

产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的异源表达及粗酶性质

李乃强^{1,2}, 于丽珺², 徐岩¹

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 上海凯赛生物技术研发中心有限公司, 上海 201203

李乃强, 于丽珺, 徐岩. 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的异源表达及粗酶性质. 生物工程学报, 2016, 32(4): 537-531.

Li NQ, Yu LJ, Xu Y. Heterologous expression and characterization of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase. Chin J Biotech, 2016, 32(4): 527-531.

摘要: 赖氨酸脱羧酶, 可以催化赖氨酸脱羧生成戊二胺。戊二胺是重要的平台化合物, 可以合成新型聚酰胺材料、脂肪族异氰酸酯等新材料。本研究对来自于产酸克雷伯氏菌的赖氨酸脱羧酶进行异源表达。以 pUC18 质粒为载体, 将来源于产酸克雷伯氏菌的赖氨酸脱羧酶基因 *ldc* 克隆到大肠杆菌, 得到菌株 LN18。在添加 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中, 对 LN18 进行摇瓶培养, 发酵液酶活可达到 35 U/g 发酵液, 从发酵液制备的赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白的酶活可以达到 30 000 U/g 粗蛋白。产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧粗酶蛋白大小约 80 kDa, 粗酶的最适温度和 pH 值分别为 55 °C 和 5.5, 与文献中报道的大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶 CadA 在 pH 8.0 几乎没有酶活不同, 产酸克雷伯氏菌的赖氨酸脱羧酶在 pH 8.0 的酶活达到最优 pH 下酶活的 30% 以上。金属离子对酶活有一定的影响, Mg²⁺ 对酶活有促进作用, Fe²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺ 有一定的抑制作用。

关键词: 赖氨酸脱羧酶, 产酸克雷伯氏菌, 戊二胺, 异源表达, pH 稳定性

Heterologous expression and characterization of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase

Naiqiang Li^{1,2}, Lijun Yu², and Yan Xu¹

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Cathay Industrial Biotech Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Cadaverine is a biogenic amine that has the potential to become an important platform chemical for the production of industrial polymers, such as polyamides and polyurethanes. We reported here a lysine decarboxylase from *Klebsiella oxytoca*. The lysine decarboxylase from *Klebsiella oxytoca* was cloned to *Escherichia coli* to get the strain LN18. The specific activity of the crude protein from LN18 reached 30 000 U. The molecular weight was about 80 kDa. The optimum temperature and pH of the crude protein were 55 °C and 5.5 respectively. The specific activity could keep over 30% at pH 8.0 compared the one at pH 5.5, much difference from *Escherichia coli* lysine decarboxylase CadA. Mg²⁺ was positive to the specific activity, whereas Fe²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ were negative.

Keywords: lysine decarboxylase, *Klebsiella oxytoca*, cadaverine, heterologous expression, pH stability

Received: August 28, 2015; **Accepted:** October 25, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A204-04).

Corresponding authors: Naiqiang Li. Tel: +86-21-50801916; Fax: +86-21-50801386; E-mail: linaiqiang@cathaybiotech.com

Yan Xu. Tel: +86-531-88369463; Fax: +86-531-88567250; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A204-04) 资助。

一些学者如 Gale 和 Epps 等在 20 世纪 40 年代就研究了赖氨酸脱羧酶,其主要用途被用来定量分析赖氨酸的含量^[1]。随着人们对赖氨酸脱羧酶的认识的提高,在越来越多的生物体内发现有赖氨酸脱羧酶的存在,如在大肠杆菌 *Escherichia coli*、尸杆菌 *Bacterium cadaveris*、蜂房哈夫尼菌 *Hafnia alvei*、产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca* 等微生物中存在赖氨酸脱羧酶^[2-4]。文献中研究比较广泛的是大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶,大肠杆菌中存在两种类型的赖氨酸脱羧酶。一种是在低 pH 环境下诱导产生的赖氨酸脱羧酶,其编码基因为 *cadA*^[5],另外一种是组成型的,其编码基因为 *ldcC*^[6-7]。Krithika 等^[8]研究了来自大肠杆菌的两种赖氨酸脱羧酶 CadA 和 Ldc 的反应动力学以及它们的酶学性质。

