

# 构建 *pyc* 启动子突变文库改造谷氨酸棒杆菌高效生产 $\beta$ -丙氨酸

宋雅琪, 徐建中, 张伟国

(江南大学生物工程学院, 无锡 214122)

**摘要:**  $\beta$ -丙氨酸是唯一天然存在的 $\beta$ 型氨基酸, 在制药、食品和化学工业中有着广泛的应用。鉴于日益增长的市场需求,  $\beta$ -丙氨酸生产的研究是至关重要的。本研究利用改良的产赖氨酸菌株 XQ-5.5 作为出发菌株, 通过底盘细胞以及 *pyc* 启动子突变文库的构建进一步促进 $\beta$ -丙氨酸的合成。为了增加细胞内草酰乙酸的供应并确保其转化为天冬氨酸 ( $\beta$ -丙氨酸的直接前体), 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *pck* 被删除。同时为了保证充足的丙酮酸维持三羧酸循环和草酰乙酸的合成, 对丙酮酸氧化酶编码基因 *poxB* 也进行了删除。接下来, 试图对基因 *pyc* 进行精细调控进一步保证充足的草酰乙酸含量供 $\beta$ -丙氨酸的合成。通过 *pyc* 启动子随机突变文库的构建与筛选提高丙酮酸到草酰乙酸的碳通量。最终, 菌株 XQ-5.7 在 5 L 发酵罐中分批补料培养,  $\beta$ -丙氨酸产量为 62.8 g·L<sup>-1</sup>。

**关键词:**  $\beta$ -丙氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 代谢工程; 生物调控元件

**中图分类号:** Q815

## Construct a *pyc* promoter library and modify *Corynebacterium glutamicum* to produce $\beta$ -alanine efficiently

SONG Yaqi, XU Jianzhong, ZHANG Weiguo

(Bioengineering School, Jiangnan University, WuXi 214122)

**Abstract:**  $\beta$ -Alanine is the only naturally occurring  $\beta$ -type amino acid, with various applications in the pharmaceutical, food, and chemical industries. Given the growing market demand, the study of  $\beta$ -alanine production is important. In this study, the modified lysine-producing strain XQ-5.5 was used as the starting strain to further promote the synthesis of  $\beta$ -alanine through the construction of chassis cells and *pyc* promoter mutation library. To increase the intracellular supply of oxaloacetate and ensure its conversion to aspartate (a direct precursor of  $\beta$ -alanine), the phosphoenolpyruvate carboxylase coding gene *pck* was deleted. In order to ensure sufficient pyruvate to maintain tricarboxylic acid cycle and oxalacetate synthesis, the pyruvate oxidase coding gene *poxB* was also deleted. Next, an attempt was made to fine-regulate the gene *pyc* to further ensure sufficient oxalacetate content for  $\beta$ -alanine synthesis. The carbon flux from pyruvate to oxalacetate was increased through the construction and screening of *pyc* promoter random mutation library. Finally, the strain XQ-5.7 was cultured in a 5L fermenter with batch feeding, and the yield of  $\beta$ -alanine was 62.8 g·L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Corynebacterium glutamicum*;  $\beta$ -alanine; Metabolic engineering; Biological control elements.

## 0 引言

$\beta$ -丙氨酸是一种非蛋白氨基酸, 是维持生物代谢和生长发育的重要氨基酸。 $\beta$ -丙氨酸是目前世界上最具发展前景的三碳化工产品之一, 广泛应用于医药、食品、饲料、化工等领域<sup>[1]</sup>。在制药行业,  $\beta$ -丙氨酸衍生物 (如泛酸) 被用于治疗神经炎和术后绞痛<sup>[2]</sup>。在化学工业

基金项目: 国家重点研究与发展计划项目[No. 2021YFC2100900]

作者简介: 宋雅琪 (1999-), 女, 主要研究方向: 发酵工程及分子生物学

通信联系人: 张伟国 (1963-), 男, 博导, 主要研究方向: 发酵工程. E-mail: zhangwg@jiangnan.edu.cn

中，聚β-丙氨酸用于处理废水以实现水的净化<sup>[3]</sup>。此外，它还可以合成降糖和抗氧化物质（如肌肽），并用于饲料、功能饮料和化妆品的生产<sup>[4]</sup>。近年来，全球对β-丙氨酸及其衍生物的需求显著增加。β-丙氨酸的需求量约为 81,000 吨<sup>[5]</sup>。因此，β-丙氨酸的产生已成为一个重要的研究课题。

