

钝齿棒杆菌中异源表达 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶合成 L-鸟氨酸的研究*

舒群峰 徐美娟** 李 静 张 显 杨套伟 许正宏 饶志明**

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘要 目的:对一株产鸟氨酸的钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5/ $\Delta proB$ / $\Delta argF$ (SYPO-1) 进行代谢工程改造,筛选不同细菌来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶在大肠杆菌中克隆与表达,纯化后对其进行酶学性质的比较;将黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* Y213 来源的 *SmargE* 基因编码的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶在 L-鸟氨酸生产菌株 *C. crenatum* SYPO-1 中过量表达,进一步提高 L-鸟氨酸的产量。方法:通过利用 pDXW10 穿梭质粒对不同来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶进行克隆表达和酶学性质比较,选择性质最优来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶编码基因 *SmargE* 在产 L-鸟氨酸重组钝齿棒杆菌中表达,考察重组菌株发酵过程中参数的变化。结果:来源于 *S. marcescens* Y213 的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶比酶活最高为 798.98U/mg,最适 pH 为 7,最适温度为 37℃,0.1mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Li^{+} 、 Mn^{2+} 促进酶的比酶活提高了 50%;在钝齿棒杆菌中表达 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶酶活达到 128.4U/ml,显著提高了钝齿棒杆菌中胞内乙酰基循环水平;5L 发酵罐发酵重组菌株 96h, L-鸟氨酸的产量达到 38.5g/L,比出发菌株, L-鸟氨酸的产量提高了 33.2%,产率达 0.401g/(L·h)。结论:筛选出最佳来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶,在鸟氨酸生产菌株 *C. crenatum* (SYPO-1) 中过量表达,可以促进鸟氨酸的前体物质 *N*-乙酰鸟氨酸的快速消耗,实现鸟氨酸的积累。

关键词 L-鸟氨酸 钝齿棒杆菌 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 *argE*

中图分类号 Q819

L-鸟氨酸是一种重要的食物添加剂,常用于食品、医药及化工领域中,已经被人所知的是在治疗肝脏疾病及伤口愈合中有重要价值^[1]。微生物法生产鸟氨酸相对于化学合成具有低耗能、环保、易分离提取的优势,更具有工业化生产的应用价值^[2]。

L-鸟氨酸是 L-精氨酸合成的中间代谢产物,其合成途径包括以 *Escherichia coli* 为代表菌属的乙酰基线性化途径^[3] 和以 *Corynebacterium glutamicum* 为代表的乙酰基的循环途径^[4]。其中,谷氨酸棒杆菌不仅是 L-

谷氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸的生产菌,也是生产 L-鸟氨酸的优势菌种^[5]。在谷氨酸棒杆菌中由前体 L-谷氨酸合成 L-鸟氨酸需要 4 步反应,是由位于同一基因簇上的 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD* 4 个基因编码的酶来催化的。其中由 *argJ* 编码的 L-鸟氨酸合成关键酶 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶 (L-ornithine acetyltransferase; OATase; EC 2.3.1.35) 为双功能酶,它催化 *N*-乙酰鸟氨酸和 L-谷氨酸合成 L-鸟氨酸和 *N*-乙酰谷氨酸,实现了乙酰基的循环利用,但此酶受 L-鸟氨酸的反馈抑制^[6]。课题组前期在高产 L-精氨酸菌株钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum* SYPA5-5) 中过量表达 *argJ* 基因,可提高 L-精氨酸的产量^[6]。而在大肠杆菌中,鸟氨酸的生成主要是由 *argA*、*argB*、*argC*、*argD*、*argE* 这几个基因来控制的。大肠杆菌中鸟氨酸的合成途径为线性途径,由于 OATase 双功能酶的不存在,由 *argA* 和

收稿日期:2018-01-27 修回日期:2018-04-15

* 国家自然科学基金 (31770058)、江苏省杰出青年科学基金 (BK20150002)、教育部重点研究项目 (113033A)、中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51708A)、江苏高校优势学科建设工程资助项目

**通讯作者, 电子信箱: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; raozhm@jiangnan.edu.cn

argE 编码的 *N*-乙酰谷氨酸合成酶 (*N*-acetylglutamate synthase; NAGS, EC 2. 3. 1. 1) 和 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 (*N*-acetyl-L-ornithine deacetylase; NAOD, EC 3. 5. 1. 16) 分别完成合成鸟氨酸途径中加乙酰基、去乙酰基的过程。目前,国内外课题组主要通过代谢工程改造谷氨酸棒杆菌来提高 L-鸟氨酸的产量,如 Hwang 等^[7]通过敲除谷氨酸棒杆菌中 *argF*、*argR*、*proB* 基因并且使磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCK; EC 4. 1. 1. 32) 失活来提高 L-谷氨酸的利用率,使 L-鸟氨酸的产量达到 179. 14mg/L; 2015 年,韩国团队 Kim 等^[8]在已有的产 L-鸟氨酸突变株中过表达 *argC*、*argB*、*argJ*、*argD* 基因簇,优化 NADPH 的含量,利用补料分批发酵技术,发酵 72h 后鸟氨酸产量到达 51. 5g/L。随后,Zhang 等^[9]在谷氨酸棒杆菌 S9114 中,过表达 *lysE* 基因对 L-鸟氨酸的产量有促进作用,结合敲除 *argF*、*ncgI221*、*argR*、*putP* 及弱化丙酮酸脱氢酶的活性,通过发酵鸟氨酸产量达到 18. 4g/L。

本实验室拥有一株高产精氨酸的工业用钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5,未改造前在最优化的培养基中 L-精氨酸产量达 36. 1g/L^[10]。课题组经过十余年的努力通过一系列代谢工程改造,显著提高了 L-精氨酸的产量。同时,课题组通过同源整合在基因组上敲除 *proB* 和 *argF* 基因,获得了重组钝齿棒杆菌中 L-鸟氨酸的过量积累,该菌株被命名为 SYPO-1^[11-12]。本研究克隆表达了来自于 *E. coli* BL21、*Serratia marcescens* Y213、*Klebsiella pneumoniae* P01 和 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 中的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶 (NAOD) 编码基因 *argE*,利用镍柱亲和层析对表达有活性的 4 种来源的重组 NAOD 进行纯化,对酶学性质进行初步研究,选取最佳酶活的来源 *SmargE*;同时构建了重组菌 SYPO-1/pDXW10-*SmargE* (命名为 SYPO-2) 和 SYPO-1/pDXW10-*argJ* (命名为 SYPO-3)。在 *C. crenatum* 中分别加强 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶和 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的表达,对重组钝齿棒杆菌进行酶活分析和发酵产鸟氨酸测定,进一步提高钝齿棒杆菌 L-鸟氨酸的产量。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

