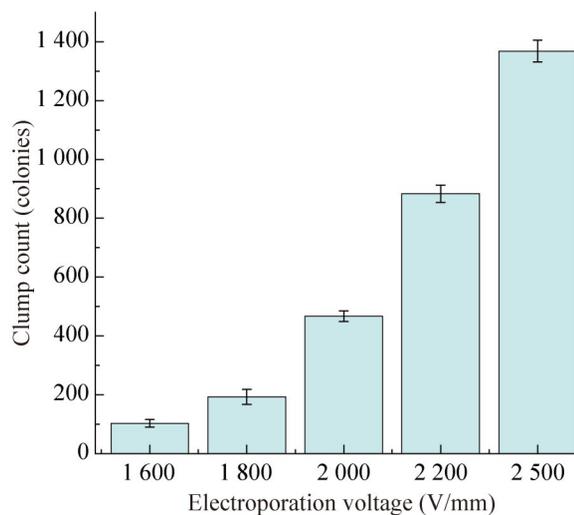


图2 不同电压转化平板菌落数统计

Figure 2 Colony count statistics on plates after transformation with different voltages.

鞘氨醇单胞菌, 通过抗性筛选可在少动鞘氨醇单胞菌中起始质粒复制的复制子^[35]。转化子数量结果如图 3A 所示, 质粒 pSC101 和 pET28a 的复制子均能在少动鞘氨醇单胞菌中成功控制质粒复制。相较于 pET28a, 使用 pSC101 复制子转化后平板菌落数提升了 200%。在 FMME-GG01 菌株中对不同质粒的拷贝数进行了定量分析(图 3B)。结果显示, pET28a 质粒的拷贝数为 22 个/细胞, pSC101 质粒的拷贝数为 4 个/细胞。进一步分析表明, 质粒的转化效率与拷贝数之间存在负相关性, 即质粒拷贝数越高, 其转化效率越低。因此, 后续研究使用 pSC101 复制子改造基因编辑系统。

为了筛选组成型启动子用于代谢工程改造, 根据调研, 选择了 6 个启动子, 在合成时删除了诱导启动子的诱导序列, 以避免整合基因后诱导剂的添加。荧光检测结果显示, P_{tac} 、 P_{trc} 、 P_{J23119} 、 P_{araB} 、 P_I 和 P_{51} 启动子都能在少动鞘氨醇单胞菌中启动 eGFP 表达, 其中 P_{tac} 、 P_{trc} 和 P_{J23119} 展现出较强的启动能力, P_{tac} 表现出最高的表达强度(图 4)^[36]。因此, 后续研究中使用

P_{tac} 启动子用于重组酶的表达。

将 INTEGRATE、CRISPR-Cpf1、RecET-Cre/loxP、CRISPR-Cas9 这 4 种基因编辑系统质粒原有的复制子替换为 pSC101 和 pBBR1 MCS2 质粒复制子, 使各质粒可在少动鞘氨醇单胞菌中复制表达。将 eGFP 荧光蛋白基因整合框整合至 *ldhA* 位点, 评估各编辑系统的编辑效率(图 5)。

以三亲本接合系统为对照, 评估本研究改造的基因编辑系统。结果表明, CRISPR-Cpf1 平板上无荧光菌落; RecET-Cre/loxP 平板上有少量荧光菌落(1 个); INTEGRATE 与 CRISPR-Cas9 平板上有较多的荧光菌落, 分别为 12 个和 22 个(图 6A)。相较于 INTEGRATE, CRISPR-Cas9 在少动鞘氨醇单胞菌中具有更高的编辑效率, 从平板上挑选部分单菌落进行聚合酶链式反应(PCR)验证, 并进一步实施测序验证(图 6B、6C)。在 CRISPR-Cas9 平板上挑选的 13 个单菌落中, 发现 1 个菌落的测序结果显示存在单核苷酸位点突变, 基因编辑整合效率为 92.3%; 在 INTEGRATE 平板上挑选的 8 个单菌落中, 有 2 个

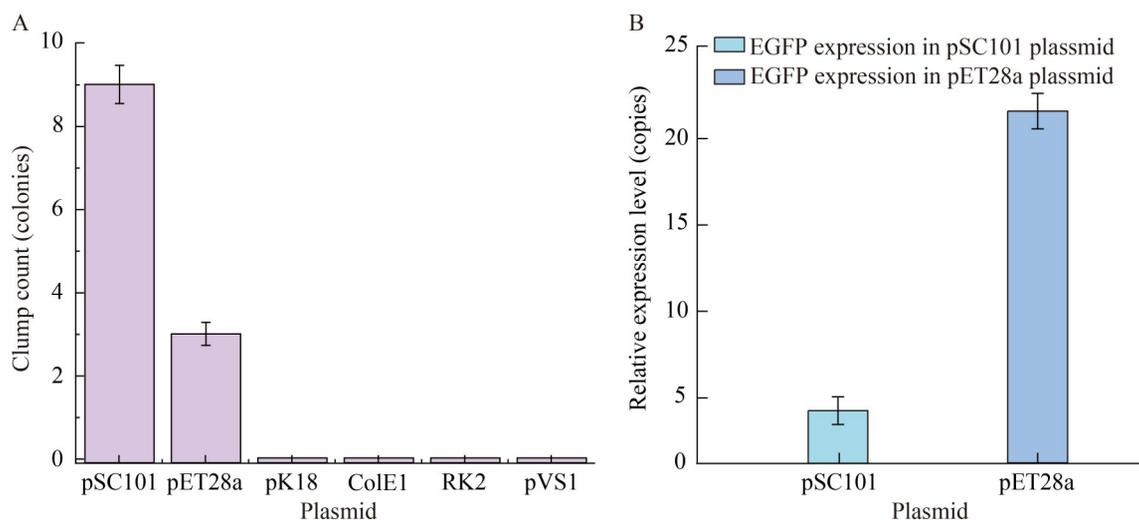


图3 不同来源质粒复制子的验证。A: 不同复制子平板菌落数统计; B: 不同质粒在少动鞘氨醇单胞菌菌株中的拷贝数。

Figure 3 Validation of plasmid replicators from different sources. A: Colony count statistics of different plasmid origins of replication on plates; B: Copy number of different plasmids in *S. paucimobilis* strains.

