

代谢工程改造大肠杆菌高效合成 L-瓜氨酸

胥琳峰^{1,2}, 于文文^{1,4}, 朱学文^{1,2}, 张权威^{1,2}, 武耀康^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{1,2},
吕雪芹^{1,2,3}, 陈坚^{1,2*}, 刘龙^{1,2*}

1 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

3 宜兴食品与生物技术研究院, 江苏 宜兴 214200

4 江南大学 中原食品实验室, 江苏 无锡 214122

胥琳峰, 于文文, 朱学文, 张权威, 武耀康, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 陈坚, 刘龙. 代谢工程改造大肠杆菌高效合成 L-瓜氨酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 242-255.

XU Linfeng, YU Wenwen, ZHU Xuewen, ZHANG Quanwei, WU Yaokang, LI Jianghua, DU Guocheng, LV Xueqin, CHEN Jian, LIU Long. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient biosynthesis of L-citrulline[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 242-255.

摘要: L-瓜氨酸是一种非蛋白质氨基酸, 在人体健康方面发挥着重要作用, 具有很大的市场需求。尽管微生物细胞工厂已被广泛用于生物合成, 但在 L-瓜氨酸生物合成方面仍存在着遗传不稳定和效率低等挑战。本研究以大肠杆菌 BL21(DE3)为出发菌株构建了一株高效、无质粒、无需诱导的 L-瓜氨酸生产菌株。首先阻断 L-瓜氨酸降解并解除反馈抑制, 构建出 L-瓜氨酸合成底盘菌株, 其产量达到 0.43 g/L。随后采用推拉抑制策略增强了 L-瓜氨酸生物合成, 使产量提高到 6.0 g/L。接着, 强化了 NADPH 合成和 L-瓜氨酸转运系统以提高合成效率, 最终 L-瓜氨酸产量达到 11.6 g/L。最后, 在 3 L 发酵罐中进行分批补料发酵, L-瓜氨酸产量达到 44.9 g/L。本研究为 L-瓜氨酸的工业化生产奠定了基础, 为其他氨基酸代谢网络的改造提供了思路。

关键词: L-瓜氨酸; 大肠杆菌; 代谢工程; L-脯氨酸; 反馈抑制

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFA0914500)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFA0914500).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Jian, jchen@jiangnan.edu.cn; LIU Long, longliu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-06; Accepted: 2024-04-22; Published online: 2024-04-24

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient biosynthesis of L-citrulline

XU Linfeng^{1,2}, YU Wenwen^{1,4}, ZHU Xuewen^{1,2}, ZHANG Quanwei^{1,2}, WU Yaokang^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, LV Xueqin^{1,2,3}, CHEN Jian^{1,2*}, LIU Long^{1,2*}

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Yixing Institute of Food and Biotechnology, Yixing 214200, Jiangsu, China

4 Food Laboratory of Zhongyuan, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-citrulline is a nonprotein amino acid that plays an important role in human health and has great market demand. Although microbial cell factories have been widely used for biosynthesis, there are still challenges such as genetic instability and low efficiency in the biosynthesis of L-citrulline. In this study, an efficient, plasmid-free, non-inducible L-citrulline-producing strain of *Escherichia coli* BL21(DE3) was engineered by combined strategies. Firstly, a chassis strain capable of synthesizing L-citrulline was constructed by block of L-citrulline degradation and removal of feedback inhibition, with the L-citrulline titer of 0.43 g/L. Secondly, a push-pull-restrain strategy was employed to enhance the L-citrulline biosynthesis, which realized the L-citrulline titer of 6.0 g/L. Thirdly, the NADPH synthesis and L-citrulline transport were strengthened to promote the synthesis efficiency, which achieved the L-citrulline titer of 11.6 g/L. Finally, fed-batch fermentation was performed with the engineered strain in a 3 L fermenter, in which the L-citrulline titer reached 44.9 g/L. This study lays the foundation for the industrial production of L-citrulline and provides insights for the modification of other amino acid metabolic networks.

Keywords: L-citrulline; *Escherichia coli*; metabolic engineering; L-proline; feedback inhibition

L-瓜氨酸因其独特的化学结构拥有一系列生理功能,包括改善男性性功能、刺激肌肉蛋白质合成、舒张血管^[1]和清除自由基^[2-3]等,被广泛应用于医疗健康领域。L-瓜氨酸可以直接从葫芦科植物比如西瓜中提取^[2],然而天然原料中提取的 L-瓜氨酸含量普遍较低,限制了其大规模生产。目前,L-瓜氨酸主要通过酶催化法制备,以 L-精氨酸为底物,使用精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI)催化生成 L-瓜氨酸^[4-5]。然而,由于 ADI 昂贵的纯化成本不利于大量生产,所以构建微生物细胞工厂,并利用廉价碳源生产 L-瓜氨酸成为了更经济的选择。

L-瓜氨酸的生物合成以 L-谷氨酸为底物,

经过 6 步酶促反应合成^[6]。在微生物中,L-瓜氨酸的生物合成有 2 种途径,根据第 5 步反应中 N-乙酰鸟氨酸脱下的乙酰基能否被回收,可分为线性途径和循环途径^[7-8]。此外,NADPH 参与合成了 L-瓜氨酸合成途径中的多种中间代谢产物,是 L-瓜氨酸生物合成的限制因素^[9]。此外,细胞内代谢网络复杂,多条竞争途径通过代谢节点分散了代谢通量,减少了 L-瓜氨酸的合成^[10]。

阻断 L-瓜氨酸降解的常见策略是失活精氨酸琥珀酸合酶(由 *argG* 基因编码)^[11],以阻断 L-瓜氨酸转化为 L-精氨酸。Eberhardt 等^[12]通过失活精氨酸转录调节因子 ArgR,解除了精氨酸对合成途径的反馈抑制。Hao 等^[8]使用质粒在谷氨

酸棒杆菌中过表达编码鸟氨酸乙酰转移酶的基因 *argJ*, 获得了 8.51 g/L 的 L-瓜氨酸产量。Jiang 等^[13]将来自谷氨酸棒杆菌的 L-瓜氨酸操纵子基因整合到大肠杆菌中, 重构了 L-瓜氨酸生物合成途径, 减少了副产物乙酸的产生。

在之前的研究中, 大都通过强化 L-瓜氨酸合成途径以提高产量, 然而关于竞争途径的报道较少^[14-15]。L-脯氨酸合成会消耗前体 L-谷氨酸, 腐胺生物合成会消耗前体 L-鸟氨酸^[16], 这些竞争途径通常被认为是减少 L-瓜氨酸产量的关键。此外, 合适的宿主也是 L-瓜氨酸合成的重要影响因素之一。大肠杆菌作为模式菌株, 具有遗传背景清晰、基因编辑技术成熟等优点, 已被广泛应用于氨基酸的生物合成。相比于 K-12 系列的 MG1655 大肠杆菌菌株, BL21(DE3) 菌株的三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环的通量更大, 积累的乙酸更少, 而且

BL21(DE3) 的细胞无鞭毛, 减少了不必要的能量损耗^[17]。本研究采用组合策略在大肠杆菌中高效稳定地合成了 L-瓜氨酸 (图 1)。首先构建了生产 L-瓜氨酸的底盘菌株, 并且强化了 L-瓜氨酸的线性合成途径。然后抑制了 L-脯氨酸和腐胺的合成, 以提高 L-瓜氨酸产量。此外, NADPH 合成和 L-瓜氨酸转运模块也得到了强化。本研究中构建的 L-瓜氨酸生产菌株 CTL18 在 3 L 发酵罐中发酵 48 h, 产量达到 44.9 g/L。本研究使用组合策略实现了高价值中间代谢产物 L-瓜氨酸的生物合成并提供了一种经济的发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养条件和试剂

