

## 酶法转化生产 $\alpha$ -酮酸的研究进展

张权<sup>1,3</sup>, 宋伟<sup>1</sup>, 张灿<sup>1</sup>, 裴杉杉<sup>1,2</sup>, 陈修来<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 罗秋玲<sup>1,3</sup>, 刘立明<sup>1</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

3 无锡宸明生物科技有限公司, 江苏 无锡 214122

张权, 宋伟, 张灿, 等. 酶法转化生产  $\alpha$ -酮酸的研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1193–1205.

Zhang Q, Song W, Zhang C, et al. Recent advances in enzymatic production of alpha-keto acids. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1193–1205.

**摘要:**  $\alpha$ -酮酸是一种同时含有羧基和酮基的双官能团有机化合物, 广泛应用于食品、药品和化妆品等行业。为了满足环境友好、安全高效和可持续发展的社会要求, 利用酶转化法生产  $\alpha$ -酮酸受到人们的广泛关注。文中从酶的筛选、酶的改造以及酶的转化条件优化 3 个方面介绍丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、酮亮氨酸、酮缬氨酸、苯丙酮酸和酮蛋氨酸酶法合成的研究状况, 并展望了  $\alpha$ -酮酸进一步高效生产的发展方向。

**关键词:**  $\alpha$ -酮酸, 酶转化, 蛋白质工程

## Recent advances in enzymatic production of alpha-keto acids

Quan Zhang<sup>1,3</sup>, Wei Song<sup>1</sup>, Can Zhang<sup>1</sup>, Shanshan Pei<sup>1,2</sup>, Xiulai Chen<sup>1</sup>, Jia Liu<sup>1</sup>,  
Qiuling Luo<sup>1,3</sup>, and Liming Liu<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Wuxi Chenming Biotechnology Co., Ltd., Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Alpha-keto acid is a bifunctional organic compound containing both carboxyl and ketone groups, and widely applied in the industries of food, pharmaceutical and cosmetics. Based on the demand of eco-friendly process, safety and sustainable development, production of  $\alpha$ -keto acids by enzymatic conversion technology has been paid more and more attention. In this article, we review the status of  $\alpha$ -keto acids biosynthesis from three aspects: enzymatic screening, enzymatic modification and optimization of enzymatic conversion conditions. Meanwhile, we also indicate future research directions for further improving  $\alpha$ -keto acids production.

**Keywords:**  $\alpha$ -keto acids, enzymatic conversion, protein engineering

**Received:** November 6, 2018; **Accepted:** January 9, 2019

**Supported by:** National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-08), Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province (No. BE2018623).

**Corresponding author:** Liming Liu. Tel: +86-510-85197357; Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn

国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08), 江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2018623) 资助。

酮酸是一类同时含有羧基和酮基的双官能团有机化合物。根据分子中羧基和酮基的相对位置可以将其分为 $\alpha$ -酮酸和 $\beta$ -酮酸。其中 $\alpha$ -酮酸包括丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、酮亮氨酸、酮缬氨酸、苯丙酮酸和酮蛋氨酸等。 $\alpha$ -酮酸是有机药物合成及生物合成的重要中间体,已广泛用于食品、医药、化工和化妆品等领域。

目前, $\alpha$ -酮酸的生产技术主要可以分为化学合成法、微生物发酵法和酶转化法3种。化学合成法是指某些特定的化学物质在苛刻的反应条件下生成目标产物,主要包括氧化法、水解法、双羰基化法和海因法等,化学法以一氯戊烷和一氧化碳为底物,八羰基二钴和钨络合物为催化剂在60℃条件下合成 $\alpha$ -酮亮氨酸,转化率达到71.1%<sup>[1]</sup>。但是反应过程中原料昂贵且复杂,工艺繁琐,反应条件苛刻不易被人们采用。发酵法指微生物直接发酵糖类原料或其他碳源生成 $\alpha$ -酮酸。但是采用直接发酵法生产某些 $\alpha$ -酮酸时产量较低,底物转化率低,比如 $\alpha$ -酮亮氨酸的碳酸转化率仅仅达到了0.17 g  $\alpha$ -酮亮氨酸/g 葡萄糖,难以满足工业化的要求<sup>[2-3]</sup>。酶转化法指利用微生物中某些酶高选择性的催化性质,将底物特定分子氨基酸催化转化为价值更高的 $\alpha$ -酮酸(图1)。在部分 $\alpha$ -酮酸的合成过程中,酶转化法与其他方法相比具有独特的优势,比如高选择性、高效性、无毒、低污染等特点。

近年来,酶法转化生产 $\alpha$ -酮酸已经成为研究热点,总结于表1。本综述以丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、酮亮氨酸、酮缬氨酸、苯丙酮酸和酮蛋氨酸为目标产物,从酶的筛选、酶的改造以及酶的转化条件优化3个方面详细论述 $\alpha$ -酮酸酶法合成的研究状况,并对未来 $\alpha$ -酮酸的高效生产进行了展望。

## 1 丙酮酸

丙酮酸(Pyruvic acid, PA)又称 $\alpha$ -氧代丙

酸,是在 $\alpha$ 碳上含有羰基的三碳一羧酸化合物,分子式为 $C_3H_4O_3$ ,相对分子质量为88.06。丙酮酸是许多酶催化的中间代谢物,参与体内的TCA循环,对于维持体内的氧化还原状态也发挥重要的作用,此外,丙酮酸还是一种重要的工业原料<sup>[21]</sup>。

### 1.1 酶的筛选

酶转化法合成丙酮酸的底物包括乳酸和丙氨酸。当以乳酸为底物时,涉及的酶包括L-乳酸氧化酶(L-lactate oxidase, LOD, EC 1.1.3.2)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27)和乙醇酸氧化酶(Glycolate oxidase, GO, EC 1.1.3.15)。谷劲松等从土壤样品中富集、筛选和纯化获得乳酸氧化酶的菌株SM-10#、SM-29#、SM-14#,总酶活力为1 469.50、1 310.64、1 103.55 U/mL。LDH借助辅酶的氧化型或还原型( $NAD^+$ 或NADH)在糖酵解过程中参与乳酸和丙酮酸的可逆转化<sup>[22]</sup>。郁书怀在乳酸片球菌*Pediococcus acidilactici*和戊糖片球菌*Pediococcus pentosaceus*中克隆LDH基因并在*E. coli*中实现了表达,对丙酮酸的比活性分别为422.1和835 U/mg,  $K_{cat}/K_m$ 值分别为3 157和658 mmol/(L·S)<sup>[23]</sup>。赵婷从副干酪乳杆菌*Lactobacillus paracasei* W2中克隆了LDH基因,表达成功后对丙酮酸具有较高的酶活性<sup>[24]</sup>。乙醇酸氧化酶能将乳酸氧化为丙酮酸,并伴随过氧化氢的生成,此过程以FMN为辅酶,氧气作为最终的电子受体<sup>[25]</sup>。Amy利用多形汉逊酵母*Hansenula polymorpha*和毕赤酵母*Pichia pastoris*分别表达来源于菠菜的乙醇酸氧化酶。当pH为8.0时,乙醇酸氧化酶活性最高,L-乳酸和丙酮酸对应的pKa分别为3.79和2.49,并且发现L-乳酸不会对该酶产生抑制效应,而底物丙酮酸会抑制该酶的活性<sup>[25]</sup>。

