

# 基于钝齿棒杆菌 *argGH* 启动子改造的 L-瓜氨酸高效合成

张微微<sup>1</sup>, 陈紫薇<sup>1</sup>, 张晓娟<sup>1</sup>, 窦文芳<sup>1</sup>, 张晓梅<sup>1</sup>, 耿燕<sup>1</sup>, 许正宏<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** L-瓜氨酸是尿素循环的重要中间体, 在 *argGH* 编码酶的催化下易分解为 L-精氨酸, 在微生物体内难以大量积累。作者通过启动子替换手段, 以弱启动子 P-*dapAB6* 替换调控 *argGH* 表达的启动子 P-*argG*, 构建了弱化 L-瓜氨酸分解代谢途径的重组菌株 *Corynebacterium crenatum* H-7-P*dapAB6*:*argGH*。重组菌株的转录水平和酶活力结果显示, 重组菌株分解途径中 *argG* 和 *argH* 的基因表达水平下调, 精胺琥珀酸合成酶 ASS(*argG* 编码)和精胺琥珀酸裂解酶 ASL(*argH* 编码)酶活分别降低 91.80%和 55.35%。摇瓶发酵结果表明, L-瓜氨酸的产量、糖酸转化率和生产强度分别为 33.85 g/L、0.25 g/g 和 0.34 g/(L·h), 较原始菌株分别提高了 4.91、5.00 和 4.86 倍。通过启动子替换策略, 构建了 L-瓜氨酸分解代谢途径弱化的工程菌株, 初步实现了 L-瓜氨酸的高效合成。

**关键词:** 钝齿棒杆菌; L-瓜氨酸; L-精氨酸; 启动子; 代谢工程

中图分类号: Q 939.97 文章编号: 1673-1689(2019)03-0083-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.012

## Enhancement of L-Citrulline Production by Promoter Modification of *argGH* in *Corynebacterium crenatum*

ZHANG Weiwei<sup>1</sup>, CHEN Ziwei<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojuan<sup>1</sup>, DOU Wenfang<sup>1</sup>,  
ZHANG Xiaomei<sup>1</sup>, GENG Yan<sup>1</sup>, XU Zhenghong<sup>\*1,2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** L-citrulline is an important intermediate metabolite in urea cycle. The enzymes encoded by gene *argGH* catalyze the reaction of L-citrulline to L-arginine, resulting in difficulty of L-citrulline accumulation via microbial metabolism. In this study, promoter P-*argG* was replaced by a weak promoter P-*dapAB6* to down-regulate *argGH* expression. The recombinant strain *Corynebacterium crenatum* H-7-P*dapAB6*:*argGH* showed lower *argGH* expression level, with ASS (argininosuccinate

收稿日期: 2016-02-03

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022102); 江苏省自然科学基金项目(BK20150151)。

\* 通信作者: 许正宏(1971—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物资源及其产品开发方面的研究。

E-mail: zhengxu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张微微, 陈紫薇, 张晓娟, 等. 基于钝齿棒杆菌 *argGH* 启动子改造的 L-瓜氨酸高效合成[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 83-90.

synthase, encoding by *argG*) and ASL (argininosuccinase, encoding by *argH*) activities reducing by 91.80% and 55.35%, respectively, compared with the parent strain. Via fermentation in shake flasks, the L-citrulline titer, yield and productivity of *Corynebacterium crenatum* H-7-PdapAB6:*argGH* were 33.85 g/L, 0.25 g/g and 0.34 g/ (L·h), respectively, which were 4.91, 5.00 and 4.86-fold of those obtained from the parent strain. These results indicated that, by promoter engineering approach, the preliminary construction of L-citrulline biosynthesis pathway was achieved.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum*, L-citrulline, L-arginine, promoter, metabolic engineering

L-瓜氨酸是一种重要的非必需氨基酸,是尿素循环过程中的重要中间体<sup>[1]</sup>,广泛应用于医药及化妆品领域<sup>[2]</sup>。目前,L-瓜氨酸的主要生产方法有化学合成法<sup>[3]</sup>、酶法<sup>[4]</sup>和微生物发酵法<sup>[5]</sup>。其中,微生物发酵法利用可再生糖质原料生产瓜氨酸,具有成本低、产率高以及环境污染小等优势,近年来引起了广泛的关注。

