

# 赖氨酸脱羧酶分子改造及固定化合成 1,5-戊二胺研究进展

刘思敏, 齐海山

天津大学 化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

刘思敏, 齐海山. 赖氨酸脱羧酶分子改造及固定化合成 1,5-戊二胺研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4403-4419.

LIU SM, QI HS. Molecular engineering and immobilization of lysine decarboxylase for synthesis of 1,5-diaminopentane: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4403-4419.

**摘 要:** 1,5-戊二胺又名尸胺, 是一种重要的生物基聚酰胺生产原料, 可以与二元羧酸缩合生成生物基聚酰胺 PA5X, 其性能可以与石油基聚酰胺材料媲美。生物基聚酰胺以可再生能源为底物, 如淀粉、纤维素、植物油等, 符合绿色可持续发展战略。1,5-戊二胺的生物合成主要包括微生物从头合成及全细胞催化两种方法, 而赖氨酸脱羧酶是其生物合成中的关键酶, 该酶主要包括诱导型赖氨酸脱羧酶 CadA 和组成型赖氨酸脱羧酶 LdcC 两种。赖氨酸脱羧酶是一种折叠型 I 型磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5' phosphate, PLP) 依赖酶, 但该酶在实际反应过程中易受环境因素影响, 存在活性不高、结构不稳定等问题。因此, 提高赖氨酸脱羧酶催化活性及稳定性成为该领域的研究热点, 主要包括分子改造以及固定化研究。文中综述了赖氨酸脱羧酶的作用机理、分子改造技术及固定化策略的研究进展, 并对未来进一步提升赖氨酸脱羧酶活性及稳定性策略进行了展望, 旨在实现 1,5-戊二胺的高效生物制备。

**关键词:** 赖氨酸脱羧酶; 1,5-戊二胺; 分子改造; 固定化; 磷酸吡哆醛

Received: May 19, 2022; Accepted: July 14, 2022; Published online: July 20, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902200)

Corresponding author: Qi Haishan. E-mail: hsqi@tju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0902200)

# Molecular engineering and immobilization of lysine decarboxylase for synthesis of 1,5-diaminopentane: a review

LIU Simin, QI Haishan

Key Laboratory of System Bioengineering of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract:** 1,5-diaminopentane, also known as cadaverine, is an important raw material for the production of biopolyamide. It can be polymerized with dicarboxylic acid to produce biopolyamide PA5X whose performances are comparable to that of the petroleum-based polyamide materials. Notably, biopolyamide uses renewable resources such as starch, cellulose and vegetable oil as substrate. The production process does not cause pollution to the environment, which is in line with the green and sustainable development strategy. The biosynthesis of 1,5-diaminopentane mainly includes two methods: the *de novo* microbial synthesis and the whole cell catalysis. Lysine decarboxylase as the key enzyme for 1,5-diaminopentane production, mainly includes an inducible lysine decarboxylase CadA and a constituent lysine decarboxylase LdcC. Lysine decarboxylase is a folded type I pyridoxal-5' phosphate (PLP) dependent enzyme, which displays low activity and unstable structure, and is susceptible to deactivation by environmental factors in practical applications. Therefore, improving the catalytic activity and stability of lysine decarboxylase has become a research focus in this field, and molecular engineering and immobilization are the mainly approaches. Here, the mechanism, molecular engineering and immobilization strategies of lysine decarboxylase were reviewed, and the further strategies for improving its activity and stability were also prospected, with the aim to achieve efficient production of 1,5-diaminopentane.

**Keywords:** lysine decarboxylase; 1,5-diaminopentane; molecular engineering; immobilization; pyridoxal-5' phosphate

1,5-戊二胺又名尸胺, 在农业<sup>[1]</sup>、食品<sup>[2]</sup>、医药<sup>[3]</sup>和工业领域均有广泛应用。尤其在工业领域, 可以和多种二元羧酸聚合制备性能优良的生物基聚酰胺 PA5X。如与丁二酸缩聚合成的 PA54, 耐油溶胀性、耐冲击性以及防渗透性能优异<sup>[4]</sup>; 与己二酸缩聚合成的 PA56, 吸潮透气性好、拉伸强度高<sup>[5]</sup>; 与癸二酸缩聚合成的 PA510, 其机械性能强、熔点高、密度低<sup>[6]</sup>。生物基聚酰胺 PA5X 可广泛应用于汽车零部件、包装材料、电子设备及航空技术等领域<sup>[7-8]</sup>。全

球每年消耗约 3000 万 t 的聚酰胺产品, 且呈持续上升趋势<sup>[9]</sup>。石油基聚酰胺材料面临石油资源的短缺以及生产过程中环境污染等问题。与传统石油基材料相比, 生产 1 t 的生物基材料可以节省 (55 000±34 000) J 的一次能源 (自然存在的、未经人类改造为另一种形式的能源), 减少 (3±1) t 的 CO<sub>2</sub> 当量温室气体排放<sup>[10]</sup>。因此, 1,5-戊二胺作为制备新型生物基聚酰胺材料的重要原料, 有望替代石化基己二胺, 在聚酰胺材料市场发挥重要作用。

1,5-戊二胺的生物合成法主要包括微生物从头合成及全细胞催化<sup>[11-12]</sup>。微生物从头合成是指宿主菌株利用葡萄糖、纤维二糖等碳源合成 1,5-戊二胺,常用的宿主包括大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌<sup>[7,13-15]</sup>。该方法可利用多种底物生产 1,5-戊二胺,除常见糖类外,还可以利用甘油、甲醇、甲烷等物质。Kim 等<sup>[13]</sup>通过用强启动子 H30 调控来自蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) 的赖氨酸脱羧酶 *ldcC* 基因,并将其整合至谷氨酸棒状杆菌 *lysE* 位点构建了重组菌株 GH30HaLDC,以葡萄糖为底物生产 1,5-戊二胺,产量可达 125 g/L,是目前微生物从头合成的最高产量。全细胞催化是指以 L-赖氨酸溶液为底物,利用表达赖氨酸脱羧酶的工程细胞催化生成 1,5-戊二胺<sup>[16]</sup>。Ma 等<sup>[17]</sup>在大肠杆菌中共表达赖氨酸脱羧酶 (lysine decarboxylase, CadA) 和尸胺-赖氨酸转运蛋白 (cadaverine-lysine antiporter protein, CadB),构建了全细胞催化体系,16 h 后 1,5-戊二胺产量可达 221 g/L,摩尔产率达到 92%。全细胞催化整个催化过程简单,副产物少,且底物 L-赖氨酸已经成功实现了商业化,是一种生产 1,5-戊二胺的理想原料。无论是全细胞催化还是微生物从头合成,赖氨酸脱羧酶均是生产 1,5-戊二胺过程中的关键酶。

文献报道了多种植物和微生物来源的赖氨酸脱羧酶,例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[1]</sup>、尸毒杆菌 (*Bacterium cadaveris*)<sup>[18]</sup>、蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*)<sup>[19]</sup>、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)<sup>[20]</sup>、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[21]</sup>等。目前,NCBI 数据库里收录的大都是来自微生物的赖氨酸脱羧酶序列。我们在 NCBI 数据库中选择收录数量最多的 19 种不同物种 (肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、副

溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)、宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*)、类肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella quasipneumoniae*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、类鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、肺炎双球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 来源的赖氨酸脱羧酶的氨基酸序列进行系统进化树构建。如图 1 所示,这 19 种赖氨酸脱羧酶分为 5 簇,其中属于肠杆菌目来源的 7 种和属于弧菌目来源的 2 种在同一簇,芽孢杆菌目 *Listeria monocytogenes* 和假单胞菌目 *Pseudomonas aeruginosa* 各成一簇,伯克氏菌目菌种来源的 2 种赖氨酸脱羧酶自成一簇,其余 6 种成一簇。该系统进化树不仅可以反映已有的赖氨酸脱羧酶的进化和同源关系,还可以确定新发现的酶与已有的酶的进化和同源关系<sup>[22]</sup>。

