

## 学位论文使用授权声明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华东理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。保密论文在解密后遵守此规定。

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日至\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日）

学位论文作者签名：

指导老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 年 月 日

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 硕士学位论文

谷氨酸棒杆菌合成  $\gamma$ -氨基丁酸的  
代谢工程改造和生物炼制发酵应用

王洁

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

张斌 特聘副研究员 华东理工大学

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物与医药

论文定稿日期: 2025.06.05 论文答辩日期: 2025.06.05

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

## 作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。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：

年 月 日

谷氨酸棒杆菌合成  $\gamma$ -氨基丁酸的代谢工程改造和生物炼制发酵应用

## 摘要

$\gamma$ -氨基丁酸是一种重要的生物基化学品，在食品、农业和材料领域均有广泛应用。微生物发酵法是  $\gamma$ -氨基丁酸的主要生产方式。以木质纤维素生物质为原料，通过预处理、脱毒、酶解糖化的生物炼制方法制备可发酵单糖，应用于  $\gamma$ -氨基丁酸生产可以大幅降低其生产成本。谷氨酸棒杆菌对木质纤维素生物炼制过程中产生的抑制物有较强的耐受性，而其谷氨酸发酵能力可以为  $\gamma$ -氨基丁酸合成提供谷氨酸前体，是生物炼制发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸的重要宿主菌。谷氨酸棒杆菌没有内源性的谷氨酸脱羧酶，需要异源表达谷氨酸脱羧酶才能实现  $\gamma$ -氨基丁酸的合成。前期的研究已经实现了携带谷氨酸脱羧酶表达质粒的谷氨酸棒杆菌菌株进行  $\gamma$ -氨基丁酸发酵生产。但是，上述工作构建的重组谷氨酸棒杆菌所携带的谷氨酸脱羧酶表达质粒在传代过程中不稳定，难以适应工业生产，而添加抗生素维持质粒稳定遗传又会增加生产成本和环境污染，而且上述重组菌株液不具备木糖代谢能力。针对上述问题，本文在一株具备木糖代谢能力的谷氨酸棒杆菌工程菌上进行了代谢工程改造，实现了谷氨酸脱羧酶基因在基因组水平上的多拷贝整合，并进行了一系列代谢支路基因的敲除，成功地构建了数株可以高效合成  $\gamma$ -氨基丁酸且能稳定遗传的谷氨酸棒杆菌工程菌，并以玉米芯残渣生物质为原料，实现了高产量  $\gamma$ -氨基丁酸合成。

首先在谷氨酸生产菌株 *Corynebacterium glutamicum* GJ04 构建含  $\gamma$ -氨基丁酸路径的重组质粒。通过表达谷氨酸脱羧酶基因，构建了一株具有  $\gamma$ -氨基丁酸生产能力的谷氨酸棒杆菌，并在合成培养基合成 18.9 g/L  $\gamma$ -氨基丁酸。在限氮条件下，重组菌株合成  $\gamma$ -氨基丁酸的能力提高到合成培养基的 2.4 倍。

其次是谷氨酸棒杆菌中  $\gamma$ -氨基丁酸的多拷贝基因的基因组整合及代谢路径的优化。通过将分泌表达型谷氨酸脱羧酶在 *C. glutamicum* GJ04 基因组中整合三次，构建无质粒合成  $\gamma$ -氨基丁酸的重组菌株 *C. glutamicum* GJ07。之后，通过敲除异柠檬酸脱氢酶编码基因 *aceA* 和  $\gamma$ -氨基丁酸通透酶编码基因 *gabP* 对代谢通量分布进行优化，构建了重组菌株 *C. glutamicum* GJ09。在摇瓶发酵生产中，重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 的  $\gamma$ -氨基丁酸产量提高到 *C. glutamicum* GJ07 的 1.8 倍。在限氮条件下，重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 发酵生产 GABA 的产量达到  $55.1 \pm 0.7$  g/L。为了进一步提高前体谷氨酸的供应，以 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株表达含有双顺反子结构的谷氨酸脱氢酶基因发现， $\gamma$ -氨基丁酸产量提高 1.47 倍。

最后是在玉米芯残渣水解液测试重组工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的  $\gamma$ -氨基丁酸发

醇能力。结果表明，以玉米芯残渣获得的可发酵单糖为碳源，*C. glutamicum* GJ09 的  $\gamma$ -氨基丁酸产量为  $44.3 \pm 3.8$  g/L，得率为 0.45 g/g。以浓缩的玉米芯残渣糖浆为原料进行补料分批发酵，*C. glutamicum* GJ09 的  $\gamma$ -氨基丁酸最高产量为 63.4 g/L，得率为 0.42 g/g。

综上所述，本文成功在谷氨酸棒杆菌中实现了基因组水平的谷氨酸脱羧酶基因的多拷贝基因的整合，获得了高效合成  $\gamma$ -氨基丁酸的稳定谷氨酸棒杆菌工程菌。以玉米芯残渣为原料进行  $\gamma$ -氨基丁酸发酵生产，达到了较高的发酵产量和得率，为以非粮生物质原料生产  $\gamma$ -氨基丁酸的工业技术奠定了重要基础。

**关键词：** $\gamma$ -氨基丁酸；木质纤维素；谷氨酸棒杆菌；谷氨酸脱羧酶；多拷贝基因整合

## Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for $\gamma$ -Aminobutyric Acid Synthesis and its Biorefinery Fermentation Applications

### Abstract

$\gamma$  - aminobutyric acid (GABA) is an important bio-based chemical that is widely used in the fields of food, agriculture, and materials. Microbial fermentation is the main method for the production of GABA. The biorefinery method of pretreatment, detoxification, and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass can prepare fermentable sugars, and can reduce the production cost of GABA. *Corynebacterium glutamicum* has strong tolerance to the inhibitors produced from pretreatment, and its glutamate fermentation ability can provide the enough glutamate for GABA synthesis. It is an important host strain for the biorefinery fermentation production of GABA. However, *C. glutamicum* contains no endogenous glutamate decarboxylases. It needs to express heterologous glutamate decarboxylase to achieve the synthesis of GABA. Previous studies have realized the fermentation production of GABA by harboring glutamate decarboxylase in expressing plasmid. However, the recombinant *C. glutamicum* strains harbored the glutamate decarboxylase expressing plasmid in the previous work is not suitable for industrial production for their unstable genetics. Moreover, the addition of antibiotics to maintain the stable inheritance of the plasmid will increase production costs and environmental pollution. In addition, the recombinant strains mentioned above can not metabolize xylose. In this study, a xylose-consuming strain of *C. glutamicum* was metabolically engineered. Several *C. glutamicum* strains efficiently synthesize GABA from corncob residue biomass were successfully constructed after the integration of the multiple copies of glutamate decarboxylase gene in the genome and knocking out a series of genes in metabolic pathway.

Firstly, the glutamate-producing strain *C. glutamicum* GJ04 was constructed a plasmid-expression system for GABA production . By expressing the glutamate decarboxylase gene in plasmid, a recombinant GABA-producing *C. glutamicum* strain was successfully constructed. The concentration of GABA in limited nitrogen medium was increased by 2.4 times than that in synthetic one (18.9 g/L).

Secondly, *C. glutamicum* was integrated GABA related genes and the optimization of metabolic pathways . The plasmid-free GABA-producing recombinant strain *C. glutamicum* GJ07 was successfully constructed after the three times of integration of the glutamate decarboxylase gene for secretory expression in multiple copies into the genome of *C. glutamicum* GJ04. Subsequently, the recombinant strain *C. glutamicum* GJ09 was constructed

for the fine tuning the distribution of metabolic flux by knocking out the isocitrate dehydrogenase-encoding gene *aceA* and the GABA permease-encoding gene *gabP* of *C. glutamicum* GJ04. In shake-flask fermentation, the title of GABA of the recombinant strain *C. glutamicum* GJ09 was increased by 1.8 times than that of the control *C. glutamicum* GJ07. Under limited nitrogen conditions, the recombinant strain *C. glutamicum* GJ09 produced  $55.1 \pm 0.7$  g/L of GABA. To further improve the supply of the precursor glutamate, an increase by 1.47 times for the title of glutamate was achieved after expressing the glutamate dehydrogenase gene containing a dual-cistron structure in *C. glutamicum* GJ04.

Finally, the engineered *C. glutamicum* strain GJ09 was investigated the fermentability of GABA in corncob residue hydrolysate. The results showed that *C. glutamicum* GJ09 produced  $44.3 \pm 3.8$  g/L of GABA with the yield of 0.45 g/g using corncob residue as the carbon source. 63.4 g/L of GABA with the yield of 0.42 g/g was produced using concentrated corncob residue syrup in fed-batch fermentation for *C. glutamicum* GJ09.

In all, this work successfully engineered a genetic stable strain *C. glutamicum* efficiently producing GABA by the genome integration of multiple-copies of glutamate decarboxylase encoding gene. The achievement of the better productivity and yield of GABA using corncob residue would establish the technology for GABA production from non-food biomass.

**Keywords:**  $\gamma$ -Aminobutyric Acid; Lignocellulose; *Corynebacterium glutamicum*; Glutamate decarboxylase; Multi-copy integration

## 目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.1.1 生物炼制过程以及加工链.....	1
1.1.2 干法生物炼制技术及应用.....	3
1.2 $\gamma$ -氨基丁酸的发酵生产.....	5
1.2.1 廉价碳源生产 $\gamma$ -氨基丁酸.....	5
1.2.2 $\gamma$ -氨基丁酸生产菌株.....	7
1.2.3 $\gamma$ -氨基丁酸发酵优化.....	8
1.3 谷氨酸棒杆菌合成 $\gamma$ -氨基丁酸的优势与不足.....	9
1.4 本研究的立题依据及研究内容.....	11
第 2 章 $\gamma$ -氨基丁酸质粒表达生产菌株的构建和发酵.....	12
2.1 引言.....	12
2.2 材料与方法.....	12
2.2.1 实验菌株、培养基和发酵条件.....	12
2.2.2 实验所用酶及试剂.....	14
2.2.3 重组质粒的构建.....	14
2.2.4 重组菌株的构建.....	14
2.2.5 GABA 发酵.....	15
2.2.6 分析方法.....	21
2.3 结果与讨论.....	21
2.4 本章小结.....	24
第 3 章 基因组整合谷氨酸脱羧酶及在玉米芯残渣水解液中的发酵.....	25
3.1 引言.....	25
3.2 材料与方法.....	26
3.2.1 实验菌株、培养基和发酵条件.....	26
3.2.2 实验所用酶及试剂.....	26
3.2.3 重组质粒的构建.....	26
3.2.4 重组菌株的构建.....	28
3.2.5 RT-qPCR.....	30
3.2.6 玉米芯残渣水解液的制备.....	30

3.2.7 GABA 发酵.....	30
3.2.8 分析方法.....	31
3.2.9 GABA 得率计算.....	31
3.3 结果与讨论.....	31
3.3.1 谷氨酸棒杆菌基因组整合谷氨酸脱羧酶稳定生产 $\gamma$ -氨基丁酸.....	31
3.3.2 代谢工程改造提高 $\gamma$ -氨基丁酸产量.....	34
3.3.3 谷氨酸棒杆菌工程菌株利用玉米芯残渣水解液发酵生产 $\gamma$ -氨基丁酸.....	34
3.4 本章小结.....	39
第 4 章 结论与展望.....	41
4.1 结论.....	41
4.2 创新点.....	41
4.3 展望.....	42
参考文献.....	43
致谢.....	53
硕士期间研究成果.....	54

## 第1章 文献综述

### 1.1 木质纤维素生物炼制

#### 1.1.1 生物炼制过程以及加工链

木质纤维素生物炼制旨在将各种低价值或负价值的木质纤维素转化为生物基能源、材料和产品<sup>[1]</sup>。目前,生物乙醇、生物丁醇和生物柴油等木质纤维素生物炼制产品可以替代传统汽油和柴油的生物燃料<sup>[2]</sup>,有机酸、溶剂和聚合物等生物基化学品<sup>[3]</sup>,热解和气化木质纤维素产生的可以用于能源供应和土壤改良的生物炭和生物气等<sup>[4]</sup>。随着技术的不断发展和应用,木质纤维素生物炼制将会是生物经济的重要组成部分。

木质纤维素是植物细胞壁的主要成分,主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,还有少量蛋白质和灰分<sup>[3,5]</sup>。纤维素占干重的40-50%,其骨架上的羟基会使纤维素分子间形成紧密的结晶结构,并且具有较高的机械强度,在水和大部分溶剂中溶解度较差<sup>[6]</sup>。半纤维素占干重的25-35%,结构松散,主要由五碳糖和六碳糖组成,含有多种侧链和支链结构。纤维素和半纤维素的溶解需要控制时间和温度等条件,条件剧烈会产生如糠醛和5-羟甲基糠醛等有毒性的降解产物,其降低菌株的发酵效率<sup>[6]</sup>。木质素占干重的15-20%,是一种复杂的芳香族聚合物,具有高度疏水性和化学稳定性,植物细胞壁机械强度高<sup>[7,8]</sup>。

木质纤维素中的纤维素和半纤维素结构复杂不易被分解,为提高后续转化效率,需要对其进行预处理以破坏顽拗性的结构<sup>[9]</sup>。预处理方法主要有物理法、化学法、生物法和组合预处理四大类。物理预处理通过破碎、冷冻、辐射和爆破等手段破坏木质纤维素结构,提高比表面积,降低原料聚合度,但存在能耗高和成本高等缺点<sup>[10]</sup>。化学预处理通过酸、碱或氧化剂等化学试剂将木质纤维素各组分溶解分离,但存在容易产生抑制物,处理后产物难回收,氧化剂成本高等缺点<sup>[11-14]</sup>。生物预处理在微生物或酶的作用下,通过白腐菌和软腐菌等微生物产生木质素降解酶降解木质素,或者通过纤维素酶和半纤维素酶水解纤维素和半纤维素,破坏木质纤维素结构<sup>[15]</sup>,但存在处理效率低和需要空间大等缺点。组合预处理通过物理-化学组合、生物-化学组合、酸碱组合等,结合不同预处理的优点,协同作用下提高木质纤维素的预处理效果,但存在处理时间长和成本高等缺点。各种预处理方法各有优缺点,因此选择合适的高效且低成本的预处理方法需要从以下四方面综合考虑:(1)木质纤维素原料性质。碱预处理法可以有效溶解木质素,但是对于软木类难降解的原料,酸预处理效果更好,但是成本较高<sup>[16]</sup>。(2)糖降解少。预处理过程中,不会造成大量单糖和寡糖的流失。(3)抑制物少<sup>[17]</sup>。预处理过程中产生太多的抑制物会影响后续糖化和发酵效率,因为糖化前需要对预处理后的物料进行脱毒处理,

减少抑制物。(4) 酶水解得率。在预处理后的酶水解过程中, 酶水解得率应该维持较高水平。

高温高压条件下预处理木质纤维素, 不可避免会产生抑制物。主要有呋喃醛类化合物、酚醛类化合物和弱酸类化合物三种抑制物。大量抑制物的存在会影响纤维素酶水解的效率, 抑制菌株生长和发酵性能<sup>[18]</sup>。去除抑制物的过程称为脱毒, 常见的脱毒方法有蒸发或活性炭吸附等物理法, 氨水中和、萃取等化学法, 微生物代谢和酶催化等生物法<sup>[18]</sup>。

预处理木质纤维素原料后剩下的多糖, 主要有纤维素和半纤维素, 通过水解可以将多糖转化为微生物可利用的单糖。酶水解和酸水解是常用的水解方法。酶水解的常用酶是纤维素酶和半纤维素酶。纤维素酶包括内切酶、外切酶、纤维素酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 其将纤维素分解为葡萄糖<sup>[19]</sup>。半纤维素可以通过半纤维素酶分解为木糖、阿拉伯糖和甘露糖等<sup>[20]</sup>。酶水解法效率高, 反应条件温和, 但是酶的价格昂贵, 用量大。酸水解相对而言成本低, 反应迅速, 不会受到底物抑制<sup>[21]</sup>。但是, 酸水解存在腐蚀设备、废液难处理和过度降解可发酵糖等问题。

木质纤维素生物炼制中通过微生物发酵将糖化得到的可发酵主要采用同步糖化与发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 和分步糖化与发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) 两种工艺。SSF 工艺在同一反应器内同步进行纤维素酶解糖化和微生物发酵, 避免了葡萄糖积累对纤维素酶的产物抑制, 维持了较高的酶活性和糖化效率, 同时降低了染菌风险<sup>[22,23]</sup>。然而, 该工艺面临糖化与发酵条件不匹配的难题: 纤维素酶的最适温度 45-50 °C 与酵母、谷氨酸棒杆菌等发酵菌株最适发酵温度 30 °C 存在差距; 纤维素酶最适 pH 4-6 和大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等最适发酵 pH 7 不一致; SSF 体系中木质素残渣与菌体混杂, 既影响发酵过程监测, 又阻碍胞内产物(如蛋白质、油脂等)的后续提取。相比之下, SHF 工艺将糖化和发酵分步进行, 避免了发酵菌株和纤维素酶的之间的相互影响。虽然该工艺存在糖化后期高浓度葡萄糖抑制酶活和木质素残渣去除导致未水解组分损失等问题, 但其发酵液黏度低、传质效果好, 可降低搅拌和通气能耗<sup>[24,25]</sup>。更重要的是, SHF 在发酵前去除了木质素残渣, 方便收集菌体, 产物分离提取难度降低。

最后对产物进行分离与纯化, 提高产物纯度。根据产物的性质和生产规模等, 可以选择不同的分离与纯化方式。

上述生物炼制过程中虽然在生物燃料和生物基产品的生产中发挥了重要的作用, 但是仍然存在一些问题。生物炼制过程中预处理、脱毒和糖化步骤会产生大量废水, 一些废水中还存在酸碱成分, 给环境带来了较大负担的同时增加了废水处理成本和设备成本。还有些方法对木质纤维素原料的利用率低或者能耗高, 造成资源浪费。这些问题限制了生物炼制技术在实际生产中的应用。

### 1.1.2 干法生物炼制技术及应用

本实验室采用的干法生物炼制技术,过程包括干酸预处理、生物脱毒、糖化、发酵、纯化与分离步骤。

干酸预处理克服了生物炼制过程中产生大量废水、腐蚀设备和预处理效率低等问题。干酸预处理在稀酸预处理的基础上,提高原料与预处理反应器的填充比和固/液体预浸泡比两个参数<sup>[26]</sup>。整个反应体系中固含量极高,稀酸溶液和蒸汽量少,物料呈现干固体颗粒状态,不产生含酸废水,还减少了酸溶液对设备的腐蚀<sup>[27]</sup>。反应过程中通过螺带式搅拌桨充分混合木质纤维素原料、稀酸溶液和蒸汽,提高预处理效率<sup>[28]</sup>。这种预处理方法对小麦、玉米等秸秆类木质纤维素都适用,并且反应充分,预处理效率高。

预处理后物料中含有较多糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸等抑制物,需要进行脱毒处理。实验室目前有两株丝状真菌树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 和宛式拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89,可以利用这两株菌进行生物脱毒,去除预处理物料中的抑制物。*A. resinae* ZN1 是从预处理后的玉米秸秆中筛选出的脱毒菌株,通过固态脱毒代谢抑制物<sup>[29]</sup>。但是,*A. resinae* ZN1 在实际应用中存在明显的局限性:该菌株对生长环境要求苛刻,需要在恒定的 30 °C 和中性条件下才能生长和代谢。固体原料混合不均匀,部分温度或 pH 不合适时,菌株脱毒效果变差。此外,该菌株只能用于固态脱毒,更容易在物料表面氧气充足的条件下存活。这些局限性使脱毒过程难以监测、容易损失可发酵糖,还需要庞大的反应器容纳固体原料。更关键的是,开放式的操作方式极易引发染菌问题,不利于规模化生产。相比之下,从稀酸预处理玉米秸秆中新筛选获得的 *P. variotii* FN89 展现出显著优势<sup>[30]</sup>。该嗜中温丝状真菌可以进行液态脱毒,对极端环境适应性更强,能在 pH2.3-10.5 及最高 42 °C 的温度条件下生长。研究发现,完全消耗抑制物后,菌株会产生大量游离脂肪酸降低糖化液 pH 值。这一特性使得通过监测 pH 峰值即可精准判定脱毒终点,从而有效避免过度脱毒造成的可发酵糖损耗<sup>[31]</sup>。这种可监测和可控制的脱毒方式为生物脱毒技术的工业化应用提供了新的可能性。

