

学校代码：10251

学 号：Y10160172

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

论文题目 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌发酵生产

纤维素谷氨酸和 γ -氨基丁酸

学科专业 生物化工

研究方向 木质纤维素生物炼制

论文作者 温经柏

指导教师 鲍杰 教授

定稿日期：2019 年 05 月 20 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌发酵生产
纤维素谷氨酸和 γ -氨基丁酸

温经柏

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学 生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2019.5.20 论文答辩日期: 2019.5.28

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 钟建江 教授

评 阅 人: 孙际宾 研究员

许 平 教授

万印华 研究员

李炳志 教授

陈国强 教授

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____①_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名： 温经柏

2019年05月29日

指导教师签名： 鲍杰

2019年05月29日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名： 温经柏

2019年 05 月 29 日

代谢工程发酵谷氨酸棒状杆菌生产纤维素谷氨酸和 γ -氨基丁酸

摘要

谷氨酸是一种重要的食品添加剂和化工原料，其脱羧反应产物 γ -氨基丁酸是一种重要的生物活性物质和聚合材料单体。以来源广泛、价格低廉、可再生的木质纤维素原料替代粮食性淀粉原料发酵生产谷氨酸和 γ -氨基丁酸，能够为它们作为化工原料和材料单体的大规模应用奠定坚实基础。然而目前利用木质纤维素原料进行谷氨酸和 γ -氨基丁酸发酵的研究极少报道，也没有真正意义上的木质纤维素原料发酵的案例。这可能是由于在复杂的木质纤维素体系下影响谷氨酸和 γ -氨基丁酸发酵的关键因素还不明确。为了实现真正意义上的纤维素谷氨酸和 γ -氨基丁酸发酵，本论文以干法生物炼制技术为依托，对 *Corynebacterium glutamicum* 利用玉米秸秆水解液进行谷氨酸和 γ -氨基丁酸发酵的过程进行研究。首先对玉米秸秆水解液中影响谷氨酸发酵的关键因素进行了探究，确定了过量生物素是水解液中 *C. glutamicum* 无法正常积累谷氨酸的关键因素。然后对 *C. glutamicum* 进行代谢工程改造，实现高生物素木质纤维素体系下生产谷氨酸并显著提高了纤维素谷氨酸的发酵性能。最后通过代谢工程改造，解决 *C. glutamicum* 发酵 γ -氨基丁酸过程中的关键性问题和障碍，实现利用木质纤维素原料高产 γ -氨基丁酸。

本研究第一部分对 *C. glutamicum* 利用玉米秸秆水解液发酵谷氨酸的过程进行研究，发现菌株在水解液中虽然生长良好但是不积累谷氨酸。通过研究发现，玉米秸秆水解液中存在过量的生物素，其浓度高达 $22.5 \pm 4.3 \mu\text{g/L}$ ，是生物素“亚适量”条件的 10 倍左右。然后通过一系列的实验证实水解液中过量的生物素是谷氨酸不能够积累的关键因素。进一步的研究发现，木质纤维素原料中普遍存在大量的生物素并且生物素在生物炼制过程中保持稳定，最终导致水解液中包含过量的生物素而无法进行谷氨酸发酵。此外，通过测定我们发现木质纤维素原料中其他 B 族维生素在生物炼制过程中也得以保留，它们可以作为营养成分对发酵过程起到促进作用。

本研究第二部分针对 *C. glutamicum* 在高生物素木质纤维素体系下不积累谷氨酸的问题对菌株进行代谢工程改造，实现在高生物素玉米秸秆水解液中生产谷氨酸。通过对多种代谢工程改造方法的尝试和评估，我们发现激活谷氨酸分泌通道和降低 α -酮戊二酸脱氢酶活性具有最好的效果。首先通过对谷氨酸分泌通道 MscCG 的改造激活谷氨酸分泌，成功实现在高生物素下持续积累谷氨酸，谷氨酸浓度达到 9.2 g/L 。随后通过优化 *odhA* 基因 RBS 序列的方式降低 α -酮戊二酸脱氢酶活性，显著提高了谷氨酸的产量，谷氨酸浓度达到 55.7 g/L 。比出发菌株青霉素诱导下的谷氨酸发酵浓度提高 16.8%，生产速率提高 55.6%，成功实现不经过诱导生产谷氨酸。最终得到的重组菌株通过分批发酵生产谷氨酸浓度达到 65.2 g/L ，得率达到 0.63 g/g 葡萄糖，实现了真正意义上的纤维素谷氨酸发酵。

本研究第三部针对 *C. glutamicum* 发酵 γ -氨基丁酸过程中生产速率、浓度和得率低的关键问题，对菌株进行代谢工程改造。首先通过异源表达大肠杆菌谷氨酸脱羧酶，初步实现在谷氨酸高产条件下生产 γ -氨基丁酸。随后将谷氨酸脱羧酶通过 Sec 通道分泌表达使谷氨酸脱羧反应直接在胞外进行，成功将 γ -氨基丁酸的产量提高将近 4 倍。最后对分泌表达质粒启动子优化和 γ -氨基丁酸通透酶 *gabP* 基因进行敲除进一步提高 γ -氨基丁酸的产量。最终得到的重组菌株利用复合培养基分批补料发酵生产 γ -氨基丁酸浓度能够达到 77.6 g/L，得率达到 0.44 g/g 葡萄糖，生产速率达到 $1.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，是 *C. glutamicum* 基于谷氨酸脱羧酶生产 γ -氨基丁酸所达到的最高指标，显著提高了 *C. glutamicum* 发酵 γ -氨基丁酸的生产速率、浓度和得率。该菌株利用玉米秸秆水解液进行 γ -氨基丁酸发酵浓度达到 39 g/L，得率达到 0.44 g/g 葡萄糖，成功实现纤维素 γ -氨基丁酸的发酵生产。

通过本论文的研究，我们成功发现并解决了木质纤维素体系发酵谷氨酸和 γ -氨基丁酸的关键性问题，实现了利用木质纤维纤维素原料高产谷氨酸和 γ -氨基丁酸，为进一步促进谷氨酸和 γ -氨基丁酸作为聚合材料单体的工业化应用奠定坚实基础。

关键词：木质纤维素；*Corynebacterium glutamicum*；生物素；谷氨酸； γ -氨基丁酸

Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Cellulosic Glutamic Acid and γ -Aminobutyric Acid Fermentation

Abstract

Glutamic acid is one of the most important food additives and chemical raw materials, and its decarboxylation product γ -aminobutyric acid is an important bioactive and polymer monomer compound. Glutamic acid and γ -aminobutyric acid fermentation using the most available, cheap and renewable lignocellulose biomass instead of food starch-based feedstocks can lay a solid foundation for their large-scale application as chemical raw materials or polymer monomers. However, few studies focused on their production from lignocellulose biomass, and no practical results had ever been reported. This may be due to the key factors in the complicated lignocellulose system that affect glutamic acid and γ -aminobutyric acid fermentation are still unclear. In this paper, in order to achieve a real breakthrough in the fermentation of cellulosic glutamic acid and γ -aminobutyric acid, their fermentation by *Corynebacterium glutamicum* using corn stover hydrolysate that prepared based on dry biorefinery process was studied. First, the key factors that affect glutamate production were investigated, and excessive biotin in corn stover hydrolysate was demonstrated to be the key factor for no glutamic acid accumulation. Then metabolic engineering was applied to trigger efficient glutamic acid production in corn stover hydrolysate by *C. glutamicum*, and the glutamic acid production performance was significantly improved. Finally, metabolic engineering was applied to solve the key problems and obstacles in γ -aminobutyric acid fermentation, and efficient γ -aminobutyric acid production from corn stover hydrolysate was successfully achieved.

The first part of this study focused on glutamic acid production in corn stover hydrolysate, and better cell growth but no glutamic acid accumulation was observed when *C. glutamicum* cells were cultured in corn stover hydrolysate. Further experiment discovered excessive biotin in 15% (w/w) corn stover hydrolysate. The biotin concentration was as high as $22.5 \pm 4.3 \mu\text{g/L}$, which was about ten-fold higher than that of “sub-optimal” level for glutamic acid accumulation. A series of experiments further demonstrated that excessive biotin in corn stover hydrolysate was the key factor for no glutamic acid accumulation. The rich existence of biotin was found to be a common phenomenon in a wide range of lignocellulose biomass, and most of biotin remain stable during the dry biorefining chain and thus creates an excessive condition for glutamic acid accumulation in corn stover hydrolysate. We also found that the major vitamin B compounds were under high concentration levels even after harsh pretreatment, and they may act as potential nutrients to biorefining fermentations.

The second part of this study tried to achieve efficient glutamic acid accumulation by metabolic engineering of *C. glutamicum* S9114. Among various metabolic engineering strategies we tried or evaluated, activating glutamic acid secretion and decreasing α -

oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) activity were the two most effective methods. First, we modified the glutamate secretion channel MscCG to activate the glutamic acid secretion, and successfully achieved constitutive glutamic acid accumulation in the biotin excessive corn stover hydrolysate with a final glutamic acid titer of 9.2 g/L. Then the ODHC activity was attenuated by regulating *odhA* RBS sequence, and glutamic acid accumulation was significantly improved to more than five folds. 55.7 g/L glutamic acid was accumulated. 16.8% and 55.6% improvement in glutamic acid titer productivity were achieved compared to that of penicillin triggered glutamic acid fermentation by the starting strain. Efficient cellulosic glutamic acid production was successfully reached. The final strain reached a highest glutamic acid titer of 65.2 g/L with a yield of 0.63 g/g glucose in fed-batch fermentation, and the practical cellulosic glutamate fermentation was successfully achieved for the first time.

The third part of this thesis focused on metabolic engineering of *C. glutamicum* to overcome key problems of low titer, yield and productivity in γ -aminobutyric acid fermentation. First, a modified glutamate decarboxylase from *E. coli* was heterologously expressed in *C. glutamicum* to achieve γ -aminobutyric acid production under glutamate overproducing condition. Then we facilitated the extracellular decarboxylation reaction by secreting expression of glutamate decarboxylase through the Sec pathway, and more than 4-folds improvement in γ -aminobutyric acid titer was achieved. Consequent expression promoter optimization and *gabP* gene knockout further improved the γ -aminobutyric acid titer. Fed-batch fermentation of the final strain produced 77.6 g/L of GABA with the yield of 0.44 g/g glucose and productivity of 1.21 g·L⁻¹·h⁻¹ in complex medium. This is the highest result ever reported for γ -aminobutyric acid production by *C. glutamicum*. Significant improvement in γ -aminobutyric acid titer, yield and productivity was achieved. Finally, 39 g/L γ -aminobutyric acid was produced in corn stover hydrolysate by the final strain with the yield of 0.44 g/g glucose, successfully achieved cellulosic γ -aminobutyric acid production.

Based on the above studies, the key problems in glutamic acid and γ -aminobutyric acid production from lignocellulose biomass were identified and solved, and practical cellulosic glutamic acid and γ -aminobutyric acid fermentation was successfully reached. These results laid a solid foundation for promoting glutamate and γ -aminobutyrate as monomers use in industrial production of polyesters and polyamides.

Keywords: Lignocellulose; *Corynebacterium glutamicum*; biotin; glutamic acid; γ -aminobutyric acid

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.2 谷氨酸棒状杆菌与生物炼制	3
1.3 谷氨酸发酵生产	4
1.4 γ -氨基丁酸发酵生产	9
1.5 立题依据和主要研究内容	11
第 2 章 木质纤维素中过量生物素的发现及其对谷氨酸棒状杆菌发酵谷氨酸的影响	13
2.1 引言	13
2.2 材料与方法	14
2.2.1 原料	14
2.2.2 酶、试剂以及仪器设备	14
2.2.3 菌种、培养基以及培养方法	14
2.2.4 原料预处理以及生物脱毒	15
2.2.5 玉米秸秆水解液制备	15
2.2.6 谷氨酸发酵	16
2.2.7 实时荧光定量 PCR	19
2.2.8 B 族维生素测定	19
2.2.9 分析方法	21
2.2.10 谷氨酸糖酸转化率计算	21
2.3 结果与讨论	21
2.3.1 水解液中谷氨酸发酵情况	21
2.3.2 青霉素诱导谷氨酸发酵	23
2.3.3 发酵过程中的胞内外生物素浓度变化	25
2.3.4 玉米秸秆水解液中生物素对谷氨酸发酵的影响	27
2.3.5 生物炼制过程中的生物素	32
2.3.6 生物炼制过程中的其他 B 族维生素	34
2.5 本章小结	36
第 3 章 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌利用玉米秸秆原料生产谷氨酸	37
3.1 引言	37
3.2 材料与方法	38
3.2.1 菌种、培养基以及培养方法	38

3.2.2 酶、试剂以及仪器设备.....	38
3.2.3 质粒构建.....	43
3.2.4 重组菌株构建.....	44
3.2.5 木质纤维素原料及其生物炼制处理.....	45
3.2.6 谷氨酸发酵.....	45
3.2.7 分析方法.....	46
3.2.8 谷氨酸糖酸转化率计算.....	46
3.3 结果与讨论.....	46
3.3.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在高生物素水解液下的谷氨酸发酵.....	46
3.3.2 谷氨酸转运体 MscCG 改造促进谷氨酸分泌.....	48
3.3.3 通过 <i>odhA</i> 基因 RBS 弱化提高谷氨酸生产.....	50
3.3.4 强化谷氨酸合成以及分泌途径提高谷氨酸生产的尝试.....	52
3.3.5 重组谷氨酸棒状杆菌 XW6 谷氨酸发酵评价.....	54
3.4 本章小结.....	55
第 4 章 谷氨酸棒状杆菌分泌表达谷氨酸脱羧酶促进纤维素 γ -氨基丁酸发 酵生产.....	57
4.1 引言.....	57
4.2 材料与方法.....	58
4.2.1 菌种、培养基以及培养条件.....	58
4.2.2 酶、试剂以及仪器设备.....	58
4.2.3 质粒构建以及重组菌株构建.....	63
4.2.4 木质纤维素原料及其生物炼制处理.....	64
4.2.5 GABA 发酵.....	64
4.2.6 蛋白样品处理以及 SDS-PAGE.....	65
4.2.7 分析方法.....	65
4.2.8 γ -氨基丁酸得率计算.....	65
4.3 结果与讨论.....	65
4.3.1 异源表达大肠杆菌谷氨酸脱羧酶突变体实现 GABA 发酵生产.....	65
4.3.2 分泌表达谷氨酸脱羧酶促进 GABA 生产.....	66
4.3.3 表达质粒启动子优化和阻断 GABA 降解提高 GABA 产量.....	69
4.3.4 发酵罐上重组菌株利用复合培养基发酵生产 GABA.....	72
4.3.5 重组菌株利用玉米秸秆水解液发酵生产 GABA.....	74
4.4 本章小结.....	75
第 5 章 结论与展望.....	76
5.1 结论与创新点.....	76

5.2 展望	77
参考文献	79
附录 I 仪器设备	102
附录 II 人工合成的 <i>gad</i> 基因序列	103
博士期间研究成果	105
致谢	106

第 1 章 绪论

1.1 木质纤维素生物炼制

随着当今世界人口的不断增长、化石资源的逐渐消耗殆尽以及环境污染和温室效应的加剧，以粮食或者化石原料进行能源以及化学品的生产逐渐受到限制^[1, 2]。寻找替代性原料势在必行，而在所有潜在的替代性原料中，木质纤维素原料来源广泛、价格低廉，是含量最为丰富的可再生资源^[3]。利用木质纤维素原料进行替代性能源以及化学品的生产，能够有效缓解这一系列问题，具有重大的研究和应用价值^[4]。

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[5, 6]，除此之外还含有一些结构性蛋白、脂类及灰分等成分^[7, 8]。这些物质以特定的方式构成木质纤维素致密紧凑的结构，从而具有较强的生物顽抗性，不容易被微生物利用与降解^[9, 10]。为此，木质纤维素原料往往需要经过一系列的生物炼制过程处理转化为可发酵性糖后才能被利用^[11]。木质纤维素生物炼制过程主要包括预处理、脱毒、水解、发酵以及产品分离纯化等^[12, 13]。

木质纤维素具有较强的生物顽抗性，必须通过预处理步骤破坏其致密结构后才能够被利用^[11, 14]。预处理方法主要包括以下四大类^[14-19]：物理法（如机械研磨、热水预处理等^[14, 15]）、化学法（如酸、碱、离子液预处理等^[14, 16, 18]）、物理化学法（如氨纤维爆破、CO₂/SO₂ 蒸汽爆破等^[18]）以及生物法（如白腐真菌处理^[15, 18, 19]）。其中稀酸预处理比较常用且适用范围非常广^[18]。稀硫酸预处理能够有效降解半纤维素组分从而破坏木质纤维素结构，但是预处理过程产生大量废水且对设备腐蚀性强^[16, 20, 21]。本实验室针对稀硫酸预处理存在的这些问题进行了改进，开发了干酸预处理技术^[13, 22, 23]。该预处理技术极大的降低了硫酸、蒸汽和水的用量，实现了预处理过程中零废水产生^[23]，并且这种预处理方法能够最大程度减少酸对预处理反应器的腐蚀作用^[21]，解决了稀酸预处理过程中存在的突出问题，具有非常大的应用潜力。

预处理过程通常需要在高温高压的条件下进行，因此不可避免导致木质纤维素原料中的一些组分过度降解产生抑制物，产生对后续糖化和发酵过程具有抑制作用^[24-26]。虽然不同来源的木质纤维素在抑制物产生中可能存在差异，但是根据其形成以及结构特征大致可以分为呋喃醛类、有机弱酸类和酚类^[27]。其中比较典型的抑制物包括：呋喃类的糠醛和 5-羟甲基糠醛（HMF）等^[28, 29]；有机弱酸类的甲酸、乙酰丙酸和乙酸等^[30]；酚类的香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛等^[31, 32]。这些抑制物对微生物生长和发酵具有抑制作用，包括抑制代谢过程中相关酶的活性、降低胞内 pH、导致胞内活性氧积累以及破坏细胞膜完整性等^[30, 33]。抑制物导致的菌株生长缓慢、发酵性能下降等问题是生物炼制过程中比较大的难题^[34]。为此，在生物炼制过程中需要进行脱毒以去除这些抑制物或者将其转化为毒性较低的物质^[34]。常见的脱毒方法包括物理法、化学法以及生物法等^[35, 36]。相比物理法和化学法大量的废水产生以及化学品大量消耗，生物法因其条件温和、耗水

量少等特点逐渐成为研究热点^[37]。本实验室在研究过程中筛选得到一株脱毒性能优异的霉菌，树脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae* ZN1^[38]，它能够优先利用预处理过程中产生的抑制物而保留物料中的大部分糖类^[39]。将该霉菌直接接种至固态的预处理后的物料，在通气的环境下能够实现快速脱毒^[39]。该固态生物脱毒方法相比于传统方法不需要进行液态脱毒，大大减少了水的消耗和废水产生，是真正具有实际应用价值的脱毒方式。

经过脱毒或者未经过脱毒的物料在进一步用于微生物发酵之前还需要进行水解释放可发酵性糖，这个过程称为水解或者糖化。目前经常采用的水解方式为纤维素酶水解，水解条件相对比较温和，能够避免单糖进一步降解产生抑制物^[40, 41]。纤维素酶通常包含内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶^[6]，它们能够作用于纤维素并将其水解成葡萄糖^[42]。除此之外，纤维素酶当中也含有作用于半纤维素的酶如乙酸乙酯酶、木聚糖酶以及 β -木糖苷酶等^[43]。在生物炼制应用过程中，由于纤维素酶的成本比较高，如何减少酶用量、提高酶水解效率和糖浓度是非常关键的问题^[6, 18]。为了得到高糖浓度，往往需要较高的底物浓度，因此底物和产物抑制作用问题比较严重^[44]，但是提高纤维素酶的添加量则会显著提高酶水解成本^[6, 12, 18, 45]。针对这个问题，本实验室设计的螺带式搅拌浆反应器能够在高物料载量下实现物料和酶的有效混合并显著降低纤维素酶的用量，节省成本^[44]。

在生物炼制过程中常采用的发酵方式包括分步糖化与发酵和同步糖化发酵^[46-49]。分步糖化与发酵是利用酶水解得到的糖化液进行发酵，同步糖化发酵则是将糖化和发酵两个过程在同一反应器里同时进行^[46]。分步糖化与发酵能够使糖化和发酵在各自的最适条件下进行从而提高发酵性能^[47]，但是糖化过程中较高的底物和产物抑制作用往往使糖化过程不够充分，导致糖的利用不完全^[47]。同步糖化过程中酶水解产生的可发酵性糖能够立即被微生物利用，从而缓解纤维素酶的底物抑制作用使糖能够被充分利用^[48]，也能一定程度上减少纤维素酶的使用量、节省设备使用率和发酵时间^[49]。但是，当酶水解条件和菌株生长发酵条件不相符合时，发酵菌株无法充分发挥其发酵性能^[46]。为此发酵过程中需要根据实际情况选择合适的发酵方式。得益于实验室设计的螺带式搅拌浆反应器，我们既可以得到高初糖浓度水解液用于分步糖化与发酵也可以实现高固含量同步糖化发酵，从而大大提高发酵产品的浓度和得率^[13, 50-52]。

在生物炼制体系中，不论是同步糖化发酵还是分步糖化与发酵，固液分离都是必不可少的步骤^[53]。而由于木质纤维素体系十分复杂，固液分离往往需要更高的成本^[54]。本实验室针对高固含量木质纤维素糖化醪和同步糖化发酵醪体系，采用短时高温加热方法能够有效的实现快速固液分离，为产品的进一步的分离纯化提供有力保障^[55]。固液分离后的固体残渣中还含有大量的碳水化合物，具有较高的热值^[56]，通常可以用于燃烧产热或者发电，实现生物质的全利用。所以，本实验室开发的干法生物炼制技术对木质纤维素生物炼制过程中存在的关键性问题进行了一一解决，成功实现了多种生物能源以及生物基化学品的高指标生产^[13, 50, 52, 57, 58]，具有非常广泛的应用前景。

此外, 由于生物炼制体系的特殊性, 所使用的发酵菌株需要能够适应相应的发酵体系才能最大程度发挥菌株发酵性能, 为此生物炼制菌株的开发十分重要。目前的研究主要集中在两个方面: 提高菌株抑制物耐受性或者降解能力和实现菌株对木质纤维素混合糖的共利用。虽然通过脱毒能够去除大部分抑制物, 但是残留的抑制物对菌株的发酵性能还是有很大的影响。为此需要筛选具有较强的抑制物耐受性的菌株, 或者通过驯化或者代谢工程手段提高菌株的耐受性, 才能在木质纤维素体系中实现高性能发酵生产。反过来, 发酵菌株抑制物耐受性提高也可以进一步缩减脱毒时间或者直接不脱毒进行发酵, 从而节省成本。提高菌株耐受性通常采用的两种方式为适应性进化^[59, 60]和理性工程改造^[61-63]。适应性进化是在含有较高抑制物的培养基中连续传代培养, 通过菌株的遗传变异和高抑制物的定向选择作用得到抑制物耐受性提高的菌株^[59]。进一步对这些抑制物耐受性菌株进行抑制物耐受性机制解析, 能够对高抑制物耐受性菌株的工程改造提供指导。这种基于已有耐受性机制借助代谢工程手段提高菌株对抑制物的耐受性或者转化能力的方式叫理性工程改造^[61-63]。目前适应性进化和理性工程改造手段已经充分应用于提高多种菌株的抑制物耐受性和转化能力, 如 *Saccharomyces cerevisiae*^[64, 65]、*Escherichia coli*^[66]、*Zymomonas mobilis*^[67]、*Corynebacterium glutamicum*^[68]等。

对生物炼制菌株混合糖利用的研究也十分重要。木质纤维素原料制备的水解液中除了葡萄糖以外还含有多种糖, 如木糖、阿拉伯糖、半乳糖等单糖以及未水解完全的糖, 如纤维二糖、葡寡糖、木寡糖等^[69]。虽然大部分的糖含量都不如葡萄糖高, 但是它们在总糖含量中占据很大的比例^[70]。而很多微生物通常只能够利用其中的葡萄糖, 造成大量其他糖的浪费, 并且导致相应的发酵废水中化学需氧量 (COD) 较高, 对后续废水处理造成巨大压力^[71]。通过代谢工程手段或者驯化等策略使木质纤维素中的多种糖类得到充分利用, 能够有助于提高产品的产量, 并且减少后续废水处理的压力。目前研究最多的是对木糖的共利用, 木糖可以通过木糖异构酶途径和氧化还原途径加以利用^[66], 通过这两个途径的构建以及相应的代谢优化, 很多的工业菌株中都已经成功实现了木糖的利用, 例如 *S. cerevisiae*、*Z. mobilis* 以及 *C. glutamicum* 等^[72]。其他可发酵性的糖, 如阿拉伯糖、半乳糖、纤维二糖等的共利用也有比较深入的研究^[72, 73], 不再赘述。此外, 很多微生物在多种糖的共利用过程中通常存在葡萄糖效应, 在菌株的代谢工程改造过程中还需要充分考虑这一因素^[74]。而 *C. glutamicum* 的葡萄糖效应比较弱^[75], 具有多种糖同步共利用的潜力。

1.2 谷氨酸棒状杆菌与生物炼制

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是革兰氏阳性菌, 是公认安全的 GRAS 菌株^[76]。自其在 20 世纪 60 年代被发现以来, 一直被用于工业上氨基酸如谷氨酸和赖氨酸等的生产^[77]。随着生物技术的发展, 基因组学^[78-80]、转录组学^[81-84]、代谢组学^[85, 86]以及系统生物技术^[87]等技术的广泛应用使得对 *C. glutamicum* 的研究更加深入。而基因编辑系统^[88-90]和基因表达系统^[91-93]的成功构建, 使得 *C. glutamicum* 的代谢工程改

造更加容易。利用 *C. glutamicum* 代谢工程改造进行生物基化学品、生物燃料、生物材料等生产的研究十分广泛^[94]。而其自身的一些特性也使它在生物炼制上具有非常大的应用潜力。

首先, *C. glutamicum* 对木质纤维素来源抑制物具有较高的耐受性^[95, 96], 能够适应复杂的含有较高抑制物成分的木质纤维素体系^[97]。并且借助特定的培养条件、驯化、基因工程改造等方法, 能够进一步提高菌株的抑制物耐受性^[68, 96, 98]。该菌株还具备同化多种芳香类化合物如香草醛、4-羟基苯甲醛等的的能力^[99]。其次, 该菌株具有混合糖利用的潜力。虽然 *C. glutamicum* 不能够利用木质纤维素体系中存在的阿拉伯糖、半乳糖、木糖、二糖以及寡糖聚糖等^[100], 但是该菌株葡萄糖效应相对比较弱, 具有同步利用多种糖的潜力^[75]。通过代谢工程引入这些糖的利用途径, 就能够使该菌株具有混合糖发酵的能力^[101]。通过木糖异构酶、木酮糖激酶、木糖转运蛋白的表达以及转录调控, *C. glutamicum* 能够成功共利用木糖进行共发酵生产产品, 如谷氨酸、赖氨酸等^[102-104]。在此基础上, 通过分泌表达木聚糖内切酶和木酮糖酶能够实现直接利用半纤维素生产氨基酸^[105]。通过表达来自 *E. coli* 的 *araBAD* 基因簇能够实现阿拉伯糖的利用^[106, 107]。通过进一步表达 *araE* 转运蛋白能够实现阿拉伯糖和木糖的同步利用^[108]。其他木质纤维素来源的糖, 如半乳糖、纤维二糖、纤维素等利用的研究也多有报道^[75, 101, 109], 不再赘述。

同时, 谷氨酸棒状杆菌具有非常广泛的产物生产潜力^[94]。作为最主要的氨基酸生产菌株, *C. glutamicum* 通过代谢工程改造已经能够利用木质纤维素原料进行氨基酸如谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、二胺, 以及氨基酸衍生产品的生产^[110]。同时它还能够用来生产有机酸(如乳酸、琥珀酸等)、生物燃料(如乙醇、异丁醇等)和可生物降解材料及其单体(如尸胺、二元醇、聚羟基丁酸酯等)^[94, 111]。可以预见, 在代谢工程技术的推动下, *C. glutamicum* 在生物炼制领域的应用将会越来越广。除此之外, *C. glutamicum* 属于兼性厌氧菌, 在发酵工艺方面也具有很大的适应性。对其好氧发酵的研究已经比较深入, 对一些传统产品以及多胺类化学品的生物炼制生产具有广泛的借鉴作用^[112-114]。在厌氧条件下, 菌株的生长会受到一定限制, 但是菌株的代谢活动依然十分活跃, 更多的碳源可以用来进行产品如乳酸、琥珀酸以及乙酸等有机酸的生产^[82, 115, 116]。而且生长限制下的细胞在有抑制物存在的情况下依然能够保持很高的催化活性^[98]。这些研究充分说明该菌株能够很好的适应生物炼制体系, 在生物炼制进行生物基化学品、生物材料、生物能源等方面具有十分巨大的潜力。

1.3 谷氨酸发酵生产

谷氨酸 (Glutamic acid), 又名 α -氨基戊二酸, 其结构式及分子式图 1.1 所示, 根据化学构象的不同区分左旋体、右旋体和消旋体^[117]。D-谷氨酸只在一些特定的情况下存在, 如细菌的细胞壁中^[118], 自然界中广泛存在的通常为 L-谷氨酸。本文中所提及的谷氨酸均指 L-谷氨酸, 不再特殊说明。谷氨酸是二十种构成蛋白质的天然氨基酸之一, 虽然是非必须氨基酸, 但它在营养、代谢以及信号传导等方面具有非常重要的作用^[119, 120]。

谷氨酸在各个行业具有非常广泛的应用。在食品行业，谷氨酸一钠盐是味精的主要成分，是一种重要的鲜味增强剂，也是重要的食品添加剂^[121]；在医药行业，谷氨酸可作为碳氮营养参与机体代谢，可用于治疗肝昏迷、脑震荡或神经损伤、癫痫等疾病^[120]；在日用化妆品行业谷氨酸可用于氨基酸型表面活性剂如 N-酰基谷氨酸的合成^[122]；谷氨酸还用于生物聚合材料的合成，由谷氨酸聚合而成的 γ -聚谷氨酸是一种生物可降解性的高分子材料，在医药、食品、农业等多个方面具有很大的应用潜力^[123]。经过脱羧反应生成的 γ -氨基丁酸是可生物降解材料尼龙 4 的合成原料^[124]。除此之外，谷氨酸还有很多其他的衍生物（图 1.1），都具有非常广泛的应用，如 L-焦谷氨酸、脯氨酸、戊二酸、5-氨基乙酰丙酸、5-氨基-1-丁醇等。为此谷氨酸 2004 年被美国可再生能源实验室（NREL）评选为可通过生物质进行生产的 12 种平台化合物之一^[125]。

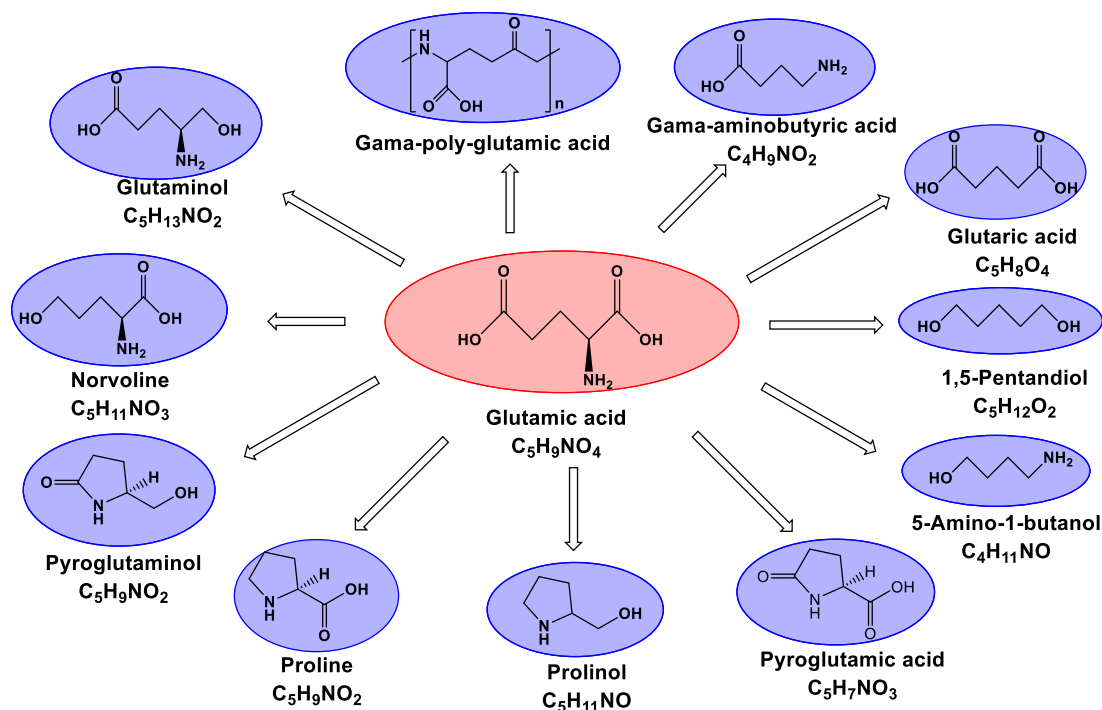


图 1.1 谷氨酸及其衍生物

Fig. 1.1 Glutamic Acid and its Derivatives

从 1907 年由 Kikunae Ikeda 成功分离纯化得到谷氨酸开始，谷氨酸的工业化生产经历了水解法、化学合成法和微生物发酵生产法三个阶段^[121]。由于水解法和化学合成法存在成本高、消耗较大、条件要求苛刻、设备腐蚀严重以及产量低等问题，始终未能得到广泛应用^[126]。直到 1957 年日本科学家 Kinoshita 等成功筛选到能够生产谷氨酸的菌株，谷氨酸开始采用微生物法进行生产^[127]。由于微生物法相对于水解法和化学合成法具有生产条件相对温和，对设备要求低等优点，因此在发酵法出现以后，提取法和化学合成法很快被淘汰。利用微生物法发酵生产谷氨酸的成为主流并形成了多种谷氨酸发酵生产的工艺^[121, 126]。

谷氨酸的生产途径相对简单，主要包括糖酵解途径、磷酸戊糖途径、TCA 循环、氮同化以及谷氨酸分泌等过程^[128]，其合成代谢途径如图 1.2 所示。葡萄糖首先经糖酵解和

磷酸戊糖途径以及回补途径等进入 TCA 循环^[129], 然后进一步生成 α -酮戊二酸^[130]。 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的作用下经还原氨基反应生成谷氨酸^[131], 再经过转运体介导的跨膜运输分泌到胞外实现谷氨酸积累^[132]。在 *C. glutamicum* 发酵生产谷氨酸的过程中, 生物素是比较关键的因素。生物素是 acetyl-CoA 羧化酶的辅酶^[133], 参与到细胞的脂肪酸合成过程^[134]。谷氨酸棒状杆菌是生物素营养缺陷型菌株^[135], 一方面需要生物素维持其生长, 但另一方面过量的生物素供应会抑制谷氨酸的分泌^[136]。所以目前主要采用生物素亚适量的方法进行生产^[137], 或者在生物素过量的情况下, 通过添加青霉素、表面活性剂等进行诱导生产谷氨酸^[138], 亦或利用温度敏感型菌株进行发酵生产^[139]。

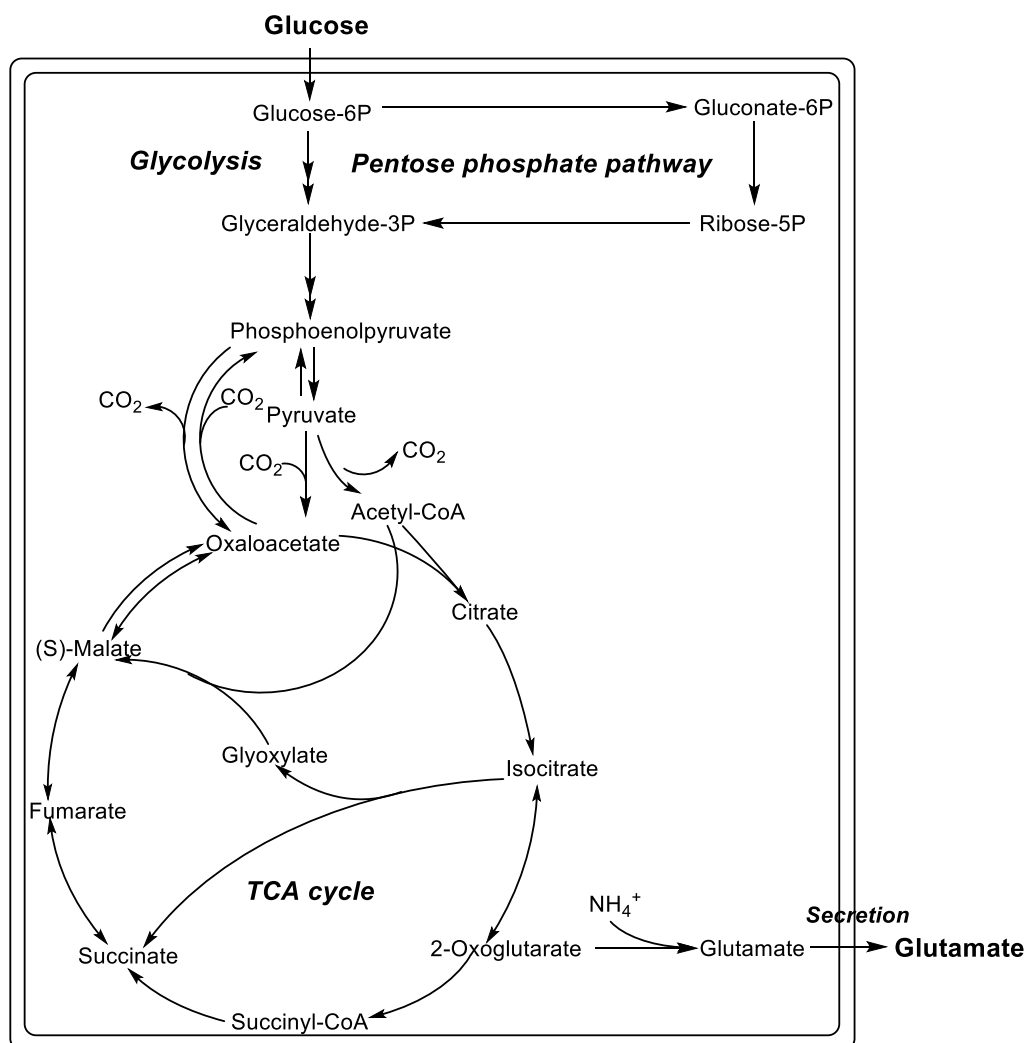


图 1.2 谷氨酸生物合成代谢路径简图

Fig. 1.2 Simplified glutamate biosynthesis pathway

尽管诱导是工业上谷氨酸生产工艺中最为核心的技术, 但是有关诱导谷氨酸发酵生产的分子机制却是在最近这些年才逐渐清晰。谷氨酸的过量生产主要和三个方面的变化有关系 (如图 1.3 所示)。首先, 在谷氨酸的生产和 α -酮戊二酸脱氢酶系 (ODHC) 活性降低有关^[140]。谷氨酸的合成主要是由 TCA 循环的 α -酮戊二酸和铵根离子在谷氨酸脱氢酶的作用下生成, 该反应与 TCA 循环中 ODHC 催化生成琥珀酸的反应相互竞争^[141]。有

研究指出，在 α -酮戊二酸节点处的代谢流更大程度上取决于 ODHC 的活性^[140]，所以降低 ODHC 的酶活，使碳代谢更多流向谷氨酸的生成是谷氨酸高产所必须的。在所有谷氨酸高产的条件下均能够检测到 ODHC 活性的降低^[141]，甚至通过将 ODHC 的 e1o 亚基编码基因 *odhA* 的敲除，也能够实现谷氨酸在高生物素下积累^[142]。ODHC 活性的调节主要通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknG 和 ODHC 抑制性蛋白 OdhI 实现^[143]。未磷酸化的 OdhI 蛋白能够结合到 ODHC 的 OdhA 亚基上从而抑制 ODHC 的活性，而 PknG 能够通过磷酸化 OdhI 蛋白，从而解除这一抑制效应^[144]。OdhI 蛋白的失活会导致谷氨酸减少，甚至不生成谷氨酸，而 PknG 的敲除则因为无法磷酸化 OdhI 导致 ODHC 活性降低而影响生长^[145]。在吐温 40 和青霉素诱导条件下 OdhI 蛋白的量也出现增加^[146]。这些现象充分证明了谷氨酸合成过程所产生的代谢变化。

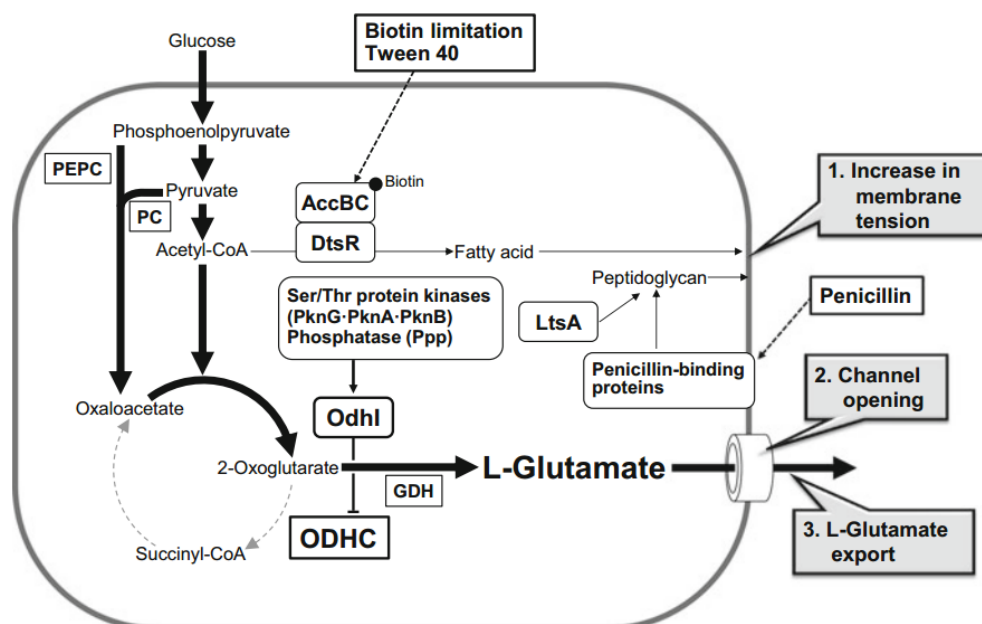


图 1.3 谷氨酸棒状杆菌谷氨酸发酵机制^[147]

Fig. 1.3 Overview of L-glutamate production mechanism in *Corynebacterium glutamicum*^[147]

其次谷氨酸的生产还和细胞膜和细胞壁的变化相关。早在 1968 年，Takinami 等在谷氨酸发酵中发现生物素限量会导致脂肪酸的合成减少，从而影响细胞质膜的磷脂和脂肪酸的合成以及细胞壁成分的合成^[148, 149]。吐温 40 作为表面活性剂能够影响细胞膜的状态^[150]，青霉素作为细胞壁成分肽聚糖合成的抑制剂能够影响细胞壁的合成^[138, 151]。Nampoothiri 等通过对影响细胞膜脂质成分合成的相关基因的调节，能够影响谷氨酸的产量^[152]。Hashimoto 等发现在谷氨酸生产过程中，细胞壁分枝菌酸成分也有变化^[153]。进一步通过敲除脂肪酸合成关键酶 acetyl-CoA 羧化酶 *dtsR1* 基因以及和肽聚糖合成基因 *ltsA*，均能够实现在高生物素下不经过谷氨酸诱导的发酵^[154-157]。虽然也有研究指出仅细胞膜的改变不足以诱导谷氨酸的分泌^[158]，但是谷氨酸的生产和细胞膜细胞壁的改变确实关系密切。