目前工业上大规模生产β-丙氨酸的主要方法是化学合成。主要方法有丙烯酸氨化法、丙烯腈氨化水解法、β-氨基丙烯腈水解法<sup>[6,7]</sup>。在化学合成方法中，对反应条件的要求是极端的，需要在高温高压或强酸强碱条件下进行β-丙氨酸的合成。同时还会产生大量的副产品，不符合绿色可持续发展的理念。β-丙氨酸也可通过酶转化法合成，涉及天冬氨酸-α-脱羧酶（Aspartate-α-decarboxylase, ADC）和天冬氨酸解氨酶<sup>[8,9]</sup>。大多数转化使用富马酸盐作为主要底物<sup>[10]</sup>。然而，富马酸盐是从石油中提取的，这对环境不友好，导致更高的生产成本。该方法存在底物价格高、酶不稳定等局限性<sup>[11,12]</sup>。这些限制使得进一步的突破变得困难。因此，具有高转基因潜力和绿色可持续性的微生物发酵方法日益受到广泛关注，并逐渐成为生产β-丙氨酸的主流方法（图 1）。

菌株 XQ-5.5 是通过外源表达优化后的天冬氨酸-α-脱羧酶并阻断β-丙氨酸竞争途径构建而成，在 5-L 发酵罐中产生 56.5 g·L<sup>-1</sup> β-丙氨酸<sup>[13]</sup>。然而，菌株 XQ-5.5 仍然存在前体供应不足和 L-赖氨酸副产物生产不稳定等问题。本研究以菌株 XQ-5.5 为出发菌株，构建β-丙氨酸产生菌。首先，对丙酮酸-草酰乙酸节点进行修饰，通过阻断丙酮酸消耗途径来增强细胞内草酰乙酸的供应。其次，通过 *pyc* 启动子文库的构建及筛选，将对合成β-丙氨酸的最佳启动子 P15 进行整合。所得菌株 XQ-5.7 在批料发酵中β-丙氨酸产量为 62.8 g·L<sup>-1</sup>。

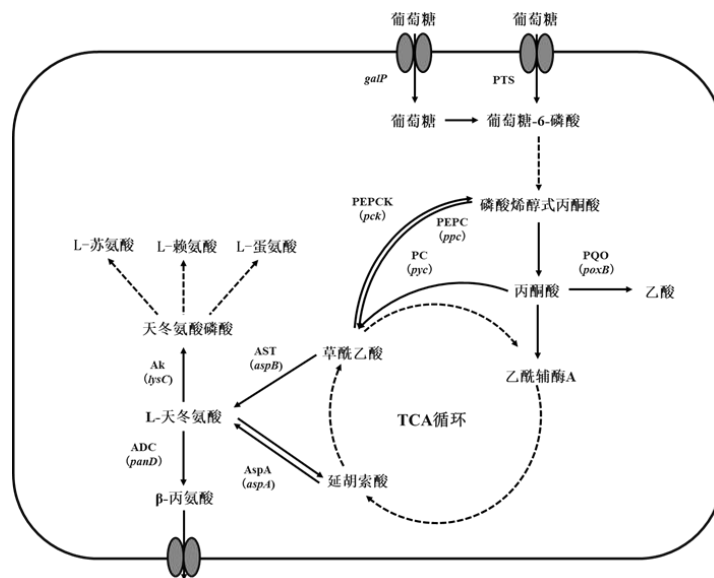


图 1 微生物发酵法合成β-丙氨酸代谢路径

Fig.1 Synthesis of β-alanine metabolic pathway by microbial fermentation

65

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌株和质粒

70 谷氨酸棒杆菌 XQ-5.5 作为出发菌株，本实验室保藏。用大肠杆菌 JM109 构建质粒。在本研究中，基因是通过质粒 pEC-XK99E 和质粒 pTRCmob 在谷氨酸棒杆菌中过表达。基因的敲除与替换通过质粒 pK18mobsacB 进行整合。主要菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒

Tab. 1 Plasmids and strains used in this study

名称	特征	来源
菌株		
<i>E. coli</i> jm109	the cloning host	ATCC
谷氨酸棒杆菌		
Wild type	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	ATCC
XQ-5.5	XQ-5ΔAK <sub>XQ-5</sub> ::AK <sub>13032</sub> Δ <i>CgpanD</i> ::P <sub>gro</sub> -ThirRBS- <i>BspanD</i> <sup>E56S/I88M</sup> :: <i>aspB</i> Δ <i>ldh</i> Δ <i>avtA</i> weaken <i>alaT</i>	[13]
XQ-5.6	XQ-5.5 derivative, Δ <i>pck</i> , Δ <i>poxB</i>	本研究
XQ-5.7	XQ-5.6 derivative, P-15- <i>pyc</i>	本研究
质粒		
pEC-XK99E	Kan <sup>r</sup> , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector for inducible gene expression	BNCC
pTRCmob	Kan <sup>r</sup> , <i>C. glutamicum</i> vector for constitutive gene expression	NTCC
pK18mobsacB	Kan <sup>r</sup> , intergration vector; <i>oriV<sub>Ec</sub></i> <i>oriT sacB</i> , allows for selection of double crossover <i>C. glutamicum</i>	ATCC
pTRC- <i>pyc</i>	Kan <sup>r</sup> , pTRC-mob containing gene <i>pyc</i>	本研究
pEC- <i>pyc</i>	Kan <sup>r</sup> , pEC-XK99E containing gene <i>pyc</i>	本研究
pK18-Δ <i>poxB</i>	Kan <sup>r</sup> , pK18mobsacB containing for in-frame deletion of gene <i>poxB</i>	本研究
pK18-Δ <i>pck</i>	Kan <sup>r</sup> , pK18mobsacB containing for in-frame deletion of gene <i>pck</i>	本研究

### 1.1.2 培养基

75 LBG 培养基 (g/L)：葡萄糖 5.0，蛋白胨 10.0，酵母粉 5.0， NaCl 10.0， pH 7.0，在 121 °C 下灭菌 20 min。

发酵培养基 (g/L)：葡萄糖 100.0、甜菜糖蜜 30 .0、甜菜碱 3.0×10<sup>-2</sup>、玉米浆干粉 20.0、生物素 6.0×10<sup>-4</sup>、硫胺素 3.0×10<sup>-4</sup>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40.0、KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5、FeSO<sub>4</sub> 3.0×10<sup>-2</sup>、MnSO<sub>4</sub> 2.0×10<sup>-2</sup> g，pH 7.0，115°C 灭菌 20 min。

### 1.1.3 主要仪器与试剂

80 2, 4-二硝基氟苯；甲醇；（色谱级）；乙腈（色谱级）；乙酸钠；生物传感仪（SBA-40E，山东省科学院生物研究所）；安捷伦高效液相色谱仪；5 L 发酵罐；引物合成与测序：安升达生物科技有限公司，本实验所用引物见表 2。

表 2 本实验所用引物

Tab. 2 Primers used in this study

名称	序列
<i>pck</i> -L-F	ACGCGTCGACACAGTGATGACAACAATGAGATGC

85

<i>pck</i> -L-R	AGCGTGAACCTACTTCTCCAGATTTTGTGTCATTCTGA
<i>pck</i> -R-F	CTGGAGAAGTAAGTTCACGCTTAAGAAGCTGCT
<i>pck</i> -R-R	CCCAAGCTTCTCCATCGACGATGCCAT
<i>poxB</i> -L-F	GGAATTCGTAACGTGAACGAATGGTTCG
<i>poxB</i> -L-R	CCACGATCGGATTAAGGC
<i>poxB</i> -R-F	GCCTTAATCCGATCGTGGTGCAATGTGTGGCATGC
<i>poxB</i> -R-R	CCCAAGCTTCTTATGTTTCGAACGGGC
<i>pyc</i> -F	CCCTCGAGCGAGGTCATAAAGTGGCGC
<i>pyc</i> -R	GCTCTAGAGCACCGTCAACAGCATCT

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

种子液的培养：将冰箱保存的甘油菌液取出，通过三区划线法对重组菌株进行活化。用接种环刮取菌落至 10 mL LBG 液体培养基中，30°C 过夜培养。

90 摇瓶发酵培养：按照 10%接种量将 5 mL 种子液转移到 50 mL 发酵培养基中，置于 500 mL 标准摇瓶中。30°C，转速 100 r/min，发酵培养 72 h。

