



L-氨基酸氧化酶的结构、底物谱、家族进化及应用研究进展*

陆泽林^{1,2)**} 越 皓^{1)**} 张艺凡²⁾ 于珊珊¹⁾ 杨广宇^{3)***} 马富强^{2)***}⁽¹⁾ 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; ⁽²⁾ 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 苏州 215163;⁽³⁾ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要 L-氨基酸氧化酶(LAAO)是一类生物体内参与氨基酸氧化代谢的重要氧化还原酶,能够以氧分子为电子受体催化L-氨基酸氧化脱氨,生成相应的酮酸、氨(NH₃)和过氧化氢(H₂O₂)。近期发现有些LAAO能够专一性识别特定氨基酸,而不受其他种类氨基酸的干扰,因而在手性胺类化合物拆分、 α -酮酸生物合成、临床样本、食品及氨基酸发酵过程中氨基酸含量检测等领域都发挥着重要作用。本文重点综述目前研究报道的底物专一性LAAO,总结并比较这些酶的酶学性质、结构功能,以及家族进化规律等,并进一步讨论这些酶在生物催化及氨基酸检测中的应用。本综述将为底物特异性LAAO的分子机制研究及产业应用研究提供重要的素材和指导。

关键词 L-氨基酸氧化酶, 底物特异性, 酶家族进化, 氨基酸检测, 生物催化

中图分类号 Q5, Q51, Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0161

L-氨基酸氧化酶(EC.1.4.3.2, L-amino acid oxidase, LAAO)是自然界中普遍存在的氧化还原酶类,能够催化氧化L-氨基酸脱氨生成相应的酮酸、过氧化氢和氨(图1)。该类酶在生物体内分布广泛,在动物^[1]、植物^[2]、细菌^[3]、真菌^[4]、放线菌^[5]、藻类^[6]中都有相关报道。细菌、真菌和植物等来源的LAAO主要与氮源的利用和转化有关^[7]。大多数LAAO属于黄素蛋白家族(flavoproteins),以黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)为辅因子。自从1944年Zeller等^[8]首次对LAAO进行报道以来,科学家们对LAAO的研究已有半个多世纪的历史,对该类酶的酶学性质、分子结构、催化机制等都有较为深入的理解,并将该家族酶广泛应用于疾病治疗、生物合成、生物传感器等各个领域。

LAAO的主要生理功能是参与氨基酸的转化和再利用,因此其底物谱通常比较宽泛,一种酶能够识别并催化多种天然氨基酸。如来自哥伦比亚珊瑚蛇(*Micrurus mipartitus*)蛇毒的MipLAAO、来自金环蛇(*Bungarus fasciatus*)蛇毒的Bf-LAAO能

够识别催化多种氨基酸^[9-10]。近年来,科学家们陆续从不同来源的物种中鉴定出具有高度底物专一性的LAAO,如L-赖氨酸氧化酶、L-精氨酸氧化酶、L-色氨酸氧化酶、L-苯丙氨酸氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、甘氨酸氧化酶等,这些LAAO能够专一地催化特定种类的氨基酸,而不受其他种类氨基酸的干扰。随着越来越多底物专一性LAAO的发现和深入研究,其应用领域也越来越广泛,如在手性胺类化合物拆分^[11-12]、 α -酮酸生物合成^[12-13]、临床样本氨基酸含量测定^[14-15]、氨基酸发酵过程监测^[16]、食品营养成分检测^[17-18]等方面都具有重大应用潜力。

本文对目前已报道大多数的氨基酸氧化酶进行

* 国家自然科学基金(31900911, 21627812), 江苏省自然科学基金(SBK2019041665), 中国博士后面上基金(2019M660129)和长春中医药大学培育基金(2018KJ02)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

马富强. Tel: 0512-69588303, E-mail: mafuqiang318@sibet.ac.cn

杨广宇. Tel: 021-34207189, E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-29, 接受日期: 2020-07-17

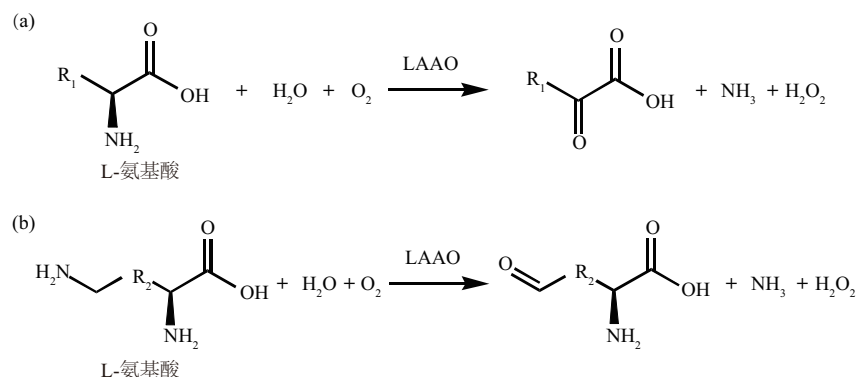


Fig. 1 L-amino acid oxidase catalyzes the oxidative deamination of amino acids. (a) LAAO oxidizes the α -carbon amine.
(b) LAAO oxidizes the side-chain amine

图1 L-氨基酸氧化酶催化氨基酸主链氨基 (a) 和侧链氨基 (b) 氧化脱氨的反应式

调研总结, 重点对其中具有高度底物特异性的氨基酸氧化酶的来源、结构功能特征、酶学性质尤其是底物谱性质、家族进化关系进行总结和比较, 进一步对这些酶在氨基酸检测、化合物合成方面的应用进行综述。

1 LAAO的结构功能

目前已进行结构表征的大多数LAAO为同源二聚体, 具有相似的折叠方式, 由 α 螺旋和 β 折叠共同组成3个主要结构域: FAD结合结构域(FAD-binding domain)、底物结合结构域(substrate-binding domain)和螺旋结构域(helical domain) (图2a) [19]。其中FAD结合结构域具有高度保守的三级结构, FAD辅因子结合在FAD结合结构域和底物结合结构域形成的空腔内, 是活性位点的一部分, 在催化过程中起到电子传递的作用。螺旋结构域主要负责两单体二聚作用 (图2b) [20]。

目前, 对LAAO催化机制的研究尚不透彻, 科学家们以不同来源LAAO为研究对象, 提出了可能存在不同的催化残基组合, 包括His223-Gly464 (*Calloselasma rhodostomum*) [21]、H244-R386-E121 (*Escherichia coli*) [22]、R143-H₂O-T313 (*Pseudomonas sp.* P-501) [23]等, 说明了LAAO家族催化机制的复杂性。以来源于马来亚蝮蛇 (*Calloselasma rhodostomum*) 的Cr-LAAO为例, 催化残基His223和Gly464, 位于FAD结合结构域和底物结合结构域界面处 (图2c), 该酶Gly464的羰基氧原子与底物的氨基形成氢键, His223夺取底物