目前的干法生物炼制工艺主要适用于 SSF 技术,可以应用到糖酸、乳酸和乙醇等胞外产物的生产中。但是如果应用该技术生产胞内产物,会出现较难分离木质素残渣和菌体的情况,影响下游产物的提取效率。若采用 SHF 工艺,糖化结束后分离未水解的固体组分和水解液,会降低可发酵糖浓度和得率,影响后续发酵效率。因此,若要拓展干法生物炼制的范围,使其同样适用于胞内产物的生产,必须优化 SHF 的糖化过程,提高可发酵糖的得率,从而提升整体工艺的经济性和可行性。

干法生物炼制技术可以应用到生物材料、生物燃料和生物基化学品等生产中。以软木为原料,通过中性磺化处理增加纤维的亲水性和酶的可及性,酶处理提高纤维化效率和纤维的可及性,机械处理提高纤维的表面积和分散性,之后分离和纯化出纤维素纳米纤维<sup>[32]</sup>。这种生物材料可以广泛应用于包装、纳米复合材料和薄膜等领域。和化学浆解

纤工艺相比,选择木质纤维素生物质作为生产原料,降低了生产成本,减少了环境污染。对于生物燃料和生物基化学品的生产,选择的木质纤维素原料大部分为玉米或小麦秸秆。这类原料经过干酸预处理后会产生不利于菌株生长和生产的抑制物,因此需要利用脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 或 *P. variotii* FN89 进行脱毒处理。之后通过 SSF 或者 SHF 进行发酵生产。根据不同生产菌株,可以生成不同的产物。目前生产工艺较成熟的产物及产量列于表 1.1。

表 1.1 木质纤维素干法生物炼制的应用

Table 1.1 Applications of dry biorefining of lignocellulosic biomass

产物	木质纤维素原料	脱毒菌株	生产菌株	产量
纤维素乙醇	镉污染稻谷	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>S. cerevisiae</i> XH7	55.2 g/L <sup>[27]</sup>
纤维素乙醇	玉米秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>S. cerevisiae</i> XH7	24.2 g/L <sup>[33]</sup>
纤维素烃	玉米秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>C. glutamicum</i> S9114	16.0 mg/L <sup>[34]</sup>
D-乳酸 (D-丙交酯)	小麦秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>P. acidilactici</i> ZY271	128.0 g/L <sup>[35]</sup>
D-乳酸	软木	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>P. acidilactici</i> ZP26	44.5 g/L <sup>[36]</sup>
L-乳酸 (L-丙交酯)	小麦秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>P. acidilactici</i> ZY271	129.4 g/L <sup>[37]</sup>
L-乳酸	小麦秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>P. acidilactici</i> ZB220	110.4 g/L <sup>[38]</sup>
纤维素油脂	玉米秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>T. cutaneum</i> MS28	33.8 g/L <sup>[39]</sup>
纤维素油脂	小麦秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>T. cutaneum</i> YY52	55.4 g/L <sup>[40]</sup>
纤维素油脂	玉米秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>T. cutaneum</i> YY52	58.4 g/L <sup>[40]</sup>
纤维素单细胞蛋白	小麦秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>T. cutaneum</i> MP11	24.4 g/L <sup>[41]</sup>
纤维素糖酸	玉米秸秆	<i>P. variotii</i> FN89	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	156.0 g/L <sup>[25]</sup>
柠檬酸	玉米秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>A. niger</i> SIIM M288	136.3 g/L <sup>[42]</sup>
3-羟基丁酸酯 (PHB)	小麦秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>C. glutamicum</i> JH02-pPefu-Ncg/phaC	16.2 g/L <sup>[43]</sup>
赖氨酸	小麦秸秆	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>C. glutamicum</i> LJ01-pPefu-PntAB	31.3 g/L <sup>[44]</sup>
戊二胺	玉米芯残渣	无	<i>C. glutamicum</i> LJ02-pXMJ19-Ncg/CadA	78.2 g/L <sup>[45]</sup>

注:玉米芯残渣经过干酸预处理后抑制物含量较低,不需要脱毒处理,直接酶解糖化制备玉米芯残渣水解液。

## 1.2 $\gamma$ -氨基丁酸的发酵生产

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)又称哌啶酸或氨酪酸,分子式是  $C_4H_9NO_2$ , 其含有氨基和羧基。GABA 合成 2-吡咯烷酮(2-pyrrolidone)后可聚合成尼龙 4<sup>[46]</sup>, 可以参与到材料的改性中<sup>[47]</sup>, 也可以合成新型聚酯酰胺等<sup>[48]</sup>。GABA 除了可以应用到材料的合成, 还可以添加剂增加食品风味<sup>[49]</sup>, 也作为植物生长调节剂提高作物抗逆性和产量<sup>[50]</sup>等。GABA 应用广泛, 天然来源提取的  $\gamma$ -氨基丁酸已经无法满足人们日益增长的需求。

目前有化学合成、植物富集和生物合成三种主要的  $\gamma$ -氨基丁酸生产方法<sup>[51]</sup>。化学合成法是最早合成  $\gamma$ -氨基丁酸的方法, 至少有五种常用的合成方法。这些合成方法需要的原料有溴醋酸甲酯和乙烯、氨水和丁酸、甲酸和丙胺、吡咯烷酮、邻苯二甲酰亚氨钾和  $\gamma$ -氯丁氰或丁内酯等, 反应有聚合、 $\gamma$  射线光照、辉光放电等, 可以制出纯度高的 GABA。但是反应剧烈、能耗高、环境不友好、有化学物质残留, 不适用于食品、医药等对产品安全要求高的行业。植物富集法指通过筛选和培育  $\gamma$ -氨基丁酸含量高的植物, 采用柱分离制备或溶剂萃取提纯从植物中提取  $\gamma$ -氨基丁酸<sup>[52]</sup>。GABA 作为信号因子和营养因子存在于植物中<sup>[53]</sup>, 可以通过非生物胁迫触发其在植物中的积累, 有利于提取出更多的 GABA。虽然植物富集法安全无污染, 但是提取难度高、产量低, 不利于工业化生产。生物合成法包括全细胞催化和微生物发酵两类。这两种方法都是谷氨酸经过谷氨酸脱羧酶(Glutamic acid decarboxylase, GAD)催化<sup>[54]</sup>, 催化反应见图 1。这一反应需要 5'-磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-phosphate, PLP)作为辅因子, 促进谷氨酸脱羧酶将谷氨酸转化为  $\gamma$ -氨基丁酸。全细胞催化催化效率高, 产物分离简单, 但是反应过程具有不确定性, 受底物浓度、产物浓度等因素的影响。



图 1 谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸生成  $\gamma$ -氨基丁酸

### 1.2.1 廉价碳源生产 $\gamma$ -氨基丁酸

微生物发酵法进行  $\gamma$ -氨基丁酸的生物合成具有较大的优势, 可以选择的生产菌株种类丰富, 培养条件简单, 生产效益高, 适用于大规模生产。但目前的研究中, 常用的碳源主要是粮食来源的葡萄糖, 一般会选择购买葡萄糖或其他可利用的单糖进行  $\gamma$ -氨基丁酸发酵生产。这不利于“双碳”目标的落实, 难以实现  $\gamma$ -氨基丁酸的可持续生产。因此

寻找廉价的替代性碳源进行  $\gamma$ -氨基丁酸的生产具有重要的意义。

廉价碳源通常是指来源广泛、价格低廉、易于获取的有机化合物，其可以被微生物高效利用进行目标产物的合成。选择合适的碳源可以降低生产成本，提高产量。廉价碳源有乳清、米糠、麸皮和蔗糖等以粮食作物和糖类为主的第一代糖基原料，也有农作物秸秆和甘蔗渣等以木质纤维素为主的非粮生物质原料。第一代糖基原料虽然可以降低  $\gamma$ -氨基丁酸的生产成本，但是这些基于粮食原料的生物基开发可能造成“与人争粮”问题。为了减少粮食为原料的生物质资源的消耗，开发非粮生物质资源至关重要。以木质纤维素为代表的非粮生物质资源丰富，全球每年可供应 1500 亿 t 木质纤维素生原料<sup>[55]</sup>。非粮生物质的开发可以促进农业废弃利用、边际土地开发，还可以降低生物基产品的生产成本、扩大产品规模。目前廉价碳源进行  $\gamma$ -氨基丁酸生产的概况列于表 1.2。

表 1.2 廉价碳源生产  $\gamma$ -氨基丁酸的概况

Table 1.2 Overview of  $\gamma$ -aminobutyric acid production by using cheap carbon sources

低成本碳源	生产菌株	产量
乳糖	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> 9D3	287.4 mg/L <sup>[56]</sup>
乳清蛋白水解物	<i>Lactobacillus brevis</i> M2	3.1 g/L <sup>[57]</sup>
米糠	<i>Lactobacillus brevis</i> VTCC-B397	8.4 g/L <sup>[58]</sup>
蔗糖	<i>Lactobacillus futsaii</i> CS3	23.0 g/L <sup>[59]</sup>
糖蜜	<i>Aspergillus oryzae</i> NSK	354.1 mg/L <sup>[60]</sup>
椰子油饼	<i>Monascus sanguineus</i>	15.5 mg/gds <sup>[61]</sup>
空果串	<i>Corynebacterium glutamicum</i> H36GD1852	35.0 g/L <sup>[62]</sup>
枣渣	<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 <sup>T</sup>	1.0 g/L <sup>[63]</sup>
甘油	<i>Escherichia coli</i> W	0.6 g/L <sup>[64]</sup>
甘油	<i>Corynebacterium glutamicum</i> G7-1	45.6 g/L <sup>[65]</sup>
水稻秸秆	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JMY140K	50.0 mg/L <sup>[66]</sup>
玉米秸秆	<i>Corynebacterium glutamicum</i> XW6-16	39.2 g/L <sup>[67]</sup>
玉米芯残渣	<i>Corynebacterium glutamicum</i> XY24	93.1 g/L <sup>[68]</sup>

虽然乳清、蔗糖和枣渣等廉价碳源可以进行  $\gamma$ -氨基丁酸的生产，但是这些原料来源途径单一， $\gamma$ -氨基丁酸产量偏低，不适用于大规模生产。我国作为农业大国，水稻、小麦、玉米等每年可以产生 7 亿 t 农作物秸秆<sup>[69]</sup>。将大量廉价的秸秆类木质纤维素用于发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸，将会更具有应用前景。然而目前对秸秆类木质纤维素发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸的研究并不多，一方面可能是因为生产  $\gamma$ -氨基丁酸的大肠杆菌不能在木质纤维素体系中正常生长和生产；另一方面可能是因为木质纤维素体系中存在一些非抑制组分，

会干扰微生物发酵生产过程中产物的生成。以谷氨酸工业生产菌株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 为例,木质纤维素体系中含有较多生物素,导致细胞膜的通透性降低,谷氨酸分泌生产受到抑制。因此如果需要以 *C. glutamicum* S9114 为生产菌株,通过谷氨酸脱羧酶的作用生产  $\gamma$ -氨基丁酸,那么首先需要解决 *C. glutamicum* S9114 不能在木质纤维素体系中正常生产谷氨酸的问题。以 *C. glutamicum* S9114 为出发菌株,通过代谢工程改造,敲除谷氨酸分泌通道蛋白 (mechanosensitive channels of *Corynebacterium glutamicum*, MscCG) 碳端的 110 个氨基酸,提高谷氨酸棒杆菌在高生物素环境中分泌生产谷氨酸的能力。弱化 TCA 循环中  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 (oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC),使代谢流更多流向谷氨酸的合成,获得的重组菌株 *C. glutamicum* XW6 可以利用干酸预处理后的玉米秸秆进行谷氨酸的生产,谷氨酸产量有 65.2 g/L<sup>[70]</sup>。以 *C. glutamicum* XW6 为出发菌株,质粒表达分泌表达型谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD),实现  $\gamma$ -氨基丁酸的胞外分泌表达,并敲除 GABA 通透酶编码基因 *gabP*,阻止分泌到胞外的 GABA 被转运至胞内。获得的重组菌株 *C. glutamicum* XW6-16 以玉米秸秆为碳源,生产出的 GABA 产量有 39.2 g/L,以葡萄糖为碳源,通过补料分批发酵,GABA 产量达到 77.6 g/L<sup>[71]</sup>。对  $\gamma$ -氨基丁酸生产菌株 *C. glutamicum* XY24 从糖浓度、氮含量、辅因子添加量、通气量和发酵模式多个发酵条件进行优化,以干酸预处理后的玉米芯残渣为原料,补料分批发酵生产出的 GABA 产量达到 93.1 g/L<sup>[68]</sup>。

### 1.2.2 $\gamma$ -氨基丁酸生产菌株

常见的  $\gamma$ -氨基丁酸天然生产菌株有大肠杆菌、乳酸菌、芽孢杆菌、红曲霉、链球菌和酵母等。这些菌株中,大肠杆菌和乳酸菌的谷氨酸脱羧酶活性较高。大肠杆菌适用范围广,可以在极酸性条件下生存和生产 GABA<sup>[72]</sup>。大肠杆菌基因工程手段成熟,易于操作,生长速度快,转化效率高,是良好的改造对象。敲除或抑制与 GABA 生物合成竞争的 GABA 分流途径获得的重组菌株 *Escherichia coli* GTS,通过葡萄糖补料分批发酵,GABA 产量可以达到 85.9 g/L<sup>[73]</sup>。但是大肠杆菌在生产过程中会产生内毒素,存在安全性问题。乳酸菌虽然含有内源性谷氨酸脱氢酶和谷氨酸脱羧酶,但是自身合成谷氨酸能力有限,无法满足合成  $\gamma$ -氨基丁酸的需求,需要额外添加谷氨酸钠。短乳杆菌是乳酸菌中研究最多的菌株,也是生产 GABA 时产量最高的菌株。短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* NCL912 的 GABA 产量可以达到 205 g/L<sup>[74]</sup>。芽孢杆菌也展现了一定的 GABA 生产能力。芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BBEL02 可以利用工业废料生产出 12.5 g/L 的 GABA<sup>[75]</sup>。红曲霉、链球菌和酵母的谷氨酸脱羧酶活性一般不高,因此 GABA 产量也不高,不适用大规模生产。

谷氨酸棒杆菌虽然不存在天然的合成  $\gamma$ -氨基丁酸的途径,但该菌株是谷氨酸的生产

菌株,可以为 GABA 的合成提供充足的前体。谷氨酸棒杆菌容易进行基因改造,不含内毒素,是公认安全的(Generally recognized as safe, GRAS)菌株,也是理想的 GABA 生产菌株。有研究通过改造谷氨酸棒杆菌,可以同时利用葡萄糖和木糖进行 GABA 的发酵生产<sup>[76]</sup>。谷氨酸棒杆菌生长 pH 为中性,大肠杆菌来源或者乳酸菌来源的谷氨酸脱羧酶最佳 pH 为酸性。虽然两种 pH 不一致,但是可以通过对谷氨酸脱羧酶进行改造,使 pH 差距缩小,提高谷氨酸脱羧酶在中性条件中的活性。而且谷氨酸棒杆菌对木质纤维素体系耐受性较强,可以利用木质纤维素类廉价碳源,降低 GABA 生产成本,适用于工业化生产。

### 1.2.3 $\gamma$ -氨基丁酸发酵优化

不同生产菌株的  $\gamma$ -氨基丁酸生产能力不同,并且大肠杆菌、乳酸菌和谷氨酸棒杆菌等可以通过基因改造提高菌株的  $\gamma$ -氨基丁酸合成能力。除了基因改造手段,发酵条件同样是影响  $\gamma$ -氨基丁酸生成系统整体性能的关键因素。优化发酵条件,对提高产物产量至关重要。

碳氮源对微生物生长和代谢至关重要,菌株的生长和生产会因碳氮源的种类和浓度而有所差异。葡萄糖是微生物生长常用的碳源,但是对于短乳杆菌 *L. brevis*,使用木糖、果糖或阿拉伯糖作为碳源时,可以激活木糖操纵子,显著促进生长和提高产量<sup>[77,78]</sup>。短乳杆菌 *L. brevis* CE701 的发酵培养基中用木糖替代葡萄糖,获得了 176.04 g/L 的 GABA 产量<sup>[79]</sup>。酵母 *Kluyveromyces marxianus* C21 的发酵培养基中用豆渣代替传统培养基对 GABA 的产生有显著的积极影响<sup>[80]</sup>。除了更换碳氮源的种类,碳氮源的浓度也会对菌株生长和产物产量产生影响。在本实验室前期研究发现,利用 *C. glutamicum* XY24 生物合成  $\gamma$ -氨基丁酸时,高浓度的氮源有利于菌体生长但是不利于 GABA 生产。优化培养基培养基中有机氮源玉米浆和无机氮源硫酸铵的浓度后,GABA 产量提升为优化前的 2 倍<sup>[68]</sup>。

发酵技术有两阶段发酵、补料分批发酵和共培养发酵,可以根据实际情况和不同需求采用不同的发酵技术。两阶段发酵可以促进细胞生长并且可以增加 GABA 的产生。有研究采用两阶段发酵法,前期控制 pH 为菌株生长适宜的 pH,后期将 pH 调整为谷氨酸脱羧酶适宜的 pH 用于 GABA 的生产。通过控制不同阶段的 pH 值使短乳杆菌 *L. brevis* CGMCC 1306 达到最佳生长速率和生成速率,GABA 产量提高到 526 mmol/L<sup>[81]</sup>。*C. glutamicum* GB-16 通过两阶段发酵,前期 pH 7.0 适合菌株生长,后期 pH 6.0 更有利于促进谷氨酸脱羧酶的酶活,最终 GABA 的产量达到 81.31 g/L<sup>[82]</sup>。补料分批发酵指前期选择合适的底物初始浓度进行发酵,在发酵过程中不断添加营养物质、底物或前体。该技术可以防止底物消耗,提高细胞密度,增加 GABA 产量。在发酵第 12 h 和 24 h 分别添加 280.7 和 224.56 g 谷氨酸,GABA 的浓度在 48 h 达到 1005.81 mM<sup>[83]</sup>。双歧杆菌

*Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275 重组菌株通过补料分批发酵, 额外添加谷氨酸, 获得浓度为 415 mM 的 GABA<sup>[84]</sup>。共培养发酵指在同一发酵系统中培养多种微生物菌株, 利用不同菌株之间的协同作用, 提高产物的产量。例如一种菌株生产 GABA 合成需要的谷氨酸, 另一种菌株表达高活性的谷氨酸脱羧酶, 提高 GABA 的产量<sup>[85]</sup>。有研究共培养撕裂蜡孔菌 *Ceriporia lacerate* 和植物乳杆菌 *L. plantarum* K154, *C. lacerate* 用于生产蛋白酶、胞外多糖、纤维素等有利于 *L. plantarum* K154 生长的营养物质, 最终生成 15.53 mg/mL GABA<sup>[86]</sup>。用乳制品生产 GABA 时, 短乳杆菌 *L. brevis* 蛋白水解活性差, 无法在牛奶中生存, 但是将 *L. brevis* 877G 与产生蛋白酶的菌株酒红乳杆菌 *L. sakei* 795 共培养, GABA 浓度显著提高到 22.51 mM<sup>[87, 88]</sup>。

