



## 谷氨酸脱羧酶结构及催化机制的研究概述

孙磊 王苑 柏映国\* 罗会颖 姚斌 涂涛\*

中国农业科学院饲料研究所 农业农村部饲料生物技术重点实验室 北京 100081

**摘要:** 谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)是一种磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)依赖性酶,广泛存在于自然界的动植物和微生物中,在酸性环境下发生结构变化,不可逆地催化 L-谷氨酸或谷氨酸盐  $\alpha$ -脱羧生成  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)。 $\gamma$ -氨基丁酸在人体中作为一种抑制性神经递质,具有重要的生理功能,可以被广泛应用于食品和制药工业中。本文就谷氨酸脱羧酶结构及催化机制的研究进展进行概述。

**关键词:** 谷氨酸脱羧酶,  $\gamma$ -氨基丁酸, 催化机制, 晶体结构

## Structure and catalytic mechanism of glutamate decarboxylase: a review

SUN Lei WANG Yuan BAI Ying-Guo\* LUO Hui-Ying YAO Bin TU Tao\*

Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Glutamate decarboxylase, a widely distributed in plants, animals and microorganisms in nature, is a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme. It undergoes structural changes in an acidic environment and can irreversibly catalyze the  $\alpha$ -decarboxylation of L-glutamic acid or glutamate to produce  $\gamma$ -aminobutyric acid.  $\gamma$ -aminobutyric acid, as an inhibitory neurotransmitter in human body, has important physiological functions and can be widely used in the food and pharmaceutical industries. In this paper, the research progress of the structure and catalytic mechanism of glutamate decarboxylase was summarized.

**Keywords:** Glutamate decarboxylase,  $\gamma$ -aminobutyric acid, Catalytic mechanism, Crystal structure

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是自然界普遍存在的一种四碳非蛋白质氨基酸,主要以兼性离子的方式存于水溶液中<sup>[1-2]</sup>。在微生物中, GABA 的生成过程与菌体的耐酸机制直接相

关<sup>[3-5]</sup>。研究发现,大多真核微生物细胞内 GABA 的存在可促进孢子生长<sup>[6]</sup>;另外, GABA 在酵母抵御活性氧及有机酸等逆境胁迫中也发挥着重要作用<sup>[4,7]</sup>。在植物中, GABA 影响着植物碳源和氮源

**Foundation item:** China Agriculture Research System (CARS-41)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-10-82106065

E-mail: BAI Ying-Guo: baiyingguo@caas.cn; TU Tao: tutao@caas.cn

**Received:** 31-10-2019; **Accepted:** 03-04-2020; **Published online:** 09-05-2020

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-41)

**\*通信作者:** Tel: 010-82106065

E-mail: 柏映国: baiyingguo@caas.cn; 涂涛: tutao@caas.cn

收稿日期: 2019-10-31; 接受日期: 2020-04-03; 网络首发日期: 2020-05-09

的存储,能诱导生物体中乙烯的合成或调节胞内 pH 的平衡,同时防止植物体受氧化胁迫或渗透压等外界环境的影响,并在抵抗真菌和害虫等多种生理生化反应中均有参与<sup>[8]</sup>。此外,在动物体内 GABA 同样发挥着重要的生理功效,主要表现为:(1) 血压与心率的调节<sup>[9]</sup>;(2) 促进生长激素分泌<sup>[10]</sup>;(3) 抗衰老<sup>[11]</sup>;(4) 保肝利肾<sup>[12]</sup>;(5) 治疗哮喘<sup>[13]</sup>;(6) 其余功能:除上述功能外,GABA 还具备其他多种生理功效,如改善机体的脂质代谢、减缓血管动脉硬化、防止皮肤的老化、预防肥胖、抑制癌细胞生长和促进生殖等<sup>[13-14]</sup>,因此 GABA 在医药领域得到越来越多的关注。GABA 减少活动量、促进生长的作用,使其还可以作为一种新型饲料添加剂应用于畜牧业。

目前工业制备 GABA 包括化学合成和生物转化两种常用方法,生物转化法相比较化学合成法具有反应过程简单、条件温和的优势,而围绕生物转化法的核心便是谷氨酸脱羧酶。谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)是一种依赖于磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)的 II 类氨基酸脱羧酶,可催化 L-谷氨酸或谷氨酸盐脱羧生成 GABA,并释放出 CO<sub>2</sub><sup>[15]</sup>。GAD 广泛分布于从单细胞生物到哺乳动物的各种有机体活细胞中。微生物生长条件较简单、生长速度快、代谢过程特殊,成为生物酶的重要来源。利用微生物中的 GAD 生物转化生产 GABA 不受资源、环境和空间等因素的限制,具有显著的优点<sup>[16]</sup>。但不同来源的 GAD 在结构和功能上具有一定的差异,因此利用蛋白质工程、生物信息学等技术的支持在现有 GAD 结构的基础上进行定向改造或者获得新来源的 GAD,对得到高效益的 GAD 具有不可忽视的作用。