的质子化 α -氨基的一个氢原子, 去质子化之后的氨基氮原子上的孤对电子转移到 α -碳原子上, 而 α -碳原子上的氢转移到FAD辅因子, 底物被激活而形成亚胺 (亚氨基酸) 中间体, 亚氨基酸经过自发水解, 生成相应的 α -酮酸和氨 (图3) [21]。目前报道晶体结构的LAAO多数来源于蛇毒, 近年来陆续有微生物来源的LAAO晶体结构被报道, 如来源于硫化叶菌 (*Sulfolobus tokodaii*) 的天冬氨酸氧化酶 [24]、不透明红球菌 (*Rhodococcus opacus*) 的RoLAAO [25]、假单胞菌 (*Pseudomonas sp.* P-501) 的苯丙氨酸氧化酶 [23] 及绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 的赖氨酸氧化酶 [26]。通过比较不同来源的LAAO发现, 虽然蛇毒来源和微生物来源的LAAO在氨基酸序列上同源性很低, 但在三级结构上高度类似, 例如Cr-LAAO与Ro-LAAO序列同源性仅为27%, 但是对两种酶的晶体结构进行分子重叠却显示出高度的相似性 (RMSD 5.8) (图2d), 这说明LAAO的三级结构对其发挥催化功能具有重要作用。

目前, 除了以FAD为辅因子的LAAO之外, 科学家们还解析了依赖磷酸吡哆醛 (pyridoxal phosphate, PLP) [27]、半胱氨酸色氨酸酮 (cysteine tryptophylquinone, CTQ) [28]等其他辅因子的LAAO (图4)。这些酶具有与FAD依赖型LAAO不同的催化机制, 可能是由不同的祖先蛋白趋同进化而来 [29]。此外, 这些新型LAAO大多具有较高的底物专一性, 正逐渐得到越来越广泛的关注和研究。

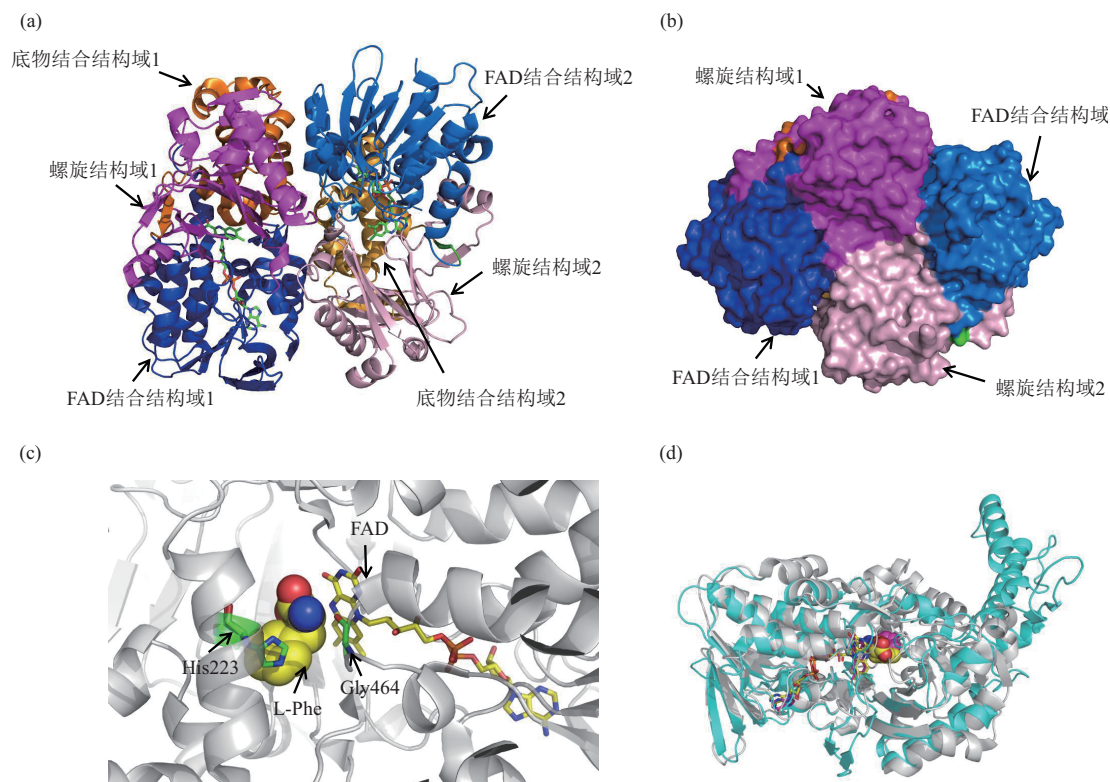


Fig. 2 Analysis of crystal structures of LAAOs

图2 LAAO晶体结构分析

(a) 来自矛头蝮蛇 (*Bothrops atrox*) 的LAAO (BatroxLAAO) 二聚体三维结构模型, 每个单体包含3个结构域: 底物结合结构域、FAD结合结构域、螺旋结构域. (b) BatroxLAAO二聚体的结合方式, FAD结合域和螺旋域参与二聚体形成. (c) Cr-LAAO的催化位点, FAD为黄色棒状分子, 底物苯丙氨酸为黄色球状分子, 催化残基His223和Gly464为绿色棒状分子. (d) Cr-LAAO与Ro-LAAO (同源性仅27%) 的结构重叠显示二者具有类似的三维结构, RMSD 为5.8.

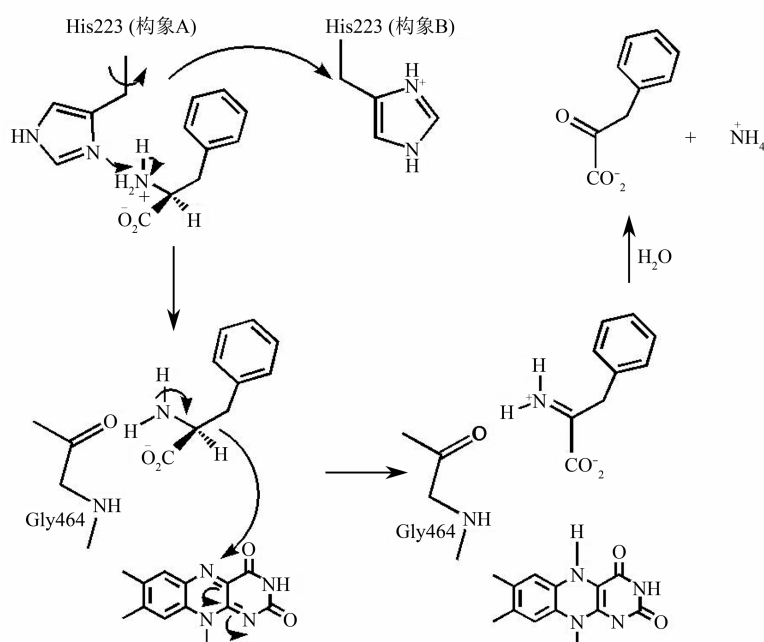


Fig. 3 Catalytic mechanism for the oxidation of L-phenylalanine by L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostomum* [21]

图3 来源于*Calloselasma rhodostomum*的LAAO催化氧化L-苯丙氨酸的反应机理 [21]