更加深入的研究发现，这些细胞膜和细胞壁的变化能够使 *C. glutamicum* 的谷氨酸分泌通道打开，将谷氨酸分泌到胞外实现谷氨酸的积累^[132, 159]。谷氨酸分泌通道 MscCG

为机械敏感型通道，能够感应细胞膜表面张力的变化从而调节该通道的开启和关闭^[132, 160]。MscCG 通道的发现得益于对 *odhA* 敲除的菌株的研究：*odhA* 的敲除导致编码 MscCG 的 *Ncgl1221* 基因发生突变，从而使谷氨酸能够分泌^[132]，这也是 *odhA* 基因敲除菌株能够分泌谷氨酸的直接原因。随后的研究对该通道编码基因的改造也能够实现谷氨酸的持续分泌^[161, 162]。对该分泌通道的结构研究发现，*Ncgl1221* 编码的 MscCG 转运通道其 N-末端结构和大肠杆菌的 MscS 相似，但是额外多了一个 C-末端^[163]。该基因编码的蛋白含有四个跨膜区域，N 末端的三个跨膜区和谷氨酸的分泌相关，而 C 末端的一个跨膜区和谷氨酸分泌通道的打开和关闭相关^[164]。对该蛋白 C-末端 110 个氨基酸残基的截取，能够使该通道打开并持续分泌谷氨酸^[161, 164]。进一步的研究还发现除了 MscCG 以外，部分 *C. glutamicum* 中还同时存在额外的和 MscCG 性质类似的 MscCG2 机械敏感型通道，可以参与谷氨酸的分泌^[159]。综合目前的研究结果来看，谷氨酸的生产是一个多重作用的结果，除了需要碳代谢流的改变生成更多谷氨酸以外，还需要通过细胞壁和细胞膜的变化使谷氨酸分泌通道开启，实现谷氨酸分泌和胞外积累。

目前，谷氨酸发酵主要采用淀粉质原料，包括玉米、小麦、木薯、马铃薯等^[119]，通过“双酶法”制糖^[165]，利用得到的糖化液进行谷氨酸发酵。除此之外，糖蜜也是用来进行谷氨酸生产的原料之一^[166]。以糖蜜为原料，采用青霉素诱导进行发酵也是比较常用的方法^[131]。糖蜜是制糖工业中的副产物，但是糖蜜成分复杂，通常要经过一系列的前处理才能够用于谷氨酸的发酵，并且对后续分离纯化和废水处理造成很大压力^[167]。考虑到其营养成分丰富、生物素含量高等特点，目前工业上更倾向于将糖蜜作为营养物质添加到谷氨酸发酵中^[168, 169]。为此，粮食性淀粉原料依然是谷氨酸生产主要采用的原料，而原料成本约占谷氨酸生产总成本的 50%左右^[137]。在原料价格不断上涨、发酵废水处理以及能源消耗的巨大压力下，利用更为廉价的可替代性原料进行谷氨酸生产更加可行，也能够进一步促进谷氨酸作为聚合材料单体的工业化应用^[170]。

在所有可选的原料中，木质纤维素是目前最具潜力的替代性原料^[3]。以木质纤维素原料代替传统的粮食性原料进行谷氨酸生产具有巨大的潜力。而谷氨酸棒状杆菌对木质纤维素体系具有很好的适应性^[95, 96]，采用木质纤维素原料进行谷氨酸发酵具有很大的可行性。但是，目前利用木质纤维素原料进行谷氨酸发酵的研究十分有限。两个比较相关的报道为 2011 年 Gopinath 等利用稻秆和麦麸水解液最终产生了约 14 g/L 的谷氨酸^[102]，以及 2013 年 Meiswinkel 等利用稻秆水解液最终产生约 5.7 g/L 的谷氨酸^[103]。但是，他们的研究更加强调的是 *C. glutamicum* 的戊糖利用，因此在水解液的制备上存在较大差异，而且水解液中也添加了大量的营养成分，并不具备实际应用潜力。为此建立具有实际工业应用价值的木质纤维素生物炼制生产谷氨酸的工艺具有重大意义。

本实验室开发的干法生物炼制技术，针对生物炼制过程中存在的问题进行了一一解决^[13]，并且已经成功应用于多种能源以及生物基化学品的生产，如乙醇^[13]、油脂^[171, 172]、乳酸^[50, 51]、柠檬酸^[52]、葡萄糖酸^[173]等，具备实际工业应用的潜力。但是，目前在谷氨

酸上的应用依然十分有限，所以本研究基于干法生物炼制技术平台，对谷氨酸发酵过程存在的问题进行了研究，最终实现谷氨酸的高效率发酵生产，为木质纤维素生物炼制生产谷氨酸奠定基础。

1.4 γ -氨基丁酸发酵生产

γ -氨基丁酸，又称 4-氨基丁酸，英文名称为 γ -aminobutyric acid (GABA)，是一种四碳非蛋白氨基酸，结构式如下图 1.4 所示^[124]。 γ -氨基丁酸是一种天然的生物活性成分，广泛的存在于动植物体内以及微生物当中，具有十分重要的生理功能^[174]。在植物和微生物中，GABA 是一种重要的中间体，在对环境压力的响应中具有重要作用^[174]。在植物中 GABA 在耐旱、抗虫、自我防御以及信号转导等方面具有重要作用^[175]。在微生物中，因为生成 GABA 的过程中会消耗 H^+ （如图 1.4）使胞内 pH 升高，所以 GABA 对于抵抗酸性 pH 环境具有重要功能^[176-178]。在哺乳动物中， γ -氨基丁酸是神经系统中的一种重要的抑制性神经递质^[179]，在大脑发育、抗焦虑、降血压以及止痛等方面具有十分重要的作用^[180, 181]，同时 GABA 还是食品当中重要的生物活性成分^[181]，因此 GABA 在医药和保健食品等领域具有非常广泛的应用^[182]。除此之外，GABA 还是可生物降解材料尼龙 4 的合成前体^[183, 184]，具有非常重要的应用前景^[124]。

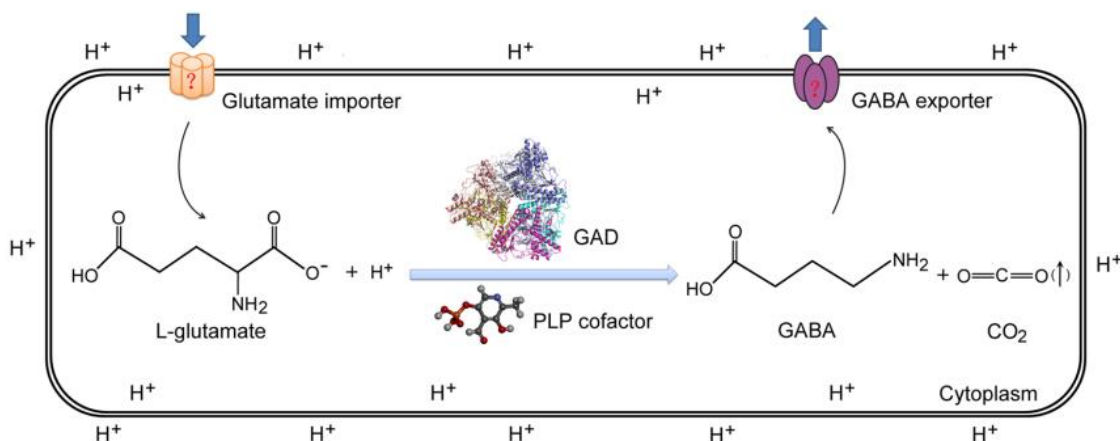


图 1.4 谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸生产 γ -氨基丁酸^[124]

Fig. 1.4 γ -aminobutyric acid (GABA) production from l-glutamate catalyzed by glutamate decarboxylase (GAD)^[124]

γ -氨基丁酸的生产包括化学合成法、天然产物提纯法和生物转化法^[185]。但是，由于化学合成法中反应条件苛刻、能耗大、成本高，天然产物提取法中植物富集量相对较低等原因，只有生物发酵法具有比较大的开发前景^[185]。由于 γ -氨基丁酸可以以谷氨酸为底物通过谷氨酸脱羧酶（GAD）的脱羧反应生产（图 1.4）^[124]，所以生物法主要是以谷氨酸盐为底物通过谷氨酸脱羧酶直接催化或者利用表达谷氨酸酶的重组菌株进行全细胞催化生产^[182]。这种生物转化法的条件相对温和，产量比较高，是潜力比较大的生产方法^[182]。谷氨酸脱羧酶广泛存在于动植物以及微生物中，但是目前最常见的是采用来自于微生物中的谷氨酸脱羧酶进行 GABA 生产^[182]。

目前，生物催化法生产 γ -氨基丁酸使用最为广泛的菌株是乳酸菌（LAB）和大肠杆

菌^[186,187]。因为这两类细菌具有相对较高的谷氨酸脱羧酶活性^[182]，在有谷氨酸前体的存在下，能够生产高浓度的 GABA。目前已经有很多能够生产 GABA 的乳酸菌得到开发，以谷氨酸钠为底物生产的 GABA 产量已经非常高^[182,188]。Shi 等利用 *Lactobacillus brevis* CGMCC 3414 静息细胞以谷氨酸钠为底物进行催化，经过 10h 的催化反应最终得到 202 g/L 的 GABA，转化率高达 99.4%^[189]。Wang 等利用 *Lactobacillus brevis* NCL912 直接以谷氨酸为底物生产，最终也得到 205 g/L 的 GABA^[190]。而大肠杆菌本身也具有比较高的谷氨酸脱羧酶活性，再额外表达 GAD，以谷氨酸钠为底物进行全细胞催化能够快速生成高浓度的 GABA^[191]。这种方法相比酶固定化的催化具有更高的应用价值，并且 GABA 的转化率和浓度可以达到 99% 以及 600 g/L 以上^[191]。基于细胞催化的生产方法虽然目前已经能够得到很高浓度的 GABA，但是由于过程需要以谷氨酸钠作为底物并且还需要满足催化反应条件，其生产成本依然比较高。如果能够通过微生物发酵，直接利用廉价的碳源和氮源进行生产，则能够显著降低其生产成本，并且进一步促进其在工业上的应用。为此，直接发酵生产 GABA 的方法逐渐受到大家关注。

目前，代谢工程改造直接发酵生产 GABA 的研究主要集中在大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌^[124]。大肠杆菌由于其自身含有谷氨酸脱羧酶，并且具有比较高的活性，如果能够通过代谢工程改造提高其谷氨酸前体的合成，就能够提高 GABA 的生产^[192,193]。关于利用大肠杆菌一步法生产 GABA 的报道也越来越多。2016 年 Dung 等通过将谷氨酸合酶、谷氨酸脱羧酶和 GABA 分泌转运体构建成一个支架结构，形成链式催化反应提高其催化效率，最终 GABA 的产量相比原始菌提高 2.2 倍^[192]；2017 年 Soma 等通过重建大肠杆菌的代谢调节网络，最终使 GABA 的产量提高到 3.3 倍^[194]。虽然这些代谢工程改造使得重组大肠杆菌相比野生型菌株的 GABA 产量有所提高，但是 GABA 的产量依然比较低。这主要是由于大肠杆菌细胞本身不能够积累谷氨酸，而对其进行改造存在很大的困难^[124]。所以利用大肠杆菌直接发酵生产 GABA 并不是合理的选择。

相比之下，*C. glutamicum* 其本身是重要的谷氨酸工业生产菌株，能够积累大量的谷氨酸^[195]，利用它进行 GABA 的生产潜力巨大。但是，它本身没有谷氨酸脱羧酶，所以进行 GABA 的生产时需要在细胞中异源表达 GAD^[196]。Shi 等在 2011 年首次将来自短乳杆菌当中的谷氨酸脱羧酶表达在 *C. glutamicum* 中，经过 72 小时的发酵产生了 2.15g/L 的 GABA^[197]，虽然 GABA 的产量相对较低但初步实现了 GABA 的直接发酵生产。GABA 的产量过低主要和 GAD 的催化特性有关，GAD 最适的 pH 在 4-5 之间，pH 一旦提高到中性或者接近中性条件时其活性会迅速下降^[198]。而 *C. glutamicum* 生产谷氨酸的最适 pH 往往是中性，所以其生产 GABA 的能力受到很大的限制。如果能够提高谷氨酸脱羧酶在偏中性环境下的活性，则能够提高 *C. glutamicum* 进行 GABA 生产的能力^[199]。目前很多研究集中于筛选能够在中性 pH 下具有较高活性的谷氨酸脱羧酶。2012 年 Yu 等通过将来自短乳杆菌中的谷氨酸脱羧酶的羧基端截取，使 GAD 的活性范围扩展到中性 pH^[200]。2013 年 Thu 等对来自大肠杆菌的 GAD 进行了定向改造，得到谷氨酸酶突变体

(Glu89Gln/ Δ 452-466)能够在中性 pH 具有催化活性^[198]。在 *C. glutamicum* 细胞中表达该 GAD 突变体进行 GABA 的发酵,最终 GABA 产量提高到 38.6 g/L^[201]。其他扩展 GAD 在中性 pH 下活性的方法还包括诱变筛选和定向进化,目前都已取得一定的进展^[202-204]。此外,从自然界微生物中筛选性能较高的谷氨酸脱羧酶也是比较常用的方法。2016 年 Liu 等从巨大芽孢杆菌中得到的 GAD 在 pH 6.0 下表现出比其他来源的 GAD 更高的活性,利用它进行 GABA 的生产具有很大的潜力^[205]。得到的一些谷氨酸脱羧酶在谷氨酸棒状杆菌中表达后,GABA 的产量也得到进一步的提高^[204, 206, 207]。

除了对谷氨酸脱羧酶的发掘以外,其他能够提高谷氨酸前体积累的研究方法也应用于进一步提高谷氨酸棒状杆菌中 GABA 的生产,如降低 ODHC 的活性和敲除丙酮酸羧化酶^[208]、表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和敲除苹果酸脱氢酶^[209]等。同时为了提高 GABA 的积累,GABA 在中性 pH 下的降解也是需要考虑的。在 *C. glutamicum* 中,GABA 可以经由 *gabP* 编码的 GABA 通透酶吸收,然后在 *gabT* 和 *gabD* 编码的 GABA 转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶的催化下转化为琥珀酸,并进入 TCA 循环进一步降解^[210, 211]。这种降解在中性 pH 下更为明显,所以减少 GABA 降解能够一定程度提高 GABA 的生产^[210]。除此之外,其他副产物生成途径的阻断和提高磷酸吡哆醛的供应也能够提高 GABA 的生产。2014 年 Zhang 等在表达 GAD 和吡哆醛激酶的同时阻断一些副产物的合成,使菌株不需要额外添加磷酸吡哆醛作为辅因子进行 GABA 发酵,最终得到 70.6g/L 的 GABA^[206],这也是目前 *C. glutamicum* 生产 GABA 所报道的最高指标。相比于通过对 pH 的依赖性较高的 GAD 进行 GABA 生产, Jorge 等构建了经由腐胺生成 GABA 的途径,由于所用到的酶都能够在中性 pH 下发挥作用,GABA 的生产速率相比通过谷氨酸脱羧酶进行催化的过程有所提高,在优化的条件下能够积累 8 g/L 的 GABA^[212]。进一步对代谢途径进行优化,GABA 的产量进一步提升,经过分批补料发酵能够达到 63.2g/L,GABA 的生产速率为目前报道最高指标^[213]。但是,由于其代谢途径过长,理论得率较低,想进一步提高 GABA 的产量依然是一个不小的挑战。

基于目前这些研究成果,通过谷氨酸脱羧酶发酵生产 GABA 依然是值得进一步研究的方向。虽然经过多年的努力,利用 *C. glutamicum* 生产 GABA 的产量和得率有所提高,但是生产速率、浓度和得率偏低的问题依然是限制 *C. glutamicum* 应用于生产 GABA 的关键问题。如果能够提高 GABA 生产速率和得率,同时利用更加廉价易得的木质纤维素原料进行生产,将更加有利于进一步降低 GABA 的生产成本。为此本研究针对 *C. glutamicum* 生产 GABA 速率、浓度和得率偏低的问题,探索进一步提高 *C. glutamicum* 发酵生产 GABA 的生产效率的方法,并且基于实验室开发的干法生物炼制技术平台,对利用木质纤维素原料进行 GABA 的生产进行研究。

1.5 立题依据和主要研究内容

利用木质纤维素原料替代性生产生物能源、生物基化学品以及生物材料等是目前研究中比较热门的方向,但是利用木质纤维素原料进行谷氨酸以及 γ -氨基丁酸生产的

研究却非常少。本实验室开发的干法生物炼制技术虽然能够应用于纤维素乙醇、生物柴油、乳酸、柠檬酸、葡萄糖酸等的生产^[13, 50, 52, 57, 58]，但是在谷氨酸和 γ -氨基丁酸的生产应用上比较有限。目前工业上谷氨酸的生产主要采用淀粉原料进行，原料占成本的 50% 以上。 γ -氨基丁酸在生产中除了微生物生长所需的成分以外还需要以谷氨酸钠为底物，生产成本也很高。如果能够采用更加廉价易得的木质纤维素原料进行替代性生产，将大大降低生产成本，进一步扩大谷氨酸和 γ -氨基丁酸在食品、化工行业等行业的应用。

为此，本研究以玉米秸秆为原料，利用谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114，进行了谷氨酸和 γ -氨基丁酸生产的研究。首先对其利用玉米秸秆水解液进行谷氨酸发酵的过程进行了探究，发现生物素过量对谷氨酸发酵的关键影响。随后，针对影响谷氨酸发酵生产的关键因素，对 *C. glutamicum* S9114 进行相应的代谢工程改造，成功实现利用玉米秸秆水解液生产高浓度的谷氨酸。在此研究的基础上，对菌株进一步生产 γ -氨基丁酸中的关键问题进行了解决，成功实现利用玉米秸秆水解液高效率生产高浓度的 γ -氨基丁酸。从而为利用木质纤维素原料替代粮食性淀粉原料进行谷氨酸和 γ -氨基丁酸的生产奠定坚实基础。

本论文的主要内容包括以下三个方面：

(1) 对 *C. glutamicum* 利用玉米秸秆水解液发酵生产谷氨酸过程进行研究。针对在正常发酵情况下 *C. glutamicum* 不能够利用玉米秸秆水解液进行发酵的原因进行了分析。利用多组实验证明生物素在纤维素谷氨酸生产中的关键作用以及生物素对纤维素谷氨酸发酵的影响。然后对玉米秸秆水解液中存在高含量生物素的原因进行了分析，并进一步拓展到对其他 B 族维生素的研究。

(2) 针对 *C. glutamicum* 在高生物素木质纤维素体系下不积累谷氨酸的问题进行代谢工程改造，实现在木质纤维素水解液体系下可以不经诱导发酵生产谷氨酸。对多种代谢工程改造方式进行尝试和评估确定最佳的代谢工程方案。确定首先对谷氨酸转运通道修饰实现不诱导分泌谷氨酸，然后对谷氨酸合成代谢途径进行优化，进一步促进谷氨酸的生产。最终使 *C. glutamicum* 能够利用玉米秸秆水解液生产谷氨酸，提高纤维素谷氨酸发酵性能。

(3) 为了解决 *C. glutamicum* 发酵 γ -氨基丁酸时浓度、生产速率和得率低的关键问题，首先在菌株中异源表达经过改造的谷氨酸脱羧酶，使其能够在正常发酵生产谷氨酸的条件下发酵 γ -氨基丁酸。随后通过将该谷氨酸脱羧酶进行分泌表达并优化其表达以及敲除 γ -氨基丁酸降解途径相关基因，提高 γ -氨基丁酸的生产效率、浓度和得率。最后利用玉米秸秆水解进行 γ -氨基丁酸的发酵，实现高浓度的纤维素 γ -氨基丁酸生产。

第 2 章 木质纤维素中过量生物素的发现及其对谷氨酸棒状杆菌发酵谷氨酸的影响

2.1 引言

谷氨酸是一种 5-碳的非必须氨基酸，是构成蛋白的氨基酸之一^[195]，在食品、医药、农业、工业等方面具有十分广泛的应用。同时谷氨酸也是 12 种重要的平台化合物之一，可以用于多种衍生物及可生物降解聚合材料的生产^[125]，这使得谷氨酸的需求进一步增强。谷氨酸是目前世界上需求量最高的氨基酸，其年产量在 300 万吨以上^[195]。谷氨酸的生产原料主要是粮食性淀粉原料，如玉米淀粉、木薯淀粉等^[170]，占谷氨酸发酵生产成本的 50%左右^[137]。大量的粮食性原料的消耗，一定程度上加剧了全球性粮食危机的产生，限制了谷氨酸工业化聚合材料单体的应用。如果能够利用来源广泛、价格低廉、可再生的木质纤维素原料进行谷氨酸的生产^[3, 34]，有利于进一步扩大谷氨酸的工业应用。

谷氨酸棒杆菌自上世纪 60 年代被分离以来，一直是氨基酸的主要生产菌株^[214]。通过多年的研究，它除了可以进行传统氨基酸生产，也被改造用来进行其他化学及能源产品的生产，如乙醇、乳酸、琥珀酸、异丁醇以及聚-3-羟基丁酸等^[94, 215]。除此之外，*C. glutamicum* 对木质纤维素体系抑制物具有较强的耐受性^[68, 95-98]，其葡萄糖效应相对较弱，经过改造能够同时利用木质纤维素体系中的多种糖进行产品的生产^[75]。目前，除葡萄糖以外的木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等的利用途径已经成功构建并得到应用^[102-104]。这使得 *C. glutamicum* 在木质纤维生物炼制上的应用前景得到进一步的扩大。但是，关于利用木质纤维素原料进行谷氨酸发酵生产的研究却非常少，且得到的谷氨酸生产结果不理想。目前所见报道中，只有 Gopinath 等^[102]和 Meiswinkel 等^[103]在构建戊糖利用途径中得到少量的谷氨酸。这可能是由于木质纤维素体系十分复杂、影响谷氨酸发酵的关键因素不够明确所致，但是采用木质纤维素原料替代性生产谷氨酸的研究却十分有必要。因此，本研究尝试利用谷氨酸棒状杆菌采用木质纤维素原料进行谷氨酸的生产，并探究其中对谷氨酸发酵影响的关键因素，实现木质纤维素谷氨酸的生产。

在木质纤维素生物炼制过程中，原料预处理过程中产生的大量抑制物通常被当作生物炼制过程中十分关键的问题^[26]。在利用谷氨酸棒状杆菌在经过干式稀酸预处理、生物脱毒和酶水解得到的玉米秸秆水解液中进行谷氨酸发酵时发现 *C. glutamicum* 的生长非常良好，但是整个过程不能够积累谷氨酸。这说明 *C. glutamicum* 对在预处理过程中产生的抑制物具有较高的耐受性，抑制物不是影响谷氨酸生产的关键因素。为此，本研究对玉米秸秆水解液不能够积累谷氨酸的关键因素进行了研究，确定过量存在的生物素是谷氨酸不能积累的关键因素。同时我们对生物素大量存在的原因发现木质纤维素原料中存在大量的生物素并在生物炼制过程中保持稳定，大量其他 B 族维生素在生物炼制过程也得以保留，从而可以作为木质纤维素原料发酵过程中的潜在营养。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料

玉米秸秆和麦秆于 2013 年秋季收集于河南郸城, 麦秆于 2014 年夏季收集于安徽滁州, 甘蔗渣为 2014 年夏季收集于广西北海。芦苇草 (*Phragmites communis reeds*) 和白杨木屑于 2014 年夏季收集于山西运城。这些收集的木质纤维素原料首先进行水洗去除灰尘、砂石以及铁块。然后进行风干以及 105 °C 烘箱烘干, 之后进行粉碎并过 10 mm 直径筛, 储存于塑料袋中待用。最终得到的原料含水量约为 10%。原料组分依据美国国家可再生能源实验室 (National Renewable Energy Laboratory, NREL) 两步酸水解方法^[216, 217]进行测定, 各个组分含量如表 2.1 所示。

2.2.2 酶、试剂以及仪器设备

尤特尔(Youtell)#6 纤维素酶购买自湖南尤特尔生化有限公司。根据考马斯亮蓝法^[218]测得其蛋白含量为 90 mg/g 干纤维素酶粉。基于美国国家可再生能源实验室 (NREL) 方法 LAP-006^[219]测得其滤纸酶活为 135 FPU/g 干纤维素酶粉。利用 Ghose 报道方法^[220]测得其纤维二糖酶活为 344 CBU/g 干纤维素酶粉。亲和素 (Avidin) 购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 标记的活性为 10–15 单位/mg 蛋白。将其配制为 1 mg/L 溶液, 然后采用无菌滤头过滤除菌待用。生物素也是购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 纯度为 98%, 同样配制为 1 mg/L 溶液, 用无菌滤头过滤除菌待用。青霉素购买自北京普博欣生化有限公司, 效价为 1650 U/mg, 将其配制为 50 mg/mL 溶液, 然后无菌滤头过滤除菌, 用于谷氨酸发酵诱导实验。玉米浆 (CSL) 购买自山东西王集团有限公司。酵母粉 (YE) 和蛋白胨购买自 Oxoid Ltd, 葡萄糖购买自秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司, 其他常见的试剂均为分析纯, 购买自国内化学试剂提供商。所用常见仪器设备见附录 I。

2.2.3 菌种、培养基以及培养方法

谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 购买自上海工业微生物研究所 (Shanghai Industrial Institute of Microorganism, SIIM, <http://www.gsy-siim.com/>), 保藏编号为 SIIM B460。该菌株同时还保藏在中国工业微生物菌株保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC, <http://www.china-cicc.org/>), 保藏编号为 CICC 20935。*C. glutamicum* S9114 是以天津短杆菌 T6-13 为出发菌株选育得到的耐高糖、耐高谷氨酸、不利用谷氨酸但高产谷氨酸的菌株^[221]。培养条件为 30 °C, 200 rpm, pH 7.0。所使用的培养基包括:

- (1) LB 琼脂平板: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl, 1.7% 琼脂粉, pH 7.2;
- (2) 预培养种子培养基: 25 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L FeSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 25 g/L 玉米浆 (Corn steep liquor);
- (3) 种子培养基: 25 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L FeSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 5 g/L 玉米浆;
- (4) 生物素限量复合培养基: 60 g/L 葡萄糖, 1 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.5

g/L 尿素, 2.0 mg/L FeSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 0.5 g/L 玉米浆;

- (5) 生物素过量复合培养基: 60 g/L 葡萄糖, 1 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L FeSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 5 g/L 玉米浆;

其中, 葡萄糖, KH₂PO₄ 和尿素一起配制成培养基, 115 °C, 20 min 高压蒸气灭菌待用。MgSO₄ 和玉米浆分别配置为 120 g/L 和 300g/L 母液, FeSO₄ 和 MnSO₄ 一起配置为浓度分别为 150 mg/L 的母液。MgSO₄ 和玉米浆 115 °C, 20 min 灭菌后按照相应当量添加进培养基中, FeSO₄ 和 MnSO₄ 母液用无菌滤头过滤后按照相应当量添加至培养基中, 然后用 5M NaOH 溶液将配置好的培养基调节 pH 至 7.0。

生物脱毒菌株为本实验室自主筛选得到的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[38], 该菌株保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microorganism Collection Center, CGMCC, <http://www.cgmcc.net/>), 保藏编号为 7452。该菌株培养保存并保存在 PDA 斜面培养基上。PDA 培养基包含 200 g/L 土豆汁, 20 g/L 葡萄糖和 17 g/L 琼脂。

2.2.4 原料预处理以及生物脱毒

原料预处理采用本实验室开发的干酸预处理方法^[22, 23]进行。预处理条件为 2.5% (w/w) H₂SO₄ (基于原料干重), 50 rpm, 175 ± 1 °C, 5min。过程中稀硫酸溶液吸收到原料当中, 没有废水产生。预处理过后的原料含水量约为 50%, pH 约为 2.0。通过测定, 预处理后的玉米秸秆每克干物料中含有 29.7 mg 葡萄糖, 155.1 mg 木糖, 5.3 mg 糠醛, 3.5 mg 5-羟甲基糠醛 (HMF), 24.8 mg 乙酸, 0.06 mg 4-羟基苯甲醛 (HBA), 3.3 mg 香草醛和 2.2 mg 丁香醛。预处理后的物料室温保存待用。

预处理后的玉米秸秆物料随后采用本实验室开发的固态生物脱毒技术^[38, 39]进行生物脱毒。在脱毒之前, 首先采用 20% (w/w) Ca(OH)₂ 溶液将物料 pH 调节至 5.5, 然后采用碟式磨浆机 (PSB-80JX) 进行磨浆, 以粉碎预处理过后原料中残留的较长的纤维。随后进行生物脱毒, 脱毒在 15L 生物反应器 (BIOTECH-15L, 上海保兴生物设备工程有限公司) 中进行, 具体过程参见 He 等^[39]和 Zhang 等^[38]。脱毒条件为 10%(w/w)脱毒种子接种量, 28 °C, 通气 1.0 vvm, 48 h。糠醛和 5-羟甲基糠醛基本脱除, 其他典型抑制物也有所降低, 乙酸降低至 21.9 mg/g 干脱毒物料 (DM), 4-羟基苯甲醛降低至 0.02 mg/g DM, 香草醛降低至 1.1 mg/g DM, 丁香醛降低至 0.4 mg/g DM。脱毒后物料保存在-20 °C 冰箱待用。进行水解液制备之前解冻, 然后 115 °C, 20 min 灭菌使用。

2.2.5 玉米秸秆水解液制备

本研究中用到的水解液包括: 15% (w/w)固含量未脱毒玉米秸秆水解液, 15%、20% 和 25% (w/w)固含量脱毒玉米秸秆水解液。水解液制备在带有螺带式搅拌桨的 5L 发酵罐中进行 (BIOTECH-5L-4BG, 上海保兴生物工程设备有限公司)^[222]。将未脱毒的新鲜预处理玉米秸秆原料按照基于干物料 15% (w/w)载量加入发酵罐中, 纤维素酶按照 10 mg 蛋白/g 干物料添加, 在 50 °C, 150 rpm, pH 4.8 下糖化 48 h。得到的糖化醪经 16,125×g

离心 10 min 去除固体残留, 所得上清液 115 °C, 20 min 灭菌, 然后在无菌的条件下进行过滤进一步去除残留固体, 得到的水解液即为 15% 未脱毒玉米秸秆水解液。在使用之前用 5 M NaOH 将 pH 调至 7.0。同理, 以 15%、20% 和 25%(w/w) 载量以经过脱毒的玉米秸秆为原料进行糖化可以得到 15%-25%(w/w) 脱毒玉米秸秆水解液。得到的这四种水解液的葡萄糖、木糖以及抑制物成分如表 2.2 所示。

除此之外, 本研究中还利用亲和素能够特异性结合生物素的原理^[223], 通过亲和素和纯生物素的添加得到如下几种水解液:

生物素去除水解液 (Biotin free CSH): 理论上一分子的亲和素能够结合四分子的生物素, 1 单位的亲和素吸附 1 μg 生物素^[223]。考虑到水解液成分复杂, 在利用亲和素去除生物素制备生物素去除水解液时首先进行预实验, 往 15% 脱毒水解液中添加不同量的 1 mg/L 亲和素溶液, 并在 30 °C, 200 rpm 下吸附 2 h。得到的水解液用生物素缺陷型的 *C. glutamicum* 测试其生长, 结合生长情况最终确定生物素去除水解液所需最佳的亲和素添加量为 20 mg/L (相当于 200 单位/L CSH)。该亲和素添加量下制备的水解液即为生物素去除水解液。

生物素补加亚适量水解液 (Biotin re-supplemented CSH1, sub-optimal): 向生物素去除水解液当中添加 30 μL 的 1 mg/L 生物素溶液 (相当于 1.0 μg 生物素/L 水解液) 制得。

生物素过量水解液 (Biotin re-supplemented CSH2, excessive): 向生物素去除水解液当中添加 690 μL 的 1 mg/L 生物素溶液 (相当于 23 μg 生物素/L 水解液) 制得。

2.2.6 谷氨酸发酵

在用于谷氨酸发酵之前, *C. glutamicum* S9114 首先在 15%(w/w) 未脱毒玉米秸秆水解液中进行驯化, 以 10% (v/v) 接种量每 24 小时转接一次。经过 147 次转接之后, 其生长和糖耗趋于稳定。驯化稳定后的菌株用于谷氨酸发酵, 驯化菌株首先在 LB 平板上划线, 30 °C 下培养 36-48 h, 挑取单菌落接入含有 30 mL 预培养种子培养基的三角烧瓶中。在 30 °C, 200 rpm 下培养 16 h 后, 按照 5% (v/v) 的接种量转接至含有 30 mL 种子培养基的三角烧瓶中。30 °C, 200 rpm 下培养 8 h 后得到发酵用种子培养液。

对于摇瓶发酵, 种子培养液按照 5% (v/v) 的接种量接入含有 30 mL 发酵培养基 (包括发酵用复合培养基和水解液) 的三角烧瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 条件下进行摇瓶发酵。发酵过程中用灭过菌的 20% (w/w) 尿素溶液调节 pH 至 7.0。上罐发酵在 3L 发酵罐 (BIOTECH-4BG-3L, 上海保兴生物工程设备有限公司) 中进行, 培养基为 800 mL 添加 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 15%-25%(w/w) 玉米秸秆水解液。温度为 32 °C, 接种量 10% (v/v), 通气量 1.4 vvm。pH 通过自动补加 2 M H_2SO_4 和 20% (w/v) 氨水溶液维持在 7.0。通过自动调节搅拌转速, 将生长阶段的溶氧控制在 10% 左右, 产酸阶段控制在 40% 左右。当菌株生长到对数中前期时 (OD_{600} 约 8-9 时), 添加 2 mL 配置好的 50 mg/mL 青霉素溶液进行诱导。定时取样, 测定其生长、葡萄糖消耗以及谷氨酸生产等情况。每组实验至少两次重复。

表 2.1 不同木质纤维素原料组分

Table 2.1 The composition of different lignocellulose biomass

	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Ash (%)
Corn stover	34.20 ± 0.24	31.50 ± 0.31	8.10 ± 0.09	5.24 ± 0.00
Wheat straw	41.25 ± 0.30	12.66 ± 0.20	10.24 ± 0.19	0.78 ± 0.00
Rice straw	37.67 ± 0.38	27.61 ± 0.47	2.58 ± 0.00	5.52 ± 0.01
Sugarcane bagasse	45.84 ± 0.33	31.64 ± 0.56	7.86 ± 0.00	1.62 ± 0.00
<i>Phragmites communis</i> reeds	42.47 ± 0.01	26.79 ± 0.03	7.28 ± 0.00	4.56 ± 0.00
Poplar tree sawdust	53.90 ± 2.47	16.82 ± 0.32	18.86 ± 0.02	0.23 ± 0.00

注：不同原料的纤维素、半纤维、木质素以及灰分含量的测定通过两步酸水解法^[216, 217]进行。

表 2.2 不同玉米秸秆水解液葡萄糖、木糖以及抑制物组分浓度

Table 2.2 Concentrations of glucose, xylose and inhibitor compounds in different corn stover hydrolysate (CSH)

CSH	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Acetic acid (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Vanillin (mg/L)	HBA (mg/L)	Syringaldehyde (mg/L)
15% non-detoxified CSH	63.2 ± 1.6	19.5 ± 1.2	3.7 ± 0.7	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	500 ± 77	10 ± 2	300 ± 78
15% detoxified CSH	63.9 ± 3.6	27.4 ± 2.2	3.3 ± 0.1	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 1	2 ± 0	60 ± 10
20% detoxified CSH	90.4 ± 3.4	17.4 ± 3.7	1.4 ± 0.4	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 1	3 ± 1	43 ± 5
25% detoxified CSH	109.1 ± 1.8	26.7 ± 1.3	8.3 ± 0.6	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 3	4 ± 0	200 ± 3

注：水解液中的葡萄糖浓度通过生物传感分析仪测定，其他成分通过 HPLC 测定，具体测定方法见 2.2.9。

表 2.3 RT-qPCR 实验所用引物
Table 2.3 Primers used for RT-qPCR assay

Genes	Gene locus	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>16S rRNA</i>	CGS9114_RS11955	GCCCCTTATGTCCAGGGCTT	GGTCGAGTTGCAGACCCCAA
<i>ufaA</i>	CGS9114_RS06985	ACTTTGCGGGCCATTACCTAAA	GCGGTAGACGGCATCAAAGC
<i>pgsA1</i>	CGS9114_RS06020	AGCCTTGTTGGTTTGGGGCT	TGACCAAGCGCTGCACAACA
<i>pima</i>	CGS9114_RS07945	GATGCGCAGTTGCTCATTGT	GGCAAGCGTGTTGATCATGT
<i>dacB</i>	CGS9114_RS00725	ACCAGAACCACCGACAACCT	CCAGGCTAGTGCGGCGATTA
<i>dac</i>	CGS9114_RS13375	TACGCCTCGTCTGCTTGATG	CACCCGAGAGTCCGACGTAG
<i>ftsI</i>	CGS9114_RS11420	ACTGCAGCCACCGTTTCAGTT	CGCTGCACATTGGCAAGGAC
<i>ftsI</i>	CGS9114_RS07835	GTGTGGGACAGTCAACGGGT	CGACATACCCTGACCGATGG
<i>odhA</i>	CGS9114_RS03450	GTCATGCTGGTCTCCGGCA	CCTCGGAGATGCGGTTGAAC
<i>sucB</i>	CGS9114_RS08045	CCTTCACCATCACCAACATTGG	CGGTGATGACAACCTGGACGC
<i>lpdA</i>	CGS9114_RS13335	TTTGGCTACTAACCACGCG	CACCACGACACCACCGATG
<i>lpd</i>	CGS9114_RS04910	CTGCTCGGTGGACACCTCGTT	TTGGGTGAATGTGAACGCTGC
<i>gdh</i>	CGS9114_RS12025	AACCGTGGCATCACTGTGGT	GCAGTCTCTGCACGGAATGC
<i>gdh</i>	CGS9114_RS07420	CCTGAGGCTGTTGAGGTCTTC	CGAAGCGTTCTGCTGCAT
<i>yggB</i>	CGS9114_RS01440	TGACCACCTCCGAAACTTCC	GTTGAGGTTTCCTGCTGCGT
<i>bioY</i>	CGS9114_RS11175	GGTCTCGCGGGTCTGATCAC	GCACAAAGGCACCTTGAGCA
<i>bioM</i>	CGS9114_RS11180	AATCACCGCACACCCTATCCG	CAGCAGGGTAGTGGGCTCATCA
<i>bioN</i>	CGS9114_RS11185	AGCGGATGTTGCAGCCTTTTG	CACCGTGGCTAATTGCAGCG
<i>accBC</i>	CGS9114_RS13275	ATCTCCGGACAGTTCGACTC	CCTCGACAACGTACTCTGCA
<i>accD1</i>	CGS9114_RS13235	ACATCCCAATCGTCATGCTT	CCGTATGCGTAGAGCAGCTT
<i>accD2</i>	CGS9114_RS13240	GTTCTGTTGGCATCGTGGCT	AGGAAGCCTGGAACGTCCAC
<i>accD3</i>	CGS9114_RS13505	CCTGATCTACGCAGCCGA	CTGCACGCCTTGTCGTTT
<i>accD4</i>	CGS9114_RS12340	TCCGTATCTGCGACGCCTAC	CACGGTGAATCAAACCGACC
<i>fasA</i>	CGS9114_RS13530	CCACCGTCACTGGTGAAGAA	CGTCGTAGAGTTCGGTGTTCG

2.2.7 实时荧光定量 PCR

C. glutamicum 在不同生物素浓度下和谷氨酸生产相关基因的转录水平通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行测定。实验总共包含三种培养基: 生物素限量复合培养基 (包含 0.5 g/L CSL), 生物素过量复合培养基 (包含 5 g/L CSL) 以及 15% 脱毒玉米秸秆水解液。其中脱毒玉米秸秆水解液为实验组, 生物素限量复合培养基为对照, 生物素过量复合培养基为阳性对照。

C. glutamicum 细胞培养 10 h 后立即取出, 冰水浴 10 min 后 4 °C 条件下 5000 rpm 离心 10 min 去上清, 用 LB 液体培养基清洗一次后离心取上清, 之后迅速液氮冷冻, 保存在 -80 °C 冰箱待用。之后取冷冻的细胞进行 RNA 提取, RNA 提取采用液氮冷冻研磨破碎细胞, 然后用 Trizol 试剂提取总 RNA。利用分光光度计在 260 和 280 nm 下测定其浓度和纯度之后, 利用东洋纺反转录试剂盒 (ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover kit) 进行反转录, 反转录好的 cDNA 用于下一步的实时荧光定量 PCR 实验。RT-qPCR 所使用的引物基于 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 数据库上的 *C. glutamicum* S9114 基因组序列设计, 所使用的引物如表 2.3 所示。

RT-qPCR 反应在带有 CFX96 Real-Time 系统的伯乐 C10000 qPCR 仪上进行, 反应体系采用东洋纺 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 配制而成。反应程序设置为 95 °C 预变性 1 min, 然后 95 °C 15s, 55.4 °C 15s, 72 °C 30s, 循环 40 次。16s 核糖体 RNA 基因(*CGS9114_RS11955*)用作内参基因, 用于 qPCR 的数据分析。基因在生物素过量的复合培养基和水解液中的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算得到^[224]。表达倍数大于等于 2.0 或者小于等于 0.5 视为明显差异表达。

2.2.8 B 族维生素测定

生物素 (维生素 B7) 采用德国拜发公司开发的生物素测定试剂盒进行测定。该方法主要是基于生物素缺陷型植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 的生长测定^[225]。其原理是在一定范围内, 生物素的含量和植物乳杆菌的菌体量呈现线性关系。对于水解液样品不需要提取可以直接用于测定。对于木质纤维素样品, 1 g 样品添加适量 1 M 硫酸溶液进行混合, 然后在 121 °C 下酸解 30 min, 使生物素得以释放。对于胞内生物素的测定, 首先收集细胞, 13,000×g 离心 5 min, 然后用 0.85% 的生理盐水清洗两次并用适量 1 M 硫酸溶液进行重悬, 然后在 121 °C 下酸解 30 min, 使细胞破碎的同时释放结合态的生物素。酸解冷却后, 用 NaOH 将 pH 调至 4.5, 然后用该试剂盒进行测定。试剂盒中含有特定的培养基以及含有植物乳杆菌 *L. plantarum* ATCC 8014 干粉的 96 孔板。往该孔板中添加培养基以及待测样品, 在 37 °C 下避光培养 48h 后, 测定其在 630 nm 下的 OD 值, 然后根据制作的标准曲线可以得到样品中生物素的浓度。

其他 B 族维生素由上海动植物与食品检验与检疫中心(<http://spzx.shciq.gov.cn/>)进行测定。平行实验之间方差小于 10% 视作结果有效。总体来说样品是基于相应维生素缺陷型的菌株或者荧光法进行测定的。

