

王世依, 赵毅雯, 贾田丽, 等. 微生物法合成 γ -氨基丁酸的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 94-101.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.011

微生物法合成 γ -氨基丁酸的研究进展

王世依, 赵毅雯, 贾田丽, 陈守文

湖北大学生命科学学院/省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 武汉 430062

摘要 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种四碳非蛋白质氨基酸,在食品、农业、医药、化工等领域具有广阔的应用前景。微生物法生产GABA因其温和、可持续发展等优势越来越受到人们的关注。因此,为了得到环保、便捷且效率更高的GABA生产方式,以满足食品、制药和畜牧领域对添加剂的严格要求,本文系统介绍了GABA的生产方法、生物体中的合成途径及微生物法生产GABA的研究进展,总结了目前全细胞催化法和微生物从头合成GABA的生产水平。研究者们致力于筛选和优化具有高催化效率和稳定性的酶并通过对微生物的代谢途径进行精细调控,以提高GABA的合成效率,未来的研究需要进一步优化酶和菌株的性能,降低生产成本,并探索更大规模的工业化生产途径。

关键词 γ -氨基丁酸; 合成途径; 微生物法合成; 谷氨酸脱羧酶

中图分类号 TQ922 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0094-08

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA),又称氨酪酸、哌啶酸、4-氨基丁酸,是一种广泛存在于脊椎动物、植物和微生物中的四碳非蛋白质氨基酸,分子式 $C_4H_9NO_2$,相对分子质量103.12,等电点为7.2^[1]。GABA极易溶于水,微溶于乙醇,不溶于醚和苯等常见有机溶剂。其结晶形状与所处的结晶体系有关,如以游离态形式存在的GABA通常呈现白色或类白色结晶性粉末状态;在乙醇中结晶为白色针状;而在甲醇或乙酸中为白色叶状^[2]。

Roberts等^[3]于1950年首次发现哺乳动物的大脑中含有大量的GABA。Brinley等^[4]发现GABA在哺乳动物的大脑中具有神经递质的作用,并且参与众多生理功能的调节。GABA的生理功能主要有降低血压、治疗癫痫、控制哮喘、调节心血管疾病、调节激素的分泌和增强肝肾功能等,除此之外,GABA还有镇静安神、增强记忆、抗衰老、抗癌功效^[5-6]。GABA在植物细胞中主要有调控生长信号分子、储藏碳素和维持pH的功能,可加强植物在干旱、盐碱和病原菌侵染等逆境中的抵抗能力^[7-8]。GABA在微生物中主要是保持菌体内pH的稳定,使菌体适应酸性的环境^[9-10]。鉴于GABA在动植物中扮演重要的生理角色,其市场需求量日益增加。目前GABA的生

产方法包括化学合成法、植物富集法、全细胞催化法和微生物发酵法等,其中,全细胞催化法和微生物发酵法生产GABA受到普遍关注。

尽管目前微生物法生产GABA已经取得了大量的进展,但仍存在一些问题,面临的挑战包括全细胞催化的生产成本较高、微生物发酵法的分离提纯难度大等。另外,还存在产酶菌株和谷氨酸脱羧酶高效表达的最适pH不一致、磷酸吡哆醛辅因子价格高等问题。本文概述了目前GABA的生产方法,对微生物法合成GABA的研究进展进行归纳总结,并对今后的研究方向进行展望,旨在为得到更加环保、便捷且高效率的GABA生产方式提供方向。

1 γ -氨基丁酸的生产方法

1.1 化学合成法

化学合成法生产GABA最常使用的方法是以邻苯二甲酰亚氨钾和 γ -氯丁氰为原料,在180℃下发生剧烈反应后,将获得的产物用浓硫酸进行水解,最后通过结晶的方法获得^[11]。该方法对环境会造成较大的污染,且安全性差,生产成本低,获得的GABA不能用于食品行业中。

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2100200)

王世依, E-mail: D20240010@hubu.edu.cn

通信作者: 陈守文, E-mail: mel212@126.com

1.2 植物富集法

植物体内具有谷氨酸脱羧酶,能够将谷氨酸脱羧基转化成GABA,植物会在高温、低氧或盐碱等逆境胁迫下促使体内GABA的富集^[12-13]。沈强等^[14]通过对茶叶进行真空 N_2 厌氧处理,茶叶中的GABA含量提高至1.86 mg/g。玉米幼苗根系中的GABA含量相对较高,被视为富集GABA的优良植株^[15]。此植物富集法虽然具有生产安全性,但是提取工艺复杂,产量太低,不适合工业生产。