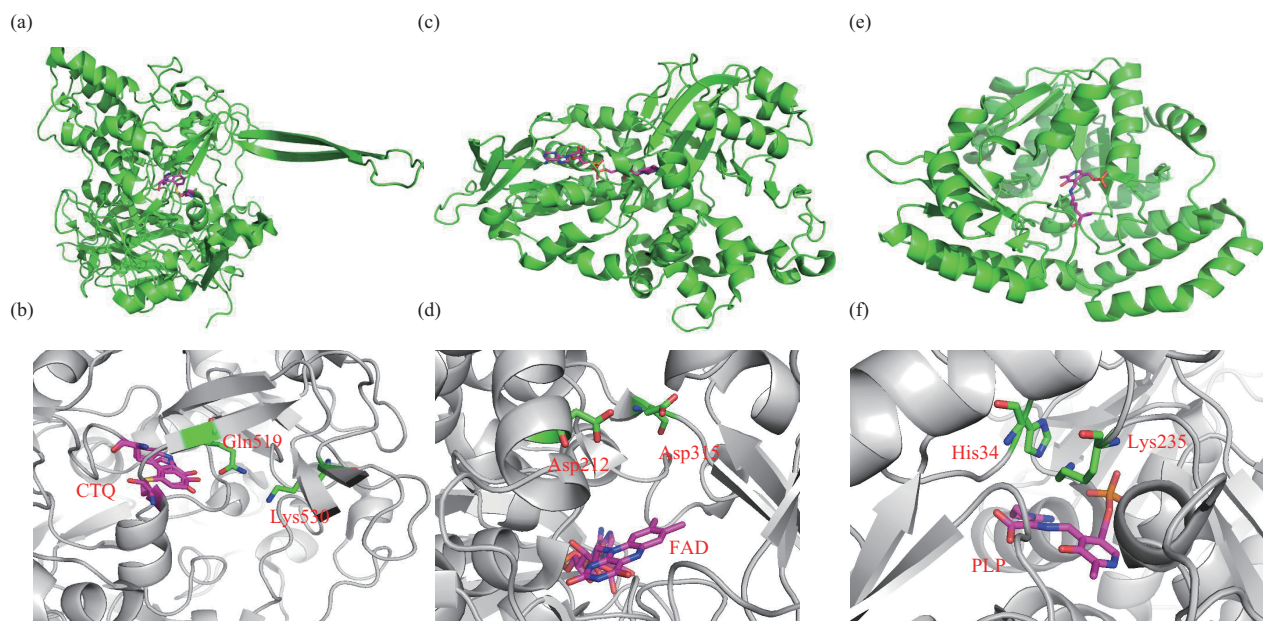


Fig. 4 Molecular structure and catalytic residue of cofactor-dependent amino acid oxidase

图4 3种辅因子依赖氨基酸氧化酶的分子结构及推测催化残基

(a) CTQ依赖的赖氨酸氧化酶LeO (PDB: 3WEV) 的晶体结构, 玫红色球棍分子结构表示辅因子CTQ. (b) CTQ依赖的赖氨酸氧化酶LeO的活性中心, 绿色球棍分子结构表示推测催化残基Gln519、Lys530. (c) FAD依赖的赖氨酸氧化酶LaO (PDB: 3X0V) 的晶体结构, 玫红色球棍分子结构表示辅因子FAD. (d) FAD依赖的赖氨酸氧化酶LaO的活性中心, 绿色球棍分子结构表示推测催化残基Asp212、Asp315. (e) PLP依赖的精氨酸氧化酶RohP (PDB: 6C3C) 的晶体结构, 玫红色球棍分子结构表示辅因子PLP. (f) PLP依赖的精氨酸氧化酶RohP的活性中心, 绿色球棍分子结构表示推测催化残基Lys235、His34.

2 LAAO家族底物谱进化关系分析

目前缺少对LAAO的家族进化关系分析. 我们对本文中涉及的几种具有代表性的LAAO蛋白序列进行进化树分析, 并考察进化树上相邻成员的同源性 (图5). 我们发现两种完全不同功能和来源的蛋白质同源性一般在20%以下. 本文涉及的LAAO大致由5种祖先蛋白进化而来, 根据祖先蛋白的不同可以分为5个分支. 具体分析如下:

a. 第I分支均为FAD依赖的LAAO, 包含了本文研究的大部分LAAO. 从底物特异性来看, 第I分支同时包含宽底物谱和底物专一性的LAAO, 这从侧面说明了宽底物谱和底物专一性的LAAO具有相同的进化起源.

b. 第II分支也均为FAD依赖的LAAO, 从功能上看, 第II分支既包含底物特异性的LAAO (色氨酸氧化酶vioA、Ok-AROD和Ps-AROD为精氨酸氧化酶, 而Ap-LAAO和Ac-LAAO为宽底物谱的LAAO). 值得注意的是, 虽然色氨酸氧化酶vioA与来自第I分支的La-RebO同属色氨酸氧化酶, 但

二者并无明显的同源性, 可能是由不同祖先蛋白经趋同进化而来.

c. 第III分支包含5个成员: Mm-GO、Mm-LeO、Ms-LeO、Ds-LeO以及Pf-LAAO, 其中Pf-LAAO为FAD依赖的LAAO, 其余4种LAAO的辅因子为CTQ. 值得注意的是, 虽然Pf-LAAO为宽底物谱的LAAO, 而Mm-LeO为底物专一性的赖氨酸氧化酶, 但二者的序列同源性高达54%, 说明它们是由同一个祖先基因进化而来, 形成的功能不同、且依赖不同辅因子及不同催化机制的现代酶, 这为酶分子进化提供了非常有价值的研究素材, 对其进行深入的分子机制及进化轨迹研究, 有望揭示LAAO进化的新规律.

d. 第IV分支均为特异性的天冬氨酸氧化酶且都以FAD为辅因子, 包括Pp-LAspO、Lh-LAspO、Tl-LAspO和St-LAspO. 值得注意的是, 谷氨酸和天冬氨酸在分子结构上非常类似, 具有相同的侧链官能团, 区别仅在于天冬氨酸相比于谷氨酸少一个亚甲基, 但是已报道的天冬氨酸氧化酶对谷氨酸基本无活性 (图6). 相比之下, 谷氨酸氧化酶

(Sp-LGOX 和 Ss-LGOX) 属于第I分支, 其对天冬氨酸也几乎无活性, 上述现象说明这两类专一性的氨基酸氧化酶来源于不同的祖先蛋白, 从而造成了这两类酶高度专一的底物偏好性. 深入研究这两类酶的底物结合识别模式, 有助于揭示酶对高度类似底物特异性差异的分子机制.

e. 第V分支为PLP依赖的精氨酸氧化酶Ind4及RohP, 这类酶应该是单独一个祖先基因进化而来. 来源于第II分支的Ok-AROD和Ps-AROD也是底物

专一性的精氨酸氧化酶, 但与Ind4及RohP分别来源于不同祖先蛋白, 也属于趋同进化的现象.