当以丙氨酸为底物时,主要包括L-丙氨酸脱氢酶(Alanine dehydrogenase, ALDH, EC

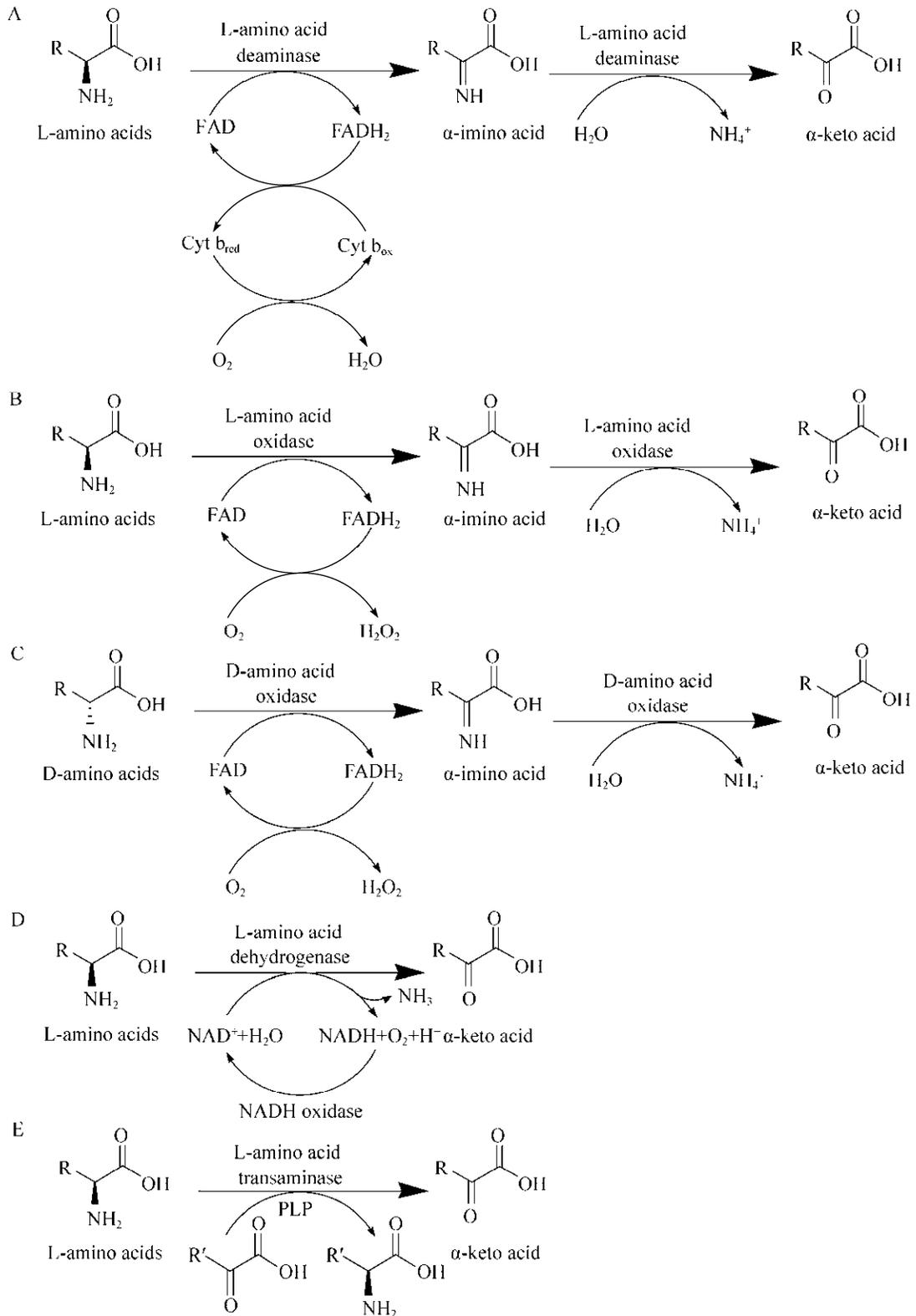
图 1 酶法转化氨基酸合成  $\alpha$  酮酸Fig. 1 Production of  $\alpha$ -keto acids from amino acid by enzymatic conversion technology. PLP: Pyridoxal 5'-phosphate.

表 1 酶转化法生产  $\alpha$ -酮酸Table 1 Production of  $\alpha$ -keto acids by enzymatic conversion technology

Product	Substrate	Enzyme	Source of enzyme	Coenzyme	Expressing host	Titer (g/L)	Conversion rate (%)	Reference
Pyruvic acid	L-alanine	Mutant of L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	14.57	29.14	[4]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	1.52	12.67	[5]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i> KCTC2566	FAD	<i>B. subtilis</i> 168	4.65	31.00	[6]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	Mutant of L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i> KCTC2566	FAD	<i>B. subtilis</i> 168	10.08	83.30	[7]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	L-glutamate oxidase	<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	FAD	<i>E. coli</i> BL21	104.70	96.10	[8]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	L-glutamate oxidase	<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	FAD	<i>E. coli</i> BL21	127.20	97.00	[9]
$\alpha$ -ketoglutarate acid	L-glutamic acid	L-glutamate oxidase, Catalase-peroxidase	<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672, <i>E. coli</i> W3110	FAD	<i>E. coli</i> BL21	103.10	94.60	[10]
$\alpha$ -ketoisocaproate	L-leucine	L-amino acid deaminase	<i>R. opacus</i> DSM 43250	FAD	NR	1.27	NR	[11]
$\alpha$ -ketoisocaproate	L-leucine	L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	61.50	95.70	[12]
$\alpha$ -ketoisocaproate	L-leucine	Mutant of L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	106.20	97.70	[13]
$\alpha$ -ketoisocaproate	L-leucine	L-amino acid deaminase	<i>P. vulgaris</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	86.55	94.25	[14]
$\alpha$ -ketoisovalerate	L-valine	L-amino acid deaminase	<i>P. myxofaciens</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	8.197	72.54	[15]
$\alpha$ -ketoisovalerate	L-valine	L-amino acid oxidase	<i>C. glutamicum</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	51.00	79.10	[16]
$\alpha$ -ketoisovalerate	L-valine	Mutant of L-amino acid oxidase	<i>C. glutamicum</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	54.60	84.60	[17]
Phenylpyruvate	L-phenylalanine	Mutant of L-amino acid deaminase	<i>P. mirabilis</i> KCTC2566	FAD	<i>E. coli</i> BL21	72.50	96.67	[18]
Phenylpyruvate	L-phenylalanine	Mutant M5 optimized by codon	<i>P. mirabilis</i> KCTC2566	FAD	<i>E. coli</i> BL21	83.00	98.20	[19]
$\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyric acid	L-methionine	L-amino acid oxidase optimized by codon	<i>R. erythropolis</i>	FAD	<i>E. coli</i> BL21	95.18	95.84	[20]

NR: not reported.

