

钝齿棒杆菌的代谢改造：L-鸟氨酸与 L-瓜氨酸 合成菌株的构建

赵芹芹¹ 罗玉常¹ 窦文芳^{1*} 张晓梅¹ 耿燕¹ 许正宏^{1,2}

(1. 江南大学 药学院 制药工程研究室 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：【目的】对一株产 L-精氨酸的钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) SYPA5-5 进行代谢工程改造，构建 L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸合成菌株，并考察其发酵生产相应氨基酸的性能。【方法】分别敲除菌株 SYPA5-5 鸟氨酸氨甲酰转移酶(Ornithine carbamoyltransferase, OTC)的编码基因 *argF* 和精胺琥珀酸合成酶(Argininosuccinate synthase, ASS)的编码基因 *argG*，构建能够合成 L-鸟氨酸及 L-瓜氨酸的重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 和 SYPA5-5 Δ *argG*；考察不同营养条件对上述重组菌株生长和相应氨基酸积累的影响。【结果】添加 0.3 g/L L-精氨酸可满足 SYPA5-5 Δ *argF* 的生长及 L-鸟氨酸积累所需，L-鸟氨酸产量可达 21.5 g/L；添加 L-精氨酸有利于 SYPA5-5 Δ *argG* 的生长，但不利于 L-瓜氨酸的积累；不添加 L-精氨酸时，L-瓜氨酸产量可达 15.2 g/L，同时积累 6.8 g/L 的 L-谷氨酸。【结论】分别敲除 L-精氨酸生产菌株 SYPA5-5 的 *argF* 及 *argG* 基因，可实现 L-精氨酸合成途径的中间代谢物 L-瓜氨酸和 L-鸟氨酸的积累，拓展了该菌株的工业应用范围。

关键词：L-鸟氨酸，L-瓜氨酸，钝齿棒杆菌，鸟氨酸氨甲酰转移酶，*argF*，精胺琥珀酸合成酶，*argG*

Engineering *Corynebacterium crenatum* for construction of L-Ornithine and L-Citrulline producers

ZHAO Qin-Qin¹ LUO Yu-Chang¹ DOU Wen-Fang^{1*} ZHANG Xiao-Mei¹ GENG Yan¹
XU Zheng-Hong^{1,2}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] L-Ornithine and L-Citrulline producers were constructed based on the L-Arginine producer *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5 and their fermentative performances were evaluated. [Methods] *argF* encoding ornithine carbamoyltransferase (OTC) and *argG* encoding argi-

基金项目：国家 863 计划项目(No. 2012AA022102)

*通讯作者：Tel：86-510-85918206；✉：douwenfang@aliyun.com

收稿日期：2014-01-18；接受日期：2014-03-26；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-06-18

ninosuccinate synthase (ASS) were deleted respectively in SYPA5-5 to block the biosynthetic pathway that converting L-Ornithine and L-Citrulline to L-arginine. Two recombinant strains SYPA5-5 Δ *argF* and SYPA5-5 Δ *argG* were constructed. The influence of different L-arginine concentration on growth and amino acids accumulation of the recombinant strains were determined. [Results] SYPA5-5 Δ *argF* kept well growth status with the fermentation media supplied with 0.3 g/L L-arginine and the growth rate was similar to SYPA5-5. SYPA5-5 Δ *argF* had the capacity of producing 21.5 g/L L-Ornithine. On the contrary, L-arginine had no use for SYPA5-5 Δ *argG* to enhance the productivity of L-Citrulline even though it contributed to improve cell growth. SYPA5-5 Δ *argG* produced 15.2 g/L L-Citrulline with the original media without adding L-arginine, and it produced 6.8 g/L L-glutamate simultaneously. [Conclusion] Deleting *argF* and *argG* respectively in SYPA5-5 made it accumulate high concentration of L-Ornithine and L-Citrulline. These expanded the applied scope of SYPA5-5 in amino acids industry.