通过比对不同分支的底物谱性质可以发现, 宽底物谱LAAO的进化关系较为复杂, 分布于I、II、III等不同分支, 说明了其起源的多样性. 以上这些现象说明了氨基酸氧化酶来源及功能进化的多样性, 为进一步深入研究氨基酸氧化酶家族进化及亚家族分类提供了线索.

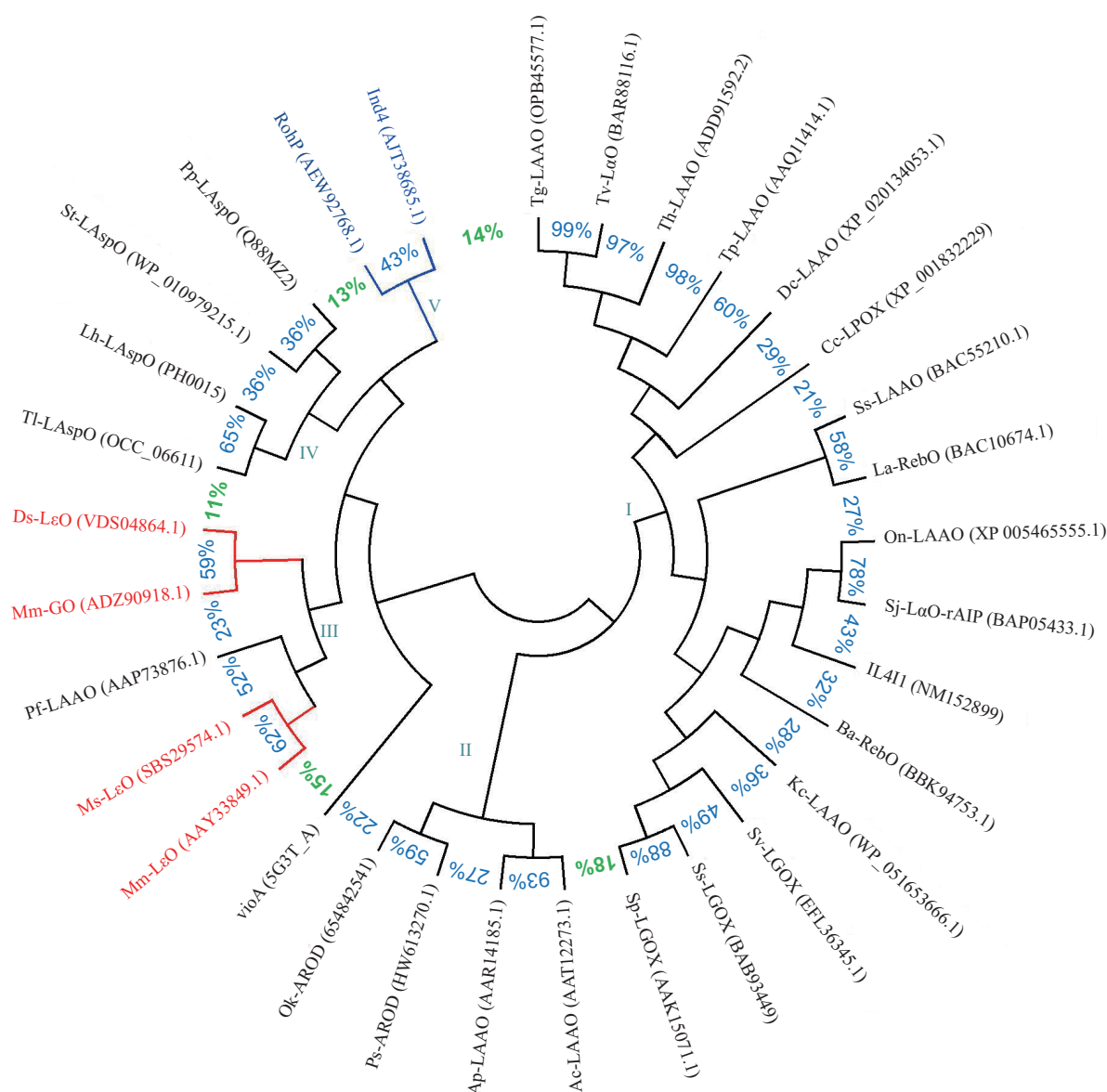


Fig. 5 Phylogenetic analysis of the LAAO protein sequences and the homology of the adjacent members in the evolutionary tree

图5 LAAO家族进化树分析

进化树上标注了相邻成员的序列同源性. 蓝色字体表示PLP辅因子, 红色字体表示CTQ辅因子, 其余黑色字体表示FAD辅因子.

3 LAAO的底物谱特征

3.1 宽底物谱的LAAO

目前发现的大多数LAAO（如几乎所有蛇毒来源的LAAO）都是宽底物谱的，能够识别并催化多种氨基酸. 但这些广谱LAAO的底物谱也各有不同：有的能够催化所有20种天然氨基酸，如来自海洋细菌 *Pseudoalteromonas flavipulchra* strain C2 的 Pf-LAAO^[30] 和来自北里孢菌 (*Kitasatospora cheerisanensis*) 的 Kc-LAAO^[31]（图6），但它们对不同氨基酸表现出明显的偏好性，相对活力可以相差上百倍；有的只能催化部分氨基酸种类，如贝伦

珊瑚蛇 (*Micrurus lemniscatus*) 蛇毒中的 Ml-LAAO，能够识别L-酪氨酸、L-色氨酸、L-亮氨酸等多种疏水性氨基酸^[32]；加州海兔 (*Aplysia californica*) 中的 Ac-LAAO 能够识别L-精氨酸、L-赖氨酸等亲水性的碱性氨基酸^[33]；也有一些宽底物谱的LAAO既能够识别疏水性氨基酸，也能识别亲水性氨基酸，如哈茨木霉菌 (*Trichoderma harzianum* ETS 323) 中的 Th-LAAO 能够识别L-苯丙氨酸、L-丙氨酸等疏水性氨基酸，也能够识别L-赖氨酸、L-谷氨酸等亲水氨基酸（表1）^[34]. 不同底物偏好性的LAAO为研究酶的底物特异性分子机制提供了丰富的素材.