1.4.1.1)、L-氨基酸脱氨酶和氨基酸氧化酶。研究表明,来源于产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* 的丙氨酸脱氢酶分别以丙氨酸和丙酮酸为底物进行催化反应时,最适 pH 为 10.9 和 8.7。对丙氨酸、 $\text{NAD}^+$ 、丙酮酸、 $\text{NADH}$  和氨的  $K_m$  值分别为 0.47、0.16、0.22、0.067 和 66.7 mmol/L<sup>[26]</sup>。L-氨基酸脱

氨酶催化的氧化脱氨反应主要是酶与细胞膜上电子传递链相关,电子经过电子传递链传递给细胞色素氧化酶,使分子氧还原为水,生成  $\alpha$ -酮酸和氨<sup>[27]</sup>。L-氨基酸氧化酶是利用分子氧直接氧化还原型的 FAD,再生成氧化型的 FAD,生成过氧化氢、 $\alpha$ -酮酸和氨<sup>[28]</sup>。

## 1.2 酶的表达与改造

2016年, Hossain 等以大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)为表达宿主, 表达来自奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* 的 L-氨基酸脱氨酶基因 *pm1*, 构建了重组菌株 pET-20b(+)-*pm1* (*E. coli* BL21), 丙氨酸经过全细胞转化丙酮酸的产量达到了 1.14 g/L<sup>[4]</sup>。为了阻断丙氨酸和丙酮酸的去路, 敲除了基因 *cycA*、*amaP* 和 *lldP*, 丙酮酸的产量进一步得到提高, 达到了 5.38 g/L。为了提高转氨酶的催化效率, Hossain 等对 *pm1* 进行了定向进化, 经过 3 轮易错 PCR, 得到了突变体 *pm1ep3*, 使得丙酮酸的产量达到了 14.57 g/L, 转化率达到 29.14%<sup>[4]</sup>。该突变体对 L-丙氨酸的亲合力 ( $K_m$ ) 和催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 分别提高至 6.76 mmol/L 和 0.085 mmol/(L·s)。上述结果表明, 酶转化技术结合定向进化策略和代谢工程策略可以显著提高丙酮酸的产量。Simona 等将来源于红酵母 *Rhodotorula gracilis* 的氨基酸氧化酶用于丙氨酸的转化实验, 最终转化率达到 90% 以上<sup>[29]</sup>。

乳酸脱氢酶可以催化乳酸生成丙酮酸。Ping Xu 课题组以假单胞杆菌 *Pseudomonas stutzeri* SDM 为出发菌株, 以 25.5 g/L 的 D/L-乳酸为底物, 转化 24 h, 丙酮酸的产量达到了 22.6 g/L, 转化率高达 88.6%<sup>[30]</sup>。

## 2 $\alpha$ -酮戊二酸

$\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG) 是戊二酸的两种含酮基衍生物中的一种, 分子式为  $C_5H_6O_5$ , 相对分子质量为 146.1。 $\alpha$ -KG 是连接微生物细胞碳-氮代谢的关键节点, 是微生物三羧酸循环中重要的代谢中间物, 在氨基酸形成和氮转运中扮演着重要的角色<sup>[31]</sup>。 $\alpha$ -KG 作为保健品原料, 增加蛋白质的合成, 作为饲料添加剂可以缓解免疫性应激对畜牧氨基代谢的影响<sup>[32]</sup>。

## 2.1 酶的筛选

以 L-谷氨酸为底物酶法合成  $\alpha$ -KG 的酶包括谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH)、L-氨基酸脱氨酶 (L-amino acid deaminase) 和 L-谷氨酸氧化酶 (L-glutamate oxidase, LGOX, EC: 1.4.3.11)。Paul 等以黄化瘤胃球菌 *Ruminococcus flavefaciens* FD1 为出发菌株, 纯化并研究了谷氨酸脱氢酶 (EC: 1.4.1.4) 的性质, 该酶以  $NADP^+$  为辅酶, 在 0.5 mol/L KCl 溶液中的最适 pH 为 6.9–7.0, 对  $NH_3$ 、 $\alpha$ -KG、谷氨酸的  $K_m$  值分别为 19、0.41、62 mmol/L<sup>[33]</sup>。此外, 张克旭等研究了天津短杆菌 T6-13 谷氨酸脱氢酶的特性, 研究表明, 该酶对还原型辅酶 II (NADPH)、 $\alpha$ -KG、 $NH_3$ 、谷氨酸的  $K_m$  值分别为 0.076、3.23、4.0、120.48 mmol/L。并且该酶受反应产物的抑制, 正反应受 NADPH、 $\alpha$ -KG 和  $NH_4^+$  的抑制, 逆反应受  $NADP^+$  和谷氨酸的抑制<sup>[34]</sup>。

LGOX 是一种核黄素酶, 是以 FAD 为辅酶, 在不添加外源性辅助因子的条件下, 专一性地将 L-谷氨酸氧化脱氨, 生成氨、 $\alpha$ -KG 和过氧化氢。研究者测定了来源于链霉菌属 *Streptomyces endus*、*Streptomyces* sp. 18G 和 *Streptomyces* sp. X-119-6 的 LGOX 的生化特性<sup>[35-37]</sup>。LGOX 的蛋白大小分别为 90、120、77 kDa, 比酶活分别为 0.0024、0.15、0.056 U/mL。来源于 *Streptomyces endus* 的 LGOX  $K_m$  值最大为 1.1 mmol/L。Amina 等还对 *Streptomyces* sp. X-119-6 中的 LGOX 晶体结构进行了分析, 发现其蛋白活性部位在蛋白中心、底物和产物进出通道较窄, 并且活性部位残基不同造成底物专一性强<sup>[38]</sup>。

## 2.2 酶的表达与改造

2014年, Hossain 等以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 和 *E. coli* BL21 (DE3) 为表达宿主, 表达来自 *P. mirabilis* KCTC2566 的 L-氨基酸脱氨酶基因 *pmAAD*, 构建了重组菌株 pHT43-*pmAAD*

(*B. subtilis*)和 pET-20b(+)-pmAAD (*E. coli* BL21)。通过以 L-谷氨酸为底物进行全细胞转化 24 h, 重组菌株 pHT43-pmAAD (*B. subtilis*)转化率优于 pET-20b(+)-pmAAD (*E. coli* BL21),  $\alpha$ -KG 产量和转化率分别达到了 4.65 g/L 和 31%<sup>[6]</sup>, 其原因可能是 *B. subtilis* 可以去除错误折叠和不完整的蛋白来促进高质量蛋白的合成。为了提高 pmAAD 的催化效率, Hossain 等在前期的基础上对 pmAAD 进行蛋白质工程改造。首先, 通过易错 PCR 手段确定了影响催化效率的 6 个关键点, 分别为 F110、A255、E349、R228、T249 和 I352, 随后, 采用定点饱和突变的方法将 6 个位点分别突变为 F110I、A255T、E349D、R228C、T249S 和 I352A,  $\alpha$ -KG 的产量从之前的 4.65 g/L 提高到了 10.08 g/L, 转化率从 31% 提高到了 83.25%, 此时, 酶的亲和效率也有所提高 ( $K_m$  值从 49.21 mmol/L 降低到了 23.58 mmol/L)<sup>[7]</sup>。最后, Hossain 等采用 Cre/lox 无痕敲除系统阻断了 *B. subtilis* 中  $\alpha$ -KG 的降解路径,  $\alpha$ -KG 的产量得以提高, 达到了 12.21 g/L。上述研究表明, 蛋白质工程改造技术能够增强底物特异性和催化速率, 进而提高  $\alpha$ -KG 的产量。

