

细菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的分子机制及分子改造研究进展

莫芹^{1,2} 李由然^{1,2} 石贵阳^{1,2*}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: L-天冬氨酸 α -脱羧酶能够催化 L-天冬氨酸生成 β -丙氨酸, 是泛酸代谢中的关键酶之一, 对生物体中的能量代谢和脂肪代谢至关重要。细菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶属于丙酮酰依赖型的一类酶, 具有特别的翻译后加工机制和底物失活作用, 本文对 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的分子机制和分子改造进行了综述, 并对其在 β -丙氨酸合成方面的应用进行了展望。

关键词: L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 丙酮酰基团, β -丙氨酸, 自剪切作用/自加工作用, 底物失活作用

Advances in molecular mechanism and modification of bacterial L-aspartate alpha-decarboxylase

MO Qin^{1,2} LI You-Ran^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: L-aspartate alpha-decarboxylase could catalyze the decarboxylation of L-aspartic acid to generate beta-alanine, which is one of key enzymes in pantothenate metabolism, playing an important role in energy and lipid metabolism of all lives. It belongs to a small class of pyruvoyl-dependent enzymes, which has characteristic mechanisms of self-cleavage on pro-enzyme and substrate inactivation during catalysis. Here, we reviewed advances and achievements in molecular mechanism and modification of bacterial L-aspartate alpha-decarboxylase, and expected its application in biosynthesis of beta-alanine.

Keywords: L-aspartate alpha-decarboxylase, Pyruvoyl group, Beta-alanine, Self-cleavage/Self-processing, Substrate inactivation

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31401674); The 13th Five-Year National Key Research and Development Program of China (2016YFD0401400)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: October 16, 2017; **Accepted:** December 13, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 15, 2018
基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31401674); “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401400)

*通信作者: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-10-16; 接受日期: 2017-12-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-01-15

蛋白质分子改造技术能够改善酶分子的催化效率、稳定性、对应选择性等性能,在理想酶制剂的开发中起到了重要作用^[1]。相较于传统的定向进化,理性改造策略的应用范围比较有限,这主要是因为大多数酶分子缺乏蛋白结构和催化分子机理的研究基础。随着微生物资源的不断开发、蛋白结构的不断解析以及信息技术等方面的发展,蛋白质的结构与功能关系越来越清晰,理性改造策略获得理想酶制剂的可能性大大增强^[2-3]。

β -丙氨酸是重要的化合物前体,在精制化工、功能性食品以及生物医药等领域都有重要应用^[4-7]。目前 β -丙氨酸的生产方法主要为化学合成法,存在反应条件苛刻、污染大、副产物多等弊端,近年来利用细菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶进行酶转化法生产 β -丙氨酸引起了研究者的关注。该酶在转化过程中存在严重的底物失活作用,因此利用分子改造技术提高其在催化过程中的分子稳定性成为研究的重点。本文主要对 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的分子机制和分子改造相关研究做一综述。

1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶简介

L-天冬氨酸 α -脱羧酶(L-aspartate alpha-decarboxylase, ADC, EC: 4.1.1.11),又称 L-天冬氨酸 1-脱羧酶,能够催化 L-天冬氨酸脱去 α -羧基生成 β -丙氨酸。在机体内, β -丙氨酸对泛酸、辅酶 A 和酰基载体蛋白的合成至关重要,是所有生物不可或缺的营养因子^[8-9]。目前报道的 ADC 主要有两类,第一类 ADC (PYR-ADC)被发现于大多数细菌和古细菌中,这一类 ADC 以丙酮酰基团作为活

性中心,其编码基因首次在泛酸缺陷型菌株的研究中被发现,因此多以 PanD 命名,目前在 PDB 数据库中已有 6 种来源的结构数据,分别为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[10]、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)^[11]、嗜热菌 (*Thermus thermophiles*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)^[12]; 第二种 ADC (PLP-ADC) 被发现于部分古细菌和昆虫中,需要辅基磷酸吡哆醛 (PLP) 完成催化活性,这一类酶通常具有多种催化能力,例如谷氨酸脱羧酶和亚磺酸脱羧酶活性。这类酶序列上与其他来源谷氨酸脱羧酶的序列相似性很高,但是目前在 PDB 数据库中并没有结构数据^[13-16]。这两类脱羧酶主要在结构和催化性能上有较大差异,详见表 1。

本文主要对目前已有结构基础的 PanD 的分子机制和分子改造做一综述。PanD 属于依赖丙酮酰基团的一类酶,同类酶中还有 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶、组氨酸脱羧酶、磷脂酰丝氨酸脱羧酶、磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶以及脯氨酸/甘氨酸还原酶。这一类酶通过原酶的自加工作用获得丙酮酰基团,其催化产物多为胺类物质,在生物体中有多种生理作用^[17]。

2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的分子机制

2.1 自剪切加工机制

PanD 在合成过程中发生自加工的分子重排来获得催化活性,这种分子重排现象在蛋白拼接、多肽水解以及原酶熟化的过程中普遍存在^[18]。晶体结构的测定是解析蛋白分子反应机理最直接的证

