

# 构建整合型重组枯草芽孢杆菌高效合成胍基乙酸

廖雅芯, 张杰, 张显, 饶志明, 徐美娟\*

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

廖雅芯, 张杰, 张显, 饶志明, 徐美娟. 构建整合型重组枯草芽孢杆菌高效合成胍基乙酸[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3025-3038.

LIAO Yaxin, ZHANG Jie, ZHANG Xian, RAO Zhiming, XU Meijuan. Efficient biosynthesis of guanidoacetic acid by a recombinant strain of *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3025-3038.

**摘要:** 胍基乙酸作为一种能源性物质, 在食品、医药和饲料等行业有着广泛的应用前景, 但目前尚未实现利用生物法工业化生产胍基乙酸。本研究在食品级安全菌株枯草芽孢杆菌中设计胍基乙酸的合成路线, 利用调控关键酶表达、解除反馈抑制、增加膜通透性等技术, 实现全细胞催化高效合成胍基乙酸。首先基于进化树挖掘筛选最佳 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶, 利用强启动子与基因组整合相结合的策略提高关键酶表达水平; 其次, 引入谷氨酸棒杆菌中用于 L-精氨酸合成的鸟氨酸循环途径, 缓解副产物 L-鸟氨酸对酶的反馈抑制, 并敲除 L-精氨酸降解途径, 强化底物再生; 再次, 增强 N-乙酰胞壁-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, LytC)基因表达, 改善细胞膜通透性; 最后, 使用菌株 Bs-13 在最佳转化条件下, 经 24 h 获得 13.1 g/L 胍基乙酸, 转化速率为 0.54 g/(L·h), 底物甘氨酸的转化率为 92.7%。以上策略一定程度上提高了胍基乙酸的生产效率, 为生物法合成胍基乙酸提供了参考。

**关键词:** 胍基乙酸; L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶; 全细胞催化; 鸟氨酸循环; 细胞通透性; 枯草芽孢杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(32270036, 32070035); 国家重点研发计划(2023YFD1300700); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP221012, JUSRP622022); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF202305)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270036, 32070035), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1300700), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (JUSRP221012, JUSRP622022), and the Open Project of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education (KLIB-KF202305).

\*Corresponding author. E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-01-14; Accepted: 2024-03-25

# Efficient biosynthesis of guanidoacetic acid by a recombinant strain of *Bacillus subtilis*

LIAO Yaxin, ZHANG Jie, ZHANG Xian, RAO Zhiming, XU Meijuan\*

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

**Abstract:** Guanidinoacetic acid, as an energetic substance, has a wide range of applications in the food, pharmaceutical, and feed industries. However, the biosynthesis of guanidinoacetic acid has not been applied in industrial production. In this study, we designed the synthetic route of guanidinoacetic acid in a food-grade strain of *Bacillus subtilis*. By regulating the expression of key enzymes, lifting feedback inhibition, and increasing membrane permeability, we achieved the efficient synthesis of guanidinoacetic acid by whole-cell catalysis. Firstly, the optimal L-arginine:glycine amidinotransferase was screened based on the phylogenetic tree, and the expression of the key enzyme was enhanced by a strategy combining strong promoter and genome integration. Secondly, the ornithine cycle for L-arginine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* was introduced to alleviate the feedback inhibition of the enzyme by the byproduct L-ornithine, and the L-arginine degradation pathway was knocked down to enhance substrate regeneration. Thirdly, the expression of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (LytC) was up-regulated to increase the cell membrane permeability. Finally, after optimization of whole-cell production conditions, strain Bs-13 achieved guanidinoacetic acid production at a titer of 13.1 g/L after 24 h, with a production rate of 0.54 g/(L·h) and a glycine conversion rate of 92.7%. The above strategy improved the production of guanidinoacetic acid and provided a reference for the biosynthesis of guanidinoacetic acid.

**Keywords:** guanidoacetic acid; L-arginine:glycine amidinotransferase; whole-cell catalysis; ornithine cycle; cell permeability; *Bacillus subtilis*

胍基乙酸(guanidoacetic acid, GAA)是一种天然存在的甘氨酸和 L-精氨酸的 N-脒基衍生物。GAA 作为能源性物质肌酸的直接前体<sup>[1]</sup>, 在人体内可以直接合成。早期研究人员评估喂养不同氨基酸和相关物质对肌酸的影响时发现, 喂食 GAA 的幼鼠肌肉肌酸水平增幅超过对照, 与直接喂食等量的肌酸相比也具有相同的结果<sup>[2]</sup>, 这对在动物营养领域使用 GAA 具有开创性意义。之后, 研究人员将 GAA 用于人体实验性营养干预, 并验证了 GAA 治疗关节炎<sup>[3]</sup>、急性和慢性脊髓灰质<sup>[4]</sup>、运动神经元疾病<sup>[5]</sup>和神经肌肉

疾病<sup>[6]</sup>的功能。如今, 由于具有高稳定性、高成本效益以及与肌酸相比的非特异性转运特性, GAA 作为一种无毒且耐受性良好的膳食补充剂和动物营养添加剂得到广泛推广, 以促进动物的生长<sup>[7-8]</sup>, 补偿慢性肾功能衰竭患者的 GAA 缺乏<sup>[9]</sup>, 恢复以低脑肌酸和肌酸合成功能酶机制为特征的疾病中的细胞生物能<sup>[10-11]</sup>。

GAA 的生产方法包括化学合成法、微生物转化法。工业上 GAA 的生产主要是采用甘氨酸或甘氨酸钠与鸟苷酰化剂(如 O-烷基异脒或氰胺)反应进行化学合成, 生产过程需要高温高压,

对环境不友好,此外产品纯度较低,不利于用作食品添加剂。目前对于生物转化法制备 GAA 主要是通过构建高效的微生物细胞工厂,利用 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶(L-arginine:glycine amidinotransferase, AGAT, EC: 2.1.4.1)的催化作用,以 L-精氨酸和甘氨酸为底物生产胍基乙酸和 L-鸟氨酸(图 1A)。与化学合成法相比,该法具有步骤简单、副产物少及绿色环保等优势。但生物转化需要以 L-精氨酸和甘氨酸为底物,成本相对较高,此外副产物 L-鸟氨酸对 AGAT 具有强烈的抑制作用,这大大阻碍了生物法生产 GAA 的工业化进程。2020 年, Zhang 等<sup>[12]</sup>构建工程化大肠杆菌用于 GAA 的全细胞转化生产,第一次实现了 GAA 的生物合成。利用该工程化大肠杆菌在 1 L 反应体系中经 22 h 生物转化获得了 8.61 g/L GAA。Yan 等<sup>[13]</sup>利用重组枯草芽孢杆菌进行生物转化,20 h 获得 4.26 g/L GAA,产率为 0.21 g/(L·h),与 GAA 生物法实现工业生产仍有一定的差距。

枯草芽孢杆菌作为典型的食品安全级工业模式微生物,具有明确的遗传背景和成熟的基因操作技术<sup>[14-15]</sup>。由于其无致病性和较强的蛋白质合成能力<sup>[16]</sup>,非常适合 GAA 生物催化。本研究以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 作为出发菌株,筛选最佳 AGAT,在 *B. subtilis* 168 中构建了 GAA 合成路径。通过增强关键酶的表达,解除副产物 L-鸟氨酸对 AGAT 的反馈抑制作用,改善底盘细胞的膜通透性,实现了全细胞催化 L-精氨酸和甘氨酸高效制备胍基乙酸。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究中使用的所有菌株和质粒见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、枯草芽孢

