(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 10 日 (10.12.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/244380 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/21 (2006.01)	*A23K 10/18* (2016.01)
C12P 13/00 (2006.01)	*A61K 31/197* (2006.01)
C12G 3/02 (2019.01)	*A61P 9/12* (2006.01)
A23L 7/104 (2016.01)	*A61P 25/00* (2006.01)
A23L 33/00 (2016.01)	*A61P 25/20* (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)	*C12R 1/24* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/091049

(22) 国际申请日: 2020 年 5 月 19 日 (19.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910490670.9 2019年6月6日 (06.06.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 徐岩(XU, Yan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 任聪(REN, Cong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 宫璐婵(GONG, Luchan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** METHOD FOR IMPROVING SYNTHESIS ABILITY OF LACTOBACILLUS BREVIS γ-AMINOBUTYRIC ACID AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 提高短乳杆菌γ-氨基丁酸合成能力的方法及其应用

(57) **Abstract:** Provided is a means of knocking out the glnR gene by means of homologous recombination, and a method and application thereof for obtaining a Lactobacillus brevis glnR knockout strain to improve the ability of Lactobacillus brevis γ-aminobutyric acid synthesis and high tolerance for acidic environments. The Lactobacillus brevis glnR knockout strain is fermented by using controlled acid flow and fed-batch methods; the cumulative concentration of GABA is 301.5 g/L, the production efficiency is up to 5.76 g/L/h, and the invention can be used for large-scale production of GABA, reducing the production cost of GABA, and used for the fermentation of acidic foods and the like.

(57) 摘要: 提供了一种通过同源重组的方式实现glnR基因的敲除，获得短乳杆菌glnR敲除株以提高短乳杆菌γ-氨基丁酸合成能力和高耐受酸性环境能力的方法及其应用。采用控酸流加补料法发酵短乳杆菌glnR敲除株，GABA的累计浓度为301.5g/L，生产效率最高达5.76g/L/h，可用于GABA的规模化生产，降低GABA的生产成本，用于酸性食品的发酵等。

WO 2020/244380 A1

提高短乳杆菌 γ-氨基丁酸合成能力的方法及其应用

技术领域

本发明涉及提高短乳杆菌 γ-氨基丁酸合成能力的方法及其应用，属于微生物领域。

背景技术

γ-氨基丁酸(GABA)是作为一种重要的抑制性神经递质，对哺乳动物具有安神、降低血压、改善睡眠等多种生理功能，可作为生物活性物质广泛应用于食品、医药、饲料、化工等领域。食品级的 GABA 多由微生物采用生物法合成。微生物主要是谷氨酸脱羧酶 (GAD)系统 (包括谷氨酸/GABA 的反转运体、谷氨酸脱羧酶)的作用，通过谷氨酸/GABA 反转运体将胞外的谷氨酸运输至胞内，通过消耗 H^+，由胞内的谷氨酸脱羧酶对谷氨酸底物进行催化脱羧合成 GABA。合成的 GABA 再通过谷氨酸/GABA 反转运体将 GABA 运出胞内，实现 GABA 的积累，同时维持胞内 pH 的稳定，帮助菌株抵抗酸性环境的胁迫。

已报道的 GABA 合成菌株中，乳酸菌具有绝对的优势，尤其是短乳杆菌。前期研究中本研究室从白酒酿造体系中筛选出一株高效合成 GABA 的短乳杆菌 D17，该菌株的生长与 GABA 的合成耦联，通过发酵策略优化 (控制发酵 pH)可提高菌株的生产效率 (3.76 g/L/h)。

现有提高 GABA 产量的方法主要针对高产 GABA 菌株的筛选，GABA 生产发酵条件及培养基的优化，谷氨酸脱羧酶系统的过表达。但对于已有的 GABA 高产菌或低产菌而言，若要增加其工业化应用，继续提高其生产效率，需要有针对的调控其代谢途径。

发明内容

为了解决上述问题，本发明提供了一种提高短乳杆菌菌株 γ-氨基丁酸合成能力的方法。

在本发明的研究过程中，发明人发现，虽然模式菌株短乳杆菌 ATCC 367 与短乳杆菌 D17 的谷氨酸脱羧系统的相关编码基因 (谷氨酸/GABA 的反转运体、谷氨酸脱羧酶 (GAD)的基因)的氨基酸序列一致，但当菌株在 5%的谷氨酸钠发酵时，短乳杆菌 ATCC 367 的 GABA 产量(10 g/L)远低于短乳杆菌 D17 (17.8 g/L)，且短乳杆菌 ATCC 367 与短乳杆菌 D17 的 GABA 产量并不随着谷氨酸钠的添加而继续增加，二者的 GABA 产量均受到限制。

谷氨酸(钠)不仅是 GABA 合成的唯一底物，同时也是微生物的氮源之一，它的代谢会受到一些调控子的控制，如 TnrA，GlnR 及 CodY 等。GlnR (谷氨酰胺合成酶抑制子)是广泛存在于革兰氏阳性菌中的一个重要的全局的氮源调控因子。它对氮源代谢的某些基因具有调控作用，尤其在链霉菌属、芽孢杆菌属中。在芽孢杆菌属中，当氮源充足时，GlnR 会抑制 *gln*RA 操纵子的转录，降低氮源的利用。在链霉菌属中，GlnR 不仅调控氮代谢且控制碳源代谢、磷

代谢，抗生素合成与菌株的耐受性 (渗透压，耐酸、氧化)等。控制 GABA 的合成的 GAD 系统是微生物抵抗酸胁迫的耐酸系统，在谷氨酸氮源充足的情况下，可能受 GlnR 的阻遏调控。而且目前有关于乳酸菌的 *gln*R 基因敲除菌株未有报道。

本发明通过对短乳杆菌的 *gln*R 基因进行敲除，进一步解除了短乳杆菌 GABA 合成的限制，提高 GABA 产量，缩短 GABA 合成时间，进一步提高 GABA 的工业化生产效率。

本发明的第一个目的是提供一种提高短乳杆菌菌株 γ-氨基丁酸合成能力的方法，所述方法是敲除短乳杆菌菌株中的 *gln*R 基因 (谷氨酰胺合成酶抑制子基因)。

在一种实施方式中，所述 *gln*R 基因表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在一种实施方式中，编码所述 *gln*R 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

在一种实施方式中，所述短乳杆菌菌株为任意能够合成 GABA 的短乳杆菌。

在一种实施方式中，所述短乳杆菌菌株为短乳杆菌 D17 (保藏编号为 CGMCC NO. 14385)或者模式菌株短乳杆菌 ATCC 367、短乳杆菌 NCL912、短乳杆菌 CGMCC1306、短乳杆菌 NPS-QW-145 等。在一种实施方式中，所述敲除，是使用任意一种已知的敲除方法，比如同源重组，二类内含子 (Targetron 或 Clostron)基因插入失活、CRISPR-Cas 基因编辑等。

在一种实施方式中，所述敲除是使用无痕敲除，尤其是基于同源重组的无标记基因敲除。

在一种实施方式中，所述敲除，具体是：将要敲除的 *gln*R 基因上、下游同源片段 1000 bp (包含 *gln*R 基因前后端各 21 bp)分别按一定方向连接到乳酸菌的整合质粒 pGID023 上，获得靶基因的敲除质粒 pGID023-Δ*gln*R；将敲除质粒通过电转化进入短乳杆菌中，通过在红霉素抗性平板上筛选得到含敲除质粒的重组菌株。随后选择正确的重组菌株，在含红霉素的 GYP 液体培养基中，进行传代，再在无红霉素抗性的 GYP 液体培养基中传代，将传代后的菌液涂于含红霉素的抗性平板上，筛选获得发生第一次同源重组使质粒整合到受体菌染色体上的单交换子；然后将单交换子在无红霉素条件下，液体 GYP 培养基中传代培养，将传代后的菌液涂于无抗生素的 GYP 平板上，挑选单克隆直至筛选得到发生第二次同源重组的无红霉素抗性实现靶基因敲除的菌株。

上述 pGID023 质粒携带能在大肠杆菌中复制的复制原点、多克隆位点 MCS、红霉素抗性基因。

上述敲除质粒是通过将短乳杆菌染色体上要敲除的靶基因上游和下游、大小约为 1000 bp 的同源序列片段分别按基因排列方向酶切连接至 pGID023 的多克隆位点上。

上述敲除质粒通过电转化进入短乳杆菌中得到含敲除质粒的菌株的方法：将 1 μg 敲除质粒与短乳杆菌感受态细胞混合，采用合适的电转化条件，将质粒电转化至短乳杆菌中。电击

后迅速加入预冷 MRS 培养基，于 37℃培养箱中复苏。离心去除上清，细胞重悬后涂布含红霉素的 MRS 平板，37℃培养至长出转化子。挑取转化子进行菌液 PCR 验证。

上述发生第一次同源重组使质粒整合到受体菌染色体上的单交换子的验证方法是：将含敲除质粒的短乳杆菌的转化子接种至含有红霉素的 MRS 培养基中 37℃静置培养 24 h。取培养后的菌液接种于上述的含红霉素的 MRS 液体培养基中，37℃培养 24 h 后，按照此步骤进行传代培养。将传代后的菌液稀释 10^{-3}~10^{-6} 倍后涂布含有红霉素的 MRS 平板 37℃培养，直至长出单菌落。挑取单菌落接种于含有红霉素的 MRS 培养基中，37℃培养 24 h，进行菌液 PCR 验证，筛选获得发生第一次同源重组使质粒整合到受体菌染色体上的潜在单交换子，再将潜在单交换子提取全基因组 DNA，采用 PCR 及测序验证，确保获得正确敲除 *gln*R 基因的突变株。

