

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023 年 8 月 3 日 (03.08.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/142178 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C12N 9/88* (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

*C12N 15/60* (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)

*C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/076360

(22) 国际申请日: 2022 年 2 月 15 日 (15.02.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210086048.3 2022 年 1 月 25 日 (25.01.2022) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 饶志明(RAO, Zhiming); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 韩瑾(HAN, Jin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 杨套伟(YANG, Taowei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 徐美娟(XU, Meijuan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 张显(ZHANG, Xian); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL

(54) **Title:** GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE MUTANT WITH IMPROVED PH TOLERANCE AND USE THEREOF IN GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID SYNTHESIS

(54) 发明名称: 一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在  $\gamma$ -氨基丁酸合成中的应用

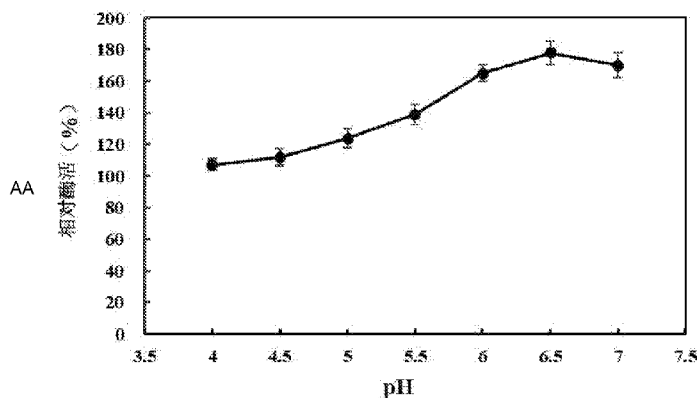


图 3

AA Relative enzyme activity (%)

(57) **Abstract:** Provided is a glutamic acid decarboxylase (GAD) mutant with improved pH tolerance and use thereof in gamma-aminobutyric acid synthesis. The mutant is obtained by mutating an amino acid sequence, such as the GAD set forth in SEQ ID NO. 3. The enzyme activity at pH 6.5 of the mutant is increased to 178% of the original sequence (SEQ ID NO. 3). In a 12-h feed-batch culture with 1000 g of substrate in a 5-L bioreactor, the final yield is as high as 688.13 g/L, with a 52% production performance improvement compared with the original GAD and a final molar conversion rate of up to 98.2%.

(57) **摘要:** 提供一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在  $\gamma$ -氨基丁酸合成中的应用, 该突变体通过将氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示的谷氨酸脱羧酶突变得到的; 该突变体在 pH 6.5 时的酶活提高至原始 (SEQ ID NO.3 所示) 的 178%, 在 5L 罐中 12h 分批补料 1000g 底物最终产量高达 688.13g/L, 比原始谷氨酸脱羧酶生产性能提高约 52%, 最终摩尔转化率可达 98.2%。



WO 2023/142178 A1

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路188号吴中万达广场A座苏州大学国家科技园2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

# 一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在 $\gamma$ -氨基丁酸合成中的应用

## 技术领域

本发明属于生物工程技术领域，具体涉及一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在 $\gamma$ -氨基丁酸合成中的应用。

## 背景技术

GABA ( $\gamma$ -氨基丁酸) 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸，作为哺乳动物中枢神经系统中主要的抑制性神经递质，具有抗焦虑、降血压、镇定安神、增强记忆、预防肥胖及糖尿病等多种重要的生理功能，因而被广泛应用于医药及食品领域。

目前，有关 GABA 的制备方法主要有化学合成法和生物合成法两大类。根据生物催化剂种类的不同，后者又可进一步细分为植物转化法、微生物转化法和酶法。常见的 GABA 化学合成法主要有两种。一种是以邻苯二甲酰亚胺钾和  $\gamma$ -氯丁腈为底物，在 180℃ 条件下反应后，产物再与浓硫酸回流水解，经结晶提纯得到 GABA。另一种方法是以吡咯烷酮作为原料，在 121℃-135℃ 下反应，经  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  水解开环而制得 GABA。由于工业生产反应条件苛刻，且反应过程容易产生有毒物质，因此 GABA 的生产主要为微生物酶法合成，利用谷氨酸脱羧酶 (GAD) 能催化 L-谷氨酸脱羧生成  $\gamma$ -氨基丁酸，反应过程中消耗一个质子。

