

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250120006

引用格式: 姚博伟, 武世强, 高红亮, 等. *glnA* 基因敲除对土壤杆菌产可得然胶的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 33–39.

YAO BW, WU SQ, GAO HL, et al. Effects of *glnA* gene knockout on the production of available curdlan by *Agrobacterium* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 33–39. (in Chinese with English abstract).

glnA 基因敲除对土壤杆菌产可得然胶的影响

姚博伟^{1*}, 武世强², 高红亮³, 杨雪霞^{2*}

(1. 宁夏计量质量检验检测研究院, 银川 750000; 2. 东华大学生物与医学工程学院, 上海 201620;
3. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要: **目的** 探究 *glnA* 基因对土壤杆菌产可得然胶的影响。**方法** 构建 *glnA* 基因敲除株 $\Delta glnA$ 菌株, 分析 $\Delta glnA$ 菌株生长代谢情况和产生的可得然胶在产量、凝胶性质和红外结构的变化, 并通过实时荧光定量聚合酶链式反应的方法探究可得然胶合成相关基因的表达量。**结果** $\Delta glnA$ 菌株在发酵过程中氨基氮消耗情况与 CGMCC11546 一致, 在蔗糖消耗方面, $\Delta glnA$ 菌株与 CGMCC11546 在 12 h 之前无明显差别, 但在 15 h 之后出现明显差异, 蔗糖消耗比 CGMCC11546 明显降低。 $\Delta glnA$ 菌株可得然胶产量约 4 g/L, 相对于 CGMCC11546 降低了 60%。**结论** *glnA* 基因不影响菌体生长和可得然胶结构, 但可以使可得然胶的合成减少。本研究通过对 *glnA* 基因进行敲除, 研究其对可得然胶合成的影响, 为后续提高可得然胶产量提供一些分子生物学基础。

关键词: 可得然胶; 土壤杆菌; 基因敲除; *glnA* 基因

Effects of *glnA* gene knockout on the production of available curdlan by *Agrobacterium*

YAO Bo-Wei^{1*}, WU Shi-Qiang², GAO Hong-Liang³, YANG Xue-Xia^{2*}

(1. Ningxia Academy of Metrology & Quality Inspection, Yinchuan 750000, China; 2. College of Biological Science and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China; 3. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of *glnA* gene on the production of curdlan by *Agrobacterium*. **Methods** A *glnA* gene knockout strain $\Delta glnA$ was constructed in this paper. The growth and metabolism of $\Delta glnA$ strain and the changes in yield, gel properties and infrared structure of the obtained gum were analyzed, and the expression of genes related to the synthesis of curdlan was explored by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results** The amino nitrogen consumption of the $\Delta glnA$ strain during fermentation was consistent with that of CGMCC11546. In terms of sucrose consumption, there was no significant difference before 12 h, but there was a significant difference between the $\Delta glnA$ strain and CGMCC11546 after 15 h, and sucrose consumption was

收稿日期: 2025-01-20

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2023AAC03735); 2023年度宁夏回族自治区青年科技托举人才培养项目(宁科协发组字[2024]6号); 宁夏科技惠民项目(2024CMG03049)

第一作者/*通信作者: 姚博伟(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为应用微生物及食品质量安全。E-mail: ybw2016@sina.com

*通信作者: 杨雪霞(1971—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为应用微生物与酶学研究。E-mail: yxx@dlhu.edu.cn

significantly reduced compared to CGMCC11546. The $\Delta glnA$ strain could produce approximately 4 g/L of natural gum, which was 60% lower than CGMCC11546. **Conclusion** The *glnA* gene does not affect bacterial growth or the structure of collagen, but it can reduce the synthesis of collagen. This study provides insights into the role of *glnA* in curdlan production and lays a molecular biological foundation for further efforts to enhance curdlan yield.

KEY WORDS: curdlan; *Agrobacterium*; gene knockout; *glnA* gene

0 引言

可得然胶, 又称为可得然胶多糖, 是一种微生物胞外多糖, 不溶于水, 可溶于 NaOH、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等碱性溶剂中。可得然胶最早发现于粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogens*) 10C3K^[1], 后陆续发现根瘤菌(*Rhizobium*)^[2]、土壤杆菌(*Agrobacterium*)^[3]等菌株也可以合成可得然胶。由于其加热成胶性、持水性、无毒性、可降解性等性能受到食品、生命医学、新型材料、环境保护等行业的广泛关注^[4-7]。可得然胶是一种 β -D-1,3-葡聚糖^[8-9], 可得然胶分子式为 $(C_6H_{10}O_5)_n$, 在碱溶液中有单链螺旋结构、三螺旋结构以及松散环状结构 3 种构象。三螺旋结构在普遍存在, 是可得然胶的主要结构^[10]。60 °C 时可形成低固胶(可逆凝胶); 80 °C 时可形成高固胶(不可逆凝胶)^[11]。可得然胶具有抗脱水性、稳定性、分散性、抗冻融性和抗消化性^[12], 这些性质使得可得然胶在诸多领域中都有着广泛的应用。可得然胶水悬浮液高温和低温下会形成两种结构不同的凝胶, 分别称为高凝固热不可逆凝胶和低凝固热可逆凝胶^[13-14]。相较于其他亲水胶体, 可得然胶具有独特的加热流变性和保水性能, 作为稳定剂、持水剂、增稠剂、乳化剂等的面制品^[15]、肉制品^[16]、乳制品^[17]、速冻食品^[18]、复合食品添加剂^[19]和食品保鲜材料^[20]中广泛应用。