上述筛选发生第二次同源重组实现靶基因敲除的菌株的方法是：将单交换子接种到不含红霉素的液体 MRS 培养基中，37℃培养 24 h。在无抗的 MRS 培养基中传代后，菌液稀释 10^{-3}~10^{-6} 倍后涂布不含红霉素的 MRS 平板 37℃培养，直至长出单菌落。挑取单菌落，接种于无红霉素抗性的 MRS 液体培养基中 37℃培养 24 h，进行菌液 PCR 验证，从而得到 *gln*R 基因敲除的潜在突变株。再将潜在敲除株提取全基因组 DNA，采用 PCR 及测序验证，确保获得正确敲除 *gln*R 基因的突变株。若未获得 *gln*R 基因敲除株，可继续传代，重复上述步骤，直至筛选获得 *gln*R 基因敲除株。

本发明的第二个目的是提供一种 γ-氨基丁酸合成能力提高的短乳杆菌，所述短乳杆菌在出发菌株的基础上敲除了 *gln*R 基因。

在一种实施方式中，所述 *gln*R 基因表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在一种实施方式中，编码所述 *gln*R 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

在一种实施方式中，所述出发菌株为任意能够合成 GABA 的短乳杆菌，可选地，为短乳杆菌 D17（保藏编号为 CGMCC NO. 14385）、模式菌株短乳杆菌 ATCC 367、短乳杆菌 NCL912、短乳杆菌 CGMCC1306 或者短乳杆菌 NPS-QW-145 等。

在一种实施方式中，所述敲除，可以使用任意一种已知的敲除方法，比如同源重组，二类内含子 (Targetron 或 Clostron)基因插入失活、CRISPR-Cas 基因编辑等。

本发明的第三个目的是提供一种合成 γ-氨基丁酸的方法，所述方法是利用敲除了 *gln*R 基因的短乳杆菌进行发酵生产。

在一种实施方式中，所述发酵生产是将短乳杆菌接种于含有谷氨酸或谷氨酸钠的培养基中进行发酵生产。

在一种实施方式中，所述发酵生产可以是采用如下任意一种方法进行：

(1) 将短乳杆菌 *gln*R 敲除株，接种于含有谷氨酸(钠)的液体发酵培养基中，进行发酵培养；

(2) 发酵过程进行酸碱度调节的批次补料发酵：将短乳杆菌 *gln*R 敲除株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，pH 控制为 4.8-5.5，搅拌不通气条件下进行发酵；发酵 6~24 h 间补充谷氨酸(钠)底物。优选地，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加；

(3) 发酵过程进行酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵：将短乳杆菌 *gln*R 敲除株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，pH 控制为 4.8-5.5，搅拌不通气条件下进行发酵；发酵 6~36 h 间补充谷氨酸(钠)底物。优选地，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加，同时在 6~36 h 流加葡萄糖碳源。

在一种实施方式中，所述发酵生产是采用如下任意一种方法进行：

(1) 将短乳杆菌 *gln*R 敲除株分别接种于 10 g/L 葡萄糖碳源，添加 50 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 液体发酵培养基中，于 37℃×200 rpm 培养条件下进行发酵。

(2) 发酵过程进行酸碱度调节的批次补料发酵：采用生物反应器，将短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 或 D17Δ*gln*R 突变株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中。采用 5 mol/L 浓度的硫酸将发酵液的 pH 控制为 5.0，于 37℃×200 rpm 搅拌不通气条件下进行发酵。为避免高浓度谷氨酸(钠)对菌体生长的抑制，于 6~24 h 间补充谷氨酸(钠)底物。优选地，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加。发酵 60 h，ATCC 367Δ*gln*R 的 GABA 的累计浓度为 233.9 g/L，发酵 36 h，生产效率最高达 4.88 g/L/h；发酵 48 h，D17Δ*gln*R 的 GABA 的累计浓度为 148.0 g/L，发酵 18 h，生产效率最高达 5.73 g/L/h。

(3) 发酵过程进行酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵：采用生物反应器，将短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 或 D17Δ*gln*R 突变株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中。采用 5 mol/L 浓度的硫酸将发酵液的 pH 控制为 5.0，于 37℃×200 rpm 搅拌不通气条件下进行发酵。为避免高浓度谷氨酸(钠)对菌体生长的抑制，于 6~36 h 间补充谷氨酸(钠)底物。优选地，ATCC 367Δ*gln*R 的发酵过程中，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加，同时在 12~36 h 流加葡萄糖碳源，发酵 60 h，ATCC 367Δ*gln*R 的 GABA 的累计浓度为 282.80 g/L，发酵 36 h，生产效率最高达 4.93 g/L/h；优选地，D17Δ*gln*R 的发酵过程中，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加，同时在 6~30 h 流加葡萄糖碳源，发酵 60 h，D17Δ*gln*R 的 GABA 的累计浓度为 301.5g/L，发酵 36 h，生产效率最高达 5.76 g/L/h。

本发明的第四个目的是提供一种提高产 γ-氨基丁酸的短乳杆菌的耐酸能力的方法，所述

方法是敲除短乳杆的菌 *gln*R 基因。

本发明的第五个目的是提供所述重组菌或者所述方法，在食品、制备药物、饲料、化工等领域的应用。

在一种实施方式中，所述食品为酸性发酵食品；比如黄酒或者酸面团生产。

本发明的第六个目的是提供所述重组菌或者所述方法，在制备对哺乳动物具有安神、降低血压、改善睡眠的药物或者保健品方面的应用。

生物材料：

短乳杆菌 D17，已经在公布号 CN 108034599 A、公开日为 2018 年 05 月 15 日的专利申请 2017112754179 中公开；其分类学命名为短乳杆菌 *Lactobacillus brevis*，于 2017 年 7 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC NO. 14385。

模式菌株短乳杆菌 ATCC 367，购自中国微生物保藏中心编号 CGMCC1.2028，也可以从美国模式培养物研究所编号 ATCC 367 购买得到。

本发明涉及的短乳杆菌NCL912、短乳杆菌CGMCC1306及短乳杆菌NPS-QW-145已在本专利申请之前的文献中公开 (Li, H.X., Gao, D.D., et al. A high γ-aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai [J]. 2008, Annals of Microbiology, 58 (4):649-653. Peng, C. L., Huang, J., 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, 21(10): 1190-1194. Wu, Q., Law, Y. S., et al. Dairy *Streptococcus thermophilus* improves cell viability of *Lactobacillus brevis* NPS-QW-145 and its gamma-aminobutyric acid biosynthesis ability in milk [J]. Scientific Report, 2015, 5(12885): 1-12.)。

整合质粒pGID023，如图1所示，已经在1994年的文献中公开 (Pascal Hols, Thierry Ferain, Dominique Garmyn, et al. Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. Applied Environmental Microbiology 1994，60:1401-1413.)。

本发明的有益效果：

本发明首次发现 *gln*R 基因的缺失可显著提高短乳杆菌的 GABA 合成能力，且通过获得的短乳杆菌的 *gln*R 基因敲除菌株 ATCC 367Δ*gln*R 与短乳杆菌 D17Δ*gln*R，发现该方法具有通用性，原则上适合所有的短乳杆菌。本发明利用敲除了 *gln*R 基因的菌株生产 GABA，可以大幅度提高短乳杆菌 GABA 生产效率或产量、缩短发酵周期，同时可显著提高菌株在酸性环境

中的存活能力，菌株也适用于黄酒酿造、酸面团生产等酸性食品的发酵。

附图说明

图 1. 用于基因敲除的 pGID023 质粒；

图 2. 敲除质粒 pGID023-Δ*gln*R 的构建；上图为 *gln*R 基因上下游同源臂扩增，下图为敲除质粒 pGID023-Δ*gln*R；

图 3. 短乳杆菌 *gln*R 基因敲除的流程示意图；

图 4. 短乳杆菌 ATCC 367 及 D17*gln*R 基因敲除的 PCR 验证图；

附图 4A 中的标记为：M: 500bp Marker；6: 采用引物对 F-*gln*R 与 R-*gln*R 扩增短乳杆菌 D17 基因组；9:采用引物对 F-*gln*R 与 R-*gln*R 扩增短乳杆菌 ATCC 367 基因组；1~5: 提取潜在短乳杆菌 D17 的 *gln*R 敲除菌株的基因组，采用引物对 F-*gln*R 与 R-*gln*R 扩增；7~8: 提取潜在短乳杆菌 ATCC 367 的 *gln*R 敲除菌株的基因组，采用引物对 F-up-*gln*R-BamH 与 R-down-*gln*R-Hind3 扩增。

附图 4B 中的标记为：M: 5 kb Marker；1: 采用引物对 F-up-*gln*R-BamH 与 R-down-*gln*R-Hind3 扩增短乳杆菌 D17 基因组；7. 采用引物对 F-up-*gln*R-BamH 与 R-down-*gln*R-Hind3 扩增短乳杆菌 ATCC 367 基因组；2~6: 提取潜在短乳杆菌 D17 的 *gln*R 敲除菌株的基因组，采用引物对 F-up-*gln*R-BamH 与 R-down-*gln*R-Hind3 扩增；8~9: 提取潜在短乳杆菌 ATCC 367 的 *gln*R 敲除菌株的基因组，采用引物对 F-up-*gln*R-BamH 与 R-down-*gln*R-Hind3 扩增。

