

• 工业生物技术 •

利用脯氨酸效应提高短乳杆菌谷氨酸脱羧酶的热稳定性

方卉¹, 吕常江¹, 花雨娇¹, 胡升², 赵伟睿², 方文姬¹, 宋奎¹, 黄俊¹, 梅乐和²

1 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

2 浙江大学 宁波理工学院 生物与化学工程学院, 浙江 宁波 315100

方卉, 吕常江, 花雨娇, 等. 利用脯氨酸效应提高短乳杆菌谷氨酸脱羧酶的热稳定性. 生物工程学报, 2019, 35(4): 636–646.

Fang H, Lü CJ, Hua YJ, et al. Increasing the thermostability of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* by introducing proline. Chin J Biotech, 2019, 35(4): 636–646.

摘要: 以磷酸吡哆醛为辅酶的谷氨酸脱羧酶 (Glutamate decarboxylase, GAD), 能专一、不可逆地催化 L-谷氨酸脱去 α -羧基生成 γ -氨基丁酸。为了提高 GAD 热稳定性为目标, 本研究通过与嗜热古细菌 *Thermococcus kodakarensis* 中 GAD 氨基酸序列的比对及引入脯氨酸策略, 最终在短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* CGMCC No.1306 的 GAD 突变体中筛选得到热稳定性提高的突变酶 G364P。结果显示, 突变酶 G364P 在 55 °C 的半衰期以及半失活温度分别比野生酶提高 19.4 min 和 5.3 °C, 并且突变酶 G364P 的催化效率与野生酶相比没有明显变化。此外, 利用分子动力学模拟来验证突变对蛋白质热稳定性的影响, 突变酶 G364P 的均方根偏差 (Root mean square deviation, RMSD) 以及含 G364 的 loop 区域均方根涨落 (Root mean square fluctuation, RMSF) 均比野生酶低, 引入脯氨酸增加了 364 位氨基酸与相邻氨基酸的疏水相互作用。文中通过引入脯氨酸成功提高了 *L. brevis* 中 GAD 的热稳定性, 同时也为其他酶热稳定性的理性设计提供了方法学指导。

关键词: 谷氨酸脱羧酶, 脯氨酸, γ -氨基丁酸, 短乳杆菌, 热稳定性, 分子动力学

Increasing the thermostability of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* by introducing proline

Hui Fang¹, Changjiang Lü¹, Yujiao Hua¹, Sheng Hu², Weirui Zhao², Wenji Fang¹, Kui Song¹, Jun Huang¹, and Lehe Mei²

1 School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

2 Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: Glutamate decarboxylase, a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme, catalyzes α -decarboxylation of

Received: September 20, 2018; **Accepted:** December 4, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31470793, 31670804, 31240054), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Nos. LY16B060008, LZ13B060002).

Corresponding authors: Jun Huang. Te/Fax: +86-571-85070370; E-mail: hjunlzh@163.com

Lehe Mei. Te/Fax: +86-574-88229101; E-mail: meilh@zju.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31470793, 31670804, 31240054), 浙江省自然科学基金 (Nos. LY16B060008, LZ13B060002) 资助。

L-glutamate to γ -aminobutyrate. However, glutamate decarboxylase from different sources has the common problem of poor thermostability that affects its application in industry. In this study, proline was introduced at 13 different positions in glutamate decarboxylase by using the design strategy of homologous sequence alignment between *Thermococcus kodakarensis* and *Lactobacillus brevis* CGMCC No.1306. A mutant enzyme G364P with higher thermostability was obtained. Compared to the wild type, thermostability of the mutant G364P was significantly improved, the half-life time ($t_{1/2}$) at 55 °C and the semi-inactivation temperature (T_{50}^{15}) of the mutant G364P increased 19.4 min and 5.3 °C, respectively, while k_{cat}/K_m of the mutant enzyme remained nearly unchanged. Further analysis of their thermostability by molecular dynamics simulations were performed. The root mean square deviation of G364P and root mean square fluctuation in the loop region including G364 were lower than the wild type at 313 K for 10 ns, and G364P increased one hydrophobic interaction in the loop region. It proves that mutation of flexible 364-Gly to rigid proline endows glutamate decarboxylase with enhanced thermostability.

Keywords: glutamate decarboxylase, proline, γ -aminobutyric acid, *Lactobacillus brevis*, thermostability, molecular dynamics

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸, 具有降血压、抗抑郁、抗惊厥、改善睡眠等多种重要的生理功能, 在食品、医药、化工等领域具有广阔的应用前景^[1-5]。谷氨酸脱羧酶 (Glutamate decarboxylase, GAD; EC 4.1.1.15) 能专一、不可逆地催化 *L*-谷氨酸 (*L*-glutamic acid, *L*-Glu) 脱去 α -羧基生成 GABA 和 CO₂, 通过蛋白质工程手段获得催化效率更高、稳定性更好的 GAD 突变酶, 对于拓展其工业应用具有重要的意义^[6-7]。

GAD 广泛存在于细菌、酵母和丝状真菌等各种微生物中, 介导胞内 GABA 的合成, 并在细胞抵御外部酸性环境的过程中发挥重要的作用^[8-9]。值得关注的是, 在这些所报道的菌株中, 作为发酵食品最主要的有益微生物——乳酸菌通常具有较高的 GABA 合成能力, 乳酸菌源 GAD 也因此受到更为广泛的关注^[10]。迄今为止, 人们已从鲜奶、泡菜、清酒及各种传统的发酵乳制品和肉制品中分离并鉴定了数百株具有 GABA 合成能力的乳酸菌, 分布于 8 个属 45 个种和亚种^[10-11]。

课题组前期分离并鉴定了多株具有 GABA 合成能力的乳酸菌^[12]。其中, 分离于未灭菌生牛奶中的短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* CGMCC No. 1306 具有较高的 GABA 发酵性能^[13]。随后, 基于分子生物学手段实现了该菌株 GAD 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中的异源重组表达, 该重组酶