GAD 广泛存在于细菌、酵母和丝状真菌等各种微生物中，介导了胞内 GABA 的合成。利用含有 GAD 的微生物转化制备 GABA，不受资源、环境和空间等限制，成为工业化生产 GABA 最为有效的手段之一，受到人们普遍关注。目前，自然界中存在的 GAD 最适 pH 普遍在 4.0-5.0 之间，在中性 pH 下酶活力急剧下降，而在微生物自然发酵或转化过程中，由于菌体催化活性往往会随着酵液中

GABA 积累所导致 pH 值的上升而降低，从而致使底物转化率偏低。因此拓宽谷氨酸脱羧酶的 pH 作用范围可有助于底物转化率的提高。

## 发明内容

本发明旨在提供一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体及其在 $\gamma$ -氨基丁酸合成中的应用，在偏中性条件下的酶活提高，能够提高制备 $\gamma$ -氨基丁酸的转化效率。

按照本发明的技术方案，所述 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体，通过将氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示的谷氨酸脱羧酶经以下任一方式突变得得到：

- (1) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示；
- (2) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 88 位的天冬氨酸突变为精氨酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；
- (3) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 309 位的酪氨酸突变为赖氨酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示；
- (4) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 88 位的天冬氨酸突变为精氨酸以及第 309 位的酪氨酸突变为赖氨酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

SEQ ID NO.3 所示谷氨酸脱羧酶与 GB 01-21 菌株谷氨酸脱羧酶（氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示）相比具有四个氨基酸残基突变，分别是第 72 位脯氨酸突变为苏氨酸、第 154 位丙氨酸突变为苏氨酸、第 185 位甲硫氨酸突变为缬氨酸以及第 412 位亮氨酸突变为苯丙氨酸。

编码 SEQ ID NO.3 所示谷氨酸脱羧酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

本发明的第二方面提供了编码上述 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体的基因。

进一步的，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10 或 SEQ ID NO.12 所示。

具体的，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示谷氨酸脱羧酶突变体的基因，

其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示谷氨酸脱羧酶突变体的基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示；编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.9 所示谷氨酸脱羧酶突变体的基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示；编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示谷氨酸脱羧酶突变体的基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示。

本发明的第三方面提供了携带上述基因的重组表达载体。

进一步的，以 pET-28a、PMA5 或 PXMJ-19 作为原始表达载体。

本发明的第四方面提供了含有上述重组表达载体的重组菌。

进一步的，所述重组菌以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或谷氨酸棒杆菌作为宿主菌。

进一步的，所述枯草芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168, BS168)。

本发明的第五方面提供了上述 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体、基因、重组表达载体或重组菌在合成 $\gamma$ -氨基丁酸中的应用。

进一步的，以 L-谷氨酸或 L 谷氨酸钠为底物，上述 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体或重组菌为催化剂，生成 $\gamma$ -氨基丁酸。

进一步的，以 0.9% NaCl 溶液为转化体系，不需要调节 pH，转化以后产物提取简单。

进一步的，温度为 25-60℃。

本发明的技术方案相比现有技术具有以下优点：

本发明通过将谷氨酸脱羧酶进行突变，不仅拓宽了 GAD 在最适 pH 下的酶活，还拓宽其在偏中性 pH 下的酶活，增强了该酶合成 $\gamma$ -氨基丁酸的能力，使其更适应于工业生产；

试验结果表明，在不同 pH 条件下本发明的谷氨酸脱羧酶突变体比亲本谷氨酸脱羧酶的酶活均有所上升，特别是突变方式为第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 88 位天冬氨酸突变为精氨酸以及第 309 位酪氨酸残基突变成赖氨酸残基时，

在 pH 6.5 时的酶活提高至原始 (SEQ ID NO.3 所示) 的 178%，在 5 L 罐中 12 h 分批补料 1000 g 底物最终产量高达 688.13 g/L，比原始谷氨酸脱羧酶提高约 52%，最终摩尔转化率可达 98.2%。