蛋白质工程是在基因重组、分子生物学等学科的基础上,融合了蛋白质晶体学、动力学和计算机辅助设计等多学科而发展起来的新兴研究领域,其内容主要有两个方面:(1) 根据需要合成具

有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质;(2) 确定蛋白质化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。在此基础之上,实现从氨基酸序列预测蛋白质空间结构和生物功能的目标,最终设计合成具有特定生物功能的全新蛋白质。例如,Tu 等在对蛋白质分子结构进行分析的基础上,在不影响酶活性的同时,通过增加构象的刚性来提高酶的热稳定性<sup>[17-18]</sup>。因为不同来源 GAD 的结构差异较大,且结构与功能之间关系的研究报道较少。因此,本文主要就已有的不同来源谷氨酸脱羧酶的结构进行综述,加深对其催化机制的了解。

## 1 谷氨酸脱羧酶的来源

GAD 广泛存在于动植物和微生物中(表 1),且 GAD 在动物中枢神经系统中的作用一直是研究的热点。不同来源的 GAD 在酶学性质上不仅种属间具有一定差异,而且在亚种之间也有一定差异。通常微生物来源的 GAD 在酸性范围内具有活性,当 pH 偏中性时酶活消失;其最适反应 pH 值在 3.8–5.0 之间,主要集中在 pH 4.0–5.0。植物来源的 GAD 最适 pH 为弱酸性,主要集中在 pH 5.5–6.0。动物来源的 GAD 最适 pH 为中性,在 pH 7.0 左右。

表 1 不同来源的 GAD

Table 1 Different source of GAD

来源 Source	最适温度 Optimum temperature (°C)	最适 pH Optimum pH	参考文献 References
微生物 Microorganism			
<i>Escherichia coli</i> K12	37	3.8–4.6	[19]
<i>Lactobacillus brevis</i> Lb85	50	4.0–5.0	[20]
<i>Lactobacillus sakei</i> A156	55	5.0	[21]
<i>Bacillus megaterium</i> CICC10055	50	5.5	[22]
植物 Plant			
大豆 Soy	40	5.9	[23]
玉米胚 Corn germ	40	5.7	[24]
米胚 Rice embryo	40	5.5–5.8	[25]
动物 Animal			
人 Human	37	6.8	[26]
猪 Pig	37	7.0–7.5	[27]

不同 GAD 最适反应温度差别相对较大, 与其生长温度范围有很大关系, 生长温度范围较高的微生物、植物的 GAD 其最适反应温度也相对较高, 主要在 30–50 °C 之间。

## 2 谷氨酸脱羧酶的催化机理

GAD 是一种 PLP 依赖酶, PLP 可以催化外消旋化、转氨、脱羧、消除、克莱森缩合等多种反应, 且 PLP 催化的大多数反应是从 Schiff 碱的碳上提取质子, 去质子化通常由赖氨酸的氨基进行, 赖氨酸是通过 PLP 从醛亚胺内部释放出来, 导致碳负离子中间体即醌类中间体的形成, 该中间体由 Schiff 碱和吡啶环共振稳定<sup>[28]</sup>。

PLP 催化 GAD 脱羧生成 GABA 的具体催化过程如图 1 所示。首先, PLP 在无底物时同酶活性部位的赖氨酸  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 以 Schiff 碱结合, 形成内部的醛

亚胺结构; 在 L-Glu 进入 GAD 的底物结合口袋时, 辅酶 PLP 与 L-Glu 作用形成外部的醛亚胺, 继而由 GAD 催化脱羧形成一种结构极不稳定的醌类中间体; 该中间体会立即转化成与 PLP 结合的醛亚胺结构, 同时释放产物 GABA, PLP 与 GAD 在反应结束后恢复至初始状态<sup>[28]</sup>。