图 5. 短乳杆菌 ATCC 367 及 D17 的 *gln*R 基因敲除的测序验证；

图 6. *gln*R 基因的缺失对乳杆菌 GABA 合成的影响；附图 6A 中的标记为：367 代表短乳杆菌 ATCC 367 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株；附图 6B 中的标记为：367 代表短乳杆菌 D17 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株。

图 7. 短乳杆菌 *gln*R 敲除菌在极端酸性环境的存活；附图 7A 中的标记为：367 代表短乳杆菌 ATCC 367 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株；附图 7B 中的标记为：367 代表短乳杆菌 D17 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株。

图 8. 短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的批次补料发酵合成 GABA；附图 8 中的标记为：367 代表短乳杆菌 ATCC 367 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株。

图 9. 短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵合成 GABA；附图 9 中的标记为：367 代表短乳杆菌 ATCC 367 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株。

图 10. 短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的批次补料发酵合成 GABA；附图 10 中的标记为：D17 代表短乳杆菌 D17 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株。

图 11. 短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵合成 GABA；附图 11 中的标记为：D17 代表短乳杆菌 D17 野生菌；Δ*gln*R 代表短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株。

具体实施方式

MRS 培养基：葡萄糖 2%，酵母浸粉 0.4%，蛋白胨 1%，牛肉膏 0.5%，吐温 80 0.1%，乙酸钠 0.5%，磷酸氢二钾 0.2%，柠檬酸三铵 0.2%，硫酸镁 0.02%，硫酸锰 0.05%，均为质量-体积分数，调节 pH 为 6.2；固体培养基中添加 2%浓度的琼脂。

含红霉素的 MRS 液体培养基：在 MRS 培养基基础上加入终浓度为 1 μg/mL 的红霉素。

含红霉素的 MRS 平板：在 MRS 培养基基础上加入终浓度为 4 μg/mL 的红霉素。

复苏液：葡萄糖 2%，酵母浸粉 0.4%，蛋白胨 1%，牛肉膏 0.5%，吐温 80 0.1%，乙酸钠 0.5%，磷酸氢二钾 0.2%，柠檬酸三铵 0.2%，硫酸镁 0.02%，硫酸锰 0.05%，蔗糖 10.26%，均为质量-体积分数。

LB 培养基 (g/L)：液体：酵母浸粉 5，蛋白胨 10，氯化钠 10；固体培养基中添加 2%浓度的琼脂。

含红霉素的 LB 培养基：在 LB 培养基基础上加入终浓度 200 μg/mL 的红霉素。

GYP 培养基：葡萄糖 1%，酵母浸粉 1%，蛋白胨 0.5%，乙酸钠 0.2%，硫酸镁 0.02%，硫酸锰 0.01%，硫酸亚铁 0.01%，氯化钠 0.01%，均为质量-体积分数；固体培养基中添加 2%浓度的琼脂，发酵培养基中添加不同浓度谷氨酸钠。

耐酸能力测试：将短乳杆菌野生菌及 *gln*R 敲除株分别接种于 10 g/L 葡萄糖碳源，10 g/L 谷氨酸(钠)的发酵培养基中，37℃发酵 10 h。离心收集细胞，采用 pH 7.0 的磷酸钾缓冲洗菌 1 次。并用含有或不含 10 mM 谷氨酸(钠)的 pH 7.0 的磷酸钾缓冲重悬菌体，使其 OD_{600} 为 1.0。37℃分别静置培养 0 h，1 h，2 h，2.5 h 时，立即加入 9 倍体积含有或不含 10 mM 谷氨酸钠 pH 2.5 的磷酸钾缓冲于菌悬液中，继续静置培养至 3 h 结束。取出样品立即用 pH 7.4 的 PBS 缓冲按 10^{-1}~10^{-5} 稀释，选择合适的梯度取 100 μL 稀释液涂于 GYP 平板上，37℃静置培养 24 h。

实施例 1：短乳杆菌 *gln*R 基因的无痕敲除

根据短乳杆菌的模式菌株ATCC 367或D17中*gln*R基因的上下游DNA序列，*gln*R基因的上游与下游保留各21 bp (防止基因全切除影响上下游同源臂基因表达)，设计引物对F-up-*gln*R-

BamHI与R-up，F-down与R-down-*gln*R-HindIII。以短乳杆菌ATCC 367或D17的基因组DNA为模板，分别用引物对F-up-*gln*R-BamHI与R-up和F-down与R-down-*gln*R-HindIII扩增*gln*R基因的上下游同源序列up-*gln*R(序列如SEQ ID NO:3所示)、down-*gln*R(序列如SEQ ID NO: 4所示)。PCR条件为98℃预变性30 s；98℃变性10 s，55℃退火15 s，72℃延伸1 min，30个循环；72℃后延伸10 min。采用Omega胶回收试剂盒回收上下游同源臂各1000 bp。取等摩尔up-*gln*R、down-*gln*R片段加水补足为5 μL，再加入5 μL的Takara 的PrimeSTAR Max DNA Polymerase，PCR条件为98℃预变性30 s；98℃变性10 s，55℃退火2 min，72℃延伸2 min，15个循环；72℃后延伸10 min。以得到的PCR产物为模板，采用引物F-up-*gln*R-BamHI、R-down-*gln*R-HindIII继续进行PCR。PCR条件为98℃预变性30 s；98℃变性10 s，55℃退火15 s，72℃延伸2 min，30个循环；72℃后延伸10 min。采用重叠PCR方法得到上下游同源臂的拼接片段up-down-*gln*R (序列如SEQ ID NO:5 所示)。

利用BamHI和HindIII双酶切up-down-*gln*R片段和质粒pGID023，之后将酶切产物于16℃连接16 h后，转化至大肠杆菌JM109感受态中。经菌液PCR、酶切及测序鉴定获得阳性菌株，进而得到将*gln*R基因上下游同源序列克隆至pGID023的基因敲除质粒pGID023-Δ*gln*R (如图2所示)。

(1)发生第一次同源重组的单交换菌株的筛选

将构建好的基因敲除质粒 pGID023-Δ*gln*R 电转化入短乳杆菌 ATCC 367 或短乳杆菌 D17 的感受态细胞，其转化条件为电压 2000V~2500V 电击 5 ms，将菌液涂布在含红霉素(终浓度为 4 μg/μL)的 MRS 平板上 37℃培养，直至长出单克隆。挑选单克隆，用引物对 F-GID 与 R-GID 进行 PCR 验证。挑选转入敲除质粒的正确重组菌。将重组菌单菌落接种至含有红霉素抗性的 MRS 液体培养基中传代，促进单交换整合的发生。将传代后的菌液稀释后，涂于含红霉素 (终浓度为 4 μg/mL)的 MRS 平板上，挑取长出的抗性单菌落，接至含红霉素 (终浓度为 1 μg/mL)的 MRS 培养基中 37℃培养 24 h。取 200μL 菌液离心去除发酵上清，加入 20 μL 去离子水重悬，并加入 0.1 g 的玻璃粉 (0.1 mm)，采用珠磨仪破碎 2 min 后，离心取上清进行菌液 PCR 验证。采用多对引物对 F-367-0092 与 R-367-0090 (同源臂两端设计的引物)、F-GID 与 R-GID、F-367-0092 与 R-GID 、F-GID 与 R-367-0090 验证，PCR 条件为 98℃预变性 30 s；98℃变性 10 s，55℃退火 15 s，72℃延伸 2 min，30 个循环；72℃后延伸 10 min。确定筛选到正确的单交换子 (单交换方式如图 3 所示)。

(2)发生第二次同源重组的基因敲除菌株的筛选

将单交换子接种到不含抗性的液体 MRS 培养基中，在无抗的情况下通过传代，促进染色

体内的重组。将连续传代后的菌液稀释后，涂布于无抗性的平板。挑取平板上长出的单菌落接种至 MRS 液体培养基中 37℃培养 24 h，采用上述的方法破碎细胞，取上清进行菌液 PCR 验证。引物对为 F-up-*gln*R-BamHI 与 R-down-*gln*R-HindIII，PCR 条件为 98℃预变性 30 s；98℃变性 10 s，55℃退火 15 s，72℃延伸 2 min，30 个循环；72℃后延伸 10 min。筛选出潜在的敲除菌株后，提取潜在敲除菌株的基因组 DNA，用引物对 F-up-*gln*R-BamHI 与 R-down-*gln*R-HindIII 和 F-*gln*R 与 R-*gln*R (根据 *gln*R 基因内部序列设计引物)进行 PCR 扩增 (如图 4 所示)并测序验证 (如图 5 所示)。

在发生第二次同源重组的双交换子中，一种是回复突变成野生型，另一种就是 *gln*R 基因敲除株(图 3)。

如图 4A 所示，采用引物对 F-up-*gln*R-BamHI 与 R-down-*gln*R-HindIII，利用 Δ*gln*R 突变株的基因组只能扩增出约 2000 bp 大小的 PCR 产物 (含 up-*gln*R 和 down-*gln*R)，而利用野生菌基因组可扩增出约 2300 bp 大小的片段，说明在 Δ*gln*R 突变株中缺失 *gln*R。如图 4B 所示采用引物对 F-*gln*R 与 R-*gln*R，利用 Δ*gln*R 突变株的基因组无法扩增出 PCR 产物，说明 *gln*R 缺失，而利用野生菌基因组可扩增出约 300 bp 大小的片段。