在谷氨酸棒杆菌中,L-瓜氨酸的合成是以 $\alpha$ -酮戊二酸为前体,经谷氨酸脱氢酶(*gdh*编码)催化生成L-谷氨酸,L-谷氨酸进一步在*argCJBDFR*编码酶的作用下合成L-瓜氨酸,然而L-瓜氨酸易被*argGH*编码酶分解为L-精氨酸,造成L-瓜氨酸在微生物体内无法大量积累,见图1。在该途径中,L-瓜氨酸合成和分解途径的调控基因*argCJBDFR*和*argGH*为两个转录单元,受到不同启动子的调控<sup>[6]</sup>。Hao N等<sup>[7]</sup>在*C. glutamicum* ATCC 13032  $\Delta argG \Delta argR$ 中过表达*argJ*基因,增强了鸟氨酸乙酰转移酶的活性,成功使L-瓜氨酸产量提高到了8.51 g/L;赵芹芹等<sup>[8]</sup>在*C. crenatum* SYPA 5-5中敲除了*argG*

基因,L-瓜氨酸的产量达到15.2 g/L;Ikeda M等<sup>[9]</sup>利用反向代谢工程方法,通过在*C. glutamicum* ATCC13032中敲除*argR*,并引入A26V和M31V突变获得L-瓜氨酸生产菌株。总体而言,大多数研究主要通过敲除分解途径编码基因或外源质粒过表达合成途径关键基因两种策略提高L-瓜氨酸的产量,然而上述方法存在容易形成营养缺陷型菌株,外源质粒表达不稳定等缺陷。

实验室前期保存的菌株*C. crenatum* H-7具有高产L-精氨酸的特性,该菌株与*C. glutamicum*具有高度同源性<sup>[9]</sup>。作者以*C. crenatum* H-7为研究对象,通过启动子替换手段,弱化L-瓜氨酸分解成L-精氨酸的关键基因*argGH*的表达,最终获得了一株能够高效积累L-瓜氨酸的重组菌株。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株和质粒** 本研究所用的菌株与载体见表1。

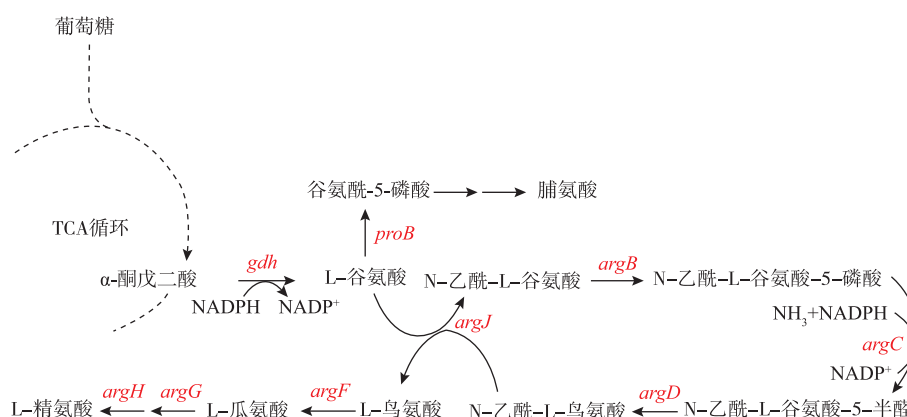


图1 谷氨酸棒杆菌中L-瓜氨酸的合成途径

Fig. 1 Metabolic pathway of L-citrulline in *Corynebacterium glutamicum*

表 1 文中涉及的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒名称	简称/相关特性	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E.coli</i> JM109	制药工程研究室保存
<i>Corynebacterium crenatum</i> H-7	原始菌株	制药工程研究室保存
<i>Corynebacterium crenatum</i> H-7-PdapAB6: <i>argGH</i>	<i>C.crenatum</i> H-7 衍生物	本研究构建
pK18mobsacB	<i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , Km <sup>r</sup>	制药工程研究室保存
pK18mobsacB-PdapAB6: <i>argGH</i>	pK18mobsacB 衍生物	本研究构建
pDXW-11	启动子探针质粒, Km <sup>r</sup> , <i>cat</i>	制药工程研究室保存
pDXW-11-P- <i>argC</i>	pDXW-11 衍生物	本研究构建
pDXW-11-P- <i>argG</i>	pDXW-11 衍生物	本研究构建
pDXW-11-P- <i>dapAB6</i>	pDXW-11 衍生物	本研究构建
pDXW-11-P- <i>leuAM2C</i>	pDXW-11 衍生物	本研究构建
pDXW-11-P- <i>leuAM3C</i>	pDXW-11 衍生物	本研究构建

1.1.2 培养基及培养条件

- 1) LB 培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5, NaCl 10;
- 2) LBG 培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5, NaCl 10,葡萄糖 5;
- 3) LBHIS 培养基(组分 g/L):酵母膏 2.5,蛋白胨 5,NaCl 5,脑心浸液 18.5,山梨醇 91;
- 4) 感受态制备(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5, NaCl 10,甘氨酸 30,吐温 80;
- 5) 种子培养基(组分 g/L):葡萄糖 30,酵母粉