## 3 谷氨酸脱羧酶的结构特征

随着结构生物学的发展和对 GAD 研究的深入, 研究者们已经得到了来自大肠杆菌、短乳杆菌、拟南芥和人的总共 7 个 GAD 的晶体结构 (表 2)。

### 3.1 微生物来源的谷氨酸脱羧酶

目前在很多细菌、真核生物中发现了 GAD, 其中对大肠杆菌 GAD 的研究最为深入, 并得到了 *E. coli* GAD 的晶体结构。

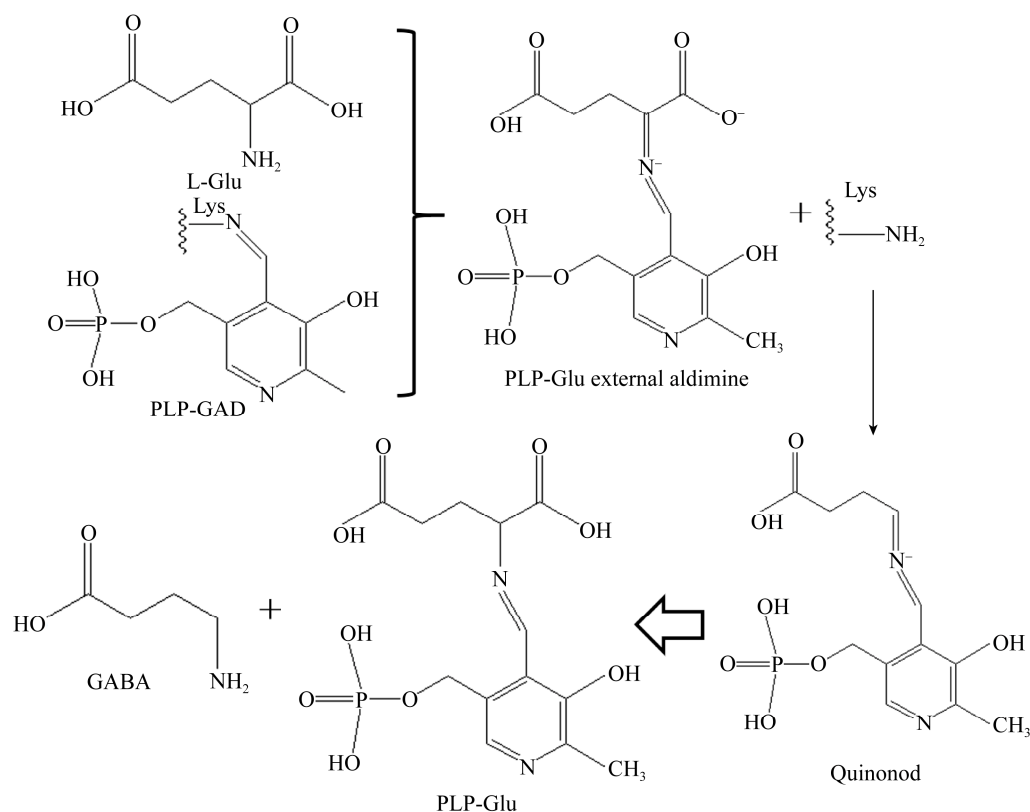


图 1 GAD 的催化过程

Figure 1 Catalytic process of GAD

表 2 已报道的 GAD 结构

Table 2 The crystal structure of reported GAD

来源 Source	Protein Data Bank (PDB) ID	参考文献 References
<i>Lactobacillus brevis</i>	5GP4	[29]
<i>Homo sapiens</i>	2OKJ	[30]
<i>Homo sapiens</i>	2OKK	[30]
<i>Homo sapiens</i>	3VP6	[30]
<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	1PMM	[31]
<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	1PMO	[31]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3HBX	[32]

*E. coli* GAD 存在 GadA 和 GadB 两种亚型, 由染色体上的 *gadA* 和 *gadB* 两段基因编码, 它们与 *gadC* 编码的 Glu/GABA 反转运体——GadC 共同组成大肠杆菌的耐酸系统<sup>[29-30]</sup>。*E. coli* GAD 是由 6 个相同的亚基组成的六聚体, 六聚体被分成两层, 每层由 3 个亚基组成, 两层的亚基呈中心对称。每个亚基由 N 端、C 端和 PLP 结合区三部分组成, 每个 PLP 结合区中都有一分子 PLP 通过共价键与 GAD 的赖氨酸相结合<sup>[31]</sup>。GAD 每个亚基又可以划分为大(58–346)、小(347–466)两个结构域。大结构域中包含辅因子结合位点, 即 PLP 结构域, 以及 300–313 残基形成的  $\beta$ -发夹结构。该结构域由 7 条混合的  $\beta$ -折叠片和 8 个  $\alpha$ -螺旋组成。小结构域则由一个四股反平行  $\beta$ -折叠片和 3 条  $\alpha$ -螺旋组成。

*E. coli* GAD 六聚体在酸性 pH 时具有活性, 其整体结构与中性 pH 时基本一致, 主要变化发生在 N 端、C 端以及 300–313 残基的  $\beta$ -发夹结构<sup>[31]</sup>。N 端 3–15 残基在中性 pH 时不呈现任何形式的二级结构, 且在 6 个亚基中的结构都不相同, 其形状类似一个“钩子”, 可以延伸到另一层并与另一亚基相连, 对六聚体的形成具有重要作用(图 2); 另外, 在酸性 pH 时 3–15 残基在所有亚基中都会形成垂直于六聚体平面的  $\alpha$ -螺旋构象<sup>[33]</sup>。

