

易错 PCR 法提高 L-氨基酸脱氨酶全细胞转化 L-异亮氨酸生产 α -酮- β -甲基正戊酸效率

郭濛濛^{1,2}, 刘 龙^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{*1,2}, 陈 坚^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物系统与生物加工工程研究室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* 中的 L-氨基酸脱氨酶进行定向进化, 利用易错 PCR 技术向基因中引入随机突变, 建立突变文库来筛选可获得较高 α -酮- β -甲基正戊酸产量的突变株。突变株 7/23-6 最适全细胞转化反应条件是以 pH 8.5 Tris-HCl 为缓冲液, 用 900 mmol/L L-异亮氨酸在 30 °C 下进行催化反应 21~24 h, 其 α -酮- β -甲基正戊酸产量可以达到 102 g/L, 底物转化率达到 87%。与对照菌相比, α -酮- β -甲基正戊酸产量和底物转化率均提高了 13%, 热稳定性提高了 36.7%。

关键词: L-氨基酸脱氨酶; 易错 PCR; 全细胞转化; α -酮- β -甲基正戊酸

中图分类号: Q 819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)11-1173-08

Modification of L-amino Acid Deaminase Gene by Error-prone PCR to Improve the Production of α -keto- β -methylvaleric Acid from L-isoleucine Through Whole-Cell Biocatalyst

GUO Mengmeng^{1,2}, LIU Long^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Lab of Biosystem and Bioprocessing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to make directed evolution on L-amino acid deaminase coming from *Proteus mirabilis*, the error-prone PCR was used to introduce random mutagenesis to the gene to construct a mutation library and screen for mutants which could have high production of α -keto- β -methylvaleric acid. The optimal reaction conditions of the mutant named 7/23-6 were as following. The optimal substrate concentration was 900 mmol/L L-Ile. The optimal reaction temperature was 30 °C. The optimal reaction pH was 8.5. And the optimal reaction time was about 21~24 h. Under these conditions, 102 g/L α -keto- β -methylvaleric acid could be got with 87% substrate conversion rate as a

收稿日期: 2016-02-18

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BY2013015-37)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 郭濛濛, 刘龙, 李江华, 等. 易错 PCR 法提高 L-氨基酸脱氨酶全细胞转化 L-异亮氨酸生产 α -酮- β -甲基正戊酸效率[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1173-1180.

result. Compared with the original strain, both the α -keto- β -methylvaleric acid production and substrate conversion rate were improved 13 %, and its thermostability was improved 36.7 %.

Keywords: L-amino acid deaminase, error-prone PCR, whole-cell biocatalyst, α -keto- β -methylvaleric acid

α -酮- β -甲基正戊酸(KMV)是一种含有双官能团的支链酮酸,是有机合成、药物合成以及生物合成中的重要中间体,在医药和化学合成领域具有广泛的研究与应用^[1]。Huang 等人研究发现 KMV 可以改善神经退行性疾病中出现的线粒体功能障碍和氧化应激现象^[2];有研究报道 1~20 mmol/L KMV 可以在低氧情况下使细胞活性增强^[3]; α -酮酸还可用于治疗氮代谢疾病和慢性尿毒症,通过降低蛋白食物中氮的摄入量,降低肾过滤压力^[4]。

有氧条件下, L-氨基酸脱氨酶催化 L-Ile 发生氧化脱氨基反应,生成 KMV 和氨。L-氨基酸氧化酶也可以催化 L-氨基酸生成相应酮酸,但大部分 L-氨基酸氧化酶催化反应过程中生成双氧水,而双氧水会降低酶的活性,同时会对酮酸的稳定性造成影响^[5],因此本研究选择 L-氨基酸脱氨酶作为研究对象。*Proteus*^[6-9]、*Providencia*^[10]和 *Morganella*^[11]这 3 种属的 L-氨基酸脱氨酶均位于细胞膜上。在变形杆菌属(*Proteus*)中, *Proteus mirabilis*^[6-7]、*Proteus vulgaris*^[9]、*Proteus rettgeri*^[12]、*Proteus myxofaciens*^[8]来源的 L-氨基酸脱氨酶均成功在大肠杆菌中表达。

与纯酶转化相比,全细胞转化有很多优势:易制备,成本低;更稳定,不易受环境温度、pH 等因素影响,使用方便;无污染,副产物少。目前已有多个以全细胞转化氨基酸方式生产相应酮酸的研究报道。Hossain 等人在枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中分别异源表达来自 *Proteus mirabilis* 的脱氨酶和 *Proteus vulgaris* 的 L-氨基酸脱氨酶,并用构建的重组菌分别全细胞转化 L-谷氨酸、L-蛋氨酸生成 α -酮戊二酸、 α -酮- γ -甲硫基丁^[13-14]; Hou 等人在大肠杆菌中