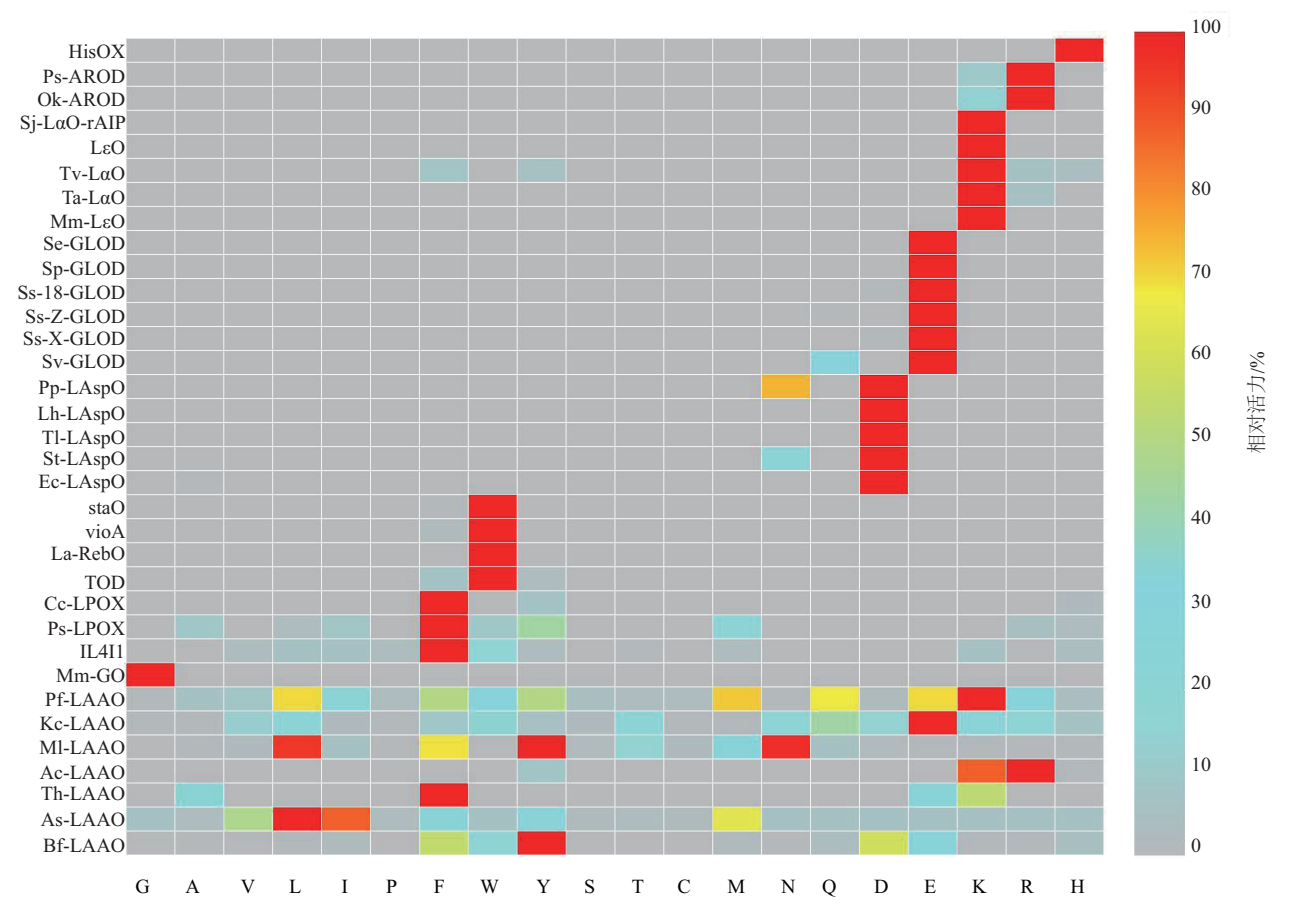


Fig. 6 Substrate specificity properties of some typical LAAOs
图6 目前已报道的部分代表性LAAO的底物谱性质
每一行代表不同LAAO，每一列代表LAAO对20种天然氨基酸之一的相对比活力，右侧渐变条对应相应的数值0~100，代表同一种酶对不同底物的相对活力，以活力最高的底物为100%。

3.2 底物专一性LAAO

随着对LAAO研究的不断深入，越来越多的底物专一性LAAO被发现，这些底物专一性的LAAO

大多是微生物来源的. 通过对目前已报道的底物专一性LAAO进行总结比较发现，底物专一性LAAO种类分布与底物氨基酸类型（极性、电荷等）呈现

一定的规律性 (表1). 在非极性脂肪族侧链氨基酸中, 除了特异性的甘氨酸氧化酶被发现外^[35-36], 其他如L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸等氨基酸都没有发现相应的专一性LAAO; 所有的极性、不带电荷的侧链氨基酸 (L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-半胱氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酰胺) 都尚未发现相应的专一性LAAO; 在芳香族侧链氨基酸中, 除了L-酪氨酸没有发现专一性的LAAO, L-苯丙氨酸、L-色氨酸都发现了多种专一性的LAAO^[37-39]; 所有的酸性侧链氨基酸 (L-天冬氨酸、L-谷氨酸) 和碱性侧链氨基酸 (L-赖氨酸、L-精氨酸和L-组氨酸) 也都发现了多种专一性的LAAO^[40-47]. 由此可见, 目前发现的底物专一性LAAO 多是对具有带电或芳香族

官能团侧链的氨基酸, 这种现象可能与酶的底物选择性分子机制有关, 即通过改变底物结合口袋的组成氨基酸残基来调节静电作用力、空间位阻等参数, 可以比较容易地实现对带电或芳香族侧链氨基酸底物的专一性识别, 而较难实现对侧链大小相差不大、不能产生较强的酶-底物作用力的其他氨基酸的专一性识别. 另外, 有必要通过进一步的研究来考察自然界是否存在针对其他非极性侧链氨基酸的专一性LAAO, 以及能否通过蛋白质工程手段获得对其他类型氨基酸具有专一性的LAAO突变体, 这将对深入了解底物特异性机制、探讨自然进化是否存在序列空间的盲区 (即无法考察所有可能的突变类型) 产生重要启发.

Table 1 A summary of LAAO for different types of amino acids has been found so far

表1 目前已发现的针对不同类型氨基酸的LAAO总结

氨基酸类型	包含氨基酸种类	目前是否发现专一性LAAO
非极性脂肪族侧链氨基酸	G、A、P、V、L、I、M	除了G, 其他均未发现
极性、不带电荷的侧链氨基酸	S、T、C、N、Q	均未发现
芳香族侧链氨基酸	F、W、Y	F、W都有发现, Y未发现
带正电荷的 (碱性) 侧链氨基酸	K、R、H	均有发现
带负电荷的 (酸性) 侧链氨基酸	D、E	均有发现

从底物专一性的严格程度上看, 目前发现的底物专一性LAAO中, 有些酶具有高度的专一性, 只能特异性识别特定底物, 对其他氨基酸, 甚至是结构类似的氨基酸均无活性 (表2). 来自端链霉菌 (*Streptomyces endus*) 的谷氨酸氧化酶, 对谷氨酸的比活力是6 U/mg, 但对类似物谷氨酰胺、天冬氨酸, 以及其他氨基酸均无活性^[48]; 来自嗜嗜热古菌 (*Pyrococcus horikoshii* OT-3) 的天冬氨酸氧化酶, 对天冬酰胺和谷氨酸, 以及其他氨基酸也无明显活性^[49]; 来自地中海海洋单胞菌 (*Marinomonas mediterranea* NBRC 103028^T) 的赖氨酸氧化酶, 对赖氨酸的比活力是36.9 U/mg, 对精氨酸以及其他氨基酸均无活性^[14]. 这些例子为研究高度底物特异性识别机制提供了良好的素材. 相比于这些高度专一的酶, 还有一些除了对偏好底物有较高的活性, 对偏好底物的类似氨基酸也有一定活性 (表2). 例如: 来自紫色链霉菌 (*Streptomyces violascence*) 的谷氨酸氧化酶, 除了对谷氨酸的比活力为60.3 U/mg, 对谷氨酰胺也有