在中性 pH 下, 由第 300–313 位氨基酸残基组成的  $\beta$ -发夹结构与二聚体中的另外一个亚基 C 端的 463–466 位残基相互作用, 改变了酶活性中心的空间构象, 增大了底物与酶结合的空间位阻。此时的 C 末端延伸到催化口袋里, H465 与 K276-PLP 结合形成稳定的支撑, T466 与活性位点结合, 阻止了底物与活性位点的结合, 从而使酶活降低(图 3)<sup>[34]</sup>。

### 3.2 植物来源的谷氨酸脱羧酶

与其他来源的 GAD 相比, 植物中的 GAD 具有特殊的生理功能, 其 C 末端存在钙调蛋白结合区 (CaM-binding domains, CaMBD), 可以感知  $\text{Ca}^{2+}$  信号, 达到激活 GAD 的目的<sup>[35]</sup>。

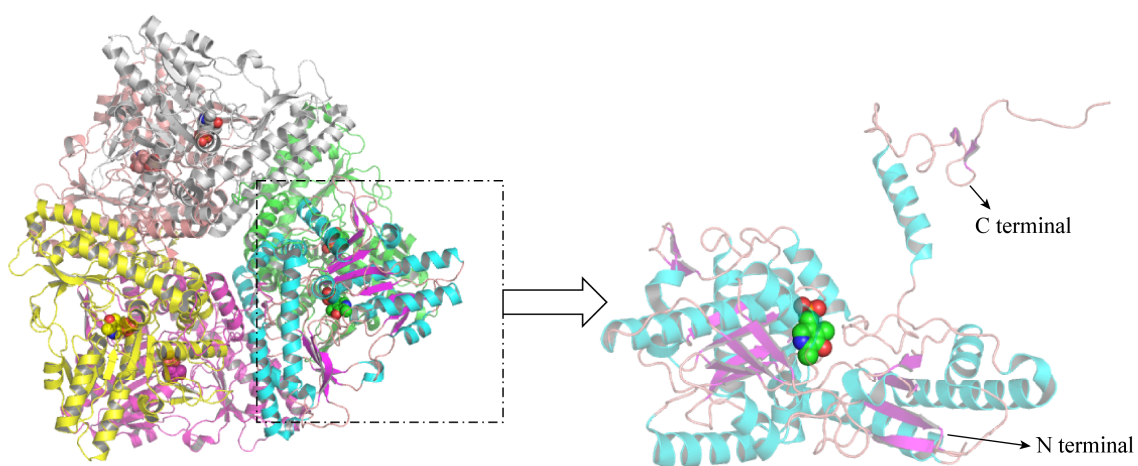


图 2 GAD 六聚体及其单体的结构

Figure 2 The hexamer structure of GAD and its monomer

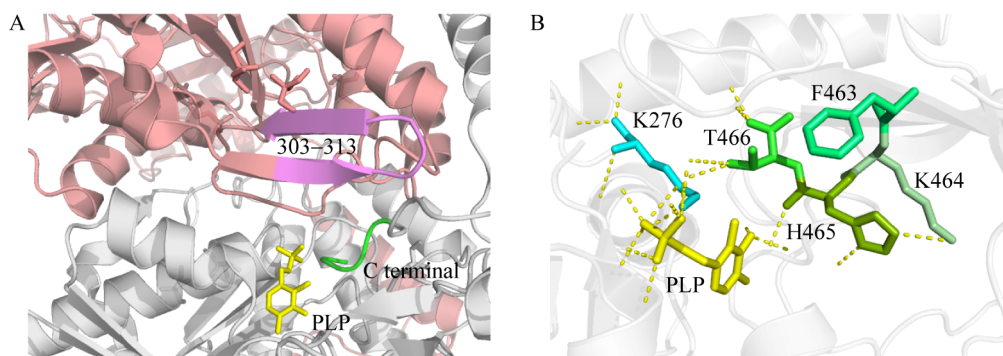


图3 中性 pH 下 GadB 活性中心的空间构象

Figure 3 The active center conformation of the GadB at neutral pH condition

注: A: 中性 pH 时, 303–313 残基的  $\beta$ -发夹结构(紫色)和 C 末端(绿色)延伸到催化口袋占据底物结合位点; B: C 末端残基 463–466 及 Lys276 与 PLP 之间的相互作用。

Note: A: The 303–313 residues in the  $\beta$ -hairpin structure (purple) and C-terminal (green) extend to the catalytic pocket to occupy the substrate binding site at neutral pH condition; B: The interactions between the residues 463–466 at C-terminal, Lys276 and the PLP-cofactor.

