

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):817-824; 4 August 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

以葡萄糖为底物一步法合成 γ -氨基丁酸整合型重组钝齿棒杆菌的构建

孙红梅¹, 饶志明^{1*}, 李秀鹏¹, 徐美娟¹, 张显¹, 许正宏²

¹江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

²江南大学药学院制药工程实验室, 无锡 214122

摘要:【目的】为了构建一株直接利用廉价的葡萄糖合成 γ -氨基丁酸的重组钝齿棒杆菌, 将来自于植物乳杆菌 γ -氨基丁酸合成途径的关键酶谷氨酸脱羧酶基因 (*lpgad*) 在产谷氨酸菌株钝齿棒杆菌中进行整合表达, 实现葡萄糖到 GABA 的一步法生产。【方法】运用 PCR 技术扩增得到带有 *tac* 启动子的谷氨酸脱羧酶基因 *tacgad*。通过重叠 PCR 的方法获得钝齿棒杆菌精氨酸合成途径关键酶 N-乙酰谷氨酸激酶 (NAGK) 基因内部缺失型基因 $\Delta argB$ 。利用自杀载体 pK18*mobsacB* 构建同源整合载体 pK18- $\Delta argB::tacgad$, 以 $\Delta argB$ 的上下游序列为同源臂, 通过两次同源重组将 *tacgad* 基因整合到钝齿棒杆菌基因组, 同时将 NAGK 基因 *argB* 灭活, 利用蔗糖致死基因 *sacB* 反向筛选标记筛选得到谷氨酸脱羧酶的重组钝齿棒杆菌 *C. crenatum* $\Delta argB::tacgad$ 。重组钝齿棒杆菌以葡萄糖为底物进行发酵, 测定 GABA 含量。【结果】重组菌 *C. crenatum* $\Delta argB::tacgad$ 成功表达谷氨酸脱羧酶, 同时阻断了精氨酸合成途径对谷氨酸到 GABA 代谢途径的竞争, 粗酶液基本检测不到 NAGK 活性, 发酵液无精氨酸合成。通过 96 h 发酵, 重组菌可积累约 8.28 g/L 的 GABA。【结论】本研究通过将谷氨酸脱羧酶基因定向整合到钝齿棒杆菌精氨酸合成途径的关键酶基因 *argB* 内部, 成功表达谷氨酸脱羧酶的同时阻断竞争途径精氨酸的合成。本研究为实现直接利用葡萄糖合成 GABA 的一步法生产奠定了基础。

关键词: γ -氨基丁酸, 钝齿棒杆菌, 同源重组, 谷氨酸脱羧酶, 一步法发酵

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013)08-0817-08

γ -氨基丁酸 (γ -amino butyric acid, GABA) 是天然存在于某些生物体内的非蛋白质氨基酸, 为哺乳动物中枢神经系统重要的抑制性神经递质, 具有抗焦虑、降血压、镇定安神、增强记忆、调节激素分泌、促进生殖、利尿、镇痛等生理功能^[1], 在食品、饲料、

医药等领域都具有广泛的应用。

目前, GABA 的制备主要通过化学合成法和微生物法, 化学合成法反应条件剧烈, 污染严重, 微生物发酵法条件温和、安全、成本较低, 目前最受关注的微生物法主要是通过微生物中的谷氨酸脱羧酶

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-10-0459); 国家“973 项目” (2012CB725202); 国家“863 计划” (2011AA02A211); 国家自然科学基金 (21276110, 30970056); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51306A); 高等学校博士学科点专项科研基金 (201110093120001); 江苏高校优势学科建设工程项目

* 通信作者。Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

作者简介: 孙红梅 (1986-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 发酵工程专业。E-mail: sun_hongmei0321@sina.com

收稿日期: 2013-01-24; 修回日期: 2013-04-07

(glutamate decarboxylase, GAD; EC4. 1. 1. 15) 催化 L-谷氨酸的 α -羧基脱羧来生产 GABA, 而 GAD 是作用于这一过程的唯一酶^[2]。目前, 已有一些利用谷氨酸脱羧酶生产 GABA 的报道。江南大学的傅元欣等^[3] 利用一株乳酸菌中的谷氨酸脱羧酶进行细胞转化法生产 GABA, 通过分批添加谷氨酸, GABA 积累量达到 19.1 g/L。浙江大学黄俊、梅乐和^[4-5] 等人经筛选诱变得一株乳酸菌, GABA 产量为 17 g/L, 通过一系列优化, 该诱变菌株在 3.7 L 发酵罐中 GABA 积累量达到 76.36 g/L。本研究室前期通过菌种筛选获得一株植物乳杆菌, 此菌株具有较高的谷氨酸脱羧酶活力, 摇瓶水平转化 24 h, GABA 产量可达到 34.66 g/L^[6], 原始菌株经诱变处理后在 5 L 发酵罐中经全细胞转化 24 h, GABA 浓度可达到 65.45 g/L。在此基础上, 本研究室将植物乳杆菌中谷氨酸脱羧酶基因克隆, 构建 GAD 高表达型重组大肠杆菌, 借助大肠杆菌生长迅速以及可人工调控 GAD 表达的优点进行 GABA 高效率生产, 重组菌通过添加 L-谷氨酸为底物, 全细胞转化 24 h, GABA 累计浓度可达 204.5 g/L^[7]。