Keywords: L-Ornithine, L-Citrulline, *Corynebacterium crenatum*, Ornithine carbamoyltransferase, *argF*, Argininosuccinate synthase, *argG*

L-鸟氨酸(L-Ornithine)和 L-瓜氨酸(L-Citrulline)均为非蛋白质氨基酸,是尿素循环的重要中间代谢产物,因具有重要的生理功能而广泛应用于食品、医药及化工领域。微生物发酵法有节能环保、易提取分离等优点,具有重要的工业化应用价值^[1]。

实现微生物发酵法生产氨基酸的关键在于高产菌株的选育。代谢工程作为理性育种的技术手段被广泛应用于工业微生物的改造。目前,该技术已应用于 L-鸟氨酸及 L-瓜氨酸高产菌株的构建。Lee Y. J. 等构建的大肠杆菌 W3110 (Δ *argF* Δ *argR* Δ *proB* Δ *speF*, ParaB-*arg214*) 在添加谷氨酸的条件下发酵,可积累 13.2 mg/g (Dry cell weight) L-鸟氨酸^[2]; Jiang L. Y. 等构建的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 (Δ *argF* Δ *argR* Δ *proB* Δ *speE*), 经生长偶联的菌株驯养后,可积累 17.2 g/L L-鸟氨酸^[3]。1964 年, Okumura S. 等首先报道应用精氨酸营养缺陷型的枯草芽孢杆菌发酵生产 L-瓜氨酸^[4]; 谢红翠等构建的谷氨酸棒杆菌 1006 (Δ *argG*, pXMJ19-*lacI-argCJBDF*), 可积累 4.6 g/L L-瓜氨酸^[5]。但上述 L-鸟氨酸及 L-瓜氨酸生产菌株仍存在产量不高或携带外源质粒等问题^[6], 限制了其工业化应用。

钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) SYPA5-5 是本研究室经过多级诱变筛选获得的一株 L-精氨酸高产菌株, 利用葡萄糖为碳源, 摇瓶发酵 96 h 可积累约 30 g/L L-精氨酸^[7-8]。L-精氨酸

的生物合成是以 L-谷氨酸为前体, 先通过 5 步酶促反应生成 L-鸟氨酸; 再经鸟氨酸氨甲酰转移酶 (Ornithine carbamoyltransferase, OTC) 将 L-鸟氨酸转化为 L-瓜氨酸; 最后, 在精胺琥珀酸合成酶 (Argininosuccinate synthase, ASS) 和精胺琥珀酸裂解酶 (Argininosuccinase, ASL) 催化下合成 L-精氨酸^[9]。前期研究表明, SYPA5-5 发酵生产 L-精氨酸的过程中, 中间代谢物 L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸的积累量较低。本研究以 SYPA5-5 为出发菌株, 分别敲除其编码鸟氨酸氨甲酰转移酶和精胺琥珀酸合成酶的基因 *argF* 和 *argG*, 阻断 L-鸟氨酸及 L-瓜氨酸进一步合成 L-精氨酸的途径, 构建了能够积累 L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸的重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 和 SYPA5-5 Δ *argG*, 并研究了其发酵性能, 为实现采用糖质原料直接发酵生产上述氨基酸奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

C. crenatum SYPA5-5 及 pK18mobsacB 均由本实验室保藏^[7,10]; pMD19-T simple vector 购自大连宝生物工程有限公司; *E. coli* JM109 购自上海生物工程有限公司; 重组质粒 pMD19-T Δ *argF*、pMD19-T Δ *argG* 及 pK18mobsacB Δ *argF*、pK18mobsacB Δ *argG* 均由本实验构建。本研究使用的引物见表 1。