表达来自 *Proteus mirabilis* 的脱氨酶,并用重组菌株全细胞转化 L-苯丙氨酸生成苯丙酮酸^[15]; Song 等人在大肠杆菌中异源表达来自 *Proteus vulgaris* 的脱氨酶,并全细胞转化 L-亮氨酸生成 α -酮异己酸^[16]。

本研究将来自 *Proteus mirabilis* 中的 L-氨基酸脱氨酶作为研究对象。为了提高该酶对 L-异亮氨酸(L-Ile)的催化能力,获得更高的 KMV 产量,利用易错 PCR 方法对该 L-氨基酸脱氨酶进行定向进化,构建 L-氨基酸脱氨酶突变库,并结合高通量筛选方法得到催化能力提高的突变株。

1 材料与方法

1.1 相关试剂

SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4-DNA 连接酶均购自 TAKARA 公司(大连、中国); GeneMorph II Random Mutagenesis 试剂盒购自安捷伦公司; α -酮- β -甲基正戊酸(KMV)标样购买于 Sigma-Aldrich 有限公司(MO, 美国); 氨苄青霉素和 IPTG 购买于上海生工。

1.2 菌种和培养基

本实验所用到的菌株和质粒如表 1 所示。用 10 mL LB 培养基培养种子液,用 TB 培养基对菌体进行诱导培养。LB 液体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl, 100 μ g/mL 氨苄青霉素; TB 液体培养基: 12 g/L 胰蛋白胨, 24 g/L 酵母提取物, 4 g/L 甘油, 17 mmol/L KH_2PO_4 , 72 mmol/L K_2HPO_4 和 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)。

表 1 本研究中所用到的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and oligonucleotides used in the research

菌株/质粒/引物	相关说明	来源
pET-20b(+)- <i>pma</i> / <i>E. coli</i> BL21(DE3)	含 <i>pma</i> 基因的重组大肠杆菌 BL21(DE3), 以 pET-20b(+)为载体, 酶切位点为 <i>Nde</i> I 和 <i>Xho</i> I	本研究室
<i>E. coli</i> BL21(DE3)		Invitrogen, Carlsbad, CA
pET-20b(+)		Invitrogen, Carlsbad, CA
EP/ <i>pma</i> -1	ATGAACATTTC AAGGAGAAAGCTACT	
EP/ <i>pma</i> -2	TTACTTCTTAAAACGATCCAAACTAAAC	

1.3 全细胞催化剂制备

重组菌株接种 10 mL LB 培养基培养 10 h (37 °C, 220 r/min), 1 %接种量接种 50 mL TB 培养基中, 37 °C条件下培养至菌液 OD₆₀₀ 为 1.0 左右, 添加终浓度为 0.21 mmol/L 的 IPTG, 37 °C条件下诱导培养 4.5 h。诱导培养结束后, 4 °C下离心 (1 200 r/min, 5 min), 并收集菌体。

1.4 全细胞转化 L-Ile 生成 KMV

菌体用 pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液洗涤一次, 重悬至适当浓度。用 UVmini-1240 分光光度计(日本岛津)测定细胞悬浮液 OD₆₀₀, 用公式(1)计算细胞质量浓度(DCW, g/L)^[13]

$$DCW = 0.444 \times OD_{600} - 0.021 \quad (1)$$

测定反应速率的反应体系为: 18 g/L Ile (pH 8.5 Tris-HCl), 1 g/L 细胞量(DCW), 220 r/min, 30 °C, 体积 1 mL, 反应时间 20 min。反应结束后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, HPLC 测定反应液中 KMV 浓度。

1.5 用易错 PCR 法对 *pma* 进行随机突变以及突变库构建

使用 GeneMorph II Random Mutagenesis 试剂盒对目标片段进行随机突变。易错 PCR 体系(50 μ L): 重组质粒(pET-20b(+)-*pma*)作为模板, EP/*pma*-1 和 EP/*pma*-2 作为上下游引物, 各 1 μ L, Mutazyme II DNA 聚合酶 1 μ L, dNTPs 1 μ L, 10 $\times$ Mutazyme II 反应缓冲液 5 μ L, 用 ddH₂O 补足反应体系。易错 PCR 条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min (20~30 个循环); 72 °C 5 min。将柱回收产物作为引物, 进行下一轮 Megaprimer PCR 反应^[17]。Megaprimer PCR 反应体系为 50 μ L: 质粒模板 50 ng, 引物 500 ng, 聚合酶 PrimeSTAR HS 预混物 25 μ L, 用 ddH₂O 补足反应体系。Megaprimer PCR 反应条件为: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 62 °C 15 s, 72 °C 3 min 42 s (30 个循环); 72 °C 5 min。用 *Dpn* I 限制性内切酶消化 Megaprimer PCR 反应产物, 37 °C下酶切 2 h。消化后的产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态, 进行 LB 抗性平板筛选。平板上所有转化子挑到含有 1 mL LB 培养基/孔 (100 μ g/mL 氨苄青霉素和 0.21 mmol/L IPTG) 的 96 深孔板中, 37 °C培养。

