

# 基于分子改造和宿主优化促地衣芽胞杆菌高效表达 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶

雷家琪, 张清, 祝志豪, 廖永庆, 陈守文, 蔡冬波\*

湖北大学 生命科学学院 湖北省环境微生物工程技术研究中心 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

雷家琪, 张清, 祝志豪, 廖永庆, 陈守文, 蔡冬波. 基于分子改造和宿主优化促地衣芽胞杆菌高效表达  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2026-2037.

LEI Jiaqi, ZHANG Qing, ZHU Zhihao, LIAO Yongqing, CHEN Shouwen, CAI Dongbo. Molecular modification and host optimization enhance the expression of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in *Bacillus licheniformis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2026-2037.

**摘要:**  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, GGT)在临床诊断、食品加工和医药制造等领域应用广泛, 然而较低的表达量限制了其广泛应用。为提高 GGT 表达水平, 本研究首先使用 MütCompute 软件对来源于地衣芽胞杆菌的 GGT 进行蛋白质工程改造, 获得了催化效率提高的突变体 GGT<sup>A339C</sup>。通过对底物结合口袋进行分析, 发现突变体 GGT<sup>A339C</sup> 的隧道结构更直, 底物结合区域更开放, 酶活较对照提高 255%。随后, 以地衣芽胞杆菌 BL11 为出发菌株, 通过整合表达分子伴侣 PrsA, 构建了高效分泌 GGT 的地衣芽胞杆菌 BL11::prsA/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup>, 其 GGT 酶活达到 22.1 U/mL。最后, 通过 5 L 发酵罐进行放大, GGT 酶活达 180.14 U/mL。本研究获得了高催化性能的突变体 GGT<sup>A339C</sup>, 并构建了一株高产 GGT 的地衣芽胞杆菌 BL11::prsA/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup>, 为 GGT 工业生产及催化应用奠定了基础。  
**关键词:**  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶; 地衣芽胞杆菌; 分子改造; 表达宿主

## Molecular modification and host optimization enhance the expression of $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in *Bacillus licheniformis*

LEI Jiaqi, ZHANG Qing, ZHU Zhihao, LIAO Yongqing, CHEN Shouwen, CAI Dongbo\*

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

**Abstract:**  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) is widely used in clinical diagnosis, food processing,

资助项目: 武汉市自然科学基金特区计划(2024040701010048)

This work was supported by the Special Zone Project of Wuhan Natural Science Foundation (2024040701010048).

\*Corresponding author. E-mail: caidongbo@hubu.edu.cn

Received: 2024-12-24; Accepted: 2025-02-26; Published online: 2025-02-26

and pharmaceutical manufacturing, whereas the low expression limits its application expansion. To improve the expression of GGT, we employed MütCompute to engineer the GGT derived from *Bacillus licheniformis* and obtained the mutant GGT<sup>A339C</sup> with improved catalytic efficiency. By analyzing the substrate-binding pocket, we found that the mutant GGT<sup>A339C</sup> had a more open substrate-binding region and a substantially straighter tunnel than the control, with a 255% increase in activity. Subsequently, with *B. licheniformis* BL11 as the starting strain, we constructed the strain BL11::prsA/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> with efficient GGT secretion by integrating the expression of chaperone PrsA, and the enzyme activity reached 22.1 U/mL. Finally, after optimization of the fermentation process in a 5 L fermenter, the GGT activity reached 180.14 U/mL, marking the highest level of GGT activity reported to date. In conclusion, the mutant GGT<sup>A339C</sup> with high catalytic performance was successfully obtained, and the strain *B. licheniformis* BL11::prsA/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> was attained with high production of GGT, which provided an excellent strain for the industrial production and catalytic application of GGT.

**Keywords:**  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase; *Bacillus licheniformis*; molecular modification; expression host

$\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, GGT)是一种普遍存在于生物体内的 N-末端亲核试剂(N-terminal nucleophile, Ntn)水解酶,其能够催化亲核取代反应,使  $\gamma$ -谷氨酰基团从谷胱甘肽或其他含有此基团的分子中转移至氨基酸、二肽或水等受体上,合成多种  $\gamma$ -谷氨酰化合物<sup>[1]</sup>,包括口服调节肽  $\gamma$ -D-谷氨酰-L-色氨酸<sup>[2]</sup>、谷胱甘肽(glutathione, GSH)前体  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸<sup>[3]</sup>、L-茶氨酸<sup>[4]</sup>等。因此,GGT在临床诊断、食品加工和医药制造等领域展现出广泛的应用潜力<sup>[5]</sup>。已有研究表明,大肠杆菌来源的 GGT 大部分是在胞外不稳定、具有亲水性的周质酶蛋白,而芽胞杆菌来源的 GGT 大多能分泌到胞外<sup>[6]</sup>,其工业应用价值更高。

微生物异源表达是提高目标酶蛋白表达水平的有效策略。目前,GGT 已在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)等多种宿主中成功表达。Bindal 等<sup>[7]</sup>在 *E. coli* BL21(DE3)中表达来源于地衣芽胞杆菌的 GGT,在 7.5 L 发酵罐中酶活达到 24.5 U/mL。Chen 等<sup>[8]</sup>通过筛选和优化地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)来源的 GGT 编码基因的

启动子、信号肽,将其在 *B. subtilis* 中表达的酶活提高到 53.65 U/mL。与此同时,随着结构生物学及计算机生物学的发展进步,越来越多的酶分子设计改造策略被陆续推出,并应用于 GGT 分子改造及催化性能提升。Ong 等<sup>[9]</sup>定向突变了 *E. coli* 来源 GGT 的第 114 位和 337 位精氨酸,发现这 2 个氨基酸位点对 GGT 正常功能发挥至关重要,突变体的 GGT 酶活均显著降低。刘栓英<sup>[10]</sup>通过对来源于短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*) ML413 的 *ggt* 基因进行随机突变,获得了正向突变体 GGT<sup>T463S</sup>,其比活力较对照提高了 1.52 倍。不过,目前 GGT 酶活的生产水平依旧较低,限制了 GGT 的生产和应用推广。

地衣芽胞杆菌是一种公认安全(generally regarded as safe, GRAS)的革兰氏阳性菌,其不仅具有良好的蛋白分泌能力,还具有生产周期短、生产效率高、遗传操作相对简单等优势,目前被广泛应用于酶制剂生产<sup>[11]</sup>。本课题组前期开发了系列表达元件工具库,并通过胞外蛋白酶敲除、蛋白分泌通道强化、膜壁工程等提高了多种酶蛋白表达水平<sup>[12-14]</sup>。本研究以地衣