可得然胶在氮源限制的条件下合成, 主要包括两个方面: 底物合成和能量供给。可得然胶合成的底物是尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)-葡萄糖, 尿苷三磷酸(uridine triphosphate, UTP)-葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶(由 *galU* 基因编码)催化 UTP 和葡萄糖-1-磷酸生成 UDP-葡萄糖, 在不同氧浓度下 *galU* 基因转录水平有些显著变化, 因此 *galU* 是可得然胶合成过程中的一个关键酶^[21]。可得然胶合成需要大量的能量, 转录组分析表明, 在高氧浓度下可得然胶有着很高产量, 同时三羧酸循环和电子传递链中的关键基因以及 *galU* 基因均呈现显著上调。研究发现, 参与半胱氨酸和蛋氨酸代谢的 *metZ* 和 *metH* 基因在胶原蛋白的合成中起着重要作用。敲除 *metZ* 和 *metH* 基因会降低土壤杆菌对氮源和糖的利用, 减少腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)合成, 抑制 L-甲流氨酸合成, 导致可得然胶合成过程中糖利用率降低, 能量供应不足, 导致减产^[22]。细菌在不缺少营养物质, 但是碳源过剩时可以产生聚-3-羟基烷酸(poly-3-hydroxyalkanoate, PHA), 碳源不足时 PHA

亦可作碳源供细菌使用^[23-24]。聚-3-羟基丁酸(poly-3-hydroxybutyrate, PHB)是 PHA 中研究最为广泛的一种。PHB 的合成涉及多个基因^[25], *phbC* 基因编码的聚羟基丁酸合酶, 可催化 3-羟基丁酸合成 PHB。土壤杆菌 CGMCC11546 的 *phbC* 基因敲除后可得然胶产量降低约 46%^[26]。

研究发现 *crdASC* 操纵子(包含 *crdA*、*crdS*、*crdC*)和 *crdR* 对于可得然胶的生物合成至关重要, 在 *crdASC* 操纵子中, *crdS* 编码一种糖基转移酶, 将 UDP-葡萄糖的葡萄糖残基转移到可得然胶链中^[27]。*CrdS* 与糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)家族 II 具有相似性, 其介导细胞膜内测葡萄糖基聚合。*crdS* 的突变导致可得然胶合成障碍, 通过回补 *crdS* 基因可消除该基因突变带来的影响, 从而证明 *crdS* 对于可得然胶生物合成是必需的^[28]。基于转录组分析, 在氮饥饿时 *crdASC* 操纵子上调近 100 倍, 证明了 *crdASC* 操纵子在土壤杆菌 ATCC31749 菌株的可得然胶生物合成中的突出作用^[29]。YU 等^[30]已经确定, 作为正调节剂的 *CrdR* 可以改善土壤杆菌 ATCC31749 中的可得然胶生物合成, 并且 *crdR* 位于 *crdA* 起始密码子的上游。还推断 *CrdR* 通过调节 *crdASC* 操纵子的表达来调节可得然胶的生物合成。

NtrC-NtrB 是在氮源耗尽时参与氮信号级联的双组分系统, 研究表明土壤杆菌 ATCC31749 中 *ntrBC* 突变体在酵母提取物-葡萄糖培养基上可以产生可得然胶。*ntrBC* 操纵子是可得然胶生物合成的关键调节机制, *ntrBC* 基因可用于在氮耗尽下启动氮同化^[31], 此时糖类物质便不再供应细胞生长, 而是被用于合成可得然胶, 所以氮元素的利用情况是影响可得然胶生物合成的主要因素^[32-34]。在土壤杆菌 CGMCC11546 中也存在类似的双组分系统 Gene0716-Gene0717, 其中起主要作用的是转录因子 Gene0716, 但是通过增强 *gene0717* 的表达可以提高野生株的可得然胶产量^[35]。

国内对于可得然胶的研究起步较晚, 但发展迅速, 在高产菌株诱变选育及改造^[36-37]、发酵工艺优化^[38-39]、合成机制调控^[40]等方面报道了诸多研究成果, 为我国可得然胶产业发展奠定了基础。但是, 目前我国可得然胶仍未实现完全自主化生产, 究其原因主要是存在产量低/凝胶强度差等一系列瓶颈问题^[41]。为进一步了解土壤杆菌可得然胶合成的分子机制, 通过基因改造提高可得然胶产量, 华东师范大学生命科学学院微生物实验室在前期研究中发现

glnA 基因突变能够明显降低可得然胶产量^[40]。本研究通过构建 *glnA* 基因敲除株, 并研究 *glnA* 基因对土壤杆菌 CGMCC11546 产可得然胶的影响, 以期从分子生物学角度为提高可得然胶产量及工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

土壤杆菌 CGMCC11546、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株以及质粒 pMD-19T、pEXG2 均为华东师范大学生命科学学院微生物实验室保存。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司); DNA 片段纯化试剂盒、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶(大连宝生物工程有限公司); 2 \times Taq Master Mix、2 \times Fast Pfu Master Mix、DNA marker(美国赛默飞世尔科技有限公司); 反转录试剂盒(北京普洛麦格生物技术有限公司); 荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒、Gold View 核酸染液(上海翊圣生物科技有限公司); DMSO、NaOH、KH₂PO₄、K₂HPO₄·3H₂O、(NH₄)₂HPO₄、NH₄Cl、蔗糖、MgSO₄·7H₂O、玉米浆、CaCO₃、95%乙醇、甘油、庆大霉素(国药集团化学试剂有限公司); PCR 引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 实验所需要的引物
Table 1 Primers of the experiment