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)谷氨酸脱羧酶 (AtGad1)与细菌 GadB 结构相似, 具有 39% 的序列同一性, 这两种酶具有相同的折叠和亚基结合方式<sup>[32-33]</sup>。AtGad1 在植物体内参与发育和抵御酸性胁迫, 在生理 pH 的条件下(pH 7.0–8.0)主要以二聚体的形式存在, 而酸性条件(pH 6.0–7.0)时二聚体被诱导组合成六聚体, 从而达到 AtGad1 最高的催化活性; AtGad1 六聚体的每个亚基由 N 端(残基 1–57)、包含辅因子结合位点的大结构域(残基 58–347)、小结构域(残基 348–448)和含有钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合区(CaMBD)的 C 端组成<sup>[35]</sup>。AtGad1 和 GadB 最主要的差异在 C 端, GadB 通过 C 端 14 个残基来调节其催化活性对 pH 的依赖性, 而 AtGad1 C 末端约 20 个残基连接的 CaMBD 使其依赖于 CaM 调节酶活<sup>[32-33]</sup>。

在 Gad1 中, 活性位点和辅助因子结合模式都有很好的保守性。PLP 通过 Schiff 碱基与 Lys277 共价连接。吡啶环夹在 Gln163 和 Ala246 之间, 而 Asp244 与吡啶环氮形成盐桥; Gad1 对应于 GadB 中 Thr62 的位置被丝氨酸所取代, 其可以与底物结合时充当供氢体<sup>[32]</sup> (图 4)。

Gad1 和 GadB 的 N 端关键功能模块有显著差异, 在 Gad1 中, 残基 1–15 主要是无序的, 而低

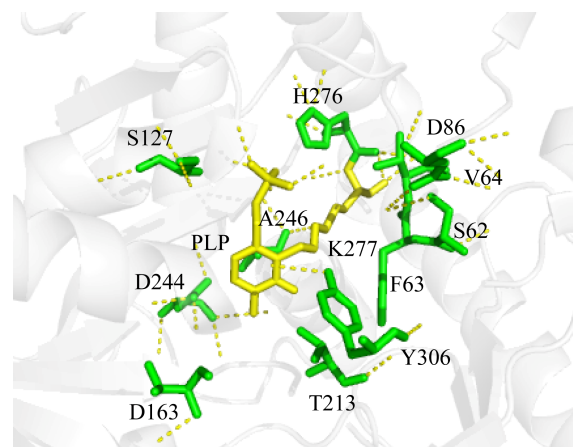


图4 PLP 及其周围活性位点的残基

Figure 4 The interactions of PLP with residues surrounding the active sites

pH 时, GadB 中每个亚基的 3–15 残基形成一个  $\alpha$ -螺旋, 并结合在两个对细胞定位很重要的三螺旋束中, GadB 的 N 端三螺旋束以可逆和 pH 依赖的方式形成, 这改变了蛋白质在细胞中的定位。但是由于少量氨基酸的变化, 这两种功能都不存在于植物蛋白 Gad1 中。相应的 Gad1 的 N 端残基不能形成这样的束, 因为 Gad1 的 N 端没有七肽重复序列<sup>[31]</sup>。Gad1 loop 区包含 16–20 残基, 其构象有利于卤化物与 Ser16 和 Arg427 的结合, 即使 Ser16 在结构上是保守的, 但在 Arg427 的位置上放置



一个负电荷残基(Glu423)的突变可以防止卤化物通过静电斥力与 Gad1 结合<sup>[28]</sup>。

### 3.3 动物来源的谷氨酸脱羧酶

动物 GAD 在动物体内作为一种神经递质, 存在 GAD65 和 GAD67 两种亚型, 它们都以二聚体形式存在, 但具有不同的结构特征。GAD 在动物体内的作用机制一直是研究的热点。

GAD67 单体由 C 端、PLP 结合域以及 N 端三部分组成, N 端包括两个平行的  $\alpha$ -螺旋; PLP 结合域包括 9 个  $\alpha$ -螺旋围绕的一个九股的平行  $\beta$ -折叠片; C 端结构域包含 3 个  $\alpha$ -螺旋和一个四股反平行  $\beta$ -折叠片; GAD67 的两个活性位点位于二聚体 PLP 结合域的中心, 在单体 A 中, 活性中心包含单独的 GABA 分子, GABA 的羧基与 Arg567 形成盐桥, 与 Gln190 形成氢键; 在单体 B 的活性中心, 观察到 GABA 两种无序的结构构象, PLP 和 GABA 之间的连续电子密度揭示了 PLP-GABA 中