表 1 本研究所用的引物 Table 1 The primers used in this study		
引物名称 Primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
F1	GAGGATCCACTTATGACTTCACAACCACAGG	<i>Bam</i> H I
F2	TCTAGTATGCTTAAACACCAGGTACACAGCCTTCTTAC	—
F3	TGTTTAAGCATACTAGAGTGATTGATGGACCAGCGTC	—
F4	GAGTCGACGATCTGTAGAAACCAGCAGTTCATC	<i>Sal</i> I
G1	GAGAATTCGAAGGAGCACACCTCATGACTAACC	<i>Eco</i> R I
G2	TCCAGTATCGATTACAGGTGCAATGATCTCCAGGTTTG	—
G3	TGTAAATCGATACTGGACACGTTGGGCTGAGGAAGTATAC	—
G4	GAGTCGACGTGGCTAGATCTTCATCAGAAAGTAG	<i>Sal</i> I

1.2 工具酶及试剂

少量质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司 ; *Pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA ligase、*Bam*H I、*Eco*R I 及 *Sal* I 限制性内切酶购自 Thermo 公司 ; *Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等购自大连宝生物工程有限公司 ; 卡那霉素及氨苄霉素及 L-精氨酸、L-鸟氨酸、L-瓜氨酸等生化试剂购自上海生工生物工程有限公司 ; 其它试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基及培养方法

斜面培养基、种子培养基及发酵培养基均按文献[11]配制。

钝齿棒杆菌的菌种活化及种子培养均按文献[11]进行，钝齿棒杆菌按 5% (体积比)的接种量接种于摇瓶发酵培养基中，于 30 ℃、120 r/min 往复式摇床培养。发酵 36 h 后补加 50 g/L 葡萄糖；在发酵过程中，每隔 12 h 取样检测相关指标。

1.4 *argF*和*argG*基因的敲除

以 SYPA5-5 基因组 DNA 为模板，分别以 F1/F2、F3/F4、G1/G2、G3/G4 为引物，扩增 *argF* 上游片段为 517 bp，下游片段 450 bp；*argG* 上游片段 463 bp，下游片段 562 bp，通过 Crossover PCR 扩增获得 *argF* 基因内缺失片段($\Delta argF$) 950 bp，*argG* 基因内缺失片段($\Delta argG$) 1 008 bp。将获得的

$\Delta argF$ 与 $\Delta argG$ 片段连入 pK18mobsac*B* 质粒得到重组质粒 pK18mobsac*B* $\Delta argF$ 及 pK18mobsac*B* $\Delta argG$ 。将重组质粒电转化入 SYPA5-5 感受态细胞中^[12]，经两次同源重组后，挑取转化子，经培养后分别以 F1/F4 及 G1/G4 为引物，进行 PCR 验证。

1.5 发酵参数的测定

1.5.1 菌体生物量的测定: 取一定体积的发酵液并用 0.25 mol/L HCl 稀释，紫外分光光度计测定 *OD*₅₆₂，细菌 *OD* 值与菌体干重的关系为 1 *OD*₅₆₂=0.375 g(DCW)/L^[11]。

1.5.2 葡萄糖含量的测定: 发酵液离心取上清，用 DNS 法测定^[13]。

1.5.3 游离氨基酸的测定: 将发酵液上清稀释适当倍数，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 进行氨基酸含量的测定^[14]。

2 结果与分析

2.1 重组菌株SYPA5-5 $\Delta argF$ 及SYPA5-5 $\Delta argG$ 的构建

按 1.4 中所述方法构建重组质粒 pK18mobsac*B* $\Delta argF$ 及 pK18mobsac*B* $\Delta argG$ ，将重组质粒电转化入 SYPA5-5 中，经两次同源重组，对获取的转化子，提取基因组，进行 PCR 扩增并

送至上海生工测序,结果表明,成功构建了分别敲除 *argF* 和 *argG* 的重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 和 SYPA5-5 Δ *argG*。