组别	引物名称	序列(5'→3')
同源重组基因敲除所用引物	gUF	CGGGATCCAGCCCCGACCAGCAGTTTCAG
	gUR	AGAAACACAGACCCGGTGATACGGAAC CACGAGCATGACATGGC
	gDF	GCCATGTCATGCTCGTGGTTCCGTATCAC CGGGTCTGTGTTTCT
	gDR	CCAAGCTTGCGCCATTTTCGGGATGGA
	gF	AAGGTGGCGTAGATGCCGTG
	gR	CTGGAAGCCGGTCTGATGAC
实时荧光定量 PCR 所用引物	q-fixN-F	CACGTAGAAGGATGTGGCGA
	q-fixN-R	TGGGGTGTGTGCGTTTCT
	q-ppx-F	TCGGCTATCGGAACAATCGG
	q-ppx-R	CATGTACCACCGACCGCATA
	q-exoC-F	GCAACGGAATCAGATCGGC
	q-exoC-R	GTCGACCAGTCTGTACAGAA
	q-galU-F	CAAGTCGCTTCATGCCATCG
	q-galU-R	ATCACGGCTTTTCCGTCCT
	q-crdR-F	TCCTCAATGTGCCCGTTTCC
	q-crdR-R	GATCTTACGAAAGCCCGGT
	q-crdS-F	CCAGACCATAGACAGCCTGC
	q-crdS-R	GGCAATGGCTAAACCGTTTCG
	q-ntrB-F	TCGGCTATCGGAACAATCGG
	q-ntrB-R	CATGTACCACCGACCGCATA
q-ntrC-F	AGACCGATGTGACGCTGATG	
q-ntrC-R	TTCCGATTCGATCAGGTCGC	

1.2 仪器与设备

GNP 型隔水式恒温培养箱、DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); UV-2700 型分光光度计(日本岛津仪器有限公司); SorvallRC-6plus 型冷冻离心机、Nanodrop 型微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司); PB-10 型 pH 酸度计、SQP 型精密电子天平(精度 0.0001 g)(德国赛多利斯仪器有限公司); MLS-378L-PC 型立式压力蒸汽灭菌器(日本松下电器有限公司); sw-cj-2FD 型洁净工作台(苏净安泰空气技术有限公司); Sub-Cell GT 型电泳槽、PowerEase 型稳压电泳仪、cfx opus 96 型实时荧光 PCR 仪(伯乐生命医学产品有限公司); Mastercycler 型 PCR 仪(德国艾本德股份有限公司); SCIENTZ-18N 型真空冷冻干燥机(宁波新之生物技术有限公司)。

1.3 培养基配制

LB 培养基: 胰蛋白胨 1.0 g/L、酵母粉 0.5 g/L、NaCl 1.0 g/L、pH 7.2。配制固体培养基时, 加入 2%琼脂。

LB-蔗糖培养基: 蔗糖 8.0 g/L、胰蛋白胨 1.0 g/L、酵母粉 0.5 g/L、NaCl 1.0 g/L、pH 7.2。配制固体培养基加入 2%琼脂。

种子培养基: 蔗糖 2.0 g/L、(NH₄)₂HPO₄ 1.5 g/L、KH₂PO₄ 0.15 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L、玉米浆 0.4 g/L、CaCO₃ 0.3 g/L、pH 7.2。

发酵培养基: 蔗糖 9.0 g/L、(NH₄)₂HPO₄ 0.2 g/L、KH₂PO₄ 0.2 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L、玉米浆 0.3 g/L、CaCO₃ 0.2 g/L、pH 7.2。

1.4 实验方法

1.4.1 感受态细胞制备及转化

按照《分子克隆指南》进行制备和转化步骤进行^[42]。

1.4.2 *glnA* 基因敲除菌株的获得

参考文献[26], 以 CGMCC11546 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 *glnA* 上下游同源臂融合片段 *glnA*-UD。先将 *glnA*-UD 连接到 pMD-19T 载体上, 构建克隆载体 pT-*glnA*-UD(图 1A), 经酶切、测序鉴定无误后回收 *glnA*-UD。再将 *glnA*-UD 与 pEXG2 质粒连接构建基因打靶载体 pEXG2-*glnA*-UD(图 1B), 鉴定无误后电转进 CGMCC11546 菌株进行同源重组。将菌液稀释涂布在含有 50 μ g/mL 庆大霉素的 LB 固体培养基上并挑选存活的菌落接种在含有 8%蔗糖的 LB 平板上培养, 验证无误后保存。

1.4.3 Δ *glnA* 菌株可得然胶产量验证

按照按照文献[35,38]所述方法进行可得然胶产量的测定。

1.4.4 Δ *glnA* 菌株生长曲线测定

参考文献[26], 将活化菌液按 2%的接种量接入种子

培养基(250 mL 锥形瓶装液量 50 mL), 30 °C、250 r/min 培养, 每隔 2 h 取样, 测 OD₆₀₀ 值。

1.4.5 氮含量测定

按照 HJ 536—2009《水质 氨氮的测定 水杨酸分光光度法》标准检测氮含量。

1.4.6 蔗糖含量测定

按照 GB 5009.8—2023《食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》标准检测蔗糖含量。

