

· 酶催化与生物合成机制 ·

饶志明 江南大学至善岗位教授、博士生导师，现为粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心副主任，担任中国发酵工程专家技术委员会、中国氨基酸专家技术委员会委员，中国饲料工业协会生物饲料技术委员会副主任，*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 期刊副主编，*Amino Acids*、*Fermentation* 和 *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 期刊编委等。近年来主持承担或完成包括“十三五”国家重点研发计划项目(首席科学家)、863 重大项目、国家自然科学基金面上项目及企业委托课题等 20 余项。相关成果被科技部遴选为国家“十三五”科技成就展优秀成果。以责任作者在 *Nature Communications*、*Science Advances*、*Advanced Materials*、*Nucleic Acids Research*、*ACS Catalysis* 等权威期刊发表 SCI 论文 120 余篇，其中 IF>10 的 14 篇。授权国家发明专利 80 项，国际发明专利 10 项，以排名第一获中国商业联合会科技进步特等奖、江苏省科技进步二等奖和中国轻工业联合会科学技术发明二等奖等多项科技奖励。参与获得天津市科技进步特等奖 1 项、国家教学成果二等奖 2 项，以及江苏省教学成果特等奖、一等奖和二等奖各 1 项。



植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶催化 pH 范围的理性改造及高效转化生产 γ -氨基丁酸

肖杰文¹，韩瑾¹，乔郅钠¹，张国栋²，黄武军²，钱凯²，徐美娟¹，张显¹，杨套伟¹，饶志明^{1*}

1 江南大学生物工程学院，江苏 无锡 214122

2 仁仁健康产业有限公司，江西 宜春 331200

肖杰文，韩瑾，乔郅钠，张国栋，黄武军，钱凯，徐美娟，张显，杨套伟，饶志明. 植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶催化 pH 范围的理性改造及高效转化生产 γ -氨基丁酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2108-2125.

XIAO Jiewen, HAN Jin, QIAO Zhina, ZHANG Guodong, HUANG Wujun, QIAN Kai, XU Meijuan, ZHANG Xian, YANG Taowei, RAO Zhiming. Efficient biosynthesis of γ -aminobutyric acid by rationally engineering the catalytic pH range of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2108-2125.

摘 要: γ -氨基丁酸可由谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)催化谷氨酸一步合成，反应体系成分简单、环境友好。然而，绝大多数 GAD 酶催化 pH 偏酸性且反应范围狭小，需要加入无机盐维持最适催化环境，增加了生产附加成分。此外，随着产物 γ -氨基丁酸的生成，溶液 pH 会逐渐

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2100900)；国家自然科学基金(32071470)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900) and the National Natural Science Foundation of China (32071470).

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

Received: 2022-12-16; Accepted: 2023-03-29; Published online: 2023-03-31

上升,不利于 GAD 酶的持续转化。本研究首先从实验室保藏的一株高产 γ -氨基丁酸的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 中克隆得到谷氨酸脱羧酶 *LpGAD*, 基于酶蛋白表面电荷修饰, 选择 9 个位点进行定点突变及组合突变, 酶学性质表征结果显示三突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 在催化 pH 区间内酶活力整体提高, 尤其拓宽了在偏中性 pH 6.0 下的酶活, 为野生酶的 1.68 倍。接下来, 通过分子动力学模拟解析了酶活提高的机理。此外, 将 *Lpgad* 与 *Lpgad*^{S24R/D88R/Y309K} 突变基因分别在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) E01 中过表达, 通过优化确定了摇瓶最适转化条件为反应温度 40 °C, 菌体量 $OD_{600}=20$, 底物 L-谷氨酸 100.0 g/L, 5-磷酸吡哆醛添加量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。5 L 发酵罐中, 不调节 pH, 通过分批投料底物 L-谷氨酸, γ -氨基丁酸产量高达 402.8 g/L, 较对照菌株提高了 1.63 倍。本研究成功拓宽了 *LpGAD* 的 pH 催化范围及酶活, 提高了 γ -氨基丁酸的转化效率, 为实现其规模化工业生产奠定了基础。

关键词: γ -氨基丁酸; 谷氨酸脱羧酶; pH 改造; 表面电荷; 全细胞转化

Efficient biosynthesis of γ -aminobutyric acid by rationally engineering the catalytic pH range of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*

XIAO Jiewen¹, HAN Jin¹, QIAO Zhina¹, ZHANG Guodong², HUANG Wujun², QIAN Kai², XU Meijuan¹, ZHANG Xian¹, YANG Taowei¹, RAO Zhiming^{1*}

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Renren Health Industry Limited Company, Yichun 331200, Jiangxi, China

Abstract: γ -aminobutyric acid can be produced by a one-step enzymatic reaction catalyzed by glutamic acid decarboxylase. The reaction system is simple and environmentally friendly. However, the majority of GAD enzymes catalyze the reaction under acidic pH at a relatively narrow range. Thus, inorganic salts are usually needed to maintain the optimal catalytic environment, which adds additional components to the reaction system. In addition, the pH of solution will gradually rise along with the production of γ -aminobutyric acid, which is not conducive for GAD to function continuously. In this study, we cloned the glutamate decarboxylase *LpGAD* from a *Lactobacillus plantarum* capable of efficiently producing γ -aminobutyric acid, and rationally engineered the catalytic pH range of *LpGAD* based on surface charge. A triple point mutant *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} was obtained from different combinations of 9 point mutations. The enzyme activity at pH 6.0 was 1.68 times of that of the wild type, suggesting the catalytic pH range of the mutant was widened, and the possible mechanism underpinning this increase was discussed through kinetic simulation. Furthermore, we overexpressed the *Lpgad* and *Lpgad*^{S24R/D88R/Y309K} genes in *Corynebacterium glutamicum* E01 and optimized the transformation conditions. An optimized whole cell transformation process was conducted under 40 °C, cell mass (OD_{600}) 20, 100 g/L L-glutamic acid substrate and 100 $\mu\text{mol/L}$ pyridoxal 5-phosphate. The γ -aminobutyric acid titer of the recombinant strain reached 402.8 g/L in a fed-batch reaction

carried out in a 5 L fermenter without adjusting pH, which was 1.63 times higher than that of the control. This study expanded the catalytic pH range of and increased the enzyme activity of *LpGAD*. The improved production efficiency of γ -aminobutyric acid may facilitate its large-scale production.

Keywords: γ -aminobutyric acid; glutamic acid decarboxylase; pH transformation; surface charge; whole cell transformation

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种四碳的非蛋白质氨基酸^[1], 普遍存在于植物、动物和微生物中^[2]。因其可以保护植物免受各种病原体侵害^[3]、参与人体内血压、心率等心血管疾病的调节^[4], 还能作为工业生产尼龙合成前体的原料^[5]而被广泛应用于食品添加剂、畜牧^[6]、医药和化工等领域^[7]。尽管 GABA 生产方法多样, 包括植物富集、化学合成和生物合成法。但考虑到大批量工业化生产及绿色合成需求, 生物合成法生产 GABA 具有广阔的应用前景^[8]。生物合成法又分为直接发酵法和酶(或细胞)催化法。2015 年, Pham 等^[9]通过引入合成蛋白支架、敲除突变和失活竞争性代谢网络构建大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1 工程菌株, 以 10 g/L 葡萄糖发酵获得 GABA 浓度为 1.3 g/L。2022 年, Zhang 等^[10]通过模型引导的代谢工程策略改造谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032, 工程菌株补料分批发酵产 GABA 达 23.07 g/L。目前 GABA 发酵法生产产量还无法和酶催化法相媲美, 且发酵法通过微生物代谢直接发酵原料, 存在下游分离提取过程复杂、生产周期长等问题。因此全细胞转化一步法合成 GABA 受到国内外研究者的广泛重视^[11]。

谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD, EC: 4.1.1.15)是一种独特的 II 类氨基酸脱羧酶, 广泛分布在真核生物和原核生物中。因其在许多微生物中的抗酸性^[12], 对生物体维持正常的生理值具有重要作用。GAD 作为生物合成法制备 GABA 的限速酶, 在 5-磷酸吡哆醛

(pyridoxal-5-phosphate, PLP)少量添加下, 专一性地催化 L-谷氨酸脱羧生成 GABA 和 CO₂, 反应过程不可逆^[13]。然而, 自然界中天然 GAD 生产者大多本底表达量不高, 培养条件较难控制等使得 GABA 产量和生产效率较低。2013 年, Jiang 等^[14]从猕猴桃表面分离出一株产 GABA 能力较强的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) MJ2, 28 °C 培养约 48 h, GABA 产量仅有 5.823 g/L。乳酸菌作为 GABA 主要生产菌株^[15], 但其天然 GAD 活力较低。2010 年, Kook 等^[16]为了提高乳酸菌催化合成 GABA 的能力, 在一株清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*) B2-16 中过表达植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) ATCC 14917 来源的 *gad* 基因, 提高了 GABA 的产量, 重组菌产 GABA 最大浓度达 265.3 mmol/L。但仅通过表达基因提高蛋白表达水平仍是不够的, 目前利用基因工程与蛋白工程技术的手段, 从分子水平改进 GAD 酶, 使其具有优良工业属性的相关研究正在大量展开。一方面是针对不同来源 GAD 酶催化效率低、热稳定性差不适合持续化生产进行的相关研究, 如 2016 年, Liu 等^[17]通过定点诱变巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)来源的新型谷氨酸脱羧酶 *BmGAD* 提高了酶的催化活性及 V_{\max} 值。2020 年, Zhang 等^[18]通过序列分析和自由能计算结果, 突变短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) CGMCC No.1306 来源的 GAD 酶热稳定性关键位点, 获得了具有较高热稳定性且活性增加 1.67 倍的突变体 S325A。2020 年, 汪钟^[19]通过分析 *L. brevis* CGMCC 1306 来源的 GAD 酶中 loop 区域的 β -转角结构

