
分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学号: 2220520126

代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶

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

学生姓名: 孙鹏

指导教师: 刘立明 教授

校外导师: 刘瑞华 高级工程师

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 05 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：子, 月, 日

日期：2025 年 05 月 11 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☐。

学位论文作者名：孙小鹏

指导教师签名：刘明

日期：2025 年 05 月 11 日

日期：2025 年 05 月 11 日

代谢工程改造少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶

摘 要

结冷胶是少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 产生的高分子量胞外多糖, 具有优异的增稠性、凝胶性、乳化性和稳定性, 广泛应用于食品、化工、医药等多个领域。少动鞘氨醇单胞菌作为一种非模式生物, 缺乏成熟的用于菌种系统代谢工程改造的基因编辑工具, 限制了菌种生产性能的进一步提升。本研究优化了少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑方法, 并利用优化的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统强化结冷胶合成途径的调控蛋白 *gelA* 和 β -1,4-葡萄糖醛酸转移酶 *gelK* 表达, 构建的工程菌株利用 15 L 发酵罐进行分批补料发酵, 结冷胶产量达到 20.1 g/L。主要研究结果如下:

(1) 优化少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法。由于少动鞘氨醇单胞菌产生大量胞外多糖, 用常规方法制作的感受态细胞转化效率低, 为了提高感受态效率, 使用去离子水洗涤平板菌落, 分离不含胞外多糖的菌体并用甘油洗涤制备感受态细胞; 以宽宿主范围质粒 pBBR1 MCS2 为参考, 确定外源 DNA 片段最佳电转化条件为 2500 V/mm; 通过更换 pBBR1 MCS2 复制子, 筛选了可在少动鞘氨醇单胞菌菌株中复制和表达的 pET28a 和 pSC101 的复制子, 用于改造 CRISPR-Cas9、

CRISPR-cpf1 和 INTEGRATE 等系统中的质粒；以增强绿色荧光蛋白 eGFP 为报告蛋白表征现有基因编辑工具：pRK2013-pLO3 三亲接合、RecET-cre/loxP、CRISPR-Cas9、CRISPR-cpf1 和 INTEGRATE 的效率，CRISPR-Cas9 与 INTEGRATE 成功将 eGFP 基因整合至少动鞘氨醇单胞菌菌株基因组，其编辑效率分别为 92.3%和 75%。

(2)构建高产结冷胶工程菌株。选取 6 个不同来源的强启动子，以 eGFP 蛋白表征各启动子在少动鞘氨醇单胞菌中的强度，发现 P_{tac} 、 P_{23119} 和 P_{trc} 具有较强的启动能力，其强度为 $P_{tac} > P_{23119} > P_{trc}$ ；利用游离质粒分别过表达结冷胶合成路径关键基因 *pgm*、*vgb*、*gelA*、*gelK* 和 *gelD*，经摇瓶发酵验证，在强启动子 P_{tac} 驱动下，*gelA* 与 *gelK* 过表达结冷胶产量与粘度显著提高；使用优化的 CRISPR-Cas9 系统依次将 *gelA* 与 *gelK* 整合至少动鞘氨醇单胞菌基因组，获得重组菌株 FMME-GG07 与 FMME-GG08，经摇瓶发酵验证，结冷胶产量达到 10.8 g/L，粘度为 4683 mPa·S，较野生型分别提高了 130.2%和 85.1%。

(3) 高产结冷胶工程菌株发酵工艺优化。在 5 L 发酵罐中分别对碳源、氮源、pH、溶氧等发酵参数进行优化，确定蔗糖为最适碳源，并采用两阶段补料策略：发酵初始糖浓度为 30 g/L，发酵 20 h 时补加 10 g/L 蔗糖；使用 3‰ (w/v) 豆粕粉为氮源时，结冷胶产量达到最大值 (16.4 g/L)，较优化前提高了 8.6%；采用 pH-stat 控制策略，将发酵全程 pH 维持在 7.0 ± 0.2 ；设计两阶段溶解氧调控方案，在发酵前期 (0-12 h) 将搅拌转速控制在 450 rpm 以促进菌体快速增殖，

在发酵中后期（12-60 h）将搅拌转速提升至 600-1000 rpm，确保溶解氧浓度维持在 30%以上，以满足菌体代谢和产物合成需求；将上述最优发酵工艺放大至 15 L 发酵罐，使用 FMME-GG08 进行发酵生产，结冷胶的产量为 20.1 g/L，糖胶转化率为 0.5 g/g，生产强度为 0.34 g/L/h。

关键词：结冷胶，少动鞘氨醇单胞菌，基因编辑，代谢工程，CRISPR-Cas9

METABOLIC ENGINEERING OF *SPHINGOMONAS* *PAUCIMOBILIS* FOR THE PRODUCTION OF GELLAN GUM

ABSTRACT

Gellan gum is a high molecular weight extracellular polysaccharide produced by *Sphingomonas paucimobilis*. It exhibits excellent thickening, gelling, emulsifying, and stabilizing properties, making it widely applicable in various fields such as food, chemical, and pharmaceutical industries. As a non-model organism, *Sphingomonas paucimobilis* lacks well-established gene editing tools for systematic metabolic engineering, which significantly restricts the further enhancement of its production capabilities. This study optimized the gene editing methods for *Sphingomonas paucimobilis* and utilized an enhanced CRISPR-Cas9 gene editing system to overexpress the regulatory protein *gelA* and the β -1,4-glucuronosyltransferase *gelK* in the gellan gum synthesis pathway. The engineered strain achieved a gellan gum yield of 20.1 g/L through fed-batch fermentation in a 15 L fermenter. The main findings are as follows:

(1) Optimization of the gene editing method for *Sphingomonas paucimobilis*. Due to the production of large amounts of extracellular polysaccharides by *Sphingomonas paucimobilis*, the transformation

efficiency of competent cells prepared by conventional methods is low. To improve the efficiency of competent cells, deionized water was used to wash plate colonies, isolating cells free of extracellular polysaccharides, which were then washed with glycerol to prepare competent cells. Using the broad-host-range plasmid pBBR1 MCS2 as a reference, the optimal electroporation conditions for exogenous DNA fragments were determined to be 2500 V/mm. By replacing the replication origin of pBBR1 MCS2, replication origins from pET28a and pSC101 that could replicate and express in *Sphingomonas paucimobilis* were screened and used to modify plasmids in systems such as CRISPR-Cas9, CRISPR-Cpf1, and INTEGRATE. Enhanced green fluorescent protein (eGFP) was used as a reporter protein to characterize the efficiency of existing gene editing tools: pRK2013-pLO3 tri-parental conjugation, RecET-cre/loxP, CRISPR-Cas9, CRISPR-Cpf1, and INTEGRATE. Both CRISPR-Cas9 and INTEGRATE successfully integrated the eGFP gene into the genome of *Sphingomonas paucimobilis*, with editing efficiencies of 92.3% and 75%, respectively.

(2) Construction of a high-yield gellan gum engineered strain. Six strong promoters from different sources were selected, and the strength of each promoter in *Sphingomonas paucimobilis* was characterized using eGFP protein. The promoters P_{tac} , P_{23119} , and P_{trc} exhibited strong promoter activity, with their strengths ranked as $P_{tac} > P_{23119} > P_{trc}$. By overexpressing key genes in the gellan gum synthesis pathway *pgm*, *vgb*, *gelA*, *gelK*, and *gelD* on plasmids, shake flask fermentation experiments confirmed that overexpression of *gelA* and *gelK* under the control of the strong promoter P_{tac} significantly increased gellan gum yield and viscosity. Using the optimized CRISPR-Cas9 system, *gelA* and *gelK* were sequentially integrated into the genome of *Sphingomonas paucimobilis*,

resulting in strains FMME-GG07 and FMME-GG08. Shake flask fermentation experiments demonstrated that the gellan gum yield reached 10.8 g/L with a viscosity of 4683 mPa·S, representing increases of 130.2% and 85.1%, respectively, compared to the wild-type strain.

(3) Optimization of fermentation conditions for the high-yield gellan gum engineered strain. To further enhance the production and yield of gellan gum, fermentation parameters such as carbon source, nitrogen source, pH, and dissolved oxygen were optimized in a 5 L fermenter. Through carbon and nitrogen source optimization experiments, sucrose was identified as the optimal carbon source, and a two-stage feeding strategy was adopted: the initial sugar concentration was set at 30 g/L, and 10 g/L of sucrose was supplemented at 20 h of fermentation. Nitrogen source screening results indicated that, compared to peptone, using soybean meal powder as the nitrogen source only reduced gellan gum yield by 2.6%, but significantly lowered production costs. Further optimization revealed that when the initial concentration of soybean meal powder was 3‰ (w/v), the gellan gum yield reached its maximum (16.4 g/L), representing an 8.6% increase compared to pre-optimization levels. A pH-stat control strategy was employed to maintain the pH at 7.0 ± 0.2 throughout the fermentation process. A two-stage dissolved oxygen regulation scheme was designed: during the early fermentation phase (0-12 h), the stirring speed was controlled at 450 rpm to promote rapid cell proliferation, while in the mid-to-late fermentation phase (12-60 h), the stirring speed was increased to 600-1000 rpm to ensure the dissolved oxygen concentration remained above 30%, meeting the metabolic and product synthesis needs of the cells. The optimized fermentation process was scaled up to a 15 L fermenter, and strain FMME-GG08 was used for production. The gellan gum yield reached 20.1 g/L, with a sugar-to-gum

conversion rate of 0.5 g/g and a production intensity of 0.34 g/L/h.

Peng Sun (Biological and Pharmaceutical Engineering)

Supervised by Li Ming Liu

KEY WORDS: gellan gum, *Sphingomonas paucimobilis*, gene editing tool, metabolic engineering, CRISPR Cas9

目录

摘 要.....	IV
ABSTRACT.....	VII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 结冷胶概述	1
1.2 结冷胶简介	1
1.2.1 结冷胶的结构与性质	1
1.2.2 结冷胶的应用	2
1.2.3 结冷胶的生物合成	2
1.3 结冷胶的发酵生产	4
1.3.1 生产菌种	4
1.3.2 发酵培养基	5
1.3.3 发酵工艺	5
1.4 结冷胶生产菌株的代谢改造	6
1.4.1 强化合成主路径	6
1.4.2 敲除代谢支路	7
1.4.3 强化转运途径	7
1.5 高效的基因编辑技术	7
1.5.1 自杀质粒介导的基因编辑技术	7
1.5.2 重组酶介导的基因编辑技术	8
1.5.3 CRISPR 介导的基因编辑技术	9
1.6 研究意义与研究内容	10
1.6.1 本论文的立题背景与研究意义	10
1.6.2 本论文的主要研究内容	10
第 2 章 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的构建.....	12

2.1 引言	12
2.2 实验材料与仪器	12
2.2.1 实验材料	12
2.2.2 实验方法	17
2.3 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的构建	18
2.3.1 感受态细胞制备	18
2.3.2 转化条件优化	18
2.3.3 不同来源复制子筛选	18
2.3.4 基因编辑方法的构建与评估	18
2.4 结果与讨论	19
2.4.1 转化条件	19
2.4.2 复制子筛选	19
2.4.3 基因编辑方法构建	20
2.4.4 基因编辑方法验证	21
2.5 本章小结	22
第 3 章高产结冷胶工程菌株的构建	24
3.1 引言	24
3.2 实验材料与仪器	24
3.2.1 菌株与质粒	24
3.2.2 试剂与仪器	25
3.2.3 培养基	25
3.2.4 引物	25
3.3 启动子筛选	26
3.4 关键基因筛选	27
3.5 基因编辑	27
3.6 关键基因的基因组整合	27
3.6.1 <i>gelA</i> 基因的基因组整合	27
3.6.2 转化子结冷胶摇瓶验证	30

3.6.3 <i>gelK</i> 基因的基因组整合	31
3.7 结果与讨论	32
3.7.1 启动子筛选	32
3.7.2 关键基因筛选	32
3.7.3 质粒和整合框的构建	34
3.7.4 <i>gelA</i> 转化子筛选	35
3.7.5 FMME-GG07 菌株质粒消除	36
3.7.6 <i>gelK</i> 转化子筛选	36
3.7.7 FMME-GG08 菌株质粒消除	37
3.7.8 转化子的摇瓶验证	37
3.8 本章小结	38
第 4 章发酵工艺优化	40
4.1 引言	40
4.2 实验材料与仪器	40
4.2.1 菌株	40
4.2.2 试剂与仪器	40
4.2.3 培养基	40
4.3 发酵过程优化	41
4.3.1 菌株生长曲线测定	41
4.3.2 培养基组分优化	41
4.3.3 发酵条件优化	42
4.3.4 结冷胶发酵	42
4.4 结果与讨论	43
4.4.1 最优培养基组分	43
4.4.2 最佳发酵条件	44
4.4.3 15 L 罐发酵验证	45
4.5 本章小结	46
第 5 章 结论与展望	48

5.1 结论	48
5.2 展望	48
参考文献.....	50

第 1 章 绪论

1.1 结冷胶概述

结冷胶 (Gellan gum) 是由少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 产生的胞外多糖, 1978 年作为天然大分子多糖被首次分离。结冷胶具有独特的物理化学性质, 在低浓度下即可形成富有弹性、透明、强韧的凝胶^[1, 2], 具有良好的热稳定性和酸碱适应性, 因此, 结冷胶在许多应用中具有不可替代的优势^[3, 4], 尤其在食品、医药、化妆品和工业领域中备受关注^[5, 6], 成为天然多糖领域的研究热点。同时, 结冷胶的环境友好性和可持续性将使其在全球日益重视绿色和环保的背景下, 成为重要的生物材料之一。

结冷胶优异的凝胶特性是由其分子结构中具有高度结构重复性的线性多糖链决定的^[7], 多糖链与水分子形成强烈的相互作用, 最终在物理和化学环境的影响下形成凝胶^[8]。结冷胶的生物合成是通过少动鞘氨醇单胞菌细胞内的糖基转移酶催化多个高能活性单糖前体连接而完成的, 对这一过程的深入研究将揭示结冷胶的合成途径和相关酶的作用机制^[9]。未来, 随着生物技术和材料科学的不断进步, 结冷胶的应用领域将不断拓展。

1.2 结冷胶简介

1.2.1 结冷胶的结构与性质

结冷胶是由 D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸和 L-鼠李糖按 2: 1: 1 连接构成的阴离子线性四糖重复单元聚合物 (图 1-1), 其中葡萄糖残基通常由乙酰基和甘油酰基修饰, 其相对分子质量高达 1×10^6 Da^[10]。结冷胶有两种存在形式: 天然结冷胶 (高酰基结冷胶) 和低酰基结冷胶, 二者在结构上的区别在于, 前者在每个以 β -1,3-糖苷键连接的葡萄糖分子的 C2 位被 L-甘油酸酯化, C6 位被乙酸酯化。

结冷胶具有良好的流变性和凝胶特性^[11], 且易于降解、安全无毒^[12], 与传统的琼脂相比, 结冷胶具有更低的胶凝浓度和更高的凝胶强度, 可作为增稠剂、凝结剂、悬浮剂和成膜剂等应用于食品、医药和化妆品等领域^[13-15]。

结冷胶溶液具有典型的非牛顿流体特征, 其表观粘度随剪切速率增加而显著降低。在生理 pH 范围内, 结冷胶有着良好的 pH 稳定性, 其分子构象不受 pH

变化影响。在热稳定性研究过程中，发现结冷胶的热变性温度超过 150℃，这种高热稳定性源于其分子间强烈的氢键网络。

结冷胶还具有优良的生物相容性，可被特定 β -糖苷酶系降解。在哺乳动物消化系统中，结冷胶表现出抗消化酶特性，这种特性与其分子中的 β -糖苷键构型有关。此外，结冷胶能够显著促进双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和乳酸菌(*Lactobacillus*)等益生菌的增殖，同时抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)等条件致病菌的生长。

1.2.2 结冷胶的应用

结冷胶作为食品添加剂广泛应用于果冻、糖果、乳制品和无糖饮料等食品中^[16]。结冷胶的凝胶性质可通过不同的离子浓度、pH 值和温度条件下调控，使其在食品加工中具有多功能性^[17]。此外，与传统的食品凝胶剂相比，结冷胶具有更强的热稳定性，能够在较高的温度下保持凝胶结构，这使得它在高温加工过程中表现优异。

结冷胶在医药、化妆品、生物医学工程等领域也具有广泛应用。结冷胶作为生物相容性材料，可被用于制备缓释药物载体，具有优异的药物包埋能力和释放控制效果^[18]。结冷胶良好的凝胶性能和亲水性，使其成为一种理想的基质材料用于制备软膏、乳膏以及其他外用药物^[19]。结冷胶作为增稠剂和稳定剂，可在乳液和凝胶产品中提供理想的质感和稳定性^[20]。

随着对结冷胶功能化改性的深入研究，通过化学或酶促修饰引入不同的功能基团，可以调节结冷胶的粘度、凝胶强度以及水合作用，增强其生物降解性、抗菌性和抗氧化性，进而扩展其在工业和生物医药领域的应用范围^[21, 22]。此外，结冷胶在智能材料、生物传感器等新兴领域的应用潜力也正在被积极探索。

结冷胶凭借其独特的分子结构和丰富的理化特性，在食品稳定剂、药物载体、农业保水和化工稳定等多个行业中展现出广泛的应用潜力。随着研究的深入和技术的不断进步，结冷胶有望在未来发挥更大的作用，推动各行业的发展。

1.2.3 结冷胶的生物合成

结冷胶的生物合成包括糖核苷酸前体的合成、四糖重复单元的组装以及结冷胶的聚合和外排等环节^[23]，涉及多个关键基因的协同作用（图 1-1）。

糖核苷酸前体的合成是结冷胶生物合成的起始步骤^[24]，葡萄糖进入细胞后在葡萄糖磷酸变位酶(*pgm*)的催化作用下转化为 1-磷酸葡萄糖(1-P-Glucose)，