以上利用谷氨酸为底物进行 GABA 发酵的方法, 虽然可以获得较高的转化率及产量, 但原料成本比较高, 如何利用更廉价的底物直接发酵生产获得 GABA 是本研究的主要目的。

本实验室前期筛选到的植物乳杆菌具有高产 GABA 能力, 钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 是本研究室与江南大学药学院许正宏教授合作通过筛选及层级诱变获得的一株高产 L-精氨酸菌株, 可利用葡萄糖发酵获得将近 40 g/L 的精氨酸, 精氨酸合成途径中受精氨酸反馈抑制的关键酶为 *argB* 基因编码的乙酰谷氨酸激酶 (NAGK)^[8]。本研究室前期对钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 的 *argB* 基因有过较为深入的研究, 徐美娟^[9] 等对 *argB* 进行定点突变, 提高精氨酸的产量。本工作将 *tacgad* 基因整合到钝齿棒杆菌基因组并成功表达, *argB* 基因灭活, 在表达谷氨酸脱羧酶的同时消除了精氨酸的竞争, 获得了能以廉价的葡萄糖为底物利用内源性谷氨酸合成 GABA 的重组菌, 构建示意图如图 1 所示。这一研究为实现葡萄糖到 GABA 的一步法生产奠定的基础。

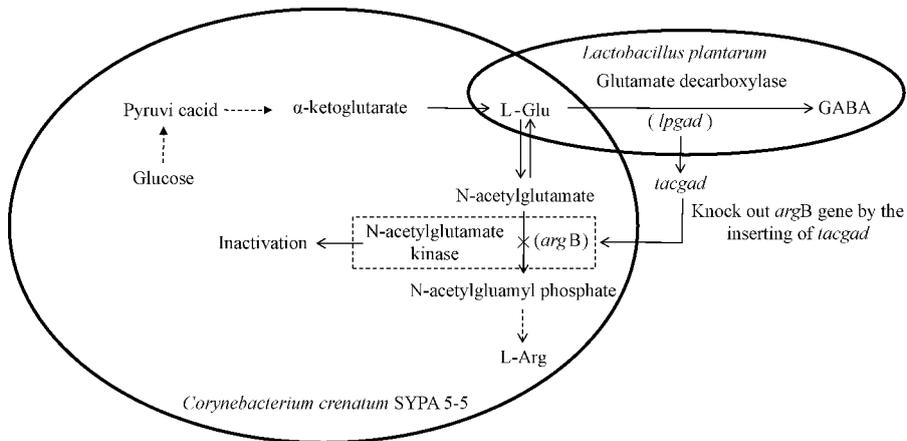


图 1. 重组钝齿棒杆菌构建示意图

Figure 1. The construction schematic of the recombinant strain.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* GB 01-21) 由本实验室筛选并诱变获得。钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 本实

验室保藏。 *E. coli* JM109 本实验室保藏。克隆载体 pMD 18-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司。重组表达质粒 pJC-tac-lpgad 由本实验室保藏, 钝齿棒杆菌整合型质粒 pK18mobsacB^[10] 由本实验保藏。

1.1.2 引物: PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, 实验涉及的引物名称及核苷酸序列如表 1 所示。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used for PCR in this study

Primers	Sequences and restriction sites(5'→3')
PargB1F	ACCGTCTAGAAATGAATGACTTGTATCAAAAG (<i>Xba</i> I)
PargB2R	CGCGTCTGACTTACAGTTCCTCCATCCTTG (<i>Sal</i> I)
PargB3R	AGATCTCCCATCCACTAAACTTAAACACGGTTTAC CATCTCA (<i>Bgl</i> II)
PargB4F	TGTTTAAAGTTTGTGGATGGGAGATCTTGGACCT GCCGCGCAAATC (<i>Bgl</i> II)
PtacgadF	CGCGGATCCGGA GCT TAT CGA CTG CAC GGTGCA (<i>Bam</i> HI)
PtacgadR	CGCGGATCCTCAGGTGTGTTTAAAGCTGTT-(<i>Bam</i> HI)