类型,对酶进行分子改造,提高了酶的热稳定性。另一方面则是针对 GAD 酶作用 pH 偏酸性的特点,改造其 pH 特性的研究。如 2013 年, Kang 等^[20]通过增减 *E. coli* 来源的 GAD 酶结构 C 末端长度,获得突变体 GAD Δ 466,大幅提升了酶的 pH 作用范围。2014 年, Shi 等^[21]结合定向进化和理性突变手段改造了 *L. brevis* Lb85 来源的 GAD 酶,获得组合突变体 T17I/D294G/E312S/Q346H,提高了酶在 pH 6.0 条件下的催化活性,进一步在 *C. glutamicum* ATCC 13032 中表达突变体成功提高了 GABA 生产量。同年, Shin 等^[22]依据 *L. plantarum* ATCC 14917 来源的 GAD 酶结构模型,截取酶 C 端残基后使酶在 pH 4.0–8.0 的广泛范围内表现出明显的催化活性。通过提高酶在偏中性环境中的催化活力,不仅能减轻酸环境对菌体量积累的胁迫作用,还能减少环境维持剂如酸碱、无机盐的投加,从而更好地满足中性环境作业需求,降低生产成本^[23]。

尝试对不同来源的 GAD 酶实施 pH 改造并构建用于 GABA 合成的单细胞工程菌株是具有重要生产意义的。本研究首先将一株早期经实验室常压室温等离子体(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变的植物乳杆菌来源的谷氨酸脱羧酶 *LpGAD* 酶基于蛋白表面电荷理性突变后,拓宽了酶的 pH 适用范围并提高了酶的催化活性。由于谷氨酸棒杆菌被认为是食品安全菌株(generally regarded as safe, GRAS),因此选择谷氨酸棒杆菌作为底盘细胞,通过在胞内过表达突变体,摇瓶转化实验优化反应条件后进行 5 L 发酵罐全细胞转化实验,实现了 L-谷氨酸到 GABA 的高效合成。本研究旨在解决菌体催化活性随转化液 pH 的升高而降低致使生产持续性及底物转化率偏低的问题,提高菌体产 GABA 能力,构建一种经济高效的生物催化方法,为其工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)、植物乳杆菌 HG-06^[24]和谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* E01^[25]由本实验室保藏。pET-28a 表达载体(质粒抗性: KanR)和 pXMJ19 表达载体(质粒抗性: ChlR)由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;蛋白 Marker 购于上海碧云天生物技术有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、同源重组试剂盒和蛋白浓度测定试剂盒购自上海 GENEray 公司;抗生素(Kan 和 Chl)、异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;谷氨酸和 γ -氨基丁酸(分析纯)购自上海阿拉丁试剂有限公司;其余培养基试剂均购自上海国药试剂有限公司。

1.1.3 主要设备

SBA-40D 型生物传感仪,山东省科学院生物研究所;Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司;Gene Pulser Xcell 电穿孔仪, Bio-Rad 公司;5 L 发酵罐,上海迪必尔生物有限公司;UV-1200 型可见紫外分光光度计,上海翱艺仪器有限公司;小型台式离心机 and 干式金属浴, Eppendorf 公司;AKTA 蛋白纯化仪, Cytiva 有限公司;超声波破碎仪 JY92-IIN, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

通过提取植物乳杆菌全基因组核酸序列,PCR 扩增获得 *Lpgad* 基因,实验设计含同源臂引物参见表 1。引物由苏州 Azenta 公司合成。

1.2.2 培养基与培养方法

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5。121 °C灭菌 20 min, 用于大肠杆菌培养。

脑心浸液(brain-heart infusion, BHI)培养基(g/L): 脑心浸液粉 35。115 °C灭菌 20 min, 用于谷氨酸棒杆菌培养。

MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 8, 葡萄糖 20, 酵母粉 4, 乙酸钠 5, 柠檬酸氢二胺 2, 吐温-80 1 mL, 磷酸氢二钾 2, 硫酸镁 0.2, 一水硫酸锰 0.05。115 °C灭菌 20 min, 用于植物乳杆菌培养。

1.2.3 重组菌株的构建

大肠杆菌重组菌构建: 以植物乳杆菌基因组

为模板, 通过 PCR 扩增获得谷氨酸脱羧酶基因片段 *Lpgad*, 与经限制性内切酶(*EcoR* I/*Hind* III)双酶切后的 pET-28a 质粒片段进行同源重组酶连, 连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 转化子进行菌落 PCR 验证, 挑取阳性转化子进行培养, 提取质粒送测序验证。

大肠杆菌突变菌构建: 以重组质粒 pET28a-*Lpgad* 为模板, 根据突变位点上下游的引物对(表 1)分别 PCR 扩增得到含突变碱基的上下游基因片段, 利用融合 PCR 获得完整突变基因片段, 目的片段与双酶切后的 pET-28a 质粒片段同源重组酶连, 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。转化子菌落 PCR 验证条带大小正确后, 提取质粒送测序验证。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
S24R-F/P2	GTCTTTGGTGCGCCTAGAGAACAACATGATCTT	33
S24R-R/P3	AAGATCATGTTGTTCCTAGGCGCACCAAAGAC	33
D88R-F/P4	CGAAAGAATGCCATCAGAAAATCTGAGTACCCC	33
D88R-R/P5	GGGGTACTCAGATTTCTGATGGCATTCTTTTCG	33
L135K-F/P6	TGTATGTTAGGCGGTAAAGCAATGAAATTCGCC	33
L135K-R/P7	GGCGAATTTTCATTGCCTTACGCGCTAACATACA	33
E170R-F/P8	TATCAAGTTTGCTGGAGAAAGTTTTGTGTCTAC	33
E170R-R/P9	GTAGACACAAAACCTTCTCCAGCAAACCTTGATA	33
H196R-F/P10	GTCTTTGACGTTAACAGAGTCTTAGACTACGTG	33
H196R-R/P11	CACGTAGTCTAAGACTCTGTAAACGTCAAGGAC	33
A225K-F/P12	ATATGACGACCTAGCCAAACTCGATAAGGTCGTT	34
A225K-R/P13	AACGACCTTATCGAGTTTGGCTAGGTCGTCATAT	34
Y309K-F/P14	AGTCTTCAAAGTTAGTAAATTAGGTGGGGAGTTG	34
Y309K-R/P15	CAACTCCCCACCTAATTTACTAAGTTTGAAGACT	34
A359R-F/P16	GCCCCGTACCTGGCAAGAGCTCTGGATAAAGTT	33
A359R-R/P17	AACTTTATCCAGAGCTCTTGCCAGGTAGCGGGC	33
E417K-F/P18	ATCCTTTCCCTGCTAATCTGAAACAACAAGTCATCAA	38
E417K-R/P19	TTGGATGACTTGTTGTTTCAGATTAGCAGGGAAAGGAT	38
<i>LpGAD</i> -F/P1	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCAATGTTATACGG	38
<i>LpGAD</i> -R/P20	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGTGTGTGAATAGGTATT	40
pXMJ19- <i>Lpgad</i> -F	AGAATTAATTAAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGGCAATGTTATAC	45
pXMJ19- <i>Lpgad</i> -R	CAAAACAGCCAAGCTGAATTCAGTGTGTGAATAGGT	38

The italic sequences are the mutation sites and the restriction enzyme cutting sites.

谷氨酸棒杆菌重组菌构建：以重组质粒 pET28a-*Lpgad* 为模板，PCR 扩增获得带质粒酶切位点两侧同源臂的基因片段，与经限制性内切酶(*EcoR* I/*Hind* III)双酶切后的质粒 pXMJ19 同源重组酶连，转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，构建 *E. coli* BL21/pXMJ19-*Lpgad* 菌株，提取转化子质粒送测序验证成功后，重组质粒电击转化 *C. glutamicum* E01 感受态细胞^[26]，构建 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-*Lpgad* 菌株。

1.2.4 GAD 的诱导表达与纯化

验证成功后的转化子液体扩大培养，当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 即大肠杆菌对数生长期时，加入终浓度 1.0 mmol/L IPTG，16 °C 过夜诱导蛋白表达。4 °C、8 000 r/min 离心 6 min 收集菌体，50 mmol/L、pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)悬浮菌体并进行细胞破碎。细胞破碎液经 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 后得到粗酶液，利用 1 mL 镍亲和柱进行纯化。0–500 mmol/L 咪唑线性梯度洗脱后，收集目标蛋白，加入 10% (体积分数)甘油，–40 °C 保存。SDS-PAGE (12%丙烯酰胺)分析蛋白表达及纯化情况。

1.2.5 酶活检测方法

GAD 酶活测定方法^[27]：反应体系(1 mL)含有 0.2 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，10 mmol/L 底物 L-谷氨酸和 100 μ mol/L PLP。加入 50 μ L 酶液到 1 mL 预热的酶活测定缓冲液中启动反应。37 °C 保温 10 min 后，沸水浴中加热 10 min 终止反应，离心收集样品。GABA 和底物 L-谷氨酸浓度分别用液相色谱仪和 SBA 生物传感仪测定。谷氨酸脱羧酶酶活单位(U)定义为 1 min 产生 1 μ mol γ -氨基丁酸所需的酶量。