本研究中使用的菌株见表 1。以野生型大肠杆菌 BL21(DE3) 作为出发菌株, 使用大肠杆菌 DH5 α 用于质粒构建。除非另有说明,

表 1 本研究中构建的菌株

Table 1 Strains constructed in this study

Strains	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Host for cloning	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	General cloning host	Lab store
CTL1	<i>E. coli</i> BL21(DE3), $\Delta argG$	This study
CTL2	CTL1, $\Delta argR$	This study
CTL3	CTL2, <i>ykgH::P_{tac}-argA-argD-argI (eco)</i>	This study
CTL4	CTL3, <i>dadX::P_{tac}-argC-argB-argE (eco)</i>	This study
CTL5	CTL2, <i>ykgH::P_{tac}-argC-argJ (cgl)</i>	This study
CTL6	CTL5, <i>dadX::P_{tac}-argB-argD-argF (cgl)</i>	This study
CTL7	CTL6, <i>arpB::P_{tac}-gltA</i>	This study
CTL8	CTL7, <i>caiB::P_{tac}-icD</i>	This study
CTL9	CTL8, <i>cstA::gdhA</i>	This study
CTL10	CTL9, $\Delta proB$	This study
CTL11	CTL9, $\Delta putP$	This study
CTL12	CTL11, $\Delta speC$	This study
CTL13	CTL11, $\Delta speF$	This study
CTL14	CTL11, $\Delta speE$	This study
CTL15	CTL14, $\Delta sthA$	This study
CTL16	CTL15, <i>yjiP::P_{pntAB}-pntAB</i>	This study
CTL17	CTL15, <i>yjiP::P_{pntAB}-ppnK (bsu)</i>	This study
CTL18	CTL16, <i>yadL::P_{tac}-lysE (cgl)</i>	This study
CTL19	CTL16, <i>yadL::P_{tac}-argO (eco)</i>	This study

所有菌株均使用 LB 培养基(10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母粉和 10 g/L NaCl)在 37 °C、220 r/min 条件下培养。此外,还使用 50 μg/mL 卡那霉素和 100 μg/mL 壮观霉素来筛选大肠杆菌。实验中使用的所有化学品均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。用于菌落聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的 Max DNA 聚合酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。DNA 凝胶纯化试剂盒、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自赛默飞世尔科技公司。DNA 寡核苷酸的无缝克隆试剂盒、质粒提取试剂盒和退火缓冲液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。用于菌落聚合酶链式反应(PCR)的 *Taq* DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 质粒和引物

本研究中使用的引物和质粒已提交到国家微生物科学数据中心编号为 NMDCX0000270)。引物和基因均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。本研究用 T4 DNA 连接酶和无缝克隆试剂盒构建质粒,所用的基因编辑系统含有 pEcCpf1 和 pcrEG 关键质粒,均由本实验室提供。

1.3 CRISPR-Cpf1 基因编辑方法

对待编辑的大肠杆菌细胞中转入 pEcCpf1 质粒^[18],然后制备其化学感受态细胞,制备过程中加入卡那霉素以维持质粒的稳定和 10 mmol/L 阿拉伯糖进行诱导。用 pcrEG 质粒构建正确的 crRNA 表达载体,然后用同源臂取代 pcrEG 质粒中的 *sfgfp* 基因,构建含有同源臂的 crRNA 表达载体,并将其导入含有 pEcCpf1 的化学感受态细胞。最后涂布在含有壮观霉素和卡那霉素的双抗性平板上,于 37 °C 培养箱内培养。在同源臂的外侧设计引物对菌落进行 PCR,并测序验证。挑取测序正确的菌落接种到 2 mL 的 LB 培养基中,添加卡那霉素和终浓度为 10 mmol/L 的鼠李糖,在 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养

以消除 pcrEG 质粒。将消除 pcrEG 质粒的单菌落接种于 2 mL 的 LB 培养基中,并加入终浓度为 5 g/L 的葡萄糖,在 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养,以消除 pEcCpf1 质粒。

1.4 发酵方法

摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 酵母粉 2.0, (NH₄)₂SO₄ 16.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.6, MnSO₄·5H₂O 5.0, FeSO₄·7H₂O 5.0, CaCO₃ 30.0。按照 5%接种量,将种子液接种于装有 15 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中,220 r/min、37 °C 发酵 48 h。

分批补料发酵培养基组成为: 10 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母粉, 3 g/L MgSO₄, 2 g/L 柠檬酸, 1 g/L L-精氨酸, 20 mg/L MnSO₄, 20 mg/L FeSO₄, 2 mg/L V_H, 2 mg/L 维生素 B₁, 4 mg/L CoCl₂, 4 mg/L ZnSO₄。使用 LB 培养基培养种子液, 220 r/min、37 °C 培养 12 h 后,按 15%的接种量接种于 3 L 发酵罐中,发酵培养基的底糖为 10 g/L,底糖耗尽后开始流加葡萄糖溶液(750 g/L),将发酵液中的葡萄糖浓度维持在 0.4 g/L 以下。通过流加氨水使 pH 保持在 7.0±0.2,温度 37 °C,通过调节曝气量和搅拌速度使溶解氧(dissolved oxygen, DO)保持在 15%–30%。

1.5 检测方法

发酵结束后,将 1.0 mL 发酵液加入 1.5 mL 试管中,12 000×g 离心 10 min。将上清液转移到 2 mL 的液相瓶[生工生物工程(上海)股份有限公司]中。使用高效液相色谱仪(Agilent 公司)测定葡萄糖浓度和 L-瓜氨酸浓度。采用 HPX-87H 色谱柱(Bio-Rad 公司)和折射率检测器测定葡萄糖浓度, Hypersil ODSC-18 色谱柱(ThermoFisher Scientific 公司)和紫外指数检测器测定 L-瓜氨酸浓度。以 5 mmol/L 硫酸水溶液为流动相,流速 0.6 mL/min,40 °C 下测定葡萄糖浓度。测定 L-瓜氨酸浓度的条件和程序已提交到国家微生物科学数据中心编号为(NMDCX0000270)。

使用 LC-MS (Agilent 公司) 检测腐胺, 流动相为 0.1% 甲酸(A) 和乙腈(B), 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 进样量 1 μL, 梯度洗脱程序: 0–2 min, 90%–80% A; 2–5 min, 80%–75% A; 5–6 min, 75%–40% A; 6–9 min, 40% A; 9–12 min, 40%–90% A。流速 0.3 mL/min, 40 °C。

2 结果与分析

2.1 L-瓜氨酸合成底盘菌株的构建

在大肠杆菌中, L-瓜氨酸在精氨酸琥珀酸合成酶(由 *argG* 基因编码)的催化下生成 L-精氨酸琥珀酸^[11], 然后参与 L-精氨酸的合成(图 1), 导致 L-瓜氨酸无法积累。野生型大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组上的 *argG* 基因被删除^[19], 以构建 CTL1 菌株。发酵结果显示(图 2A), 大肠杆菌 BL21(DE3) 野生型菌株的发酵液中无 L-瓜氨酸检出, 而 CTL1 的发酵液中 L-瓜氨酸积累量为 0.32 g/L。CTL1 菌株是 L-精氨酸营养缺陷型菌株, 由于摇瓶发酵培养基的营养丰富且发酵规模小, 不需要额外添加 L-精氨酸, 相比之下发酵罐培养基的营养消耗过快, 需要额外添加 L-精氨酸, 以维持细胞的正常生长。然而, L-精氨酸会对合成途径造成反馈抑制^[12,20]。因此, 为了评估 L-精氨酸添加量对 L-瓜氨酸合成的抑制作用, 在不同的 L-精氨酸添加浓度下(0.0、0.1、0.2、0.3、0.5、1.0 g/L)用 CTL1 菌株进行发酵。结果显示(图 2A), L-瓜氨酸产量随着 L-精氨酸添加量的增加而下降, 当 L-精氨酸浓度达到 0.5 g/L 时, L-瓜氨酸产量为 0.12 g/L, 比未添加 L-精氨酸时降低了 62.5%。L-精氨酸过高的添加量会抑制 L-瓜氨酸合成, 因此, 消除 L-精氨酸造成的反馈抑制是实现高效生产的关键因素之一。