具体而言, 硫胺素(维生素 B1)的测定是基于荧光检测方法^[226]。硫胺素首先利用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液在 121 °C 下提取 30 min, 然后利用 2 mol/L 的乙酸钠溶液调节 pH 到 4.5, 冷却后添加淀粉酶和蛋白酶在 45-50 °C 下水解 16 h。然后往样品中添加 $K_3Fe(CN)_6$ 进行反应, 使硫胺素变成具有荧光的脱氢硫胺素。之后采用正丁醇进行提取, 并且检测在 432 和 371nm 下的荧光。最后根据制作的标准曲线得到硫胺素的浓度。

核黄素(维生素 B2)的测定是基于维生素 B2 缺陷型的干酪乳酸杆菌 *Lactobacillus casei* ATCC 7469 的生长进行测定的^[227]。样品首先添加 1 mol/L 的 HCl 溶液提取 30min, 然后用 1 mol/L 的 NaOH 调节其 pH 到 4.6。之后添加 20 mg 的 α -淀粉酶在 40 °C 下水解 16 h, 从而使结合的核黄素得到释放, 得到的样品用于测定。添加有样品的培养基中加入该干酪乳酸杆菌在 37 °C 避光培养 18-24 h, 然后测定其在 540 nm 下的 OD 值, 最后根据制作的标准曲线得到对应样品的维生素 B2 浓度。

烟酸(维生素 B3)的测定是根据烟酸营养缺陷型菌株植物乳杆菌 *L. plantarum* ATCC 8014 的生长测定的^[227]。样品添加 30 mL 0.5M H_2SO_4 在 121 °C 下提取 30 min, 用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 到 4.5 后用于测定。同样的, 往添加有样品的培养基中加入该菌株细胞, 在 37 °C 下避光培养 72 h, 然后测定 540nm 下的 OD 值。最后根据标准曲线得到对应的浓度。

泛酸(维生素 B5)的测定是基于泛酸缺陷型的植物乳杆菌 *L. plantarum* ATCC 8014 的生长测定的^[228]。样品加入水混匀, 在 121 °C 下提取 30 min, 然后利用碱性磷酸酶和丙酮肝粉在 37 °C 下避光过夜水解。水解样品用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 到 6.8, 然后添加到测定培养基中进行测定。植物乳杆菌在 37 °C 下避光培养 16-20 h 后, 测定其在 540 nm 下的 OD 值, 最后根据标准曲线计算得到泛酸浓度。

吡哆醇(维生素 B6)的测定是根据维生素 B6 依赖性的酿酒酵母 *Saccharomyces carlsbergens* ATCC 9080 的生长测定的^[229]。样品添加 0.22 M H_2SO_4 在 121 °C 下提取 30 min, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 到 4.5 后用于测定。该酿酒酵母在 30 °C 下避光培养 18-20 h 后, 测定其在 550 nm 下的 OD 值, 最后根据标准曲线计算得到吡哆醇浓度。

叶酸(维生素 B9)的测定是根据维生素 B9 缺陷型的干酪乳酸杆菌 *Lactobacillus casei* ATCC 7469 的生长测定的^[230]。样品中添加 50 mM 的 pH 6.8 磷酸缓冲液在 121 °C 下水解 15 min。样品添加一定量的胰酶粉在 37 °C 下处理 24 h, 使叶酸得以释放后用于测定。干酪乳酸杆菌在 37 °C 下避光培养 40 h 后测定在 540 nm 下的 OD 值, 最后根据标准曲线得到叶酸浓度。

钴胺素(维生素 B12)的测定是通过赖氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 的生长测定的^[227, 231]。样品利用含有 13.0 g/L Na_2HPO_4 、10.0 g/L 偏亚硫酸氢钠和 12.0 g/L 柠檬酸钠的溶液在 121 °C 下提取 10 min, 然后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 到 6.8, 然后用于测定。赖氏乳酸杆菌在 36 °C 下避光培养 16-20h, 然后测定其在 550 nm 下的 OD 值, 最后通过标准曲线计算得到钴胺素浓度。

2.2.9 分析方法

葡萄糖、谷氨酸和乳酸采用山东省科学院研发的生物传感分析仪 SBA-90 进行测定。乙酸、木糖、糠醛和羟甲基糠醛采用在配备 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱和示差折光检测器的 HPLC (LC-20AD, 示差折光检测器 RID-10A) 上测定。柱温为 65°C, 流动相为 5 mM H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min。香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛三种酚类组分依据配备 YMC-Pack ODS-A C18 柱 (YMC, Tokyo, Japan) 和紫外检测器 (SPD-20A UV 检测器) 的高效液相色谱 (LC-20AT, 日本岛津) 上进行, 具体方法参考 He 等此前报道的方法^[39]。菌体生长采用 600 nm 下的光密度表征 (OD₆₀₀) 细胞干重依据测定的 OD₆₀₀ 和细胞干重关系曲线换算, 每单位 OD₆₀₀ 相当于 0.40 mg/mL 细胞干重。

2.2.10 谷氨酸糖酸转化率计算

基于消耗葡萄糖生成的谷氨酸的量可以计算谷氨酸发酵的糖酸转化率。计算公式如下:

$$\text{谷氨酸得率} = \frac{[GMA] \times V - [GMA]_0 \times V_0}{[G]_0 \times V_0 - [G] \times V} \times 100\% \quad (1-1)$$

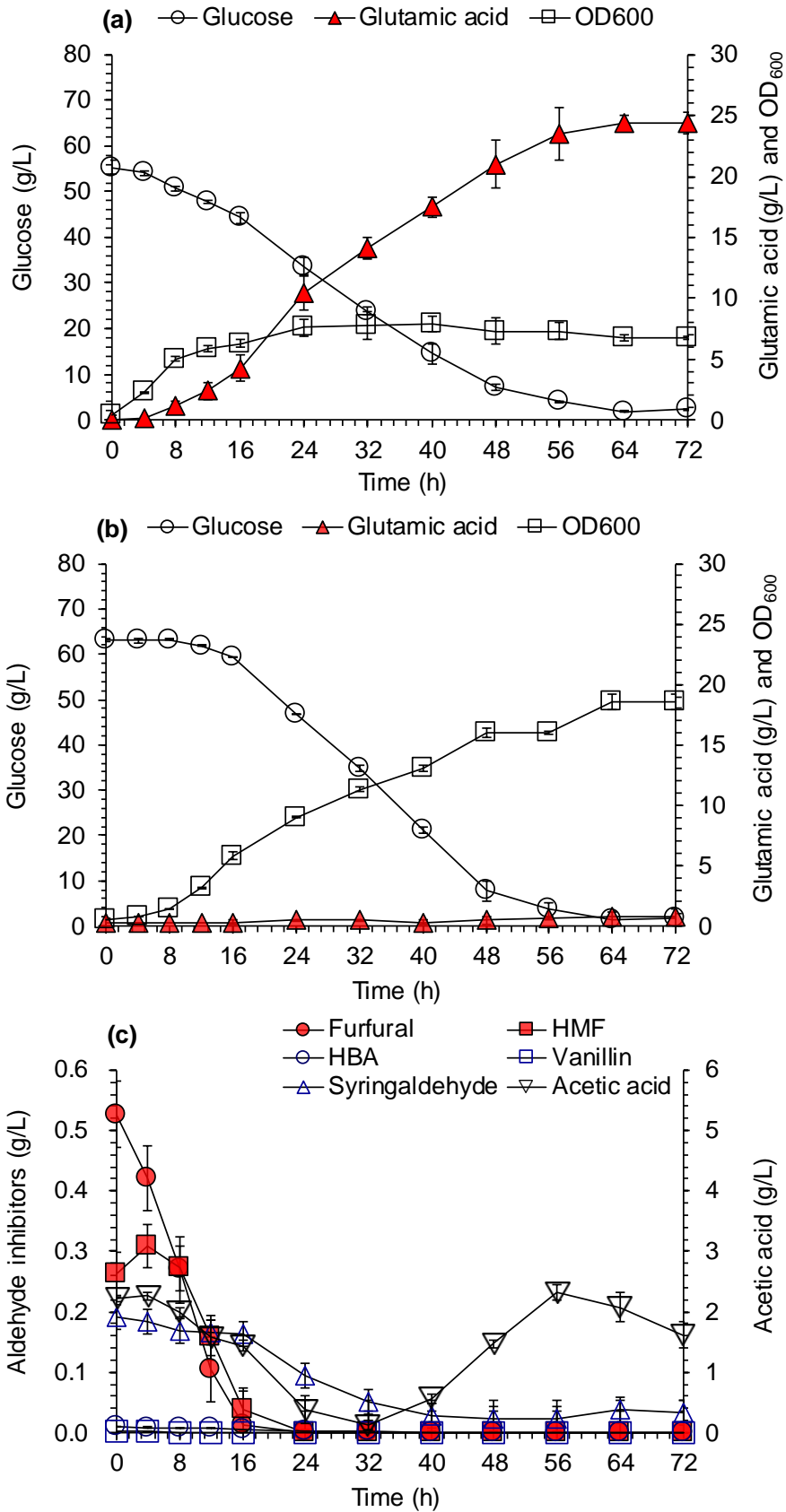
其中 [GMA] 和 [GMA]₀ 表示发酵液中最终和初始谷氨酸浓度, [G]₀ 和 [G] 表示发酵初始和最终的葡萄糖浓度, V₀ 和 V 代表初始和最终的发酵液体积。在计算过程中, 忽略因调节 pH 所需的酸和碱造成的体积变化。

2.3 结果与讨论

2.3.1 水解液中谷氨酸发酵情况

为了实现谷氨酸生产, 首先对 *C. glutamicum* S9114 在复合培养基中以及水解液中的谷氨酸生产情况进行了测试。生物素限量是谷氨酸生产最常用的处理方式之一^[232], 所以首先是在生物素限量的复合培养基中进行发酵。在生物素限量培养基中 (图 2.1a), 菌体能够正常生长, OD₆₀₀ 维持在 8 左右, 经过 72 h 发酵, 细胞利用 55.4 g/L 葡萄糖生产了约 24.4 g/L 的谷氨酸, 表现出比较好的生产性能。但是, 当在水解液中进行发酵时, 结果却完全不一样。不论是在未脱毒 15%(w/w) 玉米秸秆水解液还是在脱毒 15%(w/w) 玉米秸秆水解液中, 菌体都能表现出更好的生长, 其 OD₆₀₀ 值均能达到 20 左右, 是复合培养基中最大 OD₆₀₀ 值的两倍以上 (图 2.1b 和图 2.1d)。葡萄糖也能够迅速被利用, 但是谷氨酸却没有生成。通过对多种抑制物的降解转化情况进行分析 (图 2.2c) 发现, 在未脱毒水解液中, *C. glutamicum* 细胞能够快速将其中的糠醛和羟甲基糠醛转化。其他抑制物本身浓度比较低, 而且菌株也能够快速将其转化为其他低毒物质。乙酸由于本身也是谷氨酸棒状杆菌的一种代谢副产物^[233], 前期消耗完之后后续又有少量生成, 但是它本身对谷氨酸棒状杆菌产谷氨酸影响不大。进一步在复合培养基中添加抑制物成分, 发现菌株虽然谷氨酸产量受到小幅度影响, 但是也能够使菌株发酵生产谷氨酸 (表 2.4)。所以结果说明菌株对抑制物具有一定的耐受和转化能力, 并不是菌株影响谷氨酸生产的关键因素。随后, 通过往往水解液中添加多种营养盐以及玉米浆的发酵结果显示, 这些物

质的添加对于谷氨酸生产没有任何促进作用（表 2.4）。说明营养成分缺乏也不是水解液中不能够积累谷氨酸的关键因素。



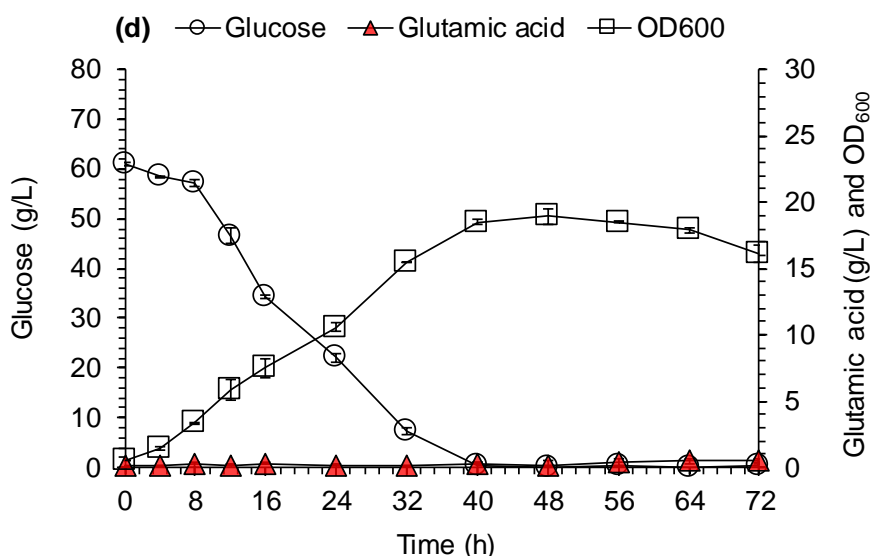


图 2.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在复合培养基和玉米秸秆水解液中的谷氨酸发酵情况

Fig. 2.1 Glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* S9114 in the complex medium and corn stover hydrolysate

(a) 复合培养基中发酵情况；(b) 未脱毒 15%(w/w)玉米秸秆水解液中发酵情况；(c) 未脱毒 15%(w/w)水解液中的抑制物降解情况；(d) 脱毒 15%(w/w)玉米秸秆水解液中发酵情况。发酵在 250 mL 三角烧瓶中进行，发酵条件见材料与与方法部分，平行结果标准差由误差线表示。

表 2.4 抑制物与营养成分对谷氨酸棒状杆菌谷氨酸发酵的影响^a

Table 2.4 Effects of inhibitors and nutrients on glutamic acid fermentation by *C. glutamicum*

Medium	Inhibitors and Nutrients			Glutamic acid (g/L)
	Inhibitors	Metal Ions	CSL	
Complex Medium	-	+	+	24.4 ± 0.8
Complex Medium	+	+	+	19.2 ± 0.2
Fresh CSH	+	-	-	trace
Biodetoxified CSH	-	-	-	trace
Biodetoxified CSH	-	+	-	trace
Biodetoxified CSH	-	-	+	trace

^a 发酵条件：250 mL 三角瓶，30°C，pH7.0，200 rpm。

2.3.2 青霉素诱导谷氨酸发酵

在水解液中，*C. glutamicum* 生长良好却没有谷氨酸的生成，这种现象和生物素过量的情况非常类似。在谷氨酸发酵过程中，生物素具有非常重要的作用^[133]，生物素作为 acetyl-CoA 羧化酶的辅酶参与脂肪酸的合成，从而参与细胞膜和细胞壁的合成^[234]。一方面由于 *C. glutamicum* 是生物素缺陷型菌株，必须要有生物素存在以保证基本的生长^[234]。另一方面，在过量生物素条件下，谷氨酸无法正常分泌^[136, 148, 235]。为此，通常需要在生物素限量或者“生物素亚适量”条件下生产谷氨酸^[236, 237]，或者在生物素过量的条件下通过添加表面活性剂如吐温 40^[150]、β-内酰胺环类抗生素如青霉素^[85, 138, 145, 151, 238]或者细胞壁合成抑制剂如乙胺丁醇^[239]等进行谷氨酸的诱导发酵，亦或者采用温度敏感型菌株进

行发酵^[240,241]。其中，具有 β -内酰胺环的青霉素会抑制细胞壁肽聚糖的合成，引起细胞壁结构变化从而使谷氨酸能够分泌。在本实验中，我们尝试采用青霉素诱导的方式来诱导水解液中的谷氨酸发酵，水解液中青霉素诱导实验结果如图 2.2 所示。

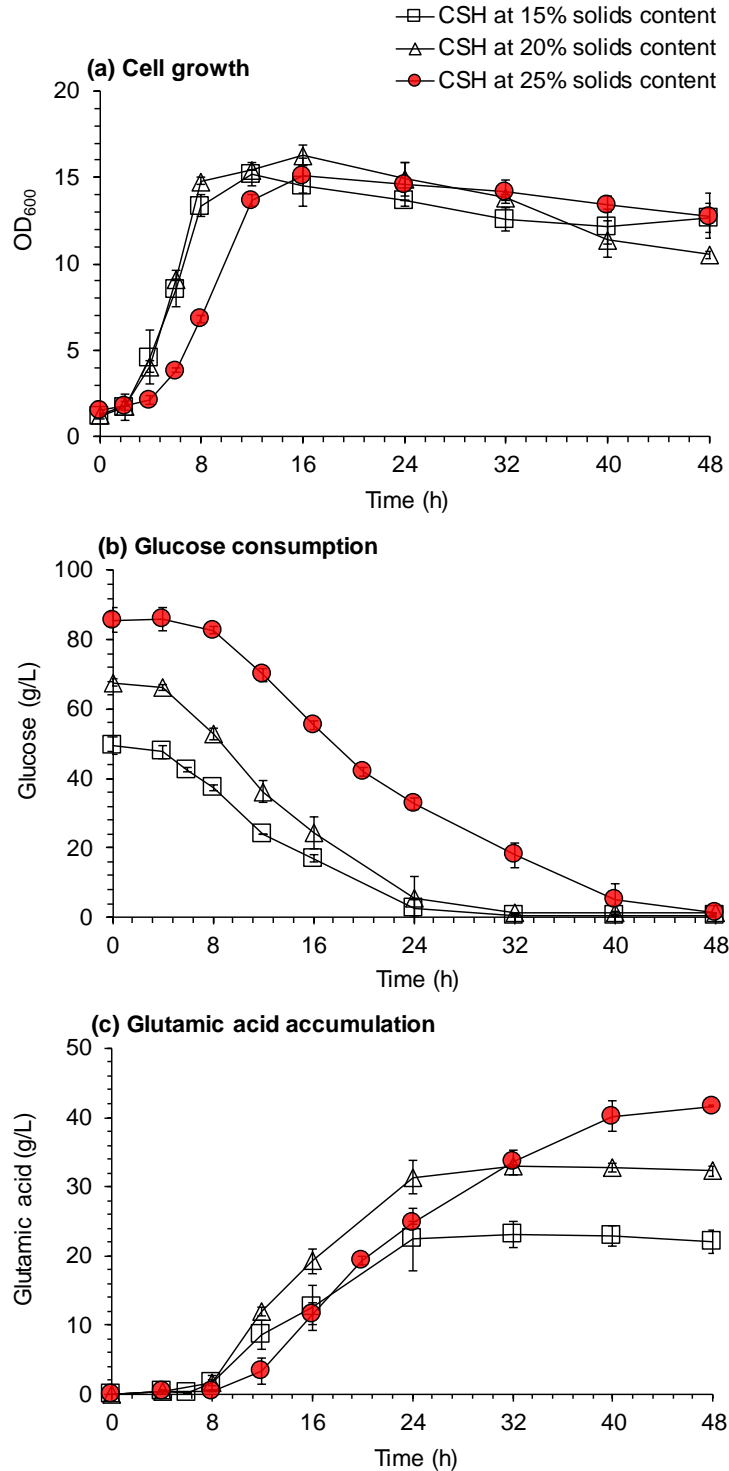


图 2.2 青霉素诱导谷氨酸棒状杆菌 S9114 在玉米秸秆水解液中生产谷氨酸

Fig. 2.2 Penicillin triggered glutamic acid production from *C. glutamicum* S9114 cells in corn stover hydrolysate

注：(a) 细胞生长；(b) 葡萄糖消耗；(c) 谷氨酸积累。谷氨酸在 15%、20% 和 25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液中的发酵在 3L 发酵罐中进行，发酵条件及诱导条件见材料与方法部分，平行实验间的标准差通过误差线表示。

从图中发酵结果可以看出，*C. glutamicum* 细胞在水解液中均能够生长良好，最大的 OD₆₀₀ 值在 14-16 之间，同时随着发酵进行，OD 值存在一定的下降。葡萄糖均能够被快速消耗，能够在 48 h 内消耗完全。在菌体对数生长中前期添加完青霉素诱导之后，谷氨酸开始在发酵液中积累。15% 和 20% 玉米秸秆水解液中，随着葡萄糖在 32h 消耗殆尽，谷氨酸浓度在 32 h 达到最高值。而在 25% 玉米秸秆水解液中，谷氨酸浓度伴随着葡萄糖的持续消耗，在 48 h 达到最大值，谷氨酸的浓度达到 41.7 ± 0.1 g/L。基于葡萄糖消耗的糖酸转化率达到 50%。由于 *C. glutamicum* 不能够利用水解液中的木糖、阿拉伯糖等，而水解液中其他可利用的糖浓度非常低，所以谷氨酸的得率仅基于消耗的葡萄糖计算。

这一结果是利用木质纤维素原料进行谷氨酸发酵所得到的比较高的指标，这一结果也比 Gopinath 等^[102]和 Meiswinkel 等^[103]利用添加多种营养成分后的水解液发酵得到的谷氨酸浓度高出 2 倍以上。虽然和利用淀粉原料进行分批补料发酵所得到的高浓度谷氨酸 (120 g/L 以上)^[137]还存在一定差距，但是这个结果也充分说明了利用木质纤维素水解液进行谷氨酸发酵的可行性。后续的研究，通过进一步优化谷氨酸发酵条件、采用分批补料发酵方式、通过改造实现水解液中混合糖的利用以及减少副产物生成等能够使水解生产的谷氨酸浓度进一步提高。这一实验结果同时也说明青霉素诱导谷氨酸发酵同样适用于木质纤维素水解液。基于上述的这些结果可以推断，玉米秸秆水解液中正常发酵无法积累谷氨酸的原因可能是水解液中的生物素含量过高。

2.3.3 发酵过程中的胞内外生物素浓度变化

为了验证是否是由于水解液中生物素含量过高导致的谷氨酸无法积累，我们随后设计了一系列实验进行了验证。首先，我们采用德国拜发公司的 VitaFast 试剂盒，对水解液中的生物素浓度进行了测定。通过测定我们发现，在 15%(w/w)脱毒水解液中的生物素浓度高达 22.5 ± 4.3 $\mu\text{g/L}$ (图 2.3a)。这一生物素浓度比我们采用的用于谷氨酸发酵的复合培养基中的生物素浓度 (0.21 ± 0.02 $\mu\text{g/L}$) 高出两个数量级。同时，这一生物素浓度也比文献报道中的生物素“亚适量”的浓度 (2–5 $\mu\text{g/L}$) 高出十倍左右^[236]，是典型的生物素过量条件，所以生物素可能是谷氨酸不能够积累的关键因素。

随后，我们对发酵过程中细胞内以及胞外的生物素浓度也进行了测定。如图 2.3 所示，在发酵过程中，胞外（即水解液中）的生物素能够快速被 *C. glutamicum* 细胞吸收，最终仅少量的生物素残留在水解液中。胞外的生物素和吸收到细胞内的生物素在总量上基本保持不变 (图 2.3a)。从基于细胞干重的胞内生物素含量来看，胞内生物素含量呈现先升高后下降的趋势，胞内生物素含量在 12 h 时达到最大值，为 11.3 ± 0.1 $\mu\text{g/g}$ 干细胞重 (DCW)。然后随着细胞的不断增殖，生物素逐渐被分配到增殖的细胞中，生物素含量逐渐下降，但是当细胞生长稳定以后，细胞的生物素浓度也随之保持稳定。从图 2.4 b 中看出，最低的生物素浓度是在 60 h 时的 2.7 ± 0.2 $\mu\text{g/g}$ DCW，但是这一生物素浓度依

然比可以分泌谷氨酸的浓度要高^[236]。所以从对细胞内和细胞外生物素浓度的测定结果来看，胞外过量的生物素被吸收到细胞内，形成细胞内一个过量的生物素环境，从而使谷氨酸无法分泌。虽然不同的研究中，所提到的生物素亚适量浓度有所差别，但是胞内适合谷氨酸分泌的生物素浓度却比较接近^[169, 236]。所以通过我们对细胞内生物素浓度的测定结果可以说明，胞外高浓度的生物素被吸收到细胞内所形成过高的胞内生物素浓度环境，是谷氨酸不能够积累的原因，可以说玉米秸秆水解液中的过量生物素是导致不能够分泌谷氨酸的原因。

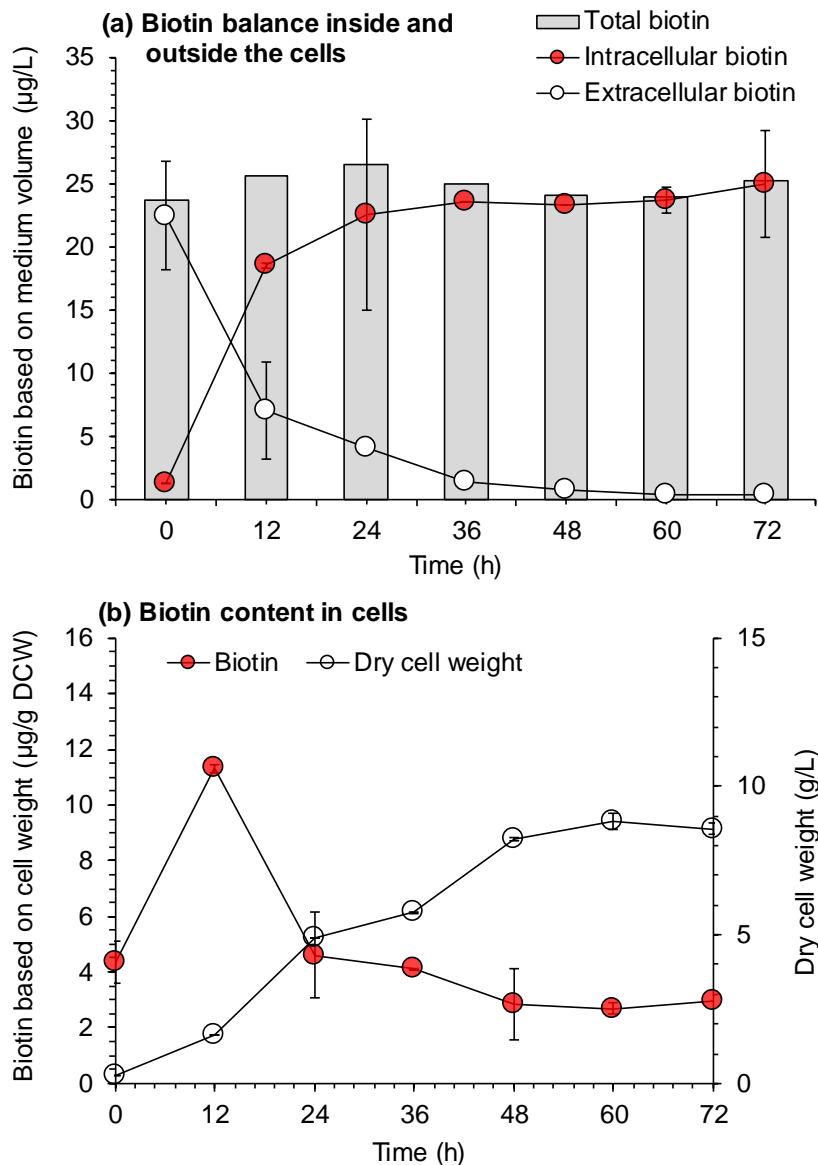


图 2.3 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在玉米秸秆水解液谷氨酸发酵过程中的胞内外生物素浓度变化

Fig. 2.3 Intracellular and extracellular biotin changes during glutamic acid fermentation by *C. glutamicum* S9114 in corn stover hydrolysate

注：(a) 细胞内外的生物素平衡；(b) 胞内生物素浓度变化情况。谷氨酸的发酵采用 15% 脱毒玉米秸秆水解液，发酵在 250mL 三角烧瓶中进行，过程不经过青霉素诱导，其他发酵条件见材料与与方法部分。胞内外的生物素提取以及测定见材料与与方法部分。细胞干重基于测定的 OD₆₀₀ 和菌体干重曲线计算获得。平行实验得到的结果的标准差通过误差线表示。

2.3.4 玉米秸秆水解液中生物素对谷氨酸发酵的影响

为了进一步验证水解液中生物素的影响，我们利用生物素特异性结合蛋白亲和素（Avidin）对水解中的生物素进行吸附^[223]。通过往脱毒玉米秸秆水解液里面添加合适浓度的亲和素，可以吸附掉水解液中的生物素，使生物素无法发挥其原来的作用且不能够被 *C. glutamicum* 利用。我们首先通过预实验并且充分考虑由于水解液中复杂的成分所造成的无效吸附，往 15%(w/w)脱毒玉米秸秆水解液中添加相对过量的亲和素(23 mg/L, 相当于 200 单位/L CSH)，得到生物素完全吸附水解液（Biotin free CSH）。然后在生物素完全吸附水解液的基础上，再往里面补加纯生物素。通过预实验，添加 30 μ L 1 mg/L 生物素溶液得到生物素补加亚适量水解液（Biotin re-supplemented CSH1, suboptimal），添加 690 μ L 的 1 mg/L 生物素溶液得到生物素补加过量水解液（Biotin re-supplemented CSH2, excessive）。需要说明的是，由于亲和素是一类蛋白，它对生物素的吸附必须在蛋白具有活性的情况下才能吸附，在测定生物素过程中前期样品处理会导致蛋白失活，所以对于这三种水解液生物素我们暂时没法测定。随后我们利用得到的这三种玉米秸秆水解液以及原始脱毒玉米秸秆水解液进行了谷氨酸的发酵实验。发酵三角瓶中进行，发酵结果如图 2.4 所示。

从发酵结果来看，和原始脱毒玉米秸秆水解液相比，生物素完全去除的水解液中，菌体生长受到非常明显的限制，相应的葡萄糖的消耗也出现停滞，谷氨酸无法正常积累。说明在生物素完全去除的情况下，*C. glutamicum* 细胞无法生长和产酸。只有当发酵进入后期，可能由于亲和素对生物素的吸附不再非常牢固，才有部分生物素可以被用来生长。这主要是由于 *C. glutamicum* 是生物素缺陷型菌株，只有在生物素存在下才能够生长^[234]，所以当生物素完全去除时，菌体的生长以及谷氨酸的生产都会受到非常明显的抑制。

随后，通过往水解液里面补加纯生物素到亚适量的条件后（Biotin re-supplemented CSH1），菌体生长得以恢复，菌体量最大值为对照条件下的一半（图 2.4a），但是葡萄糖的消耗速率和原始水解液比较接近（图 2.4b）。谷氨酸在 32 h 后开始有生成，最终约有 6 g/L 的谷氨酸的积累（图 2.4c）。但是，当往水解液里面补加过量的生物素时（Biotin re-supplemented CSH2），菌体的生长糖耗和产酸又恢复到和原始水解液中的情况一样，甚至表现出更好的生长，但是同样没有谷氨酸的积累（图 2.4）。从发酵结果可以看出，在水解液中只有当生物素补加至合适水平才有谷氨酸积累，去除生物素或者过量生物素反而导致谷氨酸无法积累。这些结果可以充分说明生物素是玉米秸秆水解液中 *C. glutamicum* 无法积累谷氨酸的关键因素。

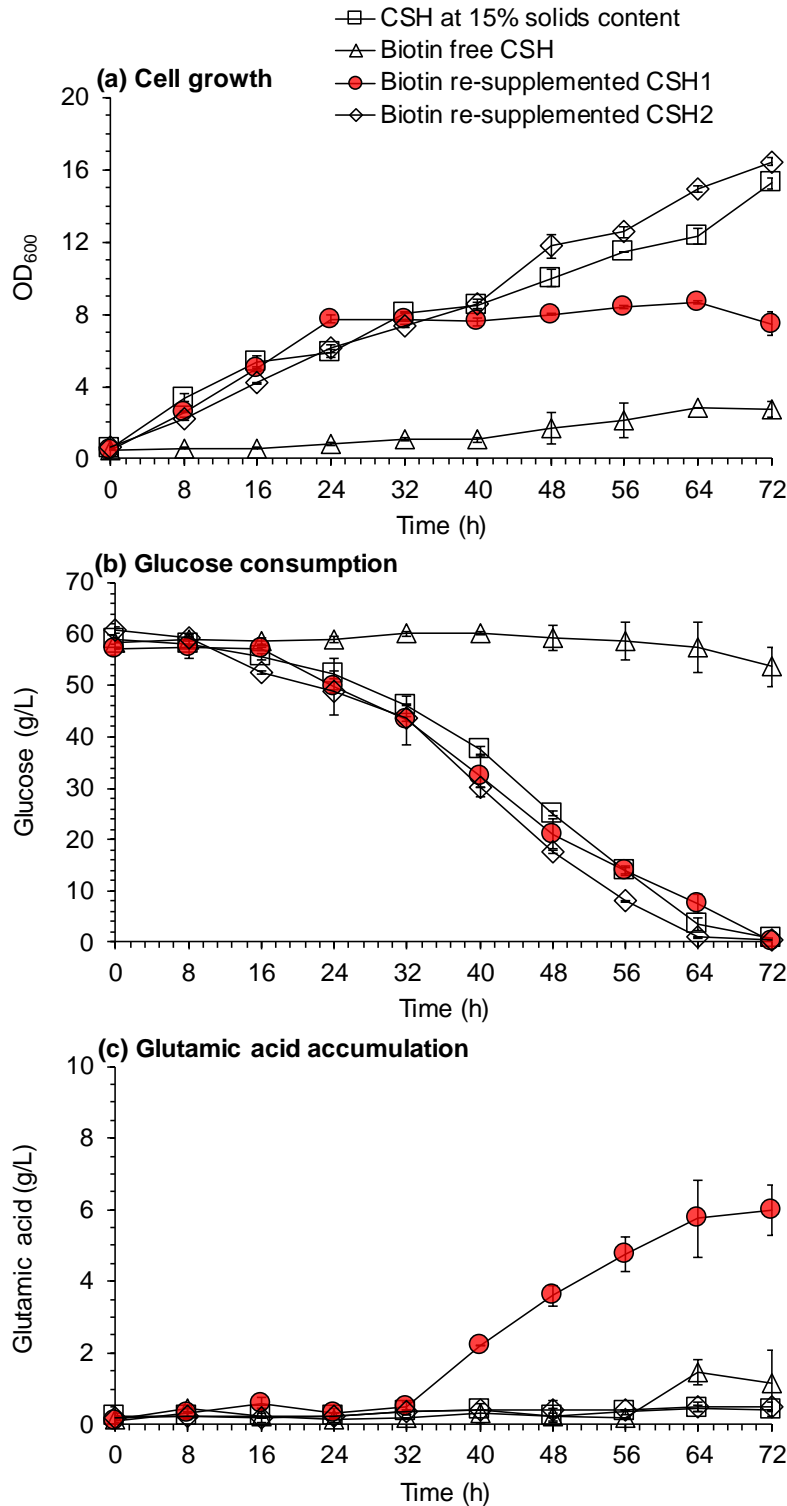


图 2.4 生物素去除和补加对谷氨酸棒状杆菌 S9114 生长和谷氨酸发酵的影响

Figure 2.4 Biotin removal and re-supplementation on cell growth and glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* S9114

注：(a) 细胞生长；(b) 葡萄糖消耗；(c) 谷氨酸积累。水解液采用脱毒的 15%玉米秸秆水解液，生物素浓度为 $22.5 \pm 4.3 \mu\text{g/L}$ 。生物素去除、生物素亚适量以及生物素过量水解液的制备方法见材料与方法部分。谷氨酸的发酵在 250 mL 三角烧瓶中进行，发酵条件见材料与方法部分。平行实验间的结果的标准差通过误差线表示。

表 2.5 生物素过量条件下谷氨酸棒状杆菌中和谷氨酸积累相关基因的表达水分分析

Table 2.5 Expression of genes involving glutamic acid accumulation of *C. glutamicum* S9114 in biotin rich conditions

Proteins	Genes	Locus_tag	Relative gene expression level	
			In biotin rich complex medium	In the CSH (15% solids content, w/w)
Phospholipid synthesis				
Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	<i>ufaA</i>	CGS9114_RS06985	2.44 ± 0.77	4.32 ± 0.84
Phosphatidylglycerophosphate synthase	<i>pgsA1</i>	CGS9114_RS06020	9.00 ± 3.00	17.65 ± 4.09
Phosphatidylinositol α -mannosyltransferase	<i>pima</i>	CGS9114_RS07945	1.24 ± 0.31	5.48 ± 1.47
Peptidoglycan synthesis				
Cell division protein FtsI	<i>ftsI</i>	CGS9114_RS11420	3.60 ± 0.54	2.71 ± 0.27
Cell division protein FtsI	<i>ftsI</i>	CGS9114_RS07835	2.16 ± 0.06	7.16 ± 0.09
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	<i>dacB</i>	CGS9114_RS00725	0.94 ± 0.02	2.45 ± 0.48
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	<i>dac</i>	CGS9114_RS13375	1.43 ± 0.39	0.87 ± 0.31
Glutamate synthesis				
α -ketoglutarate decarboxylase	<i>odhA</i>	CGS9114_RS03450	3.44 ± 0.32	5.20 ± 1.64
Dihydrolipoamide acetyltransferase	<i>sucB</i>	CGS9114_RS08045	2.47 ± 0.42	2.60 ± 0.18
Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>lpdA</i>	CGS9114_RS13335	0.80 ± 0.13	0.75 ± 0.18
Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>lpd</i>	CGS9114_RS04910	1.51 ± 0.21	1.67 ± 0.28
Glutamate dehydrogenase	<i>gdh1</i>	CGS9114_RS12025	0.70 ± 0.13	0.87 ± 0.09
Glutamate dehydrogenase (NADP ⁺ dependent)	<i>gdh2</i>	CGS9114_RS07420	1.47 ± 0.36	0.73 ± 0.06
Glutamate secretion				

Mechanosensitive channel MscCG ^a	<i>yggB</i>	CGS9114_RS01440	0.32 ± 0.16	0.17 ± 0.04
Biotin transporter				
Biotin biosynthesis protein BioY	<i>bioY</i>	CGS9114_RS11175	7.16 ± 0.94	5.09 ± 0.69
Cobalt ABC transporter ATP-binding protein	<i>bioM</i>	CGS9114_RS11180	16.6 ± 1.78	13.19 ± 1.00
ABC transporter permease	<i>bioN</i>	CGS9114_RS11185	5.14 ± 0.90	3.11 ± 0.29
Fatty acid synthesis				
Acetyl-/propionyl-CoA carboxylase subunit α	<i>accBC</i>	CGS9114_RS13275	2.47 ± 0.64	2.07 ± 0.43
Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase ^b	<i>accD1</i>	CGS9114_RS13235	1.13 ± 0.36	0.08 ± 0.02
Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase ^c	<i>accD2</i>	CGS9114_RS13240	2.01 ± 0.19	1.53 ± 0.13
Acetyl-CoA carboxylase subunit β	<i>accD3</i>	CGS9114_RS13505	1.11 ± 0.57	0.88 ± 0.17
Acetyl-CoA carboxylase subunit β	<i>accD4</i>	CGS9114_RS12340	2.44 ± 0.24	5.38 ± 0.58
Fatty acid synthase	<i>fasA</i>	CGS9114_RS13530	1.37 ± 0.33	0.54 ± 0.04

^a 该基因和 *C. glutamicum* ATCC13032 中编码的机械敏感型通道 MscCG 的 *NCgl1221* 基因 99%类似;

^b 该基因和 *C. glutamicum* ATCC13032 中的 *dtsR1* 基因 98%类似;

^c 该基因和 *C. glutamicum* ATCC13032 中的 *dtsR2* 基因 99%类似。

为了进一步说明玉米秸秆水解液中生物素对谷氨酸生产的影响,我们以生物限量条件为对照,对和谷氨酸生产相关的一些基因在水解液中的表达水平进行了分析。谷氨酸棒状杆菌谷氨酸积累机制目前已经非常明确,要实现谷氨酸积累,一方面需要改变碳代谢流增强谷氨酸的合成,另一方面需要使细胞膜和细胞壁结构发生变化进而打开谷氨酸分泌通道实现谷氨酸分泌。这些过程总结起来涉及脂肪酸合成、磷脂以及肽聚糖合成、谷氨酸的合成以及谷氨酸分泌等。为此我们考察了涉及磷脂以及肽聚糖合成的部分基因、谷氨酸合成中的关键酶 α -酮戊二酸脱氢酶系的编码基因、两个谷氨酸脱氢酶编码基因、谷氨酸分泌通道 MscCG 编码基因以及脂肪酸合成相关基因在水解液条件下的转录水平变化,从而进一步说明水解液中生物素对谷氨酸积累的影响。除此之外,我们还考察了生物素转运相关基因的转录水平变化。

对这些基因表达水平的测定通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行。以添加 0.5 g/L 玉米浆的生物素限量复合培养基为对照组,添加 5.0 g/L 玉米浆的生物素过量复合培养基为阳性对照组,15%(w/w)脱毒玉米秸秆水解液为实验组。取样点选取 *C. glutamicum* 在生物素限量培养基中谷氨酸开始积累(即 10 h)的时间。基因表达水平结果如表 2.5 所示。

在生物素过量的复合培养基和玉米秸秆水解液中,和磷脂合成相关的三个基因环丙烷脂肪酸酰磷脂合酶编码基因 *ufaA*^[152]、磷脂酰甘油磷酸合成酶编码基因 *pgsA1*^[152]和磷脂酰肌醇 α -甘露糖基转移酶编码基因 *pima*^[152]均上调表达,其中 *pgsA1* 基因在水解液中上调倍数高达 17.65 倍。说明在生物素过量条件下,磷脂的合成得到增强。同样的,和肽聚糖合成的细胞分裂蛋白编码基因 *ftsI*^[242]在生物素过量条件下均显著上调表达,D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶编码基因 *dacB*^[151, 243]在生物素过量水解液中显著上调表达,D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶编码基因 *dac*^[151, 243]在生物过量合成培养基中显著上调表达。说明在生物素过量情况下,肽聚糖的合成也得到增强。在谷氨酸发酵过程中,磷脂和肽聚糖的合成是和谷氨酸积累相关的^[132]。在生物素过量条件下,吐温 40 诱导除了能够改变细胞表面张力以外也会抑制细胞膜的合成^[152]。而青霉素诱导可以使青霉素结合到 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶上从而阻止该酶参与肽聚糖的合成^[244]。所以在生物素过量情况下磷脂和肽聚糖合成的增强是谷氨酸无法积累的原因之一。

在谷氨酸的生产过程中, α -酮戊二酸节点非常重要。谷氨酸主要由 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的催化下生成,但是 α -酮戊二酸脱氢酶系(ODHC)可以竞争性催化 α -酮戊二酸生成琥珀酸^[142]。所以,ODHC 活性下降是谷氨酸高产的必要条件之一^[140]。在生物素过量的复合培养基以及玉米秸秆水解液中,ODHC 两个亚基 e1o 和 e2o 编码基因 *odhA* 和 *sucB* 均显著上调表达,而谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh1* 和 *gdh2* 没有明显上下调表达。由于在 α -酮戊二酸节点的代谢流更多取决于 ODHC^[140],这些基因的转录水平的结果可以说明,在生物素过量情况下更多的 α -酮戊二酸流向 TCA 循环而非谷氨酸的合成。对于谷氨酸转运体 MscCG 编码基因 *yggB*^[132],它在生物素过量的复合培养基以及玉米秸