温度和 pH 等发酵条件也十分重要。温度会影响微生物的生长和代谢, GABA 生产的最适温度取决于微生物菌株种类。*C. glutamicum* 发酵生产最适温度 37 °C, 植物乳杆菌 *L. plantarum* NTU 102 发酵生产最适温度为 34 °C<sup>[89]</sup>, 乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 311 和 *L. lactis* 491 发酵生产最适温度分别为 35.4 °C 和 30 °C<sup>[90]</sup>, 嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* fmb5 发酵生产最适温度 38.8 °C<sup>[91]</sup>, 戊糖片球菌 *Pediococcus pentosaceus* MN1 温度为 45 °C 时 GABA 产量最高<sup>[92]</sup>。发酵 pH 除了会影响菌株生长, 还会影响 GABA 合成。GABA 合成中起关键作用的酶是谷氨酸脱羧酶, 该酶最适 pH 偏酸性。乳酸菌中的谷氨酸脱羧酶在酸性 pH 下活性最高, pH 高于 5 时, 酶活显著降低甚至失活<sup>[93]</sup>。植物乳杆菌 *L. plantarum* N5 和短乳杆菌 *L. brevis* K203 中的 GAD 最适 pH 分别是 5.50 和 5.25<sup>[94, 95]</sup>。大肠杆菌 *E. coli* 中的 GAD 最适 pH 是 4.6<sup>[96]</sup>。

谷氨酸脱羧酶是 5'-磷酸吡哆醛依赖性酶, GABA 发酵生产中需要补充辅因子激活谷氨酸脱羧酶的酶促反应<sup>[97]</sup>。有研究在探究短乳杆菌 *L. brevis* RK03 的最佳 PLP 添加量时发现, GABA 在 PLP 浓度为 10 和 20 μM 时显示出最高的产量<sup>[98]</sup>。还有研究发现五碳糖乳杆菌 *Lactiplantibacillus pentosus* SN001 发酵生产 GABA 时, 添加 100 μM PLP 的 GABA 含量是未添加 PLP 的 17 倍<sup>[99]</sup>。

综上所述, 碳氮源、发酵技术、温度、pH 和辅因子是微生物发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸需要考虑的基本条件。优化发酵条件可以显著提高生产效率和降低成本, 并确保发酵过程的稳定性和可重复性, 还为可持续生物经济的发展提供了重要的技术支持。

### 1.3 谷氨酸棒杆菌合成 $\gamma$ -氨基丁酸的优势与不足

谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 是革兰氏阳性菌株, 呈短杆棒状, 是 FDA 认定的 GRAS 菌株<sup>[100]</sup>。目前已经对谷氨酸棒杆菌进行了大量的基因组学<sup>[101]</sup>和转录组学<sup>[102]</sup>的研究, 基因组序列公开, 基因编辑技术也在不断更新。除了常用的同源重组技术, 目前还研究出如 CRISPR-Cpf 和 CRISPR-Cas9<sup>[103-105]</sup>等基因编辑技术, 为改造谷氨酸棒杆菌提

供了高效有用的工具。对于  $\gamma$ -氨基丁酸的合成来说, 谷氨酸棒杆菌具有内源性的谷氨酸合成路径, 可以提供充足的前体, 是理想的宿主菌株。在谷氨酸棒杆菌中, 分流途径是生物体内降解 GABA 的主要途径。该途径涉及 GABA 转氨酶编码基因 *gabT* 和琥珀酸半醛脱氢酶编码基因 *gabD*。GABA 转氨酶催化 GABA 生成琥珀酸半醛和谷氨酸。这一反应通过降解  $\gamma$ -氨基丁酸, 参与了细胞内的代谢。琥珀酸半醛被琥珀酸半醛脱氢酶氧化成琥珀酸, 接着进入 TCA 循环, 继续参与细胞的能量代谢和合成代谢<sup>[106]</sup>。谷氨酸棒杆菌中还存在着一种特异性转运蛋白 GABA 通透酶<sup>[107]</sup>。在 GABA 通透酶的作用下, 可以调节胞内外 GABA 浓度。

在生物炼制领域, 预处理过程中会产生抑制物, 且脱毒后仍有残留。和其他菌株相比, 谷氨酸棒杆菌耐受木质纤维素体系, 可以较好地生长<sup>[108]</sup>。并且通过驯化或基因改造, 可以提高耐受性<sup>[109]</sup>。对于木质纤维素水解液中的不同糖类, 谷氨酸棒杆菌不会优先利用大量葡萄糖<sup>[110]</sup>。可以通过代谢工程改造, 引入除了葡萄糖外的其他碳源利用途径, 适应不同的生物炼制需求, 提高木质纤维素的利用率。结合章节 1.1.2 部分干法生物炼制技术, 谷氨酸棒杆菌已经成功实现了木质纤维素原料向谷氨酸、赖氨酸和聚羟基丁酸酯等大宗化学品的高效转化。

但是, 谷氨酸棒杆菌中生产  $\gamma$ -氨基丁酸也存在一些不足。(1) 谷氨酸棒杆菌合成  $\gamma$ -氨基丁酸会出现细胞生长和 GABA 生产不平衡问题<sup>[111]</sup>, 细菌的生长速度较快, 快速的细胞生长会消耗掉大量的碳源, 导致后期产物合成缺少能量支持, 因此碳代谢流的调控尤其重要。(2) 野生型的谷氨酸脱羧酶通常具有较低的催化活性以及较低的最适 pH, 不适应谷氨酸棒杆菌的中性培养条件<sup>[112]</sup>。因此部分研究尝试了对来源于大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶 GadB 进行改造, 扩大谷氨酸脱羧酶活性 pH 范围。例如定向进化和理性设计来源于短乳杆菌的谷氨酸脱羧酶获得突变体 GadB1 (T17I/D2194G/E312S/Q346H), 在谷氨酸棒杆菌中过表达 GadB1 后 GABA 产量达到 29.5 g/L<sup>[113]</sup>; 异源表达大肠杆菌突变体 GadB (Glu89Gln/ $\Delta$ 452-466), 在中性条件下生产 38.6 g/L 的 GABA<sup>[96]</sup>。(3) 谷氨酸棒杆菌生产 GABA 时, 大部分研究以质粒的形式表达谷氨酸脱羧酶<sup>[114]</sup>。质粒在发酵过程中容易丢失, 不利于工厂化生产, 需要添加抗生素维持质粒, 但这样会增加生产成本和环境污染<sup>[115, 116]</sup>。因此目前常见做法是在基因组整合谷氨酸脱羧酶基因, 实现谷氨酸棒杆菌的无质粒稳定生产 GABA。质粒在细胞生长中能够保持高拷贝数, 易于外源基因的复制和扩增, 因此谷氨酸棒杆菌基因组整合外源谷氨酸脱羧酶编码基因时, 需要考虑增加 GAD 拷贝数来达到质粒表达菌株生产 GABA 的能力。Shi 等人<sup>[117]</sup>在 *C. glutamicum* ATCC 13032 的基因组上共表达谷氨酸脱羧酶基因 *gadB1* 和 *gadB2*, 并且优化 RBS 序列和启动子, 重组菌株 GABA 产量达到 25 g/L。Yao 等人<sup>[114]</sup>在 *C. glutamicum* ATCC 13032 的基因组上, 谷氨酸脱氢酶和谷氨酸脱羧酶拷贝数为 2:3 时, 重组菌株 GABA 产量有 33.17 g/L。Wen 等人<sup>[82]</sup>在 *C. glutamicum* XW6- $\Delta$ *gabP* 的基因组上整合三次含有双顺反子

结构的分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因，并优化一些代谢支路的启动子，重组菌株 GABA 产量达到 39.65 g/L。

#### 1.4 本研究的立题依据及研究内容

$\gamma$ -氨基丁酸发酵是生产  $\gamma$ -氨基丁酸的常用方法，但是目前存在以下不足：（1）微生物质粒表达生产  $\gamma$ -氨基丁酸时质粒容易丢失；（2）葡萄糖为碳源时  $\gamma$ -氨基丁酸生产成本较高。目前， $\gamma$ -氨基丁酸（GABA）的生物合成主要以商品葡萄糖或第一代糖基原料为碳源。如果采用木质纤维素这类丰富的非粮生物质作为碳源，不仅能够显著降低 GABA 的生产成本，还能有效避免“与人争粮”的问题。

本研究选择对木质纤维素体系有较强耐受性的谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* GJ04 为研究对象，在其中构建了  $\gamma$ -氨基丁酸的生物合成路径。通过对发酵条件和代谢路径的优化，提高  $\gamma$ -氨基丁酸的产量，最后在木质纤维素水解液体系中实现廉价碳源进行  $\gamma$ -氨基丁酸的生产。

本论文的研究内容包括以下四个方面：

（1）*C. glutamicum* GJ04 分泌表达谷氨酸脱羧酶基因，获得具有葡萄糖和木糖利用途径的、可以胞外积累  $\gamma$ -氨基丁酸的质粒表达重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgdBmut。

（2）通过代谢工程改造，在 *C. glutamicum* GJ04 基因组中多拷贝整合分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因，获得遗传稳定的  $\gamma$ -氨基丁酸生产的重组菌株。在重组菌株基因组中敲除乙醛酸支路的异柠檬酸脱氢酶，使更多的碳通量流向  $\alpha$ -酮戊二酸的积累，促进前体谷氨酸的合成，增加  $\gamma$ -氨基丁酸的合成。接着敲除 GABA 通透酶，减少胞外  $\gamma$ -氨基丁酸被运输至胞内，获得工程菌株 *C. glutamicum* GJ09。

（3）在玉米芯残渣水解液中检验工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 生产  $\gamma$ -氨基丁酸的能力。玉米芯残渣水解液制备糖浆，工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 在玉米芯残渣水解液中补料分批发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸。

## 第 2 章 $\gamma$ -氨基丁酸质粒表达生产菌株的构建和发酵

### 2.1 引言

$\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 微生物发酵是工业化生产 GABA 的主要方法。微生物发酵生产 GABA 的机制是以谷氨酸为前体, 通过谷氨酸脱羧酶作用生成 GABA。大肠杆菌和乳酸菌含有谷氨酸脱羧酶, 是天然的 GABA 生产菌株。但是大肠杆菌在生产过程中会产生内毒素, 产品应用具有局限性。乳酸菌自身供给谷氨酸能力不强, 需要额外添加谷氨酸钠, 会增加 GABA 生产成本。因此, 不产生内毒素且自身能够提供充足的谷氨酸的菌株, 是理想的 GABA 生产菌株。

谷氨酸棒杆菌虽然不是天然的 GABA 生产菌株, 但是自身具有较强的谷氨酸合成能力, 异源表达谷氨酸脱羧酶即可生成 GABA。目前已经有大量谷氨酸棒杆菌通过质粒表达谷氨酸脱羧酶成功生产 GABA 的研究。并且谷氨酸棒杆菌对木质纤维素耐受性较强, 可以利用木质纤维素的发酵糖正常生长和生产。实验室前期研究中, 通过质粒表达谷氨酸脱羧酶编码基因, 构建了一株可以在木质纤维素体系生长且胞外生产 GABA 的谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* XW6-16<sup>[71]</sup>。表达质粒 pTacM-NsgadBmut 的组成如下: (1) 分泌表达蛋白效果较好的启动子 TacM<sup>[118]</sup>; (2) 中性条件下催化谷氨酸生成 GABA 的谷氨酸脱羧酶 GadBmut (Glu89Gln/ $\Delta$ 452-466)<sup>[96]</sup>; (3) Sec 分泌蛋白通道和 Ncg11289 分泌表达信号肽, 将谷氨酸脱羧酶分泌表达达到胞外, 使其在胞外和谷氨酸反应生成 GABA。但是该菌株缺乏木糖代谢途径, 无法利用木质纤维素水解液中的木糖。而本实验室前期研究中, 通过代谢工程改造, 在 *C. glutamicum* S9114 基因组中整合来源于大肠杆菌的 *xylAB* 基因 (*xylA*, 木糖异构酶编码基因; *xylB*, 木酮糖激酶编码基因) 和戊糖转运蛋白 AraE, 获得的重组菌株 *C. glutamicum* GJ04 增加了木糖的代谢途径<sup>[119]</sup>。

为了提高木质纤维素利用率, 本章节选择引入了木糖代谢途径的 *C. glutamicum* GJ04 作为出发菌株进行改造。通过质粒表达分泌表达型谷氨酸脱羧酶, 实现谷氨酸棒杆菌的胞外生产 GABA。并减少培养基中玉米浆和硫酸铵的浓度, 在限氮条件下进行 GABA 的发酵生产, 提高 GABA 的产量。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 实验菌株、培养基和发酵条件

本章节使用的菌株和质粒列于表 2.1 和表 2.2, 引物列于表 2.3。

实验室之前的研究已构建了一株能够适应木质纤维素水解液体系中高生物素含量

且能同时利用葡萄糖和木糖的高产谷氨酸的 *C. glutamicum* GJ04, 本论文以此菌株作为出发菌株。本章节用到的实验室前期研究中的表达质粒 pTacM-NsgadBmut, 以 *E. coli* DH5 $\alpha$  作为宿主菌株。大肠杆菌发酵条件 37 °C, 转速 200 rpm。谷氨酸棒杆菌发酵条件 30 °C, 转速 200 rpm。本研究中用到的培养基成分如下:

- (1) LB 培养基 (g/L): 5 酵母提取物, 10 蛋白胨, 10 氯化钠;
- (2) LK 培养基: LB 培养基, 50 mg/L 卡那霉素;
- (3) CM2B 培养基 (g/L): 10 酵母提取物, 10 蛋白胨, 10 氯化钠;
- (4) CM2BK 培养基: CM2B 培养基, 50 mg/L 卡那霉素;
- (5) LBG 感受态培养基 (g/L): LB 培养基, 30 甘氨酸, 20 葡萄糖, 1.0 吐温 80;
- (6) LBHIS 培养基 (g/L): 2.5 酵母提取物, 5 蛋白胨, 2 氯化钠, 18.5 牛脑心浸粉, 91 山梨糖醇;
- (7) LBHISK 平板: LBHIS 培养基, 12.5 mg/L 卡那霉素;
- (8) LBS 平板 (g/L): LB 培养基, 100 蔗糖, 15 琼脂粉;
- (9) 种子液培养基 (g/L): 30 葡萄糖, 1.5 磷酸二氢钾, 0.6 硫酸镁, 2.5 尿素, 0.002 硫酸亚铁, 0.002 硫酸锰, 5.0 玉米浆;
- (10) 合成培养基 (g/L): 120 葡萄糖, 1 磷酸二氢钾, 0.6 硫酸镁, 10 硫酸铵, 0.002 硫酸亚铁, 0.002 硫酸锰, 25 玉米浆, 0.1 mM 5'-磷酸吡哆醛;
- (11) 限氮合成培养基 (g/L): 120 葡萄糖, 30 木糖, 1 磷酸二氢钾, 5 硫酸铵, 10 玉米浆, 0.6 硫酸镁, 0.002 硫酸亚铁, 0.002 硫酸锰, 0.1 mM 5'-磷酸吡哆醛 (PLP);
- (12) 储存液: 0.1 M 氯化钙, 19% (w/w) 甘油。

种子液培养基、GABA 发酵培养基和限氮合成培养基中的碳源 (葡萄糖、木糖) 和磷酸二氢钾一起配制, 于 115 °C 和 20 min 高压蒸汽灭菌后使用。硫酸镁配制成 300 g/L 一水硫酸镁母液, 尿素配制成 400 g/L 母液, 硫酸铵配制成 500 g/L 母液, 玉米浆配制成 300 g/L 母液, 115 °C 和 20 min 高压蒸汽灭菌后使用。硫酸亚铁和硫酸锰均配制成 10 g/L 母液, 5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 配制成 0.1 mM 母液, 用无菌滤头过滤使用。5 M 氢氧化钠和 2 M 硫酸调节培养基 pH 为 7.0。

LB 培养大肠杆菌, CM2B 培养谷氨酸棒杆菌。相应的 LK 和 CM2BK 培养携带质粒的菌株。平板活化菌株, 在液体培养基中加入 20 g/L 琼脂粉。LBG 感受态培养基制备谷氨酸棒杆菌感受态, 感受态用 10% 甘油保存于 -80 °C 冰箱备用。含牛脑心浸粉成分的培养基和平板用于电转实验中谷氨酸棒杆菌的孵育和培养。LBS 平板用于谷氨酸棒杆菌同源重组双交换筛选验证。种子液培养基、合成培养基和限氮合成培养基用于谷氨酸棒杆菌发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸。*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态用储存液保存于 -80 °C 冰箱。

### 2.2.2 实验所用酶及试剂

质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物科技有限公司 (Shanghai, China)。玉米浆购自山东邹平山东西王集团。5'-磷酸吡哆醛购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。上海泰坦科技股份有限公司提供实验中使用的其他试剂。

### 2.2.3 重组质粒的构建

本章节使用的质粒 pTacM-NsgadBmut 信息见表 2.1。

### 2.2.4 重组菌株的构建

本章节使用引物见表 2.2。

选择谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 作为出发菌株, 采用电转化的方法将质粒转化入谷氨酸棒杆菌中。具体操作步骤如下:

#### (1) 谷氨酸棒杆菌感受态细胞的制备

- 1) 取出 *C. glutamicum* GJ04 冻存管, 在 CM2B 平板划线活化。在 30 °C 恒温培养箱倒置培养 2-3 d。
- 2) 长出单菌落后, 接种到 5 mL 的液体 CM2B 培养基中, 于 30 °C 和 200 rpm 的摇床中培养 12 h。
- 3) 将菌液按 10% 的接种量转接到 30 mL 的 LBG 感受态培养基中, 摇床培养 4 h 后, 加入 60  $\mu$ L 浓度为 50 mg/L 的氨苄青霉素, 摇床培养 1 h。
- 4) 将菌液倒入 50 mL 灭菌的离心管中, 冰浴 15 min。
- 5) 冰浴结束, 于 4 °C 和 5000 rpm 离心 10 min。结束后倒去上清液, 加入 30 mL 预冷的 10% 甘油, 移液枪轻柔吹吸重悬菌体。相同的离心条件再次离心收集菌体。
- 6) 重复步骤 5 用 10% 甘油重悬离心一次, 移液枪尽量吸干净上清液。
- 7) 加入 2 mL 的 10% 甘油 (甘油添加量视总菌体量而定), 移液器轻柔吹吸重悬菌体, 按 100  $\mu$ L 的体积分装到灭菌的 EP 管中, -80 °C 冰箱冻存备用。

#### (2) 电转实验

- 1) 将 20  $\mu$ L 的质粒和 100  $\mu$ L 提前解冻的感受态细胞用移液器轻柔混匀, 冰浴 30 min。
- 2) 冰浴结束后, 将菌液转移到预冷干燥的电击杯中, 动作轻柔尽量没有气泡产生, 盖上电击杯盖子。纸巾擦干电击杯外壁水珠后, 进行电击。电转参数为电压 1800 V, 电阻 200  $\Omega$ 。
- 3) 电击结束后将菌液转移到 EP 管中, 立即加入 1 mL 的 46 °C 预热的 LBHIS 培养基, 混匀后将 EP 管放入提前预热的水浴锅中, 46 °C 热激 8 min。
- 4) 热激结束后将 EP 管放入 37 °C, 200 rpm 摇床孵育 1 h, 再转移到 30 °C, 200 rpm 摇床孵育 1 h。

5) 孵育结束后, 将 EP 管在离心机内 4000 rpm 离心 3 min。弃去上清液, 少量剩余菌液轻柔混匀后涂布到 LBHISK 平板中, 30 °C 培养 60-72 h。长出合适大小的单菌落后进行菌落 PCR 验证。