在 pH 为 3–6 时具有催化 *L*-Glu 生成 GABA 的能力, 但当 pH 高于 5.6 时, 催化活性降至 10% 以下^[14]。此外, 本课题组解析了该蛋白的晶体结构 (PDB ID: 5GP4), 并通过定向进化及计算机辅助的蛋白质分子理性设计等方法有效地拓宽了其 pH 催化范围, 同时实现了其催化效率的显著提升^[7, 15]。尽管该蛋白呈现出较高的工业应用潜力, 但其稳定性相对较差, 当温度高于 50 °C 时, GAD 活力显著下降^[12]。因此, 如何提高该 GAD 的热稳定性, 对于实现其工业化应用具有重要的价值。

与传统的定向进化相比, 利用理性设计来提高蛋白质的热稳定性具有目的性强、效率高等优点, 对阐明蛋白质结构和功能的关系亦具有重要意义^[16-18]。目前, 提高蛋白质热稳定性的理性方法主要有同源序列比对^[19]、预测折叠自由能^[20]、温度因子 (B-factor) 设计^[21]、引入二硫键^[22]、优化蛋白质表面电荷^[23]及脯氨酸效应^[24]等。大量研究表明, 蛋白质分子中引入脯氨酸 (Pro) 可以降低蛋白质去折叠的骨架熵, 增加蛋白质的刚性, 显著提高蛋白质的热稳定性。目前关于利用脯氨酸效应提高 GAD 热稳定性的研究鲜有报道。

基于以上分析, 本研究首先将 *L. brevis* CGMCC No. 1306 与嗜热古细菌 *Thermococcus kodakarensis* 的 GAD 氨基酸序列进行比对, 选择来自 *T. kodakarensis* GAD 中 Pro 所对应的 *L. brevis* GAD 氨基酸位点作为突变位点, 然后采

用定点突变技术在 *L. brevis* GAD 对应的氨基酸位点引入 Pro, 并通过比色法快速筛选具有高热稳定性的 GAD 突变体, 以期提高实验效率。此外, 分别利用 YASARA 和 PyMOL 软件进行分子动力学模拟及可视化剖析, 探讨蛋白质热稳定性提高的机制, 并为进一步深入研究 GAD 家族的热稳定性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

L. brevis CGMCC 1306、*E. coli* BL21 (DE3) 及 *E. coli* DH5 α 为本实验室保藏。磷酸吡哆醛 (Pyrodoxal-5'-phosphate, PLP)、硫酸卡那霉素 (Kan)、丹磺酰氯 (DNS-Cl)、改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; *Dpn* I 购自 Thermo Scientific 公司; PrimeSTAR Max DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; Ni-NTA 层析介质购自北京全式金生物技术有限公司; 溴甲酚紫 (Bromocresol purple, BCP) 购自上海三爱思试剂有限公司; PCR 引物由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成。

1.2 GABA 及 *L*-Glu 含量的测定

将 100 μ L 待测样品、900 μ L 0.2 mol/L NaHCO₃ 溶液 (pH 9.8) 及 500 μ L 4 g/L DNS-Cl 丙酮溶液混合均匀后置于 40 $^{\circ}$ C 下避光衍生 1 h, 然后采用 HPLC 法测定样品中的 GABA 及 *L*-Glu 含量, 具体参考文献^[25]。

1.3 突变文库的构建

以来源于 *T. kodakarensis* GAD 的氨基酸序列为参照, 使用 DNAMAN 软件进行序列比对获取目标蛋白中可引入 Pro 的氨基酸残基位点, 并设计相应定点突变 PCR 引物。以 pET28a(+)-GAD 质粒为模板, 采用表 1 中的引物, PCR 克隆获取目标突变体质粒基因; 使用 *Dpn* I 对 PCR 反应产物进行消化处理 (37 $^{\circ}$ C, 2 h), 以消除父本模板;

采用热击转化法将克隆产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。突变体质粒经通用生物系统 (安徽) 有限公司测序验证后进一步转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 获取目标重组菌株。

1.4 热稳定性提高突变体的初步筛选及鉴定

为快速筛选出具有较高热稳定性的 GAD 突变体, 建立了基于比色法的 GAD 突变体筛选流程: 突变体接种于 96 深孔板中, 每个孔装有 1 mL 含 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 12 h 后, 取 100 μ L 培养液转接至上述相同培养体系中; 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 再次培养 OD_{600} 至 0.6–0.8 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L; 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 诱导 8–12 h 后离心收集菌体细胞, 存放至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱; 冻融后用 150 μ L 的 PBS 溶液 (磷酸钠缓冲液, pH 7.5) 将菌体重悬, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的溶菌酶, 于 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h 以破碎细胞; 离心取上清液, 并于 55 $^{\circ}$ C 水浴中处理 15 min, 随后立即于冰浴中放置 5 min; 取处理后的酶液 20 μ L 于 96 微量孔板中, 加入 200 μ L 含有 20 mmol/L *L*-Glu 的 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (50 μ mol/L BCP, 0.01 mmol/L PLP, pH 4.8), 48 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡 2 h 后观察颜色变化。

1.5 野生酶和突变酶的表达与纯化

挑取含重组表达质粒的单菌落并接种至 5 mL 含 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养过夜。随后, 以 2% (V/V) 的接种量转接至 200 mL 相同培养基中, 继续培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 并于 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下诱导 8 h 后离心收集菌体。

将收集的菌体细胞经 20 mmol/L PBS (pH 7.5) 离心洗涤 2 次后重悬于 20 mL 破胞缓冲液 (20 mmol/L PBS, 300 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5), 在冰浴条件下超声处理破碎菌体 (超声功率为 300 W, 工作 3 s, 间歇 6 s, 超声 15 min)。超声处理完毕后, 细胞破碎液于 8 000 r/min、4 $^{\circ}$ C

表 1 定点突变引物及其序列

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis.