1.6 高通量筛选方法

高通量筛选流程图如图 1 所示。将接种有突变子的 96 深孔板于 37 °C培养 10 h, 从中取 100 μ L

菌液于 96 浅孔板中, 添加 50 μ L 28 g/L L-Ile, 混匀后于 30 °C 转化 1 h, 反应结束后, 添加 50 μ L 60 g/L FeCl₃ 溶液, 并混匀。依照 96 浅孔板上显深墨绿色孔的位置, 在 96 深孔板中找到相应的突变株, 并在 5 mL 离心管中分别测定全细胞转化反应速率和全细胞转化反应进行 3 h 后 1 mL 转化体系中 KMV 的质量浓度。然后选择反应速率较高或者 KMV 生成量较高的突变子, 在 250 mL 三角瓶中测定它们在 900 mmol/L L-Ile 条件下的最大 KMV 产量: 转化体系为 20 mL, 1 g/L 细胞量 (DCW), 220 r/min, 30 °C下反应 20~24 h。

1.7 α -酮- β -甲基正戊酸(KMV)测定方法

采用高效液相色谱法测定样品中的 α -酮- β -甲基正戊酸质量浓度。取 0.6 mL 离心后的转化液上清, 用 0.45 μ m 孔径滤膜过滤, 所得滤液即为待测试样。色谱条件为: Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 伯乐 Aminex HPLC-87H 色谱柱 (300 $\times$ 7.8 mm, 9 μ m), 流动相为 5 mmol/L 稀 H₂SO₄, 进样量 10 μ L, 流速为 0.6 mL/min, 紫外检测波长为 210 nm, 柱温为 40 °C, 进样时间为 30 min。

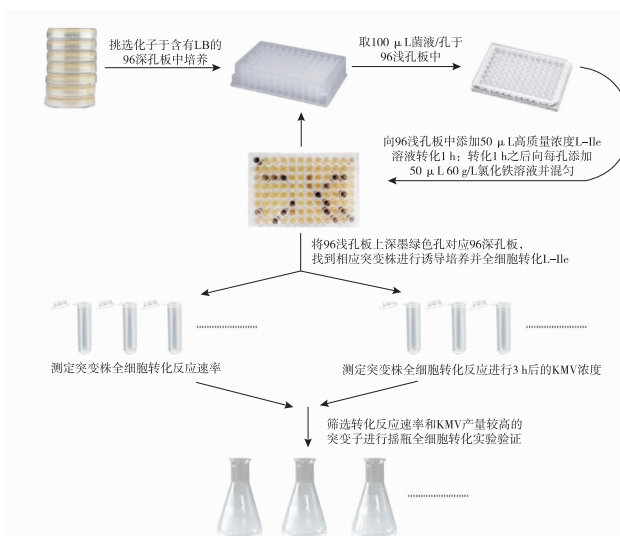


图 1 高通量筛选流程

Fig. 1 Process of high throughput screening

2 结果与分析

2.1 高通量筛选结果

经过多轮易错 PCR, 得到了两株正向突变株 5/13-26 和 7/23-6。突变株 5/13-26 全细胞转化反应速率要高于对照菌 13.8 % (图 2(a)); 用它们全细胞

转化 900 mmol/L L-Ile, KMV 产量分别要高于对照菌 8 %, 13 % (图 2(b))。对突变株 5/13-26、7/23-6 的外源 L-氨基酸脱氨酶基因测序后, 分析其氨基酸序列, 并与亲本脱氨酶的氨基酸序列进行对比, 结果如表 2 所示, 可以发现突变酶 7/23-6 比 5/13-26 仅多了一个氨基酸突变位点 A209E。

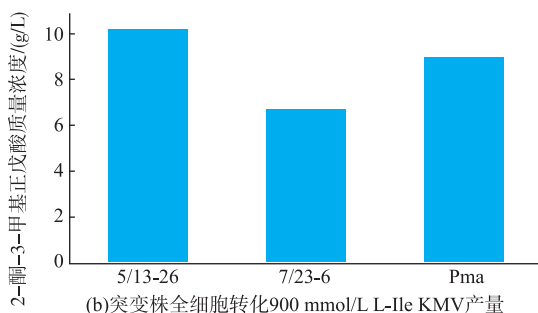
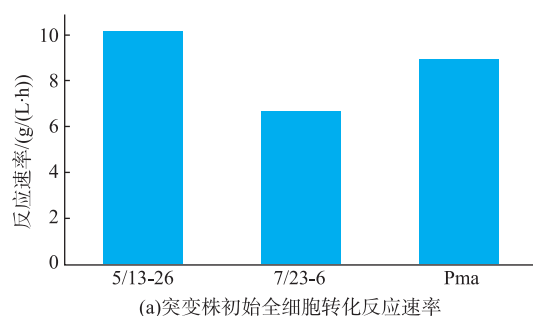