C. crenatum SYPA5-5 为本实验室保藏^[13-14],SYPO-1 为本实验室保藏^[11-12],*Serratia marcescens* Y213、*Klebsiella pneumoniae* P01 为本实验室筛选^[15-16],

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* str. 168 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;pDXW10 穿梭质粒为王小元教授实验室馈赠^[17];pMD18-T simple vector 购自大连生物工程有限公司;*Escherichia coli* JM109 和 BL21 (DE3) 购自上海生物工程有限公司;重组质粒 pMD18-T-*argJ*、pDXW10-*argJ*、pMD18-T-*argE*、pDXW10-*argE* 均由本实验室构建。本实验室使用的菌株、质粒和引物见表 1、表 2。

1.2 工具酶与试剂

质粒 DNA 小量试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒均购自上海生物工程有限公司;rtaq DNA 聚合酶,Extaq DNA 聚合酶、PrimerStar DNA 聚合酶、T4 DNAligase、*Sal* I、*Sac* I、*Eco* R I 限制性内切核酸酶购自宝公司;*N*-乙酰鸟氨酸购自 Sigma (中国),氨苄霉素、卡那霉素、L-鸟氨酸、L-精氨酸等购自阿拉丁生物试剂公司;其他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

大肠杆菌在 LB 培养基中培养,钝齿棒杆菌在 BHIS 培养基中活化,钝齿棒杆菌种子培养基及发酵培养基是根据已有几种精氨酸的培养基进行的改进。种子培养基每升:50g 葡萄糖,20g 酵母抽提物,15g 玉米浆,15g (NH₄)₂SO₄, 2. 5g MgSO₄ · 7H₂O, 1g KH₂PO₄, 0. 5g K₂HPO₄, 0. 5g Na₂HPO₄, 0. 05g 精氨酸, 20g CaCO₃。发酵培养基每升培养基包含:100g 葡萄糖,20g 玉米浆,50g (NH₄)₂SO₄, 2. 5g MgSO₄ · 7H₂O, 1g KH₂PO₄, 0. 5g K₂HPO₄, 0. 5g Na₂HPO₄, 0. 02g MnSO₄ · 4H₂O, 0. 02g FeSO₄ · 7H₂O, 0. 05g 精氨酸, 20g CaCO₃。初始 pH 调到 7. 0。

钝齿棒杆菌的发酵培养方法为:菌种以 5% (体积比) 的接种量接种于摇瓶发酵培养基中,将上述接种后的培养基放置于 30℃、180r/min 的往复式摇床培养 96h。5L 发酵方法参考文献[18],发酵过程中,每隔 8h 取 500ml 样品检测相关指标。

1.4 不同来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的筛选及酶学性质的研究

经 NCBI 基因组信息数据库和 BRENDA 酶数据库分析,结合本实验室已有的菌株,选择克隆来源于 *Escherichia coli* BL21/*Serratia marcescens* Y213/*Klebsiella pneumoniae* P01 和 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 中 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的编码基因,利用大肠杆菌与谷氨酸棒杆菌中穿梭表达的质粒 pDXW-10^[17]

表 1 本实验所用的菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmid used in this study

Strain/plasmid	Characteristic	Source
Strains		
<i>E. coli</i> JOM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> <i>traD36</i> , <i>proAB</i> +, <i>lac Iq</i> , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>]	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F'</i> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Invitrogen
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5	A hyper arginine production strain, His ⁻ , SG ^r , D-Arg ^r , H-Arg ^r	Our lab
SYPO-1	<i>C. crenatum</i> SYPA5-5 with <i>proB</i> and <i>argF</i> deletion, the positive mutation E19Y of CcNAGK into the chromosome of SYPA5-5	Our lab
SYPO-2	SYPO-1 with pDXW10- <i>SmargE</i>	This study
SYPO-3	SYPO-1 with pDXW10- <i>CcargJ</i>	This study
Plasmids		
pMD-18T	<i>E. coli</i> clone plasmid Amp ^r , Col E origin	TaKaRa
T- <i>CcargJ</i>	A derivative of pMD18-T, Amp ^r , harboring <i>argJ</i> gene from <i>C. crenatum</i> SYPA5-5	This study
T- <i>argE</i>	A derivative of pMD18-T, Amp ^r , harboring <i>argE</i> gene	This study
pDXW10	A shutter expression vector, Km ^R , Ptac promoter	[17]
pDXW10- <i>CcargJ</i>	A derivative of pDXW10, harboring <i>argJ</i> gene from <i>C. crenatum</i> SYPA5-5 under its native promoter	This study
pDXW10- <i>EcargE</i>	A derivative of pDXW10, harboring <i>argE</i> gene from <i>E. coli</i> BL21 (DE3) under its native promoter	This study
pDXW10- <i>KpargE</i>	A derivative of pDXW10, harboring <i>argE</i> gene from <i>Klebsiella pneumoniae</i> P01 under its native promoter	This study
pDXW10- <i>BsargE</i>	A derivative of pDXW10, harboring <i>argE</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain 168G under its native promoter	This study
pDXW10- <i>SmargE</i>	A derivative of pDXW10, harboring <i>argE</i> gene from <i>Serratia marcescens</i> Y213 under its native promoter	This study

Note: Km^R indicates resistance to kanamycin

进行克隆与表达,通过 SDS-PAGE (12% 丙烯酰胺) 来验证蛋白质大小^[19],通过 His-Trap HP 纯化柱^[20]纯化目的蛋白。利用 Bradford 溶液以牛血清白蛋白为内参来测定目标蛋白的溶度^[21]。参照文献测定 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的酶活^[22]。测定酶的酶学性质参照文献[18],包括比酶活、最适温度、热稳定性、最适 pH、pH 稳定性、金属离子的影响。

1.5 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的酶活测定

参照以前研究报道的方法测定 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的酶活^[23]。

1.6 重组钝齿棒杆菌的构建

通过上述的比较,将最优化的来源的重组质粒,利用电转化入 SYPO-1 感受态中^[24]。挑取转化子,利用引物 P4 F/R ; P5 F/R PCR 验证,获得重组钝齿棒杆菌株 SYPO-1/pDXW10-*SmargE*(命名为 SYPO-2)及 SYPO-1/pDXW10-*CcargJ*(命名为 SYPO-3)的阳性转化子。