表 1 两类 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的结构特点和催化特性比较

Table 1 Comparison of structural and catalytic properties in two types L-aspartate alpha-decarboxylases

特性 Properties	PYR-ADC	PLP-ADC
辅助因子 Cofactors	丙酮酰基团 Pyruvoyl group	磷酸吡哆醛 Pyridoxine phosphate
专一性 Specificity	强 High	弱 Low
基因来源 Gene resources	原核生物 Prokaryotes	多为真核生物 Eukaryotes mostly
同源性 Homologies	有同源性 Homologous	与谷氨酸脱羧酶的序列相似性很高 Show high similarity with glutamate decarboxylases
PDB 序列号 PDB ID	1PPY, 1UHD, 2C45, 2EEO, 3PLX	无报道 No reported

据。Albert 等^[19]首次测定了大肠杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的晶体结构。该酶结构是一个拟回转对称四聚体，每个亚基含有六股 β 折叠片，其末端附有小的 α 螺旋线。它的活性中心位于相邻亚基之间，电子云密度显示有 3 个活性中心含有丙酮酰基团，而第 4 个位置含有一个酯基，它是自加工过程中的中间体。大肠杆菌 PanD 表达后以原酶(π -Chain, 13.8 kD)形式存在，随后在 Gly24-Ser25 处进行自剪切加工,获得 C 端为羟基的 β 链(β -Chain, 11 kD)和 N 端带有丙酮酰基团的 α 链(α -Chain, 2.8 kD)。根据三维晶体结构的特征及活性位点氨基酸残基的相互作用，Albert 等推测出了 L-天冬氨酸 α -脱羧酶原酶的加工机理：自催化的第一步是形成一个酯基，该步骤 Ser25 的亲核性被 Tyr A58、Lys D9、His D11 加强，其羟基攻击 Gly24 的羰基，形成酯基，同时释放了一个伯氨。第二步是酯键的断裂，形成具有活性的丙酮酰基团，同时去除 Ser25 的 $C\alpha$ 的质子和 Gly24 的羧基(图 1)。

为了进一步研究 ADC 的加工作用机制，

Schmitzberger 等^[20]对 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的自剪切位点进行定点突变和嵌入，比较了不同突变体的晶体结构与原酶结构的差异，结果证实了严格控制自剪切位点的特殊构象和位阻效应在加工过程中的必要性，同时证明了自加工过程中发生的分子重排是至关重要的。他们提出 Thr57 $O\gamma$ 和水分子形成一个氧阴离子穴来稳定含氧恶唑烷中间体，Thr57 和水分子可能是支持酸碱催化的关键。另外，在剪切位点之前的 Loop 结构构象的柔性也对正确剪切至关重要。

PanD 的活化是一种分子内自发的加工过程，但体外较高温度的孵化过程能够加速其活化速率，尽管体外大肠杆菌的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶在 37 °C 条件下孵育能加速其加工过程，获得一定程度的活化，但是延长孵育时间，其活化速率相对于体内还是相差很多，这说明生物体内可能有促进原酶加工的催化剂。Nozaki 等^[21]分析了泛酸缺陷型突变体的染色体突变情况，在 89 min 的位置发现了在泛酸代谢途径中的关键基因 *yhhK* (后也称 *panZ* 或