蛋白浓度通过考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)测定^[28]。GAD 酶比活力为每毫克蛋白质所具有的酶活力单位数，单位为 U/mg。以测得酶

最高比活力的条件作为酶最适反应条件，将纯酶放入不同 pH 缓冲液和不同温度保温处理前的酶活力值定义为 100%，通过测定残余酶活力分析酶的 pH 稳定性和温度稳定性。

1.2.6 突变位点选取方法

将 *LpGAD* 蛋白序列提交至 SWISS-MODEL^[29] 服务器(<https://swissmodel.expasy.org/>)建模获得 PDB 结构，通过 PROCHECK^[30]评估后(位于禁止区域的氨基酸数量小于氨基酸总数的 5%)使用 Rosetta Supercharge (<https://www.rosettacommons.org/>)进行基于表面电荷的蛋白理性设计^[31]，通过上调电荷 10–20 kcal/mol，得到 9 个表面残基候选位点(表 1)。突变位点选取考虑表面相互作用，包括静电和疏水相互作用，以 Lys 或 Arg 进行替代，允许通过突变疏水氨基酸来调节蛋白的表面电位分布。

1.2.7 分子对接及动力学模拟方法

利用 Schrödinger2020-3 软件包中的 Glide 模块分子对接构建 *LpGAD*、辅助因子 PLP 及谷氨酸的三元复合物，进一步通过计算机点突变的方式获取突变体的三元复合物。模拟全程使用 Amber18 软件包^[32]完成。辅助因子 PLP 的力场参数采用 antechamber 计算，其中电荷信息采用键电荷校正。蛋白体系采用 ff14SB 力场，用 Sander 模块对体系进行能量最小化。随后依次进行 500 ps 的正则系综模拟，1 ns 的等温等压系综(constant-pressure, constant-temperature, NPT)模拟和轨迹收集阶段时 50 ns 的 NPT 模拟。非键截止距离设定为 8 Å，用 particle mesh Ewald 方法计算长程静电作用^[33]，涉及氢原子键的键长采用 Shake 设置进行限制^[34]，温度控制使用 Langevin 算法^[35]，其中碰撞频率 γ 设为 2/ps。体系压强为 1 atm，积分步长为 2 fs，每隔 10 ps 保存轨迹，输出的轨迹用于进一步分析计算。

1.2.8 全细胞转化条件

摇瓶转化条件：细胞培养结束后收集菌体，重悬于 0.9% (质量体积分数) NaCl 溶液中，控制菌体量 $OD_{600}=20$ ，L-谷氨酸浓度 100 g/L，辅助因子 PLP 100 $\mu\text{mol/L}$ ，终体积 50 mL 转化体系不控 pH，在 37 °C、200 r/min 条件下转化 20 min 后取样。

5 L 发酵罐转化条件：细胞培养结束后收集菌体，重悬于 0.9% (质量体积分数) NaCl 溶液中，控制菌体量 OD_{600} 为 20，在 0 h 投入 L-谷氨酸 100 g，辅助因子 PLP 100 $\mu\text{mol/L}$ ，终体积 1 L 转化体系不控 pH，在 40 °C、300 r/min 条件下进行转化。反应过程中及反应结束后取样，分析产物及底物含量。

1.2.9 HPLC 检测条件

产物 GABA 的 HPLC 测定方法：取反应液用 5%三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)稀释 5 倍，在 4 °C 冰箱沉淀蛋白 3 h 左右离心，取上清液用 0.22 μm 膜过滤处理收集样品后，采用 OPA 在线衍生法分析样品。色谱柱：diamondsil C18 (5 μL , 250 mm \times 4.6 mm)；流动相 A：醋酸钠 8 g/L、四氢呋喃 5 mL/L、三乙胺 0.225 mL/L，pH 7.2；流动相 B：醋酸钠 6 g/L、甲醇 400 mL/L、乙腈 400 mL/L，pH 7.2；检测器：UV Detector；检测波长：338 nm；柱温：40 °C；进样量：10 μL ；流速：1.0 mL/min。梯度洗脱过程：0–22.5 min, 8% B；22.5–22.6 min, 8% B \rightarrow 60% B；22.6–26.5 min, 60% B；26.5–31.5 min, 100% B；31.5–35.0 min, 8% B。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸脱羧酶性质研究及分子改造

2.1.1 谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达

GAD 是催化 GABA 生产的关键酶，以实验室一株 ARTP 诱变后的植物乳杆菌 GB HG-06 基

因组^[24]全序列为模板，PCR 扩增获得 *Lpgad* 基因序列，长度为 1 410 bp (图 1A)，按照 1.2.3 方法构建重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*Lpgad* 并进行诱导表达，SDS-PAGE 分析结果显示，在 52 kDa 有明显条带加粗，这表明 *LpGAD* 在 *E. coli* BL21 中成功实现了表达(图 1B)。

2.1.2 谷氨酸脱羧酶的酶学性质研究

不同温度条件下谷氨酸脱羧酶 *LpGAD* 的酶活测定结果显示，*LpGAD* 的最适温度为 37 °C，高于 55 °C 时酶活力急剧下降，30–45 °C 范围内能维持 70% 以上的酶活力(图 2A)；40 °C 以下保温 10 h 后，残余酶活保持在 85% 以上，具有良好的热稳定性(图 2B)。pH 测定结果显示，最适 pH 为 4.8，酶在 pH 3.6–5.0 下的活力均保持在 60% 以上，当 pH 高于 5.0 时酶活力急剧下降，pH 6.0 以上几乎检测不到酶活(图 2C)，这表明 *LpGAD* 最佳催化 pH 偏酸性，偏中性范围内催化能力极差甚至没有，这与以往的研究一致，GAD 酶存在 pH 作用区间狭窄的问题。在不同 pH 条件下考察此酶 pH 稳定性，处理 2 h 后，*LpGAD* 在 pH 3.6–5.0 范围内残留酶活力高于 80%，当 pH 高于 5.4 时，酶活力严重损失，进一步说明了该酶对中性环境不耐受(图 2D)。综合以上 *LpGAD* 的酶学特性结果，应对其 pH 适用范围进行改造，使其更具工业应用价值。

2.1.3 基于表面电荷理性设计突变体及 pH 特性研究

利用 Rosetta Supercharge 将酶表面电荷从 -76 上调到 -66，确定 9 个突变位点，依次构建大肠杆菌突变株，测定其酶学性质。分别以 pH 4.5 和 pH 6.0 下野生酶的酶活力值作为 100%，比较各单点突变体及组合突变体在对应条件下的相对酶活(图 3)，结果显示，除位点 H196R、Y309K、A359R 外，其余位点在偏中性 pH 6.0

下活性提高比例皆大于酸性 pH 4.5, 侧面说明了该理性设计方法具有较好的可行性。单突变

点中 S24R 在 pH 6.0 下活性提高最明显, Y309K 在 pH 4.5 条件下活性提高最明显。因此, 选择

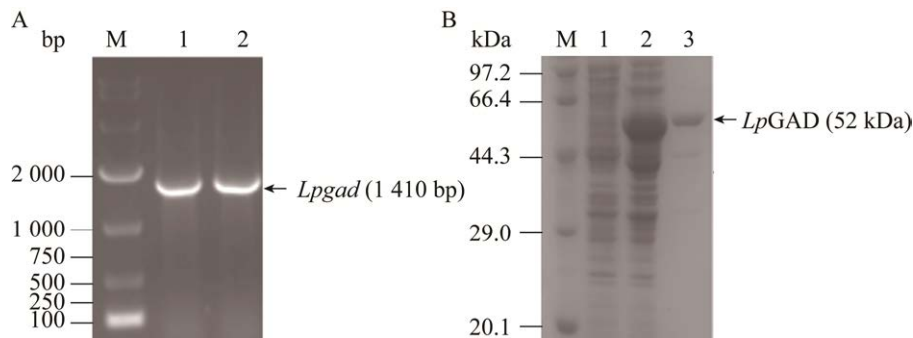


图 1 目的基因的扩增及 *LpGAD* 的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 PCR of *Lpgad* gene and SDS-PAGE analysis of the purified protein. A: PCR results. M: DNA marker; 1: *Lpgad*; 2: *Lpgad*. B: SDS-PAGE analysis. M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21/pET28a cell breaking supernatant (CBS); 2: *E. coli* BL21/pET28a-*Lpgad* CBS; 3: *E. coli* BL21/pET28a-*Lpgad* purified protein.