在大肠杆菌中, L-瓜氨酸生物合成途径相关基因的表达被精氨酸阻遏蛋白 ArgR 抑制(由 *argR* 基因编码, 图 2B)^[21–23]。删除 CTL1 菌株

基因组上的 *argR* 基因, 构建出 CTL2 菌株, 对 CTL2 进行摇瓶发酵以评估其对 L-精氨酸的敏感性。发酵结果显示(图 2C), CTL2 受到的抑制明显减轻, 在 L-精氨酸添加量为 0.5 g/L 时, L-瓜氨酸产量仅降低 9.3%(从 0.43 g/L 降至 0.39 g/L)。此外, 在无 L-精氨酸添加时, CTL2 的 L-瓜氨酸产量比 CTL1 高 37.5%, 这是因为培养基成分酵母粉中含有一定量的 L-精氨酸。这些结果表明, CTL2 可以作为 L-瓜氨酸生物合成的底盘菌株进行进一步的改造^[24]。

2.2 L-瓜氨酸合成路径的优化

在大肠杆菌中, L-瓜氨酸的线性生物合成途径由 6 个基因控制: *argA*、*argB*、*argC*、*argD*、*argE* 和 *argI* (图 3A)。为了强化 L-瓜氨酸的合成, *argC-argB-argE* 簇基因在强启动子 P_{tac} 控制下被整合到 CTL2 的假基因 *ykgH* 基因座上, 构建出 CTL3 菌株, 然后 *argA-argD-argI* 基因簇在强启动子 P_{tac} 控制下被整合到 CTL3 的假基因 *dadX* 基因座上, 构建出 CTL4 菌株。发酵结果显示, CTL3 和 CTL4 中的 L-瓜氨酸产量分别达到 0.7 g/L 和 1.2 g/L (图 3B)。L-瓜氨酸的生物合成途径有 2 条: 以大肠杆菌为代表的线性途径和以谷氨酸棒状菌为代表的循环途径^[13,25]。来自谷氨酸棒状菌的循环途径由 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD* 和 *argF* 5 个基因控制^[7]。L-瓜氨酸合成的第 5 步酶促反应中, N-乙酰鸟氨酸转化为 L-鸟氨酸时会脱去乙酰基, 在线性途径中该乙酰基转化为乙酸, 而在循环途径中该乙酰基能被回收并参与到第 1 步酶促反应中^[25]。来自谷氨酸棒状菌的 *argC-argJ* 基因簇在强启动子 P_{tac} 控制下被整合到 CTL2 的假基因 *ykgH* 基因座上, 构建出 CTL5 菌株, 然后 *argB-argD-argF* 基因簇在强启动子 P_{tac} 控制下被整合到 CTL5 的假基因 *dadX* 基因座上, 构建出 CTL6 菌株。引入循环途径的 CTL5 和 CTL6 菌

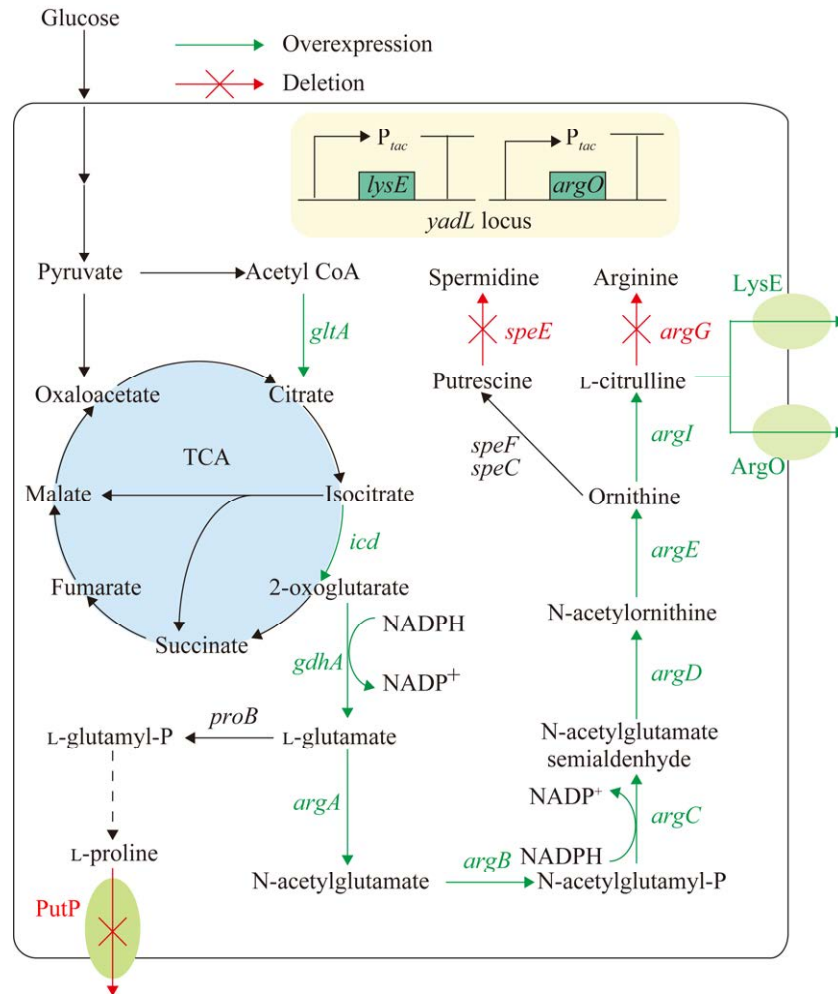


图1 L-瓜氨酸代谢途径及关键代谢工程策略 绿色箭头表示相关基因的过度表达和整合。红色箭头和“×”表示与缺失相关的基因或蛋白。*gltA*: 柠檬酸合成酶; *icd*: 异柠檬酸脱氢酶; *gdhA*: 谷氨酸脱氢酶; *argA*: 乙酰谷氨酸合成酶; *argB*: 乙酰谷氨酸激酶; *argC*: 乙酰-谷氨酰磷酸还原酶; *argD*: 乙酰鸟氨酸氨基转移酶; *argE*: 乙酰鸟氨酸脱乙酰酶; *argI*: 鸟氨酸氨甲酰转移酶; *argG*: 精氨酸琥珀酸合成酶; *ArgO*: 精氨酸转运蛋白(大肠杆菌); *LysE*: 精氨酸转运体(谷氨酸棒状菌); *proB*: 谷氨酸激酶; *PutP*: 脯氨酸转运蛋白; *speC*: 鸟氨酸脱羧酶; *speF*: 鸟氨酸脱羧酶同工酶; *speE*: 亚精胺合酶; *pntAB*: 嘧啶核苷酸转氢酶包括膜结合性转氢酶; *sthA*: 吡啶核苷酸转氢酶。

Figure 1 L-citrulline metabolism pathways and key metabolic engineering strategies in BL21(DE3). Green arrows represent overexpression and integration of associated genes. Red arrows and “X” indicate genes associated with deletion. *gltA*: Citrate synthase; *icd*: Isocitrate dehydrogenase; *gdhA*: Glutamate dehydrogenase; *argA*: Amino acid N-acetyltransferase; *argB*: Acetylglutamate kinase; *argC*: N-acetyl- γ -glutamylphosphate reductase; *argD*: Acetylornithine aminotransferase; *argE*: Acetylornithine deacetylase; *argI*: Ornithine carbamoyltransferase; *argG*: Argininosuccinate synthase; *ArgO*: Arginine transporter (*eco*); *LysE*: Arginine transporter (*cgl*); *proB*: Glutamate kinase; *putP*: Proline sodium symporter; *speC*: Ornithine decarboxylase; *speF*: Ornithine decarboxylase; *speE*: Spermidine synthase; *pntAB*: Pyridine nucleotide transhydrogenase; *sthA*: Pyridine nucleotide transhydrogenase.