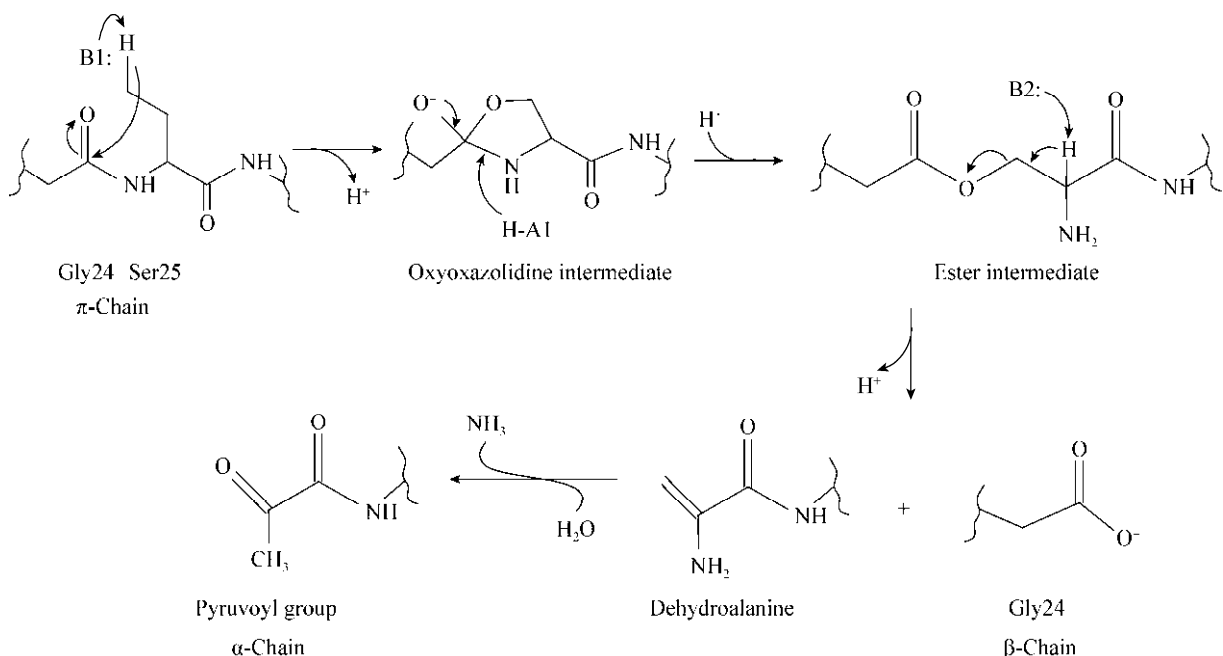


图 1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶自剪切加工过程示意图^[19]

Figure 1 Schematic representation of self-processing reaction in L-aspartate α -decarboxylase^[19]

panM)。经研究发现该基因能促进 PanD 的激活, 并且保守存在于包括大肠杆菌在内的一小类革兰氏阳性菌中。Stuecker 等^[22]给出了体内外 YhhK 与 PanD 相互作用的证据, 该相互作用促进原酶的活化。PanZ 是一种类似 Gcn5 的 N-乙酰转移酶蛋白, 它没有乙酰转移酶活性, 但是具有乙酰辅酶 A 的感应功能, 能促进 PanD 的活化。Monterio 等^[23]解析了 PanD-PanZ 蛋白复合体的晶体结构, 得出了几条重要结论: (1) 在 PanZ 与 PanD 的相互作用中有乙酰辅酶 A 的参与; (2) PanZ-AcCoA 通过反应构象的选择来促进 PanD 的活化; (3) PanZ-AcCoA 对已经活化的 PanD 有抑制作用, 对泛酸的生物合成有调控作用。

然而并不是所有 PanD 原酶的活化都需要 PanZ 的促进, 例如来源于谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 PanD。Stuecker 等^[24]根据 L-天冬氨酸 α -脱羧酶转译后原酶的自剪切加工活化的能力不同, 将天然的 PanD 分成两种类型, 类型 I 需要乙酰辅酶 A 感应子 PanM 辅助剪切形成有活性的 PanD, 这类酶仅存在于革兰氏阳性菌中; 类型 II 在没有 PanM 的情况下仍然能有效地自剪切形成有活性的 PanD, 这类酶广泛存在于细菌以及部分广古菌门和泉古菌门中。PanM 的研究虽然不能涵盖大多数 PanD 的自剪切规律, 但充分表明了 PanD 的自剪切作用在体内泛酸代谢中的重要作用。

2.2 催化反应机制

细菌 ADC 的催化机制是由 Lee 等^[25]在解析了酶和底物类似物的晶体机构后推测获得的。他们测定了幽门螺杆菌的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶在 2.0 Å 分辨率下的原酶, 以及在 1.55 Å 分辨率下与异天冬酰胺结合的复合结构。该晶体结构是一个双 ψ β -桶状结构, 该结构中所有亚基均在 Gly24-Ser25 处发生自剪切作用, 形成一个小的 β 链(碱基 1-24)和一个大的 α 链(碱基 25-117), 每个亚基含有 9 个 β 折叠片和 3 个 α -螺旋结构。在

原酶结构中, α 链的 N 端 Ser25 被转换成一个丙酮酰基团, 而在异天冬酰胺复合结构中, 底物类似物(异天冬酰胺)与丙酮酰基团共价结合。该研究提出在催化脱羧步骤之前, 底物和酶形成了一个 Schiff 碱中间体, 为解析 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的催化机理提供了直接的结构证据。催化机理的推测如图 2 所示: (1) 底物 L-天冬氨酸通过一个 Schiff 碱结构连接丙酮酰基团形成酶-底物的中间体; (2) 中间体释放 α -羧基形成延伸的烯醇结构; (3) 烯醇结构去质子化, 获得酶-产物的 Schiff 碱中间体。该步骤需要 Tyr A58 的苯环提供的质子。这里的质子供体为 Tyr A58 而不是 Thr 57, 已经被 Saldanha 等^[26]通过立体化学标记分析方法证明; (4) 通过水解作用释放产物 β -丙氨酸, 重新获得丙酮酰基团。