其中,大肠杆菌来源的赖氨酸脱羧酶研究最为广泛,赖氨酸脱羧酶有两种,一种是组成型赖氨酸脱羧酶 LdcC,可以在不加任何诱导剂的条件下表达;另一种是诱导型赖氨酸脱羧酶 CadA<sup>[23-24]</sup>。赖氨酸脱羧酶在催化 L-赖氨酸生产 1,5-戊二胺的过程中,需要添加辅酶磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5' phosphate, PLP),每一个脱羧反应周期中都会消耗 H<sup>+</sup>,使反应体系的 pH 随反应进行而逐渐增高,导致赖氨酸脱羧酶的多聚体结构被破坏<sup>[25]</sup>。因此,提高赖氨酸脱羧酶的活性,加强该酶结构稳定性和 pH 耐受性对于开发

高效的 1,5-戊二胺生产工艺至关重要,下文将介绍赖氨酸脱羧酶的作用机理、赖氨酸脱羧酶的分子改造方法、固定化策略及未来展望,旨在提升 1,5-戊二胺生产效率并降低生产成本。

## 1 赖氨酸脱羧酶的结构及性能

赖氨酸脱羧酶通常是一种由 5 个二聚体组成的十聚体结构 (图 2), 每个单体的核心结构

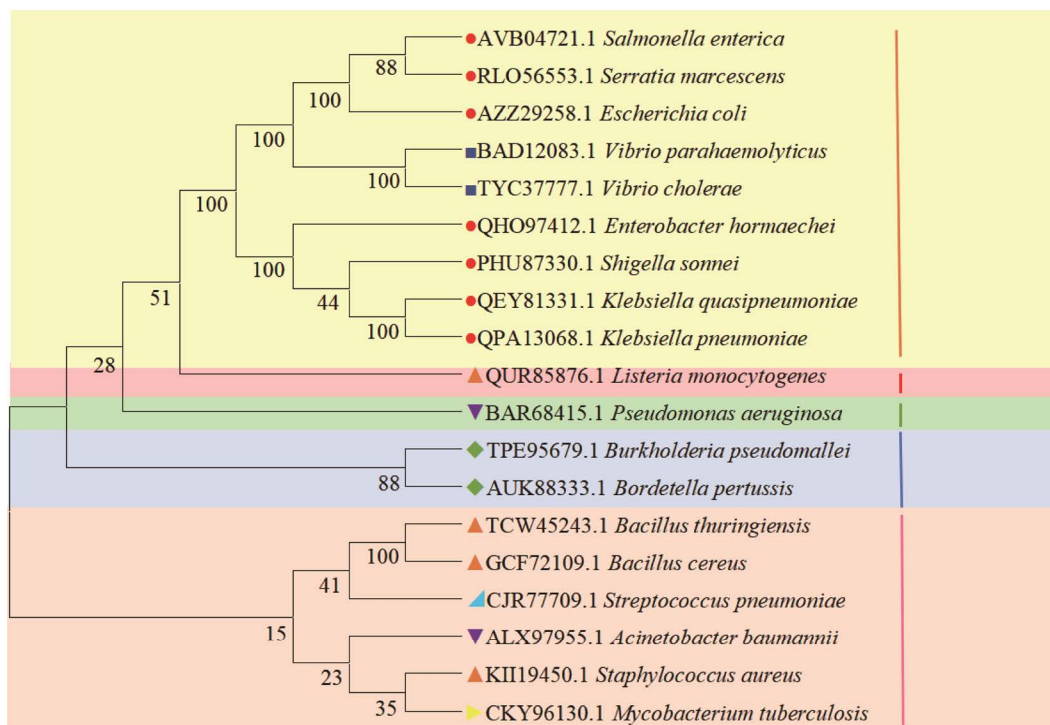


图 1 不同赖氨酸脱羧酶菌株系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of different lysine decarboxylases.

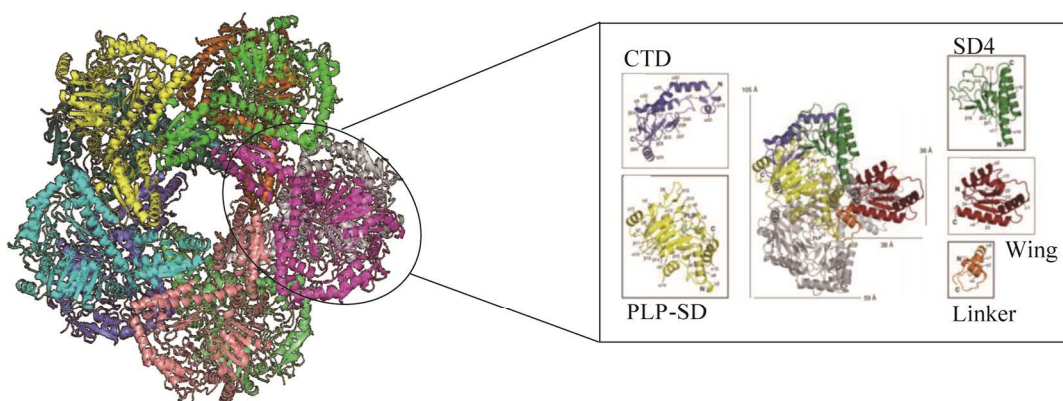


图 2 大肠杆菌中赖氨酸脱羧酶 (PDB 号: 3N75) 的十聚体及二聚体结构<sup>[24]</sup>

Figure 2 Decamer and dimer structure of lysine decarboxylase (PDB No. 3N75) in *E. coli*<sup>[24]</sup>.

域紧密相连形成二聚体，其单体分为 3 个结构域，分别是 N 端翼结构域（残基 1–129）、核心结构域（残基 130–563）和 C 端结构域（残基 564–715），其中核心结构域由连接区域和两个子结构域（PLP 结合结构域和子结构域 4）组成<sup>[24]</sup>。体系 pH 的变化会影响赖氨酸脱羧酶的催化活性，主要原因是赖氨酸脱羧酶的多聚体构象会随着 pH 的变化而改变，在较低的 pH 条件下，酶通常是以低聚物的形式存在，在较高的 pH 条件下，酶会形成十聚体和二聚体，且二聚体占比会随着 pH 的增加而增加。而赖氨酸脱羧酶的最佳构象是十聚体，因此，赖氨酸脱羧酶的催化能力往往随着 pH 增加先变强再变弱<sup>[26]</sup>。

Marc 等<sup>[23]</sup>对 LdcC 酶的催化参数进行了测定,发现该酶 pH 活性广泛,最适 pH 为 7.6,高于 CadA 的 5.5;最适温度是 52 °C,与 CadA 相同。尽管 LdcC 的最适 pH 比 CadA 高,但 CadA

的比酶活通常高于 LdcC, 且 CadA 具有更优越的热稳定性, 在 70 °C 的条件下活性尚能保持, 而 LdcC 从 37 °C 开始, 活性便会随着温度的增加而下降。在表 1 中总结了目前已经报道的赖氨酸脱羧酶的最适温度和最适 pH, 不同来源的赖氨酸脱羧酶最适条件有很大不同。

大肠杆菌中诱导型赖氨酸脱羧酶 CadA 发现更早且研究更深入, CadA 作为 Cad 系统中的一员, 在低 pH 和过量赖氨酸的条件下诱导表达以减轻酸胁迫<sup>[38]</sup>。大肠杆菌的 Cad 系统包括编码 CadA 和 CadB 的 CadBA 操纵子, 以及膜整合转录激活因子 CadC<sup>[39-41]</sup>。LysP 是一种赖氨酸特异性渗透酶, 可以感知外源赖氨酸的变化, 与 CadC 共同诱导大肠杆菌对赖氨酸的适应<sup>[40,42]</sup>。如图 3 所示, 当富赖氨酸环境 (>5 mmol/L) 是酸性条件 (pH<6.8) 时, CadC 和 LysP 之间的相互作用减弱, 此外, L-赖氨酸的结合/易位使 LysP 的构象进一步改变, 从而导致 CadC 和 LysP 的