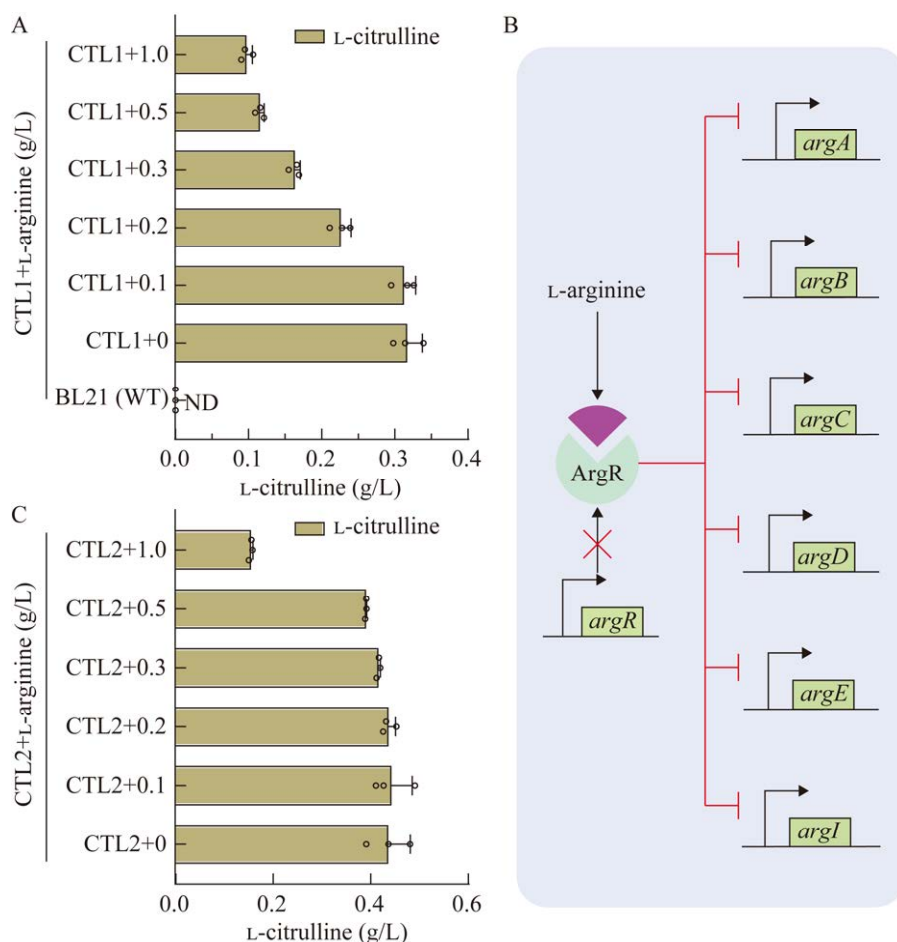


图 2 敲除 *argG* 基因和 *argR* 基因对 L-瓜氨酸积累的影响 A: 在不同 L-精氨酸添加浓度(0–1.0 g/L)下, 重组菌株 CTL1 合成 L-瓜氨酸。B: ArgR 抑制合成途径基因示意图。C: 在不同 L-精氨酸添加浓度(0–1.0 g/L)下, 重组菌株 CTL2 合成 L-瓜氨酸。红色“⊥”代表相关基因的抑制。ND 代表未检测出 L-瓜氨酸。

Figure 2 Impact of *argG* and *argR* genes knockout on L-citrulline accumulation. A: In the presence of varying levels of L-arginine (0–1.0 g/L), recombinant strains produce L-citrulline. B: Schematic of ArgR-inhibiting synthetic pathway genes. C: Recombinant strain CTL2 produces L-citrulline in the presence of varying levels of L-arginine (0–1.0 g/L). The red “⊥” represents the repression of the genes involved. ND: Not detected.

株的 L-瓜氨酸产量分别达到 0.6 g/L 和 0.7 g/L (图 3B)。以上结果表明, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中 L-瓜氨酸的线性生物合成途径优于循环途径, 因此选择 CTL4 菌株用于后续改造。

L-谷氨酸是 L-瓜氨酸的前体, 在 α -酮戊二酸节点转移 TCA 循环中的部分碳通量产生(图 3C)^[26], 较低的 L-谷氨酸水平会阻碍 L-瓜氨酸的合成^[23]。柠檬酸合成酶(由 *gltA* 基因编码)催化乙酰辅酶 A 转化为柠檬酸, 该反应是 TCA

循环中的限速步骤^[27], 过表达 *gltA* 基因是增强 TCA 循环的一种常用策略。将 *gltA* 基因用强启动子 P_{tac} 控制, 整合到 CTL4 的假基因 *arpB* 基因座上, 构建出 CTL7 菌株。在 TCA 循环中, 异柠檬酸被异柠檬酸脱氢酶催化生成 α -酮戊二酸; 然而, 在乙醛酸循环中异柠檬酸也会被异柠檬酸裂解酶催化生成琥珀酸和乙醛酸^[28], 这一反应会减少流向 α -酮戊二酸的通量。阻断乙醛酸循环会影响细胞的正常生理活动, 因此, 为