图 2 突变株初始全细胞转化反应速率及全细胞转化 900 mmol/L L-Ile KMV 产量比较

Fig. 2 comparison of the original whole-cell biocatalyst reaction rates between mutant strains and comparison of KMV production between mutant strains under 900 mmol/L L-Ile

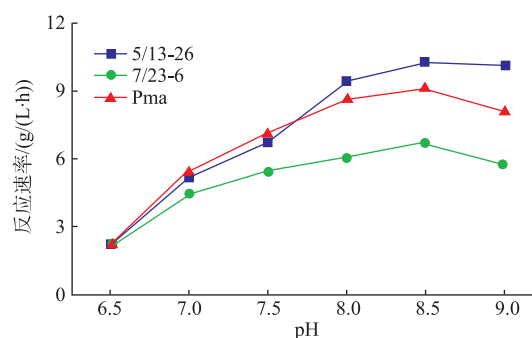
表 2 正向突变株外源氨基酸脱氨酶氨基酸突变位点
Table 2 Amino acid mutation sites of exogenous amino acid deaminases from mutant strains

突变菌株	外源氨基酸脱氨酶氨基酸突变位点
5/13-26	D149Y, T205R, A214T, K366R
7/23-6	D149Y, T205R, A214T, A209E, K366R

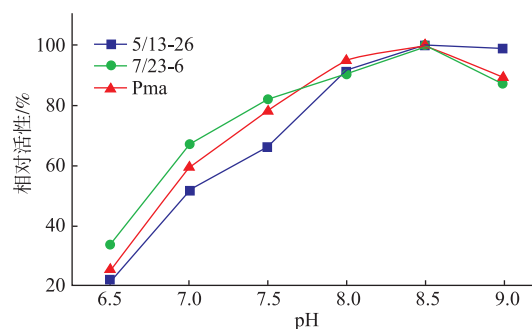
2.2 突变株全细胞转化反应条件优化

2.2.1 突变株全细胞催化剂最适 pH 如图 3(a) 所示, 突变株 5/13-26 和 7/23-6 最适反应 pH 均为 8.5, 且在 pH 8.0~9.0 范围内, 突变株 5/13-26 全细胞转化反应速率高于对照菌。不同 pH 下突变株全细胞催化剂的相对活性变化情况如图 3(b) 所示, 可以发现, 当 pH 为 7.5 时突变株 5/13-26 活性下降幅

度最大, 约 34 %。而在实际的全细胞转化过程中, 由于大量 KMV 生成, 缓冲液 pH 值会由最初的 8.5 逐步下降为 7.3 左右。所以, 突变株 5/13-26 的 L-氨基酸脱氨酶可能对反应 pH 值变化较为敏感, 酶活性也因此受到影响。



(a) 全细胞转化反应速率随 pH 变化情况



(b) 全细胞转化相对活性随 pH 变化情况

图 3 反应 pH 对全细胞转化反应的影响

Fig. 3 Effect of pH on whole-cell biocatalyst

2.2.2 突变株全细胞催化剂最适反应温度 在 20~37 °C 范围内, 设置 4 个温度梯度, 测定全细胞转化反应进行 24 h 后的 KMV 产量, 结果如图 4 所示。可以发现, 突变株 5/13-26 和 7/23-6 全细胞催化剂最适反应温度为 30 °C。当全细胞转化温度为 37 °C 时, 突变株 5/13-26 全细胞催化剂的 KMV 产量下降幅度最大, 这可能与突变株 5/13-26 的外源 L-氨基酸脱氨酶热稳定性有关。

2.2.3 突变株全细胞催化剂最适反应时间 以 900 mmol/L L-Ile 为底物, 以 pH 8.5 Tris-HCl 为缓冲液, 使用 1 g/L 细胞量 (DCW), 在 30 °C 下进行全细胞转化反应, 测定 12~24 h 内不同菌株全细胞催化反应中 KMV 产量随时间的变化情况, 结果如图 5 所示, 可以发现, 突变株 5/13-26 和 7/23-6 全细胞催化反应在转化反应进行 24 h 后 KMV 达到最大值, 对照株在 21 h 时达到最大值。在转化反应进行