Primer name	Primer sequence (5'-3')
GAD-M70P-F	TTCTGTCAGACTTAC <u>CCGGA</u> ACCGGAAGCGGTTG
GAD-M70P-R	AACCGCTTCCGGTTC <u>CGG</u> GTAAGTCTGACAGAAC
GAD-K89P-F	AAAAACGCCATCGAT <u>CCG</u> TCCGAGTATCCTCGG
GAD-K89P-R	CGAGGATACTCGGAC <u>CGG</u> ATCGATGGCGTTTTTC
GAD-S162P-F	TCAACCTAATATTGTCAT <u>CCG</u> GCCGGTTATCAAGTTTGTG
GAD-S162P-R	ACAACTTGATAACCGGC <u>CGG</u> GATGACAATATTAGGTTGATG
GAD-A224P-F	GACAATACGACGATTTA <u>CCG</u> CGATTAGATGCCGTTGTAG
GAD-A224P-R	TACAACGGCATCTAATCG <u>CGG</u> TAAATCGTTCGATTGTCC
GAD-Y242P-F	ACTAAGTTC <u>CCG</u> GTACCGATCCATGTCGATGCC
GAD-Y242P-R	GCATCGACATGGAT <u>CGG</u> TACCGGAACTTAGTC
GAD-L261P-F	CGTTTATTGAACCGAG <u>CCG</u> GAAGTGGGACTTCCGTTTAAAC
GAD-L261P-R	TTAAACGGAAGTCCCACTT <u>CGG</u> CTCGGGTTCAATAAACGGC
GAD-G277P-F	CCATCAATGCCTCC <u>CCG</u> CACAAATATGGCTTG
GAD-G277P-R	CAAGCCATATTTGTG <u>CGG</u> GGAGGCATTGATGG
GAD-Y284P-F	CAAATATGGCTTGGTT <u>CCT</u> CCCGGAGTCGGCTG
GAD-Y284P-R	CAGCCGACTCCGGG <u>AGG</u> AACCAAGCCATATTTG
GAD-V306P-F	AGCTGGTCTTTAAG <u>CCG</u> AGCTACTTGGGTGGTG
GAD-V306P-R	ACCACCAAGTAGCT <u>CGG</u> CTTAAAGACCAGCTC
GAD-G364P-F	ATCGCTCACTAAATT <u>ACCG</u> GGCTTTTCCCTCATTAATG
GAD-G364P-R	TAATGAGGGAAAAGCC <u>CGG</u> TAATTTAGTGAGCGATTTC
GAD-S323P-F	CATCAACTTCTCCAC <u>CCG</u> GCCTCCCAATTAATCGG
GAD-S323P-R	CGATTAATTGGGAGG <u>CCG</u> GTGGGAGAAGTTGATGG
GAD-G372P-F	CGCTCACTAAATT <u>ACCG</u> GGCTTTTCCCTCATTAATG
GAD-G372P-R	ATGAGGGAAAAGCC <u>CGG</u> TAATTTAGTGAGCGATTTC
GAD-A427P-F	GGATCGTGGTTCGG <u>CCG</u> GACTTTGGTATGAG
GAD-A427P-R	TCATACCAAAGT <u>CCG</u> GCCGAACCACGATCCG

Underlined letters are mutation sites.

下离心 30 min, 收集上清液, 即得含有 GAD 的粗酶液。粗酶液经 0.45 μm 滤膜过滤后采用 Ni-NTA 亲和层析获取目标重组蛋白, 并分别采用 SDS-PAGE 和 Bradford 法测定纯化后的蛋白纯度及浓度。

1.6 酶活力测定

GAD 酶活力的测定参考 Ueno 等^[26]所述方法: 400 μL 底物溶液 (0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液, 0.01 mmol/L PLP, 100 mmol/L L-Glu, pH 4.8) 与 20 μL 纯酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min, 然后加 900 μL 0.2 mol/L NaHCO_3 溶液 (pH 9.8) 终止反应, 采用 HPLC 法测定反应生成的 GABA 含量。

1.7 野生酶和突变酶酶学参数及热稳定性测定

分别将纯化后的野生酶和突变酶在 0–70 $^{\circ}\text{C}$ 水

浴中孵育 15 min, 孵育结束后迅速放置在冰上冷却 5 min, 采用上述 1.6 方法测定酶活力。设未经温浴条件下所测得的酶活力为 100%, 将经过不同温度热处理后所测得的酶活力折合为相对剩余酶活力; 并以温度为横坐标, 以热处理后与处理前酶活力的比值为纵坐标作图, 采用 Origin 8.0 软件进行 Boltzmann S 型函数拟合, 并计算相对剩余酶活力降为 50% 时所对应的温度, 即半失活温度 (T_{50}^{15})。

将野生酶和突变酶在 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别孵育 10–70 min, 孵育结束后迅速放置在冰上冷却 5 min, 采用上述 1.6 方法测定酶活力。以时间为横坐标, 以经过不同时间热处理后与处理前的酶活力的比值为纵坐标作图, 通过 Origin8.0 软件拟合非线性

性方程 $y = \exp(-k_d \cdot t)$, 一阶速率常数 (k_d) 经非线性回归确定, 并计算相对剩余酶活力降低为 50% 时所对应的孵育时间, 即半衰期 ($t_{1/2}$)。

采用 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液 (含 0.01 mmol/L PLP, pH 4.8) 配制不同浓度 (1–100 mmol/L) 的底物 (*L*-Glu) 溶液, 利用上述 1.6 方法测定酶活力。以底物浓度 [*S*] 对反应速率 [*V*] 作图, 通过 Origin 8.0 软件非线性拟合计算相应的 K_m 和 V_{max} 值, 根据 $k_{cat} = V_{max}/[E_0]$ ($[E_0]$ 为酶初始浓度, 单位 mmol/L) 计算求得的 k_{cat} 和催化效率 k_{cat}/K_m 。