赖氨酸脱羧酶催化赖氨酸脱羧得到的戊二胺是一种重要的平台化合物,可以合成新型聚酰胺、新型异氰酸酯和哌啶、吡啶等重要化合物。特别是用戊二胺合成的新型聚酰胺,由于其结晶度、结晶结构的不同以及内部官能团被氢键饱和的程度不同从而具备新的特性。如聚酰胺 56 具备阻燃性好、流动性好等特点,这些新的特点都为下游的材料提供了新的性能。

生物法合成戊二胺主要有两条途径,一种是以葡萄糖为原料,通过微生物发酵来直接合成戊二胺,其代谢途径复杂,得到产物的转化率低,生成的戊二胺对微生物有毒害作用。如在菌株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 过量表达来源于 *E. coli* 的 *cadA* 基因得到菌株 TM45。TM45 可以用 50 g/L 的葡萄糖生产 2.6 g/L 的戊二胺^[9]。如 Qian^[10]等通过引入强启动子过表达赖氨酸脱羧酶、敲除代谢戊二胺的相关基因等构建的大肠杆菌 XQ56 能产 9.6 g/L 戊二胺。Kind 等^[11-13]通过代谢工程系统改造,包括目的基因的启动子、密码子优化、删除副产物乙酰戊二胺的相关酶系、提高重组菌分泌戊二胺的能力等。这些改进将葡萄糖到戊二胺的转化率提高到 17%。另外一条途径是以赖氨酸为底物,用赖氨酸脱羧酶来催化生成戊二胺,该工艺路径短、产物单一,但是催化效率需要进一步提高,而且由于赖氨酸的价格不菲,限制了生物法戊二胺的产业化。生物法制备戊二胺随着戊二胺浓度的累积,反应液的 pH 不断上升使得酶活大大降低。Usheer K 和 Irina Gutsche 等^[14]研究表明随着 pH 上升,大肠杆菌赖氨酸脱羧酶 CadA 由十聚体逐步解离成二聚体而丧失酶活。而为了维持酶活,

就需要添加大量的 pH 缓冲试剂,这对后续的纯化和产品质量带来影响。因此寻求不同于大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶,发掘新来源的赖氨酸脱羧酶的新功能,解决上述瓶颈问题,是生物法合成戊二胺的一个重要方向。

本文主要通过扩增来源于产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca* 的赖氨酸脱羧酶基因,将该基因在 *E. coli* 进行异源表达,将重组菌进行培养产酶,并对重组菌的赖氨酸脱羧酶进行纯化,研究其相关酶学性质。选择产酸克雷伯氏菌的主要原因是产酸克雷伯氏菌在食物中广泛存在,并且产酸克雷伯氏菌有较高的赖氨酸脱羧酶活力,能够累积一定量的戊二胺^[15]。在后续的研究过程中,作者尝试了目的基因的密码子优化以及 RBS 优化(核糖体结合位点优化),证明了密码子优化和 RBS 优化都是目的基因提高表达效率的有效手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物

本研究所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers in this study

Primer	Sequence (5'-3')
KOldc-F	GGCGAGCTCTTTTACCTGGAGATATGAC TATGAACGTTATCGCAATCATG
KOldc-R	GGCTCTAGATTATTTGTTATTTCTTCTTT CAGCAC

1.1.2 主要试剂

琼脂粉、氯化钠、酵母粉和蛋白胨等购自国药集团化学试剂有限公司;PCR 试剂盒、内切酶 *Sac* I、内切酶 *Xba* I、内切酶 *EcoR* I、连接酶、质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖、电转杯等购自上海生工生物工程有限公司。DNA 回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。除非特殊说明,采用的试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *ldc* 基因的克隆与测序