并分别在 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (*ugpG*) 和 TDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (*rmlA*) 的作用下转化为 UDP-D-葡萄糖 (UDP-D-Glucose) 和 dTDP-D-葡萄糖 (dTDP-D-Glucose), 一部分 UDP-D-葡萄糖在 UDP-葡萄糖脱氢酶 (*ugdG*) 的作用下生成 UDP-D-葡萄糖醛酸 (UDP-D-GlcA); dTDP-D-葡萄糖则在 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶 (*rmlB*)、dTDP-6-脱氧-D-葡萄糖异构酶 (*rmlC*)、dTDP-6-脱氧鼠李糖脱氢酶 (*rmlD*) 的作用下生成 dTDP-L-鼠李糖 (dTDP-L-Rhamnose); UDP-葡萄糖、UDP-葡萄糖醛酸和 dTDP-L-鼠李糖是组成结冷胶四糖重复单元的重要前体^[25, 26]。

四糖重复单元的组装是结冷胶生物合成的核心环节, 受细胞内的代谢状态和外部环境条件等多种因素的调控。首先, 糖基转移酶 *gelB* 将 UDP-D-葡萄糖连接到脂质载体上, 随后 β -1,4-葡萄糖醛酸转移酶 (*gelK*)、UDP-D-葡萄糖转移酶 (*gelL*) 和 dTDP-D-鼠李糖转移酶 (*gelQ*) 依次将 UDP-D-葡萄糖醛酸、UDP-D-葡萄糖和 dTDP-L-鼠李糖连接到延伸中的多糖链上, 形成了最初的四糖单元结构。

最后, 四糖重复单元在聚合酶 (*gelSGCE*) 的作用下聚合形成结冷胶多糖链, 并被分泌到细胞外, 这一过程不仅依赖于特定的输出蛋白 *gelD*, 还与细胞膜的流动性有关^[27]。

此外, 结冷胶合成过程中, 还会发生酰基化修饰形成高酰基结冷胶, 而脱酰基酶则会去除酰基基团产生低酰基结冷胶。酰基化修饰影响结冷胶的物理性质, 并决定了其在不同应用领域的性能^[5]。

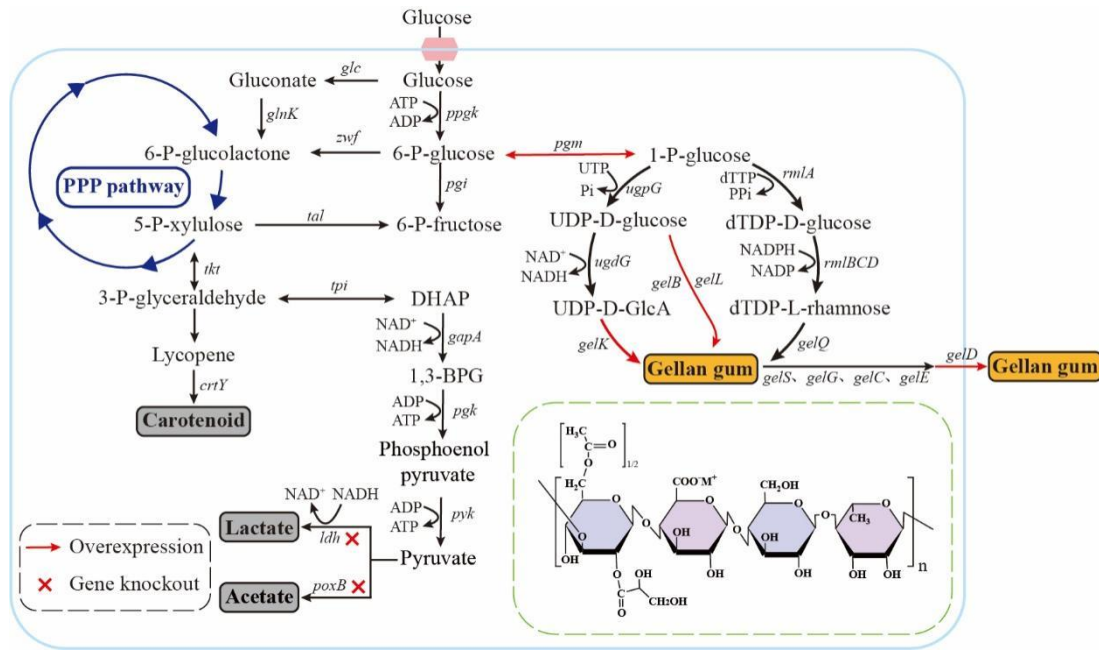


图 1-1 结冷胶合成路径和结冷胶结构式

Figure 1-1 Metabolic pathway and structural formula of gellan gum.

1.3 结冷胶的发酵生产

在工业化生产过程中，如何提高结冷胶产量、降低生产成本、提高产品的纯度和一致性，仍是一个重要的研究方向。近年来，基因工程技术和生物发酵工艺的进步为结冷胶的高效生产提供了新的可能，尤其是在发酵条件的优化和菌株改造方面的研究，显著提升了结冷胶的生产效率，并降低了生产成本^[25]。

1.3.1 生产菌株

目前，结冷胶的生产主要依赖于少动鞘氨醇单胞菌 ATCC 31461^[28]，该菌株产量较高、性能稳定且作为主要生产菌株有较为深入的研究。国内外新选育开发的菌株在性能稳定性及产量上均有所提升，通过紫外诱变和化学诱变筛选高产突变株，成功获得了结冷胶产量显著提高的菌株^[29, 30]。利用三亲接合等基因编辑技术敲除竞争途径中的关键基因，能够有效减少代谢分流，从而进一步提高结冷胶的积累^[30-32]，例如，林璟等人通过敲除葡萄糖代谢途径中的 *pgi* 和 *ppc*，使更多碳源流向结冷胶的合成路径，获得菌株的摇瓶产量达到 9.98 ± 0.13 g/L，相较于野生型菌株产量提高了 62.5%^[33]。此外，过表达结冷胶合成途径中的关键酶基因也被证明是提高产量的有效策略^[24, 34, 35]。例如，C.M. Manjusha 等人在质粒上过表达 *gelQ* 基因，构建了菌株 Recombinant Type-*gelQ*，通过 5 L 生物反应器发

酵 60 h 结冷胶产量达到 11.71 ± 0.2 g/L, 相较于野生型菌株产量提升了 45.6%^[35]。

1.3.2 发酵培养基

在结冷胶发酵生产过程中, 培养基中碳源、氮源、微量元素等营养成分的浓度和种类直接影响结冷胶的产量、结构、以及发酵过程的稳定性^[36], 通过系统调控可有效优化代谢流分布, 增强前体物质供应, 并调节关键酶活性, 从而实现结冷胶的高效合成与品质调控。

碳源的选择决定了生产菌株的生长速率和结冷胶的合成效率, 也影响着发酵液的 pH 变化以及最终产物的分子量、酰基水平等特性, 对生产不同品质的结冷胶具有工业指导意义^[37]。结冷胶发酵生产的碳源包括葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘油和麦芽糖等, 研究表明, 葡萄糖作为碳源时, 结冷胶的产量较高, 但若葡萄糖浓度大于 3.2%, 结冷胶的生物合成将受到抑制^[38]; 若在发酵过程中采取二次补加葡萄糖的策略, 能有效解除高浓度葡萄糖的抑制作用, 从而促进结冷胶的高效合成^[39, 40]。此外, 研究发现利用廉价碳源或者工业废渣替代葡萄糖、蔗糖等碳源可以有效降低生产成本, 如使用甘蔗工业中的废糖蜜或葡萄果渣发酵生产结冷胶, 可有效提高结冷胶的产率^[41]。

氮源主要包括有机氮源和无机氮源, 不仅影响微生物的生长和代谢, 还对结冷胶的产量和质量有着显著的影响^[42, 43]。有机氮源中含有丰富的氨基酸、微量元素、维生素, 对结冷胶合成具有促进作用, 同时有机氮源作为缓释氮源, 可维持培养基合适的碳氮比, 利于代谢朝利于结冷胶合成的方向进行, 能显著提高结冷胶的分子量和黏度^[44]。无机氮源在发酵过程中能够为微生物提供快速利用的氮源, 促进其生长和繁殖, 从而提高结冷胶的生产速率。因此, 在无机氮源培养基中, 菌株生长旺盛, 但结冷胶产量不高; 使用有机氮源时, 菌体量不高而产量相对较高^[45]。

金属离子、生物素、维生素等微量元素作为多种酶的辅基, 可显著影响结冷胶的合成效率和分子特性。例如, Ca^{2+} 不仅参与细胞膜稳定性, 还能与结冷胶分子交联增强其凝胶强度及稳定性^[46]。在发酵培养基中添加 Mn^{2+} , 结冷胶的产量提高了近一倍。

1.3.3 发酵工艺

结冷胶发酵生产过程中, 温度、pH、溶氧、搅拌速度等发酵条件对结冷胶

的产量、分子量及发酵液的流变学特性有显著影响。

结冷胶发酵温度一般在 28-32℃之间，温度过高或过低都会对菌体的代谢活动产生抑制作用，从而影响结冷胶的合成。采用两阶段温度法发酵，即第一阶段 33℃促进菌体生长，第二阶段降低温度至 25℃促进结冷胶合成，相比恒温培养产胶率提高 1 倍以上^[47]。

发酵液 pH 是另一个重要的参数，适宜的 pH 不仅有助于细菌的生长，还能优化结冷胶的产量和凝胶性质。少动鞘氨醇单胞菌在中性至弱酸性环境中生长最好，pH 值过高或过低都会抑制其生长并影响结冷胶的合成，最佳 pH 一般在 6.8-7.4 之间^[48]。

结冷胶发酵体系为高黏体系，随着多糖的积累，发酵液增厚，黏度逐渐增大，因此，通气和搅拌成为影响整个发酵过程的关键参数。氧容量不足会限制细菌的呼吸作用，导致菌体生长缓慢进而影响多糖的合成。适当的搅拌速度可以增强气体传递效率，保证细菌在发酵过程中获得充足的氧气，从而促进其生长和代谢；还可以有效混合发酵液，避免形成停滞层，从而提高结冷胶的产量^[49]。研究表明，分阶段溶氧控制对结冷胶发酵生产具有促进作用，即在发酵前期（0-30 h），保持 30%溶氧，在发酵后期（30-60 h）增加溶氧^[50]。此外，在发酵不同阶段添加适量低浓度双氧水，不仅不会影响菌体生长，还可促进结冷胶产生^[51]。溶氧条件不仅直接影响结冷胶产率，同时影响酰基含量和分子量，较高溶氧条件下生产的结冷胶其乙酰基含量较低，而甘油酰基含量和分子量都较高。

生物反应器的形状和构造对结冷胶的动力学及流变学特性也会产生很大的影响。

综上所述，通过改进生产菌种，优化培养基组分，结合系统调控温度、pH、溶氧、搅拌速率等发酵参数，可实现结冷胶生物合成途径的精准调控，从而显著提升产物得率并确保其品质稳定性，将为结冷胶的高效生产提供可靠的技术支撑。

1.4 结冷胶生产菌株的代谢改造

1.4.1 强化合成主路径

通过优化代谢流和关键酶活性实现结冷胶合成路径的强化。首先，增强中心碳代谢途径如糖酵解途径（EMP）和磷酸戊糖途径（PPP），如过表达葡萄糖激酶和磷酸葡萄糖异构酶基因，提高前体物质 UDP-葡萄糖的供应^[33, 52]。其次，强

化结冷胶合成的关键酶活性，如通过基因编辑技术增加 UDP-葡萄糖脱氢酶和结冷胶合酶的拷贝数，或利用启动子工程提高关键酶的表达水平，促进结冷胶的聚合，实现结冷胶的高效生产^[53]。

1.4.2 敲除代谢支路

在结冷胶合成过程中，细胞内存在黄色类胡萝卜素合成途径、聚羟基脂肪酸酯（PHB）合成途径、乳酸和乙酸等竞争性代谢支路，影响了代谢流^[54]。聚羟基脂肪酸酯合成途径是主要的竞争支路之一，消耗大量乙酰辅酶 A，降低菌株的糖胶转化率，通过敲除 PHB 合酶（*phaC*），可有效阻断该途径^[30]。乳酸合成途径是 EMP 途径的支路，在无氧条件下，丙酮酸能够被 NADH 还原为乳酸，通过敲除乳酸脱氢酶基因（*ldhA*），从而增强中心碳代谢流向结冷胶合成。三羧酸循环（TCA 循环）异柠檬酸作为关键代谢节点，通过调控异柠檬酸裂解酶基因（*aceA*）的表达水平，可有效调节碳代谢流向，减少碳源向 CO₂ 的流失，进一步提高前体物质的利用率^[55]。

1.4.3 强化转运途径

通过过表达细胞膜上的转运蛋白基因，如 ABC 转运蛋白家族相关基因，可以显著增强结冷胶前体物质的跨膜运输效率，从而加速结冷胶的合成与分泌^[9]。过表达 UDP-葡萄糖转运蛋白基因（*ugpA* 或 *ugpB*），能够提高 UDP-葡萄糖从胞内向胞外的转运速率，为结冷胶的聚合提供充足的前体物质^[34, 56]。此外，通过敲除或弱化竞争性转运途径中的关键基因，如与胞外多糖（EPS）合成相关的转运基因 *gelD*、*gelN* 等，可以减少碳源分流，进一步提高结冷胶的产量^[57]。

1.5 高效的基因编辑技术

1.5.1 自杀质粒介导的基因编辑技术

1.5.1.1 三亲接合

三亲接合是指携带游动质粒的辅助菌株协助含有重组质粒的供体菌株将重组质粒转移至受体菌株即目的菌株中。在这一过程中，辅助质粒提供游动和转移功能，重组质粒含有转移起点，能够被辅助质粒特异性地识别并转移至目标菌株内；此外，重组质粒含有可在供体菌中复制的复制起点，以及抗性标记基因和反向筛选标记基因，因此，重组质粒由于无法在目的菌株中复制而不能以游离形式存在于染色体之外，只能通过质粒上目的基因的上下游同源臂经同源重组整合入

染色体,最后经过在反向筛选压力下进行第二次同源重组,实现目的基因的敲除或整合^[58]。

三亲接合是目前结冷胶生产菌株基因改造的主要手段。该技术采用含辅助质粒 pRK2013 的辅助菌株 *E. coli* HB101,含重组自杀质粒 pLO3 的供体菌株 *E. coli* S17-1,已用于敲除乙酰基转移酶基因 (*nat*),构建低酰基结冷胶生产菌株,显著提高了结冷胶产率^[59];敲除八氢番茄红素脱氢酶基因 (*crtI*),构建不产黄色素的生产菌株,便于结冷胶提取纯化^[54];进一步敲除 PHB 合成关键酶基因 *phaC*,接合负荷诱变,构建了高产低杂生产菌株,最终结冷胶产率为 15.43 g/L,为野生型菌株 ATCC 31461 的 1.6 倍^[30]。然而,三亲接合技术的效率相对较低,筛选过程复杂,菌株需要多次传代验证,限制了其在结冷胶生产菌株改造的应用。

1.5.1.2 pK18mobsacB 系统

pK18 质粒介导的基因编辑技术通过二次同源交换重组实现基因组的精准编辑,具有操作简便、效率高、适用范围广等优点^[60],广泛用于谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造。例如,通过 pK18mobsacB 系统对六个调控草酰乙酸和 α -酮戊二酸分支的基因进行过表达或敲除,动态调节优化三羧酸循环和碳通量,降低了副产物的合成,获得了高产 4-羟基异亮氨酸的菌株^[61]。然而,该系统存在回复突变频率高、*sacB* 易失活导致转化子筛选耗时长、编辑效率低、遗传操作复杂等问题。

1.5.2 重组酶介导的基因编辑技术

1.5.2.1 RecET 系统

RecET 系统是一种基于细菌 RecET 重组酶的基因组编辑工具,主要依赖 RecE 和 RecT 两种酶的协同作用实现目标 DNA 片段的重组与插入^[62]。RecE 酶能识别并切割 DNA 的特定区域,生成带有单链重组末端的 DNA 断裂,而 RecT 酶则能够促使与切割区域互补的 DNA 片段在宿主基因组中发生同源重组。RecET 系统的优势在于其高度的重组效率和广泛的应用范围,在细菌、酵母等微生物以及哺乳动物细胞中都表现出较强的稳定性。然而,RecET 系统对同源重组酶的依赖较强,在缺乏同源重组酶的菌株中很难应用,且其操作难度较高,对重组条件的控制更加严格^[63]。

1.5.2.2 Cre-LoxP 系统

Cre-LoxP 系统基于噬菌体 P1 的 Cre 重组酶与 LoxP 位点的特异性识别与重组机制进行基因编辑。Cre 重组酶识别并切割 LoxP 位点之间的 DNA 序列，导致该区域的 DNA 片段被敲除或倒位，从而实现基因的敲除或调控^[64]。该系统通过在不同细胞类型中使用不同 Cre 重组酶驱动元件，实现在特定组织或细胞中空间特异性的基因敲除或表达调控。该系统具有精确调控的特性，但由于 LoxP 位点的非特异性重组风险，可能导致在不同细胞群体中发生不可预期的基因重组^[65]。

1.5.3 CRISPR 介导的基因编辑技术

1.5.3.1 CRISPR-Cas9 系统

CRISPR-Cas9 系统是一种源自细菌免疫系统的基因编辑工具，能够精确地在基因组中引入定向变异。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 序列是一类细菌和古菌基因组中特有的 DNA 序列，其包含来自病毒的间隔序列，这些间隔序列作为“记忆”，使得细菌能够识别和抵御特定的病毒。Cas9 蛋白作为一种特异性核酸酶，通过与向导 RNA (gRNA) 形成功能复合体，利用 gRNA 与靶 DNA 序列的特异性碱基互补配对机制，实现基因组精确定位，并在目标位点诱导产生 DNA 双链断裂^[66]。在细胞内同源重组修复 (HDR) 系统的作用下，通过引入外源修复模板，精确地引入目标基因的修改^[67]。