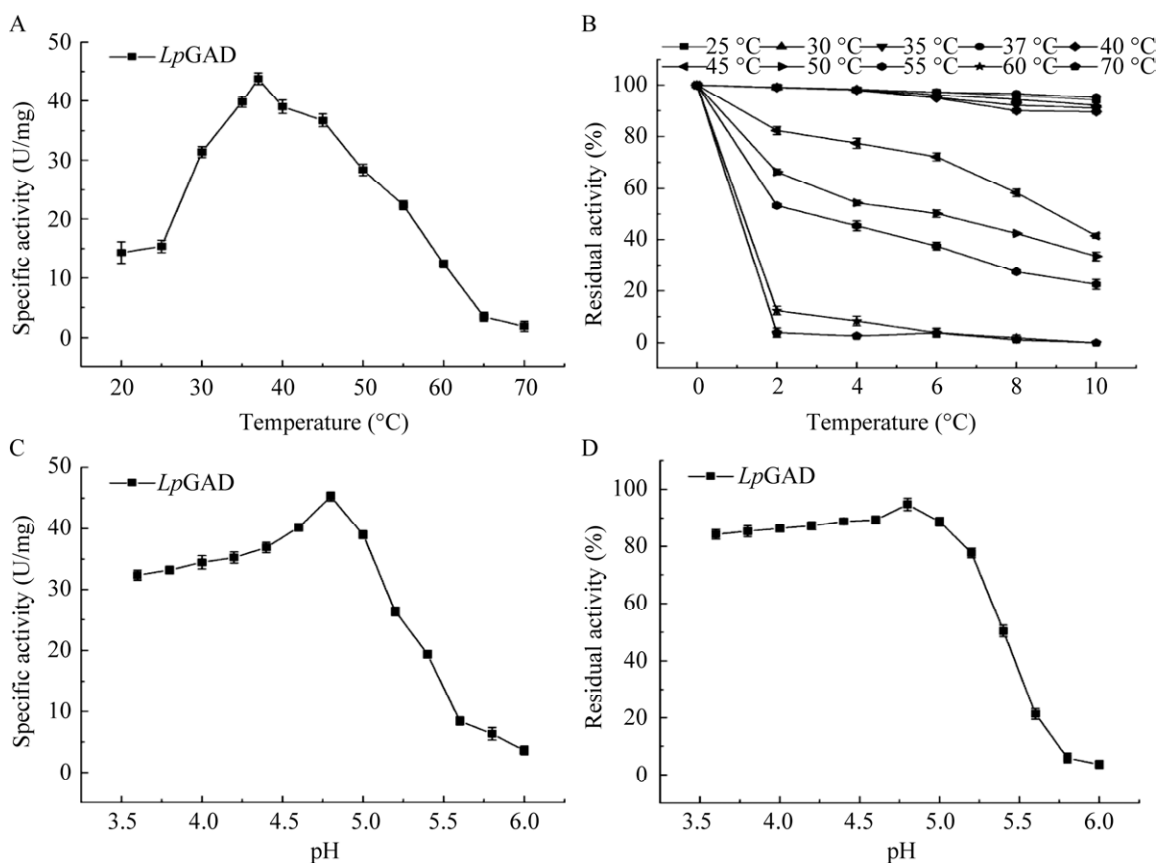


图 2 谷氨酸脱羧酶 *LpGAD* 的最适温度(A)、温度稳定性(B)、最适 pH (C)及 pH 稳定性(D)的测定

Figure 2 Determination of optimal temperature (A), thermal stability (B), optimal pH (C) and pH stability (D) of *LpGAD*. Citric acid-sodium citrate buffer was used in this study.

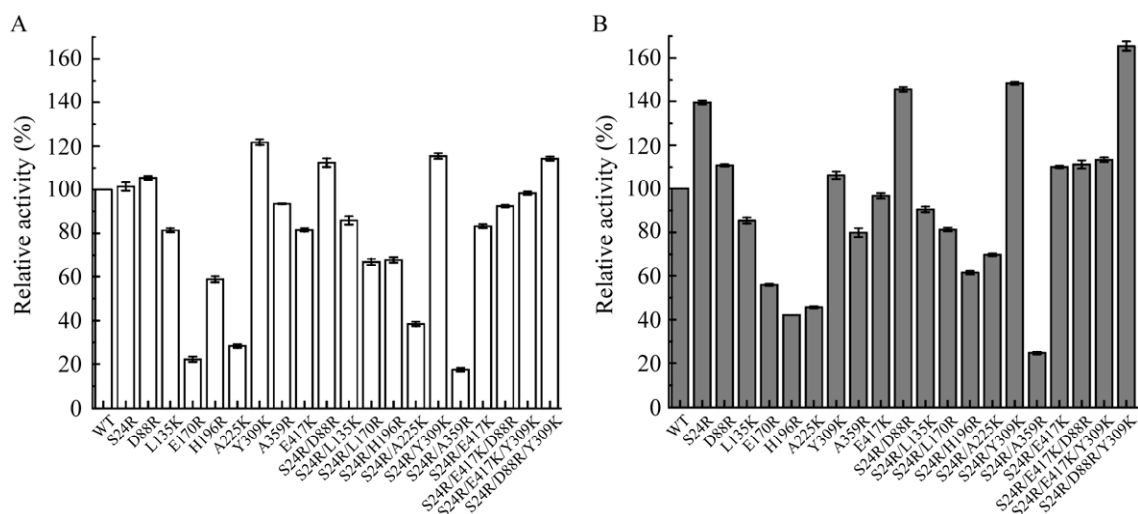


图3 谷氨酸脱羧酶突变体在 pH 4.5 (A)和 pH 6.0 (B)条件下的相对活性

Figure 3 The relative activity of glutamate decarboxylase mutants at pH 4.5 (A) and 6.0 (B). Each data point represents the mean of three independent measurements.

了偏中性环境下提高最显著的点 S24R 继续组合其他位点, 结果发现叠加有益单突变位点进一步提升了酶在偏中性环境下的催化能力。同时, 组合过程中发现突变体 $LpGAD^{S24R/A359R}$ 较各单突变体并没有表现出活性的提高, 这可能是位点组合使酶结合底物与产物的空间结构或活性中心的静电势发生了负向改变, Khersonsky 等^[36]在对一种小假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)来源的磷酸三酯酶(phosphotriesterase, PTE)进行突变的过程中, 也观察到类似现象。最终得到的三突变体 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$, 在 pH 4.5 和 pH 6.0 的酶活分别提高到野生酶对应 pH 酶活的 114% 和 165%。组合突变得到的正向效果可能是由于不同的残基侧链与催化氨基酸或底物的相互作用造成。

接下来, 通过设置不同底物浓度 0.1–50 mmol/L, 测试了 pH 4.5 和 pH 6.0 条件下 $LpGAD$ 突变前后的动力学变化。用 GraphPad Prism 7 软件计算反应常数 K_m 和 V_{max} 值, 从表 2 中可以看出, 原始酶 $LpGAD$ 在 pH 4.5 下的 k_{cat}/K_m 值高于高

pH 条件下的值, 为 2.8 L/(s·mmol), 突变酶 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 为 4.5 L/(s·mmol), 值得注意的是, 虽然突变酶 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 的 k_{cat}/K_m 值在 pH 6.0 下小于 pH 4.5, 但其在 pH 6.0 时的 k_{cat}/K_m 值显示出较原始酶的绝对优势, 是 $LpGAD$ 对应值的 2.3 倍。这说明通过累积表面电势变量改变了酶与底物的作用, 使突变酶在偏中性 pH 下拥有了更好的底物催化能力。突变后该蛋白的表面电势图如图 4 所示。可以看出, 一些显著的酸表面聚集体已被取代。

表2 原始酶 $LpGAD$ 和突变酶的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of initial enzyme $LpGAD$ and its mutant towards L-glutamic acid substrate

Variant	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (L/(s·mmol))
$LpGAD$ (pH 4.5)	8.9	24.8	2.8
$LpGAD$ (pH 6.0)	10.6	19.5	1.8
$LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ (pH 4.5)	8.3	37.6	4.5
$LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ (pH 6.0)	9.3	38.2	4.1

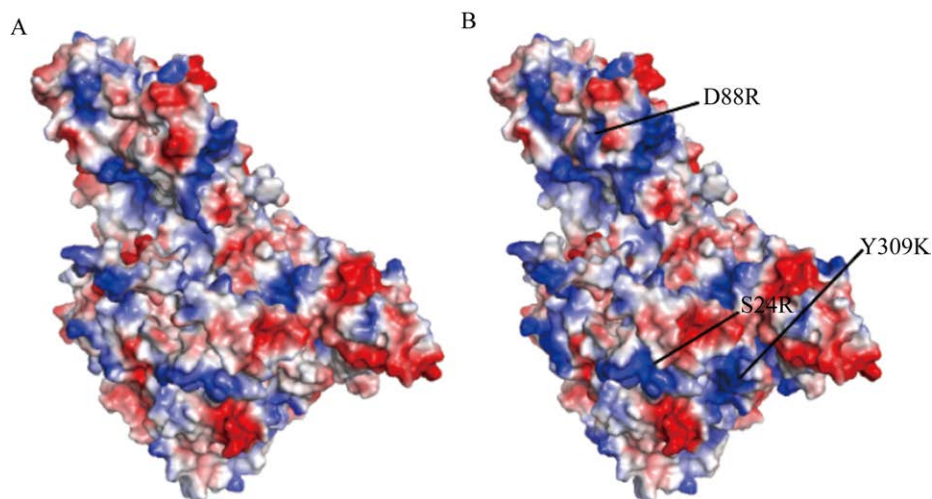


图 4 谷氨酸脱羧酶 *LpGAD* 及其突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 酶表面电势图

Figure 4 Potential changes on the enzyme surface of wild-type superfoldering *LpGAD* (A) and the mutant *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} (B). Acidic amino acids are shown in red while alkaline amino acids are shown in blue.