利用 LGOX 催化 L-谷氨酸生成  $\alpha$ -酮戊二酸的过程会产生大量的  $H_2O_2$ , 该副产物不仅能影响菌体的生长还能抑制 LGOX 的活性, 进而影响转化反应的进行, 常常需要通过外源添加过氧化氢酶才能够保证转化反应的顺利进行, 此举提高了原料的成本。因此如何解决  $H_2O_2$  的添加问题成为酶法转化生产  $\alpha$ -酮戊二酸的关键问题之一。为了解决上述  $H_2O_2$  积聚问题, Wu 等将来源于 *E. coli* K12 W3110 的过氧化氢酶基因 *katG* 异源表达于 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 并结合重组酶 LGOX 和 KatG 的生化性质, 从转录水平和翻译水平构建了 LGOX 和 KatG 共表达菌株<sup>[10]</sup>。在转录水平上, 以 pET28a 为表达载体设定了 3 种不同策略构建共表达菌株

F008、FXC008、FXC009, 分别为: 策略一, 采用单启动模式将 LGOX 和 KatG 串联表达, 两个酶分别带有相同的 RBS 序列; 策略二, 采用双启动子模式于 LGOX 和 KatG 前面添加同样的启动子及相关序列; 策略三, 采用单启动子模式将 LGOX 和 KatG 通过 *Hind* III 直接串联在一起。结果发现 F008 更有利于  $\alpha$ -KG 的生产<sup>[10]</sup>。随后, 对单启动子双酶串联表达菌株中 KatG 基因前的 SD 序列与 ATG 之间的间隔进行了优化, 分别间隔 3、6、9、12 bp, 获得重组菌株 FXC003、FXC004、FXC005、FXC006, 重组菌株 FXC005 产酶效果和转化效果最优,  $\alpha$ -KG 产量达到了 86.7 g/L, 转化率为 79.6%<sup>[10]</sup>。在翻译水平上, 通过预测合适起始翻译速率的 RBS 序列以提高 KatG 有效表达量, 构建重组菌株 F006。重组菌株 F006  $\alpha$ -KG 产量达到了 103.1 g/L, 转化率达到 94.6%, 实现了不添加过氧化氢酶高效生产  $\alpha$ -酮戊二酸<sup>[10]</sup>。上述结果表明, 借助启动子工程策略优化多酶级联催化反应可以平衡  $H_2O_2$  的合成与消耗问题, 从而提高  $\alpha$ -KG 的产量。

### 2.3 酶的转化条件优化

在转化体系中添加过氧化氢酶解除过氧化氢对 LGOX 的抑制作用。牛盼清等通过优化底物 L-谷氨酸的浓度与  $H_2O_2$  酶的添加量, 发现当 L-谷氨酸浓度与  $H_2O_2$  酶酶活的最适比例为 12 : 5 (g : k), 此时  $\alpha$ -KG 产量为 32.9 g/L, 较优化前提高了 126.9%<sup>[39]</sup>。此外,  $Mn^{2+}$  对 LGOX 有激活作用, 牛盼清等研究了在转化过程中不同浓度的  $Mn^{2+}$  对  $\alpha$ -KG 产量的影响。研究表明, 当  $MnCl_2$  的添加量为 5 mmol/L 时, 转化 24 h,  $\alpha$ -KG 产量达到最高 38.1 g/L, 较未添加  $Mn^{2+}$  提高了 15.8%<sup>[39]</sup>。樊祥臣也研究了  $Mn^{2+}$  浓度对  $\alpha$ -KG 产量的影响, 当  $Mn^{2+}$  浓度为 1 mmol/L 时, 结合正交实验最优的结果, 转化 24 h,  $\alpha$ -KG 的产量达到最大值 127.2 g/L, 转化率为 97.0%<sup>[9]</sup>。

### 3 酮亮氨酸

$\alpha$ -酮异己酸 ( $\alpha$ -ketoisocaproate, KIC) 又名  $\alpha$ -酮亮氨酸, 是亮氨酸的前体物质, 分子式为  $C_6H_{10}O_3$ , 相对分子质量为 130.14。 $\alpha$ -酮亮氨酸作为生理必需物质, 对氨基酸代谢具有平衡和刺激的作用, 同时  $\alpha$ -酮亮氨酸也可以作为氨基酸的替代物质, 降低生物体内的氮代谢负担。在临床中,  $\alpha$ -酮亮氨酸饮食疗法治疗肝肾病患者体内代谢的紊乱, 保健品中可作为运动补充剂提高健身效果。在动物饲料中, 适量加入  $\alpha$ -酮亮氨酸可以提高饲料转化率, 促进蛋白质积累与家畜生长, 提高动物免疫力。

#### 3.1 酶的筛选

以 L-亮氨酸为底物催化合成  $\alpha$ -酮亮氨酸的酶为 L-氨基酸脱氨酶, 是一类以 FAD 为辅酶的黄素蛋白, 可以催化 L-亮氨酸脱氨形成  $\alpha$ -酮亮氨酸和氨。L-氨基酸脱氨酶来源广泛, 包括蛇毒、不透明红球菌、链霉菌和变形杆菌等。其中, 结构功能研究最彻底的来源于蛇毒的 L-氨基酸脱氨酶难以异源表达, 不利于工业化制备和应用, 来源于红球菌的 L-氨基酸脱氨酶将氨基酸脱氨后会形成过氧化氢, 并且生产周期较长, 也不适合制备  $\alpha$ -酮亮氨酸。因此, 来源于变形杆菌的 L-氨基酸脱氨酶定位在细胞膜上, 采用非典型的脱氨机制将 L-亮氨酸脱氨成  $\alpha$ -酮亮氨酸具有非常大的优势。然而, 来源于不同变形杆菌的 L-氨基酸脱氨酶对底物 L-亮氨酸的转化效率也存在着差异, 来自 *P. myxofaciens* 的 L-氨基酸脱氨酶 (Ladf) 的转化效率为 99.2%<sup>[40]</sup>, 来自 *P. mirabilis* 的 L-氨基酸脱氨酶 (Pma、Pml) 的转化效率却只有 41.7% 和 7.6%<sup>[41-42]</sup>。宋阳测定了 *P. vulgaris* 来源的 L-氨基酸脱氨酶的酶学性质,  $K_m$  为 17.71 mmol/L, ( $v_{max}$  为 1.62  $\mu$ mol/(L $\cdot$ min $\cdot$ mg)),  $K_{cat}$  值为 1.41 s<sup>-1</sup><sup>[43]</sup>。

