

磷酸吡哆醛依赖型酶的研究进展及其应用

蔡雪^{1,2,3}, 孙晨阳^{1,2}, 翟增春^{1,2}, 施雪^{1,2}, 柳志强^{1,2,3*}, 郑裕国^{1,2,3}

1 浙江工业大学 生物有机合成技术研究浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

3 华东合成生物学产业技术研究院, 浙江 杭州 310014

蔡雪, 孙晨阳, 翟增春, 施雪, 柳志强, 郑裕国. 磷酸吡哆醛依赖型酶的研究进展及其应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2771-2785.

CAI Xue, SUN Chenyang, ZHAI Zengchun, SHI Xue, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Recent advances in pyridoxal phosphate-dependent enzymes and their applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2771-2785.

摘要: 磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)作为维生素 B6 的活性形式, 是多种酶促反应中的重要辅因子。磷酸吡哆醛依赖型酶能够催化多种化学反应, 如消旋、脱羧、 β -加成、 β -消除、反羟醛裂解、转氨和 α -消除等多种化学反应, 是生物法合成多种天然氨基酸、非天然氨基酸及其相关化合物的有力工具。本文以 ω -转氨酶、赖氨酸脱羧酶、苏氨酸醛缩酶、L-酪氨酸酚解酶等典型 PLP 依赖型酶为例, 分析了这些酶的结构特征与催化机理, 总结了它们的分子改造研究进展以及在工业生产中的应用。最后, 本文对磷酸吡哆醛依赖型酶的未来发展进行了展望, 包括 PLP 辅因子的体内再生系统及工业应用等, 讨论了这些酶在生物催化应用中的巨大潜力。

关键词: 磷酸吡哆醛依赖型酶; 磷酸吡哆醛; 辅因子; 醛缩酶; 转氨酶; 生物催化

Recent advances in pyridoxal phosphate-dependent enzymes and their applications

CAI Xue^{1,2,3}, SUN Chenyang^{1,2}, ZHAI Zengchun^{1,2}, SHI Xue^{1,2}, LIU Zhiqiang^{1,2,3*}, ZHENG Yuguo^{1,2,3}

1 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

3 Huadong Industry Technology Institute of Synthetic Biology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Pyridoxal phosphate (PLP), the active form of vitamin B6, is an important coenzyme in

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102100); 国家自然科学基金(32000898); 浙江省自然科学基金(LQ21B060006)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102100), the National Natural Science Foundation of China (32000898), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ21B060006).

*Corresponding author. E-mail: microlu@zjut.edu.cn

Received: 2023-12-21; Accepted: 2024-02-22; Published online: 2024-06-17

various enzyme-catalyzed reactions. PLP-dependent enzymes can catalyze a variety of chemical reactions, such as racemization, decarboxylation, β -addition, β -elimination, retro-aldol cleavage, transamination, and α -elimination. They are biologically synthesized a powerful tool for a variety of natural amino acids, non-natural amino acids and their related compounds. This article details the structural features and catalytic mechanisms of typical PLP-dependent enzymes such as ω -transaminase, lysine decarboxylase, threonine aldolase, and L-tyrosine phenol-lyase, and reviews the research progress in molecular modification and industrial applications of these enzymes. Finally, this article provides an outlook on the future development of PLP-dependent enzymes, including *in vivo* regeneration system and industrial applications of PLP cofactors, and discusses the tremendous potential of these enzymes in biocatalytic applications.

Keywords: pyridoxal phosphate-dependent enzyme; pyridoxal phosphate; co-factor; aldolase; transaminase; biocatalysis

磷酸吡哆醛依赖型酶以吡哆醛-5'-磷酸(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)为辅因子, 广泛存在于生物体内。它能够催化多种化学反应, 如消旋、脱羧、 β -加成、 β -消除、反羟醛裂解、转氨和 α -消除等, 可用于 C-C、C-N 键的形成, 是生物法合成多种天然氨基酸、非天然氨基酸及其相关化合物的有力工具, 因此被认为是具有广泛应用前景的工业生物催化剂^[1]。PLP 的结构与苯甲醛相似, 但邻位羟基和环氮的存在改变了其羰基的性质, 使得 PLP 易于通过自身醛基与氨基形成亚胺, 有利于稳定形成的碳负离子中间体。PLP 依赖型酶可以根据其底物的特征进行分类, 例如对氨基酸进行转移的转氨酶、对氨基酸进行脱羧的脱羧酶、对醛进行缩合反应的醛缩酶等, 其分类对于研究其催化机理和应用具有重要意义, 有助于深入理解不同酶的特点和作用方式。本文总结与分析了 PLP 依赖型酶家族的不同成员之间结构、催化机理的差异, 着重分析了 PLP 依赖型酶家族成员的工业催化属性提升案例。

1 PLP 依赖型酶的分类

PLP 依赖型酶根据其折叠结构可分为 I-V 五种类型, 以及两个附加的折叠类型 VI 和 VII^[2-4]。

其中最常见 I 型酶包括 ω -转氨酶、赖氨酸脱羧酶、苏氨酸醛缩酶等; II 型酶包括 L-酪氨酸裂解酶等; III 型酶包括 α -氨基 ϵ -己内酰胺消旋酶等; IV 型酶包括胱硫醚 β -裂解酶等; V 型酶包括糖原磷酸化酶等(表 1)。PLP 依赖型酶的一个特点是, 只有当辅因子 PLP 与酶活性中心的赖氨酸残基共价结合生成内醛亚胺时才具有活性^[5-6]。

转氨酶(transaminase, TAm, EC 2.6.1.X)又称氨基转移酶, 属于 I 型 PLP 依赖型酶, 是手性胺合成的重要工业酶之一。根据底物类型, 转氨酶可分为两大类: α -转氨酶(α -TAMs)和 ω -转氨酶(ω -TAMs)。 α -TAMs 需要在羰基官能团的 α 位存在羧基, 它们参与 α -氨基酸的生物合成, 进行相应的 α -酮酸的氨基转移^[7]。而 ω -TAMs 能以脂肪族酮和胺作为其底物(即不仅是 α -酮酸和氨基酸), 代表所有剩余的转氨酶。 ω -TAMs 可进一步细分为 2 个亚组, 即 β -转氨酶(β -TAMs)和胺转氨酶(ATAMs)。TAMs 也可以根据其折叠类型进行分类, 属于折叠 I 型(天冬氨酸转氨酶超家族)和折叠 IV 型(D-氨基酸转氨酶超家族)^[8]。

赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC, EC 4.1.1.18)属于 I 型 PLP 依赖型酶, 广泛分布于原核生物和真核生物中。它可分为组成型和

表 1 PLP 依赖型酶类别及典型代表

Table 1 Typical enzymes of different fold-types in PLP-dependent enzymes

Fold-type	EC number	Typical enzyme	Applications
I	2.6.1.X	Transaminase	Sitagliptin, (<i>S</i>)-rivastigmine
	4.1.1.18	Lysine decarboxylase	Bisucaberin, (-)-lupinine
	4.1.2.X	L-threonine aldolase	L-threo-dihydroxyphenylserine (L-DOPS), florfenicol
	5.1.1.15	α -amino- ϵ -caprolactam racemase	L-lysine, D- or L-amino acid
II	4.1.99.2	L-tyrosine phenol-lyase	L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
III	4.1.2.42	D-threonine aldolase	
IV	4.4.1.8	Cystathionine β -lyase	L-homocysteine, L-methionine
V	2.4.1.1	Glycogen phosphorylase	Hypoglycaemic agents
VI, VII	5.4.3.2	Lysine-5,6-aminomutase, Lysine-2,3-aminomutase	β -lysine

诱导型两大类, 虽然氨基酸序列相似, 但在最适 pH 和热稳定性方面存在差异^[9]。在 1,5-戊二胺的生产中, 最常用的是诱导型 LDC, 原因是其具有较高的热稳定性和催化稳定性。然而, 底物抑制和狭窄的 pH 使用范围限制了 LDC 在工业应用中的拓展。

苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase, TA, EC 4.1.2.X)能够裂解苏氨酸形成甘氨酸和乙醛, 同时可逆催化其羟醛缩合反应, 承担了苏氨酸分解代谢和甘氨酸合成的功能^[10]。由于 TA 催化具有可逆性, 是不对称 C-C 成键的有力催化剂, 能够广泛应用于 β -羟基- α -氨基酸(β -hydroxy- α -amino acids, HAAs)的生物合成。根据其在 α -碳上的高度特异性, 可将 TA 分为 L-TA 或 D-TA^[11]。基于其对苏氨酸 β -碳原子的特异性, L-TA 又可分为 3 类: (1) 高度特异性的 L-TA (EC 4.1.2.5), 只接受 L-苏氨酸; (2) L-*allo*-TA (EC 4.1.2.49), 只接受稀有的立体异构体 L-*allo*-苏氨酸; (3) L-low specificity-TA (EC 4.1.2.48), 既能接受 L-苏氨酸又能接受 L-*allo*-苏氨酸作为底物^[11]。在 D-TA 中, 目前只发现了 D-low specificity-TA (EC 4.1.2.42) 能够同时接受 D-苏氨酸和 D-*allo*-苏氨酸作为底物。L-TA 和 D-TA 分别属于 I 型和 III 型 PLP 依赖型酶。L-TA 多为四聚体结构, 活性中心位于亚基界面, 而 D-TA 多为二聚体。但 L-TA 与

D-TA 中与催化相关的关键氨基酸残基具有相似性。

L-酪氨酸酚裂解酶(L-tyrosine phenol-lyase, TPL, EC 4.1.99.2)是一种 I 型 PLP 依赖型酶, 呈同源四聚体形态, 活性位点位于每个单体界面之间, 共有 4 个活性位点。TPL 具有的一个特性是其催化关键结构域可经重排形成两种不同的构象——开放构象和封闭构象^[12]。

α -氨基- ϵ -己内酰胺消旋酶(α -amino- ϵ -caprolactam racemase, ACLR, EC 5.1.1.15)属于 I 型 PLP 依赖型酶, 其晶体结构揭示 ACLR 呈同源二聚体形态, 活性位点位于二聚体界面中, 由两个单体的残基组成, 底物结合位点通常位于 Trp49 和 Tyr137 之间(PDB ID: 3DXW)^[13]。

胱硫醚 β -裂解酶(cystathionine β -lyase, CBL, EC 4.4.1.8)属于 IV 型 PLP 依赖型酶的 γ -家族, 是一种手性二面体对称的同源四聚体酶。酶的每个单体由 3 个不同的结构域组成: (1) 3 个 α -螺旋和 1 个 β -折叠形成的 N 端结构域(残基 1-60), 构成相邻亚基的部分活性位点; (2) 第 2 个结构域(残基 61-256)由 1 个 α/β -结构形成, 是 PLP 锚定到酶的区域; (3) C 端(残基 257-395)由 4 个螺旋暴露在溶剂中, 以及位于该区域中部的 4 个反平行 β -折叠组成。CBL 除了能在 L-蛋氨酸代谢中发挥作用外, 还能产生非天然 D-氨基酸,

参与 D-和 L-丝氨酸的代谢,是一种在化工和制药工业中具有巨大潜力的酶^[14]。

糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, GlyP, EC 2.4.1.1)是第一个被描述的变构酶, GlyP 活性位点(残基 248-260 和残基 278-289)的关键调控环路稳定性较弱,并且在结构模型中经常缺失密度或具有较大的 b 因子。即 GlyP 调节是通过关键结构的有序-无序转换对活性位点进行门控来实现的,但其功能调节基础的精确动态变化仍有待深入研究^[15]。糖原磷酸化酶是治疗 2 型糖尿病和转移性癌症的临床靶标^[16]。

2 PLP 依赖型酶的催化机理

PLP 依赖型酶催化不同的反应,均需要形成外醛亚胺和内醛亚胺。首先,辅因子 PLP 与酶活性中心的氨基酸残基共价结合生成内醛亚胺,得到的反应产物以共价键的形式结合到辅因子 PLP 上作为外醛亚胺,反应产物从活性位点释放到溶剂中,辅因子 PLP 再次与活性位点氨基酸残基共价结合,形成内醛亚胺,完成一个催化循环(图 1)^[17]。

转氨酶催化的转氨反应由两步可逆反应组成,遵循双底物“乒乓”反应机理:首先氨基供体的氨基取代内醛亚胺中的 Lys 残基,生成外醛亚胺磷酸吡哆胺(pyridoxamine phosphate, PMP)和相应的酮,随后 PMP 的氨基转移到胺受体(酮、酮酸或醛)上,内醛亚胺再生并形成相应的胺,完成催化循环(图 1A)^[18-19]。转氨酶催化合成手性胺的关键在于催化残基 Lys 所处位置,其位于中间体平面醌结构的 *si* 面或 *re* 面,分别生成 *S* 型或者 *R* 型手性胺。

赖氨酸脱羧酶的催化机制^[17,20]与 PLP 依赖型酶类似,首先,PLP 上的醛基亲核攻击活性位点 Lys 的氨基,并形成稳定的酶-PLP 复合物,即内醛亚胺;当 L-赖氨酸攻击内醛亚胺时,导致 PLP 与 Lys 之间的亚胺键断裂;同时,PLP

与 L-赖氨酸的氨基结合形成外醛亚胺;在此过程中,L-赖氨酸发生脱羧反应,释放 CO₂ 并形成醌中间体;醌中间体从反应介质中获得 H⁺,使外醛亚胺再次质子化;最后产物 1,5-戊二胺生成并释放,同时内醛亚胺重新建立,进入下一个反应循环(图 1B)。

酪氨酸酚裂解酶的催化机理(图 1C)与其他 PLP 依赖酶类似,第一步是在 L-酪氨酸存在下,随着内醛亚胺的裂解,形成外醛亚胺;随后赖氨酸作为碱,使底物的 C_α 脱质子,形成醌类中间体;随着醌类中间体发生重排,释放苯酚并裂解 C_β-C_γ 键;最后内醛亚胺重新形成,释放丙酮酸铵,完成催化循环。此外,丙酮酸铵与水反应生成丙酮酸和铵^[12,21]。目前尚不清楚质子化和键断裂是逐步发生还是以协同方式发生。

苏氨酸醛缩酶处于非催化状态时,PLP 与活性中心赖氨酸残基形成内醛亚胺。当含有氨基的底物(甘氨酸、β-羟基-α-氨基酸)进入活性中心,从内醛亚胺中置换赖氨酸的 ε-氨基与 PLP 形成新的席夫碱(外醛亚胺)。吡啶环帮助 α-碳的质子转移至酶催化中心的广义碱,产生高度共振的阴离子;醛受体进攻 α-碳形成 C-C 键,产物通过席夫碱交换机制被释放出活性中心,PLP 则从产物转移回到活性中心的保守赖氨酸的侧链重新形成内醛亚胺,完成一个催化循环(图 1D)^[22]。

α-氨基-ε-己内酰胺消旋酶有两种催化机制假说:一种是单碱基机制,另一种是双碱基机制。单碱基机制是由 Frese 等^[23]提出的,氘标记实验表明 Lys267 可能是负责平面醌类中间体两侧质子化的碱基。然而,Asano 等^[24]发现的证据表明外消旋作用是通过双碱基机制发生的,底物的每一面各有一个,该过程中涉及的氨基酸残基是 Lys267 (来自 *re*-face)和 Tyr137 (来自 *si*-face)。

大肠杆菌来源胱硫醚 β-裂解酶的晶体结构 (PDB ID: 1CL1)显示^[25],残基 Lys210 和 Tyr111

在该酶的催化机制中发挥至关重要的作用。辅因子 PLP 结合残基 Lys210 还负责 C_α 和 S_γ 之间的质子转移; 另一方面, Tyr111 是负责底物激活的残基, 在所有利用脒硫醚的酶中都是保守的, 它以酚盐形式存在于活性位点, 负责从底物脒硫醚的 α-氨基上除去质子; 然后, 活化底物的去质子化氨基可以进行亲核攻击, 置换与 PLP 结合