1.4.7 可得然胶合成相关基因的定量分析

以 CGMCC11549 基因表达量为参考, 用实时荧光定量 PCR 引物分别检测发酵 6 h 和 12 h 的 *fixN*、*ppx*、*exoC*、*galU*、*crdR*、*crdS*、*ntrB*、*ntrC* 和 *glnA* 基因表达量。

1.5 数据处理

本研究中采用 Excel 2013、SPSS 22.0 统计软件进行数据处理, 采用 GraphPad prism 8.0 进行图表绘制, 每组实验数据均测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 *glnA* 基因同源重组基因敲除载体构建

将鉴定无误的 *glnA* 上下游同源臂融合片段 *glnA*-UD

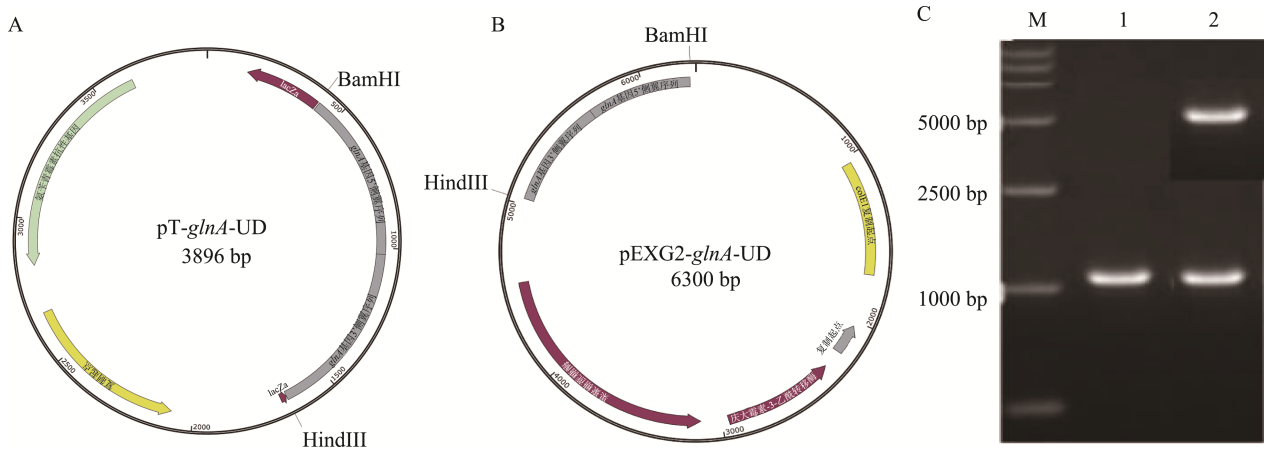
与 pEXG2 质粒构建基因打靶载体 pEXG2-*glnA*-UD, 酶切鉴定, 如图 1C 所示。酶切结果显示, 酶切产物有两条条带, 较小的片段在 1000 bp 左右, 较大的片段在 5000 bp 左右, 条带大小正确, 基因打靶载体 pEXG2-*glnA*-UD 准确无误。

2.2 $\Delta glnA$ 菌株的验证

利用基因重组方法构建 *glnA* 敲除株。将 PEXG2-*glnA*-UD 电转化到土壤杆菌 CGMCC11546 菌株中, 并进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 2 所示。10 个选定菌株均扩增为同源臂融合片段未扩增为 *glnA* 片段。取编号为 1 的菌株表示为 $\Delta glnA$, 发酵 96 h 后可以获得可得然胶的粗产量, 如图 3 所示。从发酵结果可以看出, 经过 96 h 的发酵后, $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌 CGMCC11546 的可得然胶粗产量存在极显著差异, $\Delta glnA$ 菌株可得然胶产量约 4 g/L, 相对于 CGMCC11546 降低了 60%

2.3 $\Delta glnA$ 菌株生长代谢情况

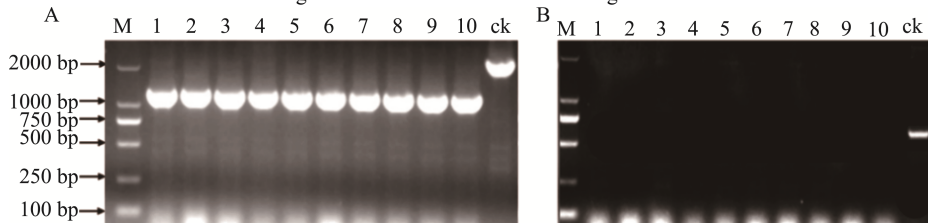
为了消除 *glnA* 基因敲除对菌体生长的影响, 本研究测定了 $\Delta glnA$ 菌株的生长曲线、发酵 24 h 可得然胶粗产量、24 h 后的氮含量和蔗糖含量。从生长曲线看(图 4A), $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌 CGMCC11546 之间没有差异。两种菌株均在 6 h 进入指数生长期, 在 18 h 进入稳定期。