#### 3.2 酶的表达与改造

2011 年, Zhu 等首次利用不透明红球菌 *Rhodococcus opacus* DSM 43250 自身合成 L-氨基酸脱氨酶催化 L-亮氨酸合成  $\alpha$ -酮亮氨酸, 并且取得了成功, 采用响应面分析的方法对菌体培养条件和转化条件优化后,  $\alpha$ -酮亮氨酸的产量达到了 1.27 g/L<sup>[11]</sup>。为了提高  $\alpha$ -酮亮氨酸的产量, 研究者们选择了变形杆菌属来源的 L-氨基酸脱氨酶。Song 和刘立明分别将来源于普通变形杆菌和奇异变形杆菌的 L-氨基酸脱氨酶克隆至表达载体 pET-28a 上, 转入表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 后均能检测到 L-氨基酸脱氨酶的活性<sup>[12-14]</sup>。

为了进一步提高 L-氨基酸脱氨酶的表达量, Song 等对其转录水平和翻译水平进行了调控, 通过对非编码区的 RBS 序列优化控制翻译的起始速率, 通过改变质粒拷贝数影响转录水平,  $\alpha$ -酮亮氨酸的产量得到了大幅度的提高, 达到了 86.55 g/L<sup>[14]</sup>。虽然  $\alpha$ -酮亮氨酸的产量得到了大幅度的提高但是其转化率为 94.25%, 还有进一步上升的空间。针对上述转化率低的问题, 刘立明课题组对 L-氨基酸氧化酶进行了蛋白质工程改造, 首先在奇异变形杆菌 L-氨基酸脱氨酶同源建模的基础上, 通过分析确定了突变位点 T436A, 突变体 T436A  $\alpha$ -酮亮氨酸的产量达到了 106.2 g/L, 转化率为 97.7%, 此突变体 T436 对 L-亮氨酸的催化效率较原 L-氨基酸脱氨酶提高了 72.7%<sup>[13]</sup>。此研究工作增强了  $\alpha$ -酮亮氨酸的工业应用价值。

#### 3.3 酶的转化条件优化

在大肠杆菌细胞中存在两种亮氨酸的转运系统。高亲和性的分支氨基酸转运系统 LivFGHJM 和 LivFGHMK 是细胞膜上的 ATP 结合转运家族的组成部分。LivJ 可转运亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸 3 种支链氨基酸, LivK 专一性地转运 L-亮氨酸, BrnQ 需要钠离子梯度电势。因此, 为了减少 L-亮氨酸的转运, 宋阳等采用不同浓度的转运抑制剂

3- 羰基氰酯 (Cyanide-3-chlorophenylhydrazone, CCCP) 抑制 *livK*、*livJ* 和 *BrnQ* 的转运效率, 提高了酶的转化效率。但是 CCCP 价格昂贵, 未来可以通过基因敲除的策略敲除 *livK* 和 *BrnQ* 基因以降低生产成本<sup>[43]</sup>。

## 4 酮缬氨酸

$\alpha$ -酮异戊酸 ( $\alpha$ -ketoisovalerate,  $\alpha$ -KI( ) 又名酮缬氨酸, 是缬氨酸的前体物质, 分子式为  $C_5H_8O_3$ , 相对分子质量为 116.12。作为支链酮酸的一种,  $\alpha$ -酮异戊酸是重要的中间体, 它主要应用于食品、医药、化妆品等领域。在饲料内加入酮缬氨酸可以促进家畜的肌肉生长。同时  $\alpha$ -酮酸具有降低肾过滤压力的效果, 可用于治疗慢性尿毒症和氮代谢的相关疾病。

### 4.1 酶的筛选

以 L-缬氨酸为底物酶转化法合成酮缬氨酸所用的酶包括氨基酸氨基转移酶、L-氨基酸氧化酶和 L-氨基酸脱氨酶。氨基酸氨基转移酶通常以  $\alpha$ -酮戊二酸和缬氨酸为底物生成对应的酮缬氨酸和谷氨酸, 该方法添加  $\alpha$ -酮戊二酸增加了成本, 副产物谷氨酸的出现增加了后续的纯化分离步骤, 因此, 研究者更倾向于选择 L-氨基酸氧化酶和 L-氨基酸脱氨酶。然而, 文献报道 L-氨基酸脱氨酶和 L-氨基酸氧化酶催化 L-缬氨酸生成  $\alpha$ -酮缬氨酸的催化效率都较低<sup>[41-42]</sup>。吴静等选取的 L-氨基酸氧化酶的催化效率是目前文献中报道最高的, 达到了 84.6%<sup>[17]</sup>。

### 4.2 酶的表达与改造

Li 等在 *E. coli* BL21(DE3) 中建立了酶转化体系合成酮缬氨酸。表达来自 *P. myxofaciens* 的 L-氨基酸脱氨酶基因 *ladf*, 构建了重组菌株 *E. coli* BL21 (*ladf*), 为了提高底物 L-缬氨酸的利用率, 继续敲除了细胞膜支链氨基酸转运蛋白基因 *livF*

和氨基酸转氨酶基因 *ilvE*, 得到了重组菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta livF \Delta ilvE$ , *ladf*), 此菌株以 5 g/L 的 L-缬氨酸为底物进行转化实验得到了 0.585 g/L 的酮缬氨酸<sup>[15]</sup>。吴静等同样以 *E. coli* BL21 作为表达宿主表达 L-氨基酸氧化酶, 构建了重组菌株 *E. coli* BL21-LAAO,  $\alpha$ -酮缬氨酸的产量最高可达 51 g/L, 转化率为 79.1%。

为了提高 L-氨基酸脱氨酶的催化效率, Li 等借助了蛋白质工程改造技术对 L-氨基酸脱氨酶进行了改造<sup>[15]</sup>。首先, 根据同源建模和分子对接分析确定了 4 个关键氨基酸位点 F318、R316、N100 和 Q276, 然后对这 4 个位点进行饱和突变得得到最优单突变体 F318T。在此基础之上, 对 F318T 进行 N100 饱和突变, 得到最优突变体 N100H, 其转化效率比 F318T 提高了 28.24%; 最后在 F318T/N100H 的基础上对 Q276 进行饱和突变, 三突变体 F318T/N100H/Q276E 的产量为 8.197 g/L, 转化率达到 72.54%, 转化时间缩短至 10 h<sup>[15]</sup>。上述研究中对 L-氨基酸脱氨酶的改造工作一定程度上提高了酶的催化效率。

### 4.3 酶的转化条件优化

在酶催化过程中酶的转化效率会受到温度、pH、金属离子、催化剂浓度的影响, 甚至反应体系的大小也会影响酶催化的效率。Li 等<sup>[15]</sup>和吴静等<sup>[16]</sup>分别对转化温度、转化 pH 和金属离子进行了优化。重组菌株 *E. coli* (pET20b-*ladf*,  $\Delta livF \Delta ilvE$ ) 全细胞转化 L-缬氨酸的最优转化条件为 pH 6.5、底物浓度为 100 mmol/L、菌体量为 10 g/L DCW 细胞, 转化 12 h,  $\alpha$ -酮异戊酸的产量达到了 1.49 g/L<sup>[15]</sup>。重组菌株 *E. coli* BL21-LAAO 的最优转化条件为 25 °C、pH 8.0、菌体量为 30 g/L 湿菌体, 转化 24 h,  $\alpha$ -酮异戊酸的产量最高可达 51 g/L, 转化率为 79.1%, 大幅度提高了生产效率, 实现了 L-缬氨酸向  $\alpha$ -酮缬氨酸的高效合成<sup>[16]</sup>。