1.1.3 培养基及培养条件:① LB 培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 121℃ 灭菌 15 min, 固体培养基添加 2% 的琼脂, 用于大肠杆菌的培养;② LBG 培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 葡萄糖 5, 115℃ 灭菌 15 min, 固体培养基添加 2% 的琼脂, 用于钝齿棒杆菌的培养;③ 钝齿棒杆菌感受态培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 甘氨酸 30, Tween 80 1, 121℃ 灭菌 15 min;④ 钝齿棒杆菌种子培养基(g/L):葡萄糖 25, 玉米浆 30, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 尿素 6(分消), pH 7.0-7.2, 115℃ 灭菌 15 min;⑤ 钝齿棒杆菌发酵培养基(g/L):葡萄糖 150, 玉米浆 3, 尿素 5.5(分消), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 生物素 8×10^{-5} , L-组氨酸 5×10^{-4} , pH 7.0-7.2, 115℃ 灭菌 15 min。大肠杆菌培养温度 37℃, 旋转式摇床 160 r/min。钝齿棒杆菌培养温度 30℃, 往复式摇床 220 r/min。⑥ 植物乳杆菌培养基:MRS 培养基。

1.1.4 主要试剂和仪器:质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。工具酶、IPTG 购自 TaKaRa 公司。氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Km)购自上海 Sangon 公司。PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。 γ -氨基丁酸(GABA)标样:购自上海生工生物技术有限公司(Sigma, 纯度 99.9%), 其他试剂均为国产试剂纯。氨基酸自动分析仪为日立 835-50 型, 2619# 树脂(阳离子交换柱 $\Phi 2.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$)。

1.2 基因的克隆

根据 GenBank 中 *C. glutamicum* ATCC13032 *argB* 基因序列设计引物。以钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 基因组^[11]为模板, PargB1F、PargB2R 为 *argB* 基因引物进行 PCR, PCR 产物连接 pMD 18-T Simple 克

隆载体, 获得 T-*argB*, 经上海 Sangon 测序。根据 *argB* 基因测序结果, 设计带有 21 bp 互补序列(引物中加粗斜体部分)的引物 PargB3R、PargB4F, 经重叠 PCR^[12] 制备缺失型片段 $\Delta argB$ 。以钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 染色体为模板, 分别以 PargB1F、PargB3R 和 PargB2R、PargB4F 为引物进行 PCR, 获得含 21 bp 互补粘性末端的 PCR 产物, 以上述 PCR 产物为模板, 以 PargB1F、PargB2R 为引物 PCR, 获得中间带有 *Bgl* II 酶切位点的缺失型片段 $\Delta argB$ 。

根据 NCBI 中植物乳杆菌 *L. plantarum* subsp. *plantarum* ST-III 全基因组核酸序列中的 *lpgad* 基因序列(GI:308044682), 以及 *tac* 启动子序列, 设计带有 *tac* 启动子的谷氨酸脱羧酶编码基因 *tacgad* 的引物。以实验室保藏的质粒 pJC-*tac-lpgad* 为模板, PtcgadF、PtcgadR 为引物进行 PCR。

PCR 采用 50 μL 体系, 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸(延伸时间为: *tacgad* 基因 90 s, 其它基因 1 min), 35 个循环; 72℃ 终延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳检测, 切下目的条带。将 PCR 所得片段经 DNA 胶回收试剂盒回收纯化后与克隆载体 pMD 18-T Simple 连接, 转化 *E. coli* JM109, 经过氨苄青霉素抗性平板筛选, 挑取阳性转化子。提取质粒酶切鉴定, 将酶切验证正确的重组质粒送至上海 Sangon 公司测序, 最终成功得到 T- $\Delta argB$ 和 T-*tacgad*。

1.3 同源整合载体 pK18- $\Delta argB$:*tacgad* 的构建

根据 *bgl* II 和 *Bam*HI 可以将基因切出相同粘性末端的性质, 将测序正确的 T- $\Delta argB$ 用 $\Delta argB$ 的内部酶切位点 *Bgl* II 进行酶切, 并用碱性磷酸酶 CIAP 于 65℃ 水浴处理 30 min, 将测序正确的 T-*tacgad* 用 *Bam*HI 进行酶切释放两端带有 *Bam*HI 的 *tacgad*, 将其与前一酶切产物分别回收纯化, T4 DNA 连接酶连接, 转化至大肠杆菌 JM109, 构建重组质粒 T- $\Delta argB$:*tacgad*, 酶切验证, 并送上海 Sangon 测序。用 *Xba* I 以及 *Sal* I 双酶切重组质粒 T- $\Delta argB$:*tacgad* 以及 pK18*mobsacB*, 胶回收目的片段, T4 DNA 连接酶连接, 转化至大肠杆菌 JM109, 提取重组自杀质粒 pK18- $\Delta argB$:*tacgad*, 酶切验证。