1.8 野生酶和突变酶分子动力学模拟

为进一步解释突变位点对蛋白构象的影响, 通过计算野生酶及突变酶的分子动力学模拟轨迹中均方根偏差 (Root mean square deviation, RMSD) 和均方根涨落 (Root mean square fluctuation, RMSF), 来比较野生酶及突变酶整个系统势能的涨落情况和蛋白结构局部区域的灵活性。本研究以 *L. brevis* CGMCC 1306 的 GAD 晶体结构 (PDB ID: 5GP4) 为模板, 利用 FoldX 软件构建突变酶的三维结构, 并采用 YASARA 软件的 Amber14 力场分别对野生酶和突变酶在 313 K 下进行时长为 10 ns 的动力学模拟。模拟过程为: 以 PDB 格式的野生酶和突变酶的三维结构作为分子动力学模拟的初始结构, 经加氢处理后将晶体结构放置于 $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ 的立方体盒子中, 以 0.98 g/L 的密度填充水分子, 并向体系中添加合适的抗衡离子 (Na^+/Cl^-), 使模拟系统呈电中性。范德华力相互作用的短程截断距离为 7.86 \AA 。采用 Particle Mesh Ewald 方法计算长程静电相互作用。模拟结果数据的可视化及分析采用 PyMOL 软件分析。

2 结果与分析

2.1 突变文库的构建

来源于嗜嗜热古细菌的 *T. kodakarensis* 是一种仅存于高温地热环境的严格厌氧菌, 具有超高

的最适生长温度 (95 $^{\circ}\text{C}$)。Tomita 等^[27]报道来源于 *T. kodakarensis* GAD 的最适反应温度为 85 $^{\circ}\text{C}$, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 的半衰期分别为 10 h 和 5.5 h。*L. brevis* 的 GAD 氨基酸序列与 *T. kodakarensis* 的 GAD 氨基酸序列具有 44.74% 的相似性, 应用同源比对策略, 选择来自 *T. kodakarensis* GAD 中 Pro 所对应的 *L. brevis* GAD 氨基酸位点作为突变位点, 通过定点突变技术在 *L. brevis* CGMCC 1306 的 GAD 中引入 Pro 的位点分别为 M70、K89、S162、A224、Y242、L261、G277、Y284、V306、S323、G364、G372、A427 (图 1), 突变位点在 *L. brevis* GAD (PDB ID: 5GP4) 三维结构的位置如图 2 所示。

2.2 热稳定性提高突变体的初步筛选及鉴定

为快速获取具有较高热稳定性的 GAD 突变体, 本研究采用比色法对进行热处理后的 GAD 酶活力进行初筛^[28]。BCP 是一种酸碱指示剂, 其在低于 pH 5.0 的条件下显示黄色, 高于 pH 6.8 的条件下呈现紫色, 在 pH 5.0–6.8 时为浅紫色或橙色。而 *L*-Glu 在 GAD 催化生成 GABA 的过程中, 由于质子的消耗和碱性物质 GABA 的产生, 使其在弱缓冲体系中的 pH 随着反应而发生变化。因此, 可通过向缓冲液中添加一定浓度的 BCP 作为指示剂用于反应体系中 GAD 活性高低的定性分析。采用上述比色分析方法, 利用 96 深孔板对 13 个突变体进行初步筛选。在所考察的体系中, 与 96 微孔板中 11 号所在位置的 GAD-WT 相比 (图 3), 4 号呈现出更深的紫色反应, 其所对应的突变体为 G364P。另外, 质子化和去质子化形式的 BCP 的吸收光谱见图 4A。两种形式之间的吸光度的最大差异发生在 590 nm, 而进一步的 OD_{590} 处吸收值也验证了颜色区别所体现的 GAD 活性变化 (图 4B)。与 GAD-WT 相比, G364P 在 OD_{590} 处的吸收值明显高于 GAD-WT。为此, 选择 G364P 进行进一步热稳定性分析。

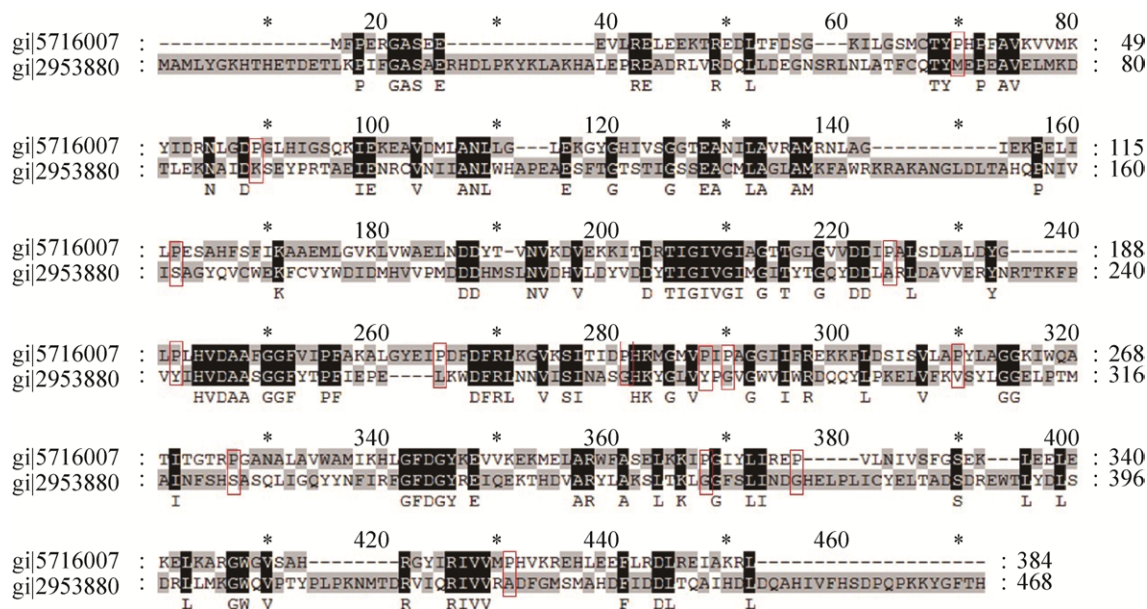


图 1 *L. brevis* CGMCC 1306 中 GAD 氨基酸序列与 *T. kodakarensis* 中 GAD 氨基酸序列对比结果图

Fig. 1 Sequence alignment of glutamate decarboxylase from *L. brevis* and *T. kodakarensis*. The amino acid sequences of GADs from *L. brevis* and *T. kodakarensis* were aligned with the DNAMAN program using default parameters. The proline residues which are in the amino acid sequences of *T. kodakarensis* are indicated with red square.