表 1 不同来源赖氨酸脱羧酶的性能总结

Table 1 Performance summary of lysine decarboxylase from different sources

Lysine decarboxylases	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Origin	References
LdcC	37	6.5	<i>Hafnia alvei</i>	[19]
LdcC	52	7.6	<i>Escherichia coli</i>	[23]
LdcC	37	7.0	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[27]
Ldc	50	6.0	<i>Selenomonas ruminantium</i>	[28-29]
Ldc	55	5.5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	[30]
PaLdc	60	6.5	<i>Photobacterium angustum</i>	[31]
AsLdc	50	7.5	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	[31]
EtLdc	60	7.0	<i>Edwardsiella tarda</i>	[31]
GoLDC	30	9.0	<i>Gluconobacter oxydans</i>	[32]
PpLDC	30	9.0	<i>Bacillus licheniformis</i>	[32]
BILDC	60	7.0	<i>Pseudomonas putida</i>	[32]
CadA	52	5.5	<i>Escherichia coli</i>	[23]
CadA	37	7.0	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[27]
CadA	37	6.0	<i>Vibrio vulnificus</i>	[33]
CadA	40–50	5.5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[34]
SmcadA	40	6.0	<i>Serratia marcescens</i>	[35]
Unnamed	ND	7.0	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	[36]
Unnamed	37	7.5	Soybean	[37]

<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>



### 3 赖氨酸脱羧酶的分子改造策略

为了进一步提升 1,5-戊二胺的生产效率,

研究人员对赖氨酸脱羧酶进行了分子改造来提高酶的稳定性, 主要包括定向进化策略、定点突变策略以及“EKylation”策略 (图 5)。

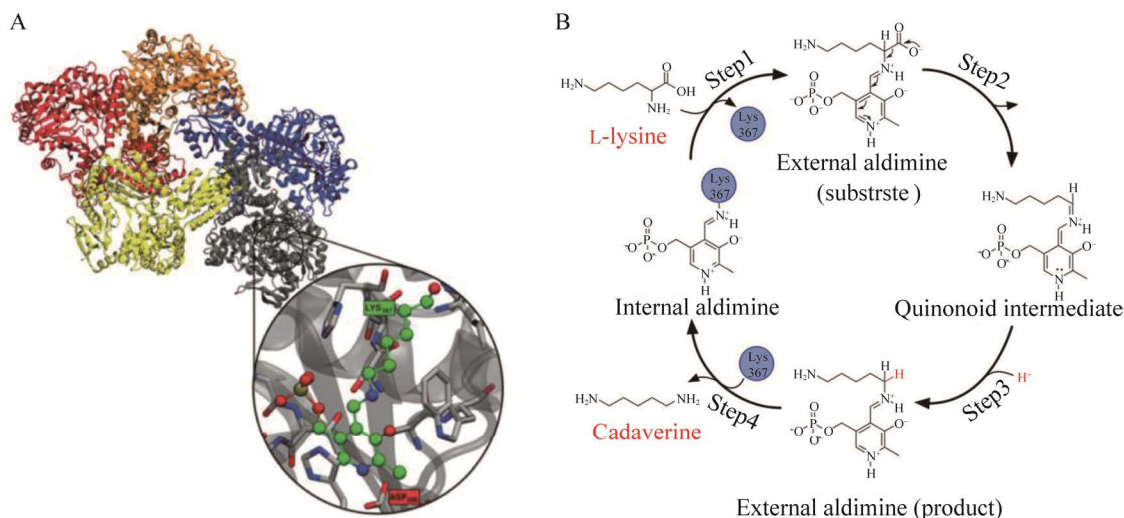


图 4 大肠杆菌中赖氨酸脱羧酶 (PDB 号: 3N75) 的 3D 结构及催化机制<sup>[26]</sup> A: 3D 结构, 底部是其活性位点, 绿色是内部醛亚胺的位置; B: 赖氨酸脱羧酶在 PLP 辅助下生产 1,5-戊二胺的机制

Figure 4 The 3D structure and mechanism of lysine decarboxylase (PDB No. 3N75) in *E. coli*<sup>[26]</sup>. (A) The 3D structure, with the active site at the bottom and the internal aldimine in green. (B) The mechanism of lysine decarboxylase production of 1,5-pentanediamine assisted by PLP.

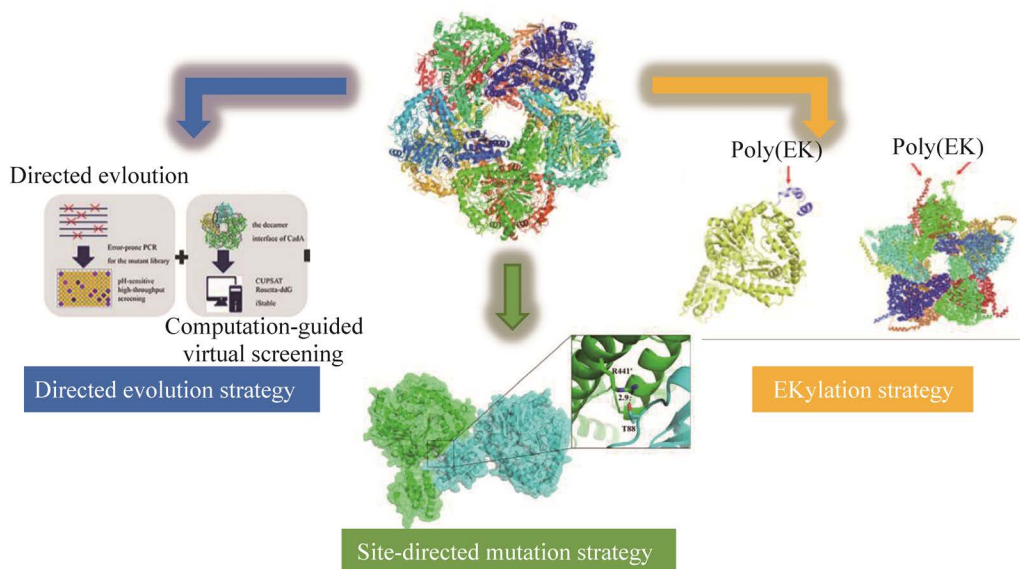


图 5 赖氨酸脱羧酶分子改造策略进展<sup>[47-49]</sup>

Figure 5 Advances in molecular engineering strategies of lysine decarboxylase<sup>[47-49]</sup>.

### 3.1 定向进化策略

定向进化是提高目标蛋白功能的一种方法,可以通过快速进化成功生成一个大的突变体库,然后通过高通量筛选或选择方法来获得所需的突变体,一个改进的突变体被用作后续循环的模板,直到满足所需的生物催化剂改进程度<sup>[19,50-56]</sup>。Wang 等<sup>[19]</sup>利用易错 PCR 和 DNA 改组技术构建了大肠杆菌 JM109/pTrc99a-ldcLDC 突变体,并且建立了一种基于 pH 指标的敏感高通量筛选策略,溴甲酚紫作为 LBBL 板中的颜色指示剂,可以准确、快速地筛选阳性转化子。通过高通量筛选获得了改良的突变体,其中 LDC<sup>V147F/E583G</sup> 突变体的催化活性最高,是野生型 LDC 活性的 1.62 倍,分析发现 E583G 位点发挥关键作用。且与野生型 LDC 比对, LDC<sup>E583G</sup> 的  $V_{\max}$  是野生型 LDC 的 1.32 倍, LDC<sup>E583G</sup> 突变体的 1,5-戊二胺产量比野生型 LDC 提高了 1.48 倍。这一结果可能是因为 E538 位于 LDC 的 C 端结构域 (C-terminal domain, CTD), 而 CTD 是进入酶活性位点通道的一部分<sup>[57]</sup>, 所以 E583G 这一突变有