2.3 底物失活作用机制

早在 1988 年 Smith^[10]研究发现 L-天冬氨酸 α -脱羧酶易受 L-天冬氨酸的影响而失活, 进一步研究表明该失活方式是一个与时间相关的一级反应, 这说明该失活反应源于酶-底物的复合结构, 并参与了酶催化反应的过程。他在研究 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的结构与分子特征时发现 α -亚基的 N 端测序结果第一个氨基酸为丙氨酸, 该结果与其活性中心的丙酮酰基团不相符, 因此在解释丙氨酸的存在时, 他借鉴了 Kalyankar 等^[27]在研究 PLP 依赖型脱羧酶时观察到脱羧相关转氨作用的研究结果, 给出了失活机理的推测(图 3), 说明了在脱羧过程中亚胺结构的异常质子化是导致转氨作用形成的主要原因, 转氨作用伴随脱羧作用的发生, 最终导致酶失去了丙酮酰基团, 也就失去了催化活性。该机理中的副产物丙二酸半醛是一个极不稳定的化合物, 除了本身容易聚合外, 在 pH>8.0 时还会与产物 β -丙氨酸结合。同时由于转氨反应相对脱羧来说是微弱的, 因此要测到副产物的存在还需要大量的酶与底物作用。目前 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的失活机理并没有得到直接有利的证据。

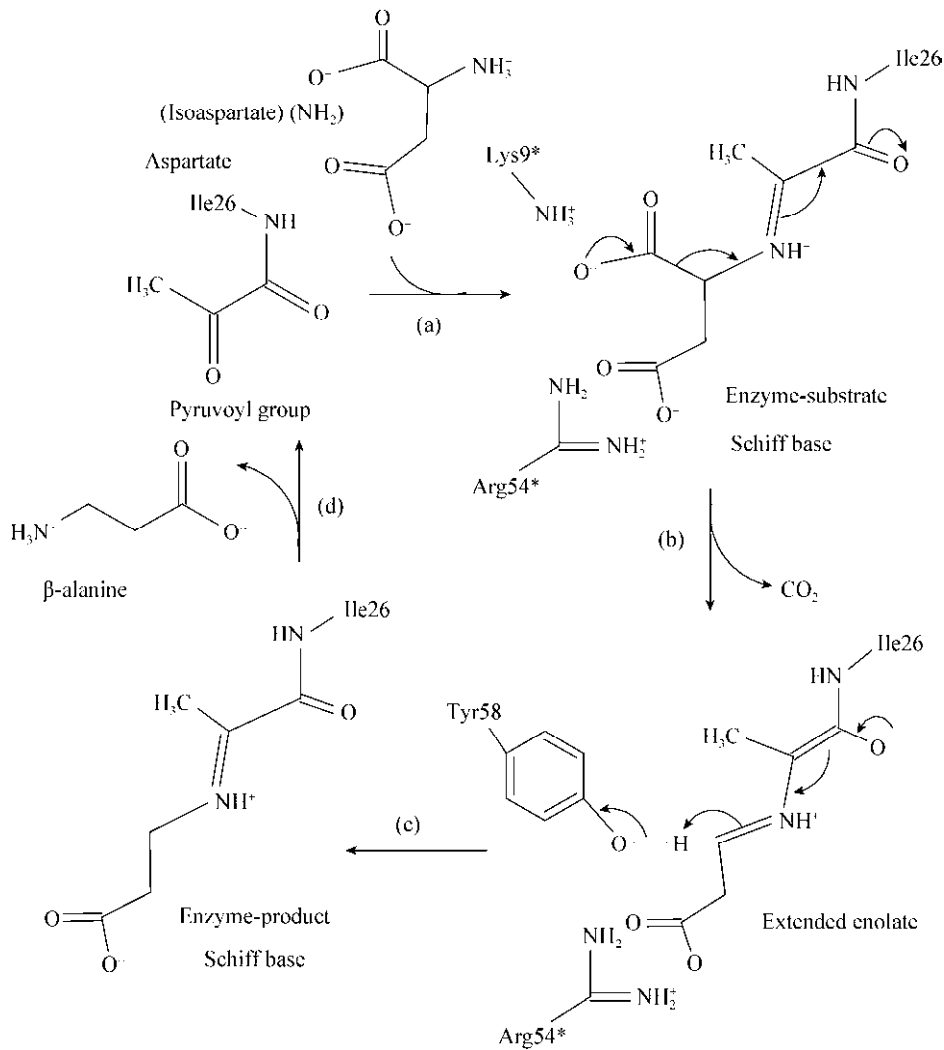


图 2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶推测的催化反应机理^[25]

Figure 2 The proposed catalytic mechanism of L-aspartate α -decarboxylase^[25]

注: *: 相邻亚基的氨基酸残基.

Note: *: Amino acid residues from the adjacent subunit.