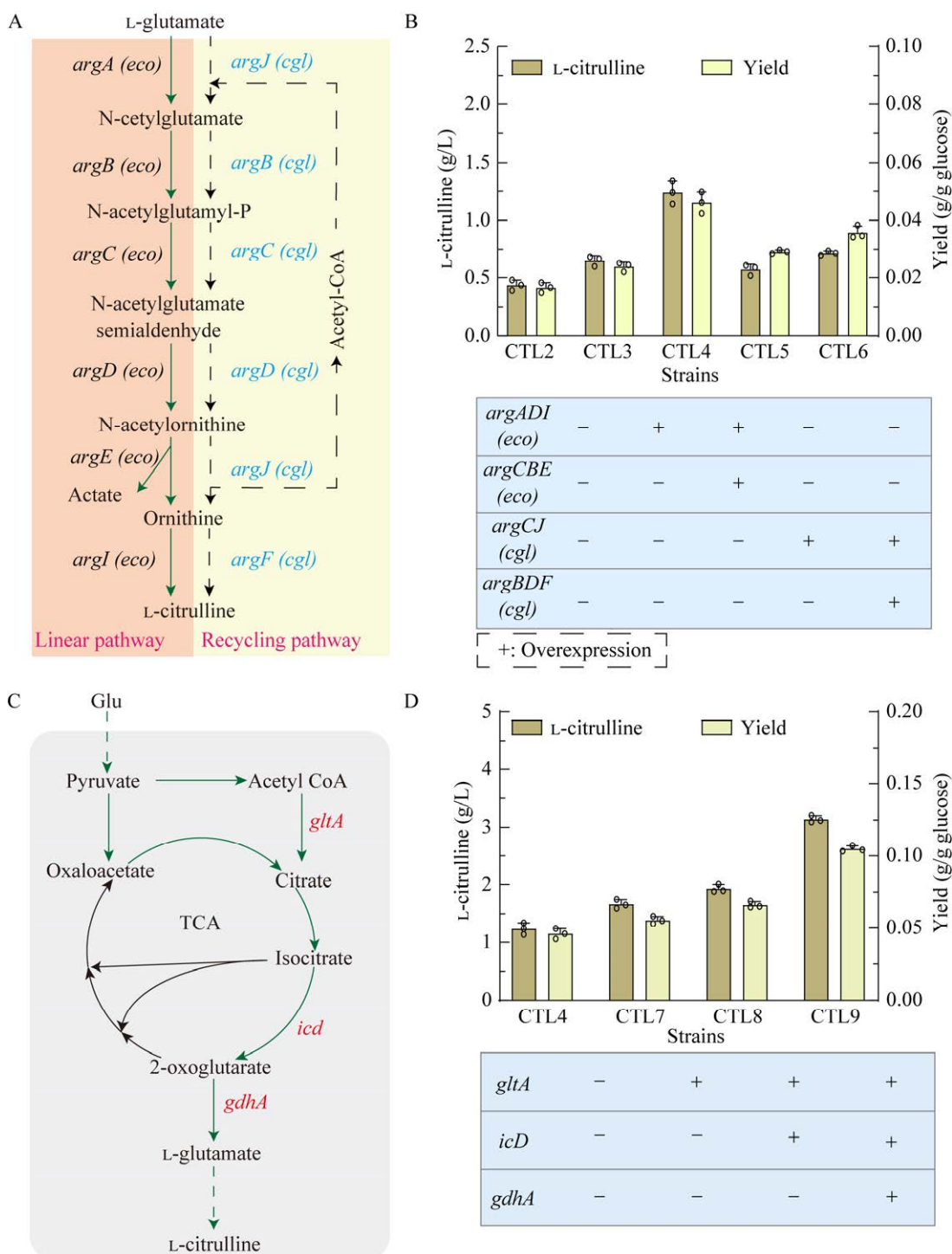


图 3 L-瓜氨酸生物合成途径优化 A: L-瓜氨酸线性途径和循环途径示意图; B: 线性途径和循环途径对 L-瓜氨酸生产的影响; C: TCA 循环示意图; D: 强化前体 L-谷氨酸合成对 L-瓜氨酸生产的影响。“-”表示未对该基因进行过表达。“+”表示对该基因进行过表达。

Figure 3 Optimization of the L-citrulline biosynthetic pathway. A: Schematic of the linear and recycling pathways; B: Impact of linear pathway versus recycling pathway on L-citrulline production; C: Schematic of the TCA cycle; D: Effect of enhanced precursor L-glutamate synthesis on L-citrulline production. “-” signifies that the gene has not been overexpressed. “+” signifies that the gene has been overexpressed.

了强化 α -酮戊二酸的合成,将 *icD* 基因用强启动子 P_{tac} 控制,整合到 CTL7 的假基因 *caiB* 基因座上,构建出 CTL8 菌株。 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶(由 *gdhA* 基因编码)催化下生成 L-谷氨酸^[13-14]。在 CTL8 中,*gdhA* 基因被强启动子 P_{tac} 控制,整合到假基因 *cstA* 基因座上,构建出 CTL9 菌株。发酵结果显示(图 3D),CTL7、CTL8 和 CTL9 的 L-瓜氨酸产量分别为 1.7、1.9 和 3.1 g/L,分别提高了 34.6%、15.9%和 62.3%。上述结果表明,提高胞内 L-谷氨酸的水平能有效促进 L-瓜氨酸合成。由于 TCA 循环对细胞的重要性,因此并未阻断 TCA 中的竞争途径,而是过表达 *gltA*、*icD* 和 *gdhA* 基因以强化 L-瓜氨酸合成。

L-脯氨酸是 L-瓜氨酸的竞争产物,二者都由 L-谷氨酸转化产生(图 4A)。 γ -谷氨酸激酶(由 *proB* 基因编码)是 L-脯氨酸生物合成途径中催化第一步反应的酶^[29]。在 CTL9 菌株中,敲除 *proB* 基因,构建出 CTL10 菌株。然而 CTL10 的 L-瓜氨酸产量下降了 45.0%,仅为 1.7 g/L(图 4B)。上述结果推测是由 CTL10 无法合成自身所需的 L-脯氨酸造成。在无 L-脯氨酸额外添加的培养基中 CTL10 的生长受到抑制,削弱了 L-瓜氨酸的合成。然而,在培养基中额外添加 L-脯氨酸会增加生产成本,不适合工业生产。因此,只能削弱而不是阻断 L-脯氨酸合成。抑制 L-脯氨酸合成的一个常见策略是删除由 *putP* 基因编码的 L-脯氨酸转运体,使 L-脯氨酸在细胞中积累,对 L-脯氨酸合成途径造成反馈抑制。删除 CTL9 菌株中的 *putP* 基因,构建出 CTL11 菌株。发酵结果显示,CTL11 的 L-瓜氨酸产量比 CTL9 菌株高 24.3%,达到 3.9 g/L(图 4B),同时,在 CTL11 的发酵液中没有检测到 L-脯氨酸。上述结果表明,使用反馈抑制来削弱竞争途径是可行的,这项策略也能用于其他产物的生物合成。

L-鸟氨酸经由鸟氨酸氨基甲酰转移酶(由

argI 基因编码)催化生成 L-瓜氨酸,同时 L-鸟氨酸也可经由鸟氨酸脱羧酶及其同工酶(由 *speC* 和 *speF* 基因编码)催化生成腐胺(图 4C)^[16,22]。Ginesy 等^[22]通过删除大肠杆菌中的 *speC* 和 *speF* 基因来阻止 L-鸟氨酸产生腐胺。为了减少腐胺合成,提高 L-鸟氨酸的转化率。依次删除 CTL11 菌株的 *speC* 和 *speF* 基因,构建出 CTL12 和 CTL13 菌株。然而,发酵结果显示,CTL12 和 CTL13 菌株的 L-瓜氨酸产量均下降,分别降低至 3.6 g/L 和 1.8 g/L(图 4D)。在大肠杆菌中,腐胺的合成途径有 2 条:一条由鸟氨酸脱羧酶催化 L-鸟氨酸合成腐胺;另一条由精氨酸脱羧酶催化 L-精氨酸合成腐胺^[30-31]。此外,腐胺对细胞的生理活动有重要影响,在转录、翻译、营养转运和细胞通透性等方面发挥作用。CTL13 菌株中同时缺乏鸟氨酸脱羧酶和 L-精氨酸,不能合成腐胺,细胞生长受损并削弱了 L-瓜氨酸的生产^[32]。因此,在 CTL11 菌株中,失活了亚精胺合成酶(由 *speE* 基因编码),构建出 CTL14 菌株。CTL14 中,腐胺的合成途径被保留,但其降解为亚精胺的途径被抑制,腐胺积累抑制了 L-鸟氨酸向腐胺转化^[33]。CTL14 菌株的 L-瓜氨酸产量比 CTL11 菌株高 53.4%,达到 6.0 g/L(图 4D)。上述结果表明,胞内腐胺的积累能够抑制 L-鸟氨酸转化为腐胺。

2.3 L-瓜氨酸合成路径的辅因子优化

在大肠杆菌中,每合成 1 分子 L-瓜氨酸需要消耗 3 分子 NADPH,因此,充足的 NADPH 供应是 L-瓜氨酸合成的关键因素之一。研究表明,调节膜结合型转氢酶的表达,迫使 NADH 中的氢离子转移至 NADPH 中,能有效提高 L-瓜氨酸的产量^[28]。删除 CTL14 菌株中的 *sthA* 基因,构建出 CTL15 菌株。然后,将受到天然启动子控制大肠杆菌内的 *pntAB* 和来自枯草芽孢杆菌的 *ppnK* 基因^[34]整合到 CTL15 菌株的假