CRISPR-Cas9 技术具有高效性、精准性、操作简便、技术和成本低等特点，但脱靶效应对其精确性和安全性构成了挑战，此外该系统在某些特定的细胞类型或组织中编辑效率较低^[68]。

1.5.3.2 CRISPR-Cpf1 系统

CRISPR-Cpf1 (Cas12a) 系统通过单 RNA (crRNA) 引导 Cpf1 核酸酶识别并切割靶 DNA 序列。与 Cas9 系统相比，Cpf1 具有操作简单、重组效率高、可编辑范围广、蛋白尺寸小等特性，在药物体内递送、精准基因插入和特定基因组位点编辑等特定应用场景展现出独特优势^[69]，但仍需通过 PAM 序列识别范围扩展、酶活性优化及递送系统改进等策略进一步提升性能^[70]。

1.5.3.3 INTEGRATE

INTEGRATE 系统是一种基于位点特异性整合酶系统的新型基因组编辑平台。整合酶复合体通过其固有的 DNA 识别与催化功能，在不依赖宿主细胞 HDR

或 NHEJ 修复机制的情况下，直接介导供体 DNA 在基因组靶位点的精准插入，克服了传统基因编辑技术对细胞修复通路的依赖性，同时避免了双链断裂的产生，显著降低基因组不稳定性及脱靶效应风险，显著提高了大片段 DNA 整合的精确性和效率^[71]。INTEGRATE 系统高效的编辑效率在外源基因精准插入应用中展现出独特的技术优势。但其编辑效率存在显著的细胞类型和物种依赖性，且外源整合酶可能诱发宿主免疫反应，影响编辑效果，仍需通过整合酶定向进化、递送系统优化及免疫原性调控等策略，进一步提升其适用性和可靠性^[71, 72]。

1.6 研究意义与研究内容

1.6.1 本论文的立题背景与研究意义

少动鞘氨醇单胞菌具有独特的代谢多样性，可合成鞘氨醇类脂质和功能性多糖等在药品、化妆品及食品中广泛应用的高附加值化合物；同时，由于其优异的环境适应性，作为合成生物学领域的新型底盘细胞，为人工细胞工厂的设计提供了新的可能性，在生物合成领域展现出显著的应用价值。然而，由于该菌株潜在的限制性修饰系统对外源 DNA 的修饰和降解、以及固有低遗传操作效率，现有基因编辑工具无法适用该菌株，相关代谢途径及调控机制尚未完全阐明，制约了鞘氨醇单胞菌细胞工厂的构建和工业化生产进程。

因此，开发适用于该菌株的高效基因编辑平台，通过优化 DNA 递送系统、构建特异性重组酶体系以及消除限制性修饰屏障等策略，进行系统性的基因敲除或过表达重构代谢途径，突破现有技术的限制，深入解析其生物合成途径及代谢调控网络，实现复杂基因线路的精确组装与动态调控，从而构建具有新型代谢功能的工程菌株，为优化其工业应用性能、拓展其在合成生物学领域的应用潜力提供重要的技术支撑。

1.6.2 本论文的主要研究内容

（1）少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的构建：筛选可在少动鞘氨醇单胞菌中复制和表达的复制子元件，优化现有基因编辑系统，构建可用于少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑工具；

（2）高产结冷胶工程菌株的构建：筛选结冷胶合成途径的关键酶，使用优化的基因编辑系统在少动鞘氨醇单胞菌基因组增加关键酶拷贝数，构建结冷胶高产菌株；

(3) 高产结冷胶工程菌株发酵工艺优化：利用 5 L 罐对碳源、氮源、pH、溶氧等发酵工艺进行优化，利用工程菌株在 15 L 发酵罐上发酵生产结冷胶，并评估结冷胶产量、黏度和分子量等关键指标。

第 2 章 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的构建

2.1 引言

目前，结冷胶生产菌种的改造均采用三亲接合法，该方法结合了自杀质粒与细菌接合转移机制，其核心在于利用供体细胞、辅助细胞以及携带目的基因的自杀重组质粒，实现受体细胞高效、精确地基因编辑，避免了传统转化或电穿孔方法中可能遇到的细胞壁屏障问题，从而显著提高了基因编辑效率；由于自杀质粒的特异性，使得仅整合到菌株基因组的转化子才可以在特定的筛选平板上生长，便于目的菌株的筛选；此外，该技术具有广泛的宿主适用性，不仅可用于多种细菌系统，还可扩展至真核细胞，为跨物种基因功能研究提供了重要工具^[73]。然而，该技术也存在一定的局限性，例如，在复杂基因组中可能发生脱靶效应，导致非目标位点的意外编辑，引发潜在的基因功能紊乱或细胞毒性；受供体细胞与受体细胞相容性的限制，在某些宿主中表现出较低的转移效率；接合转移过程中可能引发基因编辑元件的扩散，存在生物安全风险^[31]。

伴随着基因编辑技术的发展，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；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。INTEGRATE 技术在特定插入和稳定表达方面表现出色。但上述基因编辑方法未应用于少动鞘氨醇单胞菌的遗传改造。

本研究基于少动鞘氨醇单胞菌特点对上述基因编辑系统进行特异性改造，评估了各系统在其中的编辑效率，建立了适用于少动鞘氨醇单胞菌的基因编辑方法。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 菌株与质粒

本研究中使用的菌株和质粒如表 2-1 所示。

表 2-1 本研究使用的菌株和质粒

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<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
Plasmids		
pBBR1 MCS2	pBBR1 <i>oriV</i> , Kan ^r , P _{T7} , lacZa	采购自 Addgene
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

2.2.1.2 试剂

质粒提取试剂盒购于生工生物工程股份有限公司（上海）；胶回收试剂盒、同源重组酶 ClonExpress II One Step Cloning Kit 和高保真酶 Phanta Max Master Mix（Dye Plus）购于南京诺维赞生物科技有限公司；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，豆粕粉购于山东万德福生物科技有限公司。本研究所用引物见表 2-2，由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2.2.1.3 培养基

LB 培养基（g/L）：蛋白胨 10，酵母粉 5，氯化钠 10。固体培养基中添加琼脂粉 20。

YPG 培养基（g/L）：葡萄糖 20，酵母膏 3，蛋白胨 5。

YM 固体培养基（g/L）：葡萄糖 10，蛋白胨 5，麦芽抽提物 3，酵母粉 3，琼脂粉 20。

以上培养基均使用氢氧化钠调 pH 到 7.0-7.2 之间，葡萄糖和蔗糖灭菌温度为 115℃、15 min，其余组分均在 121℃条件下灭菌 20 min。

2.2.1.4 引物

表 2-2 本研究使用的引物
Table 2-2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Sizes (bp)
pBBR1-F	CTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTG	23
pBBR1-R	AAGCACACGGTCACACTGCTTCC	23
gyrb-F	CTCGACGATGTGGTGATCG	19
gyrb-R	GAGGAGCTCAAGACGGTCG	19
gelA-F	GAGAAGCATGTAAGCGAGGAG	21
gelA-R	CTGGGATTGTCGTATAGCAG	20
gelK-F	GACGTCGTAATCTCGACAG	19
gelK-R	CTGGACGATCGAGATCGTG	19
tac-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAATTAATCATCGGCTCG	41
tac-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	43
	C	
trc-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAATTAATCATCCGGCTCG	44
	TA	
trc-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	43
	C	
J23119-eGFP-F	ACTGGCCTCAGGCATTTGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG	43
	G	
J23119-eGFP-R	AGCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	44
	CC	
araB-eGFP-F	ACTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTG	46
	CATC	
araB-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	43
	C	
P1-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGTGGCGTGCAAATATCTCTAACGA	45
	AC	
P1-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	43
	C	
P51-eGFP-F	CTGGCCTCAGGCATTTGAGCCGGTAGCAAATGGGGGCGGCT	47
	TTGTAG	
P51-eGFP-R	GCAGTGTGACCGTGTGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	43
	C	
pBBR1-RecET-F	GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA	22
pBBR1-RecET-R	GATATCGAATTCCTGCAGCCC	21
	R	
SacB-RecET-F	GGCTGCAGGAATTCGATATCCACATATACCTGCCGTTCACT	41
SacB-RecET-R	AGCCGATGATTAATTGTCAATTATTTGTAACTGTTAATTGTC	47
	CTTG	
RecET-F	TTGACAATTAATCATCGGCTCG	22
RecET-R	TCACTGGCCAATCTCCCGGC	20

arac-F	GCCGGGAGATTGGCCAGTGATTATGACAACTTGACGGCTAC	41
arac-R	ACGGTCAGTAAATTGGACATATGGAGAAACAGTAGAGAGTT GC	43
Cre-RecET-F	GCCGGGAGATTGGCCAGTGATTATGACAACTTGACGGCTAC	41
Cre-RecET-R	ATCGCCATCTTCCAGCAGGCGCAC	24
lacI-RecET-F	CCGGAAGCATAAAGTGTAATCACTGCCCCGCTTTCCAGTC	40
lacI-RecET-R	ACTCATTAGGCACCCCAGGCGACACCATCGAATGGCGCAAA ACCT	45
pBBR1-ori-F	AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTCTACCGGCGCGGCAGCGTGA	40
pBBR1-ori-R	GAAAAGATCAAAGGATCTTCGCGGCCACCGGCTGGCTCGCT TC	43
pCas9-F	ACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTA	24
pCas9-R	GGTTCTTATGGCTCTTGTATCTATC	25
pSC101-ori-F	GATACAAGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGC CAG	45
pSC101-ori-R	GCGGAACTGACTAAAGTAGTGAGTTATACACAGGGCTGGGA TC	43
pSGN20-F	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGG	25
pSGN20-R	AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTAC	25
pJYS-F	GGCCCGGTGAACAGTTGTTCTAC	23
pJYS-R	CTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCC	24
UP-RecET-F	GCATCGTCTCGCAGACCTCGAGGCTG	26
UP-RecET -R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGGC	25
Down-RecET-F	CAGCGGCTCCAGATCGCGGAAAGGG	25
Down-RecET-R	CGGATCGAAGCCTATGCCGATGCCG	25
eGFP-RecET-F	GAAGGGGAGGGGCTTGATGTCATATCGTCAATTATTACCTC CACG	46
eGFP-RecET-R	CGGTTGGGAATGTAATTCAGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCA TGCC	46
CmR-RecET-F	AGCTGAATTACATTCCCAACCGCG	24
CmR-RecET-R	CTTTCGCGATCTGGAGCCGCTGCAACTTAAATGTGAAAGTG GGTC	46
pSPIN-ldhA-F	CGAGGTCATTTCGCGGGATCCCATATCGTCAATTATTACCTC CACG	46
pSPIN-ldhA-F	CACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCC	47
pSPIN-F	GGCAGTTATTGGTGCCCTTCTAGA	24
pSPIN-R	GGATCCCCGGAAATGACCTCGAGG	24
eGFP-pSPIN-F	CATATCGTCAATTATTACCTCCACG	25
eGFP-pSPIN-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	24
UP-cas-F	GCATCGTCTCGCAGACCTCGAGGCTG	26
UP-cas-R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGGC	25
Down-cas-F	CAGCGGCTCCAGATCGCGGAAAGGG	25
Down-cas-R	CGGATCGAAGCCTATGCCGATGCCG	25

eGFP-cas-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTC CACG	46
eGFP-cas-R	CTTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCC	47
pN20-ldhA-F	GGAAAACCTGTTCCGCGCCTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA G	43
pN20-ldhA-R	AAGGCGCGGAACAGTTTTCCACTAGTATTATACCTAGGACTG AG	44
pJYS101-ldhA-F	AAGGCGCGGAACAGTTTTCCCCGGATCTACAACAGTAGAAA TTCGGATCCAT	52
pJYS101-ldhA-R	CCGGGGAAAACCTGTTCCGCGCCTTATTTAAATAAAACGAAA GGCTCAGTCG	51
UP-ldhA-500-F	CACCACCGAGTTGATTTCTGGATGC	26
UP-ldhA-500-R	CGTGAGCCTTCCTTTTCGTGCCGCG	25
Down-ldhA-500-F	TCAGCCCGGCCGCTTCTCGAACGTC	25
Down-ldhA-500-R	GTTCGAGGAGTTCCTCCACGAAGC	25
eGFP-pJYS-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTC CACG	46
eGFP-pJYS-R	CTTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCC	47
pLO3-F	TCTAGAGTCGACTGTTTAAACCTGCAG	27
pLO3-R	GAGCTCGAATTAAAGGATCTAGGTGAAG	28
UP-pLO3-F	CACCTAGATCCTTTAATTCGAGCTCAATAGCCGGCGATGTTG AGCAGCCC	50
UP-pLO3-R	ACATCCAAGCCCCTCCCCTTCAGG	24
Down-pLO3-F	TCAGCGGCTCCAGATCGCGGAAA	23
Down-pLO3-R	TTTAAACAGTCGACTCTAGAACACCTATTACAGCGACACGC	41
eGFP-pLO3-F	GAAGGGGAGGGGCTTGGATGTCATATCGTCAATTATTACCTC CACG	46
eGFP-pLO3-R	CTTTCCGCGATCTGGAGCCGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCC	47

2.2.1.5 仪器和设备

T100 Thermal Cycler PCR 仪、PowerPacTM 基础电泳仪、Gel Doc EZ 凝胶成像仪、Gene Pluser Xcell 电穿孔仪，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；QWZY-WFC3 往复式震荡培养箱，太仓市强文实验设备有限公司；Nano Drop 分光光度计，赛默飞世尔科技有限公司；SHIMADZU UVmini-1280 紫外可见分光光度计，岛津仪器（苏州）有限公司；真空冷冻干燥机，上海继谱电子科技有限公司

公司; BROOKFIELD DV2T 粘度计, 美国阿美特克-博勒飞公司; BLBIO-15SJ 15 L 不锈钢发酵罐, 上海百仑生物科技有限公司。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 基因组、质粒抽提及片段回收

基因组和质粒抽提: 将-80℃保藏的少动鞘氨醇单胞菌在 YM 固体培养基上划线活化, 在 30℃培养至长满菌落, 使用无菌去离子水洗脱。8000 rpm 离心收集菌体, 分别利用基因组提取试剂盒及质粒小提试剂盒进行提取。

片段回收: PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 利用胶回收试剂盒提取。

2.2.2.2 感受态的制备

少动鞘氨醇单胞菌感受态细胞制备: 将少动鞘氨醇单胞菌菌株接种至 YM 液体培养基中, 在 30℃往复式摇床中培养至对数生长中期, 吸取 30-50 μ L 菌液在固体平板上划线, 待平板长满菌落, 使用无菌去离子水洗脱。将洗脱液冰浴冷却后, 离心收集菌体, 并用预冷的 10%甘油重悬细胞 2-3 次。重悬后的细胞在冰浴中孵育一段时间, 以进一步增强细胞膜的通透性。最后, 将细胞分装并保存于-80℃备用。

大肠杆菌 MG1655 感受态细胞制备: 将大肠杆菌 MG1655 接种至 LB 液体培养基, 37℃摇床培养至对数中期, 转接 30 μ L 菌液至新鲜 LB 液体培养基, 培养 OD₆₀₀ 至 0.6-0.8 范围内, 冰浴 15 min, 在 4℃、5000 rpm 条件下离心收集菌体, 使用预冷的 10%甘油洗涤两次, 分装并保存于-80℃备用。

2.2.2.3 复制子筛选

在复制子筛选过程中, 以 pBBR1 MCS2 为质粒骨架, 更换不同来源的复制子元件, 获得的重组质粒转化少动鞘氨醇单胞菌, 在卡那抗性平板上筛选阳性克隆, 确定可在少动鞘氨醇单胞菌中复制和表达的复制子。

2.2.2.4 基因编辑工具优化

分别使用 pSC101 和 pBBR1 MCS2 质粒复制子, 替换 INTEGRATE、CRISPR-Cpf1、RecET-Cre/loxP、CRISPR-Cas9 四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。

2.2.2.5 荧光信号测定

将待测样品加入酶标板的孔中，确保样品分布均匀且无气泡。根据荧光物质的特性，设置酶标仪的激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 520 nm，启动检测程序，仪器扫描并记录荧光强度数据。检测完成后，分析荧光信号强度，结合内参基因 *gyrB* 表达强度，计算 *gelA* 与 *gelK* 的浓度。

2.3 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑方法的构建

2.3.1 感受态细胞制备

从甘油保藏管中吸取 20 μ L 菌液，稀释后涂布在 YM 平板，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，6000 rpm、4°C 离心 5 min，收集菌体，用预冷的 10% 甘油洗涤 2-3 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。

2.3.2 转化条件优化

向 2.3.1 制备的感受态细胞中加入 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 1600、1800、2000、2200、2500 V/mm 5 个梯度。电击结束后，向电击杯中加入 800 μ L YPG 培养基，转移至无菌 EP 管中，30°C、220 rpm 培养 1 h，6000 rpm 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。

2.3.3 不同来源复制子筛选

选择 6 个不同质粒来源的复制子，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，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 pBBR1-101 ori、pBBR1-pk18 ori、pBBR1-RK2 ori、pBBR1-ColE1 ori、pBBR1-pET28a ori 和 pBBR1-pVS1 ori。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，根据转化子数量，确定最佳复制子。

2.3.4 基因编辑方法的构建与评估

以 CRISPR-Cas9 基因编辑方法为例：通过 PCR 扩增获得 pSC101 ori 和 pBBR1 MCS2 ori，分别用于替换质粒 pCAS9 和 pTarget 复制子，获得质粒 pCAS 和 pN20；PCR 扩增 *ldhA* 位点上下游 500 bp 做为同源臂，同时扩增由 P_{tac} 启动子