一定活性, 比活力为19.3 U/mg^[50]; 来自黄绿木霉菌 (*Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D) 的赖氨酸氧化酶, 除了对L-赖氨酸的比活力为90 U/mg, 对L-精氨酸和非蛋白质氨基酸L-鸟氨酸也具有较弱活性, 比活力分别为5.2 U/mg、7.5 U/mg^[51]; 来自假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. TPU 7192) 的精氨酸氧化酶能够识别L-精氨酸, 同时也能识别L-赖氨酸, 比活力为0.019 U/mg^[15]. 还有些酶能够特异性识别带有芳香环侧链的底物, 如来自紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472)^[52] 和海洋链霉菌 (*Streptomyces* sp. TP-A0274)^[53] 的色氨酸氧化酶能够识别L-色氨酸, 也能够轻微识别L-苯丙氨酸, 可能是由于两种氨基酸具有疏水的芳香环; 来自鬼伞属真菌 (*Coprinus* sp. SF-1) 的色氨酸氧化酶, 能够识别L-色氨酸, 同时能够轻微识别L-苯丙氨酸和L-酪氨酸^[54]. 底物特异性的LAAO为我们研究底物特异性分子机制, 以及探讨不同底物特异性LAAO的进化关系, 也提供了重要的素材.

Table 2 The source, substrate specificity and specific activity of LAAO with different substrate specificity listed in this paper

表2 本文中列举的不同底物特异性的LAAO的来源、底物特异性、比活力等酶学性质

L-氨基酸氧化酶	来源	底物特异性	比活力/(U·mg ⁻¹)	参考文献
As-LAAO	<i>Aquimarina</i> sp. strain antisso-27	宽谱 (最优亮氨酸)	未报道	[3]
Bf-LAAO	<i>Bungarus fasciatus</i>	宽谱 (最优酪氨酸)	41.99	[10]
Pf-LAAO	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> strain C2	宽谱 (最优赖氨酸)	未报道	[30]
Kc-LAAO	<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	宽谱 (最优谷氨酸)	未报道	[31]
Ml-LAAO	<i>Micrurus lemniscatus</i> snake venom	宽谱 (最优酪氨酸)	800	[32]
Ac-LAAO	<i>Aplysia californica</i>	宽谱 (最优精氨酸)	未报道	[33]
Th-LAAO	<i>Trichoderma harzianum</i> ETS 323	宽谱 (最优苯丙氨酸)	未报道	[34]
Sj-LaO-rAIP	<i>Scomber japonicus</i>	专一 (赖氨酸)	6.5	[43]
Mm-LεO	<i>Marinomonas mediterranea</i>	专一 (赖氨酸)	未报道	[44]
Tv-LaO	<i>Trichoderma viride</i> Y244-2	专一 (赖氨酸)	66.2	[45]
Tc-LaO	<i>Trichoderma</i> cf. <i>aureoviride</i> Rifai VKM F-4268D	专一 (赖氨酸)	90	[51]
Mm-N-LεO	<i>Marinomonas mediterranea</i> NBRC103028 ^T	专一 (赖氨酸)	36.9	[14]
Ps-AROD	<i>Pseudomonas</i> sp. TPU 7192	专一 (精氨酸)	0.19	[15]
Ok-AROD	<i>Oceanobacter kriegii</i>	专一 (精氨酸)	未报道	[29]
AncARODn0	Artificial design , predicted ancestral gene	专一 (精氨酸)	未报道	[29]
AncARODn1	Artificial design , predicted ancestral gene	专一 (精氨酸)	未报道	[29]
AncARODn2	Artificial design , predicted ancestral gene	专一 (精氨酸)	未报道	[29]
RohP	<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057	专一 (精氨酸)	未报道	[27]
Ind4	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 12648	专一 (精氨酸)	未报道	[46]
staO	<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0274	专一 (色氨酸)	0.08	[55]
vioA	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	专一 (色氨酸)	未报道	[55]
La-RebO	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> ATCC 39243	专一 (色氨酸)	未报道	[37]
TOD	<i>Coprinus</i> sp. SF-1	专一 (色氨酸)	362	[54]
Cc-LPOX	<i>Coprinopsis cinereus</i>	专一 (苯丙氨酸)	6.04	[12]
Ps-LPOX	<i>Pseudomonas</i> sp. P-501	专一 (苯丙氨酸)	102.5	[38]
IL4I1	<i>Humen</i>	专一 (苯丙氨酸)	3.236	[39]
Se-GLOD	<i>Streptomyces endus</i>	专一 (谷氨酸)	6	[48]
Sp-GLOD	<i>Streptomyces platensis</i> NTU 3304	专一 (谷氨酸)	未报道	[57]
Ss-18-GLOD	<i>Streptomyces</i> sp. 18G	专一 (谷氨酸)	152.4	[40]
Ss-Z-GLOD	<i>Streptomyces</i> sp. Z-11-6	专一 (谷氨酸)	50.8	[5]
Ss-X-LGOX	<i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	专一 (谷氨酸)	55.1	[41]
Sv-GLOD	<i>Streptomyces violascence</i>	专一 (谷氨酸)	60.3	[50]
Pp-LAspO	<i>Pseudomonas putida</i>	专一 (天冬氨酸)	未报道	[66]
Ph-LAspO	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT-3	专一 (天冬氨酸)	3.2	[49]
Tl-LAspO	<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473	专一 (天冬氨酸)	3.86	[42]
St-LAspO	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	专一 (天冬氨酸)	0.98	[11]
Ec-LAspO	<i>Escherichia coli</i>	专一 (天冬氨酸)	0.085	[47]
Bs-GO	<i>Bacillus subtilis</i> MT-2	专一 (甘氨酸)	0.46	[35]
Mm-GO	<i>Marinomonas mediterranea</i>	专一 (甘氨酸)	0.057	[36]
HisOX	<i>Brevibacillus borstelensis</i> KAIT-B-022	专一 (组氨酸)	未报道	[60]

4 应 用

底物专一性LAAO由于具有能够特异性识别某

一种氨基酸,而不受其他杂质成分的干扰、副产物少等优点,在α-酮酸制备、手性胺拆分及在临床、食品等领域中对氨基酸的检测都有广泛的应用

前景.

4.1 LAAO在氨基酸检测中的应用

专一性 LAAO 能够特异性识别特定氨基酸, 避免其他组分的干扰, 是临床样本、食品、发酵样品中氨基酸检测的核心酶. 例如, L-色氨酸作为血清素的前体, 与抑郁症、纤维藻等有关, 被确定为诊断炎症性肠病的有用生物标志物.

Kameya 等^[55] 利用两种色氨酸氧化酶对人体血液中 L-色氨酸的含量进行检测.

谷氨酸是世界上产量最大的氨基酸品种, 是重要的食品增鲜剂及医药分子, 同时也是生物体内氮代谢的基本氨基酸之一, 是人体重要的生理指标, 因此对其含量进行检测具有重要意义.