杆菌(*Bacillus subtilis*) 168、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032、质粒 pMA5、p7S6、pDG148 均为本实验室保藏。来源于拟无枝杆菌(*Amycolatopsis kentuckyensis*)的 AkAGAT (GenBank 登录号: WP\_086848752.1)、土地放线动孢菌(*Actinokineospora terrae*)的 AtAGAT (GenBank 登录号: SER40935.1)、拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)的 CrAGAT (GenBank 登录号: WP\_240866007.1)、智人(*Homo sapiens*)的 HsAGAT (GenBank 登录号: NP\_001473.1)和丝状蓝藻(*Moorea producens*)的 MpAGAT (GenBank 登录号: WP\_071104515.1)由苏州金唯智生物科技有限公司合成,本研究中所用引物见表 2。

#### 1.1.2 酶和试剂

质粒提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;胶回收试剂盒、同源重组酶 ClonExpress II One Step Cloning Kit 和高保真酶 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)购于南京诺唯赞生物科技有限公司;L-精氨酸、L-鸟氨酸购于上海麦克林生化科技股份有限公司;甘氨酸购于国药集团试剂有限公司;胍基乙酸购于默克 Sigma-Aldrich 试剂公司。

#### 1.1.3 培养基与转化体系

LB 培养基(g/L):酵母提取物 5,氯化钠 10,蛋白胨 10。固体培养基加入 1.7% (质量体积分数)琼脂粉。

TB 培养基(g/L):酵母提取物 24,蛋白胨 12,甘油 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.54, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31。

转化体系: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5-8.5), 10-30 g/L L-精氨酸, 5-15 g/L 甘氨酸, 全细胞催化剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组表达菌株的构建

不同来源的 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶基因 *agat* 由公司合成。利用对应的引物对 pMA5-

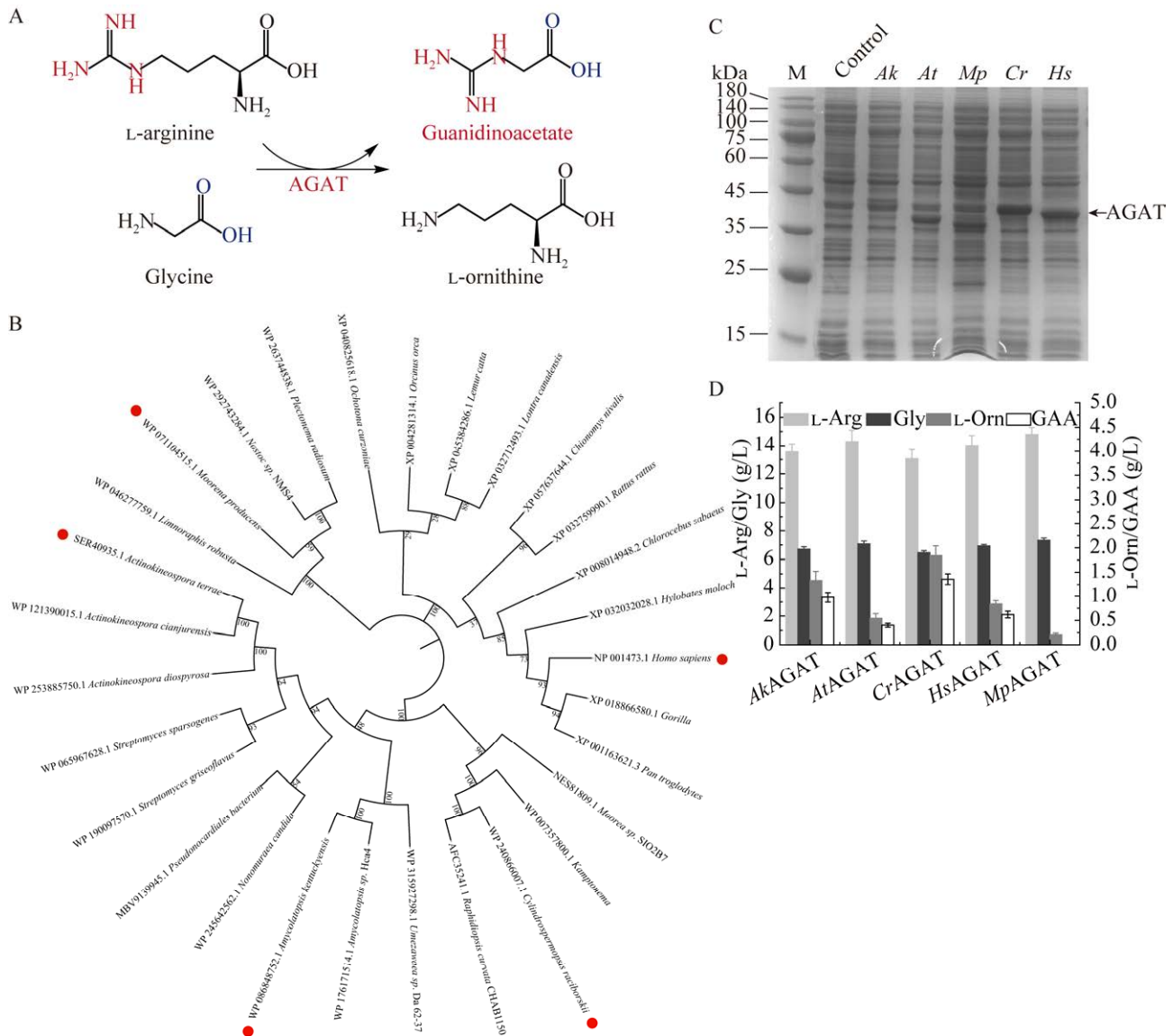


图1 胍基乙酸合成反应(A)及不同物种 AGAT 的系统发育树(B)、在 *Bacillus subtilis* 168 中的表达(C)、全细胞催化产生 GAA (D)

Figure 1 Guanidoacetic acid synthesis reaction (A) and phylogenetic tree of AGAT from different species (B), expression in *Bacillus subtilis* 168 (C), whole-cell catalysis of GAA (D).