2.2 添加不同浓度L-精氨酸对重组菌株发酵产L-鸟氨酸及L-瓜氨酸的影响

菌株 SYPA5-5 分别敲除 L-精氨酸合成途径中的 *argF* 和 *argG* 基因后,可导致 L-精氨酸营养缺陷型。发酵培养基含有一定量的酵母粉,能够提供少量的相应氨基酸,但 L-精氨酸的供应不足可能会影响重组菌的正常生长和产物积累。通过在发酵培养基中添加不同浓度 L-精氨酸,研究其对重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 和 SYPA5-5 Δ *argG* 生物量和产物积累的影响。

2.2.1 不同浓度 L-精氨酸对重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 发酵产 L-鸟氨酸的影响:

在发酵培养基中添加 0–5 g/L 的 L-精氨酸,摇瓶发酵 96 h,结果如图 1A 所示:在添加 0–0.5 g/L L-精氨酸时,菌体生物量及 L-鸟氨酸的产量随 L-精氨酸浓度的增加而增加;随着添加浓度继续增加,菌体生物量及 L-鸟氨酸的产量略有下降。进一步研究了添加 0–0.5 g/L 的 L-精氨酸的影响(图 1B),当 L-精氨酸浓度为 0.3 g/L 时,重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF* 的生物量及 L-鸟氨酸的产量达到最高值,分别为 24.4 g/L 和 21.3 g/L,较不添加 L-精氨酸时的生物量(12.5 g/L)和 L-鸟氨酸产量

(10.7 g/L)均提高约 1 倍。

2.2.2 不同浓度 L-精氨酸对重组菌株 SYPA5-5 Δ *argG* 发酵产 L-瓜氨酸的影响:

在发酵培养基中添加 0–5 g/L L-精氨酸,摇瓶发酵 96 h 后,发酵结果如图 2A 所示:当 L-精氨酸在 0–0.5 g/L 时,该菌体生物量随其添加量的增加而增加;进一步加大其添加浓度,菌体生物量无显著变化,而 L-瓜氨酸的产量却有所降低。进一步研究添加低浓度 L-精氨酸对 SYPA5-5 Δ *argG* 产 L-瓜氨酸的影响(图 2B),结果表明在 0–0.05 g/L 浓度范围内,菌体生物量随添加量的增大而增加,但 L-瓜氨酸产量随添加量的增加而降低,不添加 L-精氨酸时该重组菌生物量最低(12.5 g/L),但 L-瓜氨酸产量(15.2 g/L)最高,单位菌体合成产物的能力最强。这与较低浓度范围内 L-精氨酸对 SYPA5-5 Δ *argF* 产 L-鸟氨酸的影响趋势明显不同。

2.3 菌株摇瓶发酵过程比较

分别考察出发菌株 SYPA5-5 及重组菌株 SYPA5-5 Δ *argF*、SYPA5-5 Δ *argG* 的发酵过程,结果如图 3 所示。添加 0.3 g/L L-精氨酸后,SYPA5-5 Δ *argF* 的生长速率与 SYPA5-5 基本保持一致,发酵结束后其生物量达 23.3 g/L,与后者的 25.5 g/L 相当;而在有利于 SYPA5-5 Δ *argG* 积累 L-瓜氨酸(不添加 L-精氨酸)的条件下,该菌的生物量较 SYPA5-5 低 42.3%,发酵结束后仅为 14.7 g/L。