1.3 全细胞催化法

全细胞催化法是利用能够产生谷氨酸脱羧酶的微生物细胞催化底物L-Glu脱去羧基,得到GABA。生物催化法生产GABA常用的菌株是具有较高谷氨酸脱羧酶活性的乳酸菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和芽胞杆菌(*Bacillus*),目前已经开发多种微生物用于催化合成GABA^[16-18]。虽然全细胞催化法可以快速获得高浓度的GABA,但是该过程需要利用大量L-Glu或L-谷氨酸钠作为底物,还要添加磷酸吡哆醛作为辅因子,在最适的催化反应条件下才能完成,生产成本相对较高。

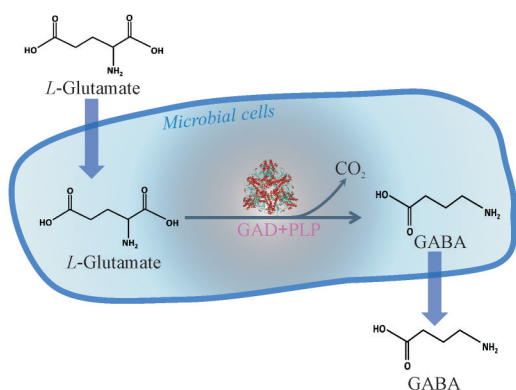


图1 全细胞催化合成GABA的过程
Fig. 1 The process of synthesizing GABA catalyzed by whole-cell catalysis

1.4 微生物发酵法

微生物发酵法是直接利用廉价的碳源和氮源进行发酵合成GABA,该方法生产成本低,而且较为安全,发酵条件不受环境、空间、资源的影响,可进一步促进GABA在工业上的应用,因此,该方法越来越受关注^[19-20]。但是,此方法产物得率低,培养基成分复杂,后期GABA分离纯化成本较高,目前应用于大规模生产较为困难。

综合上述的GABA生产方法,可知利用微生物生产GABA具有环保、反应温和、成本低的优势。为

了提高微生物法合成GABA的产量,研究者们还需要进行深入的探索。

2 生物体中 γ -氨基丁酸的合成途径

2.1 谷氨酸脱羧酶途径

谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)普遍存在于动物、植物和微生物中,特异性催化L-Glu脱去羧基生成GABA和 CO_2 ,具体过程如图2所示^[21]。GAD是一种磷酸吡哆醛(PLP)依赖酶,当没有底物时,PLP的4-甲酰基与酶活性位点上一个保守赖氨酸残基的共价键结合,内部形成醛亚胺结构^[22]。在催化过程中,L-Glu进入催化口袋,PLP从赖氨酸中被分离出来并与底物中氨基结合,在外部形成醛亚胺结构。在此基础上,脱羧反应后得到了一种稳定性较差的醌类中间体,该中间体可迅速转变为与PLP结合的醛亚胺,并在此过程中产生GABA,PLP和GAD在反应结束后恢复到初始状态。除了L-Glu,谷氨酸钠(俗称味精)因廉价易得,不少研究者也将谷氨酸钠作为前体物质添加到转化液中生产GABA^[23]。



图2 谷氨酸脱羧酶催化合成GABA的过程
Fig. 2 The process of synthesizing GABA catalyzed by glutamate decarboxylase

不同来源的GAD在分子质量大小、蛋白亚基数、对底物的亲和性以及最适催化条件方面均有不同程度的差异(表1)。根据不同来源GAD的 K_m 值可知,细菌中的GAD与底物具有更高的亲和力。

在GAD催化过程中,pH是较为关键的因素。由于GAD的羧基端在酸性pH条件下可以自由摆动,但在接近中性条件时,羧基端会进入催化通道,阻碍底物与活性位点结合,影响催化活性。为了更好地利用GAD合成GABA,大多数研究致力于通过蛋白质工程改造GAD,将其最适pH偏向于中性。有研究表明,将大肠杆菌来源的GAD羧基端的15个氨基酸敲除后,GAD的活性pH范围向中性偏移0.5个单位^[24]。

2.2 腐胺途径

在大肠杆菌中,GABA可经腐胺分解产生。腐胺

表1 不同来源GAD结构和理化性质比较

Table 1 Comparison of structure and physicochemical properties between different GAD