1.4 电转化法同源重组

将经酶切验证正确的 pK18- $\Delta argB$:*tacgad* 电击转化^[13] *C. crenatum* SYPA 5-5, 经 1800 V, 5 ms 电击后涂布于含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的固体 LBG 平

板,于30℃培养36 h,经过卡那霉素初次筛选获得一次重组菌。再分别将目标转化子在含10%蔗糖的培养基中进行胁迫二次重组筛选,30℃培养24 h后获得二次同源重组菌。提取重组子染色体为模板,以 *argB* 基因以及 *tacgad* 基因上下游引物 PCR,进行回复野生型/重组型的鉴定,将 PCR 鉴定为重组型的菌株命名为 *C. crenatum* $\Delta argB::tacgad$ 。

1.5 重组钝齿棒杆菌酶活的检测

1.5.1 粗酶液制备:将重组菌转化子以及原始菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 以及 *L. plantarum* GB 01-21 分别在 LBG 或 MRS 培养基培养36 h,发酵液离心收集的菌体根据菌体浓度重悬于 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,超声波破碎细胞,离心破碎液,取上清即为粗酶液。粗酶提取液中蛋白质浓度测定采用考马斯亮兰染色法,以牛血清蛋白为标样。

1.5.2 N-乙酰谷氨酸激酶 (NAGK) 酶活检测^[9]:具体操作见参考文献,一个活力单位 (U) 定义为在上述反应条件下,每分钟生成 1 μmol N-乙酰谷氨酸氧肟酸所需的酶量。

1.5.3 谷氨酸脱羧酶 (GAD) 酶活检测:采用 Berthlot 比色法^[14],具体操作见参考文献,一个酶活力单位 (U) 定义为在测定条件下每分钟产生 1 μmol GABA 所需的酶量。

1.6 重组菌发酵产 GABA

挑取重组菌单菌落接种至液体种子培养基,原始菌株作为对照,30℃,220 r/min 往复式摇床培养 12 h。以 8% 接种量转接至发酵培养基,30℃,220 r/min 进行发酵。培养至 8 h 时开始定时添加尿素作为 NH_4^+ 源来合成谷氨酸,约 36 h 时停止 NH_4^+ 的供给,即终止谷氨酸的合成,继续 GABA 的发酵。实时检测发酵过程中 GABA、谷氨酸和精氨酸产量以及菌体量、糖耗等参数。

1.7 菌体生长的测定

菌液浓度测定:吸取样品菌液,用蒸馏水稀释一定倍数,以蒸馏水作为空白对照,采用分光光度计于 1 cm 光程测定 OD_{562} 。

1.8 发酵液中还原糖的测定

采用 SBA-40B 生物传感分析仪测定发酵液中葡萄糖浓度。

1.9 氨基酸含量的测定

精氨酸初步定量采用改良的坂口试剂测定法^[15]。各种氨基酸的精确测定采用氨基酸自动分

析仪测定发酵液中氨基酸含量。样品的处理:发酵液经 8000 r/min 离心 2 min 后收集上清,用终浓度为 5% 的三氯乙酸处理一段时间后经双层滤纸过滤,滤液经 10000 r/min 离心 10 min,上清稀释至适宜浓度测定。

2 结果

2.1 *C. crenatum* $\Delta argB::tacgad$ 的构建与鉴定

测序结果显示,来自于 *C. crenatum* SYPA 5-5 的 *argB* 基因与 GenBank 中的 *C. glutamicum* ATCC13032 (No. BX927147.1) 的 *argB* 基因序列同源性高达 99.47%,此基因长度为 954 bp。经两轮重叠 PCR 获得 $\Delta argB$ 片段测序结果显示, $\Delta argB$ 缺失 *argB* 基因中间 491 bp 的碱基,与理论值相一致。

tacgad 基因 PCR 产物经核酸电泳显示约 1680 bp 的片段 (图 2-A),与预期扩增产物大小吻合。测序结果证实本实验克隆的基因片段 *tac* 启动子部分与 pJC-*tac* 中 *tac* 启动子序列一致;而 *tac* 启动子下游 *lpgad* 基因部分与 GenBank 数据库所提交的原序列 (Accession No. JN248358) 进行比对,结果完全吻合,该基因大小为 1410 bp,编码 469 个氨基酸和一个终止密码子。