*agat*-F/R 以 pMA5 质粒为模板, PCR 获得带有目的基因同源臂的线性化质粒片段, 将该片段与 *agat* 经同源重组连接后转化 *E. coli* BL21 感受态, 涂布在含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 固体平板过夜培养。利用 pMA5-F/R 引物对, 经菌

落 PCR 鉴定成功后, 提取质粒, 转化 *B. subtilis* 168 感受态细胞, 涂布在含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 固体平板过夜培养。挑取阳性转化子进行测序, 若测序正确则重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-*agat* 构建成功。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristic	Source
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> BL21	The host of the plasmid construction	Lab store
<i>Bacillus subtilis</i> 168	The host of the recombinant protein	Lab store
<i>Bs-AkAGAT</i>	<i>B. subtilis</i> 168, expressing <i>AkAGAT</i> in pMA5 plasmid	This study
<i>Bs-AtAGAT</i>	<i>B. subtilis</i> 168, expressing <i>AtAGAT</i> in pMA5 plasmid	This study
<i>Bs-CrAGAT (Bs-1)</i>	<i>B. subtilis</i> 168, expressing <i>CrAGAT</i> in pMA5 plasmid	This study
<i>Bs-HsAGAT</i>	<i>B. subtilis</i> 168, expressing <i>HsAGAT</i> in pMA5 plasmid	This study
<i>Bs-MpAGAT</i>	<i>B. subtilis</i> 168, expressing <i>MpAGAT</i> in pMA5 plasmid	This study
<i>Bs-2</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>43</sub>-agat</i>	This study
<i>Bs-3</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>laps</sub>-agat</i>	This study
<i>Bs-4</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>566</sub>-agat</i>	This study
<i>Bs-5</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>laps</sub>-agat</i> ×2	This study
<i>Bs-6</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>laps</sub>-agat</i> ×3	This study
<i>Bs-7</i>	<i>B. subtilis</i> 168, <i>yqhB::P<sub>laps</sub>-agat</i> ×4	This study
<i>Bs-8</i>	<i>Bs-6</i> , $\Delta argI$	This study
<i>Bs-9</i>	<i>Bs-6</i> , $\Delta nosA$	This study
<i>Bs-10</i>	<i>Bs-6</i> , $\Delta argI$ , $\Delta nosA$	This study
<i>Bs-11</i>	<i>Bs-10</i> , <i>argI::P<sub>43</sub>-argF</i> , <i>argF</i> from <i>Corynebacterium glutamicum</i>	This study
<i>Bs-12</i>	<i>Bs-11</i> , <i>nosA::P<sub>43</sub>-argGH</i> , <i>argGH</i> from <i>C. glutamicum</i>	This study
<i>Bs-13</i>	<i>Bs-12</i> , overexpression of <i>LytC</i> under <i>P<sub>43</sub></i> promoter	This study
<b>Plasmids</b>		
pMA5	<i>B. subtilis</i> 168 expression vector, <i>P<sub>HpaII</sub></i> promoter, <i>kan<sup>r</sup></i>	Lab store
pMA5-AGAT	pMA5 carrying AGAT of different species	This study
p7S6	pMD18-T carrying <i>lox71-spc-lox66</i> and <i>P<sub>43</sub></i> promoter, <i>Spc<sup>r</sup></i>	Lab store
pDG148	<i>Kan<sup>r</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>B. subtilis Cre/lox</i> knockout plasmid, temperature-sensitive plasmid in <i>B. subtilis</i>	Lab store

1.2.2 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶的表达

重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-*agat* 在 10 mL LB 培养基中 37 °C 培养 10–12 h, 以 1% (体积分数) 接种量转至 50 mL TB 培养基中, 30 °C 培养 30–36 h。然后, 离心(4 °C, 8 000 r/min, 5 min) 收集细胞, 用 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4) 洗涤 2 次, 加入适量溶菌酶重悬于 5 mL PBS 缓冲液中进行低温超声破碎, 破碎后的粗酶液可用于粗酶活性测定和 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 酶活性的测定

AGAT 酶活测定体系(2 mL): 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200 mmol/L 精氨酸, 200 mmol/L

甘氨酸, 加入 1 mL 纯酶。酶活检测方法: 在 35 °C、200 r/min 反应 1 h, 加入 750  $\mu$ L HClO<sub>4</sub> 终止反应, 放置 10 min, 离心去除沉淀。取 500  $\mu$ L 反应液+500  $\mu$ L 乙酸+500  $\mu$ L 茚三酮溶液, 于 100 °C 反应 1 h, 冷却后在 515 nm 处测吸光值<sup>[17]</sup>。本研究中 1 个酶活力单位定义(1 U): 在标准反应条件下, 每分钟催化产生 1  $\mu$ mol 胍基乙酸所需要的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.4 基因编辑方法

基因敲除: 利用 *Cre/lox* 重组酶系统进行基因组编辑<sup>[18-19]</sup>。以敲除编码精氨酸酶的 *argI* 基因为例, 首先利用引物对 *argI-1-F/R*、*argI-3-F/R*

表 2 本研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
pMA5-F	TATGGTTTTGGTTCGGCACTGC	21
pMA5-R	TTACAGACAAGCTGTGACCGTCT	23
pMA5-Akagat-F	GGTATCGGTGCGCATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	44
pMA5-Akagat-R	GGTATCGGTGCGCATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	41
pMA5-Atagat-F	GAATGGGTTGGTCATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	44
pMA5-Atagat-R	CAGCCACTGGCATAAGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGC	40
pMA5-Cragat-F	GATGCGGTCTGCATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	44
pMA5-Cragat-R	CGCTTCATCATCTAAGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGC	40
pMA5-Hsagat-F	CCGCACCCGACGATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	44
pMA5-Hsagat-R	TCCTACTTGGACTGAGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGC	40
pMA5-Mpagat-F	AAAACATTAACCATCATATGAAAATCGCTCCTTTTTAGGTGGC	44
pMA5-Mpagat-R	GATTACTTCAACTAAGGATCCTCTAGAGTCGAGCTCAAGC	40
yqhB-1-F	TCAACCGGTGGTCTCTTCAATGCG	24
yqhB-1-R	CGTTTTGGTCACTGTGAGGAT	22
yqhB-2-F	ACAGTGACCAAACCGTACCGTTCGTATAGCATAACATTATACGAAG	45
yqhB-2-R	TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG	30
yqhB-P <sub>43</sub> -F	CATACATTATACGAACGGTATGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGA	45
yqhB-P <sub>laps</sub> -F	ATTATACGAACGGTACCGGAATTCTCAGGAGCATTTAACCTAAA	44
yqhB-P <sub>566</sub> -F	CATACATTATACGAACGGTAAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGG	45
yqhB-3-R	TTAGATGATGAAGCGGGACACGC	23
yqhB-4-F	CGCTTCATCATCTAAGACGTCCCGCCATATTCATCTATGAG	41
yqhB-4-R	ATGCCTTCCTGGAGAAGGCAG	22
ΔargI-1-F	CGATCACCACAAAAGCCTTTGCG	23
ΔargI-1-R	GCTATACGAACGGTACTGTGATTCCACCTCAACATTTAAG	40
lox71-F	TACCGTTCGTATAGCATAACATTATAC	26
lox71-R	TACCGTTCGTATAATGTATGCT	22
ΔargI-3-F	ATTATACGAACGGTAATGGATAAAAACGATTTTCGGTTATTGGA	42
ΔargI-3-R	AGATGAGCCAGTTTGAAGAAGCTG	24
ΔnosA-1-F	CCTGCTTGAATCAAAGAAAAACAATC	27
ΔnosA-1-R	GCTATACGAACGGTAACAATAGAAAATCGATGATGGCCTTCAAGG	45
ΔnosA-3-F	ATTATACGAACGGTACAAACTCTCCCCTTACATCAC	37
ΔnosA-3-R	TGTTTTAATTGATGCCGGCATGC	23
argF-1-F	ATGACTTCACAACCACAGGTTTCG	23
argF-1-R	ATGACTTCACAACCACAGGTTTCG	20
argF-2-F	AACCAGCCGAGGTAATGGATAAACGATTTTCGGTTATTGGA	42
argF-2-R	TGGTTGTGAAGTCATGTGTACATTCCTCTCTTACCTATAATGGTACCG	48
argGH-1-F	ATGACTAACCGCATCGTTCCTTGC	23
argGH-1-R	TTATCGACGTACCCCCGCAC	20
argGH-2-F	GGGGTACGTCGATAACAACTCTCCCCTTACATCAC	37
argGH-2-R	GATGCGGTTAGTCATTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG	45
LytC-1-F	ACCAGAAAATCTACTTCAACAG	27
LytC-1-R	GCTATACGAACGGTATTGATTTCCTCCTTAAATGGCGTTA	40
LytC-3-F	AGAGAGGAATGTACACTTGCCTTCTTATATAAAAAGTCCTAACAATG	46
LytC-3-R	CGTGACCCGGATCAATAAAGATTGTTTCA	29