芽胞杆菌 BL11 为出发菌株<sup>[15]</sup>, 通过蛋白质工程优化来源于 *B. licheniformis* 的 GGT, 并结合宿主改造及发酵工艺优化, 以期提高其在地衣芽胞杆菌中的表达水平, 为 GGT 的工业生产及催化应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所用到的质粒和菌株见表 1, 相关引物见表 2。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids                                                      | Characteristics                                                                                                                                                                                                                     | Source     |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Strains</b>                                                            |                                                                                                                                                                                                                                     |            |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α                                              | F-Φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | Lab store  |
| <i>Bacillus licheniformis</i> BL11                                        | WX-02Δ <i>mpr</i> Δ <i>vpr</i> Δ <i>aprX</i> Δ <i>epi</i> Δ <i>bpr</i> Δ <i>wpr</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>bprA</i> Δ <i>hag</i> Δ <i>amyL</i> Δ <i>pgsC</i>                                                                            | Lab store  |
| BL11-UTR9-DnaJ                                                            | WX-02Δ <i>mpr</i> Δ <i>vpr</i> Δ <i>aprX</i> Δ <i>epi</i> Δ <i>bpr</i> Δ <i>wpr</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>bprA</i> Δ <i>hag</i> Δ <i>amyL</i> Δ <i>pgsC</i> -UTR9-DnaJ                                                                 | Lab store  |
| BL11-SppA::pr <i>sA</i>                                                   | WX-02Δ <i>mpr</i> Δ <i>vpr</i> Δ <i>aprX</i> Δ <i>epi</i> Δ <i>bpr</i> Δ <i>wpr</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>bprA</i> Δ <i>hag</i> Δ <i>amyL</i> Δ <i>pgsC</i> -SppA::pr <i>sA</i>                                                        | Lab store  |
| BL11Δ <i>hrcA</i>                                                         | WX-02Δ <i>mpr</i> Δ <i>vpr</i> Δ <i>aprX</i> Δ <i>epi</i> Δ <i>bpr</i> Δ <i>wpr</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>bprA</i> Δ <i>hag</i> Δ <i>amyL</i> Δ <i>pgsC</i> Δ <i>hrcA</i>                                                              | Lab store  |
| BL11/pHY300                                                               | BL11 containing plasmid pHY300                                                                                                                                                                                                      | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT                                      | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT                                                                                                                                                                             | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>V43T</sup>                      | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>V43T</sup>                                                                                                                                                             | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>T140G</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>T140G</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A202G</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A202G</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>Q284K</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>Q284K</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>K320R</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>K320R</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>P379A</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>P379A</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>N440S</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>N440S</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>D475P</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>D475P</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                     | BL11 containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                                                                                                                                                            | This study |
| BL11-UTR9-DnaJ/pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>           | BL11-UTR9-DnaJ containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                                                                                                                                                  | This study |
| BL11-SppA::pr <i>sA</i> /pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup> | BL11-SppA::pr <i>sA</i> containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                                                                                                                                         | This study |
| BL11Δ <i>hrcA</i> /pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>       | BL11Δ <i>hrcA</i> containing plasmid pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                                                                                                                                               | This study |
| <b>Plasmids</b>                                                           |                                                                                                                                                                                                                                     |            |
| pHY300                                                                    | <i>E. coli</i> - <i>Bacillus</i> shuttle vector; Amp <sup>r</sup> in <i>E. coli</i> , Tc <sup>r</sup> in both <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>                                                                                 | Lab store  |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT                                           | Gene <i>ggt</i> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                     | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>V43T</sup>                           | GGT <sup>V43T</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                 | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>T140G</sup>                          | GGT <sup>T140G</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A202G</sup>                          | GGT <sup>A202G</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>Q284K</sup>                          | GGT <sup>Q284K</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>K320R</sup>                          | GGT <sup>K320R</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>A339C</sup>                          | GGT <sup>A339C</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>P379A</sup>                          | GGT <sup>P379A</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>N440S</sup>                          | GGT <sup>N440S</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |
| pPykzA+rbs6-SP <i>SacC</i> -GGT <sup>D475P</sup>                          | GGT <sup>D475P</sup> driven by promoter PykzA+rbs6 and signal peptide SP <i>SacC</i>                                                                                                                                                | This study |

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

| Primer name           | Primer sequence (5'→3')                  |
|-----------------------|------------------------------------------|
| PykzA+                | TGCTGTTTTATCCTTTACGAAATATTGA             |
| rbs6-F                | TGTGACAC                                 |
| PykzA+                | AATCAGTCTCTTTTTTCATGGTACATTCC            |
| rbs6-R                | TCCTTTCT                                 |
| SP <sub>SacC</sub> -F | AGAAAGGAGGAATGTACCATGAAAAA<br>GAGACTGATT |
| SP <sub>SacC</sub> -R | ACCATCTCCGCCGCTCATTGCATCTGC<br>CGAAAATGC |
| GGT-F                 | TCGGCAGATGCAATGAGCGGCGGAGAT              |
| GGT-R                 | CTATTTAGCCGATGTCTTAATGTTGA               |
| V43T-F                | GAAAGACACAATGGTGGCTA                     |
| V43T-R                | CCACCATTGTGTCTTTCCC                      |
| T140G-F               | ACGGAAATGGAGTCGGTG                       |
| T140G-R               | ACCGACTCCATTTCCTGT                       |
| A202G-F               | GCAAAGGATGGCTTCCTTCCG                    |
| A202G-R               | GAAGGAAGCCATCCTTTGCGG                    |
| Q284K-F               | TCGCAAGCAAACCTCCTCCAA                    |
| Q284K-R               | GGAGGAGTTTGCTTGCGATA                     |
| K320R-F               | ATCATCTGCGCGCGGAAA                       |
| K320R-R               | GTTTCCGCGCGCAGATGATA                     |
| A339C-F               | CGATCCGTGCTTTGTTCGATG                    |
| A339C-R               | TCGACAAAGCACGGATCGC                      |
| P379A-F               | GAAATACGCTGCGGGAGAG                      |
| P379A-R               | CTCCCGCAGCGTATTTCC                       |
| N440S-F               | ATGAAGTGAAGCGATTTTGATG                   |
| N440S-R               | TCAAAATCGCTCAGTTCATTGT                   |
| D475P-F               | ACCGGTGCCTACTGTCGG                       |
| D475P-R               | CGACAGTAGGCACCGGTTT                      |
| $\Delta$ Tet-R        | ATAGTAGCCATGGGAGAAGGAGTCGGTC             |
| $\Delta$ Tet-F        | GACCGACTCCTTCTCCCATGGCTACTAT             |
| amp-F                 | CCCTGATCTCGACTTCGT                       |
| amp-R                 | TTAAGGGGTCTGACGCTC                       |
| 300-T5-F              | GAATTCCTGTTATAAAAAAAGGATC                |
| 300-T5-R              | TCTAGAAGCTTGGGCAAAGCGTTT                 |