基因 *yjiP* 基因座，分别构建出 CTL16 和 CTL17 菌株(图 5A)。发酵结果显示，CTL15、CTL16 和 CTL17 的 L-瓜氨酸产量分别达到 6.8、8.2、7.0 g/L(图 5B)，且 CTL16 中 NADPH 的水平最高。这表明调控膜结合型转氨酶，包括敲除 *sthA* 基因、过表达 *pntAB* 基因、*ppnK* 基因，均能有效地促进 NADPH 的再生，促进 L-瓜氨酸的生物合成，并且在大肠杆菌 BL21(DE3)中，*pntAB* 基因提升 NADPH 水平的能力优于 *ppnK* 基因。

2.4 L-瓜氨酸转运系统强化

转运系统的开发一直是氨基酸生产菌株发展的一个重要部分，当 L-瓜氨酸被过量生产，细胞内积累的大量产物对细胞产生毒害作用，因此，高效的出口系统对于实现持续生产至关重要。将 CTL16 细胞裂解后，检测到 1.6 g/L 的 L-瓜氨酸。在大肠杆菌中，*argO* 基因编码 L-瓜氨酸的转运蛋白，而在谷氨酸棒状菌中也存在与其同源的 *lysE* 基因^[35-36]。为减少胞内的 L-

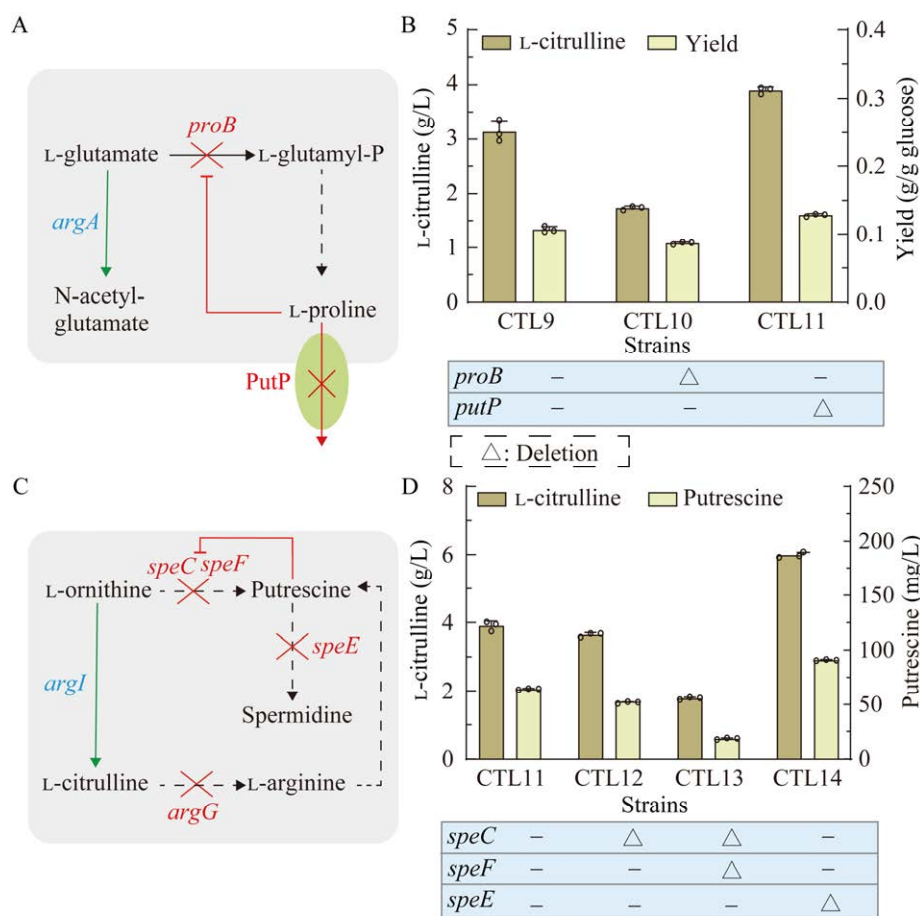


图 4 优化前体代谢对 L-瓜氨酸合成的影响 A: L-脯氨酸生物合成示意图; B: 削弱 L-脯氨酸合成对 L-瓜氨酸合成的影响; C: L-鸟氨酸代谢示意图; D: 优化前体 L-鸟氨酸代谢对 L-瓜氨酸合成的影响。红色“⊥”表示对相关基因的抑制。“-”表示未删除该基因。“△”表示删除该基因。

Figure 4 Effect of optimizing precursor metabolism on L-citrulline synthesis. A: Schematic representation of L-proline synthesis; B: Impact of weakening the L-proline synthesis on L-citrulline synthesis; C: Schematic diagram of L-ornithine metabolism; D: Effect of optimizing precursor L-ornithine metabolism on L-citrulline synthesis. Red “⊥” signifies the transcriptional suppression of the associated genes. “-” signifies the gene has not been deleted. “△” signifies the gene has been deleted.

瓜氨酸, 将 *lysE* 和 *argO* 基因置于 P_{tac} 启动子控制下并被整合到 CTL16 中的假基因 *yadL* 基因座, 分别构建出 CTL18 和 CTL19 菌株。发酵结果显示, *lysE* 基因的过度表达使 CTL18 的 L-瓜氨酸产量提高了 28%, 为 11.6 g/L, 而 *argO*

基因的过度表达仅使 CTL19 的 L-瓜氨酸产量提高了 16%, 为 9.5 g/L, 且检测到 CTL18 的胞内 L-瓜氨酸浓度也更低(图 6A)。以上结果表明, 强化 L-瓜氨酸的转运系统, 可以有效改善胞内 L-瓜氨酸对细胞的毒害, 并提高产量。

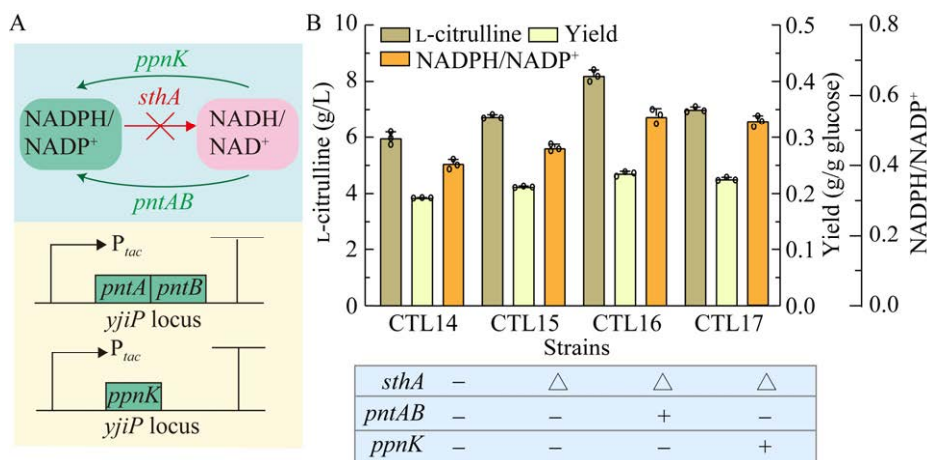


图 5 强化辅因子合成对 L-瓜氨酸合成的影响 A: 转氢酶调节示意图; B: 增强 NADPH 合成对 L-瓜氨酸合成和 NADPH/NADP⁺ 水平的影响。“-”表示未对该基因进行编辑; “+”表示对该基因进行过表达; “△”表示对该基因进行删除。

Figure 5 Effects of enhancing cofactor synthesis on L-citrulline production. A: Schematic of transhydrogenase regulation; B: Effect of enhanced NADPH synthesis on L-citrulline synthesis and NADPH/NADP⁺ levels. “-” signifies the gene has not been edited; “+” signifies that the gene has been overexpressed; “△” signifies the gene has been deleted.