Maity 等^[56] 利用谷氨酸氧化酶开发了一种高灵敏度和选择性的 L-谷氨酸传感器, 用于人体血液中 L-谷氨酸浓度的测定; Kusakabe 等^[18] 用谷氨酸氧化酶测定酱油中的 L-谷氨酸含量; Chen 等^[57] 利用谷氨酸氧化酶开发了一种安培 L-谷氨酸传感器, 用于发酵过程中 L-谷氨酸浓度的测定.

高糖血症是先天性赖氨酸代谢异常的疾病, 通常伴随着许多其他先天性疾病, 包括尿素循环紊乱、丙酮酸羧化酶缺乏症和有机酸紊乱^[58]. Matsuda 等^[14] 用地中海海洋单胞菌 (*Marinomonas mediterranea* NBRC103028^T) 中的赖氨酸氧化酶检测血液中赖氨酸的含量; Isobe 等^[59] 用该酶与绿色木霉菌 (*Trichoderma viride* Y244-2) 中的赖氨酸氧化酶对 L-赖氨酸检测进行了比较, 并用超高效液相色谱法 (UPLC) 进行验证, 发现前者更接近 UPLC 检测值, 可能是由于前者的底物谱更专一. 赖氨酸还是一种重要的必需氨基酸, Ciriello 等^[17] 将赖氨酸氧化酶通过共价偶联固定在过氧化聚吡咯修饰的铂电极上, 用来检测奶酪中的 L-赖氨酸含量. 赖氨酸主要通过发酵法制备, 对发酵过程中的赖氨酸产量进行实时监控具有重要意义. Romette 等^[16] 将赖氨酸氧化酶固定在明胶载体中, 并固定在氧电极传感器上, 用于连续流动系统对发酵罐中 L-赖氨酸的浓度进行测量.

L-组氨酸是一种必需氨基酸, 人体无法自身合成, 它必须在饮食中才能提供给身体, L-组氨酸广泛存在于肉类、家禽和鱼类中, 少量的游离态存在于植物和发酵食品中. Kiba 等^[60] 将组氨酸氧化酶固定在树脂化聚乙烯醇的珠子上, 利用含有固定过氧化氢酶的传感器对产生的过氧化氢进行检测, 从而用来分析鱼肉中 L-组氨酸的含量.

上述成功的案例表明, 相比于传统的高效液相色谱 (HPLC) 或电喷雾离子法串联质谱法 (MS-MS), 基于氨基酸氧化酶的氨基酸检测方法具有操作简单、检测速度快、成本低、特异性高的优势^[15, 17].

4.2 LAAO在生物催化方面的应用

LAAO 在手性胺拆分、 α -酮酸制备等生物催化领域也有多种应用潜力. Singh 等^[61] 利用宽谱的氨基酸氧化酶对 DL-氨基酸 (DL-丙氨酸、DL-苯丙氨酸和 DL-酪氨酸) 进行拆分, 反应 1 h 后 D-丙氨酸光学纯度为 100%, D-苯丙氨酸和 D-酪氨酸分别为 80.2%、84.1%. Bifulco 等^[11] 利用重组天冬氨酸氧化酶对 DL-天冬氨酸进行拆分, 反应 24 h 后, L-天冬氨酸几乎被完全氧化, D-天冬氨酸纯度高于 99.5%. Zhang 等^[12] 利用苯丙氨酸氧化酶对 DL-苯丙氨酸进行拆分, 100 min 内 L-苯丙氨酸被完全氧化, 并且利用苯丙氨酸氧化酶对 L-苯丙氨酸催化转化成苯丙酮酸, 8 h 内转化率达 97.4% (图 7). Rao 等^[31] 利用宽谱的氨基酸氧化酶制备 α -酮戊二酸, 在最佳条件下, 120 g/L 的 L-谷氨酸可制备 103 g/L 的 α -酮戊二酸. Niu 等^[13] 利用谷氨酸氧化

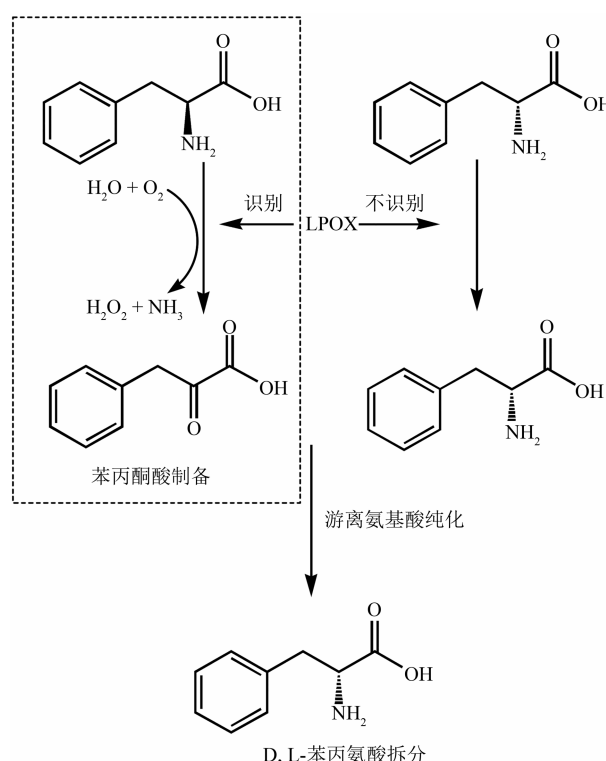


Fig. 7 Applications of L-phenylalanine oxidases in biocatalysis

图7 L-苯丙氨酸氧化酶在生物催化方面的应用

图为D, L-天冬氨酸拆分过程, 虚线框内为苯丙酮酸制备过程.

酶制备 α -酮戊二酸, 在最佳条件下反应 24 h, 110 g/L 的 L-谷氨酸可制备 104.7 g/L 的 α -酮戊二酸. α -酮酸制备过程中, 涉及到过氧化氢的积累, 从而影响 α -酮酸的产量, 因此在反应过程中, 移除过氧化氢有利于提高 α -酮酸的产量. Wu 等^[62] 通过在细胞内共表达 L-谷氨酸氧化酶和过氧化氢酶的级联生物催化促进工程, 提高 α -酮戊二酸的产量, 在最佳条件下 (谷氨酸氧化酶: 过氧化氢酶为 2.1: 1 185), 110 g/L 的 L-谷氨酸可制备 106 g/L 的 α -酮戊二酸, 转化率高达 96%. 随着高活性、高稳定性的 LAAO 被不断开发, 有望在多种重要精细化工品的生物催化领域起到重要作用.