对野生菌与 Δ*gln*R 突变株的 *gln*R 基因进行测序，*gln*R 缺失片段如图 5 所示。

通过该方法得到的正确的 *gln*R 基因敲除的短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株及短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株。

表 1 引物

引物名称	序列	SEQ ID NO:
F-up-*gln*R-BamHI	AGCGCGGATCCACTGGCCATTAAATTAGCCCAAGCCTTTA	6
R-up	CGGCCGCTGTTGCTGCCGTAATTCTTTTTCTTTCACCACTAC	7
F-down	GAAAAAGAATTACGGCAGCAACAGCGGCCGCTTTAAGATATTGATGAG	8
R-down-*gln*R-HindIII	CCCAAGCTTCCAAGCAACATAGACCGGTGCTTCGT	9
F-367-0092	ATGATTAAAGTTGTGGCGGTTG	10
R-367-0090	TTCTAGATATTGATCGCGTTCCC	11
F-GID	GCTATTACGCCAGCTGGCGA	12
R-GID	GAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGC	13
F-*gln*R	CGGAACGGTGATGAAGCTGACTAAT	14
R-*gln*R	AGCCCACCTTGACGAATGAACTC	15

实施例 2：短乳杆菌 *gln*R 基因敲除菌合成 GABA 的应用

在无菌条件下，将-80℃保存的短乳杆菌 ATCC 367 野生菌、ATCC 367Δ*gln*R 突变株、短乳杆菌 D17 野生菌、D17Δ*gln*R 突变株取出，分别划线于 GYP 固体平板上，37℃静置培养。

待单菌落长出后从活化的 GYP 固体平板上挑取短乳杆菌 ATCC 367 野生菌、ATCC 367Δ*gln*R 突变株及 D17 野生菌、D17Δ*gln*R 突变株单菌落，接种于 GYP 种子培养基中，37℃静置培养 24 h。取种子培养液，按 10%的接种量接种于新的 GYP 种子培养基中，37℃静置培养 12 h 后，培养液作为发酵种子。在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 的添加 10 g/L 葡萄糖碳源和 50 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基，取培养 12 h 的发酵种子按 10%的接种量接种，于 37℃×200 rpm 培养 48 h。发酵上清液经高效液相色谱检测 GABA 含量。

结果显示：如图 6A 所示，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力 18.0 g/L，相比野生菌 ATCC 367 的 11.8 g/L，提高了 52.5%；短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株发酵 24 h, GABA 达到最高产量，相比野生菌 ATCC 367 的 48 h，缩短了 100%；发酵 24 h，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的生产效率为 0.72 g/L/h，相比野生菌 ATCC 367 的 0.19 g/L/h，提高了 280%。

如图 6B 所示，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力 19.3 g/L，相比野生菌 D17 的 18.4 g/L，仅提高了 4.9%；但短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株发酵 24 h, GABA 达到最高产量，相比野生菌 D17 的 36 h，缩短到了 50%；发酵 24 h，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的生产效率为 0.76 g/L/h，相比野生菌 D17 的 0.55 g/L/h，提高了 38.2%。

综上所述，GlnR 对短乳杆菌的 GABA 合成能力有调控作用，*gln*R 敲除后可显著提高 *gln*R 敲除突变株的 GABA 生产效率。

实施例 3：短乳杆菌 *gln*R 基因敲除菌提高耐酸性的应用

将斜面上活化的短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株与 D17Δ*gln*R 突变株，分别接种于 GYP 液体培养基中，37℃静置培养 24 h，制成一级种子培养液。按 10%的接种量，将一级种子液接种于新鲜的 GYP 培养基中，37℃×200 rpm 培养 15 h，制成二级种子培养液。将二级种子培养液按 10%接种量，接种于 10 g/L 葡萄糖为碳源，10 g/L 谷氨酸(钠)底物的 GYP 的发酵培养基中，37℃×200 rpm 培养 10 h。9000 rpm，4℃离心 10 min 收集细胞。采用 pH 7.0 的磷酸钾缓冲液重悬菌体后，离心后去除上清。用含有 10 mM 谷氨酸(钠)的 pH 7.0 的磷酸钾缓冲液重悬菌体，使其 OD_{600} 为 1.0。37℃静置培养 0 h，1 h，2 h，2.5 h 时，立即分别加入 9 倍体积含

有 10 mM 谷氨酸(钠)pH 2.5 的磷酸钾缓冲液于不同培养时间的菌悬液中，继续静置培养至 3 h 结束。同样的，用不含谷氨酸(钠)的 pH 7.0 的磷酸钾缓冲液重悬菌体，使其 OD_{600} 为 1.0。37℃静置培养 0 h，1 h，2 h，2.5 h 时，立即分别加入 9 倍体积不含谷氨酸(钠)pH 2.5 的磷酸钾缓冲液于不同培养时间的菌悬液中，继续静置培养至 3 h 结束。取出所以酸刺激的样品立即用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液按 10^{-1}~10^{-5} 梯度稀释，选择合适的梯度，取 100 μL 稀释液涂于 GYP 平板上，37℃静置培养 24 h，记录平板上的菌落数。

结果显示：如图 7A 所示，短乳杆菌 ATCC 367 野生菌与 ATCC 367Δ*gln*R 突变株，在未添加谷氨酸钠的酸性缓冲中 0.5 h 后，完全没有活菌存在。而短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 0.5 h 后，菌落数为 6.8×10^9 cfu/mL，相比野生菌 ATCC 367 的 4.4×10^9 cfu/mL，提高了 54.5%；短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 1 h 后，菌落数为 4.9×10^9 cfu/mL，相比野生菌 ATCC 367 的 2.2×10^9 cfu/mL，提高了 122.7%；短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 2 h 后，菌落数为 2.4×10^9 cfu/mL，相比野生菌 ATCC 367 的 1.2×10^9 cfu/mL，提高了 100%；短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 3 h 后，菌落数为 1.5×10^9 cfu/mL，相比野生菌 ATCC 367 的 2.8×10^8 cfu/mL，提高了 435.7%；说明通过在缓冲中添加谷氨酸(钠)，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的耐酸能力显著高于野生菌 ATCC 367。

如图 7B 所示，短乳杆菌 D17 野生菌与 D17Δ*gln*R 突变株，在未添加谷氨酸钠的酸性缓冲中刺激 0.5 h 后，完全没有活菌存在。而短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 0.5 h 后，菌落数为 9.6×10^9 cfu/mL，相比野生菌 D17 的 7.0×10^9 cfu/mL，提高了 37.1%；短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 1 h 后，菌落数为 7.6×10^9 cfu/mL，相比野生菌 D17 的 3.7×10^9 cfu/mL，提高了 105.4%；短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 2 h 后，菌落数为 4.9×10^9 cfu/mL，相比野生菌 D17 的 2.2×10^9 cfu/mL，提高了 122.7%；短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株在添加 10 mM 谷氨酸(钠)缓冲中 3 h 后，菌落数为 2.6×10^9 cfu/mL，相比野生菌 D17 的 9.0×10^8 cfu/mL，提高了 188.9%；说明通过添加 10 mM 谷氨酸(钠)，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的耐受极端酸性环境的能力显著高于野生菌 D17。

综上说明 GlnR 可调控菌株的谷氨酸依赖的酸耐受性，*gln*R 敲除后可有效提高 *gln*R 敲除突变株的耐酸性。获得的高耐酸的突变株适用于酸性的食品的发酵剂，如黄酒酿造，酸面团生产等。

实施例 4：短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的批次补料发酵合成 GABA 的应用

将斜面上活化的短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株，接种于 GYP 液体培养基中，37℃静置培养 24 h，制成一级种子培养液。按 10%的接种量，将一级种子液接种于新鲜的 GYP 培养基中，37℃×200 rpm 培养 15 h，制成二级种子培养液。将二级种子培养液按 10%接种量，接于 pH 为 5，30 g/L 葡萄糖为碳源及含有 74.8 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中。使用生物反应器控制温度 37℃，进行 200 rpm 搅拌不通气发酵，以 5 mol/L 硫酸在线控制 pH 为 5.0。在 6~24 h 内，每 6 h 补料 (谷氨酸(钠)) 74.8 g (100 mL)，发酵 72 h。采用 HPLC 分析检测发酵上清液的 GABA 含量。野生菌 ATCC 367 采用同样的方法培养和测试发酵上清液的 GABA 含量。

结果显示，如附图 8 所示，发酵 60 h，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力产量最高，为 233.9 g/L，相比野生菌 ATCC 367 的 10.2 g/L，提高了 2193%；发酵 36 h，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的生产效率最高为 4.88 g/L/h，相比野生菌 ATCC 367 的 0.20 g/L/h，提高了 2340%。