### (3) 表达质粒菌落 PCR 验证

设计表达质粒 pTacM-NsgadBmut 的上下游引物 VeTacM-F/R, 选择电转后长出的单菌落进行菌落 PCR 验证, 在凝胶电泳中跑出正确条带的菌株即为质粒转化成功的重组菌株。

## 2.2.5 GABA 发酵

本章节在 3 L 发酵罐中进行 GABA 发酵生产。研究所用的种子液培养基、合成培养基和限氮合成培养基见 2.2.1。

挑取在 CM2B 平板上活化的 *C. glutamicum* 重组菌株单菌落转接到 10 mL 种子液培养基中, 培养 12 h 形成一级种子液, 发酵温度 30 °C, 转速 200 rpm。接菌前用 5M NaOH 调节培养基 pH 为 7.0。

按 10% 的接种量, 将一级种子液转接到含有 30 mL 种子液培养基的 250 mL 摇瓶和含有 50 mL 种子液培养基的 500 mL 摇瓶中, 再次培养 12 h 形成二级种子液。根据发酵需求, 将 800 mL 合成培养基或限氮合成培养基倒入已经灭菌冷却的 3 L 发酵罐内, 并添加适量消泡剂防止发酵过程中起泡。发酵罐参数设置为: 转速 600 rpm, 温度 30 °C, pH 7.0, 通气量 1.4 vvm。发酵罐内限氮合成培养基达到设定参数后, 按 10% 的接种量, 将二级种子液转接到培养基中进行 GABA 的 3 L 发酵罐。发酵周期为 72 h, 每 12 h 取一次样, 后续对发酵液进行检测分析。

表 2.1 本研究中使用的菌株

Table 2.1 Strains used in this study

Strains	Description	Sources
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> GJ04	Engineered <i>C. glutamicum</i> S9114 for cellulosic glutamate production	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> GJ04-pTacM-NsgadBmut	GABA plasmid expression production strain harboring pTacM-NsgadBmut	This work
GJ05	GJ04- $\Delta$ <i>ldh</i> ::pTacM-NsgadBmut	This work
GJ06	GJ05- $\Delta$ <i>gabT</i> ::pTacM-NsgadBmut	This work
GJ07	GJ06- $\Delta$ <i>gabD</i> ::pTHP7-NsgadBmut	This work
GJ08	GJ07- $\Delta$ <i>aceA</i>	This work
GJ09	GJ09- $\Delta$ <i>gabP</i>	This work
GJ04-pTacM	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTacM	This work
GJ04-pTacM- <i>gdh</i>	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTacM- <i>gdh</i>	This work
GJ04-pTHP7- <i>gdh</i>	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTHP7- <i>gdh</i>	This work
GJ04-pTHP9- <i>gdh</i>	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTHP9- <i>gdh</i>	This work
GJ04-pTHT8- <i>gdh</i>	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTHT8- <i>gdh</i>	This work
GJ04-pTHT11- <i>gdh</i>	Glutamic acid plasmid expression production strain harboring pTHT11- <i>gdh</i>	This work

表 2.2 本研究中使用的质粒

Table 2.2 Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Sources
pTacM-NsgadBmut	Plasmid for secretory expression of glutamate decarboxylase	Lab stock
pK18sacBmob	Suicide vector in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance, sacB	Lab stock
pK18- $\Delta$ ldh::pTacM-NsgadBmut	Plasmid for <i>ldh</i> gene knockout and pTacM-NsgadBmut insert in the genome	This work
pK18- $\Delta$ gabT::pTacM-NsgadBmut	Plasmid for <i>gabT</i> gene knockout and pTacM-NsgadBmut insert in the genome	This work
pK18- $\Delta$ gabD::pTHP7NsgadBmut	Plasmid for <i>gabD</i> gene knockout and pTHP7-NsgadBmut insert in the genome	This work
pK18- $\Delta$ aceA	Plasmid for <i>aceA</i> gene knockout	This work
pK18- $\Delta$ gabP	Plasmid for <i>gabP</i> gene knockout	This work
pTacM	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pTacM- <i>gdh</i>	Plasmid for expression of <i>glutamate dehydrogenase</i>	This work
pTHP7- <i>gdh</i>	pTacM- <i>gdh</i> derivative with HP7 fore-cistron inserted	This work
pTHP9- <i>gdh</i>	pTacM- <i>gdh</i> derivative with HP9 fore-cistron inserted	This work
pTHT8- <i>gdh</i>	pTacM- <i>gdh</i> derivative with HT8 fore-cistron inserted	This work
pTHT11- <i>gdh</i>	pTacM- <i>gdh</i> derivative with HT11 fore-cistron inserted	This work

表 2.3 本研究中使用的引物

Table 2.3 Primers used in this study

Primers	Sequence(5'-3')
VeTacM-F	TGAGCTGTTGACAATTAATCATCGTG
VeTacM-R	CCTCCTTTATCTAGACGTTGATGTCCTTTCAATTGGGAA
pTN <i>ldh</i> -F1	CCGCGCTGAGCTGTTGACAATTAATCATCGTGTGG
pTN <i>ldh</i> -R1	CATGGGAAGGATCAGTGATCGCTGAGATATTTTCAGGGAG
<i>ldh</i> -F1	GACATGATTACGAATTCAGCCTCAAGGACGCCGGT
<i>ldh</i> -R1	TCAACAGCTCAGCGCGGGCAACTGCTTC
<i>ldh</i> -F2	CACTGATCCTTCCCATGGCTGGTCACAAAG
<i>ldh</i> -R2	ATGCCTGCAGGTCGACGCCACGATGGCGAAAAGTGG
pTN <i>gabT</i> -F1	TGAGCTGTTGACAATTAATCATCGTG
pTN <i>gabT</i> -R1	TCAGTGATCGCTGAGATATTTTCAGGGAG
<i>gabT</i> -F1	CATGATTACGAATTCACGCGGTGAATGGTGG
<i>gabT</i> -R1	ATTGTCAACAGCTCAGGTTCCCTCCTGTGAGGTGAG
<i>gabT</i> -F2	CTCAGCGATCACTGAGACCGCGAAGAACCGC
<i>gabT</i> -R2	GCCTGCAGGTCGACACGGATCTTTCGCGGGG
HP7-F1	TCTAGATAAAGGAGGACAACCATGACTAACGGAAAATTGATTC
HP7-R1	TCATATTTCAATTAGTTGTCCTCCTTTTGGTTGGATGC
pTHP7N-F	ACTAATGAAATATGAATTTAATAATAGATTC CGAACGAAATCGGTG
pTHP7N-R	TCAGTGATCGCTGAGATATTTTCAGG

---

<i>gabD</i> -F1	CATGATTACGAATTCGTGAGGTTCCAATGCTGGAAAAC
<i>gabD</i> -R1	TTAATTGTCAACAGCTCAGGGCTTTTACCTTCGTTTCGC
<i>gabD</i> -F2	TATCTCAGCGATCACTGAGGGAGTATCTGATGCTGCTCC
<i>gabD</i> -R2	TGCCTGCAGGTCGACCTGCAACAAGATTGCCGG
<i>aceA</i> -F1	TGACATGATTACGAATTCAGCTGAGGTCCTGCCGG
<i>aceA</i> -R1	TGTAGGTCCCAAAGTCACTTCCTTAAGTGCTGATTGCAATGG
<i>aceA</i> -F2	GTGACTTTGGGACCTACAGGTTCTGACAATTTAAATCTCCCTACATC
<i>aceA</i> -R2	GCATGCCTGCAGGTCGACGCATTTGCATTCCCAGTTCCC
<i>gabP</i> -F1	CATGATTACGAATTCATTTCCCCATCGCCATGG
<i>gabP</i> -R1	CCAGCCAGCGTTTTTTTCCTTCGGGTTATTCACC
<i>gabP</i> -F2	GGAAAAACGCTGGCTGGTGTTCATTG
<i>gabP</i> -R2	TGCCTGCAGGTCGACTTAAATTTCCAAGGAGCCGTTG
Vector-F	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
Vector-R	GAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG
VepK18-F	GCGCAACGCAATTAATGTGAG
VepK18-R	CTTCGCTATTACGCCAGCTG
Veldh-F	CAAACCCCATACAACCCGAC
Veldh-R	CAGCCATGGTGCAACATTC
VegabT-F	GTGAGCGCACTTCGATTTC
VegabT-R	GGGTGGAATCGTGGTTTTCTAG
VegabD-F	GTGGTACTTCCAGCGTTACATC
VegabD-R	CTCCGCATATTTTGTGATTCCC

---

---

<i>VeaceA</i> -F	CGACTTTTACCTAGGTCACACCTTC
<i>VeaceA</i> -R	GTATGTCCTTTCATTGGCGACTTAATG
<i>VegabP</i> -F	CCTTCCGGAATCGGTCACATC
<i>VegabP</i> -R	CAACAATTTGGGCGTATCTGGAATC
<i>VeTacM</i> -F	GTTGGCTTGGTTTCATCAGCC
<i>VeTacM</i> -R	GCTTAATTTGATGCCTGGCAGTTTATG
<i>TacM</i> -F	GGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAG
<i>TacM</i> -R	GTCGATTAGCTCGAACATGGTTGTCCTCCTTTAATTGACACATGG
<i>gdh</i> -F	ATGTTTCGAGCTAATCGACGACTGGGGTCCCGAAAAGATC
<i>gdh</i> -R	CAGCCAAGCTTGCATGCCTTATCGGCGAACCATACCTCTGG
HP7-R2	GTCGATTAGCTCGAACATCATTAGTTGTCCTCCTTTTGGTTGGATG
HP9-R	GTCGATTAGCTCGAACATCATTAGTTGTCCTCCTTTTCGATCAAAGAC
HT8-R	GTCGATTAGCTCGAACATCATTAGTTGTCCTCCTTTTTAACGAGGTC
HT11-R	GTCGATTAGCTCGAACATCATTAGTTGTCCTCCTTTTTTAGCTGCC
RT-q PCR-F	GCCCGCTACTGGGATGT
RT-q PCR-R	CACGCCGATGGTGTTTT

---

### 2.2.6 分析方法

用分光光度计和 HPLC 评价发酵液样品的菌体生长、葡萄糖、木糖、谷氨酸和 GABA。

发酵液中通过分光光度计测定 600 nm 下的光密度值表征细胞生长。利用 10 g/L 氢氧化钠将离心的发酵上清液稀释 10 倍，使用山东省科学院开发的生物传感器分析仪 SBA-90 测定谷氨酸含量。利用配备示差折光检测器 (RID-10 A) 和 Aminex HPX-87H 柱 (Bio-Rad) 的岛津 LC-20 D HPLC 检测葡萄糖和木糖的浓度。柱温 65 °C，等度洗脱流速为 0.6 mL/min，流动相为 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

发酵产物 GABA 需要先通过邻苯二甲醛衍生化<sup>[121]</sup>，衍生物在 HPLC 中分离效果好，检测的分辨率和灵敏度提高。衍生化试剂组成：0.3 g 邻苯二甲醛溶于 5 mL 甲醇后，加入 250 μL 巯基乙醇，用 pH 9.5 的硼酸缓冲液定容至 100 mL。将待测样品、衍生化试剂、0.1 M 磷酸二氢钾按照 1: 3: 4 的比例反应 2 min 后制备样品，利用配备紫外检测器 (SPD-20A UV) 和 C18 柱 (YMC Pack ODS-A) 的岛津 LC-20 AT HPLC 检测 GABA 浓度。检测波长 338 nm，柱温 40 °C。梯度洗脱法<sup>[71]</sup>：总流速 1.0 mL/min，B 泵 0-15-22 min 时间段内的流速变化是从原始的 8% (v/v) 提高到 37% (v/v)，之后又降为 8% (v/v)。流动相 pH 为 7.2，A 泵流动相 (1 L) 成分为 0.036 M 乙酸钠溶液，200 μL 三乙胺，5 mL 四氢呋喃；B 泵流动相成分为 0.18 M 乙酸钠溶液、甲醇和乙腈的体积比为 1: 2: 2。

## 2.3 结果与讨论

大部分木质纤维素生物质水解液中除了葡萄糖，还含有 30% 的木糖。为了提高水解液的利用率，本章节选择实验室之前研究得到的引入了木糖代谢途径的谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株，将表达质粒 pTacM-NsgadBmut 电转入 *C. glutamicum* GJ04，实现谷氨酸棒杆菌质粒表达谷氨酸脱羧酶生产 GABA。表达质粒含有 Sec 分泌蛋白通道和 Ncg11289 介导 Sec 分泌蛋白通道的分泌表达信号肽，可以将谷氨酸脱羧酶分泌表达胞外，在胞外和谷氨酸反应生成 GABA。质粒表达重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 合成 GABA 生物途径见图 2.1。

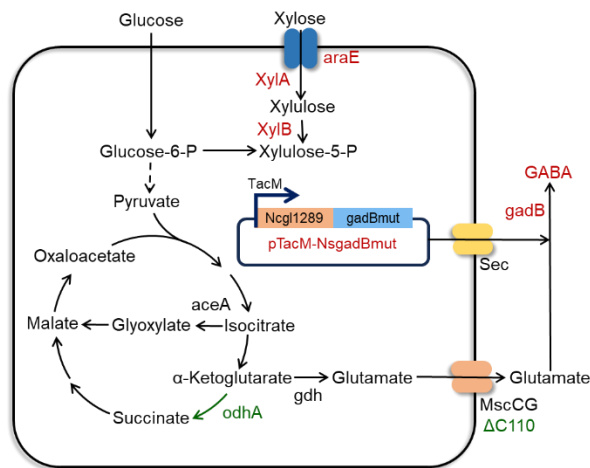


图 2.1 质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 合成 GABA 的生物途径

Fig. 2.1 Biopathways for GABA production for *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut

注: 木糖代谢途径相关酶木糖异构酶(Xylose isomerase, XylA), 木酮糖激酶(Xylose reductase, XylB), 戊糖转运蛋白(Arabinose-proton symporter, AraE)。表达质粒 pTacM-NsgadBmut 包括启动子 TacM 和 Sec 分泌蛋白通道, Ncg1289 介导 Sec 分泌蛋白通道的分泌表达信号肽、*E.coli* K12 中突变的谷氨酸脱羧酶 gadBmut。

本论文在 3 L 发酵罐内考察质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 发酵合成培养基的 GABA 生产能力 (图 2.2)。研究发现, 质粒重组菌株在发酵 72 h 消耗完 120 g/L 葡萄糖。与葡萄糖相比较, 40 g/L 木糖的利用速度较慢, 但是其在发酵 72 h 也全部消耗。质粒表达重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的生长在 48 h 之后几乎没有变化, 维持在 25 左右。发酵周期内, 发酵液中谷氨酸含量逐步上升, 发酵 72 h 为 5.6 g/L。发酵 72 h, 重组菌株合成的最大 GABA 浓度为 18.9 g/L。

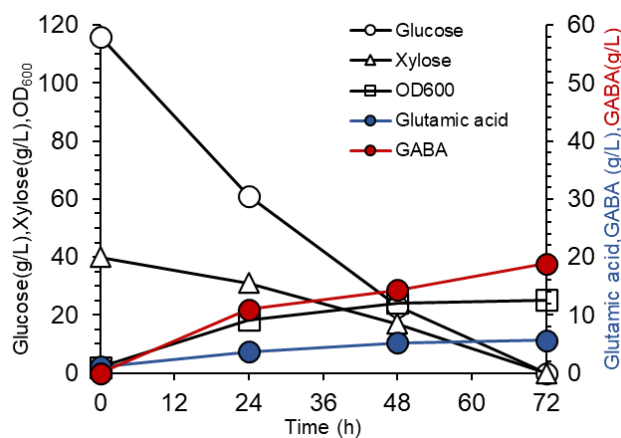


图 2.2 质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 发酵生产 GABA

Fig. 2.2 GABA production by *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为合成培养基（氮源：25 g/L 玉米浆、10 g/L 硫酸铵），具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，发酵过程中用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制发酵 pH 为 7.0。

实验室前期探究了氮源对 GABA 质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* XY24 发酵生产 GABA 的影响，发现减少合成培养基中玉米浆和硫酸铵的含量有利于 GABA 产量的提高<sup>[45]</sup>。*C. glutamicum* XY24 和 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 都来源于 *C. glutamicum* S9114，本章节直接采用 *C. glutamicum* XY24 优化后的限氮合成培养基，在 3 L 发酵罐内对谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 和质粒表达重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 进行 GABA 发酵。

图 2.3 (a) 是谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 发酵限氮培养基合成 GABA 的情况。发酵过程中，110 g/L 葡萄糖在发酵 60 h 完全消耗。30 g/L 木糖消耗速度稍慢，36 h 就被完全消耗。谷氨酸在整个发酵过程中稳定积累，从起始 1.1 g/L 上升到 72 h 的 7.8 g/L，并且没有 GABA 的产生。

图 2.3 (b) 是质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 在限氮培养基发酵生产 GABA 的情况。该菌株能够完全利用 110 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖，葡萄糖和木糖分别在 36 h 和 72 h 被完全消耗。在发酵后期有明显的谷氨酸积累，本论文推测 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 菌株发酵后期可能出现部分质粒丢失的情况，因此谷氨酸不能完全被利用转化成 GABA。GABA 的合成速率在 24 h 之后减慢但是一直在合成，最终 GABA 产量为 45.5 ± 2.6 g/L。限氮条件下，质粒表达重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的 GABA 产量是合成培养基（18.9 g/L）中的 2.4 倍。

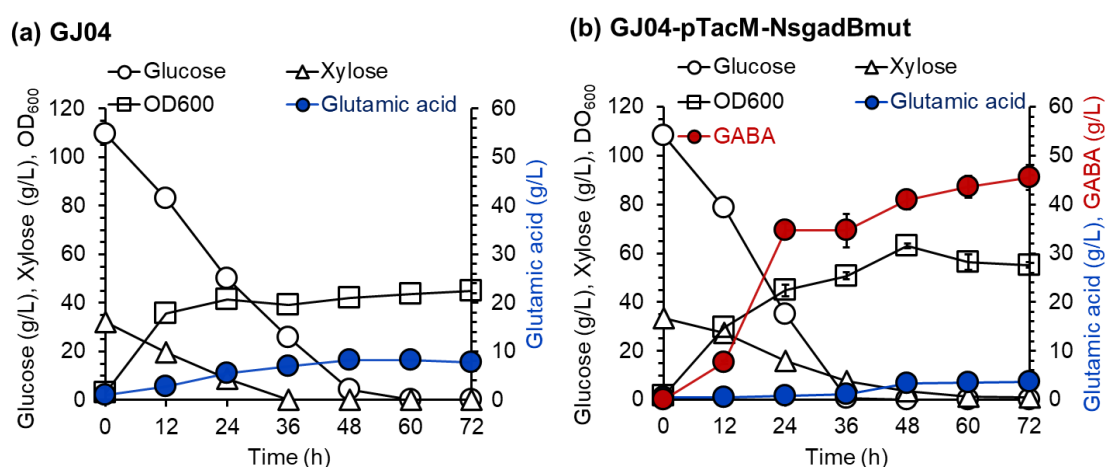


图 2.3 谷氨酸棒杆菌在限氮合成培养基中的发酵

(a) 谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04;

(b) GABA 质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut

Fig. 2.3 Fermentation of *C. glutamicum* using limited nitrogen medium(a) *C. glutamicum* GJ04; (b) *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为限氮合成培养基（氮源：10 g/L 玉米浆、5 g/L 硫酸铵），具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，发酵过程中用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制发酵 pH 为 7.0。

## 2.4 本章小结

本章以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 为研究对象，通过质粒表达分泌表达型谷氨酸脱羧酶，在谷氨酸棒杆菌中构建了一条 GABA 合成路径。并且在限氮条件下进行 GABA 的发酵，结果表明 GABA 产量得以提高。本章的主要结论如下：