间体的存在<sup>[30]</sup>(图 5)。

值得注意的是, 每个活性位点基本上都被另一个单体延伸过来的 Loop 环(残基 432-442, 称为“催化环”)所覆盖。催化环使保守残基 Tyr434 非常接近碱基堆积 His291 和 GABA(图 6); 在单体 A 的活性位点, Tyr434 的侧链羟基与碱基堆积 His291 的 Ne2 形成氢键; 在单体 B 的活性位点, Tyr434 被翻转成另一种构象, 其中羟基的氢键键合到 Tyr291 的主链氮<sup>[36]</sup>(图 5)。在单一构象(图 5A)中, Tyr434 的羟基距离 PLP-GABA 部分的质子化位点(C $\alpha$ )为 2.8 Å, 在活性位点可观察到游离 GABA<sup>[30]</sup>。因此, 我们认为 Tyr434 直接负责 C $\alpha$  的质子化, Tyr434 与 His291 之间的氢键有利于降低单体 A 活性中心 Tyr434 的 pKa。在单体 B 的活性位点, Tyr434 的羟基不能使 PLP-GABA 部分的 C $\alpha$  质子化, 因为它离 C $\alpha$  的距离大于 6 Å<sup>[30]</sup>。这与 PLP-GABA 中间体的存在是一致的, Tyr434 的

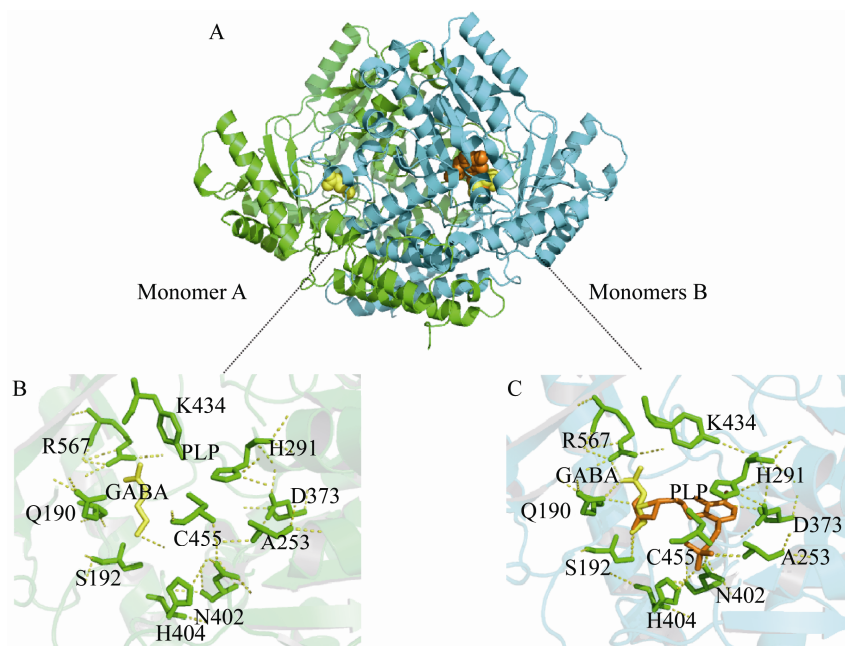


图 5 GAD67 的结构

Figure 5 The structure of GAD67

注: A: GAD67 二聚体及其单体结构; B、C: GAD67 B、A 两个单体中 PLP 及活性位点残基。

Note: A: The dimer structure of GAD67 and its monomer; The interactions between the PLP and active site residues in monomer A (C) and B (B) of GAD67.

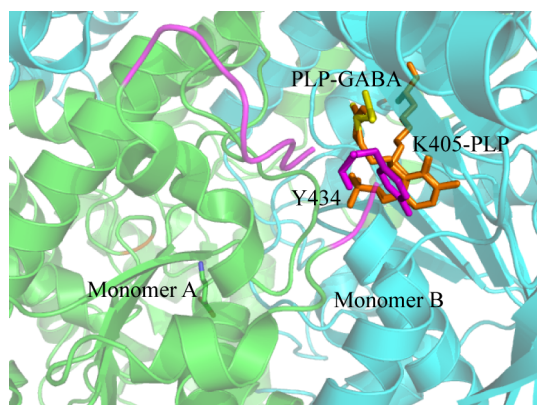


图6 GAD67 单体 A 的催化环

Figure 6 The catalytic loop of GAD67 in monomer A

扭转也有助于底物从活性位点进入和产物流出。综上所述, 这些结构为 GAD67 生产 GABA 提供合理的理论支撑。

在动物体内 GAD67 和 GAD65 都负责转化 GABA, 而 GAD67 始终处于活性状态来保持机体内 L-Glu/GABA 的正常代谢; GAD65 通常以脱辅酶的形式存在细胞中, 仅在机体迫切需要 GABA 时才具有活性<sup>[36-37]</sup>。GAD65 和 GAD67 采用相同的折叠和二聚体组合方式, PLP 在 GAD65 的两个活性位点通过共价键连接到 Lys396 上<sup>[30]</sup>。也可以观察到类似于在 GAD67 中看到 GABA 两个离散无序的构象, 但是没有观察到共价 PLP-GABA 中