至21 h 之后,KMV 产量增加幅度在逐步降低,这说明在转化反应后期,全细胞催化剂的酶催化活性已经大幅度降低。

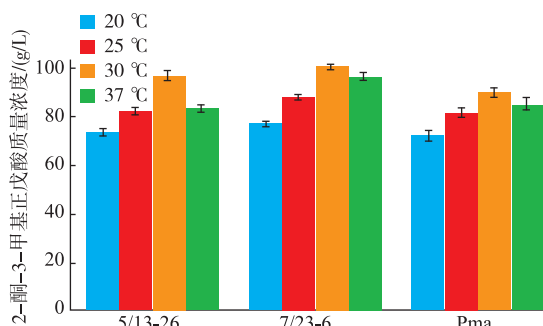


图 4 反应温度对全细胞转化反应的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on whole-cell biocatalyst

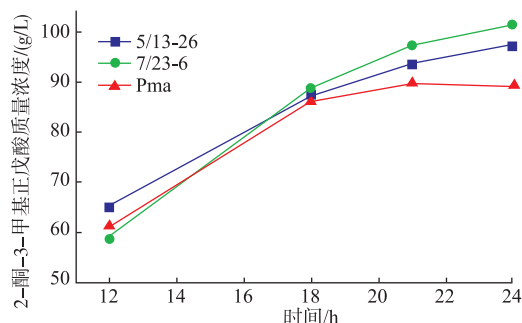
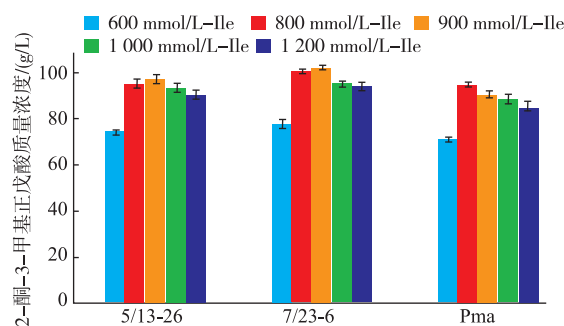


图 5 转化反应时间对全细胞转化反应的影响

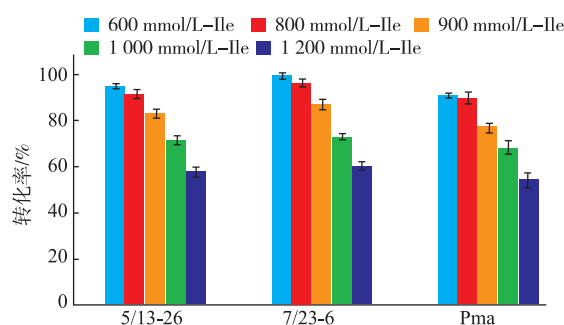
Fig. 5 Effect of reaction time on whole-cell biocatalyst

2.2.4 突变株全细胞催化剂最适底物浓度 在 600~1 200 mmol/L L-Ile 范围内设置了 5 个浓度梯度,测定全细胞转化反应进行 21~24 h 后的最大的 KMV 产量,可以发现突变株 5/13-26 和 7/23-6 最适底物浓度均为 900 mmol/L L-Ile,而初始菌最适底物浓度为 800 mmol/L L-Ile(图 6(a)),这说明该两株突变株全细胞转化 L-Ile 的能力要强于对照菌。当继续增加底物浓度,KMV 产量反而出现了下降(图 6(a)),这说明当细胞长时间暴露于高浓度的 L-Ile 饱和溶液中时全细胞催化剂受底物抑制的现象才显现出来。此外,当底物浓度为 600~800 mmol/L 时,这三株菌全细胞转化反应时底物转化率均在 90%以上,继续增加底物浓度时,底物转化率均急剧下降(图 6(b))。尽管如此,在 900 mmol/L L-Ile 下,突变株 7/23-6 的 KMV 产量可以达到 102 g/L,底物转化率可以达到 87%,与对照菌相比,底物转化率

提高了 13%。



(a)不同L-Ile浓度下 α -酮- β -甲基正戊酸产量的比较



(b)不同L-Ile浓度下底物转化率的比较

图 6 比较突变株 5/13-26、7/23-6 与初始菌全细胞转化不同浓度 L-Ile

Fig. 6 Comparison of whole-cell biocatalysts between 5/13-26, 7/23-6 and the original strain under different L-Ile concentration

综上所述,1 g/L 突变株全细胞催化剂(DCW)全细胞转化反应最适转化反应条件为:以 pH 8.5 Tris-HCl 为缓冲液,用 900 mmol/L L-Ile 作为底物,并在 30 °C 下进行全细胞催化反应,最适反应时间为 21~24 h。在此反应条件下,突变株 7/23-6 全细胞转化 L-Ile 可生成 102 g/L KMV。