3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的克隆、表达及分子改造

3.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的克隆与表达

酶学性质研究以及蛋白晶体制作的前提是高效的克隆表达获得大量高纯度蛋白。L-天冬氨酸 α -脱羧酶的基因最初是从鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* LT2) 丙氨酸营养缺陷型菌株中发现的, 由于 β -丙氨酸和泛酸的添加能够恢复该营养缺陷型突变体的生长, 因此将其命名为 *panD*。随后, 大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、结核杆

菌、幽门螺杆菌等来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶陆续在重组大肠杆菌中被克隆和高效表达^[9]。近年来, 国内学者着力于性能良好 *panD* 基因的挖掘, 以及对 PanD 酶学性质和生物转化等方面的研究, 获得了大量具有工业应用潜力的 *panD* 基因微生物资源。邓思颖等^[28]比较了大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌 3 种来源 PanD 的比酶活(分别为 0.98、7.52 和 8.4 U/mg)及酶学性质, 发现枯草芽孢杆菌来源的重组酶最适 pH 为 6.5, 最适温度为 65 °C, 具有较好的活性和热稳定性。本实验室

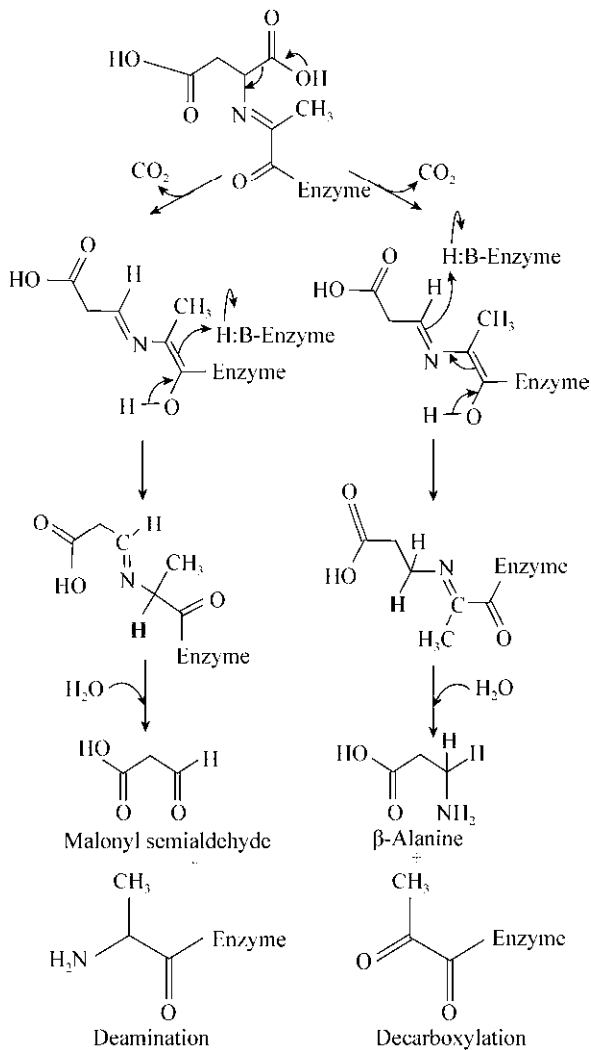


图 3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的脱羧作用及伴随而来的转氨作用机理的推测^[10]

Figure 3 Postulated mechanisms for L-aspartate α -decarboxylase decarboxylation and decarboxylation-dependent transamination^[10]

注: 图中质子化位置用粗体 H 原子标出。

Note: The protonation is marked in bold H atoms.

陈夏林等^[29]利用基因合成技术, 将密码子优化后的单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和杰氏棒杆菌(*Corynebacterium jeikeium*) *panD* 基因克隆至表达载体 pET28a(+)中, 构建重组菌大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*, 获得比酶活分别为 8.9 U/mg 和 11.8 U/mg 的重组酶, 其酶学性质研究发现两种酶的最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 分别为 7.0 和 6.0, 同时它们均在 30–50 °C 和酸性条件

下比较稳定, 具有很大的工业应用潜力。除此之外, 传统的从土壤环境中筛选性能优良的菌种也是开发用于 β -丙氨酸生产的酶制剂方法之一。冯志彬等^[30]从葡萄园土壤中分离 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的生产菌株, 获得了一株特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) PanD37, 经发酵条件优化后其酶活力达到 44.57 U/mL。

3.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的分子改造

基于 PanD 的特殊加工机制和催化特性, 目前该酶在催化过程中的失活作用是限制其应用的主要瓶颈, 因此其分子改造的主要目标是提高酶的催化活力和酶在催化过程的稳定性。

自剪切作用是 PanD 获得催化活性不可或缺的加工步骤。不同微生物来源的 PanD 加工效率取决于蛋白本身的分子结构^[24], 因此自加工效率是 PanD 提高酶催化活力不可忽略的部分。Cui 等^[31]克隆了谷氨酸棒杆菌 ST01 的 *panD* 基因获得重组酶, 并结合结构模拟对可能影响自裂解和活性中心的氨基酸残基 Arg3、Lys9、Arg54、Tyr58 进行定点突变, 结果显示 PanD 的 Arg3 严格控制重组酶的自剪切, 而 Lys9、Arg54、Tyr58 严格调控丙酮酰基的催化。沈艳^[32]采用定点突变的方法对谷氨酸棒杆菌来源的重组酶进行理性设计, 结合氨基酸的理化性质和模型模拟设计, 研究比较了 6 个突变子的突变效果。突变结果显示, 非催化位点 Ile5、催化位点 Lys9 及 Asp63-Asn68 的 Loop 结构的突变均降低或失去重组酶的催化功能。不同来源 PanD 的序列比对结果显示, 严格保守位点有 17 个, 其中位于蛋白表面 Loop 区的有 5 个(Thr16、Asp29、Asn51、Asp82 和 Asn111), 这些位点可能起到结构骨架的作用; 位于活性中心附近的有 12 个(Lys9、His11、Tyr22、Gly24、Ser25、Arg54、Thr57、Tyr58、Gly72、Ala73、Ala74 和 Ile85)^[11]。上述研究中的位点均为活性中心附近的保守或半保守位点, 这些位点对 PanD 的自剪切和催化功能起关键作用。