### 1.1.2 酶和试剂

KeyPo DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Protein marker (Broad)、DNA 分子量标准 marker (DL 5000 DNA marker)均购自 TaKaRa 公司；Hi-Efficient Cloning Mix、质粒抽提试剂盒、

DNA 回收纯化试剂盒均购自武汉茵慕生物科技有限公司；蛋白胨、酵母粉、琼脂糖均购自 Biowest 公司；其他普通试剂(国产分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基：蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L, pH 7.2, LB 固体培养基另加 1.5% 琼脂粉。

GGT 发酵培养基：2%葡萄糖、1%大豆蛋白胨、1%玉米浆、1%骨蛋白胨、1.5%酵母粉、0.3%磷酸氢二钾、0.6%硫酸铵, pH 7.2。

## 1.2 方法

### 1.2.1 MütCompute 软件预测进化位点

MütCompute 是一个分析蛋白质氨基酸微环境的工具(<https://mutcompute.com/>)，该软件使用基于结构的机器学习算法，通过学习 PDB 数据库中的蛋白质来预测蛋白质上每个氨基酸位点的稳定性。在网站中输入 GGT 蛋白的 PDB 数据库登录号(2V36)，随后对获得的结果进行排序筛选，最后获得待进化位点。

### 1.2.2 CAVER 3.0 PyMOL Plugin 预测底物通道参数

CAVER 是用于识别和分析蛋白质分子内部通道和孔道的工具，CAVER 3.0 允许在 PyMOL 中计算和可视化隧道。在 CAVER 3.0 PyMOL Plugin 中输入蛋白质 PDB 格式的结构，指定活性残基，设置最大 Java 堆大小为 6 GB、最小探针半径为 0.9 Å、壳层深度为 4、壳层半径为 3 Å、聚类阈值为 3.5、近似球的数量为 12。以活性残基为坐标原点，开始计算路径，计算结束后在 PyMOL 中展示底物进入通道，导出包括曲率、流量、瓶颈半径和长度在内的通道参数。

### 1.2.3 GGT 表达载体构建

表达质粒 pP<sub>ykzA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT 的构建方法如下：以质粒 pHY-P<sub>ykzA+rbs6</sub>-amp 为模板，使用引物 PykzA+rbs6-F/R 扩增串联启动子 P<sub>ykzA+rbs6</sub>。以 *B. subtilis* 168 为模板，使用引物

SP<sub>SacC</sub>-F/R 扩增信号肽 SP<sub>SacC</sub>。以地衣芽胞杆菌 9945A 为模板,使用引物 GGT-F/R 扩增基因 *ggt*。以质粒 pHY-P<sub>yzkA+rbs6</sub>-amp 为模板,使用引物 amp-F/R 扩增终止子 amp。然后使用引物 P<sub>yzkA+rbs6</sub>-F 和 amp-R 通过重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension, SOE-PCR), 将上述 4 个片段进行连接。同时,使用引物 300-T5-F/R, 扩增 pHY300 骨架。随后, Hi-Efficient Cloning Mix 被用于连接纯化后的 DNA 片段与载体,并将其转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中。转化后体系被涂布在含有四环素 (tetracycline, Tet) 抗性的平板,待长出单菌落后,依次经过菌落 PCR 和 DNA 测序验证,获得的阳性转化子即为 pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT。

#### 1.2.4 GGT 游离表达菌株的构建

以游离表达菌株 BL11/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT 的构建为例。首先将 GGT 表达载体 pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT 电转化至地衣芽胞杆菌 BL11 中,筛选得到的阳性转化子,即为表达菌株 BL11/pP<sub>yzkA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT。

#### 1.2.5 地衣芽胞杆菌表达 GGT

将保藏于-80 °C 冰箱的菌株划线在含有 20 mg/L Tet 的 LB 平板上,在 37 °C 下将菌株活化 12-14 h。随后,挑取单菌落接种到含有 5 mL 液体 LB (含 20 mg/L Tet) 的小摇瓶中,37 °C、230 r/min 过夜培养。将培养好菌液转接于含有 50 mL 液体 LB (含 20 mg/L Tet) 的 250 mL 三角瓶中,37 °C、230 r/min 培养至 OD<sub>600</sub>≈4。最后,按 3% (体积比) 接种量将种子液转接至含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、230 r/min 培养 48 h,并检测相关生理参数。

#### 1.2.6 GGT 酶活检测

参考 Meister 等<sup>[16]</sup>报道的 GGT 酶活测定方法,以  $\gamma$ -谷氨酰对硝基苯胺(L- $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide,  $\gamma$ -GpNA) 和双甘氨酸(glycylglycine, Gly-Gly) 为底物进行反应。首先配制反应体系,在酶标板中依次加入 10  $\mu$ L Tris-HCl (50 mmol/L, pH 9)、40  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (1 mmol/L)、50  $\mu$ L Gly-Gly

(30 mmol/L)、50  $\mu$ L 适当稀释的酶液,最后加入 50  $\mu$ L  $\gamma$ -GpNA (1.25 mmol/L)。设置的对照组用无菌水替代双甘氨酸。然后将上述体系置于 40 °C 条件下反应 10 min,加入 20  $\mu$ L 醋酸(3.5 mol/L) 终止反应。由于产物对硝基苯胺(p-nitroaniline) 会在 410 nm 出现明显吸收峰,随后使用酶标仪检测反应体系在 410 nm 处的吸光值,根据绘制的对硝基苯胺的标准曲线(0-0.4 mol/L),计算发酵样品中对硝基苯胺含量。

GGT 酶活(U)定义为:每 min 生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯胺所需的酶量。

样品酶活力按公式(1)计算:

$$X = \frac{(A_{410} - B_{410}) \times V_1 \times n}{V_2 \times 10} \quad (1)$$

其中:  $X$  为样品酶活力, U/mL;  $A_{410}$  为实验组(加入双甘氨酸)的吸光值;  $B_{410}$  为对照组(加入无菌水)的吸光值;  $V_1$  为反应体系总体积, mL;  $V_2$  为加入样品体积, mL;  $n$  为样品稀释倍数; 10 为反应时间 10 min。

#### 1.2.7 GGT 最适反应 pH 和温度

最适反应 pH 的检测: 分别将酶液置于不同 pH (3.0-11.0) 的缓冲体系中反应,测定其在不同 pH 条件下的酶活。不同 pH 条件下的缓冲体系分别为: 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液 (pH 3.0-5.0)、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 5.0-8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0-10.0) 和 50 mmol/L 硼酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0-11.0)。