2.3 产物 KMV 以及反应时间对突变株全细胞转化反应的影响

2.3.1 产物 KMV 对突变株全细胞转化反应速率的影响 向转化体系中添加 100 mmol/L KMV,研究 KMV 对不同突变株全细胞转化反应速率的影响,并与不添加 KMV 时的全细胞转化反应速率进行比较(图 7(a)),可以发现,所有菌株的转化反应速率在添加 KMV 后均出现了不同程度的降低,产物 KMV 对酶活性产生了比较明显的抑制作用。添加 KMV 后速率下降百分比如图 7(b)所示,突变株 5/13-26 速率下降幅度最大,约 32%,高于对照菌的 27%。

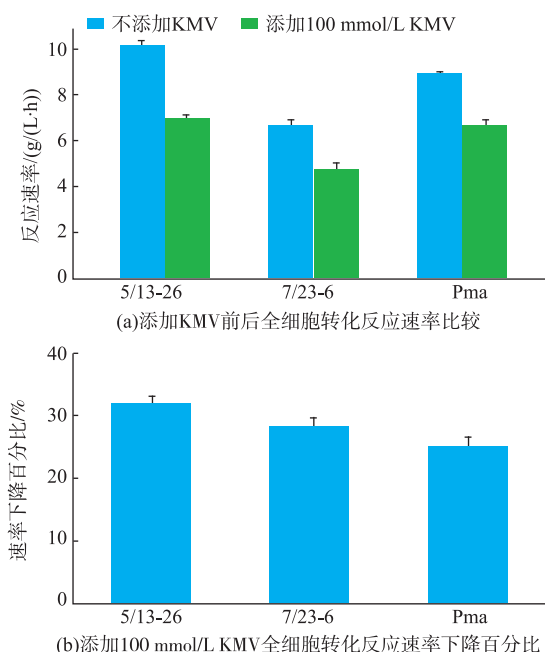


图7 产物KMV对全细胞转化反应速率的影响

Fig. 7 Effect of KMV on whole-cell biocatalyst reaction rate

2.3.2 转化反应时间对突变株全细胞催化剂热稳定性的影响 将正向突变株在 30 °C 下热处理不同时间,测定其全细胞转化反应速率,结果如图 8(a)所示,热处理 24 h 内,突变株 5/13-26 的反应速率均高于对照菌,然而其相对活性下降幅度最大(图 8(b)),约 25%;虽然热处理 24 h 内,突变株 7/23-6 反应速率一直低于对照菌,但其相对活性下降幅度最小,约 14%(图 8(b)),低于对照菌 36.7%。由此可见,除了产物KMV对酶活性有明显的抑制作用外,氨基酸脱氨酶的热稳定性是另外一个不可忽略的影响因素。

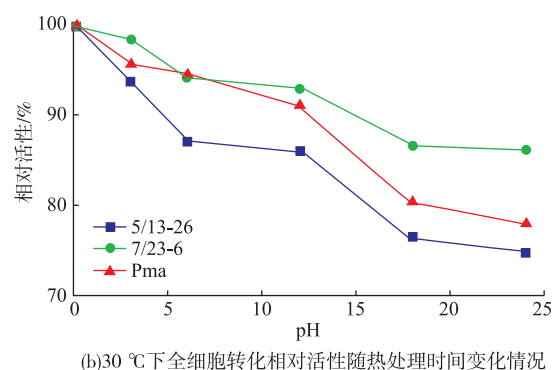
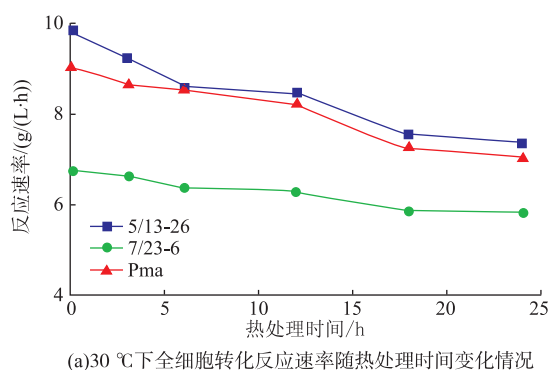


图8 不同突变株 30 °C 下全细胞转化热稳定性比较

Fig. 8 Comparison of thermostability between different mutants by whole-cell biocatalyst at 30 °C