产酸克雷伯氏菌全基因组购买于 DSMZ (DSMZ6673),以其为模板,根据 GenBank Accession No. CP003683.1 来设计 *ldc* 基因的扩增引物为 KOldc-F 和 KOldc-R。设计 PCR 扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2.5 min,30 个

循环; 72 °C 延伸 10 min。所得片段回收后与克隆载体 pMD18-T 连接, 转化 *E. coli* JM109, 挑取阳性转化子。提取质粒酶切鉴定, 并将重组质粒命名为 pMD18-KOIdc, 并测序 (测序工作由上海生工完成)。

1.2.2 重组表达载体的构建及鉴定

用 *Sac* I 和 *Xba* I 分别酶切 pMD18-KOIdc 和 pUC18 质粒, 回收 KOIdc 基因片段和 pUC18 线性片段后进行连接, 所得质粒命名为 pUC18-KOIdc。用内切酶对 pUC18-KOIdc 进行酶切, 凝胶电泳验证酶切片段大小, 将大小正确的 pUC18-KOIdc 质粒电击转化 *E. coli* MG1655 K12 感受态细胞, 得到含有 pUC18-KOIdc 质粒的大肠杆菌细胞, 命名为菌株 LN18。

1.2.3 重组菌培养

挑取在氨苄青霉素抗性 LB 平板培养基上的 LN18 单菌落转接到液体 LB 培养基中, 加入氨苄青霉素钠至终浓度为 100 mg/L, 在 37 °C、200 r/min 培养 15 h 后至 OD_{560} 达到 5 时, 按照 1% 的比例转接至装发酵培养基的摇瓶, 发酵培养基同摇瓶培养基, IPTG 的浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C、200 r/min 的搅拌条件下培养过夜, 发酵液的酶活可以达到 35 U/g 发酵液。

1.2.4 赖氨酸脱羧酶粗酶制备和 SDS-PAGE

所有的纯化步骤均在 4 °C 下进行, 缓冲液使用 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0)。将 LN18 发酵液进行离心收集, 将收集的细胞悬浮于缓冲液中, 使用超声波振荡器 (HM2412, Honda Electronics Co. Ltd. Toyohashi, Japan) 进行细胞破碎。细胞碎片通过离心去除。离心条件为 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min, 上清液为无细胞提取液。取 40 mL 无细胞提取液加入到 40% 饱和硫酸铵溶液中, 在冰上搅拌 4 h。然后于 17 000 r/min 离心 20 min。将离心后的不溶物收集, 将其溶解在 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液中, 冷冻干燥后存放于 -20 °C 冰箱内, 制备得到赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白。对粗酶蛋白进行 SDS-PAGE, 分析蛋白的分子量, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.5 赖氨酸脱羧酶酶活测定方法

在 500 mL 三角瓶中加入 pH 值为 5.5 的 5% 的赖氨酸盐酸盐溶液 100 g, 加入 5'-磷酸吡哆醛至终浓度为 0.1 mmol/L, 最后加入上述 1.2.4 制备的赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白, 37 °C、170 r/min 振荡反应 10 min, 沸水浴终止反应, 反应液测定戊二胺含量, 以每分

钟 1 g 赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白催化产生 1 μ mol 的戊二胺定义为一个酶活单位, 即 1 U。

1.2.6 戊二胺测定方法

利用核磁共振一维氢谱来定量分析酶反应液中的戊二胺。取定量的样品和含有定量内标和重水溶液混合。采用的仪器为 Bruker 400 Ultrashield Plus NMR 核磁共振仪, 程序为 FID 65536, 扫描数为 16, 脉冲 14.49 μ s, 功率 17 W, 样品温度 27 °C。为了提高测量的准确度, 所有的样品都采用称重的方式。