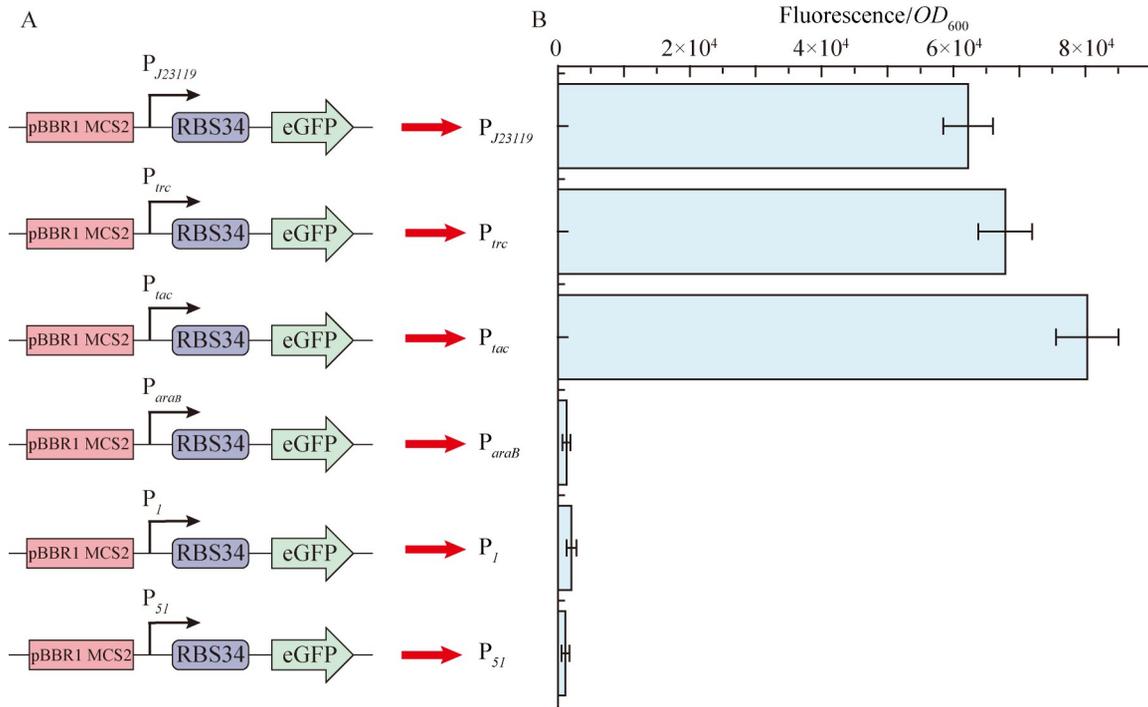


图4 启动子强度表征。A: 不同来源强组成型启动子表达质粒的构建; B: 摇瓶发酵24 h菌株的荧光/ OD_{600} 。

Figure 4 Characterization of promoters strength. A: Construction of strongly composed promoter expression plasmids from different sources; B: Fluorescence/ OD_{600} of strain fermented in flask for 24 h.

菌株出现核苷酸位点突变，基因编辑整合效率为75.0%。因此，后续研究使用改造的CRISPR-Cas9系统对少动鞘氨醇单胞菌进行基因编辑和代谢工程改造。

2.2 影响结冷胶合成的关键基因确定

为快速筛选能够促进结冷胶积累的关键基因，根据文献调研，选取了1个调控基因，即来源于透明颤菌的促进菌体获取氧气的 vgb 基因^[37-38]，以及少动鞘氨醇单胞菌结冷胶合成路径中的4个内源基因，分别为促进前体物质合成的 pgm 基因、调控结冷胶合成的 $gelA$ 基因、促进结冷胶单糖元件组装的 $gelK$ 基因以及促进结冷胶外排的 $gelD$ 基因。以pBBR1 MCS2为质粒骨架，构建了各基因的重组表达质粒pBBR1 MCS2- P_{tac} - pgm 、pBBR1 MCS2- P_{tac} - vgb 、pBBR1 MCS2- P_{tac} - $gelA$ 、pBBR1 MCS2- P_{tac} - $gelK$ 和

pBBR1 MCS2- P_{tac} - $gelD$ ，并通过优化的电击法转化至出发菌株FMME-GG01中，最后通过重组菌株的摇瓶发酵评估这些基因对结冷胶积累和发酵液黏度的影响。

摇瓶结果显示(图7)，过表达 $gelA$ 基因时，结冷胶产量达到7.2 g/L，发酵液黏度为3 780 mPa·s，较对照菌株分别提高了53.1%和49.4%；过表达 $gelK$ 基因时，结冷胶产量无显著提升，但发酵液黏度达到4 750 mPa·s，较对照菌株提高了87.7%；过表达 pgm 、 vgb 和 $gelD$ 基因对结冷胶的积累和发酵液黏度均无显著影响。上述结果表明 $gelA$ 和 $gelK$ 基因对结冷胶合成有重要影响。因此，后续研究将通过基因组编辑，在出发菌株FMME-GG01中增加这2个基因的拷贝数，以构建结冷胶高产菌株。