来源 Species origin	分子量/ku Molecular size	亚基数 Subunit number	最适温度/°C Optimum temperature	最适pH Optimal pH	对谷氨酸的K _m 值/ (mmol/L) K _m value of L-Glu	参考文献 References
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	53	6	37	4.0~4.5	0.6	[24]
短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>	33	2	30	4.2	1.0	[25]
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	48	6	40	5.0~5.5	13.0	[26]
大豆 Soybean	48	2	40	5.8	19.4	[27]
小麦 Wheat	50	6	37	5.8	8.5	[28]
小鼠脑 Mouse brain	44	2	37	7.0	0.7	[29]

分解为GABA有2条途径,一条是由腐胺转氨酶YgjG和γ-氨基丁醛脱氢酶YdcW催化合成GABA,另一条是由Puu途径(由puu操纵子编码)合成GABA,最后,

GABA经过γ-氨基丁醛转氨酶GabT和琥珀酸半醛脱氢酶GadD转化为琥珀酸进入TCA循环^[30](图3)。

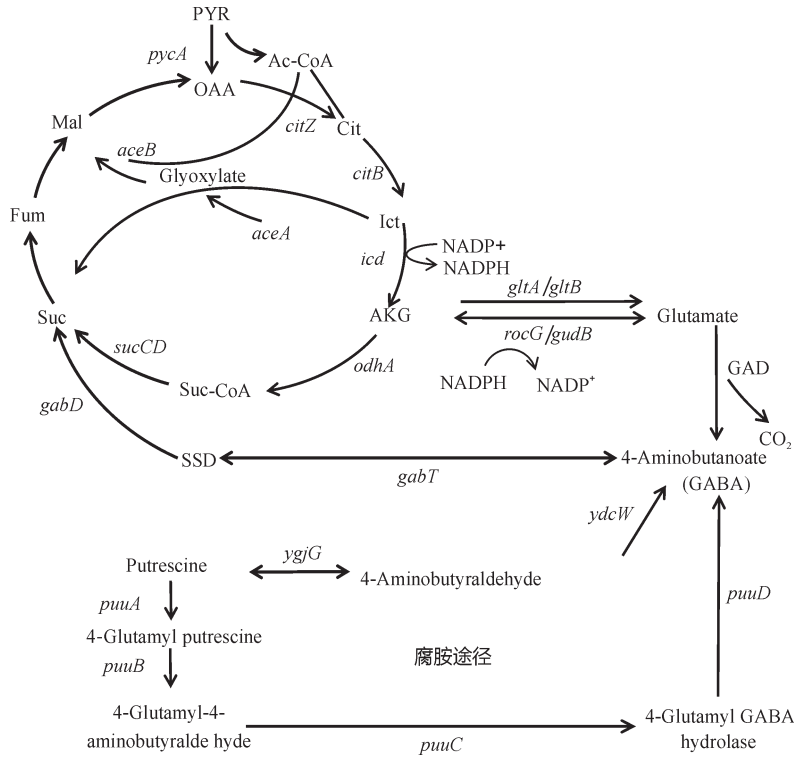


图3 大肠杆菌中GABA的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of GABA in *Escherichia coli*

腐胺代谢途径较为复杂,而且,若以腐胺为前体物质催化合成GABA,成本较高,故而很少应用^[31]。然而,由于腐胺途径中催化合成GABA的酶在中性pH条件下具有较高的活性,可以避免由于菌株生长和GAD酶活pH需求不同的矛盾,因此,采用腐胺途径构建生产GABA的工程菌株是一种新思路。

3 利用微生物生产γ-氨基丁酸

3.1 全细胞催化合成γ-氨基丁酸

目前广泛应用于全细胞催化合成GABA的菌株种类包括大肠杆菌、芽胞杆菌、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等,研究内容主要集中于全细胞催化工程菌株的构建、催化体系的优化以及谷氨酸脱羧酶GAD的改造等,

目的是高效合成GABA。

GAD可以特异性催化L-Glu或谷氨酸钠进行脱羧反应生成GABA,故在全细胞催化法中,GABA的产量与GAD的催化性能息息相关,因此提升GAD活性成为高效催化合成GABA的突破口。Yuan等^[32]从链霉菌中克隆了谷氨酸脱羧酶基因,并在酿酒酵母BJ5464中进行重组表达,发现BJ5464/SsGAD是生产 γ -氨基丁酸的高效全细胞生物催化剂,优化反应条件后,重组细胞重复使用催化10批次后GABA产量累计达62.6 g/L,该研究为首次关于工程酵母细胞高水平生产 γ -氨基丁酸报道。Shi等^[33]介绍了一种利用短乳杆菌TCCC13007高效全细胞催化生产GABA的方法,对培养条件进行优化,在最佳催化条件下,静息细胞催化80 g/L谷氨酸和240 g/L谷氨酸钠的混合物,最终转化率为99.4%,GABA含量达到201.18 g/L。Wang等^[34]利用乳酸菌直接以L-Glu为底物进行催化反应,最终获得205 g/L的GABA。Yang等^[35]利用工程化大肠杆菌催化生产GABA达到307.4 g/L,转化率达到99.4%。