从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增出 *argI* 基因上下游 1 000 bp 同源臂;使用引物对 *argI*-2-F/R 从质粒 p7S6 上扩增抗性筛选标记;使用引物 *argI*-1-F 和 *argI*-3-R 通过融合 PCR 技术将 3 个片段序列进行融合,经纯化后获得待敲除表达框,转化感受态细胞,通过壮观霉素抗性标记来筛选阳性转化子。将温敏型质粒 pDG148 (含有 Cre 重组酶) 导入敲除菌中,51 °C 培养 48 h,筛选不含有 pDG148 质粒的转化子,获得基因敲除重组菌株。

基因整合/启动子替换:操作流程与基因敲除流程相似。分别使用相应引物对从基因组中扩增出整合位点上下游 1 000 bp 同源臂;使用引物对从质粒 p7S6 上扩增抗性筛选标记;利用 PCR 技术将上下游同源臂、筛选标记、目的基因融合成 1 个重组 DNA 片段,按照基因敲除所述步骤进行转化、消抗、筛选获得基因整合重组菌。

### 1.2.5 全细胞催化方法

将保藏的重组菌于 LB 固体培养基活化,挑取单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基,37 °C 培养 10–12 h。以 1% (体积分数) 接种量接种于 TB 培养基,30 °C 培养 30–36 h。在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心收集细胞,用 0.1 mol/L PBS 缓冲液洗涤 2 次,将清洗后的菌体重悬于转化体系中,菌体浓度  $OD_{600}$  为 20–60,催化反应温度为 25–50 °C,反应体系 pH 为 5.0–10.0 (pH 范围为 5.0–7.5 时采用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液,7.5–8.5 时采用 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,8.5–10.0 时采用 100 mmol/L 碳酸盐缓冲液),转速为 140 r/min,反应 24 h。

### 1.2.6 检测与分析

使用分光光度计(上海翱艺仪器有限公司)在 600 nm 下测量各菌株的生物量。胍基乙酸的检测使用安捷伦高效液相色谱(配备紫外吸收器),色谱柱为 Waters XBridge BEH Amide 5  $\mu$ m column (4.6 mm $\times$ 250 mm)。流动相为 30%乙腈水

溶液,检测波长为 210 nm,流速为 0.6 mL/min。各种氨基酸的浓度,包括 L-精氨酸、甘氨酸、L-鸟氨酸,采用柱前衍生邻苯二甲醛法测定<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于进化树分析的酶挖掘

随着高通量测序技术的不断发展,基因组序列数据日益丰富,为挖掘新酶提供了丰富的基因资源,迄今已有 2 400 种 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶(AGAT)被测序报道,但相关研究较少,这导致该酶在非天然宿主中的表达和活性具有不可预测性。为了获得能在 *B. subtilis* 168 中具有较高催化能力的 AGAT,本研究基于数据库中注释为 AGAT 的已知或预测序列,构建 AGAT 蛋白质系统进化树(图 1B)。经前人研究发现来源于拟无枝杆菌(*Amycolatopsis kentuckyensis*)的 *AkAGAT* 催化效率较好,因此选择了与其亲缘性相近的 *AtAGAT* [来源于土地放线动孢菌(*Actinokineospora terrae*)]、*CrAGAT* [来源于拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)];此外,还选择了关系较远的 *HsAGAT* [来源于智人(*Homo sapiens*)]、*MpAGAT* [来源于丝状蓝藻(*Moorea producen*)]进行克隆表达,比较其酶活及催化效率。

将构建好的携带不同 AGAT 的 pMA5 质粒在 *B. subtilis* 168 中过表达,分别获得重组菌 *Bs-AkAGAT*、*Bs-AtAGAT*、*Bs-CrAGAT*、*Bs-HsAGAT*、*Bs-MpAGAT*。如图 1C 所示,不同来源的 AGAT 均可以在 *B. subtilis* 168 中表达,蛋白质分子大小约 43–45 kDa,但是来源不同的 AGAT 表达水平相差较多,其中 *C. raciborskii* AWT205 来源的 *CrAGAT* 表达效果最好,并且 *CrAGAT* 酶活力最高(表 3),其粗酶酶活力为 (4.23 $\pm$ 0.07) U。结合全细胞转化验证不同来源

AGAT 生产 GAA 能力, 结果如图 1D 所示, 在 *B. subtilis* 168 中过表达来源于 *C. raciborskii* AWT205 的 CrAGAT 能够实现 GAA 的高效生产, 产量为 1.36 g/L, 底物甘氨酸转化率为 11.62%。因此选择 *B. subtilis* 168/pMA5-CrAGAT 进行后续研究, 将其命名为 *Bs-1* 菌株。

## 2.2 优化 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶的表达

由上述结果可知 *Bs-1* 菌株转化 L-精氨酸和甘氨酸为 GAA 的效率较低, 导致大量的 L-精氨酸和甘氨酸仍残留在转化体系中。另外, 鉴于质粒需要额外的选择压力维持其在细胞内表达的特点, 选择将 CrAGAT 在枯草芽孢杆菌染色体中进行整合表达。在强启动子 P<sub>43</sub> 的调控下, 将 CrAGAT 整合至基因组上的 *yqhB* 位点(*B. subtilis* 168 基因组上的假基因位点), 得到菌株 *Bs-2*。同时, 选择双启动子 P<sub>laps</sub><sup>[21]</sup> 和枯草芽孢杆菌中常用的强启动子 P<sub>566</sub> 启动子<sup>[22]</sup> 替换 P<sub>43</sub> 启动子, 获得 *Bs-3*、*Bs-4* 菌株(图 2A), 以验证 AGAT 在不同启动子调控下合成 GAA 的情况。如图 2B 所示, AGAT 在 P<sub>laps</sub> 启动子调控下转化效率最高, GAA 的产量为 1.98 g/L, 底物甘氨酸转化率为 16.92%, 使用 P<sub>43</sub> 启动子和 P<sub>566</sub> 启动子对于 GAA 的产量提升没有明显效果。

在重组菌株 *Bs-3* 的基础上, 进一步增加 AGAT 的拷贝数, 分别构建 2 拷贝、3 拷贝、

4 拷贝 P<sub>laps</sub>-*agat* 整合表达的菌株, 获得菌株 *Bs-5*、*Bs-6*、*Bs-7*。测试多拷贝整合表达后 AGAT 粗酶的催化活力, 并利用全细胞催化验证这些菌株的 GAA 转化能力。结果如表 4 所示, 随着拷贝数的增加, 其催化活力逐渐增加, 但相较于 3 拷贝时, 4 拷贝整合时其粗酶酶活并未增加。GAA 生产能力如图 2B 所示, 当整合 3 拷贝时, GAA 产量为 3.88 g/L, 底物甘氨酸的转化率为 33.16%, 继续整合 4 拷贝时, GAA 产量并未继续提高, 这表明 *agat* 基因拷贝数的增加在一定程度上能提高 GAA 产量, 但并不是呈正相关, 还受到多方面的因素的影响。