1.7 发酵参数的鉴定

1.7.1 菌体生物量的测定 吸取一定量的发酵液,用

0.125mol/L HCl 去除发酵液中的 CaCO₃,利用紫外分光光度测量仪 (UNICOTM-UV2000, 上海, 中国) 在吸光度 562nm 下检测细胞的 OD 值,菌体干重与细菌 OD 值的关系为 $OD_{562} = 0.375g(DCW) / L$ ^[25]。

1.7.2 葡萄糖含量的测定 发酵液离心后取上清,利用生物分析仪 SBA-40C (山东省科学院生物研究所) 测定葡萄糖的含量。

1.7.3 游离氨基酸的测定 将发酵液离心取上清稀释一定倍数,以 OPA(邻苯二甲醛)作为衍生化试剂进行氨基酸在线衍生,利用高效液相色谱法 (HPLC) on Agilent 1260 LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 进行氨基酸含量的测定^[13]。

2 结果与分析

2.1 不同来源 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的克隆与表达

如 1.4 所表述,以不同来源的基因组 DNA 为模板,引物 P1 F/R、P2 F/R、P3 F/R、P4 F/R 进行 PCR 扩增,

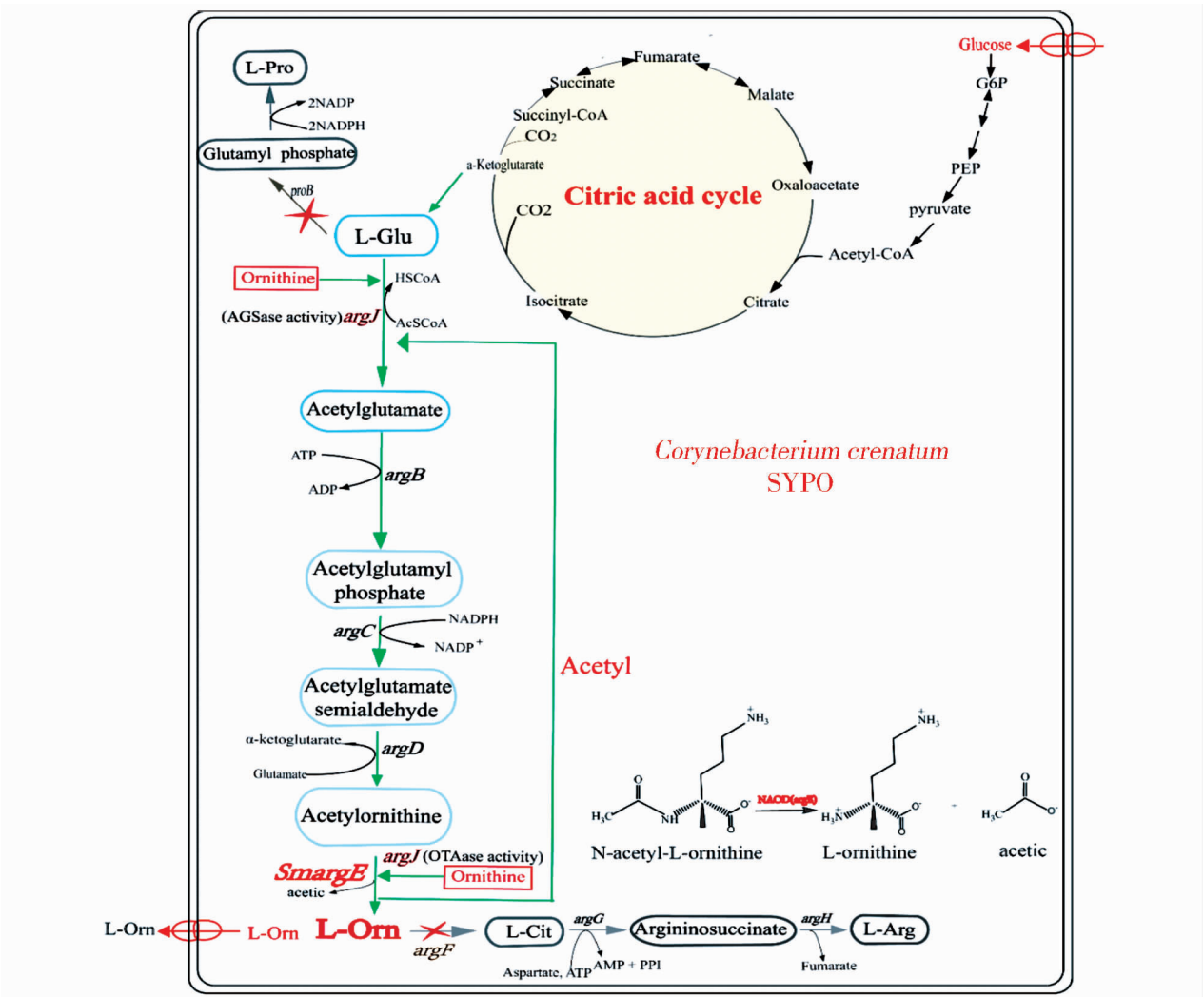


图 1 钝齿棒杆菌 SYPO-1 中 L-鸟氨酸生物合成途径
Fig. 1 The L-ornithine biosynthesis pathway in *Corynebacterium crenatum* SYPO-1

表 2 本研究所用到的引物
Table 2 Primers used in this study

Name	DNA Sequence (5' - 3')	Restriction site
P1 F	CCG GAATTCAAAGGAGGGAAATCATGAAAAACAAATTACCGCCATT	EcoR I
P1 R	C GAGCTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATGCCAGCAAAAATGGG	Sac I
P2 F	CCG GAATTCAAAGGAGGGAAATCATGACCGCGACCCTTGAGCT	EcoR I
P2 R	C GAGCTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCATTTTTACTTTTCG	Sac I
P3 F	CCG GAATTCAAAGGAGGGAAATCATGCCGTTGCCGACGCTG	EcoR I
P3 R	C GAGCTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCGAGGCAATAGTCCG	Sac I
P4 F	CCG GAATTCAAAGGAGGGAAATCGTGAAGATGAAATTACCTC	EcoR I
P4 R	C GAGCTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTGCCGGCAAAAAGTGAT	Sac I
P5 F	CGC GTCGACAAAGGAGGGAAATCATGCACCACCACCACCACATGGCAGAAA AAGGCATTAC	Sal I
P5 R	CGC GAATTCCTTAAGAGCTGTACGCGGAGTTG	EcoR I