最适反应温度的检测: 将酶液分别置于不同温度条件下(20-80 °C)测定酶活,最适温度下的 GGT 酶活被认定为 100%。

#### 1.2.8 5 L 发酵罐放大工艺

首先依照 1.2.5 中所述方法培养所需的种子液,以 10% 接种量接至含有 2.5 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中,初始搅拌转速设置为 200 r/min,溶氧(25.00±0.05)%,随后溶氧联动控制搅拌转速,通气量为 1 vvm。发酵 pH 控制在 7.2 左右,发酵 72 h。每隔 4 h 取样,测定生物量、酶活及葡萄糖浓度。

### 1.3 统计分析

所有实验均重复 3 次, 每个数据均设置 3 个平行, 采用 Origin 2021 进行数据处理和分析。其中: \*表示  $P<0.05$ , 有统计学差异; \*\*表示  $P<0.01$ , 有显著统计学差异; \*\*\*表示  $P<0.001$ , 有极显著的统计学差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 游离表达 GGT 的地衣芽胞杆菌构建与发酵

为了研究 GGT 在地衣芽胞杆菌中分泌表达情况, 本研究使用串联启动子  $P_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}$  和信号肽  $\text{SP}_{\text{SacC}}$  共同介导 *ggt* 基因表达, 成功构建了 GGT 游离表达菌株 BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$ 。随后, 对菌株 BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$  进行摇瓶发酵实验, 检测发酵 48 h 的酶活力及表达情况。如图 1 所示, 与对照菌株 BL11/ $p\text{HY300}$  相比, 菌株 BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$  的胞外上清中大小亚基的条带明显, 分别为 20 kDa (小亚基) 和 43 kDa (大亚基), GGT 酶活为 3.67 U/mL。以上结果表明, GGT 在地衣芽胞杆菌中成功分泌表达, 但其酶活较低, 需要进一步优化提升。

### 2.2 GGT 的蛋白质工程改造及酶学性质分析

#### 2.2.1 GGT 突变体构建与筛选

近年来, 3D 神经自监督的卷积神经网络 (convolutional neural network, CNN) 软件 MütCompute 被开发出来, 并被证实能够识别出蛋白质分子上待优化的氨基酸及潜在突变位点, 成功用于多种酶分子性能提升的优化改造<sup>[17-18]</sup>。使用 MütCompute 工具预测 GGT (PDB 登录号: 2V36) 的待进化位点, 结果如图 2A 所示, GGT 蛋白三维结构图中蓝色位点为稳定氨基酸, 浅粉色至红色为氨基酸不稳定程度, 该位点颜色越深则越不稳定。在对 MütCompute 预测结果进行处理时, 首先将各位点的 Wt\_prob (wild type probability) 结果进行升序排列, 选取 Wt\_prob 值小于 0.1 的氨基酸位点, 随后对上述选中的氨基酸位点的 Pred\_prob (prediction probability) 进行降序排列, 选取结果大于 0.8 的氨基酸位点。如表 3 所示, 共得到 9 个待进化位点及候选突变策略, 分别为 V43T、T140G、A202G、Q284K、K320R、P379A、D475P、A339C、N440S。

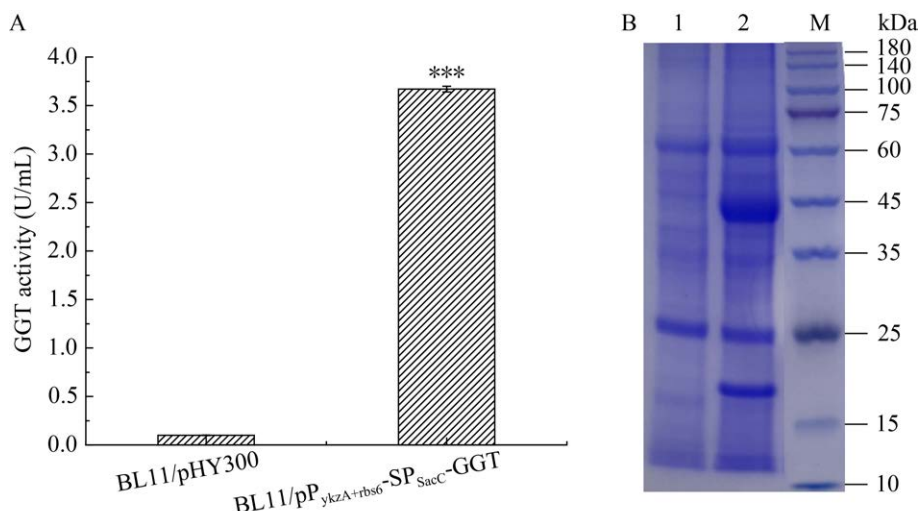


图 1 菌株 BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$  的发酵分析 A: GGT 酶活测定(\*\*\*:  $P<0.001$ ); B: 发酵上清液的 SDS-PAGE 分析。

Figure 1 Fermentation analysis of BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$  strain. A: GGT activity. \*\*\*:  $P<0.001$ . B: SDS-PAGE analysis of fermentation supernatants. Lane 1: BL11/ $p\text{HY300}$ ; Lane 2: BL11/ $pP_{y\text{y}k\text{zA}+\text{rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}$ ; Lane M: Protein marker.

接着,在原始 GGT 表达载体  $pP_{ykzA+rbs6-SP_{SacC}}-GGT$  的基础上,构建了上述 9 种 GGT 突变体及对应菌株,并通过发酵实验检测其突变效果。由图 2B 可知,与野生型 WT 相比,突变体  $GGT^{A339C}$  的酶活明显提升,酶活达到了 13.06 U/mL,相比于对照提高了 255%。其他位点发生的突变均未能提升酶活水平,且第 320、475 位氨基酸突变后,GGT 酶活完全丧失。

### 2.2.2 GGT<sup>A339C</sup> 突变对底物结合区域的影响分析

为了探究  $GGT^{A339C}$  突变体的蛋白三维结构

变化情况,本研究使用 CAVER 3.0 软件计算野生型 GGT 和突变体  $GGT^{A339C}$  的通道参数,包括曲率、流量、瓶颈半径和长度。结果如图 3 所示,虽然第 339 位氨基酸远离活性口袋,但其由 A 突变为 C 后,其底物通道的平均曲率从 1.39 Å 下降到 1.30 Å,同时隧道长度由 6.8 Å 扩增至 13.6 Å。上述结果表明, A339C 突变使得 GGT 底物结合区域更加开放,隧道结构也更加趋于直线化。该结构的改变不仅有助于活性位点接触效率增加,还能促进产物快速释放,而这可能是突变体  $GGT^{A339C}$  催化活性提升的主要原因。