5 L 发酵罐培养（培养体积 2 L）：在冰箱中保存的甘油菌液被活化。将重组目标菌划在新鲜的固体平板上，置于 30°C 恒温培养箱中，直到菌落生长。将活化菌接种于 10 mL LBG 液体培养基中，30°C 培养 12 h。将种子液以 10%的接种量接种到 5 L 发酵罐中，发酵时间为 95 72 h，发酵过程中每 4 h 取样测定 OD<sub>600</sub>、β-丙氨酸产量和葡萄糖残糖浓度。

### 1.2.2 重组菌株的构建

以菌株 XQ-5.5 基因组为模板，通过 PCR 扩增出基因 *pck* 的上下游片段。空质粒 pK18mobSacB 通过酶切或全质粒扩增进行线性化。通过酶联或同源重组的方式进行质粒 pK18mobsacB-Δ*pck* 的构建。用相同的方法对质粒 pK18mobsacB-Δ*poxB* 进行构建。

100 以菌株 XQ-5.5 的基因组为模板，通过 PCR 扩增基因 *pyc* 的整个表达框。将空载质粒 pEC-XK99E 或质粒 pTRCmob 进行线性化后，将其与 *pyc* 表达框进行同源重组进行表达质粒的构建。

### 1.2.3 菌体浓度的测定

105 将样品菌液稀释 25 倍后，用紫外分光光度计测定 600 nm（OD<sub>600</sub>）吸光度，记录并观察细胞生长情况。

### 1.2.4 残糖的测定

采用 SBA-40E 型生物传感器(中国山东科学院)测定发酵液中葡萄糖浓度。

### 1.2.5 分析方法

110 用高效液相色谱法测定发酵液中β-丙氨酸浓度。色谱柱为 C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Waters, Milford, MA, USA)，检测波长为 360 nm，流动相为缓冲液 A（0.02 mol·L<sup>-1</sup> pH 6.2 的乙酸钠缓冲液）和 B（乙腈）。在 25 min 内将两者的体积比（A:B）由 95:5 增加到 60:40，

洗脱液流速为  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

### 1.2.6 补料分批发酵验证

为评估菌株 XQ-5.7 在 5 L 发酵罐的 $\beta$ -丙氨酸发酵性能, 将根据原有的补料分批发酵工  
115 艺对菌株 5.7 进行发酵试验, 每隔 4 h 取样测定葡萄糖浓度、生物量及 $\beta$ -丙氨酸产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 生产 $\beta$ -丙氨酸底盘细胞的构建

草酰乙酸作为天冬氨酸的直接前体, 它的胞内供应也影响着 $\beta$ -丙氨酸的合成。为了保证  
120 有充足的草酰乙酸流向天冬氨酸, 我们对菌株 XQ-5.5 进行了改造。在谷氨酸棒杆菌中, 磷  
酸烯醇丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, 由 *pck* 编码)是糖异生第一个关键  
步骤中的关键酶, 它催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇丙酮酸和  $\text{CO}_2$ <sup>[14]</sup>。为了减少草酰乙酸的消  
耗, 对基因 *pck* 进行敲除, 同时为了为草酰乙酸合成供应充足的丙酮酸, 丙酮酸氧化酶的编  
码基因 *poxB* 也被删除, 最终构成菌株 XQ-5.6。为了检测菌株 XQ-5.6 的 $\beta$ -丙氨酸生产能力,  
125 以菌株 XQ-5.5 为对照进行摇瓶发酵结果的测试。实验结果如图 2 所示, 菌株 XQ-5.6 的 $\beta$ -  
丙氨酸产量为  $31.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与出发菌株 XQ-5.5 ( $28.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比提高了 10.1%。结果表明, 磷  
酸烯醇式丙酮酸-丙酮酸-草酰乙酸节点上碳通量的重新分配有利于 $\beta$ -丙氨酸的合成, 可能需  
要进一步微调该节点。