得到大小 1 152bp、1 152bp、1 305bp、1 152bp 分别编码 383 个、383 个、434 个、383 个氨基酸的基因片段,连接至 pMD18-T 载体测序,比对结果表明不同基因的同源性为 66.19%。将 *T-argE* 用 *EcoR* I、*Sac* I 双酶切,回收 *argE* 片段后,与线性化 pDXW10(+) 连接后转化,阳

性转化子提取质粒经 *EcoR* I、*Sac* I 酶切验证,释放 8 531bp和约 1 152bp、1 152bp、1 305bp、1 152bp 大小的片段,分别对应 pDXW10(+) 和 *KpargE*、*EcargE*、*BsargE*、*SmargE* 的大小,结果表明质粒 pDXW10-*argE* 构建成功,如图 2 所示。

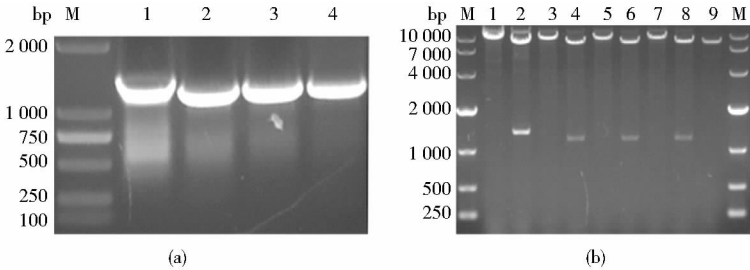


图 2 基因 PCR 结果及质粒 pDXW10-*argE* 酶切验证

Fig. 2 PCR results of *argE* genes and identification of pDXW10-*argE* plasmids and empty pDXW10 plasmid by single and double enzyme digestion

(a) PCR results of different *argE* gene amplification M; DL2000; Lane 1: *BsargE*; Lane 2: *SmargE*; Lane 3: *KpargE*; Lane 4: *EcargE*
(b) Identification of pDXW10-*argE* plasmids and empty pDXW10 plasmid by single and double enzyme digestion M; DL10000 maker; Lane 1, 2; Results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*BsargE*; Lane 3, 4; Results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*SmargE*; Lane 5, 6; Results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*KpargE*; Lane 7, 8; Results of single and double enzymes digestion of pDXW10-*EcargE*; Lane 9; Result of double enzyme digestion of empty pDXW10

重组菌 pDXW10(+) -*argE*/BL21(DE3), 经诱导表达后的菌液经过超声破碎取上清液 SDS-PAGE 分析,检测到分子质量约为 39kDa、39kDa、47kDa、39kDa 的特异性条带,如图 3 所示。4 种不同的上清液测得的酶活分别为 156.8U/g、198.3U/g、30.2U/g、432.98U/g, 说

明不同 *argE* 基因在大肠杆菌中表达, *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶具有生物学活性。采用 Ni-NTA 亲和层析,纯化后 NAOD 酶液比酶活为 416.26U/mg、460.06U/mg、62.03U/mg、798.98U/mg, 结果见表 3。

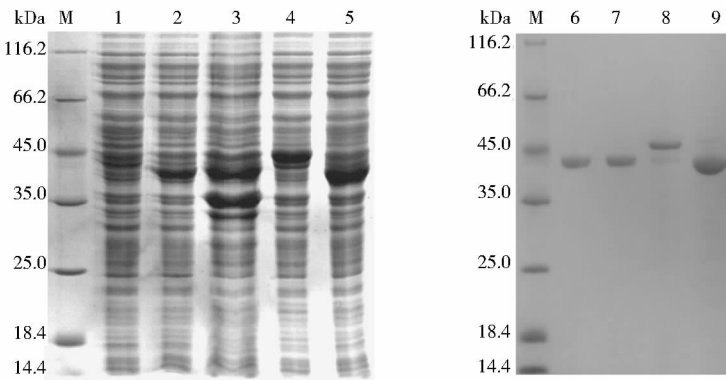


图 3 重组菌株粗蛋白及 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of crude proteins and NAOD purification

M; Unstained protein ladder; Lane1: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+); Lane 2, 6: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*KpargE*, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*KpargE*; Lane 3, 7: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*EcargE*, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*KpargE*; Lane 4, 8: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*BsargE*, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*BsargE*; Lane 5, 9: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*SmargE*, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*SmargE*

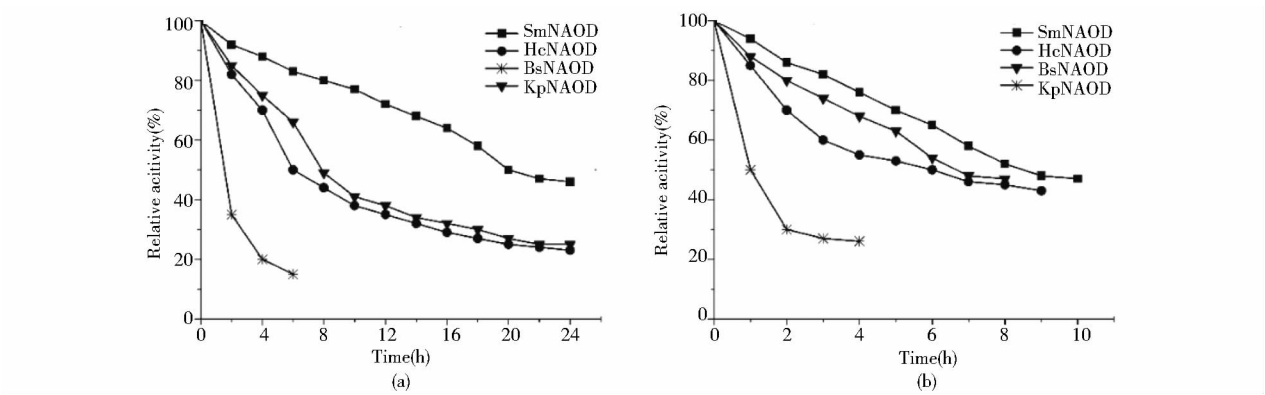


图 4 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶温度及 pH 稳定性

Fig. 4 Thermal and pH stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase

(a) Under 30℃ , thermal stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase (b) Under pH7 , pH stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase

2.2 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 (NAOD) 的酶学性质的研究

由表 3 可知不同来源 (Sm、Kp、Ec、Bs) 重组酶的最适反应 pH 分别为 7、7.5、7、8,但在 pH 为 6.0~9.0 时酶活均处于比较高的水平,从数据可以发现,在较酸和强碱的条件下,比酶活下降的较快。由于钝齿棒杆菌发酵时的适宜 pH 控制在中性最为经济,所以对 4

个不同来源的酶分别于 pH 7.0 处理 1~10h 后测定酶活性,如图 4a 所示,酶在中性条件下,保温 1h 后来源于 Bs 的酶活力已经丧失了 50%,而其他来源的均能保持 85% 以上的酶活力,随着时间的变化,6h 后来源 Ec 的酶活丧失 50%,6.5h 后来源 Kp 的酶活下降 50%,而 Sm 也在 8.5h 后酶活也只有初始的 50%。

表 3 本实验涉及的 NAOD 重组酶的酶学性质的研究

Table 3 Enzymatic properties of recombinant enzymes used in this study

Enzyme	Organism	Specific activity (U/mg)	pH optimum	Temperature optimum (℃)	Metals
EcNAOD	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	416.26	7.0	37	Mg ²⁺ , Li ⁺ (0.1mmol/L a litter promote to activity)
SmNAOD*	<i>Serratia marcescens</i> Y213	798.98	7.0	37	Mn ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ (0.1mmol/L activity increases more than 50%)
KpNAOD	<i>Klebsiella pneumoniae</i> P01	460.06	7.5	37	Mn ²⁺ (0.1mmol/L activity increases more than 50%)
BsNAOD	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain168G	62.03	8.0	50	Mn ²⁺ (0.1mmol/L 57% inhibition)

* Indicates that the corresponding parameters were used for next experiments

如表 3 所示,在 25~70℃ 进行酶促反应,来源于 Ec、Kp、Sm、Bs 的最适反应温度分别为 40℃、40℃、40℃、50℃。为了经济效益,本研究在 37℃ 条件下测定 4 个不同来源的 NAOD 酶的稳定性,由图 4b 可知,表明来源于 Kp、Sm 的 NAOD 酶热稳定相对较好,Kp、Sm、Ec 来源的 NAOD 酶在 37℃ 下 1h 酶活还能保持 80% 以上。随着放置的时间变化,最终 EcNAOD 的酶活在 6h 后降低 50%,Kp 在 8.5h 丧失 50%,而 SmNAOD 的酶活在 20h 下降一半,但是 Bs 来源的较差,1h 左右

BsNAOD 的酶活几乎检测不到,说明酶已全部失活。

金属离子可以作为酶促反应过程中的辅助因子,在酶促反应中常常添加一些金属离子。在 NAOD 酶促反应添加金属离子及 EDTA,以不添加离子的反应液作为空白对照设其酶活为 100%,离子对不同来源的 NAOD 酶活的影响结果见表 3。添加 Zn²⁺、Cu²⁺、Ni⁺ 对导致 4 种来源的 NAOD 酶酶活失活,并且 EDTA、Fe³⁺、Mn²⁺、Li⁺、Mg²⁺、Co³⁺ 都有不同程度降低 Bs 来源的 NAOD 酶的酶活的作用。EDTA 对 4 个来源的 NAOD

酶的酶活都有抑制作用,但是对 Bs、Kp 来源的抑制作用最为明显。Mn²⁺ 对 KpNAOD 酶的促进作用最大,其他离子对 KpNAOD 酶的酶活都有抑制作用。Mn²⁺、Li⁺、Mg²⁺ 对 SmNAOD 酶的酶活有促进作用,Mn²⁺ 使酶活提高 50% 左右。Mg²⁺、Li⁺ 对 EcNAOD 酶的酶活也有轻微的促进作用。

2.3 重组菌 SYP0/pDXW10-SmargE 及 SYP0/pDXW10-CcargJ 的构建

利用上文构建的重组质粒 pDXW10-SmargE 及 pDXW10-CcargJ,电击转化进 SYPO-1,在含有卡那霉素的 BHIS 平板上筛选阳性转化子 SYPO-2 和 SYPO-3。

2.4 重组钝齿棒杆菌 SYPO-2/SYPO-3 的获得及其与 SYPO-1 中 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶酶活的比较

挑选 SYPO-2、SYPO-3 转化子和出发菌株 SYPO-1 接种于 BHIS 培养基 16h 后转接于种子培养基,16h 后离心收集菌体,经超声波破碎,通过 SDS-PAGE 验证,如图 5 所示,*N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶在钝齿棒杆菌中的大小为 39kDa 左右。而 OATase 蛋白在钝齿棒杆菌表达时,因 OATase 中存在 ATML 易断裂区,过量表达后表现为 26kDa、20kDa 的 α 和 β 两个亚基,这与文献报道一致^[23],说明基因 *argJ* 表达。分别测定粗酶液中 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶及 OATase 酶活,如表 4 所示。重组菌株 SYPO-2 粗酶液的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶活力相对于出发菌株显著提高,并且 OATase 的酶活相对于野生型菌株提高了 111.9%,证明重组菌株 SYPO-2 的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶表达量加强,并且可以提高内源 OATase 的酶活。

表 4 重组钝齿棒杆菌粗酶液中的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶与 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰转移酶酶活比较

Table 4 Crude enzyme activities for NAOD and OATase in <i>C. crenatum</i>		
Crude enzyme activity	Total activity of NAOD (U/ml)	Total activity of OATase (U/ml)
<i>C. crenatum</i> SYPO-1	0	5.9
SYPO-1/pDXW10-argJ	0	50.8
SYPO-1/pDXW10-argE	128.4	12.5

2.5 菌株发酵过程比较

研究表明 IPTG 的添加对细胞的生长具有一定的毒性,因此在以下重组菌的发酵中选择不添加 IPTG 而改加少量乳糖诱导。分别对出发菌株 SYPO-1 及重组菌株 SYPO-2、SYPO-3 进行 250ml 摇瓶发酵,通过对发酵过程