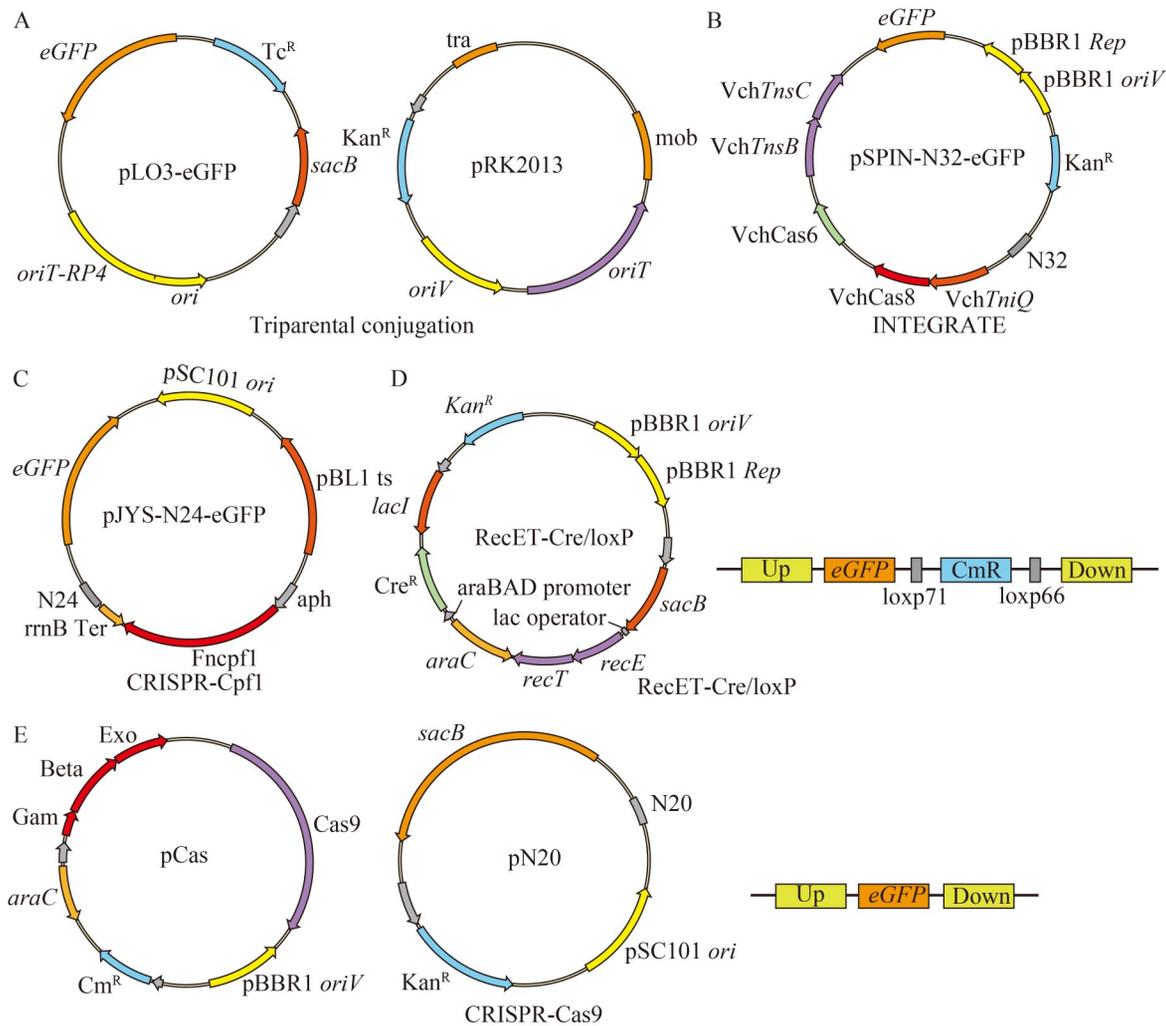


图5 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑系统构建。A: 三亲接合系统的pLO3-eGFP重组质粒和游动质粒 pRK2013质粒图; B: INTEGRATE系统质粒图; C: CRISPR-Cpf1系统质粒图; D: RecET-Cre/loxP系统质粒图和目的基因整合框; E: CRISPR-Cas9系统质粒图和目的基因整合框。

Figure 5 Construction of *Sphingomonas paucimobilis* strain gene editing system. A: Figure of the pLO3-eGFP recombinant plasmid of the triparental conjugation system and the mobilizable plasmid pRK2013; B: INTEGRATE system plasmid map; C: CRISPR-Cpf1 system plasmid map; D: RecET-Cre/loxP system plasmid map and target gene integration frame; E: CRISPR-Cas9 system plasmid map and target gene integration frame.

2.3 结冷胶合成路径强化

基于上述结果, 利用本研究改造的 CRISPR Cas9 系统将 *gelA* 整合至 FMME-GG01 基因组 *ldhA* 基因位点, 得到重组菌株 FMME-GG07。进一步将 *gelK* 整合至 FMME-GG07 基因组 *poxB* 基因位点, 得到重组菌株 FMME-GG08。利用

FMME-GG08 进行摇瓶发酵, 结果如图 8 所示, 在发酵过程中, 重组菌株 FMME-GG08 中 *gelA* 和 *gelK* 的转录水平均高于出发菌株 FMME-GG01, 其生长未受到影响; 发酵结束后, 结冷胶产量达到 10.8 g/L, 发酵液黏度为 4 683 mPa·s, 较 FMME-GG01 分别提高了 130.2% 和 85.1%。