1.2.7 赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白的最适 pH 和 pH 稳定性

分别配制 pH 值为 4.0–10.0, 浓度为 5% 的赖氨酸盐酸盐缓冲溶液, 加入 5'-磷酸吡哆醛至终浓度为 0.1 mmol/L, 加入纯化的赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白, 测定不同 pH 值下赖氨酸脱羧酶 LDC 的酶活。

分别将纯化的赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白溶解于不同 pH 值缓冲液中, 37 °C 静置保存 36 h 后测定酶活, 确定此酶的 pH 稳定性。

1.2.8 赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白的最适温度及温度稳定性

配制 pH 值为 5.5, 终浓度为 5% 的赖氨酸盐酸盐缓冲液 100 g, 加入 5'-磷酸吡哆醛至终浓度为 0.1 mmol/L, 加入纯化的赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白, 分别在 20 °C 到 80 °C 不同温度下测定酶活, 研究酶的最适反应温度。

将纯化的赖氨酸脱羧酶蛋白溶解于 pH 值为 5.5 缓冲溶液中, 静置于不同温度的水溶液中水浴保温 36 h, 测定酶活力, 考察温度对酶稳定性的影响。

1.2.9 不同金属离子对粗酶酶活的影响

在反应液中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的各种离子, 37 °C 测定赖氨酸脱羧酶 LDC 酶活, 不加金属离子的作为对照。

2 结果与分析

2.1 *ldc* 基因在大肠杆菌中的表达

以克雷伯氏菌基因组 DNA 为模板, 用 KOIdc-F、KOIdc-R 引物进行 PCR 扩增。所得到片段与目的基因 *ldc* 的 2 148 bp 大小一致 (约为 2.1 kb), 如图 1 所示。

胶回收此目的片段, 连接 pMD18-T 载体构建得到 pMD18-KOIdc, 转化大肠杆菌 *E. coli* JM109 中, 提取质粒, 经酶切鉴定后送出测序。测序结果通过 Blast 进行比对, 表明 PCR 扩增获得的基因 *ldc* 核苷

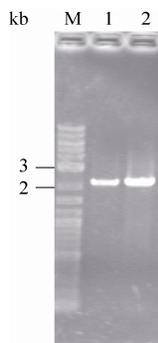


图1 产酸克雷伯氏菌 *ldc* 基因的扩增

Fig. 1 PCR products of *ldc* gene. M: marker; 1-2: *ldc* PCR.

酸序列与 *K. oxytoca* E718 的赖氨酸脱羧酶的基因序列 (GenBank Accession No. CP003683.1) 同源性达 99%, 为一个完整的阅读框。pMD-KO*ldc* 用 *Sac* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 胶回收 KO*ldc* 片段, 将其与经相同酶切线性化的 pUC18 载体连接, 将得到的重组表达载体命名为 pUC18-KO*ldc*。并将其转化大肠杆菌 JM109, 通过菌落 PCR 筛选出阳性转化子, LB 培养后提取质粒, 用 *Eco*R I 酶切验证确认。

重组质粒 pUC18-KO*ldc* 通过电击转化入 *E. coli* MG1655 K12 感受态细胞, 首先通过菌落 PCR 筛选出阳性转化子。将阳性转化子液体培养后提取少量质粒酶切验证, 酶切验证正确的阳性转化子命名为 LN18。将 LN18 接种至含苄青霉素钠 (终浓度为 100 μ g/mL) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日转接, 35 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{560} 约 4–5, 加入 IPTG 过夜诱导表达, 发酵液酶活可达到 35 U。由于大肠杆菌本身的赖氨酸脱羧酶 CadA 的表达需要在低 pH、有赖氨酸的诱导下才能表达, 而且野生型的表达量很低^[7]。因此认为表达的为产酸克雷伯氏菌的赖氨酸脱羧酶。将发酵液按照步骤 1.2.4 制备得到的粗酶的 1 \times SDS-PAGE 电泳结果表明, LDC 蛋白大小约为 80 kDa, 结果见图 2。

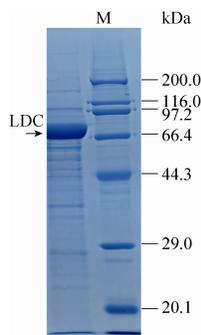


图2 赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins from strain LN18.