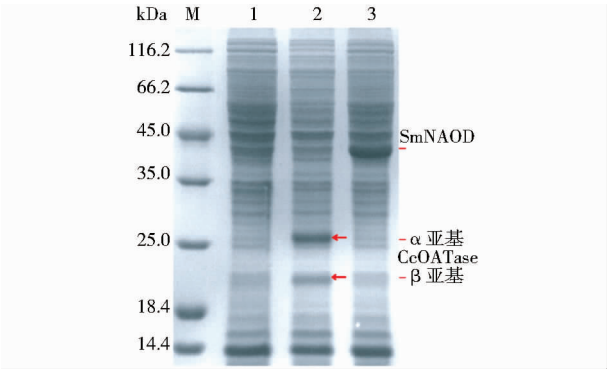


图 5 重组钝齿棒杆菌 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶及 OATase 粗酶液 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the overexpression of SmNAOD and CcOATase in recombinant *Corynebacterium crenatum* SYPO-1

M: Unstained protein ladder; Lane 1: SYPO-1/pDXW10(+); Lane 2: SYPO-1/pDXW10(+)-CcargJ; Lane 3: SYPO-1/pDXW10(+)-SmargE

中的重要参数的跟踪测定发现,摇瓶发酵到 96h 鸟氨酸的产量分别为 8.2g/L、15.8g/L、12.3g/L,可以发现重组菌株 SYPO-2 的产量较 SYPO-1、SYPO-3 的分别高 48.1%、22.2%。前期研究表明,在发酵鸟氨酸的过程中,加入 0.05g/L 的精氨酸对鸟氨酸的产量有一定的促进作用^[12]。发酵 96h 后细胞的干重没有明显的差异,发酵到后期,残糖无剩余。但是发酵过程中 SYPO-2 菌株的其他氨基酸如异亮氨酸、赖氨酸的产量较出发菌株有明显的降低。然而测定发酵过程中的乳酸和乙酸发现,出发菌株与重组菌株的两种有机酸含量都比较高,这是由于摇瓶发酵过程中的氧气供应不足所致。

对菌株 SYPO-1、SYPO-2 和 SYPO-3 进行 5L 上罐发酵研究,并考察发酵过程中参数的变化。每隔 8h 取一次样测发酵液的 OD、残糖及产酸的情况。根据发酵的结果可以分析出重组菌株 SYPO-2 产酸能力较出发菌株 SYPO-1 及 SYPO-3 强。如图 6a 所示,发酵前期,重组菌株的 OD 不及出发菌株,但是稳定期后两者相差甚微;40~96h 为菌体积累鸟氨酸的重要时期,此时重组菌株 SYPO-2 发酵产酸能力相对重组菌株 SYPO-3 及出发菌株 SYPO-1 来说优势较为明显,鸟氨酸的生成率明显提升。

发酵过程中其他氨基酸及有机酸的对比如表 5 所示,重组菌株发酵过程中,其他氨基酸如 L-缬氨酸、L-脯氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸相比出发菌株及重组菌株 SYPO-2 的结果都有明显下降,说明增加碳代谢可以

提高目标物的产量,并且减少副产物的产生。5L 发酵较摇瓶过程中,重组菌株 SYPO-2、SYPO-3 及出发菌株有了较大的变化,乳酸、乙酸有明显的下降,主要原因可能是菌株的 5L 罐发酵过程中,有充足的氧气使得厌氧反应几乎停止。但 SYPO-2 由于引入的线性化鸟氨酸途径中的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶在去乙酰基反应的同时会产乙酸,使得发酵液中乙酸的含量较 SYPO-1、SYPO-3 中的要高。如图 6b 所示,发酵到后期鸟氨酸的产量达到 38.5g/L,相较出发菌株产酸 25.7g/L 及重组菌株 SYPO-3 产 L-鸟氨酸 30.3g/L,提高了 33.2%、

21.3%,产率达 0.401g/(L·h)。分析原因是重组菌株 SYPO-3 中的 *argJ* 编码的 OATase 受产物 L-鸟氨酸的反馈抑制作用,使酶活提高不明显,L-鸟氨酸合成代谢流得不到显著增强。从图 6a 的残糖曲线可知,而异源表达线性化途径中的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使得鸟氨酸的合成速率增加,其产量提高显著。可知重组菌 SYPO-2 从 16h 开始对葡萄糖的消耗就比出发菌株 SYPO-1 及 SYPO-3 的要快,到 96h 两者的残糖都为零。将上述重组菌株与已报道菌株产 L-鸟氨酸情况进行比较,如表 6 所示。

表 5 重组菌株与出发菌株的 5L 发酵罐上的发酵液中的 18 种氨基酸的浓度

Table 5 Concentration of 18 standard amino acid in the 5L fermentation supernatants of the mutant strains

Amino acid/strains	SYPO-1 (g/L)	SYPO-1/ <i>argJ</i> (g/L)	SYPO-1/ <i>argE</i> (g/L)
Asp	0.028 ± 0.000 2	0.026 ± 0.000 3	0.023 ± 0.000 2
Glu	0.15 ± 0.001	0.14 ± 0.009	0.16 ± 0.009
Ser	0.004 ± 0.000 2	0.005 ± 0.000 3	0.004 ± 0.000 2
His	0.022 ± 0.000 3	0.023 ± 0.000 1	0.024 ± 0.000 2
Gly	0.058 ± 0.000 5	0.054 ± 0.000 21	0.059 ± 0.000 43
Thr	0.008 ± 0.000 06	0.005 ± 0.000 02	0.004 ± 0.000 03
Arg	0.005 ± 0.000 2	0.004 ± 0.000 1	0.004 ± 0.000 3
Ala	0.706 ± 0.004 3	0.659 ± 0.003 2	0.694 ± 0.004 5
Tyr	0.196 ± 0.001 2	0.210 ± 0.002 6	0.187 ± 0.001 5
Cys	0.008 ± 0.000 2	0.012 ± 0.000 3	0.009 ± 0.000 2
Val	0.985 ± 0.003	0.598 ± 0.002	0.241 ± 0.001
Met	0.035 ± 0.000 1	0.034 ± 0.000 2	0.032 ± 0.000 1
Phe	0.042 ± 0.000 3	0.040 ± 0.000 2	0.032 ± 0.000 2
Ile	3.528 ± 0.032	3.112 ± 0.027	2.432 ± 0.018
Leu	0.769 ± 0.006 5	0.654 ± 0.004 3	0.712 ± 0.005 9
Lys	3.947 ± 0.043	3.017 ± 0.037	2.192 ± 0.015
Pro	0.0007 ± 0.000 03	0.000 4 ± 0.000 02	0.000 2 ± 0.000 01
Trp	0.008 ± 0.000 3	0.006 ± 0.000 5	0.005 ± 0.000 3