间体的存在(图 7)。值得注意的是, 与 GAD67 相比, GAD65 中与催化环对应的区域是无序的, 活性位点完全暴露(图 7)。

催化环所包裹的整个 C 末端区域的动态构象是 GAD65 失活的关键, C 末端结构域在催化环的稳定性中起着重要作用。对 GAD67 来说, 活性位点上 Tyr434 的持续存在有利于质子化位点的质子化和 GABA 的不间断产生。

#### 4 展望

随着对不同来源 GAD 的性质及其产物 GABA 在神经系统中不可或缺作用的逐步了解, 使得 GABA 在医药领域得到越来越多的关注; 而且, GABA 减少活动量、促进生长的作用使其可以作为一种新型饲料添加剂应用于畜牧业<sup>[38]</sup>。因此, 获得生产效率高且安全应用的 GAD 生物酶便成为了研究的目标。然而目前报道的微生物 GAD 活性相对较低, 而且大多数都具有潜在的不安全性, 例如, 大肠杆菌在发酵过程容易产生内毒素, 因此寻找活性高且能安全用于 GABA 生产的微生物仍需不断努力。

近年来, 结合分子生物学、蛋白质组学、生物信息学等领域的发展, 可以从基因编辑及蛋白质定向改造方面入手获得新型优质的生物酶<sup>[39]</sup>。

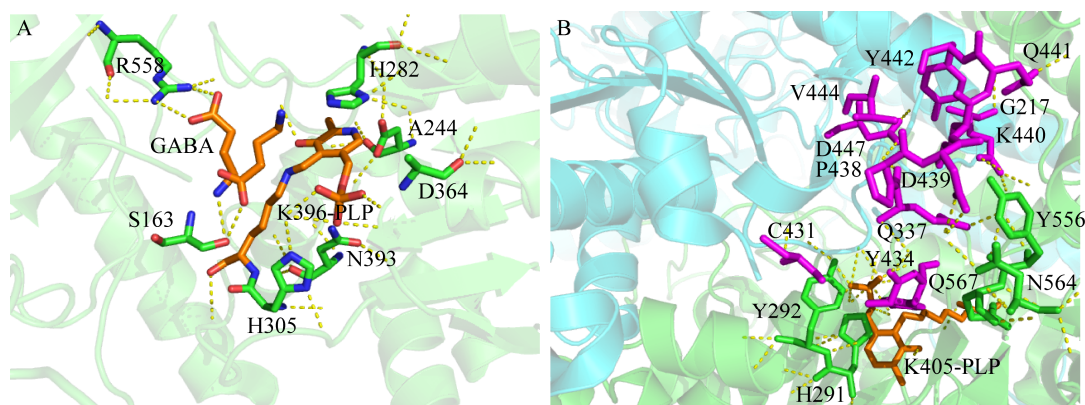


图7 GAD65 活性中心的构象

Figure 7 The active center conformation of GAD65

注: A: GAD65 的活性位点; B: GAD65 的催化环与相邻残基的作用。

Note: A: The active sites of GAD65; B: The interactions between the catalytic loop and adjacent residues for GAD65.

例如,本实验室对多聚半乳糖醛酸酶和葡萄糖氧化酶进行蛋白质结构改造,使酶的性能能更好地应用于生产需要<sup>[40]</sup>。对蛋白质进行的理性设计是基于对结构深入认知后展开的,也是用来确定与催化效率相关的重要因素<sup>[18]</sup>。然而目前获得的 GAD 结构较少,对于全面了解该酶的催化机制,以及在此基础上进行结构改良获得高转化效率的 GAD 具有一定的局限性。因此,获得更多不同来源的 GAD 结构,分析确定其保守残基及底物结合方式,对于更全面地了解 GAD 的催化机制、提高催化效率具有重要的指导意义,这也是我们需要努力的方向。