秆水解液中均明显下调表达。该谷氨酸分泌通道表达量的减少可以进一步说明谷氨酸在高生物素条件下是无法分泌的。而生物素转运体编码基因 *bioYMN*^[245] 在生物素过量的复合培养基以及玉米秸秆水解液中均明显的上调表达也正好印证了在发酵开始时胞外的生物素得以快速的吸收到胞内这一现象。由于 *C. glutamicum* 是生物素缺陷型菌株，不能够合成生物素^[246]，为此我们没有选择和生物素合成相关的基因进行分析。除此之外，在和脂肪酸合成相关的这些基因中，只有 *acetyl-CoA* 羧化酶 α 亚基编码基因 *accBC* 明显上调表达，该酶和可以和生物素结合参与到脂肪酸的合成过程。说明过量的生物素需要更多的 *acetyl-CoA* 羧化酶 α 亚基来结合生物素以发挥其作为辅酶的作用。在四个 *accD* 基因中，只有 *accD4* 在两种生物素过量条件下出现明显的上调表达，但是 *accD4* 本身并不参与脂肪酸的合成过程^[133]。同时脂肪酸合成中的 *fasA* 基因也没有表现出明显的上下调表达。所以生物素本身可能对于脂肪酸合成相关基因表达的影响相对较小。

所以基于上述结果，在生物素过量的复合培养基以及水解液中，比较类似的基因表达情况能够说明水解液中生物素对谷氨酸积累的关键影响。过量的生物素会通过生物素转运蛋白快速吸收到胞内，形成胞内的高生物素条件。而在高生物素条件下，位于 α -酮戊二酸节点的代谢流会更多的流向 TCA 循环而导致谷氨酸的合成渐少。另一方面，胞内过量的生物素会使和磷脂以及肽聚糖等合成过程得到加强进而形成致密的细胞被膜结构阻挡谷氨酸分泌，同时谷氨酸分泌通道 *MscCG* 也会在这种情况下明显下调表达，从而导致谷氨酸无法分泌。所以高生物素下谷氨酸合成的减少和分泌过程受到的抑制使谷氨酸在在高生物素玉米秸秆水解液中无法积累谷氨酸。

2.3.5 生物炼制过程中的生物素

为了进一步了解在水解液中存在大量的生物素的原因，我们对玉米秸秆原料中的生物素含量进行了测定。我们发现，在初始的玉米秸秆原料中，生物素的含量高达 $353 \pm 16 \mu\text{g/kg}$ 干玉米秸秆原料 (DM)，比玉米当中的生物素的浓度 ($29 \pm 6 \mu\text{g/kg DM}$) 高出一个数量级 (图 2.5 a)。该生物素含量已经非常接近玉米浆中的生物素含量 ($744 \pm 15 \mu\text{g/kg DM}$)，甚至接近花生饼粉 ($1790 \mu\text{g/kg DM}$) 和酵母粉 ($1000 \mu\text{g/kg DM}$) 中的生物素含量^[247]。过量的生物素不仅仅在这一批次的玉米秸秆原料中检测得到，在收集的其他批次来自不同地方的玉米秸秆中，同样也能够检测到过量的生物素。如 2015 年秋季在内蒙古巴彦淖尔收集的玉米秸秆中生物素含量达到 $282 \pm 11 \mu\text{g/kg}$ ，2016 年秋季在内蒙古通辽收集的玉米秸秆中生物素含量达到 $330 \pm 15 \mu\text{g/kg}$ 。说明玉米秸秆中存在大量的生物素这一现象是一个普遍现象。

除了玉米秸秆以外，我们对其他典型生物质原料中的生物素含量也进行了测定，这些原料包括农业类生物质如稻秆、麦秆以及甘蔗渣，草类生物质如芦苇草以及木材类生物质如白杨木屑。我们发现高生物素含量这一现象不仅仅是出现在玉米秸秆原料中，在我们选择的其他几种典型的木质纤维素原料中也能够检测到。其中，稻秆、麦秆以及甘蔗渣分别含有 357 ± 13 、 101 ± 5 和 $197 \pm 8 \mu\text{g/kg DM}$ 的生物素，典型的芦苇草类中的生

物素含量也达到 $133 \pm 7 \mu\text{g/kg DM}$ 。但是，白杨木屑中生物素的含量相对较低，只有 $23 \pm 0.2 \mu\text{g/kg DM}$ 。这一现象可以通过玉米叶和玉米秆中生物素含量的差别来解释：在收集的玉米叶中生物素含量高达 $1344 \pm 54 \mu\text{g/kg DM}$ ，而玉米秆中生物素的含量只有 $161 \pm 4 \mu\text{g/kg DM}$ ，相差近一个数量级。这可能是由于在植物叶片中色素体 (Plastid) 需要生物素作为辅酶参与到脂肪酸的合成有关^[248]，而茎秆对生物素的需求相对较小。所以在叶片含量最少的白杨木屑生物质中生物素的含量相对较低。木质纤维素原料高生物素含量这一现象也是为什么目前利用木质纤维素原料生产谷氨酸的研究较少且发酵结果不太理想的原因之一。

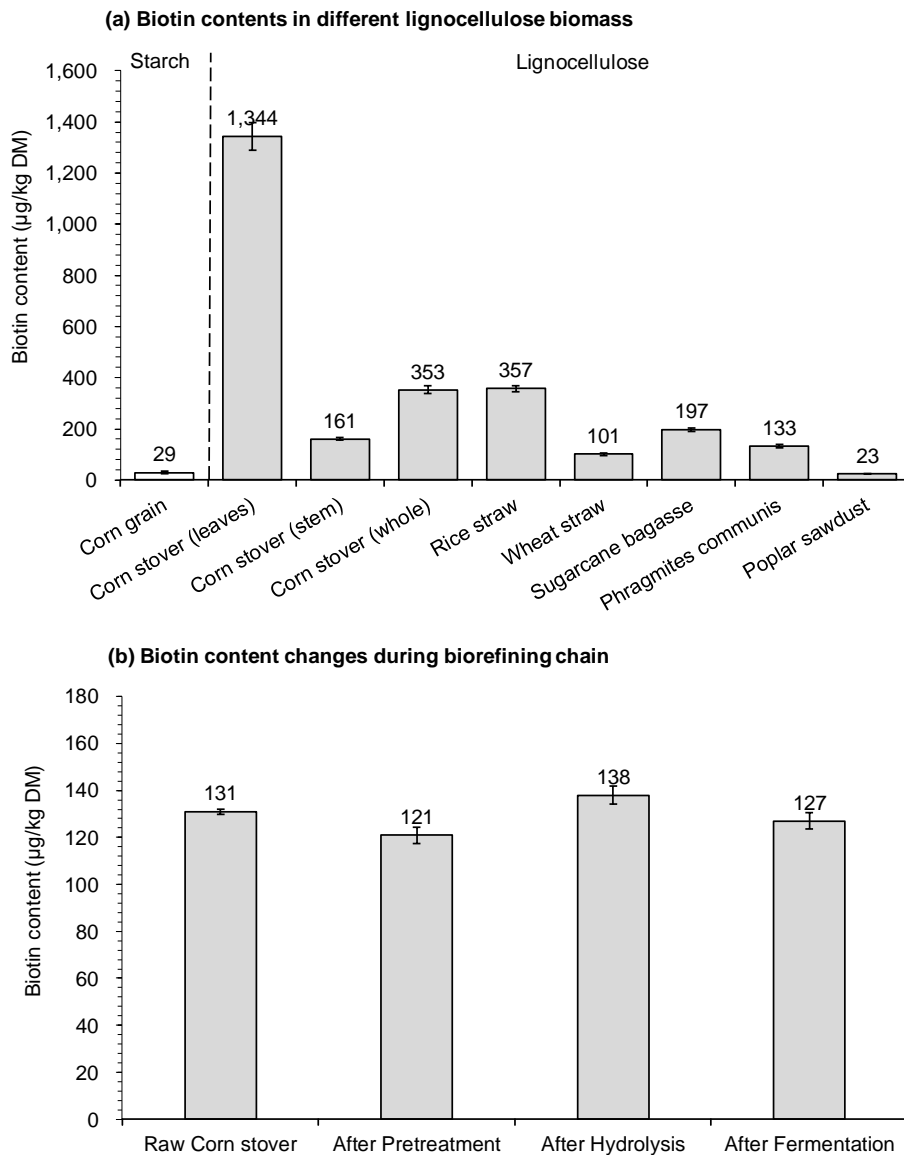


图 2.5 不同木质纤维素原料中的生物素和生物素在生物炼制过程中的变化情况

Figure 2.5 Biotin contents in different lignocellulose biomass and biotin content changes during biorefining steps

注：(a) 不同木质纤维素生物质中的生物素含量；(b) 生物炼制过程中生物素的变化情况。水解液和发酵液中的生物素总量是通过测定的生物素浓度进一步换算为每 kg 干物料中的生物素得到的。每组测定实验少两次重复，标准差通过误差线表示。

生物素在农作物、水果以及乳制品如小麦、玉米、土豆、甜菜和甘蔗糖蜜、花生饼粉、葡萄以及牛奶等中早已经有所报导^[248, 249]，但是木质纤维素原料中存在大量生物素却是第一次报道。在植物中，生物素通常以两种形式存在，在细胞质中通常以游离形式存在，而细胞器中通常作为辅因子结合到羧化酶上从而以结合形式存在^[250]。结合生物素的羧化酶参与到细胞的多种代谢活动当中，如氨基酸代谢、脂肪酸合成以及碳水化合物的糖质新生等过程^[251]，而游离态的生物素通常是作为储备存在与植物细胞当中^[252]。对于生物素缺陷型的细菌如 *C. glutamicum*，游离生物素的浓度通常非常低^[247]，必须通过吸收外界的生物素才能够维持其自身的生长和代谢。但是，过量的生物素反而会使 *C. glutamicum* 无法积累谷氨酸。

随后，我们进一步对生物炼制生产谷氨酸的整个过程中的生物素变化情况进行了测定，这些过程包括原料水洗除尘、干酸预处理、生物脱毒、纤维素酶水解和谷氨酸发酵。初始获得的玉米秸秆原料需要进行水洗去除当中残留的灰尘、砂石以及金属片，在这个过程中生物素损失将近 60%。经过水洗的原料生物素的含量降低至 $131 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg DM}$ (图 2.6 b)。但是，这一水洗过程在工业化处理过程中通常由机械除尘替代^[253]而得以避免。在随后的干酸预处理、生物脱毒、纤维素酶水解以及谷氨酸发酵过程中，生物素的总量几乎保持不变 (图 2.6 b)。在高强度的干酸预处理过程中 (2.5 % 硫酸, 175 °C, 5min) 生物素含量基本保持不变 ($121 \pm 4 \mu\text{g}/\text{kg}$)，可能主要得益于在我们特殊的预处理过程中没有废水产生而带走生物素。此外，稀硫酸预处理过程正好和生物素的提取过程 (121 °C 下 1M 硫酸酸解 30 min) 的条件比较接近，这也可能是生物素得以保留的一个原因。经过生物脱毒后，原料当中的生物素浓度有小幅的提高，达到 $138 \pm 4 \mu\text{g}/\text{kg DM}$ ，这可能是由于经过脱毒后抑制物对生物素测定菌株植物乳杆菌 *L. plantarum* ATCC 8014 的抑制作用减少导致的。此外生物脱毒菌株树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 和纤维素酶当中均没有检测到生物素，所以由于没有额外的生物素引入，生物素的总量基本保持稳定。在随后的发酵过程中，胞外水解液中的生物素全部吸收到 *C. glutamicum* 细胞中，但是总量保持不变 (图 2.4 b)。所以在整个生物炼制过程中，生物素的含量保持不变。从这些结果可以看出，正是由于木质纤维素原料本身含有大量的生物素，而且生物素又在生物炼制过程中得到充分的保存，所以导致制备的水解液中含有大量的生物素，最终导致 *C. glutamicum* 在正常的发酵条件下无法积累谷氨酸。

2.3.6 生物炼制过程中的其他 B 族维生素

鉴于生物素在整个生物炼制过程中保持稳定这一现象，我们进一步对该实验进行了扩展，对生物炼制过程中玉米秸秆原料中的其他的 B 族维生素的含量进行了测定。同时我们以文献中报道的淀粉质生物质 (玉米和稻米) 中的对应含量为对照，实验结果如表 2.6 所示。通过测定，我们发现在初始的玉米秸秆原料中包括生物素在内的八种 B 族维生素均能够检测到。其中核黄素 (维生素 B2)、烟酸 (维生素 B3) 和泛酸 (维生素 B5) 的含量和淀粉质原料当中非常接近，生物素 (维生素 B7) 和叶酸 (维生素 B9) 的含量

比淀粉质原料中高。其他几种 B 族维生素虽然含量偏低，但是在初始玉米秸秆中均存在。原料经过水洗之后，各种 B 族维生素的含量均存在不同程度的损失。硫胺素、核黄素、烟酸、泛酸、吡哆醇、叶酸和钴胺素的损失比例分别为 67%、48%、38%、22%、44%、8%和 14%。和前文提到的一样，水洗除尘只是实验室规模的做法，在工业上通过机械除尘可以有效避免这些维生素的损失^[253]。

随后是玉米秸秆的干酸预处理（2.5% H₂SO₄）过程。经过干酸预处理后，部分 B 族维生素的含量变化比较明显。其中，硫胺素的含量从 200 μg/kg DM 增加到 500 μg/kg DM，核黄素的含量从 1100 μg/kg DM 增加到 4200 μg/kg DM，这可能是由于它们在硫酸存在下的预处理过程中，结合态的维生素得到更加充分的释放。除此之外，吡哆醇、烟酸和泛酸的含量经过预处理后有所下降。其中，吡哆醇从 500 μg/kg DM 降低到 200 μg/kg DM，烟酸从 4600 μg/kg DM 降低到 2600 μg/kg DM，泛酸从 988 μg/kg DM 降低到 130 μg/kg DM。而叶酸在这个预处理过程中下降非常明显，其含量在初始玉米秸秆和水洗过后都比较高，但是经过预处理之后，其含量已经低于 20 μg/kg DM。可能这些维生素在在高温高压和硫酸存在下的不够稳定所以降解更加明显。值得一提的是钴胺素，钴胺素通常只有原核生物才能够合成^[254]，所以在玉米秸秆中检测到的钴胺素可能是来自于玉米秸秆生长过程中感染或者附着在上面的细菌。虽然预处理过程中很多的 B 族维生素都存在一定程度的降解，但是还是有相当一部分的 B 族维生素在预处理过后得到保存。

表 2.6 生物炼制过程中玉米秸秆原料中的 B 族维生素含量变化情况(μg/kg DM)
Table 2.6 Vitamin B contents in the raw corn stover during biorefining chain (μg/kg DM)

Vitamin B members	In virgin corn stover	After washing	After pretreatment	In starch biomass ^a
Thiamin (vitamin B1)	600	200	500	4100 (Rice) ^[229]
Riboflavin (vitamin B2)	2100	1100	4200	2600 (Corn) ^[229]
Niacin (vitamin B3)	7400	4600	2600	16000 (Corn) ^[254]
Pantothenate (vitamin B5)	1270	988	130	2000 (Rice) ^[229]
Pyridoxine (vitamin B6)	900	500	200	20000 (Corn) ^[255]
Biotin (vitamin B7)	353 ± 16	131 ± 1	121 ± 4	<0.15 (Corn) ^[249]
Folic acid (vitamin B9)	118	108	<20 ^b	19 (Rice) ^[256]
Cobalamin (vitamin B12)	7	6	<1 ^b	N/A ^[229]

^a 淀粉质生物质中 B 族维生素含量参考对应参考文献中的结果；

^b 对应的维生素含量低于检测限，无法检出。

B 族维生素对于很多发酵来说都是必须或者有促进作用的营养添加剂，如纤维素乙醇发酵^[257]、乳酸发酵^[258]以及氨基酸发酵^[259,260]。和谷物类生物质（如大米和玉米）^[249, 254-256, 261]相比，预处理后的玉米秸秆原料依然还有相对比较丰富的硫胺素、核黄素、烟酸、泛酸、吡哆醇以及生物素。它们在发酵过程中可以作为营养提高生物炼制菌株的发酵性能。比如，在毕赤酵母 *Pichia guilliermondii* 中，生物素的添加能够提高菌株的抗氧化活性从而促进纤维素乙醇的生产^[257]。在纤维素乳酸发酵过程中，乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 在玉米秸秆水解液中的生长明显好于在 MRS 培养基中的生长^[262]，

对乳酸发酵具有一定促进作用。此外对于在玉米秸秆水解液中的谷氨酸发酵来说，除了需要添加额外的氮源以外，不需要再补加任何其他营养成分如玉米浆，就能够使菌株具有良好的生长。说明玉米秸秆在预处理过程中保留下来的这些营养成分对谷氨酸发酵过程有利，这也是利用木质纤维素原料生产谷氨酸的优势之一。这些结果说明木质纤维素原料的预处理过程不仅仅产生抑制物，同时也能够释放或者保留营养成分如 B 族维生素，从而能够促进生物炼制发酵过程生产生物能源和生物基化学品。基于这一结果，木质纤维素预处理过程中需要在处理强度和保留营养成分之间做好平衡，在保证预处理效果的前提下为后续发酵实验保留更多的营养成分。

2.5 本章小结

本研究对 *C. glutamicum* S9114 利用玉米秸秆水解液生产谷氨酸的过程进行了研究，采用青霉素诱导的方法成功实现了谷氨酸的生产。同时还确定了影响谷氨酸发酵的关键因素生物素，并对生物素对谷氨酸分泌的影响以及水解液中高生物素含量的原因进行了探究。本章主要的结论如下：

(1) *C. glutamicum* 在玉米秸秆水解液中表现出比生物素限量复合培养基中更良好的生长，但是不能够积累谷氨酸。通过实验发现发酵过程中抑制物、营养成分以及玉米浆的添加均不是影响谷氨酸积累的关键因素。采用青霉素诱导，*C. glutamicum* 能够初步实现利用玉米秸秆生产谷氨酸；

(2) 通过对水解液以及发酵过程中 *C. glutamicum* 细胞内外的生物素含量的测定，发现在玉米秸秆水解液中含有过量的生物素，过量的生物素快速吸收到细胞内，导致胞内的生物素含量过高而无法积累谷氨酸。此外，胞内胞外的生物素总量在发酵过程中基本保持恒定；

(3) 通过亲和素 (Avidin) 特异性吸附去除生物素的实验，充分证明水解液中过量的生物素是谷氨酸不能够积累的关键因素。过量生物素导致不能够积累谷氨酸，但是完全去除生物素菌株无法生长，只有当生物素含量在一个相对适量的情况下才能够积累谷氨酸。通过 RT-qPCR 实验，针对水解液中生物素对谷氨酸积累的影响进行了分析，从转录水平说明了水解液中生物素对谷氨酸积累的影响；

(4) 对不同的木质纤维素原料中的生物素含量以及生物炼制过程中玉米秸秆原料中生物素含量的变化情况进行了测定。发现木质纤维素原料通常都含有高含量的生物素，并且生物素在生物炼制过程中保持稳定，进而导致水解液中生物素含量过高无法积累谷氨酸。此外对生物炼制过程中其他 B 族维生素含量的测定发现，预处理过后的原料依然保留有相对丰富的 B 族维生素，对于生物炼制生产生物能源以及生物基化学品有利。

第3章 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌利用玉米秸秆原料生产谷氨酸

3.1 引言

谷氨酸是应用最为广泛的氨基酸之一，年产量在 300 万吨以上^[195]。目前主要采用粮食性原料进行生产，成本相对较高，在一定程度上加剧了粮食危机的产生，并且很大程度限制了谷氨酸作为可生物降解聚合物单体的工业化应用^[137]。在所有潜在的原料当中，木质纤维素原料具有来源广泛，价格低廉、可再生等特点，是谷氨酸生产最具潜力的替代性原料^[34]。目前，木质纤维素已经被广泛用来生物炼制生产多种燃料、生物基化学品以及生物材料等^[263]。但是，第二章的研究显示木质纤维素原料当中通常含有大量的生物素，并且在生物炼制过程中得到有效的保留，最终导致制备的水解液中的生物素含量过高而无法积累谷氨酸。青霉素诱导能够使 *C. glutamicum* 在较低固含量的水解液中积累谷氨酸，同时也有研究中采用乙胺丁醇诱导进行纤维素谷氨酸生产^[102]。但是，青霉素和乙胺丁醇都对细胞生长具有非常强烈的抑制作用。除此之外，水解液中大量存在的生物素和残留的抑制物也对发酵过程存在较大的影响。因此，发酵过程中细胞的生长会受到生物素、抑制物以及诱导等多重因素的影响而不稳定。这种不稳定现象会直接导致谷氨酸产量下降，同时限制后续优化发酵工艺进一步提高谷氨酸的产量。为此有必要通过基因工程改造实现在高生物素条件下能够不经过诱导实现谷氨酸的高效生产。

C. glutamicum 发酵生产谷氨酸的分子机制经历了从最初的泄露模型到代谢流改变模型，目前已经十分明确^[132, 138]。*C. glutamicum* 作为生物素缺陷型菌株^[234]，生物素在发酵过程中具有非常重要的作用。生物素作为辅酶参与丙酮酸羧化酶介导的回补途径^[129]以及 acetyl-CoA 羧化酶催化生成脂肪酸的过程^[234]。特别是 acetyl-CoA 羧化酶，过量的生物素能够提供足够的辅酶用于脂肪酸的合成，进而形成致密的细胞被膜结构导致谷氨酸不能够分泌^[232, 235]。所以工业上往往采用生物素限量条件进行谷氨酸的发酵^[119]，生物素限量一方面影响脂肪酸的合成，从而影响细胞膜的合成，使细胞膜状态发生改变^[155]，从而打开谷氨酸分泌通道使谷氨酸能够分泌到胞外^[132]；另一方面还能够降低谷氨酸合成途径中关键酶 ODHC 的活性，使代谢流更多的流向谷氨酸的合成^[132, 141]。除了在生物素限量条件下生产谷氨酸以外，在生物素过量条件下也可以通过诱导生产谷氨酸。这些诱导条件包括添加表面活性剂如 Tween40^[145, 232]、青霉素^[85, 138, 151]以及乙胺丁醇^[239]等，亦或采用温度敏感型菌株通过温度诱导进行谷氨酸发酵^[240, 241, 264, 265]。这些条件和生物素限量诱导谷氨酸发酵的发酵机制相似，都能够改变细胞膜的状态使谷氨酸分泌通道打开促进谷氨酸分泌，也能够降低 ODHC 的活性使谷氨酸合成代谢流增加^[132]。

目前，已经有很多针对高生物素下积累谷氨酸的研究。编码 acetyl-CoA 羧化酶的 *dtsR1* 基因的敲除能够实现在高生物素下生产谷氨酸，但是菌株需要额外补充脂肪酸用于生长^[154, 155]。参与细胞肽聚糖合成的编码酰胺转移酶 *ItsA* 基因的敲除同样能够使 *C.*

glutamicum 积累谷氨酸,但是该基因敲除的菌株对外界环境更加敏感^[156]。此外,对 ODHC 的 *elo* 亚基的编码基因 *odhA* 进行敲除,也能够得到可以在高生物素下积累谷氨酸的突变体^[142],但是 *odhA* 的敲除会导致 TCA 循环受阻从而使菌体的生长受到非常显著的抑制^[142]。Nampoothiri 等发现通过调节和细胞脂质合成相关的基因,可以实现不依赖诱导的谷氨酸分泌,但是谷氨酸的产量非常低^[152]。由于这些方法本身对菌体生长影响很大或者效果不理想,它们并不适合含有抑制物的木质纤维素体系。进一步的研究确定了谷氨酸分泌转运体为 *Ncgl1221* 基因编码的机械敏感型通道 MscCG^[132],并且通过 MscCG 的突变或者对其羧基端的截取能够在生物素过量的情况下持续分泌谷氨酸^[161, 266]。但是,该通道的改造对于木质纤维素体系的适应性还不明确。基于这些研究成果,本研究尝试了多种代谢工程手段来实现纤维素谷氨酸的发酵,最终确定从谷氨酸转运通道和谷氨酸合成途径入手,成功构建能够在高生物素含量的高固含量玉米秸秆水解液中高产谷氨酸的菌株,为利用木质纤维素原料替代粮食性原料生产谷氨酸奠定理论基础。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌种、培养基以及培养方法

本章节所使用到的菌株以及构建的重组菌株在表 3.1 中列出。其中大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 用于构建本研究中使用的质粒。培养采用 LB 培养基(1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl)在 37 °C, 200 rpm 下培养。携带相应表达质粒或者敲除质粒的大肠杆菌在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中进行培养,用以维持质粒。谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 购买自上海工业微生物研究所(SIIM, <http://www.gsy-siim.com/>), 保藏编号为 SIIM B460。该菌为本研究中重组菌株构建的出发菌株。该出发菌和构建的重组菌在 CM2B 培养基(包含 1% 蛋白胨, 1% 酵母粉, 1% NaCl 以及 10 μ g/L 生物素, pH 7.0)培养,培养条件为 30 °C, 200 rpm, 携带质粒的重组菌株添加 50 μ g/mL 卡那霉素用以维持质粒。生物脱毒菌株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 为本实验自主筛选得到^[38], 该菌株培养并保存在 PDA 斜面培养基上,温度为 28 °C。PDA 培养基包含 200 g/L 土豆汁, 20 g/L 葡萄糖和 17 g/L 琼脂。

3.2.2 酶、试剂以及仪器设备

诺维信纤维素酶 Cellic CTec2 购买自诺维信(中国)生物技术有限公司。根据考马斯亮蓝法^[218]测得其蛋白含量为 87.3 mg/mL 纤维素酶。基于美国国家可再生能源实验室(NREL)方法 LAP-006^[219]测得其滤纸酶活为 203.2 FPU/mL 纤维素酶。利用 Ghose 提供的方法^[220]测得其纤维二糖酶活为 4,900 CBU/mL 纤维素酶。DNA 聚合酶和 T4 连接酶购买自宝日医生物技术(北京)有限公司。各类限制性内切酶购买自赛默飞世尔科技公司。基于 Gibson 组装的无缝克隆试剂盒 HB-infusionTM购买自汉恒生物科技(上海)有限公司。生物素、青霉素、玉米浆、酵母粉、蛋白胨和葡萄糖等来源参见第二章 2.2.2。其他常见的试剂均为分析纯,购买自国内化学试剂提供商。所使用的常见仪器设备见附录 I。

表 3.1 本研究中使用的菌株
Table 3.1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>A. resinae</i> ZN1 (CGMCC 7542)	Biodetoxification fungus isolated by our lab	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> S9114	Industrial strain for glutamate production	SIIM ^a
$\Delta bioY$	S9114 strain with <i>bioY</i> gene knockout	This study
$\Delta C110$	S9114 strain with MscCG C-terminal truncated	This study
$\Delta C110\Delta bioY$	$\Delta C110$ with <i>bioY</i> gene knockout	This study
$\Delta C110odhARBS20$	$\Delta C110$ with RBS20 substitution of <i>odhA</i> gene	This study
$\Delta C110odhARBS10$	$\Delta C110$ with RBS10 substitution of <i>odhA</i> gene	This study
$\Delta C110odhARBS0.1(XW6)$	$\Delta C110$ with RBS0.1 substitution of <i>odhA</i> gene	This study
XW6-pH36	XW6 carrying the empty expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>pyc</i>	XW6 carrying the <i>pyc</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>ppc</i>	XW6 carrying the <i>ppc</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>gltA</i>	XW6 carrying the <i>gltA</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>icd</i>	XW6 carrying the <i>icd</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>gdh1</i>	XW6 carrying the <i>gdh1</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- <i>gdh2</i>	XW6 carrying the <i>gdh2</i> expressing vector	This study
XW6-pH36- $\Delta C110$	XW6 carrying C-terminal truncated MscCG expressing vector	This study
XW6- $\Delta RS02700::H36-\Delta C110$	XW6 strain with C-terminal truncated MscCG encoding gene integrated into the genome at CGS9114_RS02700 locus	This study

^a 上海工业微生物研究所 (SIIM, <http://www.gsy-siim.com/>)

表 3.2 本研究中所使用的质粒
Table 3.2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
pTRCmob	Overexpression vector, kanamycin resistance	[159]
pK18mobsacB	Mobilizable vector, allows for selection of double crossover in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance, sacB	[159]
pH36mob	Overexpression vector derived from pTRCmob	This study
pK18- Δ C110	Plasmid for the truncation of C-terminal of MscCG	This study
pK18- Δ bioY	Plasmid for <i>bioY</i> gene knockout	This study
pK18- <i>odh</i> ARBS0.1	Plasmid for RBS with 0.1au substitution of <i>odhA</i>	This study
pK18- <i>odh</i> ARBS10	Plasmid for RBS with 10au substitution of <i>odhA</i>	This study
pK18- <i>odh</i> ARBS20	Plasmid for RBS with 20au substitution of <i>odhA</i>	This study
pK18- Δ RS02700:: <i>H36</i> Δ C110	Plasmid for integrating C-terminal truncated MscCG encoding gene in to the genome at CGS9114_RS02700 locus	This study
pH36- <i>pyc</i>	<i>pyc</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- <i>ppc</i>	<i>ppc</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- <i>gltA</i>	<i>gltA</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- <i>icd</i>	<i>icd</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- <i>gdh1</i>	<i>gdh1</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- <i>gdh2</i>	<i>gdh2</i> gene overexpressing vector	This study
pH36- Δ C110	C-terminal truncated MscCG overexpressing vector	This study

表 3.3 本研究中用到的引物

Table 3.3 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3') ^c	Restriction enzyme
ΔC110-up-F	CGGGATCCCGGGCGCTGCGATTC	BamHI
ΔC110-up-R	TCAGCGTCTATTCCACAGTCATGACCTTAAATAGTGAC	
ΔC110-down-F	TGACTGTGGAATAGGACGCTGATTACAGACGT	
ΔC110-down-R	GCTCTAGATGCATCTGCCACAATATCGC	XbaI
bioY-up-F	CTAGTCTAGAAGGATTCTCTCGATTACACCATT	XbaI
bioY-up-R	AAA <u>ACTGCAG</u> GAAAAAATCATACACCTGAACAGTG	PstI
bioY-down-F	AAA <u>ACTGCAG</u> ATCCAACCCACTTTTCCTCAGA	PstI
bioY-down-R	CCCA <u>AGCT</u> TTTTGACCACCGGATAGGGTG	HindIII
odhA-up-F	ACAGCTATGACATGATTACGTCAGACGATCCGATCCTAGAAAAC	
odhA-down-R	GCAGGTGACTCTAGAGCTTGGTCAGACGTGGGACAGAG	
odhA-RBS0.1-up-R	CCTAGTTATTGAACTCGTGGGTGAGCTTCTTGAGGGTTTATTGAGCTTTG	
odhA-RBS0.1-down-F	CTCACCCACGAGTTCAATAACTAGGGTGAGCAGCGCTAGTACTTTTCG	
odhA-RBS10-up-R	GCCGCGTGGTTAACTTGAGGGACCCTTCTTGAGGGTTTATTGAGCTTTG	
odhA-RBS10-down-F	CTCAAGTTAACACGCGGCGTGAGCAGCGCTAGTACTTTTCG	
odhA-RBS20-up-R	GCTCACTATGACTTTATCGGTATGATATTTAGCCTTCTTGAGGGTTTATTGAGCTTTG	
odhA-RBS20-down-F	GCTAAATATCATACCGATAAAGTCATAGTGAGCAGCGCTAGTACTTTTCG	
RS02700-up-F	GCTCTAGAGACTGCTATCGGTGTGGC	XbaI
RS02700-up-R	CCCAGCTTTTGGTAGCCCTTTCAGTTGTTGG	
H36-F	AAAGGGCTACCAAAGCTGGGTACCTCTAT	
H36-R	GCCTAAAATCATGGATCCCATGCTACTCCT	
ΔC110-overlap-F	AGCATGGGATCCATGATTTTAGGCGTACCCATT	
ΔC110-overlap-R	CAACATTTTTTCTCCCTATTCCACAGTCATGACCTTAAATAG	

RS02700-down-F	TGACTGTGGAATAGGGAGAAAAAATGTTGTCACTCAC	
RS02700-down-R	CCCAAGCTTAGCACTCCTTCAACGCCT	HindIII
ΔC110-F	GCTCTAGAATGATTTTAGGCGTACCCAT	XbaI
ΔC110-R	ACGCGTGCACCTATTCCACAGTCATGACCTTAA	SalI
pH36-Vector-F	GTCCACCTGACCCCATGCC	
pH36-Vector-R	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCC	
pyc-F	GAGAAGATTTTCAGCGTGTGCGACTCACACATCTTCAAC	
pyc-R	GGGGTCAGGTGGGACTTAGGAAATGACGACGATCAAGTCG	
ppc-F	GGTACCCGGGGATCCTCTAGAATGACTGATTTTCTACGCGATGAC	XbaI
ppc-R	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACCTAGCCGGAGTTGCGCAGT	SalI
gdh1-F	GCTCTAGAATGACAGTTGATGAGCAGGTCTCT	XbaI
gdh1-R	ACGCGTGCAGCTTAGATGACGCCCTGTGCC	SalI
gdh2-F	GCTCTAGAATGTTTCGAGCTAATCGACGACTG	XbaI
gdh2-R	AAAACCTGCAGTTATCGGCGAACCATACTCTG	PstI
gltA-F	CCGGAATTCACCTATTCCGCTGACAGCTAC	EcoRI
gltA-R	GCTCTAGAGGCTGAAATGAGTGGGAGGG	XbaI
icd-F	CCGGAATTCACACGTCAGCAATGCGTGG	EcoRI
icd-R	GCTCTAGAGCATGTGCCATTATGGCA	XbaI
pH36-F	CAACGCAATTAATGTGAGTTAGCGC	
pH36-R	TCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTC	

^c 下划线代表对应的限制性内切酶酶切位点。

3.2.3 质粒构建

质粒构建采用标准方法，所使用到的引物见表 3.3。对于用于敲除谷氨酸转运体 MscCG 羧基端 110 个氨基酸残基编码序列的质粒，首先用 $\Delta C110$ -up-F/R 和 $\Delta C110$ -down-F/R 两对引物分别从 *C. glutamicum* S9114 基因组中将跨过该 110 个氨基酸残基编码序列的上下游同源臂分别扩增下来，然后用 $\Delta C110$ -up-F/ $\Delta C110$ -down-R 通过融合 PCR 将两个片段连接在一起。随后获得的片段和敲除质粒 pK18mobsacB 分别用 BamHI/XbaI 酶酶切，然后采用 T4 连接酶将其连接起来，得到 pK18- $\Delta C110$ 。用引物 bioY-up-F/R 和 bioY-down-F/R 分别从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增跨过基因 *bioY* 的上下游同源臂，然后上游片段用 XbaI/PstI 酶切然后连接到 pK18monsacB 质粒对应酶切位点上，连接成功后再将下游片段通过 PstI/HindIII 进行酶切并连接到该质粒上，得到 *bioY* 基因敲除质粒 pK18- $\Delta bioY$ 。对于 *odhA* 基因，原始 RBS 序列的翻译起始速率利用 RBS Calculator (<https://www.denovodna.com/software/doLogin>) 软件进行计算。然后依据得到的原始基因的翻译起始速率设置不同的翻译起始速率，通过该软件计算得到对应的 RBS 序列，依据得到的序列进行引物设计。原始 RBS 序列和设计的 RBS 序列以及对应的翻译起始速率如表 3.4 所示。用引物 *odhA*-up-F/*odhA*-RBS0.1-up-R 和 *odhA*-RBS0.1-down-F/*odhA*-down-R 分别扩增 *odhA* 基因上游携带 RBS 序列片段和相应的 *odhA* 基因上下游片段，然后和经 EcoRI/BamHI 线性化的 pK18mobsacB 片段一起进行无缝克隆连接，从而得到用于将 *odhA* 基因原始 RBS 替换为翻译起始速率为 0.1 au 的 RBS 序列的质粒 pK18-*odhARBS0.1*。用同样的方法，构建得到将 *odhA* 原始 RBS 替换为起始速率为 10 和 20 au 的 RBS 序列的质粒，pK18-*odhARBS10* 和 pK18-*odhARBS20*。pK18-*odhARBS10* 质粒构建所用到的引物对分别为 *odhA*-up-F/*odhA*-RBS10-up-R 和 *odhA*-RBS10-down-F/*odhA*-down-R，pK18-*odhARBS20* 质粒构建所使用到的引物对为 *odhA*-up-F/*odhA*-RBS20-up-R 和 *odhA*-RBS20-down-F/*odhA*-down-R。对于用于整合谷氨酸转运体到基因组的质粒 pK18- $\Delta RS02700::H36\Delta C110$ 的构建，首先利用 H36-F/R 和 $\Delta C110$ -overlap-F/R 应用分别从 pH36mob 和 *C. glutamicum* S9114 基因组中扩增下启动子 H36 片段和修饰的谷氨酸转运体编码基因片段，并将它们通过融合 PCR 连接在一起。然后利用 RS02700-up-F/R 和 RS02700-down-F/R 引物分别将 *CGS9114_RS02700* 基因的上下游片段从 *C. glutamicum* S9114 基因组中扩增下来。得到和这两个片段和融合好的 H36- $\Delta C110$ 片段再通过融合 PCR 连接在一起。之后得到的大片段以无缝克隆的方式连接到采用 XbaI/HindIII 线性化的 pK18mobsacB 质粒上，得到 pK18- $\Delta RS02700::H36\Delta C110$ 质粒。

对于表达质粒，首先以 pTRCmob 表达质粒为骨架，将其 Trc 启动子替换为 H36 强启动子^[267]，得到本研究中所使用的 pH36mob 表达质粒。H36 启动子的合成以及 pH36mob 的构建由上海捷瑞生物工程有限公司完成。用引物 $\Delta C110$ -F/R 从 *C. glutamicum* S9114 基因组上将 MscCG $\Delta C110$ 编码序列片段扩增下来，将其连接至 pH36mob 质粒 XbaI/SalI 位点，得到用于过表达 C-末端 110 个氨基酸截取后的谷氨酸转运通道的表达质粒 pH36-

Δ C110; 通过引物 pH36-Vector-F/R 将 pH36mob 质粒线性化, 用 pyc-F/R 引物将丙酮酸羧化酶编码基因 *pyc* 从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增下来, 然后采用无缝克隆试剂盒将两个片段连接起来得到过表达 *pyc* 基因的质粒 pH36-pyc; 用引物 ppc-F/R 将磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *ppc* 从 *C. glutamicum* S9114 基因组中扩增下来, 然后连接到 pH36mob 质粒的 XbaI/SalI 位点, 得到表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因的质粒 pH36-ppc; 将编码 NADPH 依赖型 GDH 的 *gdh1* 基因通过 *gdh1*-F/R 引物从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增下来插入到 pH36mob 质粒 XbaI/SalI 位点之间, 得到 *gdh1* 基因表达质粒 pH36-gdh1; 通过引物 *gdh2*-F/R 将 *gdh2* 基因从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增下来, 将其插入到质粒 XbaI/PstI 位点之间得到 *gdh2* 基因表达质粒 pH36-gdh2; 分别用引物 *gltA*-F/R 和 *icd*-F/R 从 *C. glutamicum* S9114 基因组上分别将柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 和异柠檬酸脱氢酶编码基因 *icd* 相应片段从 *C. glutamicum* S9114 基因组中扩增下来, 并将其插入到 pH36mob 质粒的 EcoRI/XbaI 位点上, 分别得到 *gltA* 和 *icd* 基因表达质粒 pH36-gltA 和 pH36-icd。所有构建成功的质粒通过测序无误后方可使用。

表 3.4 *odhA* 基因的 RBS 序列以及对应预测的翻译起始速率

Table 3.4 RBS sequence and predicted translation initiation rate of *odhA*

Name	Sequence (5'-3') ^b	Predicted translation initiation rate (au)
Original	CAAGGAAAAGAGGCGAGTACCTGCC	50.38
RBS20	GCTAAATATCATACCGATAAAGTCATA	20.72
RBS10	GGTCCCTCAAGTTAACCACGCGGC	10.33
RBS0.1	CTCACCCACGAGTTCAATAACTAGG	0.11

^b *odhA* 基因的原始 RBS 序列的翻译起始速率计算和不同翻译起始速率序列的设计采用 RBS Calculator (<https://www.denovodna.com/software/doLogin>) 进行。

3.2.4 重组菌株构建

本研究构建的重组菌株如表 3.1 所示。质粒采用电转化方法转入 *C. glutamicum* 细胞中。首先挑取在 CM2B 平板中活化的 *C. glutamicum* 单菌落接入 5 mL 的 CM2B 培养基中过夜培养, 然后按照 10%(v/v) 接种量转接至感受态培养基 (LB 培养基添加 3% 甘氨酸和 0.11% 吐温 80) 中培养到 OD₆₀₀ 在 0.8 左右。然后将其在冰水浴条件下放置 15 min。然后在 4 °C 下 5000 rpm 离心 10 min 去上清后, 采用预冷的 10% (v/v) 甘油清洗三次。随后得到的细胞用一定体积 (约 100-200 μ L) 的 10% 甘油重悬, 得到感受态细胞。然后取 60 μ L 细胞和 20 μ L 的质粒混匀, 用间隔宽度为 1 mm 的电击杯进行电转。电转化采用美国伯乐 Bio-rad 电穿孔仪 Gene Pulser Xcell 进行, 电转化条件为: 25 μ F, 200 Ω 和 2.0 kV。电转完成后将细胞转入 1 mL EP 管中, 加入 800 μ L SOC 培养基 (包含 2% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ 和 20 mM 葡萄糖), 然后在 46 °C 下热激 6 min, 然后放入 30 °C 摇床中孵育 2 h。2 h 后取适量孵育好的细胞涂布于添加卡那霉素的 CM2B 平板中。

对于基因的敲除,采用基于 *sacB* 的同源双交换的方法进行^[88],通过卡那霉素筛选一次重组,然后利用蔗糖抗性筛选二次重组的菌株。首先将对应的敲除质粒电转到 *C. glutamicum* 细胞中后,挑取具有卡那霉素抗性的单菌落通过菌落 PCR 进行一次重组验证。然后挑取一次重组验证成功的菌落在 CM2B 液体培养基中过夜培养,使菌株在培养过程中发生二次重组并丢失质粒。然后将适度稀释的菌液涂布在添加 10%蔗糖的 CM2B 平板上,选取能够在蔗糖平板上生长但是不具备卡那霉素抗性的单菌落进行菌落 PCR 验证,验证成功的克隆进一步通过测序验证,测序验证成功的克隆即为对应基因敲除成功的菌株。对于基因的表达,对应的表达质粒电转到 *C. glutamicum* 细胞中之后,挑取具有卡那霉素抗性的重组菌株进行菌落 PCR 验证。菌落 PCR 采用 pH36-F 和对应表达基因的下游引物进行,验证成功的克隆即为对应基因过表达的重组菌株。

3.2.5 木质纤维素原料及其生物炼制处理

木质纤维素原料为 2016 年秋收集于内蒙古通辽的玉米秸秆。获得的原料不经过水洗直接进行风干,然后粉碎。基于美国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)两步酸水解方法^[216,217]测得该玉米秸秆中含有 33%的纤维素、26.9%的半纤维素、20.8%的木质素和 6.3%的灰分。然后该原料采用干酸预处理技术进行预处理^[22,23],条件为 3.8% H_2SO_4 (基于物料干重), 175 °C, 5 min。预处理过后的玉米秸秆原料每 g 干物料含有 40.1 mg 葡萄糖、132.7 mg 木糖、5.1 mg 糠醛、9.7 mg 5-羟甲基糠醛(HMF)和 19.2 mg 乙酸。预处理过后的原料采用生物脱毒方法^[38,39]进行脱毒,其中大部分的抑制物得到脱除。脱毒完成后的玉米秸秆原料用于制备玉米秸秆水解液。按照 30% (w/w)的固含量添加脱毒玉米秸秆物料,然后按照 10 mg 纤维素酶蛋白/g 干玉米秸秆的用量加入纤维素酶,在 50 °C, 150 rpm 下水解 48 h。得到的糖化醪在 16,125×g 下离心 10 min 去除固体残渣。得到的水解液 115 °C, 20 min 灭菌,然后再用灭菌滤纸进一步将固体残渣过滤掉,得到本研究中使用的玉米秸秆水解液。通过检测,水解液中含有 131.6 ± 0.2 g/L 葡萄糖, 18.8 ± 0.1 g/L 木糖, 2.3 ± 0.0 g/L 乙酸, 0.04 ± 0.01 g/L 糠醛和 0.02 ± 0.01 g/L 5-羟甲基糠醛(HMF)。