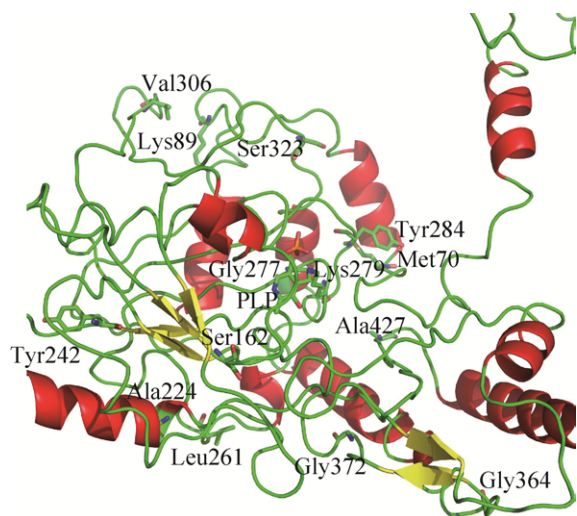


图 2 *L. brevis* CGMCC 1306 GAD 三维结构及突变位点

Fig. 2 Mutation sites in *L. brevis* CGMCC 1306 GAD. Loop, helix and sheet are colored in green, red and yellow, respectively. Mutation sites include: Met70, Lys89, Ser162, Ala224, Tyr 242, Leu261, Gly277, Tyr 284, Val306, Gly364, Gly372, Ala427 and Ser323. The coenzyme PLP is covalently attached to the catalytic Lys279.

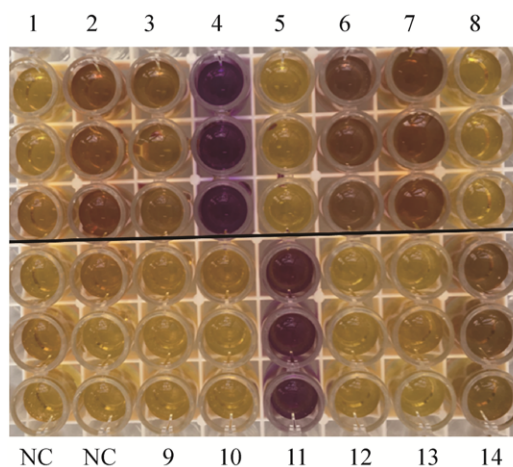


图 3 具有较高热稳定性的 GAD 突变体的初步筛选

Fig. 3 Colour changes of reaction system. Reaction mixtures contained 0.01 mmol/L PLP, 50 μ mol/L BCP, 20 mmol/L *L*-Glu and 20 μ L crude extract in 20 mmol/L acetate buffer (pH 4.8). Cell extracts from the same plasmid construct without insertion served as a negative control. 1: V306P; 2: Y284P; 3: A427P; 4: G364P; 5: G277P; 6: S323P; 7: G372P; 8: A261P; 9: K89P; 10: A242P; 11: GAD-WT; 12: A224P; 13: S162P; 14: M70P; NC: negative control.

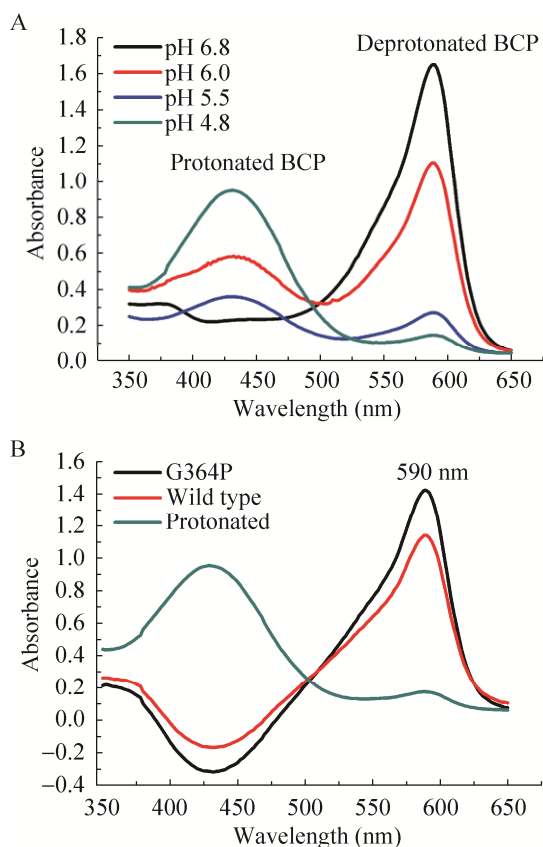


图4 不同质子化状态的溴甲酚紫吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectra of protonated and deprotonated forms of BCP. BCP concentration is 50 $\mu\text{mol/L}$. (A) Absorption spectra (350–650 nm) of protonated and deprotonated forms of BCP at different pH. (B) Increased absorbance at 590 nm is due to the deprotonation of indicator BCP via the glutamate decarboxylation reaction, and the mutants G364P exhibited higher absorbance than the GAD-WT at 590 nm.