(1) 在能够利用葡萄糖和木糖生产谷氨酸的 *C. glutamicum* GJ04 中，通过质粒表达分泌表达型谷氨酸脱羧酶，成功构建了一株 GABA 生产菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut，该菌株在合成培养基中的 GABA 最高产量为 18.9 g/L；

(2) 在限氮条件下，质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的 GABA 产量达到  $45.5 \pm 2.6$  g/L，是合成培养基发酵 GABA 产量的 2.4 倍。

### 第3章 基因组整合谷氨酸脱羧酶及在玉米芯残渣水解液中的发酵

#### 3.1 引言

上一章构建了一株 GABA 质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgdBmut, 并成功进行 GABA 的发酵生产。但是质粒表达存在一些问题, 诸如质粒通常含有抗性标记基因, 在基因治疗等应用中可能会带来安全问题, 并且抗生素的添加会造成环境污染, 增加生产成本; 外源基因的转录和翻译会增加宿主细胞代谢负担, 过量表达外源蛋白可能会对细胞产生毒性, 影响细胞的生长和存活。

针对以上问题, 目前常见做法是通过将外源谷氨酸脱羧酶基因整合到谷氨酸棒杆菌基因组, 实现 GABA 的无质粒稳定生产。但是质粒表达效率高, 质粒可以在细胞内独立复制, 具有较高的拷贝数, 而基因组中外源基因的单拷贝重组菌株 GABA 产量远远不及质粒表达菌株。因此大部分研究选择增加谷氨酸脱羧酶拷贝数, 增加谷氨酸脱羧酶的表达量, 进而提高重组菌株 GABA 产量。

除了增加谷氨酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的拷贝数可以使重组菌株达到质粒表达菌株的 GABA 生产水平, 还可以优化 GABA 的代谢路径, 进一步提高 GABA 产量。GABA 的代谢路径优化主要从两方面进行: (1) 增加前体谷氨酸的供应。在谷氨酸棒杆菌中, TCA 循环中的  $\alpha$ -酮戊二酸经过谷氨酸脱氢酶的作用下合成谷氨酸。因此, 设法简化乙醛酸循环支路或者过表达 TCA 循环到谷氨酸合成路径中的相关基因, 使更多的碳通量流向谷氨酸的合成, 进而会有更多的碳通量流向 GABA 的合成。(2) 敲除 GABA 代谢路径相关基因。谷氨酸棒杆菌中常见的和 GABA 代谢相关的基因有  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶编码基因 *gabT*, 可以将 GABA 转化为琥珀酸半醛; 琥珀酸半醛脱氢酶编码基因 *gabD*, 可以将琥珀酸半醛氧化为琥珀酸。敲除这两种基因可以减少 GABA 的降解, 提高 GABA 产量。除了 *gabT* 和 *gabD* 两种基因, 还有 *gabP* 编码的 GABA 通透酶, 这是一类膜蛋白, 负责 GABA 的跨膜运输, 可以将 GABA 从胞外运输至胞内。可以敲除 *gabP* 阻止胞外 GABA 运输至胞内, 有利于胞外 GABA 的积累。

木质纤维素生物质是农业生产过程中的废弃物, 来源广泛, 价格低廉, 是生产 GABA 极具潜力的原料。本章节选择的玉米芯残渣, 大部分木糖被提取, 经过干酸预处理后产生的抑制物较少, 因此不需要进行脱毒处理就可以被谷氨酸棒杆菌利用。在玉米芯残渣水解液中进行代谢工程改造后的重组菌株的发酵, 并且制备玉米芯残渣水解液糖浆进行补料分批发酵, 为木质纤维素原料工业化生产 GABA 奠定了基础。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 实验菌株、培养基和发酵条件

本章节所用的实验菌株和质粒见表 2.1 和表 2.2，引物见表 2.3。培养基和发酵条件与第二章节 2.2.1 相同。

*E. coli* DH5 $\alpha$  作为质粒构建的宿主菌株，pK18sacBmob 用于构建同源重组法用到的质粒。实验室已有研究的 *C. glutamicum* GJ04 和表达质粒 pTacM-NsgadBmut 用于提供本章节研究所需的的目的基因。

批发酵和补料分批发酵用玉米芯残渣水解液替换限氮合成培养基的葡萄糖和木糖成分，其余成分和第三章节 3.2.1 的限氮合成培养基相同。

### 3.2.2 实验所用酶及试剂

目的基因片段扩增和质粒载体扩增所用的酶、菌落 PCR 验证所用的酶、RT-qPCR 用到的酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，质粒酶切的用到酶购自赛默飞世尔科技公司。将目的基因和质粒载体基于 Gibson 组装的 HB-infusion 无缝克隆酶试剂盒购自汉恒生物科技（上海）有限公司。本章节制备玉米芯残渣水解液用到的纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自 Novozymes (Beijing, China)。根据 NREL E1006 中的方法测得纤维素酶酶活 256 FPU/mL，Ghose 方法测得纤维二糖酶活 4653.3 CBU/mL<sup>[122]</sup>，Bradford 方法测得蛋白质浓度为 86.3 mg/mL。

质粒提取、PCR 产物回收纯化和琼脂糖凝胶回收纯化的试剂盒均从上海捷瑞生物科技有限公司购买。环保型总 RNA 抽提试剂购自信励致和，逆转录试剂盒购自 TOYOBO (Osaka, Japan)。其余试剂见第二章 2.2.2。其余试剂，均购自上海泰坦科技股份有限公司。

### 3.2.3 重组质粒的构建

本章节使用的菌株和质粒见表 2.1 和表 2.2，引物列于表 2.3。本章节用的出发菌株是 *C. glutamicum* GJ04，整合和敲除质粒是 pK18sacBmob。

本章节基于同源重组的原理构建整合质粒，对 *C. glutamicum* GJ04 基因组中的特定基因进行敲除和替换。为了通过引入谷氨酸棒杆菌中没有的谷氨酸脱羧酶基因实现 GABA 的无质粒稳定生产，本论文选择将乳酸脱氢酶编码基因 *ldh* 替换成分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 pTacM-NsgadBmut。首先，用引物 pTN-F1/R1 从表达质粒 pTacM-NsgadBmut 扩增分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因，用引物 *ldh*-F1/R1 和 *ldh*-F2/R2 扩增替换基因乳酸脱氢酶编码基因 *ldh* 上下游同源臂。然后，通过 BamH1 酶切线性化质粒 pK18sacBmob，用引物 Vector-F/R 将载体 pK18sacBmob 扩增。最后，通过 HB-infusion

无缝克隆酶, 连接三个基因片段以 *ldh*-up、pTacM-NsgadBmut 和 *ldh*-down 的顺序与载体 pK18sacBmob, 得到质粒 pK18- $\Delta$ *ldh*::pTacM-NsgadBmut。第二次整合选择, 将 GABA 转氨酶基因 *gabT* 替换成分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 pTacM-NsgadBmut。首先, 用引物 pTN-F1/R1 从表达质粒 pTacM-NsgadBmut 扩增分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因, 用引物扩增 *gabT*-F1/R1 和 *gabT*-F2/R2 被替换基因乳酸脱氢酶编码基因 *ldh* 上下游同源臂下来。然后质粒 pK18sacBmob 用 BamH1 酶切预线性化后, 用引物 Vector-F/R 将载体 pK18sacBmob 扩增下来。最后, 通过 HB-infusion 无缝克隆酶, 连接三个基因片段以 *gabT*-up、pTacM-NsgadBmut 和 *gabT*-down 的顺序和载体 pK18sacBmob, 得到质粒 pK18- $\Delta$ *gabT*::pTacM-NsgadBmut。第三次整合选择, 将琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 替换成含有谷氨酸脱羧酶基因的双顺反子表达盒。在分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因的基础上增加高表达基因 HP7, 因为 HP7 作为前顺反子和目的基因 pTacM-NsgadBmut 形成双顺反子表达盒, 可以提高谷氨酸脱羧酶的表达。用引物 TacM-F/R 从表达质粒 pTacM-NsgadBmut 扩增 TacM 启动子, 用引物 HP7-F1/R1 (含 SD2 序列) 从 *C. glutamicum* GJ04 扩增 62 bp 的高表达基因 HP7, 用引物 pTHP7N-F/R 从表达质粒 pTacM-NsgadBmut 扩增分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 NsgadBmut, 用引物 *gabD*-F1/R1 和 *gabD*-F2/R2 从 *C. glutamicum* GJ04 扩增琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 上下游同源臂 *gabD*-up 和 *gabD*-down。通过 HB-infusion 无缝克隆酶, 连接将以上五个片段和载体 pK18sacBmob, 得到质粒 pK18- $\Delta$ *gabD*::pTHP7-NsgadBmut。

本章节基于同源重组的原理构建敲除质粒, 对重组菌株基因组中的特定基因进行敲除。为了减少代谢支路对 GABA 合成的影响, 选择敲除乙醛酸循环中异柠檬酸脱氢酶编码基因 *aceA* 和 GABA 通透酶编码基因 *gabP*。用引物 *aceA*-F1/R1 和 *aceA*-F2/R2 扩增异柠檬酸脱氢酶编码基因 *aceA* 上下游同源臂。通过 HB-infusion 无缝克隆酶, 连接扩增片段和载体 pK18sacBmob, 得到质粒 pK18- $\Delta$ *aceA*。用引物 *gabP*-F1/R1 和 *gabP*-F2/R2 将 GABA 扩增通透酶编码基因 *gabP* 上下游同源臂, 通过 HB-infusion 无缝克隆酶, 连接扩增片段和载体 pK18sacBmob, 得到质粒 pK18- $\Delta$ *gabP*。

本章节还构建了表达质粒, 以 pTacMmob 质粒为载体, 利用引物 TacM-F/R 扩增得到线性化载体 TacM-liner, 利用引物 *gdh*-F/R 将谷氨酸脱氢酶基因片段 *gdh* 扩增, 和线性化载体 TacM-liner 通过 HB-infusion 无缝克隆酶连接, 得到表达质粒 pTacM-*gdh*。利用引物 *gdh*-F/HP7-R2 从 *C. glutamicum* GJ04 基因组中扩增高表达基因片段 HP7, 按照 *gdh*-up、HP7、*gdh*-down 的顺序和线性化载体 TacM-liner 通过 HB-infusion 通过无缝克隆酶进行连接, 得到表达质粒 pTHP7-*gdh*。利用引物 *gdh*-F/HP9-R、*gdh*-F/HT8-R、*gdh*-F/HT11-R 从 *C. glutamicum* GJ04 基因组扩增高表达基因 HP9 和高转录基因 HT8 及 HT11, 和线性化载体 TacM-liner 通过 HB-infusion 无缝克隆酶进行连接, 构建表达质粒 pTHT7-*gdh*、pTHT8-*gdh*、pTHT11-*gdh*。

质粒构建步骤如下:

(1) 感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  的制备

- 1) 取出 *E. coli* DH5 $\alpha$  冻存管, LB 板上划线活化。于 37 °C 倒置培养 12 h。
- 2) 12 h 后取出平板, 接种单菌落到 5 mL 的 LB 液体中。37 °C, 200 rpm 摇床中培养 12 h。
- 3) 菌液接至 100 mL 的 LB 液体中, 摇床培养 5-7 h。菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.3-0.4。
- 4) 菌液转移到无菌的 50 mL 离心管, 冰浴 30 min。
- 5) 离心机 4 °C 预冷, 将菌液以 4 °C, 4000 rpm 离心 10 min。弃去上清液, 加入 10 mL 预冷的 0.1 M 氯化钙, 轻柔吹吸重悬菌体。
- 6) 重复 2 次上个步骤。
- 7) 弃去上清液, 加入 2 mL 储存液。重悬细胞后, 将菌液按 100  $\mu$ L 的体积分装到灭菌后的 EP 管中。分装好的感受态细胞保存在 -80 °C 冰箱中。

(2) 连接液的制备

根据 HB-infusion 无缝克隆试剂盒说明书步骤分别计算目的基因和载体的体积, 10  $\mu$ L 移液枪吹吸充分混匀后, 放入预热的 50 °C 水浴锅中水浴 30 min。

(3) 质粒转化进 *E. coli* DH5 $\alpha$

- 1) 将提前从 -80 °C 冰箱内取出的感受态细胞加入到 10  $\mu$ L 水浴后的连接液中, 移液枪轻柔地吹吸混匀, 混匀后冰浴 30 min;
- 2) 水浴锅提前设置 42 °C, 将冰浴后的菌液放入水浴锅, 42 °C 热激 90 s。冰浴 2 min 后立即加入 900  $\mu$ L 的 LB 培养基。37 °C, 200 rpm 摇床培养 1 h。
- 3) 1 h 后取出 EP 管, 4000 rpm 离心 2 min。吸出 900  $\mu$ L 上清液, 剩余菌液轻柔吹吸混匀后涂布到 LK 平板上。
- 4) 将涂布后的 LK 平板倒扣到 37 °C 恒温培养箱中, 过夜培养。
- 5) 次日早上长出单菌落后取出 LK 平板, 挑取单菌落利用验证引物 pK18-F/R 和 TacM-F/R 进行菌落 PCR 验证。
- 6) 将菌落 PCR 验证后的阳性转化子接种到 5 mL 的 LK 液体培养基中。37 °C, 200 rpm 摇床培养 12 h。提取质粒, 通过测序验证。

### 3.2.4 重组菌株的构建

本实验选择同源重组的方法进行谷氨酸脱羧酶基因的整合和敲除。具体操作步骤如下:

(1) 一次重组验证

挑取电转后长出的单菌落, 用 pK18sacBmob 质粒的上下游通用引物进行菌落 PCR 验证, 验证为阳性的单菌落即为一次重组成功的菌株;

### (2) 一次重组菌株筛选培养

将一次重组成功的菌株在 LK 平板上划线，30 °C 扩大培养 12 h。长出后挑取少量菌落到装有 1 mL 的 LB 的灭菌 EP 管内，30 °C 摇床培养 3 h。之后吸取适量菌液在 LBS 平板涂布。倒扣平板 30 °C 培养至 LBS 平板上长出单菌落，约 12-24 h。同一个单菌落在 LK 平板划线，后在 LBS 平板划线，LK 和 LBS 对应的单菌落做好标记。挑选在 LBS 板上长 LK 平板上不长的重组菌株进行二次重组验证。

### (3) 二次重组验证

在目的基因的上下游设计引物，进行菌落 PCR 验证。琼脂糖凝胶电泳的条带大小正确，即说明整合成功。将 PCR 产物送公司测序，测序结果无误即表示二次重组成功，则重组菌株构建完成。

以 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株，质粒表达重组菌株的构建见第二章 2.2.4。

## 3.2.5 RT-qPCR

本章节 RT-qPCR 实验所用引物见表 2.1。

实验步骤如下：

### (1) 收集样品

从长有谷氨酸棒杆菌重组菌株的 CM2B 平板上，挑取一个单菌落接种到 10 mL 种子液培养基，并于 30 °C，200 rpm 摇床培养 12 h，制成一级种子液。12 h 后，将一级种子液按 10% 接种量转接到 30 mL 合成培养基中，30 °C，200 rpm 培养 24 h。培养基在接种前均用 5 M NaOH 调节 pH 至 7.0。

收集 1 mL 培养了 24 h 的菌液，4 °C，12000 × g 离心 5 min，弃去上清液，收集菌体。用 1 mL PBS 缓冲液重悬离心后的菌体，4 °C，12000 xg 离心 5 min，弃去上清液，收集菌体。PBS 缓冲液重复洗涤 3 次后，将弃去上清液收集到的菌体倒入液氮速冻，接着将其储存到 -80 °C 冰箱备用。

### (2) 提取 RNA

向收集的菌体里加入 1 mL 裂解液 Cinozol，移液枪反复吹吸至无明显沉淀。室温静置 5 min 后将裂解液 10000 xg 离心 10 min，管内有少许沉淀，尽量吸取上清液到 2 mL RNase-free 离心管。加入 500 μL 纯水，上下颠倒混匀，静置 3 min，10000 × g 离心 10 min，管内有明显沉淀，尽量吸取 1 mL 上清液到 2 mL RNase-free 离心管内。加入 1 mL 异丙醇，上下颠倒混匀，室温孵育 10 min。10000 × g 离心 10 min，弃去上清，管壁有胶状沉淀。加入 1 mL 的 75% 乙醇（RNase-free 水配制），剧烈涡旋震荡，7500 × g 离心 5 min。弃上清液，超净台晾干沉淀。50 μL RNase-free 水溶解沉淀，55-60 °C 孵育数分钟促进沉淀溶解。将提取的 RNA 用 RNase-free 水稀释至浓度 300 ng/μL 左右，液氮速冻，保存 -80 °C 冰箱备用。注意提取 RNA 全程都用 RNase-free 水。

### (3) 逆转录 RNA 成 cDNA

将 RNA 从-80 °C冰箱取出置于冰上解冻, 取 10  $\mu$ L 在 PCR 仪内 65 °C变性 10 min。按照 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 和 gDNA Rmover 试剂盒 (TOYOBO, Osaka, Japan) 说明, 去除基因组 DNA 反应和逆转录反应, 得到 cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 实验。

### (4) RT-qPCR 实验

利用 Primer 5.0 软件设计引物。按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂说明书配制 RT-qPCR 体系并进行 RT-qPCR。RT-qPCR 程序: 95 °C预变性 1 min, 95 °C反应 15 s, 55 °C反应 15 s, 72 °C反应 30 s, 后三个反应循环 40 次。

## 3.2.6 玉米芯残渣水解液的制备

实验室制备水解液的玉米芯残渣由圣泉集团惠赠。玉米芯残渣含水量为 51.11%。实验室先前研究发现玉米芯残渣制成水解液得到的葡萄糖和木糖浓度适合工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 进行 3 L 发酵罐批发酵和分批补料发酵。

玉米芯残渣水解液制备方法: 在 5 L 发酵罐 (Baoxing Biotech, Shanghai, China) 中按 15%固含量的比例添加玉米芯残渣和水, 每克玉米芯残渣需要添加 6 mg 总纤维素酶蛋白, 在 50 °C, 200 rpm 的反应条件下水解 48 h。纤维素酶最适 pH 为 5.0, 玉米芯残渣 pH 偏低, 需要添加  $\text{CaCO}_3$  中和玉米芯残渣 pH。每克玉米芯残渣添加 20 mg  $\text{CaCO}_3$ 。水解结束后将混合物以 8000 rpm 的转速离心 15 min, 收集上清液进行高温高压灭菌。同时需要准备干净的 1000 mL 蓝口瓶、漏斗和滤纸一起灭菌。灭菌后在超净台内将上清液过滤, 除去残留的固体物质, 蓝口瓶收集滤液备用。

通过旋转蒸发浓缩额玉米芯残渣水解液, 用于补料分批发酵。同样的方法制备玉米芯残渣水解液, 混合物以 8000 rpm 的转速离心 15 min 后收集上清液。收集上层清液, 减少下层固体残渣的掺入。之后, 利用旋转蒸发仪浓缩玉米芯残渣水解液。浓缩液的最终葡萄糖和木糖浓度分别是 778 g/L 和 120 g/L。浓缩液糖浓度越高, 补料时添加量越少, 能够保持发酵过程中较高的细胞密度和 GABA 浓度。

## 3.2.7 GABA 发酵

本章节重组菌株在 250 mL 摇瓶和 3 L 发酵罐内进行发酵生产 GABA。取 3 mL 一级种子液接种在 30 mL 发酵培养基中, 发酵 72 h, 发酵温度 30 °C, 转速 200 rpm, 进行摇瓶发酵。接菌前用 5M NaOH 调节培养基 pH 为 7.0。发酵过程中每 12 h 调节一次 pH 并取样, 后续对发酵液进行检测分析。3 L 发酵罐批发酵操作方法与第二章 2.2.5 中 3 L 发酵罐批发酵相同。