表征的 eGFP 片段，通过融合 PCR 构建敲除框。最后通过筛选平板上阳性转化子正确率计算基因编辑效率。

2.4 结果与讨论

2.4.1 转化条件

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，本研究使用梯度电压进行电击试验，结果显示，当电击电压为 2500 V/mm 时，转化子数量最多。

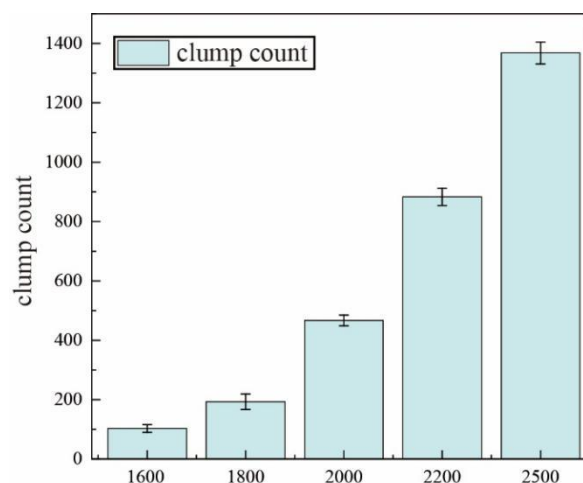


图 2-1 不同电压转化平板菌落数统计

Figure 2-1 Colony count statistics on plates after transformation with different voltages

2.4.2 复制子筛选

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，RK2 ori 和 pVS1 ori 为假单胞菌中常用的质粒复制子。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。转化子数量结果如图 2-2A 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 2-2B）。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。

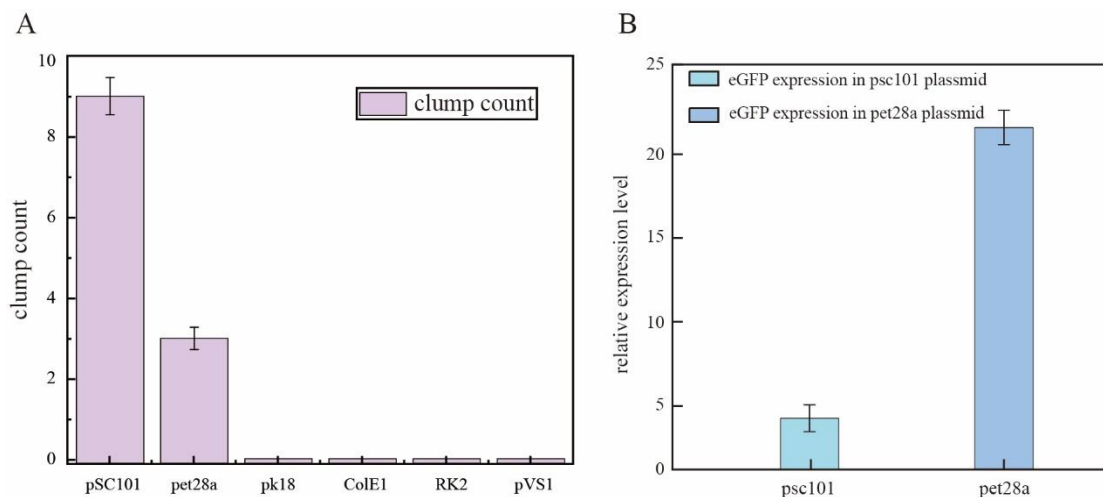


图 2-2 不同来源质粒复制子的验证 A：不同复制子平板菌落数统计. B：不同质粒在少动鞘氨醇单胞菌菌株中的拷贝数.

Figure 2-2. 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 *Sphingomonas paucimobilis* strains.

2.4.3 基因编辑方法构建

将 INTEGRATE、CRISPR-Cpf1、RecET-Cre/loxP、CRISPR-Cas9 四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，通过筛选平板阳性转化子比例评估各编辑系统的编辑效率。

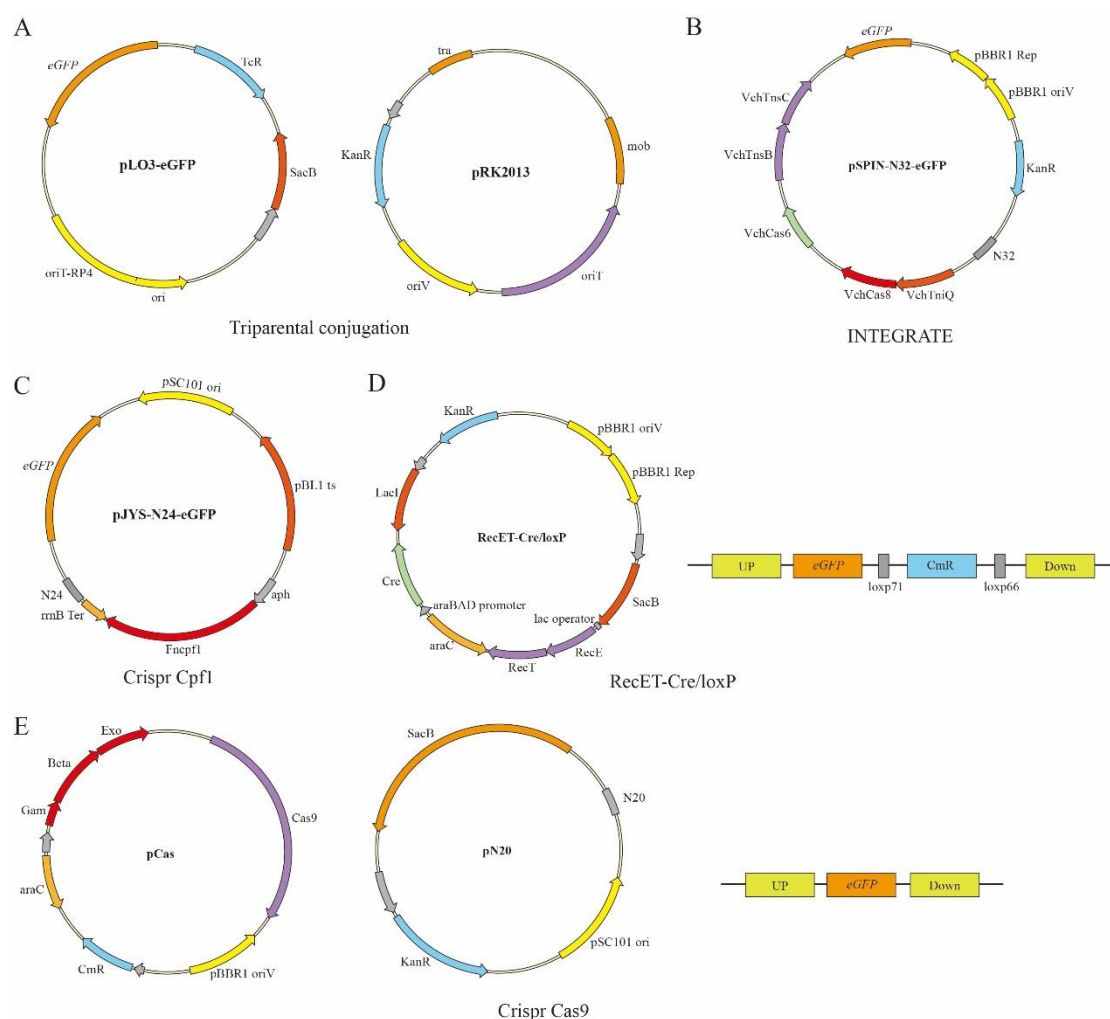


图 2-3 少动鞘氨醇单胞菌基因编辑系统构建 A: 三亲接合系统的 pLO3-eGFP 重组质粒和游动质粒 pRK2013 质粒的图. B: INTEGRATE 系统质粒图. C: CRISPR Cpfl 系统质粒图. D: RecET-Cre/loxP 系统质粒图和目的基因整合框. E: CRISPR Cas9 系统质粒图和目的基因整合框.

Figure 2-3 Construction of *S. 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 Cpfl 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.

2.4.4 基因编辑方法验证

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 22 个和 12 个(图 2-4A)。相较于 INTEGRATE,在少动鞘氨醇单胞菌中 CRISPR-Cas9 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 2-4B、2-4C)。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 个菌株出现核苷酸位点突变,基因编辑整合效率为 75%。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。

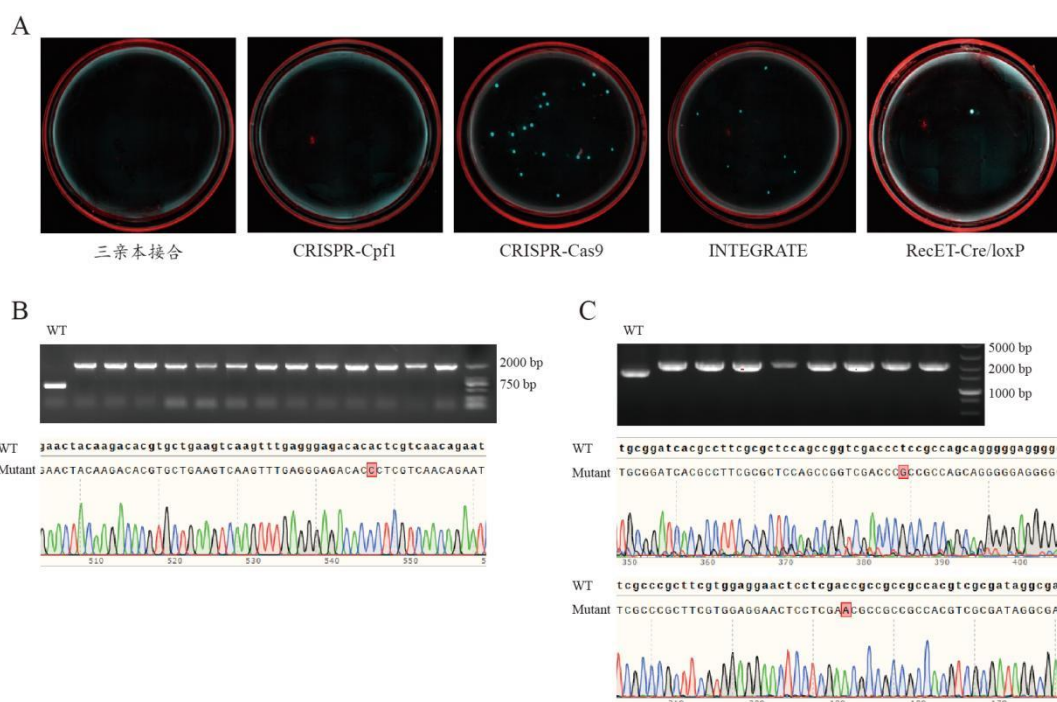


图 2-4 基因编辑系统验证 A: 不同基因整合系统荧光显色平板. B: CRISPR Cas9 平板荧光菌株 PCR 验证电泳图和突变菌株测序图. C: INTEGRATE 平板荧光菌株 PCR 验证电泳图和突变菌株测序图

Figure 2-4 Verification of gene editing systems A: Fluorescent colorimetric plate for different gene integration systems. B: CRISPR Cas9 INTEGRATE plate fluorescent strain PCR validation electrophoresis map and mutant strain sequencing map. C: Plate fluorescent strain PCR validation electrophoresis map and mutant strain sequencing map.

2.5 本章小结

本章节从大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌和假单胞菌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，本研究结果表明，来源于质粒 pSC101 和 pET28a 的复制子均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。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，CRISPR-Cas9 系统表现出更高的编辑效率。

第 3 章高产结冷胶工程菌株的构建

3.1 引言

野生型少动鞘氨醇单胞菌在结冷胶发酵生产中表现出显著的技术瓶颈，严重制约了产物的产量、质量及经济性^[74]。结冷胶天然合成能力低下主要源于代谢途径的固有缺陷：前体物质供应不足、关键酶活性受限以及代谢通量分配失衡等因素共同导致底物利用率低和代谢流失控^[73]。同时，菌株固有的代谢调控网络缺乏对结冷胶合成途径的特异性调控，易受竞争性代谢途径的干扰，进一步降低了糖胶转化效率^[75]。因此，基于代谢工程和合成生物学策略，通过系统优化菌株的代谢途径和调控网络，是实现结冷胶高效生物合成的关键突破口。

在少动鞘氨醇单胞菌的基因改造研究中，研究者通过整合代谢工程和合成生物学策略，对野生型菌株进行了系统性优化，显著提升了结冷胶的产量和糖胶转化率。通过过表达结冷胶合成途径中的关键基因（如 *gel* 基因簇），有效增强了前体物质向目标产物的代谢通量^[76]，此外，引入启动子工程和核糖体结合位点（RBS）优化等外源调控元件，进一步提高了关键酶的表达水平和催化效率^[53]。通过敲除竞争性代谢途径的关键基因，减少代谢分流，使碳源更高效地定向流向结冷胶合成途径^[32]，例如，敲除 *pgi*、*ppc* 基因，结冷胶产量相较于野生型菌株提高了 62.5%^[33]。

本章节首先筛选了结冷胶合成路径中的限速步骤，随后利用改造的 CRISPR-Cas9 系统对出发菌株进行基因组编辑。通过强化合成路径关键基因 *gelA* 和 *gelK* 的表达，并敲除副产物合成相关基因 *ldhA* 和 *poxB*，成功构建了 FMME-GG08 菌株。该菌株在摇瓶发酵中的结冷胶产量达到 10.8 g/L，较出发菌株提高了 130.2%，显著提升了结冷胶的生产效率。

3.2 实验材料与仪器

3.2.1 菌株与质粒

本研究中使用的菌株和质粒如表 3-1 所示。

表 3-1 本研究使用的菌株和质粒

Table 3-1 Strains and plasmids used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
Strains		
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 $\Delta ldhA::P_{tac}$ - <i>gelA</i>	This study
FMME-GG08	FMME-GG07 $\Delta poxB::P_{tac}$ - <i>gelK</i>	This study
Plasmids		
pLO3	RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i> , Tc ^r , SacB	Lab stock
pRK2013	RP4 <i>oriT</i> , Kan ^r , <i>oriT</i> , trfA	Lab stock
pJYS	pSC101 <i>ori</i> , Fncpf1, P _{J23119}	采购自 Addgene
pSPIN	pBBR1 <i>oriV</i> , Cm ^R , P _{J23119}	采购自 Addgene
pCas9	pSC101 <i>ori</i> , Amp ^r	采购自 Addgene
pSGN20	pET28a <i>ori</i> , Kan ^r , SacB,	采购自 Addgene
pCas	pSC101 <i>ori</i> , Cm ^r	This study
pN20	pBBR1 <i>oriV</i> , Kan ^r , SacB,	This study
pRecET-Cre/loxP	pBBR1 carrying lox-Cm ^R -lox, Cre	This study
pBBR1-tac	pBBR1 carrying P _{tac} promoter	This study
pBBR1-trc	pBBR1 carrying P _{trc} promoter	This study
pBBR1-J23119	pBBR1 carrying P _{J23119} promoter	This study
pBBR1-araB	pBBR1 carrying P _{araB} promoter	This study
pBBR1-P ₁	pBBR1 carrying P ₁ promoter	This study
pBBR1-P ₅₁	pBBR1 carrying P ₅₁ promoter	This study
pBBR1-pgm	pBBR1 carrying P _{tac} - <i>pgm</i> cassette	This study
pBBR1-vgb	pBBR1 carrying P _{tac} - <i>vgb</i> cassette	This study
pBBR1-gelA	pBBR1 carrying P _{tac} - <i>gelA</i> cassette	This study
pBBR1-gelK	pBBR1 carrying P _{tac} - <i>gelK</i> cassette	This study
pBBR1-gelD	pBBR1 carrying P _{tac} - <i>gelD</i> cassette	This study

3.2.2 试剂与仪器

详见 2.2.1.2 与 2.2.1.3

3.2.3 培养基

详见 2.2.1.4

3.2.4 引物

表 3-2 本研究使用的引物

Table 3-2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Sizes (bp)
pLO3-F	TCTAGAGTCGACTGTTTAAACCTGCAG	27
pLO3-R	GAGCTCGAATTAAAGGATCTAGGTGAAG	28

pBBR1-pgm-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTC G	43
pBBR1-pgm-R	AGGTCGACGGTATCGATAAGGCTTTCGTCGGGATGACAGAA GTAGG	46
pBBR1-vgb-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTC G	43
pBBR1-vgb-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTCGAGTTACTCGACGGCCT G	42
pBBR1-gelA-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTC G	43
pBBR1-gelA-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCGCCCAGCGACAAGCATGGT TAAC	45
pBBR1-gelK-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTC G	43
pBBR1-gelK-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGTTGTAGTGCGGGATGAC GACGCTG	48
pBBR1-gelD-F	CTGCAGGAATTCGATATCAAGTTGACAATTAATCATCGGCTC G	43
pBBR1-gelD-R	GAGGTCGACGGTATCGATAAGGTGTGCCTCGTCCGCTGCCAT CATTG	47
YZ-ldhA-F	GGAAGTCGCTGGGGGTGGTCGTGATC	26
YZ-ldhA-R	GTTCTCGACACCAAGCAGTGGAAC	25
pN20-poxB-F	CATGCACGCGATCCGCGTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AG	43
pN20-poxB-R	CGACGCGGATCGCGTGCATGACTAGTATTATACCTAGGACTG AG	44
UP-poxB-F	GACCGTAGCAGCGTTGATGACCGAC	25
UP-poxB-R	GAGCCGATGATTAATTGTCAAGCTCAGCCGCTCGGCGAGCT GCTG	45
Down-poxB-F	GTCGTCATCCCGCACTACAATCAGCCGGTGCGGCCTTGCGCC TCTTC	47
Down-poxB-R	GAGCGACGAGCCCTTCCTGCTG	22
YZ-poxB-F	CTCCCGCTGACCAGAGCGCAATC	23
YZ-poxB-R	GAACCGTGGGTCGGCAGAAAGGTG	24