2.3 野生酶和突变酶的热稳定性

经 Ni-NTA 亲和层析纯化后的野生酶及突变酶的 SDS-PAGE 检测结果如图 5 所示。纯化后的突变酶 G364P 及 GAD-WT 电泳条带清晰且单一，其分子量约为 56 kDa，与理论分子量相一致。随后，按照 1.6 所述方法测定突变酶 G364P 与 GAD-WT 的 $t_{1/2}$ 和 T_{50}^{15} 。由图 6A 可见，GAD-WT 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下的 $t_{1/2}$ 为 23.6 min，而突变酶 G364P 则达到了 43.0 min，是 GAD-WT 的 1.82 倍；在 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 60 min 后，GAD-WT 的残余酶活力仅

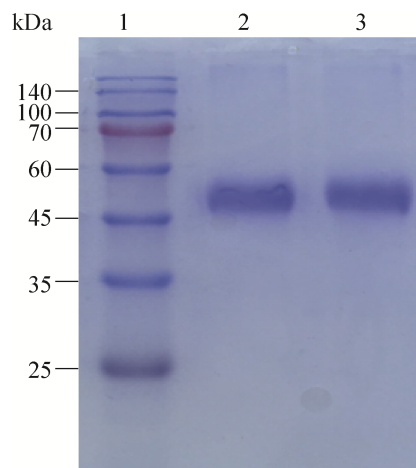


图5 野生酶和突变酶的 SDS-PAGE 检测结果图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of GAD-WT and G364P. 1: protein marker; 2: GAD-WT; 3: G364P.

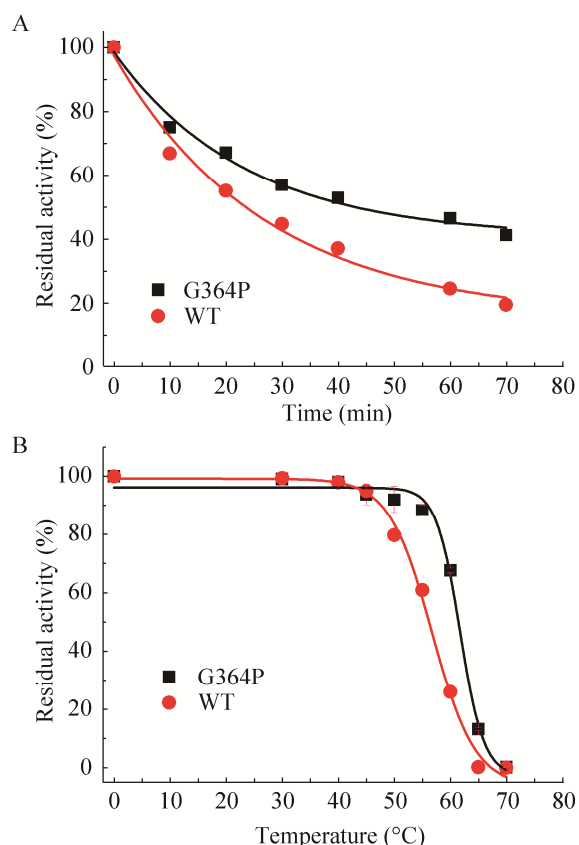


图6 野生酶和突变酶 G364P 的热稳定性

Fig. 6 Stability analysis of GAD-WT and G364P. (A) Thermal inactivation half-life ($t_{1/2}$) of G364P and GAD-WT at 40 $^{\circ}\text{C}$. (B) Stability analysis of GAD-WT and G364P. Thermal inactivation of G364P and GAD-WT at different temperatures over 10 min (T_{50}^{10}). The error bars show standard deviation calculated for three replicated experiments.

为 24.5%，而突变酶 G364P 的残余酶活力仍有 45.2%。这表明 364 位点发生的 Pro 替换增强了蛋白质的稳定性，对热失活有了更强的抗性，减缓了酶的热失活速率。由图 6B 可见，GAD-WT 的 T_{50}^{15} 为 56.2 °C，而突变酶 G364P 则提高到了 61.5 °C，比 GAD-WT 提高了 5.3 °C；在 60 °C 条件下处理 15 min 后，GAD-WT 的残余酶活力降为 25.3%，而突变酶 G364P 仍保留 65.9% 的残余酶活力。

2.4 野生酶和突变酶的动力学参数

以 L-Glu 为底物，在 pH 4.8、37 °C 的条件下，分别测定 GAD-WT 及突变酶 G364P 的米氏动力学常数，采用 Hyperbola 函数进行非线性拟合得到动力学参数，结果如表 2 所示。由表 2 可知，突变酶 G364P 的米氏常数 K_m 值 (45.718 mmol/L) 比 GAD-WT 的 K_m 值 (41.283 mmol/L) 高 4.435 mmol/L，突变酶 G364P 对底物的亲和力略微下降。而突变酶 G364P 的 k_{cat} 值 (31.904 s^{-1}) 与 GAD-WT 的 k_{cat} 值 (30.461 s^{-1}) 较为接近，说明突变酶 G364P 的

催化速率与 GAD-WT 相比相差不大。此外，突变酶 G364P 的 k_{cat}/K_m 为 GAD-WT 的 0.86 倍，即保留了原始 GAD 催化活性的 86%。由此表明，突变酶 G364P 热稳定性得到提高的同时，并未显著降低酶的催化效率。

2.5 野生酶和突变酶的分子动力学模拟

本研究采用 YASARA 软件进行分子动力学模拟，通过结合 RMSD 值 (图 7A) 与 RMSF 值 (图 7B)，分析引入的 Pro 突变位点对 GAD 热稳定性的贡献。由图 7A 可知，随着模拟不断推进，GAD-WT 和突变酶 G364P 的 RMSD 值起初有个明显上升的阶段，突变酶 G364P 的 RMSD 在 1 ns 处达到系统平衡，而野生酶 RMSD 在 4 ns 处才达到系统平衡。平衡后野生酶 RMSD 平均为 (5.81 ± 0.41) nm，突变酶 G364P 的 RMSD 平均为 (3.80 ± 0.69) nm。RMSD 越低则分子构象越稳定。由此说明，突变酶 G364P 的蛋白质构象位移较小，酶整体柔性有所降低。