2.2 谷氨酸脱羧酶突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 的酶学性质研究及动力学解析

2.2.1 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 的酶学性质研究

突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 在不同温度下的酶活测定如图 5A 所示。突变体酶活力曲线整体趋势与野生酶相似，最适温度为 37 °C，整体较野生酶有微弱提升。将突变体与野生酶在各温度条件下保温 10 h 测定残留活力(图 5B)，定义保温前酶活力大小为 100%。结果显示，突变体在最适温度附近残留酶活力与野生酶无明显差异，但随着温度的上升(大于 40 °C)，其残留活力明显大于野生酶，在 50 °C 时，突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 残留近 50% 的活性，约为野生酶的 1.4 倍。突变体在不同 pH 条件下的比活力大小(图 5C)及在各 pH 条件下保温 2 h 后的残留活性曲线(图 5D)显示，突变酶在小于最适 pH 4.8 条件下，酶活力大小与野生酶差异不明显，但随着 pH 逐渐上升，突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 酶活力较野生酶有明显的提升，在 pH 6.0 时，突

变体酶活力是同条件下野生酶活力的 168%，且突变体在 pH 6.5 的条件下仍具有一定的酶活力，改变了野生酶在大于 pH 6.0 时无活性的特性。当突变体在 pH 3.6–5.0 下保温 2 h 后仍能保持 90% 左右的活力，在 pH 大于 5.0 的条件下，突变体残留酶活下降趋势较野生酶有所减缓，其中在 pH 5.4 下突变体残留活性约为 70%，远高于野生酶。以上有关突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 的酶学性质研究结果，说明了突变不仅拓宽了酶作用 pH 范围，还对改善酶在较高温及偏中性 pH 环境下的耐受性有重要影响。

2.2.2 分子动力学模拟解析突变的影响

为了从分子水平了解突变引起的变化，通过分子动力学模拟研究了出发酶 *LpGAD* 和突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 在结合模式以及相关动力学参数上的差异。

从图 6 中可以观察到，谷氨酸与 *LpGAD* 的结合通过不同的作用力维持，例如，小分子和蛋白上的 Gln-593、Ser-309、Thr-491、Phe-492 形成的氢键作用以及和 Lys-707、Arg-75 形成的

盐桥作用。而在谷氨酸与 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 的复合物中, 可以观察到更多的作用力, 例如, 谷氨酸可以和 Thr-642、Cys-493 形成额外的氢键作用, 和 Arg-850 形成盐桥作用, 以及和 Phe-308 形成疏水作用。多作用力的形成利于底物的稳定结合。

此外, 就复合物体系能量、溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA)、旋转半径的时间差(radius of gyration, Rog)和复合物均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)的变化参数分析了突变的影响。从图 7 可知, 在相同模拟条件下, 突变体系的能量低于原体

系, 平均总能量为 $-207\ 000\ \text{kcal/mol}$, 较初始值降低了 $43\ 000\ \text{kcal/mol}$, 这表明突变增加了酶的结构稳定性。RoG 反映分子中心与原子质量的关系, 可表征蛋白质结构的紧密性。从 RoG 中可以观察到 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 体系的 RoG 值减少, 表明酶的构象发生了收缩, 暗示突变体系的三元复合物更加密实且稳定。通过分析溶剂可及表面积发现, 在模拟前期, 2 个复合物 SASA 相当, 但是在模拟后期突变体 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 体系的 SASA 较小, 暗示该突变体系具有内敛的趋势, 突变使得体系内在作用增加, 即蛋白与底物以及辅因子作用更密

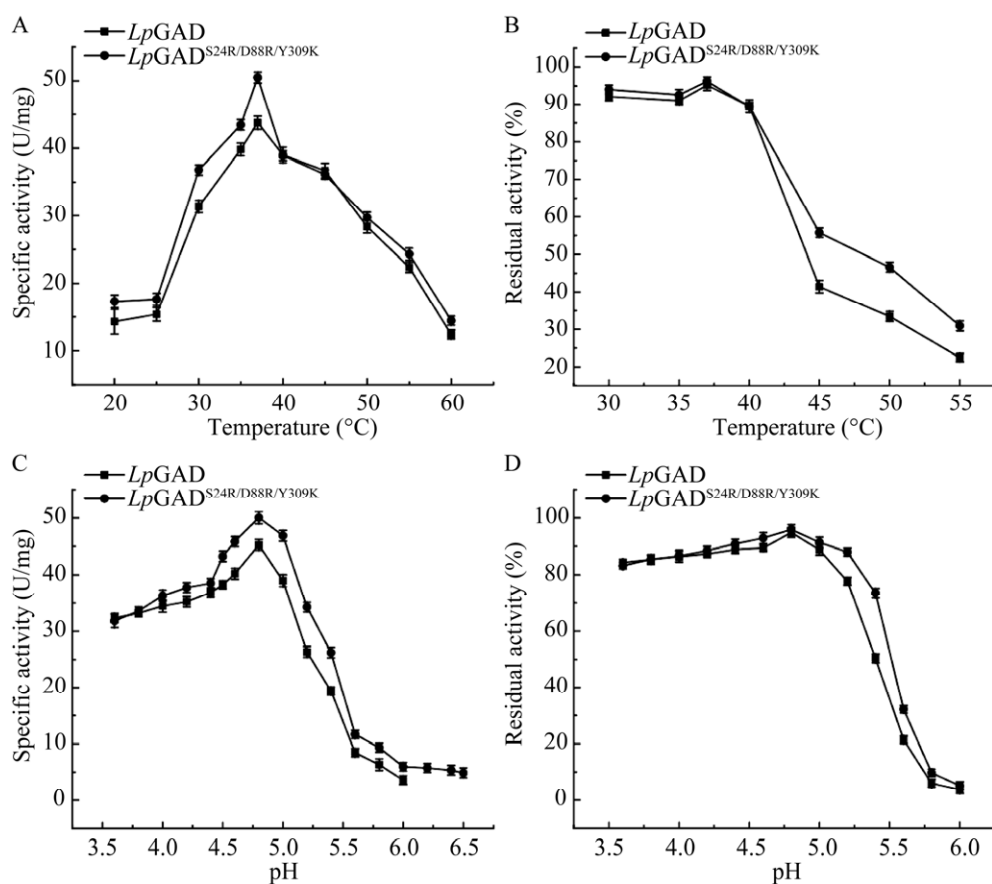


图 5 谷氨酸脱羧酶突变体 $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ 与野生酶 $LpGAD$ 在最适温度(A)、温度稳定性(B)、最适 pH (C)及 pH 稳定性(D)方面的比较

Figure 5 Comparison of $LpGAD^{S24R/D88R/Y309K}$ and $LpGAD$ in optimal temperature (A), thermal stability (B), optimal pH (C) and pH stability (D).

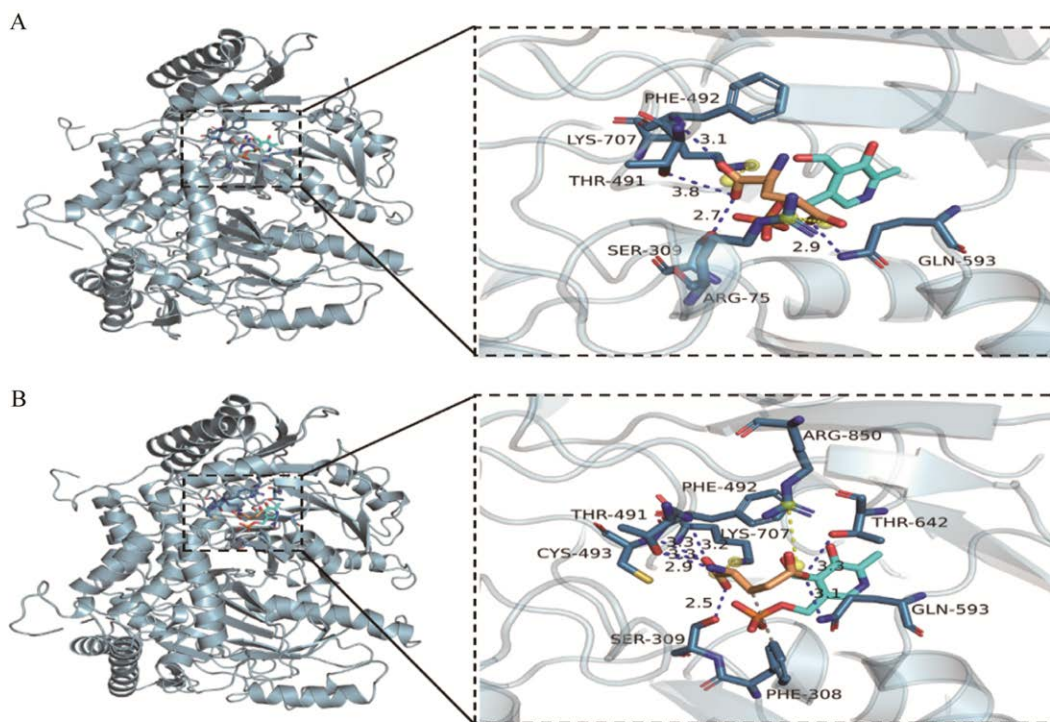


图 6 *LpGAD* (A)及其突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} (B)与底物的结合模式分析

Figure 6 Analysis of substrate binding mode in glutamate decarboxylase *LpGAD* (A) and the mutant *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} (B). Proteins are shown in blue, small molecules are shown in orange, hydrogen bonding is shown in dashed blue, hydrophobic action is shown in gray and salt bridge is shown in yellow.