## 2.3 解除关键酶的反馈抑制, 促进底物再生

利用 *Cre/lox* 重组系统将菌株 *Bs-6* 中 *argI* (编码精氨酸酶)、*nosA* (编码一氧化氮合酶)<sup>[23]</sup> 进行单独和组合敲除(图 3A), 获得菌株 *Bs-8*、*Bs-9*、*Bs-10*, 利用这些菌株进行全细胞催化生产 GAA。与菌株 *Bs-6* 相比, 敲除 *argI*、*nosA*、*argI* 和 *nosA* 后所获得的菌株生长状况无明显变化, 但这些策略只是略微增加了 L-精氨酸的浓度, GAA 的产量并未明显提升(图 3C)。同时, 转化体系中仍残留较多的 L-鸟氨酸, 曾有报道 L-鸟氨酸作为 GAA 生产的副产物对 CrAGAT 酶活具有强烈抑制作用<sup>[17]</sup>。

表 3 本研究中不同来源 AGAT 粗酶酶活力

Table 3 Enzyme activity of AGAT from different sources in this study

Enzyme	Source	Protein size (kDa)	Crude enzyme activity (U)
AkAGAT	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	43	3.23±0.05
AtAGAT	<i>Actinokineospora terrae</i>	45	0.50±0.04
CrAGAT	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> AWT205	44	4.23±0.07
HsAGAT	<i>Homo sapiens</i>	43	1.44±0.02
MpAGAT	<i>Moorea producens</i>	44	—

“—” represents no enzyme activity detected.



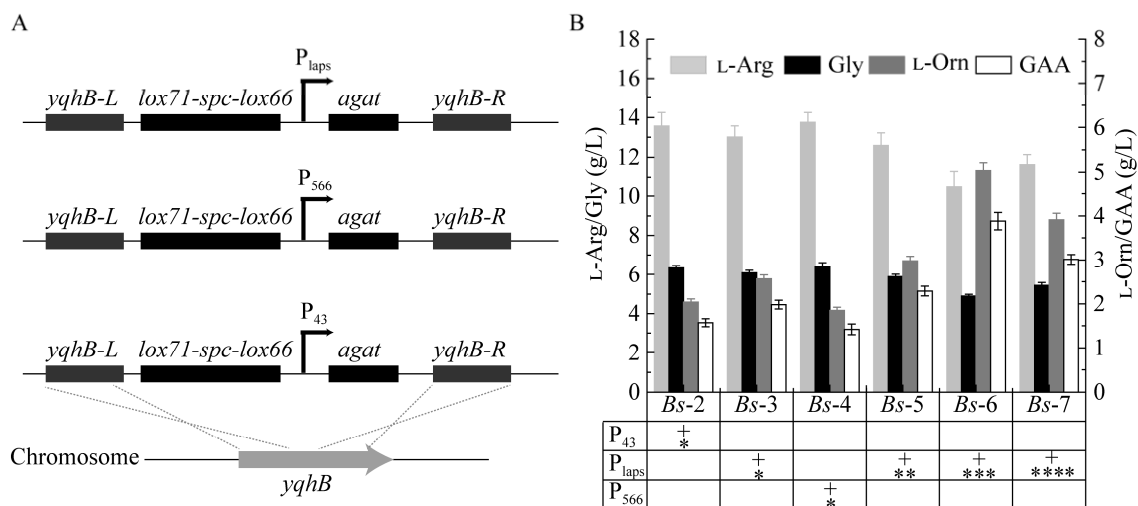


图 2 AGAT 基因组整合表达(A)及其对 GAA 生产的影响(B) “+”代表使用该启动子，“\*”代表基因拷贝数

Figure 2 Integration expression of AGAT in the genome (A) and its effect on GAA production (B). “+” represents the use of this promoter and “\*” represents gene copy number.

表 4 基因拷贝数对 AGAT 粗酶酶活力的影响  
Table 4 Effect of gene copy number on enzyme activity of AGAT

Promoter	Gene copy number	Crude enzyme activity (U)
P <sub>laps</sub>	1	5.43±0.07
P <sub>laps</sub>	2	8.21±0.05
P <sub>laps</sub>	3	13.67±0.10
P <sub>laps</sub>	4	12.98±0.07

在 *B. subtilis* 168 中, 由 *argF* 编码的鸟氨酸氨基甲酰转移酶能够催化 L-鸟氨酸转化为瓜氨酸, 再由 *argG* 和 *argH* 编码的精氨酸琥珀酸合酶和精氨酸琥珀酸裂解酶催化瓜氨酸到 L-精氨酸的合成。为了促进 L-鸟氨酸的转化, 解除其对 AGAT 酶的反馈抑制作用, 将谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 来源的 *argF*、*argG* 和 *argH* 在 *B. subtilis* 168 中过表达。在 *argI* 位点利用强启动子 P<sub>43</sub> 过表达 *argF*, 在 *nosA* 位点过表达 *argGH* 操纵子, 分别获得菌株 Bs-11、Bs-12 (图 3B)。其中, Bs-12 表现出更好的 GAA 生产能力, 其

产量为 5.57 g/L, 提升了 29.53%, 转化体系中 L-鸟氨酸的积累明显减少, 底物甘氨酸的转化率为 47.61%。这说明增加鸟氨酸循环代谢流量以促进 L-鸟氨酸产生 L-精氨酸, 一方面可以缓解 L-鸟氨酸对 AGAT 的抑制作用, 另一方面可以增加 GAA 生物合成所需的 L-精氨酸。

### 2.4 改善底盘细胞膜通透性

枯草芽孢杆菌作为一种革兰氏阳性菌, 利用其进行全细胞催化法生产目标产物时, 必须考虑到细胞被膜的屏障作用。为了提高目标产物 GAA 的产量, 参与反应的底物以及产物需要能够自由进出细胞。在不破坏细胞整体结构的情况下, 改造细胞形态相关蛋白, 是改善底盘细胞的通透性的一种可用策略<sup>[24]</sup>。N-乙酰胞壁-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, LytC)是一类广泛存在于细菌中的酶类, 它切割胞壁酸的乳酰基和 L-丙氨酸的氨基之间的酰胺键, 以释放肽部分, 从而参与细菌

细胞壁的合成、修复和降解过程<sup>[25]</sup>。为了验证 LytC 对 *B. subtilis* 168 细胞膜通透性的影响, 利用强启动子  $P_{43}$  过表达水解酶 LytC, 获得菌株 *Bs*-13。此外, 在全细胞催化中, 通常也会采用有机溶剂或表面活性剂一定程度地破坏细胞被膜, 从而改善物质的进出。因此, 在 *Bs*-12 全细胞转化中分别加入 1% 的曲拉通 X-100、吐温 80, 以比较基因层面和外界条件对 *B. subtilis* 168 细胞膜通透性的影响。