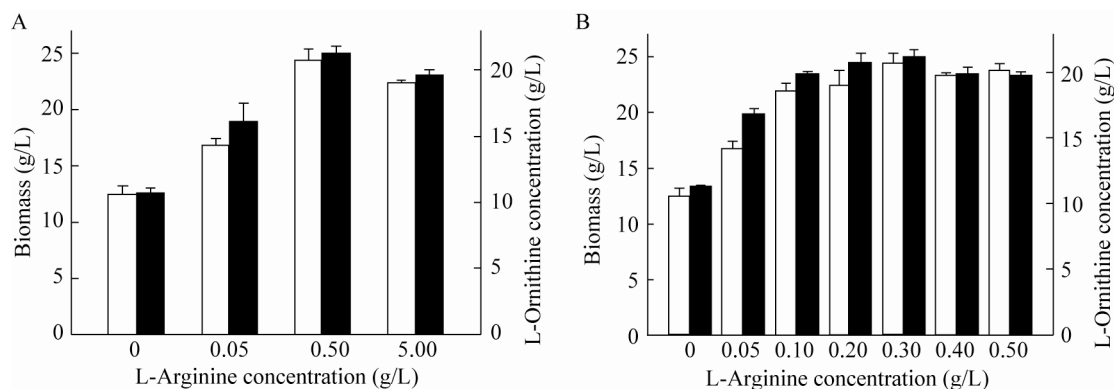


图1 添加不同浓度 L-精氨酸对 SYPA5-5 Δ *argF* 生长(白色)及产 L-鸟氨酸(黑色)的影响
Figure 1 Influence of different L-Arginine concentration on growth (white bars) and L-Ornithine production (black bars) of SYPA5-5 Δ *argF*

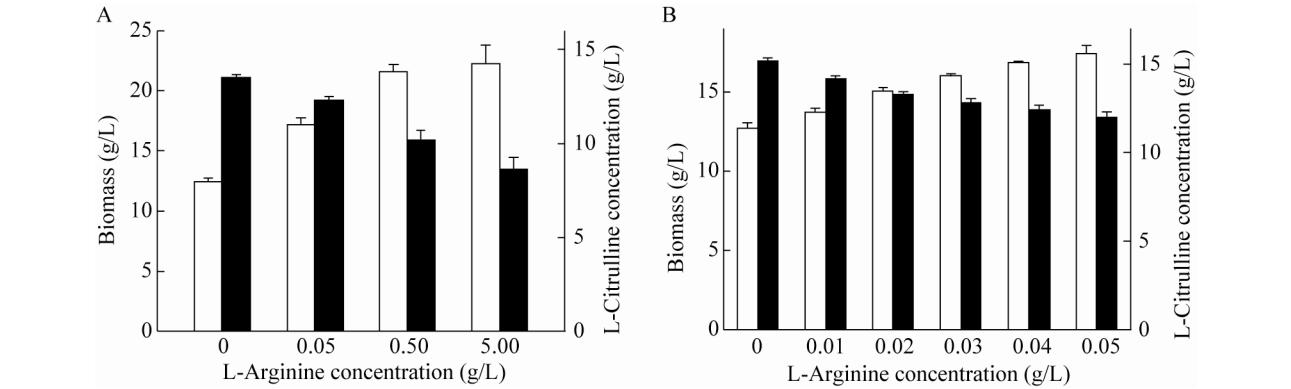


图 2 添加不同浓度 L-精氨酸对 SYPA5-5ΔargG 生长(白色)及发酵产 L-瓜氨酸(黑色)的影响
Figure 2 Influence of different L-Arginine concentration on growth (white bars) and L-Ornithine production (black bars) of SYPA5-5ΔargG

SYPA5-5 可大量积累 L-精氨酸，至发酵结束时产量达 29.6 g/L (图 3A)，同时，积累一定量的 L-瓜氨酸(2.1 g/L)及 L-鸟氨酸(1.8 g/L)，且 L-赖氨酸及 L-异亮氨酸作为副产物也有少量积累(图 3a，表 2)。SYPA5-5ΔargF 可大量积累 L-鸟氨酸，至发酵结束时产量达 21.5 g/L (图 3B)，但发酵液中无 L-瓜氨酸及 L-精氨酸的积累，该结果表明，在 L-精氨酸生产菌株 SYPA5-5 中敲除 *argF* 基因，可阻断 L-鸟氨酸进一步转化为 L-瓜氨酸的合成途径，进而实现 L-鸟氨酸的大量积；该菌发酵液中 L-赖