表 2 突变酶 G364P 和 GAD-WT 动力学参数比较

Table 2 Kinetic analysis of G364P and GAD-WT

	V_m (U/mg)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
GAD-WT	0.597 ± 0.015	41.283 ± 2.279	31.904 ± 0.015	0.773
G364P	0.570 ± 0.021	45.718 ± 3.602	30.461 ± 0.021	0.666

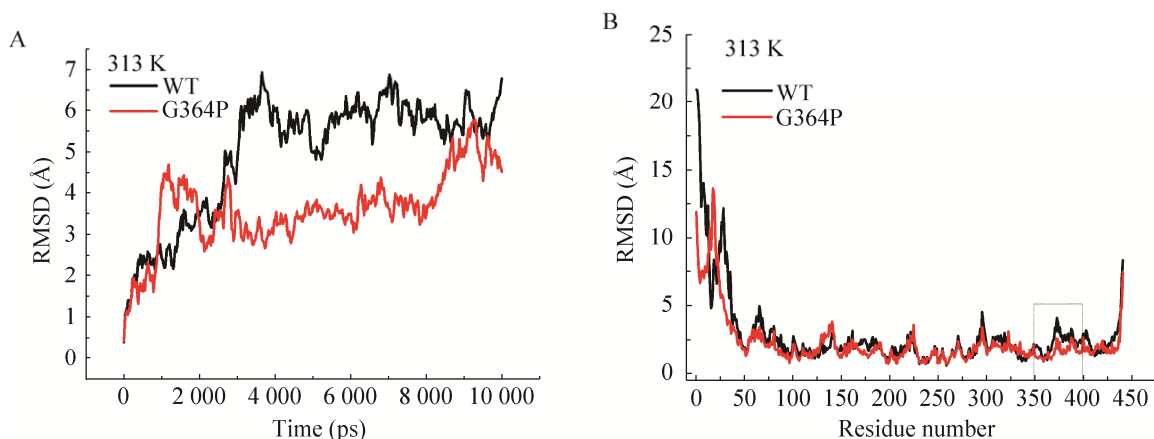


图 7 野生酶与突变酶 G364P 的分子动力学模拟分析

Fig. 7 MD simulation analysis of G364P and GAD-WT for 10 ns at 313 K using YASARA.

对 GAD-WT 和突变酶 G364P 进行时长 10 ns 的分子动力学模拟, 计算 GAD-WT 和突变酶 G364P 每个氨基酸的 RMSF 值, 可反映模拟过程中氨基酸的涨落变化状况。GAD-WT 和突变酶 G364P 的 RMSF 曲线如图 7B 所示。由图 7B 可知, 突变酶 G364P 和野生酶柔性最大的区域均为蛋白质的 N 端, 突变酶 G364P 在蛋白质 N 端以及突变位点的 Loop 区域 RMSF 值小于野生型。由图 2 可知, G364 位于 GAD 的 Loop 区域并且远离活性中心, 该 Loop 区域在热运动作用下易于形变, 显著影响蛋白质结构的稳定性。在该区域引入 Pro 后, 能增加该区域的刚性, 降低蛋白质去折叠的骨架熵。

3 讨论

本研究基于比色法可快速筛选经热处理后仍具有高活力的 GAD 突变酶, 可在相对短的时间内得到性质改善的突变酶, 节省时间成本, 对指导实验设计具有积极作用。影响酶的热稳定性因素众多, 酶分子热稳定的内在机制主要包括静电相互作用^[23]、疏水相互作用^[29]、氢键^[30]、二硫键^[22]、芳香环的相互作用^[31]、氨基酸组成等^[24,32]。为深入探讨突变酶稳定性提高的机制, 本研究利用在线服务器 (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) 进一步对野生酶及突变酶 G364P 的 364 位氨基酸残基分别进行了分子间相互作用的模拟分析。选取疏水相互作用(距离设为 5 Å)和氢键选项, 具体分析方法参照参考文献^[33], 模拟结果如图 8 所示。GAD 野生酶的 364 位氨基酸为 Gly, 其 O 原子与 Phe366 侧链的 N 原子形成空间距离为 2.9 Å 的氢键; 突变酶 G364P 的 364 位氨基酸是 Pro, 其 O 原子与 Phe366 侧链的 N 原子同样形成空间距离仍为 2.9 Å 的氢键。突变酶 G364P 与野生酶相比, 364 位氨基酸的氢键数量没有发生变化, 说明对于突变酶 G364P 热稳定性的提高, 氢键贡献不大。从图 8 C、D 中所知, 野生酶 364 位点的 Gly 并不与其相邻的氨基酸残基形成疏水相互作用, 但在该位点引入 Pro

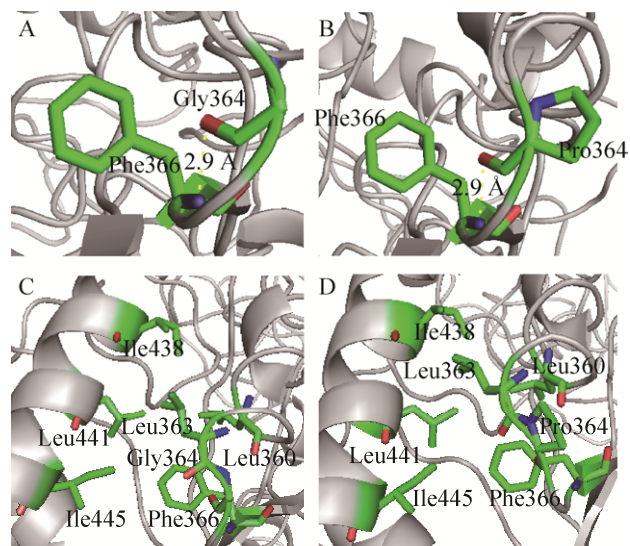


图 8 突变酶 G364P 与 GAD-WT 的 364 位点附近分子间相互作用模拟

Fig. 8 Molecular interaction simulation between the mutant enzyme G364P and GAD-WT near the 364 site. (A) In the GAD-WT, Glu 364 was involved in hydrogen bond with the neighbouring Phe366. (B) In the G364P, Pro 364 was involved in hydrogen bond with the neighbouring Phe366. (C) Leu 363 of wild type was involved in hydrophobic interaction with the neighbouring hydrophobic amino acids Leu360, Phe366, Ile438, Leu441 and Ile445. (D) Leu 363 of mutant G364P was involved in hydrophobic interaction with the neighbouring hydrophobic amino acids Leu360, Phe366, Ile438, Leu441 and Pro 364.