2.2 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

每种酶都有其最适 pH, 在最适 pH 下催化反应的速率是它的最高值。最适 pH 的偏离, 使得酶活性部位的基团离子化发生变化从而降低酶的活力。本研究考察在 pH 4.0–10.0 的范围内产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶粗酶的酶活变化, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 酶的最适反应 pH 为 5.5 左右, 酶活达到 30 000 U 左右, 随着 pH 值上升, 酶活力逐渐降低, 当 pH 值达到 7.5 左右时, 酶活几乎降低一半, 当 pH 值偏酸性如 pH 值为 4.0 时, 酶活也大幅下降。通过对比前人的文献^[8], 发现产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的最适 pH 和大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶 CadA 相近, 最适 pH 都为 5.5, 但与大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶 CadA 在 pH 8.0 几乎没有酶活不同, 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶在 pH 8.0 的酶活能达到最适 pH 值酶活的 30% 以上。

将粗酶蛋白在不同 pH 缓冲液 (pH 4.0–10.0) 中于 37 $^{\circ}$ C 处理 36 h 后, 测定其相对酶活, 相对酶活为处理前后的酶活百分比, 结果如图 3 所示。产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶在 pH 5.0–6.0 范围内比较稳定, 能保持 80% 以上的酶活力; pH 7.0 以上, 酶稳定性迅速下降。

2.3 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的最适反应温度和温度稳定性

温度从两方面影响酶促反应的速率, 升高温度增加底物分子的热能, 提高反应的速率, 但是较高温度会增加构成酶本身蛋白质结构的分子热能, 增加了多重弱的非共价键相互作用破裂的机会, 这些相互作用维系着酶的三维结构, 最终将导致酶的变性。酶的三维构象会改变活性部位的结构, 从而改变酶的催化活性。本研究将 pH 值为 5.5 的赖氨酸脱羧酶溶液放置于 20 $^{\circ}$ C–80 $^{\circ}$ C 的环境中测定酶活, 结果见图 4, 由图 4 可知该粗酶的最适反应温度为 55 $^{\circ}$ C, 在该温度下酶活达到 37 000 U。

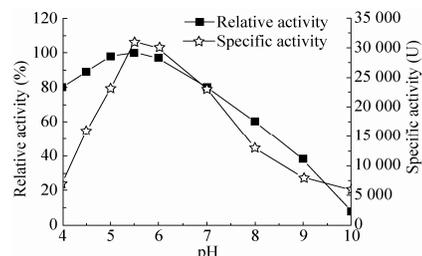


图3 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

Fig. 3 The optimal pH and pH stability for LDC.

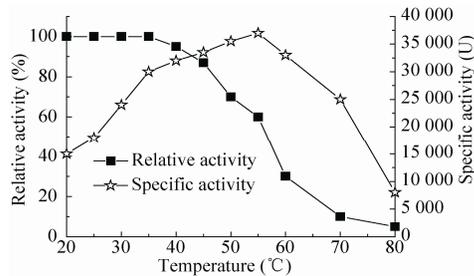


图4 产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶的最适反应温度和温度稳定性

Fig. 4 The optimal temperature and temperature stability for LDC.