氨酸的积累量较出发菌株略低，但 L-谷氨酸和 L-天冬氨酸的积累量较出发菌株略高(图 3b，表 2)。SYPA5-5ΔargG 大量积累 L-瓜氨酸，至发酵结束时产量达 15.2 g/L (图 3C)，无 L-精氨酸积累，仅有少量 L-鸟氨酸(0.62 g/L)积累，该结果表明，通过敲除 *argG* 基因可阻断 L-瓜氨酸合成 L-精氨酸的途径，使菌株有效积累 L-瓜氨酸；同时，副产物 L-赖氨酸的积累量大幅度降低，但 L-丙氨酸含量大幅度提高，L-谷氨酸作为 L-瓜氨酸合成的前体物质大量积累，积累量达 6.8 g/L (图 3c，表 2)。

表 2 SYPA5-5 及重组菌发酵液中游离氨基酸含量分析			
Table 2 Analysis of amino acids concentration in the broth of two recombinant strains and SYPA5-5 (g/L)			
氨基酸 Amino acids	菌株 Strains		
	SYPA5-5	SYPA5-5ΔargF	SYPA5-5ΔargG
L-Aspartate	0.06	0.22	0.20
L-Glutamate	0.01	0.39	6.80
L-Citrulline	2.10	—	15.20
L-Arginine	29.60	—	—
L-Alanine	0.10	0.14	1.00
L-Isoleucine	0.76	1.00	0.74
L-Ornithine	1.80	21.50	0.62
L-Lysine	2.10	1.70	0.81