## 附图说明

图 1 是突变株的 SDS-PAGE 图。

图 2 为不同突变体的相对酶活。

图 3 是为三组合突变株在不同 pH 下的相对酶活。

图 4 是为三组合突变株在不同温度下的相对酶活。

## 具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施，但所举实施例不作为对本发明的限定。

### 实施例 1 含编码谷氨酸脱羧酶突变体基因的重组表达载体的构建

以含有 SEQ ID NO: 4 所示核苷酸序列的 pET-28a 重组质粒为模板，分别以含有突变位点的引物扩增出突变位点上下游的基因片段，采用融合 PCR 法构建突变基因，其中组合突变体通过以单突变质粒为模板以含有突变位点的引物扩增出突变位点上下游基因片段，再采用融合 PCR 法，最终可得到一系列基因。具体如下：

| 引物             | 基因                     |
|----------------|------------------------|
| P1/P2、P3/P20   | lpgad <sup>S24R</sup>  |
| P1/P4、P5/P20   | lpgad <sup>D88R</sup>  |
| P1/P6、P7/P20   | Lpgad <sup>L135K</sup> |
| P1/P8、P9/P20   | Lpgad <sup>E170R</sup> |
| P1/P10、P11/P20 | Lpgad <sup>H196R</sup> |
| P1/P12、P13/P20 | Lpgad <sup>A225K</sup> |
| P1/P14、P15/P20 | Lpgad <sup>Y309K</sup> |

|                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| P1/P16、P17/P20             | Lpgad <sup>A359R</sup>           |
| P1/P18、P19/P20             | Lpgad <sup>E417K</sup>           |
| P1/P2、P3/P4、P5/P20         | lpgad <sup>S24R/D88R</sup>       |
| P1/P2、P3/P6、P7/P20         | lpgad <sup>S24R/L135K</sup>      |
| P1/P2、P3/P8、P9/P20         | lpgad <sup>S24R/E170R</sup>      |
| P1/P2、P3/P10、P11/P20       | lpgad <sup>S24R/H196R</sup>      |
| P1/P2、P3/P12、P13/P20       | lpgad <sup>S24R/A225K</sup>      |
| P1/P2、P3/P14、P15/P20       | lpgad <sup>S24R/Y309K</sup>      |
| P1/P2、P3/P16、P17/P20       | lpgad <sup>S24R/A359R</sup>      |
| P1/P2、P3/P18、P19/P20       | lpgad <sup>S24R/E417K</sup>      |
| P1/P2、P3/P4、P5/P14、P15/P20 | lpgad <sup>S24R/D88R/Y309K</sup> |

P1: ATGGCAATGTTATACGGTAAACACAAT

P2: CTTAGGAAGATCATGTTGTTTCGCGAGG

P3: GGTGCGCCTCGCGAACAACATGATCTT

P4: TCAGATTTCCGGATGGCATTCTTTCGC

P5: TGCCATCCGGAAATCTGAGTACCCCCG

P6: CATTGCTTTACCGCCTAACATACAAGC

P7: AGGCGGTAAAGCAATGAAATTCGCCTG

P8: AAAGTTACGCCAGCAAAGTTGATAGCC

P9: TTGCTGGCGTAAGTTTTGTGTCTACTG

P10: TAAGACACGGTTAACGTCAAGGACCAT

P11: GTTAACCGTGTCTTAGACTACGTGGAC

P12: ATCGAGTTTGGCTAGGTCGTCATATTG

P13: CTAGCCAAAGTCGATAAGGTCGTTACT

P14: CCCACCTAATTTACTAACTTTGAAGAC

P15: AAAGTTAGTAAATTAGGTGGGGAGTTG

P16: CAGAGCGCGTGCCAGGTAGCGGGCAAC

P17: CTGGCACGCGCTCTGGATAAAGTTGGT

P18: TTGTTGTTTCAGATTAGCAGGGAAAGG

P19: AATCTGAAACAACAAGTCATCCAACGA

P20: TCAGTGTGTGAATAGGTATTTCTTAGG

利用限制性内切酶 EcoR I/Hind III 对表达质粒 pET-28a 进行酶切处理以获得线性化载体，目的基因与线性化载体连接后获得重组质粒，将重组质粒用化学转化法转化至大肠杆菌 JM109 中，涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板，37 °C 下培养过夜，随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定和测序验证，结果表明含有编码谷氨酸脱羧酶突变体的基因的重组表达载体成功转化至克隆载体大肠杆菌 JM109 中，经测序验证突变成功的菌液提取重组质粒保存于 -20 °C 冰箱。测序工作由苏州金唯智完成。