实施例 5：短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵合成 GABA 的应用

将斜面上活化的短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株或野生菌 ATCC 367，接种于 GYP 液体培养基中，37℃培养 24 h，制成一级种子培养液。按 10%的接种量，将一级种子液接种于新鲜的 GYP 培养基中，37℃×200 rpm 培养 15 h，制成二级种子培养液。将二级种子培养液按 10%接种量，接于 pH 为 5，20 g/L 葡萄糖为碳源并含 74.8 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，使用生物反应器控制温度 37℃，进行 200 rpm 搅拌不通气发酵，以 5 mol/L 硫酸在线控制 pH 为 5.0。在 6~36 h 内每 6 h 补料 (谷氨酸(钠)) 74.8 g (100 mL)，同时在 12~36 h 流加 150 g/L 葡萄糖，流速为 0.625 g/h，发酵 72 h。采用 HPLC 分析检测发酵上清液的 GABA 含量。

结果显示，如附图 9 所示，发酵 60 h，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力产量最高，为 282.8 g/L，相比野生菌 ATCC 367 的 14.1 g/L，提高了 1906%；发酵 36 h，短乳杆菌 ATCC 367Δ*gln*R 突变株的生产效率最高为 4.93 g/L/h，相比野生菌 ATCC 367 的 0.21 g/L/h，提高了 2248%。

实施例 6：短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的批次补料发酵合成 GABA 的应用

将斜面上活化的短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株或野生菌短乳杆菌 D17，接种于 GYP 液体培养基中，37℃培养 24 h，制成一级种子培养液。按 10%的接种量，将一级种子液接种于新鲜的 GYP 培养基中，37℃×200 rpm 培养 15 h，制成二级种子培养液。将二级种子培养液按 10%接种量，接于 pH 为 5，50 g/L 葡萄糖为碳源含 74.8 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中。使用生物反应器控制温度 37℃，进行 200 rpm 搅拌不通气发酵，以 5 mol/L 硫酸在线控制 pH 为 5.0。在 6~24 h 内每 6 h 补料 (谷氨酸(钠)) 74.8 g (100 mL)，发酵 72 h。采用 HPLC 分析检测发酵上清液的 GABA 含量。

结果如附图 10 所示，发酵 60 h，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力产量最高，为 148.0 g/L，相比野生菌 D17 的 116.1 g/L，提高了 27.4%；发酵 18 h，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的生产效率最高为 5.73 g/L/h，相比野生菌 D17 的 3.39 g/L/h，提高了 70.0%。

实施例 7：短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株采用酸碱度调节的流加葡萄糖的批次补料发酵合成 GABA 的应用

将斜面上活化的短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株或野生菌短乳杆菌 D17，接种于 GYP 液体培养基中，37℃培养 24 h，制成一级种子培养液。按 10%的接种量，将一级种子液接种于新鲜的 GYP 培养基中，37℃×200 rpm 培养 15 h，制成二级种子培养液。将二级种子培养液按 10%接种量，接于 pH 为 5，30 g/L 葡萄糖为碳源并含 74.8 g/L 谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，使用生物反应器控制温度 37℃，进行 200 rpm 搅拌不通气发酵，以 5 mol/L 硫酸在线控制 pH 为 5.0。在 6~36 h 内每 6 h 补料 (谷氨酸(钠)) 74.8 g (100 mL)，同时在 12~36 h 流加 400 g/L 葡萄糖，流速为 2.58 g/h，发酵 72 h。采用 HPLC 分析检测发酵上清液的 GABA 含量。

结果如附图 11 所示，发酵 60 h，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的 GABA 合成能力产量最高，为 301.5 g/L，相比野生菌 D17 的 180.7 g/L，提高了 66.8%；发酵 36 h，短乳杆菌 D17Δ*gln*R 突变株的生产效率最高为 5.76 g/L/h，相比野生菌 D17 的 4.93 g/L/h，提高了 17.0%。

1、一种γ-氨基丁酸合成能力提高的短乳杆菌，其特征在于，所述短乳杆菌在出发菌株的基础上敲除了 *gln*R 基因；所述 *gln*R 基因表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；编码所述 *gln*R 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；所述出发菌株为短乳杆菌 D17、模式菌株短乳杆菌 ATCC 367、短乳杆菌 NCL912、短乳杆菌 CGMCC1306 或短乳杆菌 NPS-QW-145。

2、一种γ-氨基丁酸合成能力提高的短乳杆菌，其特征在于，所述短乳杆菌在出发菌株的基础上敲除了 *gln*R 基因。

3、根据权利要求 2 所述的短乳杆菌，其特征在于，所述 *gln*R 基因表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

4、根据权利要求 3 所述的短乳杆菌，其特征在于，编码所述 *gln*R 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

5、根据权利要求 2 所述的短乳杆菌，其特征在于，所述出发菌株为任意能够合成 GABA 的短乳杆菌。

6、根据权利要求 5 所述的短乳杆菌，其特征在于，所述能够合成 GABA 的短乳杆菌为短乳杆菌 D17、模式菌株短乳杆菌 ATCC 367、短乳杆菌 NCL912、短乳杆菌 CGMCC1306 或者短乳杆菌 NPS-QW-145。

7、根据权利要求 1-6 任一所述的短乳杆菌，其特征在于，所述敲除，可以使用任意一种已知的敲除方法；比如同源重组，二类内含子 (Targetron 或 Clostron)基因插入失活、CRISPR-Cas 基因编辑等；可选地，所述敲除是使用无痕敲除，尤其是基于同源重组的无标记基因敲除。

8、一种提高短乳杆菌菌株γ-氨基丁酸合成能力的方法，其特征在于，所述方法是敲除短乳杆菌菌株中的 *gln*R 基因。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 *gln*R 基因表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

10、一种合成γ-氨基丁酸的方法，其特征在于，所述方法是利用权利要求 1-6 任一所述的敲除了 *gln*R 基因的短乳杆菌进行发酵生产。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述发酵生产是将短乳杆菌接种于含有谷氨酸或谷氨酸钠的培养基中进行发酵生产。

12、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，将短乳杆菌 *gln*R 敲除株，接种于含有谷氨酸(钠)的液体发酵培养基中，进行发酵培养。

13、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，发酵过程进行酸碱度调节的批次补料发

酵：将短乳杆菌 *gln*R 敲除株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，pH 控制为 4.8-5.5，搅拌但不通气条件下进行发酵；发酵 6~24 h 间补充谷氨酸(钠)底物。优选地，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加。

14、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，发酵过程进行酸碱度调节的流加葡萄糖批次补料发酵：将短乳杆菌 *gln*R 敲除株接种于含谷氨酸(钠)的 GYP 发酵培养基中，pH 控制为 4.8-5.5，搅拌不通气条件下进行发酵；发酵 6~36 h 间补充谷氨酸(钠)底物。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，每 6 h 可进行谷氨酸(钠)底物添加，同时在 6~36 h 流加葡萄糖碳源，流加速率 0.6~3 g/h。

16、一种提高产 γ-氨基丁酸的短乳杆菌的耐酸能力的方法，其特征在于，所述方法是敲除短乳杆菌的 *gln*R 基因。

17、权利要求 1-6 任一所述短乳杆菌或者权利要求 7-16 任一所述方法，在食品、保健品、制备药物、饲料、化工等领域的应用。

18、根据权利要求 17 所述的应用，其特征在于，所述食品为酸性发酵食品。

19、根据权利要求 18 所述的应用，其特征在于，所述酸性发酵食品包括黄酒或者酸面团。

20、根据权利要求 17 所述的应用，其特征在于，所述药物为对哺乳动物具有安神、降低血压、改善睡眠的药物。

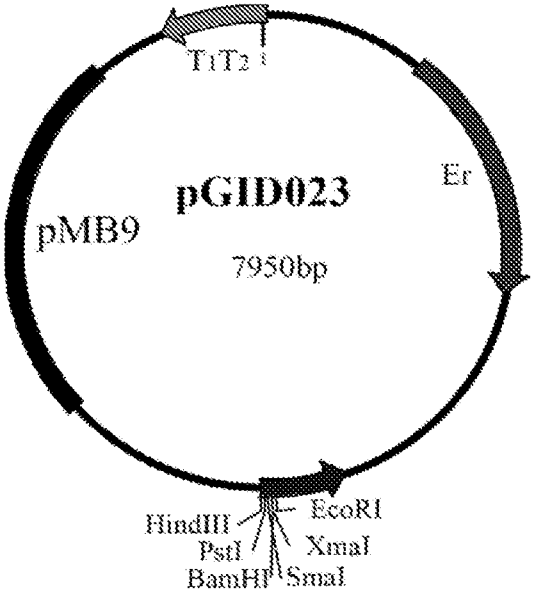
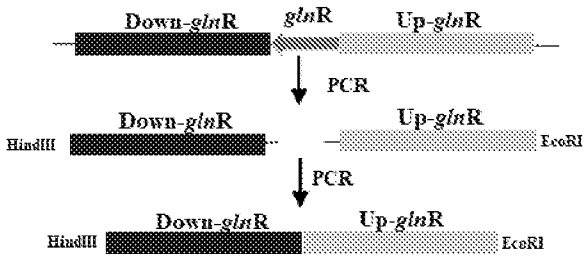

T1T2
pGID023
pMB9
7950bp
Er
HindIII
EcoRI
PstI
XmaI
BamHI
SmaI

图 1


Down-glnR
glnR
Up-glnR
PCR
Down-glnR
Up-glnR
HindIII
EcoRI
PCR
Down-glnR
Up-glnR
HindIII
EcoRI