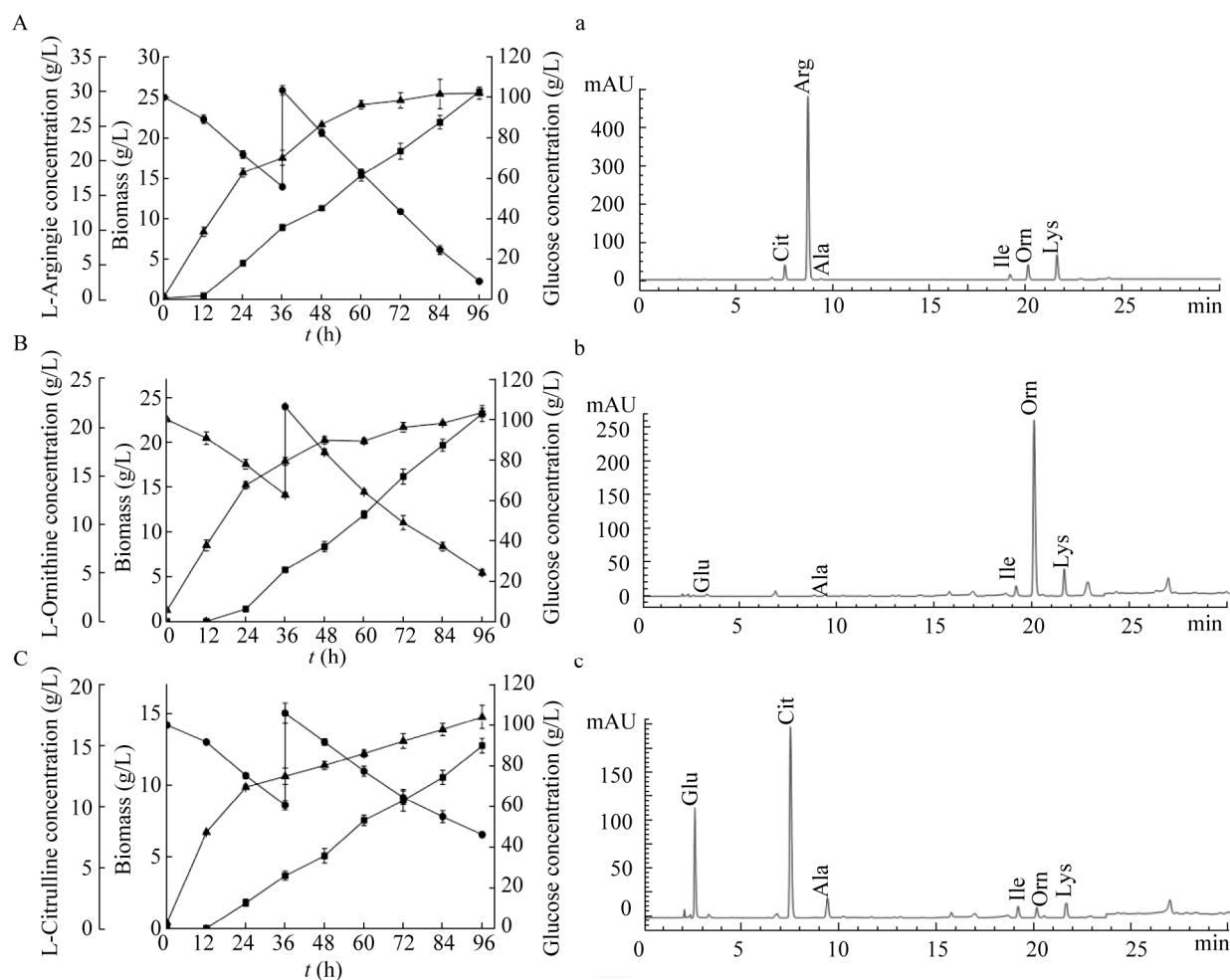


图3 SYPA5-5 (A, a)与 SYPA5-5ΔargF (B, b)及 SYPA5-5ΔargG (C, c)摇瓶发酵过程参数及发酵结束后发酵液的液相色谱分析

Figure 3 Fermentation parameters of SYPA5-5 (A, a), SYPA5-5ΔargF (B, b) and SYPA5-5ΔargG (C, c) over the fermentation course and their amino acids concentration analysis after culturing 96 h

注: ■: L-精氨酸、L-鸟氨酸或 L-瓜氨酸产量; ▲: 菌体生物量; ●: 葡萄糖含量。

Note: ■: L-Arginine, L-Ornithine, L-Citrulline concentration; ▲: Biomass; ●: Glucose concentration.

至发酵结束, SYPA5-5 消耗约 94%的葡萄糖, 糖酸转化效率为 0.22 g L-精氨酸/g 葡萄糖; SYPA5-5ΔargF 消耗约 84%的葡萄糖, 较出发菌株葡萄糖消耗量略低, 糖酸转化率为 0.17 g L-鸟氨酸/g 葡萄糖; SYPA5-5ΔargG 消耗约 69%的葡萄糖, 显著低于出发菌株及 SYPA5-5ΔargF, 糖酸转化效率为 0.15 g L-瓜氨酸/g 葡萄糖。上述结果表明, 两株重组菌株均可利用葡萄糖作为碳源直接发酵合成大量 L-鸟氨酸及 L-瓜氨酸, 但由于基因敲除后对菌体生长产生不同影响, 而导致葡萄糖的利用效率存

在差异。

3 讨论

SYPA5-5 是本实验室经过多级诱变筛选获得的一株 L-精氨酸生产菌株, 对其高产 L-精氨酸的机制^[15]、发酵工艺优化^[8]以及代谢工程改造提高 L-精氨酸产量^[16]等方面进行了相关的研究工作。本研究以 SYPA5-5 作为出发菌株, 通过代谢工程改造分别构建了具有 L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸合成能力的重组菌株。通过 argF 单基因敲除即可使 L-鸟

氨酸的摇瓶发酵产量达 21.5 g/L, 与 Jiang L. Y. 报道的 17.2 g/L 相比, 具有一定的优势^[3]; 通过 *argG* 单基因敲除, 可获得摇瓶发酵产量达 15.2 g/L 的 L-瓜氨酸生产菌株, 处于目前文献报道的直接发酵法生产 L-瓜氨酸的较高水平。上述结果表明了出发菌株 SYPA5-5 及其代谢途径改造的重组菌株对 L-精氨酸合成途径中的相关氨基酸均具有较强的积累能力。