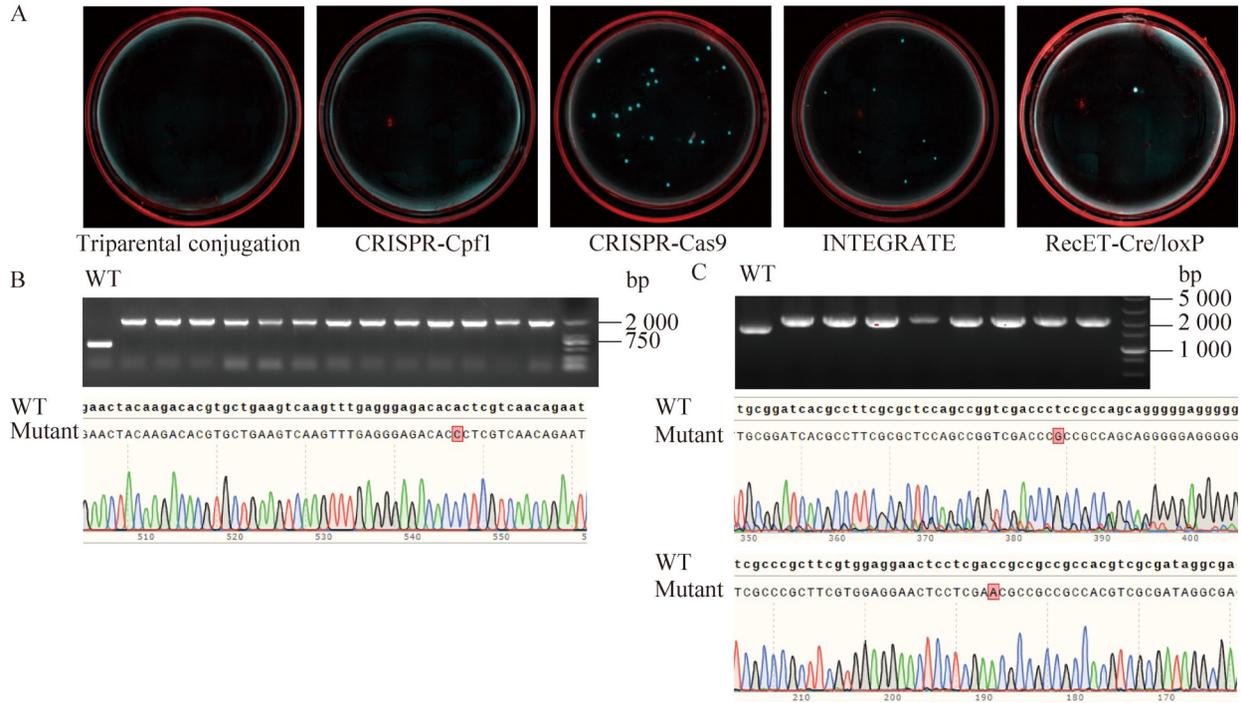


图6 基因编辑系统验证。A: 不同基因整合系统荧光显色平板; B: CRISPR-Cas9平板荧光菌株PCR验证电泳图和突变菌株测序图; C: INTEGRATE平板荧光菌株PCR验证电泳图和突变菌株测序图。

Figure 6 Verification of gene editing systems. A: Fluorescent colorimetric plate for different gene integration systems; B: CRISPR-Cas9 plate fluorescent strain PCR validation electrophoresis map and mutant strain sequencing map; C: INTEGRATE plate fluorescent strain PCR validation electrophoresis map and mutant strain sequencing map.

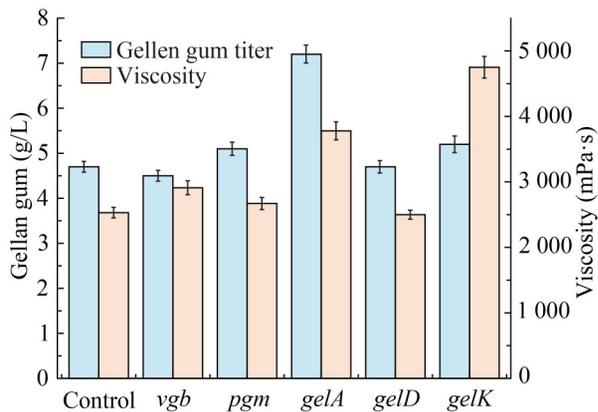


图7 重组菌株的摇瓶验证

Figure 7 Shaken bottle verification of recombinant strains.

2.4 优化发酵过程参数强化结冷胶合成

为进一步提高结冷胶的产量, 在 15 L 发酵

罐中进行放大培养, 优化种子培养、碳源、氮源、pH 和溶解氧浓度等关键参数。

种子液生长曲线如图 9 所示, 在一级种子摇瓶中, 0–10 h 为延滞期, 10–16 h 为对数生长期; 16–20 h 为稳定期。在二级种子摇瓶中, 0–4 h 为延滞期, 4–8 h 为对数生长期; 8–13 h 为稳定期。处于对数生长期的菌种对新环境的适应期短, 接种后可迅速生长, 因此选择培养 6–8 h 的二级种子液接种至发酵罐发酵。

分别选取葡萄糖、蔗糖和麦芽糖浆作为唯一碳源, 结果如图 10A 所示, 蔗糖作为唯一碳源时, 结冷胶产量最高达 13.5 g/L。在补糖策略上, 设计了 2 个条件: (1) 初糖浓度 40 g/L, 发酵过程中不再补加碳源; (2) 初糖浓度 30 g/L, 发酵 20 h 时补加蔗糖 10 g/L。结果如图 10B 所