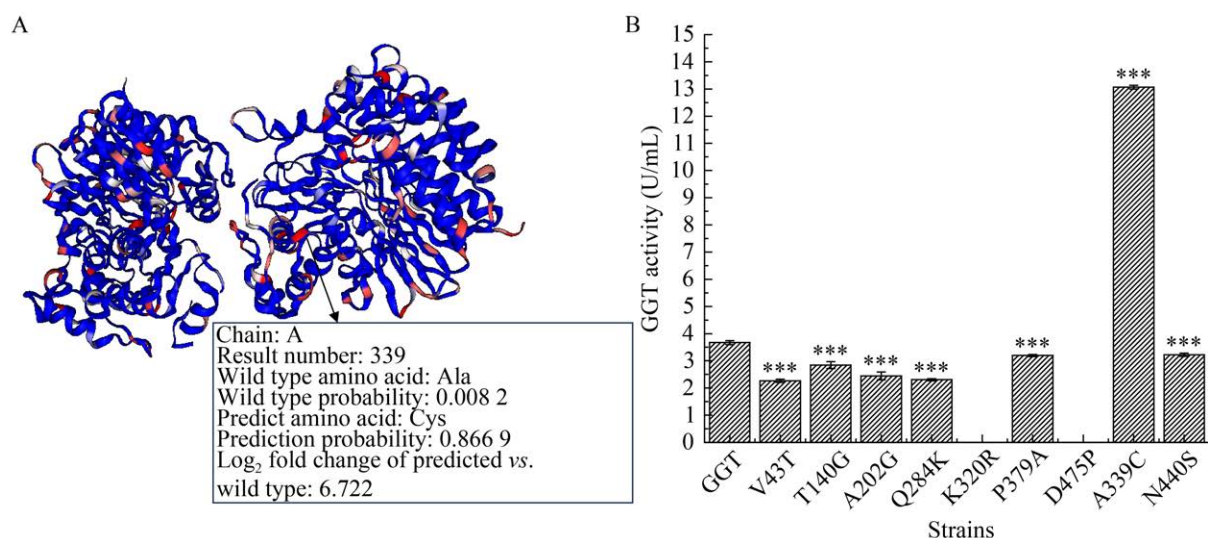


图 2 GGT 的蛋白质工程改造 A: 基于 MütCompute 的 GGT 三维结构预测图; B: GGT 突变菌株的发酵酶活分析。

Figure 2 Protein engineering modification of GGT. A: 3D structure prediction of GGT based on MütCompute; B: Fermentation enzyme activity of GGT mutant strains. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

表 3 基于 MütCompute 的 GGT 待进化位点预测表

Table 3 Prediction table of GGT evolutionary sites based on MütCompute

| Position | Wild type amino acid | Wild type probability | Predict amino acid | Prediction probability |
|----------|----------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| 202      | Ala                  | 0.000 05              | Gly                | 0.999 92               |
| 440      | Asn                  | 0.000 01              | Ser                | 0.995 31               |
| 379      | Pro                  | 0.000 66              | Ala                | 0.993 29               |
| 284      | Gln                  | 0.047 41              | Lys                | 0.945 99               |
| 320      | Lys                  | 0.032 38              | Arg                | 0.920 62               |
| 140      | The                  | 0.003 08              | Gly                | 0.902 64               |
| 475      | Asp                  | 0.002 50              | Pro                | 0.896 47               |
| 339      | Ala                  | 0.008 21              | Cys                | 0.849 87               |
| 43       | Val                  | 0.019 04              | Thr                | 0.849 87               |

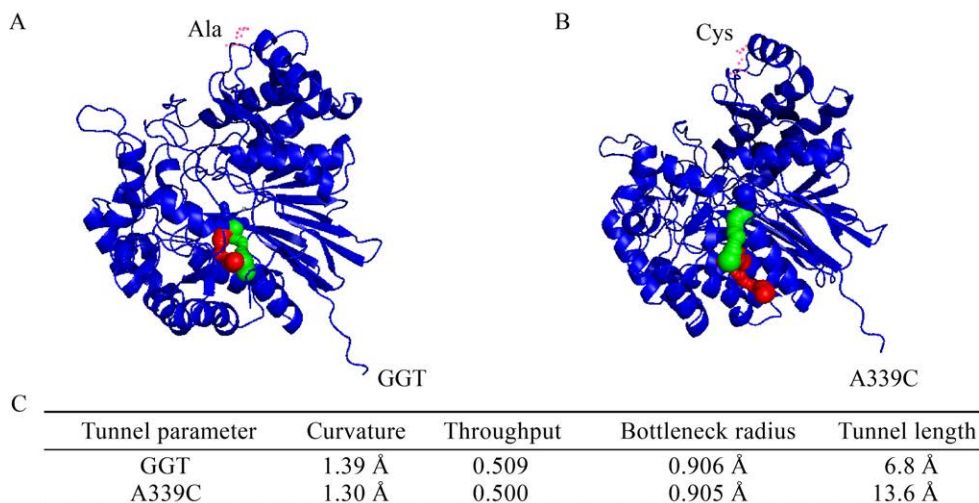


图3 A339C 突变前后的通道变化 A: GGT 的隧道结构; B: A339C 的隧道结构; C: GGT 和 A339C 的曲率、流量、瓶颈半径和长度的隧道参数。

Figure 3 Channel changes predicted for wild-type and A339C. A: Tunnel structure of GGT; B: Tunnel structure of A339C; C: Tunnel parameters for curvature, flow rate, bottleneck radius, and length of GGT and A339C.

### 2.2.3 GGT 酶学性质分析

为了研究突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  的最适反应 pH 和温度变化情况, 首先, 将野生型和突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  的发酵上清液分别置于不同 pH 缓冲体系中, 检测其酶活水平。由图 4A 可知, 野生型与突变体的最适 pH 均为 8.0。在酸性条件下(pH 3.0–5.0), 二者的转肽活性几乎为零。在 pH 6.0–7.0 条件下, 野生型 GGT 酶活保持在最高活力的 20% 左右, 而突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  的相对酶活力保持在最高活力的 30%–40%。在 pH 10.0–11.0 条件下, 酶活几乎为零, 但突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  还存在 20% 酶活力。由此说明, 突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  能够在更广泛的 pH 值范围内保持活性。

随后, 在最适 pH 条件(pH 8.0)下考察了野生型和突变体的最适反应温度差异。如图 4B 所示, 在 20–50 °C 范围内, 突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  能保留更高酶活。野生型 GGT 的最适温度为 60 °C, 而突变体  $\text{GGT}^{\text{A339C}}$  在 65 °C 时酶活达到峰值, 说明突变体的最适反应温度有所提升。温度继续升高后, 两者的酶活开始下降, 温度升至