谷氨酸脱羧酶的高效表达和高酶活是全细胞催化生产GABA的关键。2020年,邱玲^[36]引入来自大肠杆菌中的GAD在枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)中进行表达,优化了最适温度及pH后,引入了吡哆醛氧化酶(PdxH),其重组菌酶活最高达到31.86 U/mL。阳元娥等^[37]构建了重组大肠杆菌谷氨酸脱羧酶表达菌株,通过优化诱导条件,提高了可溶性蛋白的表达,使GAD酶活达到41.2 U/mL,提升了11.1%。笔者所在实验室提出通过促进地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis* DW2)二硫键的形成来提高含二硫键蛋白GAD表达活性的新策略,通过表达元

件优化和强化半胱氨酸合成途径,挖掘并鉴定了地衣芽胞杆菌内源二硫键异构酶StoA和二硫键氧化还原酶BdbCD并进行强化表达,然后引入来源于大肠杆菌DH5 α 的二硫键氧化还原酶DsbA和毕赤酵母GS115的二硫键异构酶PDI,获得地衣芽胞杆菌工程菌的GAD酶活达到65.6 U/mL;优化发酵培养基后使GAD酶活达到80.5 U/mL,是目前报道GAD酶活的最高水平^[38],在最佳催化条件下,GABA产量最高达到560 g/L,菌体重复使用3次后转化率仍然保持100%^[39]。

3.2 葡萄糖直接发酵生产 γ -氨基丁酸

目前已经发现具备GABA合成途径的微生物有大肠杆菌、乳酸菌、酵母菌和曲霉等^[40]。但是,自然条件下GABA的合成水平较低,不能满足工业化需求,近年来众多研究者采用代谢工程改造的方法来提高菌株从头合成GABA的能力。

1)菌株的分子育种。Yu等^[41]将编码谷氨酸脱羧酶基因*gadA*、*gadB*和转运蛋白基因*gadC*在*E. coli* BL21(DE3)中游离表达,最终工程菌合成GABA的能力达到3.98 g/L。在*E. coli*中首先敲除转氨酶基因*gabT*,然后采用蛋白质支架将GAD和GadC连接表达,最终使GABA的产量达到5.65 g/L^[42]。Pham等^[43]也通过蛋白质支架将异柠檬酸脱氢酶、谷氨酸合成酶和谷氨酸脱羧酶连接起来,在*E. coli*中游离表达,使得GABA的产量提高了2.2倍。Takahashi等^[44]在*C. glutamicum*中转入大肠杆菌来源的*gadB*,在葡萄糖培养基中经过72 h发酵,摇瓶发酵合成12.4 g/L的GABA,发酵罐产量可达70.6 g/L(表2)。Shi等^[45]在*C. glutamicum*中引入短乳杆菌来源的谷氨酸脱羧酶基因,经过分批补料发酵72 h后可产生32.8 g/L的GABA。Wen等^[46]利用

表2 从头合成GABA的重组菌株

Table 2 *De novo* production of GABA by engineering microorganisms

菌株 Strains	特征 Descriptions	摇瓶GABA产量 GABA titer in shake flask	发酵罐GABA产量 GABA titer in fermentor	来源 References
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>icd, gltB, gadA, gadB, ΔackA, ΔgabT</i>	1.3	—	[43]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>ΔgadT, gadB, gadC, icdA, gdhA, dr1558</i>	2.8	6.2	[47]
<i>E. coli</i> BW25113	<i>ΔlacI, ΔgabT, ΔsucA, ΔaceA, tetR, pyc, gdhA, gadB, gadC</i>	4.8	—	[48]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>gadB1, gadB2, ppc</i>	12.4	70.6	[44]
<i>C. glutamicum</i> XW6	<i>gadRCB2</i>	18.8	77.6	[25]
<i>B. subtilis</i>	<i>gadB</i>	5.3	—	[49]
<i>B. licheniformis</i> DW2	<i>gadB, ΔgabT, citZ-icd-mdh, pycA, pdhA, rocG</i>	20.9	—	本研究 Our lab