由图 4 可以看出, 曲拉通 X-100、吐温 80 的加入确实一定程度上改善 GAA 的生产, 其中 1% 曲拉通 X-100 效果最好, 但是当过表达 LytC 时, 其表现出优于曲拉通 X-100、吐温 80 的细胞通透性, 并且过表达 LytC 后细胞仍处于

正常生长状态, GAA 转化产量提高 11.8%, 达到 6.23 g/L, 说明细胞壁的部分降解影响了细胞通透性, 并促进 GAA 产量增加。根据上述结果, 将 LytC 过表达与转化体系添加 1% 曲拉通 X-100 或 1% 吐温 80 策略结合以进一步改善细胞通透性, 但是均未得到更好的效果, 因此菌株 *Bs*-13 转化体系中不需要添加细胞通透剂, 这也节约了生产成本。

## 2.5 全细胞催化合成胍基乙酸的条件优化

全细胞催化的本质是利用细胞内的酶参与催化反应。温度和 pH 对酶活性的影响较大, 同时本实验所用的 AGAT 属于胞内酶, 酶量与菌体量呈正相关, 因此本研究考察了不同温度、pH、菌体浓度对转化过程的影响。

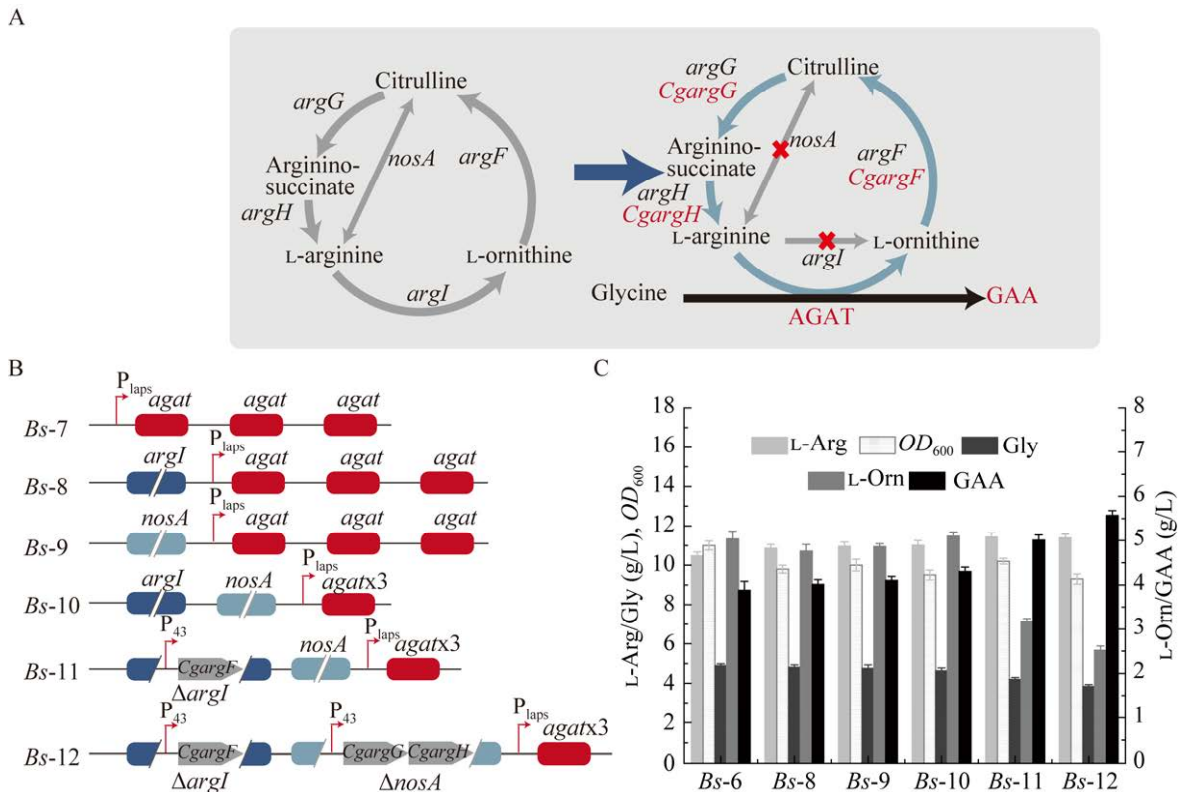


图 3 *Bacillus subtilis* 168 中鸟氨酸循环的设计(A)及改造策略(B)、对 GAA 生产的影响(C)

Figure 3 L-ornithine cycle design in *Bacillus subtilis* 168 (A) and modification strategies (B), and the impact on GAA production (C).

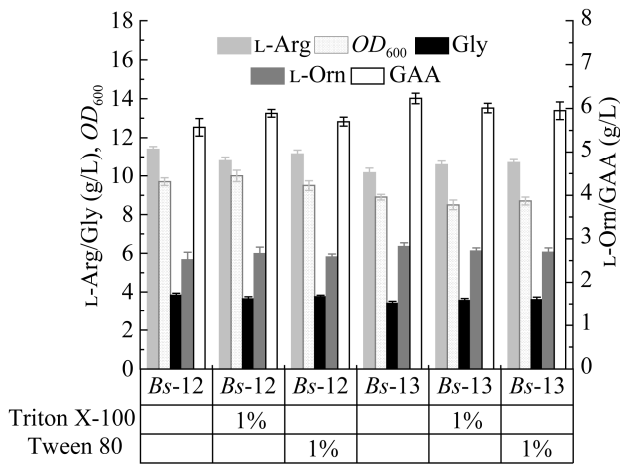


图 4 细胞膜通透性对 GAA 生产的影响 “1%”表示在转化体系中加入 1% (体积分数)该物质  
Figure 4 Effect of cell membrane permeability on GAA production. “1%” means 1% (volume fraction) of the substance is added to the conversion system.

由图 5A 所示, 在 25–35 °C 中, 随着温度的升高, GAA 的浓度呈现出由低到高的趋势, 在 35 °C 时 GAA 产量最高为 7.01 g/L, 但当温度超过 35 °C 时, GAA 产量呈现降低的趋势。这是由于当温度超过酶的最适温度时, 酶的结构会受到破坏, 导致酶活性降低, 因此选择最适转化温度 35 °C。由图 5B 可以看出, 当转化 pH 在 7.0 以下时催化效率较低, GAA 产量不高; 当 pH 在 7.0–8.0 之间时催化效率较高, 说明在此区间酶活性较高, 其中 pH 为 8.0 时 GAA 浓度最高, 转化 24 h 后转化液中 GAA 的含量可达到 7.55 g/L。当 pH > 8.0 时, GAA 浓度下降, 因此选择最适初始 pH 为 8.0。由图 5C 可以看出, 设置菌体浓度 ( $OD_{600}$ ) 范围为 10–60, 当菌体浓度 ( $OD_{600}$ )

