

• 生物育种与工艺优化 •

重组钝齿棒杆菌全细胞转化生产 L-瓜氨酸条件优化

刘倩妮¹, 徐美娟¹, 张荣珍¹, 王梅洲¹, 张显¹, 杨套伟¹, 饶志明^{1,2}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

刘倩妮, 徐美娟, 张荣珍, 等. 重组钝齿棒杆菌全细胞转化生产 L-瓜氨酸条件优化. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1889–1894.
Liu QN, Xu MJ, Zhang RZ, et al. Production of L-citrulline by a recombinant *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 whole-cell biocatalyst. Chin J Biotech, 2017, 33(11): 1889–1894.

摘要: 实现了精氨酸脱亚胺酶 (ADI) 首次在钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 中的高效表达。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化得到纯化 ADI, 经 SDS-PAGE 测定其分子量约为 46.8 kDa, 酶学性质研究发现 ADI 的最适催化温度为 37 °C, 最适 pH 为 6.5, ADI 在最佳催化条件下作用于 L-精氨酸的米氏常数为 12.18 mmol/L, 最大反应速率为 0.36 μmol/(min·mL)。优化了重组菌全细胞转化产 L-瓜氨酸的工艺条件, 在最优条件下可一次转化 300 g/L L-精氨酸, 转化速率达 8 g/(L·h)。进行重组菌 5 L 罐发酵并进行罐上全细胞转化 300 g/L L-精氨酸, 一批菌体可进行多次转化, 累计产量达 1 900 g 以上。

关键词: 精氨酸脱亚胺酶, L-瓜氨酸, 全细胞转化优化, 钝齿棒杆菌

Production of L-citrulline by a recombinant *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 whole-cell biocatalyst

Qianni Liu¹, Meijuan Xu¹, Rongzhen Zhang¹, Meizhou Wang¹, Xian Zhang¹, Taowei Yang¹, and Zhiming Rao^{1,2}

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

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Arginine deiminase (ADI) was first high-efficient expressed in *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5. The ADI was purified by Ni-NTA affinity chromatography and SDS-PAGE analysis showed the molecular weight (MW) was 46.8 kDa. The optimal temperature and pH of ADI were 37 °C and 6.5 respectively. The Michaelis constant was 12.18 mmol/L and the maximum velocity was 0.36 μmol/(min·mL). Under optimal conditions, 300 g/L of arginine was transformed and the productivity reach 8 g/(L·h). The recombinant strain was cultivated in a 5-L fermentor and used for whole-cell transformation of 300 g/L arginine, under repeated-batch bioconversion, the cumulative production reached 1 900 g/L.

Keywords: arginine deiminase, L-citrulline, whole-cell conversion, *Corynebacterium crenatum*

Received: January 23, 2017; **Accepted:** May 17, 2017

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2015AA021004), National Natural Science Foundation of China (No. 31300028), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Nos. BK20150002, BK20130137).

Corresponding authors: Rongzhen Zhang. Tel: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn
Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2015AA021004), 国家自然科学基金 (No. 31300028), 江苏省自然科学基金 (Nos. BK20150002, BK20130137) 资助。

L-瓜氨酸 (L-Cit, $C_6H_{13}N_3O_3$) 是一种非蛋白质氨基酸, 在人体中易于消化和吸收。研究表明瓜氨酸在炎症和败血症的免疫应答中起到至关重要的作用, 减少瓜氨酸在败血症和内毒素血症中的利用率将导致死亡率升高, 补充瓜氨酸能回复精氨酸代谢平衡, 提高血浆精氨酸浓度, 同时提高 NO 的含量^[1]。瓜氨酸在氮稳态中起到重要作用, 它通过精氨酸和谷氨酰胺来抑制氮素循环中的不适当激活; 利用瓜氨酸运输 NO, 能治疗新生儿肺动脉高压症^[2]。瓜氨酸缺乏会导致一些自身免疫疾病, 例如类风湿关节炎、牛皮癣和多发性硬化等^[3]。

精氨酸脱亚胺酶 (ADI) 存在于生物体内的 ADI 途径即精氨酸降解途径中, 此途径包含 3 种酶, 分别为精氨酸脱亚胺酶 (ADI)、鸟氨酸转氨基甲酰酶 (OTC) 和氨基甲酸酯激酶 (CK), 它们共同作用使 1 mol 精氨酸转化为鸟氨酸、氨和 CO_2 并释放出 1 mol ATP, ADI 途径是某些微生物的主要能量来源。

钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 (*Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5) 是符合工业化安全生产的微生物菌株, 发酵菌体量大, 适合用于全细胞转化生产高附加值产品, 主要用于各种氨基酸的生产^[4], 且适用于外源酶的高效表达^[5-6]。本研究前期对该菌株有过较为深入的研究。徐美娟等^[7]通过对 *argB* 基因进行定点突变, 提高精氨酸产量; 满在伟等^[4,8]通过对该菌株进行代谢工程改造, 使精氨酸产量得到进一步提升。本研究选取粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 来源的编码 ADI 基因 *arcA* 连接到表达载体 pXMJ19 上, 电转化到钝齿棒杆菌 *C. crenatum* 中, 构建高效转化 L-精氨酸合成 L-瓜氨酸的重组菌株。本研究首次将 ADI 在棒杆菌中表达, 为工业化高效生产 L-瓜氨酸提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. faecalis 由本实验室保藏; *C. crenatum* SYPA 5-5、*C. crenatum* SYA 5、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 由本实验保藏^[9]; 表达载体 pXMJ19 由本实验室保藏。

本研究所用的引物为 *arcA* F: 5'-ACCGGGATC CATGAGTCATCCAATTAATG-3'(BamH I) 和 *arcA* R: 5'-ACCGGAATTCTTAATGATGATGATGATGATG AAGATCTTCACGGTAAAG-3'(EcoR I)。

1.2 培养基及培养方法

LBG 培养基、种子培养基、发酵培养基及钝齿棒杆

菌的菌种活化、种子培养及发酵培养均参照文献^[10]。

1.3 试剂及工具酶

BamH I、*EcoR* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等购自 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司; 氯霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、蛋白质相对质量标准、L-精氨酸标样、L-瓜氨酸标样购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其他分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 重组菌构建

提取 *E. faecalis* 的基因组, PCR 扩增目的基因 *arcA*, 将所得片段割胶回收后, 经 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切与经过相同双酶切的表达载体 pXMJ19 连接, 将连接产物电转化入 3 种宿主感受态细胞中, 感受态细胞的制备和电转化按文献^[5]操作。在 LBG 固体培养基上培养, 挑取转化子至 LBG 液体培养基中培养, 提取得到重组质粒 pXMJ19-*arcA*, 并送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 结果表明成功构建重组菌株。

1.5 ADI 酶的表达、纯化和酶活测定

将 3 株重组菌按文献^[4]方法表达, 选择酶活最高的重组 ADI 进行后续实验。N 端带有组氨酸标签的 ADI 通过 Ni-NTA 亲和层析, 利用不同浓度的咪唑进行梯度洗脱获得纯化蛋白, 将发酵上清、粗酶液和纯化酶液经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析重组菌表达和纯化结果。

配制含终浓度 0.2 mol/L L-精氨酸的底物缓冲液 (pH 6.5, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液), 取 1.8 mL 底物溶液, 加入 0.2 mL 酶液, 37 °C 反应 10 min。将酶反应液稀释适当的倍数后按文献^[11]测定酶活。ADI 酶活定义: 每分钟催化 L-精氨酸转化生成 1 μ mol 瓜氨酸的酶量定义为一个单位 ADI 酶活力 (1 U)。比酶活定义: 每毫克蛋白里包含的酶活数量 (U/mg)。蛋白浓度采用 Bradford 法测定^[12]。

1.6 L-精氨酸及 L-瓜氨酸含量的测定

将转化液稀释适当的倍数, 以邻苯二甲醛 (OPA) 作为衍生化试剂进行氨基酸柱前衍生, 利用 HPLC 进行氨基酸含量的测定^[13]。

1.7 重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA* 摇瓶培养及全细胞转化生产 L-瓜氨酸

将重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA* 单菌落在含终浓度 10 μ g/mL 氯霉素的 10 mL LBG