的赖氨酸并形成外醛亚胺的席夫碱; 游离的赖氨酸从 C_α 中提取质子, 形成醌类中间体; 随后, S_γ 的质子化导致 C_β-S_γ 键断裂, 外醛亚胺被赖氨酸的亲核攻击所取代, 再生具有催化活性的内醛亚胺并释放不稳定的烯胺、脱氢丙氨酸, 互变异构为 2-亚氨基丙酸亚胺, 该亚胺经过水解脱氨基形成丙酮酸和氨^[25]。

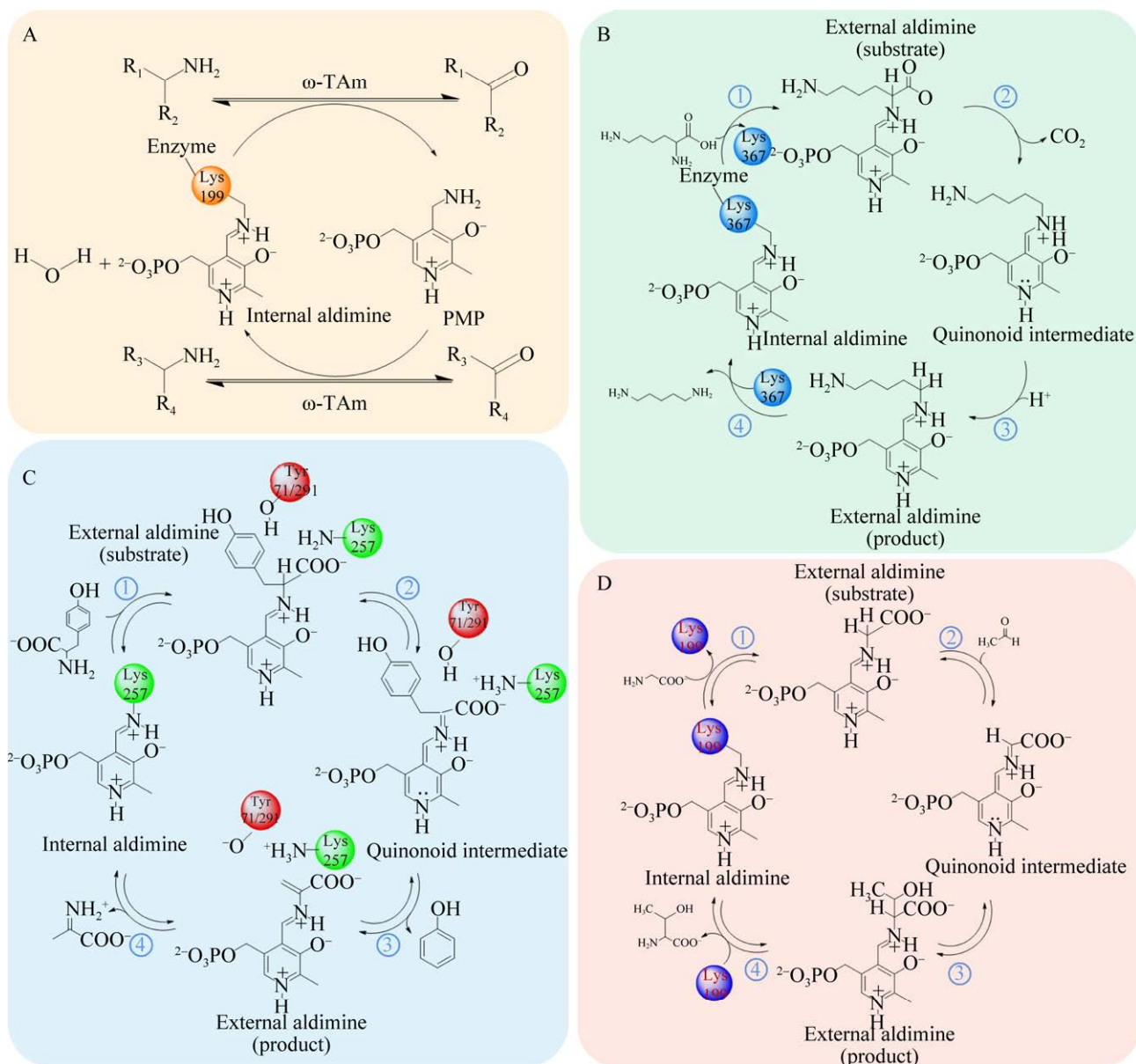


图 1 典型 PLP 依赖型酶的催化机理

Figure 1 The catalytic mechanism of PLP-dependent enzymes. A: Transaminase (TAM)^[18]. B: Lysine decarboxylase (LDC)^[20]. C: L-tyrosine phenol-lyase (TPL)^[21]. D: Threonine aldolase (TA)^[22].

3 PLP 依赖型酶的高通量筛选技术

高通量筛选技术是快速获得目标酶的有力工具,需具有高灵敏度、高通量和高稳定性等特性(图 2)。针对转氨酶的快速评价和鉴定,多种高通量筛选方法被开发^[26-27]。这些方法涵盖了基于富集、pH 传感器、邻苯三酚红和辣根过氧化物酶、CuSO₄ 和 MeOH、乙二酚、电导法、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)以及四氯酮等。Cheng 等^[27]开发了一种基于荧光的转氨酶活性筛选系统以扩展其底物范围,反应在微量滴定板(microtiter plates, MTP)中进行,显示出低背景干扰、高灵敏度($\mu\text{mol/L}$ 大小)和宽动态范围(z 因子 >0.9)的特性(图 2A)。基于该筛选方法,对范巴伦氏分枝杆菌(*Mycobacterium vanbaalenii*)来源的转氨酶(MvTA)进行了高通量筛选,从约 8 000 个克隆中获得了 2 个有益单突变体(G68Y 和 F129A)和 3 个双突变体(M3, M4 和 M5);最优突变体 MvTA M5 (WT-G68Y/F129A)的催化效率比出发酶高 3.2 倍,对 6 种不同的手性酮表现出明显增强的活性,且 $e.e.>99\%$ ^[26]。该结果证明了基于荧光的高通量筛选策略的有效性与高灵敏性,并适用于多种底物的筛选,适用性广。

Gong 等^[28]采用 DNPH 法结合 96 孔板建立了醛缩酶的高通量筛选方法;底物中的醛化合物与 2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH, 2.5mmol/L, 溶于含 3%硫酸的 95%乙醇)进行反应,然后加入 NaOH 进行显色反应,于 485 nm 波长下进行吸光值的测定(图 2B)。L-酪氨酸酚裂解酶的高通量方法可以利用邻苯二酚 2,3-双加氧酶来测定残余邻苯二酚的浓度^[29](图 2C-i);该方法可高效可靠地评估 L-酪氨酸酚裂解酶的活性,且适用于全细胞和粗酶液,无须进行复杂的酶纯化,大大提升了筛选效率。Tang

等^[30]开发了一种 L-酪氨酸酚裂解酶合成活性的高通量筛选方法(图 2C-ii),发现底物之一丙酮酸钠在碱性条件下与水杨醛反应,形成黄色化合物;根据比色化合物在 465 nm 波长处的吸光度可以定量丙酮酸钠的浓度,根据吸光度的降低可以筛选 TPL 的活性;经过比色反应条件的优化,建立的高通量筛选方法成功用于筛选具有增强的 L-DOPA 合成活性的 TPL。Ejim 等^[31]开发了胱硫氨酸 β -裂解酶的高通量筛选方法,该方法以 5,5'-二硝基苯二硫酸(5,5'-dinitrobenzene disulphous, DTNB)作为底物,采用滴定法测定在 412 nm 波长下同型半胱氨酸含量以检测该酶活性。

PLP 依赖型酶因其高对映选择性、宽底物特异性和高反应性,使其成为理想的生物催化剂。鉴于 PLP 依赖型酶作为工业催化剂的重要性,迅速评估其酶特性具有重要意义。然而,在开发成本效益高且高灵敏度的高通量筛选技术方面,仍有进一步的空间。此外,人工智能、深度学习等先进的计算技术可有效地从蛋白质数据库中识别具有理想性状的新型 PLP 依赖型酶,结合高效、低成本的高通量筛选技术将大大促进 PLP 依赖型酶作为工业生物催化剂的应用^[32]。