效提升了酶活性。另外,随着计算机技术的快速发展, Xi 等<sup>[47]</sup>将定向进化和计算引导的虚拟筛选结合起来提高赖氨酸脱羧酶 CadA 的稳定性,开发了一种高通量筛选方法 (以 0.1% 麝香草酚蓝和 0.1% 酚酞 (3 : 1,  $V/V$ ) 组成的混合指示剂) 来区分在 50 °C 和 pH 8.0 条件下的赖氨酸脱羧酶活性,并基于这种高通量筛选方法,对 CadA 进行了定向进化。分别使用 CUPSAT、iStable 和 Rosetta-ddG 对不同位点进行了虚拟饱和诱变,筛选出突变体 E445Q, 在 50 °C 和 pH 8.0 的条件下, 1,5-戊二胺的产量提高了 13%。筛选出的四点突变体 K477R/E445Q/F102V/T88S 显示出优越的性能, 于 70 °C 孵育 70 min 后残留活性为 49.14% (野生型为 5.81%), 在 50 °C 条件下催化 2.0 mol/L L-赖氨酸溶液生成 160.7 g/L (野生型为 143.7 g/L) 1,5-戊二胺。通过分析野生型和 K477R 十聚体界面上 K543 和 E104' 之间的盐桥及距离 (图 6A), 表明盐桥相互作用可以阻止 CadA 十聚体的解离; 对比 477 位点突变前后表面电荷分布 (图 6B 和 6C), 发现突变体 K477R

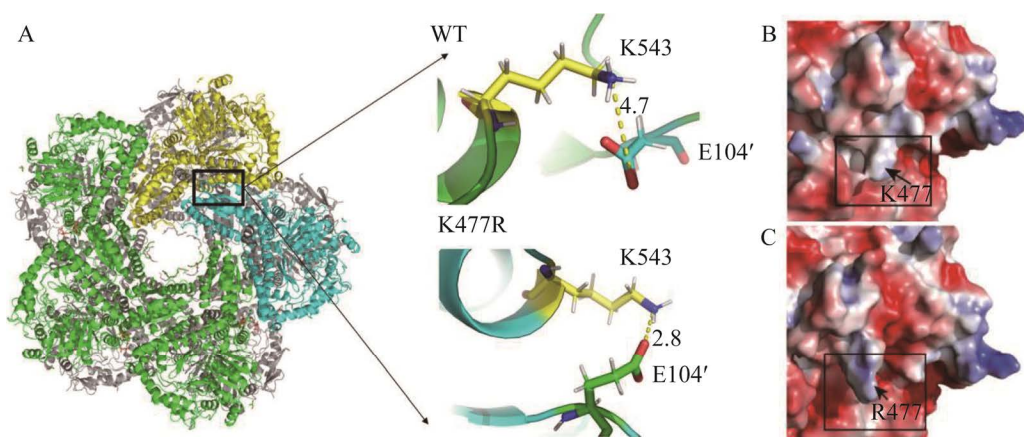


图 6 野生型 CadA (PDB: 3N75) 和突变体 K477R<sup>[47]</sup> A: 十聚体界面上 K543 和 E104' 之间的盐桥及距离 477 位点周围静电表面的比较; B: 野生型; C: K477R 突变体。蓝色表示正电荷, 红色表示负电荷

Figure 6 The wild type CadA (PDB: 3N75) and K477R mutant<sup>[47]</sup>. (A) Salt bridge and distance between K543 and E104' at the decamer interface. Comparison of the electrostatic surface around residue 477. (B) The wild-type CadA. (C) The K477R mutant. Blue means positive charge, while red means negative charge.



周围有更多的正电荷,而这些正电荷可以中和蛋白质表面的负电荷,减少蛋白质表面不利的静电相互作用,有助于提高稳定性。定向进化策略的优势就在于能提升酶的大部分性能,包括酶的催化活性、稳定性以及底物谱等,但需要开发配套的高通量筛选方法。

### 3.2 定点突变策略

定点突变是指通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 等方法向目的 DNA 片段中引入所需变化,包括碱基的添加、删除、点突变等,是一种提高酶的稳定性的常用方法。通常有两种方法可以产生突变结构:引物延伸<sup>[58]</sup>和 DNA 替换<sup>[59]</sup>。为了提高赖氨酸脱羧酶的结构稳定性, Kim<sup>[60]</sup>课题组通过定点突变在赖氨酸脱羧酶多聚体的界面处引入 4 对二硫键,如图 7 所示,分别是 A1(V91C/G445C)、A2(F102C/T544C)、B1(F14C/K44C) 和 C1(P233C/L628C),在不同的 pH 条件下,对这 4 株以及野生株的活性进行了检测。B1 突变体对高 pH 的条件更加耐受,当在 pH 9.0 条件下孵育后,野生型 CadA 只剩下 9% 的活性,而

B1 突变体保留了 84%,在 pH 为 10.0 的条件下,该突变体依旧保持了其 76% 的原始活性。突变体 B1 的半衰期增加 216 倍,这一结果表明,通过二硫键共价连接的十聚体复合体结构不仅显著提高了 B1 突变体的碱性 pH 稳定性,而且还显著提高了 B1 突变体的热稳定性。在 B1 的基础上进行另一轮突变体筛选,得到突变体 B1/L7M/N8G,该突变体的 1,5-戊二胺产量达到了 157 g/L,而野生型的产量只有 119 g/L。这说明对赖氨酸脱羧酶的十聚体界面进行二硫键突变是一种有效地提高酶稳定性及 1,5-戊二胺产量的策略。Kou 等<sup>[48]</sup>通过对赖氨酸脱羧酶的多聚界面进行工程化设计,选择最佳的突变体 T88S 并对其性能进行了测试,与野生型 CadA 相比, T88S 具有更高的热稳定性,在 70 °C 条件下的半衰期增加了 2.9 倍,熔化温度从 76 °C 增加至 78 °C。在 pH 为 8.0 的条件下培养 10 h 后,野生型和突变体残留的活性分别是 57% 和 78%。结果表明通过界面工程加强十聚体结构可以增强赖氨酸脱羧酶在碱性 pH 条件下的活性及稳定性。T88S 的 1,5-戊二胺产率为 40 g/(L·h),

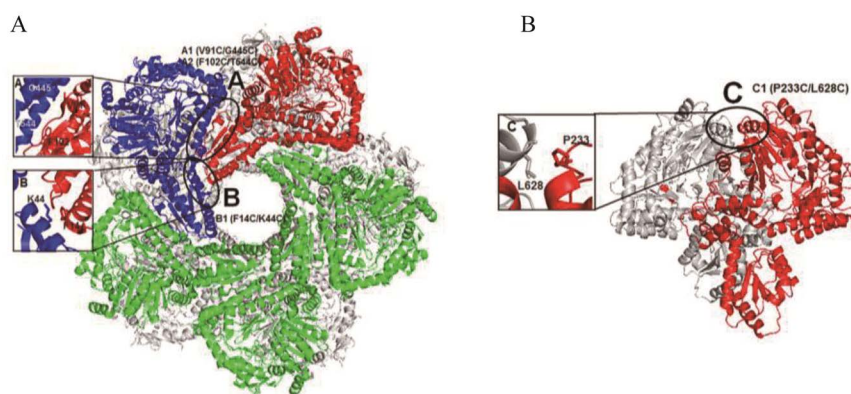


图 7 野生型 CadA (PDB: 3N75) 的界面区域<sup>[60]</sup>

A: 二聚体结合形成十聚体的两个界面,分别记为 A 和 B,分别预测了 2 对和 1 对二硫键; B: 组成二聚体的两个单体之间的界面 C,预测了 1 对二硫键

Figure 7 Interfacial region of wild-type CadA (PDB: 3N75)<sup>[60]</sup>. (A) The two interfaces at which the dimer binds to form the decamer, denoted A and B, predicted two and one pair of disulfide bonds, respectively. (B) Interface C between the two monomers forming the dimer, predicted one pair of disulfide bonds.