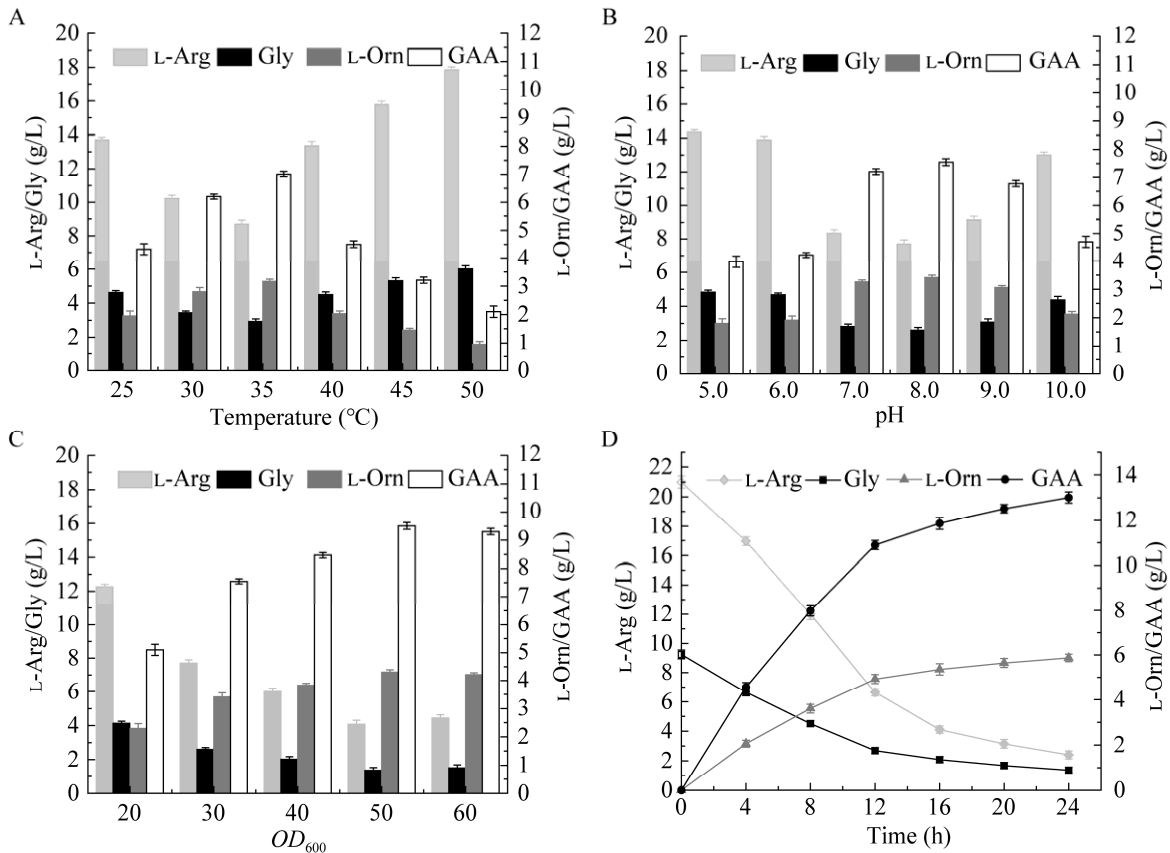


图 5 不同温度(A)、pH(B)、菌体浓度(C)对全细胞催化产 GAA 的影响及 5 L 反应器中全细胞催化产 GAA (D)

Figure 5 Effects of different temperatures (A), pH (B), cell concentrations (C) on whole-cell catalysis of GAA production, and whole cell catalysis of GAA production in a 5 L reactor (D).

为 20–50 之间时随着菌体浓度的增大, 转化液中 GAA 的含量不断增加。当菌体浓度( $OD_{600}$ )为 50 时, 酶的催化速率最高, 但菌体浓度( $OD_{600}$ )>50 时单位时间内产物增加并不明显, 可能是因为菌体浓度过高, 不利于物质进出细胞, 因此选择最适菌体浓度( $OD_{600}$ )为 50。在温度为 35 °C、pH 8.0、菌体浓度( $OD_{600}$ )为 50 的条件下转化 24 h 后, 转化液中 GAA 的含量为 9.51 g/L, 产量提高 52.64%。

## 2.6 5 L 反应器全细胞催化合成胍基乙酸

为验证重组菌 *Bs-13* 在大体系中的转化水平, 在 5 L 反应器中进行初步测试。用 1 L 100 mmol/L 的 Tris-HCl 转化体系液悬浮 *Bs-13* 菌体, 控制反应温度 35 °C、初始 pH 8.0、菌体浓度( $OD_{600}$ )为 50 的条件, 于 5 L 反应器中进行全细胞催化, 其间控制转速为 140 r/min, 利用氨水控制反应体系 pH 维持在 8.0, 转化结束后利用 HPLC 分析检测各组分含量。结果如图 5D 所示, 前期转化速率较快, 转化后期由于转化时间较长, 酶活力逐渐丧失, GAA 的产生速率逐渐降低, 在 20–24 h GAA 产生较少。由于在反应器中能够维持反应体系 pH 稳定, 因此与摇瓶相比, 5 L 反应器中 GAA 生产能力更好。转化 24 h 后, GAA 产量为 13.1 g/L, 平均转化速率为 0.54 g/(L·h), 底物甘氨酸的转化率为 92.7%。以上结果表明, 本研究构建的重组枯草芽孢杆菌具有在大体系中稳定转化 L-精氨酸和甘氨酸产生胍基乙酸的能力, 有望用于工业化生产。

## 3 讨论与结论

目前, 胍基乙酸已成功应用于食品、饲料、医学等行业, 有着广泛的应用前景。Zhang 等<sup>[12]</sup>在大肠杆菌中通过模块化工程构建了胍基乙酸、瓜氨酸、L-精氨酸合成模块, 缓解 L-鸟氨酸的抑制作用, 提高了生物催化剂的效率, 在 22 h 的

生物转化中获得 8.61 g/L 胍基乙酸, 第一次实现了生物法合成胍基乙酸。Yan 等<sup>[13]</sup>通过在枯草芽孢杆菌中构建胍基乙酸合成途径, 利用核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)和 N-末端编码序列(N-terminal coding sequence, NCS)策略提高关键酶的表达水平, 并敲除宿主菌中的底物降解途径, 最终在 20 h 的生物转化中获得 4.26 g/L 胍基乙酸。针对目前已报道的生物法合成胍基乙酸生产率低、安全性等问题, 本研究对 *C. raciborskii* AWT2051 来源的 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶在食品级安全菌株枯草芽孢杆菌中进行克隆表达, 开发了胍基乙酸合成的全细胞生物催化方法。利用强启动子调控 *agat*, 并将基因多拷贝整合至枯草芽孢杆菌染色体上, 实现了 AGAT 的高效表达, AGAT 胞内酶活提高至(12.98±0.07) U, 胍基乙酸产量提高 1.85 倍, 产量达到 3.88 g/L, 这一策略相比于 Yan 等<sup>[13]</sup>通过优化 RBS 和 NCS 提高 AGAT 的表达效果更好。由于副产物 L-鸟氨酸随着胍基乙酸生产的积累存在对 AGAT 的抑制问题, 在研究中利用谷氨酸棒杆菌中的 L-鸟氨酸到 L-精氨酸的高效合成途径, 重建枯草芽孢杆菌中的 L-鸟氨酸循环, 促进 L-鸟氨酸向 L-精氨酸的分解代谢, 并敲除底物 L-精氨酸的降解途径。在该体系中, L-精氨酸从共底物转化为辅助因子, 并被有效的循环利用, L-鸟氨酸的积累显著降低, 其残留量降低了 50%, 有效缓解了副产物 L-鸟氨酸对 AGAT 的反馈抑制作用, L-鸟氨酸循环的构建促使胍基乙酸的合成, 较未优化之前提高了 43.5%, 产量提高至 5.57 g/L, 重建的鸟氨酸循环可应用于其他胍类化合物的生物合成。此外, 在全细胞催化法生产中, 需要考虑物质能够高效进出细胞的问题, 为此, 本研究过表达 *LytC* 促进细胞壁的部分降解, 并向转化体系中添加细胞通透剂比较其细胞通透性的改善情况, 发现过表达 *LytC* 后细胞仍处于