底物失活作用是限制 PanD 大规模应用的关键

问题,因此提高该酶在催化过程中的分子稳定性是分子改造的重点之一。目前丙酮酰依赖型的一类酶中组氨酸脱羧酶是没有底物失活作用的,但该酶经过单点突变(Asp197Ala)后可以获得底物失活作用,该研究为分子改造减弱底物失活提供理论可能性^[33]。Pei 等^[34]采用了易错 PCR 的方法对枯草芽孢杆菌的 PanD 进行随机突变,并利用荧光测定 β-丙氨酸的高通量筛选方法获得一系列突变子,将酶活力提高了 18%–22%,同时将分子稳定性提高了 29%–64%。其中最优突变子(I88M)将生物转化中的产物生成量提高了 50%。

4 L-天冬氨酸 α-脱羧酶的应用及前景

目前对 PanD 的应用研究还处于文献报道阶段,主要应用有 β-丙氨酸及其衍生产品的合成^[34-35]、D/L-天冬氨酸的拆分^[36]、抗致病菌药物靶点的开发^[12,37]以及改善植物的耐受性^[38-39]等。

生物转化法生产 β-丙氨酸是 PanD 的主要应用之一。从生物炼制的角度来看,L-天冬氨酸可以从生物质废物流中获得,如含氮的多肽藻青素(CGP),因此利用 PanD 合成 β-丙氨酸是生物质能源的有效利用手段。β-丙氨酸是生物合成含氮化合物的中间体,是作为生产丙烯酰胺和丙烯腈的重要平台化合物,具有很大的应用潜力。对于 PanD 表达及性质的研究,目前报道的主要为来源于大肠杆菌^[40]、谷氨酸棒杆菌^[41-42]、枯草芽孢杆菌^[28]和特基拉芽孢杆菌^[30]的 *panD* 基因。Könst 等^[40]研究了利用大肠杆菌 PanD 生产 β-丙氨酸的方法,并考察了该酶的最适温度、pH 和稳定性等工业化应用的关键因素。同时也将该酶分别固定到疏水性的环氧树脂材料和亲水性的含氨基环氧树脂材料上,固定化并没有改善该酶的热稳定性,但是增加了其操作的稳定性。然而催化过程中因丙酮酰基团不可逆的转氨作用造成的酶失活仍然依赖分子改造来获得改善,同样的不可逆底物失活作用也被发现于谷氨酸棒杆菌和枯草芽孢杆菌^[34,41-42]。另外,本实验室对两种新来源的 PanD (分别为单核增生李斯特菌和杰氏棒杆菌)进行了表达和性质研究,实验结果

发现这两种来源的酶同样存在底物失活作用,但是来源于单核增生李斯特菌的失活作用相对较弱^[42]。目前所有开发的天然 PanD 均受催化过程中的底物失活作用影响,因此利用该酶生产 β-丙氨酸的关键是提高其催化过程中的分子稳定性。

近年来, PanD 也被广泛用于代谢工程改造工程菌来生产 β-丙氨酸及其衍生物。Song 等^[43]利用代谢工程方法改造了一株产富马酸的大肠杆菌工程菌,获得了 β-丙氨酸的积累,最终 39 h 分批发酵获得 β-丙氨酸最终产量为 32.3 g/L。他们在积累 β-丙氨酸的基础上通过引入 3 种酶(丙氨酸转氨酶,编码基因 *pa0132*; 丙二酸半醛还原酶,编码基因 *ydfG*; 半醛脱氢酶,编码基因 *yneI*)将工程菌的 β-丙氨酸导向 3-羟基丙酸和丙二酸,最终获得 31.1 g/L 3-羟基丙酸和 3.60 g/L 丙二酸的积累^[44]。Borodina 等^[45]将 PanD 引入到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,通过合成途径的优化最终获得了能够积累 13.7±0.3 g/L 3-羟基丙酸的工程菌。泛酸是由 β-丙氨酸和泛解酸在泛酸合酶的作用下合成的,Dusch 等^[7]在大肠杆菌中表达谷氨酸棒杆菌来源的 PanD 基因(*panD_{C.g}*)有效积累泛酸,单位生产率达到了 140 ng/(mg·h)。在泛酸代谢中 PanD 催化合成 β-丙氨酸是限速步骤之一,在大肠杆菌中 PanD 与其剪切促进子 PanZ 在乙酰辅酶 A 的作用下能有效调控泛酸的合成^[46],因此在工程菌中解除 PanD 严格的调控和提高其转化效率是提高泛酸合成的关键。利用工程菌发酵法生产 β-丙氨酸及其衍生物也离不开 PanD 的有效利用,而 PanD 在代谢途径中的调控作用与其自剪切和失活作用密切相关,因此分子改造技术也为工程菌进一步合理利用 PanD 提供可能。