后, 突变酶 G364P 的 364 位点的 Pro 与 363 位点的 Leu 之间形成疏水相互作用。Pace 等^[34]研究了疏水相互作用和氢键对 22 个不同分子量大小的蛋白质(氨基酸残基介于 36–534 之间)稳定性的影响, 疏水相互作用对这 22 个蛋白质的稳定性平均贡献为 60%±4%, 氢键对这 22 个蛋白质的稳定性平均贡献为 40%±4%。因此, 在 364 位点引入 Pro 后, 突变酶 G364P 增加了氨基酸残基之间的疏水相互作用, 进而使突变酶 G364P 的热稳定性得到一定的提高。

REFERENCES

- [1] Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, et al. GABA and

- its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*, 2003, 300(5620): 812–815.
- [2] Inoue K, Shirai T, Ochiai H, et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr*, 2003, 57(3): 490–495.
- [3] Kai KL, Ruusuvuori E, Seja P, et al. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 26: 34–41.
- [4] Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J Funct Foods*, 2014, 10: 407–420.
- [5] Lammens TM, Franssen MCR, Scott EL, et al. Synthesis of biobased *N*-methylpyrrolidone by one-pot cyclization and methylation of γ -aminobutyric acid. *Green Chem*, 2010, 12(8): 1430–1436.
- [6] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, 10(1/3): 67–79.
- [7] Huang J, Fang H, Gai ZC, et al. *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 glutamate decarboxylase: crystal structure and functional analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1703–1709.
- [8] Lyu CJ, Zhao WR, Hu S, et al. Physiology-oriented engineering strategy to improve gamma-aminobutyrate production in *Lactobacillus brevis*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(4): 858–866.
- [9] Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(11): 898–907.
- [10] Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 2010, 39(5): 1107–1116.
- [11] Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of gaba (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(4): 1230–1241.
- [12] Huang J, Mei LH, Sheng Q, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chin J Chem Eng*, 2007, 15(2): 157–161.
- [13] Xia J. Breeding of γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus* and optimization of fermentation conditions[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- 夏江. 产 γ -氨基丁酸的乳酸菌菌株选育及其发酵条件优化[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [14] Fan EY, Huang J, Hu S, et al. Cloning, sequencing and expression of a glutamate decarboxylase gene from the GABA-producing strain *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306. *Ann Microbiol*, 2012, 62(2): 689–698.
- [15] Yu K, Lin L, Hu S, et al. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 50(4/5): 263–269.
- [16] Yang HQ, Liu L, Li JH, et al. Rational design to improve protein thermostability: recent advances and prospects. *ChemBioEng Rev*, 2015, 2(2): 87–94.
- [17] Durrenberger M, Ward TR. Recent achievements in the design and engineering of artificial metalloenzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 19: 99–106.
- [18] Jones BJ, Lim HY, Huang J, et al. Comparison of five protein engineering strategies for stabilizing an α/β -hydrolase. *Biochemistry*, 2017, 56(50): 6521–6532.
- [19] Max KEA, Wunderlich M, Roske Y, et al. Optimized variants of the cold shock protein from *in vitro* selection: structural basis of their high thermostability. *J Mol Biol*, 2007, 369(4): 1087–1097.
- [20] Benedix A, Becker CM, de Groot BL, et al. Predicting free energy changes using structural ensembles. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 3–4.
- [21] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 118(46): 7909–7915.
- [22] Xie DF, Fang H, Mei JQ, et al. Improving thermostability of (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus terreus* through introduction of disulfide bonds. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(2): 255–262.
- [23] Strickler SS, Gribenko AV, Gribenko AV, et al. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry*, 2006, 45(9): 2761–2766.
- [24] Huang J, Jones BJ, Kazlauskas RJ. Stabilization of an

- α/β -hydrolase by introducing proline residues: salicylic acid binding protein 2 from tobacco. *Biochemistry*, 2015, 54(28): 4330–4341.
- [25] Chen XX, Li D, Lü JX, et al. Determination of γ -aminobutyric acid and glutamic acid in human cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography. *Chin J Chromatogr*, 1997, 15(3): 237–239 (in Chinese).
陈希贤, 李东, 吕建新, 等. 高效液相色谱法测定人脑脊液中 γ -氨基丁酸和谷氨酸. *色谱*, 1997, 15(3): 237–239.
- [26] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobadllus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(7): 1168–1171.
- [27] 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 Bacteriol*, 2014, 196(6): 1222–1230.
- [28] Yu K, Hu S, Huang J, et al. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(3): 272–276.
- [29] Gromiha MM, Pathak MC, Saraboji K, et al. Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins. *Proteins*, 2013, 81(4): 715–721.
- [30] Shirley BA, Stanssens P, Hahn U, et al. Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry*, 1992, 31(3): 725–732.
- [31] Burley SK, Petsko GA. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, 1985, 229(4708): 23–28.
- [32] Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, et al. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 1998, 392(6674): 353–358.
- [33] Tina KG, Bhadra R, Srinivasan N. PIC: protein interactions calculator. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(S2): W473–W476.
- [34] Pace CN, Fu HL, Fryar KL, et al. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *J Mol Biol*, 2011, 408(3): 514–528.

(本文责编 郝丽芳)