谷氨酸棒状杆菌分泌表达来自大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶突变体,通过优化分泌表达系统,GABA发酵罐产量达到77.6 g/L(表2),葡萄糖转化率为0.44 g/g。笔者所在课题组在*B. licheniformis* DW2中引入谷氨酸脱羧酶,采用代谢工程的手段系统改造了地衣芽胞杆菌中心代谢途径,通过强化三羧酸循环、平衡乙醛酸循环和增强Glu合成途径等,获得了1株从头高效合成GABA的高产菌株,摇瓶产量达到20.9 g/L,葡萄糖转化率为0.4 g/g。

2)发酵工艺优化。不同微生物合成GABA的能力有所差别,除了菌体自身代谢的差异外,也受发酵条件的影响,如pH、温度和培养基成分等^[40]。发酵条件必须根据微生物和产物的特点进行优化以期达到最优的发酵效果。pH是影响GABA合成的关键因素,不同微生物来源的谷氨酸脱羧酶GAD具有菌种特异性。Yu等^[41]发现在*E. coli* BL21工程菌中发酵生产GABA,当控制pH为4.2时,产量达到最大值16.14 g/L。Li等^[50]发现唾液链球菌在pH为4.5时GABA产量最高达到7.98 g/L。为了解决菌体生长和谷氨酸脱羧酶最适pH不兼容的问题,笔者所在课题组在谷氨酸棒状杆菌中引入大肠杆菌来源的谷氨酸脱羧酶,采用两阶段pH值发酵策略实现了GABA的高产,产量为62.5 g/L(未发表)。由于谷氨酸棒状杆菌生长最适pH为中性,而GAD最适pH为酸性,因此控制菌体生长阶段pH为中性,可使菌体生长至最佳状态,后期将pH控制为酸性,使GAD发挥最大活性,可以显著提高GABA的合成水平。温度不仅影响菌株的生长状态,也会影响酶的催化活性。有研究指出,植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)在30℃的发酵条件下可以有效地生产GABA^[51]。培养基的组分包括碳源、氮源和生物素等都会影响微生物生产GABA的能力,为了满足工业化生产GABA的需求,需降低生产成本,通常学界采用廉价的碳源做培养基^[40]。孙红梅等^[52]将来自植物乳杆菌的GAD整合至枯草芽胞杆菌中,构建了1株直接利用廉价的葡萄糖生产GABA的重组菌,通过添加生物素等,使产量达8.28 g/L。以乳酸菌作为微生物发酵菌株,赵安琪^[31]优化了培养基的碳源种类和添加浓度等条件,使GABA产量提升到75.5 g/L。总之,通过优化发酵工艺,可以显著提高微生物的生长速率和代谢活性,从而增加目标产物的产量。

4 展 望

近年来,随着GABA在各个行业的广泛应用,微生物法合成GABA因安全性高、绿色环保、周期短、成本低而备受关注。然而,微生物法合成GABA存在一些瓶颈问题,如缺乏高效底盘菌株、限速酶活性低、菌株与限速酶最适pH值不兼容、从头合成底物利用率低、代谢压力影响菌株生长等。针对以上问题,为了进一步提高微生物法生产GABA的竞争力,笔者提出以下几点展望。

1)利用全细胞催化法高效合成GABA。全细胞催化合成GABA的核心是提高GAD的催化活性。研究者可以重点从以下几方面开展:(1)从自然界中筛选性能更佳的谷氨酸脱羧酶;(2)GAD酶的改造:利用酶分子改造技术,筛选出催化效率更高、稳定性更强的GAD突变体,拓宽GAD酶促pH适应性,使其最适pH偏向于中性环境;(3)构建更优良的GAD高效表达宿主,实现GAD的高效表达。

2)微生物从头发酵法高效合成GABA。微生物从头发酵合成GABA是一种有前景的生物技术,未来研究方向和发展趋势包括:(1)通过基因工程和合成生物学手段,进一步改造和优化现有的微生物菌株,提高GABA的产量和生产效率;(2)探索使用非传统原料,如农业副产品和木质纤维素等物质,作为可再生资源进行GABA生产,以降低成本;(3)通过代谢通量分析,揭示生产菌株补料发酵过程GABA代谢调控机制,以提高GABA的产量和生产效率等。

综上所述,全细胞催化法和微生物从头发酵法均是利用微生物合成GABA,具有环保、生产效率高、食品安全等优势。全细胞催化法侧重于提高GAD的酶活,而微生物从头发酵法则侧重于降低生产成本,各有千秋。这些研究方向和趋势将有助于微生物法合成GABA技术的进一步发展,提高GABA在工业生产中的竞争力和应用范围,满足不断增长的市场需求,为人类健康和可持续发展做出更大的贡献。