切。RMSF 通过提供每个氨基酸的运动性信息，反映了模拟过程中蛋白的柔性，可用于分析热稳定性。从图中可以看到两体系 RMSF 整体都较小，表明残基的灵活性没有显著改变。但突变体在多处序列位置表现出更低 RMSF，且在氨基酸序号 298–328 处显著降低了蛋白的柔性，这种蛋白刚性的增加可能会对底物结合产生影响，利于稳定结合小分子底物，降低底物“脱靶”的敏感性，从而更好地催化反应发生。

2.3 全细胞转化体系的优化

2.3.1 重组谷氨酸棒杆菌的构建及诱导表达

谷氨酸棒杆菌作为食品安全菌株 GRAS，培养简单，不产内毒素，适用于原核生物基因的克隆表达及重组蛋白的有效分泌，在多种氨基酸及其衍生物生产中被广泛利用^[23]。由方法 1.2.3 构建表达 *Lpgad* 基因及 *Lpgad*^{S24R/D88R/Y309K} 突变基

因的谷氨酸棒杆菌重组菌株 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-*Lpgad* 和 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-*Lpgad*^{S24R/D88R/Y309K}。质粒构建流程如图 8 所示，重组谷氨酸棒杆菌转化子质粒测序验证成功后，在 BHI 培养基中逐步扩大培养。50 mL 体系培养 5 h 后加入 IPTG 诱导蛋白表达，20 h 后离心收集菌体，进行摇瓶转化。

2.3.2 温度对全细胞转化合成 GABA 的影响

转化温度通过影响菌体的生长状态以及酶的催化效率间接影响 GABA 的合成。考察了不同温度 25–60 °C 对全细胞催化合成 GABA 的影响。结果如图 9A 所示，在反应温度为 40 °C 时 GABA 的产量最高，为 35.3 g/L。当温度大于 50 °C 时，GABA 的产量下降明显，说明高温会影响突变酶 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 的活力，降低酶催化效率。

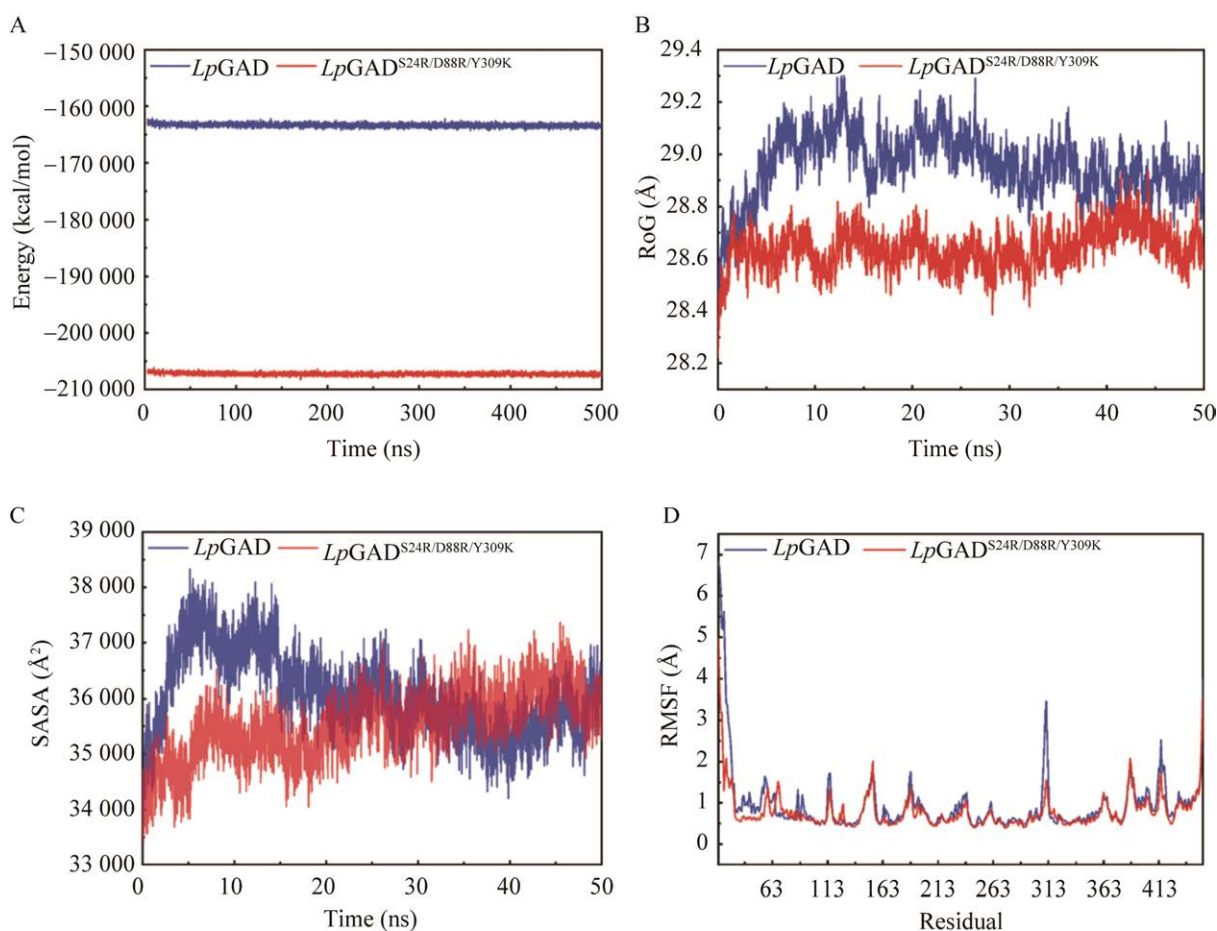


图7 *LpGAD* 及其突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 复合体系的总能量(A)、回转半径(B)、溶剂可及表面积(C)及均方根波动(D)

Figure 7 Total energy (A), radius of gyration (B), solvent-accessible surface area (C) and RMSF (D) of *LpGAD* and the mutant *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} composite system.

2.3.3 辅助因子浓度对全细胞转化合成 GABA 的影响

在全细胞转化中, GAD 酶依赖少量 PLP 发挥催化作用, 适当浓度的 PLP 能够促进重组菌合成产物, 使 GABA 产量不断提高, 所以需要对其对 PLP 的添加量进行优化。在最适转化温度 40 °C 条件下, 设置 PLP 浓度梯度为 50–350 μmol/L, 进行全细胞转化。如图 9B 所示, 随着 PLP 添加量的增加, GABA 的转化率不断增加。当 PLP 添加浓度为 100 μmol/L 时, GABA 产量为 35.6 g/L。当添加浓度 ≥ 100 μmol/L 时, GABA 产量上升幅

度减缓, 表明辅酶添加浓度 ≥ 100 μmol/L 时就可以满足反应的需求, 出于经济性原则考虑, 选取 PLP 浓度 100 μmol/L 进行后续优化实验。

2.3.4 底物浓度对全细胞转化合成 GABA 的影响

适当的底物浓度有利于促进产物的高效合成, 控制转化温度 40 °C, 辅酶 PLP 浓度 100 μmol/L, 设置底物谷氨酸浓度范围 60–160 g/L, 进行全细胞转化, 以确定最优底物浓度。结果如图 9C 所示, 在 L-谷氨酸浓度为 100 g/L 时, GABA 的产量最高, 为 37.7 g/L, 选取底物浓度 100 g/L 进一步优化。

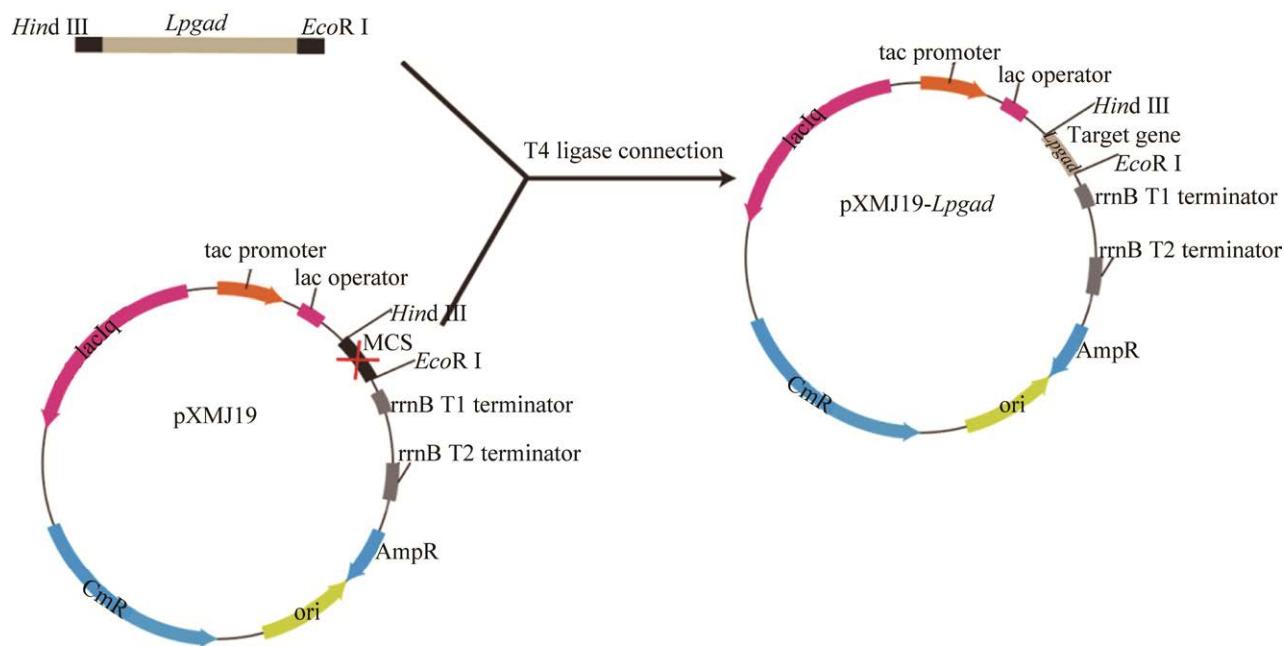


图 8 重组谷氨酸棒杆菌过表达质粒的构建

Figure 8 Construction of recombinant plasmid pXMJ19-Lpgad.