虽然利用 L-天冬氨酸 α-脱羧酶生物转化法生产 β-丙氨酸是近年来的研究热点,但是国外学者对 PanD 的应用研究并不多,其原因可能是催化过程中的失活作用导致催化稳定性差和转化率低,分子改造技术是解决这个难题的重要手段。由于目前已有大量的对原酶加工和催化机理的报道以及多种微生物 PanD 晶体结构数据的解析,为该酶的理性或半理性分子改造提供了理论基础,因此相比较

定向进化而言, 理性或半理性改造策略更有优势, 利用分子改造技术提高 PanD 的催化能力和催化过程中的分子稳定性为工业化生产 β -丙氨酸提供了可能。

REFERENCES

- [1] Burton SG, Cowan DA, Woodley JM. The search for the ideal biocatalyst[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(1): 37-45
- [2] Sugrue E, Scott C, Jackson CJ. Constrained evolution of a bispecific enzyme: lessons for biocatalyst design[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(4): 937-946
- [3] Franceus J, Verhaeghe T, Desmet T. Correlated positions in protein evolution and engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(4/5): 687-695
- [4] Brencher L, Verhaegh R, Kirsch M. Attenuation of intestinal ischemia-reperfusion-injury by β -alanine: a potentially glycine-receptor mediated effect[J]. *Journal of Surgical Research*, 2017, 211: 233-241
- [5] Blancquaert L, Baba SP, Kwiatkowski S, et al. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination[J]. *The Journal of Physiology*, 2016, 594(17): 4849-4863
- [6] Quesnele JJ, Laframboise MA, Wong JJ, et al. The effects of beta-alanine supplementation on performance: a systematic review of the literature[J]. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2014, 24(1): 14-27
- [7] Dusch N, Pühler A, Kalinowski J. Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1530-1539
- [8] Gliessman JR, Kremer TA, Sangani AA, et al. Pantothenate auxotrophy in *Zymomonas mobilis* ZM4 is due to a lack of aspartate decarboxylase activity[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(13): fnx136
- [9] Gao LJ, Qiu JP. Research advances in L-aspartate decarboxylase[J]. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(5): 54-59 (in Chinese)
高丽娟, 裘娟萍. L-天冬氨酸脱羧酶研究进展[J]. *工业微生物*, 2007, 37(5): 54-59
- [10] Smith RC. The structure and molecular characterization of L-aspartate-alpha-decarboxylase from *Escherichia coli*[D]. Cambridge: Doctoral Dissertation of Massachusetts Institute of Technology, 1988: 256
- [11] Kwon AR, Lee BI, Han BW, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of aspartate L-decarboxylase from *Helicobacter pylori*[J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2002, 58(5): 861-863
- [12] Gopalan G, Chopra S, Ranganathan A, et al. Crystal structure of uncleaved L-aspartate- α -decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65(4): 796-802
- [13] Tomita H, Yokooji Y, Ishibashi T, et al. An archaeal glutamate decarboxylase homolog functions as an aspartate decarboxylase and is involved in β -Alanine and coenzyme A biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(6): 1222-1230
- [14] Liu PY, Ge XM, Ding HZ, et al. Role of glutamate decarboxylase-like protein 1 (GADL1) in taurine biosynthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(49): 40898-40906
- [15] Wang Y, Xu HM, White RH. β -alanine biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(15): 2869-2875
- [16] Phillips AM, Smart R, Strauss R, et al. The drosophila *black* enigma: the molecular and behavioural characterization of the *black¹* mutant allele[J]. *Gene*, 2005, 351: 131-142
- [17] van Paul PD, Snell EE. Pyruvoyl-dependent enzymes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59: 29-59
- [18] Paulus H. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 447-496
- [19] Albert A, Dhanaraj V, Genschel U, et al. Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing[J]. *Nature Structural Biology*, 1998, 5(4): 289-293
- [20] Schmitzberger F, Kilkenny ML, Lobley CMC, et al. Structural constraints on protein self-processing in L-aspartate- α -decarboxylase[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(23): 6193-6204
- [21] Nozaki S, Webb ME, Niki H. An activator for pyruvoyl-dependent L-aspartate α -decarboxylase is conserved in a small group of the γ -proteobacteria including *Escherichia coli*[J]. *Microbiology Open*, 2012, 1(3): 298-310
- [22] Stuecker TN, Hodge KM, Escalante-Semerena JC. The missing link in coenzyme A biosynthesis: PanM (formerly YhhK), a yeast GCN5 acetyltransferase homologue triggers aspartate decarboxylase (PanD) maturation in *Salmonella enterica*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(4): 608-619
- [23] Monteiro DCF, Patel V, Bartlett CP, et al. The structure of the PanD/PanZ protein complex reveals negative feedback regulation of pantothenate biosynthesis by coenzyme A[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(4): 492-503
- [24] Stuecker TN, Bramhacharya S, Hodge-Hanson KM, et al. Phylogenetic and amino acid conservation analyses of bacterial L-aspartate- α -decarboxylase and of its zymogen-maturation protein reveal a putative interaction domain[J]. *BMC Research Notes*, 2015, 8: 354
- [25] Lee BI, Suh SW. Crystal structure of the Schiff base intermediate prior to decarboxylation in the catalytic cycle of aspartate α -decarboxylase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(1): 1-7
- [26] Saldanha SA, Birch LM, Webb ME, et al. Identification of Tyr58 as the proton donor in the aspartate- α -decarboxylase reaction[J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1760-1761
- [27] Kalyankar GD, Snell EE. Pyridoxal-catalyzed decarboxylation of amino acids[J]. *Biochemistry*, 1962, 1(4): 594-600
- [28] Deng SY, Zhang JL, Cai Z, et al. Characterization of L-aspartate- α -decarboxylase from *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(8): 1184-1193 (in Chinese)
邓思颖, 张君丽, 蔡真, 等. 枯草芽胞杆菌 L-天冬氨酸 α 脱羧酶的酶学性质[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(8): 1184-1193
- [29] Chen XL, Li YR, Gu ZH, et al. Expression and characterization