3.2.6 谷氨酸发酵

本章节中谷氨酸发酵在 3L 发酵罐中进行。发酵种子液培养在 250 mL 三角烧瓶中进行。*C. glutamicum* S9114 或者重组菌首先在 CM2B 平板上划线,在 30 °C 下培养 36-48 h。挑取生长好的单菌落接入 30 mL 预培养培养基中 30 °C、200 rpm 培养 16 h,然后按照 5%接种量转接至 30 mL 种子培养基中,培养 8 h 后得到发酵用种子液。所使用的预培养种子培养基和种子培养基成分详见 2.2.3。

分批发酵在 3L 发酵罐 (BIOTECH-4BG-3L, 上海保兴生物工程设备有限公司) 中进行,培养基为 800 mL 添加 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 的玉米秸秆水解液。发酵温度为 32 °C, 转速为 600 rpm, 接种量为 10% (v/v), 通气量为 1.4 vvm。发酵过程中通过自动补加 2 M H_2SO_4 和 25% (w/v) 氨水溶液将 pH 维持在 7.2 左右。对于青霉素诱导的谷氨酸发酵,

当菌株生长到对数中前期时，添加 2 mL 配置好的 50 mg/mL 青霉素溶液进行诱导。分批补料发酵条件和分批发酵相同，但是在发酵 30、36 和 40 h 时分别添加 125 mL、150 mL 和 175 mL 的玉米秸秆水解液进行发酵。

携带有表达质粒的重组菌株在其培养的全过程均添加 50 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素以维持质粒的复制。发酵过程中定点定时取样，测定其生长，葡萄糖消耗以及谷氨酸生产等情况。每组实验至少进行两次重复。

3.2.7 分析方法

葡萄糖、谷氨酸和乳酸，乙酸、木糖、糠醛和羟甲基糠醛以及三种酚类组分香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛测定方法详见 2.2.9。细胞生长通过测定 600 nm 下的光密度值表征。生物素的测定方法参考国标 GB 541319-2010，采用生物素营养缺陷型菌株植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 进行，生物素的提取等方法参考 2.3.5。本章节生物素测定方法和生物素测定试剂盒测定方法测定原理相同，测定结果具有一致性。

3.2.8 谷氨酸糖酸转化率计算

谷氨酸糖酸转化率计算公式详见 2.2.10。

3.3 结果与讨论

3.3.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在高生物素水解液下的谷氨酸发酵

第二章的研究结果表明在玉米秸秆水解液中存在大量的生物素，并且证实在水解液中正是由于大量存在的生物素导致的谷氨酸不能够积累，只有利用青霉素诱导才能够实现谷氨酸的生产，并且最终在 25%(w/w)玉米秸秆水解液中生产了 41.7g/L 谷氨酸。由于本部分使用的水解液是通过未水洗玉米秸秆原料制备得到，为此我们首先确定了谷氨酸棒状杆菌在这种水解液中的谷氨酸发酵情况。从结果可以看出（图 3.1a），菌株在 30% 水解液中的谷氨酸发酵情况和第二章的结果类似，菌体生长良好，最大的 OD_{600} 值高达 38，但是没有谷氨酸的生成。通过测定，这种未水洗玉米秸秆制备的水解液生物素高达 125 $\mu\text{g/L}$ 。

随后我们进一步尝试了在该水解液中采用青霉素诱导进行谷氨酸发酵，如图 3.1b 所示，和采用青霉素诱导的谷氨酸发酵相比，采用青霉素诱导的发酵，菌体也能够快速生长，在 8 h 进行诱导后，生长速率减慢，菌株最大 OD_{600} 值达到 16。但是，随着发酵的进行， OD_{600} 值逐渐下降。糖耗速率略慢于不经过诱导下的发酵，但是也能够在 48h 消耗完全。谷氨酸在经过诱导后快速生成，最终经过 48 小时产生了 47.7 g/L 的谷氨酸，糖酸转化率为 47%。从发酵情况来看，青霉素诱导能够使谷氨酸分泌，但是发酵过程比较缓慢，最终的得率并不高。同时也能够观察到发酵过程中 OD_{600} 值达到最高值后会逐渐下降，说明在这种高固含量玉米秸秆水解液体系中，青霉素的诱导会导致细胞逐渐死亡，发酵过程中菌体的生长并不稳定，谷氨酸产量和得率并不高，这可能和水解液中同时还存在一定量的抑制物有关。考虑到其他诱导条件，如吐温 40 以及乙胺丁醇添加或者温度诱导，它们多少对菌体的生长有所影响，在这种特殊的含有抑制物的木质纤维素

发酵体系下，菌体生长不稳定、诱导时机不好把握这些问题都会存在。所以这些诱导方法最终获得的纤维素谷氨酸的产量和得率也会受到很大的影响，最终得不到更高的纤维素谷氨酸指标。所以考虑代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌，实现不经过诱导进行谷氨酸的发酵生产才是比较好的解决办法。

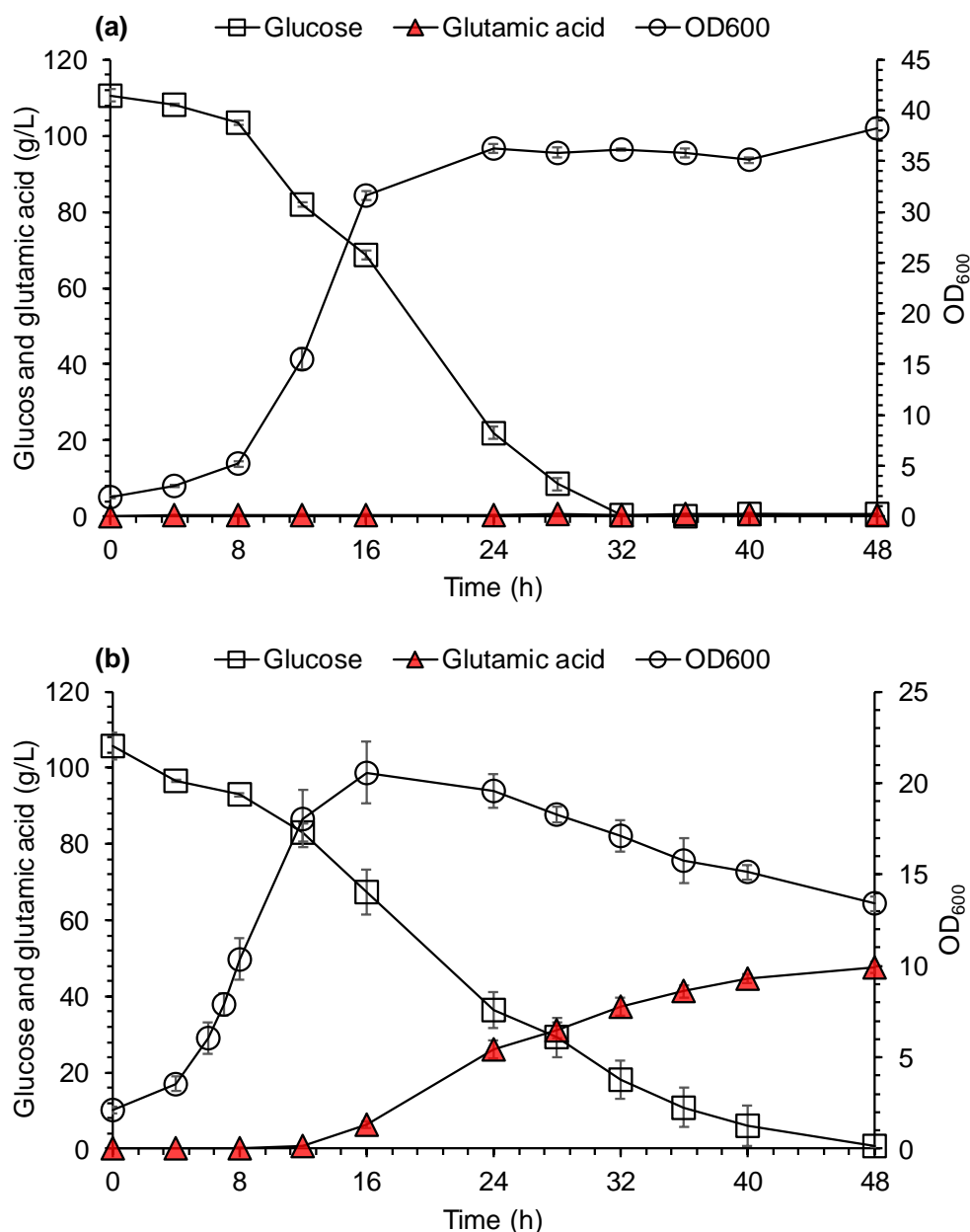


图 3.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在 30%(w/w)玉米秸秆水解液当中的正常谷氨酸发酵及青霉素诱导下的谷氨酸发酵情况

Fig. 3.1 Normal and penicillin-triggered glutamic acid fermentation by *C. glutamicum* S9114 in 30% (w/w) corn stover hydrolysate

注：(a) 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在 30%(w/w)玉米秸秆中的正常谷氨酸发酵情况；(b) 谷氨酸棒状杆菌 S9114 在 30%(w/w)玉米秸秆中青霉素诱导的谷氨酸发酵情况。水解液为利用未水洗玉米秸秆原料制备的 30%(w/w)脱毒玉米秸秆水解液，详细的发酵条件见材料与方法部分，平行实验结果标准差采用误差线表示。

3.3.2 谷氨酸转运体 MscCG 改造促进谷氨酸分泌

为了实现在高生物素玉米秸秆水解液中不诱导发酵谷氨酸，首先要解决在高生物素水解液中不能够分泌谷氨酸的问题。为此，我们一方面考虑将编码生物素转运通道 BioYMN^[245]基因中的 *bioY* 基因敲除，限制吸收到胞内的生物素，使胞内达到一个能够分泌谷氨酸的生物素含量水平从而实现谷氨酸分泌；另一方面，有报道指出对谷氨酸转运通道 MscCG 羧基端 110 个氨基酸进行截取，能够实现谷氨酸的持续分泌，并且该方法适用于两株不同的 *C. glutamicum*^[161, 164]。所以我们尝试采用这种方法，对谷氨酸分泌通道 MscCG C-末端 110 个氨基端残基进行截取，并测试其在木质纤维素体系下的适用性。为此我们构建了 *bioY* 基因敲除的菌株 $\Delta bioY$ 和 MscCG 的 C-端 110 个氨基端残基编码序列敲除的菌株 $\Delta C110$ 。为了考察两种改造结合起来是否具有协同效应，我们在 $\Delta C110$ 菌株基础上敲除 *bioY* 基因，获得共敲除菌株 $\Delta C110\Delta bioY$ 。得到的三株重组菌以 *C. glutamicum* S9114 出发菌株为对照，在 30%玉米秸秆水解液中进行谷氨酸发酵，结果如图 3.2 所示。

和出发菌株 *C. glutamicum* S9114 相比，*bioY* 基因的敲除对菌体的生长具有比较大的影响（图 3.2）。 $\Delta bioY$ 菌株在种子培养阶段需要额外补充生物素才能够正常生长，同样在水解液中的生长也有更长的延滞期（12 h），虽然菌体量最终能够达到和出发菌株相当的水平，但是细胞生长速率只有出发菌株的 50%左右。与之相对应的葡萄糖消耗速率也有非常明显的减弱，在整个发酵过程中并没有谷氨酸生成。但是，当在较低生物素含量的 15%(w/w)水解液中(约 60 $\mu\text{g/L}$)进行培养时，能够观察到一定程度的谷氨酸积累，最终产生了 6.3 g/L 的谷氨酸（图 3.3）。从实验结果来看，*bioY* 基因的敲除并不能够消除生物素对谷氨酸发酵的影响并实现谷氨酸积累。由于 *C. glutamicum* 中除了 BioYMN 转运体吸收生物素以外还存在其他的生物素转运通道^[268]，一旦培养基中生物素浓度过高，胞外的生物素还是能够进入胞内，不能创造出适合谷氨酸积累的生物素环境。

而对于谷氨酸转运通道 MscCG 改造的 $\Delta C110$ 菌株，它在生长和糖耗方面和出发菌株相比没有比较明显的差异，仅仅是细胞生长量的最大值降低约 16%。但是，相比于出发菌株， $\Delta C110$ 菌株能够实现谷氨酸持续积累，经过 48 h 的发酵，谷氨酸的浓度最终能够达到 9.2 g/L（图 3.2）。所以从实验结果来看，对谷氨酸分泌转运体 MscCG 的 C-端 110 个氨基端残基的截取实现能够使 *C. glutamicum* S9114 在玉米秸秆水解液中分泌谷氨酸。而在 $\Delta C110$ 菌株基础上进一步敲除 *bioY* 基因的 $\Delta C110\Delta bioY$ 菌株，其生长和糖耗受到比较明显的影响，和单独的 *bioY* 基因敲除的 $\Delta bioY$ 菌株十分类似。在发酵过程中虽然能够积累谷氨酸，但是最终的谷氨酸浓度仅仅和 $\Delta C110$ 菌株相当，并没有表现出任何的协同效应。由于 $\Delta C110\Delta bioY$ 菌株在生长和葡萄糖消耗方面和 $\Delta C110$ 菌株相比比较缓慢，且谷氨酸积累没有进一步的提高，对于谷氨酸发酵促进作用不大，所以后续选择谷氨酸转运通道修饰的 $\Delta C110$ 菌株进行后续的实验。

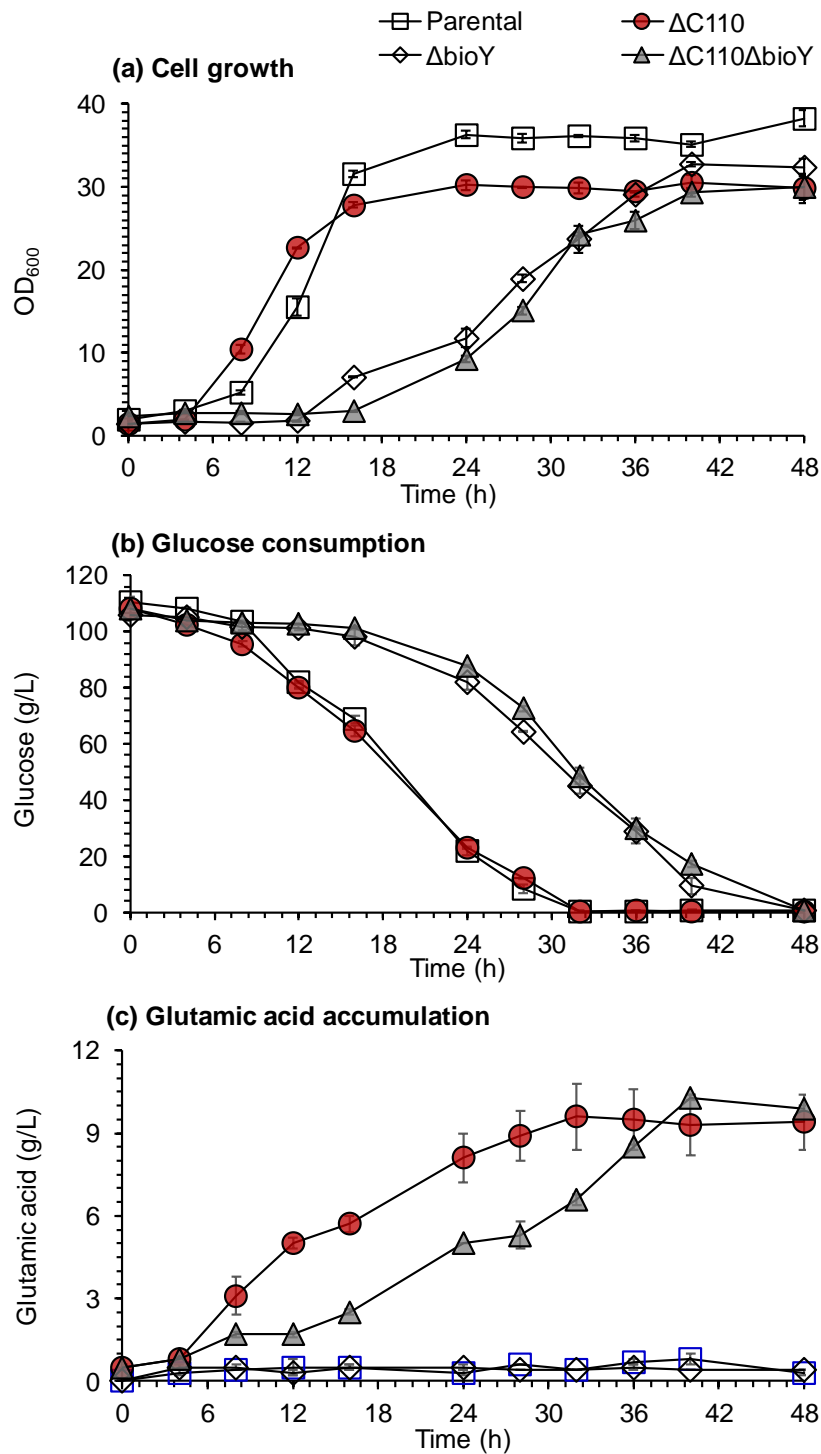


图 3.2 通过谷氨酸棒状杆菌 S9114 MscCG 羧基端截取和 bioY 基因敲除诱导谷氨酸分泌
 Fig. 3.2 Triggering of glutamic acid accumulation by C-terminal truncation of MscCG and bioY knockout of *C. glutamicum* S9114

注：(a) 细胞生长；(b) 葡萄糖消耗；(c) 谷氨酸积累。Parental 代表原始菌株 *C. glutamicum* S9114， $\Delta C110$ 代表谷氨酸分泌转运体 MscCG C-末端截取的菌株， $\Delta bioY$ 代表 bioY 基因敲除的菌株， $\Delta C110\Delta bioY$ 代表 MscCG C-末端截取基础上敲除 bioY 基因的菌株。谷氨酸的发酵在 3L 发酵罐中进行，过程中不添加任何诱导剂诱导，具体发酵条件见材料与方法部分。平行实验结果标准差通过误差线表示。

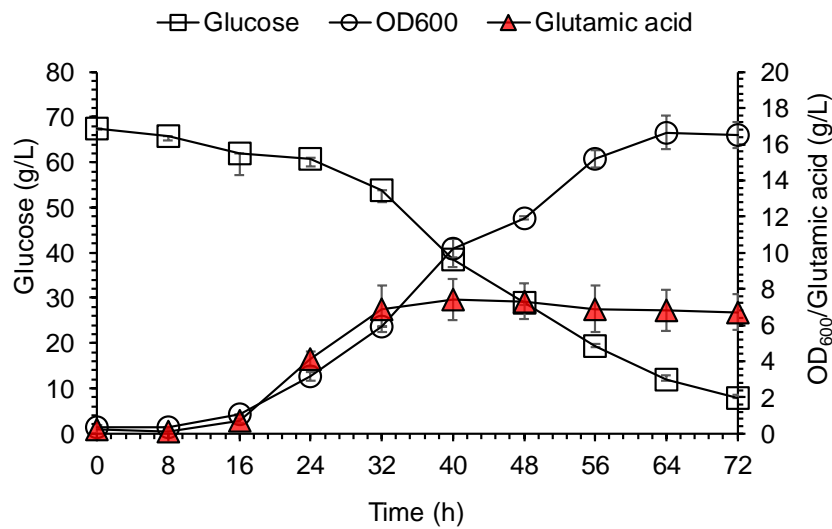


图 3.3 *bioY* 基因敲除菌株在 15%(w/w)玉米秸秆水解液中的发酵情况

Figure 3.3 Glutamic acid fermentation of the $\Delta bioY$ strain in 15%(w/w) corn stover hydrolysate
注：谷氨酸的发酵在 3L 发酵罐中进行，过程中不添加任何诱导剂诱导，具体发酵条件见材料与方
法部分。平行实验结果标准差通过误差线表示。

3.3.3 通过 *odhA* 基因 RBS 弱化提高谷氨酸生产

在谷氨酸发酵生产中， α -酮戊二酸节点处 α -酮戊二酸脱氢酶系(ODHC)的活性对于谷氨酸高产具有非常关键的作用。该酶竞争性催化 α -酮戊二酸生产琥珀酸，从而使谷氨酸脱氢酶催化 α -酮戊二酸生产谷氨酸的代谢流量变少^[141]。所以降低 ODHC 活性十分有必要。大量的研究结果也证实在生物素限量、青霉素或者表面活性剂诱导等谷氨酸高产条件下均能够监测到 ODHC 活性的降低^[141, 145, 155, 269]。更有研究报道指出，敲除 ODHC 的 *e1o* 亚基编码基因 *odhA* 就能够实现在高生物素的条件下不经过诱导进行谷氨酸生产^[142]。但是，该基因的敲除会阻断 TCA 循环严重抑制菌体的生长，而我们没有成功将该基因敲除，说明该基因对谷氨酸棒状杆菌 S9114 是必须的，所以并不是非常可行的方案。为此，要实现不经过诱导高产谷氨酸，降低而非失活 ODHC 是常用的策略。

目前，已经有很多的方法可以应用到降低 ODHC 的活性，包括替换 *odhA* 基因的 RBS 序列^[270]或者起始密码子^[271]、表达 *odhA* 基因的反义 RNA^[269]以及调节 ODHC 抑制性蛋白 *Odhl*^[144, 145, 272, 273]。综合考虑，最后我们选择采用替换 *odhA* 基因的 RBS 序列的方式来削减 ODHC 的活性，因为很多报道已经证实，通过替换具有不同强度（翻译起始速率）的 RBS 序列能够使该酶的活性削减到对应的程度^[270, 274]。从而可以相对比较方便的调节该酶的活性，使该酶在保留活性维持 TCA 循环的情况下尽可能使更多的代谢流流向谷氨酸合成。RBS 序列的设计采用 RBS Calculator 软件进行，通过该软件计算，出发菌株原始 RBS 的翻译起始速率为 50 au（表 3.5）。在此基础上，我们通过该软件设计了将 RBS 强度降低至 40%（20 au）、20%（10 au）以及最低（0.1 au）的三组 RBS 序列（表 3.4），并得到实现对应 RBS 序列替换的质粒。将对应的质粒电转化到 $\Delta C110$ 菌株中，然后通过两轮的同源重组筛选，最终得到将原始 *odhA* 基因 RBS 序列替换为对应

RBS 序列替换的菌株 $\Delta C110odhARBS20$ 、 $\Delta C110odhARBS10$ 和 $\Delta C110odhARBS0.1$ 。

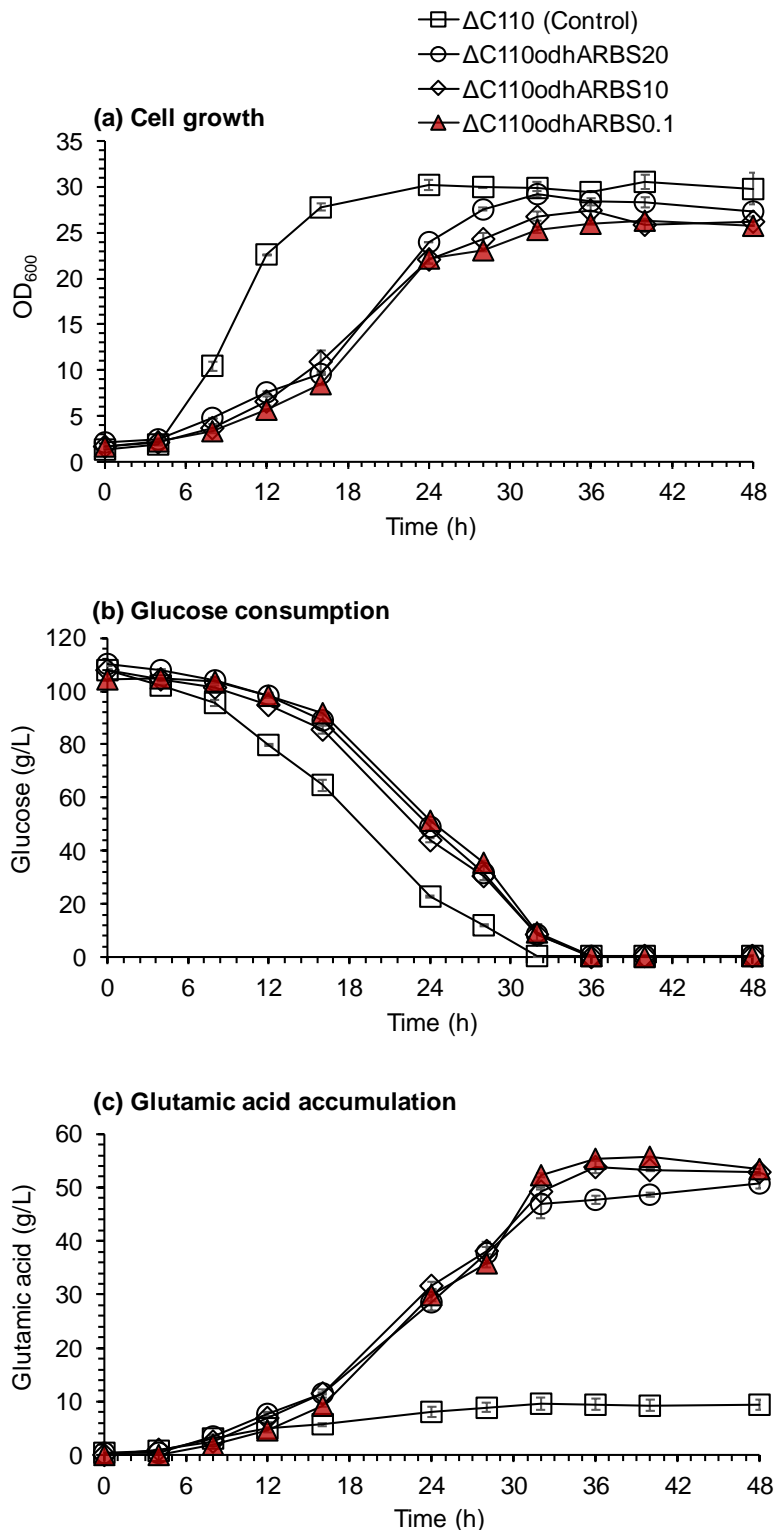


图 3.4 *odhA* 基因 RBS 序列替换对谷氨酸发酵的影响

Fig. 3.4 Effect of RBS substitution of *odhA* on glutamic acid accumulation

注：(a) 细胞生长；(b) 葡萄糖消耗；(c) 谷氨酸积累。谷氨酸的发酵在 3L 发酵罐中进行，过程中不添加任何诱导剂诱导，具体发酵条件见材料与方法部分。平行实验结果标准差通过误差线表示。

这三株菌株的发酵结果显示（图 3.4），经过 RBS 序列替换的菌株均能够在水解液中正常生长，只是和对照菌株 $\Delta C110$ 相比，其生长速率有所下降，大约降低了约 30%（图 3.4a）。相对应的葡萄糖消耗速率也会有所减弱，但是葡萄糖均能够在 36 h 消耗完全（图 3.4b），而谷氨酸的产量相比于对照菌株 $\Delta C110$ 都有非常明显的提高。经过 48 h 的发酵，最终均产生了超过 50 g/L 的谷氨酸（图 3.4c）。其中以 $\Delta C110odhARBS0.1$ 菌株的谷氨酸浓度最高，在 36 h 内达到了 55.7 g/L，基于葡萄糖的糖酸转化率达到 53.5%。谷氨酸的浓度相比对照菌株 $\Delta C110$ 提高了将近 5 倍。所以从实验结果来看，将 *odhA* 基因原始 RBS 序列替换为强度为 0.1 au 的 RBS 序列，具有更好的谷氨酸生产效果。谷氨酸产量大幅提高的结果反过来也说明 *odhA* 基因的 RBS 序列替换确实能够调节 ODHC 的活性。

此外， $\Delta C110odhARBS0.1$ 菌株的发酵结果和出发菌株 *C. glutamicum* S9114 采用青霉素诱导的发酵相比也具有更好的发酵性能。该菌株在发酵过程中生长良好，发酵过程比较稳定，在发酵后期也没有出现和青霉素诱导时菌体量逐渐下降的现象，谷氨酸浓度提高 16.8%，谷氨酸生产速率提高 55.6 %。所以通过谷氨酸分泌转运体改造和 *odhA* 基因 RBS 序列替换的 $\Delta C110odhARBS0.1$ 菌株已经成功实现不经过诱导高效生产谷氨酸。该菌株命名为 XW6 并应用于后续的进一步研究。

3.3.4 强化谷氨酸合成以及分泌途径提高谷氨酸生产的尝试

在得到 XW6 菌株后，为了能够进一步提高谷氨酸的产量，我们尝试了强化谷氨酸合成和分泌途径。由于在生物素过量情况下糖酵解途径的速率会有所提升，容易导致丙酮酸出现积累，为此我们选取了从磷酸烯醇式丙酮酸合成谷氨酸途径中的关键酶编码基因以及修饰过的谷氨酸转运通道编码基因进行了过表达尝试，希望能够进一步提高菌株的谷氨酸产量。选取的和谷氨酸合成相关的基因包括：回补途径中的两个关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *ppc* 和丙酮酸羧化酶编码基因 *pyc* [275]，它们对提供足够的草酰乙酸用于谷氨酸合成具有重要作用；柠檬酸合酶编码基因 *glTA*，柠檬酸合酶是催化 acetyl-CoA 进入 TCA 循环的关键限速酶 [233]，该基因的表达可以促进更多的代谢流进入 TCA 循环，并用于谷氨酸合成；异柠檬酸脱氢酶编码基因 *icd* [276]，该酶催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸，该反应会和异柠檬酸裂解酶竞争异柠檬酸，所以该基因的表达可以进一步促进代谢流向 α -酮戊二酸；催化 α -酮戊二酸生成谷氨酸的两个谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh1* 和 *gdh2*，它们的表达可以促进 α -酮戊二酸更多的生成谷氨酸而非流向 TCA 循环。除此之外，我们也选择了对修饰后的谷氨酸分泌通道进行过表达，以促进谷氨酸的分泌。对应的基因过表达质粒以及空载质粒通过电转化方法分别转入 XW6 菌株中，然后利用 pH36-F 和对应基因或者空载质粒的反向引物进行菌落 PCR 验证这些质粒在对应菌株中的表达。验证成功的重组菌株用于谷氨酸发酵验证，并且以携带空载质粒的菌株为对照，发酵结果见表 3.5。

所有过表达基因重组菌株以及对照菌株均能够在水解液中生长良好，葡萄糖快速消

耗并且最终都能够生产超过 55 g/L 以上的谷氨酸。但是，和对照菌株相比，这些基因的过表达对谷氨酸浓度和得率以及生产速率并没有非常明显的提高。其中表达柠檬酸合酶的菌株 XW6-pH36-*gltA* 谷氨酸产量最高达到 60.5g/L，比对照菌株提高 1 g/L。但是，这一较高的谷氨酸浓度可能和该菌株在发酵过程中初始糖浓度相对较高有关，而且该菌株谷氨酸生产速率 (1.26 g·L⁻¹·h⁻¹) 和糖酸转化率 (54.0%) 低于对照菌株的 1.36 g·L⁻¹·h⁻¹ 和 54.9%。所以，该基因的过表达对于谷氨酸生产性能的提高影响有限。除此之外，过表达修饰谷氨酸转运通道的菌株 XW6-pH36-ΔC110 虽然在谷氨酸浓度上和对照菌株的 59.5 g/L 相同，但是其谷氨酸得率 (56.1%) 和生产速率 (1.49 g·L⁻¹·h⁻¹) 均比对照菌株高。这说明通过该分泌通道的过表达进一步促进胞内的谷氨酸分泌到胞外，对提高谷氨酸发酵性能具有一定促进作用。考虑到实际应用中质粒表达的不稳定性，我们将该基因整合到基因组上，通过提高该基因拷贝数的方法来提高该基因的表达。以编码假定蛋白的 *CGS9114_RS02700* 基因作为整合位点，将 H36 启动子和修饰的谷氨酸转运通道编码基因一起整合到 XW6 菌株基因组中，从而得到 XW6-ΔRS02700::H36-ΔC110 菌株。但是在水解液中的发酵结果显示该菌株仅产生了 55.6 g/L 的谷氨酸，糖酸转化率仅为 54.1%，发酵性能并没有明显的提高 (图 3.5)。这可能是基因组上整合过表达和质粒多拷贝的表达效果上的差异。

表 3.5 谷氨酸合成和分泌相关关键基因过表达对谷氨酸生产的影响

Table 2 Overexpression of the key genes involving glutamic acid synthesis and secretion on glutamic acid production

Strain ^d	Glutamic acid titer (g/L)	Glutamic acid Yield (%)	Glutamic acid productivity (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹) ^e
XW6-pH36	59.5 ± 0.5	54.9 ± 0.3	1.36 ± 0.11
XW6-pH36- <i>pyc</i>	55.3 ± 0.3	50.0 ± 0.8	1.38 ± 0.01
XW6-pH36- <i>ppc</i>	55.4 ± 0.4	51.4 ± 1.3	1.39 ± 0.01
XW6-pH36- <i>gltA</i>	60.5 ± 0.1	54.0 ± 0.0	1.26 ± 0.02
XW6-pH36- <i>icd</i>	58.6 ± 0.0	52.7 ± 1.7	1.22 ± 0.00
XW6-pH36- <i>gdh1</i>	56.7 ± 0.7	53.6 ± 0.1	1.18 ± 0.01
XW6-pH36- <i>gdh2</i>	55.8 ± 0.4	52.2 ± 1.2	1.40 ± 0.01
XW6-pH36-ΔC110	59.5 ± 0.5	56.1 ± 0.3	1.49 ± 0.01

^d 从磷酸烯醇式丙酮酸节点开始的和谷氨酸合成以及谷氨酸分泌相关基因的表达通过表达质粒表达在 *C. glutamicum* XW6 中；^e 谷氨酸生产速率的计算是基于达到最高谷氨酸浓度所需要的时间得到的。对照为携带空载质粒的菌株，谷氨酸发酵在 3L 发酵罐中进行，过程中不采用青霉素诱导，发酵条件参考材料与方法部分。

除去这两个基因之外，其他基因的过表达对谷氨酸浓度、得率以及生产速率没有明显促进作用，甚至部分基因的过表达导致谷氨酸产量比对照菌株还低。说明这些基因在我们得到的这株菌株中的过表达效果有限。尽管回补途径中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶对提供草酰乙酸并促进谷氨酸合成具有重要的作用^[275, 277, 278]，但是磷酸

烯醇式丙酮酸羧化酶通常受到比较强烈的反馈抑制^[278]，所以单纯将该基因过表达效果不明显。而研究显示丙酮酸羧化酶的表达情况相对稳定，由于它需要生物素作为辅因子发挥作用，所以通常只有在生物素限量条件下过表达效果才比较明显^[278]。对于 *gltA* 和 *icd* 基因，这两个基因的过表达主要是促进 α -酮戊二酸的供应。但是，由于 ODHC 活性降低，细胞本身就已经过量积累 α -酮戊二酸，所以通过 *gltA* 和 *icd* 基因的过表达促进 α -酮戊二酸生成对于提高谷氨酸产量的效果不明显。对于谷氨酸脱氢酶 *gdh1* 和 *gdh2* 的过表达，有研究显示在 *odhA* 基因敲除菌株中谷氨酸脱氢酶的表达量过高时反而对谷氨酸生产不利。由于 XW6 菌株和该 *odhA* 基因敲除菌株类似，所以有可能是采用强启动子（H36）表达使谷氨酸脱氢酶导致表达量过高而对谷氨酸生产具有不利影响。为此，采用强启动子过表达基因时所造成的代谢压力也有可能是这些基因的表达无法取得更好的谷氨酸生产结果的原因之一。关于这一现象，有待更深入的研究。所以，单纯的过表达这些基因，对谷氨酸棒状杆菌 XW6 谷氨酸发酵性能的提升效果并不明显。此外，谷氨酸棒状杆菌 S9114 是通过诱变筛选得到的高产谷氨酸的菌株，可能其自身的代谢环境已经很适合谷氨酸高产，所以进一步调整这些基因的表达并不能够取得更好的效果。综合上述的结果，我们最终选择 XW6 菌株作为在高生物素玉米秸秆水解液中的谷氨酸发酵菌株。

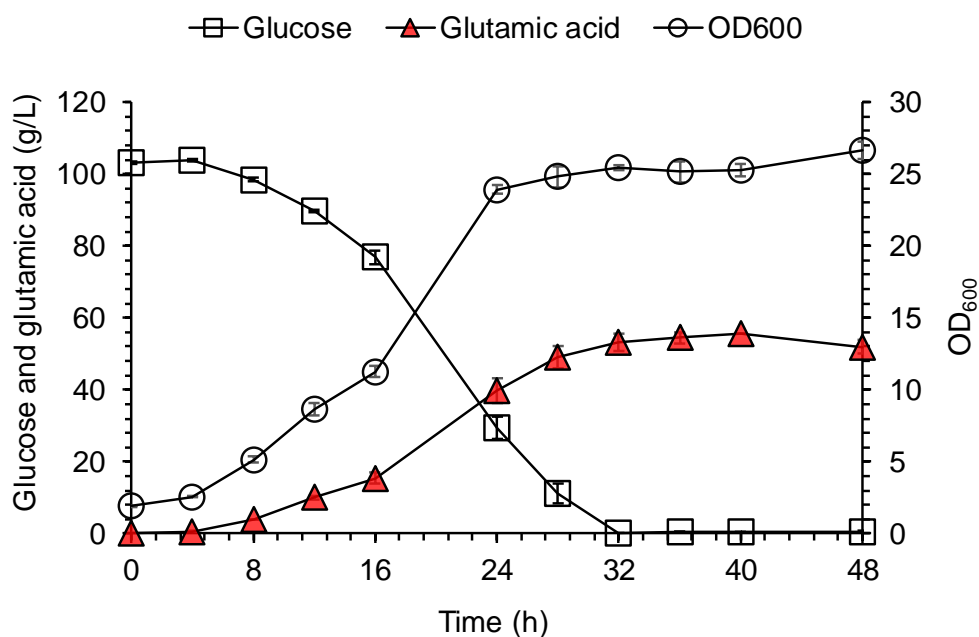


图 3.5 谷氨酸棒状杆菌 XW6- Δ RS02700::H36- Δ C110 在玉米秸秆水解液中的谷氨酸发酵

Fig. 3.5 Glutamic acid fermentation by *C. glutamicum* XW6- Δ RS02700::H36- Δ C110 in corn stover hydrolysate

注：谷氨酸的发酵在 3L 发酵罐中进行，过程中不添加任何诱导剂诱导，具体发酵条件见材料与与方法部分。平行实验结果标准差通过误差线表示。

3.3.5 重组谷氨酸棒状杆菌 XW6 谷氨酸发酵评价

在确定所使用的重组菌株之后，我们尝试利用玉米秸秆水解液采用分批补料发酵方

式对 XW6 菌株的谷氨酸发酵性能进行评价,发酵结果如图 3.6 所示。从发酵结果来看,在发酵过程中菌体生长良好,在 30 h 达到最大菌体量,随着新鲜水解液的补加,整体发酵液体积的增加,测定的菌体浓度 (OD₆₀₀ 值) 出现一定的下降。葡萄糖快速消耗,并且在 48 h 消耗完全。谷氨酸的浓度也随着葡萄糖的消耗不断增加,在 48 h 时达到 65.2 g/L。通过计算,整个发酵过程共消耗了 149 g 的葡萄糖,最后生成了 93.9 g 的谷氨酸,基于葡萄糖的糖酸转化率达到 63.0%。这也是截止目前所得到的纤维素谷氨酸最高指标。

由于目前利用木质纤维原料得到的水解液的糖浓度还相对较低 (131.6 g/L),进行分批补料发酵时会导致整个发酵液体积快速增加,谷氨酸的浓度相对较低。目前这一发酵结果和采用粮食性淀粉原料进行谷氨酸生产所能达到的指标 (超过 120 g/L) [137] 相比还存在一定的差距,但是实验结果也证明了利用得到的重组菌株以木质纤维素为原料进行谷氨酸发酵生产的潜力。由于本研究中的 *C. glutamicum* 对木质纤维素原料中其他一些浓度比较高的戊糖和寡糖如木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等不能够利用 [279, 280], 后续通过代谢工程改造实现这些糖的共利用能够进一步提高谷氨酸的产量。此外,对整个发酵工艺的优化,也能够进一步提高谷氨酸的发酵指标。

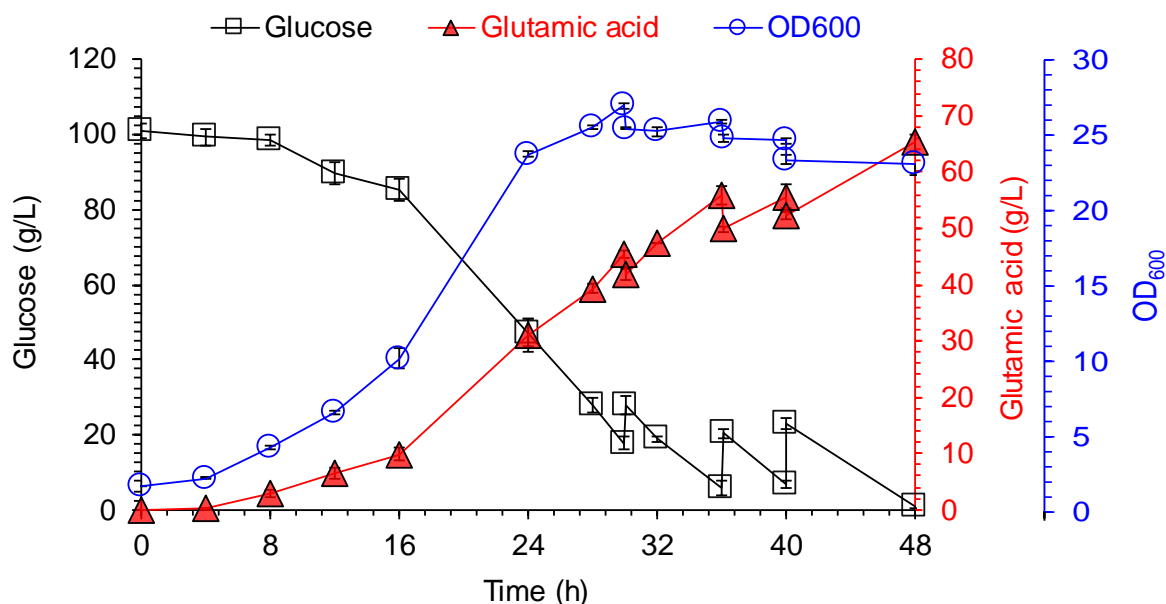


图 3.6 谷氨酸棒状杆菌 XW6 分批补料谷氨酸发酵结果

Fig. 3.6 Fed-batch glutamic acid fermentation by the engineered *C. glutamicum* XW6 strain in corn stover hydrolysate