4 PLP 依赖型酶的工业属性改造与应用

PLP 依赖型酶的应用非常广泛,它们在制药、食品、农业等领域有着很大的应用价值,但天然 PLP 依赖型酶存在催化效率低、立体选择性差、底物耐受性低、热稳定差等问题,亟须提升 PLP 依赖型酶在催化效率、稳定性、底物特异性和产物选择性等方面的工业催化性能,从而适应工业生产的需求。

手性胺是多种手性药物的重要基石,根据美国亚利桑那大学 Njardarson 研究团队发布的 2022 年全球药品销售额 TOP200 的小分子药品

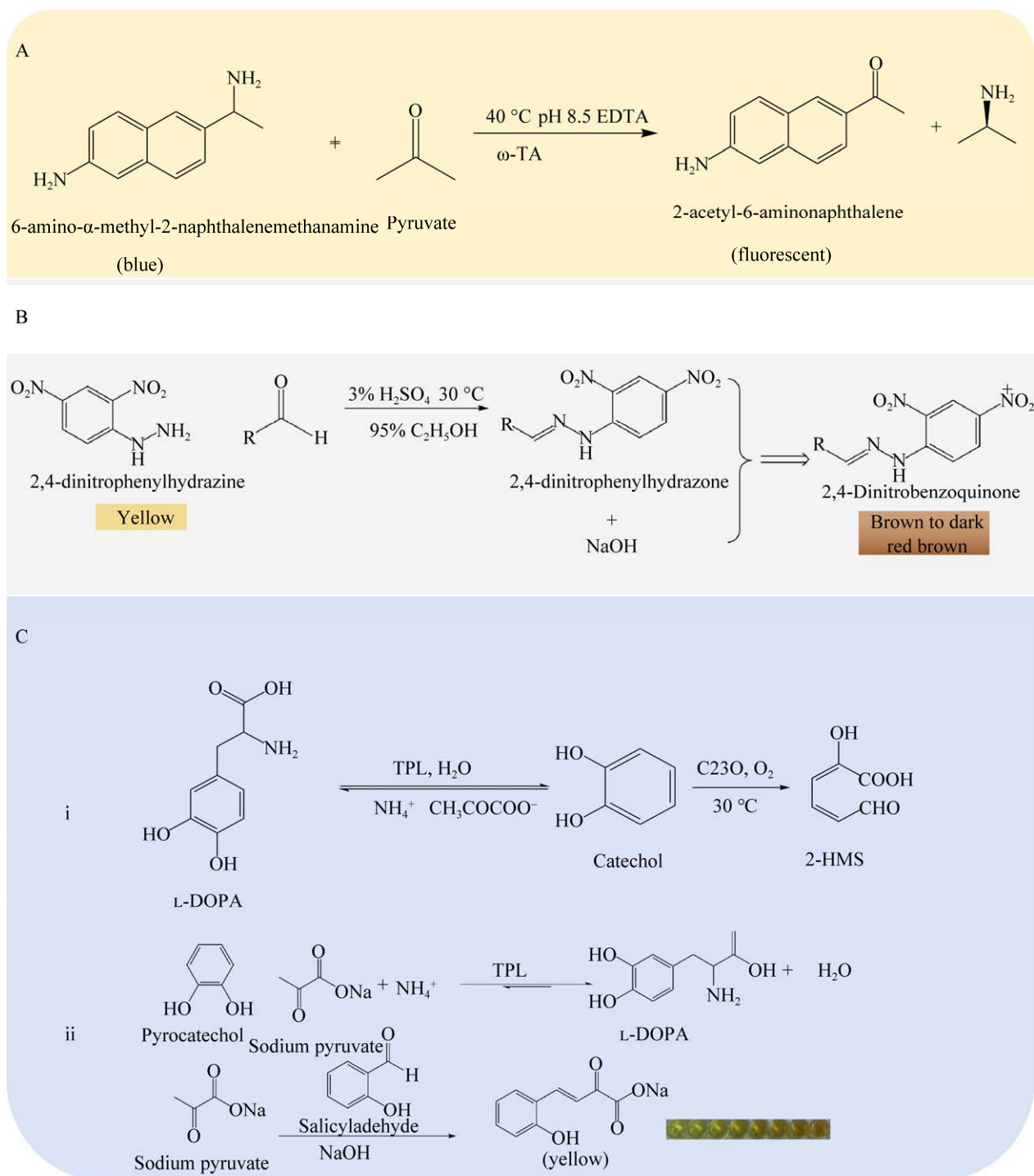


图 2 代表性 PLP 依赖型酶的高通量筛选方法反应原理 A: 转氨酶. B: L-苏氨酸醛缩酶. C: L-酪氨酸酚裂解酶

Figure 2 Reaction principle of high-throughput screening method for representative PLP-dependent enzymes. A: Transaminase. B: L-threonine aldolase. C: L-tyrosine phenol lyase.

榜单, 约 40 种药物中含有手性胺基团(不包含手性 α 、 β 和 γ -氨基酸)^[33]。生物催化合成手性胺基具有高立体选择性、高区域选择性、高活性、低毒性和环境友好等优势, 其中转氨酶是手性胺生物合成的重要酶之一^[33-36]。在自然界中, *S*-选择性转氨酶比 *R*-选择性转氨酶更丰富, 因此长期以来, *S*-选择性转氨酶被人们所认识和广泛研究, 但对于 *R*-选择性的认识仍处于探索阶段。

郑裕国课题组筛选并改造了不同来源的转氨酶, 应用于西他列汀、L-草铵膦等重要化学品的生物合成^[37-41]。课题组从卡氏节杆菌 (*Arthrobacter cummingsii*) ZJUT212、AcATA 中克隆了 *R*-选择性 ω -ATA 基因, 筛选后使用半理性设计获得了最佳突变体 M1-M122H 和 M1-T134G; 在公斤级实验中, 使用 2 g/L 突变体 M1-M122H 大肠杆菌细胞作为生物催化剂, PTfpB 底物浓度 50 kg, 在 30 h 内产生了大约 40 kg 的 *R*-APTfpB (*e.e.*>99%), 时空产率达到约 32 g/(L·d)^[40]。针对外源性昂贵辅因子 PLP 的添加导致成本高昂和反应组成复杂的问题, 课题组首次构建了基

于转氨酶和吡哆醛 5'-磷酸共价共固定化的新型自给自足生物催化剂及其在西他列汀连续生物合成中的应用, 其活性回收率为 83.6%, 比活性为 343.0 U/g^[41]。自给自足的 BgTA 生物催化剂用于在循环填充床反应器中连续生物合成(*R*)-西他列汀, 进行 700 批反应, 无需额外添加 PLP; 每批次 *R*-西他列汀的收率和 *e.e.*值分别在 90%和 99%以上, 时空产率为 40.0 g/(L·h)^[41]。

德国 Bornscheuer 课题组^[42]采用生物信息学分析与 D-氨基酸氨基转移酶的计算重构相结合的方法, 在 α -氨基酸氨基转移酶中成功引入 *R*-转氨酶活性, 该酶的活性位点中 1-6 个氨基酸被取代, 分别为 Y31F、H86F、Y88F、H100L、S180A 和 T242I (图 3); 其中 6 位点突变体 M2-6 的比酶活达到 326 mU/mg, 该比酶活数值类似于天然 *R*-转氨酶的值(通常为 250 mU/mg)。这些结果证明 *R*-转氨酶可以从 α -氨基酸氨基转移酶进化而来。

R-选择性 ω -胺转氨酶(ω -amine aminotransferases, ω -ATA)作为生物催化剂的创建对于前手性酮的不对称胺化生产西他列汀中间体至关重要, 因为