液体培养基中于 30 °C 活化 24 h, 并以 3% 转接量转入含 50 mL LBG 的 250 mL 摇瓶中于 30 °C 培养, 当生长 10 h 时添加终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 于 30 °C 诱导表达 12 h。诱导结束时 4 °C 离心收集细胞, 用 pH 6.5、0.02 mmol/L 磷酸缓冲液洗涤菌体 2 次, 用含 300 g/L L-精氨酸 (L-Arg) 的 50 mL 的底物溶液 (pH 6.5, 0.02 mol/L 磷酸缓冲液) 重悬菌体, 37 °C 下进行转化。

1.8 重组菌 5 L 罐发酵放大及罐上全细胞转化生产 L-瓜氨酸

重组菌 5 L 罐发酵参考文献[10]方法, 发酵完成后收集全部菌体用 pH 6.5、0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 2 次, 再投入 2 L 底物溶液 (pH 6.5, 0.02 mol/L 磷酸缓冲液, 300 g/L L-Arg), 于 37 °C 进行罐上全细胞转化。

2 结果与分析

2.1 重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 的构建

提取 *E. faecalis* 的基因组, PCR 扩增目的基因 *arcA*, 按 1.5 中所述方法构建重组质粒 pXMJ19-*arcA*, 将重组质粒分别电转化入 *C. crenatum* SYPA 5-5、*C. crenatum* SYA 5 和 *C. glutamicum* ATCC 13032 中, 对获取的转化子提取质粒。重组质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切验证 *arcA* 的大小约为 1 200 bp。

2.2 重组 ADI 的表达和分离纯化

将 *C. crenatum* SYPA 5-5 和 3 株重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA*、*C. crenatum* SYA 5/pXMJ19-*arcA* 和 *C. glutamicum* ATCC 13032/pXMJ19-*arcA* 在相同条件下表达, 并测定粗酶液酶活, 结果如表 1 所示。重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA* 的 ADI 酶活高于其他菌株, 因此后续实验选择该重组菌进行全细胞转化生产 L-瓜氨酸的进一步研究并对其重组 ADI 进行酶学性质的研究。

将 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA* 粗酶液进行纯化, 获得纯化 ADI 结果如图 1 所示。纯化酶液在 47 kDa 左右出现一条蛋白条带, 与 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析理论 ADI 蛋白大小 46.76 kDa 相符, 测定纯化 ADI 比酶活为 (3.38±0.13) U/mg。

2.3 ADI 酶学性质分析

2.3.1 pH 对 ADI 酶活和酶稳定性的影响

将纯化 ADI 在不同 pH 反应体系下反应, 并将酶液分别置于冰上不同 pH 条件下分别保温 1 h、2.5 h、4.5 h、6.5 h 测其 pH 稳定性。结果如图 2A 显示, 重组 ADI 的最适 pH 为 6.5, 不同于小眼虫

Euglena gracilis 来源的 ADI, 它的最适 pH 为 9.7, 是一种碱性酶^[14]。如图 2B 所示重组 ADI 在 pH 范围 5.0–7.0 之间具有较好的稳定性。在最适 pH 6.5 条件下保存 6.5 h 仍具有 52% 相对酶活。但当 pH>8.0 时, 重组酶的稳定性迅速降低。

2.3.2 温度对 ADI 酶活和酶稳定性的影响

将纯化 ADI 在不同温度反应体系下反应 10 min, 结果如图 3A 显示, 此研究中重组 ADI 的最适温度为 37 °C, 与变形假单胞菌 *Pseudomonas plecoglossicida* 来源的 ADI 最适温度相似^[15]。将重组酶置于不同温度下处理研究其热稳定性, 结果如图 3B 显示, 重组 ADI 在 37 °C 保存 3 h 仍具有 50% 以上相对酶活, 并且在高温 50 °C 下保存 0.5 h 仍具有 37% 的相对酶活。

2.3.3 ADI 的酶动力学研究

将重组纯酶与含不同摩尔浓度 (0.01–0.2 mol/L) 的 L-Arg 底物溶液 (pH 6.5, 0.2 mol/L 磷酸缓冲液溶液) 在 37 °C 反应 10 min, 测定反应速度。以反应速度的倒数为纵坐标 (1/V), L-Arg 摩尔浓度的倒数 (1/[S]) 为横坐标作 Lineweaver-Burk 图, 如图 4 得出 ADI 米氏常数 K_m 为 12.18 mmol/L, 最大反应速率 V_m 值为 0.36 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。