2.3.5 菌体量对全细胞转化合成 GABA 的影响

在实际工业生产中, 控制反应过程中的菌体量能有效降低成本和提高产率。设置菌体量 OD_{600} 为 5–40 的不同梯度, 在上述最适条件即反应温度 40 °C, PLP 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$, 谷氨酸浓度 100 g/L 下进行全细胞转化。结果如图 9D 所示, 在菌体 $OD_{600}=20$ 时, GABA 的产量最高, 为 38.7 g/L。

2.4 5 L 发酵罐水平全细胞分批补料转化合成 GABA

为了实现 GABA 的放大生产, 研究了重组谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad 和 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} 在 5 L 发酵罐水平上 GABA 的合成情况。用 0.9% 的 NaCl 溶液为缓冲体系分别悬浮了 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} 和 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad 菌体, 定容至 1 L, 控制初始反应条件一致, 菌体量 $OD_{600}=20$, 底物浓度 100.0 g/L, PLP 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$,

转化温度 40 °C, 于 5 L 发酵罐中进行转化, 转速 300 r/min, 不控制 pH, 14 h 内分批次投加 100 g 底物 L-谷氨酸。各时间段取样测得转化液中产物含量及底物谷氨酸的含量如图 10 所示。随着转化的进行, 底物消耗速度减缓, 依次增大投料时间间隔, 重组菌 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} 在 14 h 内实现 9 次投料, 考虑投料体积引起的变化, 测得 20 h 时 GABA 产量高达 402.8 g/L, 前期转化率可达 95.5%。*C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad 菌株 14 h 内实现 6 次投料, 20 h 时 GABA 积累量为 247.1 g/L。同时检测各时期转化液 pH 值发现, 在 20 h 时, *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} 转化液 pH 值达到 6.1, 高于 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad 转化液 pH 值。以上结果表明, 通过提高 LpGAD 酶在偏中性 pH 下的催化效率, 能够提高制备 γ -氨基丁酸的转化效率, 缩短生产周期。

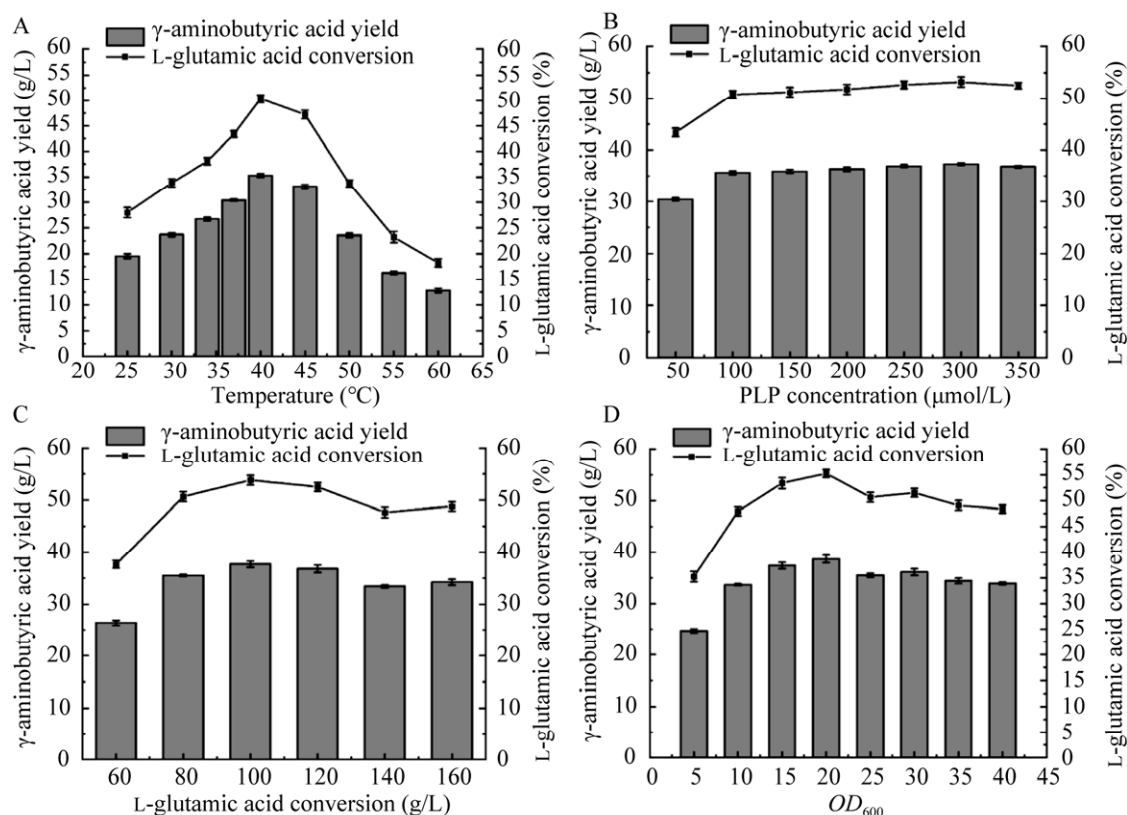


图 9 温度(A)、PLP 浓度(B)、底物浓度(C)及菌体密度(D)对重组菌 *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} 全细胞转化合成 γ -氨基丁酸的影响

Figure 9 Influence of temperature (A), PLP concentration (B), substrate concentration (C) and cell density (D) on the transformation of γ -aminobutyric acid using whole-cells of recombinant *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K}.

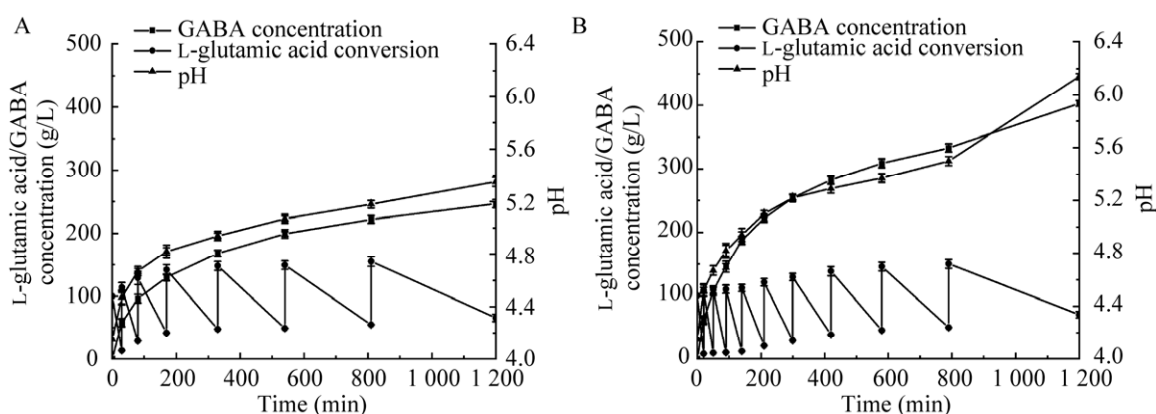


图 10 重组菌 *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad (A)和 *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} (B)在 5 L 发酵罐全细胞转化合成 γ -氨基丁酸

Figure 10 γ -aminobutyric acid synthesis using whole-cells of *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad (A) and *Corynebacterium glutamicum* E01/pXMJ19-Lpgad^{S24R/D88R/Y309K} (B) in a 5 L fermenter.