高于野生型的 28 g/(L·h)。进一步证明赖氨酸脱羧酶的多聚体界面残基在结构稳定性及其催化功能中发挥重要作用。定点突变策略具有突变率高、重复性好的优点,但需要建立在蛋白质三维结构已知的条件下,通过分析其分子结构与功能之间的关系确定可以突变的氨基酸位点。

### 3.3 “EKylation”修饰策略

化学修饰策略的目的是通过对蛋白质结构进行化学反应来得到新的生物耦联物,同时还可以保持蛋白质的完整性和功能,是一种有效的改造蛋白方式,通常包括酰基化、甲基化、泛素化、糖基化和硫酸化等<sup>[61-62]</sup>。而由阳离子和阴离子基团组成的两性离子聚合物可以为蛋白质提供一个稳定的环境,含有重复交替带电的谷氨酸 (Glu, E) 和赖氨酸 (Lys, K) 残基的聚 (EK) 多肽可以用来修饰蛋白质,将这一策略称为“EKylation”<sup>[63-65]</sup>。Du 等<sup>[49]</sup>在赖氨酸脱羧酶的 C 端融合一段聚 (EK) 多肽获得了工程化赖氨酸脱羧酶 CadA-EK (图 8A)。在不同 pH 及温度下, CadA-EK 的酶活均远远大于野生型 CadA。CadA-EK 的耐碱性增强,在 pH 为 8 的

条件下孵育 30 min 后, CadA 全部失活,而 CadA-EK 的残留活性无下降。在有机溶剂和蛋白变性剂中孵育 30 min 后, CadA-EK 的残留活性是 CadA 的 2–7 倍。4 °C 储存 21 d 后, CadA-EK 可以保留最初酶活力的 50%, 而 CadA 全部失活。通过对这两种酶的动力学参数测试,发现 CadA-EK 的催化效率是 CadA 的 2 倍。该研究提出了“拥握手”模型对 CadA-EK 催化活性和稳定性提升机理进行解释。如图 8B 所示,将二聚体的两条链分别命名为“A 链”和“H 链”,经过分子动力学模拟分析, H 链 poly(EK) 多肽中的 Glu 残基与 A 链的 Lys290A、Lys287A、Arg288A 之间存在氢键作用,将其定义为“拥抱”模型。H 链的 poly(EK) 多肽中的 Glu 残基与 A 链 poly(EK) 肽的 Lys 残基之间存在氢键作用,定义为“握手”模型,同样, H 链 poly(EK) 多肽的 Lys 残基与 A 链的 Asn294A、Glu291A 相互作用 (拥抱模型), 并与 A 链 poly(EK) 的 Glu 残基相互作用 (握手模型)。在“拥抱-握手”作用机制下,由于两条链的紧密结合导致两个二聚体单体之间的结合变得更紧密,有助于稳

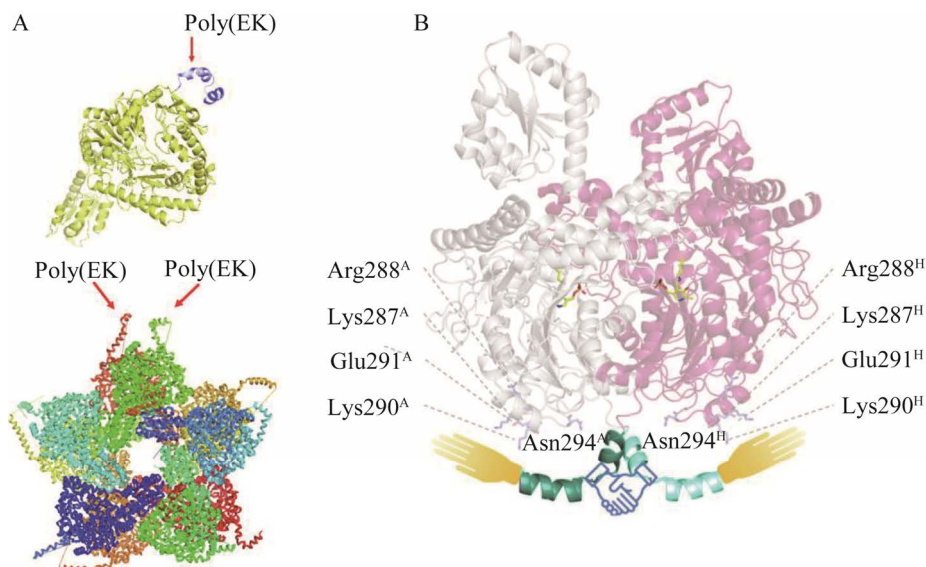


图 8 CadA-EK 的结构模型<sup>[49]</sup> A: 单体和十聚体; B: “拥抱-握手”模型

Figure 8 Structural model of CADA-EK<sup>[49]</sup>. (A) Monomer and dimers. (B) The “hug-shake” model.

定催化反应过程中的过渡态，从而提升催化常数。同时，由于 poly(EK) 多肽的超亲水性，可以将水从酶分子的疏水区域“抽”出，不仅可以改变活性中心的微环境，也可以提高酶的结构刚性，使其稳定性提升。“EKylation”修饰功能蛋白操作简单，目前已经实现对  $\beta$ -内酰胺酶、聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶、赖氨酸脱羧酶的修饰改造。“EKylation”修饰有望成为一种通用的蛋白改造策略，用于提升酶分子的催化功能。

4 赖氨酸脱羧酶的固定化策略

随着工业酶市场的扩大以及固定化酶更稳定、易分离、可重复的优点，研究人员致力于开发不溶性固定化酶，并广泛应用于制药、食品、纺织业等各个领域<sup>[66-69]</sup>。已有多种材料用于酶分子的固定，包括海藻酸盐、壳聚糖、纤维素、琼脂糖、碳纳米管、介孔二氧化硅、氧化石墨烯、陶瓷、金属有机框架 MOF 材料等<sup>[70-71]</sup>。表 2 总结了固定化赖氨酸脱羧酶的研究。由于赖氨酸脱羧酶依赖于 PLP 发挥活性，一些 PLP 与酶共固定的方法也吸引了研究人员的兴趣。下面将介绍赖氨酸脱羧酶的酶固定及与辅酶 PLP 的共固定研究进展。

4.1 赖氨酸脱羧酶固定策略

目前，赖氨酸脱羧酶的固定包括胞内固定及胞外固定。胞内固定又称为原位固定，如图 9A 所示，Seo 等<sup>[72]</sup>建立了一种胞内固定化体系，通过将 P(3HB) 颗粒相关蛋白 (PhaP1) 的碱基序列添加在 *cadA* 基因的 3'末端实现了 PhaP1 与 CadA 融合，该融合体可以与细胞内的 P(3HB) 结合。固定化 CadA-P(3HB) 复合物具有更好的热稳定性，在 50 ℃下的半衰期为 70 h，在 5 个循环反应中获得了 75%–80%的转化率。结果表明原位固定化的 CadA 是一种稳定的、可重复使用的赖氨酸脱羧酶，这种固定化策略的优势在于不需要额外的酶纯化及固定化过程，但是相关质粒的加入也造成一定程度的细胞负担。选择合适的载体来对酶分子进行固定是最常用的酶固定化策略，如图 9B 所示，Yao 等<sup>[73]</sup>首次提出将赖氨酸脱羧酶 (LdcEt) 固定在锆基金属有机骨架材料 UIO-66-NH<sub>2</sub> 的表面这一策略。且 LdcEt@UIO-66-NH<sub>2</sub> 比游离 LdcEt 具有更高的催化效率和酶活性、更宽的 pH 和温度反应范围。与游离酶相比，LdcEt@UIO-66-NH<sub>2</sub> 在高水平底物浓度 (365.3 g/L) 条件下，2 h 内催化