表 1 野生型菌株和重组菌 ADI 酶活分析

Table 1 Arginine deiminase activity assay of wild and recombinant strains

| Strain | Activity (U/(mL·OD ₆₀₀)) |
|---|--------------------------------------|
| <i>C. crenatum</i> SYPA 5-5 | ND |
| <i>C. crenatum</i> SYPA 5-5/pXMJ19- <i>arcA</i> | 0.058±0.003 |
| <i>C. crenatum</i> SYA 5/pXMJ19- <i>arcA</i> | 0.041±0.002 |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032/pXMJ19- <i>arcA</i> | 0.052±0.003 |

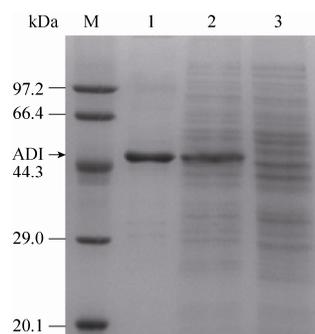


图 1 重组 ADI 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant ADI. M: protein molecular weight marker; 1: purified arginase deiminase; 2: *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-*arcA* cell extract; 3: *C. crenatum* SYPA 5-5 cell extract.

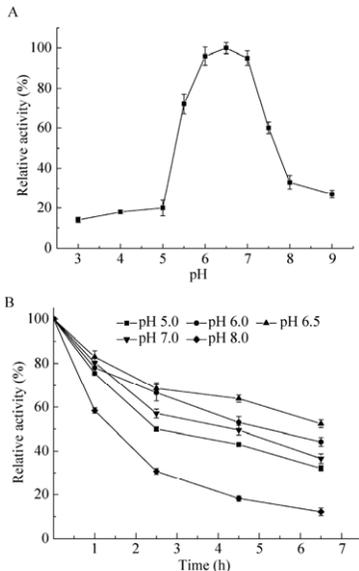


图2 重组精氨酸脱亚胺酶最适反应 pH(A)和 pH 稳定性(B)
Fig. 2 The optimum pH (A) and pH stability (B) of recombinant ADI.

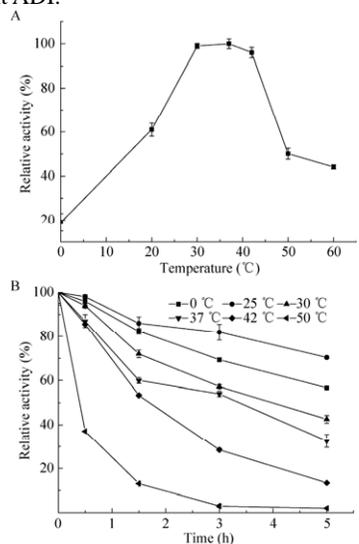


图3 重组精氨酸脱亚胺酶最适反应温度 (A) 和温度稳定性 (B)
Fig. 3 The optimum temperature (A) and temperature stability (B) of recombinant ADI.

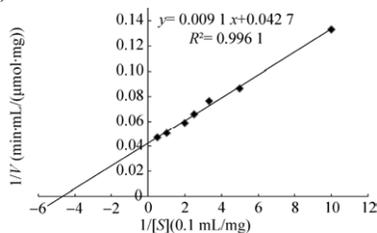


图4 重组精氨酸脱亚胺酶的酶动力学常数图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plots of the recombinant ADI.

2.4 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 的 5 L 罐发酵放大研究

2.4.1 初始诱导时间对重组菌酶活的影响

将重组菌于 5 L 罐培养, 菌体转入罐中后开始添加 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L 诱导表达, 设置其他组依次延后数小时添加相同浓度 IPTG 诱导, 每组均于 30 °C 诱导 12 h。测定诱导时 OD_{600} , 诱导结束时 4 °C 离心收集细胞测定酶活。如图 5 所示, 重组菌生长 0-18 h 时开始诱导, 随着起始诱导时间的增加, ADI 酶活逐渐增加, 当初始诱导时间为 18 h 左右时开始诱导效果最好, 酶活达 0.34 U/mL。但当初始诱导时间大于 24 h 后, 最终酶活随初始诱导时间的增加而逐渐降低。当菌体生长 96 h 开始诱导, 重组菌的酶活仅为 0.03 U/mL, 仅为 18 h 开始诱导酶活的 0.09 倍。可见合适的诱导时间对高效全细胞转化 L-Cit 十分重要。

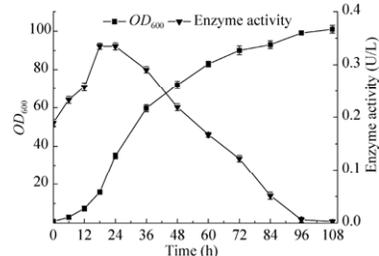


图5 诱导起始时间对重组菌酶活的影响
Fig. 5 Effects of induction time on whole-cell bioconversion.