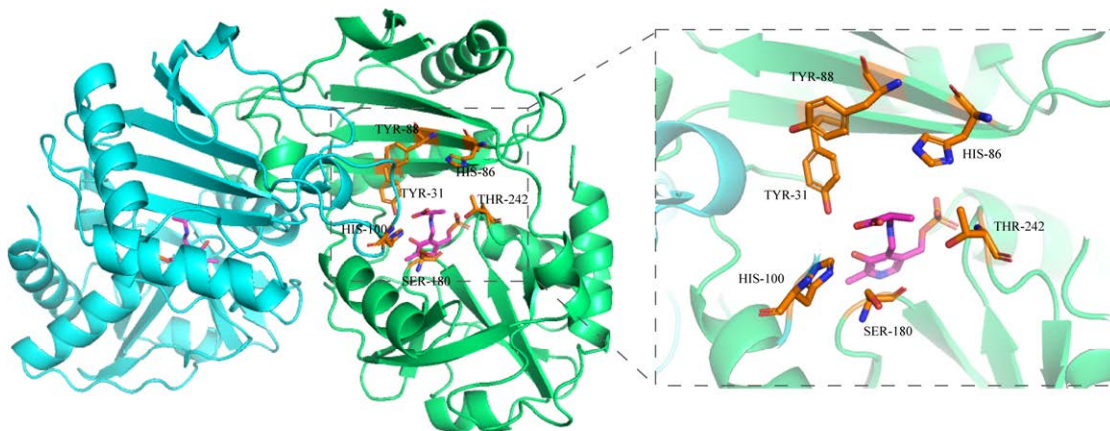


图 3 D-氨基酸转氨酶的三维结构图(左为整体结构图, 右图是 6 位点突变体 M2-6 的特写, PLP-(*R*)-苯乙胺用洋红色棒表示)^[42]

Figure 3 Three-dimensional structure diagram of D-amino acid transaminase (left is the overall structure diagram, right is a close-up of the 6 mutant M2-6, PLP-(*R*)-phenylethylamine is represented by a magenta stick)^[42].

罕见的 ω -ATA 本质上是 *R*-选择性的, 并且大多数稳定性较差对大体积前手性酮的活性较低, 以上工作通过蛋白质工程的方法, 扩展了转氨酶的底物谱范围, 同时也通过转氨酶与辅因子的共固定化, 为提高手性胺医药中间体生物合成的经济性进行了探索。

赖氨酸脱羧酶可用于生产 1,5-戊二胺。这种小分子化合物与六亚甲基二胺具有相似的结构, 可用于生产聚酰胺、聚氨酯等化合物的生产^[43-47]。此外, 1,5-戊二胺还被用作生物碱、螯合剂等的前体物质。由于石化聚合物在全球市场上有近两年大约每年新增 700 万 t 的需求量^[48], 使用生物聚合物替代这些产品将是石油化工领域的重大突破。赖氨酸脱羧酶在工业规模上的应用受到了终产物浓度、pH 等因素的影响。当终产物 1,5-戊二胺积累浓度为 3 g/L 时, 赖氨酸脱羧酶的催化活性即损失一半, 可见其对酶活性具有较大的抑制作用^[49]。另外, 催化活性对 pH 的依赖与结构构象有关(图 4)^[50]。在较低的 pH 下, 酶通常形成寡聚体, 在较高的 pH 值下, 赖氨酸脱羧酶易形成十聚体和二聚体, 二聚体的比例随 pH 的升高而增加, 而二聚体比活性低于十聚体。因此随着氢离子不断被消耗, 介质的 pH 逐步增加, 赖氨酸脱羧酶呈现的整体活力在逐步下降。

Tateno 等^[51]利用一株谷氨酸棒杆菌共表达牛链球菌来源的 α -淀粉酶(α -amylase, AmyA)和大肠杆菌 K-12 来源的赖氨酸脱羧酶, 从淀粉中一步生产 1,5-戊二胺; 通过使用高组成表达启动子来调控谷氨酰胺穿梭载体中赖氨酸脱羧酶的表达, 将其转化为分泌 α -淀粉酶的谷氨酰胺穿梭载体; 改造后的谷氨酰胺酵母同时表达赖氨酸脱羧酶和 α -淀粉酶, 并保持它们的活性; 在使用 50 g/L 可溶性淀粉作为唯一碳源进行 1,5-戊二胺发酵时, 不添加外源 PLP。谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamum*)成功地从可溶性淀粉中产生 1,5-戊二胺, 21 h 后 1,5-戊二胺的产量达到 23.4 mmol/L。

苏氨酸醛缩酶可用于甘氨酸和不同类型醛(脂肪族和芳香族)生成广泛的 β -羟基- α -氨基酸(β -hydroxy- α -amino acid, HAAs)。HAAs 是氯霉素、氟苯尼考、甲砒霉素、肾上腺素、屈昔多巴、万古霉素、鞘脂菌素等多种活性医药成分的关键中间体^[52-54]。然而, 由于在合成过程中两个手性中心的构筑导致了立体异构体的混合, 难以获得单一构型的 HAAs, 因此 HAAs 的生产成本一直居高不下, 限制了其应用。苏氨酸醛缩酶可以催化甘氨酸和醛之间的反应, 生成多种拥有两个手性中心的 β -羟基- α -氨基酸, 而且立体选择性较高。

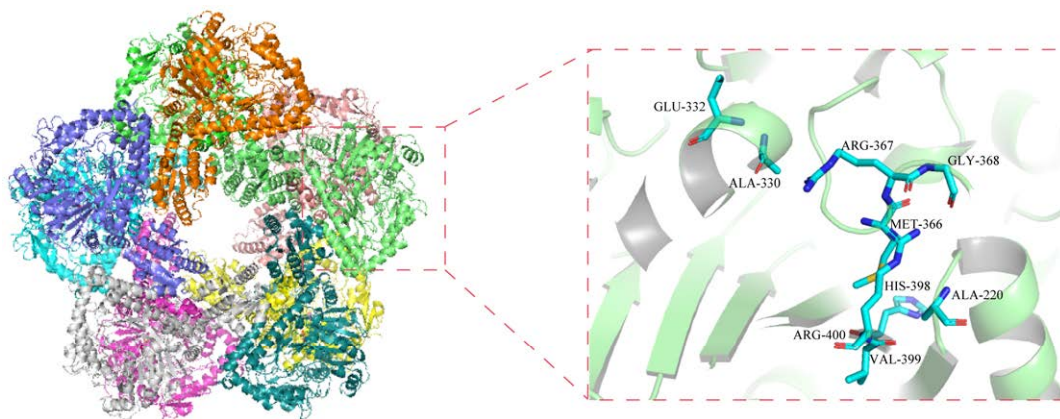


图 4 赖氨酸脱羧酶的整体三维结构和关键氨基酸位点图^[50]

Figure 4 Overall three-dimensional structure and key amino acid site map of lysine decarboxylase^[50].

浙江大学吴坚平教授课题组^[54]利用可变色景观 (mutability landscapes) 方法, 成功地对苏氨酸醛缩酶进行了有针对性的进化, 获得了两个 *e.e.* 值相对严格的突变体: 一个突变体是 H305L/Y8H/V143R, 它对 *syn* 构型的非对映选择性从 37.2% 提高到了 99.4%; 另一个突变体是 H305Y/Y8I/W307E, 成功将对 *anti* 的非对映选择性提高到了 97.2%。通过分子动力学模拟和共同进化分析, 研究团队揭示了 L-TA 非对映选择性调节机制, 遵循 Prelog 规则。中国科学院天津工业生物技术研究所朱敦明课题组^[55]针对 C_β 的立体选择性, 开发了一种逐步视觉筛选方法, 通过使用立体选择性苯丝氨酸脱水酶来测量苏氨酸醛缩酶催化的羟醛缩合的活性和立体选择性, 从而能够直接选择具有更高 C_β 立体选择性的突变体; 以来自假单胞菌的 L-PsTA 为出发菌株, 通过同时突变与底物的氨基和羟基相互作用的氨基酸残基, 获得了对芳香醛具有改进或反向立体选择性的突变体 D93F/E147D、D93H/E147D 和 D93N/E147D (图 5)。目前苏氨酸醛缩酶的反应