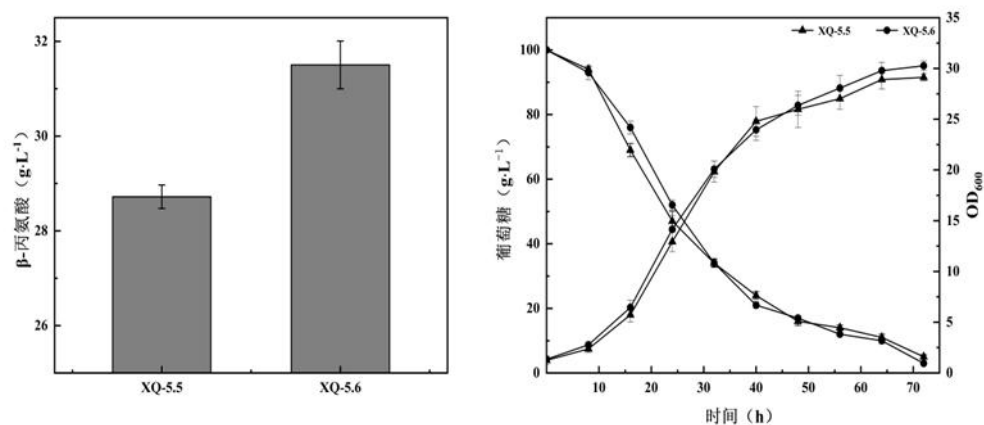


图 2 菌株 XQ-5.5 和 XQ-5.6 摇瓶发酵结果

Fig. 2 Shake flask fermentation results of recombination strains XQ-5.5 and XQ-5.6

130

### 2.2 建立 *pyc* 启动子文库筛选方法

在代谢工程过程中, 基因调控元件的微调通常有利于整个代谢途径的实现, 而启动子是  
135 调控基因表达的关键元件, 启动子文库构建也是提高目标产物产量的有效策略<sup>[15]</sup>。在谷氨酸  
棒杆菌中, 草酰乙酸主要由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (由 *ppc* 编码) 和丙酮酸羧化酶 (由 *pyc*  
编码), 分别催化磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸对草酰乙酸进行回补<sup>[16]</sup>。据文献报道, 基因

140 *pyc* 在体外虽然有着更高的酶活，但是所收到的反馈抑制更明显<sup>[16]</sup>。因此选择对 *pyc* 启动子构建随机突变文库来增强草酰乙酸回补途径。首先，以原始 *pyc* 启动子为模板，选取-10~-35 区保守序列中的 15 bp 进行随机突变文库的构建。由于该基因编码区 5'端对基因表达有显著影响，将 *pyc* 基因编码区前 250 bp 与绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）进行融合构建筛选系统，如图 3 所示。



图 3 *pyc* 启动子文库筛系统  
Fig. 3 Library screen system of *pyc* promoter

### 2.3 *pyc* 启动子文库表达载体的选择

145 首先，用 pEC-XK99E 表达质粒构建 *pyc* 启动子文库进行筛选时，发现大量的文库筛选无法确定每个单菌落添加诱导剂的最佳时间，诱导剂的诱导效果的不同也会影响最终荧光强度的测定。因此最终选择组成型表达质粒 pTRCmob 来构建 *pyc* 启动子文库筛选系统，改组成型表达质粒排除了诱导剂的影响因素。构建质粒如图 4 所示，将具有原始启动子的片段与绿色荧光蛋白（GFP）融合，并连接到质粒 pTRCmob 上构建模板质粒。采用-35 和-10 之间  
150 15 bp 的简并引物以模板质粒为模板构建质粒文库。