参考文献 References

- [1] 杨胜远,陆兆新,吕风霞,等.γ-氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J].食品科学,2005,26(9):546-551.YANG S Y, LU Z X, LU F X, et al. Research progress on microbial glutamate decarboxylase[J]. Food science, 2005, 26(9): 546-551 (in Chinese with English abstract).
- [2] HIGUCHI T, HAYASHI H, ABE K. Exchange of glutamate

- and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain[J]. Journal of bacteriology, 1997, 179(10): 3362-3364.
- [3] ROBERTS E, FRANKEL S. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid[J]. Journal of biological chemistry, 1950, 187(1): 55-63.
- [4] BRINLEY F J, KANDEL E R, MARSHALL W H. Effect of gamma-amino butyric acid (GABA) on K42 outflux from rabbit cortex[J]. Journal of neurophysiology, 1960, 23: 237-245.
- [5] SU A P, YU Q J, LUO Y, et al. Metabolic engineering of microorganisms for the production of multifunctional non-protein amino acids: γ -aminobutyric acid and δ -aminolevulinic acid[J]. Microbial biotechnology, 2021, 14(6): 2279-2290.
- [6] ZHANG Y, ZHAO J, WANG X L, et al. Model-guided metabolic rewiring for gamma-aminobutyric acid and butyrolactam biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [J/OL]. Biology, 2022, 11(6): 846 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.3390/biology11060846>.
- [7] 宋红苗, 陶跃之, 王慧中, 等. GABA在植物体内的合成代谢及生物学功能[J]. 浙江农业科学, 2010, 51(2): 225-229. SONG H M, TAO Y Z, WANG H Z, et al. Synthesis metabolism of GABA in plants and its biological functions[J]. Journal of Zhejiang agricultural sciences, 2010, 51(2): 225-229 (in Chinese).
- [8] TURNER G W, CUTHBERTSON D J, VOO S S, et al. Experimental sink removal induces stress responses, including shifts in amino acid and phenylpropanoid metabolism, in soybean leaves[J]. Planta, 2012, 235(5): 939-954.
- [9] SARASA S B, MAHENDRAN R, MUTHUSAMY G, et al. A brief review on the non-protein amino acid, γ -amino butyric acid (gaba): its production and role in microbes[J]. Current microbiology, 2020, 77(4): 534-544.
- [10] LUO H Z, LIU Z, XIE F, et al. Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives[J]. Critical reviews in biotechnology, 2021, 41(4): 491-512.
- [11] 沈萌. γ -氨基丁酸的制备研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2011. SHEN M. Preparation of γ -aminobutyric acid by two methods[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [12] MAE N, MAKINO Y, OSHITA S, et al. Accumulation mechanism of γ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O_2 with and without CO_2 [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2012, 60(4): 1013-1019.
- [13] TSUSHIDA T, MURAI T. Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions[J]. Agricultural and biological chemistry, 1987, 51: 2865-2871.
- [14] 沈强, 潘科, 郑文佳, 等. 厌氧/好氧处理对茶叶中GABA含量富集及其品质的影响研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(9): 146-152. SHEN Q, PAN K, ZHENG W J, et al. Effect of anaerobic and aerobic treatment on γ -aminobutyric acid enrichment in tea and on its quality[J]. Journal of Southwest University (natural science edition), 2012, 34(9): 146-152 (in Chinese with English abstract).
- [15] 周翔, 吴晓岚, 李云, 等. 盐胁迫下玉米幼苗ABA和GABA的积累及其相互关系[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 412-415. ZHOU X, WU X L, LI Y, et al. Accumulations and correlations of ABA and GABA in maize seedling under salt stress[J]. Chinese journal of applied and environmental biology, 2005, 11(4): 412-415 (in Chinese with English abstract).
- [16] PARK J Y, PARK Y L, CHOI T R, et al. Production of γ -aminobutyric acid from monosodium glutamate using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* KCTC 3498[J]. Korean journal of chemical engineering, 2020, 37(12): 2225-2231.
- [17] ZHAO A Q, HU X Q, LI Y, et al. Extracellular expression of glutamate decarboxylase B in *Escherichia coli* to improve gamma-aminobutyric acid production[J/OL]. AMB express, 2016, 6(1): 55 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0231-y>.
- [18] ZHAO A Q, HU X Q, PAN L, et al. Isolation and characterization of a gamma-aminobutyric acid producing strain *Lactobacillus buchneri* WPZ001 that could efficiently utilize xylose and corn cob hydrolysate[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(7): 3191-3200.
- [19] CUI Y H, MIAO K, NIYAPHORN S, et al. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(3): 995 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>.
- [20] GOURDON P, LINDLEY N D. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic engineering, 1999, 1(3): 224-231.
- [21] YU K, HU S, HUANG J, et al. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase [J]. Enzyme and microbial technology, 2011, 49(3): 272-276.
- [22] JOHN R A. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes[J]. Biochimica et biophysica acta, 1995, 1248(2): 81-96.
- [23] LE VO T D, KO J S, PARK S J, et al. Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by employing synthetic complex between glutamate decarboxylase and glutamate/GABA antiporter in engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2013, 40(8): 927-933.
- [24] CAPITANI G, DE BIASE D, AURIZI C, et al. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase[J]. The EMBO journal, 2003, 22(16): 4027-4037.
- [25] SHI F, LI Y X. Synthesis of γ -aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032[J]. Biotechnology letters, 2011, 33(12): 2469-2474.
- [26] LIU Q D, CHENG H J, MA X Q, et al. Expression, character-