重组质粒 T- $\Delta argB::tacgad$ 经 *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切验证后,释放约 2700 bp 和约 2200 bp 的两条片段,分别对应于克隆载体 pMD 18-T Simple 和 $\Delta argB::tacgad$ 片段的大小。T- $\Delta argB::tacgad$ 和 pK18mobsacB 用相应酶处理后连接获得重组自杀质粒 pK18- $\Delta argB::tacgad$,用 *Xba* I 以及 *Sal* I 双酶切后释放约 5700 bp 和 2200 bp 的两条片段,分别对应于 pK18mobsacB 和 $\Delta argB::tacgad$ 。

两次同源重组筛选获得的重组子 PCR 验证结果如图 2-B 所示,2 号泳道对应重组子约 1680 bp 的 *tacgad* 基因,说明 GAD 基因成功整合到钝齿棒杆菌染色体;原始菌 *argB* (3 号泳道) 大小约 1000 bp,而 4 号泳道对应的基因大小在 2200 bp 左右,表明 *tacgad* 基因正确插入到 $\Delta argB$ 基因内部。该转化子为整合成功的重组菌株 *C. crenatum* $\Delta argB::tacgad$ 。

2.2 重组菌 NAGK 以及 GAD 的酶活检测

为了使分析更合理,本实验采用比酶活 (U/mg 蛋白) 数据进行分析。各菌株胞内 NAGK、GAD 的

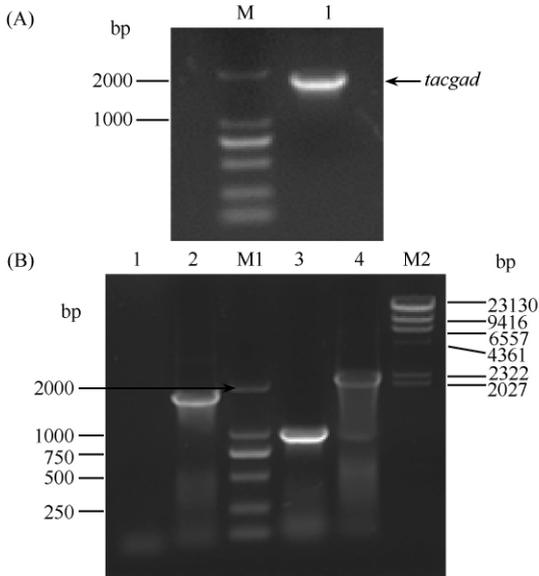


图 2. 重组钝齿棒杆菌的鉴定

Figure 2. Identification of integrated recombinant strain. A: PCR amplification of *tacgad* gene. M: DL2000 Maker; lane 1: PCR products. B: PCR identification of *C. crenatum* Δ *argB::tacgad*. M1: DL2000 Maker; lane 1: The *tacgad* gene PCR products of *C. crenatum* SYPA 5-5 (negative control); lane 2: The *tacgad* gene of recombinant strain; lane 3: The *argB* gene of *C. crenatum* SYPA 5-5; lane 4: The Δ *argB::tacgad* gene of recombinant strain; M2: λ -Hind III Maker.

比酶活如表 2。与 *C. crenatum* SYPA 5-5 相比,重组菌粗酶液 NAGK 比酶活明显低于原始菌,由此确定

表 3. 重组菌与原始菌产 GABA 的发酵参数(96 h)

Table 3. The fermentation parameters of the recombinants and original strains at 96 h during the producing of GABA

Strains	OD_{562}	Residual glucose (g/L)	$c(\text{L-Glu})/(\text{g/L})$	$c(\text{Arg})/(\text{g/L})$	$c(\text{GABA})/(\text{g/L})$
<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5	29.2 ± 0.82	0	2.26 ± 0.30	40.7 ± 1.1	0
<i>C. crenatum</i> Δ <i>argB::tacgad</i>	28.8 ± 0.91	18 ± 0.14	18.2 ± 0.83	0	8.28 ± 0.59

由生长曲线(图 3-A)可知,在相同接种量条件下,*C. crenatum* Δ *argB::tacgad* 生长较原始菌株有些缓慢,可能是谷氨酸脱羧酶的额外表达增加了菌体的负荷;在稳定期后期不再添加尿素,L-Glu 过量积累,使得这个时期发酵液成酸性,而 GAD-GABA 转运系统的耐酸性机制^[16],使得重组菌能在偏酸性条件下继续生长,重组菌菌体量稍有增加。