- of two L-aspartate α -decarboxylases[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2337-2344 (in Chinese)
- 陈夏林, 李由然, 顾正华, 等. 两种 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的表达与酶学性质分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2337-2344
- [30] Feng ZB, Zhang J, Chen GZ, et al. Isolation, identification and fermentation optimization of *Bacillus tequilensis* PanD37 producing L-aspartate α -decarboxylase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 44-55 (in Chinese)
- 冯志彬, 张娟, 陈国忠, 等. 产 L-天冬氨酸 α -脱羧酶细菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 44-55
- [31] Cui WJ, Shi ZX, Fang YQ, et al. Significance of Arg3, Arg54, and Tyr58 of L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in the process of self-cleavage[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(1): 121-126
- [32] Shen Y. Molecular modification of L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* by site-directed mutagenesis[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, Chinese Academy of Sciences, 2014 (in Chinese)
- 沈艳. 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶催化性能的定点突变分子改造[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014
- [33] McElroy HE, Robertus JD. Site-directed alteration of Glu197 and Glu66 in a pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1989, 3(1): 43-48
- [34] Pei WL, Zhang JL, Deng SY, et al. Molecular engineering of L-aspartate- α -decarboxylase for improved activity and catalytic stability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6015-6021
- [35] Lacmata ST, Kuate JR, Ding YM, et al. Enhanced poly(3-hydroxypropionate) production via β -alanine pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173150
- [36] Pantaleone DP, Fotheringham IG, Ton JL. Process and composition for preparing D-aspartic acid: US, US73889096A[P]. 1998-11-10
- [37] Sharma R, Kothapalli R, van Dongen AMJ, et al. Chemoinformatic identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* L-aspartate α -decarboxylase[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33521
- [38] Fouad WM, Rathinasabapathi B. Expression of bacterial L-aspartate- α -decarboxylase in tobacco increases β -alanine and pantothenate levels and improves thermotolerance[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(4): 495-505
- [39] Fouad WM, Altpeter F. Transplastomic expression of bacterial L-aspartate- α -decarboxylase enhances photosynthesis and biomass production in response to high temperature stress[J]. Transgenic Research, 2009, 18(5): 707-718
- [40] Könst PM, Franssen MCR, Scott EL, et al. A study on the applicability of L-aspartate α -decarboxylase in the biobased production of nitrogen containing chemicals[J]. Green Chemistry, 2009, 11(10): 1646-1652
- [41] Shen Y, Zhao LZ, Li YR, et al. Synthesis of β -alanine from L-aspartate using L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(8): 1681-1686
- [42] Zhao LZ, Zhang L, Shi GY. Expression of L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* and its application in enzymatic synthesis of β -alanine[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2161-2170 (in Chinese)
- 赵连真, 张梁, 石贵阳. 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶在大肠杆菌中的表达及酶转化生产 β -丙氨酸[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2161-2170
- [43] Song CW, Lee J, Ko YS, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-aminopropionic acid[J]. Metabolic Engineering, 2015, 30: 121-129
- [44] Song CW, Kim JW, Cho JJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-hydroxypropionic acid and malonic acid through β -alanine route[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(11): 1256-1263
- [45] Borodina I, Kildegaard KR, Jensen NB, et al. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 57-64
- [46] Arnott ZLP, Nozaki S, Monteiro DCF, et al. The mechanism of regulation of pantothenate biosynthesis by the PanD-PanZ-AcCoA complex reveals an additional mode of action for the antimetabolite N-pentyl pantothenamide (N5-Pan)[J]. Biochemistry, 2017, 56(37): 4931-4939