但经过基因敲除后, 重组菌株发酵液中的其它游离氨基酸含量也发生了较大的变化。SYPA5-5 Δ *argF* 的发酵液中 L-天冬氨酸及 L-谷氨酸的含量提高, 可能是由于催化 L-瓜氨酸合成精氨酸琥珀酸的步骤受阻, 因该途径需要天冬氨酸的参与, 导致 L-天冬氨酸消耗降低而积累; 同时, 由于 N-乙酰谷氨酸合成酶及鸟氨酸乙酰转移酶受 L-鸟氨酸反馈抑制作用^[17], L-鸟氨酸的积累可能会对相关酶产生调控作用而导致谷氨酸利用效率下降。SYPA5-5 Δ *argG* 的发酵液中副产物 L-赖氨酸的积累量大幅度降低, 但 L-丙氨酸积累量提高, 这可能是由于 L-精氨酸供给量不足, 导致菌体生长变慢, TCA 循环效率下降, 糖酵解途径中的丙酮酸积累, 使得以草酰乙酸为前体的 L-赖氨酸积累量降低, 以丙酮酸为前体的 L-丙氨酸含量提高; 此外, L-谷氨酸的积累量也可达 6.8 g/L, 此现象可能是由 L-瓜氨酸及 L-精氨酸对代谢途径中的相关酶存在调控作用所致, 但具体的调控机制需进一步探究。

L-瓜氨酸和 L-鸟氨酸微生物细胞工厂的成功构建, 实现了工业微生物资源及其优势代谢途径的高效合理利用, 为直接发酵法生产三种同系富氮氨基酸奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hoche F, Klapperstuck T, Wohlrab J. Effects of L-Ornithine on metabolic processes of the urea cycle in human keratinocytes[J]. Skin Pharmacology and Physiology, 2004, 17(6): 283-288.
- [2] Lee YJ, Cho JY. Genetic manipulation of a primary metabolic pathway for L-Ornithine production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(22): 1849-1856.
- [3] Jiang LY, Zhang YY, Li Z, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for increasing the production of L-Ornithine by increasing NADPH availability[J].

- Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(10): 1143-1151.
- [4] Okumura S, Yokohama-shi, Shibuya M, et al. Method of producing citrulline by bacterial fermentation: United States, 3 282 794[P]. 1966. www.google.com/patents/US3282794.
- [5] 谢红翠, 郝宁, 韦萍, 等. 瓜氨酸生产相关基因簇在谷氨酸棒杆菌中的组成型表达[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2011, 33(4): 43-47.
- [6] Tyo KE, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 760-765.
- [7] 熊筱晶, 窦文芳, 许正宏, 等. L-精氨酸高产菌的诱变育种及其摇瓶产酸条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(2): 10-13.
- [8] 窦文芳, 许正宏, 陶文沂. 碳源及添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 发酵生产 L-精氨酸的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(5): 272-274.
- [9] Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, et al. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway[J]. Microbiology, 1996, 142(pt1): 99-108.
- [10] Schäfer A, Tauch A, Jäger 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.
- [11] 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[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(1): 41-51.
- [12] Van der Rest M, 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] Miller G. Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(1): 426-428.
- [14] 罗玉常, 窦文芳, 张晓梅, 等. 谷氨酸棒杆菌 *ilvE* 基因的敲除对相关氨基酸合成的影响[J]. 生物技术通报, 2012(11): 185-191.
- [15] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, et al. The role of ARGR repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 587-597.
- [16] 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[J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 255-266.
- [17] Hwang GH, Cho JY. Identification of a suppressor gene for the arginine-auxotrophic *argJ* mutation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(11): 1131-1136.