注: A. pT-*glnA*-UD 质粒图谱; B. pEXG2-*glnA*-UD 质粒图谱; C. pEXG2-*glnA*-UD 双酶切电泳结果; 图 C 中 M. 10000 DNA ladder; 1. *glnA* 基因上下游同源臂融合序列; 2. pEXG2-*glnA*-UD 双酶切电泳结果。

图 1 质粒和双酶切结果

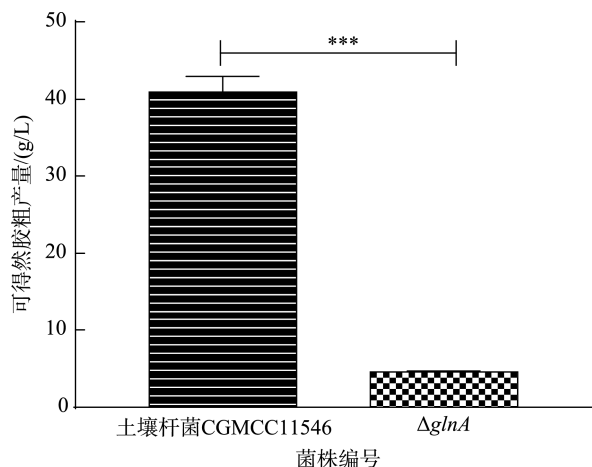
Fig.1 Vector and result of double digestion



注: A. 同源臂融合片段扩增结果; B. *glnA* 基因片段扩增结果; M. DL2000 marker; 1~10. 菌株编号; ck. 土壤杆菌 CGMCC11546。

图 2 菌落 PCR 鉴定结果

Fig.2 Result of colony PCR



注: ***表示差异极显著($P < 0.001$)。

图 3 发酵 96 h 可得然胶粗产量

Fig.3 Curdlan yield after fermentation for 96 h

可得然胶粗产量方面(图 4B), 发酵 9 h 后, $\Delta glnA$ 菌株的产量开始低于土壤杆菌 CGMCC11546 菌株。12 h 后 $\Delta glnA$ 菌株产量稳定。而土壤杆菌 CGMCC11546 菌株产量继续增长, 二者在 12 h 后出现明显差异。

氮消耗方面(图 4C), 无论是 $\Delta glnA$ 菌株还是土壤杆菌 CGMCC11546 菌株, 氮元素在约 15 h 后基本被消耗, 21 h 后无法检测到氮元素。这表明 $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌

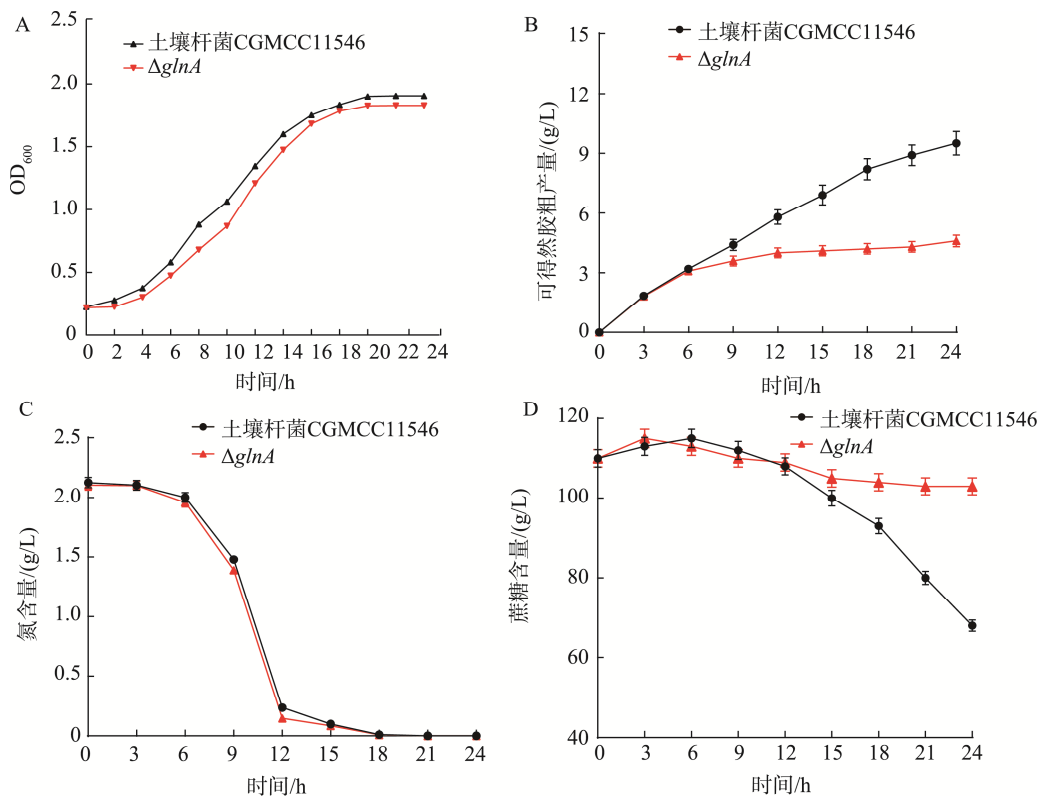
CGMCC11546 菌株的生长没有差异, 这与生长结果一致。

蔗糖消耗方面(图 4D), $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌 CGMCC11546 菌株在 12 h 前的蔗糖消耗量没有明显差异, 但在 15 h 后, $\Delta glnA$ 菌株蔗糖消耗少, 这与 $\Delta glnA$ 菌株可用粗胶生产减少结果一致。