10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 尿素 1.5; pH 7.0; 115 °C 灭菌 10 min;

6) 发酵培养基(组分 g/L):葡萄糖 130, 酵母粉 10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.02, 生物素 8×10<sup>-5</sup>, L-组氨酸 5×10<sup>-4</sup>, CaCO<sub>3</sub> 30; pH 7.0; 115 °C 灭菌 10 min。

大肠杆菌于 37 °C 培养, 必要时添加 50 mg/mL 的卡那霉素; 钝齿棒杆菌于 30 °C 培养, 必要时添加 50 mg/mL 的卡那霉素。

1.1.3 引物 本研究所用的引物见表 2。

表 2 文中所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列 5'-3' (下划线部分为酶切位点)
PdapAB6- <i>argG1F</i>	CGGGAATTC <u>CA</u> ACCAGCCGAGGTAAGACA
PdapAB6- <i>argG2R</i>	GAGGTGTGCTCCTTCATTTTAAGTT
PdapAB6- <i>argG3F</i>	GAAGGAGCACACCTCAGCCTTATGCCCTTCAACCC
PdapAB6- <i>argG4R</i>	CGATGCGGTTAGTCATGGGTAATAAAATCCTTTTCGTAGGTTT
PdapAB6- <i>argG5F</i>	ATGACTAACC GCATCGTCTTCTG CATACTC
PdapAB6- <i>argG6R</i>	GCTCTAGATCGGTGTATGCGTAGATGTCCTT
PargC-F	CGCAAGCTTCTTGCTCCACGACAGG
PargC-R	CGCGGATCCGCAAATTATTCATGCATAA
PargG-F	CGCAAGCTTTAGGGTGGGGCTGAAAGAAG
PargG-R	CGCGGATCCGAGGTGTGCTCCTTCATTTTAAGTT
PdapAB6-F	CGCAAGCTTCTTGCTCGTGTCAATTGTTC
PdapAB6-R	CGCGGATCCCTGTGCTCATAGAGTTCATG
PleuAM2C-F	CGCAAGCTTAAAACTCCAAAGTTCCCCCC
PleuAM2C-R	CGCGGATCCGCGAAGTCATGTGTTGATGC
PleuAM3A-F	CGCAAGCTTAAAACTCCAAAGTTCCCCCC
PleuAM3A-R	CGCGGATCCGCGAAGTCATGTGTTGATGC

## 1.2 携带启动子片段的重组质粒构建

以 *C.crenatum* H-7 基因组为模板, 分别以 PargC-F、PargC-R 和 PargG-F、PargG-R 为上下游引物扩增 *argC* 和 *argG* 上游长度约 160 bp 和 180 bp 的目标启动子片段, 启动子片段 P-dapAB6、P-leuAM2A 和 P-leuAM3A (长度均为 130 bp) 由上海生工进行合成。利用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 对启动子探针质粒 pDXW-11<sup>[10]</sup>进行酶切, 利用 T4 DNA ligase 连接启动子片段和酶切后的质粒 pDXW-11, 形成携带不同启动子的重组质粒。

## 1.3 启动子替换重组质粒 pK18mobsacB-PdapAB6:argGH 的构建

启动子替换质粒 pK18mobsacB-PdapAB6:argGH 的构建流程见图 2。首先, 以 *C.crenatum* H-7 的基因组为模板, 分别扩增 *argG* 基因上游长度约 600 bp 和 *argG* 基因开放阅读框长度约 700 bp 的基因片段, 弱启动子片段 P-dapAB6(130 bp) 通过基因合成得到, 利用重叠延伸 PCR, 获得长度约 1 430 bp 的启动子替换片段 *argG*-LPR; 然后利用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Xba*I 对目的片段和质粒 pK18mobsacB<sup>[11]</sup>进行双酶切, 形成具有粘性末端的线性片段; 最后, 利用 T4 DNA ligase 连接 *argG*-LPR 和线性化的 pK18mobsacB 质粒, 形成启动子替换重组质粒 pK18mobsacB-PdapAB6:argGH。