表 2 赖氨酸脱羧酶的固定化方法总结

Table 2 Summary of lysine decarboxylase immobilization methods

Enzymes	Immobilization carriers	Co-immobilization with PLP	Cycles (times—conversion)	1,5-diaminopentane (g/L)	References
CadA	3-hydroxybutyric acid and related proteins	No	5 times—75%	ND	[72]
LDCEt	MOF(UIO-66-NH <sub>2</sub> )	No	5 times—58%	182.59	[73]
CadA	Chitin-chitin binding domain	No	4 times—57%	135.60	[74]
CadA	Barium alginate	No	4 times—40%	36.78	[75]
CadA <sup>CLEA</sup>	None	No	10 times—53%	10.22	[76]
LDC	Chitin-chitin binding domain	Yes	5 times—55%	ND	[77]
CadA-KE	Barium alginate	Yes	5 times—30%	184.53	[78]

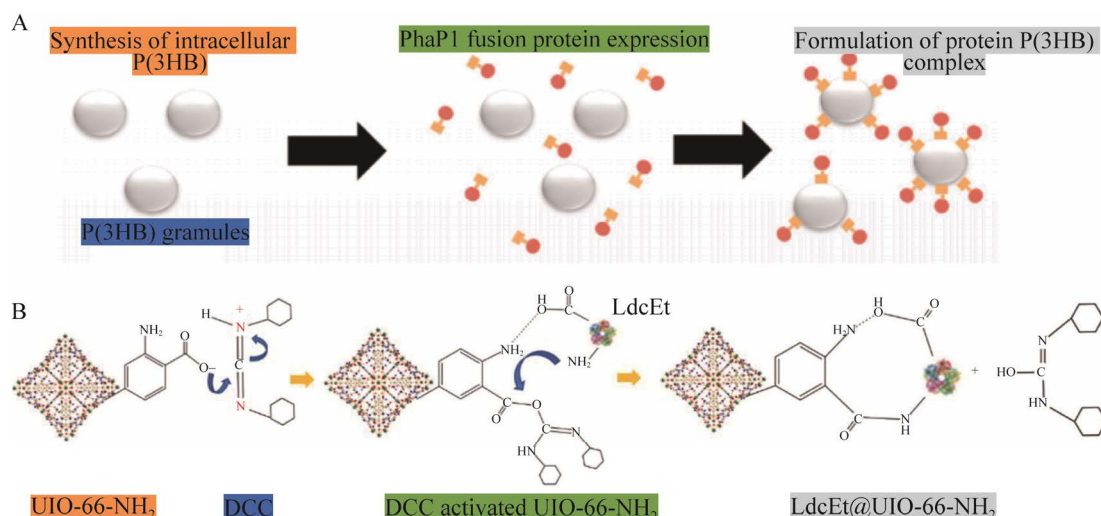


图 9 酶固定化的机制<sup>[72-73]</sup> A: PhaP1 融合蛋白固定在细胞内 P(3HB) 颗粒上; B: 赖氨酸脱羧酶 (LdcEt) 固定在锆基金属有机框架材料(MOF)UIO-66-NH<sub>2</sub> 上

Figure 9 Mechanism of enzyme immobilization<sup>[72-73]</sup>. (A) Immobilization of PhaP1 fusion protein on intracellular P(3HB) granules. (B) Immobilization of lysine decarboxylase (LdcEt) on the surface of the zirconium-based metal-organic framework material (MOF) UIO-66-NH<sub>2</sub>.

产生的 1,5-戊二胺滴度达到 182.59 g/L, 高于游离酶的产量 (161.34 g/L)。酶固定策略可选择载体较多, 且载体多是不溶性材料, 更容易实现固定化酶的分离及储藏。这些研究均表明, 固定化赖氨酸脱羧酶是一种提高其稳定性和循环催化能力的有效策略。

#### 4.2 赖氨酸脱羧酶与辅酶 PLP 共固定策略

赖氨酸脱羧酶是一种 PLP 依赖性的酶, 在催化生产 1,5-戊二胺的过程中往往需要外源添加 PLP, 实现辅酶 PLP 和酶分子的共固定将会使辅酶实现循环使用, 这将节省催化过程的成本<sup>[75]</sup>。一种用几丁质有效共固定赖氨酸脱羧酶 (lysine decarboxylase, LDC) 和 PLP 的方法被提出<sup>[77]</sup>, 通过调节几丁质的去乙酰化程度来增强 PLP 的吸附和固定化, 通过融合的几丁质结构域来固定 LDC, 这是利用几丁质实现赖氨酸脱羧酶和 PLP 共固定的首次报道。自给自足的生物催化剂在 5 个循环后保持了超过 55% 的原始

活性, 该策略为实现 PLP 依赖的酶的共固定化提供了一种新的途径 (图 10A)。Mi 等<sup>[78]</sup>在通过“EKylation”获得 CadA-KE 的基础上, 利用海藻酸钡微球一步纯化并固定 CadA-KE, 并通过聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 的引入实现辅酶 PLP 和酶的共固定 (图 10B), 此方法得到的共固定化酶在 2 mol/L L-赖氨酸溶液中可以产生 184.53 g/L 1,5-戊二胺。55 °C 孵育 30 min 后, 共固定化酶的转化率约为外源添加 PLP 的 5 倍, 65 °C 孵育 30 min 后, 共固定化酶仍旧保持高活性 (约 80%), 而未共固定的酶已经完全失活。共固定化酶在储存 30 d 后, 转化率几乎没有下降, 而未共固定的酶的转化率下降至 38.26%。此外, 共固定化酶的催化效率提升了 3.4 倍, 并且实现了连续催化 L-赖氨酸生产 1,5-戊二胺, 产率为 14.28 g/(L·h)。这些结果表明实现赖氨酸脱羧酶与辅酶 PLP 的共固定是一种有效的策略, 可以节省操作时间和成本。



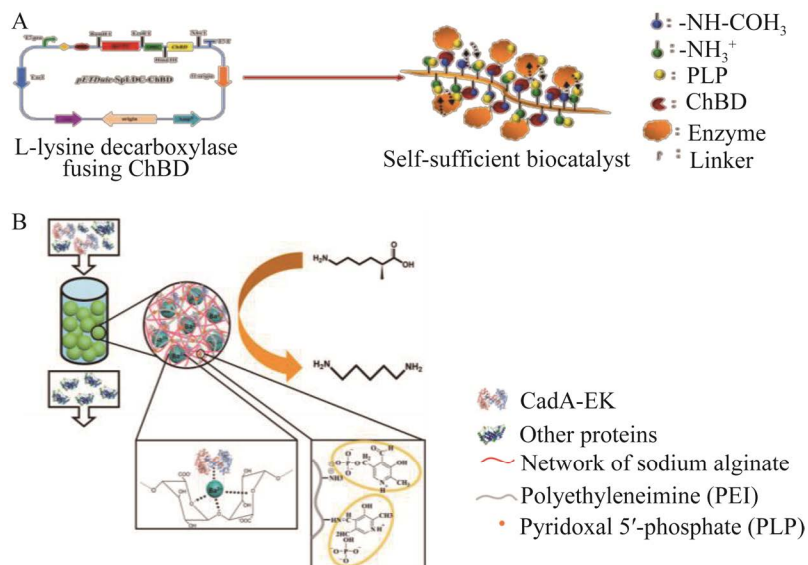


图 10 酶与 PLP 共固定<sup>[77-78]</sup> A: 几丁质共固定化 PLP 依赖的赖氨酸脱羧酶和 PLP; B: 海藻酸钡共固定 CadA-EK 及 PLP

Figure 10 Co-immobilization of enzyme and PLP<sup>[77-78]</sup>. (A) Chitin co-immobilized PLP-dependent lysine decarboxylase and PLP. (B) CadA-EK and PLP were co-immobilized by barium alginate.