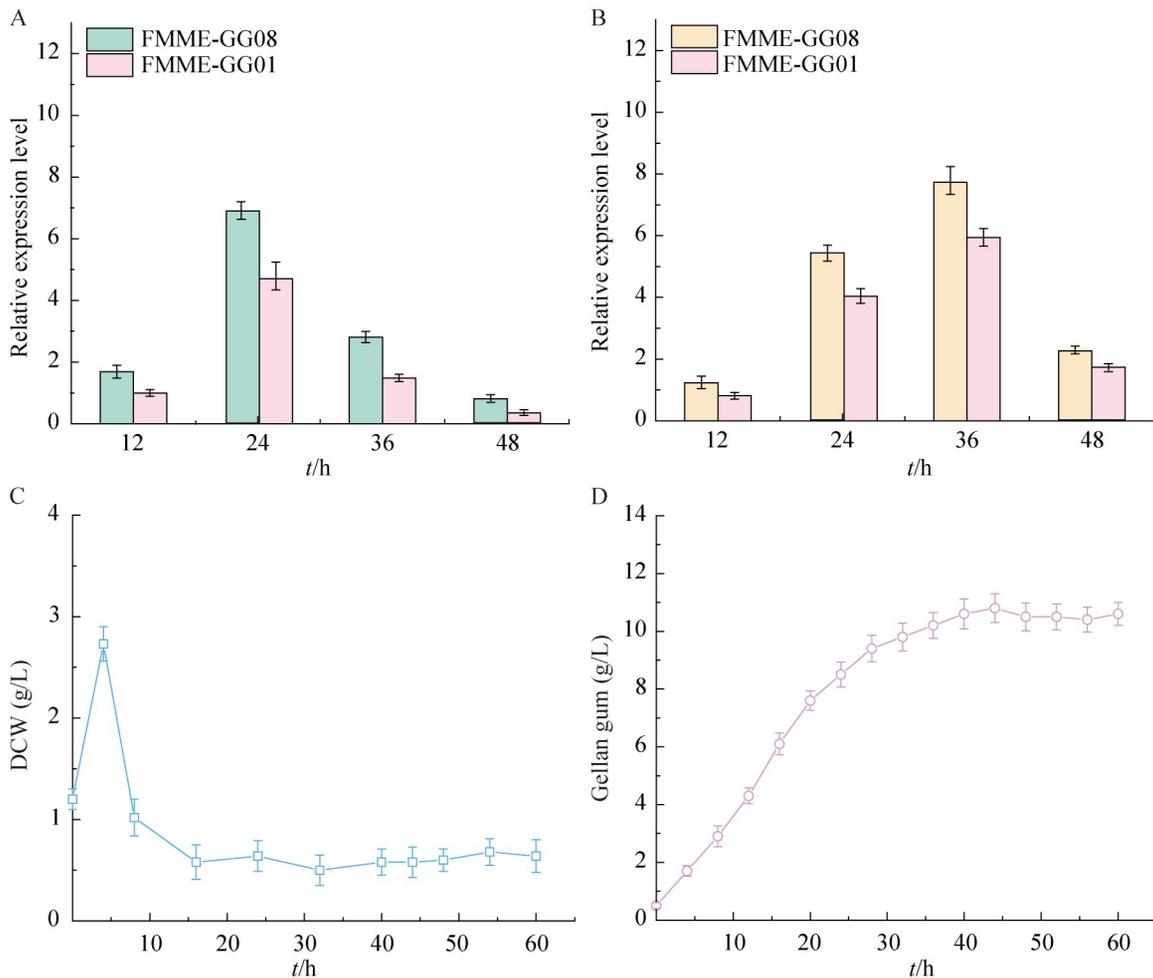


图8 FMME-GG08摇瓶发酵参数。 A: *gelA*基因转录水平比较; B: *gelK*基因转录水平比较; C: 摇瓶发酵过程中菌体细胞干重曲线; D: 摇瓶发酵过程中结冷胶产量。

Figure 8 Fermentation indexes of FMME-GG08 with flasks. A: Comparison of *gelA* transcription level between the recombinant strain FMME-GG08 and the wild-type strain FMME-GG01; B: Comparison of *gelK* transcription level between the recombinant strain FMME-GG08 and the wild-type strain FMME-GG01; C: Cell dry weight curve during shake flask fermentation; D: Yield of gellan gum during shake flask fermentation.

示, 条件(2)最优, 结冷胶产量、产率、生产强度分别为 15.1 g/L、0.37 g/g、0.25 g/(L·h)。

基于上述结果, 分别选取蛋白胨、豆粕粉、玉米浆和麸皮提取物作为唯一氮源, 结果如图 10C 所示, 选取豆粕粉为唯一氮源时, 结冷胶产量最高达 14.7 g/L, 相较于最优的蛋白胨作为氮源产量仅降低了 2.6%, 但豆粕粉价格更低廉, 利于节约工业化生产成本, 因此后续研究使用豆粕粉为氮源。进一步, 在发酵培养基中使用

梯度质量浓度(1‰、2‰、3‰、4‰、5‰、6‰、7‰)豆粕粉, 结果如图 10D 所示, 添加质量浓度 3‰ 的豆粕粉更有利于结冷胶积累, 此时结冷胶产量、产率、生产强度分别为 16.4 g/L、0.41 g/g、0.27 g/(L·h)。

同时, 设计了 2 个 pH 控制条件: (1) 控制初始 pH 为 7.5, 发酵全程不做调控; (2) 初始 pH 为 7.0, 发酵过程中使用质量浓度 30% NaOH 将发酵液 pH 维持在 7.0。结果如图 10E 所示,

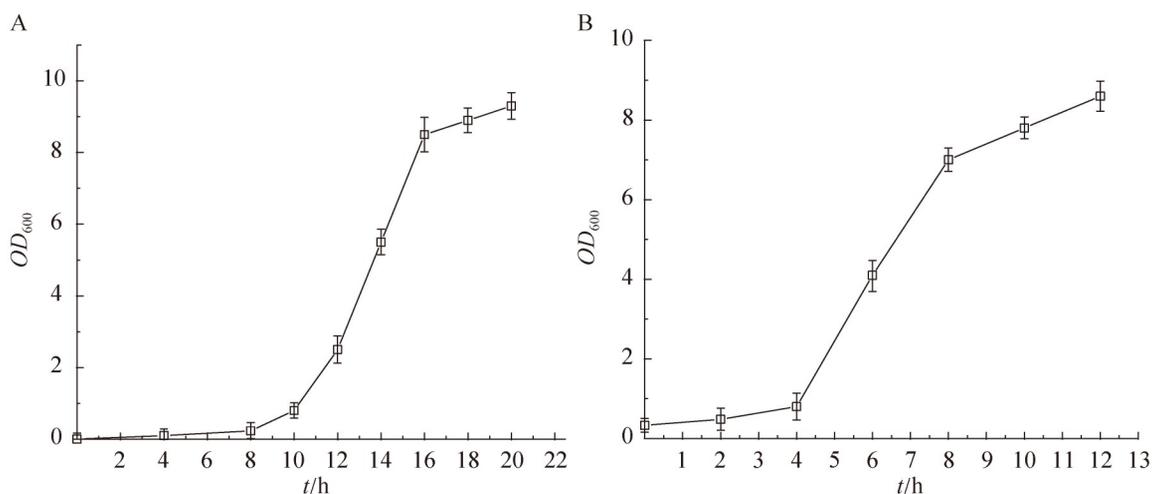


图9 FMME-GG08菌株种子摇瓶生长曲线。 A: 少动鞘氨醇单胞菌一级种子摇瓶生长曲线; B: 少动鞘氨醇单胞菌二级种子摇瓶生长曲线。

Figure 9 Shake flask growth curves of strain FMME-GG08. A: Growth curves of *S. paucimobilis* primary seed culture in shake flask; B: Growth curves of *S. paucimobilis* secondary shake flask seed culture.

条件(2)更利于结冷胶积累, 此时结冷胶产量、产率 and 生产强度分别为 17.5 g/L、0.43 g/g、0.29 g/(L·h)。

此外, 设计了 3 个条件优化溶氧, 即分别在 0–6 h、0–12 h、0–24 h 控制转速不高于 450 r/min。如图 10F 所示, 在发酵前 12 h 控制转速不高于 450 r/min, 后续将转速关联溶氧控制在 30% 以上时更利于结冷胶积累, 此时结冷胶产量、产率 and 生产强度分别为 18.0 g/L、0.45 g/g、0.30 g/(L·h)。

综合上述最优发酵工艺, 重组菌株 FMME-GG08 在 15 L 发酵罐中发酵 60 h, 结冷胶产量达到 20.1 g/L, 是其在摇瓶水平产量的 2 倍, 底物蔗糖的转化率为 0.50 g/g, 生产强度为 0.33 g/(L·h), 发酵液黏度为 8 175 mPa·s。