### 实施例 2 在大肠 BL21 中进行 GAD 突变体的表达及纯化

将含有突变基因的 pET-28a 重组质粒采用化学转化法转化至大肠杆菌 BL21 中。重组大肠杆菌经过 16 °C 诱导 12 h 后离心收集菌体破碎细胞，采用镍柱进行蛋白纯化，所得纯化酶添加 10% 的甘油于 4 °C 贮存备用。纯化后的酶用 SDS-PAGE 进行分析，其中 *E.coli* BL21/pET-28a-lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 结果参见图 1，其中 M，蛋白质 Marker；泳道 1，pET28a；泳道 2，lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 突变体上清；泳道 3，纯化 lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 突变体。结果表明得到电泳纯的重组谷氨酸脱羧酶突变体。

### 实施例 3 谷氨酸脱羧酶的酶活测定及 $\gamma$ -氨基丁酸的 HPLC 检测

测定了实施例 2 中所得一系列纯化酶（谷氨酸脱羧酶突变体）在最适 pH 4.5 以及 pH 6.0 时与 L-谷氨酸反应时的相对酶活（以 SEQ ID NO.3 所示酶活为 100%），如图 2 所示，结果显示：lpgad<sup>S24R</sup>、lpgad<sup>S24R/D88R</sup>、lpgad<sup>S24R/Y309K</sup> 和 lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 的相对酶活较高，且 pH 6.0 条件下相对酶活高于 pH 4.5。

同时测定谷氨酸脱羧酶 *lpgad*<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 突变体在 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0（如图 3 所示，可以看出其在 pH6.5 时相对酶活最高，pH5.0-7.0 时相对酶活均处于较高水平）以及在 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、50 °C、55 °C、60 °C 时的相对酶活（如图 4 所示）。反应 30 min 后取样用 HPLC 法测产物  $\gamma$ -氨基丁酸的含量。

定义酶活单位为：1 个酶活单位（U）等于在 30 °C 下，在 1 min 内催化 L-谷氨酸生成 1 nmol  $\gamma$ -氨基丁酸所需的酶量。比酶活为 1 mg 湿细胞的酶活，单位为 U/mg。酶与底物发生脱羧反应的 1 mL 反应体系采用的各物质浓度为：0.01 mM PLP、100 mM L-谷氨酸钠。在反应之前分别把缓冲液和酶液在 30 °C 下预热 5 min，然后混匀，在 30 °C 下反应 30 min，最后迅速煮沸终止反应，离心。用 5%三氯乙酸(TCA)稀释 5 倍，在 4 °C 冰箱沉淀蛋白 3 h 左右，然后用 HPLC 检测。

HPLC: 取反应液用 5%三氯乙酸(TCA)稀释 5 倍，在 4 °C 冰箱沉淀蛋白 3 h 左右离心，取上清液用 0.22  $\mu$ 膜进行过滤处理。然后进样。色谱柱：dimosil C18 (5  $\mu$ L, 250 mm $\times$ 4.6 mm)，流动相：A: 0.1% 甲酸水溶液，B: 100% 乙腈，检测器：UV Detector，检测波长：360 nm，柱温：25 °C，进样量：10  $\mu$ L，流速：1.0 mL/min。过程：0~22 min:15%B $\rightarrow$ 50%B；22~22.1 min:50%B $\rightarrow$ 15%B；22.1~26 min:15%B。

#### 实施例 4 *lpgad*<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 在枯草芽孢杆菌中的构建

以实施例 1 构建的 pET-28a-*lpgad*<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 质粒为模板，以引物 P1/P2 扩增获得目的基因，并利用限制性内切酶 *Bam*H I/*Mlu* I 对表达质粒 PMA5 进行酶切处理以获得线性化载体，目的基因与线性化载体连接后获得重组质粒 PMA5-*lpgad*<sup>S24R/D88R/Y309K</sup>，将重组质粒用化学转化法转化至大肠杆菌 JM109 中，涂布于含氨苄霉素抗性的 LB 平板，37 °C 下培养过夜，随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定，结果表明含有编码谷氨酸脱羧酶突变体基因的重组质粒成功转化至克隆载体大肠杆菌 JM109 中，挑取经验证为阳性菌落接种于 5 mL LB 液体培养