从耗糖曲线(图 3-A)看,重组菌由于精氨酸合成途径关键酶基因 *argB* 的功能缺失,不再合成精氨酸,但前体物质 L-Glu 大大积累,所以重组菌的葡萄糖的消耗能力虽有所降低但不明显。48 h 后,原始菌由于精氨酸合成能力较强,可以继续利用葡萄糖;

C. crenatum Δ *argB::tacgad* 的精氨酸合成途径被阻断。原始菌 *C. crenatum* SYPA 5-5 粗酶液 GAD 比酶活测定值为 0,这与 BRENDA 数据库没有 GAD 存在于钝齿棒杆菌的报道相一致。重组菌 *C. crenatum* Δ *argB::tacgad* 粗酶液 GAD 比酶活为 0.63 U/mg,明显高于 *C. crenatum* SYPA 5-1,证明 GAD 在重组钝齿棒杆菌有效表达。通过与 GAD 来源菌 *L. plantarum* GB 01-21 相比,重组菌 GAD 的比酶活仅为 *L. plantarum* GB 01-21 的 29.9% 左右,这说明表达体系有待进一步优化,提高 GAD 在钝齿棒杆菌中异源表达的表达量。

表 2. 重组菌及对对照菌 NAGK 和 GAD 的比酶活(U/mg)

Table 2. Specific activities of the enaymes

including NAGK and GAD

Strains	Specific activities/(U/mg)	
	GAD	NAGK
<i>L. plantarum</i> GB 01-21	2.11	-
<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5	0	0.47
<i>C. crenatum</i> Δ <i>argB::tacgad</i>	0.63	0

2.3 重组菌发酵产 GABA

以 *C. crenatum* SYPA 5-5 作为对照,将重组菌 *C. crenatum* Δ *argB::tacgad* 进行发酵实验,对发酵过程中的生物量、糖耗、 γ -氨基丁酸产量以及谷氨酸和精氨酸的产量进行跟踪测定,最终发酵参数见表 3。

而重组菌由于 GABA 合成能力较弱,因此耗糖曲线逐渐趋于平缓。

图 3-B 描述了重组菌与原始菌中 GABA, L-Glu 以及 L-Arg 等主要氨基酸合成的变化情况。原始菌是一株精氨酸高产菌株,发酵 96 h 后精氨酸积累量为 40.7 g/L,谷氨酸几乎全部被转化为精氨酸,由于钝齿棒杆菌没有 GABA 合成途径,不能合成 GABA。*C. crenatum* Δ *argB::tacgad* 由于精氨酸合成途径 *argB* 基因的失活而不再合成精氨酸,因此发酵前期 L-Glu 大量积累,36 h 达到最高点,为 27 g/L 左右;GAD 的成功表达使 L-Glu 转化为 GABA,发酵 96 h 可积累约 8.28 g/L 的 GABA,96 h 后 GABA 产量基本

稳定,120 h时 GABA 积累量约为8.67 g/L。

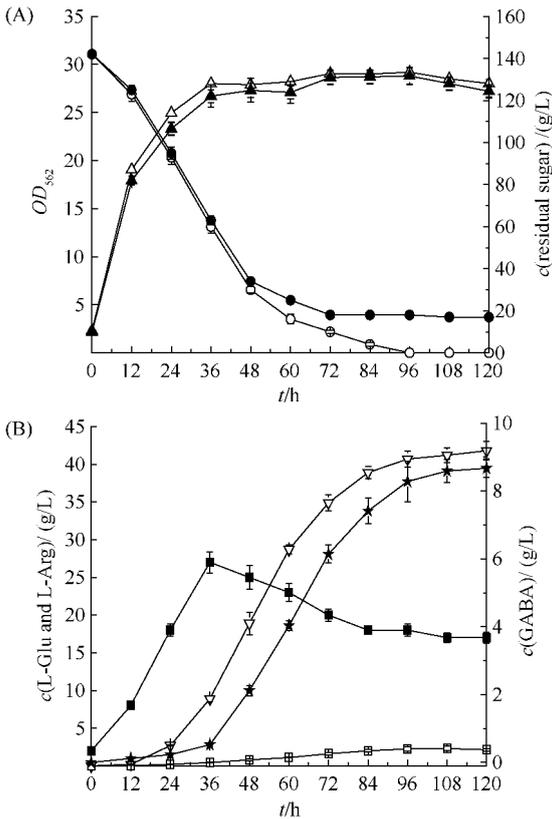


图 3. 重组菌与原始菌发酵过程曲线

Figure 3. Fermentation process curve of the recombinants and original strains. A: The curve of cell growth and residual glucose. B: Accumulation of GABA, L-Arg and L-Glu. Filled and open symbols represent *C. crenatum* ΔargB; tacgad and *C. crenatum* SYPA 5-5 respectively; OD₅₆₂nm (uptriangles), residual glucose (circles), GABA (star), L-Glu (squares), and L-Arg (downtriangles). Experiments were performed three times, and data were presented as the mean ± SD. The same as below.