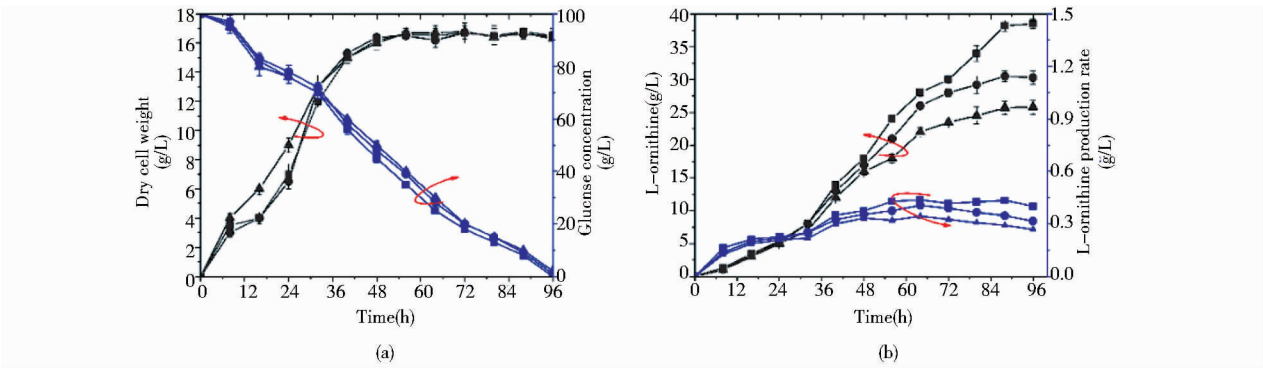


图 6 重组菌株 SYPO-2、SYPO-3 与出发菌株 SYPO-1 的发酵曲线

Fig. 6 Comparison of L-ornithine production between *C. crenatum* SYPO-1, recombinant SYPO-2 and SYPO-3

(a) Dry cell weight and glucose concentration (b) L-ornithine concentration and L-ornithine productivity *C. crenatum* SYPO-1 (filled up triangles); Recombinant SYPO-2 (filled squares) and recombinant SYPO-3 (filled circles) (all values the mean of at least three independent experiments, and error bars represent the standard deviations of the biological replicates)

表 6 比较不同菌株产 L-鸟氨酸的情况
Table 6 Comparison of various strains for the production of L-ornithine

Strain	L-ornithine titer(g/L)	Cultivation method	Medium	Key engineering	Reference
<i>C. crenatum</i> SYPO-3	38.5	Bioreactor; batch	Semi-defined	• Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , and <i>proB</i> • Heterologous expression of <i>N</i> -acetyl-L-ornithine deacetylase	This study
<i>C. glutamicum</i> YW06 (pSY223)	51.5	Bioreactor; fed-batch	Semi-defined	• Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , and <i>proB</i> • Reinforcement of the pp pathway flux • The use of a feedback-resistant enzyme	[8]
<i>E. coli</i> SJ7055	0.009	Shake flask; batch	Semi-defined	• Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , <i>argI</i> , <i>speF</i> and <i>proB</i> • The use of feedback-resistant <i>argG</i>	[3]
<i>C. glutamicum</i> SJ8074 (pEK-CJBD)	0.179	Shake flask; batch	Semi-defined	• Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , and <i>proB</i>	[7]
<i>C. glutamicum</i> △APE6937R42	24.1	Shake flask; batch	Semi-defined	• Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , and <i>proB</i> • Adaptive evolution in presence of L-ornithine	[5]
<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> S9114	18.4	Shake flask; batch	Semi-defined	• Inactivation of <i>argF</i> , <i>ncgl1221</i> , <i>argR</i> , and <i>putP</i> , attenuation of <i>odhA</i> • Overexpression of <i>LysE</i>	[9]

3 讨 论

课题组已对高产 L-精氨酸钝齿棒杆菌 SYPA5-5 进行了一系列系统代谢工程改造研究。例如,对精氨酸合成关键酶编码基因 *argB* 进行定点改造,解除了其产物反馈抑制作用,并且在基因组上进行同源替换,显著提高了 L-精氨酸的产量和产率^[14]。还发现了 *CcargJ* 基因编码的 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶受鸟氨酸的反馈抑制,在该酶的三维结构中发现其鸟氨酸的结合位点同时也是底物 *N*-乙酰鸟氨酸的结合位点,对该位点进行饱和突变后,分析结果可知,解除鸟氨酸反馈抑制作用的同时该酶的活性显著降低甚至失活。

本文首先对精氨酸线性合成途径中的 *N*-乙酰鸟氨酸转化成鸟氨酸的催化关键酶 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶进行筛选,对其不同来源进行克隆及表达,并且对其酶学性质进行比较。研究表明,Sm 来源 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的比酶活为 798.98U/mg,为 4 种不同来源的最高,测定其最适 pH 为 7,在 pH 为 7 的条件下测定其稳定性,SmNAOD 的酶活稳定性最好,8.5h 后酶活下降到初始的 50%。SmNAOD 最适温度的为 40℃,在 37℃ 下测定 SmNAOD 酶的温度稳定性,Sm 的酶活稳定性最好。将最适来源的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶及来源于钝齿棒杆菌的鸟氨酸合成途径中的关键酶 *N*-乙酰

鸟氨酸乙酰转移酶(CcOATase)在钝齿棒杆菌过量表达,结果显示由于 CcOATase 受到产物鸟氨酸的反馈抑制,*N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶过表达后的重组菌株 SYPO-3 中 L-鸟氨酸产量提高不明显;而 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶由于不受鸟氨酸的反馈抑制作用,使 *N*-乙酰鸟氨酸合成 L-鸟氨酸中的脱乙酰反应明显加快,产物鸟氨酸的积累增加。此外,还发现在 SYPO-1 菌株中过表达 SmNAOD 弥补了鸟氨酸合成途径中的关键酶 *N*-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶受产物鸟氨酸的反馈抑制作用,SmNAOD 酶在钝齿棒杆菌中异源表达后,使钝齿棒杆菌 OATase 的酶活提高了 50% 以上,结果可知通过异源表达线性化途径中的 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使得鸟氨酸的产量大幅提高。根据本研究可知,通过在钝齿棒杆菌中进行敲除代谢旁路来提高代谢通路中的碳代谢流,通过引入外源 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使代谢通路中的脱乙酰基反应加强,使得代谢途径中的终产物 L-鸟氨酸过量积累。

参考文献

[1] Han P S, Fishel R S, Efron D T, et al. Effect of supplemental ornithine on wound healing. Journal of Surgical Research, 2002, 106(2): 299.
[2] 卢冬梅. 微生物合成鸟氨酸的代谢工程研究进展. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1391-1399.