速率和立体选择性仍然未达到工业化应用的要求, 还需要进一步研究。

酪氨酸酚裂解酶天然催化 L-酪氨酸的 C_β-C_γ 键发生可逆断裂生成苯酚、丙酮酸和铵 (图 6)^[12,57-58]。利用其逆反应(合成活性), 可以合成高原子经济性的 L-酪氨酸及其衍生物, 广泛应用于医药工业, 例如合成治疗帕金森病的首选药物 3,4-二羟基苯基-L-丙氨酸 (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine, L-DOPA), 其年产量超过 250 t^[57]。由于天然来源的 L-DOPA 已不能满足市场需求, 化学路线采用的反应条件非常苛刻, 目前利用生物酶法生产的 L-DOPA 已占据了一半的市场份额。Zeng 等^[59]利用易错 PCR 技术和高通量筛选方法, 将欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*) 中的 L-酪氨酸酚裂解酶进行随机突变, 从约 3×10⁴ 个突变体中, 筛选出一株正向突变株, 通过全细胞催化反应使得 L-DOPA 的产量提高了 36.5%; 此外, 该酶温度在 20–35 °C 范围内以及 pH 在 8.5–10.0 之间都表现出良好的稳定性。Han 等^[60]预测了 25 个 TPL 突变体, 其

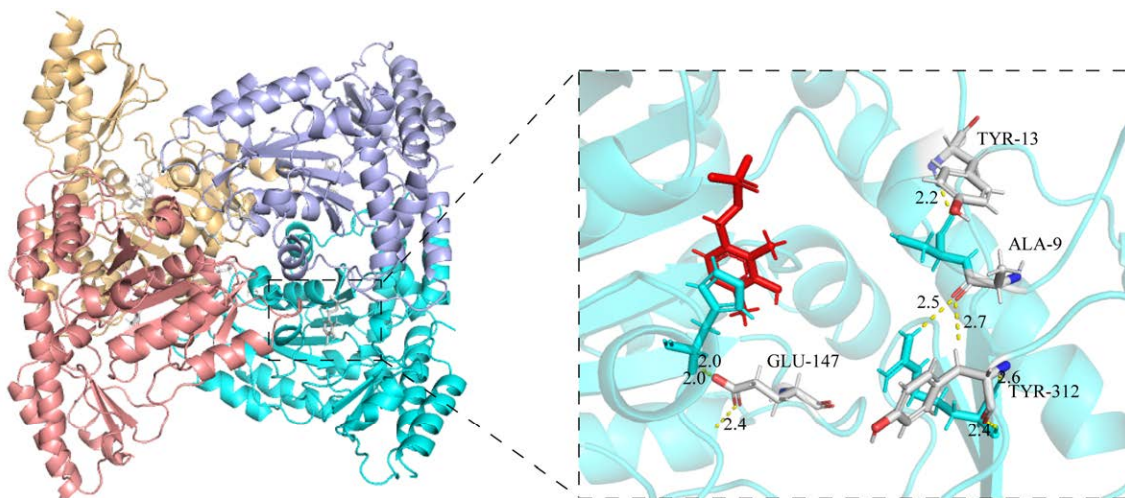


图 5 苏氨酸醛缩酶的整体三维结构图与关键催化位点图 红色为配体 4'-deoxyribose phosphate (PLR)^[56]

Figure 5 The overall three-dimensional structure diagram and modification site diagram of threonine aldolase. Red is the ligand 4'-deoxyribose phosphate (PLR)^[56].

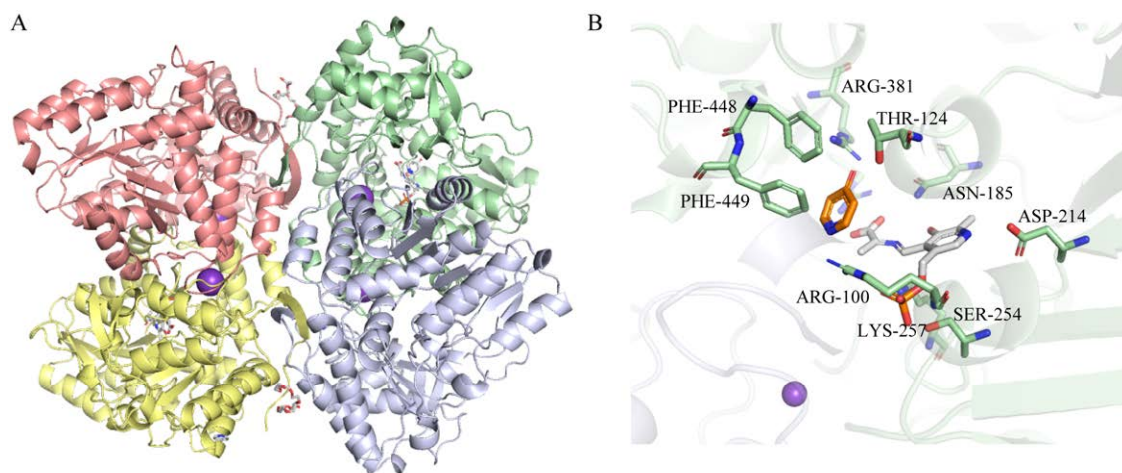


图 6 酪氨酸酚解酶的三维结构图与催化关键位点 A: TPL 三维结构全图. B: PLP-氨基丙烯酸酯中间体与 TPL 活性位点 4-HP 的结构及相互作用(氨基丙烯酸酯中间体用灰色棒状表示, 4-HP 用橙色棒表示, 钾离子用紫色球表示)^[12]

Figure 6 Three-dimensional structure diagram and catalytic key sites of tyrosine phenolase. A: Full three-dimensional structure of TPL. B: Structure and interaction between PLP-aminoacrylate intermediate and TPL active site 4-HP (aminoacrylate intermediate is represented by a gray stick, 4-HP is represented by an orange stick, potassium ions are represented by purple balls)^[12].

中两个被证实表现出最高的 L-DOPA 产量, 并命名为 E313W 和 E313M, 分别为 47.5 g/L 和 62.1 g/L, 分别比野生型(wild type, WT) TPL 产量高 110.2%和 174.8%, k_{cat} 值分别提高了 45.5%和 36.4%; 此外, E313W 和 E313M 表现出更高的热稳定性、更高的熔化温度和对 5'-磷酸吡哆醛更强的亲和力; 突变体的结构分析表明, 通过增强突变残基与 H317 之间的相互作用, 可以增强 N 末端区域的稳定性。在补料分批策略中使用这些突变体作为全细胞生物催化剂, 可提高 L-DOPA 产量。

α -氨基- ϵ -己内酰胺消旋酶介导的氨基酸及其衍生物的动力学拆分可用于合成 D-氨基酸及其衍生物, 可在饲料补充剂、药物和化妆品中应用。Frese 等^[61] 鉴定了一个人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropi*) 来源的 α -氨基 ϵ -己内酰胺消旋酶 (*Ochrobactrum anthropi* α -amino ϵ -caprolactam racemase, OaACLR) 同源物, 具有

15 U/mg 的低氨基酸酯消旋酶消旋活性; 针对 L-苯丙氨酸甲酯, 其突变体 L293C 的氨基酸酯消旋作用比野生型高 3.7 倍。

胱硫醚 β -裂解酶(CBL), 通常被称为 β -胱硫醚酶, 是参与 L-甲硫氨酸生物合成转硫途径的第二种酶, 该途径存在于多种细菌和植物中, 但在人类中不存在。因此, CBL 被认为是一种有吸引力的抗生素靶点, 且产生有害和不良副作用的可能性较小。CBL 不仅参与蛋氨酸的合成, 还参与其分解代谢, 是与食品中挥发性硫化物 (volatile sulfur compounds, VSC) 的产生密切相关的酶。

5 总结与展望

综上, PLP 依赖型酶如 ω -转氨酶、赖氨酸脱羧酶、苏氨酸醛缩酶、L-酪氨酸酚裂解酶、 α -氨基- ϵ -己内酰胺消旋酶等是在医药、化工、农业等多个领域具有极大应用价值与前景的生物