2.4.2 诱导时长对重组酶酶活的影响

重组菌在 30 °C 培养 18 h ($OD_{600}=17.2$) 时, 补加 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L。每隔一定时间取样测定发酵上清液含糖量、pH 值和 OD_{600} , 开始诱导后每隔一定时间取菌液测定酶活。由图 6 可知, 当发酵时间为 48 h 即诱导 30 h 时, 重组菌的酶活达 0.42 U/mL, 此后酶活趋于稳定, 当发酵进行 120 h 时酶活明显下降。可见重组菌进行 5 L 罐放大时培养 48 h 效率最高。

2.5 重组 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 全细胞转化底物浓度优化

将重组菌在含不同浓度底物 L-Arg (0-400 g/L) 条件下转化 12 h, 并计算 L-Cit 的平均生成速率。结果如图 7 所示, 当 L-Arg 浓度小于 300 g/L 时, 随着底物浓度的增加, L-Cit 的平均生成速率逐渐增加, 至 200 g/L 时平均生成速率升至 6.74 g/(L·h), 随后平均生成速率缓慢增加, 当底物浓度达到 300 g/L 时平均转化速率升至 7.05 g/(L·h)。然而当底物浓度大于 300 g/L 时由于底物抑制转化速率快速下降, 当底物浓度为 400 g/L 时平均生成速率仅为 3.28 g/(L·h)。因此当 L-Arg 浓度为 200-300 g/L 时, 更适合 L-Cit 的高效转化。

2.6 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 的 5 L 罐多批次全细胞转化

将重组菌进行 5 L 罐发酵, 诱导 28 h 后于 37 °C 进行罐上全细胞转化, 当转化液中底物 L-精氨酸将耗尽时, 离心收集细胞并用磷酸缓冲液洗涤, 将细胞在上述条件下继续转化, 重复多次操作。结果如图 8 所示, 第一批次 (0–36 h) 生产效率最高, 转化进行 36 h 时 L-Cit 浓度达 299.9 g/L, 平均 L-Cit 生成速率高达 8.33 g/(L·h), 转化率达 99%。第三批次 (72–108 h) 转化时部分菌体开始死亡, 生产速率逐渐下降, 至第七批次 (252–348 h) L-Cit 的平均生产速率仅为 2.66 g/(L·h)。最终在 348 h 内共投入底物 L-Arg 2 100 g/L, 全细胞转化生成 L-Cit 共 1 940 g/L, 总平均生产速率为 5.57 g/(L·h), 总平均转化率为 92.4%。

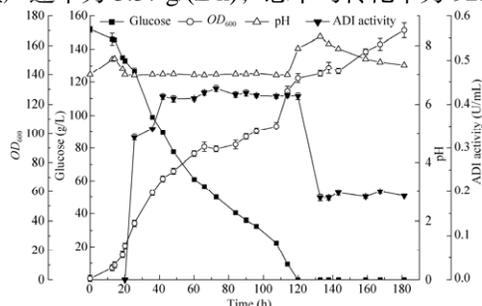


图 6 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 的 5 L 罐发酵
Fig. 6 Fermentation by *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA in 5 L fermentor.

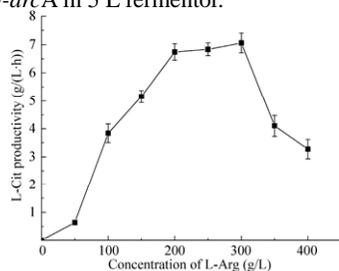


图 7 底物浓度对全细胞转化的影响
Fig. 7 Effects of L-Arg concentration on whole-cell bioconversion.