## 5 苯丙酮酸

$\alpha$ -苯丙酮酸 (Phenylpyruvic acid, PPA) 是一种含有双羰基的多功能有机酸, 分子式为  $C_9H_8O_3$ , 相对分子质量为 164.16。PPA 作为苯丙氨酸合成的原材料, 苯丙氨酸是合成手性药物的重要中间体。

### 5.1 酶的筛选

D-氨基酸氧化酶以 D-苯丙氨酸为底物催化合成苯丙酮酸, D-氨基酸氧化酶主要来源于三角酵母、毕赤酵母和红酵母。此外, 以 L-苯丙氨酸为底物催化合成苯丙酮酸的酶包括苯丙氨酸脱氢酶、氨基酸氨基转移酶和 L-氨基酸脱氢酶。对于氨基酸脱氢酶, 需要构建辅酶  $NAD^+$ 再生系统。而且苯丙氨酸脱氢酶一般属于胞内酶, 构建全细胞催化剂后, 不利于底物和酶的结合。L-氨基酸脱氢酶反应只需一种氨基酸参与反应, 无需外源添加辅酶或构建辅酶再生系统。因此, L-氨基酸脱氢酶成为催化苯丙酮酸的最佳选择。L-氨基酸脱氢酶的来源主要包括链霉菌属、变形杆菌属和红球菌属。链霉菌属来源的 L-氨基酸脱氢酶具有底物专一性, 对 L-谷氨酸表现出较高的催化活性, 红球菌属的 L-氨基酸脱氢酶 (L-AAO) 对 L-苯丙氨酸的转化效率为 53%<sup>[45]</sup>, 然而变形杆菌来源的 L-氨基酸脱氢酶 (Pma) 的催化效率为 100%<sup>[41]</sup>, 其突变体 M5 的  $K_m$  值为 33 mmol/L, 较野生型的 Pma 提高了 20.88%。

### 5.2 酶的表达与改造

Pantaleone 课题组建立了酶法生产苯丙酮酸的路径, 在大肠杆菌异源表达来自 *P. mirabilis* KCTC2566 的 L-氨基酸脱氢酶, 通过优化条件 (菌体添加量、底物投量等), 最终苯丙酮酸的产量提高至 42.50 g/L, 转化率为 85%<sup>[46]</sup>。但是, 随着 PPA 产量的提高, 对 L-氨基酸脱氢酶有很强的产物抑制, 导致产量无法进一步提高。产物抑制

的原因主要是产物释放慢, 产物与底物竞争性结合催化位点。刘佳等应用构象动力学思想, 从产物周围的 loop 结构入手, 调节对结构影响较小的 loop 上的氨基酸, 从而增大产物结合位点的构象动力学, 促进产物释放, 减弱产物抑制, 达到提高产量的目的<sup>[18]</sup>。首先, 通过对酶结构的分析选择了 18 个氨基酸位点 (Y103、T105、S106、D144、E145、R315、I316、F317、E340、L341、(411、S412、T414、F415、E417、T434、T436、(437), 将其突变为丙氨酸, 构建单点突变库, 突变体 T105、S412、E417、E340 和 E145 的转化能力得到提高; 随后, 采用组合突变的策略, 对上述 5 个有益突变进行组合突变, 构建了部分双突变体、三突变体、四突变体和五突变体, 得到最佳的五突变体为 M5 (T105A、S412A、E417A、E340A、E145A), M5 的苯丙酮酸的产量最高, 达到了 72.5 g/L, 此时底物转化率为 96.67%<sup>[18]</sup>。杨彬等测定了突变体 M5 的产物抑制常数和动力学参数, 产物抑制常数  $K_{PI}$  提高到了 86.6 g/L, 较野生型提高了 3.7 倍。 $K_{cat}$  值比野生型增加了 2 倍, 催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 也有所增加, 是野生型的 1.6 倍<sup>[47]</sup>。

### 5.3 酶的转化条件优化

Hou 等将来自 *P. mirabilis* KCTC 2566 中的 L-氨基酸脱氢酶基因克隆至 pET-20b(+) 并且成功转入表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中, 研究了温度、pH、酶浓度、底物浓度、金属离子 ( $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Li^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  等)、辅酶 FAD 的浓度对全细胞转化 L-苯丙氨酸生成苯丙酮酸的影响。条件优化后, 转化 2.5 h, 苯丙酮酸的产量达到最大值, 为 2.7 g/L, 底物转化率为 86.7%<sup>[48]</sup>。同时, Hou 等继续研究了两阶段全细胞转化, 即生长态细胞转化和静止态细胞转化, 建立了两阶段温度控制策略, 最终在 3-L 罐上苯丙酮酸的产量为 77.6 g/L, 苯丙氨酸的转化率为 99.3%<sup>[49]</sup>。刘佳等对 L-氨基酸脱氢酶突变体催化制备苯丙酮酸的体系也进行

了优化。首先,对重组大肠杆菌产酶条件进行了优化,包括不同的表达载体(pET-28a、pET-20b、pET-22b、pET-24a)、不同的培养基(LB、TB、SB、LBA、TBA、SBA和SOC)、诱导条件(诱导剂种类、浓度、诱导温度和诱导时间),然后优化了L-苯丙氨酸转化生产苯丙酮酸的条件,转化条件包括pH、温度、底物浓度、催化剂用量和添加剂种类(CTAB、曲拉通-100、吐温-80、Mn<sup>2+</sup>和DMSO)。经过条件优化后,在30-L罐上苯丙酮酸的最高产量达到了83.0 g/L,底物转化率高达98.20%<sup>[18]</sup>,该研究的产量与转化率为目前报道最高。

## 6 酮蛋氨酸

酮蛋氨酸( $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyric acid, KMTB)又称 $\alpha$ -酮- $\gamma$ -甲硫基丁酸,是由蛋氨酸脱氨基生成的含酮化合物,分子式为C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S,分子量为148.21。KMTB作为L-甲硫氨酸的衍生物,不仅可以增加机体的利用效率还能抑制肿瘤细胞的生长,也被用来治疗尿毒症的病人。此外,KMTB还是一种安全无毒的禽畜饲料添加剂。

### 6.1 酶的筛选

以蛋氨酸为底物酶法合成酮蛋氨酸的酶主要包括L-氨基酸脱氨酶、氨基酸氧化酶和L-氨基酸转氨酶。其中,氨基酸氧化酶和L-氨基酸脱氨酶全细胞转化都以胞内FAD为辅酶,不可逆的催化L-蛋氨酸生成 $\alpha$ -亚蛋氨酸, $\alpha$ -亚蛋氨酸由于结构的不稳定性,会自发水解形成 $\alpha$ -酮蛋氨酸和氨。来源于*P. vulgaris*的氨基酸脱氨酶对蛋氨酸的转化效率为100%<sup>[50]</sup>,而来源于*P. mirabilis*的氨基酸脱氨酶Pma和Pml对蛋氨酸的转化效率只有16.7%和2.6%<sup>[41-42]</sup>。