3.3 启动子筛选

根据先前研究,选择6个启动子,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^[77]、trc-eGFP-F/R^[78]、J23119-eGFP-F/R^[79]、araB-eGFP-F/R^[80]、P₁-eGFP-F/R^[81]、P₅₁-eGFP-F/R^[81],以不同启动子基因和 eGFP 为模板进行融合 PCR,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_l-eGFP、pBBR1 MCS2-P₅₁-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, 挑取单菌落接种至 YPG 液体培养基, 根据菌液荧光强度/OD₆₀₀ 比值确定启动子强度。

3.4 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^[82]、pBBR1 MCS2-P_{tac}-vgb^[83]、pBBR1 MCS2-P_{tac}-gelA、pBBR1 MCS2-P_{tac}-gelK^[84]和 pBBR1 MCS2-P_{tac}-gelD^[27], 并分别转化至 FMME-GG01 感受态, 构建重组菌株 FMME-GG02~FMME-GG06。

3.5 基因编辑

菌株的基因组编辑采用 CRISPR-Cas9 技术, 以整合 *gelA* 到 *ldhA* 为例: 首先, 将 *ldhA* 序列输入网站 <http://www.rgenome.net/cas-designer> 设计 sgRNA, 通过反向 PCR 把 sgRNA 序列构建在 pTarget 质粒上; 随后, 以工程菌株的全基因组为模板, PCR 扩增 *ldhA* 基因的上下游约 500 bp 的同源臂和 *gelA* 片段, 然后将上下游同源臂和 *gelA* 进行融合 PCR 获得敲除框。

将 pCas 质粒转入少动鞘氨醇单胞菌获得 *Spau*-pCas 菌株, 而后将 pTarget 和敲除框分别添加 600 ng 和 1200 ng 到 *Spau*-pCas 菌株的感受态细胞中, 冰浴 15 min 后电转化, 涂布在卡那霉素和氯霉素双抗平板上, 通过菌落 PCR 筛选阳性转化子。将筛选到的阳性转化子转接到蔗糖培养基中丢失 pTarget 质粒; 42°C 培养 24 h 丢失 pCas 质粒。

3.6 关键基因的基因组整合

3.6.1 *gelA* 基因的基因组整合

3.6.1.1 质粒构建

采用引物对 pN20-ldhA-F 和 pN20-ldhA-R, 以 pN20 质粒为模板进行 PCR 扩

增, 扩增可以特异性识别 *ldhA* 基因的 pN20 质粒。随后, 利用 DpnI 酶对 PCR 产物进行消化处理。DpnI 是一种能够特异性识别并切割甲基化 DNA 的限制性内切酶, 通过这一步骤可以有效去除模板质粒, 从而保留新合成的、未甲基化的 PCR 产物, 从而提高目的质粒构建的成功率。

经过 DpnI 消化后的产物, 通过热激法转入 *E.coli* JM109 感受态细胞中。将转化后的细胞涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上, 并在 37°C 的恒温条件下过夜培养, 筛选出含有重组质粒的菌株。最后从平板上挑取单菌落, 进行测序验证, 以确保所获得的目的序列与预期序列完全一致。对于测序结果正确的菌株, 进行转接培养, 以扩大菌株的培养规模, 并从中提取获得 pN20-*ldhA* 质粒。后续实验中质粒构建均与此相同。

3.6.1.2 整合框构建

以少动鞘氨醇单胞菌基因组为模板, 首先利用引物对 UP-*ldhA*-500-F/R 和 Down-*ldhA*-500-F/R 分别扩增 *ldhA* 基因上下游各 500 bp 的序列。随后, 使用引物对 UP-*ldhA*-500-F 和 Down-*ldhA*-500-R, 以上下游同源臂和 *gelA* 基因为模板进行融合 PCR, 构建 *gelA* 整合框。

最后, 通过琼脂糖凝胶电泳对融合 PCR 产物进行验证, 以确认其大小是否与预期的 *gelA* 整合框一致, 并对条带大小正确的产物进行胶回收处理, 以获取目的基因 *gelA* 的整合框片段。

3.6.1.3 质粒整合及转化子筛选

首先, 制备 FMME-GG01 菌株的感受态细胞, 并通过电转化法将改造后的 pCas 质粒导入其中。将转化后的菌液均匀涂布于含有氯霉素抗性的 YM 平板, 置于 30°C 恒温培养箱中培养 48 h。培养结束后, 挑取单菌落进行验证。随后, 将验证成功的 FMME-GG01/pCas 菌株再次制备成感受态细胞。将 3.5.1 步骤中制备的 pN20 质粒与 *gelA* 基因整合框按 1:3 的比例混合, 加入感受态细胞中, 通过电转化法将其转入 FMME-GG01 菌株。具体操作如下: 冰浴 15 min 后, 在 2500 V/mm 条件下进行电转化。转化完成后, 加入 800 μ L 含有阿拉伯糖的 YPG 液体培养基, 于 30°C、220 rpm 条件下继续培养 1 h。培养结束后, 将菌液在 5000 rpm 条件下离心 2 min, 弃去上清, 将残留菌液充分混匀后涂布于含有卡那霉素和氯霉素的双抗性 YM 平板上, 置于 30°C 恒温培养箱中培养。最后, 挑取单菌落进

行菌落 PCR 验证。

3.6.1.4 质粒消除

为了消除 pN20 质粒,首先挑选单菌落接种于含有 15%蔗糖的 YM 培养基中,培养 12 h。蔗糖的加入能够诱导 sgRNA 序列靶向 pN20 质粒,从而实现质粒的消除。随后,将培养后的菌液均匀涂布于氯霉素抗性的 YM 平板上,挑选单菌落以获得 pN20 质粒消除的菌株。为了验证质粒是否成功消除,将长出的单菌落分别在氯霉素抗性平板以及氯霉素与卡那霉素双抗性平板上划线。若菌落仅在氯霉素抗性平板上生长而在双抗性平板上不生长,则表明 pN20 质粒已成功消除。

为了消除 pCas 质粒,首先将菌株在 42℃条件下培养,以诱导质粒的消除。随后,将培养后的菌液均匀涂布于无抗的 YM 平板上,挑选单菌落以获得 pCas 质粒消除的菌株。为了验证质粒是否成功消除,将长出的单菌落分别在无抗性平板和氯霉素抗性平板上划线。若菌落仅在无抗性平板上生长而在氯霉素抗性平板上不生长,则表明 pCas 质粒已成功消除。后续实验中质粒消除均与此相同。

3.6.1.5 荧光定量 PCR

从菌液中提取 RNA,确保提取的纯度和完整性,之后使用通过反转录酶将其转化为 cDNA。设计特异性引物对 (gyrB-F/R、gelA-F/R、gelK-F/R),确保与目标序列高度匹配,避免引物二聚体和非特异性扩增。配置反应体系后,将反应体系置于 PCR 仪中,设置扩增程序。

表 2-3 q-PCR 体系

Table 2-3 q-PCR system

组分	体积 (μL)
2× SYBR Green Mix	10
正向引物	0.5
反向引物	0.5
cDNA 模板	2
RNase-free H ₂ O	7

表 2-4 q-PCR 扩增程序

Table 2-4 q-PCR amplification procedures		
温度 (°C)	时间 (s)	循环数
95	30	1
95	5	40
60	30	
95	15	1
12	∞	1

3.6.2 转化子结冷胶摇瓶验证

3.6.2.1 转化子摇瓶发酵

将构建完成并成功消除 pCas 和 pN20 质粒的菌株在种子斜面上划线，置于 30°C 恒温培养箱中培养 48 h。培养结束后，用 10 mL 无菌去离子水洗涤斜面，收集菌体，并吸取 1 mL 洗脱的菌液接种至装有 30 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中。将摇瓶置于 30°C、180 rpm 的往复式摇床中培养 14 h，作为一级种子液。随后，取 1 mL 一级种子液转接至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中，在相同条件下继续培养 7 h，作为二级种子液。最后，取 10 mL 二级种子液接种至装有 90 mL 发酵培养基的 500 mL 带挡板摇瓶中，于 28°C、150 rpm 的往复式振荡摇床中培养 60 h，完成发酵过程。

3.6.2.2 结冷胶产量测定

取 5 mL 发酵液，根据其粘度用去离子水稀释 4 至 10 倍，粘度越高稀释倍数越大。将稀释后的发酵液置于沸水中加热 5 至 10 min，随后在常温下 8000 rpm 离心 30 min，分离菌体沉淀和上清液。向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇，剧烈振荡混匀后，置于 4°C 条件下过夜沉降约 12 h。沉降完成后，在 4°C、8000 rpm 条件下离心 10 min，分别收集沉淀和上清液。将收集的沉淀用无水乙醇漂洗，以去除色素等杂质。将漂洗后的沉淀转移至预先烘干并称重 (W1) 的圆形小铝箔盒中，在 60°C 下烘干至恒重 (W2)。通过公式“结冷胶产量 = (W2 - W1) × 200 (单位: g/L)”计算结冷胶的产量^[85]。

3.6.2.3 细胞干重（DCW）检测

将上述 2.3.2.2 中分离得到的菌体沉淀收集到预先烘干并称重（W3）的圆形小铝箔盒中，将小铝箔盒置于 60℃烘干至恒重（W4）；最后，通过公式“生物量 = (W4 - W3) × 200（单位：g/L）”计算发酵液的菌体干重。

3.6.2.4 发酵液粘度测定

在发酵过程中，取 35 mL 发酵液，置于 50 mL 离心管中，使用粘度计测定粘度，测试条件为 4 号转子、25℃、10 rpm。

3.6.3 *gelK* 基因的基因组整合

3.6.3.1 质粒构建

采用引物对 pN20-poxB-F 和 pN20-poxB-R，以 pN20 质粒为模板进行 PCR 扩增，扩增可以特异性识别 *poxB* 基因的 pN20 质粒。构建方法与 3.5.1.1 相同。

3.6.3.2 整合框构建

以少动鞘氨醇单胞菌基因组为模板，首先利用引物对 UP-poxB-500-F/R 和 Down-poxB-500-F/R 分别扩增 *poxB* 基因上下游各 500 bp 的序列。随后，使用引物对 UP-poxB-500-F 和 Down-poxB-500-R，以上下游同源臂和 *gelK* 基因为模板进行融合 PCR，构建 *gelK* 整合框。

最后，通过琼脂糖凝胶电泳对融合 PCR 产物进行验证，以确认其大小是否与预期的 *gelK* 整合框一致，并对条带大小正确的产物进行胶回收处理，以获取目的基因 *gelK* 的整合框片段。

3.6.3.3 质粒整合及转化子的筛选

首先，制备 FMME-GG07 菌株的感受态细胞，并将改造后的 pCas 质粒通过电转化法导入 FMME-GG07 菌株中。将转化后的菌液涂布于含有氯霉素抗性的 YM 平板上，在 30℃条件下恒温培养 48 h，随后挑取单菌落进行验证。接下来，将验证成功的 FMME-GG07/pCas 菌株再次制备成感受态细胞。将 3.6.1 中制备的 pN20 质粒与 *gelK* 基因整合框按 1:3 的比例混合，加入感受态细胞中，并通过电转化法将其转入 FMME-GG07 菌株中。最后，将转化后的菌液涂布于含有卡那霉素和氯霉素的双抗 YM 平板上，在 30℃条件下恒温培养，并挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。

3.6.3.4 质粒消除

详见 3.6.1.4

3.6.3.5 转化子结冷胶摇瓶验证

详见 3.6.2.1

3.6.3.6 结冷胶产量的测定

详见 3.6.2.2

3.7 结果与讨论

3.7.1 启动子筛选

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_1 和 P_{S1} 启动子都能在少动鞘氨醇单胞菌中启动 eGFP 表达, P_{tac} 、 P_{trc} 和 P_{J23119} 展现出较强的启动能力, 其中 P_{tac} 表现出最高表达强度 (图 3-1)。因此, 后续研究使用 P_{tac} 启动子用于重组酶的表达。

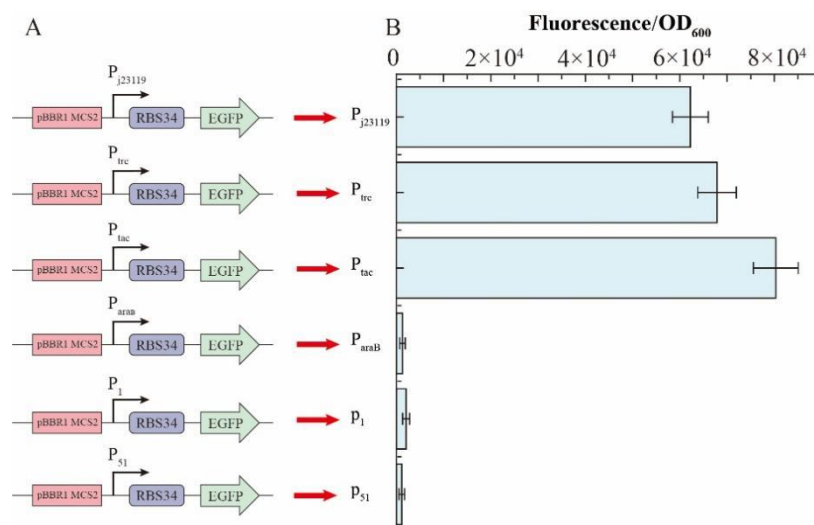


图 3-1 启动子强度表征 A: 不同来源强组成型启动子表达质粒的构建. B: 摇瓶发酵 24 h 菌株的荧光/OD₆₀₀.

Figure 3-1: Characterization of Promoters Strength A: Construction of strongly composed promoter expression plasmids from different sources. B: Fluorescence /OD₆₀₀ of strain fermented in flask for 24 h.

3.7.2 关键基因筛选

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,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粘度的影响,其中对照组为转化了空 pBBR1 MCS2 质粒的菌株。

摇瓶结果显示(图 3-2),过表达 *gelA* 基因,结冷胶产量达到 7.2 g/L,发酵液粘度 3780 mPa·S,较对照菌株分别提高了 53.1%和 49.4%;过表达 *gelK* 基因,结冷胶产量无显著提升,但发酵液粘度达到 4750 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粘度均无显著影响。以上结果表明 *gelA* 和 *gelD* 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 中增加这两个基因的拷贝数,以构建结冷胶高产菌株。

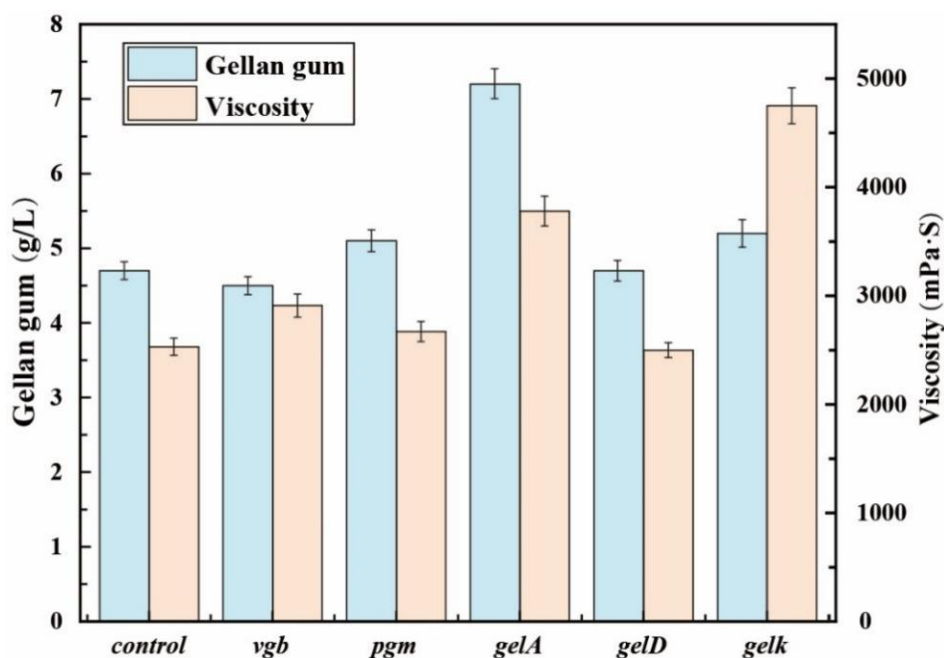


图 3-2 重组菌株的摇瓶验证

Figure 3-2 Shaken bottle verification of recombinant strains

3.7.3 质粒和整合框的构建

3.7.3.1 pN20 质粒构建

以 pN20 质粒为模板，使用引物对 pN20-ldhA-F 和 pN20-ldhA-R 进行 PCR 扩增，扩增可以特异性识别 *ldhA* 基因的 pN20 质粒。将构建完成后在平板上长出的单菌落挑选出来，进行测序验证，验证结果与目的序列进行比对，序列结果完全一致，pN20-ldhA 质粒构建成功。

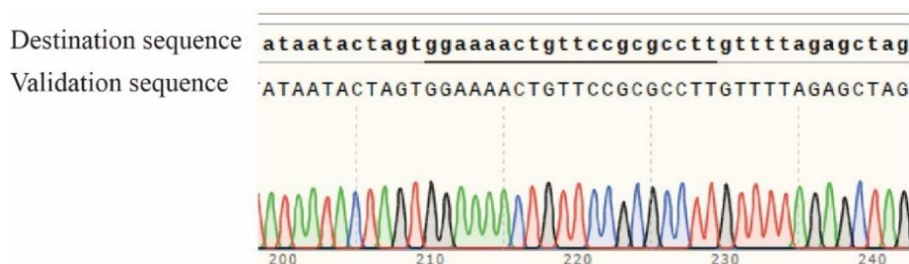


图 3-3 pN20-ldhA 质粒测序图谱

Figure 3-3 Plasmid sequencing of pN20-ldhA

以 pN20 质粒为模板，使用引物对 pN20-poxB-F 和 pN20-poxB-R 进行 PCR 扩增，扩增可以特异性识别 *poxB* 基因的 pN20 质粒。将构建完成后在平板上长出的单菌落挑选出来，进行测序验证，验证结果与目的序列进行比对，序列结果完全一致，pN20-poxB 质粒构建成功。