注: 谷氨酸发酵在 3L 发酵罐中进行。发酵初始培养基为 800 mL30%(w/w)玉米秸秆水解液, 然后以 10%接种量接入种子液进行发酵, 并且在 30、36 和 40 h 时分别补加 125、150 和 175 mL30%(w/w)玉米秸秆水解液。

3.4 本章小结

本章节为实现谷氨酸棒状杆菌在高生物素的玉米秸秆水解液中发酵生产高浓度的谷氨酸, 尝试不同的代谢工程手段对 *C. glutamicum* S9114 进行改造, 找出最适合木质纤

纤维素体系生产谷氨酸的代谢工程方法，成功实现利用玉米秸秆水解液高产谷氨酸。本章节主要结论如下：

(1) 通过对谷氨酸分泌通道 MscCG 的修饰，*C. glutamicum* 能够在对生长影响较小的情况下成功实现在高生物素水解液中的谷氨酸分泌。而生物素吸收通道编码基因 *bioY* 的敲除会显著影响菌体的生长，而且当生物素浓度过高时不能够积累谷氨酸；

(2) 通过替换 *odhA* 基因原始 RBS 序列降低 ODHC 的活性，能够在保持正常的生长的情况下显著提高 *C. glutamicum* 在高生物素含量的玉米秸秆水解液中的谷氨酸积累，其中以 0.1 au 的 RBS 序列替换效果最好。最终谷氨酸发酵指标好于采用青霉素诱导的谷氨酸发酵指标，成功实现不经过诱导进行高浓度谷氨酸发酵；

(3) 在谷氨酸分泌通道修饰以及 *odhA* 基因 RBS 替换的 $\Delta C110odhARBS0.1$ 菌株中过表达谷氨酸合成途径中的关键基因对于谷氨酸发酵性能的提高效果有限。通过质粒过表达修饰的谷氨酸分泌通道编码基因能够一定程度上提高谷氨酸生产速率和得率，但是通过基因组整合方式过表达该基因对谷氨酸发酵性能提高效果有限；

(4) 得到的重组菌株 (XW6) 通过分批补料发酵实验，最终发酵生成了 65.2 g/L 的谷氨酸，糖酸转化率达到 63%，充分证明了利用该菌株利用木质纤维素原料替代粮食性淀粉原料发酵生产谷氨酸的潜力。

第4章 谷氨酸棒状杆菌分泌表达谷氨酸脱羧酶促进纤维素 γ -氨基丁酸发酵生产

4.1 引言

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种 4-碳非蛋白氨基酸, 具有非常广泛的应用, 也是合成可生物降解材料尼龙 4 的原料^[124]。 γ -氨基丁酸是谷氨酸的脱羧产物, 可通过谷氨酸脱羧酶在磷酸吡哆醛作为辅酶的情况下发生脱羧反应生成^[124]。目前, GABA 的工业生产通常由谷氨酸脱羧酶直接催化或者利用表达谷氨酸酶的乳酸菌或者大肠杆菌全细胞催化谷氨酸钠转化生产^[188]。虽然转化生产法效率比较高, 但是除了需要用来维持菌体生长以及催化环境所需的成本以外, 还需要以谷氨酸钠为底物, 所以成本比较高^[182], 很大程度限制了其作为聚合材料单体的应用。如果能够通过代谢工程改造, 采用更为廉价易得的木质纤维素原料, 直接经过微生物发酵生产 γ -氨基丁酸将大大降低成本并进一步促进其在工业上的应用。在目前的研究中, 直接发酵生产 GABA 的研究主要集中于 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 两种模式菌株^[182]。大肠杆菌虽然本身具有很高的谷氨酸脱羧酶活性, 但是由于本身不能够积累谷氨酸, 将代谢流改向谷氨酸的合成往往比较困难^[194, 281]。在没有谷氨酸钠前体的存在下, GABA 的产量依然非常低^[192, 194, 281, 282], 所以目前不具备工业应用的潜力。

而 *C. glutamicum* 本身是谷氨酸高产菌株, 通过异源表达谷氨酸脱羧酶就能够进行 GABA 的生产^[161]。Shi 等通过异源表达来自短乳杆菌中的谷氨酸脱羧酶, 初次实现了利用 *C. glutamicum* 生产 GABA, 但是其产量相对较低^[197]。这主要是和谷氨酸脱羧酶特性有关, 谷氨酸脱羧酶通常需要在酸性 pH 下发生反应, 当 pH 升高到中性 pH 时, 谷氨酸脱羧酶活性会显著下降^[198, 204]。因此, 在需要在中性 pH 环境下生长和生产谷氨酸的 *C. glutamicum* 中, 谷氨酸脱羧酶的活性往往不高导致最终 GABA 的产量、得率以及生产速率普遍比较低。在这种情况下, 很多研究通过改造谷氨酸脱羧酶^[196, 198, 201, 203, 204, 283]、优化谷氨酸脱羧酶表达^[284, 285]、促进谷氨酸前体的合成^[208, 286]或者分阶段进行 GABA 生产^[206]等方法一定程度上提高了 GABA 的产量和生产速率。但是, GABA 的产量、得率以及生产速率依然不高, 很大程度限制了 *C. glutamicum* 工业化生产 GABA 的应用。而通过脯氨酸合成途径来实现 GABA 的生产虽然能够避开谷氨酸脱羧酶和发酵 pH 不匹配的问题使 GABA 生产率提高, 但是这个过程由于存在很多的催化步骤, GABA 的得率依然不高^[212, 213], 并不是 GABA 理想的生产途径。所以解决谷氨酸脱羧酶生产 GABA 过程中 GABA 生产速率较慢浓度得率较低的问题才是关键。

针对这个问题, 本研究尝试通过简化谷氨酸脱羧酶催化生产 GABA 过程来促进 GABA 生产速率的提高。GABA 的生产通常是将胞内的谷氨酸转化为 GABA 然后再分泌到胞外积累。由于谷氨酸脱羧酶在谷氨酸生产条件下时活性不高, 很大一部分生成的

谷氨酸会分泌到胞外，而胞外的谷氨酸需要吸收到胞内然后转化为 GABA 再分泌到胞外。如果将谷氨酸脱羧酶分泌表达胞外，直接催化在胞外积累的谷氨酸转化为 GABA 则能够使催化过程得到简化从而提高 GABA 的生产效率。而 *C. glutamicum* 由于内源性分泌蛋白少、基本没有胞外蛋白水解酶活性以及只有单层细胞膜等特点，是潜力巨大的蛋白分泌表达菌株^[287]。所以 *C. glutamicum* 分泌表达谷氨酸脱羧酶进行 GABA 生产提高 GABA 的生产速率具有非常巨大的可行性。此外，*C. glutamicum* 对于木质纤维素体系具有比较良好的适应性，对抑制物的耐受性较高^[68]，在生物炼制生产能源、生物材料以及生物基化学品生产上具有非常广泛的应用^[75]。通过我们之前的研究（第三章），*C. glutamicum* 在木质纤维素水解液中生长良好，代谢工程改造后的 XW6 菌株可以利用木质纤维素原料生产高浓度的谷氨酸。对该菌株进一步代谢工程改造，利用木质纤维素原料生产 GABA 具有非常大的优势。

为此，本研究从 *C. glutamicum* XW6 出发，选择大肠杆菌中经过改造在中性 pH 下有活性的谷氨酸脱羧酶进行异源表达，缓解发酵过程 pH 不匹配的问题，初步实现 GABA 发酵生产。然后，在谷氨酸脱羧酶编码基因前融合信号肽进行谷氨酸脱羧酶分泌表达，使 *C. glutamicum* 生产的谷氨酸直接在胞外发生脱羧反应生成 GABA，显著提高了 GABA 的生产效率和得率。进一步利用玉米秸秆水解液进行 GABA 的发酵，能够得到目前所见报道中最高的纤维素 GABA 产量，充分证明了该菌株应用于 GABA 生产的潜力，为利用木质纤维素原料工业化生产 GABA 奠定基础。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌种、培养基以及培养条件

本章节所用到的菌株全部列在表 4.1 当中。代谢工程改造能够在高生物素木质纤维素水解液中生产谷氨酸的 *C. glutamicum* XW6 为本研究的出发菌株，该出发菌和构建的重组菌在 CM2B 培养基（包含 1% 蛋白胨，1% 酵母粉，1% NaCl 以及 10 $\mu\text{g/L}$ 生物素，pH 7.0）培养，培养条件为 30 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm。携带质粒的重组菌株添加 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素用以维持质粒。用于质粒构建的 *Escherichia coli* DH5 α 以及用于生物脱毒的菌株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 培养条件参考第三章 3.2.1。

4.2.2 酶、试剂以及仪器设备

纤维素酶、基因工程所用酶来源参考第三章 3.2.2，玉米浆、酵母粉（YE）和蛋白胨等来源参考第三章 2.2.2。葡萄糖购买自秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司， γ -氨基丁酸标准品购买自上海源聚生物。邻苯二甲醛、 β -巯基乙醇以及其他衍生化所用试剂均为分析纯，购买自上海泰坦科技股份有限公司。其他常见的试剂均为分析纯，购买自国内化学试剂提供商。所用常见仪器设备见附录 I。

表 4.1 本研究中使用到的菌株
Table 4.1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>A. resinae</i> ZN1 (CGMCC 7542)	Biodetoxification fungus isolated by our lab	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> XW6	Engineered <i>C. glutamicum</i> S9114 for cellulosic glutamate production	Lab stock
XW6-pH36- <i>gadA</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadA</i>	This study
XW6-pH36- <i>gadB</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadB</i>	This study
XW6-pH36- <i>gadBLB85</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadBLB85</i>	This study
XW6-pH36- <i>gadBM</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadBM</i>	This study
XW6-pH36- <i>gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadBmut</i>	This study
XW6-pH36- <i>gadBmutgadC</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>gadBmutgadC</i>	This study
XW6-pH36- <i>Rs-gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>Rs-gadBmut</i>	This study
XW6-pH36- <i>Ns-gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pH36- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6-pNcgl- <i>Ns-gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pNcgl- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6-pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 carrying pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6- Δ <i>gabT</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 with <i>gabT</i> gene deleted	This study
XW6- Δ <i>gabP</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 with <i>gabP</i> gene deleted	This study
XW6- Δ <i>gabP</i> Δ <i>gabT</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 with <i>gabP</i> and <i>gabT</i> gene deleted	This study
XW6- Δ <i>ldhA</i> -pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	<i>C. glutamicum</i> XW6 with <i>ldhA</i> gene deleted and carrying pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6- Δ <i>gabT</i> -pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	XW6- Δ <i>gabT</i> carrying pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6- Δ <i>gabP</i> -pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	XW6- Δ <i>gabP</i> carrying pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	This study
XW6- Δ <i>gabP</i> Δ <i>gabT</i> -pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	XW6- Δ <i>gabP</i> Δ <i>gabT</i> carrying pTacM- <i>Ns-gadBmut</i>	This study

表 4.2 本研究中使用到的质粒
Table 4.2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
pK18mobsacB	Mobilizable vector, allows for selection of double crossover in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance, sacB	[159]
pH36mob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pH36-gadA	pH36mob carrying <i>gadA</i> from <i>E. coli</i> K12	This study
pH36-gadB	pH36mob carrying <i>gadB</i> from <i>E. coli</i> K12	This study
pH36-gadBmut	pH36mob carrying mutated <i>gadB</i> from <i>E. coli</i> K12	This study
pH36-gadBLB85	pH36mob carrying mutated <i>gadB</i> from <i>Lactobacillus brevis</i> Lb85	This study
pH36-gadBM	pH36mob carrying mutated <i>gadB</i> from <i>Bacillus megaterium</i> CICC 10055	This study
pH36-gadBC	pH36mob carrying <i>gadBmut</i> and <i>gadC</i> from <i>E. coli</i> K12	This study
pH36-RsgadBmut	pH36mob carrying <i>E. coli</i> K12 mutated <i>gadB</i> with signal peptide of <i>RS04950</i>	This study
pH36-NsgadBmut	pH36mob carrying <i>E. coli</i> K12 mutated <i>gadB</i> with signal peptide of <i>Ncgl1289</i>	This study
pNcgl-NsgadBmut	pH36-NsgadBmut with H36 promoter replaced by promoter of <i>Ncgl1289</i>	This study
pTacM-NsgadBmut	pH36-NsgadBmut with H36 promoter replaced by TacM promoter	This study
pK18-ΔgabT	Plasmid for <i>gabT</i> gene knockout in the genome	This study
pK18-ΔgabP	Plasmid for <i>gabP</i> gene knockout in the genome	This study
pK18-ΔldhA	Plasmid for <i>ldhA</i> gene knockout in the genome	This study

表 4.3 本研究中使用到的引物
Table 4.3 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')*	Restriction enzyme
gadA-F	CTAGTCTAGAATGGACCAGAAGCTGTAA	XbaI
gadA-R	ACGCGTCGACTCAGGTGTGTTTAAAGCTGT	SalI
gadB-F	CTAGTCTAGAATGGATAAGAAGCAAGTAACG	XbaI
gadB-R	ACGCGTCGACTCAGGTATGTTTAAAGCTGTTC	SalI
gadBmut-F1	CCGGGGATCCTCTAGAATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTAAAG	XbaI
gadBmut-R1	GATACTGTTCTTTGTCGATCCAGTTTTTGTTAATGG	
gadBmut-F2	CTGGATCGACAAAGAACAGTATCCGCAATCCGCAG	
gadBmut-R2	ATGCCTGCAGGTCGACTCAGTGATCGCTGAGATATTTTCAGGG	SalI
gadBM-F	ACGCGTCGACATGCCTCAATGGCATCCGCATC	SalI
gadBM-R	AAAACCTGCAGTTAATGATGAAATCCATTGTCGTATTTTCGTG	PstI
gadBLB85-F	ACGCGTCGACATGGCTATGTTATATGGTAAACACA	SalI
gadBLB85-R	AAAACCTGCAGTTAGTGAGTGAATCCGTATTTTTTTAG	PstI
gadBC-F1	GGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTTA	
gadBC-R1	GTTACCGTTAAACGTTATCAGTGATCGCTGAGATATTTTCAGG	
gadBC-F2	ATCTCAGCGATCACTGATAACGTTTAAACGGTAACGGTGTCC	
gadBC-R2	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTAGTGTTTCTTGTCATTCATCACAATATAG	
RsgadB-F1	GGTACCCGGGGATCCTCTAGAATGCAAATAAACC GCCGAGGCTTC	XbaI
RsgadB-R1	CTTCTTATCCATTGCTCCCTGGGCGTTGGC	
RsgadB-F2	CCCAGGGAGCAATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTT	
RsgadB-R2	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCAGTGATGGTGATGGTGATCGCTGAGATATTTTCAGGG	SalI
NsgadB-F1	TACCCGGGGATCCTCTAGAATGAAATATGAATTTAATAATAGATTCCGAA	XbaI
NsgadB-R1	TGCTTCTTATCCATAAAGAGCTCCTGATCATGTAGGTG	
NsgadB-F2	TCAGGAGCTCTTTATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTT	

NsgadB-R2	TTGCATGCCTGCAGGTCGACTCAGTGATGGT <u>GATGGT</u> GATGGTGCATCGCTGAGATATTTTCAGGG	Sall
pH36-Vector-F	GGCATGCAAGCTTGGCTG	
pH36-Vector-R	ATGATAAGCTGTCAAACCAGATCAATTC	
pTacM-F	TTGATCTGGTTTGACAGCTTATCATTGAGCTGTTGACAATTAATCATCGTGTGGTACCATGTGTGG AATTGTGAGCG	
pTacM-NsgadB-R1	AAATTCATATTTCAATCTAGACGTTGATGTCCTTTCAATTGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCA CAC	
pTacM-NsgadB-F2	TCTAGATTGAAATATGAATTTAATAATAGATTCCGAACGAAATCGGTG	
gadBmut-R	AACAGCCAAGCTTGCATGCCTCAGTGATGGTGCATGGTGCATGG	
Ncgl1289-F	TTGATCTGGTTTGACAGCTTATCATAGCCTGACTAGCGGTGTTTAAGGCAC	
Ncgl1289-R	TGCTTCTTATCCATAAAGAGCTCCTGATCATGTAGGTG	
NCgl1289-gadB-F	TCAGGAGCTCTTTATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTT	
gabTup-F	CCGGAATTCGGTGAATGGTGGCTAGGTCGT	EcoRI
gabTup-R	GCTCTAGAGGTTCCCTCCTGTGAGGTGAGATAC	XbaI
gabTdown-F	ACGCGTCGACAATGTCTTTGACCTTCCCAGTAATC	Sall
gabTdown-R	CCCAAGCTTCTTATCATCGGTGGGGAGGTC	HindIII
gabPup-F	CGAATTCGAGCTCGGTACCCCGGGATCCCGCAGGGCTTGGTCT	SmaI
gabPup-R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTCACGGCAAAGCGAGGTAAC	BamHI
gabPdown-F	TGAGGATCCTCTAGAGTCGACTCACTTCTGTTGTGGCTGCCTG	Sall
gabPdown-R	CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCGCATTTCTGGGCGGTTGTTT	PstI
ldhAup-F	CCGGAATTCCTTTTCATACGACCACGGGCTAC	EcoRI
ldhAup-R	ACGCGTCGACTTTCGATCCCACTTCTGATTT	Sall
ldhAdown-F	ACGCGTCGACATCTTTGGCGCCTAGTTG	Sall
ldhAdown-R	CCCAAGCTTTCGAACCATTTCTGGGGTG	HindIII

* 单下划线代表对应限制性内切酶酶切位点，双下划线代表组氨酸标签序列。

4.2.3 质粒构建以及重组菌株构建

本研究所使用的质粒在表 4.2 中列出, 质粒构建以及质粒和重组菌株验证引物在表 4.3 中列出。表达质粒以 pH36mob 质粒为基础进行构建。利用引物 *gadA*-F/R 和 *gadB*-F/R 分别从大肠杆菌 K12 中将 *gadA* 和 *gadB* 基因扩增下来, 利用无缝克隆试剂盒将它们分别连接到经过 XbaI/SalI 内切酶线性化的 pH36mob 质粒上, 从而得到 pH36-*gadA* 和 pH36-*gadB* 质粒。对于来自短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* Lb85 中突变的谷氨酸脱羧酶^[204]和巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* CICC 10055 中突变的谷氨酸脱羧酶^[205]的表达, 两个基因首先由上海捷瑞生物工程有限公司人工合成, 序列详细信息见附录 II。然后利用引物 *gadBLB85*-F/R 和 *gadBM*-F/R 分别以合成的基因为模板将对应的片段扩增下来, 插入到 pH36mob 质粒的 SalI/PstI 酶切位点, 从而得到 pH36-*gadBLb85* 和 pH36-*gadBM* 质粒。对于大肠杆菌中突变的谷氨酸脱羧酶 *GadB*(Glu89Gln/ Δ 452-466)^[198]表达质粒的构建, 首先利用 *gadBmut*-F1/R1 和 *gadBmut*-F2/R2 引物对从大肠杆菌 K12 中将对应的片段扩增下来, 然后通过融合 PCR 将两个片段连接在一起。随后将融合的 PCR 片段通过无缝克隆连接到经过 XbaI/SalI 酶线性化的 pH36mob 质粒上, 从而得到 pH36-*gadBmut* 质粒。

对于 *gadBmut* 和 *gadC* 共表达质粒 pH36-*gadBC*, 首先利用引物 *gadBC*-F1/R1 和 *gadBC*-F2/R2 分别从 pH36-*gadBmut* 质粒和大肠杆菌 K12 基因组中将对应片段扩增下来, 然后通过融合 PCR 融合在一起, 并将其连接到 SmaI/XbaI 酶线性化的 pH36mob 质粒, 从而得到 pH36-*gadBC* 质粒。对于 pH36-*RsgadBmut* 质粒, 首先利用引物 *RsgadB*-F1/R1 将基于 TAT 通道分泌蛋白的 *cgR_0949* (*CGS9114_RS04950*) 基因的信号肽^[288]从 *C. glutamicum* S9114 基因组中扩增下来, 然后利用引物 *RsgadB*-F2/R2 将携带组氨酸标签的 *gadBmut* 基因从 pH36-*gadBmut* 质粒中扩增下来, 随后将这两个片段通过融合 PCR 连接在一起, 得到的融合片段通过无缝克隆连接到经过 XbaI/SalI 酶线性化的 pH36mob 质粒上, 从而得到 pH36-*RsgadBmut*。同样的, 对于 pH36-*NsgadBmut* 质粒, 首先利用引物 *NsgadB*-F1/R1 将基于 SEC 通道分泌蛋白的 *Ncgl1289* 基因的信号肽^[289]编码序列从 *C. glutamicum* ATCC13032 中扩增下来, 然后利用引物 *NsgadB*-F2/R2 将携带组氨酸标签的 *gadB* 基因从 pH36-*gadBmut* 质粒中扩增下来, 随后将这两个片段通过融合 PCR 连接在一起, 得到的融合片段再通过无缝克隆连接到经过 XbaI/SalI 酶线性化的 pH36mob 质粒上从而得到 pH36-*NsgadBmut*。对于 pTacM-*NsgadBmut* 质粒, 通过 pTacM-F/pTacM-*NsgadB*-R1 引物退火得到突变的 Tac 启动子 TacM 片段, 然后利用引物 pTacM-*NsgadB*-F2/*gadBmut*-R 将 *NsgadBmut* 片段从 pH36-*NsgadBmut* 质粒上扩增下来, 随后这两个片段通过融合 PCR 连接在一起。融合的 PCR 片段再通过无缝克隆试剂盒将其和利用 pH36-Vector-F/R 引物 PCR 线性化的 pH36mob 质粒连接到一起, 从而得到 pTacM-*NsgadBmut* 质粒。对于 pNcgl-*NsgadBmut* 质粒, 首先利用引物 *Ncgl1289*-F/R 将包含 *Ncgl1289* 基因启动子和信号肽的片段从 *C. glutamicum* ATCC13032 基因组中扩增下来, 然后和利用 *NCgl1289-gadB*-F/*gadBmut*-R 从 pH36-*NsgadBmut* 质粒上扩增下来的 *NsgadBmut* 片段通

过融合 PCR 连接在一起。融合的 PCR 片段再通过无缝克隆试剂盒将其和利用 pH36-Vector-F/R 引物 PCR 线性化的 pH36mob 质粒连接到一起，从而得到 pNcgl-NsgadBmut 质粒。所有得到的质粒均需要通过测序验证才能够用于后续试验。这些表达质粒通过电转化的方法转入 *C. glutamicum* 细胞当中，挑取具有卡那霉素抗性的单菌落进行菌落 PCR 的验证，验证成功的菌落即为所得到的携带相应基因表达质粒的重组菌株。电转化方法参考 3.2.4。

对于 pK18- Δ gabT 质粒，首先利用 gabTup-F/R 和 gabTdown-F/R 两对引物分别将 gabT 基因的上游和下游同源臂片段扩增下来，然后分别将它们插入 pK18mobsacB 质粒的 EcoRI/XbaI 和 SalI/HindIII 位点处，最终得到 pK18- Δ gabT 质粒。同样的，利用 gabPup-F/R 和 gabPdown-F/R 两对引物将 gabP 基因的上下游同源臂扩增下来，然后分别将它们插入到 pK18mobsacB 质粒的 SmaI/BamHI 和 SalI/PstI 酶切位点处，最终得到 pK18- Δ gabP 质粒。利用 ldhAup-F/R 和 ldhAdown-F/R 引物对分别将 ldhA 基因的上下游同源臂扩增下来，然后分别插入到 pK18mobsacB 质粒的 EcoRI/SalI 和 SalI/HindIII 酶切位点处，最终得到用于 pK18- Δ ldhA 质粒。通过将这些质粒电转化进入 *C. glutamicum* 细胞，然后经过两轮的同源重组筛选，最终获得能够得到对应基因敲除的菌株。具体方法参考 3.2.4。

4.2.4 木质纤维素原料及其生物炼制处理

本研究中使用的木质纤维素原料为 2016 年秋收集于内蒙古通辽的玉米秸秆，该原料和本论文第三章所使用原料为同一批原料。对于原料的预处理、脱毒以及水解液制备等方法以及水解液成分相关信息参考第三章 3.2.5。

4.2.5 GABA 发酵

GABA 发酵过程中的种子培养过程和谷氨酸发酵过程中的种子培养方法一样，具体参考论文第三章 3.2.6。摇瓶发酵用到的培养基包括玉米秸秆水解液和复合培养基。复合培养基中包括：100 g/L 葡萄糖、1 g/L KH_2PO_4 、0.6 g/L MgSO_4 、3 g/L 尿素、2.0 mg/L FeSO_4 、2.0 mg/L MnSO_4 、25 g/L 玉米浆 (CSL) 和 0.1mM 5-磷酸吡哆醛，pH7.0。摇瓶发酵时，种子液以 5% (v/v) 接种量接种至三角烧瓶中进行发酵，发酵条件为 30°C、200 rpm。pH 通过补加 20% (w/w) 尿素溶液控制在中性 (pH 6-8)。

GABA 的上罐发酵在 3L 发酵罐 (BIOTECH-4BG-3L, 上海保兴生物工程设备有限公司) 中进行，发酵用到的培养基包括上述复合培养基以及添加了 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的玉米秸秆水解液。发酵温度为 32 °C，转速 600 rpm，接种量为 10% (v/v)，通气量为 1.4 vvm。发酵过程中 pH 通过自动补加 2 M H_2SO_4 和 25% (w/v) 氨水溶液维持在 7.2。分批补料发酵实验条件和上罐发酵条件相同，培养基采用 Zhang 等^[206]使用的培养基，并将做小幅调整，具体成分如下：100 g/L 葡萄糖、30 g/L 玉米浆、10 g/L 酵母粉、5.5 g/L 尿素、1.5 g/L K_2HPO_4 、0.8 g/L MgSO_4 、0.02 g/L MnSO_4 、0.02 g/L FeSO_4 、200 $\mu\text{g/L}$ 维生素 B1 和 0.1mM 5-磷酸吡哆醛，pH7.2。补料统一采用 50 mL 浓度为 279 g/L 的葡萄糖液，发酵过程中从 24 h 开始每 4 h 补加一次，总共补加 8 次，并在 72 h 结束发酵。

4.2.6 蛋白样品处理以及 SDS-PAGE

当摇瓶发酵到 48 h 时立即将三角瓶取出并在 4 °C 冰水中冷却 10 min。然后将冰冷的发酵液转入离心管中，在 4 °C、10,000×g 下离心 10 min，所得到的上清作为细胞胞外蛋白组分。然后采用丙酮沉淀法^[290]对蛋白进行浓缩，然后采用考马斯亮蓝法^[218]测定样品的蛋白含量，并将不同蛋白浓度样品稀释至相同的蛋白浓度。然后取 10 μL 样品进行蛋白电泳。

4.2.7 分析方法

葡萄糖、谷氨酸和乳酸，乙酸、木糖、糠醛和羟甲基糠醛以及三种酚类组分香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛测定方法参考第二章 2.2.9。细胞生长通过测定 600 nm 下的光密度值表征。GABA 测定采用邻苯二甲醛柱前衍生化方法^[291]。邻苯二甲醛衍生化试剂配制如下：准确称取 0.3 g 邻苯二甲醛于 100 mL 容量瓶，添加 5 mL 甲醇将邻苯二甲醛溶解。添加 250 μL 巯基乙醇，并用 pH 9.5 硼酸缓冲液定容至 100 mL。取 100 μL 待测样品，加入 400 μL 0.1 M KH₂PO₄ 和 300 μL 衍生化试剂，反应 2 min 后利用高效液相色谱进行测定。高效液相色谱（岛津 LC-20AT）配备有 C18 柱（YMC-Pack ODS-A）和紫外检测器（SPD-20A UV 检测器），柱温 40 °C，检测波长为 338 nm。采用梯度洗脱方法，总流速为 1.0 mL/min。A 泵为每升添加了 200 μL 三乙胺和 5 mL 四氢呋喃的 0.036 M 的乙酸钠溶液，pH 7.2。B 泵为 0.18 M 乙酸钠溶液(pH 7.2)：甲醇：乙腈=1:2:2 溶液，配置好的溶液乙酸钠的最终浓度为 0.036 M。B 泵的流速在 0-15 min 内从 8%(v/v)提高到 37%(v/v)，然后在 15-22 min 内从 37%(v/v)降低至 8%(v/v)。

4.2.8 γ-氨基丁酸得率计算

以 1 mol 葡萄糖转化为 1 mol 谷氨酸计算，基于葡萄糖消耗的 γ-氨基丁酸的理论得率为 57.2%。基于消耗的葡萄糖的 γ-氨基丁酸的实际得率计算如下：

$$\text{GABA 得率} = \frac{[GABA] \times V - [GABA]_0 \times V_0}{[G]_0 \times V_0 - [G] \times V} \times 100\% \quad (4-1)$$

其中[GABA]和[GABA]₀表示发酵液中最终和初始 γ-氨基丁酸浓度，[G]₀和[G]表示发酵初始和最终的葡萄糖浓度，V₀和V代表初始和最终的发酵液体积。在计算过程中，忽略因调节 pH 所需的酸和碱造成的体积变化。

基于理论得率的实际相对得率计算如下：

$$\text{GABA 实际相对得率} = \frac{\text{GABA 得率}}{\text{GABA 理论得率}} \times 100\% \quad (4-2)$$

4.3 结果与讨论

4.3.1 异源表达大肠杆菌谷氨酸脱羧酶突变体实现 GABA 发酵生产

在适合谷氨酸发酵的条件下进行 GABA 发酵能够提供更多的谷氨酸前体进行 GABA 生产，从而有助于提高 GABA 生产能力。为此我们利用在第三章中获得的能够在高生物素水解液中高产谷氨酸的 *C. glutamicum* XW6 为出发菌株，测试了不同来源谷氨酸脱羧酶的异源表达对 GABA 生产的影响。在这些谷氨酸脱羧酶中，除了来自大肠杆

菌的 GaDA 和 GaDB 以外, 还有目前已见报道中经过改造能够在偏中性条件下具有催化活性的谷氨酸脱羧酶。这些谷氨酸脱羧酶包括来自大肠杆菌 *E. coli* K12 的 GadBmut^[198]、来自巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* CICC 10055 的谷氨酸脱羧酶 GadBM^[205]以及来自短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* Lb85 的谷氨酸脱羧酶 GadBLB85^[204]。分别构建用于表达这些谷氨酸脱羧酶的表达质粒, 并将它们分别电转化到 *C. glutamicum* XW6 中得到相应谷氨酸脱羧酶表达的菌株。然后在摇瓶中利用复合培养基进行 GABA 的发酵测试, 发酵过程中通过补加 20%(w/w)尿素控制 pH 中性, 发酵结果如图 4.1 所示。

从发酵结果来看, 经过 72 h 的发酵, 在所有菌株的发酵液中都能够检测到 GABA 的产生, 但是来自大肠杆菌 K12 的 GaDA 和 GaDB 的表达所产生的 GABA 量非常少 (低于 0.3 g/L)。选择的三个经过改造或者突变的谷氨酸脱羧酶的表达中, 来自巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* CICC 10055 的谷氨酸脱羧酶 GadBM 以及来自短乳杆菌 *L. brevis* Lb85 的谷氨酸脱羧酶 GadBLB85 的表达所产生的 GABA 的量依然比较少 (低于 0.5 g/L), 谷氨酸的积累水平也和 GadA 和 GadB 表达时的谷氨酸积累水平相当。但是, 来自大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶具有比较好的效果, 产生了 1.54 g/L 的 GABA, 是其他谷氨酸脱羧酶表达情况下所产生 GABA 的 3 倍以上, 相对应的谷氨酸的量也相比其他菌株的积累量少。这些结果说明该谷氨酸脱羧酶在 pH 偏中性的发酵中是发挥作用的, 并且能够利用谷氨酸积累一定的 GABA。所以在后续的实验中采用来自大肠杆菌中的 *gadBmut* 基因编码的改造后的谷氨酸脱羧酶 GadBmut 进行 GABA 的生产。

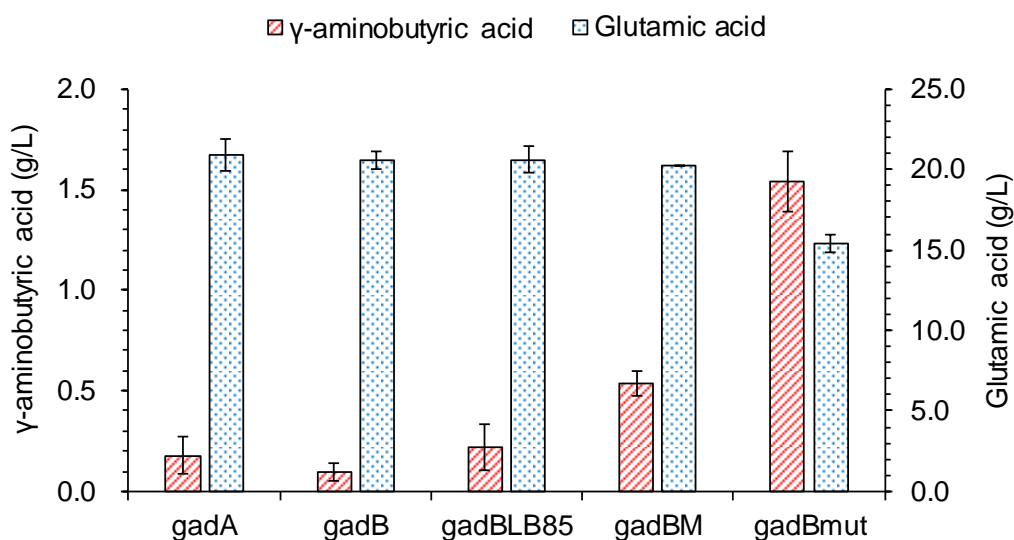


图 4.1 不同谷氨酸脱羧酶表达对 *C. glutamicum* XW6 GABA 生产的影响

Fig. 4.1 Effects of different glutamate decarboxylases overexpression in *C. glutamicum* XW6 for γ -aminobutyric acid production

注: gadA、gadB、gadBLB85、gadBM 以及 gadBmut 分别代表携带对应基因表达质粒的谷氨酸棒状杆菌, GABA 的发酵在摇瓶中进行, 30 °C, 200 rpm, 过程补加尿素控制 pH 中性。

4.3.2 分泌表达谷氨酸脱羧酶促进 GABA 生产

为了进一步提高 GABA 的产量, 我们希望通过两种策略来提高谷氨酸脱羧酶的催

化效率（图 4.2）：（1）强化胞内的谷氨酸脱羧反应：在表达谷氨酸脱羧酶的基础上，共表达谷氨酸/ γ -氨基丁酸逆向转运体 GadC，提高细胞对谷氨酸和 GABA 的通透性，使胞内的谷氨酸脱羧酶的脱羧反应更容易进行；（2）促进胞外的谷氨酸脱羧反应进行：直接催化分泌到胞外的谷氨酸生产 GABA，简化 GABA 催化生产的过程，从而提高 GABA 的生产效率。

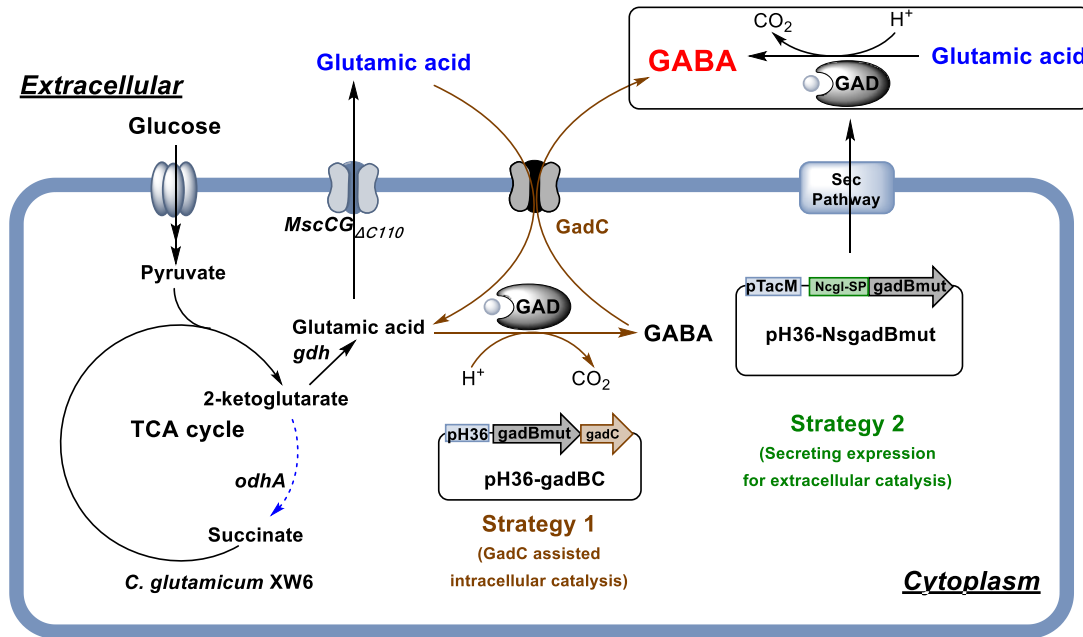


图 4.2 谷氨酸棒状杆菌中提高 GABA 生产效率的代谢工程改造策略图解

Fig. 2 Diagram of the metabolic engineering strategy for efficient GABA production in *Corynebacterium glutamicum*

对于在表达谷氨酸脱羧酶的基础上共表达谷氨酸/ γ -氨基丁酸逆向转运体 GadC，我们将大肠杆菌中的 GadC 编码基因和突变的谷氨酸脱羧酶 GadBmut 编码基因融合在一起，共同构建到表达质粒 pH36mob 上得到 *gadBmut* 和 *gadC* 共表达的质粒 pH36-*gadBC*。然后将该质粒电转化至 *C. glutamicum* XW6 中，得到的菌株以单独表达 *gadBmut* 的菌株为对照进行 GABA 的发酵，结果如图 4.3 所示。从发酵结果来看，和对照相比，谷氨酸/GABA 逆向转运体 GadC 与谷氨酸脱羧酶的共表达对于菌株生长、糖耗、谷氨酸生产以及 GABA 的生产均没有特别大的影响，GadC 的表达对 GABA 生产的提高没有明显效果。这一结果和在大肠杆菌里面表达有所区别，一方面可能是 GadC 通常需要在酸性 pH 下发挥作用，另一方也可能是由于大肠杆菌胞内谷氨酸浓度低，胞外的谷氨酸吸收到胞内可以促进该催化反应进行。而在谷氨酸棒状杆菌里面谷氨酸生产阶段胞内谷氨酸浓度已经达到饱和，进一步通过谷氨酸/GABA 逆向转运体的表达，对促进谷氨酸吸收和 GABA 转化效果有限。同时这种胞内的催化反应需要经历谷氨酸吸收-转化-GABA 分泌这样一个多步骤过程，在一定程度上限制了谷氨酸脱羧酶催化生产 GABA 的效率。所以，这种基于胞内催化生产 GABA 的方式可能并不适合于 GABA 的生产。为此我们进一步尝试通过分泌过氨酸脱羧酶进行胞外催化生产 GABA。

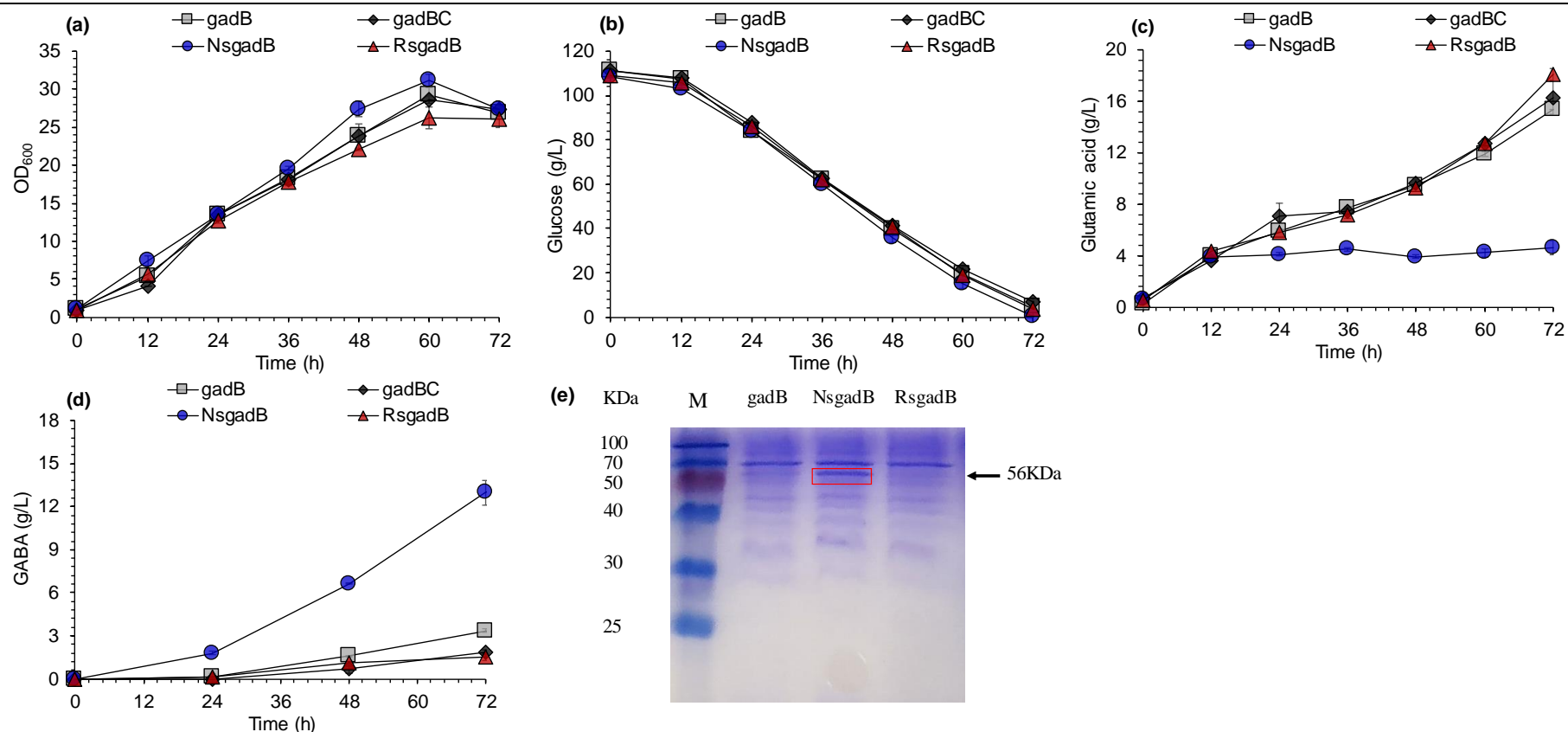


图 4.3 共表达谷氨酸/GABA 逆向转运体和谷氨酸脱羧酶分泌表达对 GABA 发酵生产的影响

Fig. 4.3 Effects of glutamate/γ-aminobutyrate co-expression or glutamate decarboxylase extracellular expression on GABA production

(a) 细胞生长; (b) 葡萄糖消耗; (c) 谷氨酸积累; (d) GABA 积累, (e) 胞外样品 SDS-PAGE 分析

注: gadB、gadBC、RsgadB 和 NsgadB 分别表示携带表达 gadBmut、共表达 gadBmut 和 gadC、融合 CGRS9114_RS04950 信号肽分泌表达 gadBmut 和融合 Ncg11289 信号肽分泌表达 gadBmut 的重组 *C. glutamicum*。发酵在摇瓶中进行, 30 °C、200rpm, 过程中用 20% 尿素调节 pH 至中性。