上述结果表明, $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌 CGMCC11546 菌株的生长正常无差别。然而, $\Delta glnA$ 菌株可得然胶合成和蔗糖消耗明显低于土壤杆菌 CGMCC11546 菌株, 这说明 *glnA* 基因的敲除会降低土壤杆菌对糖的消耗效率, 减少糖向可得然胶的转化。

2.4 不同时期可得然胶合成相关基因的表达

实时荧光定量 PCR 检测发现, 在发酵 6 h 时, $\Delta glnA$ 菌株中 *fixN* 基因表达量上调 3.8 倍, *ntrC* 基因表达量上调 10 倍。NtrC 是一个转录调控因子, 可以正向调控 *glnA* 基因的表达, *glnA* 基因的作用便是催化 L-谷氨酸和 NH_3 合成 L-谷氨酰胺, 从而细菌快速利用氮源^[35]。而在 $\Delta glnA$ 菌株中 NtrC 的高表达或许是因为 *glnA* 的敲除解除了谷氨酰胺对 NtrC 的反馈抑制, 提高了 NtrC 的表达。发酵 12 h 时, $\Delta glnA$ 菌株中, *galU*、*crdR*、*crdS* 基因以及 *ntrB*、*ntrC* 基因表达量明显降低, *galU* 基因下调了 3.8 倍, *crdR* 基因下调了 1.6 倍, *crdS* 基因下调了 33 倍, *ntrB* 和 *ntrC* 也分别下调了 3 倍和 4 倍。



注: A. 生长曲线; B. 发酵前 24 h 可得然胶粗产量; C. 发酵前 24 h 氮含量; D. 发酵前 24 h 蔗糖含量。

图 4 发酵前 24 h $\Delta glnA$ 菌株与土壤杆菌 CGMCC11546 菌株生长代谢情况

Fig.4 Growth and metabolic status of $\Delta glnA$ strain and *Agrobacterium* sp. CGMCC11546 strain 24 hours before fermentation.

从实时荧光定量 PCR 结果(图 5)来看, *glnA* 基因敲除能够提高了 *fixN* 基因、*exoC* 基因、以及 *ntrC* 基因表达, 其中 *ntrC* 基因编码的 NtrC 是 NtrBC 中的核心蛋白质, 而 NtrBC 参与氮代谢, 且 NtrC 调控的基因正是 *glnA*, 在 $\Delta glnA$ 菌株中, *crdR* 和 *crdS* 基因表达量同样是降低的, 且 *galU* 基因表达量也是降低的, GalU 的产物 UDP-葡萄糖是可得然胶合成的底物, *galU* 基因表达降低, 导致 UDP-葡萄糖减少, 从而影响了可得然胶合成。综合来看, *glnA* 基因可以影响 UDP-葡萄糖的合成和 *crdR* 和 *crdS* 的表达, 两者共同作用使得 $\Delta glnA$ 菌株中可得然胶产量减少。

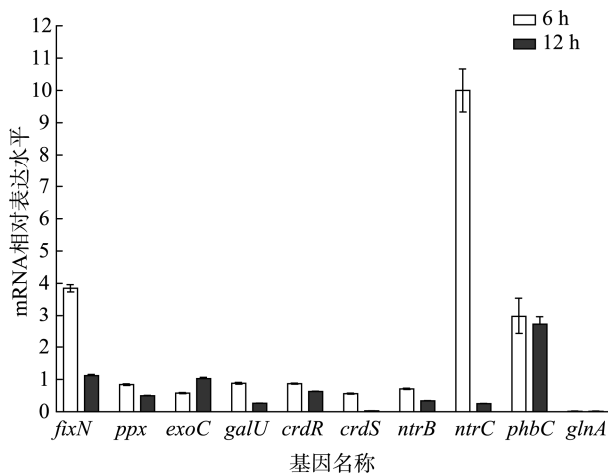


图 5 $\Delta glnA$ 菌株可得然胶合成相关基因实时荧光定量 PCR 结果
Fig.5 Real-time fluorescence quantification PCR results of genes related to curdlan synthesis obtained from the $\Delta glnA$ strain

3 结论

产可得然胶土壤杆菌 CGMCC11546 菌株中, 基因 *glnA* 被敲除之后可得然胶产量降低了 60%。土壤杆菌 CGMCC11546 菌株、 $\Delta glnA$ 菌株在发酵过程中生长代谢情况均正常, 可得然胶产量降低并不是因为菌体生长不好、受损引起的。在发酵过程中氨基酸消耗情况是一致的, $\Delta glnA$ 菌株和土壤杆菌 CGMCC11546 生长一致。糖消耗方面, $\Delta glnA$ 菌株与土壤杆菌 CGMCC11546 在 12 h 之前无明显差异, 12 h 之后, $\Delta glnA$ 菌株糖的消耗开始小于 CGMCC11546 菌株, 在 15 h 之后 $\Delta glnA$ 菌株与土壤杆菌 CGMCC11546 之前出现明显差异, 土壤杆菌 CGMCC11546 蔗糖消耗比 $\Delta glnA$ 菌株明显增加。综合生长曲线、可得然胶粗产量、氨基氮和糖结果, 初步得到 *glnA* 基因的敲除不影响菌体生长, 但是影响了可得然胶的合成。从定量结果来看, *glnA* 基因敲除能够提高 *fixN* 基因的表达, 同时在产胶期 *exoC* 基因表达增加, *glnA* 基因可以影响细胞中能量的合成这也与之前预测的基因功能吻合。但是在 $\Delta glnA$ 菌株中, 编码可得然胶合酶催化亚基的 *crdS* 基因与调控基因 *crdR* 表达量均减少, 这就可以解释 $\Delta glnA$ 菌