催化剂,可用于左旋多巴、屈西多巴等治疗神经退行性病变药物、西他列汀等降糖药物、氟苯尼考等抗生素类药物以及 L-赖氨酸、 β -赖氨酸等氨基酸等。其中辅因子在 PLP 依赖型酶的催化体系中起着不可或缺的作用,但由于这些辅因子化合物的生产成本相对较高及其在生产过程中的消耗,开发辅因子的再生系统可有效降低其应用成本。相关研究^[62-64]表明 PLP 体内再生系统不仅有利于显著改善胞内 PLP 的供应,同时也提高了 PLP 依赖型酶的酶活,有望降低 PLP 依赖型酶的工业应用成本。但目前相关工作仍然较少,后续需要继续提高其 PLP 再生效率,扩大使用范围。除了辅因子因素外,PLP 依赖型酶自身的工业属性也仍需提升,包括对非天然底物的特异性识别度、底物耐受性、有机溶剂耐受性等。未来,研究人员可以借助 AlphaFold2、Rosetta、RosettaFold、FireProt、ProteinMPNN 等先进的计算工具^[65],通过人工智能与深度学习,结合定向进化改造、晶体解析等实验验证的相互支撑,大幅提高 PLP 依赖型酶的改造效率。在原子水平解析 PLP 依赖型酶“序列-结构-功能”的关系,掌握决定其催化活力、立体选择性、底物特异性等酶学性质的核心因素,指导新一代工业酶的开发,降低生产成本,实现 PLP 依赖型酶介导的重要化学品的工业化绿色生产。

REFERENCES

- [1] FERNANDES HS, RAMOS MJ, CERQUEIRA NMFA. The catalytic mechanism of the pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, histidine decarboxylase: a computational study[J]. *Chemistry*, 2017, 23(38): 9162-9173.
- [2] GRISHIN NV, PHILLIPS MA, GOLDSMITH EJ. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1995, 4(7): 1291-1304.
- [3] PERCUDANI R, PERACCHI A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 273.
- [4] LIANG J, HAN Q, TAN Y, DING HZ, LI JY. Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2019, 6: 4.
- [5] NGO HPT, CERQUEIRA NMFA, KIM JK, HONG MK, FERNANDES PA, RAMOS MJ, KANG LW. PLP undergoes conformational changes during the course of an enzymatic reaction[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2014, 70(2): 596-606.
- [6] OLIVEIRA DP, MOURA HHG, JANINI MER, FERNANDES NC, SANTOS N. Diagnosis and treatment of persistent oral lesions caused by herpesvirus in a patient with *Pemphigus vulgaris*[J]. *International Journal of Dermatology*, 2011, 50(3): 335-339.
- [7] ABRAHAMSON MJ, VÁZQUEZ-FIGUEROA E, WOODALL NB, MOORE JC, BOMMARIUS AS. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2012, 51(16): 3969-3972.
- [8] PAVKOV-KELLER T, STROHMEIER GA, DIEPOLD M, PEETERS W, SMEETS N, SCHÜRMAN M, GRUBER K, SCHWAB H, STEINER K. Discovery and structural characterisation of new fold type IV-transaminases exemplify the diversity of this enzyme fold[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38183.
- [9] KIM HT, KHANG TU, BARITUGO KA, HYUN SM, KANG KH, JUNG SH, SONG BK, PARK K, OH MK, KIM GB, KIM HU, LEE SY, PARK SJ, JOO JC. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of glutaric acid, a C5 dicarboxylic acid platform chemical[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 51: 99-109.
- [10] LIU GX, ZHANG MX, CHEN XM, ZHANG W, DING W, ZHANG Q. Evolution of threonine aldolases, a diverse family involved in the second pathway of glycine biosynthesis[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2015, 80(2): 102-107.
- [11] BEAUDOIN SF, HANNA MP, GHIVIRIGA I, STEWART JD. Progress in using threonine aldolases for preparative synthesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 119: 1-9.
- [12] PHILLIPS RS, BAUER O. Characterization of

- aminoacrylate intermediates of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes[J]. *Methods in Enzymology*, 2023, 685: 199-224.
- [13] OKAZAKI S, SUZUKI A, MIZUSHIMA T, KAWANO T, KOMEDA H, ASANO Y, YAMANE T. The novel structure of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent fold-type I racemase, alpha-amino-epsilon-caprolactam racemase from *Achromobacter obae*[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(5): 941-950.
- [14] LEE WJ, BANAVARA DS, HUGHES JE, CHRISTIANSEN JK, STEELE JL, BROADBENT JR, RANKIN SA. Role of cystathionine beta-lyase in catabolism of amino acids to sulfur volatiles by genetic variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3034-3039.
- [15] KISH M, SUBRAMANIAN S, SMITH V, LETHBRIDGE N, COLE L, VOLLMER F, BOND NJ, PHILLIPS JJ. Allosteric regulation of glycogen phosphorylase by order/disorder transition of the 250' and 280s loops[J]. *Biochemistry*, 2023, 62(8): 1360-1368.
- [16] KISH M, IVORY DP, PHILLIPS JJ. Transient structural dynamics of glycogen phosphorylase from nonequilibrium hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(1): 298-307.
- [17] ROCHA JF, PINA AF, SOUSA SF, CERQUEIRA NMFS. PLP-dependent enzymes as important biocatalysts for the pharmaceutical, chemical and food industries: a structural and mechanistic perspective[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(18): 4864-4876.
- [18] MUTTI FG, FUCHS CS, PRESSNITZ D, SATTLER JH, KROUTIL W. Stereoselectivity of four (R)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353(17): 3227-3233.
- [19] SHIN JS, KIM BG. Exploring the active site of amine: pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: how the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67(9): 2848-2853.
- [20] BUNSUPA S, KATAYAMA K, IKEURA E, OIKAWA A, TOYOOKA K, SAITO K, YAMAZAKI M. Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 1202-1216.
- [21] MILIĆ D, DEMIDKINA TV, FALEEV NG, MATKOVIĆ-CALOGOVIĆ D, ANTSON AA. Insights into the catalytic mechanism of tyrosine phenol-lyase from X-ray structures of quinonoid intermediates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(43): 29206-29214.
- [22] ROCHA JF, SOUSA SF, CERQUEIRA NMFS. Computational studies devoted to the catalytic mechanism of threonine aldolase, a critical enzyme in the pharmaceutical industry to synthesize β -hydroxy- α -amino acids[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(9): 4990-4999.
- [23] FRESE A, SUTTON PW, TURKENBURG JP, GROGAN G. Snapshots of the catalytic cycle of the industrial enzyme α -amino- ϵ -caprolactam racemase (ACLR) observed using X-ray crystallography[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(2): 1045-1048.
- [24] CLAUSEN T, HUBER R, LABER B, POHLENZ HD, MESSERSCHMIDT A. Crystal structure of the pyridoxal-5'-phosphate dependent cystathionine beta-lyase from *Escherichia coli* at 1.83 Å[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 262(2): 202-224.
- [25] ASANO Y, YAMAGUCHI S. Dynamic kinetic resolution of amino acid amide catalyzed by D-aminopeptidase and α -amino- ϵ -caprolactam racemase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(21): 7696-7697.
- [26] CHENG F, TANG XL, KARDASHLIEV T. Transcription factor-based biosensors in high-throughput screening: advances and applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(7): e1700648.
- [27] CHENG F, CHEN XL, XIANG C, LIU ZQ, WANG YJ, ZHENG YG. Fluorescence-based high-throughput screening system for R- ω -transaminase engineering and its substrate scope extension[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 2999-3009.
- [28] GONG L, XU GC, CAO XD, HAN RZ, DONG JJ, NI Y. High-throughput screening method for directed evolution and characterization of aldol activity of D-threonine aldolase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(2): 417-429.
- [29] ZHU HQ, HU WY, TANG XL, ZHENG RC, ZHENG YG. High-throughput assay of tyrosine phenol-lyase activity using a cascade of enzymatic reactions[J].