## 5 总结与展望

聚酰胺材料广泛应用于我们的日常生活中, 常见的石油基聚酰胺材料往往面临着石油资源不可再生, 生产过程中的副产物造成环境污染等问题, 而合成生物学技术的发展使得利用清洁可再生的能源生产聚酰胺材料成为可能。1,5-戊二胺是生产生物基聚酰胺的重要单体, 有望替代石油基己二胺在聚酰胺市场发挥重要作用。赖氨酸脱羧酶作为生物合成 1,5-戊二胺的关键酶, 其结构稳定性较差, 容易受到反应环境 (尤其是 pH) 的影响。提升赖氨酸脱羧酶的催化能力及稳定性是提升 1,5-戊二胺产量的重要方法, 目前常用的改造方法是分子改造以及进行固定化, 鉴于目前研究进展, 未来可以在下述方面加强研究。

(1) 不同物种来源赖氨酸脱羧酶性能研究。赖氨酸脱羧酶来源十分广泛, 仍有多种不同来

源的酶学特性未进行深入研究。因此, 通过对不同物种来源的赖氨酸脱羧酶性能研究可以更加了解其构效关系, 挖掘催化性能更好的酶, 进一步提升 1,5-戊二胺的生物生产效率。比如利用多肽识别模式挖掘出爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 来源的赖氨酸脱羧酶 LdcEt, 稳定性好, 催化活性高, 具有一定的工业化应用潜力<sup>[79]</sup>。

(2) 基于人工智能技术的高效赖氨酸脱羧酶理性设计研究。近年来, 该技术已经在酶定向进化中发挥了重要作用, 可以对蛋白质结构以及功能进行预测。该技术依赖于蛋白质数据库, 对所需数据的准确性及数量要求较高。对酶结构的准确预测, 能大大简化设计新型高效赖氨酸脱羧酶的进程, 有望获得催化活性和稳定性更好的赖氨酸脱羧酶。

(3) 自组装蛋白纳米结构的深入研究。该结构利用可以自组装的蛋白 (例如酿酒酵母蛋白



Sup35) 作为酶固定化载体。与普通的固定化载体相比, 这种自组装可以实现对载体表面酶固定位点的精确操控, 还可以通过对载体蛋白质的修饰实现对固定酶的催化界面调控, 有利于提高固定化酶在不同环境中的稳定性和活性。利用自组装蛋白质为载体对赖氨酸脱羧酶进行固定的效果值得期待。

## REFERENCES

- [1] Gibbs NM, Su SH, Lopez-Nieves S, et al. Cadaverine regulates biotin synthesis to modulate primary root growth in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2021, 107(5): 1283-1298.
- [2] Costa CAB, Grazhdan D, Fiutowski J, et al. Meat and fish freshness evaluation by functionalized cantilever-based biosensors. *Microsyst Technol*, 2020, 26(3): 867-871.
- [3] Jancewicz AL, Gibbs NM, Masson PH. Cadaverine's functional role in plant development and environmental response. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 870.
- [4] Lee PC, Lee SY, Hong SH, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(5): 663-668.
- [5] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(1): 399-400.
- [6] Ogunniyi DS. *Castor oil*: a vital industrial raw material. *Bioresour Technol*, 2006, 97(9): 1086-1091.
- [7] Kim HT, Baritugo KA, Oh YH, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the high-level production of cadaverine that can be used for the synthesis of biopolyamide 510. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2018, 6(4): 5296-5305.
- [8] Yang PP, Li XJ, Liu HD, Li ZH, Liu J, Zhuang W, Wu JL, Ying HJ. Thermodynamics, crystal structure, and characterization of bio-based nylon 54 monomer. *CrystEngComm*, 2019, 21(46): 7069-7077.
- [9] 邓洁, 高震, 高华, 等. 生物酶法合成 1, 5-戊二胺的研究进展. *广西科学*, 2017, 24(1): 40-47, 53.  
Deng J, Gao Z, Gao H, et al. Research progress of the biosynthesis of 1,5-diaminopentane. *Guangxi Sci*, 2017, 24(1): 40-47, 53 (in Chinese).
- [10] Weiss M, Haufe J, Carus M, et al. A review of the environmental impacts of biobased materials. *J Ind Ecol*, 2012, 16: S169-S181.
- [11] Shin J, Joo JC, Lee E, et al. Characterization of a whole-cell biotransformation using a constitutive lysine decarboxylase from *Escherichia coli* for the high-level production of cadaverine from industrial grade L-lysine. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 185(4): 909-924.
- [12] Mi JL, Liu SM, Qi HS, et al. Cellular engineering and biocatalysis strategies toward sustainable cadaverine production: state of the art and perspectives. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2021, 9(3): 1061-1072.
- [13] Kim HT, Baritugo KA, Hyun S, et al. Development of metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for enhanced production of cadaverine and its use for the synthesis of bio-polyamide 510. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(1): 129-138.
- [14] Kwak DH, Lim HG, Yang JN, et al. Synthetic redesign of *Escherichia coli* for cadaverine production from galactose. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 20.
- [15] Qian ZG, Xia XX, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(4): 651-662.
- [16] Rui JQ, You SP, Zheng YX, et al. High-efficiency and low-cost production of cadaverine from a permeabilized-cell bioconversion by a Lysine-induced engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2020, 302: 122844.
- [17] Ma WC, Cao WJ, Zhang H, et al. Enhanced cadaverine production from L-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(4): 799-806.
- [18] Rajewsky B, Bückner H, Pauly H. The UV-action spectrum of the lysine decarboxylase induction in *Bacterium cadaveris*. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82(1): 229-232.
- [19] Chen W, Kai Z, Chen ZJ, et al. Directed evolution and mutagenesis of lysine decarboxylase from *Hafnia alvei* AS1.1009 to improve its activity toward efficient cadaverine production. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2015, 20(3): 439-446.
- [20] Li NQ, Chou H, Yu LJ, et al. Cadaverine production by heterologous expression of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2014, 19(6): 965-972.
- [21] Yamamoto Y, Miwa Y, Miyoshi K, et al. The

- Escherichia coli ldcC* gene encodes another lysine decarboxylase, probably a constitutive enzyme. *Genes Genet Syst*, 1997, 72(3): 167-172.
- [22] 陈炫, 范昕建, 吕晓菊, 雷秉钧, 张再伟. 大肠埃希氏菌及肺炎克雷伯氏菌超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因的核苷酸序列测定及分子进化树的构建. *中国抗生素杂志*, 2003, 28(2): 87-90.
- Chen X, Fan XJ, Lv XJ, et al. Nucleotide sequence and molecular evolutionary tree establishing of extended spectrum  $\beta$ -lactamases gene in *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Chin J Antibiot*, 2003, 28(2): 87-90 (in Chinese).
- [23] Lemonnier M, Lane D. Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)*, 1998, 144 ( Pt 3): 751-760.
- [24] 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.
- [25] Moreau PL. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J Bacteriol*, 2007, 189(6): 2249-2261.
- [26] Rocha JF, Pina AF, Sousa SF, et al. PLP-dependent enzymes as important biocatalysts for the pharmaceutical, chemical and food industries: a structural and mechanistic perspective. *Catal Sci Technol*, 2019, 9(18): 4864-4876.
- [27] Kim JH, Kim HJ, Kim YH, et al. Functional study of lysine decarboxylases from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli* and application of whole cell bioconversion for cadaverine production. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(9): 1586-1592.
- [28] Takatsuka Y, Onoda M, Sugiyama T, et al. Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(6): 1063-1069.
- [29] Takatsuka Y, Yamaguchi Y, Ono M, et al. Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J Bacteriol*, 2000, 182(23): 6732-6741.
- [30] 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): 527-532.
- Li NQ, Yu LJ, Xu Y. Heterologous expression and characterization of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase. *Chin J Biotech*, 2016, 32(4): 527-532 (in Chinese).
- [31] 寇凤雨. L-赖氨酸脱羧酶的酶学性质及其应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2016.
- Kou FY. Enzymatic properties of L-lysine decarboxylase and its application in cadaverine production[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016 (in Chinese).
- [32] OSIRE Tolbert, 杨套伟, 乔郅钠, 等. 赖氨酸脱羧酶分子改造及其催化合成戊二胺. *食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 8-14.
- Tolbert O, Yang TW, Qiao ZN, et al. Molecular modification of lysine decarboxylase for catalytic synthesis of pentanediamine. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(1): 8-14 (in Chinese).
- [33] Han LF, Yuan JJ, Ao XL, et al. Biochemical characterization and phylogenetic analysis of the virulence factor lysine decarboxylase from *Vibrio vulnificus*. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3082.
- [34] Yamamoto S, Imamura T, Kusaba K, et al. Purification and some properties of inducible lysine decarboxylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1991, 39(11): 3067-3070.
- [35] Osire T, Qiao ZN, Yang TW, et al. Biochemical characterization and structural insight into interaction and conformation mechanisms of *Serratia marcescens* lysine decarboxylase (SmcadA). *Molecules*, 2021, 26(3): 697.
- [36] Jeong S, Yeon YJ, Choi EG, et al. Alkaliphilic lysine decarboxylases for effective synthesis of cadaverine from L-lysine. *Korean J Chem Eng*, 2016, 33(5): 1530-1533.
- [37] Kim HS, Kim BH, Cho YD. Purification and characterization of monomeric lysine decarboxylase from soybean (*Glycine max*) axes. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 354(1): 40-46.
- [38] Kanjee U, Houry WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 2013, 67: 65-81.
- [39] Eichinger A, Haneburger I, Koller C, et al. Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family. *Protein Sci*, 2011, 20(4): 656-669.
- [40] Rauschmeier M, Schüppel V, Tetsch L, et al. New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2014, 426(1): 215-229.