## REFERENCES

- [1] Tillakaratne NJK, Medina-Kauwe L, Gibson KM. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1995, 112(2): 247-263
- [2] Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of gaba ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1230-1241
- [3] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10(1/3): 67-79
- [4] Wang X, Li BZ, Ding MZ, et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol[J]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2013, 17(3): 150-159
- [5] de Biase D, Tramonti A, Bossa F, et al. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(6): 1198-1211
- [6] Hao R, Schmit JC. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa* conidia[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(8): 5135-5139
- [7] Cao JX, Barbosa JM, Singh NK, et al. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production[J]. *Yeast*, 2013, 30(4): 129-144
- [8] Bouché N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite?[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(3): 110-115
- [9] Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 10: 407-420
- [10] di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, et al. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2): 731-741
- [11] McCann SM, Vijayan E, Negro-Vilar A, et al. GAMMA aminobutyric acid (GABA), a modulator of anterior pituitary hormone secretion by hypothalamic and pituitary action[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1984, 9(2): 97-106
- [12] Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, et al. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 812-815
- [13] Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006, 6(1): 7-17
- [14] Khakhlin AS. Questioning the depolarizing effects of GABA during early brain development[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2011, 106(3): 1065-1067
- [15] Zhang QF, Hu S, Zhao WR, et al. Parallel strategy increases the thermostability and activity of glutamate decarboxylase[J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 690
- [16] de Carvalho CCCR. Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(2): 250-263
- [17] Tu T, Luo HY, Meng K, et al. Improvement in thermostability of an *Achaetomium* sp. strain Xz8 endopolygalacturonase via the optimization of charge-charge interactions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6938-6944
- [18] Tu T, Wang Y, Huang HQ, et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution[J]. *Food Chemistry*, 2019, 281: 163-170
- [19] Jun C, Joo JC, Lee JH, et al. Thermostabilization of glutamate decarboxylase B from *Escherichia coli* by structure-guided design of its pH-responsive N-terminal interdomain[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 174: 22-28
- [20] Shi F, Xie YL, Jiang JJ, et al. Directed evolution and maturation 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
- [21] Sa HD, Park JY, Jeong SJ, et al. Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus sakei* A156 isolated from *Jeot-gal*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(5): 696-703
- [22] Liu QD, Cheng HJ, Ma XQ, et al. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(7): 1107-1113
- [23] Yao Q, Zhang YZ. Isolation and properties of soybean glutamate decarboxylase[J]. *China Oils and Fats*, 2011, 36(11): 26-30 (in Chinese)  
姚琪, 张永忠. 大豆谷氨酸脱羧酶分离纯化及酶学性质研究[J]. *中国油脂*, 2011, 36(11): 26-30
- [24] Li N, Wang LL, Wu ZJ, et al. Some properties of glutamate



- decarboxylase from corn germ[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 34-38 (in Chinese)
- 李楠, 王玲玲, 吴子健, 等. 玉米胚谷氨酸脱羧酶的性质[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 34-38
- [25] Zhang H, Yao HY, Chen F, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1670-1676
- [26] Moody AJ, Hejnæs KR, Marshall MO, et al. Isolation by anion-exchange of immunologically and enzymatically active human islet glutamic acid decarboxylase 65 overexpressed in Sf9 insect cells[J]. Diabetologia, 1995, 38(1): 14-23
- [27] Nathan B, Bao J, Hsu CC, et al. A membrane form of brain L-glutamate decarboxylase: identification, isolation, and its relation to insulin-dependent mellitus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(1): 242-246
- [28] John RA. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995, 1248(2): 81-96
- [29] Huang J, Fang H, Gai ZC, et al. *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 glutamate decarboxylase: crystal structure and functional analysis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 503(3): 1703-1709
- [30] Fenalti G, Law RHP, Buckle AM, et al. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2007, 14(4): 280-286
- [31] Capitani G, de Biase D, Aurizi C, et al. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(16): 4027-4037
- [32] Gut H, Dominici P, Pilati S, et al. A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 392(2): 334-351
- [33] Gut H, Pennacchietti E, John RA, et al. *Escherichia coli* acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(11): 2643-2651
- [34] Astegno A, Capitani G, Dominici P. Functional roles of the hexamer organization of plant glutamate decarboxylase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2015, 1854(9): 1229-1237
- [35] Tramonti A, John RA, Bossa F, et al. Contribution of Lys276 to the conformational flexibility of the active site of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(20): 4913-4920
- [36] Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, et al. Epilepsy in mice deficient in the 65-kD isoform of glutamic acid decarboxylase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(25): 14060-14065
- [37] Kash SF, Tecott LH, Hodge C, et al. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1698-1703
- [38] Yang PL, Yao B. Research and development of enzymes used in feed[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(12): 1844-1851 (in Chinese)
- 杨培龙, 姚斌. 饲料用酶制剂的研究进展与趋势[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1844-1851
- [39] Guo YJ, Tu T, Qiu J, et al. Characterization and structure of a novel thermostable glucoamylase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(4): 616-625 (in Chinese)
- 郭玉杰, 涂涛, 邱锦, 等. 篮状菌 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 来源的高温葡萄糖淀粉酶性质与结构[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 616-625
- [40] Tu T, Li YQ, Luo Y, et al. A key residue for the substrate affinity enhancement of a thermophilic endo-polygalacturonase revealed by computational design[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(10): 4457-4466