- ization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium* [J]. *Biotechnology letters*, 2016, 38(7):1107-1113.
- [27] JOHNSON B S, SINGH N K, CHERRY J H, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(1):39-44.
- [28] 范军, 李纯, 朱苏文, 等. 小麦谷氨酸脱羧酶的纯化及部分性质研究 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14(5):641-644. FAN J, LI C, ZHU S W, et al. Purification and some properties of glutamate decarboxylase from wheat seedling [J]. *Chinese journal of biochemistry and molecular biology*, 1998, 14(5):641-644 (in Chinese with English abstract).
- [29] WU J Y, MATSUDA T, ROBERTS E. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain [J]. *The journal of biological chemistry*, 1973, 248(9):3029-3034.
- [30] KURIHARA S, KATO K, ASADA K, et al. A putrescine-inducible pathway comprising PuuE-YneI in which gamma-aminobutyrate is degraded into succinate in *Escherichia coli* K-12 [J]. *Journal of bacteriology*, 2010, 192(18):4582-4591.
- [31] 赵安琪. 微生物发酵法高效生产 γ -氨基丁酸的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017. ZHAO A Q. Production of gamma-aminobutyric acid by microbial fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [32] YUAN H N, ZHANG W, XIAO G N, et al. Efficient production of gamma-aminobutyric acid by engineered *Saccharomyces cerevisiae* with glutamate decarboxylases from *Streptomyces* [J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2020, 67(2):240-248.
- [33] SHI X F, CHANG C Y, MA S X, et al. Efficient bioconversion of L-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2017, 44(4/5):697-704.
- [34] WANG Q, LIU X H, FU J H, et al. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912 [J/OL]. *Microbial cell factories*, 2018, 17(1):80 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0919-6>.
- [35] YANG X W, KE C R, ZHU J M, et al. Enhanced productivity of gamma-amino butyric acid by cascade modifications of a whole-cell biocatalyst [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102(8):3623-3633.
- [36] 邱玲. *E. coli* 谷氨酸脱羧酶在 *B. subtilis* 中的异源表达、发酵优化及制备 γ -氨基丁酸的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020. QIU L. Heterologous expression and fermentation optimization of *E. coli* glutamate decarboxylase in *B. subtilis*, and its application in preparation of GABA [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [37] 阳元娥, 李永莲, 张媛媛, 等. 重组大肠杆菌高效催化合成 γ -氨基丁酸 [J]. *生物技术*, 2019, 29(5):434-440. YANG Y E, LI Y L, ZHANG Y Y, et al. Synthesis of γ -aminobutyric acid catalyzed by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology*, 2019, 29(5):434-440 (in Chinese with English abstract).
- [38] WANG S Y, ZHAO Y W, MAO S F, et al. Enhancing the activity of disulfide-bond-containing proteins via promoting disulfide bond formation in *Bacillus licheniformis* [J/OL]. *International journal of biological macromolecules*, 2023, 233:123468 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123468>.
- [39] 赵毅雯. 重组地衣芽胞杆菌高效表达谷氨酸脱羧酶及催化合成 γ -氨基丁酸 [D]. 武汉: 湖北大学, 2023. ZHAO Y W. Engineering *Bacillus licheniformis* for high-efficiency expression of glutamate decarboxylase and whole-cell biocatalyst for GABA production [D]. Wuhan: Hubei University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [40] 张瑞姣, 杨鹏, 宫安东, 等. 微生物发酵生产 γ -氨基丁酸的研究进展 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2023, 36(1):162-172. ZHANG R J, YANG P, GONG A D, et al. Research progress on the production of gamma-aminobutyric acid by microbial fermentation [J]. *Journal of Xinyang Normal University (natural science edition)*, 2023, 36(1):162-172 (in Chinese with English abstract).
- [41] YU P, CHEN K F, HUANG X X, et al. Production of γ -aminobutyric acid in *Escherichia coli* by engineering MSG pathway [J]. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 2018, 48(10):906-913.
- [42] LE VO T D, KIM T W, HONG S H. Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli* [J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2012, 35(4):645-650.
- [43] PHAM V D, LEE S H, PARK S J, et al. Production of gamma-aminobutyric acid from glucose by introduction of synthetic scaffolds between isocitrate dehydrogenase, glutamate synthase and glutamate decarboxylase in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Journal of biotechnology*, 2015, 207:52-57.
- [44] TAKAHASHI C, SHIRAKAWA J, TSUCHIDATE T, et al. Robust production of gamma-amino butyric acid using recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase from *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and microbial technology*, 2012, 51(3):171-176.
- [45] SHI F, JIANG J J, LI Y F, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by co-expressing two glutamate decarboxylase genes from *Lactobacillus brevis* [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2013, 40(11):1285-1296.
- [46] WEN J B, BAO J. Improved fermentative γ -aminobutyric acid production by secretory expression of glutamate decarboxylase by *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Journal of biotechnology*, 2021, 331:19-25.
- [47] PARK S H, SOHN Y J, PARK S J, et al. Effect of DR1558, a *Deinococcus radiodurans* response regulator, on the production