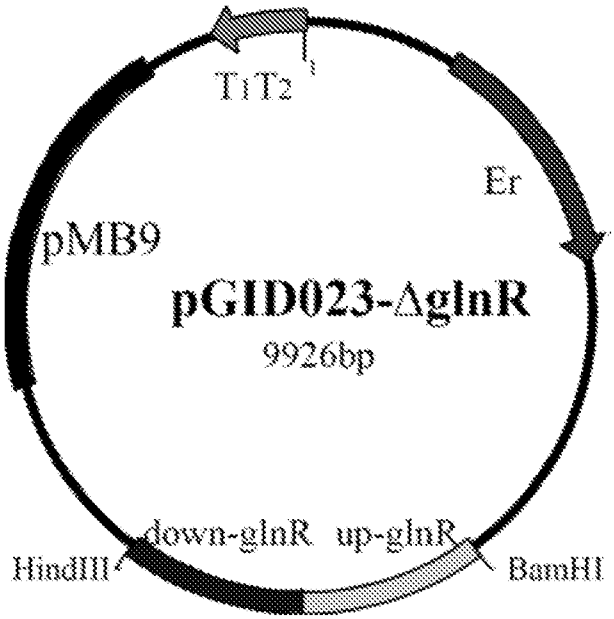

T1T2
Er
pMB9
pGID023-ΔglnR
9926bp
down-glnR
up-glnR
HindIII
BamHI

图 2

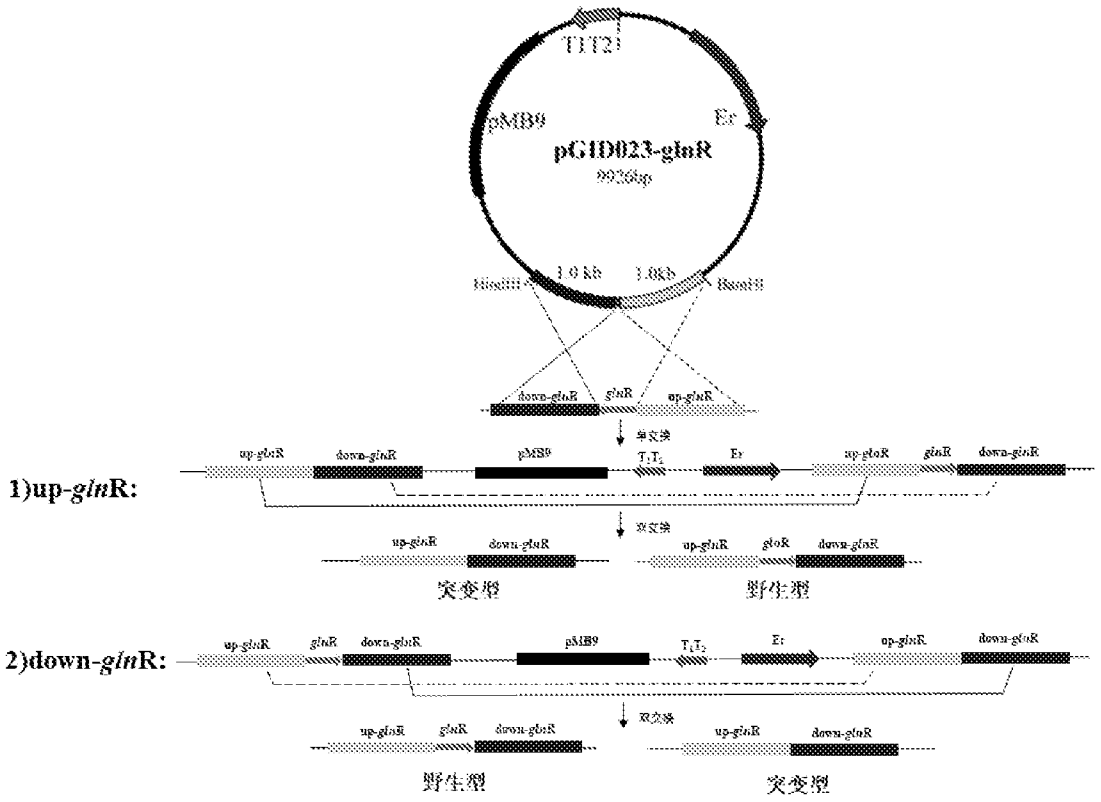

pGID023-glnR
pMB9
Er
1.0 kb
1.0kb
down-glnR
glnR
up-glnR
1)up-glnR:
突变型
野生型
2)down-glnR:
野生型
突变型

图 3

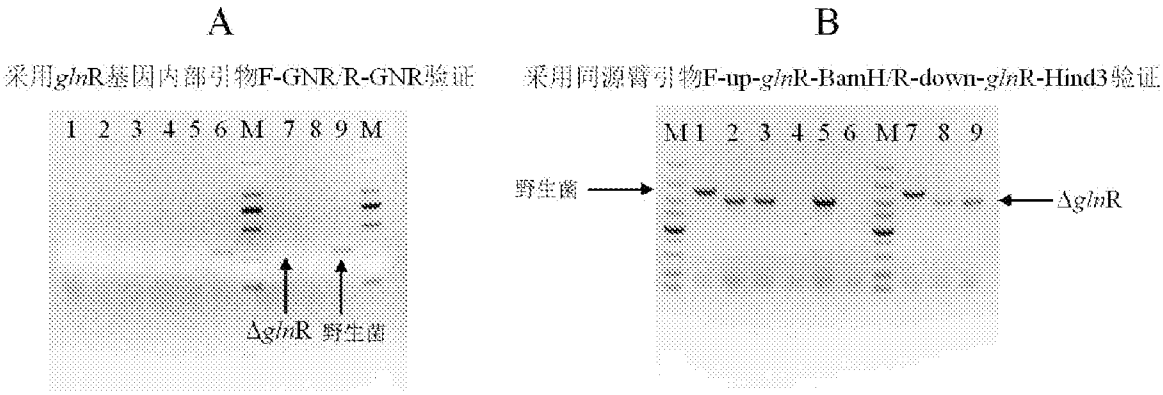

A
采用glnR基因内部引物F-GNR/R-GNR验证
1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 M
ΔglnR 野生菌
B
采用同源臂引物F-up-glnR-BamH/R-down-glnR-Hind3验证
M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9
野生菌
ΔglnR

图 4

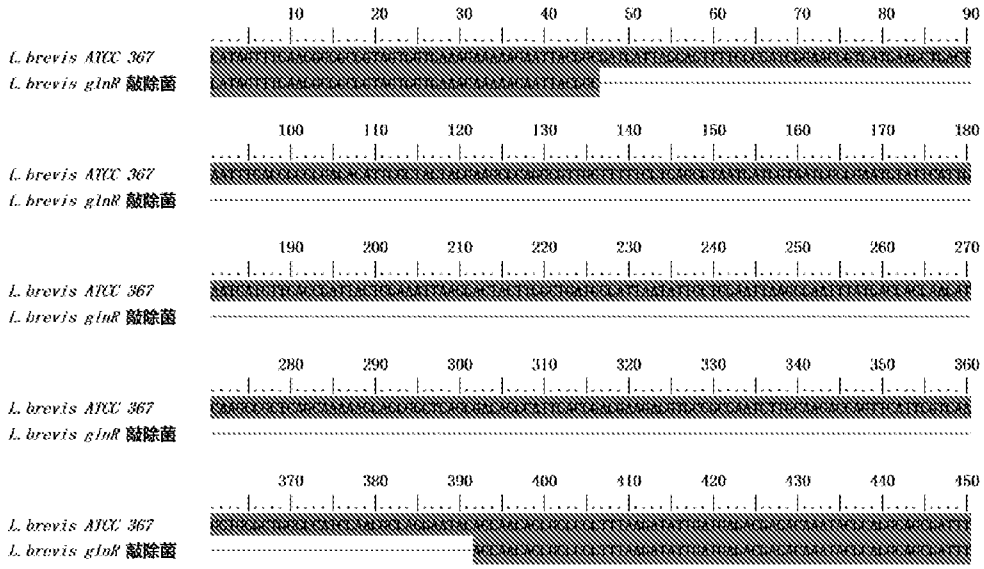

L. brevis ATCC 367
L. brevis glnR 敲除菌

图 5

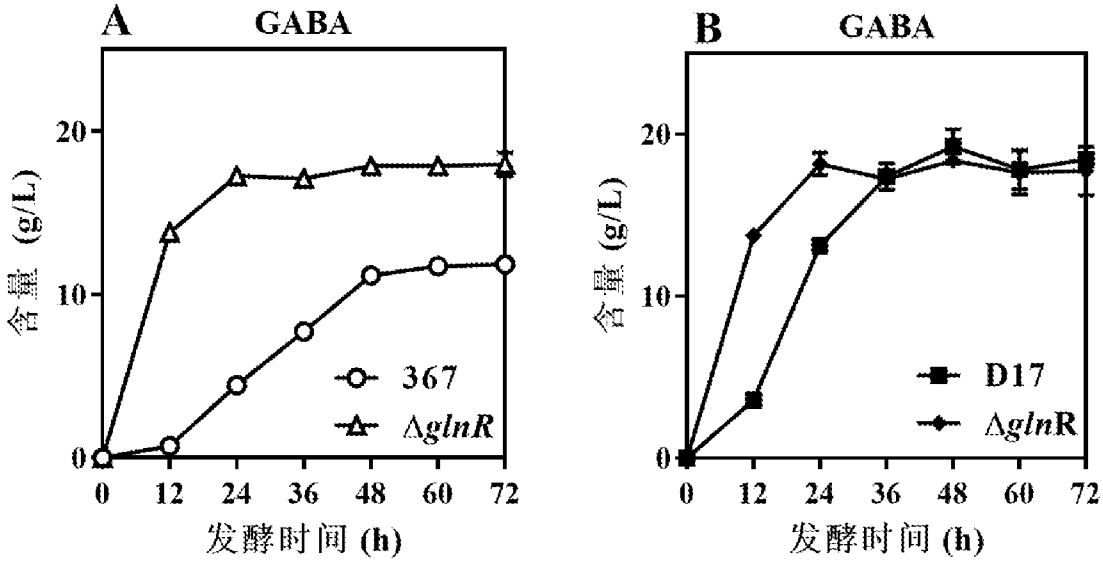

A
GABA
含量 (g/L)
367
ΔglnR
发酵时间 (h)
B
GABA
含量 (g/L)
D17
ΔglnR
发酵时间 (h)