3 结语

L-氨基酸脱氨酶活性的测定,可以通过对酶催化产物组分如氨气^[18]、 α -酮酸^[19]进行测定,也可以用经典瓦氏呼吸器或者氧电极测定氧气的消耗^[20],或者测定底物氨基酸的消耗量来进行酶活性测定^[21],但这些测量方式各有自己的优势和弊端。本研究使用氯化铁检测酮酸,氯化铁可以与 α -酮- β -甲基正戊酸生成墨绿色络合物,操作简便,可以作为初筛中检测 L-氨基酸脱氨酶的检测剂,但是由于生成的络合物不稳定,无法在络合物紫外吸光值和 KMV 浓度之间获得较好的线性关系,所以只能采用 HPLC 方法对 KMV 进行定量检测。尽管用定向进化等突变方法对目标基因进行突变十分普遍,但是高效筛选目标酶的方法并没有得到改善。本研究中使用的高通量筛选方法具有概率低、工作强度大、消耗时间长的缺点,需要对每个克隆子进行重复操作,先后要经过 96 孔板培养、转移部分菌液至另一块 96 微孔板以及活性测定这些过程,面对突变子数量庞大的突变库却无法针对耐产物抑制突变子直接进行筛选。此外,较低浓度的 KMV 即可与氯化铁络合反应产生颜色较深的墨绿色现象,降低了筛选的灵敏度。建立一个适合在培养液中快速、灵敏检测 L-氨基酸脱氨酶的高通量筛选方法仍旧是一项挑战^[22]。

由于 L-Ile 在室温下最大溶解度为 30 g/L 左右,一定量的固体 L-Ile 在转化反应开始前被一次性加入到 20 mL 转化反应体系中,然后一边被转化生成 KMV 一边溶解。因此在实际的全细胞转化底

物过程中,底物抑制作用并不是很明显,只有在细胞长时间暴露于L-Ile饱和溶液中时,底物的抑制作用才显现出来。此外,产物抑制在本研究中表现得较为明显,高浓度的KMV会抑制底物进一步被转化为产物。由于L-氨基酸脱氨酶的活性在实际转化反应过程中同时受产物抑制和底物抑制、环境pH值的变化和酶的热稳定性的影响,全细胞转化反应速率不能作为唯一的检测指标来进行突变子筛选,所以本研究通过逐步增加底物浓度,对不同突变株全细胞转化底物的最高KMV产量进行对比,来筛选出综合性能提高的突变株。

虽然可以通过随机突变的方式对L-氨基酸脱氨酶进行分子改造,但该方法具有一定盲目性。来源于蛇毒(*Calloselasma rhodostoma*)和不透明红球菌(*Rhodococcus opacus*)中的氨基酸氧化酶的晶体结构均被报道^[23-24],并且这些酶的催化活性以及结

构特点均被详细地研究。但是L-氨基酸脱氨酶的氨基酸序列与它们的同源性不高,与其他有晶体结构报道的蛋白的氨基酸序列相似性也较低,无法开展可靠性较高的蛋白结构同源模拟。

易错PCR具有操作简便的特点,其应用也比较广泛。本研究利用易错PCR定向进化来自于*Proteus mirabilis*的L-氨基酸脱氨酶,获得了全细胞转化L-Ile生成KMV产量略有提高的突变株7/23-6,与突变株5/13-26相比,其目标基因的氨基酸序列仅多了一个突变位点A209E,而突变株7/23-6在热稳定性上表现出一定程度的提高,所以后期将会对该位点进行饱和突变来分析该位点对酶活性的影响。同时,也可以在此基础上针对该突变株的其他氨基酸突变位点进行分析来提高L-氨基酸脱氨酶转化L-Ile的效率。

参考文献:

- [1] OGO S,UEHARA K,ABURA T et al. pH-dependent chemoselective synthesis of alpha-amino acids. Reductive amination of alpha-keto acids with ammonia catalyzed by acid-stable iridium hydride complexes in water [J]. **Journal of the American Chemical Society**,2004,126(10):3020-3021.
- [2] HUANG H M,ZHANG H,OU H C et al. alpha-Keto-beta-methyl-n-valeric acid diminishes reactive oxygen species and alters endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2004,37(11):1779-1789.
- [3] HUANG H M,OU H C,CHEN H L,et al. Protective effect of alpha-keto-beta-methyl-n-valeric acid on BV-2 microglia under hypoxia or oxidative stress [M]. *Role of the Mitochondria in Human Aging and Disease; From Genes to Cell Signaling*,2005:272-278.
- [4] APARIICIO M,BELLIZZI V,CHAUVEAU P et al. Protein-restricted diets plus keto/amino acids - a valid therapeutic approach for chronic kidney disease patients[J]. **Journal of Renal Nutrition**,2012,22(2):S1-S21.
- [5] FERNANDEZ-LAFUENTE R,RODRIGUEZ V,GUISAN J M. The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into alpha-keto acids (phenylpyruvic acid) [J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1998,23(1/2):28-33.
- [6] BAEK J O,SEO J W,KWON O et al. Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Basic Microbiol**,2011,51(2):129-135.
- [7] MASSAD G,ZHAO H,MOBLEY H L T. *Proteus mirabilis* amino-acid deaminase-cloning,nucleotide-sequence and characterization of aad[J]. **Journal of Bacteriology**,1995,177(20):5878-5883.
- [8] PANTALEONE D P,GELLER A M,TAYLOR P P. Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids[J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**,2001,11(4/5/6):795-803.
- [9] TAKAHASHI E,ITO K,YOSHIMOTO T. Cloning of L-amino acid deaminase gene from *Proteus vulgaris* [J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,1999,63(12):2244-2247.
- [10] CIOACA C,IVANOF A. Bacterial amino acid oxidases. I. L-amino acid oxidase and its distribution in bacteria [J]. **Archives Roumaines De Pathologie Experimentales Et De Microbiologie**,1974,33(3-4):211-222.
- [11] BOUVRETTE P,LUONG J H T. Isolation,purification,and further characterization of an L-phenylalanine oxidase from *morganella-morgan* II [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,1994,48(2):61-74.