- [41] Haneburger I, Eichinger A, Skerra A, et al. New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2011, 286(12): 10681-10689.
- [42] Ma WC, Chen KQ, Li Y, et al. Advances in cadaverine bacterial production and its applications. *Engineering*, 2017, 3(3): 308-317.
- [43] Neely MN, Dell CL, Olson ER. Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* cad operon. *J Bacteriol*, 1994, 176(11): 3278-3285.
- [44] Krin E, Danchin A, Soutourina O. Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 273.
- [45] Sagong HY, Son HF, Kim S, et al. Crystal structure and pyridoxal 5-phosphate binding property of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium*. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166667.
- [46] Oliveira EF, Cerqueira NMFS, Fernandes PA, et al. Mechanism of formation of the internal aldimine in pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(39): 15496-15505.
- [47] Xi Y, Ye LD, Yu HW. Enhanced thermal and alkaline stability of L-lysine decarboxylase CadA by combining directed evolution and computation-guided virtual screening. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9: 24.
- [48] Kou FY, Zhao J, Liu J, et al. Enhancement of the thermal and alkaline pH stability of *Escherichia coli* lysine decarboxylase for efficient cadaverine production. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(4): 719-727.
- [49] Du Y, Pu ZJ, Kang H, et al. Zwitterionic peptides encircling-assisted enhanced catalytic performance of lysine decarboxylase for cadaverine biotransformation and mechanism analyses. *Chem Eng Sci*, 2022, 251: 117447.
- [50] McLure RJ, Radford SE, Brockwell DJ. High-throughput directed evolution: a golden era for protein science. *Trends Chem*, 2022, 4(5): 378-391.
- [51] 王晓玥, 王白云, 王智文, 等. 蛋白质定向进化的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(2): 123-131.  
Wang XY, Wang BY, Wang ZW, et al. The research progress of protein directed evolution. *Prog Biochem Biophys*, 2015, 42(2): 123-131 (in Chinese).
- [52] Kuchner O, Arnold FH. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol*, 1997, 15(12): 523-530.
- [53] Dalby PA. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(4): 473-480.
- [54] Otten R, Liu L, Kenner LR, et al. Rescue of conformational dynamics in enzyme catalysis by directed evolution. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1314.
- [55] Turner NJ. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(11): 474-478.
- [56] Nirantar SR. Directed evolution methods for enzyme engineering. *Molecules*, 2021, 26(18): 5599.
- [57] An YF, Ji JF, Wu WF, et al. Random mutagenesis and recombination of *SamI* gene by integrating error-prone PCR with staggered extension process. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1227-1232.
- [58] Wu W, Jia ZC, Liu P, et al. A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(13): e110.
- [59] Lyozin GT, Brunelli L. DNA gap repair in *Escherichia coli* for multiplex site-directed mutagenesis. *FASEB J*, 2020, 34(5): 6351-6368.
- [60] Hong EY, Lee SG, Park BJ, et al. Simultaneously enhancing the stability and catalytic activity of multimeric lysine decarboxylase CadA by engineering interface regions for enzymatic production of cadaverine at high concentration of lysine. *Biotechnol J*, 2017, 12(11): 2017Nov;12(11).
- [61] Boutureira O, Bernardes GJL. Advances in chemical protein modification. *Chem Rev*, 2015, 115(5): 2174-2195.
- [62] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(45): 7342-7372.
- [63] Szkolar L, Guilbaud JB, Miller AF, et al. Enzymatically triggered peptide hydrogels for 3D cell encapsulation and culture. *J Pept Sci*, 2014, 20(7): 578-584.
- [64] Liu EJ, Sinclair A, Keefe AJ, et al. EKylation: addition of an alternating-charge peptide stabilizes proteins. *Biomacromolecules*, 2015, 16(10): 3357-3361.
- [65] Chen K, Hu Y, Dong XY, et al. Molecular insights into the enhanced performance of EKylated PETase toward PET degradation. *ACS Catal*, 2021, 11(12): 7358-7370.
- [66] Cavalcante FTT, Cavalcante ALG, De Sousa IG, et al. Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization. *Catalysts*, 2021, 11(10): 1222.

- [67] CAO LQ. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(2): 217-226.
- [68] Liu DM, Chen J, Shi YP. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, 102: 332-342.
- [69] Guisan JM, Fernandez-Lorente G, Rocha-Martin J, et al. Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. *Curr Opin Green Sustain Chem*, 2022, 35: 100593.
- [70] Bilal M, Iqbal HMN. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *Int J Biol Macromol*, 2019, 130: 462-482.
- [71] Xia H, Li N, Zhong X, et al. Metal-organic frameworks: a potential platform for enzyme immobilization and related applications. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 695.
- [72] Seo HM, Kim JH, Jeon JM, et al. *In situ* immobilization of lysine decarboxylase on a biopolymer by fusion with phasin: immobilization of CadA on intracellular PHA. *Process Biochem*, 2016, 51(10): 1413-1419.
- [73] Yao JH, Li Z, Ji XL, et al. Novel enzyme-metal-organic framework composite for efficient cadaverine production. *Biochem Eng J*, 2021, 176: 108222.
- [74] Zhou N, Zhang AL, Wei GG, et al. Cadaverine production from L-lysine with chitin-binding protein-mediated lysine decarboxylase immobilization. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 103.
- [75] Kim JH, Kim J, Kim HJ, et al. Biotransformation of pyridoxal 5'-phosphate from pyridoxal by pyridoxal kinase (pdxY) to support cadaverine production in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 104: 9-15.
- [76] Park SH, Soetyono F, Kim HK. Cadaverine production by using cross-linked enzyme aggregate of *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(2): 289-296.
- [77] Wei GG, Chen Y, Zhou N, et al. Chitin biopolymer mediates self-sufficient biocatalyst of pyridoxal 5'-phosphate and L-lysine decarboxylase. *Chem Eng J*, 2022, 427: 132030.
- [78] Mi JL, Liu SM, Du Y, et al. Cofactor self-sufficient by co-immobilization of pyridoxal 5'-phosphate and lysine decarboxylase for cadaverine production. *Bioresour Technol*, 2022, 17: 100939.
- [79] Xue YJ, Zhao YL, Ji XL, et al. Advances in bio-nylon 5X: discovery of new lysine decarboxylases for the high-level production of cadaverine. *Green Chem*, 2020, 22(24): 8656-8668.

(本文责编 郝丽芳)