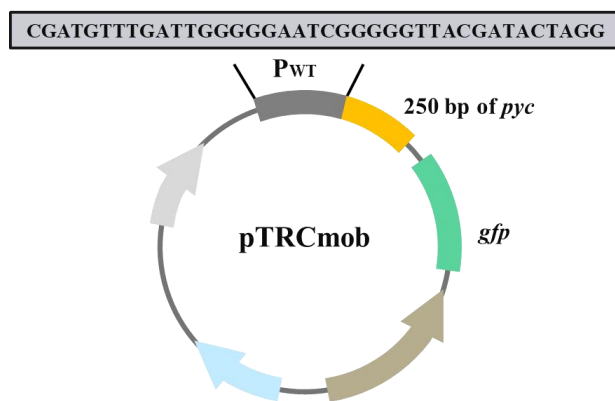


图 4 模板质粒的构建  
Fig. 4 Construction of template plasmid

### 2.4 *pyc* 启动子文库的初筛

155 将质粒文库电转至菌株 XQ-5.6 中，挑取单菌落，培养于 96 孔板中。采用荧光光谱仪(LS55, 150 PerkinElmer, uk,  $\lambda$ 激发= 479 nm,  $\lambda$ 发射= 520 nm)测定 GFP 荧光强度和 OD<sub>600</sub>。其中启动子强度用相对荧光强度(荧光强度/OD<sub>600</sub>)表示。以野生型启动子的荧光强度为对照，经过对荧光标记的转化子进行多轮筛选。排除掉荧光强度变化幅度小和基本不变化的转化子，只保留荧光强度变化显著的转化子，其中荧光强度趋于相似的转化子中只保留一条。最终筛选出了 19 条启动子序列，荧光报告如图 5 所示。根据荧光报告显示（图 5），与野生型启  
160

动子强度相比，突变型启动子强度提高了约 1.9- 17.4 倍。

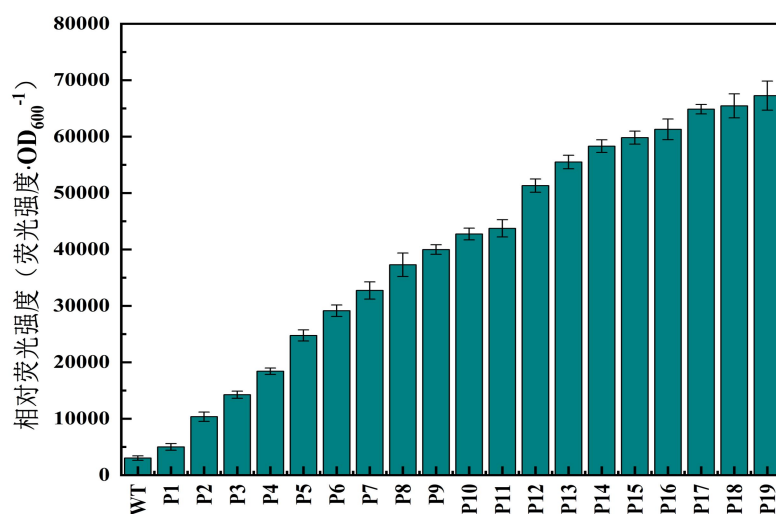


图 5 P1-19 启动子相对荧光强度

Fig. 5 Relative fluorescence intensity of promoter P1-19

## 165 2.5 *pyc* 启动子文库的复筛

不同强度启动子的替代可以很好地调控基因表达，为了筛选出适合生产 $\beta$ -丙氨酸的最佳启动子。以野生型 *pyc* 启动子为对照，将筛选出的启动子按照荧光强度的强弱分为低、中、强三个区间。我们在这三个区间里分别选择三条启动子与基因 *pyc* 原始启动子进行替换。替换的启动子分别为 P3、P5、P7、P10、P12、P13、P15、P17、P19。分别构成菌株 XQ-5.6-3、XQ-5.6-5、XQ-5.6-7、XQ-5.6-10、XQ-5.6-12、XQ-5.6-13、XQ-5.6-15、XQ-5.6-17、XQ-5.6-19。我们对这些菌株进行了摇瓶发酵实验评估，实验结果如图 6 (a) 所示，并不是所有的启动子替换都有利于 $\beta$ -丙氨酸的合成，其中突变体 XQ-5.6-17、XQ-5.6-19 与突变体 XQ-5.6-15 相比， $\beta$ -丙氨酸产量相对降低了（即  $32.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $32.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  vs  $34.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）。这可能是由于在强启动子的控制下 *pyc* 的表达较高，这反过来又对 $\beta$ -丙氨酸的产生产生了负面影响。

175 启动子 P14 和 P16 的荧光强度虽然与 P15 相差不大，但微小强度的变化或许也能够影响 $\beta$ -丙氨酸的产量。因此将启动子 P14 和 P16 与原始启动子进行替换，构成菌株 XQ-5.6-14、XQ-5.6-16。以 XQ-5.6-15 为对照菌株，进行摇瓶发酵实验。实验结果如图 6 (b) 所示，启动子 P15 是控制 *pyc* 表达从而增加 $\beta$ -丙氨酸产量的最佳启动子序列，与菌株 XQ-5.6 ( $31.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比提升了 10.6%。菌株 XQ-5.6-15 (即 XQ-5.7) 在摇瓶发酵 72 h 后产生了  $34.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\beta$ -丙氨酸。