- Lu D M. Progress in metabolic engineering for microbial synthesis of ornithine. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1391-1399.
- [3] Lee Y J, Cho J Y. Genetic manipulation of a primary metabolic pathway for L-ornithine production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(22): 1849-1856.
- [4] 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. *Microbiology*, 1996, 142 (Pt 1): 99-108.
- [5] Jiang L Y, Chen S G, Zhang Y Y, et al. Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of L-ornithine. *BMC Biotechnology*, 2013, 13(1): 47.
- [6] Dou W, Xu M, Cai D, et al. Improvement of L-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(3-4): 845-855.
- [7] Hwang J H, Hwang G H, Cho J Y. Effect of increased glutamate availability on L-ornithine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 18(4): 704.
- [8] Kim S Y, Lee J, Lee S Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(2): 416-421.
- [9] Zhang B, Yu M, Zhou Y, et al. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for L-ornithine production. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 158.
- [10] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. The role of ARGR repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(3): 587-597.
- [11] Man Z, Xu M, Rao Z, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28629.
- [12] 赵芹芹, 罗玉常, 窦文芳, 等. 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. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 1941-1947.
- Zhao Q Q, Luo Y C, Dou W F, et al. Engineering *Corynebacterium crenatum* for construction of L-ornithine and L-citrulline producers. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 1941-1947.
- [13] Xu M, Rao Z, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC-H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of (L)-arginine production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(3): 495-502.
- [14] 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*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(1): 55-66.
- [15] 李子武, 张显, 徐美娟, 等. 一株产灵菌红素黏质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(10): 1018-1024.
- Li Z W, Zhang X, Xu M J, et al. Screening and identification a *Serratia marcescens* Strain producing red-pigment and preliminary study of the fermentation conditions. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(10): 1018-1024.
- [16] 徐美娟, 杨套伟, 饶志明, 等. 克雷伯氏菌甘油脱氢酶 dhad 的克隆表达、纯化及酶学性质研究. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 30-35.
- Xu M, Rao Z, Yang W, et al. Expression, purification and enzymatic characterization of *Klebsiella* sp. glycerol dehydrogenase in *E. coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 28(12): 30-35.
- [17] Xu D, Tan Y, Shi F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2010, 64(2): 85.
- [18] 徐美娟, 张显, 饶志明, 等. 钝齿棒杆菌 *N*-乙酰鸟氨酸转氨酶的克隆表达分析及其重组菌的精氨酸发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1013-1023.
- Xu M J, Zhang X, Rao Z M, et al. Expression, cloning, expression and characterization of *N*-acetylornithine aminotransferase from *Corynebacterium crenatum* and its effects on L-arginine fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(7): 1013-1023.
- [19] Schä Gger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16-22.
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. a laboratory manual. *Analytical Biochemistry*, 2001, 186(1): 182-183.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(s 1-2): 248-254.
- [22] Javidmajd F, Blanchard J S. Mechanistic analysis of the argE-encoded *N*-acetylornithine deacetylase. *Biochemistry*, 2000, 39(6): 1285.
- [23] Marc F, Weigel P, Legrain C, et al. An invariant threonine is involved in self-catalyzed cleavage of the precursor protein for ornithine acetyltransferase. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25404-25410.
- [24] Tauch A, Kirchner O, Löffler B, et al. Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology*, 2002, 45(5): 362-367.
- [25] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. Site-directed mutagenesis and

feedback-resistant *N*-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase

2012, 43(1): 255-266.

Corynebacterium crenatum L-arginine production. Amino Acids,

Producing L-ornithine by Heterologous Expression of *N*-acetyl-L-ornithine Deacetylase in *Corynebacterium crenatum*

SHU Qun-feng XU Mei-juan LI Jing ZHANG Xian YANG Tao-wei XU Zheng-hong RAO Zhi-ming

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

Abstract Objective: The metabolic pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5/ Δ proB/ Δ argF (SYPO-1) has been performed to further enhance the pathway flux of L-ornithine biosynthesis. Firstly, the four genes encoding *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase (NAOD) from different bacterial sources were screened, cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then the recombinant NAODs were purified and characterized. The *argE* gene from *Serratia marcescens* Y213 was overexpressed in the L-ornithine producing strain *C. crenatum* SYPO-1 to increase the L-ornithine production. Methods: The genes from different sources were sub-cloned into the pDXW10 plasmid and expressed under the tacM promoter in *E. coli* BL21 (DE3). Then the recombinant *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase were purified and their characterization were studied. The optimal *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase was expressed in recombinant *C. crenatum*. The parameters of the recombinant strains during fermentation were also investigated. Results: The recombinant *argE* coding NAOD enzyme from *S. marcescens* showed a very higher activity than the other NAOD enzymes from *E. coli* BL21 (DE3), *K. pneumoniae* and *B. subtilis*, the activity was 798.98U / mg, the optimum pH and temperature were 7°C and 37°C respectively. SmNAOD was expressed in *C. crenatum*, and the activity was 128.4U/ml, which was significantly increasing intracellular acetyl cycle levels. At the end of fermentation, L-ornithine yield increased to 38.5g/L with the overall productivity of 0.401g/(L · h) in the recombinant SYPO-2, which was approximately 21.3% and 33.2% higher than that of SYPO-1 and SYPO-3, respectively. Conclusion: The *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase from *S. marcescens* Y213 has been screened and overexpressed in the L-ornithine producing strain *C. crenatum* SYPO-1, which could promote the rapid consumption of L-ornithine precursors and achieve L-ornithine accumulation. A huge potential of *C. crenatum* to overproduce not only L-ornithine but also L-citrulline, L-arginine from renewable resources such as glucose were demonstrated.

Key words L-ornithine *Corynebacterium crenatum* *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase *argE*