- Analytical Biochemistry, 2022, 640: 114547.
- [30] TANG XL, SUO H, ZHENG RC, ZHENG YG. An efficient colorimetric high-throughput screening method for synthetic activity of tyrosine phenol-lyase[J]. Analytical Biochemistry, 2018, 560: 7-11.
- [31] EJIM LJ, BLANCHARD JE, KOTEVA KP, SUMERFIELD R, ELOWE NH, CHECHETTO JD, BROWN ED, JUNOP MS, WRIGHT GD. Inhibitors of bacterial cystathionine beta-lyase: leads for new antimicrobial agents and probes of enzyme structure and function[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2007, 50(4): 755-764.
- [32] STEFFEN-MUNSBERG F, VICKERS C, KOHLS H, LAND H, MALLIN H, NOBILI A, SKALDEN L, van den BERGH T, JOOSTEN HJ, BERGLUND P, HÖHNE M, BORNSCHEUER UT. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(5): 566-604.
- [33] McGRATH NA, BRICHACEK M, NJARDARSON JT. A graphical journal of innovative organic architectures that have improved our lives[J]. Journal of Chemical Education, 2010, 87(12): 1348-1349.
- [34] HWANG BY, CHO BK, YUN H, KOTESHWAR K, KIM BG. Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 37(1/2/3/4/5/6): 47-55.
- [35] SCHNEIDER J, WENDISCH VF. Biotechnological production of polyamines by bacteria: recent achievements and future perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 17-30.
- [36] SAVILE CK, JANEY JM, MUNDORFF EC, MOORE JC, TAM S, JARVIS WR, COLBECK JC, KREBBER A, FLEITZ FJ, BRANDS J, DEVINE PN, HUISMAN GW, HUGHES GJ. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture[J]. Science, 2010, 329(5989): 305-309.
- [37] CHENG F, LI JM, ZHOU SP, LIU Q, JIN LQ, XUE YP, ZHENG YG. A single-transaminase-catalyzed biocatalytic cascade for efficient asymmetric synthesis of L-phosphinothricin[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2021, 22(2): 345-348.
- [38] JIA DX, PENG C, LI JL, WANG F, LIU ZQ, ZHENG YG. Redesign of (R)-omega-transaminase and its application for synthesizing amino acids with bulky side chain[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(11): 3624-3640.
- [39] JIA DX, WANG F, ZHAO R, GU BD, PENG C, JIN LQ, LIU ZQ, ZHENG YG. Engineering novel (R)-selective transaminase for efficient symmetric synthesis of D-alanine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(9): e0006222.
- [40] CHENG F, CHEN XL, LI MY, ZHANG XJ, JIA DX, WANG YJ, LIU ZQ, ZHENG YG. Creation of a robust and R-selective ω-amine transaminase for the asymmetric synthesis of sitagliptin intermediate on a kilogram scale[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109655.
- [41] ZHANG XJ, FAN HH, LIU N, WANG XX, CHENG F, LIU ZQ, ZHENG YG. A novel self-sufficient biocatalyst based on transaminase and pyridoxal 5'-phosphate covalent co-immobilization and its application in continuous biosynthesis of sitagliptin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 130: 109362.
- [42] VOSS M, XIANG C, ESQUE J, NOBILI A, MENKE MJ, ANDRÉ I, HÖHNE M, BORNSCHEUER UT. Creation of (R)-amine transaminase activity within an α-amino acid transaminase scaffold[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(2): 416-424.
- [43] ZHOU N, ZHANG AL, WEI GG, YANG S, XU S, CHEN KQ, OUYANG PK. Cadaverine production from L-lysine with chitin-binding protein-mediated lysine decarboxylase immobilization[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 103.
- [44] LIU YX, ZHENG YX, WU H, ZHANG W, REN TY, YOU SP, QI W, SU RX, HE ZM. Development of an integrated process for the production of high-purity cadaverine from lysine decarboxylase[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2020, 95(5): 1542-1549.
- [45] PARK SH, SOETYONO F, KIM HK. Cadaverine production by using cross-linked enzyme aggregate of *Escherichia coli* lysine decarboxylase[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(2): 289-296.
- [46] HAN LF, YUAN JJ, AO XL, LIN SJ, HAN X, YE HH. Biochemical characterization and phylogenetic analysis of the virulence factor lysine decarboxylase from *Vibrio vulnificus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3082.
- [47] KIND S, KREYE S, WITTMANN C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(5): 617-627.
- [48] 陈曦, 吴凤礼, 樊飞宇, 吴洽庆, 朱敦明, 手性医药

- 化学品的绿色生物合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4240-4262.
- CHEN X, WU FL, FAN FY, WU QQ, ZHU DM. Green biosynthesis of chiral pharmaceutical chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4240-4262 (in Chinese).
- [49] KANJEE U, GUTSCHE I, ALEXOPOULOS E, ZHAO BY, EL BAKKOURI M, THIBAUT G, LIU KY, RAMACHANDRAN S, SNIDER J, PAI EF, HOUY WA. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase[J]. The EMBO Journal, 2011, 30(5): 931-944.
- [50] PHILLIPS RS, POTEH P, KRAJCOVIC D, MILLER KA, HOOVER TR. Crystal structure of D-ornithine/D-lysine decarboxylase, a stereoinverting decarboxylase: implications for substrate specificity and stereospecificity of fold III decarboxylases[J]. Biochemistry, 2019, 58(8): 1038-1042.
- [51] TATENO T, OKADA Y, TSUCHIDATE T, TANAKA T, FUKUDA H, KONDO A. Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase and lysine decarboxylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(1): 115-121.
- [52] FESKO K, SUPLATOV D, ŠVEDAS V. Bioinformatic analysis of the fold type I PLP-dependent enzymes reveals determinants of reaction specificity in L-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei*[J]. FEBS Open Bio, 2018, 8(6): 1013-1028.
- [53] FESKO K, REISINGER C, STEINREIBER J, WEBER H, SCHÜRMAN M, GRIENGL H. Four types of threonine aldolases: similarities and differences in kinetics/thermodynamics[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 52: 19-26.
- [54] ZHENG WL, PU ZJ, XIAO LX, XU G, YANG LR, YU HR, WU JP. Mutability-landscape-guided engineering of L-threonine aldolase revealing the prelog rule in mediating diastereoselectivity of C-C bond formation[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2023, 62(2): e202213855.
- [55] CHEN QJ, CHEN X, FENG JH, WU QQ, ZHU DM, MA YH. Improving and inverting C β -stereoselectivity of threonine aldolase *via* substrate-binding-guided mutagenesis and a stepwise visual screening[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(5): 4462-4469.
- [56] LI LH, ZHANG RZ, XU Y, ZHANG WC. Comprehensive screening strategy coupled with structure-guided engineering of L-threonine aldolase from *Pseudomonas putida* for enhanced catalytic efficiency towards L-threo-4-methylsulfonylphenylserine[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1117890.
- [57] DO Q, NGUYEN GT, PHILLIPS RS. Inhibition of tyrosine phenol-lyase by tyrosine homologues[J]. Amino Acids, 2016, 48(9): 2243-2251.
- [58] ZHENG RC, TANG XL, SUO H, FENG LL, LIU X, YANG J, ZHENG YG. Biochemical characterization of a novel tyrosine phenol-lyase from *Fusobacterium nucleatum* for highly efficient biosynthesis of L-DOPA[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 112: 88-93.
- [59] ZENG WZ, XU BB, DU GC, CHEN J, ZHOU JW. Integrating enzyme evolution and high-throughput screening for efficient biosynthesis of L-DOPA[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(12): 1631-1641.
- [60] HAN HM, ZENG WZ, DU GC, CHEN J, ZHOU JW. Site-directed mutagenesis to improve the thermostability of tyrosine phenol-lyase[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 310: 6-12.
- [61] FRESE A, BARRASS SV, SUTTON PW, ADAMS JP, GROGAN G. An aminocaprolactam racemase from *Ochrobactrum anthropi* with promiscuous amino acid ester racemase activity[J]. Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2018; 19(16): 1711-1715.
- [62] ZHANG JL, WENG HJ, ZHOU ZX, DU GC, KANG Z. Engineering of multiple modular pathways for high-yield production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 353-360.
- [63] GE JW, YANG XH, YU HW, YE LD. High-yield whole cell biosynthesis of nylon 12 monomer with self-sufficient supply of multiple cofactors[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 172-185.
- [64] ZHENG WL, CHEN KT, FANG S, CHENG XL, XU G, YANG LR, WU JP. Construction and application of PLP self-sufficient biocatalysis system for threonine aldolase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109667.
- [65] MING YF, WANG WK, YIN R, ZENG M, TANG L, TANG SZ, LI M. A review of enzyme design in catalytic stability by artificial intelligence[J]. Briefings in Bioinformatics, 2023, 24(3): bbad065.

(本文责编 郝丽芳)