180

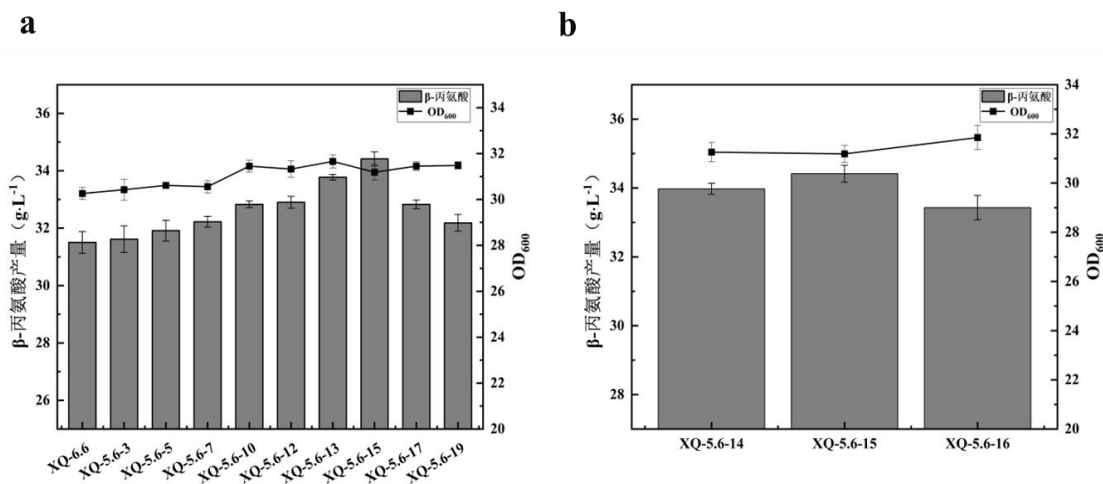


图 6 启动子替换对 $\beta$ -丙氨酸产量的影响

Fig. 6 Effect of promoter replacement on  $\beta$ -alanine production

## 2.6 补料分批发酵试验

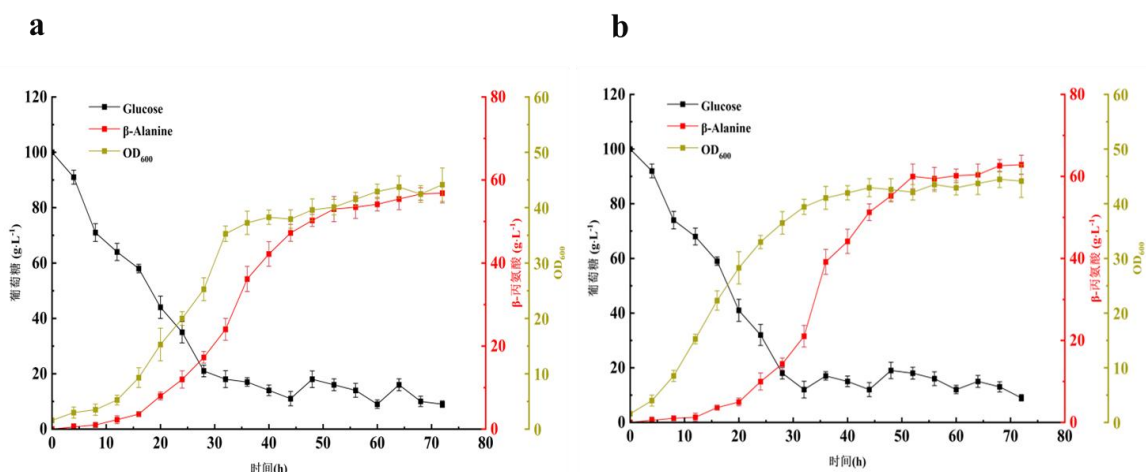


图 7 XQ-5.5 的发酵曲线 (a) ; XQ-5.7 的发酵曲线 (b)

Fig.7 The fermentation curve of XQ-5.5 (a); The fermentation curve of XQ-5.7 (b)