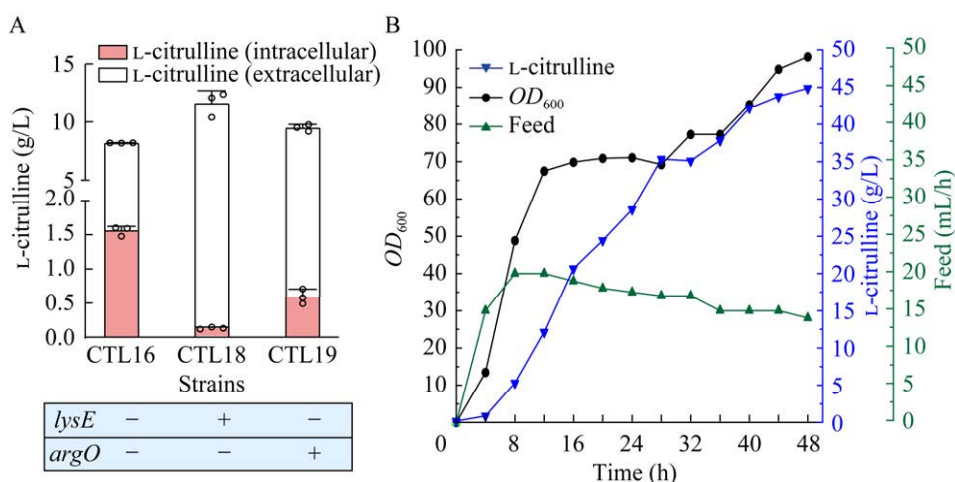


图 6 增强 L-瓜氨酸转运系统对 L-瓜氨酸合成的影响和 CTL18 菌株分批补料发酵结果 A: L-瓜氨酸转运系统强化对 L-瓜氨酸合成的影响; B: CTL18 在 3 L 生物反应器中的分批补料发酵结果。每 4 h 取样 1 次。“-”表示未对该基因进行过表达; “+”表示对该基因进行过表达。

Figure 6 Effect of enhanced L-citrulline transport system on L-citrulline synthesis and results of fed-batch fermentation of CTL18 strain. A: Modification of the L-citrulline export system and its impact on L-citrulline production; B: Fed-batch results of CTL18 in a 3 L bioreactor, sampling was performed every 4 h. “+” signifies that the gene has been overexpressed; “-” signifies that the gene has not been overexpressed.

L-瓜氨酸生产菌株在摇瓶发酵时,其产量受溶氧、营养和 pH 等发酵参数的限制,生产性能未能最大化^[37]。因此,在 3 L 发酵罐中对重组菌株 CTL18 进行分批补料发酵。培养基初始葡萄糖浓度为 10 g/L,待底糖耗尽后补加高浓度葡萄糖溶液(750 g/L)将发酵液中残糖维持在 0.1–0.5 g/L,以避免高浓度的葡萄糖导致乙酸产生。同时补加 L-精氨酸溶液(50 g/L),将浓度控制在 0.1–0.5 g/L,以维持生长。此外,为补充氮源,每 4 h 补加 50 mL 硫酸铵溶液(200 g/L)。重组菌株发酵 48 h, L-瓜氨酸产量为 44.9 g/L,转化率为 0.14 g/g 葡萄糖,生产强度为 0.94 g/(L·h)(图 6B),并且在发酵液中没有检测到其他氨基酸产生。

3 讨论与结论

已有较多文献报道微生物发酵生产 L-瓜氨酸,对合成途径进行代谢调控是最直接地提高产量的策略^[12-13,23,36,39]。例如失活精氨酸阻遏蛋白 ArgR,以解除 L-精氨酸对合成途径的反馈抑制,提高合成途径相关基因的转录水平^[12],除此之外,催化合成途径第一步反应的乙酰谷氨酸合成酶还受到 L-精氨酸造成的变构抑制,这种抑制可以通过突变 *argA* 基因来减弱^[38-40],但对于 L-精氨酸营养缺陷型菌株,发酵时控制 L-精氨酸浓度在 0.5 g/L 以下也可避免该抑制。Jiang 等^[13]在大肠杆菌中引入来源于谷氨酸棒状菌的 *argCJBDF* 基因簇,重构了无乙酸产生的循环途径以强化合成,最终在发酵罐中 L-瓜氨酸产量达到 82 g/L。但在本研究中,分别强化内源线性途径、引入循环途径,发酵结果却表明内源线性途径的产量更高,与 Jiang 等^[13]实验结果的差异推测是由大肠杆菌 BL21(DE3)和 K-12 系列菌株基因组和代谢的差异造成的^[41-43]。BL21(DE3)菌株中 TCA 循环的通量比 K-12

MG1655 菌株的更大,在发酵过程中积累的乙酸也较少,并且 BL21(DE3)菌株对许多氨基酸的产生都有正向的调节,促进了 L-瓜氨酸的合成,使得外源循环途径在 BL21(DE3)的代谢中不占优势。

增强前体的供应也是提高产量的有效手段。增大 TCA 循环到 L-谷氨酸的代谢通量,能有效强化前体 L-谷氨酸的合成^[23],除此之外,谷氨酸脱氢酶催化 α -酮戊二酸生成 L-谷氨酸的反应会消耗 NADPH,因此,增强 NADPH 合成或者更换 NADH 依赖性的谷氨酸脱氢酶,能够进一步提高 L-谷氨酸的水平。此外,需要谨慎调控竞争途径,直接阻断 L-脯氨酸^[29]和腐胺^[22]合成会造成代谢紊乱,影响细胞正常生长,减弱 L-瓜氨酸的合成,使竞争产物在胞内积累,利用细胞自身的反馈调节机制抑制竞争途径。或者给相关基因更换弱启动子,减少进入竞争途径的代谢通量,也是一种可行的策略。此外,CTL18 仍有改造的空间,氨甲酰磷酸是 L-瓜氨酸合成的另一前体物^[13],在后续实验中可以增强氨甲酰磷酸的合成,以促进 L-瓜氨酸的合成。

辅因子工程也是一种常见且有效地提高合成效率的策略,NADPH 供应不足会导致前体合成受阻,不利于 L-瓜氨酸生产。常见的调控方式有上调 *pgi* 基因的表达水平,通过增大戊糖磷酸途径的通量,以促进 NADPH 合成,然而,这会削弱糖酵解途径,影响 L-瓜氨酸的合成^[34-35];除此之外,Haskins 等^[40]报道,向发酵培养基中添加 NADPH 的前体,如烟酰胺和磷酸盐,也能提高 NADPH 的供应,然而,这将增加生产成本。相比之下,调节膜结合型转氨酶的表达,使 NADH 转化为 NADPH,能够避免上述缺陷,是一种更经济的解决方案。虽然发酵结果显示转运蛋白 ArgO 的转运效率比 LysE 低,但仍具

有开发潜力, 有研究报道了一种 *argP216* 突变体(*argO* 基因的转录调节因子)可以增强 ArgO 的表达^[36]。综上, 本研究利用多种代谢工程策略, 对 L-瓜氨酸的高效生物合成进行了探索, 部分策略也可用于其他氨基酸(如 L-鸟氨酸和 L-精氨酸)的合成。