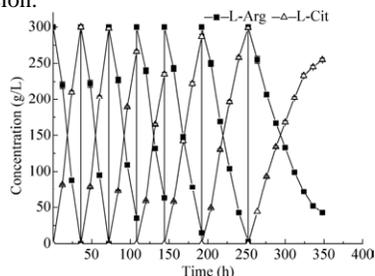


图 8 *C. crenatum* SYPA 5-5/pXMJ19-arcA 的 5 L 罐多批次全细胞转化
Fig. 8 Whole-cell bioconversion for the production of L-Cit in 5 L fermenter.

3 讨论

本研究首次将 *E. faecalis* 来源的 ADI 在棒杆菌 *C. crenatum* SYPA 5-5 中进行表达, 并用于全细胞转化生产 L-瓜氨酸。通过酶学性质研究得知重组酶反应的最适温度为 37 °C, 最适 pH 为 6.5, 反应条件温和适用于工业化放大生产。重组 ADI 与 *P. plecoglossicida* 来源的 ADI 最适温度相似, 但重组 ADI 在 20–50 °C 之间相对酶活优于 *P. plecoglossicida* 来源^[15]。乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 来源的 ADI 具有高达 60 °C 的最适温度^[16], 但此温度既不适合微生物生长也不利于后续的发酶生产和工业化。此外重组 ADI 在最适反应温度 37 °C 下保温 5 h 后仍有 50% 以上相对酶活, 在高温 50 °C 下保存 0.5 h 仍具有 37% 的相对酶活。恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 来源的 ADI 在 55 °C (*P. putida* 来源 ADI 的最适反应温度为 50 °C) 下保存仅 3 min, 酶活降低 50%^[17]; *L. lactis* 来源的 ADI 在此酶的最适反应温度 60 °C 下保存 15 min 后酶活下降一半^[16], 可见 *E. faecalis* 来源的 ADI 在该酶的最适温度下有较高的热稳定性。

任丽梅等将单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 来源 ADI 通过大肠杆菌进行高效表达, 通过一步酶促反应使 L-精氨酸分解生成 L-瓜氨酸, 5.5 h 内可使 94–258 g/L 的精氨酸转化为瓜氨酸, 但需添加 7 920–17 600 U/L 的 ADI^[18]。马越等将 *P. putida* ACCC 10185 的 ADI 通过大肠杆菌表达, 并将此酶用于转化 L-精氨酸盐酸盐生成 L-瓜氨酸, 在最佳转化条件下可使 650 g/L L-精氨酸盐酸盐于 7 h 内完全转化, 但添加酶量高达 24 U/g 底物^[19]。酶转化生产 L-瓜氨酸具有反应条件温和、效率高等特点, 但酶转化法对 ADI 酶添加量要求较高需耗费大量发酵原料且转化过程中要求较高的酶稳定性, 但 ADI 酶普遍具有稳定性不高的特点^[15–17], 难以实现 ADI 酶的重复利用。本研究利用全细胞法转化生产 L-瓜氨酸, 构建重组 *C. crenatum* SYPA 5-5 菌株能使 ADI 在细胞体内保持高效酶转化活力, 反应条件温和, 重组菌株符合工业化安全生产^[4]且细胞可多次利用, 后续重组细胞与产物仅需离心便可分离, 具有更好的工业化应用前景。

此前全细胞转化生产 L-瓜氨酸文献报道多集中于大肠杆菌宿主, Song 等^[20]将 *L. lactis* 来源的 ADI 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达, 并通过易错 PCR 获得

一株高酶活突变体 FMMME106, 此突变体能转化 176.9 g/L 的 L-瓜氨酸, 转化率为 92.6%; Yang 等^[21] 使用壳聚糖固定化 *E. faecalis* 细胞并放大到工业化规模, 210 kg 的固定化细胞能转化 1 000 kg L-精氨酸生成 974.6 kg L-瓜氨酸。本研究首次将 ADI 在棒杆菌中表达, 并进行了 5 L 罐发酵和罐上转化, 首批次转化 300 g/L L-精氨酸转化速率高达 8.33 g/(L·h), 转化率达 99%, *C. crenatum* SYPA 5-5 表达菌株不需固定化也能进行多批次转化, 能大大减少发酵原料和能源的消耗, 且菌株多批次转化生产 L-瓜氨酸的累计产量的产量能达到 1 940 g/L, 总平均转化率达 92.4%。