温度稳定性试验结果如图4所示,产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶粗酶蛋白在40℃以下较稳定,相对酶活没有变化,在40℃以上,酶稳定性逐渐下降,到达60℃时LDC相对活力下降接近80%。

2.4 不同金属离子对产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶活性的影响

金属离子经常可以作为酶促反应的辅因子,因此在酶促反应中经常添加某些金属离子来促进酶促反应的进行。赖氨酸脱羧酶反应需要5'-磷酸吡哆醛作为辅酶。反应体系中添加各种金属离子考察对酶活的影响,其中以不加离子时的酶作为对照,设其酶活为100%,结果表明 K^+ 、 Na^+ 、 Co^{2+} 金属离子对酶促反应影响较小, Mg^{2+} 对酶活有促进作用,相对酶活为113,而 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 有一定的抑制作用。

3 讨论

产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶基因可以在大肠杆菌中得到很好的表达。构建的重组菌LN18经过LB培养基培养过夜后用终浓度为0.5 mmol/L的IPTG诱导培养,发酵液酶活可以达到35 U/g发酵液,对发酵液的赖氨酸脱羧酶进行纯化,得到赖氨酸脱羧酶蛋白,酶活可以达到30 000 U。赖氨酸脱羧酶粗酶的最适反应pH值为5.5,最适反应温度为55℃。和大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶CadA在pH 8.0几乎没有酶活不同,产酸克雷伯氏菌赖氨酸脱羧酶在pH 8.0左右仍然能保持在最优pH下酶活的30%以上。这可能使得在生物催化过程中可以减少pH缓冲盐的加入,有利于后续的产品纯化和提高产品的质量,对生物法合成戊二胺的产业化具备较好的应用价值。离子实验表明, K^+ 、 Na^+ 、 Co^{2+} 金属离子对酶促反应影响较小, Mg^{2+} 对酶有促进作用, Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 有一定的抑制作用。下一步研究将对该酶

进行异源表达优化和分子定向进化,进一步提高酶的表达量和发掘酶在高pH下的表现性能,为生物法合成戊二胺的产业化奠定基础。

REFERENCES

- [1] Gale EF, Epps HMR. The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodieticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochem J*, 1942, 36(7/9): 600-618.
- [2] Sabo DL, Boeker EA, Byers B, et al. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry*, 1974, 13(4): 662-670.
- [3] Meng SY, Bennett GN. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J Bacteriol*, 1992, 174(8): 2659-2669.
- [4] Fecker LF, Beier H, Berlin J. Cloning and characterization of a lysine decarboxylase gene from *Hafnia alvei*. *Mol Gen Genet*, 1986, 203(1): 177-184.
- [5] Sabo DL, Boeker EA, Byers B, et al. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry*, 1974, 13(4): 662-670.
- [6] Kikuchi Y, Kojima H, Tanaka T, et al. Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997, 179(14): 4486-4492.
- [7] Lemonnier M, Lane D. Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1998, 144(3): 751-760.
- [8] Krithika G, Arunachalam J, Priyanka H, et al. The two forms of lysine decarboxylase; kinetics and effect of expression in relation to acid tolerance response in *E. coli*. *J Exp Sci*, 2010, 1(12): 10-21.
- [9] Mimitsuka T, Sawai H, Hatsu M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(9): 2130-2135.
- [10] Qian Z G, Xia X X, Lee S Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of Cadaverine: a five carbon diamine. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 93-103.
- [11] Kind S, Jeong WK, Schröder H, et al. Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane. *Metab Eng*, 2010, 12: 341-351.
- [12] Kind S, Jeong WK, Schröder H, et al. Identification and elimination of the competing N-acetyldiaminopentane pathway for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl and Environ Microb*, 2010, 76: 5175-5180.
- [13] Kind S, Kreye S, Wittmann C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2011, 13: 617-627.
- [14] Kanjee U, Gutsche I, Alexopoulos E, et al. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J*, 2011, 30(5): 931-944.
- [15] Ozgul F, Ozgul Y. Formation of biogenic amines by gram-negative rods isolated from fresh, spoiled, VP-packed and MAP-packed herring (*Clupea harengus*). *Eur Food Res Technol*, 2005, 221(5): 575-581.

(本文责编 郝丽芳)