正常生长状态,且与细胞通透剂相比更有利于底物和产物的进出,胍基乙酸产量较之前提高11.8%,达到6.23 g/L,这与Kabisch等<sup>[26]</sup>和Feng等<sup>[27]</sup>研究发现过表达LytC可以改善谷氨酸棒杆菌细胞膜的通透性从而提高5-ALA产量的研究结果相一致。

综上所述,本研究构建的重组枯草芽孢杆菌具有应用于工业生产胍基乙酸的潜力,仅需加入少量的底物就能够实现胍基乙酸的高效生产,有助于降低成本。在优化的转化条件下,在5 L反应器中进行全细胞转化24 h后,生产胍基乙酸13.1 g/L,平均转化速率为0.54 g/(L·h),底物甘氨酸的转化率为92.7%,这是目前报道的最高转化率。同时,本研究为实现胍基乙酸的绿色高效合成奠定了理论和应用基础。

## REFERENCES

- [1] WYSS M, KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(3): 1107-1213.
- [2] OSTOJIC SM. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid[J]. *European journal of nutrition*, 2015, 54(8), 1211-1215.
- [3] HIGGINS AR, HARPER HA, KLINE EF, MERRILL RS, JONES RE, SMITH TWD, KIMMEL JR. Effects of creatine precursors in arthritis; clinical and metabolic study of glycoamine and betaine[J]. *California Medicine*, 1952, 77(1): 14-18.
- [4] WATKINS AL. Betaine and glycoamine in treatment of poliomyelitis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1953, 248(15): 621-623.
- [5] LIVERSEDGE LA. Glycoamine and betaine in motor-neurone disease[J]. *Lancet*, 1956, 271(6953): 1136-1138.
- [6] ALDES JH. Glycoamine betaine as an adjunct in the treatment of neuromuscular disease patients[J]. *The Journal of the Arkansas Medical Society*, 1957, 54(5): 186-194.
- [7] OSTOJIC SM, STOJANOVIC M, DRID P, HOFFMAN JR. Dose-response effects of oral guanidinoacetic acid on serum creatine, homocysteine and B vitamins levels[J]. *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(8): 1637-1643.
- [8] ZHANG BL, LIU N, KANG K, ZHANG RB, HAO ML, SONG PY, WANG QR, XIE YX, LI CT. Dietary guanidinoacetic acid supplementation ameliorated meat quality and regulated muscle metabolism of broilers subjected to pre-slaughter transport stress by metabolomics analysis[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(4): 101739.
- [9] TAES YEC, MARESCAU B, de VRIESE A, de DEYN PP, SCHEPERS E, VANHOLDER R, DELANGHE JR. Guanidino compounds after creatine supplementation in renal failure patients and their relation to inflammatory status[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2008, 23(4): 1330-1335.
- [10] OSTOJIC SM, NIESS B, STOJANOVIC M, OBRENOVIC M. Creatine metabolism and safety profiles after six-week oral guanidinoacetic acid administration in healthy humans[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2013, 10(2): 141-147.
- [11] OSTOJIC SM, STOJANOVIC MD, HOFFMAN JR. Six-week oral guanidinoacetic acid administration improves muscular performance in healthy volunteers[J]. *Journal of Investigative Medicine: the Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 2015, 63(8): 942-946.
- [12] ZHANG YW, ZHOU H, TAO Y, LIN BX. Reconstitution of the ornithine cycle with arginine: glycine amidinotransferase to engineer *Escherichia coli* into an efficient whole-cell catalyst of guanidinoacetate[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2066-2075.
- [13] YAN K, TIAN RZ, ZHANG LP, LV XQ, LIU L, LIU YF. Biosynthesis of guanidinoacetate by *Bacillus subtilis* whole-cell catalysis[J]. *Fermentation*, 2022, 8(3): 116.
- [14] ZHAO L, TIAN RZ, SHEN QY, LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced N-acetylneuraminic acid production via whole-cell biocatalysis[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(7): e1800682.
- [15] 康倩, 向梦洁, 张大伟. 枯草芽孢杆菌在系统与合成生物技术中研究进展及工业应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 923-938.  
KANG Q, XIANG MJ, ZHANG DW. Research progress and industrial application of *Bacillus subtilis* in systematic and synthetic biotechnology[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 923-938 (in Chinese).

- [16] van DIJL JM, HECKER M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 3.
- [17] MUENCHHOFF J, SIDDIQUI KS, POLJAK A, RAFTERY MJ, BARROW KD, NEILAN BA. A novel prokaryotic L-arginine:glycine amidinotransferase is involved in cylindrospermopsin biosynthesis[J]. The FEBS Journal, 2010, 277(18): 3844-3860.
- [18] YAN X, YU HJ, HONG Q, LI SP. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5556-5562.
- [19] 周祺, 吕雪芹, 柴雪莹, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 刘龙. 枯草芽孢杆菌全细胞催化高效合成  $\alpha$ -熊果苷[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(22): 1-7.
- ZHOU Q, LYU XQ, CHAI XY, LIU YF, LI JH, DU GC, LIU L. Highly efficient synthesis of  $\alpha$ -arbutin by whole-cell catalysis of *Bacillus subtilis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(22): 1-7 (in Chinese).
- [20] ZHANG DL, GUAN D, LIANG JB, GUO CQ, XIE XX, ZHANG CL, XU QY, CHEN N. Reducing lactate secretion by *ldhA* deletion in L-glutamate-producing strain *Corynebacterium glutamicum* GDK-9[J]. Publication of the Brazilian Society for Microbiology, 2014, 45(4): 1477-1483.
- [21] YANG MM, ZHANG WW, JI SY, CAO PH, CHEN YL, ZHAO X. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56321.
- [22] ABOLBAGHAEI A, SILKE JR, XIA XH. How changes in anti-SD sequences would affect SD sequences in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2017, 7(5): 1607-1615.
- [23] WANG MZ, XU MJ, RAO ZM, YANG TW, ZHANG X. Construction of a highly efficient *Bacillus subtilis* 168 whole-cell biocatalyst and its application in the production of L-ornithine[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(11): 1427-1437.
- [24] 冯丽丽, 王智文. 形态工程在生物基化学品生产中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2211-2222.
- FENG LL, WANG ZW. Development of morphology engineering for production of bio-based chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(7): 2211-2222 (in Chinese).
- [25] LUPOLI TJ, TANIGUCHI T, WANG TS, PERLSTEIN DL, WALKER S, KAHNE DE. Studying a cell division amidase using defined peptidoglycan substrates[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(51): 18230-18231.
- [26] KABISCH J, THÜRMER A, HÜBEL T, POPPER L, DANIEL R, SCHWEDER T. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(2): 97-104.
- [27] FENG LL, ZHANG Y, FU J, MAO YF, CHEN T, ZHAO XM, WANG ZW. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(6): 1284-1293.

(本文责编 郝丽芳)