REFERENCES

- [1] Wijnands KAP, Castermans TMR, Hommen MPJ, et al. Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients*, 2015, 7(3): 1426–1463.
- [2] Fike CD, Summar M, Aschner JL. L-citrulline provides a novel strategy for treating chronic pulmonary hypertension in newborn infants. *Acta Paediatr*, 2014, 103(10): 1019–1026.
- [3] Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*, 2005, 29(3): 177–205.
- [4] Man ZW, Rao ZM, Xu MJ, et al. Improvement of the intracellular environment for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium glutamicum* by inactivation of H₂O₂-forming flavin reductases and optimization of ATP supply. *Metab Eng*, 2016, 38: 310–321.
- [5] Zhang X, Wu D, Yang TW, et al. Over-expression of *Mycobacterium neoaurum* 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase in *Corynebacterium crenatum* for efficient bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione. *Electron J Biotechnol*, 2016, 24: 84–90.
- [6] Xu MJ, Qin JR, Rao ZM, et al. Effect of Polyhydroxybutyrate (PHB) storage on L-arginine production in recombinant *Corynebacterium crenatum* using coenzyme regulation. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 15.
- [7] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, et al. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255–266.
- [8] Man ZW, Xu MJ, Rao ZM, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production. *Sci Rep*, 2016, 6: 28629.
- [9] Xiong XJ, Dou WF, Xu ZH, et al. L-arginine production by arginine analog-resistant mutant of microorganisms. *J Wuxi Univer of Light Ind*, 2003, 22(2): 10–13 (in Chinese).
- [10] Xu H, Dou WF, Xu HY, et al. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochem Eng J*, 2009, 43(1): 41–51.
- [11] Qian JN, Sun ZH, Liu YP, et al. Determination of L-citrulline in enzymatic conversion solution by diacetylmonoxime-thiosemicarbazide colorimetry. *Chin J Pharmaceuticals*, 2007, 38(7): 519–522 (in Chinese).
钱嘉南, 孙志浩, 刘宇鹏, 等. 二乙酰一肟-氨基硫脲比色法测定酶转化液中的 L-瓜氨酸. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(7): 519–522.
- [12] Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation//Walker JM, Ed. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2002: 15–21.
- [13] Mao HM, Wei W, Xiong WJ, et al. Simultaneous determination of L-citrulline and L-arginine in plasma by high performance liquid chromatography. *Clin Biochem*, 2010, 43(13/14): 1141–1147.
- [14] Park BS, Hirotsu A, Nakano Y, et al. Purification and some properties of arginine deiminase in *Euglena gracilis* Z. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(2): 483–489.
- [15] Ni Y, Li ZW, Sun ZH, et al. Expression of arginine deiminase from *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039 in *Escherichia coli* and its anti-tumor activity. *Curr Microbiol*, 2009, 58(6): 593–598.
- [16] Kim JE, Jeong DW, Lee HJ. Expression, purification, and characterization of arginine deiminase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 in *Escherichia coli* BL21. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(1): 9–15.
- [17] Shibata T, Kakimoto T, Chibata I. Crystallization and properties of L-arginine deiminase of *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem*, 1975, 250(12): 4580–4583.
- [18] Ren LM, Cheng ZY, Li XJ, et al. Studies of arginine deiminase activity and conversion of L-citrulline. *Amino Acids Biotic Res*, 2015, 37(3): 69–74 (in Chinese).
任丽梅, 成志远, 李晓静, 等. 精氨酸脱亚胺酶活性以及瓜氨酸转化研究. *氨基酸和生物资源*, 2015, 37(3): 69–74.
- [19] Ma Y, Su LQ, Wu D, et al. Optimization of preparing L-citrulline by recombinant arginine deiminase. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(8): 180–185 (in Chinese).
马越, 宿玲恰, 吴丹, 等. 重组精氨酸脱亚胺酶制备 L-瓜氨酸的工艺条件优化. *生物技术通报*, 2015, 31(8): 180–185.
- [20] Song W, Sun X, Chen XL, et al. Enzymatic production of L-citrulline by hydrolysis of the guanidinium group of L-arginine with recombinant arginine deiminase. *J Biotechnol*, 2015, 208: 37–43.
- [21] Yang ZY. Immobilization of *Enterococcus faecalis* cells with chitosan: a new process for the industrial production of L-citrulline. *Process Biochem*, 2015, 50(7): 1056–1060.

(本文责编 郝丽芳)