80 °C 时, 酶活性完全丧失。

### 2.3 GGT 高效表达的宿主优化

分子伴侣在蛋白质折叠和转运中发挥着重要作用, 其对于蛋白分泌表达影响重大。为研究分子伴侣优化对 GGT 分泌的影响, 选取了多个分泌表达优化宿主进行 GGT 的表达, 分别为: 启动子被替换成含有 UTR9 强启动子的分子伴侣 DnaJ 强化菌株 BL11-UTR9-DnaJ; PrsA 表达框被整合至基因组原噬菌体基因 *yqjB* 位点的 PrsA 整合表达菌株 BL11::prsA; 分子伴侣抑制因子基因 *hrcA* 缺失菌株 BL11 $\Delta$ hrcA。将 GGT 表达载体  $\text{pP}_{\text{yKzA+rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}^{\text{A339C}}$  分别电转化至上述 3 个宿主中, 获得菌株 BL11-DnaJ/ $\text{pP}_{\text{yKzA+rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}^{\text{A339C}}$ 、BL11::prsA/ $\text{pP}_{\text{yKzA+rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}^{\text{A339C}}$ 、BL11 $\Delta$ hrcA/ $\text{pP}_{\text{yKzA+rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}^{\text{A339C}}$ 。

将上述工程菌株与对照菌株进行摇瓶发酵实验, GGT 酶活检测及发酵液上清 SDS-PAGE 结果如图 5 所示, 转运途径的强化均有利于 GGT 酶活的提高, 其中工程菌株 BL11::prsA/ $\text{pP}_{\text{yKzA+rbs6}}\text{-SP}_{\text{SacC}}\text{-GGT}^{\text{A339C}}$  的酶活最高, 达到 22.1 U/mL。然而, 当在菌株 BL11::prsA 基础上

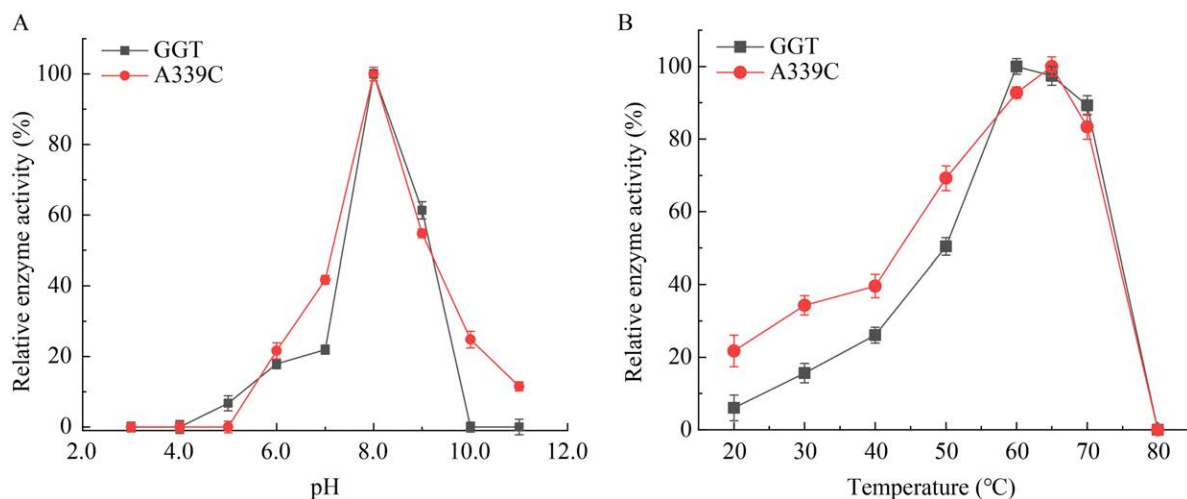


图4 GGT酶学性质检测 A: 在不同pH下的酶活检测; B: 在不同温度下的酶活检测。

Figure 4 GGT enzymatic property detection. A: Enzyme activity detection at different pH levels; B: Enzyme activity detection at different temperatures.

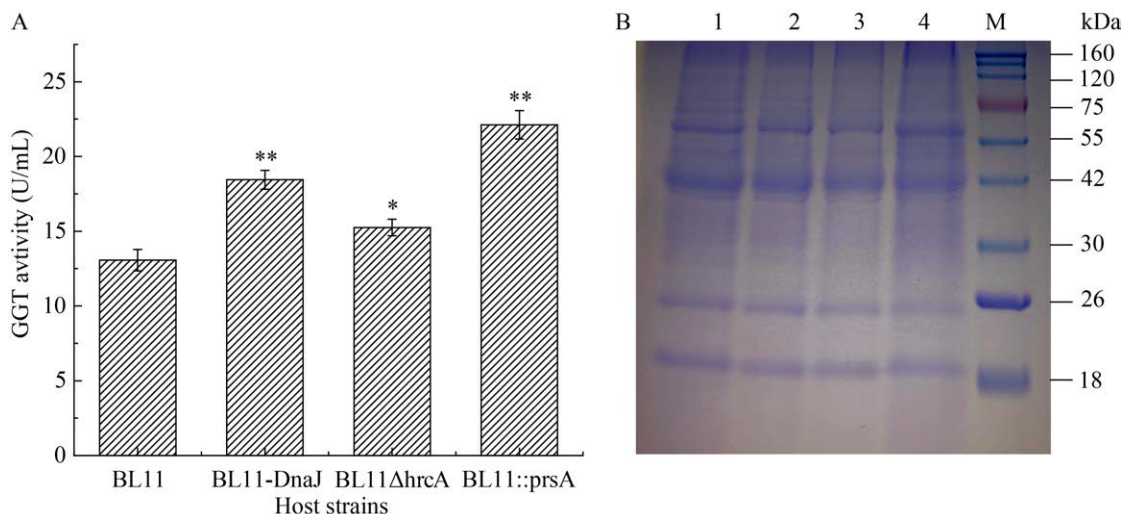


图5 GGT高效表达的宿主优化 A: 分子伴侣强化表达对GGT酶活的影响; B: 不同菌株发酵上清液的SDS-PAGE分析。

Figure 5 Optimization of GGT expression host. A: Effect of chaperone enhancement expression on GGT enzyme activity. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . B: SDS-PAGE analysis of fermentation supernatants of different strains. Lane 1: BL11::prsA/A339C; Lane 2: BL11/A339C; Lane 3: BL11ΔhrcA/A339C; Lane 4: BL11-DnaJ/A339C; Lane M: Protein marker.