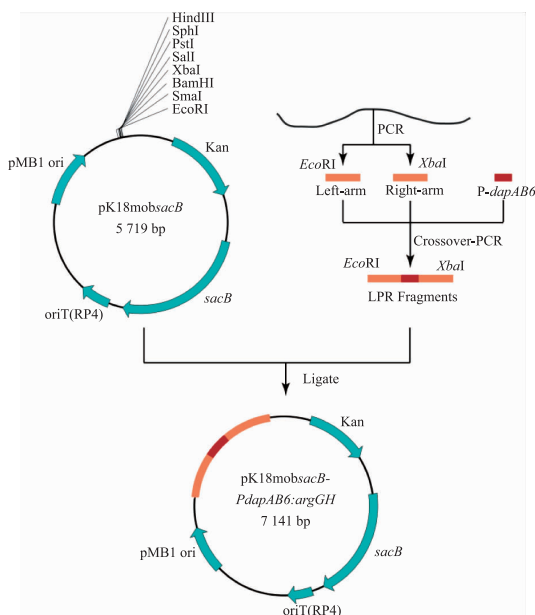


图 2 重组质粒 pK18mobsacB-PdapAB6:argGH 的构建流程  
Fig. 2 Construction of plasmid pK18mobsacB-PdapAB6:argGH

## 1.4 重组质粒的电转化

*C.crenatum* 感受态细胞的制备和电转化参考文献[12]方法。将重组质粒 pK18mobsacB-PdapAB6:argGH 电转化 *C.crenatum* 感受态细胞, 然后在含卡那霉素抗性的 LBHIS 平板和含 10% 蔗糖的 LB 平板上进行两次筛选, 通过 PCR 验证获得重组菌株 *C.crenatum* H-7-PdapAB6:argGH。

## 1.5 L-瓜氨酸发酵条件及参数测定

**1.5.1 种子培养条件** 将保存于-20℃冰箱中的甘油菌种接种于新鲜固体种子斜面, 30℃静置培养 24 h; 将活化后的菌种接入种子培养基 (装液量为 30 mL/250 mL 三角瓶), 120 r/min, 30℃往复式摇床振荡培养 10 h。

**1.5.2 摇瓶发酵培养条件** 以 6% 的接种体积分数将种子培养液接入发酵培养基 (装液量为 20 mL/250 mL 三角瓶), 120 r/min, 30℃往复式振荡培养 96 h。

**1.5.3 菌体浓度的测定** 将发酵液稀释一定倍数, 在 562 nm 处测定吸光值。

**1.5.4 葡萄糖质量浓度的测定** 将样品稀释一定倍数, 利用 SBA-40D 生物传感分析仪进行测定。

**1.5.5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量浓度的测定** 将样品稀释一定倍数, 测定方法参考 Lee H<sup>[13]</sup>。

**1.5.6 L-瓜氨酸质量浓度的测定** 将发酵液上清液稀释一定倍数, 以异硫氰酸苯酯 (PITC) 作为衍生化试剂进行氨基酸柱前衍生, 利用 HPLC 进行氨基酸质量浓度的测定。

## 1.6 启动子活性分析

将含有不同启动子片段的重组质粒转化 *E.coli* JM109, 以氯霉素乙酰转移酶 CAT 的酶活来表示启动子活性。取培养约 16 h 的含启动子探针质粒的重组菌发酵液进行离心收集细胞, 用预冷的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗涤三次, 悬浮。超声波破碎细胞, 离心, 取上清液用于氯霉素乙酰转移酶 CAT 酶活测定, 以携带空质粒的 *E.coli* JM109 为对照。采用考马斯亮蓝法测定总蛋白质质量浓度<sup>[14]</sup>, CAT 酶活测定参照文献[15]的方法。

## 1.7 实时荧光定量 PCR 实验

选择培养至对数生长中后期的原始菌株 H-7 以及重组菌株 H-7-PdapAB6:argGH 种子培养液, 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取样品中的总 RNA, 选择 A<sub>260/280</sub> 比值约为 2.0 的产物进行逆转录。按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行逆转录。

RT-PCR 实验按 PrimerScript™ RT reagent Kit (Takara)试剂盒说明书进行操作,反应条件为 95 °C 3 min, 随后 3 步反应进行 40 个循环:95 °C 30 s, 65 °C 30 s,72 °C 30 s。选用 16SrRNA 作为内参基因,所有反应设定 3 个重复。

### 1.8 酶活测定

**1.8.1 谷氨酸脱氢酶 (GDH) 酶活力测定** 谷氨酸脱氢酶酶活力单位定义为每分钟氧化 1 μmol NADPH 所需要的酶量,方法参照 Meers J L<sup>[6]</sup>。

**1.8.2 精胺琥珀酸合成酶 (ASS) 酶活力测定** 精胺琥珀酸合成酶酶活力单位定义为每分钟产生 1 μmol Pi 所需要的酶量,方法参照 Katewa S D<sup>[17]</sup>。

**1.8.3 精胺琥珀酸裂解酶酶 (ASL) 酶活力测定** 精胺琥珀酸裂解酶酶活力单位定义为每分钟产生 1 μmol L-精氨酸所需要的酶量,方法参照 Lee H<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动子活性分析