### 6.2 酶的表达优化与改造

2014年,Hossain等建立了酶转化法合成

KMTB的方法。以*E. coli* BL21 (DE3)为表达宿主,表达来自*Proteus vulgaris*的L-氨基酸脱氨酶基因pvAAD,构建了重组菌株pET-20b(+)-pvAAD(*E. coli* BL21)。重组菌株以L-蛋氨酸为底物,进行全细胞转化,转化24 h,KMTB产量和转化率分别达到了49.5 g/L和71.2%。在此基础上,Hossain等对pvAAD进行蛋白质工程改造。首先,通过易错PCR技术获得了2个能提高L-蛋氨酸转化为KMTB效率的突变体K104R和A337S,转化率分别达到了82.2%和80.8%。随后,采用组合突变的方法将2个突变位点组合在一起获得了最佳的突变体pvAADK104R/A337S。KMTB的产量从49.5 g/L提高到了63.6 g/L,转化率从71.2%提高到了91.4%<sup>[51]</sup>。上述研究表明,蛋白质工程改造技术能够增强酶的催化速率,进而提高KMTB的产量。

密码子优化能够提高酶的翻译,进而提高酶的表达水平。刘立明课题组将来源于红平红球菌的L-氨基酸氧化酶经过密码子优化后连接pET28a后导入*E. coli* BL21 (DE3)中进行异源表达。通过对湿菌体的添加量(30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L)、转化温度(15℃、20℃、30℃、37℃)和转化pH(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)优化后,KMTB的产量达到95.18 g/L,转化率为95.84%,时空产率为3.97 g/(L·h)<sup>[20]</sup>。

## 7 结论与展望

针对酶法转化L-氨基酸生产相应的 $\alpha$ -酮酸,国内外研究人员开展了卓有成效的研究工作。主要包括两个方面:重组菌株的构建,包括酶的筛选、酶的表达和酶的蛋白质工程改造;另一方面为酶转化条件的优化。然而,由于酶制剂自身的催化效率低,转化过程条件繁多且复杂,造成了 $\alpha$ -酮酸产量、产率和生产强度较低。因此,为了提高 $\alpha$ -酮酸的生产效率以及经济效益,今后需要

在以下几个方面进行深入研究。第一, 利用蛋白质工程改造策略对酶进行精准改造, 提高酶的催化效率, 从而降低酶的用量, 缩短催化反应的时间; 第二, 可以发展多酶级联催化反应转化生成附加值更高的酮酸衍生物, 使得效益最大化; 第三, 深入研究酶的循环利用, 做到酶制剂的多次重复利用, 以降低生产成本; 第四, 利用代谢工程策略对表达宿主进行改造, 协调产物合成路径与其他竞争性路径之间的关系, 增强酮酸的合成, 为  $\alpha$ -酮酸工业化生产奠定坚实基础。

## REFERENCES

- [1] Waters KL. The  $\alpha$ -keto acids. *Chem Rev*, 2002, 3: 585–598.
- [2] Bückle A, Krause FS, Messerschmidt S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisocaproate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 297–311.
- [3] Ogt M, Haas S, Polen T, et al. Production of 2-ketoisocaproate with *Corynebacterium glutamicum* strains devoid of plasmids and heterologous genes. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(2): 351–360.
- [4] Hossain GS, Shin HD, Li JH, et al. Transporter engineering and enzyme evolution for pyruvate production from D/L-alanine with a whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *RSC Adv*, 2016, 6(86): 82676–82684.
- [5] Liu L, Hossain GS, Shin HD, et al. One-step production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid from glutamic acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *J Biotechnol*, 2013, 164(1): 97–104.
- [6] Hossain GS, Li JH, Shin HD, et al. Bioconversion of L-glutamic acid to  $\alpha$ -ketoglutaric acid by an immobilized whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *J Biotechnol*, 2014, 169: 112–120.
- [7] Hossain GS, Li JH, Shin HD, et al. Improved production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $\alpha$ -KG) by a *Bacillus subtilis* whole-cell biocatalyst via engineering of L-amino acid deaminase and deletion of the  $\alpha$ -KG utilization pathway. *J Biotechnol*, 2014, 187: 71–77.
- [8] Niu PQ, Dong XX, Wang YC, et al. Enzymatic production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid from L-glutamic acid via L-glutamate oxidase. *J Biotechnol*, 2014, 179: 56–62.
- [9] Fan XC, Chen RD, Chen LL, et al. Enhancement of  $\alpha$ -ketoglutaric acid production from L-glutamic acid by high-cell-density cultivation. *J Mol Catal B: Enzym*, 2016, 126: 10–17.
- [10] Wu J, Fan XC, Liu J, et al. Promoter engineering of cascade biocatalysis for  $\alpha$ -ketoglutaric acid production by coexpressing L-glutamate oxidase and catalase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(11): 4755–4764.
- [11] Zhu YH, Li JH, Liu L, et al. Production of  $\alpha$ -ketoisocaproate via free-whole-cell biotransformation by *Rhodococcus opacus* DSM 43250 with L-leucine as the substrate. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(4): 321–325.
- [12] Liu LM, Yuan YX, Liu J, et al. Method for efficiently producing  $\alpha$ -ketoisocaproic by enzyme: CN, CN108587993A. 2018-09-28 (in Chinese).  
刘立明, 袁宇翔, 刘佳, 等. 一种酶法催化高产  $\alpha$ -酮异己酸的方法: CN, CN108587993A. 2018-09-28.
- [13] Liu LM, Yuan YX, Chen XL, et al. A method for constructing L-amino acid deaminase mutant and its application: CN, CN108624576A. 2018-10-09 (in Chinese).  
刘立明, 袁宇翔, 陈修来, 等. 一种 L-氨基酸脱氨酶的突变体及其制备方法与应用: CN, CN108624576A. 2018-10-09.
- [14] Song Y, Li JH, Shin H, et al. Tuning the transcription and translation of L-amino acid deaminase in *Escherichia coli* improves  $\alpha$ -ketoisocaproate production from L-leucine. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0179229.
- [15] Li RX, Sakir HG, Li JH, et al. Rational molecular engineering of L-amino acid deaminase for production of  $\alpha$ -ketoisovaleric acid from L-valine by *Escherichia coli*. *RSC Adv*, 2017, 7(11): 6615–6621.
- [16] Wu J, Pei SS, Liu J, et al. Method for efficiently producing  $\alpha$ -ketoisocaproate: CN, 201811350903.7. 2018-11-20 (in Chinese).  
吴静, 裴杉杉, 刘佳, 等. 一种高产  $\alpha$ -酮异戊酸的方法