强化表达 DnaJ 后, 其 GGT 酶活变化不大。因此, 后续研究依然使用工程菌株 BL11::prsA/p<sub>YkzA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> 进行发酵优化。

## 2.4 GGT 高产菌株的发酵放大

为进一步提高 GGT 表达水平, 对菌株 BL11::prsA/p<sub>YkzA+rbs6</sub>-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> 进行 5 L

发酵罐放大培养。结果如图 6 所示, 初始添加 30 g/L 的葡萄糖 75 g, 当其消耗完后再流加葡萄糖共约 180 g, 控制发酵全过程中葡萄糖浓度在 3 g/L 以下。结果表明, 发酵 12 h 后葡萄糖几乎耗尽, 这期间生物量呈上升趋势, 菌体在发酵 40 h 时出现二次生长, 并在 48 h 时生物量

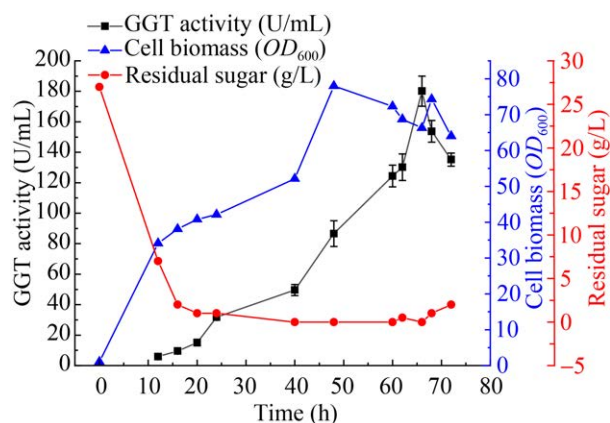


图 6 5 L 发酵罐条件下 BL11::prsA/pPykzA+rbs6-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> 的发酵过程曲线

Figure 6 Fermentation process curves of BL11::prsA/pPykzA+rbs6-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup> in a 5 L fermenter.

达到峰值。当菌体生长和代谢活动达到平衡,产酶量开始增加,12–40 h 酶活处于稳步增长状态,在 40–66 h 酶活快速增长,并在 66 h 达到最高值 180.14 U/mL。

### 3 讨论与结论

GGT 在食品工业和临床医学等领域具有广泛的应用潜力,然而,目前微生物表达 GGT 存在酶学性质不佳、表达量不高等难题。野生型 GGT 大多可以同时引发水解、转肽及自转肽反应,将其直接用于工业生产时,会产生大量副产物,影响目标产物得率及下游纯化。目前,对 GGT 催化机制的探究尚未引起广泛关注,仅有部分研究者对其进行了初步探索(表 4)。Bindal 等<sup>[19]</sup>将 *B. licheniformis* ER15 来源 GGT 的第 109 位精氨酸进行定向突变,其中 R109K 突变体的转肽酶活性和催化效率明显优于其他突变体。Minami 等<sup>[24]</sup>对 *B. subtilis* 的 GGT 进行非理性改造,发现 D445A 突变株的转肽酶活性丧失,水解活性则降至对照的 40.2%。Hsu 等<sup>[25]</sup>通过定点突变,发现 *E. coli* 来源的突变株 GGT<sup>S463D</sup>、GGT<sup>S463K</sup>、GGT<sup>S463T</sup> 的酶活力显著下降,这表明 Ser463 在维持 GGT 结构和功能方面发挥重要作用。Chang 等<sup>[26]</sup>发现删除来源于

*B. licheniformis* 的 GGT 最后 9 个氨基酸对酶自催化过程没有明显影响,但进一步删除 Val576 会损害其自催化过程。本研究发现来源于 *B. licheniformis* 的 GGT 第 339 位丙氨酸突变成半胱氨酸后,能够不影响水解能力的情况下,明显提高转肽活性,进而提升酶活性和稳定性,这为在食品工业和其他生物催化中的应用提供了重要的分子改造策略。

表达宿主优化是提高蛋白表达效率、降低酶蛋白生产成本的关键所在,目的蛋白在折叠转运过程中,可能会被其他蛋白酶所降解,Wei 等<sup>[12]</sup>通过构建 8 个蛋白酶缺失的地衣芽胞杆菌 BL10,将纳豆激酶酶活提高了 39%。分子伴侣在蛋白质稳态维持中扮演着重要角色,其对于高效、准确的蛋白分泌过程必不可少。Wu 等<sup>[27]</sup>敲除了阻遏蛋白 HrcA 及强化表达胞外脂蛋白 PrsA,使地高辛单链抗体(single chain antibody, SCA)片段的包涵体量明显减少。Chen 等<sup>[28]</sup>将 *prsA* 与部分 *dnaK* 操纵子组合过表达,显著提高了  $\alpha$ -淀粉酶酶活。本研究通过对地衣芽胞杆菌分子伴侣系列基因进行筛选优化,最终获得了一株高效分泌 GGT 的工程菌株 BL11::prsA/pPykzA+rbs6-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup>,最高酶活达到 22.1 U/mL。

地衣芽胞杆菌是异源蛋白分泌表达的优良宿主,本研究通过机器学习指导的酶改造设计软件 MütCompute 进行了待进化位点的预测,通过实验验证突变体 GGT<sup>A339C</sup> 的转肽活力明显增强,随后通过筛选和优化表达宿主的分泌性能,获得了一株高效分泌 GGT 的工程菌株 BL11::prsA/pPykzA+rbs6-SP<sub>SacC</sub>-GGT<sup>A339C</sup>,5 L 发酵罐中酶活达到 180.14 U/mL,是目前报道的最高水平。本研究不仅展示了通过基因工程手段提高异源蛋白分泌能力的可能性,也为 GGT 高效生产及催化应用提供了一株具有应用潜力的地衣芽胞杆菌工程菌株,未来可通过优化 GGT 的催化条件,用于谷胱甘肽、茶氨酸等生化产品的转化合成。

表 4 GGT 分子改造的研究进展

Table 4 Research progress on molecular modification of GGT

| Sources                                 | Host strains                 | Revamp strategy                                                                                       | Enzyme activities | References |
|-----------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13     | <i>Bacillus subtilis</i> 168 | Screening of promoter and signal peptide and optimization expression plasmid                          | 53.7 U/mL         | [8]        |
| <i>Bacillus pumilus</i> ML413           | <i>B. subtilis</i> 168       | Directed evolution: GGT <sup>T463S</sup> ; HpaII-10 promoter region and RBS sequence engineering      | 60.3 U/mL         | [10]       |
| <i>B. licheniformis</i> ER15            | <i>Escherichia coli</i> BL21 | Site-directed mutation: GGT <sup>R109K</sup>                                                          | 162.1 U/mg        | [19]       |
| <i>B. subtilis</i>                      | <i>E. coli</i>               | Cavity topology engineering: GGT <sup>Y418F/M97Q</sup>                                                | 42.8 U/mg         | [20]       |
| <i>B. licheniformis</i>                 | <i>E. coli</i>               | Site-directed mutagenesis: GGT <sup>N450D</sup>                                                       | 62.6 U/mg         | [21]       |
| <i>B. licheniformis</i>                 | <i>E. coli</i>               | Alanine scanning mutagenesis: GGT <sup>S461A</sup>                                                    | 34.1 U/mg         | [22]       |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BH072 | <i>B. subtilis</i> 168       | Screening of signal peptide and optimization induction conditions                                     | 55.0 U/mg         | [23]       |
| <i>B. licheniformis</i>                 | <i>B. licheniformis</i>      | Machine learning-guided enzyme engineering design: GGT <sup>A339C</sup> ; integrated lipoprotein PrsA | 180.14 U/mL       | This study |