钝齿棒杆菌以谷氨酸为前体,在 *argCJBDFR* 编码酶的作用下合成 L-瓜氨酸,而 L-瓜氨酸能在 *argGH* 编码酶的催化下继续分解。整个过程中,*argCJBDFR* 和 *argGH* 分别受到不同启动子的调控。以 *C.crenatum* H-7 染色体 DNA 为模板,用表 2 中引物进行 PCR 扩增得到启动子片段 P-*argC* 和 P-*argG*。在利用谷氨酸棒杆菌生产缬氨酸<sup>[18]</sup>和腐胺<sup>[19]</sup>的报道中,成功利用弱启动子 P-*dapAB6*、P-*leuAM2C* 和 P-*leuAM3A* 对代谢流进行了调控,作者同时选用这 3 个弱启动子进行了研究。将启动子片段插入到启动子探针质粒 pDXW-11 上,构建了携带启动子片段的重组质粒 pDXW-11-P-*argC*、pDXW-11-P-*argG*、pDXW-11-P-*dapAB6*、pDXW-11-P-*leuAM2C* 和 pDXW-11-P-*leuAM3A*,将其转化到 *E. coli* JM109 中用于启动子活性分析。

通过测定氯霉素乙酰转移酶 CAT 的酶活来表征启动子活性,结果见表 3。CAT 酶活测定结果显示,L-瓜氨酸合成途径调控 *argCJBDFR* 表达的启动子 P-*argC* 活性为 25.12 U/mg,而分解途径调控 *argGH* 表达的启动子 P-*argG* 活性为 6.97 U/mg,表明仍有大量 L-瓜氨酸被分解形成 L-精氨酸。因此,我们选择活性最弱的启动子 P-*dapAB6*(1.21 U/mg) 替换 *C.crenatum* H-7 基因组上的启动子 P-*argG*,以期最大程度弱化降解途径,提高 L-瓜氨酸积累。

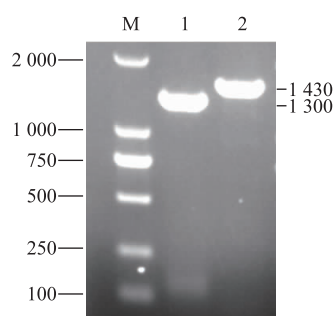
表 3 通过氯霉素乙酰转移酶(CAT) 酶活测定的启动子活性  
Table 3 Promoters activity characterized by the activity of CAT reporter

启动子	CAT 酶活±SD <sup>b</sup> /(U/mg)
pDXW-11 <sup>a</sup>	0.55±0.02
P- <i>argC</i>	25.12±0.50
P- <i>argG</i>	6.97±0.05
P- <i>dapAB6</i>	1.21±0.13
P- <i>leuAM2C</i>	7.45±0.04
P- <i>leuAM3A</i>	4.99±0.09

注:a. 以空质粒 pDXW-11 作为对照;b. 标准偏差为 3 次测量的平均值

### 2.2 启动子替换重组菌株 H-7-P*dapAB6*:*argGH* 的构建

将重组质粒 pK18mobsacB-P*dapAB6*:*argGH* 电转到 *C.crenatum* H-7 感受态细胞中,会发生两次同源重组,将重组菌涂布于含卡那霉素的 LBHIS 平板和含 10 g/dL 蔗糖的 LB 平板上进行两轮筛选。以筛选得到的阳性转化子基因组为模板,用引物 Psod-*argG1F* 和 Psod-*argG6R* 进行 PCR 验证,结果见图 3。1 号通道为以原始菌株基因组为模板 PCR 验证结果,条带大小为 1 300 bp,2 号通道为以重组菌株 H-7-P*dapAB6*:*argGH* 基因组为模板 PCR 验证结果,条带大小为 1 430 bp,这表明 P-*dapAB6* 弱启动子替换成功,*C.crenatum* H-7-P*dapAB6*:*argGH* 重组菌株构建完成。



M:marker;1:原始菌 PCR 结果;2:重组菌 PCR 结果。

图 3 启动子替换 PCR 验证结果

Fig. 3 PCR verification of promoter replacement in H-7 chromosome

### 2.3 启动子弱化对 H-7-P*dapAB6*:*argGH* 胞内关键基因转录水平和关键酶活性的影响

重组菌株 H-7-P*dapAB6*:*argGH* 和原始菌株 H-7 代谢途径中关键基因的转录水平比较见图 4。可以看出,重组菌株 H-7-P*dapAB6*:*argGH* 分解途