基中于 37 °C 下培养过夜，菌液提取重组质粒保存于 -20 °C 冰箱。

P1: ATGGCAATGTTATACGGTAAACACAAT

P2: TCAGTGTGTGAATAGGTATTTCTTAGG

采用化学转化法将构建成功的 PMA5-lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 重组质粒转化至枯草芽孢杆菌 BS168 中构建 BS168/PMA5-lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 重组菌株，涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板，37 °C 下培养过夜，随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定，验证转化成功的菌液加入甘油并于 -80 °C 冰箱保藏。

#### **实施例 5** BS168/PMA5-lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 工程菌制备 $\gamma$ -氨基丁酸

将实施例 4 中的 BS168/PMA5-lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 突变型工程菌进行 L-谷氨酸底物的转化。在 5 L 罐中以 1 L 0.9% NaCl 溶液为缓冲体系，菌量 OD<sub>600nm</sub> 控制为 16，分批添加 100 g/L L-谷氨酸，在 30 °C 下反应 12 h，lpgad<sup>S24R/D88R/Y309K</sup> 工程菌分批补料 1000 g 底物最终产量高达 688.13 g/L，比原始酶提高约 52%，摩尔转化率最高可达 98.2%。结果表明该突变酶的催化效率明显提升，具有广阔的工业化应用前景。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

## 权 利 要 求 书

1、一种 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体，其特征在于，通过将氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示的谷氨酸脱羧酶经以下任一方式突变得得到：

- (1) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸；
- (2) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 88 位的天冬氨酸突变为精氨酸；
- (3) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 309 位的酪氨酸突变为赖氨酸；
- (4) 第 24 位丝氨酸突变为精氨酸，第 88 位的天冬氨酸突变为精氨酸以及第 309 位的酪氨酸突变为赖氨酸。

2、编码权利要求 1 所述的 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体的基因。

3、如权利要求 2 所述的基因，其特征在于，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10 或 SEQ ID NO.12 所示。

4、携带权利要求 2 或 3 所述基因的重组表达载体。

5、如权利要求 4 所述的重组表达载体，其特征在于，以 pET-28a、PMA5 或 PXMJ-19 作为原始表达载体。

6、含有权利要求 4 或 5 所述重组表达载体的重组菌。

7、如权利要求 6 所述的重组菌，其特征在于，所述重组菌以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或谷氨酸棒杆菌作为宿主菌。

8、如权利要求 7 所述的重组菌，其特征在于，所述枯草芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌 168。

9、如权利要求 1 所述的 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体、权利要求 2 或 3 所述的基因、权利要求 4 或 5 所述的重组表达载体或权利要求 6、7 或 8 所述的重组菌在合成 $\gamma$ -氨基丁酸中的应用。

10、如权利要求 9 所述的应用，其特征在于，以 L-谷氨酸或 L 谷氨酸钠为底物，权利要求 1 所述的 pH 耐受性提高的谷氨酸脱羧酶突变体或权利要求 8 所述的重组菌为催化剂，生成 $\gamma$ -氨基丁酸。