3 讨论与结论

结冷胶是近年来在食品和医药领域中应用最广泛的凝胶剂之一, 1992 年美国食品药品监督管理局批准结冷胶可作为凝胶剂、悬浮剂和稳定剂应用于食品和化妆品工业, 1996 年我国批准结冷胶可作为食品添加剂。目前, 微生物

发酵法是结冷胶生产中最常见的方法。1982 年首次发现少动鞘氨醇单胞菌以来, 该菌已广泛应用于结冷胶的工业化发酵生产^[8]。参与结冷胶生物合成的基因有 26 个, 但结冷胶生产菌株的代谢调控仅限于少数基因的过表达或敲除。这主要是由于对结冷胶生物合成途径的认识不够清晰, 尤其是对四糖重复单元组装机制的研究较少, 且缺少高效的遗传操作工具和诱导调控元件。传统的三亲接合效率低、耗时长、目标菌株筛选困难, 无法满足菌株构建的需求^[39]。因此, 本研究基于 CRISPR 技术构建了高效适用于少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑工具, 并利用该工具对少动鞘氨醇单胞菌进行代谢工程改造, 以提高结冷胶产量, 为以非模式微生物为底盘菌株构建高产结冷胶等胞外多糖产品的生产菌株提供了借鉴。

本研究从 6 种大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌和假单胞菌中常用的质粒复制子元件中筛选能够在少动鞘氨醇单胞菌中复制与表达的复制子。已报道的研究中, 仅宽范围宿主质粒 pBBR1 可在少动鞘氨醇单胞菌中复制与表达。本研究表明, 来源于质粒 pSC101 和 pET28a 的复制子均

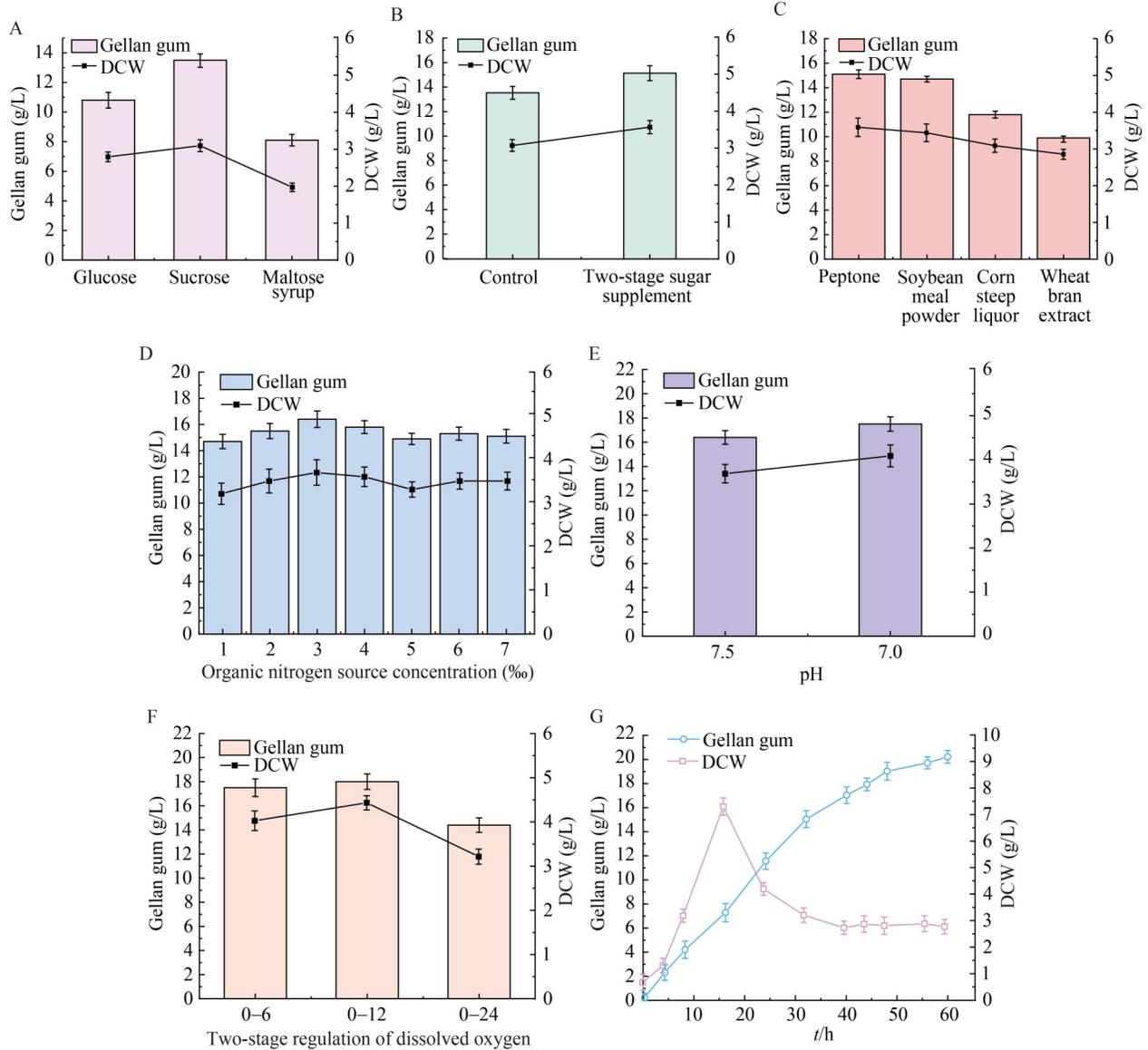


图10 发酵工艺优化。 A: 分别选取葡萄糖、蔗糖、麦芽糖浆为唯一碳源的发酵柱状图; B: 不同补糖策略的发酵柱状图; C: 分别选取蛋白胨、豆粕粉、玉米浆和麸皮提取物为有机氮源的发酵柱状图; D: 不同浓度有机氮源的发酵柱状图; E: 不同pH调控策略的发酵柱状图; F: 不同溶氧调控策略的发酵柱状图; G: 最优发酵工艺下菌株在15 L发酵罐中的发酵曲线。

Figure 10 Fermentation process optimization. A: Bar chart of fermentation using glucose, sucrose, and maltose syrup as the sole carbon source; B: Bar chart of fermentation with different sugar feeding strategies; C: Bar chart of fermentation using peptone, soybean meal powder, corn steep liquor, and wheat bran extract as organic nitrogen sources; D: Bar chart of fermentation with different concentrations of organic nitrogen sources; E: Bar chart of fermentation with different pH control strategies; F: Bar chart of fermentation with different dissolved oxygen control strategies; G: Fermentation curves of the strain in a 15 L fermenter under optimal fermentation conditions.