径基因 *argG* 和 *argH* 的转录水平分别降低了 86.23% 和 90.74%, L-瓜氨酸合成途径基因的转录水平普遍上调, 其中 *gdh* 的转录水平提高了 2.09 倍。

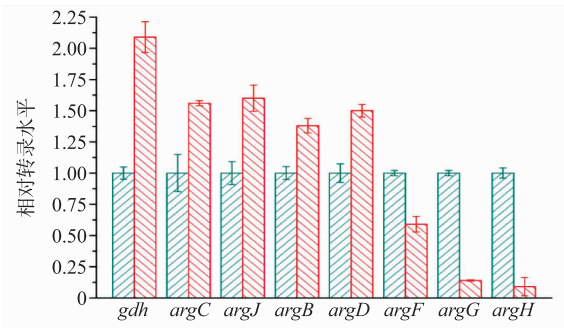


图 4 关键基因的相对转录水平分析

Fig. 4 Relative transcription level of the key genes determined by RT-PCR

对转录水平有显著差异的 3 个关键酶的酶活进行分析, 结果见表 4。相比原始菌株 H-7, 重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* 合成途径谷氨酸脱氢酶 (GDH) 的比酶活提高了 67.05%, 分解途径中精胺琥珀酸合成酶 (ASS) 和精胺琥珀酸裂解酶 (ASL) 的比酶活分别降低了 91.80% 和 55.35%。上述结果表明, 启动子替换显著弱化了 L-瓜氨酸的分解途径, 且合成途径得到一定程度的加强。

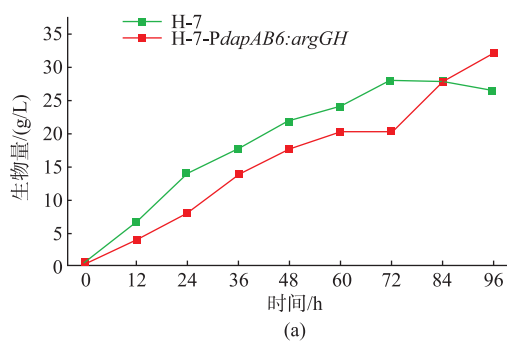
表 4 GDH, ASS, ASL 比酶活测定

Table 4 Specific activity of GDH, ASS and ASL

菌株	比酶活/(mU/mg)		
	GDH	ASS	ASL
H-7	81.34±0.85	30.49±0.54	14.02±0.11
H-7-PdapAB6: <i>argGH</i>	135.88±0.52	2.50±0.01	6.26±0.18

#### 2.4 重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* 发酵过程分析

在摇瓶水平上对重组菌株 H-7-PdapAB6:

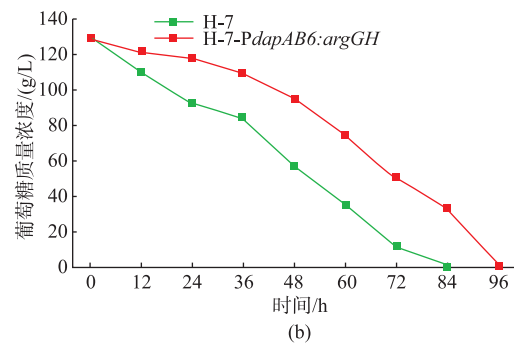


*argGH* 的 L-瓜氨酸生产性能进行评价, 结果见图 5-6。1) 96 h 发酵结束时, 重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* 的生物量达到 32.17 g/L, 比原始菌株 H-7 的生物量 (26.32 g/L) 提高了 22.22%, H-7-PdapAB6:*argGH* 的最大及平均比生长速率分别为 0.44 h<sup>-1</sup> 和 0.048 h<sup>-1</sup>, 均高于原始菌株 (分别为 0.27 h<sup>-1</sup> 和 0.037 h<sup>-1</sup>); 2) 相比原始菌株 H-7, 发酵前期 H-7-PdapAB6:*argGH* 的葡萄糖消耗速率显著降低, H-7 84 h 时葡萄糖已经耗尽, 而重组菌株直到发酵终止时葡萄糖才消耗完全。重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* 的最大及平均比底物消耗速率分别为 0.16 g/(g·h) 和 0.085 g/(g·h), 低于原始菌株 H-7 (分别为 0.36 g/(g·h) 和 0.11 g/(g·h)); 3) 重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* 的 L-瓜氨酸的产量可以达到 33.85 g/L, 相比原始菌株 H-7 (6.90 g/L) 提高了 4.91 倍, L-瓜氨酸的糖酸转化率 (0.25 g/g) 和生产强度 (0.34 g/(L·h)) 分别提高了 5.00 倍和 4.86 倍, 最大及平均比产物得率也得到了提高; 4) 相比原始菌株 H-7 主要积累 L-精氨酸, 重组菌株 H-7-PdapAB6:*argGH* L-精氨酸只有少量积累。