从重组菌 GABA 合成曲线可以看出,前36 h 主要是 L-Glu 积累时期,只有极少量 GABA 生成,可能是36 h之前发酵环境为碱性环境,而 GAD 转化的最适 pH 为 4.8^[7];36 h后,发酵环境逐渐变为酸性, GAD 开始快速催化 L-Glu 合成 GABA,同时由于重组菌株转化能力受到 GAD 表达量及酶稳定性的限制,发酵96 h GABA 的产量基本趋于稳定,而谷氨酸仍有部分剩余。因此,根据实际情况,后续实验可以把发酵时间缩短至96 h。

3 讨论

发酵法制备 GABA 基于其条件温和、安全、成

本较低等优点受到广泛关注。而目前发现的能合成 GABA 的野生菌株均需要添加外源谷氨酸或谷氨酸一钠盐作为底物,通过菌株自身的 GAD 催化谷氨酸脱羧形成 GABA。谷氨酸需要由糖质为原料经微生物发酵,采用等电点提取,离子交换树脂分离等制备获得,所以添加外源谷氨酸制备 GABA 在一定程度上增加了 γ -氨基丁酸的生产成本。因此,构建以廉价的葡萄糖为底物直接生产 GABA 的基因工程菌正在引起研究者的关注。江南大学的史锋、李佑新等将一株短乳杆菌中的 GAD 基因克隆,并在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中进行了表达,利用内源性谷氨酸生产 GABA,最终 GABA 在摇瓶中的积累量达到 2.15 g/L^[17],产量较低。2012 年,日本学者 Chihito Takahashi^[18]将大肠杆菌的 GAD 基因成功在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中表达,重组菌经初步发酵能积累 8.07 g/L 左右的 GABA,培养基经优化后 GABA 积累量提高到 12.37 g/L。

钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 具有谷氨酸合成能力,但不含有编码 GAD 的基因,本研究将植物乳杆菌 GAD 基因整合在钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 的 *argB* 基因内部,表达 GAD 的同时敲除 *argB* 基因。为了方便目标菌株的后续改造,且提高工程菌的安全性,我们选用了 Schäfer A^[10]所构建的带有卡那霉素抗性与蔗糖致死基因 *sacB* 双标记的 pK18mobsacB 整合型载体,两次同源重组后,通过 *sacB* 反向筛选标记获得目的菌株,实现 *argB* 的无痕敲除以及 *tacgad* 的成功替代。

实验结果表明重组菌 *C. crenatum*ΔargB::tacgad 成功表达了 GAD 并消除了精氨酸的竞争,不足之处在于,由于受到表达体系的限制,重组菌 GAD 的表达与 *L. plantarum* GB 01-21 相比存在差距。重组菌 GABA 积累量为 8.28 g/L,这在棒杆菌合成 GABA 的产量中处于较高水平。

本研究成功地将来源于植物乳杆菌中的 GAD 基因在 *C. crenatum* SYPA 5-5 中整合表达,实现了葡萄糖到 GABA 的一步法发酵,在棒杆菌合成 GABA 的产量中处于较高水平。虽然该研究中 GABA 产量与国内外报道的利用谷氨酸发酵生产 GABA 的产量相比有很大距离,但该研究证明了来源于植物乳杆菌的谷氨酸脱羧酶基因可以在钝齿棒杆菌中成功表达,为更完善地将不同来源的 GAD 基因在谷氨酸生产菌株中表达提供了理论依据和参考。