株可得然胶产量降低是因为 *crdR* 和 *crdS* 基因表达量下调引起的。在 $\Delta glnA$ 菌株中, *crdR* 和 *crdS* 基因表达量同样是降低的, 且 *galU* 基因表达量也是降低的, GalU 的产物 UDP-葡萄糖是可得然胶合成的底物, *galU* 基因表达降低, 导致 UDP-葡萄糖减少, 从而影响了可得然胶合成。综合来看, *glnA* 基因可以降低 UDP-葡萄糖的合成和 *crdR* 和 *crdS* 的表达, 两者共同作用使得 $\Delta glnA$ 菌株中可得然胶产量减少, 这与已经报道的结果相吻合^[40]。本研究表明 *glnA* 基因敲除后, 与氮代谢相关的基因表达水平均下调, 氮代谢受阻而引起可得然胶合成受限, 最终导致可得然胶合成量减小。*glnA* 基因参与氮代谢, 其编码产物为谷氨酰胺合成酶, 催化 L-谷氨酸和 NH_3 合成 L-谷氨酰胺。前期研究中发现 *glnA* 基因突变可得然胶产量明显下降(数据未发表), 本研究通过对 *glnA* 基因进行敲除, 初步研究其对可得然胶合成的影响, 为后续提高可得然胶产量提供分子生物学基础。

参考文献

- [1] HARADA T, FUJIMORI K, HIROSE S, *et al.* Growth and β -glucan 10C3K production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes in defined medium [J]. Microbiology and Fermentation Industry, 1966, 30(8): 764–769.
- [2] PHILLIPS KR, PIK J, LAWFORD HG, *et al.* Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29(10): 1331–1338.
- [3] NAKANISHI I, KIMURA K, SUZUKI T, *et al.* Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other P-1,3-glucan in microorganisms with aniline blue [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2006, 22(1): 1–11.
- [4] 杨镛, 臧一字, 吴鹏, 等. 多糖类食品胶体的功能特性及其在食品加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(5): 283–292.
- [5] YANG R, ZANG YY, WU P, *et al.* Research progress on functional properties of polysaccharide-based food colloids and their application in food processing [J]. Food Science, 2024, 45(5): 283–292.
- [6] CHEN Y, BERA H, SI L, *et al.* Tailor-made curdlan based nanofibrous dressings enable diabetic wound healing [J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 348(PB): 122876.
- [7] MOUSA I, ALSHARARI MA, ALALAWY IA, *et al.* Harnessing the potential of sargassum latifolium for sustainable synthesis of Ag/Bi₂O₃-curdlan nanocomposites: Phytochemical characterization and biological applications [J]. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2025. <https://doi.org/10.1007/s10904-024-03566-7>
- [8] ZHUANG YD, FAN CQ, ZHENG YY, *et al.* Study on the interaction properties between curdlan polysaccharide and water molecules in coal processing sludge by molecular dynamics simulation [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2024, 26(7): 163.
- [9] HONGLIANG G, LI Y, JIANGTAO T, *et al.* Characterization and rheological properties analysis of the succinoglycan produced by high-yield mutant of *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 61–70.
- [10] MENG Y, GANG F, YUMEI S, *et al.* Biosynthesis and applications of curdlan [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118597.
- [11] TAKASHI K, NOBUYUKI S, KOJI N. Heat-melt of β -1,3-D-glucan gel [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1977, 41(7): 1315–1316.
- [12] ZHANG H, NISHINARI K, WILLIAMS MAK, *et al.* A molecular