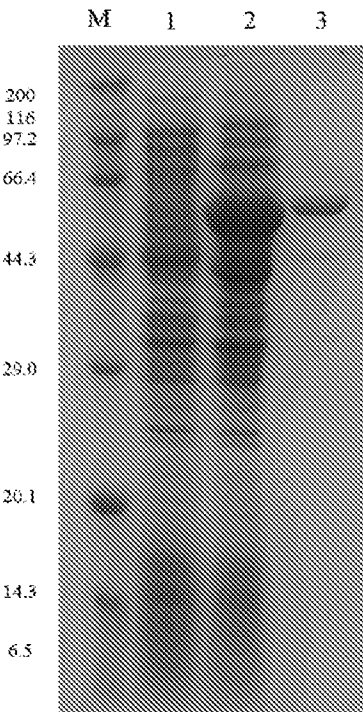


图 1

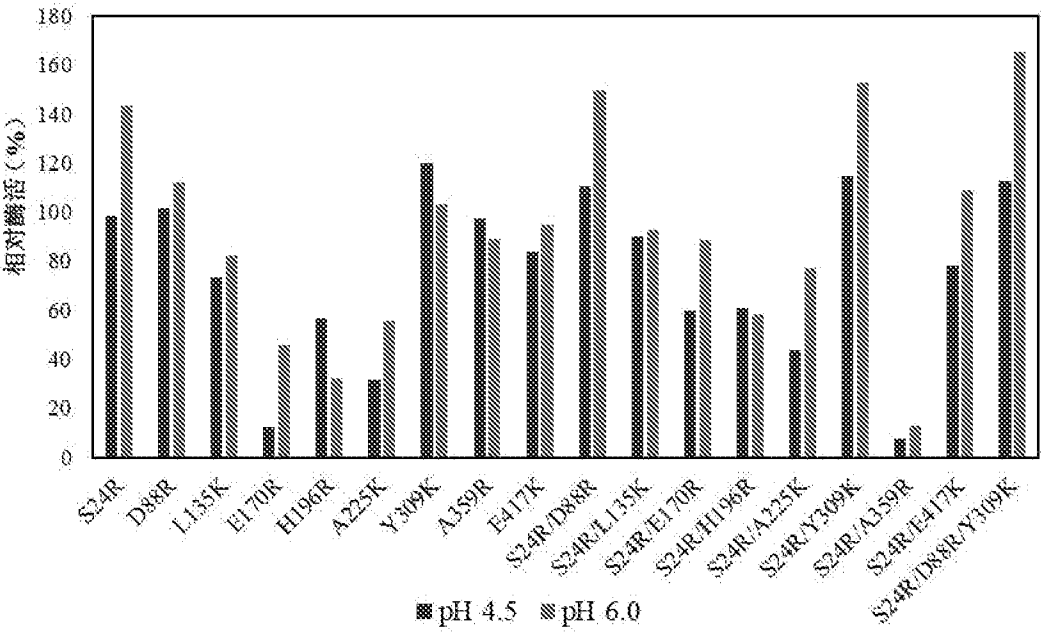


图 2

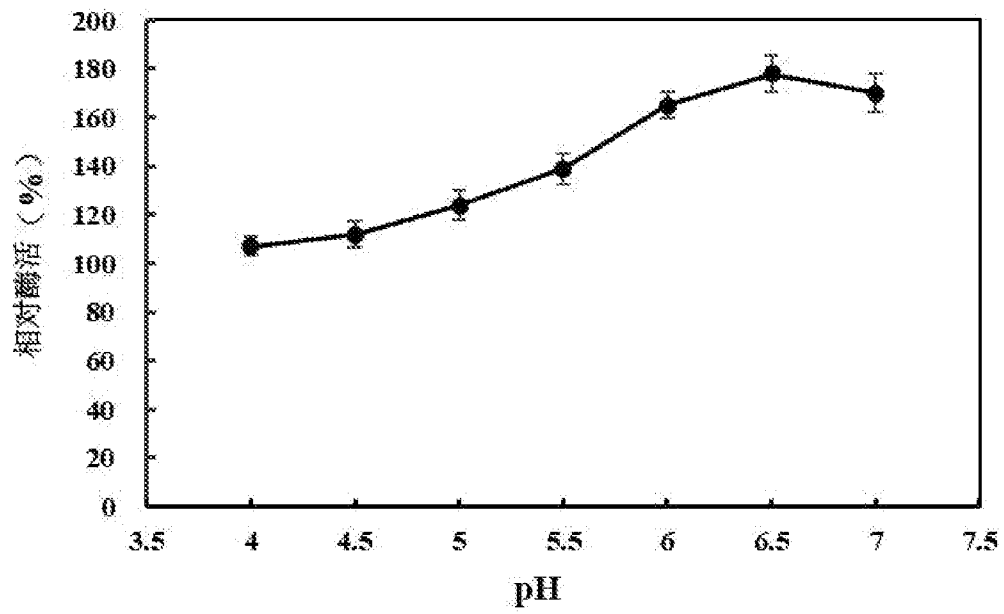


图 3

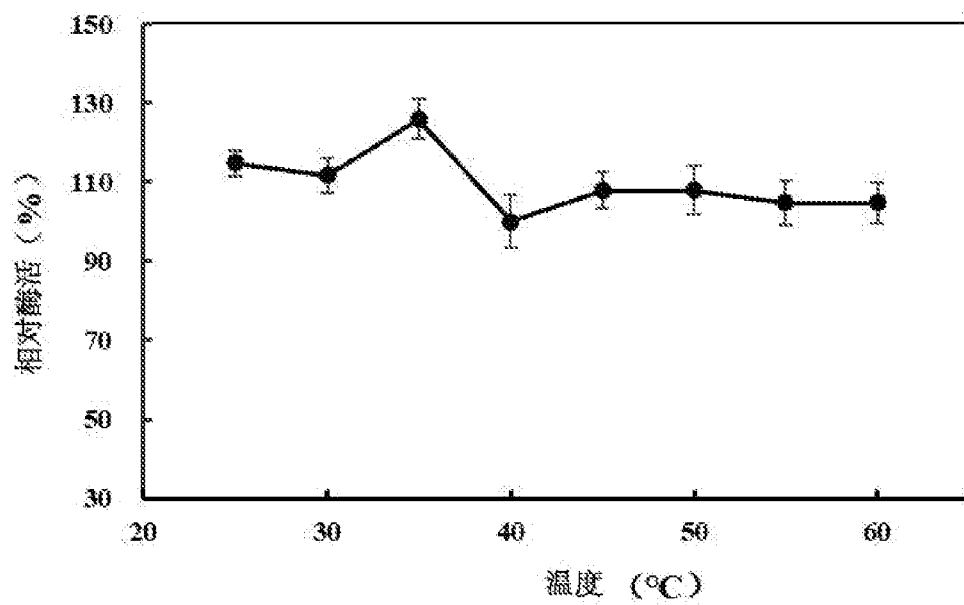


图 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/076360

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, VCN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 读秀, DUXIU, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 植物乳杆菌, Lb.plantarum, 谷氨酸脱羧酶, glutamate decarboxylase, SEQ ID NOs: 1, 3, 7, 9, 11,  $\gamma$ -氨基丁酸, gamma-aminobutyric acid.**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 114525268 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 May 2022 (2022-05-24)<br>entire document                                       | 1-10                  |
| A         | CN 105296456 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 03 February 2016 (2016-02-03)<br>entire document                                  | 1-10                  |
| A         | WO 2015092576 A1 (BASF SE et al.) 25 June 2015 (2015-06-25)<br>entire document                                         | 1-10                  |
| A         | CN 106754850 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 31 May 2017 (2017-05-31)<br>entire document           | 1-10                  |
| A         | CN 112391372 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 23 February 2021 (2021-02-23)<br>entire document | 1-10                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 October 2022

Date of mailing of the international search report

20 October 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing  
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/076360

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
| A                                      | 谭霄等 (TAN, Xiao et al.). "1株产 $\gamma$ -氨基丁酸植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达 (Cloning and Expressing of Glutamate Decarboxylase Gene from <i>Lactobacillus plantarum</i> Producing $\gamma$ -Aminobutyric Acid)"<br><i>食品科学 (Food Science)</i> , Vol. volume 39, No. 18, 31 December 2018 (2018-12-31),<br>pages 159-165 | 1-10                  |
| A                                      | SHIN, S. M. et al. "Characterization of Glutamate Decarboxylase from <i>Lactobacillus plantarum</i> and Its C-Terminal Function for the pH Dependence of Activity"<br><i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> ,<br>Vol. 62, No. 50, 31 December 2014 (2014-12-31),<br>pages 12186-12193          | 1-10                  |
| A                                      | HO, N. A. T. et al. "Expanding the active pH range of <i>Escherichia coli</i> glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness"<br><i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> , Vol. 115, No. 2, 31 December 2013 (2013-12-31),<br>pages 154-158                                               | 1-10                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/076360

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed:
    - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - ☐ on paper or in the form of an image file.
  - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/076360**

| Patent document<br>cited in search report |            |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| CN                                        | 114525268  | A  | 24 May 2022                          | None                    |                                      |
| CN                                        | 105296456  | A  | 03 February 2016                     | None                    |                                      |
| WO                                        | 2015092576 | A1 | 25 June 2015                         | None                    |                                      |
| CN                                        | 106754850  | A  | 31 May 2017                          | None                    |                                      |
| CN                                        | 112391372  | A  | 23 February 2021                     | None                    |                                      |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/076360