### 3 结语

启动子在基因表达过程中具有重要作用, 决定了基因表达的时间强度, 是必需的顺式调控元件<sup>[20]</sup>, 通过启动子调控和改变基因表达水平, 已成功应用于赖氨酸<sup>[21]</sup>、缬氨酸<sup>[18]</sup>和精氨酸<sup>[22]</sup>等生产菌株的改造中, 该方法有效地改变了代谢流分布, 实现了目标产物的高产。然而, 此方法在瓜氨酸的研究中还未见相关报道。

作者通过分析 L-瓜氨酸分解途径中调控 *argGH* 表达的启动子 P-*argG*, 发现催化瓜氨酸分解为精氨酸的 P-*argG* 具有较强的活性, 造成瓜氨酸



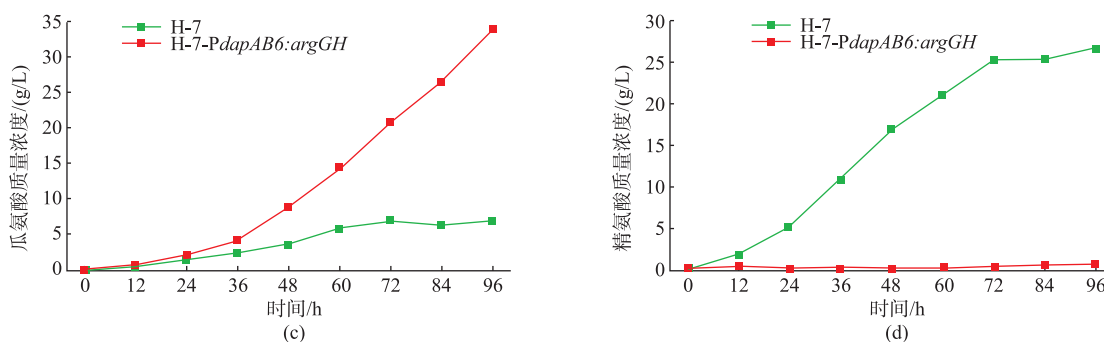


图 5 原始菌株 H-7 和重组菌株 H-7-PdapAB6:argGH 的发酵过程曲线

Fig. 5 Time course of L-citrulline fermentation by the parent strain H-7 and the engineered strain H-7-PdapAB6:argGH

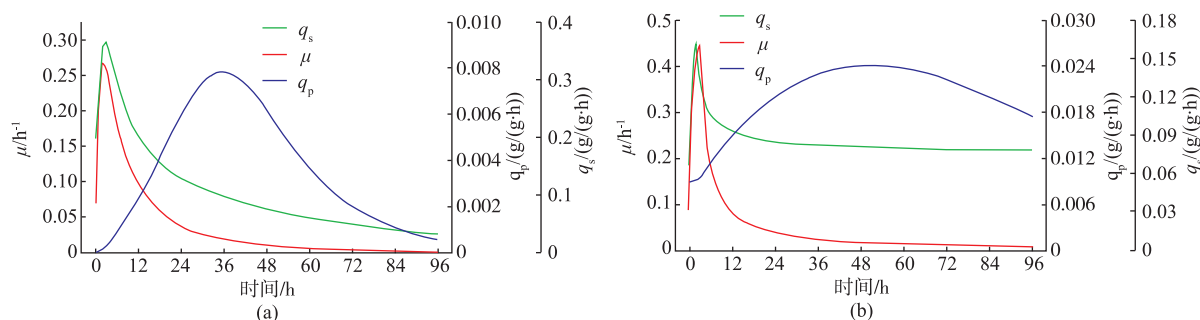


图 6 原始菌株 H-7 和重组菌株 H-7-PdapAB6:argGH 的发酵动力学参数图

Fig. 6 Fermentation kinetics of the parent strain H-7 and the engineered strain H-7-PdapAB6:argGH

无法大量积累。因此,作者采用启动子替换手段,利用启动子 P-dapAB6<sup>[19]</sup>调控 *argGH* 的表达,弱化瓜氨酸的分解途径,成功构建了一株 L-瓜氨酸高产菌株 *C.crenatum* H-7-PdapAB6:argGH。重组菌株 H-7-PdapAB6:argGH L-瓜氨酸合成途径关键基因和关键酶的表达水平分析结果表明,L-瓜氨酸分解代谢途径基因 *argGH* 表达水平降低,ASS 和 ASL 酶活大幅度下降,L-瓜氨酸的分解代谢流明显弱化,但调控  $\alpha$ -酮戊二酸进入 L-瓜氨酸合成途径的基因