为了测试菌株 XQ-5.7 生产 $\beta$ -丙氨酸的发酵性能，在 5-L 罐式发酵罐中进行补料分批发酵。图 7 显示了菌株 XQ-5.5 和 XQ-5.7 补料分批发酵的时间曲线。初始葡萄糖消耗后，继续用 800 g·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖进行分批补料，使葡萄糖浓度维持在 15 g·L<sup>-1</sup> 以下。在发酵 72 h 后，优化前 XQ-5.5 的 $\beta$ -丙氨酸产量为 56.5 g·L<sup>-1</sup>，经底盘细胞构建和启动子的替换， $\beta$ -丙氨酸的产量提高到 62.8 g·L<sup>-1</sup>，提高了 11.1%。本研究表明，利用调控元件对关键节点进行精细调控能够有效提升 $\beta$ -丙氨酸的产量。

## 3 结论

本研究以 $\beta$ -丙氨酸生产菌株 XQ-5.5 为出发菌株，通过代谢工程进一步提高 $\beta$ -丙氨酸的产量。通过删除 *pck* 基因、*poxB* 基因以及 *pyc* 启动子文库筛选出的最适启动子序列替换达到

185

190

195

了积累关键前体草酰乙酸的目的。在 5 L 发酵罐中进行补料分批发酵验证,  $\beta$ -丙氨酸产量进一步提高到了  $62.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在本研究中以菌株 XQ-5.5 为出发菌株, 使用调控元件重新分配碳通量进一步提高了 $\beta$ -丙氨酸的产量, 为后续的菌株改造提供了一定的参考价值。

200

### [参考文献] (References)

- [1] SONG P, ZHANG X, WANG S, et al. Advances in the synthesis of beta-alanine [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1283129.
- 205 [2] 杨延辉, 肖春玲. 泛酸的功能和生物合成[J]. 生命的化学, 2008, 28 (4) : 448-52.
- [3] UZ Z S, 张伟超, 杨朔, et al.  $\beta$ -丙氨酸作为有机太阳能电池双重修饰添加剂的研究 (英文) [J]. 高等学校化学学报, 2003, 44 (09) : 171-83.
- [4] 齐博, 武书庚, 王静, et al.  $\beta$ -丙氨酸的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2016, 28 (4) : 1027-34.
- 210 [5] LEE I W, NA D, PARK J M, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8 (6) : 536-46.
- [6] 罗积杏, 薛建萍, 沈寅初.  $\beta$ -氨基丙酸的合成与应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(1): 52-5.
- [7] 梁璐怡, 金少军, 徐建妙, et al. 一株能转化 $\beta$ -氨基丙腈生产 $\beta$ -氨基丙酸的菌株 G20 的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2008, (04): 11-20.
- 215 [8] SHEN Y, ZHAO L, LI Y, et al. Synthesis of beta-alanine from L-aspartate using L-aspartate-alpha-decarboxylase from Corynebacterium glutamicum[J]. Biotechnol Lett, 2014, 36(8): 1681-6.
- [9] QIAN Y Y, LIU J, SONG W, et al. Production of  $\beta$ -Alanine from Fumaric Acid Using a Dual-Enzyme Cascade [J]. ChemCatChem, 2018, 10(21): 4998-5005.
- 220 [10] WU J, MA B-D, XU Y. One-Pot Synthesis of  $\beta$ -Alanine from Maleic Acid via Three-Enzyme Cascade Biotransformation [J]. Catalysts, 2023, 13(2).
- [11] WANG L, MAO Y, WANG Z, et al. Advances in biotechnological production of beta-alanine [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2021, 37(5): 79.
- [12] 马倩, 夏利, 谭淼, et al. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势 [J]. 生物工程学报, 2021, 37(05): 1677-96.
- 225 [13] WANG J Y, RAO Z M, XU J Z, et al. Enhancing beta-alanine production from glucose in genetically modified Corynebacterium glutamicum by metabolic pathway engineering [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(24): 9153-66.
- [14] KLAFFL S, EIKMANN S B J. Genetic and functional analysis of the soluble oxaloacetate decarboxylase from Corynebacterium glutamicum [J]. J Bacteriol, 2010, 192(10): 2604-12.
- 230 [15] NEUNER A, WAGNER I, SIEKER T, et al. Production of L-lysine on different silage juices using genetically engineered Corynebacterium glutamicum [J]. J Biotechnol, 2013, 163(2): 217-24.
- [16] 张明. 重组谷氨酸棒杆菌中增加草酰乙酸的供应提高 $\gamma$ -氨基丁酸的产量 [D]; 江南大学, 2018.