在 3 L 发酵罐内进行批发酵和补料分批发酵, 一级种子液和二级种子液制备方法见

第二章节 2.2.5。补料分批发酵在 36 h 开始进行浓缩液的补充，补料后发酵液的葡萄糖浓度控制在 50 g/L，木糖浓度控制在 5 g/L 左右。每 12 h 补料一次，补料 3 次，一共发酵 72 h。

### 3.2.8 分析方法

本章节分析方法与第二章节 2.2.6 相同。

### 3.2.9 GABA 得率计算

基于消耗的葡萄糖和木糖生成 GABA 的量可以计算 GABA 得率，公式如下：

$$\text{GABA 得率} = \frac{[\text{GABA}]V - [\text{GABA}]_0V_0}{[\text{G+X}]_0V_0 - [\text{G+X}]V} \times 100\%$$

[GABA]表示 GABA 终浓度，[GABA]<sub>0</sub>表示 GABA 初始浓度，[G+X]表示葡萄糖和木糖终浓度，[G+X]<sub>0</sub>表示葡萄糖和木糖初始浓度，V 表示发酵液终体积，V<sub>0</sub>表示发酵液初始体积。在发酵过程中忽略调节 pH 所加酸碱造成的发酵液体积变化。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 基因组整合谷氨酸脱羧酶的谷氨酸棒杆菌稳定生产 $\gamma$ -氨基丁酸

质粒在生产过程中不稳定，极易丢失，因此质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 在生产过程中需要添加抗生素卡那霉素维持质粒。该做法增加了 GABA 的生产成本，不利于工业化生产。在本章节中，通过代谢工程改造，构建 GABA 稳定高产菌株。

以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株进行代谢工程改造，实现 GABA 的稳定生产。第一次选择将乳酸脱氢酶基因 *ldh* 替换成分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 pTacM-NsgadBmut，构建单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ04- $\Delta$ *ldh*::pTacM-NsgadBmut，命名为 *C. glutamicum* GJ05。这一做法在生产 GABA 的同时，还可以减少副产物乳酸的产生。第二次选择将 GABA 转氨酶基因 *gabT* 替换成分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 pTacM-NsgadBmut，构建双拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05- $\Delta$ *gabT*::pTacM-NsgadBmut，命名为 *C. glutamicum* GJ06。GABA 转氨酶基因 *gabT* 的替换还可以减少 GABA 的降解。第三次选择将琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 替换成分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因。在分泌表达型谷氨酸脱羧酶 pTacM-NsgadBmut 表达盒的基础上，在 *tacM* 启动子和谷氨酸脱羧酶基因 NsgadBmut 中间插入 62 bp 的高表达基因 HP7 做为前顺反子基因，和目标蛋白基因分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 NsgadBmut 形成双顺反子结构，将该结构命名为 pTHP7-NsgadBmut。双顺反子结构的引入可以进一步提高谷氨酸脱羧酶的分泌表达，原

因可能是前顺反子阻止在目标蛋白序列的起始处形成稳定的 mRNA 二级结构, 促进翻译起始。而且, 前顺反子和目标蛋白编码序列具有翻译偶联效应<sup>[123]</sup>。将琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 替换成高表达的分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因 pTHP7-NsgadBmut, 构建三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06- $\Delta$ *gabD*:pTacM-NsgadBmut, 命名为 *C. glutamicum* GJ07。这一做法还减少了琥珀酸半醛转化为琥珀酸, 提高 GABA 的产量。以上三株重组菌株整合和敲除示意图见图 3. 1。

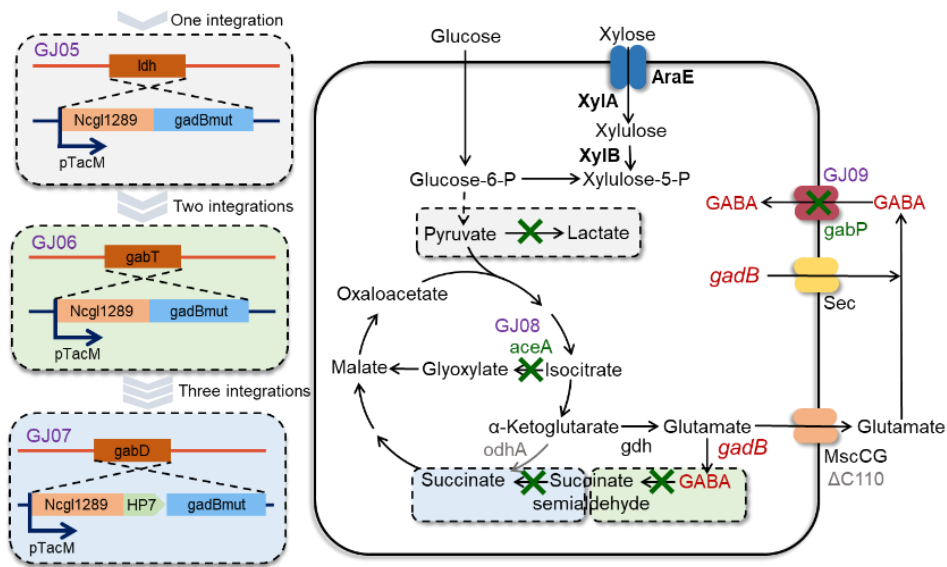


图 3. 1 谷氨酸棒杆菌中高效稳定生产 GABA 的代谢工程改造策略

Fig. 3. 1 Metabolic engineering strategy for efficient and stable GABA production in *C. glutamicum*

注: 彩色虚线框, 重组菌株基因整合示意图; 绿色十字, 基因敲除; 灰色箭头, 弱化。 *gdh*, 谷氨酸脱氢酶编码基因; *ldh*, 乳酸脱氢酶编码基因; *gabT*, GABA 转氨酶编码基因; *gabD*, 琥珀酸半醛脱氢酶编码基因; *aceA*, 异柠檬酸裂解酶编码基因; *gabP*, GABA 通透酶编码基因。GABA,  $\gamma$ -氨基丁酸; Pyruvate, 丙酮酸; Lactate, 乳酸;  $\alpha$ -Ketoglutarate,  $\alpha$ -酮戊二酸; Succinate semialdehyde, 琥珀酸半醛; Succinate, 琥珀酸; Isocitrate, 异柠檬酸; Glyoxylate, 乙醛酸; Glutamate, 谷氨酸; AraE, 戊糖转运蛋白; XylA, 木糖异构酶; XylB, 木酮糖激酶; MscCG $\Delta$ C110, 敲除 MscCG 碳端的 110 个氨基酸的谷氨酸分泌通道蛋白; *gadBmut*, *E. coli* K12 中突变的谷氨酸脱羧酶; Sec pathway, 分泌蛋白通道; Ncg1289, 介导 Sec pathway 的分泌表达信号肽; HP7, 高表达基因。

通过 250 mL 摇瓶发酵实验, 考察质粒表达菌株重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 和重组菌株 *C. glutamicum* GJ05、*C. glutamicum* GJ06、*C. glutamicum* GJ07 发酵合成培养基生产 GABA 的能力。并对质粒表达菌株和三株重组菌株进行 RT-qPCR, 以质粒表达菌株谷氨酸脱羧酶基因转录水平为对照, 分析三株重组菌株谷氨酸脱羧酶基因的转录水平。

图 3. 2a 摇瓶发酵数据显示单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 可以进行无质粒的 GABA 生产，在谷氨酸棒杆菌基因组中整合谷氨酸脱羧酶基因进行 GABA 无质粒生产的策略可行。但是，单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 的 GABA 产量太低，只有  $1.40 \pm 0.2$  g/L，是质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的 GABA 产量 ( $9.5 \pm 0.4$  g/L) 的 14.7%。继续在基因组整合谷氨酸脱羧酶基因，构建了双拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06 和三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07。双拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06 的 GABA 产量显著提高，达到了 6.06 g/L，是质粒表达菌株 GABA 产量的 63.8%。三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 的 GABA 产量为  $6.63 \pm 0.3$  g/L，是质粒表达菌株 GABA 产量的 69.8%。双拷贝和三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06 和 *C. glutamicum* GJ07 的 GABA 产量分别是单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 的 4.3 倍和 4.7 倍。由此可见，增加谷氨酸脱羧酶基因拷贝数可以有效提高 GABA 的产量。但是，三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 仍然没有达到质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的 GABA 生产水平。后续尝试过继续增加谷氨酸脱羧酶的拷贝数，但是整合失败。分析原因，可能是不断增加谷氨酸脱羧酶的拷贝数可能会干扰基因表达的正常调控机制，使基因表达调控失衡，并且给细胞带来巨大代谢负担，菌株生长能力变差。因此不再对三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 进行谷氨酸脱羧酶基因的整合。

RT-qPCR 表明，单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05，谷氨酸脱羧酶的转录水平仅为质粒表达的 2.9% (图 3. 2b)。双拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06，谷氨酸脱羧酶的转录水平是单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 转录水平的 3.2 倍。三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 引入了双顺反子结构，谷氨酸脱羧酶基因的转录水平提高更多，是单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 的转录水平的 6.6 倍。

三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 转录水平是双拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ06 的 2.0 倍，但是 *C. glutamicum* GJ07 的 GABA 产量只是 *C. glutamicum* GJ06 的 1.1 倍。*C. glutamicum* GJ07 的 GABA 增长倍数和转录水平增长倍数不一致。分析原因可能是转录后的调控机制，如 RNA 的稳定性、剪接、运输和翻译效率等，影响最终的 GABA 产量。也可能是谷氨酸脱羧酶的酶活性受到限制，即使转录水平很高，也可能无法将谷氨酸全部转化为 GABA。

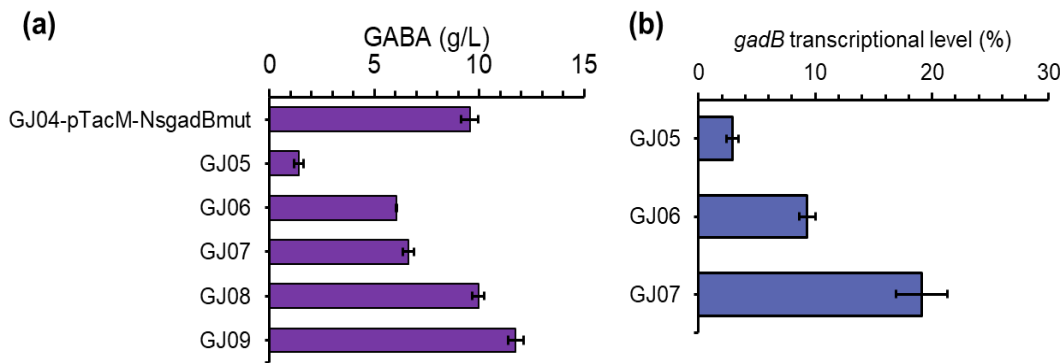


图 3.2 谷氨酸棒杆菌摇瓶发酵生产 GABA

(a) GABA 产量; (b) 谷氨酸脱羧酶基因转录水平

Fig. 3.2 GABA production of *Corynebacterium glutamicum* in shake flask fermentation

(a) Yield of GABA; (b) Transcriptional level of glutamate decarboxylase gene

注: GJ04-pTacM-NsgadBmut 表示谷氨酸棒杆菌 GABA 质粒表达菌株, GJ05、GJ06、GJ07 分别表示单拷贝、双拷贝、三拷贝谷氨酸棒杆菌重组菌株, GJ08 表示 *C. glutamicum* GJ07 敲除 *aceA* 基因的谷氨酸棒杆菌重组菌株, GJ09 表示 *C. glutamicum* GJ08 敲除 *gabP* 基因的谷氨酸棒杆菌重组菌株。在 250 mL 摇瓶中进行 GABA 发酵生产, 所用培养基为合成培养基, 具体成分见材料与方法。发酵条件: 30 °C, 200 rpm, 发酵周期为 72 h, 发酵过程中用 5 M NaOH 每 12 h 调节一次发酵液 pH 为 7.0。

### 3.3.2 代谢工程改造提高 $\gamma$ -氨基丁酸产量

上文提到在谷氨酸棒杆菌基因组中整合谷氨酸脱羧酶基因有次数限制, 第四次整合时菌株生长状况变差, 代谢负担加重。最多整合三次谷氨酸脱羧酶基因, 构建了三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07。但是 *C. glutamicum* GJ07 没有达到预期的质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 的 GABA 生产水平。因此尝试进一步对重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 中的代谢通路进行调整, 使代谢通量更多的流向 GABA。

图 3.1 表明敲除乙醛酸循环支路可以增加  $\alpha$ -酮戊二酸积累, 提高合成 GABA 前体谷氨酸的供应。因此选择敲除异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA*, 减少乙醛酸支路的碳通量。敲除异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA* 后, 重组菌株 *C. glutamicum* GJ07- $\Delta aceA$  命名为 *C. glutamicum* GJ08。图 3.2 摇瓶发酵显示, *C. glutamicum* GJ08 的 GABA 产量达到  $9.9 \pm 0.3$  g/L, 比三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 的 GABA 产量提高了 50%。

在限氮合成培养基中检验重组菌株 *C. glutamicum* GJ08 的 GABA 发酵能力。该菌株能够在发酵周期 72 h 内完全消耗了 110 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖 (图 3.3)。重组菌株在发酵 36 h 后增长缓慢, 进入生长稳定期。谷氨酸的含量一直没有明显变化, 没有出现像质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 在发酵后期谷氨酸明显升高的情况 (图 2.3), 能够实现谷氨酸向 GABA 的充分转化。36 h 之后, 葡萄糖和木糖的消耗大部分用于合成 GABA, 最终 GABA 产量达到  $41.1 \pm 0.6$  g/L。第二章提到的质粒表达菌

株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 在限氮条件下生成  $45.5 \pm 2.6$  g/L 的 GABA，重组菌株 *C. glutamicum* GJ08 的产量达到了质粒表达菌株的 90.3%。

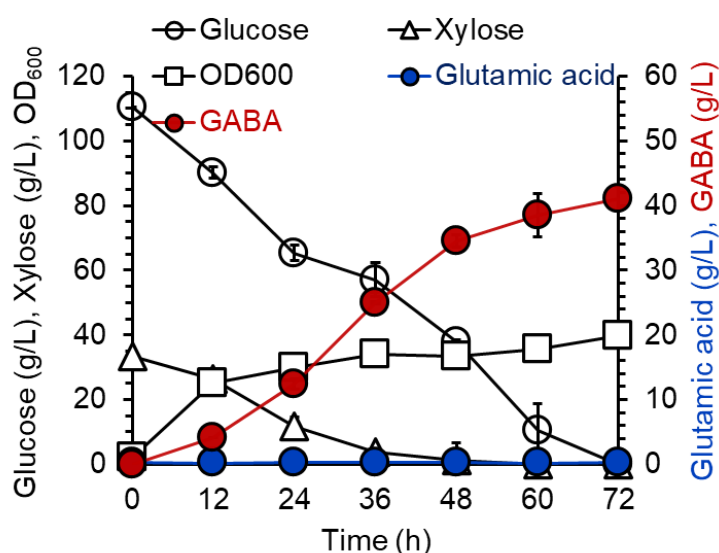


图 3.3 重组菌株 *C. glutamicum* GJ08 发酵生产 GABA

Fig. 3.3 GABA production by *C. glutamicum* GJ08 using refined sugars

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为限氮合成培养基，具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，发酵过程中用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制发酵 pH 为 7.0。

除了增加前体的供应，还可以通过阻断 GABA 的降解提高 GABA 的产量。*gabT* 和 *gabD* 两种和 GABA 代谢相关的基因已经被敲除，但是谷氨酸棒杆菌中还存在 GABA 通透酶。GABA 通透酶是一种膜蛋白，可以将 GABA 从胞外转运到胞内，不利于 GABA 在胞外的积累。因此以重组菌株 *C. glutamicum* GJ08 为出发菌株，敲除 GABA 通透酶编码基因 *gabP*，增加胞外 GABA 的积累。重组菌株 *C. glutamicum* GJ08- $\Delta$ *gabP*，命名为 *C. glutamicum* GJ09。图 3.2a 显示重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 在摇瓶中可以发酵生产  $11.7 \pm 0.4$  g/L 的 GABA，比重组菌株 *C. glutamicum* GJ08 的 GABA 产量提高了 18.2%。

在限氮合成培养基中考察重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 的 GABA 发酵生产能力（图 3.4）。该菌株能够在发酵周期 72 h 内将 110 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖完全消耗，36 h 后的菌株生长没有明显上升，谷氨酸没有出现发酵后期明显上升的情况。36 h 后，剩余葡萄糖和少量木糖用于 GABA 的合成，GABA 产量最高可以达到  $55.1 \pm 0.7$  g/L。60 h 后 GABA 产量下降可能是因为培养基中剩余的碳源太少，不足以支持菌株生长和生产，菌株触发了其他途径，通过消耗 GABA 用于维持菌体正常活动。

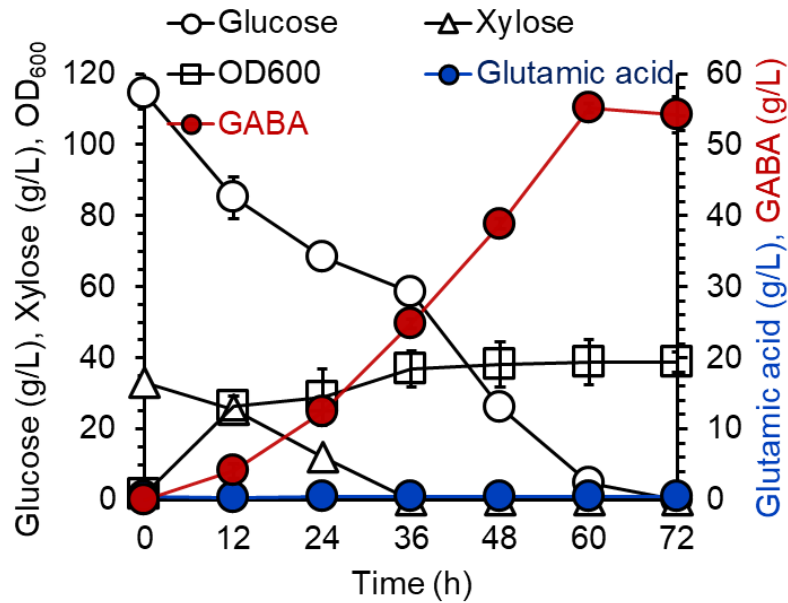


图 3.4 重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 发酵生产 GABA

Fig. 3.4 GABA production by *C. glutamicum* GJ09 using refined sugars

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为限氮合成培养基（碳源为葡萄糖和木糖），具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，发酵过程中用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制发酵 pH 为 7.0。

除了通过基因敲除的手段优化 GABA 代谢路径，还尝试引入双顺反子结构过表达谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh*，增加前体谷氨酸的供应。 $\alpha$ -酮戊二酸通过谷氨酸脱氢酶的作用，生成谷氨酸。为了筛选最佳双顺反子结构，选择以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株，构建含有 TacM 启动子的质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-*gdh*，含有双顺反子结构的质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTHP7-*gdh*、*C. glutamicum* GJ04-pTHP9-*gdh*、*C. glutamicum* GJ04-pTHT8-*gdh* 和 *C. glutamicum* GJ04-pTHT11-*gdh*。以谷氨酸产量为依据，筛选出效果最好的双顺反子结构。