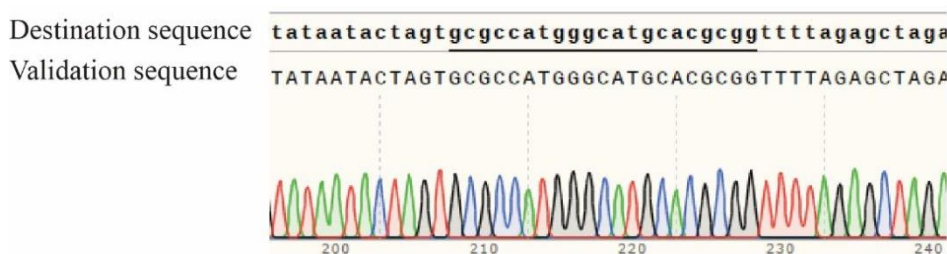
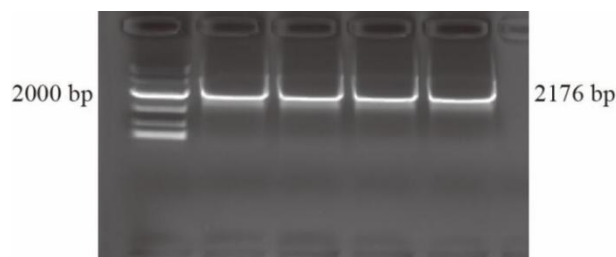


图 3-4 pN20-poxB 质粒测序图谱

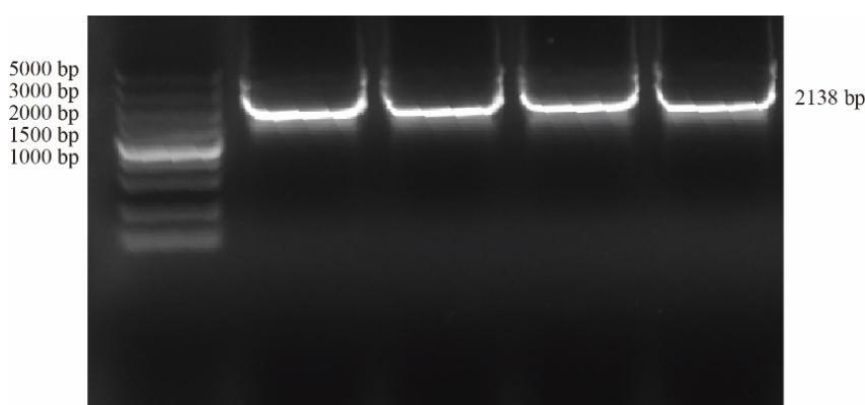
Figure 3-4 Plasmid sequencing of pN20-poxB

3.7.3.2 整合框构建

选取 *ldhA* 位点上下游各 500 bp 做为同源臂，与 *gelA* 基因进行连接，构建 *gelA* 基因整合框 UP-*gelA*-Down，片段大小为 2176 bp。

图 3-5 *gelA* 基因整合框胶图Figure 3-5 *gelA* gene integration frame glue map

选取 *poxB* 位点上下游各 500 bp 做为同源臂，与 *gelK* 基因进行连接，构建 *gelK* 基因整合框 UP-*gelK*-Down，片段大小为 2138 bp。

图 3-6 *gelK* 基因整合框胶图Figure 3-6 *gelK* gene integration frame glue map

3.7.4 *gelA* 转化子筛选

将改造后的 pCas 质粒转入 FMME-GG01 菌株中。使用阿拉伯糖诱导 cas 质粒的同源重组酶表达，最后通过电击法将 pN20 质粒和 *gelA* 基因整合框导入 FMME-GG01 菌株中，在含有卡那霉素和氯霉素的 YM 平板上培养至长出单菌落。使用引物对 YZ-ldhA-F/R，以单菌落为模板进行 PCR 验证，验证结果如图 3-7。不能扩增得到 *ldhA* 基因，同时可以得到 *gelA* 基因，说明成功敲除 *ldhA* 基因，并整合 *gelA* 基因到少动鞘氨醇单胞菌基因组中，重组菌株编号为 FMME-GG07。

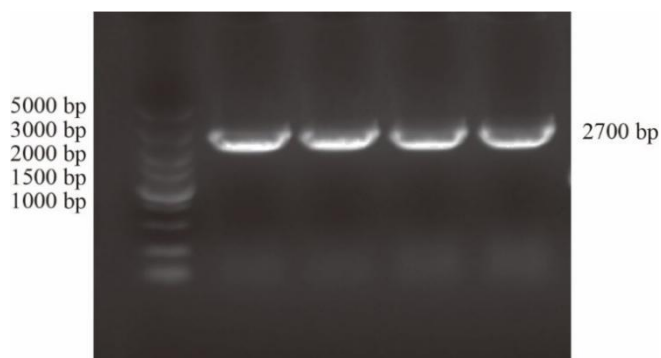


图 3-7 FMME-GG07 菌株菌落 PCR 验证

Figure 3-7 PCR verification of the colony of strain FMME-GG07

3.7.5 FMME-GG07 菌株质粒消除

3.7.5.1 N20 质粒消除

为消除 pN20-ldhA 质粒，首先挑选 FMME-GG07 单菌落接种于含有 15%蔗糖的 YPG 培养基中，在 30℃、180 rpm 条件下培养 12 h。蔗糖的加入能够诱导 sgRNA 序列靶向 pN20 质粒，从而实现质粒的消除。随后将菌液涂布到氯霉素抗性的 YM 平板上，挑取单菌落获得 pN20-ldhA 质粒消除的菌株。为验证 pN20-ldhA 质粒是否成功消除，将单菌落分别在氯霉素抗性的 YM 平板和氯霉素与卡那霉素双抗性的 YM 平板上进行划线验证。

菌株在氯霉素抗性的 YM 平板上能够生长，而在氯霉素与卡那霉素的双抗性 YM 平板上无法生长，表明 pN20-ldhA 质粒成功消除。

3.7.5.2 cas9 质粒消除

为消除 pCas 质粒，首先将 3.6.4.1 中消除了 pN20 质粒的菌株接种到 YPG 培养基中，并在 42℃、180 rpm 条件下培养，以诱导 pCas 质粒的消除。随后，将培养后的菌液均匀涂布于无抗的 YM 平板上，挑选单菌落以获得 pCas 质粒消除的菌株。为了验证质粒是否成功消除，将单菌落菌株分别在无抗性的 YM 平板和氯霉素抗性的 YM 平板上划线验证。

菌株在无抗性的 YM 平板上能够生长，而在氯霉素抗性的 YM 平板上无法生长，表明 pCas 质粒成功消除。

3.7.6 *gelK* 转化子筛选

将改造后的 pCas 质粒转入 FMME-GG07 菌株中。添加阿拉伯糖诱导同源重组酶表达，最后通过电击法将 pN20-poxB 质粒和 *gelK* 基因整合框导入

FMME-GG07 菌株中,在含有卡那霉素和氯霉素的 YM 平板上培养至长出单菌落。使用引物对 YZ-poxB-F/R, 以单菌落为模板进行 PCR 验证, 验证结果如图 3-8。不能扩增得到 *poxB* 基因, 同时可以得到 *gelK* 基因, 说明成功敲除 *poxB* 基因, 并整合 *gelK* 基因到少动鞘氨醇单胞菌基因组中, 重组菌株编号为 FMME-GG08。

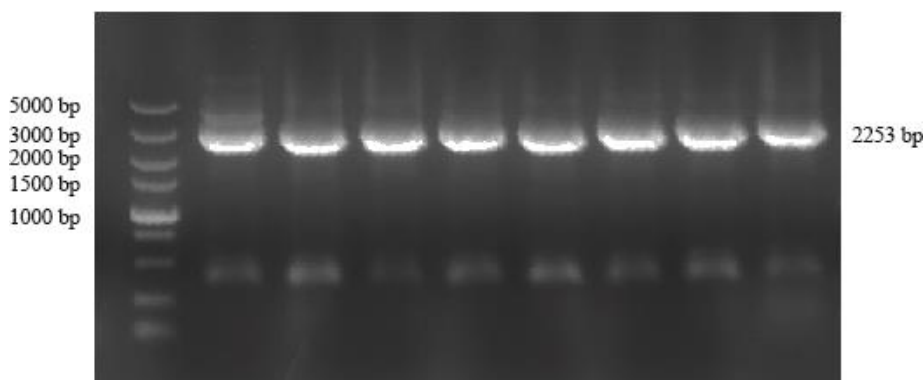


图 3-8 FMME-GG08 菌株菌落 PCR 验证

Figure 3-8 PCR verification of the colony of strain FMME-GG08

3.7.7 FMME-GG08 菌株质粒消除

3.7.7.1 N20 质粒消除

菌株在氯霉素抗性的 YM 平板上能够生长, 而在氯霉素与卡那霉素的双抗性 YM 平板上无法生长, 表明 pN20-poxB 质粒成功消除。

3.7.7.2 cas9 质粒消除

菌株在无抗性的 YM 平板上能够生长, 而在氯霉素抗性的 YM 平板上无法生长, 表明 pCas 质粒成功消除。

3.7.8 转化子的摇瓶验证

转接 10 ml 二级种子液到装有 90 ml 发酵培养基的 500 ml 带挡板摇瓶中, 并在 28°C、180 rpm 的往复式摇床中发酵培养 60 h。发酵过程中分别对发酵液中菌体干重和结冷胶产量进行测定。并选取 4 个发酵时间点测定 *gelA* 与 *gelK* 基因的转录水平。

结果如图 14 所示, 在发酵过程中, 重组菌株 FMME-GG08 中 *gelA* 和 *gelK* 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, 发酵液粘度为 4683 mPa·S, 较 FMME-GG01 分别提高了 130.2%和 85.1%。

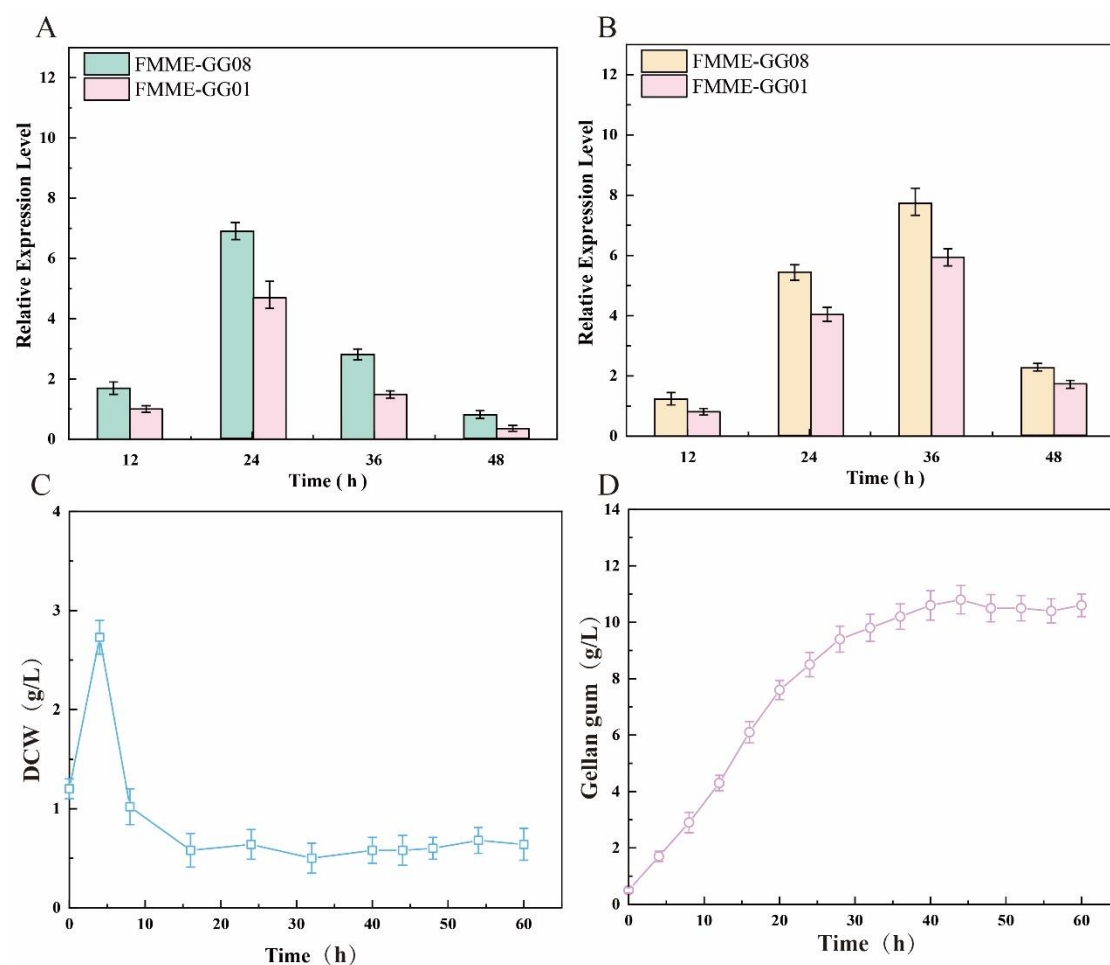


图 3-9 FMME-GG08 摇瓶发酵参数 A: *gelA* 基因转录水平比较. B: *gelK* 基因转录水平比较.

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 3-9 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.

3.8 本章小结

本章节首先利用增强绿色荧光蛋白表征不同启动子在少动鞘氨醇单胞菌中的调控强度，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调控元件。此外，本研究根据调研选取 5 种结冷胶合成相关基因，并验证他们在质粒水平上表达对结冷胶产量的影响，成功筛选到对结冷胶产量有促进作用的 *gelA* 和 *gelK* 基因。

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，在发酵过程中，重组菌株 FMME-GG08 中 *gelA* 和 *gelK* 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，发酵液粘度为 4683 mPa·S，较 FMME-GG01 分别提高了 130.2%和 85.1%。

第 4 章发酵工艺优化

4.1 引言

少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶是一个复杂的生物过程，涵盖菌体生长、代谢调控和产物合成等多个环节。近年来，少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶的工艺优化研究取得了显著进展，例如，利用响应面法（RSM）和遗传算法（GA）等统计优化方法，能够快速确定最佳培养条件^[86]；动态调控碳源和氮源的添加，有效避免了底物抑制效应，同时延长了菌体的生产期，显著提高了结冷胶产量；尽管连续发酵在理论上能够实现高效生产，但由于操作复杂且易受污染，目前仍以分批发酵和补料分批发酵为主要模式^[87]。本章节研究旨在通过整合发酵工艺优化与菌种改良策略，系统性提升少动鞘氨醇单胞菌的结冷胶生产效率。研究重点包括优化培养基关键组分及培养条件，以建立高效的发酵工艺体系。最终，基于优化工艺参数，在 15 L 发酵罐中对工程菌株 FMME-GG08 进行规模化验证，评估其结冷胶生产能力。

4.2 实验材料与仪器

4.2.1 菌株

详见 3.2.1

4.2.2 试剂与仪器

详见 2.2.1.2 与 2.2.1.5

4.2.3 培养基

种子斜面培养基（g/L）：蔗糖 10，蛋白胨 5，酵母膏 3，牛肉膏 2，氯化钠 5，琼脂粉 20。

种子培养基（g/L）：蔗糖 20，蛋白胨 5，酵母粉 3，氯化钠 5。

发酵培养基（g/L）：蔗糖 40，豆粕粉 3，氯化铵 1，磷酸氢二钾 2，七水硫酸镁 1.2，轻质碳酸钙 1。

以上培养基均使用氢氧化钠调 pH 到 7.0-7.2 之间，葡萄糖和蔗糖灭菌温度为 115℃、15 min，其余组分均在 121℃条件下灭菌 20 min。

其余培养基配方详见 2.2.1.3

4.3 发酵过程优化

4.3.1 菌株生长曲线测定

菌株 FMME-GG08 的种子液生长曲线如图 4-1 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。

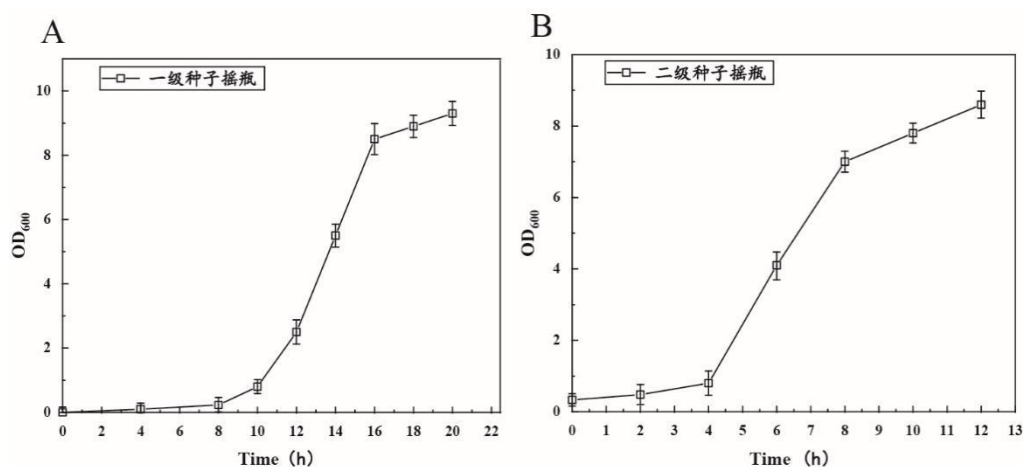


图 4-1 FMME-GG08 菌株种子摇瓶生长曲线. A:少动鞘氨醇单胞菌一级种子摇瓶生长曲线. B:少动鞘氨醇单胞菌二级种子摇瓶生长曲线.

Figure 4-1 Shake flask growth curve of strain FMME-GG08. A: Growth curve of *Sphingomonas paucimobilis* primary seed culture in shake flask. B: Growth curve of *Sphingomonas paucimobilis* secondary shake flask seed culture.