- 法: CN, 201811350903.7. 2018-11-20.
- [17] Wu J, Pei SS, Liu J, et al. A method for constructing L-amino acid oxidase mutant: CN, 201811350819.5. 2018-11-20 (in Chinese).  
吴静, 裴杉杉, 刘佳, 等. 一种 L-氨基酸氧化酶的突变体: CN, 201811350819.5. 2018-11-20.
- [18] Liu J, Wu J, Yang B, et al. Method for efficiently producing phenylpyruvic acid: CN, CN108841844A. 2018-11-20 (in Chinese).  
刘佳, 吴静, 杨彬, 等. 一种高效生产苯丙酮酸的方法: CN, CN108841844A. 2018-11-20.
- [19] Liu J, Wu J, Yang B, et al. A method for production of phenylpyruvic acid by enzyme bioconversion: CN, CN109022338A. 2018-12-18 (in Chinese).  
刘佳, 吴静, 杨彬, 等. 一种酶转化苯丙氨酸生产苯丙酮酸的工艺: CN, CN109022338A. 2018-12-18.
- [20] Liu LM, Zhang C, Liu J, et al. Method for efficiently producing KMTB (alpha-keto-gamma-methylthiobutyric acid): CN, CN107988131A. 2018-05-04 (in Chinese).  
刘立明, 张灿, 刘佳, 等. 一种高产  $\alpha$ -酮- $\gamma$ -甲硫基丁酸的方法: CN, CN107988131A. 2018-05-04.
- [21] Liu LM, Li Y, Du GC, et al. Progress in biotechnological production of pyruvic acid. Chin J Biotech, 2002, 18(6): 651–655 (in Chinese).  
刘立明, 李寅, 堵国成, 等. 生物技术法生产丙酮酸的研究进展. 生物工程学报, 2002, 18(6): 651–655.
- [22] Gu JS, Xu P, Li TL, et al. Preparation of pyruvate from lactate by lactate oxidase. Chin J Appl Environ Biol, 2001, 7(6): 617–620 (in Chinese).  
谷劲松, 许平, 李铁林, 等. 乳酸氧化酶转化乳酸产丙酮酸. 应用与环境生物学报, 2001, 7(6): 617–620.
- [23] Mu WM, Yu SH, Jiang B, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase from *Pediococcus acidilactici* that converts phenylpyruvic acid into phenyllactic acid. Biotechnol Lett, 2012, 34(5): 907–911.
- [24] Zhao T. Cloning, overexpression and properties of *ldh* gene from *Lactobacillus paracasei*[D]. Suzhou: Soochow University, 2012 (in Chinese).  
赵婷. 副干酪乳杆菌乳酸脱氢酶的克隆表达及酶学性质的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [25] Eisenberg A, Seip JE, Gavagan JE, et al. Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst. J Mol Catal B: Enzym, 1997, 2(4/5): 223–232.
- [26] Chowdhury EK, Saitoh T, Nagata S, et al. Alanine dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes*: purification, characterization, and primary structure. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(12): 2357–2363.
- [27] Molla G, Melis R, Pollegioni L. Breaking the mirror: L-amino acid deaminase, a novel stereoselective biocatalyst. Biotechnol Adv, 2017, 35(6): 657–668.
- [28] Pollegioni L, Motta P, Molla G. L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(21): 9323–9341.
- [29] Butò S, Pollegioni L, D'Angiuro L, et al. Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of  $\alpha$ -keto acids: a reactor system. Biotechnol Bioeng, 1994, 44(11): 1288–1294.
- [30] Hao JR, Ma CQ, Gao C, et al. *Pseudomonas stutzeri* as a novel biocatalyst for pyruvate production from DL-lactate. Biotechnol Lett, 2007, 29(1): 105–110.
- [31] Chernyavskaya OG, Shishkanova N, Il'chenko AP, et al. Synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53(2): 152–158.
- [32] Yang SH, Tan LL, Liao M, et al. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on growth performance and meat quality of broilers under heat stress. Feed Ind Mag, 2014, 35(22): 11–16 (in Chinese).  
杨书慧, 谭灵琳, 廖满, 等.  $\alpha$ -酮戊二酸对热应激肉鸡生长性能和肌肉品质的影响. 饲料工业, 2014, 35(22): 11–16.
- [33] Duncan PA, White BA, Mackie RI. Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(12): 4032–4037.
- [34] Zhang KX, Liu YS. Studies on glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium* Tianjinense T6-13. Acta Microbiol Sin, 1991, 31(4): 281–286 (in Chinese).  
张克旭, 刘永生. 天津短杆菌 T6-13 谷氨酸脱氢酶的研究. 微生物学报, 1991, 31(4): 281–286.
- [35] Böhmer A, Müller A, Passarge M, et al. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus* purification and properties. Eur J Biochem, 1989, 182(2): 327–332.

- [36] Wachiratianchai S, Bhumiratana A, Udomsopagit S. Isolation, purification, and characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. 18G. *Electron J Biotechnol*, 2004, 7(3): 274–281.
- [37] Kusakabe H, Midorikawa Y, Kuninaka A, et al. Occurrence of a new enzyme, L-glutamate oxidase in a wheat bran culture extract of *Streptomyces* sp. X-119-6. *Agricul Biol Chem*, 1983, 47(1): 175–177.
- [38] Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, et al. Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X - 119 - 6. *FEBS J*, 2010, 276(14): 3894–3903.
- [39] Niu PQ, Zhang ZY, Liu LM. Enzymatic production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by L-glutamate oxidase from L-glutamic acid. *Chin J Biotech*, 2014, 30(8): 1318–1322 (in Chinese).  
牛盼清, 张震宇, 刘立明. 酶法转化 L-谷氨酸生产  $\alpha$ -酮戊二酸. *生物工程学报*, 2014, 30(8): 1318–1322.
- [40] Motta P, Molla G, Pollegioni L, et al. Structure-function relationships in L-amino acid deaminase, a flavoprotein belonging to a novel class of biotechnologically relevant enzymes. *J Biol Chem*, 2016, 291(20): 10457–10475.
- [41] Baek JO, Seo JW, Kwon O, et al. Heterologous expression and characterization of L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*, 2011, 24(12): 2129–2129 (in Chinese).  
Baek JO, Seo JW, Kwon O, 等. 奇异变形杆菌的 L-氨基酸脱氢酶在大肠杆菌中的异源表达和鉴定. *生物工程学报*, 2011, 24(12): 2129–2129.
- [42] Baek JO, Seo JW, Kwon O, et al. Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol*, 2011, 51(2): 129–135.
- [43] Song Y. Molecular modification of L-amino acid deaminase and biosynthesis of  $\alpha$ -ketoisocaproate[D]: Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).  
宋阳. L-氨基酸脱氢酶分子改造及生物合成  $\alpha$ -酮异己酸[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [44] Song Y, Li JH, Shin HD, et al. One-step biosynthesis of  $\alpha$ -ketoisocaproate from L-leucine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris*. *Sci Rep*, 2015, 5: 12614.
- [45] Geueke B, Hummel W. A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(1/2): 77–87.
- [46] Pantaleone DP, Geller AM, Taylor PP. Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, 11(4/6): 795–803.
- [47] Yang B. Engineering of the conformational dynamics of enzymes to improve properties to produce pharmaceutical intermediates[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).  
杨彬. 构象动力学方法改造酶性能以生产医药中间体[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [48] Hou Y, Hossain GS, Li JH, et al. Production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(20): 8391–8402.
- [49] Hou Y, Hossain GS, Li JH, et al. Two-step production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine by growing and resting cells of engineered *Escherichia coli*: process optimization and kinetics modeling. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0166457.
- [50] Takahashi E, Ito K, Yoshimoto T. Cloning of L-amino acid deaminase gene from *Proteus vulgaris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(12): 2244–2247.
- [51] Hossain GS, Li JH, Shin HD, et al. One-step biosynthesis of  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyric acid from L-methionine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris*. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114291.

(本文责编 陈宏宇)