在 250 mL 摇瓶中，采用合成培养基，对一系列质粒表达重组菌株进行谷氨酸发酵验证（图 3.5）。以出发菌株 *C. glutamicum* GJ04 为对照，发现含有高转录基因 HT8 的重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTHT8-*gdh* 的谷氨酸产量没有提高。以含有 TacM 启动子的质粒表达菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-*gdh* 为对照，发现含有高转录基因 HT11 的重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTHT11-*gdh* 没有对照菌株的谷氨酸产量高。含有高表达基因 HP7 的重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTHP7-*gdh* 谷氨酸产量和对照菌株差不多。含有高表达基因 HP9 的重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTHP9-*gdh* 谷氨酸产量有显著增加，产量为 2.8 g/L，比对照菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-*gdh* 谷氨酸产量提高 27%，比原始菌株 *C. glutamicum* GJ04 谷氨酸产量提高 47%。因此筛选出的高表达基因 HP9 作为前顺反子结构可以明显提高谷氨酸的产量，后续实验可以考虑将双顺反子结构 pTHP9-*gdh*

整合到 *C. glutamicum* GJ09 基因组中提高谷氨酸的供应，并且探究谷氨酸脱羧酶和谷氨酸脱氢酶的最佳拷贝数，进一步提高 GABA 产量。

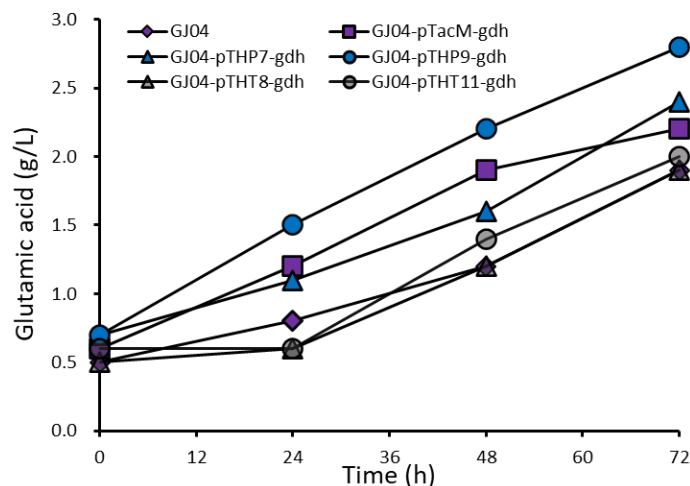


图 3.5 谷氨酸棒杆菌发酵生产谷氨酸

Fig. 3.5 Glutamate production by *C. glutamicum*

注：GJ04 表示谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04，其余都是携带表达质粒的谷氨酸棒杆菌。过表达谷氨酸脱氢酶 *gdh* 基因的表达质粒包括含有 TacM 启动子的表达质粒 pTacM-*gdh*，含有双顺反子结构的表达质粒 pTHP7-*gdh*, pTHP9-*gdh*, pTHT8-*gdh*, pTHT11-*gdh*。发酵过程在 250 mL 摇瓶中进行，培养基为合成培养基，具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，200 rpm，发酵过程中每 12 h 用 5 M NaOH 调节发酵 pH 为 7.0。

### 3.3.3 谷氨酸棒杆菌工程菌株利用玉米芯残渣水解液发酵生产 $\gamma$ -氨基丁酸

本节考察高效稳定生产 GABA 的 *C. glutamicum* GJ09 以玉米芯残渣水解液为底物合成 GABA 的能力。玉米芯残渣水解液中葡萄糖和木糖浓度适中，适合菌株生长和生产，并且乙酸等抑制物浓度较低，不需要对玉米芯残渣进行脱毒处理，少量的乙酸对细胞生长不会产生不良影响。

工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 在玉米芯残渣水解液体系中发酵生产 GABA(图 3.6)。玉米芯残渣水解液含有 85 g/L 葡萄糖和 10 g/L 木糖。工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的菌体生长在 36 h 之后趋于稳定，48 h 基本完全消耗葡萄糖和木糖。谷氨酸含量一直没有大幅上升的变化。GABA 的最高产量在 60 h 时达到  $44.3 \pm 3.8$  g/L，基于葡萄糖和木糖消耗计算出 GABA 得率 0.45 g/g。由于发酵时间较长，葡萄糖和木糖被完全消耗，菌株没有可利用的碳源，GABA 生产能力下降，GABA 产量减少。

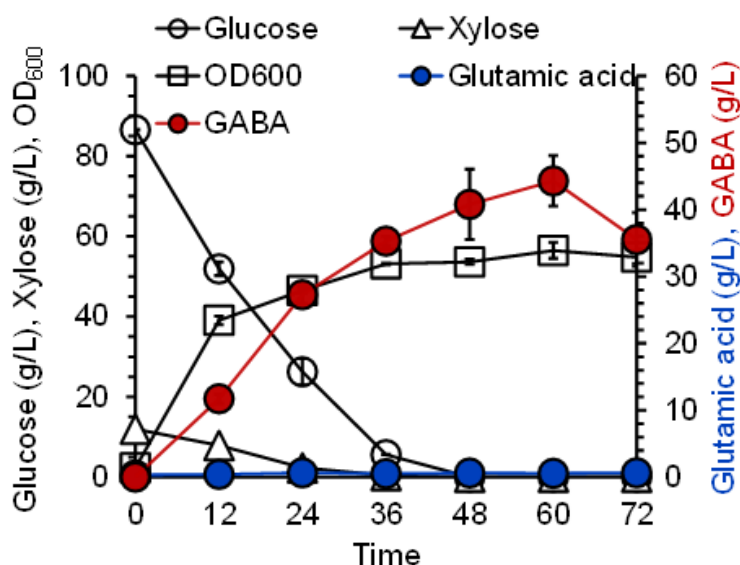


图 3.6 *C. glutamicum* GJ09 在玉米芯残渣水解液的发酵验证

Fig. 3.6 *C. glutamicum* GJ09 using corncob residues hydrolysate

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为玉米芯残渣水解液限氮合成培养基，具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制 pH 为 7.0。

为了进一步提高工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的 GABA 生产水平，通过在发酵液中加入水解液糖浆进行补料分批发酵。以玉米芯残渣水解液为发酵培养基，分别在 36 h、48 h 和 60 h 向发酵罐内补充糖浆，使罐内葡萄糖浓度达到 50 g/L，木糖浓度达到 5 g/L。该做法提供了菌株生产所需的葡萄糖和木糖，并且不会因为补充的溶液过多稀释细胞密度和 GABA 浓度。

工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 在玉米芯残渣水解液体系中补料分批发酵生产 GABA (图 3.7)。培养基中葡萄糖和木糖初始浓度为 85 g/L 和 10 g/L，在 36 h 时木糖基本被消耗，葡萄糖剩余不到 10 g/L。此时，菌体浓度的 OD 值达到 41.2。在 36 h 开始第一次补料，一共补充三次。最终，工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 可以生产 63.4 g/L 的 GABA，基于葡萄糖和木糖的消耗计算出 GABA 得率 0.42 g/g。在发酵过程中，所有谷氨酸被转化为 GABA。但是，在补料分批发酵的后期 (48-72 h)，菌体生长反而下降，GABA 生长速度减慢，每次补料的葡萄糖消耗量明显变少。

分析原因，可能是第一次补料时间不恰当。36 h 时碳源已经几乎完全消耗，没有及时补料使菌体生长受影响，菌株生长进入衰退期。48 h 和 60 h 补料时增加了发酵液体积，菌体细胞被稀释导致 OD 值下降。并且，补料时葡萄糖浓度偏高，菌体代谢负担加重。菌株代谢活力降低，生长速率减慢，导致葡萄糖没有被完全消耗逐渐积累，谷氨酸的生物合成减少，GABA 产量增长缓慢。后续可以在发酵的 24 h，葡萄糖和木糖没有完全消耗的时候开始补料，并减少补料的体积使体系内葡萄糖浓度维持在 30 g/L 左右。并

且，在发酵后期延长发酵时间，消耗完体系内的葡萄糖，增加葡萄糖向 GABA 的转化。

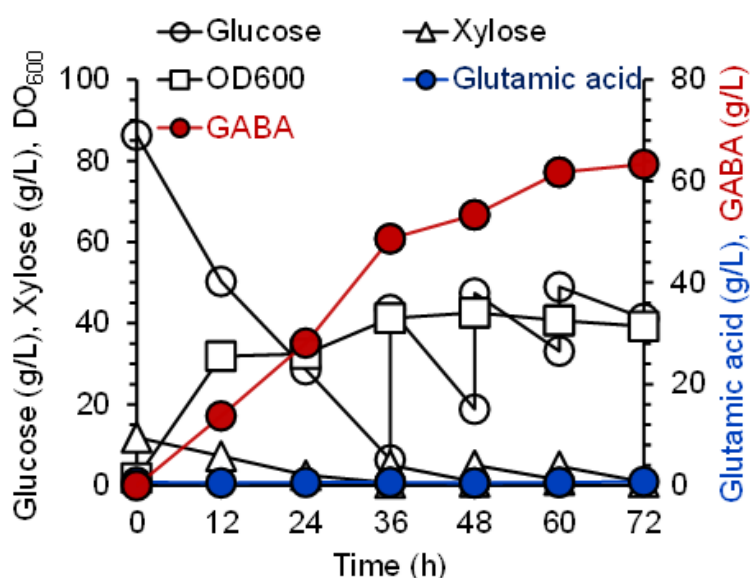


图 3.7 *C. glutamicum* GJ09 利用玉米芯残渣糖浆进行分批补料发酵

Fig. 3.7 Fed-batch fermentation of *C. glutamicum* GJ09 using corncob residues-derive syrup

注：发酵过程在 3 L 发酵罐中进行，培养基为玉米芯残渣水解液限氮合成培养基，具体成分如材料与方法所示，发酵条件：30 °C，600 rpm，用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和氨水控制 pH 为 7.0。

### 3.4 本章小结

本章节以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 为出发菌株，通过基因组整合谷氨酸脱羧酶基因，并优化代谢路径，使 *C. glutamicum* GJ04 具有高效稳定生产 GABA 的能力。以玉米芯残渣水解液来源糖为碳源，实现了 GABA 高效稳定生产菌株在木质纤维素体系中的发酵生产和分批补料发酵生产。本章节的主要结论如下：

(1) 将分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因整合到 *C. glutamicum* GJ04 基因组中可以实现胞外 GABA 的稳定生产。但是基因组中单次整合谷氨酸脱羧酶基因得到的重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 的 GABA 产量很低。在基因组中整合三次谷氨酸脱羧酶基因，并且引入能够提高谷氨酸脱羧酶基因表达量的双顺反子结构，得到了三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07。该菌株谷氨酸脱羧酶转录水平是单拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 的 6.6 倍，GABA 产量是其 4.7 倍。

(2) 为了进一步提高 GABA 产量，优化了三拷贝重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 的 GABA 代谢路径。敲除乙醛酸循环支路中的异柠檬酸脱氢酶编码基因 *aceA* 和 GABA 通透酶编码基因 *gabP*，增加前体谷氨酸的供应和减少胞外 GABA 向胞内运输，最终得到的重组菌株 *C. glutamicum* GJ09 的 GABA 产量达到  $55.1 \pm 0.7$  g/L。筛选出的双顺反子结

构 pTHP9-*gdh* 可以增加谷氨酸的产量，和原始菌株 *C. glutamicum* GJ04 相比，谷氨酸产量提高了 47%。

(3) 在玉米芯残渣水解液批次发酵中，工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的 GABA 最高产量在 60 h 时达到  $44.3 \pm 3.8$  g/L，得率 0.45 g/g。在玉米芯残渣水解液制成的糖浆补料分批发酵中，从 36 h 进行第一次补料，一共补料三次，发酵周期 72 h，最终工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的 GABA 产量达到 63.4 g/L，得率 0.42 g/g。

## 第4章 结论与展望

### 4.1 结论

使用质粒表达谷氨酸脱羧酶的谷氨酸棒杆菌发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸时, 质粒容易丢失, 且不能利用非粮生物质中木糖。本文构建了一株能够基因组多拷贝整合谷氨酸脱羧酶基因的工程菌株 *C. glutamicum* GJ09, 并通过代谢工程改造优化了  $\gamma$ -氨基丁酸的合成路径。经过实验验证, 该菌株能够有效利用木质纤维素的葡萄糖和木糖进行  $\gamma$ -氨基丁酸的发酵生产。

本文的主要结论如下:

(1) 在具有木糖代谢能力的出发菌株 *C. glutamicum* GJ04, 通过质粒表达谷氨酸脱羧酶基因, 实现了重组菌株 *C. glutamicum* GJ04-pTacM-NsgadBmut 利用葡萄糖和木糖混合糖生产  $\gamma$ -氨基丁酸。在限氮条件下,  $\gamma$ -氨基丁酸的产量达到  $45.5 \pm 2.6$  g/L。

(2) 将分泌表达型谷氨酸脱羧酶基因整合到 *C. glutamicum* GJ04 基因组, 并经过三次整合谷氨酸脱羧酶基因和引入谷氨酸脱羧酶基因双顺反子结构, 得到了重组菌株 *C. glutamicum* GJ07。该菌株的谷氨酸脱羧酶表达量与单次整合谷氨酸脱羧酶重组菌株 *C. glutamicum* GJ05 相比,  $\gamma$ -氨基丁酸的产量提高了 6.6 倍。对重组菌株 *C. glutamicum* GJ07 的  $\gamma$ -氨基丁酸合成路径进行了优化。敲除了乙醛酸循环支路中的异柠檬酸脱氢酶编码基因 *aceA*、 $\gamma$ -氨基丁酸通透酶编码基因 *gabP*, 增加了谷氨酸前体的供应、减少了胞外 GABA 向胞内运输, 最终得到的工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 的  $\gamma$ -氨基丁酸产量达到  $55.1 \pm 0.7$  g/L。筛选出双顺反子结构 pTHP9-*gdh* 可以提高谷氨酸脱氢酶的转录水平, 增加前体谷氨酸的供应, 和谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ04 相比, 谷氨酸产量提高了 47%。

(3) 工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 利用玉米芯残渣水解液合成  $\gamma$ -氨基丁酸。分批发酵的  $\gamma$ -氨基丁酸最高产量达到  $44.3 \pm 3.8$  g/L, 得率 0.45 g/g。补料分批发酵的  $\gamma$ -氨基丁酸产量达到 63.4 g/L, 得率 0.42 g/g。

### 4.2 创新点

(1) 本文构建的工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 可以实现  $\gamma$ -氨基丁酸的稳定生产, 不需要通过质粒异源表达谷氨酸脱羧酶, 不添加抗生素维持质粒, 可以减少生产成本和环境污染, 适用于工业化  $\gamma$ -氨基丁酸的生产。

(2) 本文构建的工程菌株 *C. glutamicum* GJ09 含有木糖代谢途径, 增加了  $\gamma$ -氨基丁酸合成的碳源种类。大部分木质纤维素中除了葡萄糖, 还含有 30% 的木糖。本论文的工程菌株可以利用木糖, 在木质纤维素体系中发酵时增加了木质纤维素的利用程度。

### 4.3 展望

本论文首先在谷氨酸棒杆菌中构建了  $\gamma$ -氨基丁酸的合成途径，通过异源表达谷氨酸脱羧酶生产  $\gamma$ -氨基丁酸，并且利用限氮培养基提高  $\gamma$ -氨基丁酸的产量。然后，通过代谢工程改造进行谷氨酸脱羧酶多拷贝在谷氨酸棒杆菌基因组的整合和 GABA 代谢路径的优化，实现  $\gamma$ -氨基丁酸的无质粒稳定生产。最后，在玉米芯残渣水解液中实现  $\gamma$ -氨基丁酸的发酵生产和补料分批发酵。但是，本论文还存在一些问题需要进一步探究：

(1) 增加前体谷氨酸的供应。在第三章中筛选出能够提高谷氨酸表达量的前顺反子高表达基因 HP9，但是并没有应用到  $\gamma$ -氨基丁酸生产菌株中验证该基因是否对提高 GABA 产量有效果。后续研究工作应将筛选出的前顺反子基因整合到 *C. glutamicum* GJ09 基因组，并且探究谷氨酸脱氢酶和谷氨酸脱羧酶在基因组中的最佳拷贝数，进一步提高 GABA 产量。还可以通过过表达 TCA 循环中草酰乙酸到  $\alpha$ -酮戊二酸相关基因，加强流向谷氨酸的代谢通量，增加谷氨酸的积累。

(2)  $\gamma$ -氨基丁酸发酵生产中，5'-磷酸吡哆醛作为辅因子可以增强谷氨酸脱羧酶的酶活。但是谷氨酸棒状杆菌自身合成 5'-磷酸吡哆醛的量太少不能满足 GABA 生产需求，需要额外添加 5'-磷酸吡哆醛。但是，额外添加 5'-磷酸吡哆醛会使生产成本增加。因此，可以过表达 5'-磷酸吡哆醛合酶编码基因 *pdxST*，以提高菌株自身 PLP 的供应能力，满足 GABA 生产的需求。

(3) 目前利用木质纤维素生产  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 的研究中，GABA 质粒表达生产菌株 *C. glutamicum* XY24 通过玉米芯残渣水解液补料分批发酵，可以生产出 93.1 g/L 的 GABA。本研究中 *C. glutamicum* GJ09 通过玉米芯残渣水解液补料分批发酵生产出 63.4 g/L 的 GABA，和 *C. glutamicum* XY24 还有一定的差距。后续可以在 24 h 进行第一次补料，补料时减少糖浆体积，延长发酵时间，使葡萄糖和木糖尽量完全消耗，增加 GABA 的产量。

## 参考文献

- [1] Di Fidio N, Minonne F, Antonetti C, et al. *Cutaneotrichosporon oleaginosus*: A versatile whole-cell biocatalyst for the production of single-cell oil from agro-industrial wastes [J]. *Catalysts*. 2021, 11: 1291.
- [2] Kumar V, Verma P. Pulp-paper industry sludge waste biorefinery for sustainable energy and value-added products development: A systematic valorization towards waste management [J]. *Journal of Environmental Management*. 2024, 352: 120052.
- [3] Sasi S, Bindu Sharmila TK, Julie Chandra CS, et al. Organic chemical compounds from biomass [J]. *Handbook of Biomass*. 2023: 1-41.
- [4] Stefi AL, Vorgias KE. Valorizing bio-waste and residuals [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2025, 278: 1-36.
- [5] Sun Ye, Cheng JY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review [J]. *Bioresource Technology*. 2002, 83: 1-11.
- [6] Sun SN, Sun SL, Cao XF, et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials [J]. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 49-58.
- [7] Ralph J, Lundquist K, Brunow G, et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids [J]. *Phytochemistry Reviews*. 2004, 3: 29-60.
- [8] Vanholme R, Morreel K, Ralph J, et al. Lignin engineering [J]. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008, 11: 278-285.
- [9] Brodeur G, Yau E, Badal K, et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review [J]. *Enzyme research*. 2011, 2011: 787532.
- [10] Harun MY, Radiah ABD, Abidin ZZ, et al. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) [J]. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 5193-5199.
- [11] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9: 1621-1651.
- [12] Li X, Kim TH, Nghiem NP. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF) [J]. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5910-5916.
- [13] Karimi K, Taherzadeh MJ. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity [J]. *Bioresource Technology*. 2016, 200: 1008-1018.
- [14] Li CL, Knierim B, Manisseri C, et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid

- pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification [J]. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4900-4906.
- [15] Singh P, Suman A, Tiwari P, et al. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2008, 24: 667-673.
- [16] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies [J]. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1959-1966.
- [17] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. [J] *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
- [18] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification [J]. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 17-24.
- [19] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds [J]. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9: 598-612.
- [20] Jakob A, Likozar B, Grilc M. Model-assisted optimization of xylose, arabinose, glucose, mannose, galactose and real hemicellulose streams dehydration to (hydroxymethyl) furfural and levulinic acid [J]. *Chemsuschem*. 2024, 17: 1-15.
- [21] Hu L, Lin L, Wu Z, et al. Chemocatalytic hydrolysis of cellulose into glucose over solid acid catalysts [J]. *Applied Catalysis B : Environment and Energy*. 2015, 174: 225-243.
- [22] Chen HZ, Li GH. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production [J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2013, 74: 121-126.
- [23] Anuradha R, Suresh AK, Venkatesh KV. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid [J]. *Process Biochemistry*. 1999, 35: 367-375.
- [24] Berlowska J, Cieciora-Wloch W, Kalinowska H, et al. Enzymatic conversion of sugar beet pulp: a comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation for lactic acid production [J]. *Food Technology and Biotechnology*. 2018, 56: 188-196.
- [25] Zhang B, Yang HC, Wang Y, et al. Improving the dissolved oxygen level in high solids loading cellulosic sugar acids fermentation by restructuring the biorefinery chain [J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2023, 200: 109111.
- [26] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production [J]. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.
- [27] Shao S, Zhang B, Wang Y, et al. Dry biorefinery conversion of cadmium-contaminated

- rice grain and straw to ethanol with complete collection and recycling of cadmium [J]. *Industrial Crops & Products*. 2023, 197: 116550.
- [28] Zhang J, Chu DQ, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 718-728.
- [29] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation [J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [30] Zhang B, Khushik FA, Zhan BR, et al. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification [J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021, 118: 4105-4118.
- [31] Han T, Zhang B, Yang HC, et al. Changes in pH values allow for a visible detection of the end point in submerged liquid biodetoxification during biorefinery processing [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023, 11: 16608-16617.
- [32] Han XS, Bi R, Vinay Khatri, et al. Use of endoglucanase and accessory enzymes to facilitate mechanical pulp nanofibrillation [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, 9: 1406-1413.
- [33] Zhang B, Wu L, Wang Y, et al. Re-examination of dilute acid hydrolysis of lignocellulose for production of cellulosic ethanol after de-bottlenecking the inhibitor barrier [J]. *Journal of Biotechnology*. 2022, 353: 36-43.
- [34] Xu YY, Hua KJ, Huang Z, et al. Cellulosic hydrocarbons production by engineering dual synthesis pathways in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2022, 29: 15-29.
- [35] He NL, Chen MX, Qiu ZY, et al. Simultaneous and rate-coordinated conversion of lignocellulose derived glucose, xylose, arabinose, mannose, and galactose into D-lactic acid production facilitates D-lactide synthesis [J]. *Bioresource Technology*. 2023, 377: 128950.
- [36] Joana C, Herik A, Bao J, et al. Overcoming extended lag phase on optically pure lactic acid production from pretreated softwood solids [J]. *Frontiers*. 2023, 11: 1248441.
- [37] He NL, Jia J, Qiu ZY, et al. Cyclic L-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119: 1903-1915.
- [38] Li ZB, Zhang B, Bao J. pH shifting adaptive evolution stimulates the low pH tolerance of *Pediococcus acidilactici* and high L-lactic acid fermentation efficiency [J]. *Bioresource Technology*. 2025, 416: 131813.
- [39] Liu Q, Zhang B, Hu MS, et al. Simultaneous enhancement of lignin-derived inhibitor

- tolerance and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* by adaptive evolution [J]. *Process Biochemistry*. 2024, 137: 20-29.
- [40] Liu Q, Li YY, Hou WL, et al. Cellulase mediated stress triggers the mutations of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* with super-large spindle morphology and high lipid accumulation [J]. *Biotechnology Journal*. 2023, 18: e2300091.
- [41] Zhang B, Ren DY, Liu Q, et al. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling [J]. *Bioresource Technology*. 2023, 384: 129345.
- [42] Hou WL, Bao J. Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger* [J]. *Bioresource Technology*. 2018, 253: 72-78.
- [43] Jin C, Li J, Huang Z, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) from lignocellulose biomass [J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119: 1598-1613.
- [44] Jin C, Bao J. Lysine production by dry biorefining of wheat straw and cofermentation of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021, 69: 1900-1906.
- [45] Xu YY, Zhang B, Bao J. Whole-cell catalytic synthesis of cadaverine by recombinant *Corynebacterium glutamicum* using corncob residue as carbohydrate feedstock [J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2025, 220: 109760.
- [46] Park SJ, Kim EY, Noh W, et al. Synthesis of nylon 4 from gamma-aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013, 36: 885-892.
- [47] 张小娟, 张梦龙, 张冉冉, 等. 4-氨基丁酸改性聚天冬氨酸聚合物的合成及其阻垢性能研究 [J]. *化学研究*. 2023, 34: 297-302.
- [48] Nakayama Y, Watanabe K, Tanaka R, et al. Synthesis, properties, and biodegradation of sequential poly(Ester Amide)s containing  $\gamma$ -aminobutyric acid [J]. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21: 3674.
- [49] Kwon MJ, Kim JE, Lee SP. Functional kimchi beverage enhanced with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) through serial co-fermentation using *Leuconostoc citreum* S5 and *Lactiplantibacillus plantarum* KS2020 [J]. *Fermentation*. 2025, 11: 44.
- [50] Geng W, Zhang YY, Li CH, et al. Effect of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on the growth, photosynthetic pigment, antioxidant and GABA metabolism of *Festuca arundinacea* (tall fescues) under cadmium stress [J]. *Plants*. 2025, 14: 383.
- [51] Zhang QL, Zhu L, Li HL, et al. Insights and progress on the biosynthesis, metabolism, and physiological functions of gamma-aminobutyric acid (GABA): A review [J]. *Peerj*.

- 2024, 12: e18712.
- [52] Deng XX, Xu XW, Liu Y, et al. Induction of  $\gamma$ -aminobutyric acid plays a positive role to *Arabidopsis* resistance against *Pseudomonas syringae* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2020, 62: 1797-1812.
- [53] Renault H, El Amrani A, Palanivelu R, et al. GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*. 2011, 52: 894-908.
- [54] Tam DLV, Kim TW, Hong SH. Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012, 35: 645-650.
- [55] Govil T, Wang J, Samanta D, et al. Lignocellulosic feedstock: A review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics [J]. *Journal of Cleaner Production*. 2020, 270: 122521.
- [56] Raethong N, Chamtim P, Thananusak R, et al. Genome-wide transcriptomics revealed carbon source-mediated  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production in a probiotic, *Lactiplantibacillus pentosus* 9D3 [J]. *Heliyon*. 2025, 11: e41879.
- [57] Lee H, Kim H, Chang YB, et al. *Lactobacillus brevis* M2-fermented whey protein hydrolysate increases slow-wave sleep via GABA<sub>A</sub> receptors in rodent models [J]. *Foods*. 2024, 13: 2049.
- [58] Lai QD, Doan NTT, Nguyen HD, et al. Influence of enzyme treatment of rice bran on gamma-aminobutyric acid synthesis by *Lacto bacillus* [J]. *International Journal of Food Science and Technology*. 2021, 56: 4722-4729.
- [59] Thongrueck K, Maneerat S. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid (GABA) from *Lactobacillus futsaii* CS3 using agri-food industries by-products under batch and fed-batch fermentation [J]. *Indian Journal of Microbiology*. 2023, 63: 467-482.
- [60] Azhari SH, Mohtar WAAOIW, Kadir SA, et al. Evaluation of a Malaysian soy sauce *koji* strain *Aspergillus oryzae* NSK for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production using different native sugars [J]. *Food Science and Biotechnology*. 2018, 27: 479-488.
- [61] Dikshit R, Tallapragada P. Screening and optimization of  $\gamma$ -aminobutyric acid production from *Monascus sanguineus* under solid-state fermentation [J]. *Frontiers in Life Science*. 2015, 8: 172-181.
- [62] Baritugo KA, Kim HT, David Y, et al. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from empty fruit bunch biosugar solution [J]. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17: 129.
- [63] Hasegawa M, Fujii S, Funato K, et al. Expression of two glutamate decarboxylase genes in *Lactobacillus brevis* during gamma-aminobutyric acid production with date residue

- extract [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2020, 84: 1069-1072.
- [64] Kim K, Hou CY, Choe D, et al. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* W enhances gamma-aminobutyric acid production using glycerol as the carbon source [J]. *Metabolic Engineering*. 2022, 69: 59-72.
- [65] Wei L, Zhao JH, Wang YR, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level  $\gamma$ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control [J]. *Metabolic Engineering*. 2022, 69: 134-146.
- [66] Fan TT, Chen C, Zeng DW, et al. Stress-driven production of  $\gamma$ -aminobutyric acid using non-conventional yeast strains *Kluyveromyces marxianus* JMY140K and *Metschnikowia reukaufii* JMY075 [J]. *Journal of Fungi*. 2025, 11: 20.
- [67] 温经柏. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌发酵生产纤维素谷氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸 [D]. 华东理工大学. 2019.
- [68] Xu YY, Zhang B, Bao J. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid using corncob residue as carbohydrate feedstock by engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2025, 215: 109629.
- [69] Bakonyi P, Borza B, Orlovits K, et al. Fermentative hydrogen production by conventionally and unconventionally heat pretreated seed cultures: A comparative assessment [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, 39: 5589-5596.
- [70] Wen JB, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin-rich corn stover hydrolysate [J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 86.
- [71] Wen JB, Bao J. Improved fermentative  $\gamma$ -aminobutyric acid production by secretory expression of glutamate decarboxylase by *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Journal of Biotechnology*. 2021, 331: 19-25.
- [72] Ma D, Lu PL, Yan CY, et al. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter [J]. *Nature*. 2012, 483: 632-636.
- [73] Sim MS, Park SH, Choi JI, et al. Development of a highly efficient microbial fermentation process of recombinant *Escherichia coli* for GABA production from glucose [J]. *Journal of Biotechnology*. 2025, 399: 72-80.
- [74] Wang Q, Liu XH, Fu JH, et al. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912 [J]. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17: 80.
- [75] Asun AC, Lin ST, Ng HS, et al. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Bacillus subtilis* BBEL02 fermentation using nitrogen-rich industrial wastes as crude feedstocks [J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2022, 187: 108654.
- [76] Son J, Baritugo KA, Sohn YJ, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) in

- recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expression of glutamate decarboxylase active at neutral pH [J]. ACS Omega. 2022, 7: 29106-29115.
- [77] Prückler M, Lorenz C, Endo A, et al. Comparison of homo- and heterofermentative *Lactic acid bacteria* for implementation of fermented wheat bran in bread [J]. Food Microbiology. 2015, 49: 211-219.
- [78] Kim JH, Shoemaker SP, Mills DA. Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis* [J]. Microbiology. 2009, 155: 1351-1359.
- [79] Cha XC, Ding JJ, Ba WY, et al. High production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by activating the *xyl* operon of *Lactobacillus brevis* [J]. ACS Omega. 2023, 8: 8101-8109.
- [80] Zhang L, Yue Y, Wang XJ, et al. Optimization of fermentation for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production by yeast *Kluyveromyces marxianus* C21 in okara (soybean residue) [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2022, 45: 1111-1123.
- [81] Peng CL, Huang J, Hu S, et al. A two-stage pH and temperature control with substrate feeding strategy for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2013, 21: 1190-1194.
- [82] Wen JB, Sun W, Leng G, et al. Enhanced fermentative  $\gamma$ -aminobutyric acid production by a metabolic engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2024, 29: 129-140.
- [83] Li HX, Qiu T, Huang GD, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation [J]. Microbial Cell Factories. 2010, 9:85.
- [84] Altaib H, Kozakai T, Badr Y, et al. Cell factory for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production using *Bifidobacterium adolescentis* [J]. Microbial Cell Factories. 2022, 21: 33.
- [85] Han J, Zhao X, Zhao X, et al. Microbial-derived  $\gamma$ -aminobutyric acid: Synthesis, purification, physiological function, and applications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2023, 71: 14931-14946.
- [86] Lee EJ, Lee SP. Novel bioconversion of sodium glutamate to  $\gamma$ -amino butyric acid by co-culture of *Lactobacillus plantarum* K154 in *Ceriporia lacerata* culture broth [J]. Food Science and Biotechnology. 2014, 23: 1997-2005.
- [87] Wu QL, Law YS, Shah NP. Dairy *Streptococcus thermophilus* improves cell viability of *Lactobacillus brevis* NPS-QW-145 and its  $\gamma$ -aminobutyric acid biosynthesis ability in milk [J]. Scientific Reports. 2015, 5: 12885.
- [88] Seo MJ, Nam YD, Park SL, et al.  $\gamma$ -aminobutyric acid production in skim milk co-fermented with *Lactobacillus brevis* 877G and *Lactobacillus sakei* 795 [J]. Food Science and Biotechnology. 2013, 22: 751-755.
- [89] Tung YT, Lee BH, Liu CF, et al. Optimization of culture condition for ACEI and GABA

- production by *Lactic acid bacteria* [J]. Journal of Food Science. 2011, 76: 585-591.
- [90] Dovom MRE, Najafi MBH, Vosough PR, et al. Screening of *Lactic acid bacteria* strains isolated from Iranian traditional dairy products for GABA production and optimization by response surface methodology [J]. Scientific Reports. 2023, 13: 440.
- [91] Chen L, Alcazar J, Yang T, et al. Optimized cultural conditions of functional yogurt for  $\gamma$ -aminobutyric acid augmentation using response surface methodology [J]. Journal of Dairy Science. 2018, 101: 10685-10693.
- [92] Thuy DTB, Nguyen A, Khoo KS, et al. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production by newly identified *Pediococcus pentosaceus* MN12 isolated from 'mam nem', a fermented fish sauce [J]. Bioengineered. 2021, 12: 54-62.
- [93] Rashmi D, Zanan R, John S, et al.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA): Biosynthesis, role, commercial production, and applications [J]. Studies in Natural Products Chemistry. 2018, 57: 413-452.
- [94] Harnentis H, Nurmiati N, Marlida Y, et al. Gamma-aminobutyric acid production by selected *Lactic acid bacteria* isolate of an Indonesian indigenous fermented buffalo milk (dadih) origin. Veterinary World. 2019, 12: 1352-1357.
- [95] Binh TTT, Ju WT, Jung WJ, et al. Optimization of  $\gamma$ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis* [J]. Biotechnology Letters. 2014, 36: 93-98.
- [96] Ho NAT, Hou CY, Kim WH, et al. Expanding the active pH range of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2013, 115: 154-158.
- [97] Zhu L, Wang ZF, Gao L, et al. Unraveling the potential of  $\gamma$ -aminobutyric acid: Insights into its biosynthesis and biotechnological applications [J]. Nutrients. 2024, 16: 2760.
- [98] Wu CH, Hsueh YH, Kuo JM, et al. Characterization of a potential probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and efficient production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in batch fermentation [J]. International Journal of Molecular Sciences. 2018, 19: 143.
- [99] Sekine T, Yamanushi M, Hamada-Sato N. GABA production and probiotic addition in *Saccharina angustata* (Hidakakombu) by fermentation of *Lactiplantibacillus pentosus* SN001 [J]. Fisheries Science. 2022, 88: 429-435.
- [100] Cheng FY, Luozhong SJ, Yu HM, et al. Biosynthesis of chondroitin in engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019, 29: 392-400.
- [101] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins [J]. Journal of Biotechnology. 2003, 104: 5-25.
- [102] Inui M, Suda M, Okino S, et al. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum*

- metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions [J]. *Microbiology*. 2007, 153: 2491-2504.
- [103] Sun BB, Yang JJ, Yang S, et al. A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Biotechnology Journal*. 2018, 13: e1700588.
- [104] Wang B, Hu QT, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17: 63.
- [105] Coates RC, Blaskowski S, Szyjka S, et al. Systematic investigation of CRISPR-Cas9 configurations for flexible and efficient genome editing in *Corynebacterium glutamicum* NRRL-B11474 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2019, 46: 187-201.
- [106] Liao JE, Wu XY, Xing ZQ, et al.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in tea (*Camellia sinensis* L.) through the GABA shunt and polyamine degradation pathways under anoxia [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65: 3013-3018.
- [107] Zhao Z, Ding JY, Ma WH, et al. Identification and characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake system gabp<sub>Cg</sub> (NCgl0464) in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78: 2596-2601.
- [108] Sakai S, Tsuchida Y, Okino S, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73: 2349-2353.
- [109] Park HS, Um Y, Sim SJ, et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates [J]. *Process Biochemistry*. 2015, 50: 347-356.
- [110] Wendisch VF, Brito LF, Lopez MG, et al. 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 [J]. *Journal of Biotechnology*. 2016, 234: 139-157.
- [111] Wei L, Zhao J, Wang Y, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level  $\gamma$ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control [J]. *Metabolic Engineering*. 2022, 69: 134-146.
- [112] Wang J, Ma W, Zhou J, et al. Microbial chassis design and engineering for production of gamma-aminobutyric acid [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024, 40: 159.
- [113] Shi F, Xie YL, Jiang JJ, et al. Directed evolution and mutagenesis of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* Lb85 to broaden the range of its activity toward a near-neutral pH [J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014, 61-62: 35-43.

- [114] Yao CZ, Shi F, Wang XY. Chromosomal editing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to produce gamma-aminobutyric acid [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2023, 70: 7-21.
- [115] 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* [J]. *Biotechnology Letters*. 2015, 37: 1473-1481.
- [116] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Metabolic Engineering*. 2017, 42: 157-167.
- [117] Shi F, Luan M, Li Y. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and producing  $\gamma$ -aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *AMB Express*. 2018, 8: 61.
- [118] Yim SS, Choi JW, Lee RJ, et al. Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113: 163-172.
- [119] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, et al. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks [J]. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42: 30-39.
- [120] Jin C, Huang Z, Bao J. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose [J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8: 6315-6322.
- [121] Korös A, Varga Z, Molnár-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 [J]. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1203: 146-152.
- [122] Ghose TK. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [123] Sun MM, Gao X, Zhao ZH, et al. Enhanced production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum* by constructing a bicistronic gene expression system [J]. *Microb Cell Fact*. 2020, 19: 113.

## 致谢

时光飞逝,充实的三年硕士生涯即将落下帷幕。初入研一时的场景,仿佛就在昨日。如今,毕业却已近在咫尺!回首过往三年,内心感慨万千。这一路既有诸多挫折与失败,又有成功的欢欣与喜悦,这段经历无疑是截至目前我人生中最为珍贵和收获最为丰富的时光。

首先,我要特别感谢我的导师鲍杰教授。在我的整个科研过程中,鲍老师投入了大量精力和时间。从论文选题到研究方案制定,从实验开展到数据总结,从论文撰写到论文定稿,每个研究过程都离不开鲍老师的悉心指导。鲍老师认真的工作态度、严谨的科研精神以及渊博的学识修养,永远是我学习的榜样。在这里,祝鲍老师身体健康、学术长青!

同时,我也要感谢张斌老师在实验实施和论文撰写方面我的帮助和指导。祝张老师天天开心、事事顺利!

其次,我要感谢徐迎迎师姐和宋卓琳师姐。从进实验室开始,她们就一直手把手教我各种实验技能、写作技巧以及文献查阅。从她们身上,我学到了严谨认真的科研态度和不怕困难的生活态度。同时,我也要感谢同门王新茹同学在实验之余和我一起吃喝玩乐!我还要感谢实验室其他师兄师姐师弟师妹们,谢谢你们给我的陪伴和温暖。在此,祝大家学业有成、一路生花!

最后,我要感谢我的父母亲。谢谢你们一直以来给我的关心和支持!

## 硕士期间研究成果

### 待发表论文:

**Jie Wang**, Bin Zhang, Jie Bao. Stepwise metabolic engineering of a plasmid-free *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by co-utilizing lignocellulosic feedstock-derived sugars. *Journal of Biotechnology*. (under review)

### 申请专利:

鲍杰, 王洁, 张斌. 一株利用木质纤维素生产  $\gamma$ -氨基丁酸的谷氨酸棒杆菌工程菌及其应用. 专利申请号: 202510721357.7.