4.3.2 培养基组分优化

通过系统优化少动鞘氨醇单胞菌的发酵工艺,实现结冷胶的高效生产。首先,在碳源优化实验中,分别以 40 g/L 的葡萄糖、蔗糖和麦芽糖浆为初始碳源,1 g/L 玉米浆为有机氮源,在 10.5 L 发酵罐中进行发酵。发酵条件控制为 pH 7.0、温度 28℃、通气量 1 vvm,初始搅拌转速为 300 r/min,并通过动态调节搅拌转速将溶氧控制在 30%~100%。发酵结束后,采用乙醇沉降法测定结冷胶产量。

其次,在氮源组分优化实验中,分别以 1 g/L 蛋白胨、玉米浆、豆粕粉和麸皮提取物为有机氮源,40 g/L 蔗糖为初始碳源,评估不同氮源对结冷胶产量的影响。

进一步，在碳源补加方式优化实验中，以 1 g/L 豆粕粉为有机氮源，初始蔗糖浓度为 30 g/L，分别在 12 h、16 h、20 h 和 24 h 补加 10 g/L 蔗糖，研究补加时间对结冷胶合成的影响。

最后，在氮源含量优化实验中，以 30 g/L 蔗糖为初始碳源，发酵 20 h 时补加 10 g/L 蔗糖，同时采用梯度质量浓度（1‰、2‰、3‰、4‰、5‰、6‰、7‰）的豆粕粉作为唯一氮源，探究氮源浓度对结冷胶产量的影响。

4.3.3 发酵条件优化

本实验首先针对 pH 和溶氧两个关键发酵条件进行优化。在 pH 条件优化实验中，设计了两种 pH 控制策略以探究其对发酵过程的影响。第一种条件为初始 pH 设定为 7.5，发酵全程不进行 pH 调控，观察自然发酵过程中 pH 变化对目标产物合成的影响。第二种条件为初始 pH 设定为 7.0，并在发酵过程中通过添加 30% NaOH 溶液将 pH 动态维持在 7.0，探究恒定 pH 环境对菌体生长及代谢产物积累的调控作用。

在溶氧条件优化实验中，设计了三种控制方案：分别在 0-6 h、0-12 h 和 0-24 h 三个时间段内，将发酵罐转速控制在不超过 450 rpm 的低转速范围，以限制溶氧供应，模拟低氧环境对菌体生长及代谢的调控作用。低转速控制期结束后，切换至高转速条件进行后续发酵，确保菌体在高溶氧环境下的高效代谢和目标产物合成。

4.3.4 结冷胶发酵

4.3.4.1 菌种活化

将保存在-80℃冰箱的少动鞘氨醇单胞菌甘油管取出，接种到装有 50 ml 液体种子培养基的 500 ml 摇瓶中，在 30℃、180 rpm 往复式摇床中恒温培养 14 h。用接种环蘸取少许菌液在装有 30 ml 斜面培养基的茄子瓶中划线，于 30℃培养箱中恒温培养 48 h，至斜面长出清晰菌落即可。

4.3.4.2 种子培养

从-80℃取出 FMME-GG08 菌株甘油冻存管，划线接种于种子斜面培养基，30℃恒温培养 24 h。随后，用 10 mL 无菌水洗脱斜面菌苔，取 1 mL 菌悬液接种至液体种子培养基，于 30℃、140 rpm 条件下培养 12-16 h，制备一级种子液。将 1 mL 一级种子液转接至新鲜种子培养基，在相同条件下培养 6-8 h，获得二级

种子液。

4.3.4.3 摇瓶发酵

转接 10 mL 二级种子液至装有 90 mL 发酵培养基的 500 mL 带挡板摇瓶中，28°C、150 rpm 往复式振荡摇床培养 60 h。发酵 18-20 h 时补加 2 mL 500 g/L 蔗糖。

4.3.4.4 5 L 罐补料分批发酵

5 L 发酵罐初始装液量为 3.15 L，将 350 ml 种子液接种到发酵罐中。发酵初始条件为：温度 28°C，转速 300 rpm，pH 7.0，通气量 1 vvm。发酵罐中的溶氧通过搅拌转速（300~1000 rpm）自动维持在 30% 以上。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 30% NaOH 将培养基 pH 维持在 7.0。

4.3.4.5 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。发酵初始条件与 5 L 罐发酵初始条件一致。发酵液粘度采用粘度计测定，取 20 mL 发酵液于 50 mL 离心管，4 号转子，10 rpm，室温检测。

4.3.4.6 结冷胶产量及分子量测定

结冷胶产量测定详见 3.6.2.2。分子量采用高效凝胶渗透色谱（High Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC）检测。

4.4 结果与讨论

4.4.1 最优培养基组分

分别选取葡萄糖、蔗糖和麦芽糖浆作为唯一碳源，结果如图 4-2A 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 4-2B 所示，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/（h·L）。

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做为唯一氮源，结果如图 4-2C 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，相比于最优的蛋白胨做氮源产量仅降低了 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 4-2D 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/（h·L）。

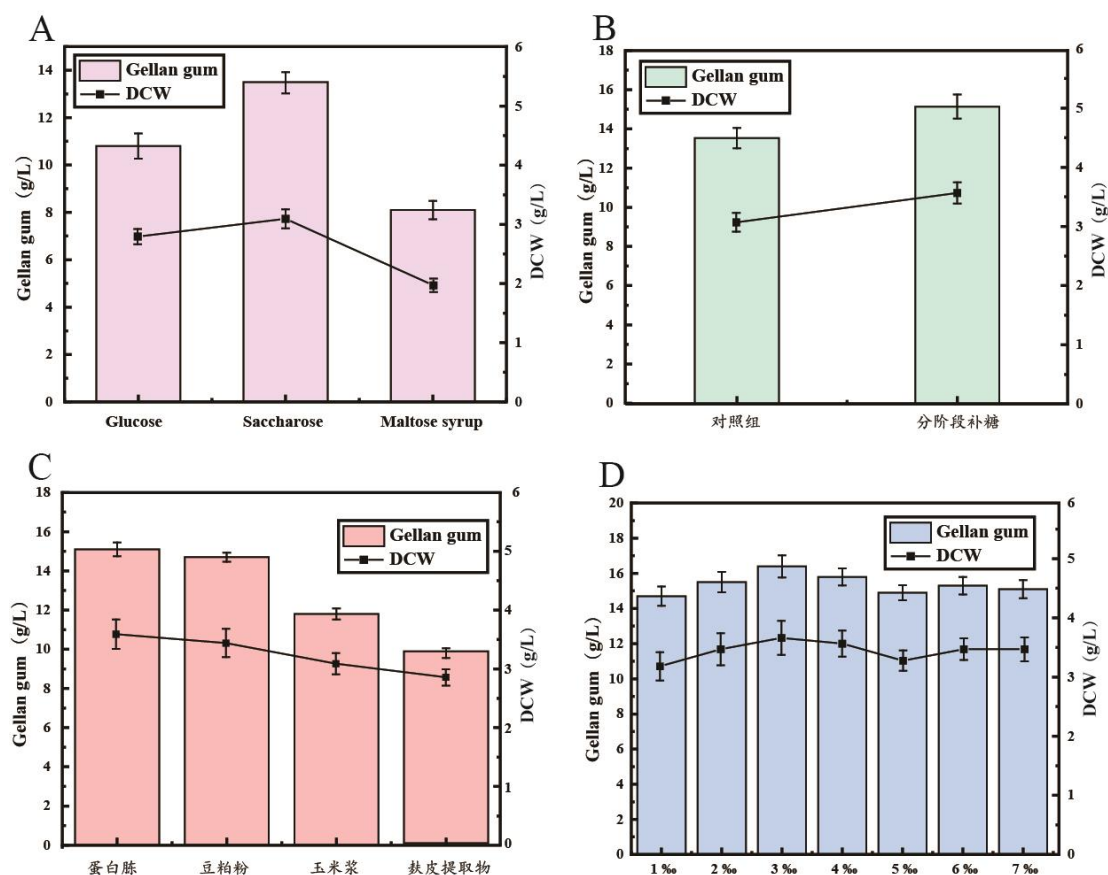


图 4-2 发酵工艺优化 A：分别选取葡萄糖、蔗糖、麦芽糖浆为唯一碳源的发酵柱状图. B：不同补糖策略的发酵柱状图. C：分别选取蛋白胨、豆粕粉、玉米浆和麸皮提取物为有机氮源的发酵柱状图. D：不同浓度有机氮源的发酵柱状图.

Figure 4-2 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.

4.4.2 最佳发酵条件

设计 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 4-3A 所示，条件（2）更利于结冷胶积累，此时结冷胶产量、产率和生

产强度分别为 17.5 g/L、0.43 g/g、0.29 g/ (h·L)。

此外, 结果如图 4-3B 所示, 在发酵前 12 h 控制转速不高于 450 rpm, 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、产率和生产强度分别为 18 g/L、0.45 g/g、0.3 g/ (h·L)。

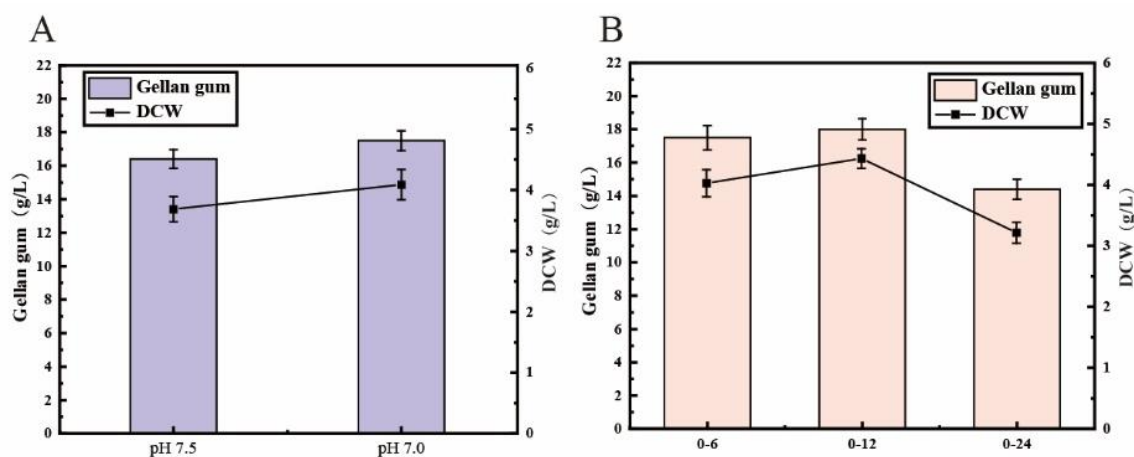


图 4-3 发酵条件优化 A: 不同 pH 调控策略的发酵柱状图. B: 不同溶氧调控策略的发酵柱状图.

Figure 4-3 Fermentation condition optimization. A: Bar chart of fermentation with different pH control strategies. B: Bar chart of fermentation with different dissolved oxygen control strategies.

4.4.3 15 L 罐发酵验证

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/ (h·L), 发酵液粘度为 8175 mPa·S, 成产的结冷胶重均分子量 M_w 为 520 kDa,

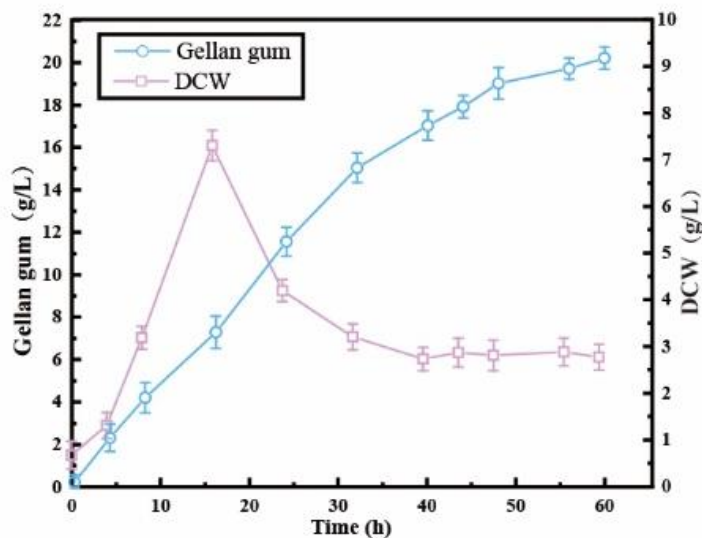


图 4-4：最优发酵工艺下菌株在 15 L 发酵罐中的发酵曲线.

Figure 4-4 Fermentation curve of the strain in a 15 L fermenter under optimal fermentation conditions.

4.5 本章小结

本章节通过优化少动鞘氨醇单胞菌发酵生产结冷胶的培养基组分和发酵条件，确定了最优培养基配方。具体而言，以蔗糖作为碳源时，结冷胶的产量达到 13.5 g/L，在碳源补加策略方面，当初始碳源浓度为 30 g/L，并在发酵 20 h 后补加 10 g/L 碳源时，结冷胶的产量最高可达 15.1 g/L。在氮源的选择上，虽然蛋白胨是最佳氮源，但使用豆粕粉作为氮源时，结冷胶的产量为 14.7 g/L，仅比使用蛋白胨时降低 2.6%，鉴于豆粕粉价格相对低廉且具有较高的利用效率，因此在发酵生产过程中选择豆粕粉作为氮源。此外，在氮源初始浓度控制方面，当氮源浓度为 3‰ 时，结冷胶的产量最高可达 16.4 g/L。

本研究进一步对 pH 值和溶氧两个关键因素进行了优化。通过全程将 pH 值维持在 7.0 左右，结冷胶的产量得到了显著提升，达到了 17.5 g/L。采取了分阶段的转速控制策略：发酵前 12 h 内维持较低转速，以促进菌体的生长和代谢；12 h 后则切换至高转速，以增强溶氧供应，更有利于菌体的进一步生长和结冷胶的产量积累，最终结冷胶的产量达到了 18.0 g/L。

最终，利用构建的工程菌株 FMME-GG08 在 15 L 发酵罐中采用优化后的最佳培养基组分和发酵工艺进行发酵，结冷胶的产量达到了 20.1 g/L，较优化前提

高了 43.8%，蔗糖转化率为 0.50 g/g，生产强度为 0.33 g/（h·L），发酵液的粘度为 8175 mPa·S。这些结果表明，优化后的培养基和发酵工艺在放大生产中具有良好的稳定性和高效性，为结冷胶的工业化生产提供了有力的技术支持。

第5章 结论与展望

5.1 结论

少动鞘氨醇单胞菌已应用于结冷胶的工业化发酵生产^[88]，由于对结冷胶生物合成途径研究不足，缺少有效的遗传操作工具和调控元件，菌种生产性能的提升仍依赖于效率低、操作复杂的三亲接合技术和传统诱变方法^[27, 32]。本研究构建了适用于少动鞘氨醇单胞菌的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，并用于对少动鞘氨醇单胞菌的系统代谢工程改造，构建了高产结冷胶的工程菌株，并优化了发酵工艺，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。主要结论如下：

(1) 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，并利用筛选的来源于质粒 pSC101 和 pET28a 的复制子改造现有的 5 种基因编辑工具，构建了适用于少动鞘氨醇单胞菌的 CRISPR/Cas9 系统。

(2) 利用绿色荧光蛋白表征并筛选了适用于少动鞘氨醇单胞菌的强启动子 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。并利用改造的 CRISPR-Cas9 系统强化结冷胶合成路径基因 *gelA* 和 *gelK*，同时敲除副产物基因 *ldhA* 和 *poxB*，构建了工程菌株 FMME-GG08 菌株，其摇瓶产量达到 10.8 g/L。

(3) 通过优化碳源、氮源、pH、溶氧等发酵参数，获得了最佳发酵工艺：以蔗糖为唯一碳源，设定初始碳源浓度 30 g/L，并在发酵 20 h 外源补加 10 g/L 蔗糖；并以 3% 质量浓度的豆粕粉做有机氮源对菌株 FMME-GG08 菌株进行分批补料发酵；发酵全程控制 pH 在 7.0 ± 0.2 ，并采用两阶段溶氧控制策略：发酵前期（0-20 h）控制转速在 450 rpm，促进菌体生长，发酵中后期（20-60 h）控制转速在 600-1000 rpm，维持菌株代谢和结冷胶合成需求。利用 FMME-GG08 菌株在 15 L 发酵罐上进行放大试验，结冷胶的产量达到 20.1 g/L，已初步具备工业化生产潜力。

5.2 展望

本研究构建的工程菌株的结冷胶产量与目前报道的最高产量仍存在一定的差距，如何通过代谢工程改造进一步提升菌株的生产性能，以提高结冷胶产量，

可从以下两方面深入研究：

（1）在菌种提升方面，基于基因组尺度代谢网络模型（GSMM）和代谢通量分析（MFA），全面解析结冷胶合成途径中的关键节点和限速步骤^[89, 90]；结合 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术，构建动态调控系统对关键节点进行精准的时空调控，优化前体物质的供应和代谢通量分配，避免代谢失衡^[91]；通过代谢工程手段增强菌株对发酵环境的耐受性，提高菌株在工业化生产中的适应性和稳定性。

（2）在发酵工艺方面，结合人工智能（AI）和大数据分析技术，优化发酵工艺参数，实现发酵过程的智能化控制；通过实时监测和反馈调节，动态优化发酵条件，提高结冷胶的生产稳定性和经济性；开发以廉价原料为碳源的发酵工艺，降低生产成本并实现绿色可持续生产；通过优化提取和纯化工艺，减少能源消耗和环境污染，进一步提升结冷胶生产的环保性和经济性^[41]。