图 6

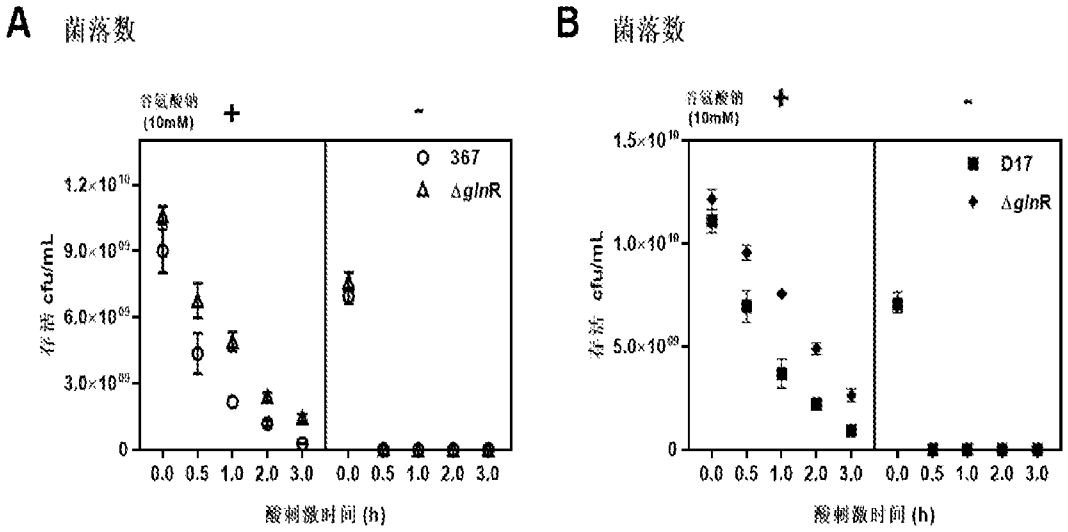

A 菌落数
B 菌落数
谷氨酸钠 (10mM)
367
ΔglnR
D17
存活 cfu/mL
酸刺激时间 (h)

图 7

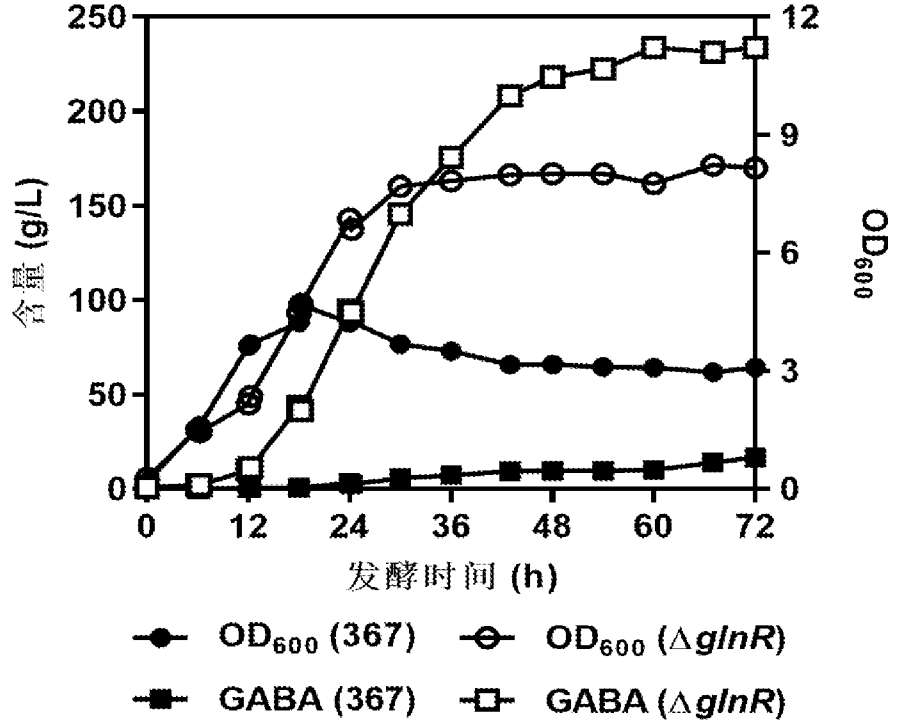

250
200
150
100
50
0
含量 (g/L)
12
9
6
3
0
OD600
0
12
24
36
48
60
72
发酵时间 (h)
OD600 (367)
OD600 (ΔglnR)
GABA (367)
GABA (ΔglnR)

图 8

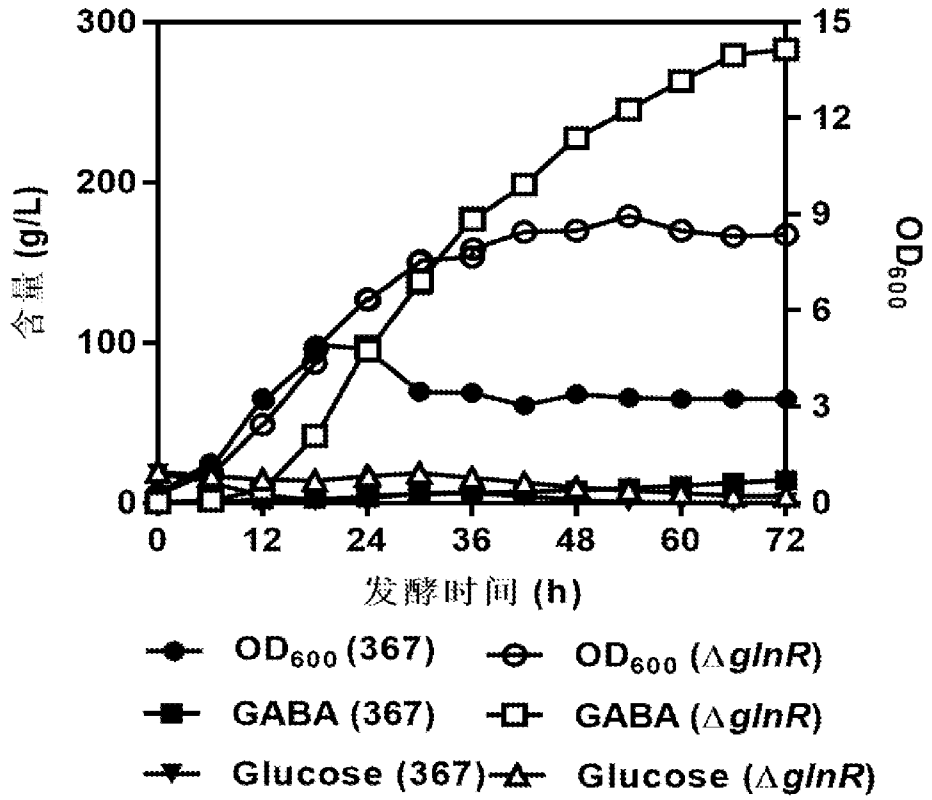

300
200
100
0
含量 (g/L)
15
12
9
6
3
0
OD600
0
12
24
36
48
60
72
发酵时间 (h)
OD600 (367)
OD600 (ΔglnR)
GABA (367)
GABA (ΔglnR)
Glucose (367)
Glucose (ΔglnR)