| <b>A. 主题的分类</b><br>C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i<br>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                              |                                      |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------|-------------------|---------|----|---------------------------------------------------------|------|---|--------------------------------------------------------|------|---|----------------------------------------------------------------|------|---|-----------------------------------------------------------|------|---|-------------------------------------------------------------|------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>C12N; C12P<br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))<br>VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, VCN, CNKI, 万方, 百度学术, 读秀, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: 植物乳杆菌, Lb.plantarum, 谷氨酸脱羧酶, glutamate decarboxylase, SEQ ID NOs:1, 3, 7, 9, 11, $\gamma$ -氨基丁酸, gamma-aminobutyric acid.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                              |                                      |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| <b>C. 相关文件</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 114525268 A (江南大学) 2022年5月24日 (2022 - 05 - 24)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105296456 A (江南大学) 2016年2月3日 (2016 - 02 - 03)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015092576 A1 (BASF SE 等) 2015年6月25日 (2015 - 06 - 25)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106754850 A (华东理工大学) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112391372 A (浙江科技学院 等) 2021年2月23日 (2021 - 02 - 23)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>谭霄等. "1株产 <math>\gamma</math>-氨基丁酸植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达"<br/>食品科学, 第39卷, 第18期, 2018年12月31日 (2018 - 12 - 31),<br/>第159-165页</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                              |                                      | 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | PX | CN 114525268 A (江南大学) 2022年5月24日 (2022 - 05 - 24)<br>全文 | 1-10 | A | CN 105296456 A (江南大学) 2016年2月3日 (2016 - 02 - 03)<br>全文 | 1-10 | A | WO 2015092576 A1 (BASF SE 等) 2015年6月25日 (2015 - 06 - 25)<br>全文 | 1-10 | A | CN 106754850 A (华东理工大学) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31)<br>全文 | 1-10 | A | CN 112391372 A (浙江科技学院 等) 2021年2月23日 (2021 - 02 - 23)<br>全文 | 1-10 | A | 谭霄等. "1株产 $\gamma$ -氨基丁酸植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达"<br>食品科学, 第39卷, 第18期, 2018年12月31日 (2018 - 12 - 31),<br>第159-165页 | 1-10 |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                            | 相关的权利要求                              |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CN 114525268 A (江南大学) 2022年5月24日 (2022 - 05 - 24)<br>全文                                                      | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 105296456 A (江南大学) 2016年2月3日 (2016 - 02 - 03)<br>全文                                                       | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2015092576 A1 (BASF SE 等) 2015年6月25日 (2015 - 06 - 25)<br>全文                                               | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 106754850 A (华东理工大学) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31)<br>全文                                                    | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 112391372 A (浙江科技学院 等) 2021年2月23日 (2021 - 02 - 23)<br>全文                                                  | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 谭霄等. "1株产 $\gamma$ -氨基丁酸植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达"<br>食品科学, 第39卷, 第18期, 2018年12月31日 (2018 - 12 - 31),<br>第159-165页 | 1-10                                 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                              |                                      |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| * 引用文件的具体类型:<br>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)<br>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件<br>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件<br>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性<br>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性<br>"&" 同族专利的文件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                              |                                      |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| 国际检索实际完成的日期<br>2022年10月9日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                              | 国际检索报告邮寄日期<br>2022年10月20日            |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              | 受权官员<br>李有朝<br>电话号码 86-(10)-53961930 |      |                   |         |    |                                                         |      |   |                                                        |      |   |                                                                |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                                                              |      |

| C. 相关文件 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 类 型*    | 引用文件，必要时，指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                                     | 相关的权利要求 |
| A       | SHIN, S.M. 等. "Characterization of Glutamate Decarboxylase from Lactobacillus plantarum and Its C-Terminal Function for the pH Dependence of Activity"<br>Journal of Agricultural and Food Chemistry,<br>第62卷, 第50期, 2014年12月31日 (2014 - 12 - 31),<br>第12186-12193页 | 1-10    |
| A       | H0, N.A.T. 等. "Expanding the active pH range of Escherichia coli glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness"<br>Journal of Bioscience and Bioengineering,<br>第115卷, 第2期, 2013年12月31日 (2013 - 12 - 31),<br>第154-158页                                    | 1-10    |

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/076360

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|----------------|
| CN          | 114525268  | A  | 2022年5月24日     | 无    |                |
| CN          | 105296456  | A  | 2016年2月3日      | 无    |                |
| WO          | 2015092576 | A1 | 2015年6月25日     | 无    |                |
| CN          | 106754850  | A  | 2017年5月31日     | 无    |                |
| CN          | 112391372  | A  | 2021年2月23日     | 无    |                |