- of GABA in the recombinant *Escherichia coli* under low pH conditions [J/OL]. *Microbial cell factories*, 2020, 19 (1) : 64 [2024-06-20].<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01322-3>.
- [48] SOMA Y, FUJIWARA Y, NAKAGAWA T, et al. Reconstruction of a metabolic regulatory network in *Escherichia coli* for purposeful switching from cell growth mode to production mode in direct GABA fermentation from glucose [J]. *Metabolic engineering*, 2017, 43:54-63.
- [49] PARK E J, GARCIA C V, YOUN S J, et al. Fortification of γ -aminobutyric acid and bioactive compounds in *Cucurbita moschata* by novel two-step fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* [J]. *LWT*, 2019, 102:22-29.
- [50] LI H X, CAO Y S. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid [J]. *Amino acids*, 2010, 39 (5) : 1107-1116.
- [51] IORIZZO M, PAVENTI G, DI M C. Biosynthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactiplantibacillus plantarum* in fermented food production [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 46(1):200-220.
- [52] 孙红梅, 饶志明, 李秀鹏, 等. 以葡萄糖为底物一步法合成 γ -氨基丁酸整合型重组钝齿棒杆菌的构建 [J]. *微生物学报*, 2013, 53(8) : 817-824. SUN H M, RAO Z M, LI X P, et al. One-step fermentation converting glucose in γ -aminobutyric acid by a recombinant *Corynebacterium crenatum* [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2013, 53 (8) : 817-824 (in Chinese with English abstract).

Progress in microbial synthesis of gamma-aminobutyric acid

WANG Shiyi, ZHAO Yiwen, JIA Tianli, CHEN Shouwen

National Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering Jointly Built by the Ministry and the Province/College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a four carbon and non-protein amino acid with broad application prospects in food, agriculture, medicine, chemical and other fields. The production of GABA with microbial methods has been received increasing attention due to its advantages of mildness and sustainable development. Therefore, this article systematically introduced the methods of producing GABA, the biosynthetic pathways in organisms, and the progress in studying the microbial production of GABA to achieve an environment-friendly, convenient, and more efficient method of producing GABA that meets the strict requirements for additives in the food, pharmaceutical, and animal husbandry industries. It summarized the current level of whole-cell catalysis and *de novo* microbial synthesis of GABA. Researchers are committed to screening and optimizing enzymes with high efficiency and stability of catalysis, and improving the efficiency of synthesizing GABA by finely regulating the metabolic pathways of microorganisms. Studies in the future need to optimize the performance of enzymes and strains, reduce costs of production, and explore pathways for industrialized production at larger scale.

Keywords gamma-aminobutyric acid (GABA); synthetic pathways; microbial synthesis; glutamate decarboxylase

(责任编辑:边书京)