图 9

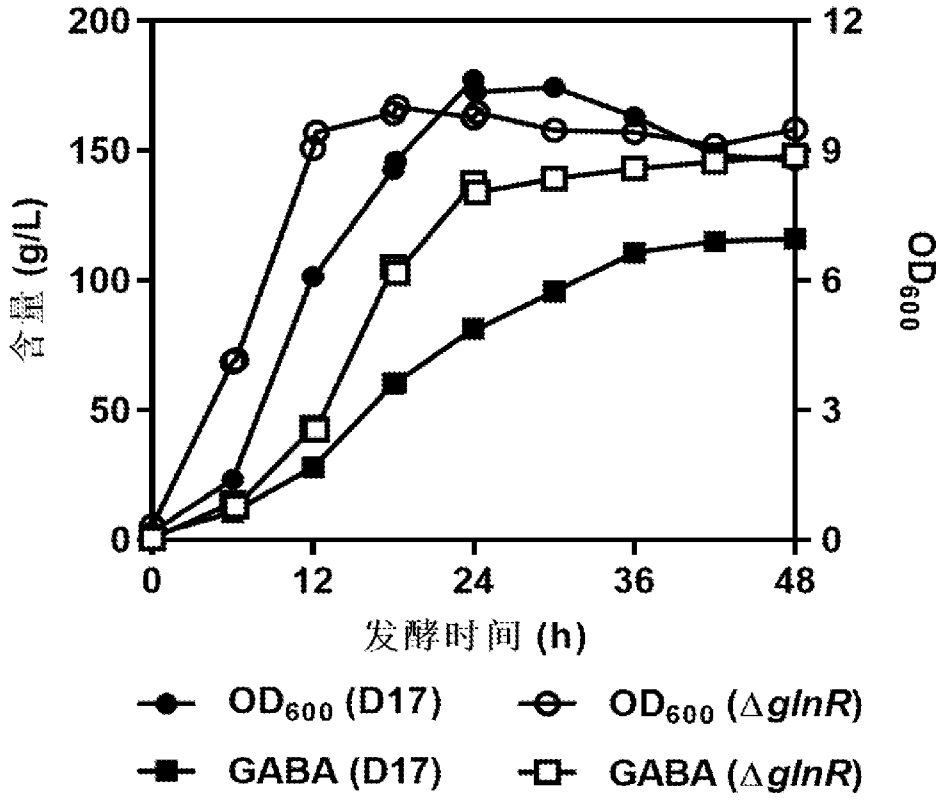

200
150
100
50
0
含量 (g/L)
12
9
6
3
0
OD600
0
12
24
36
48
发酵时间 (h)
OD600 (D17)
OD600 (ΔglnR)
GABA (D17)
GABA (ΔglnR)

图 10

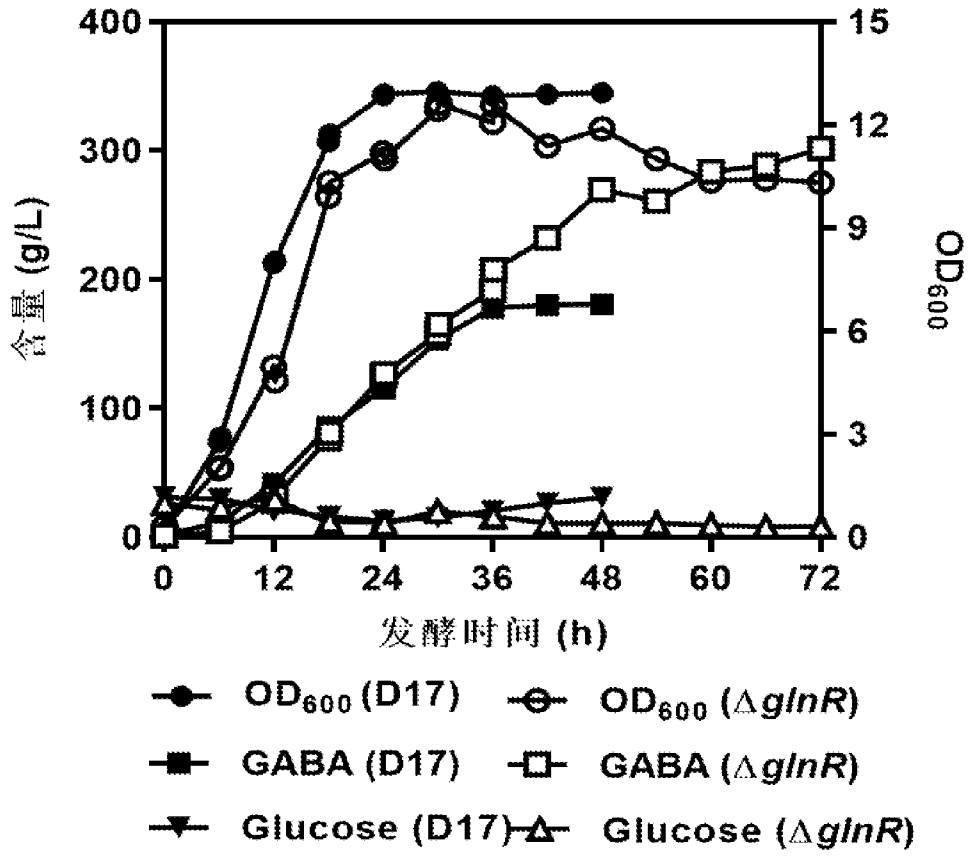

400
300
200
100
0
含量 (g/L)
15
12
9
6
3
0
OD600
0
12
24
36
48
60
72
发酵时间 (h)
OD600 (D17)
OD600 (ΔglnR)
GABA (D17)
GABA (ΔglnR)
Glucose (D17)
Glucose (ΔglnR)

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/091049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; C12G 3/02(2019.01)i; A23L 7/104(2016.01)i; A23L 33/00(2016.01)i; A23L 29/00(2016.01)i; A23K 10/18(2016.01)i; A61K 31/197(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/20(2006.01)i; C12R 1/24(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P; C12G; A23L; A23K; A61K; A61P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; PUBMED; 万方数据库: 乳杆菌, 短乳杆菌, 谷氨酸合成酶抑制子, 敲除, 失活, 突变, γ-氨基丁酸; 谷氨酸, lactobacillus, lactobacillus brevis, glnR, knock out, knock off, KO, delete, deletion, mutant, mutation, GABA, glutamic acid; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统: sequence search for SEQ ID NOs: 1-2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110241061 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 17 September 2019 (2019-09-17) see entire document	1-20
PX	GONG LC. et al. "GlnR Negatively Regulates Glutamate-Dependent Acid Resistance in Lactobacillus brevis" *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 86, No. 7, 18 March 2020 (2020-03-18), ISSN: 0090-2240, page e02615-19, see entire document	1-20
Y	江湖 (JIANG, Hu). "短乳杆菌GlnR介导的氮代谢调控研究 (GlnR-mediated Regulation for Nitrogen Metabolism in Lactobacillus brevis)" *中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑 (Basic Sciences, China Master's Theses Full-Text Database)*, 15 February 2014 (2014-02-15), ISSN: 1674-0246, pages A006-282, see abstract, main body, pages 6 and 53	1-20

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 August 2020	**25 August 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"GENBANK Accession number:ERK41890.1" *Genbank Database,* 18 September 2013 (2013-09-18), see amino acid sequence and related information	1-20
Y	"GENBANK Accession number: KIO97445.1" *Genbank Database,* 06 February 2015 (2015-02-06), see amino acid sequence and related information	1-20
A	JP 5841749 B2 (KAO CORPORATION) 13 January 2016 (2016-01-13) see abstract	1-20
A	DOROSHCHUK N.A. et al. "Regulation of nitrogen metabolism in gram-positive bacteria" *Molecular Biology,* Vol. 40, No. 5, 31 December 2006 (2006-12-31), ISSN: 0026-8933, pp. 829-836, see entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/091049

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/091049

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 110241061 A	17 September 2019	None	
JP 5841749 B2	13 January 2016	JP 2012254040 A	27 December 2012

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/091049

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; C12G 3/02(2019.01)i; A23L 7/104(2016.01)i; A23L 33/00(2016.01)i; A23L 29/00(2016.01)i; A23K 10/18(2016.01)i; A61K 31/197(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/20(2006.01)i; C12R 1/24(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P; C12G; A23L; A23K; A61K; A61P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

DWPI;CPRSABS;SIPOABS;CNABS;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;WEB OF SCIENCE;PUBMED;万方数据库:乳杆菌，短乳杆菌，谷氨酸合成酶抑制子，敲除，失活，突变，γ-氨基丁酸；谷氨酸，lactobacillus，lactobacillus brevis, glnR,knock out, knock off, KO,delete,deletion,mutant,mutation,GABA,glutamic acid; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统：对SEQ ID NOs:1-2的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110241061 A (江南大学) 2019年 9月 17日 (2019-09-17) 参见全文	1-20
PX	GONG LC.等. "GlnR Negatively Regulates Glutamate-Dependent Acid Resistance in Lactobacillus brevis" Appl Environ Microbiol., 第86卷，第7期，2020年 3月 18日 (2020-03-18), ISSN：0090-2240, 第e02615-19页，参见全文	1-20
Y	江湖. "短乳杆菌GlnR介导的氮代谢调控研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑, 2014年 2月 15日 (2014-02-15), ISSN：1674-0246, A006-282页，参见摘要，正文第6、53页	1-20
Y	"GENBANK登录号:ERK41890.1" GENBANK DATABASE, 2013年 9月 18日 (2013-09-18), 参见氨基酸序列及相关信息	1-20

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 8月 10日	2020年 8月 25日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李肖蕖
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411615

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	"GENBANK登录号:KI097445.1" GENBANK DATABASE, 2015年 2月 6日 (2015-02-06), 参见氨基酸序列及相关信息	1-20
A	JP 5841749 B2 (花王株式会社) 2016年 1月 13日 (2016-01-13) 参见摘要	1-20
A	DOROSHCHUK N.A.等. "Regulation of nitrogen metabolism in gram-positive bacteria" Molecular Biology, 第40卷, 第5期, 2006年 12月 31日 (2006-12-31), ISSN: 0026-8933, 第829-836页, 参见全文	1-20

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/091049

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/091049

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 110241061 A	2019年 9月 17日	无	
JP 5841749 B2	2016年 1月 13日	JP 2012254040 A	2012年 12月 27日