*gdh* 表达水平和 GDH 酶活水平显著提高,因此提高了 TCA 循环到 L-瓜氨酸合成途径的代谢流量。发酵结果表明,重组菌株 H-7-PdapAB6:argGH L-瓜氨酸的产量,糖酸转化率和生产强度分别达到 33.85 g/L、0.25 g/g 和 0.34 g/(L·h),比原始菌株 H-7 提高了 4.91 倍、5.00 倍和 4.86 倍。该菌株与 VF Wendisch 等<sup>[23]</sup>报道相比,发酵过程中无需外源添加抗生素和精氨酸,且 L-瓜氨酸的生产性能得到大幅提升,具有良好的工业应用前景。

### 参考文献:

- [1] KWON N S, NATHAN C F, GILKER C, et al. L-citrulline production from l-arginine by macrophage nitricoxide synthase[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1990, 265(23): 13442-13445.
- [2] BAHRI S, ZERROUK N, AUSSEL C, et al. Citrulline: from metabolism to therapeutic use[J]. **Nutrition**, 2013, 29(3): 479-484.
- [3] DING Wei, LI Aiping, ZHANG Zhenglin, et al. Synthesis of L-citrulline and L-homocitrulline[J]. **Chemical Industry Times**, 2006, 20(2): 16-17. (in Chinese)
- [4] ZHENG Pu, NI Ye, ZHANG Wen, et al. Continuous production of L-citrulline by immobilized *Pseudomonas* sp. cells in packed bed reactor[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 33-38. (in Chinese)
- [5] IKEDA M, MITSUHASHI S, TANAKA K, et al. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* l-arginine and l-citrulline producer[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, 75(6): 1635-1641.

- [ 6 ] YIM S, KIM S, PARK M, et al. Analysis of gene expression in arginine biosynthetic gene cluster of *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Genes & Genomics**, 2008, 30(3): 261-270.
- [ 7 ] HAO N, MU J, HU N, et al. Improvement of l-citrulline production in *Corynebacterium glutamicum* by ornithine acetyltransferase [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2015, 42(2): 307-313.
- [ 8 ] ZHAO Qinqin, LUO Yuchang, DOU Wenfang, et al. Engineering *Corynebacterium crenatum* for construction of L-Ornithine and L-citrulline producers[J]. **Microbiology China**, 2014, 41(10): 1941-1947. (in Chinese)
- [ 9 ] ZHAO Q, LUO Y, DOU W, et al. Controlling the transcription levels of *argGH* redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2015, 43(1): 55-66.
- [10] XU D, TAN Y, LI Y, et al. Construction of a novel promoter-probe vector and its application for screening strong promoter for *Brevibacterium flavum* metabolic engineering[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2010, 27(4): 961-968.
- [11] SCHAFFER A, TAUCH A, JAGER W, et al. 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*[J]. **Gene**, 1994, 145(1): 69-73.
- [12] van der Rest M E, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999, 52(4): 541-545.
- [13] LEE H, CHIOU S, CHANG G. Biochemical characterization and kinetic analysis of duck delta-crystallin with endogenous argininosuccinate lyase activity[J]. **Biochemical Journal**, 1992, 283: 597-603.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [15] SHAW W V. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria[J]. **Methods in Enzymology**, 1975, 43: 737-755.
- [16] MEERS J L, TEMPEST D W, BROWN C M. Glutamine (amide) 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (nadh) an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria[J]. **Journal of General Microbiology**, 1970, 64(2): 187-194.
- [17] KATEWA S D, KATYARE S S. A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays[J]. **Analytical Biochemistry**, 2003, 323(2): 180-187.
- [18] HOLATKO J, ELISAKOVA V, PROUZA M, et al. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation[J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 139(3): 203-210.
- [19] SCHNEIDER J, EBERHARDT D, WENDISCH V F. Improving putrescine production by *Corynebacterium glutamicum* by fine-tuning ornithine transcarbamoylase activity using a plasmid addiction system[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 95(1): 169-178.
- [20] EGGELING L, BOTT M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. genome, plasmids, and gene expression[M]. **Boca Raton, USA: CRC Press**, 2005.
- [21] BECKER J, ZELDER O, HAFNER S, et al. From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production[J]. **Metabolic Engineering**, 2011, 13(2): 159-168.
- [22] PARK S H, KIM H U, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production [J]. **Nature Communications**, 2014, 5: 4618-4629.
- [23] EBERHARDT D, JENSEN J V, WENDISCH V F. L-citrulline production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources[J]. **AMB Express**, 2014, 4: 85.