- [12] DUERRE J A, CHAKRABARTY S. l-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1975, 121 (2): 656-663.
- [13] HOSSAIN G S, LI J, SHIN H D, et al. Bioconversion of L-glutamic acid to α -ketoglutaric acid by an immobilized whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis* [J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 169: 112-120.
- [14] HOSSAIN G S, LI J, SHIN H D, et al. One-step biosynthesis of α -keto- γ -methylthiobutyric acid from L-methionine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris* [J]. **PLoS One**, 2014, 9(12): e114291.
- [15] HOU Y, HOSSAIN G S, LI J, 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 [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(20): 8391-8402.
- [16] SONG Y, LI J, SHIN H D, et al. One-step biosynthesis of α -ketoisocaproate from L-leucine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris* [J]. **Scientific Reports**, 2015, 5: 12614.
- [17] MIYAZAKI K, TAKENOUCHI M. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid [J]. **Biotechniques**, 2002, 33(5): 1036-1044.
- [18] TIMMER B, OLTHUIS W, van den Berg A. Ammonia sensors and their applications - a review [J]. **Sensors and Actuators B-Chemical**, 2005, 107(2): 666-677.
- [19] INGH S, GOGOI B K, BEZBARUAH R L. Optimization of medium and cultivation conditions for L-amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus* [J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2009, 55(9): 1096-1102.
- [20] RALPH E C, ANDERSON M A, CLELAND W W et al. Mechanistic studies of the flavoenzyme tryptophan 2-monooxygenase: Deuterium and N-15 kinetic isotope effects on alanine oxidation by an L-amino acid oxidase [J]. **Biochemistry**, 2006, 45(51): 15844-15852.
- [21] ROTH M. Fluorescence reaction for amino acids [J]. **Analytical Chemistry**, 1971, 43(7): 880-882.
- [22] HOSSAIN G S, LI J, SHIN H D, et al. L-Amino acid oxidases from microbial sources: types, properties, functions, and applications [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(4): 1507-1515.
- [23] FAUST A, GEUEKE B, NIEFIND K, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial L-amino-acid oxidase from *Rhodococcus opacus* [J]. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, 2006, 62: 279-281.
- [24] MOUSTAFA I M, FOSTER S, LYUBIMOV A Y, et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: Insights into structure and mechanism [J]. **Journal of Molecular Biology**, 2006, 364(5): 991-1002.

会 议 消 息

2019 年第六届化学与食品工程国际会议(ICCFE 2019)

会议时间: 2019-04-13 至 2019-04-15

会议地点: 日本东京

主办单位: ICCFE 2019

联系人: 张女士

电话: +852-3500-0137

Email: iccfe@cbees.net

官方网址: <http://www.iccfe.org/>

会议简介: 2019 年第六届化学与食品工程国际会议(ICCFE 2019)将于 2019 年 4 月 13-15 日在日本东京工业大学举办。主要亮点: 1. 著名学者教授担任大会报告人: Hiroyuki Nakamura 教授, 来自日本东京工业大学; King-Chuen Lin 教授, 来自国立台湾大学; M. R. Riazi 教授, 来自科威特大学。2. 出版: 被录用的文章将被发表在化学工程与应用国际期刊(IJCEA ISSN: 2010-0221), 能被 DOAJ, Google Scholar, ProQuest and Crossref 检索; 食品工程国际期刊(IJFE, ISSN: 2301-3664), 能被 Google Scholar, Crossref 检索。3. 考察: 我们将于 2019 年 4 月 15 日在日本东京工业大学组织学术考察。