可在少动鞘氨醇单胞菌中复制和表达, 为构建适用于该菌种的载体质粒提供了新的工具。此外, 本研究利用绿色荧光蛋白表征不同启动子的调控强度, 筛选出了适用于该菌株的不同强度启动子元件 P_{tac} 、 P_{trc} 和 P_{J23119} , 为该菌种的代谢工程改造提供了诱导调控元件。随后, 利用复制子元件改造并筛选了 5 种基因编辑系统, 其中 INTEGRATE 系统和 CRISPR-Cas9 系统均能有效编辑少动鞘氨醇单胞菌, 且 CRISPR-Cas9 系统表现出更高的编辑效率。利用改造的 CRISPR-Cas9 系统, 在出发菌株基因组上强化合成路径基因 *gelA* 和 *gelK*, 同时敲除副产物基因 *ldhA* 和 *poxB*, 构建了 FMME-GG08 菌株, 其摇瓶产量为 10.8 g/L。进一步优化碳源、氮源、pH、溶氧等发酵参数, 并在 15 L 发酵罐上进行了放大试验, 最终结冷胶的产量达到 20.1 g/L, 已初步具备工业化生产潜力, 但相较于目前报道的最高产量仍存在一定的差距。如何进一步筛选关键基因并通过代谢改造生产菌株以提高结冷胶产量是结冷胶生产待解决的关键问题。

在发酵生产结冷胶过程中, 随着产物的积累发酵液的黏度逐渐增加, 溶氧水平随之下降, 从而抑制了结冷胶的进一步积累。为进一步提高结冷胶的产率, 在后续的研究中可以通过外源补加携氧剂 H_2O_2 或适量供给无菌氧气来改善发酵过程中的溶氧条件, 满足菌株对氧气的需求。此外, 还可以通过筛选溶氧相关的蛋白基因, 增强菌株在低氧环境下的氧气摄取能力。另一方面, 可以对结冷胶合成路径酶基因进行系统的代谢工程改造, 通过提高前体的积累、增强四糖单元的组装、促进产物外排等手段来进一步提高菌株整体的生产性能。

作者贡献声明

孙鹏: 研究构思和设计、实验操作、论文撰写与修改; 薛正莲: 发酵工艺放大指导; 高聪: 基因编辑工具构建指导; 刘佳: 发酵培养

基优化指导; 吴静: 发酵工艺优化指导; 李晓敏: 研究设计、实验指导、论文指导与修改; 刘立明: 研究设计、论文指导与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] TATYKHANOVA GS, GIZATULLINA NN, KUDAIBERGENOVA GM, BERZHANOVA RZ, MUKASHEVA TD, KUDAIBERGENOV SE. Comparative study of gellan gum derived from domestic raw materials of Kazakhstan and commercial gellan[J]. *Macromolecular Symposia*, 2024, 413(4): 2400004.
- [2] GARCIA MC, TRUJILLO LA, MUNOZ J, ALFARO MC. Gellan gum fluid gels: influence of the nature and concentration of gel-promoting ions on rheological properties[J]. *Colloid and Polymer Science*, 2018, 296: 1741-1748.
- [3] YOUNES M, AGGETT P, AGUILAR F, CREBELLI R, FILIPIC M, FRUTOS MJ, GALTIER P, GOTT D, GUNDERT-REMY U, KUHNLE GG, LAMBRE C, LEBLANC JC, LILLEGAARD IT, MOLDEUS P, MORTENSEN A, OSKARSSON A, STANKOVIC I, WAALKENS-BERENDSEN I, WOUTERSEN RA, WRIGHT M, et al. Re-evaluation of gellan gum (E418) as food additive[J]. *EFSA Journal*, 16(6): 5296.
- [4] YAN BW, ZHAO ZL, ZHANG NN, RUAN H, YU XF, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN W, FAN DM. 3D food printing curing technology based on gellan gum[J]. *Journal of Food Engineering*, 2022, 327: 111036.
- [5] DAS M, GIRI TK. Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 56: 101586.
- [6] MORRIS E, NISHINARI K, RINAUDO M. Gelation of gellan-a review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28: 373-411.
- [7] DEV MJ, WARKE RG, WARKE GM, MAHAJAN GB, PATIL TA, SINGHAL RS. Advances in fermentative production, purification, characterization and applications of gellan gum[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127498.
- [8] 陈佳乐, 水小溪, 赵宝华, 张禹, 焦天悦, 刘旭冉, 李清扬. 结冷胶的生物合成及其应用研究综述[J]. *河北省科学院学报*, 2023, 40(3): 45-52.
CHEN JL, SHUI XX, ZHAO BH, ZHANG Y, JIAO TY, LIU XR, LI QY. Review on biosynthesis mechanism and application of gellan gum[J]. *Journal of the Hebei Academy of Sciences*, 2023, 40(3): 45-52 (in Chinese).
- [9] THORNE L, MIKOLAJCZAK MJ, ARMENTROUT RW, POLLOCK TJ. Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by *Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes[J]. *Journal of Industrial*

- Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(1): 49-57.
- [10] ZHU L, WU X, LI O, CHEN Y, QIAN CD, TENG Y, TAO X, GAO H. Cloning and knockout of phytoene desaturase gene in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for economic recovery of gellan gum[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2011, 38(9): 1507-1513.
- [11] LI Y, CONG H, LIU B, SONG J, SUN X, ZHANG J, YANG Q. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(9): 1185-1197.
- [12] ERENDLER SO, GENCER S, GECCKIL H, STARK BC, WEBSTER DA. Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Enterobacter aerogenes*: effect on cell growth and oxygen uptake[J]. Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiia, 2004, 40(3): 288-295.
- [13] SUN L, WANG Y, YUE M, DING X, YU X, GE J, SUN W, SONG L. Rapid screening of high-yield gellan gum mutants of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 by combining atmospheric and room temperature plasma mutation with near-infrared spectroscopy monitoring[J]. Foods, 2022, 11(24): 4078.
- [14] VARTAK NB, LIN CC, CLEARY JM, FAGAN MJ, SAIER JR MH. Glucose metabolism in '*Sphingomonas elodea*': pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant[J]. Microbiology, 1995, 141(9): 2339-2350.
- [15] MANJUSHA CM, SOUMIYA S, SANTHIAGU A. Cloning and expression of gellan gum biosynthetic genes *gelQ*, *gelB*, *gelL* and *gelK* of *Sphingomonas paucimobilis*, production and characterization of the recombinant gellan gum[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 30: 101850.
- [16] WU M, HUANG H, LI G, REN Y, SHI Z, LI X, DAI X, GAO G, REN M, MA T. The evolutionary life cycle of the polysaccharide biosynthetic gene cluster based on the *Sphingomonadaceae*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46484.
- [17] 李莎, 徐虹, 刘晓柳, 朱萍, 冯小海, 许宗奇. 一种鞘氨醇单胞菌基因工程菌及其构建方法与应用: CN201810207379.1[P]. 2021-02-05.
LI S, XV H, LIU XL, ZHU P, FENG XM, XV ZQ. A genetically engineered *Sphingomonas* strain and its construction method and application: CN201810207379.1 [P]. 2021-02-05 (in Chinese).
- [18] 陈力玉, 张淑卿, 李剑峰, 师尚礼, 霍平慧, 苗阳阳. 接种荧光标记根瘤菌对苜蓿幼苗生长的影响[J]. 草原与草坪, 2013, 33(6): 1-8.
CHEN LY, ZHANG SQ, LI JF, SHI SL, HUO PH, MIAO YY. Effect of the fluorescence marked rhizobias on alfalfa seedling growth[J]. Grassland and Truf, 2013, 33(6): 1-8 (in Chinese).
- [19] ZHAO Y, HAN J, TAN J, YANG Y, LI S, GOU Y, LUO Y, LI T, XIAO W, XUE Y, HAO Y, XIE X, LIU Y, ZHU Q. Efficient assembly of long DNA fragments and multiple genes with improved nickase-based cloning and Cre/loxP recombination[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(10): 1983-1995.
- [20] JIANG F, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. Annual Review of Biophysics, 2017, 46: 505-529.
- [21] PARK HM, LIU H, WU J, CHONG A, MACKLEY V, FELLMANN C, RAO A, JIANG FG, CHU H, MURTHY N, LEE K. Extension of the crRNA enhances Cpf1 gene editing *in vitro* and *in vivo*[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3313.
- [22] CHEN S, YAO Y, ZHANG Y, FAN G. CRISPR system: discovery, development and off-target detection[J]. Cellular Signalling, 2020, 70: 109577.
- [23] VO PLH, RONDA C, KLOMPE SE, CHEN EE, ACREE C, WANG HH, STERNBERG SH. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(4): 480-489.
- [24] GIAVASIS I, HARVEY LM, MCNEIL B. The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(1/2): 101-108.
- [25] ZENG C, YE G, LI G, CAO H, WANG Z, JI S. RID serve as a more appropriate measure than phenol sulfuric acid method for natural water-soluble polysaccharides quantification[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 278: 118928.
- [26] AGUSMAN, SURYANTI, NURHAYATI, MURDINAH, WAHYUNI T. Measurement of fish gelatin using rotational viscometer: an alternative to conventional pipette method[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 715: 012056.
- [27] CHEN W, ZHANG K, HUANG F, ZHAO L, WALDREN GC, JIANG Q, CHEN SX, WANG B, GUO W, ZHANG DY, ZHANG JX. Advancing quantitative PCR with color cycle multiplex amplification[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(17): e81.
- [28] YOSHIDA N, SATO M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5): 791-798.
- [29] GAFFKE L, KUBIAK K, CYSKE Z, WĘGRZYN G. Differential chromosome- and plasmid-borne resistance of *Escherichia coli* *hfq* mutants to high concentrations of various antibiotics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8886.
- [30] EL-SAYED GM, AGWA MM, EMAM MTH, KANDIL H, ABDELHAMID AE, NOUR SA. Utilizing immobilized recombinant serine alkaline protease from *Bacillus safensis* lab418 in wound healing: Gene cloning, heterologous expression, optimization, and characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270: 132286.
- [31] BAAS-THOMAS MS, OEHM SB, OSTROV N, CHURCH GM. Characterization of ColE1 production for robust *tolC* plate dual-selection in *E. coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 2009-2014.
- [32] TAMARA G, HASNA NM, AHMED EG, HASSANH, CHEN Z, LIU D. Molecular cloning and expression of *Candida antarctica* lipase B in *Corynebacterium* genus[J]. Microbiology and Biotechnology Letters, 2019, 47(4):

- 546-554.
- [33] THOMAS CM, HUSSAIN AA, SMITH CA. Maintenance of broad host range plasmid RK2 replicons in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nature*, 1982, 298(5875): 674-676.
- [34] ITOH Y, SOLDATI L, LEISINGER T, HAAS D. Low- and intermediate-copy-number cloning vectors based on the *Pseudomonas plasmid* pVS1[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1988, 54(6): 567-573.
- [35] TIAN R, ZHAO R, GUO H, YAN K, WANG C, LU C, LV X, LI J, LIU L, DU G, CHEN J, LIU Y. Engineered bacterial orthogonal DNA replication system for continuous evolution[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(12): 1504-1512.
- [36] ZHANG Y, LIU H, LIU Y, HUO K, WANG S, LIU R, YANG C. A promoter engineering-based strategy enhances polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 191: 608-617.
- [37] XUE S, JIANG H, CHEN L, GE N, LIU G, HU Z, CHI Z, CHI Z. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (*VHb*) and flavohemoglobin (*FHb*) genes greatly enhances pullulan production[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 701-709.
- [38] LI Y, ZHANG W, ZHU W, ZHANG B, HUANG Q, SU X. Waterlogging tolerance and wood properties of transgenic *Populus alba* × *glandulosa* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*Vgb*) [J]. *Journal of Forestry Research*, 2021, 32(2): 831-839.
- [39] 郑丽圆, 李宛莹, 喻林兵, 夏永军, 艾连中, 熊智强. 少动鞘氨醇单胞菌合成结冷胶研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(3): 298-303.
- ZHENG LY, LI WY, YU LB, XIA YJ, AI LZ, XIONG ZQ. Advances in the biosynthesis of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(3): 298-303 (in Chinese).