对于分泌表达谷氨酸脱羧酶 GadBmut 以促使谷氨酸直接在胞外发生催化反应生产 GABA, 我们首先选择了两个信号肽来实现谷氨酸脱羧酶的分泌表达。它们分别是介导 Sec 途径分泌蛋白的 Ncgl1289 基因的信号肽^[289]和介导 TAT 途径分泌蛋白的 cgR_0494 (即 S9114 中的 CGR_RS04950) 的信号肽^[288], 它们是目前报道过的在 *C. glutamicum* 中分泌蛋白效果比较好的信号肽。分别将这两个信号肽序列融合到谷氨酸脱羧酶 GadBmut 编码基因 gadBmut 前, 然后构建到表达质粒上得到 pH36-NsgadBmut 和 pH36-RsgadBmut。将它们分别电转化到 *C. glutamicum* XW6 中即得到分别通过 Sec 和 TAT 途径分泌谷氨酸脱羧酶的 XW6-pH36-NsgadBmut 和 XW6-pH36-RsgadBmut。得到的两株菌株以单独表达 gadBmut 的菌株 XW6-pH36-gadBmut 为对照, 首先进行了蛋白分泌表达效果的验证。从蛋白电泳结果 (图 4.3e) 中可以看出, 通过 Sec 通道分泌表达谷氨酸脱羧酶 GadBmut 的菌株在 50-70 KDa 之间存在明显的条带, 该位置条带 GadBmut (56KDa) 大小一致, 而对照菌株和通过 TAT 分泌表达蛋白的菌株均未见该位置有明显条带。这一结果说明谷氨酸脱羧酶需要通过 Sec 通道进行分泌。

随后我们以 XW6-pH36-gadBmut 菌株为对照, 对获得的 XW6-pH36-NsgadBmut 和 XW6-pH36-RsgadBmut 菌株进行了 GABA 的发酵实验 (图 4.3)。从发酵结果来看, 和对照相比, 通过 TAT 通道分泌的菌株 XW6-pH36-RsgadBmut 除了生长相对较差一些以外, 在糖耗、谷氨酸生产以及 GABA 生产等各方面均和对照没有明显区别。而采用通过 Sec 通道分泌表达的菌株 XW6-pH36-NsgadBmut 生长较好, 葡萄糖消耗趋势和对照比较接近。但是, 在谷氨酸生成和 GABA 生成上存在比较大的区别, 相比于对照的谷氨酸浓度持续升高, XW6-pH36-NsgadBmut 菌株谷氨酸生成后始终维持在 4.5 g/L, 与之相对应的是 GABA 积累得到非常明显的提升, 经过 72 h 发酵, 最终产生了 13 g/L 的 GABA, 相比对照提高了将近 4 倍。这一结果和胞外样品蛋白电泳的结果中只有通过 Sec 通道分泌的 NsgadB 菌株能够检测到明显的谷氨酸脱羧酶蛋白条带的结果相对应。说明通过 Sec 通道分泌谷氨酸脱羧酶能够在胞外进行 GABA 的催化生产并且能够显著提高 GABA 的产量。

从实验结果来看, 通过谷氨酸/GABA 逆向转运体和谷氨酸脱羧酶共表达来促进胞内谷氨酸脱羧反应进行的效果有限。这可能是由于在谷氨酸生产阶段胞内谷氨酸浓度已经达到饱和, 进一步通过谷氨酸/GABA 逆向转运体的表达, 对促进谷氨酸吸收和 GABA 转化效果有限, 所以 gadC 基因的表达对 GABA 产量的提高效果有限。而将谷氨酸脱羧酶分泌到胞外, 直接将胞外的谷氨酸转化为 GABA, 可以使 GABA 的生产过程得以简化而不需要将谷氨酸吸收到胞内进行催化然后分泌到胞外的繁琐过程, 同时也可以减少胞内代谢环境对谷氨酸脱羧酶的催化反应的影响, 所以能够显著提高 GABA 的生产。所以后续实验以 Sec 通道分泌表达谷氨酸脱羧酶的菌株 XW6-pH36-NsgadBmut 进行。

4.3.3 表达质粒启动子优化和阻断 GABA 降解提高 GABA 产量

在确定最佳的谷氨酸脱羧酶分泌表达途径后, 我们一方面通过优化谷氨酸脱羧酶分

泌表达所使用的启动子进一步获得更好的谷氨酸脱羧酶分泌表达效果来提高 GABA 产量,另一方面敲除主要副产物乳酸合成基因以及和 GABA 降解相关的基因,减少发酵过程中副产物生成和 GABA 的降解来提高 GABA 的产量。

对于谷氨酸脱羧酶表达启动子优化,除了 H36 这个人工合成的强启动子^[267]以外,我们还选择了 *Ncgl1289* 基因自身携带的启动子^[289],利用该基因自身的启动子配合自身的信号肽或许会有比较好的效果。同时我们还选择了目前报道中谷氨酸棒状杆菌分泌表达蛋白效果比较好的突变 *Tac* 启动子 *TacM*,经过突变后该启动子变成组成型的启动子,具有比较好的蛋白表达效果^[288]。分别构建对应启动子的表达质粒然后电转化到 *C. glutamicum* XW6 中,得到的菌株进行 GABA 发酵实验的验证,结果如表 4.4 所示。和对照采用 H36 启动子相比,采用 *Ncgl1289* 基因自身启动子时发酵液中残留大量的谷氨酸 (11.7g/L),仅有少量的 GABA 积累 (1.53g/L)。而采用 *TacM* 启动子时发酵液中谷氨酸的残留量进一步减少 (1.3g/L),GABA 的产量相比有一定程度的提高 (15.4 g/L),产量约提高 10%。由于 *TacM* 启动子具有更好的效果,所以在后续的实验中使用 *TacM* 启动子进行。

表 4.4 通过启动子优化和阻断 GABA 降解途径提高 GABA 的产量

Table 4.4 Improved GABA production by promoter optimization and GABA degradation pathway knockout

Strain	Glutamic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	γ -aminobutyric acid (g/L)	Improvement (%)
XW6-pH36-NsgadBmut (control)	2.30	28.00	14.00	0.00
XW6-pNcgl1289-NsgadBmut	11.70	24.60	1.53	-89.07
XW6-pTacM-NsgadBmut	1.30	29.90	15.40	10.00
XW6-pTacM-NsgadBmut (Control)	1.30	29.90	15.40	0.00
XW6-pTacM-NsgadBmut- <i>ldhA</i>	1.50	0.70	12.97	-15.75
XW6-pTacM-NsgadBmut- <i>gabT</i>	2.90	24.80	16.97	10.22
XW6-pTacM-NsgadBmut- <i>gabP</i>	4.10	23.00	19.45	26.29
XW6-pTacM-NsgadBmut- <i>gabP</i> <i>gabT</i>	4.50	21.50	18.51	20.21

注:不同的启动子质粒构建如材料方法所述,对照为表达以 pH36 启动子为对照;基因敲除对 GABA 影响实验以表达 pTacM-NsgadB 菌株为对照,并在此基础上进行对应的三个基因的敲除以及 *gabP* 和 *gabT* 的共敲除。GABA 发酵在摇瓶中进行,发酵条件如材料方法部分所述。

由于摇瓶发酵中存在较多的乳酸积累,所以我们对乳酸生成关键酶乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA* 进行了敲除,实验结果如表 4.4 所示。和对照菌株相比,*ldhA* 基因的敲除虽然能够显著降低乳酸的积累,但是 GABA 的积累反而减少。这一现象可能和乳酸生成的原因有关系,摇瓶发酵下通常供氧不充足容易导致胞内丙酮酸大量积累和 NAD^+/NADH 的比例不协调,进而需要通过生成乳酸进行调节^[116, 292]。所以乳酸脱氢酶的敲除,可能会对细胞代谢平衡造成影响,进而影响 GABA 的生产。由于发酵罐发酵时溶氧相对充足,乳酸生产少,*ldhA* 的敲除意义不大,后续不再考虑对其进行敲除。

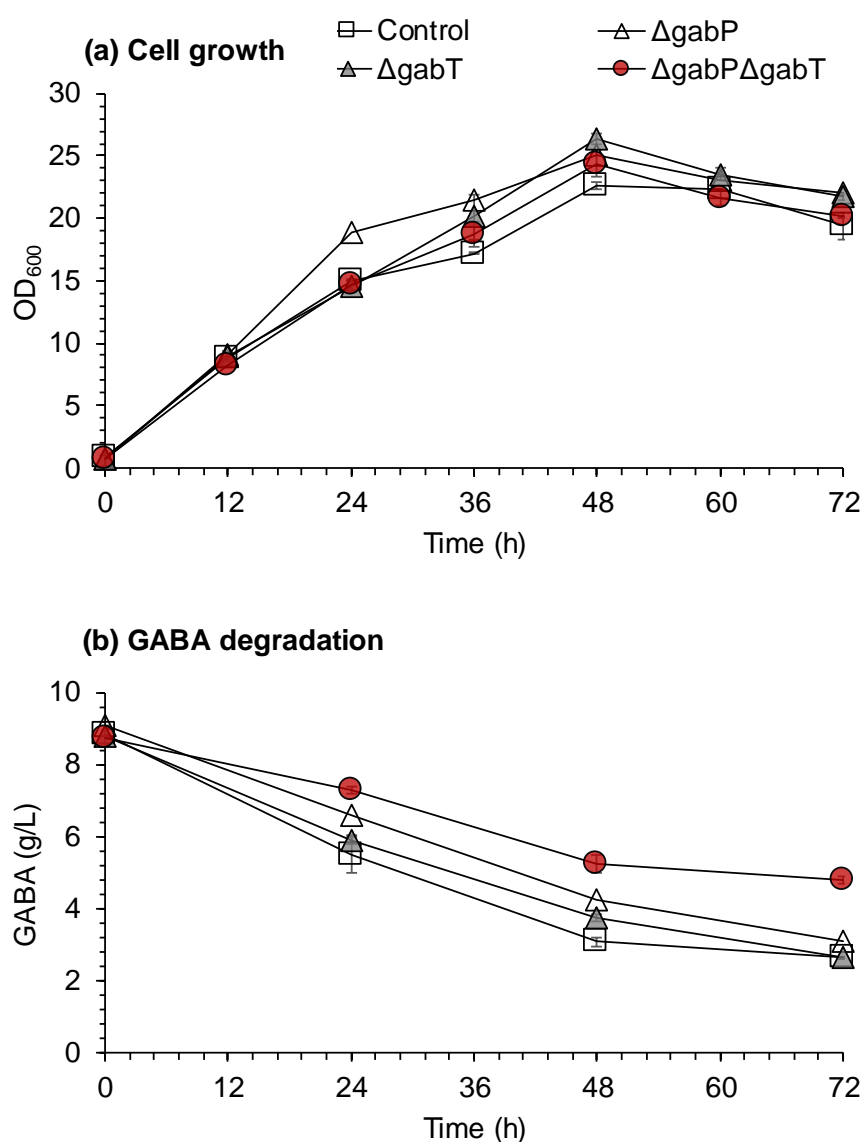


图 4.4 *gabP* 和 *gabT* 基因的敲除对谷氨酸棒状杆菌 XW6 GABA 降解的影响

Fig. 4.4 Effects of *gabP* and *gabT* knockout on GABA degradation in *C. glutamicum* XW6

(a) 细胞生长; (b) GABA 降解

注: GABA 降解实验在摇瓶中进行, 培养基为初始添加了 10 g/L GABA 的复合培养基, 发酵过程中通过添加 20%(w/w)控制 pH 中性。

此外, *C. glutamicum* 中存在 GABA 经由琥珀酸半醛进行降解的途径, 在中性 pH 下 GABA 会存在比较明显的降解^[210]。胞外的 GABA 首先通过 *gabP* 编码的 GABA 通透酶转运进入胞内, 然后在 GABA 转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶的催化下生成琥珀酸。所以我们对该降解途径中编码 GABA 通透酶和 GABA 氨基转移酶 *gabP* 和 *gabT* 基因进行了敲除以及共敲除, 分别得到 XW6- Δ *gabT*, XW6- Δ *gabP* 和 XW6- Δ *gabP* Δ *gabT* 菌株。得到的菌株首先进行了 GABA 降解情况的测试, 实验结果如图 4.4 所示。编码 GABA 通透酶的 *gabP* 基因和编码 GABA 氨基转移酶 *gabT* 基因的敲除均不能够彻底阻止 GABA 的降解。说明在 *C. glutamicum* 中还存在其他的 GABA 吸收通道和发挥 GABA 氨基转移酶作

用的其他基因。但是,这两个基因的敲除能够在一定程度上减少 GABA 的降解,两个基因的共敲除能够进一步缓解 GABA 的降解。随后,我们将谷氨酸脱羧酶分泌表达质粒电转入对应的菌株中,并进行了 GABA 的发酵实验,结果表 4.4 所示。GABA 发酵结果显示, *gabT* 和 *gabP* 的敲除以及共敲除都能够一定程度上提高 GABA 的生产,分别提高 10.22%、26.29%和 20.21%。从结果来看, *gabT* 和 *gabP* 共敲除的菌株其 GABA 产量相比单独 *gabP* 敲除的菌株 GABA 的产量反而有所下降。这可能和 *gabT* 编码的 GABA 氨基转移酶的功能有关系,该酶催化的氨基转移作用主要发生在 GABA 和 α -酮戊二酸之间, GABA 在该酶的催化下将氨基转移到 α -酮戊二酸上可进一步生成谷氨酸^[210]。所以该酶的敲除可能会导致在胞内有 GABA 存在的情况下谷氨酸的生成相对减少,从而影响最终的 GABA 的产量。最终我们选择 *gabP* 敲除的菌株(XW6- Δ gabP-pTacM-*NsgadBmut*, 命名为 XW6-16) 用于 GABA 的发酵。

4.3.4 发酵罐上重组菌株利用复合培养基发酵生产 GABA

为了验证得到的工程菌株 XW6-16 (XW6- Δ gabP-pTacM-*NsgadBmut*) 用于 GABA 发酵的潜力,我们利用复合培养基首先进行了分批发酵测试,实验结果如图 4.5a 所示。XW6-16 菌株在复合培养基中生长良好, OD₆₀₀ 值在 32h 达到最大约为 23,葡萄糖持续消耗且在 48h 接近消耗完全, GABA 在发酵过程中快速生成,并且在 48h 达到最大值 45 g/L,基于葡萄糖的得率达到 0.44 g/g 葡萄糖,实际相对得率达到 76.9%,生产速率达到 0.94 g·L⁻¹·h⁻¹。这一结果是目目前利用 *C. glutamicum* 进行 GABA 发酵中分批发酵的最好结果(表 4.4)。在发酵过程中,乳酸没有积累,但是谷氨酸存在一定程度的积累,在 48h 时,发酵液中有 9.5 g/L 的谷氨酸残留。

为了进一步提高 GABA 生产的浓度和速率,我们尝试了分批补料发酵,所使用的发酵培养基改为 Zhang 等^[206]所使用的发酵培养基,并将其中的葡萄糖浓度减少至 100 g/L。补料采用 50 mL 浓度为 279 g/L 的葡萄糖液,发酵过程中从 24 h 开始每 4h 补加一次,总共补加 8 次,并于 72h 结束发酵,发酵结果如图 4.5b 所示。从发酵结果来看,在该发酵培养基中,菌株生长迅速并且在 32 h 左右达到最高的菌体量(OD₆₀₀ 约为 25),然后随着发酵的进行存在一定程度的降低。过程中葡萄糖快速消耗并产生 GABA,经过 8 次补加葡萄糖发酵在 64h 结束, GABA 浓度达到最高值为 77.6 g/L,基于消耗的葡萄糖的得率为 0.44 g/g,实际相对得率达到 76.9%。和其他已经报道过的使用 *C. glutamicum* 进行 GABA 生产的结果相比(表 4.5),本研究的结果是目前 *C. glutamicum* 利用葡萄糖一步法生产 GABA 所达到的最高指标。其生产速率达到 1.21 g·L⁻¹·h⁻¹,是基于谷氨酸脱羧酶法生产 GABA 中生产速率最高的,同时该结果也十分接近通过腐胺途径生产 GABA 的 1.34 g·L⁻¹·h⁻¹ ^[213],但得率比通过腐胺途径生产 GABA 高出将近一倍,所以本研究中得到的菌株在 GABA 发酵中具有非常大的优势。本实验充分证明了分泌表达谷氨酸脱羧酶是提高 GABA 浓度、得率以及生产速率十分有效的方法。和分批发酵一样,发酵过程乳酸没有积累,但是谷氨酸存在较大的残留,发酵结束后依然还有将近 18 g/L 的谷氨

酸。这可能和谷氨酸脱羧酶在中性 pH 条件下的酶特性有关。在中性 pH 下谷氨酸脱羧酶的 K_m 值均增加，对底物的亲和力均有所下降^[198, 204]。如果未来能够通过酶工程手段将该酶进行改造，进一步改善其催化性能，GABA 的产量将能够进一步得到提高。同时较高的谷氨酸残留势必对后续 GABA 的分离纯化造成影响。

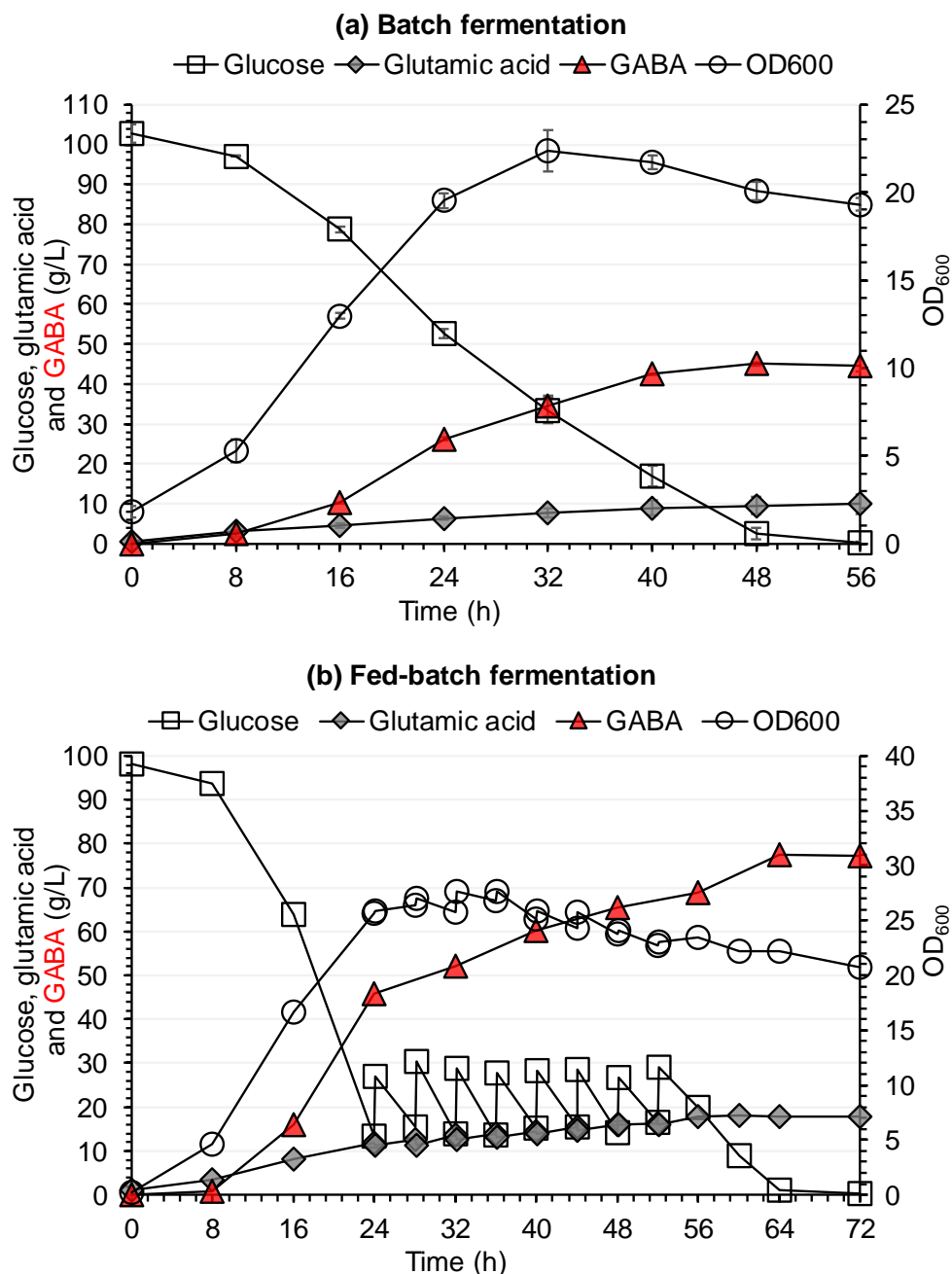


图 4.5 谷氨酸棒状杆菌 XW6-16 在 3L 发酵罐中的 GABA 发酵

Figure 4.5 GABA fermentation in 3L fermentor by *C. glutamicum* XW6-16

注：(a) *C. glutamicum* XW6-16 分批发酵结果；(b) *C. glutamicum* XW6-16 分批补料发酵结果。分批发酵采用添加 25 g/L 玉米浆的复合发酵培养基，发酵条件见材料与方法部分；分批补料发酵采用 Zhang 等^[206]所使用的培养基，在 24-52 h 期间每 4h 补加 50 mL 浓度为 279 g/L 的葡萄糖溶液，具体发酵条件参考 4.2.5 部分。

表 4.5 利用谷氨酸棒状杆菌直接发酵生产 GABA 的结果对比

Table 4.5 Comparison of GABA fermentation results by *Corynebacterium glutamicum*

Cultivation	GABA (g/L)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Source
Batch	2.7	0.02	0.03	[197]
Batch	8.0	0.20	0.31	[212]
Batch	12.4	0.25	0.17	[196]
Batch	26.5	0.21	0.44	[285]
Batch	27.1	0.27	0.44	[284]
Batch	31.1	0.31	0.26	[208]
Batch	45.0	0.44	0.94	This study
Fed-batch	26.3	N/A	0.37	[209]
Fed-batch	29.5	0.21	0.41	[286]
Fed-batch	38.6	0.32	0.54	[201]
Fed-batch	63.2	0.24	1.34 ^a	[213]
Fed-batch	70.6	<0.3 ^b	1.01	[206]
Fed-batch	77.6	0.44	1.21	This study

注：不同文献中报道的得率和生产速率结果均为根据相应文献中报道的结果，采用本论文相同的方法计算得到。

4.3.5 重组菌株利用玉米秸秆水解液发酵生产 GABA

最后我们利用该重组均在木质纤维素原料中进行了 GABA 的生产。培养基采用 30%(w/w)脱毒玉米秸秆水解液，添加 5 g/L (NH₄)₂SO₄ 作为初始氮源，其他营养成分均不添加，进行发酵实验，实验结果如下图 4.6 所示。

如图所示，在发酵过程中，菌株在玉米秸秆水解液中的生长良好，其最大生长 OD 值 (OD₆₀₀) 高达 30 以上。相应的葡萄糖消耗迅速，并且在 36 h 消耗完全。和在复合培养基中不同，在水解液的发酵过程中仅有少量的谷氨酸积累，而乳酸在发酵过程中有生成，但是在发酵后期会被重新利用。GABA 浓度在 40 h 时达到最高，约 39.2 g/L，其相对于葡萄糖的得率约为 0.39 g/g 葡萄糖。虽然得率和浓度相比采用复合培养基进行的分批发酵偏低，但是也能够充分说明利用水解液进行 GABA 生产的可行性和潜力。此外，这一发酵结果也比最近 Baritugo 等^[207]报道的能够同步利用空果串水解液中葡萄糖和木糖进行发酵生产 GABA 的结果 (35.47 g/L) 高，是利用木质纤维素原料进行 GABA 生产所达到的最高指标。同时，水解液中也残留有约 5.4 g/L 的谷氨酸，这远低于采用合成培养基进行发酵时残留的 18 g/L 的谷氨酸。由于 GABA 的生产是以谷氨酸为前体的，所以谷氨酸残留的问题在 GABA 生产过程是不可避免的。目前也有很多的方法可以应用于 GABA 和谷氨酸的分离，如离子交换法、电渗析法等。结合后续对 GABA 发酵过程的进一步优化，这一谷氨酸残留的问题可以得到充分解决。

值得一提的是，本研究所使用的菌株不能够利用水解液中的其他典型的糖如木糖，如果能够进一步将这些糖的利用途径引入 *C. glutamicum* XW6-16 中使其能够同步利用玉米秸秆水解液中糖进行发酵，GABA 的产量一定能够得到进一步的提高。本研究的结

果充分证明该菌株利用木质纤维素原料进行 GABA 生产的潜力, 为进一步降低工业化 GABA 的生产成本, 促进 GABA 的工业化应用奠定基础。

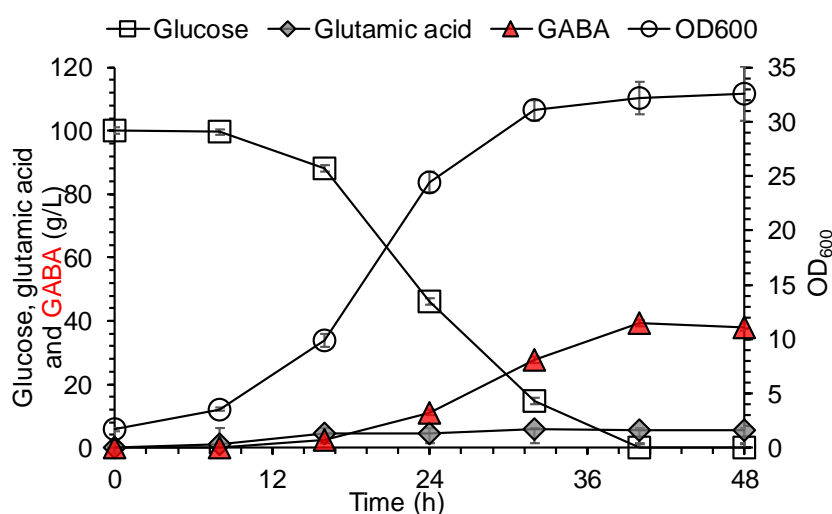


图 4.6 谷氨酸棒状杆菌 XW6-16 利用玉米秸秆水解液发酵生产 GABA

Figure 4.6 GABA production by *C. glutamicum* XW6-16 using corn stover hydrolysate

注: GABA 发酵在发酵罐中进行, 原料为添加了 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为初始氮源的 30% (w/w) 玉米秸秆水解液, 具体发酵条件参考 4.2.5 部分。

4.4 本章小结

本研究以 *C. glutamicum* XW6 为出发菌株, 通过异源表达来自大肠杆菌中的突变谷氨酸脱羧酶并促进其分泌表达, 显著的提高了 *C. glutamicum* 进行 GABA 生产时的浓度、得率以及生产速率, 并成功实现利用玉米秸秆水解液生产高浓度的 GABA。本章节主要结论如下:

(1) 在所选择的谷氨酸脱羧酶中, 自 *E. coli* K12 的经过改造的谷氨酸脱羧酶 GadBmut 的过表达能够成功实现 *C. glutamicum* XW6 在中性 pH 下生产 GABA;

(2) 谷氨酸/ γ -氨基丁酸逆向转运体的共表达对于促进胞内谷氨酸转化为 GABA 效果有限; *CGS9114_RS04950* 基因信号肽无法接到谷氨酸脱羧酶从 TAT 途径分泌表达谷氨酸脱羧酶。但是, 采用 *Ncgl1289* 基因信号肽介导 Sec 通道能够成功实现分泌表达该谷氨酸脱羧酶, 使谷氨酸在胞外转化为 GABA, 从而不用吸收到胞内转化为 GABA 后再分泌到胞外, 能够显著提高 GABA 的生产能力和生产效率。进一步优化分泌表达质粒启动子和敲除 GABA 通透酶编码基因 *gabP* 能够进一步提高 GABA 的产量;

(3) 通过分批补料实验发现, 本研究得到的重组谷氨酸棒状杆菌 XW6-16 具有非常好的 GABA 生产性能, GABA 浓度、得率和生产速率显著提高, 浓度和得率是已见报道的利用 *C. glutamicum* 生产 GABA 的结果中是最高的, 生产速率也是基于谷氨酸脱羧酶生产 GABA 中最高的。该菌株成功利用玉米秸秆原料生产超过 39 g/L 的 GABA, 基于葡萄糖的得率达到 0.44 g/g 葡萄糖, 是基于木质纤维素原料生产 GABA 的最高指标。

第5章 结论与展望

5.1 结论与创新点

本研究利用来源广泛、价格低廉、可再生的木质纤维素生物质替代粮食性淀粉原料,采用实验室开发的干法生物炼制工艺进行谷氨酸和 γ -氨基丁酸的生产。首先对 *Corynebacterium glutamicum* S9114 在玉米秸秆水解液中进行谷氨酸发酵过程研究,确定了生物素对谷氨酸发酵生产的关键作用并对水解液中高生物素存在的原因进行了分析;随后,对该菌株进行代谢工程改造实现真正意义上的纤维素谷氨酸发酵生产;最后通过代谢工程改造解决 *C. glutamicum* 生产 γ -氨基丁酸的关键问题和障碍,实现高浓度纤维素 γ -氨基丁酸的发酵。

本论文的主要结论如下:

(1) *C. glutamicum* S9114 在玉米秸秆水解液中表现出比复合培养基中更好的生长却无法积累谷氨酸。通过进一步的研究发现,抑制物以及营养成分等不是谷氨酸无法积累的关键所在,但是通过青霉素诱导能够生产谷氨酸。通过对胞内胞外生物素的测定以及一系列的验证实验,确定了玉米秸秆水解液中过量存在的生物素是 *C. glutamicum* S9114 正常培养情况下无法积累谷氨酸的关键因素。通过进一步研究发现木质纤维素原料通常含有大量生物素,并且生物素在整个生物炼制过程特别是预处理过程中保持稳定且不会被降解,最终导致水解液中的生物素过量而无法正常积累谷氨酸。此外,通过对原料在预处理前后的其他几种 B 族维生素的测定结果发现,很多 B 族维生素在预处理后都得以保留并且保持相对较高的含量,对基于木质纤维素原料的发酵过程具有一定的促进作用。

(2) 为了解决高生物素导致纤维素谷氨酸无法正常积累的问题,对 *C. glutamicum* S9114 进行代谢工程改造实现高浓度谷氨酸发酵生产。通过对不同代谢工程手段的评估和尝试,我们发现敲除生物素转运蛋白编码基因 *bioY* 的敲除,在一定程度限制生物素吸收的同时显著影响菌体生长,并且该方法仅适合于生物素含量相对较低的条件;而对谷氨酸分泌转运体 MscCG 的羧基端 110 个氨基酸残基的截取能够实现 *C. glutamicum* S9114 在高生物素下不经过诱导的情况下自主分泌谷氨酸。进一步研究发现,通过优化 *odhA* 基因的 RBS 序列,能够使谷氨酸的积累得到显著的提高。得到的菌株表现出比青霉素诱导下的谷氨酸发酵更高的谷氨酸浓度、得率和生产速率,成功实现不经过诱导发酵谷氨酸;但是,在改菌株基础上,进一步表达从磷酸烯醇式丙酮酸到谷氨酸合成途径的关键基因对谷氨酸的积累提升效果非常有限。最终得到的菌株通过玉米秸秆水解液的分批补料发酵实验实现了真正意义上的纤维素谷氨酸发酵突破,充分证明了该菌株具有利用木质纤维素原料粮食性原料生产谷氨酸的潜力。

(3) 为了解决 *C. glutamicum* 生产 γ -氨基丁酸时生产速率、浓度以及得率较低的问题

题,对 *C. glutamicum* 进行代谢工程改造。首先,不同来源谷氨酸脱羧酶的异源表达结果发现来自大肠杆菌的改造谷氨酸脱羧酶能够在谷氨酸发酵条件下生产 GABA。其次,通过共表达谷氨酸/ γ -氨基丁酸逆向转运蛋白来促进谷氨酸胞内转化为 GABA 效果有限。随后尝试通过将该蛋白分泌表达胞外,促进胞外的谷氨酸催化生产 GABA。采用 *Ncgl1289* 基因信号肽介导的 SEC 途径分泌蛋白,能够实现谷氨酸脱羧酶的分泌,并将 GABA 的产量提高 4 倍左右,而采用 *CGS9114_RS04950* 基因的信号肽介导 TAT 途径分泌没有效果。进一步对分泌表达质粒的启动子进行优化以及对 GABA 降解过程中的 *gabP* 基因进行敲除,能够使 GABA 的生产得到进一步提高。最终得到重组菌株在分批补料发酵的情况下,能够利用复合培养基生产超过 77 g/L 的 GABA,显著提高了其生产速率和得率,其浓度、得率和生产速率均为目前所见报道中最高,表现出巨大的生产优势。该菌株同样适用于玉米秸秆水解液生产 GABA,通过分批发酵,GABA 浓度能够达到 39 g/L 以上,得率达到 0.44 g/g 葡萄糖,具备利用木质纤维素原料进行 GABA 生产的潜力。

本论文的创新点如下:

(1) 首次发现典型木质纤维素原料中含有大量存生物素,并且在干法生物炼制过程中保持稳定,并且证明生物素是木质纤维素体系下不能够积累谷氨酸的关键因素;此外还发现预处理过程中其他 B 族维生素也得到比较好的保留,对基于木质纤维素原料的发酵具有促进作用。

(2) 针对高生物素木质纤维素体系不能够积累谷氨酸的问题的代谢工程改造。通过激活谷氨酸分泌通道和削弱而非彻底失活的方法降低 ODHC 活性,在最低限度影响菌体生长的情况下显著提高谷氨酸的积累,实现真正意义上的纤维素谷氨酸发酵。

(3) 通过将谷氨酸脱羧酶分泌表达,使分泌到胞外的谷氨酸能够直接在胞外被谷氨酸脱羧酶催化生成 GABA,从而使 *C. glutamicum* 生产 GABA 的过程得以简化,显著提高了 *C. glutamicum* 生产 GABA 的效率。得到的菌株发酵生产的 GABA 浓度、得率以及生产速率上均处于目前的领先水平。

5.2 展望

本研究针对在利用木质纤维素原料通过干法生物炼制生产谷氨酸和 γ -氨基丁酸过程中的问题进行了分析,并对其中的关键性问题进行了解决,初步实现了利用木质纤维素原料高产谷氨酸和 γ -氨基丁酸,但是要进一步促进利用木质纤维素原料替代性生产谷氨酸和 γ -氨基丁酸,仍然还有一些问题有待进一步的研究和改进。

(1) 由于在谷氨酸生产的代谢工程改造中,不可避免的需要削弱 ODHC 的活性,而由于 ODHC 活性减弱而削弱的 TCA 循环会一定程度上影响菌体生长以及对抑制物的耐受性,通过驯化或者代谢工程手段提高该重组菌株对抑制物的耐受性,能够进一步提高菌株的谷氨酸发酵性能;

(2) 在代谢工程改造生产 γ -氨基丁酸的研究中,由于谷氨酸脱羧酶在中性 pH 活性

下降的问题，发酵过程中特别是分批补料发酵过程中依然有大量的谷氨酸残留。通过进一步的优化谷氨酸脱羧酶的分泌表达过程以及对谷氨酸脱羧酶的进一步改造，能够进一步促进 GABA 的生产；还可以进一步尝试采用细胞表达展示法，将谷氨酸脱羧酶表达至细胞表面，有利于提高谷氨酸脱羧酶的稳定性，能够进一步提高 GABA 的生产速率；

(3) 在木质纤维素水解液中还存在大量的 *C. glutamicum* 不能够利用戊糖以及寡糖如木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等，通过代谢工程改造，使其能够同步利用木质纤维素原料中的这些糖，谷氨酸和 γ -氨基丁酸的生产指标将得到显著的提高。同时对于后续进一步生产生物基谷氨酸衍生化学品奠定基础；

(4) 目前通过木质纤维素原料生产谷氨酸主要采用水解液，由于水解液糖浓度相对较低，使最终能够得到的谷氨酸和 GABA 浓度不高。后续可以考虑建立同步糖化发酵生产谷氨酸和 GABA 的工艺，开发与之相适应的纤维素谷氨酸和 GABA 的分离纯化工艺，并尝试进一步的工艺放大，以提高纤维素谷氨酸和 γ -氨基丁酸工业化生产的潜力。

参考文献

- [1] Wu G, Zhang Y-J. Does China factor matter? An econometric analysis of international crude oil prices. *Energy Policy*. 2014, 72:78-86.
- [2] Hache E, Lantz F. Speculative trading and oil price dynamic: A study of the WTI market. *Energy Economics*. 2013, 36:334-340.
- [3] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 69(6):627-642.
- [4] Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science*. 2010, 329(5993):790-792.
- [5] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454(7206):841-5.
- [6] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, 83(1):1-11.
- [7] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2005, 44(22):3358-3393.
- [8] Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(4):860-870.
- [9] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2012, 6(4):465-482.
- [10] Kotarska K, Swierczynska A, Dziemianowicz W. Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation: Study on the decomposition of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*. 2015, 75:389-394.
- [11] Walker LP, Wilson DB. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. *Bioresource Technology*. 1991, 36(1):3-14.
- [12] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, 39(1):133-40.
- [13] Liu G, Zhang Q, Li H, Qureshi AS, Zhang J, Bao X, Bao J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115(1):60-69.
- [14] Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*. 2011, 2011:787532.
- [15] Yi Z, Zhongli P, Ruihong Z. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*. 2009, 2(3):51-68.

- [16] Zhu JY, Pan XJ. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13):4992-5002.
- [17] Tao L, Aden A, Elander RT, Pallapolu VR, Lee YY, Garlock RJ, Balan V, Dale BE, Kim Y, Mosier NS, Ladisch MR, Falls M, Holtzaple MT, Sierra R, Shi J, Ebrik MA, Redmond T, Yang B, Wyman CE, Hames B, Thomas S, Warner RE. Process and technoeconomic analysis of leading pretreatment technologies for lignocellulosic ethanol production using switchgrass. *Bioresource Technology*. 2011, 102(24):11105-11114.
- [18] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13):4851-4861.
- [19] Rajendran K, Drielak E, Sudarshan Varma V, Muthusamy S, Kumar G. Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2017, 8(2):471-483.
- [20] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9(9):1621-51.
- [21] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of Reactor Corrosion by Eliminating Liquid-Phase Existence in Dry Dilute Acid Pretreatment of Corn Stover. *Energy & Fuels*. 2017, 31(6):6140-6144.
- [22] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158:360-4.
- [23] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6):4480-8.
- [24] Kothari UD, Lee YY. Inhibition Effects of Dilute-Acid Prehydrolysate of Corn Stover on Enzymatic Hydrolysis of Solka Floc. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, 165(5-6):1391-1405.
- [25] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1):25-33.
- [26] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199:103-112.
- [27] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular Adaptation Mechanisms Employed by Ethanologenic Bacteria in Response to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9(6):598-612.
- [28] Dunlop AP. Furfural Formation and Behavior. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1948, 40(2):204-209.

- [29] J. Ulbricht R, J. Northup S, A. Thomas J. A review of 5-hydroxymethylfurfura HMF in parental solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1984, 4(5):843-53.
- [30] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hagerdal B, Liden G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4):340-349.
- [31] Bardet M, Robert DR, Lundquist K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. *Svensk Papperstidning*. 1985, 88:61-67.
- [32] Catherine L, Rolando C, Monties B. Characterization of Poplar Lignins Acidolysis Products: Capillary Gas-Liquid and Liquid-Liquid Chromatography of Monomeric Compounds. *Holzforschung*. 1983, 37(4):189-198.
- [33] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66(1):10-26.
- [34] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1):16.
- [35] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2004, 39(11):1533-1542.
- [36] Chandel AK, Silva SSD, Singh OV. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenergy Research*. 2013, 6(1):388-401.
- [37] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6(5):316-8.
- [38] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:26.
- [39] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9:19.
- [40] Taherzadeh MJ, Karimi K. Acid-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *Bioresources*. 2007, 2(3):472-499.
- [41] Ladisch MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 1983, 5(2):82-102.
- [42] Coughlan MP, Ljungdahl LG. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. *FEMS symposium - Federation of European Microbiological Societies*. 1988, (43):11-30.
- [43] Duff SJB, Murray WD. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to

- fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 1996, 55(1):1-33.
- [44] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4):718-28.
- [45] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol. *Bioresource Technology*. 2017, 245(Pt A):18-26.
- [46] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4):1109-1117.
- [47] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, Coccia V, Petrozzi A, Ingles D, Pompili E. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69:424-432.
- [48] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2000, 25(4):184-192.
- [49] Ask M, Olofsson K, Di Felice T, Ruohonen L, Penttila M, Liden G, Olsson L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47(10):1452-1459.
- [50] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic l-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 2017, 249:9-15.
- [51] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer d-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245(Pt B):1369-1376.
- [52] Zhou PP, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresource Technology*. 2017, 224:563-572.
- [53] Kiss AA, Lange JP, Schuur B, Brilman DWF, van der Ham AGJ, Kersten SRA. Separation technology-Making a difference in biorefineries. *Biomass & Bioenergy*. 2016, 95:296-309.
- [54] Huang HJ, Ramaswamy S, Tschirner UW, Ramarao BV. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*. 2008, 62(1):1-21.
- [55] 周奇圣. 高固体含量木质纤维素原料同步糖化与发酵体系的固液分离. 华东理工大学, 2018.
- [56] Liu G, Bao J. Evaluation of electricity generation from lignin residue and biogas in cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2017, 243:1232-1236.
- [57] Zhang H, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*

- from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203:211-9.
- [58] Zhang H, Han X, Wei C, Bao J. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 224:573-580.
- [59] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution - harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22(4):590-594.
- [60] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12(1):64.
- [61] Nilsson A, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hagerdal B, Liden G. Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(12):7866-7871.
- [62] Wang X, Yomano LP, Lee JY, York SW, Zheng HB, Mullinnix MT, Shanmugam KT, Ingram LO. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(10):4021-4026.
- [63] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical reviews in biotechnology* 2011, 31(1):20-31.
- [64] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1):151.
- [65] Shen Y, Li HX, Wang XN, Zhang XR, Hou J, Wang LF, Gao N, Bao XM. High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014, 41(11):1637-1645.
- [66] Nieves LM, Panyon LA, Wang X. Engineering Sugar Utilization and Microbial Tolerance toward Lignocellulose Conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015, 3:17.
- [67] Yang Y, Hu M, Tang Y, Geng B, Qiu M, He Q, Chen S, Wang X, Yang S. Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2018, 5(1):6.
- [68] Wang X, Khushk I, Xiao Y, Gao Q, Bao J. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(1):377-388.
- [69] Yao R, Hou W, Bao J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 244(Pt 1):1188-1192.