参考文献

- [1] GOMES D, BATISTA-SILVA J, SOUSA A, et al. Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2023, 311: 120-132.
- [2] ABDL AALI R A K, AL-SAHLANY S T G. Gellan gum as a unique microbial polysaccharide: Its characteristics, synthesis, and current application trends [J]. **Gels Basel**, 2024, 10(3): 183-191.
- [3] PALUMBO F S, FEDERICO S, PITARRESI G, et al. Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2020, 229: 115430.
- [4] ZHANG L, LIU Z, TANG J, et al. Gellan gum improves the gel properties and thermal stability of tilapia (*Oreochromis spp.*) skin gelatin sterilized at 121°C [J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2022, 46(11): 135-142.
- [5] FIALHO A M, MOREIRA L M, GRANJA A T, et al. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 79: 889-900.
- [6] PRASAD S, ATHOKPAM M, PUROHIT S R. Recent advances in gellan gum production and modification for enhanced applicability in food printing and bioactive delivery applications [J]. **Carbohydrate Research**, 2024: 109-121.
- [7] COELHO J, EUSÉBIO D, GOMES D, et al. Biosynthesis and isolation of gellan polysaccharide to formulate microspheres for protein capture [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2019, 220: 236-246.
- [8] YAN B, CHEN T, TAO Y, et al. Conformation and hydration property of low-acetyl gellan gum under microwave irradiation: Experiments and molecular dynamics simulations [J]. **Food Hydrocolloids**, 2023, 145: 129-140.
- [9] LEE S Y, AHN J-Y, KIM M, et al. Phenotypic and proteomic analysis of positively regulated gellan biosynthesis pathway in *Sphingomonas elodea* [J]. **Animal Cells and Systems**, 2017, 21(2): 115-123.
- [10] TATYKHANOVA G S, GIZATULLINA N N, KUDAIBERGENOVA G M, et al. Comparative study of gellan gum derived from domestic raw materials of kazakhstan and commercial gellan [C]. **Macromolecular Symposia**, 2024, 413: 240-252.
- [11] GARCÍA GONZÁLEZ M D C, TRUJILLO-CAYADO L A, MUÑOZ GARCÍA J, et al. Gellan gum fluid gels: influence of the nature and concentration of gel-promoting ions on rheological properties [J]. **Colloid & Polymer Science**, 2018, 8: 1741-1748.
- [12] ADDITIVES E P O F, FOOD N S A T, YOUNES M, et al. Re-evaluation of gellan gum (E 418) as food additive [J]. **EFSA Journal**, 2018, 16(6): 132-143.
- [13] YAN B, ZHAO Z, ZHANG N, et al. 3D food printing curing technology based on gellan gum [J]. **Journal of Food Engineering**, 2022, 327: 111-125.
- [14] DAS M, GIRI T. Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery [J]. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2020, 56:131-142.
- [15] MORRIS E R, NISHINARI K, RINAUDO M. Gelation of gellan—a review [J]. **Food Hydrocolloids**, 2012, 28(2): 373-411.
- [16] SAHA D, BHATTACHARYA S. Characteristics of gellan gum based food gels [J]. **Journal**

of *Texture Studies*, 2010, 41(4): 459-471.

[17] ZHU R, JONES O G. Effect of high acyl gellan gum and pH on the structural and foaming properties of heated whey protein suspensions [J]. *Food Chemistry*, 2024, 449: 241-255.

[18] KUMAR V, MITTAL H, ANSAR S. Synthesis and characterization of gellan gum-based hydrogels for the delivery of anticancer drug etoposide [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278: 135-146.

[19] SOUSA P, MOREIRA A, LOPES B, et al. Honey, gellan gum, and hyaluronic acid as therapeutic approaches for skin regeneration [J]. *Biomedicines*, 2025, 13(2): 508-521.

[20] JING W, HUSSAIN S A, REDDY GANGIREDDYGARI V S, et al. Biocompatibility and antibacterial activity studies of gellan gum and alginate thin film encapsulating curcumin as a wound skin care dressing [J]. *Materials Technology*, 2023, 38(1): 228-232.

[21] VILELA J A P, DA CUNHA R L. Emulsions stabilized by high acyl gellan and KCl [J]. *Food Research International*, 2017, 91: 47-54.

[22] DODI G, SABAU R E, CREȚU B E-B, GARDIKIOTIS I. Exploring the antioxidant potential of gellan and guar gums in wound healing [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(8): 215-227.

[23] DEV M J, WARKE R G, WARKE G M, et al. Advances in fermentative production, purification, characterization and applications of gellan gum [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127-141.

[24] SOUMIYA S, SANTHIAGU A, MANJUSHA C, et al. Homology modeling and structural validation of *gelC* gene involved in the biosynthesis of gellan from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2019, 12(3): 1044-1050.

[25] Sá-CORREIA I, FIALHO A, VIDEIRA P, et al. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 29(4): 170-176.

[26] MARTINS L, SA-CORREIA I. Gellan gum biosynthetic enzymes in producing and nonproducing variants of *Pseudomonas elodea* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, 14(3): 357-364.

[27] 陈佳乐, 水小溪, 赵宝华, et al. 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(03): 45-52.

[28] 郑丽圆, 李宛莹, 喻林兵, et al. 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(03): 298-303.

[29] SUN L, WANG Y, YUE M, et al. 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): 407-415.

[30] LI A, HU T, LUO H, et al. A carotenoid-and poly- β -hydroxybutyrate-free mutant strain of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for the commercial production of gellan [J]. *Msphere*, 2019, 4(5): 619-626.

[31] WU X, LI O, CHEN Y, et al. A carotenoid-free mutant strain of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 for the commercial production of gellan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(3): 1201-1207.

[32] ZHU L, WU X, LI O, et al. Cloning and knockout of phytoene desaturase gene in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for economic recovery of gellan gum [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(9): 1507-1513.

[33] 林璟. 基于碳代谢通路改造的高产结冷胶菌株构建与优化 [D] [硕士学位论文], 杭州:

浙江理工大学, 2023.

- [34] MANJUSHA C, 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: 101-112.
- [35] MANJUSHA C, SANTHIAGU A, SOUMIYA S, et al. Phyre 2 and I-Tasser web portal for protein modeling, prediction and validation of *gelQ* and *gelK* genes from gellan gum producing bacterial strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, 2019, 12(1): 27-36.
- [36] SUN L, YANG L, DING X, et al. Effects of fermentation conditions on molecular weight, production, and physicochemical properties of gellan gum [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2024, 279: 135-147.
- [37] KANARI B, BANIK R R, UPADHYAY S N. Effect of environmental factors and carbohydrate on gellan gum production [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2002, 102: 129-140.
- [38] 周龙海. 响应面分析结冷胶发酵培养基优化研究 [J]. 农产品加工, 2019, (18): 14-21.
- [39] WANG X, XU P, YUAN Y, et al. Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(5): 3367-3374.
- [40] 梁佳园, 张艳敏, 徐淑科, et al. 产低酰基结冷胶重组菌株的构建及发酵培养基优化 [J]. 中国酿造, 2023, 42(08): 203-209.
- [41] ALTAN KAMER D D, GUMUS T, PALABIYIK I, et al. Grape pomace as a promising source for gellan gum production [J]. **Food Hydrocolloids**, 2021, 114: 584-596.
- [42] JIN H, LEE N-K, SHIN M-K, et al. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2003, 16(3): 357-360.
- [43] HUANG J, JIANG S, XU X, et al. Effects of carbon/nitrogen ratio, dissolved oxygen and impeller type on gellan gum production in *Sphingomonas paucimobilis* [J]. **Annals of Microbiology**, 2012, 62: 299-305.
- [44] ZHANG Y, ZHU G, TONG Q, et al. Effects of organic and inorganic nitrogen sources on the transcriptome of gellan gum biosynthesis by *Sphingomonas paucimobilis* [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2023, 134(4): 81-90.
- [45] LIM S-M, WU J-R, LEE J-W, KIM S-K. Optimization of culture condition for the gellan production by *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 [J]. **Journal of Life Science**, 2003, 13(5): 705-711.
- [46] 常睿珩, 许康豪, 蔡雨珊, et al. 钙离子对海假交替单胞菌生物被膜形成及厚壳贻贝附着的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(06): 893-900.
- [47] WEST T. Effect of temperature on bacterial gellan production [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2003, 19: 649-652.
- [48] WEST T P, FULLENKAMP N A. Effect of culture medium pH on bacterial gellan production [J]. **Microbios**, 2001, 105(412): 133-140.
- [49] GIAVASIS I, HARVEY L M, 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.
- [50] BANIK R M, SANTHIAGU A. Improvement in production and quality of gellan gum by

- sphingomonas paucimobilis under high dissolved oxygen tension levels [J]. **Biotechnology Letters**, 2006, 28(17): 1347-1350.
- [51] 朱桂兰. 结冷胶的发酵过程优化及其在食品中的应用研究 [D] [博士学位论文], 无锡: 江南大学, 2015.
- [52] VARTAK N B, LIN C C, CLEARY J M, et al. Glucose metabolism in *Sphingomonas elodea*: Pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant [J]. **Microbiology**, 1995, 141(9): 2339-2950.
- [53] 梁佳园. 低乙酰基结冷胶生产菌的构建及其生产工艺优化研究 [D] [硕士学位论文], 济南: 齐鲁工业大学, 2023.
- [54] ZHU L, WU X, LI O, et al. Cloning and characterization of genes involved in nostoxanthin biosynthesis of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 [J]. **PLoS One**, 2012, 7(4): 350-358.
- [55] LIU M, LOU J, GU J, et al. Increasing L-homoserine production in *Escherichia coli* by engineering the central metabolic pathways [J]. **Journal of Biotechnology**, 2020, 314: 1-7.
- [56] LEE S Y, JI-YOUNG A, MIHYE K, et al. Phenotypic and proteomic analysis of positively regulated gellan biosynthesis pathway in *Sphingomonas elodea* [J]. **Animal Cells and Systems**, 2017, 21(2): 115-123.
- [57] HUSSAIN A, LIAO H, AHMAD K, et al. Bacterial metabolic engineering for the production of second-generation bioethanol and biobutanol; a review [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2023, 134(2): 61-68.
- [58] LI A, HU T, LUO H, et al. A Carotenoid-and poly-hydroxybutyrate-free mutant strain of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for the commercial production of gellan [J]. **mSphere**, 2019, 4(5)135-142.
- [59] 朱亮. 少动鞘氨醇单胞菌产结冷胶优化及其念珠藻黄素合成相关基因的功能分析 [D] [博士学位论文], 杭州: 浙江大学, 2013.
- [60] 郭晓虹. 节杆菌 ADH 基因敲除及诱导表达型载体的构建 [D] [硕士学位论文], 咸阳: 西北农业科技大学, 2019.
- [61] ZHANG C, LI Y, MA J, et al. High production of 4-hydroxyisoleucine in *Corynebacterium glutamicum* by multistep metabolic engineering [J]. **Metabolic Engineering**, 2018, 49: 287-298.
- [62] WU Y, LI T, CAO Q, et al. RecET recombination system driving chromosomal target gene replacement in *Zymomonas mobilis* [J]. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2017, 30: 118-124.
- [63] MA Z, WANG P G. RecET direct cloning of polysaccharide gene cluster from gram-negative bacteria [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2019, 1954: 15-23.
- [64] HAN M, WANG W, GONG X, et al. A modified method of gene disruption in *Komagataella phaffii* with Cre/loxP system [J]. **Journal of Biotechnology**, 2022, 347: 40-48.
- [65] YANG Y J, SINGH R P, LAN X, et al. Genome editing in model strain *Myxococcus xanthus* DK1622 by a site-specific Cre/loxP recombination system [J]. **Biomolecules**, 2018, 8(4):15-21.
- [66] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. **Science**, 2014, 346(6213): 1258096.
- [67] EKI R, SHE J, PARLAK M, et al. A robust CRISPR–Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair [J]. **Nucleic Acids Research**, 2020, 48(21): 126-138.
- [68] CHEN X, DU J, YUN S, et al. Recent advances in CRISPR-Cas9-based genome insertion technologies [J]. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, 2024, 35(1):178-190.
- [69] MELIAWATI M, SCHILLING C, SCHMID J. Recent advances of Cas12a applications in

- bacteria [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021, 105(8): 2981-2990.
- [70] JI S, WANG X, WANG Y, et al. Advances in Cas12a-based amplification-free nucleic acid detection [J]. **The CRISPR Journal**, 2023, 6(5): 405-418.
- [71] VO P L H, RONDA C, KLOMPE S E, et al. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering [J]. **Nature Biotechnology**, 2021, 39(4): 480-489.
- [72] MARTÍNEZ-GARCÍA E, DE LORENZO V. Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of gram-negative bacteria [M]. **Synthetic Gene Networks**, 2012: 267-283.
- [73] LI A, HU T, LUO H, et al. A Carotenoid and poly-hydroxybutyrate-free mutant strain of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for the commercial production of gellan [J]. **mSphere**, 2019, 4(5): 668-679.
- [74] SUN L, YANG L, YUE M, et al. Biosynthesis and physicochemical properties of low molecular weight gellan produced by a high-yield mutant of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2023, 242: 124-135.
- [75] MORAN C P, LANG N, LEGRICE S F, et al. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis* [J]. **Molecular & General Genetics Mgg**, 1982, 186(3): 339-346.
- [76] NING Y, WU X, ZHANG C, et al. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli* [J]. **Metabolic Engineering**, 2016, 36: 10-18.
- [77] CHEN R, ZHU Y, WANG H, et al. Engineering *Escherichia coli* MG1655 for highly efficient biosynthesis of 2'-fucosyllactose by de novo gdp-fucose pathway [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2023, 71(40): 14678-14686.
- [78] ARMENGAUD J, DE NUOVA PEREZ L, LEMAY P, MASSON J M. Production of a full length Tat protein in *E. coli* and its purification [J]. **FEBS Letters**, 1991, 282(1): 157-160.
- [79] ZHANG Y, LIU H, LIU Y, et al. A promoter engineering-based strategy enhances polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 191: 608-617.
- [80] VIDEIRA P A, CORTES L L, FIALHO A M, Sá-CORREIA I. Identification of the *pgmG* gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities, in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(5): 2252-2258.
- [81] JEONG J-W, PARK K-M, CHUNG M, WON J-I. Influence of *Vitreoscilla hemoglobin* gene expression on 2,3-butanediol production in *Klebsiella oxytoca* [J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2015, 20(1): 10-17.
- [82] VIDEIRA P, FIALHO A, GEREMIA R A, et al. Biochemical characterization of the β -1,4-glucuronosyltransferase *gelK* in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. **Biochemical Journal**, 2001, 358(2): 457-464.
- [83] ZHANG J, DONG Y-C, FAN L-L, et al. Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis* [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2015, 115: 694-700.
- [84] HARI SUTHAN V, SAMEEHA SYED ABDUL R, PONNUSAMI V, SUGUMARAN K. Production of gellan gum using milk skin residue (MSR)—a tea shop waste: statistical

- optimization and downstream processing [J]. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023, 13(1): 189-203.
- [85] WANG X, XU P, YUAN Y, et al. Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(5): 3367-3374.
- [86] 王亚珍. 少动鞘氨醇单胞菌高产结冷胶菌株的选育及其生物合成机理研究 [D] [硕士学位论文], 镇江: 江苏大学, 2021.
- [87] XU C, LIU L, ZHANG Z, et al. Genome-scale metabolic model in guiding metabolic engineering of microbial improvement [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(2): 519-539.
- [88] ANTONIEWICZ M R. A guide to metabolic flux analysis in metabolic engineering: Methods, tools and applications [J]. **Metabolic Engineering**, 2021, 63: 2-12.
- [89] MORENO R, ROJO F. The importance of understanding the regulation of bacterial metabolism [J]. **Environmental microbiology**, 2023, 25(1): 54-58.
- [90] ZHENG Y, KONG S, LUO S, et al. Improving furfural tolerance of *Escherichia coli* by Integrating adaptive laboratory evolution with CRISPR-enabled trackable genome engineering [J]. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2022, 10(7): 2318-2330.
- [91] SHARMA S, VARGHESE E, ARORA A, et al. Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology [J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2018, 6:112-124.

致谢

行文至此，思绪万千。三载悠悠，沿途漫漫，始于桑落，别于荷月。总觉来日方长，却不知岁月清浅，时节如流。

在此，首先感谢我的导师刘立明教授，在学业上，刘老师渊博的学识、精准的学术思维，严谨踏实的教学态度，诲人不倦的高尚师德，都使我在学术研究上受益匪浅。我的研究论文的撰写和修改等方面，刘老师给予了悉心的指导，本论文的完成离不开刘老师所倾注的精力和汗水。同时，刘老师对我为人处世方面的教诲是我在成长过程中不可或缺的。再次衷心感谢刘老师的指导和帮助。

我十分感谢李晓敏老师在我课题设计以及研究思路给了无私的启发和论文的撰写、修改上给以的帮助。感谢李晓敏老师在学术和生活上的指导和关怀。同时感谢刘佳老师、高聪老师、胡贵鹏老师、吴静老师、宋伟老师、魏婉清老师以及周怡雯老师的帮助。我还要感谢实验室张少伦师兄、杨硕师兄、王明师兄、李振栋师兄、盛琦师兄、梁光杰师兄、刘开放师兄、王家浩师兄等在课题及生活上的指导，以及同级同学于海浪、姜雨辰、王雨欣、褚如寅、袁炜佳、牛思琦等和王富鑫师妹、丁俊杰师弟、王梓暄师妹、左娇娇师妹、王子豪师弟、黄文潇师弟、陈照阳师弟、李月师妹、黄凌馨师妹、齐禾嘉师妹、王浩淼师弟、王申杰师弟等在学习生活上的帮助。

感谢我的家人对我学业的支持，在我一次次做出选择时坚定的站在我后方，对我提供支持。

所有的经历都是成长，叁载寒暑，无论是喜悦还是酸楚，所有经历，于我都是礼物。所有相遇，于我都是宝藏。毕业不是结束，而是一个新的开始，此间翻山而过，不求今后皆是明月清风、坦荡通途，只愿无论磨难，一往无前、初心不改。

最后再次感谢所有关心和爱护我的老师、家人和同学朋友们！