REFERENCES

- [1] LI HT, FENG L, JIANG WD, LIU Y, JIANG J, LI SH, ZHOU XQ. Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 126: 169-179.
- [2] PONS A, BESCÓS R, SUREDA A, TUR JA. Metabolic precursors of L-arginine supplementation in sports: a focus on L-citrulline and L-ornithine[M]//L-arginine in Clinical Nutrition. Cham: Humana Press, 2017: 311-318.
- [3] BREUILLARD C, CYNOBER L, MOINARD C. Citrulline and nitrogen homeostasis: an overview[J]. *Amino Acids*, 2015, 47(4): 685-691.
- [4] SU LQ, MA Y, WU J. Extracellular expression of natural cytosolic arginine deiminase from *Pseudomonas putida* and its application in the production of L-citrulline[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 176-183.
- [5] RAKHIMUZZAMAN M, NODA M, DANSHIITSOODOL N, SUGIYAMA M. Development of a system of high ornithine and citrulline production by a plant-derived lactic acid bacterium, *Weissella confusa* K-28[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 42(9): 1581-1589.
- [6] WANG HD, XU JZ, ZHANG WG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-arginine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(17): 5603-5613.
- [7] IKEDA M, MITSUHASHI S, TANAKA K, HAYASHI M. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1635-1641.
- [8] HAO N, MU J Jr, HU N, XU S, YAN M, LI Y, GUO K, XU L. Improvement of L-citrulline production in *Corynebacterium glutamicum* by ornithine acetyltransferase[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(2): 307-313.
- [9] DONG JJ, KAN BJ, LIU H, ZHAN ML, WANG SX, XU GC, HAN RZ, NI Y. CRISPR-Cpf1-assisted engineering of *Corynebacterium glutamicum* SNK118 for enhanced L-ornithine production by NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and NADH-dependent glutamate dehydrogenase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(3): 955-967.
- [10] KATAYAMA N, OSANAI T. Arginine inhibits the arginine biosynthesis rate-limiting enzyme and leads to the accumulation of intracellular aspartate in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Plant Molecular Biology*, 2024, 114(2): 27.
- [11] SCHRAMM T, LEMPP M, BEUTER D, SIERRA SG, GLATTER T, LINK H. High-throughput enrichment of temperature-sensitive argininosuccinate synthetase for two-stage citrulline production in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 14-24.
- [12] EBERHARDT D, JENSEN JVK, WENDISCH VF. L-citrulline production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources[J]. *AMB Express*, 2014, 4(1): 85.
- [13] JIANG S, WANG DH, WANG RR, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Reconstructing a recycling and nonauxotroph biosynthetic pathway in *Escherichia coli* toward highly efficient production of L-citrulline[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 220-231.
- [14] DUAN YT, ZHAI WJ, LIU WJ, ZHANG XM, SHI JS, ZHANG XJ, XU ZH. Fine-tuning multi-gene clusters via well-characterized gene expression regulatory elements: case study of the arginine synthesis pathway in *C. glutamicum*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(1): 38-48.
- [15] DOU WF, XU MJ, CAI DM, ZHANG XM, RAO ZM, XU ZH. Improvement of L-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(3): 845-855.
- [16] NGUYEN AQD, SCHNEIDER J, REDDY GK, WENDISCH VF. Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolites*, 2015, 5(2): 211-231.
- [17] STUDIER FW, DAEGELEN P, LENSKI RE, MASLOV S, KIM JF. Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 394(4): 653-680.
- [18] ZHU XW, WU YK, LV XQ, LIU YF, DU GC, LI JH, LIU L. Combining CRISPR-Cpf1 and recombineering facilitates fast and efficient genome editing in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(5): 1897-1907.
- [19] JIANG Y, SHENG Q, WU XY, YE BC, ZHANG B. L-arginine production in *Corynebacterium glutamicum*: manipulation and optimization of the metabolic process[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(2): 172-185.
- [20] ZHAO QQ, LUO YC, DOU WF, ZHANG X, ZHANG XM, ZHANG WW, XU MJ, GENG Y, RAO ZM, XU ZH. Controlling the transcription levels of *argGH* redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(1): 55-66.
- [21] LEISINGER T, HAAS D. N-acetylglutamate synthase of *Escherichia coli* regulation of synthesis and activity by arginine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(5): 1690-1693.
- [22] GINESY M, BELOTSEKOVSKY J, ENMAN J,

- ISAKSSON L, ROVA U. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced arginine biosynthesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 29.
- [23] PARK SH, KIM HU, KIM TY, PARK JS, KIM SS, LEE SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618.
- [24] WANG JL, MA WJ, ZHOU JW, WANG XY. Microbial chassis design and engineering for production of amino acids used in food industry[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2023, 3(1): 28-48.
- [25] PETRI K, WALTER F, PERSICKE M, RÜCKERT C, KALINOWSKI J. A novel type of N-acetylglutamate synthase is involved in the first step of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 713.
- [26] JIANG S, WANG RR, WANG DH, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 146-157.
- [27] MAN ZW, XU MJ, RAO ZM, GUO J, YANG TW, ZHANG X, XU ZH. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28629.
- [28] ZHAO ZQ, CAI MM, LIU YR, HU MK, YANG FY, ZHU RS, XU MJ, RAO ZM. Genomics and transcriptomics-guided metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128054.
- [29] KIM SY, LEE J, LEE SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416-421.
- [30] IGARASHI K, KASHIWAGI K. Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(48): 18702-18709.
- [31] THONGBHUBATE K, IRIE K, SAKAI YM, ITOH A, SUZUKI H. Improvement of putrescine production through the arginine decarboxylase pathway in *Escherichia coli* K-12[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 168.
- [32] IGARASHI K, KASHIWAGI K. Modulation of cellular function by polyamines[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(1): 39-51.
- [33] TING WW, NG IS. Metabolic manipulation through CRISPRi and gene deletion to enhance cadaverine production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(6): 553-562.
- [34] ZHAN ML, KAN BJ, DONG JJ, XU GC, HAN RZ, NI Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(1): 45-54.
- [35] LUBITZ D, JORGE JMP, PÉREZ-GARCÍA F, TANIGUCHI H, WENDISCH VF. Roles of export genes *cgmA* and *lysE* for the production of L-arginine and L-citrulline by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8465-8474.
- [36] NANDINENI MR, GOWRISHANKAR J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3539-3546.
- [37] LE T, BASSEY BF, NGUYEN-VO TP, PARK S. Achieving high titer and yield in the bioconversion of L-threonine to 2-hydroxybutyric acid with *Escherichia coli* BL21[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2024, 4(2): 708-715.
- [38] SANCHO-VAELLO E, FERNÁNDEZ-MURGA ML, RUBIO V. Site-directed mutagenesis studies of acetylglutamate synthase delineate the site for the arginine inhibitor[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(7): 1081-1086.
- [39] RAJAGOPAL BS, DePONTE J 3rd, TUCHMAN M, MALAMY MH. Use of inducible feedback-resistant N-acetylglutamate synthetase (*argA*) genes for enhanced arginine biosynthesis by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1805-1811.
- [40] HASKINS N, PANGLAO M, QU QH, MAJUMDAR H, CABRERA-LUQUE J, MORIZONO H, TUCHMAN M, CALDOVIC L. Inversion of allosteric effect of arginine on N-acetylglutamate synthase, a molecular marker for evolution of tetrapods[J]. *BMC Biochemistry*, 2008, 9: 24.
- [41] YOON SH, HAN MJ, JEONG H, LEE CH, XIA XX, LEE DH, SHIM JH, LEE SY, OH TK, KIM JF. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12[J]. *Genome Biology*, 2012, 13(5): R37.
- [42] JEONG H, BARBE V, LEE CH, VALLENET D, YU DS, CHOI SH, COULOUX A, LEE SW, YOON SH, CATTOLICO L, HUR CG, PARK HS, SÉGURENS B, KIM SC, OH TK, LENSKI RE, STUDIER FW, DAEGELEN P, KIM JF. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3)[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 394(4): 644-652.
- [43] KIM S, JEONG H, KIM EY, KIM JF, LEE SY, YOON SH. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(9): 5285-5293.