- [70] Elander RT, Dale BE, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY, Mitchinson C, Saddler JN, Wyman CE. Summary of findings from the Biomass Refining Consortium for Applied Fundamentals and Innovation (CAFI): corn stover pretreatment. *Cellulose*. 2009, 16(4):649-659.
- [71] Wang J, Hu M, Zhang H, Bao J. Converting Chemical Oxygen Demand (COD) of Cellulosic Ethanol Fermentation Wastewater into Microbial Lipid by Oleaginous Yeast *Trichosporon cutaneum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 182(3):1121-1130.
- [72] Jojima T, Omumasaba CA, Inui M, Yukawa H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85(3):471-80.
- [73] Jojima T, Inui M, Yukawa H. Metabolic engineering of bacteria for utilization of mixed sugar substrates for improved production of chemicals and fuel ethanol. *Biofuels*. 2011, 2(3):303-313.
- [74] Kim JH, Shoemaker SP, Mills DA. Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. *Microbiology-Sgm*. 2009, 155:1351-1359.
- [75] Baritugo KAG, Kim HT, David YC, Choi JH, Choi JI, Kim TW, Park C, Hong SH, Na JG, Jeong KJ, Joo JC, Park SJ. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a potential platform microorganism for biorefinery. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 2018, 12(5):899-925.
- [76] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 62(2-3):99-109.
- [77] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1-3):155-172.
- [78] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey DA, Rückert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegräbe I, Tauch A. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1-3):5-25.
- [79] Follmann M, Ochrombel I, Kramer R, Trotschel C, Poetsch A, Rückert C, Huser A, Persicke M, Seiferling D, Kalinowski J, Marin K. Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics*. 2009, 10:621.
- [80] Yang J, Yang S. Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids. *BMC Genomics*. 2017, 18(Suppl 1):940.

- [81] Kataoka M, Hashimoto KI, Yoshida M, Nakamatsu T, Horinouchi S, Kawasaki H. Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 42(5):471-6.
- [82] Inui M, Suda M, Okino S, Nonaka H, Puskas LG, Vertes AA, Yukawa H. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology*. 2007, 153(Pt 8):2491-504.
- [83] Milse J, Petri K, Ruckert C, Kalinowski J. Transcriptional response of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to hydrogen peroxide stress and characterization of the OxyR regulon. *Journal of Biotechnology*. 2014, 190:40-54.
- [84] Chen C, Pan J, Yang X, Xiao H, Zhang Y, Si M, Shen X, Wang Y. Global transcriptomic analysis of the response of *Corynebacterium glutamicum* to ferulic acid. *Archives of Microbiology*. 2017, 199(2):325-334.
- [85] Hirasawa T, Saito M, Yoshikawa K, Furusawa C, Shmizu H. Integrated Analysis of the Transcriptome and Metabolome of *Corynebacterium glutamicum* during Penicillin-Induced Glutamic Acid Production. *Biotechnology Journal*. 2018, 13(5)
- [86] Kromer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C. In-Depth Profiling of Lysine-Producing *Corynebacterium glutamicum* by Combined Analysis of the Transcriptome, Metabolome, and Fluxome. *Journal of Bacteriology*. 2004, 186(6):1769-1784.
- [87] Wendisch VF, Bott M, Kalinowski J, Oldiges M, Wiechert W. Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *Journal of Biotechnology*. 2006, 124(1):74-92.
- [88] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 1994, 145(1):69-73.
- [89] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, Shin JH, Yang D, Jang J, Lee SY. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*. 2017, 42:157-167.
- [90] Jiang Y, Qian F, Yang J, Liu Y, Dong F, Xu C, Sun B, Chen B, Xu X, Li Y, Wang R, Yang S. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications*. 2017, 8:15179.
- [91] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1-3):287-299.
- [92] Park JU, Jo JH, Kim YJ, Chung SS, Lee JH, Lee HH. Construction of heat-inducible expression vector of *Corynebacterium glutamicum* and *C. ammoniagenes*: fusion of lambda operator with promoters isolated from *C. ammoniagenes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 18(4):639-47.
- [93] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, Chen GQ. The impact of PHB accumulation on L-glutamate

- production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2007, 132(3):273-9.
- [94] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23(4):631-640.
- [95] Lessmeier L, Hoefener M, Wendisch VF. Formaldehyde degradation in *Corynebacterium glutamicum* involves acetaldehyde dehydrogenase and mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Microbiology*. 2013, 159(Pt 12):2651-62.
- [96] Park H-S, Um Y, Sim SJ, Lee SY, Woo HM. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry*. 2015, 50(3):347-356.
- [97] Sakai S, Tsuchida Y, Nakamoto H, Okino S, Ichihashi O, Kawaguchi H, Watanabe T, Inui M, Yukawa H. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(7):2349-53.
- [98] Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, Ishii J, Hasunuma T, Kondo A. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(20):8675-83.
- [99] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1):77-89.
- [100] Jojima T, Inui M, Yukawa H. Biorefinery Applications of *Corynebacterium glutamicum*. In: Yukawa H, Inui M, eds. *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013:149-172.
- [101] Wendisch VF, Brito LF, Gil Lopez M, Hennig G, Pfeifenschneider J, Sgobba E, Veldmann KH. The flexible feedstock concept in Industrial Biotechnology: Metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. *Journal of Biotechnology*. 2016, 234:139-57.
- [102] Gopinath V, Meiswinkel TM, Wendisch VF, Nampoothiri KM. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92(5):985-96.
- [103] Meiswinkel TM, Gopinath V, Lindner SN, Nampoothiri KM, Wendisch VF. Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine. *Microbial Biotechnology*. 2013, 6(2):131-40.
- [104] Jo S, Yoon J, Lee SM, Um Y, Han SO, Woo HM. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* to improve xylose utilization and succinate production. *Journal of Biotechnology*. 2017, 258:69-78.
- [105] Yim SS, Choi JW, Lee SH, Jeong KJ. Modular Optimization of a Hemicellulose-

- Utilizing Pathway in *Corynebacterium glutamicum* for Consolidated Bioprocessing of Hemicellulosic Biomass. *ACS Synthetic Biology*. 2016, 5(4):334-43.
- [106] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertes AA, Inui M, Yukawa H. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 77(5):1053-1062.
- [107] Schneider J, Niermann K, Wendisch VF. Production of the amino acids l-glutamate, l-lysine, l-ornithine and l-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2011, 154(2):191-198.
- [108] Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 85(1):105-115.
- [109] Hyeon JE, Jeon WJ, Whang SY, Han SO. Production of minicellulosomes for the enhanced hydrolysis of cellulosic substrates by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 48(4-5):371-377.
- [110] Wendisch VF. Microbial Production of Amino Acid-Related Compounds. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*. 2017, 159:255-269.
- [111] Kogure T, Inui M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(20):8685-8705.
- [112] Buschke N, Schroder H, Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose. *Biotechnology Journal*. 2011, 6(3):306-317.
- [113] Kind S, Jeong WK, Schroder H, Wittmann C. Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane. *Metabolic Engineering*. 2010, 12(4):341-351.
- [114] Smith KM, Cho KM, Liao JC. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 87(3):1045-1055.
- [115] Okino S, Suda M, Fujikura K, Inui M, Yukawa H. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 78(3):449-454.
- [116] Inui M, Murakami S, Okino S, Kawaguchi H, Vertes AA, Yukawa H. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2004, 7(4):182-196.
- [117] 李德衡, 贾召鹏, 刘建阳. 谷氨酸行业现状及其发展趋势. 2013 中国生物发酵产业年会论文集. 上海, 2013:1-3.
- [118] Liu L, Yoshimura T, Endo K, Kishimoto K, Fuchikami Y, Manning JM, Esaki N, Soda K. Compensation for D-Glutamate Auxotrophy of *Escherichia coli* WM335 by D-Amino Acid Aminotransferase Gene and Regulation of murI Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998, 62(1):193-195.

- [119] Kumar R, Vikramachakravarthi D, Pal P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2014, 81:59-71.
- [120] Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013, 45(3):413-418.
- [121] Sano C. History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, 90(3):728S-732S.
- [122] Dencausse L, Clamou J-L, Lacroix MG, Artaud MJ. Salts of N-acyl-L-aspartate-beta-mono-ester and/or of N-acyl-L-glutamate-gamma-monoester, the process for preparing them and their use in therapeutic or cosmetic compositions: Laboratoires Aseptia, 2004.
- [123] Bajaj I, Singhal R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10):5551-5561.
- [124] Xu N, Wei L, Liu J. Biotechnological advances and perspectives of gamma-aminobutyric acid production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2017, 33(3):64.
- [125] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass. vol. I: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas: Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy, Washington, DC., 2004:69.
- [126] Nakamori S. Early History of the Breeding of Amino Acid-Producing Strains. In: Yokota A, Ikeda M, eds. *Amino Acid Fermentation*. Tokyo: Springer Japan, 2017:35-53.
- [127] Kinoshita S, Uda S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation - Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1957, 50(6):331-343.
- [128] Mei J, Xu N, Ye C, Liu L, Wu J. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* S9114. *Gene*. 2016, 575(2 Pt 3):615-22.
- [129] Peters-Wendisch PG, Wendisch VF, Paul S, Eikmanns BJ, Sahm H. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 1997, 143(4):1095-1103.
- [130] Eikmanns BJ, Thum-Schmitz N, Eggeling L, Lüttke K-U, Sahm H. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*. 1994, 140(8):1817-1828.
- [131] 陈宁. 氨基酸工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [132] Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* *NCgl1221* gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(14):4491-8.
- [133] Gande R, Gibson KJ, Brown AK, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, Shioyama S, Oikawa T, Besra GS, Eggeling L. Acyl-CoA carboxylases (accD2 and accD3), together with a unique polyketide synthase (Cg-pks), are key to mycolic acid biosynthesis in

- Corynebacterianae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Biological Chemistry. 2004, 279(43):44847-57.
- [134] Heath R, Jackowski S, Rock C. Chapter 3 Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes. New Comprehensive Biochemistry. 2002, 36:55-92.
- [135] Hatakeyama K, Kobayashi M, Yukawa H. Analysis of biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: *Brevibacterium flavum*. Methods in Enzymology. 1997, 279:339-48.
- [136] Shibukawa M, Takahashi H, Ohsawa T. L-Glutamic Acid Fermentation with Molasses: Part V Relation between Biotin and Oleate to the Extracellular Accumulation of L-Glutamate. Agricultural and Biological Chemistry. 1965, 29(9):813-823.
- [137] 李华玮, 苏庆辉, 李志江, 戴凌燕. 谷氨酸生产行业现状综合分析. 农产品加工 (学刊). 2005, (08):65-67.
- [138] Eggeling L, Krumbach K, Sahm H. L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why is penicillin treatment or tween addition doing the same? Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2001, 3(1):67-68.
- [139] Delaunay S, Lapujade P, Engasser JM, Goergen JL. Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2002, 28(6):333-7.
- [140] Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, Nagahisa K, Kimura E, Shioya S. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2003, 25(5):291-8.
- [141] Hasegawa T, Hashimoto K, Kawasaki H, Nakamatsu T. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2008, 105(1):12-9.
- [142] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, Kawahara Y, Matsui K, Osumi T, Nakamatsu T. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73(4):1308-19.
- [143] Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. The Journal of Biological Chemistry. 2006, 281(18):12300-7.
- [144] Schultz C, Niebisch A, Gebel L, Bott M. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007, 76(3):691-700.
- [145] Kim J, Hirasawa T, Saito M, Furusawa C, Shimizu H. Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011, 91(1):143-51.

- [146] Boulahya K-A, Guedon E, Delaunay S, Schultz C, Boudrant J, Bott M, Goergen J-L. OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 87(5):1867-1874.
- [147] Hirasawa T, Wachi M. Glutamate Fermentation-2: Mechanism of L-Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2016, 159:57-72.
- [148] Takinami K, Yoshii H, Yamada Y, Okada H, Kinoshita K. Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acid. *Amino Acids Nucleic Acids*. 1968, 18:120-160.
- [149] Demain AL, Birnbaum J. Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Current topics in microbiology and immunology*. 1968, 46:1-25.
- [150] Takinami K, Okada H, Tsunod T. Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation: Part II. Effective Chemical Structure of Fatty Acid Derivatives on the Accumulation of L-Glutamic Acid in Biotin Sufficient Medium. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1964, 28(2):114-119.
- [151] Nara T, Samejima H, Kinoshita S. Effect of penicillin on amino acid fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1964, 28(2):120-124.
- [152] Nampoothiri CHBBK. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 58(1):89-96.
- [153] Hashimoto K, Kawasaki H, Akazawa K, Nakamura J, Asakura Y, Kudo T, Sakuradani E, Shimizu S, Nakamatsu T. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2006, 70(1):22-30.
- [154] Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T, Tokuda H. A *dtsR* Gene-Disrupted Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* Requires Fatty Acids for Growth and Efficiently Produces L-Glutamate in the Presence of an Excess of Biotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997, 234(1):157-161.
- [155] Kimura E. Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in coryneform bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, 94(6):545-51.
- [156] Hirasawa T, Wachi M, Nagai K. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182(10):2696-701.
- [157] Hirasawa T, Wachi M, Nagai K. L-glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum ltsA* mutant strains. *BMC Biotechnology*. 2001, 1:9.
- [158] Hoischen C, Krämer R. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(6):3409.
- [159] Wang Y, Cao GQ, Xu DY, Fan LW, Wu XY, Ni XM, Zhao SX, Zheng P, Sun JB, Ma YH. A Novel *Corynebacterium glutamicum* L-Glutamate Exporter. *Applied and*

- Environmental Microbiology. 2018, 84(6):e02691-17.
- [160] Hashimoto K-i, Nakamura K, Kuroda T, Yabe I, Nakamatsu T, Kawasaki H. The Protein Encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum* Functions as a Mechanosensitive Channel. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2010, 74(12):2546-2549.
- [161] Becker M, Borngen K, Nomura T, Battle AR, Marin K, Martinac B, Kramer R. Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1828(4):1230-40.
- [162] Nakayama Y, Yoshimura K, Iida H. A gain-of-function mutation in gating of *Corynebacterium glutamicum* *NCgl1221* causes constitutive glutamate secretion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(15):5432-4.
- [163] Boerngen K, Battle AR, Moeker N, Morbach S, Marin K, Martinac B, Kraemer R. The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2010, 1798(11):2141-2149.
- [164] Yamashita C, Hashimoto K, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* *NCgl1221* mechanosensitive channel. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2013, 77(5):1008-13.
- [165] 何剑虹. 发酵法生产谷氨酸 40 年回顾. 2005 年全国氨基酸生产技术交流会暨纪念发酵法生产谷氨酸 40 周年大会论文集. 天津, 2005:29-33.
- [166] Pal P, Dekonda VC, Kumar R. Fermentative production of glutamic acid from renewable carbon source: Process intensification through membrane-integrated hybrid bio-reactor system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015, 92:7-17.
- [167] Calik G, Berk M, Boyaci FG, Calik P, Takac S, Ozdamer TH. Pretreatment processes of molasses for the utilization in fermentation processes. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology, Vol 4*. 2001, 4:21-28.
- [168] 李红波, 贺玉明, 俞建良, 王晓丽, 白长胜. 谷氨酸生产中生物素含量的检测. *中国酿造*. 2013, (07):71-73+100.
- [169] 姚辉, 张建华, 毛忠贵. 谷氨酸棒状杆菌的谷氨酸分泌模式初探. *食品与发酵工业*. 2013, (05):54-58.
- [170] 李燕军, 范晓光. 氨基酸发酵工业中原料替代的思考. *发酵科技通讯*. 2015, (02):57-64.
- [171] Wang J, Gao Q, Zhang H, Bao J. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218:892-901.
- [172] Hu M, Wang J, Gao Q, Bao J. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 281:81-86.

- [173] Zhang H, Liu G, Zhang J, Bao J. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219:123-131.
- [174] Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*. 1999, 4(11):446-452.
- [175] Bouché N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*. 2004, 9(3):110-115.
- [176] Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1999, 181(11):3525-35.
- [177] Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, De Angelis M, Giuliani G, Meloni M, De Servi B, Gobetti M. Synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86(2):731-741.
- [178] Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular Microbiology*. 1998, 27(2):299-310.
- [179] Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. Free γ -aminobutyric acid in brain. *Journal of Biological Chemistry*. 1950, 187(1):35-39.
- [180] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 213. 2002, 213:1-47.
- [181] Diana M, Quilez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*. 2014, 10:407-420.
- [182] Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of GABA (gamma-aminobutyric acid) by Microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, 43(4):1230-1241.
- [183] Kawasaki N, Nakayama A, Yamano N, Takeda S, Kawata Y, Yamamoto N, Aiba S-i. Synthesis, thermal and mechanical properties and biodegradation of branched polyamide 4. *Polymer*. 2005, 46(23):9987-9993.
- [184] Park SJ, Kim EY, Noh W, Oh YH, Kim HY, Song BK, Cho KM, Hong SH, Lee SH, Jegal J. Synthesis of nylon 4 from gamma-aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013, 36(7):885-92.
- [185] 林亲录, 王婧, 陈海军. γ -氨基丁酸的研究进展. *现代食品科技*. 2008, (05):496-500.
- [186] Shi X, Chang C, Ma S, Cheng Y, Zhang J, Gao Q. Efficient bioconversion of L-glutamate to gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2017, 44(4-5):697-704.
- [187] Ke C, Wei J, Ren Y, Yang X, Chen J, Huang J. Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2018:1-8.
- [188] Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino*

- Acids. 2010, 39(5):1107-16.
- [189] Shi X, Chang C, Ma S, Cheng Y, Zhang J, Gao Q. Efficient bioconversion of l-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2017, 44(4):697-704.
- [190] Wang Q, Liu X, Fu J, Wang S, Chen Y, Chang K, Li H. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17(1):80.
- [191] Ke CR, Yang XW, Rao HX, Zeng WC, Hu MR, Tao Y, Huang JZ. Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Springerplus*. 2016, 5:597.
- [192] Dung Pham V, Somasundaram S, Lee SH, Park SJ, Hong SH. Efficient production of gamma-aminobutyric acid using *Escherichia coli* by co-localization of glutamate synthase, glutamate decarboxylase, and GABA transporter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016, 43(1):79-86.
- [193] Pham VD, Somasundaram S, Park SJ, Lee SH, Hong SH. Co-Localization of GABA Shunt Enzymes for the Efficient Production of Gamma-Aminobutyric Acid via GABA Shunt Pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016, 26(4):710-6.
- [194] Soma Y, Fujiwara Y, Nakagawa T, Tsuruno K, Hanai T. Reconstruction of a metabolic regulatory network in *Escherichia coli* for purposeful switching from cell growth mode to production mode in direct GABA fermentation from glucose. *Metabolic Engineering*. 2017, 43:54-63.
- [195] Woo HM, Park JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2014, 180:43-51.
- [196] Takahashi C, Shirakawa J, Tsuchidate T, Okai N, Hatada K, Nakayama H, Tateno T, Ogino C, Kondo A. Robust production of gamma-amino butyric acid using recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012, 51(3):171-6.
- [197] Shi F, Li Y. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnology Letters*. 2011, 33(12):2469-74.
- [198] Thu Ho NA, Hou CY, Kim WH, Kang TJ. Expanding the active pH range of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013, 115(2):154-8.
- [199] Thu Huong D, Jang NY, McDonald KA, Won K. Cross-linked aggregation of glutamate decarboxylase to extend its activity range toward alkaline pH. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2015, 90(11):2100-2105.
- [200] Yu K, Lin L, Hu S, Huang J, Mei L. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH.

- Enzyme and Microbial Technology. 2012, 50(4-5):263-9.
- [201] Choi JW, Yim SS, Lee SH, Kang TJ, Park SJ, Jeong KJ. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range. Microbial Cell Factories. 2015, 14(1):21.
- [202] Takayama M, Matsukura C, Ariizumi T, Ezura H. Activating glutamate decarboxylase activity by removing the autoinhibitory domain leads to hyper gamma-aminobutyric acid (GABA) accumulation in tomato fruit. Plant Cell Reports. 2017, 36(1):103-116.
- [203] Lin L, Hu S, Yu K, Huang J, Yao S, Lei Y, Hu G, Mei L. Enhancing the Activity of Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus brevis* by Directed Evolution. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2014, 22(11-12):1322-1327.
- [204] Shi F, Xie Y, Jiang J, Wang N, Li Y, Wang X. Directed evolution and mutagenesis of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* Lb85 to broaden the range of its activity toward a near-neutral pH. Enzyme and Microbial Technology. 2014, 61-62:35-43.
- [205] Liu Q, Cheng H, Ma X, Xu N, Liu J, Ma Y. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*. Biotechnology Letters. 2016, 38(7):1107-13.
- [206] Zhang R, Yang T, Rao Z, Sun H, Xu M, Zhang X, Xu Z, Yang S. Efficient one-step preparation of γ -aminobutyric acid from glucose without an exogenous cofactor by the designed *Corynebacterium glutamicum*. Green Chemistry. 2014, 16(9):4190.
- [207] Baritugo KA, Kim HT, David Y, Khang TU, Hyun SM, Kang KH, Yu JH, Choi JH, Song JJ, Joo JC, Park SJ. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from empty fruit bunch biosugar solution. Microbial Cell Factories. 2018, 17(1):129.
- [208] Okai N, Takahashi C, Hatada K, Ogino C, Kondo A. Disruption of *pknG* enhances production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase. AMB Express. 2014, 4:20.
- [209] Shi F, Zhang M, Li Y. Overexpression of *ppc* or deletion of *mdh* for improving production of gamma-aminobutyric acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017, 33(6):122.
- [210] Ni Y, Shi F, Wang N. Specific gamma-aminobutyric acid decomposition by *gabP* and *gabT* under neutral pH in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology Letters. 2015, 37(11):2219-27.
- [211] Shi F, Si H, Ni Y, Zhang L, Li Y. Transaminase encoded by *NCgl2515* gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 is involved in γ -aminobutyric acid decomposition. Process Biochemistry. 2017, 55:55-60.
- [212] Jorge JM, Leggewie C, Wendisch VF. A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose. Amino Acids. 2016, 48(11):2519-2531.

- [213] Jorge JM, Nguyen AQ, Perez-Garcia F, Kind S, Wendisch VF. Improved fermentative production of gamma-aminobutyric acid via the putrescine route: Systems metabolic engineering for production from glucose, amino sugars, and xylose. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(4):862-873.
- [214] Vertès AA, Inui M, Yukawa H. The Biotechnological Potential of *Corynebacterium glutamicum*, from Umami to Chemurgy. In: Yukawa H, Inui M, eds. *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013:1-49.
- [215] Becker J, Wittmann C. Advanced Biotechnology: Metabolically Engineered Cells for the Bio-Based Production of Chemicals and Fuels, Materials, and Health-Care Products. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2015, 54(11):3328-3350.
- [216] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. National Renewable Energy Laboratory-NREL/TP-510-42623. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO. 2006.
- [217] Sluiter A, Hames B, R. Ruiz CS, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory-NREL/TP-510-42618. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO. 2012.
- [218] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72:248-54.
- [219] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities: National Renewable Energy Laboratory-NREL/TP-510-42628. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO, 1996.
- [220] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59(2):257-268.
- [221] 云逢霖, 周婉冰. 高产谷氨酸菌 S9114 的选育及生产实绩. *华南理工大学学报(自然科学版)*. 1994, (01):56-62.
- [222] Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *BioEnergy Research*. 2012, 5(4):1020-1026.
- [223] Waller JR, Anderson JK, Ulmer DC. Use of avidin to prepare biotin-free culture media. *Anal Biochem*. 1984, 141(1):189-193.
- [224] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001, 25(4):402-8.
- [225] Zhang H, Lan F, Shi Y, Wan ZG, Yue ZF, Fan F, Lin YK, Tang MJ, Lv JZ, Xiao T, Yi C. A "three-in-one" sample preparation method for simultaneous determination of B-group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast((R)) kits. *Food Chemistry*. 2014, 153:371-7.

- [226] MacBride DE, Wyatt C. Evaluation of a modified AOAC determination for thiamin and riboflavin in foods. *Journal of Food Science*. 1983, 48(3):748-750.
- [227] Bell JG. Microbiological assay of vitamins of the B groups in foodstuffs. *Lab Practice*. 1974, 23(5):235-42 passim.
- [228] Walsh JH. A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *Journal of Food Biochemistry*. 1980, 3(4):175-189.
- [229] Ollilainen V, Finglas PM, van den Berg H, de Froidmont-Gortz I. Certification of B-group vitamins (B1, B2, B6, and B12) in four food reference materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(1):315-21.
- [230] Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16(6-7):253-266.
- [231] Shaw W, Bailey G. Evaluation of two vitamin B12 assay kits and *L. leichmannii* bioassay. *Clinical Biochemistry*. 1974, 7(1):320-325.
- [232] Takinami K, Yoshii H, Tsuru H, Okada H. Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation: Part III Biotin-Tween 60 Relationship in the Accumulation of L-Glutamic Acid and the Growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1965, 29(4):351-359.
- [233] Zhu N, Xia H, Wang Z, Zhao X, Chen T. Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*. *PLoS One*. 2013, 8(4):e60659.
- [234] Gande R, Dover LG, Krumbach K, Besra GS, Sahn H, Oikawa T, Eggeling L. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(14):5257-64.
- [235] Hubbard JS, Hall AN. Effects of biotin on glutamate production and fatty acid composition in *Bacillus cereus* 14B22. *Canadian Journal of Microbiology*. 1968, 14(10):1039-48.
- [236] Takinami K, Yamada Y, Okada H. Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation: Part IV Biotin Content of Growing Cells of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1966, 30(7):674-682.
- [237] CIÉMENT Y, LANÉELLE G. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *Microbiology*. 1986, 132(4):925-929.
- [238] Kim J, Fukuda H, Hirasawa T, Nagahisa K, Nagai K, Wachi M, Shimizu H. Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86(3):911-20.
- [239] Radmacher E, Stansen KC, Besra GS, Alderwick LJ, Maughan WN, Hollweg G, Sahn H, Wendisch VF, Eggeling L. Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium*

- tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 2005, 151(Pt 5):1359-68.
- [240] Momose H, Takagi T. Glutamic Acid Production in Biotin-rich Media by Temperature-sensitive Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a Novel Fermentation Process. *Agricultural and Biological Chemistry*. 2014, 42(10):1911-1917.
- [241] Delaunay S, Gourdon P, Lapujade P, Mailly E, Oriol E, Engasser JM, Lindley ND, Goergen JL. An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, 25(8-9):762-768.
- [242] Wijayarathna CD, Wachi M, Nagai K. Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycan synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 55(4):466-470.
- [243] Ogawara H. Penicillin-binding proteins in Actinobacteria. *Journal of Antibiotics*. 2015, 68(4):223-45.
- [244] Matsushashi M, Wachi M, Ishino F. Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Research in Microbiology*. 1990, 141(1):89-103.
- [245] Schneider J, Peters-Wendisch P, Stansen KC, Gotker S, Maximow S, Kramer R, Wendisch VF. Characterization of the biotin uptake system encoded by the biotin-inducible *bioYMN* operon of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiology*. 2012, 12:6.
- [246] Peters-Wendisch P, Götker S, Heider SA, Komati RG, Nguyen AQ, Stansen KC, Wendisch VF. Engineering biotin prototrophic *Corynebacterium glutamicum* strains for amino acid, diamine and carotenoid production. *Journal of Biotechnology*. 2014, 192:346-354.
- [247] Oura E, Suomalainen H. Biotin-active compounds, their existence in nature and the biotin requirements of yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. 1982, 88(5):299-308.
- [248] Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*. 2002, 41(2):182-96.
- [249] Scheiner J, De Ritter E. Biotin content of feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1975, 23(6):1157-62.
- [250] Baldet P, Alban C, Axiotis S, Douce R. Characterization of biotin and 3-methylcrotonyl-coenzyme a carboxylase in higher plant mitochondria. *Plant Physiology*. 1992, 99(2):450-5.
- [251] Alban C, Job D, Douce R. Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000, 51:17-47.
- [252] Baldet P, Alban C, Axiotis S, Douce R. Localization of free and bound biotin in cells from green pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 303(1):67-73.
- [253] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover:

- National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO., 2011.
- [254] Rucker RB, Zempleni J, Suttie JW, McCormick DB. Handbook of Vitamins. 4th Edition. CRC Press, 2013
- [255] Carpenter KJ, Schelstraete M, Vilicich VC, Wall JS. Immature corn as a source of niacin for rats. Journal of Ethnopharmacology. 1988, 23(2-3):338-339.
- [256] Gregory 3rd J, Litherland SA. Efficacy of the rat bioassay for the determination of biologically available vitamin B-6. Journal of Nutrition. 1986, 116(1):87-97.
- [257] Qi K, Xia XX, Zhong JJ. Enhanced anti-oxidative activity and lignocellulosic ethanol production by biotin addition to medium in *Pichia guilliermondii* fermentation. Bioresource Technology. 2015, 189:36-43.
- [258] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Bioresource Technology. 2005, 96(1):63-67.
- [259] Ko YT, Chipley JR. Role of biotin in the production of lysine by *Brevibacterium lactofermentum*. Microbios. 1984, 40(161-162):161-171.
- [260] Park SH, Kim HU, Kim TY, Park JS, Kim SS, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. Nature Communications. 2014, 5:4618.
- [261] Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. The American Journal of Clinical Nutrition. 1997, 66(6):1388-97.
- [262] Zhao K, Qiao Q, Chu D, Gu H, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. Bioresource Technology. 2013, 135:481-9.
- [263] Farzad S, Mandegari MA, Guo M, Haigh KF, Shah N, Gorgens JF. Multi-product biorefineries from lignocelluloses: a pathway to revitalisation of the sugar industry? Biotechnology for Biofuels. 2017, 10:87.
- [264] Uy D, Delaunay S, Goergen JL, Engasser JM. Dynamics of glutamate synthesis and excretion fluxes in batch and continuous cultures of temperature-triggered *Corynebacterium glutamicum*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2005, 27(3):153-62.
- [265] Delaunay S, Uy D, Baucher MF, Engasser JM, Guyonvarch A, Goergen JL. Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. Metabolic Engineering. 1999, 1(4):334-43.
- [266] Nakayama Y, Becker M, Ebrahimian H, Konishi T, Kawasaki H, Kramer R, Martinac B. The impact of the C-terminal domain on the gating properties of MscCG from *Corynebacterium glutamicum*. Biochimica et Biophysica Acta. 2016, 1858(1):130-8.

- [267] Yim SS, An SJ, Kang M, Lee J, Jeong KJ. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(11):2959-69.
- [268] Hebbeln P, Rodionov DA, Alfandega A, Eitinger T. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(8):2909-14.
- [269] Kim J, Hirasawa T, Sato Y, Nagahisa K, Furusawa C, Shimizu H. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 81(6):1097-106.
- [270] Zhang B, Yu M, Zhou Y, Li Y, Ye BC. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for L-ornithine production. *Microbial Cell Factories*. 2017, 16(1):158.
- [271] Nguyen AQ, Schneider J, Reddy GK, Wendisch VF. Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolites*. 2015, 5(2):211-31.
- [272] Komine-Abe A, Nagano-Shoji M, Kubo S, Kawasaki H, Yoshida M, Nishiyama M, Kosono S. Effect of lysine succinylation on the regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI, involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2017, 81(11):2130-2138.
- [273] Zhang C, Li Y, Ma J, Liu Y, He J, Li Y, Zhu F, Meng J, Zhan J, Li Z, Zhao L, Ma Q, Fan X, Xu Q, Xie X, Chen N. High production of 4-hydroxyisoleucine in *Corynebacterium glutamicum* by multistep metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 2018, 49:287-298.
- [274] Espah Borujeni A, Salis HM. Translation Initiation is Controlled by RNA Folding Kinetics via a Ribosome Drafting Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*. 2016, 138(22):7016-23.
- [275] Peters-Wendisch PG, Schiel B, Wendisch VF, Katsoulidis E, Mockel B, Sahm H, Eikmanns BJ. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001, 3(2):295-300.
- [276] Eikmanns BJ, Rittmann D, Sahm H. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Journal of Bacteriology*. 1995, 177(3):774-82.
- [277] Wada M, Sawada K, Ogura K, Shimono Y, Hagiwara T, Sugimoto M, Onuki A, Yokota A. Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121(2):172-7.

- [278] Guo X, Wang J, Xie X, Xu Q, Zhang C, Chen N. Enhancing the supply of oxaloacetate for L-glutamate production by *pyc* overexpression in different *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Letters*. 2013, 35(6):943-50.
- [279] Baritugo K-A, Kim HT, David Y, Choi J-i, Hong SH, Jeong KJ, Choi JH, Joo JC, Park SJ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(9):3915-3937.
- [280] Becker J, Gießelmann G, Hoffmann SL, Wittmann C. *Corynebacterium glutamicum* for Sustainable Bioproduction: From Metabolic Physiology to Systems Metabolic Engineering. In: Zhao H, Zeng A-P, eds. *Synthetic Biology – Metabolic Engineering*. Cham: Springer International Publishing, 2018:217-263.
- [281] Pham VD, Somasundaram S, Lee SH, Park SJ, Hong SH. Engineering the intracellular metabolism of *Escherichia coli* to produce gamma-aminobutyric acid by co-localization of GABA shunt enzymes. *Biotechnology Letters*. 2016, 38(2):321-7.
- [282] Pham VD, Lee SH, Park SJ, Hong SH. Production of gamma-aminobutyric acid from glucose by introduction of synthetic scaffolds between isocitrate dehydrogenase, glutamate synthase and glutamate decarboxylase in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2015, 207:52-7.
- [283] Shin SM, Kim H, Joo Y, Lee SJ, Lee YJ, Lee SJ, Lee DW. Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62(50):12186-93.
- [284] Shi F, Jiang J, Li Y, Li Y, Xie Y. Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by co-expressing two glutamate decarboxylase genes from *Lactobacillus brevis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2013, 40(11):1285-96.
- [285] Shi F, Luan M, Li Y. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and producing gamma-aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express*. 2018, 8(1):61.
- [286] Wang N, Ni Y, Shi F. Deletion of *odhA* or *pyc* improves production of gamma-aminobutyric acid and its precursor L-glutamate in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Letters*. 2015, 37(7):1473-81.
- [287] Liu X, Zhang W, Zhao Z, Dai X, Yang Y, Bai Z. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017, 37(4):541-551.
- [288] Zhang L, Jia H, Xu D. Construction of a novel twin-arginine translocation (Tat)-dependent type expression vector for secretory production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*. 2015, 82:50-5.
- [289] Yim SS, Choi JW, Lee RJ, Lee YJ, Lee SH, Kim SY, Jeong KJ. Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113(1):163-72.

-
- [290] Simpson DM, Beynon RJ. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *Journal of Proteome Research*. 2010, 9(1):444.
- [291] Koros A, Varga Z, Molnar-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1203(2):146-52.
- [292] Engels V, Lindner SN, Wendisch VF. The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 2008, 190(24):8033-44.

附录 I 仪器设备

名称	型号	生产厂家
紫外可见分光光度计	Biomate-3S	Thermo Scientific
高速冷冻离心机	Avanti J-26	Beckman Coulter, Inc.
立式震荡培养箱	HZ-2111KB	江苏太仓华利达
超声波脱气机	SB-5200D	宁波新芝生物
台式离心机	5418	Eppendorf
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo Scientific
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
隔水式培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒-托利多
高压蒸汽发生器	DZFZ4.5C	上海蒸源机电设备
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
高压蒸汽灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博讯实业有限公司
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏太仓华利达
隔水式恒温培养箱	HZ-9310K-3S	江苏太仓华利达
超净工作台	SW-CJ-1D	沪净净化
锤式粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
生物反应器	BIOTECH-3BG-5L	上海保兴生物
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司
溶氧电极	InPro 6800	瑞士梅特勒-托利多
生物传感分析仪	SBA-90	山东省科学院生物研究所
高效液相色谱	LC-20AD 示差检测器	日本岛津公司
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津公司
超声波细胞粉碎机	JY92-IIN	宁波新芝生物
PCR 仪	T110	美国 BioRad 公司
核酸电泳仪	Tanon EPS100	上海天能科技
凝胶成像系统	Tanon 1600	上海天能科技

附录 II 人工合成的 *gad* 基因序列巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* CICC 10055 中 *gadBM* 基因序列Detailed sequence of *gadM* from *Bacillus megaterium* CICC 10055

1 atgcctcaat ggcacccgca tcgtgaacaa aaaaatttac ctgatgaatt tectgtaat ccgcttttt
71 ctcgacaagg agaagtgaca attccaagac tgcgtatcgg tgatcaaggt atgcttccgg aaacggctta
141 tcaaatcatt catgacgaaa ttgctttaga cggaaatgcc cgcttgaatt tagctacgtt tgttactacg
211 tggatggagc ctgatgcaaa gcgtttgtac ggagaatctt ttgataaaaa tatgatcgat aaagatgagt
281 atccgcagac agcggctatt gaagagagat gtgtacgtat tttagcggat ttgtggaatt cacctaacc
351 tgataccagc atgggcgftt ctactacagg ttcactgaa gcatgtatgc ttggtggact agcgttaaaa
421 agacgatggc agaaactgcg taaaagtaaa gggctatcaa cggaccgcc caatattgta ttagttcat
491 cggttcaagt ggtatgggag aagtccgcaa actattggga cgtagagcct cgttatgtga atattaatcc
561 agatcatcct tatttagatg cagaaggcgt gattaatgcg gttgacgaaa atacaattgg cgtcgtaccg
631 attcttggag tcacgtatac aggggggttac gaaccaatag ctgctatcgc aaaagcatta gatgagtac
701 aggaaaaaac agggttggat attcctatcc atgtagatgc tgcttctgga ggttttatcg ctccatttct
771 tcaaccagac cttatcggg atttccgctt gccgcgagta aagtccatta acgtgacagg acacaagat
841 ggtttagttt accctggctt gggatgggtg atttgagac gaaaagagga cttgcctgaa gatcttattt
911 tccgcgttcc ttatttaggg ggcaacatgc caactttgc gctcaacttc tctagaccag gagcacaagt
981 cttttgcag tactacaatt tcttgcgtt aggtaaagac ggctattatg ccgtgcaaaa aacctccaa
1051 gaaaacgcgc tgtttcttag caaagaaatt ggagaaatgg acgcattcga aattcttctgatggttcag
1121 atatcccggt tcttcttgg aactgaaag aagactatac accaaactgg actctttatg attgtctag
1191 acaactgcgt acgtacggat ggcaagtcc tgettacca ctcccagcag acatggaaga aatcacaatc
1261 atgcgcattg ttgttagaaa tgggttttca agagacctg ctcatfatt tatggtaat tcaacaag
1331 ccgttgaatt tcttaactcg ttggatagac ctgttcttaa agacacgaaa tacgacaatg gatttcatca
1401 ttaa

短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* Lb85 中 *gadBLB85* 基因序列Detailed sequence of *gadBLB85* from *Lactobacillus brevis* Lb85

1 atggctatgt tgtatggaaa acacacgcat gaaacagatg agacgctcat accaatcttc ggggccaccg
71 ctgaacgcca cgacctcccc aaatataaat tggcgaagca cgcgctcgag ccccggaag ccgatcggtt
141 ggttcgcat caactgctag atgaaggaaa ctgcggctg aatctcgcca cgttctgca gacttacatg
211 gaaccggaag ctggtgaact catgaaggat aactggaga aaaacgcat cgataaatcc gattatctc
281 ggaccgctga aattgaaat cgttgcgta atatcattgc caacctctgg catgctccgg aagctgagtc
351 gttcactggc acctcaacga tgggtcctc cgaagctgc atgctggccg gtttggcgat gaagttgct
421 tggcgaagc ggcgaagc gaacgtctt gacttaactg cccatcaacc taatattgc atctcagccg
491 gctatcaagt ttgtgggaa aaattctgtg tctattggga catcgacatg catgctgctt ccatggacga
561 tgaccacatg tcttgaatg tcatcacgt gttagattac gtggatgact acaccattgg tctggtggc
631 attatggga tcaattatac tggacaatac gacgatttag cccgattaga tggcgttgta gacggtata
701 atcggacgac taagtcccc gtatatatcc atgctgatgc cgttccggc ggattttaca cgcgcttat
771 tgaacccgag ctcaagtggg acttccgtt aaacaacgtg atttccatca atgcctccgg ccacaaat
841 ggcttggtt atccggagt cggctgggta atctggcgtg gccaacagta tctacaaaa gatttggct
911 ttaaggcag ctactgggt gtagcctac ctacgatggc catcaactt tcccacagt cctccaatt
981 aatcggcag tattacaact ttattcgtt tggtttgat ggctatcgtg aaattcacga aaaaactcac
1051 gacgtgccc gctatctgc gaaatgctc actaaattag ggggctttt cctcattaac gacggccacg
1121 agttaccgt gatctgtat gaactcactg ccgattctga tctggaatgg acctctacg atttatcca
1191 tggctatta atgaaggct ggcaggtcc cacctatccc ttacaaaaa acatggcgga ccgcttatc
1261 caacggattg tggctgggc tgacttggg atgagtatgg cccacgactt tattgatgat ctaaccaag
1331 ccattcacga tctcgacaa gcacacatg tttccatag tgatccgcaa ctaaaaaat acgggtcac
1401 gcactaa

博士期间研究成果

已发表论文:

Jingbai Wen, Yanqiu Xiao, Ting Liu, Qiuqiang Gao, Jie Bao*. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology for Biofuels**. 2018, 11:132. (SCI IF=5.203, 对应本论文第二章内容)

已接收论文:

Jingbai Wen, Jie Bao*. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin rich corn stover hydrolysate. **Biotechnology for Biofuels**. 2019, 12:86. (SCI IF=5.497, 对应本论文第三章内容)

待发表论文:

Jingbai Wen, Jie Bao*. Improved γ -aminobutyric acid production by extracellular expression of a mutated *gadB* in *Corynebacterium glutamicum*. (待投, 对应本论文第四章内容)

会议论文:

Jingbai Wen, Qiuqiang Gao, Jie Bao*. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cellulosic glutamic acid production using biotin excessive lignocellulose feedstocks. AFOB Summer Forum 2018, Incheon, Korea. (**Poster**)

致谢

值此定稿之际，感慨良多。五年的硕博连读生涯充满艰辛，但更多的是成长和收获。这五年的成长与收获离不开实验室各位老师、师兄师姐的教导和帮助，也离不开父母和亲朋好友的无私支持。

首先，我要感谢我的导师鲍杰教授。鲍老师在整个研究和论文撰写过程投入很多时间和精力，时刻把握科研进展和方向，提供解决学术难题方案，悉心指导论文修改，让我受益匪浅。鲍老师治学严谨、学识渊博、为人师表，是值得我永远学习的榜样。在此毕业之际，谨向鲍老师表示由衷的感谢！

其次，我要感谢高秋强老师、张建老师和刘刚老师，他们在实验、生活和工作方面提供很大的帮助。尤其高老师在论文转录组数据分析整理以及代谢工程改造实验方面给予过大量的指导和帮助。

感谢中科院天津工业生物技术研究所孙际宾老师为我们提供的谷氨酸棒状杆菌基因表达和敲除质粒。

另外，我还要感谢为我提供很多帮助的实验室同仁：感谢刘婷师姐对谷氨酸棒状杆菌发酵相关实验的指导，使我能够快速进入相关的科学研究；感谢易霞老师、张宏森师兄和王娟师姐在我迷茫和实验遇到困难时给我的指导和帮助；感谢王霞师姐、邱忠洋师兄和周平平师姐对谷氨酸棒状杆菌代谢工程相关实验的指导以及金慈师弟对部分实验的帮助；感谢实验室高小创师兄、邵帅师兄、侯伟亮师兄以及韩响身、姚瑞苗、张强、谌泽宇、胡明珊、阚家伦、魏成香、周奇圣、董维涛、李莉、柳云龙、颜钊、赵瞭等对我的帮助和支持。

最后，感谢我的父母和姐姐，你们对我的理解包容和无私支持是我能够顺利完成学业的坚强后盾，没有你们就没有我的今天！

温经柏

2019年5月于上海

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 壹佰零陆 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____