作者贡献声明

雷家琪：方案设计、实验操作、初稿写作；  
张清：数据管理、方案设计、稿件润色修改；  
祝志豪、廖永庆：数据管理、实验操作、提供材料；  
陈守文、蔡冬波：方案设计、经费支持、监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

[1] TATE SS, MEISTER A. Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1981, 39: 357-368.

[2] SUZUKI H, KATO K, KUMAGAI H. Development of an efficient enzymatic production of gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07), a prospective medicine for tuberculosis, with bacterial gamma-glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 111(3): 291-295.

[3] 李松. 酶法合成  $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸[D]. 南京: 南京工业大学, 2008.

LI S. Enzymatic Synthesis of  $\gamma$ -L-glutamyl-L-Cysteine[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2008 (in Chinese)

[4] SUZUKI H, IZUKA S, MIYAKAWA N, KUMAGAI H. Enzymatic production of theanine, an “umami” component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(6): 884-889.

[5] SUZUKI H, FUKUYAMA K, KUMAGAI H. Bacterial  $\gamma$ -glutamyltranspeptidases, physiological function, structure, catalytic mechanism and application[J]. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences, 2020, 96(9): 440-469.

[6] 张柯铭, 罗茜, 魏夏森, 万嗣宝, 高海燕, 秦臻.  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶的催化特性及其在食品领域应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(3): 304-313.

ZHANG KM, LUO X, WEI XS, WAN SB, GAO HY, QIN Z. Research progress on catalytic properties of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and its application in food industry[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(3): 304-313 (in Chinese).

[7] BINDAL S, DAGAR VK, SAINI M, KHASA YP, GUPTA R. High level extracellular production of recombinant  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* fed-batch culture[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 116: 23-32.

[8] CHEN QL, WANG B, PAN L. Efficient expression of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in *Bacillus subtilis* via CRISPR/Cas9n and its immobilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 149.

[9] ONG PL, YAO YF, WENG YM, HSU WH, LIN LL. Residues Arg114 and Arg337 are critical for the proper function of *Escherichia coli*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 366(2): 294-300.

[10] 刘栓英.  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶分子改造及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2021.

LIU SY. Molecular modification and application of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).

[11] BASHIR F, ASGHER M, HUSSAIN F, RANDHAWA MA. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 944-951.

[12] WEI XT, ZHOU YH, CHEN JB, CAI DB, WANG D, QI GF, CHEN SW. Efficient expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis*: host strain construction and

- signal peptide optimization[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 287-295.
- [13] CHEN YZ, CAI DB, HE PH, MO F, ZHANG Q, MA X, CHEN SW. Enhanced production of heterologous proteins by *Bacillus licheniformis* with defective D-alanylation of lipoteichoic acid[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 34(9): 135.
- [14] MO F, CAI DB, HE PH, YANG F, CHEN YZ, MA X, CHEN SW. Enhanced production of heterologous proteins via engineering the cell surface of *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(12): 1745-1755.
- [15] LI X, YANG J, LIU J, ZHANG XH, WU W, YAN DZ, MIAO LH, CAI DB, MA X, CHEN SW. High production of nattokinase via fed-batch fermentation of the  $\gamma$ -PGA-deficient strain of *Bacillus licheniformis*[J]. Fermentation, 2023, 9(12): 1018.
- [16] Meister A, Tate SS, Griffith OW. Methods in Enzymology:  $\gamma$ -glutamyl Transpeptidase[M]. Amsterdam: Academic Press, 1981: 237-253.
- [17] LU HY, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, ZHU CZ, KIM W, SHROFF R, ACOSTA DJ, ALEXANDER BR, COLE HO, ZHANG Y, LYND NA, ELLINGTON AD, ALPER HS. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. Nature, 2022, 604(7907): 662-667.
- [18] TORNG W, ALTMAN RB. 3D deep convolutional neural networks for amino acid environment similarity analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1): 302.
- [19] BINDAL S, SHARMA S, SINGH TP, GUPTA R. Evolving transpeptidase and hydrolytic variants of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* by targeted mutations of conserved residue Arg109 and their biotechnological relevance[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 249: 82-90.
- [20] ZHANG ZH, LONG MF, ZHENG N, DENG Y, WANG Q, OSIRE T, XIA XL. Redesign of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus subtilis* for high-level production of L-theanine by cavity topology engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(11): 3551-3564.
- [21] LIN LL, CHI MC, CHEN YY, WANG TF, LO HF, LIN LL. Site-directed mutagenesis of a conserved Asn450 residue of *Bacillus licheniformis*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 416-425.
- [22] CHI MC, LO HF, LIN MG, CHEN YY, WANG TF, LIN LL. Mutational analysis of a highly conserved PLSSMXP sequence in the small subunit of *Bacillus licheniformis*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 508.
- [23] MU DD, LI HW, CHEN Q, ZHU J, WU XF, LUO SZ, ZHAO YY, WANG L, JIANG ST, LI XJ, ZHENG Z. Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* and its application in enzymatic synthesis of L-theanine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14129-14136.
- [24] MINAMI H, SUZUKI H, KUMAGAI H. A mutant *Bacillus subtilis*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase specialized in hydrolysis activity[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224(2): 169-173.
- [25] HSU WH, ONG PL, CHEN SC, LIN LL. Contribution of Ser463 residue to the enzymatic and autoprocessing activities of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase[J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2009, 46(4): 281-288.
- [26] CHANG HP, LIANG WC, LYU RC, CHI MC, WANG TF, SU KL, HUNG HC, LIN LL. Effects of C-terminal truncation on autocatalytic processing of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyl transpeptidase[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2010, 75(7): 919-929.
- [27] WU SC, YE R, WU XC, NG SC, WONG SL. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(11): 2830-2835.
- [28] CHEN JQ, FU G, GAI YM, ZHENG P, ZHANG DW, WEN JP. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 92.