- description of the gelation mechanism of curdlan [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 30(1): 7–16.
- [12] CHO SS. Handbook of dietary fiber [M]. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- [13] VERMA DK, NIAMAH AK, PATEL AR, *et al.* Chemistry and microbial sources of curdlan with potential application and safety regulations as prebiotic in food and health [J]. *Food Research International*, 2020, 133(prepublish): 109136.
- [14] 曹云刚, 胡春杰, 李远征, 等. 可得然胶功能特性及在肉及肉制品中的应用进展[J]. *精细化工*, 2024, 41(3): 491–498, 587.
CAO YG, HU CJ, LI YZ, *et al.* Functional properties of curdlan and its application progress in meat and meat products [J]. *Fine Chemicals*, 2024, 41(3): 491–498, 587.
- [15] HOU L, ZHAO B, FU S, *et al.* Effects of curdlan on the quality of frozen steamed bread: Quality changes, water state and starch crystallinity [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2024, 59(9): 6611–6618.
- [16] VASIEE A, JAMAB SM, FALAH F, *et al.* Microbial production of curdlan in sugar beet molasses medium: Effects on physicochemical attributes of reduced-fat frankfurter sausages [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2025, 216: 117310.
- [17] BIELECKA MM, FLORCZUK A, ALJEWICZ M. An evaluation of the impact of curdlan and buttermilk addition on the functional properties and sensory quality of processed cheese analogs [J]. *Molecules*, 2024, 30(1): 66.
- [18] LU M, ZHANG C, MA L, *et al.* Cryoprotective effect of magnetic field-assisted freezing in combination with curdlan on myofibrillar protein of *Litopenaeus vannamei*: Oxidative aggregation, protein structure and thermal stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2025, 160(P1): 110730.
- [19] SUN X, LIU Y, LI X, *et al.* Curdlan inclusion modifies the rheological properties and the helix-coil transition behavior of gelatin and increases the flexibility of gelatin films [J]. *Food Chemistry*, 2025, 469: 142567.
- [20] CHEN K, JIANG J, TIAN Y, *et al.* Improved konjac glucomannan/curdlan-based emulsion coating by mung bean protein addition for cherry tomato preservation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 291: 139080.
- [21] MOON CJ, LEE JH. Use of curdlan and activated carbon composed adsorbents for heavy metal removal [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(3/4): 1279–1283.
- [22] 张静. 土壤杆菌合成可得然胶相关基因的筛选及其分子机制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2019.
ZHANG J. The research of screening and molecular mechanism of genes involved in curdlan synthesis in *Agrobacterium* sp. [D]. Shanghai: East China Normal University, 2019.
- [23] LEE SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49(1): 1–14.
- [24] WOJCIECH S, EWELINA J, DUSAN M, *et al.* Physicochemical studies of novel sugar fatty acid esters based on (R)-3-hydroxylated acids derived from bacterial polyhydroxyalkanoates and their potential environmental impact [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1112053.
- [25] CHARLES TC, CAI GQ, ANEJA P. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) meliloti [J]. *Genetics*, 1997, 146(4): 1211–1220.
- [26] 武世强, 蒋德明, 张静, 等. *phbC* 基因敲除对土壤杆菌产可得然胶的影响[J]. *工业微生物*, 2019, 49(4): 21–26.
WU SQ, JIANG DM, ZHANG J, *et al.* The effect of *phbC* gene knockout on the production of available curdlan by *Agrobacterium* [J]. *Industrial Microbiology*, 2019, 49(4): 21–26.
- [27] ZHANG HT, ZHAN XB, ZHENG ZY, *et al.* Sequence and transcriptional analysis of the genes responsible for curdlan biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under simulated dissolved oxygen gradients conditions [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(1): 163–175.
- [28] STASINOPOULOS SJ, FISHER PR, STONE BA, *et al.* Detection of two loci involved in (1→3)- β -glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene [J]. *Glycobiology*, 1999(1): 31–41.
- [29] TARA K, CHANDANA VE, BRUCE ASA, *et al.* Topological characterization of an inner membrane (1→3)- β -D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749 [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(10): 693–706.
- [30] YU X, ZHANG C, YANG L, *et al.* *CrdR* function in a curdlan-producing *Agrobacterium* sp. ATCC31749 strain [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 25.
- [31] MCINTOSH M, STONE BA, STANISICH VA. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -d-glucans [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2): 163–173.
- [32] WU JR, YU LJ, ZHAN XB, *et al.* NtrC-dependent regulatory network for curdlan biosynthesis in response to nitrogen limitation in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(11): 1552–1558.
- [33] YU L, WU J, LIU J, *et al.* Enhanced curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 by addition of low-polyphosphates [J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2011, 16(1): 34–41.
- [34] YU LJ, WU JR, ZHENG ZZ, *et al.* Changes in gene transcription and protein expression involved in the response of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 to nitrogen availability during curdlan production [J]. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 2011, 47(5): 487–493.
- [35] 张靖宇. 农杆菌可得然胶合成相关双组分调节系统基因的筛选与机制探究[D]. 上海: 华东师范大学, 2023.
ZHANG JY. Screening and regulation mechanism of twocomponent systems of *Agrobacterium* related to curdlan biosynthesis [D]. Shanghai: East China Normal University, 2023.
- [36] 于婷婷, 韩鸿宇, 张永刚, 等. 高凝胶强度可得然胶生产菌的构建筛选与发酵工艺优化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(18): 82–90.
YU TT, HAN HY, ZHANG YG, *et al.* Construction and screening of high gel strength curdlan production bacteria and optimization of fermentation medium [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(18): 82–90.
- [37] YU T, WANG Y, WANG W, *et al.* Optimizing curdlan synthesis: Engineering *Agrobacterium tumefaciens* ATCC31749 for enhanced production using dextrin as a carbon source [J]. *Fermentation*, 2024, 10(5): 240.
- [38] 刘晓霞. 土壤杆菌产可得然胶发酵工艺优化及其性质的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
LIU XX. The research of fermentation process optimization and properties of curdlan by *Agrobacterium* sp. [D]. Shanghai: East China Normal University, 2017.
- [39] ZHANG W, GAO HL, HUANG YM, *et al.* Glutamine synthetase gene *glnA* plays a vital role in curdlan biosynthesis of *Agrobacterium* sp. CGMCC 11546 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165(PA): 222–230.
- [40] 俞珊, 段孟霞, 童彩玲, 等. 可得然胶功能性质及其在食品中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(19): 277–284.
YU S, DUAN MX, TONG CL, *et al.* Progress in research on functional properties of curdlan and its application in food [J]. *Food Science*, 2022, 43(19): 277–284.
- [41] AMBROOK J, DAVID RUSSELL. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
SAMBROOK J, DAVID R. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. Beijing: Science Publishing Company, 2002.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)