3 讨论与结论

本研究基于表面电荷的策略理性设计 *LpGAD* 酶, 通过在谷氨酸棒杆菌中异源表达优势突变酶 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K}, 实现了全细胞催化 L-谷氨酸高效合成 γ -氨基丁酸。首先从实验室保存的一株 ARTP 诱变后的高产 GABA 的植物乳杆菌中克隆表达 GAD 酶, 并测定其酶学性质, 发现其最适 pH 偏酸性, 但在 GABA 转化生成过程中, 随着 GABA 生成, 溶液 pH 会逐渐上升, 不利于 GAD 酶的持续转化, 因此, 有必要拓宽其 pH 适用范围, 以实现 GABA 的高效合成。本研究采用 Rosetta Supercharge 理性设计 *LpGAD*, 共选取 9 个突变位点进行定点突变, 获得的三突变体 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 成功提升了最适 pH 下的活力, 同时提升了酶在偏中性 pH 下的酶活, 通过酶学性质研究及动力学模拟进一步分析突变的影响。接着将 *LpGAD* 和 *LpGAD*^{S24R/D88R/Y309K} 在 *C. glutamicum* E01 中进行过表达构建单细胞工厂, 为进一步提高全细胞催化体系的效率, 从温度、PLP 辅助因子浓度、底物浓度和菌体量 4 个方面优化了全细胞催化体系, 确定最适转化条件为反应温度 40 °C, PLP 浓度 100 μ mol/L, 菌体量 OD_{600} 为 20, 底物谷氨酸浓度为 100.0 g/L。最终的工程菌 *C. glutamicum* E01/pXMJ19-*Lpgad*^{S24R/D88R/Y309K} 在最适反应条件下, 于 5 L 罐放大转化体系中, 初始添加 1 L 转化液, 14 h 内分 10 批次共投料 1 000 g 谷氨酸高效合成 γ -氨基丁酸, 产量高达 402.8 g/L, 前期摩尔转化率为 95.5%, 达到国内领先水平。目前, 国内 Wen 等^[37]以葡萄糖和玉米秸秆水解液为底物利用重组谷氨酸棒杆菌发酵合成 γ -氨基丁酸, 发酵 72 h 和 40 h, 产量达 77.6 g/L 和 39.2 g/L, 得率达到 0.44 g/g 葡萄糖和 0.39 g/g 葡萄糖; Ke 等^[38]以过表达乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) FJNUGA01 来源的 GAD 酶的重组大肠杆菌为生产菌, 在条

件优化后全细胞催化生产 γ -氨基丁酸, 7 h 后最终产物浓度约 204 g/L, 产物产量较低。本研究一定程度上解决了 γ -氨基丁酸全细胞催化生产过程中关键酶 pH 作用区间较小的问题, 不仅提升了 *LpGAD* 酶在最适 pH 下的酶活, 同时提升了酶在偏中性 pH 下的酶活, 从而增强了该酶合成 γ -氨基丁酸的能力, 使其更适应于工业生产。同时, 本研究也对其他生产用关键酶 pH 改造提供了一定指导意义。

REFERENCES

- [1] HONG J, KIM KJ. Crystal structure of γ -aminobutyrate aminotransferase in complex with a PLP-GABA adduct from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 514(3): 601-606.
- [2] GRAMAZIO P, TAKAYAMA M, EZURA H. Challenges and prospects of new plant breeding techniques for GABA improvement in crops: tomato as an example[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 577980.
- [3] LEÓN I, PEÑA I, CABEZAS C, ALONSO ER, ALONSO JL. The last link of the x-aminobutyric acid series: the five conformers of β -aminobutyric acid[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20(22): 15574-15580.
- [4] SARASA SB, MAHENDRAN R, MUTHUSAMY G, THANKAPPAN B, SELTA DRF, ANGAYARKANNI J. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes[J]. Current Microbiology, 2020, 77(4): 534-544.
- [5] GREWAL J, KHARE SK. 2-pyrrolidone synthesis from γ -aminobutyric acid produced by *Lactobacillus brevis* under solid-state fermentation utilizing toxic deoiled cottonseed cake[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(1): 145-152.
- [6] WU QL, SHAH NP. High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(17): 3661-3672.
- [7] BARITUGO KA, KIM HT, DAVID Y, KHANG TU, HYUN SM, KANG KH, YU JH, CHOI JH, SONG JJ, JOO JC, PARK SJ. Enhanced production of

- gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from empty fruit bunch biosugar solution[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 1-12.
- [8] LUO HZ, LIU Z, XIE F, BILAL M, LIU LN, YANG RL, WANG ZY. Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(4): 491-512.
- [9] PHAM VD, LEE SH, PARK SJ, HONG SH. Production of gamma-aminobutyric acid from glucose by introduction of synthetic scaffolds between isocitrate dehydrogenase, glutamate synthase and glutamate decarboxylase in recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 207: 52-57.
- [10] ZHANG Y, ZHAO J, WANG XL, TANG Y, LIU SW, WEN TY. Model-guided metabolic rewiring for gamma-aminobutyric acid and butyrolactam biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. Biology, 2022, 11(6): 846.
- [11] HUANG J, MEI LH, XIA J. Application of artificial neural network coupling particle swarm optimization algorithm to biocatalytic production of GABA[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 96(5): 924-931.
- [12] GONG LC, REN C, XU Y. GlnR negatively regulates glutamate-dependent acid resistance in *Lactobacillus brevis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(7): e02615-19.
- [13] HUANG Y, SU LQ, WU J. Pyridoxine supplementation improves the activity of recombinant glutamate decarboxylase and the enzymatic production of gamma-aminobutyric acid[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0157466.
- [14] JIANG DH, CAI QM, GAO AT, LI J, YANG Y, XU XB, YE Y, HOU JH. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from a high-yielding γ -aminobutyric acid yeast strain MJ2[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(2): 487-494.
- [15] CUI YH, MIAO K, NIYAPHORN S, QU XJ. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 995.
- [16] KOOK MC, SEO MJ, CHEIGH CI, PYUN YR, CHO SC, PARK H. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(4): 763-766.
- [17] LIU QD, CHENG HJ, MA XQ, XU N, LIU J, MA YH. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1107-1113.
- [18] ZHANG HU, ZHAO, HUANG, MEI, MEI. Parallel strategy increases the thermostability and activity of glutamate decarboxylase[J]. Molecules, 2020, 25(3): 690.
- [19] 汪钟. 短乳杆菌谷氨酸脱羧酶热稳定性的理性改造[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2020.
- WANG Z. Rational modification of thermal stability of *Lactobacillus brevis* glutamate decarboxylase[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [20] KANG TJ, HO NA, HACK SP. Buffer-free production of gamma-aminobutyric acid using an engineered glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 53(3): 200-205.
- [21] SHI F, XIE Y, JIANG J, WANG N, LI Y, WANG X. Directed evolution and mutagenesis of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* Lb85 to broaden the range of its activity toward a near-neutral pH[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 61/62: 35-43.
- [22] SHIN SM, KIM H, JOO Y, LEE SJ, LEE YJ, LEE SJ, LEE DW. Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(50): 12186-12193.
- [23] ZHANG RZ, YANG TW, RAO ZM, SUN HM, XU MJ, ZHANG X, XU ZH, YANG ST. Efficient one-step preparation of γ -aminobutyric acid from glucose without an exogenous cofactor by the designed *Corynebacterium glutamicum*[J]. Green Chemistry, 2014, 16(9): 4190-4197.
- [24] 饶志明, 韩瑾, 杨套伟, 徐美娟, 张显. 一种pH耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在 γ -氨基丁酸合成中的应用: CN114525268A[P]. 2022-05-24.
- RAO ZM, HAN J, YANG TW, XU MJ, ZHANG X. Glutamate decarboxylase mutant with improved pH tolerance and application thereof in synthesis of gamma-aminobutyric acid: CN114525268A[P]. 2022-05-24 (in Chinese).
- [25] 乔郅钠, 徐美娟, 龙梦飞, 杨套伟, 张显, 中西秀树,

- 饶志明. TCA 循环关键节点对 L-谷氨酸合成的影响[J]. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2113-2125.
- QIAO ZN, XU MJ, LONG MF, YANG TW, ZHANG X, NAKANISHI H, RAO ZM. Effect of key notes of TCA cycle on L-glutamate production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(10): 2113-2125 (in Chinese).
- [26] 余秉琦, 沈微, 诸葛健. 适用于异源 DNA 高效整合转化的谷氨酸棒杆菌电转化法[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 78-81.
- YU BQ, SHEN W, ZHUGE J. An improved method for integrative electrotransformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic DNA[J]. Progress in Biotechnology, 2005, 25(2): 78-81 (in Chinese).
- [27] ZHAO AQ, HU XQ, LI Y, CHEN C, WANG XY. Extracellular expression of glutamate decarboxylase B in *Escherichia coli* to improve gamma-aminobutyric acid production[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 1-13.
- [28] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [29] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, de BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [30] HOOFT RWW, SANDER C, VRIEND G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot[J]. Bioinformatics, 1997, 13(4): 425-430.
- [31] der BS, KLUWE C, MIKLOS AE, JACAK R, LYSKOV S, GRAY JJ, GEORGIU G, ELLINGTON AD, KUHLMAN B. Alternative computational protocols for supercharging protein surfaces for reversible unfolding and retention of stability[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64363.
- [32] SALOMON-FERRER R, CASE DA, WALKER RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2013, 3(2): 198-210.
- [33] SAGUI C, DARDEN TA. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1999, 28: 155-179.
- [34] KRÄUTLER V, van GUNSTEREN WF, HÜNENBERGER PH. A fast SHAKE algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations[J]. Journal of Computational Chemistry, 2001, 22(5): 501-508.
- [35] LARINI L, MANNELLA R, LEPORINI D. Langevin stabilization of molecular-dynamics simulations of polymers by means of quasisymplectic algorithms[J]. The Journal of Chemical Physics, 2007, 126(10): 104101.
- [36] KHERSONSKY O, LIPSH R, AVIZEMER Z, ASHANI Y, GOLDSMITH M, LEADER H, DYM O, ROGOTNER S, TRUDEAU DL, PRILUSKY J, AMENGUAL-RIGO P, GUALLAR V, TAWFIK DS, FLEISHMAN SJ. Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires[J]. Molecular Cell, 2018, 72(1): 178-186.e5.
- [37] WEN JB, BAO J. Improved fermentative γ -aminobutyric acid production by secretory expression of glutamate decarboxylase by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 331: 19-25.
- [38] KE CR, WEI J, REN Y, YANG XW, CHEN J, HUANG JZ. Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, 32(3): 1-8.

(本文责编 郝丽芳)