参考文献

- [1] Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC, 3rd. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 2003, 54 Suppl 6: S3-12.
- [2] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10(1-3): 67-79.
- [3] Fu Y, Zhang T, Jiang B, Mu W. Enzymatic conversion for γ -aminobutyric acid by *Lactococcus lactis*. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(9): 166-169. (in Chinese)
傅元欣, 张涛, 江波, 沐万孟. 乳酸菌细胞转化法制备 γ -氨基丁酸的研究. *食品工业科技*, 2008, 29(9): 166-169.
- [4] Huang J, Mei L, Sheng Q, Yao SJ, Lin DQ. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, 15(2): 157-161.
- [5] Xia J, Mei LH, Huang J, Sheng Q, Xu J, Wu H. Screening and mutagenesis of *Lactobacillus brevis* for biosynthesis of γ -aminobutyric. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006, 20(5): 379-382. (in Chinese)
夏江, 梅乐和, 黄俊, 盛清, 许静, 吴晖. 产 γ -氨基丁酸的乳酸菌株筛选及诱变. *核农学报*, 2006, 20(5): 379-382.
- [6] Liu T, Yang T, Zhang S, Xia H, Rao Z. Screening, identification and primary optimizing of a strain producing γ -aminobutyric acid from L-glutamic acid. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(5): 742-747. (in Chinese)
刘婷婷, 杨套伟, 张术聪, 夏海锋, 饶志明. 高效转化 L-谷氨酸为 γ -氨基丁酸菌株的筛选、鉴定及初步优化. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(5): 742-747.
- [7] Tian L, Xu M, Rao Z. Construction of a recombinant *Escherichia coli* BL21/pET-28a-lpgad and the optimization of transformation conditions for the efficient production of γ -aminobutyric acid. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(1): 65-75. (in Chinese)
田灵芝, 徐美娟, 饶志明. 一株重组大肠杆菌/pET-28a-lpgad 的构建及其高效生产 γ -氨基丁酸转化条件的优化. *生物工程学报*, 2012, 28(1): 65-75.
- [8] Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, Boyen A, Legrain C, Demarez M, Hallet JN, Glansdorff N. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology*, 1996, 142 (Pt 1): 99-108.
- [9] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, Yang J, Jin J, Xu ZH. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255-266.
- [10] 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.
- [11] Yu B, Shen W, Zhuge J. An improved method for integrative electrotransformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic DNA. *China Biotechnology*, 2005, 25(2): 78-81. (in Chinese)
余秉琦, 沈微, 诸葛健. 适用于异源 DNA 高效整合转化的谷氨酸棒杆菌电转化法. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 78-81.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(4): 541-545.
- [14] Kitaoka S, Nakano Y. Colorimetric determination of omega-amino acids. *Journal of Biochemistry*, 1969, 66(1): 87-94.
- [15] Meng Q, Lai B, Zhou X. Study on the L-arginine determination with sakagnchi reaction. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1998, 20(3): 1-4. (in Chinese)
蒙绮芳, 赖碧清, 周锡梁. L-精氨酸测定方法的研究. *氨基酸和生物资源*, 1998, 20(3): 1-4.
- [16] Small PL, Waterman SR. Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 1998, 6(6): 214-216.
- [17] Shi F, Li YX. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(12): 2469-2474.

[18] 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): 171-176.

One-step fermentation converting glucose in γ -aminobutyric acid by a recombinant *Corynebacterium crenatum*

Hongmei Sun¹, Zhiming Rao^{1*}, Xiupeng Li¹, Meijuan Xu¹, Xian Zhang¹, Zhenghong Xu²

¹Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²Lab of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [**Objective**] We constructed an integrative recombinant *Corynebacterium crenatum* that could directly convert glucose in γ -aminobutyric acid (GABA). [**Methods**] Using overlap PCR, we obtained $\Delta argB$ fragment that lacked 491 bp of N-acetylglutamate kinase (NAGK) gene. The glutamate decarboxylase (GAD) gene attached *tac* promoter was amplified and inserted into $\Delta argB$ fragment. Using the upstream and downstream of $\Delta argB$ as homologous arms, we constructed pK18- $\Delta argB$::*tacgad* which was used for the integration of *tacgad* gene onto the *C. crenatum* genome. Through two homologous recombinations, we got an *argB* blocked strain *C. crenatum* $\Delta argB$::*tacgad* which could successfully express GAD. We also fermented the recombinant strain with glucose as substrate and the production of GABA was detected. [**Results**] In *C. crenatum* $\Delta argB$::*tacgad*, NAGK was totally inactivated and no L-arginine was detected though L-glutamic acid was accumulated. As a result of the efficient expression of GAD, part of L-glutamic acid was transformed into GABA, and the final yield of GABA was about 8.28 g/L. [**Conclusion**] We successfully constructed a recombinant strain that could efficiently produce GABA by one-step fermentation from glucose. This research provided a new approach for GABA production.

Keywords: γ -aminobutyric acid, *Corynebacterium crenatum*, homologous recombination, glutamate decarboxylase, one-step fermentation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-10-0459), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB725202), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA02A211), by the National Natural Science Foundation of China (21276110, 30970056), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51306A), by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20110093120001) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding author. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

Received: 24 January 2013/Revised: 7 April 2013