4.3 LAAO 的催化机制研究及分子改造

天然 LAAO 在应用时往往存在催化活性不高、底物特异性不佳等问题, 通常需要经过分子改造才能满足要求. 近年来, 随着对多种 LAAO 晶体结构的陆续解析以及对该类酶构效关系认识的不断深入, 使人们有能力通过蛋白质工程手段对 LAAO 进行分子改造, 以提升其性能, 满足实际应用的需求, 同时进一步加深对 LAAO 家族结构-功能机制的理解. Chen 等^[63] 对来自拉塞尔蝰蛇 (Russell's viper) 蛇毒的 LAAO 晶体结构进行了分析并推测 H223 为关键活性位点, 结合关键位点饱和突变方法, 探讨了其催化机制. 结果发现, 残基 H223 并不是其催化活性所必需的, 但是该残基对底物特异性有重要影响. 相比于野生型 Dr-LAAO, 突变体 H223A 和 H223S 对 L-精氨酸有更高的偏好性, H223A 突变型 Dr-LAAO 对 L-精氨酸的催化效率是天然 Dr-LAAO 的 5 倍, H223S 催化效率提高约 3 倍; 相比之下, 这两种突变体对其他氨基酸底物, 如 L-亮氨酸、L-苯丙氨酸和 L-甲硫氨酸的活性提升不明显, 说明 H223 位点能够影响该酶的底物特异性. Daisuke 等^[64] 对来自地中海海洋单胞菌 (*Marinomonas mediterranea* NBRC 103028^T) 的 L-赖氨酸氧化酶 LodA 进行催化活性改造, 最终获得的突变酶 LodA7mut 较天然 LodA 活性无明显变化, 但提高了底物专一性, 对 L-鸟氨酸的相对活性由 15.1% 降低为 3.7%. Daisuke 等^[65] 对来自假单胞菌 (*Pseudomonas sp.* AIU 813) 的 L-氨基酸氧化酶的晶体结构进行分析, 结合关键位点饱和突变方法, 鉴定出的单点突变 C254I 能够将该酶的氨基酸氧化酶活性提升 5 倍. 总体来说, 人们对 LAAO 分子改造仍处于初级阶段, 大多是基于晶体结构分析的关键位点进行定点突变, 突变体的性能提升效果

有限. 随着 LAAO 高通量筛选方法的建立, 有望通过定向进化方法获得性能大幅度提升的突变体, 从而推动 LAAO 的实际应用.

5 总结与展望

由于目前人们从自然界发现的底物专一性 LAAO 种类和数量仍较少, 远远不能满足日益增长的氨基酸检测、生物化工方面的应用. 一方面能够通过宏基因组学技术从自然环境获取新酶资源, 如基于序列预测的宏基因组挖掘和基于功能筛选的宏基因组筛选. 另一方面, 利用蛋白质工程手段对天然酶进行分子改造, 以获得催化活性提升、稳定性提升、底物专一性提升的突变酶^[66], 是目前 LAAO 研究的热点方向. 随着越来越多底物专一性 LAAO 的发现, 该类酶将更加广泛地用于生物样本 (血液、组织液、发酵产物、食品等) 中的氨基酸检测, 以及用于生物催化, 如从外消旋的氨基酸中拆分光学纯氨基酸、催化合成 α -酮酸等.

参 考 文 献

- [1] Zhang H M, Teng M K, Niu L W, *et al.* Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**(5): 974-977
- [2] Hurwitz R, Butzke D, Thiede B, *et al.* Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon*, 2005, **46**(5): 479-489
- [3] Sheu S Y, Chen W M, Sheu F S. Novel L-amino acid oxidase with algicidal activity against toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* synthesized by a bacterium *Aquimarina sp.* *Enzyme Microb Technol*, 2011, **49**(4): 372-379
- [4] Singh S, Gogoi B K, Bezbaruah R L. Optimization of medium and cultivation conditions for L-amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus*. *Can J Microbiol*, 2009, **55**(9): 1096-1102
- [5] Sukhacheva M V, Zhuravleva N I. Properties and prospects of practical use of extracellular L-glutamate oxidase of *Streptomyces sp.* Z-11-6. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2004, **40**(2): 173-177
- [6] Bockholt R, Scholten-Beck G, Pistorius E K. Construction and partial characterization of an L-amino acid oxidase-free *Synechococcus* PCC 7942 mutant and localization of the L-amino acid oxidase in the corresponding wild type. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1307**(1): 111-121
- [7] Sukhacheva M V, Netrusov A I. *Streptomyces sp.* Z-11-6, a novel producer of extracellular L-glutamate oxidase. *Microbiologia*, 2000, **69**(1): 19-23
- [8] Zeller E A, Maritz A. Über eine neue L-Aminosäure-oxydase. (1. Mitteilung). *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 1944, **27**(1): 1888-1902

- [9] Rey-Suárez P, Lomonte B, Rangel V N, *et al.* MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the *redtail coral* snake *Micrurus mipartitus*. *Peerj*, 2018, **6**(20): e4924
- [10] Wei J F, Yang H W, Wei X L, *et al.* Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. *Toxicon*, 2009, **54**(3): 262-271
- [11] Bifulco D, Pollegioni L, Tessaro D, *et al.* A thermostable L-aspartate oxidase: a new tool for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97**(16): 7285-7295
- [12] Zhang J Z, Yang D, Yan Q J, *et al.* Characterization of a novel L-phenylalanine oxidase from *Coprinopsis cinereus* and its application for enzymatic production of phenylpyruvic acid. *Process Biochem*, 2017, **61**: 102-109
- [13] Niu P Q, Dong X X, Wang Y C, *et al.* Enzymatic production of α -ketoglutaric acid by L-glutamate oxidase from *Streptomyces ghanaensis*. *J Biotechnol*, 2014, **179**(1): 56-62
- [14] Matsuda M, Asano Y. Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028T. *Anal Biochem*, 2010, **406**(1): 19-23
- [15] Matsui D, Terai A, Asano Y. L-Arginine oxidase from *Pseudomonas* sp. TPU 7192: characterization, gene cloning, heterologous expression, and application to L-arginine determination. *Enzyme Microb Technol*, 2016, **82**: 151-157
- [16] Romette J L, Yang J S, Kusakabe H, *et al.* Enzyme electrode for specific determination of L-lysine. *Biotechnol Bioeng*, 1983, **25**(11): 2557-2566
- [17] Ciriello R, Cataldi T R I, Crispo F, *et al.* Quantification of L-lysine in cheese by a novel amperometric biosensor. *Food Chem*, 2015, **169**(Feb.15): 13-19
- [18] Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T, *et al.* Methods for determining L-glutamate in soy sauce with L-glutamate oxidase. *Agric Biol Chem*, 1984, **48**(1): 181-184
- [19] Feliciano P R, Rustiguel J K, Soares R O S, *et al.* Crystal structure and molecular dynamics studies of L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox*. *Toxicon*, 2017, **128**: 50-59
- [20] 余志良, 周宁, 乔华. L-氨基酸氧化酶的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2012, **32**(3): 125-135
Yu Z L, Zhou N, Qiao H. *China Biotechnology*, 2012, **32**(3): 125-135
- [21] 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 Mol Biol*, 2006, **364**(5): 991-1002
- [22] Tedeschi G, Nonnis S, Strumbo B, *et al.* On the catalytic role of the active site residue E121 of *E. coli* L-aspartate oxidase. *Biochimie*, 2010, **92**(10): 1335-1342
- [23] Ida K, Suguro M, Suzuki H. High resolution X-ray crystal structures of L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. structures of the enzyme-ligand complex and catalytic mechanism. *J Biochem*, 2011, **150**(6): 659-669
- [24] Tsuge H, Yoneda K, Ohshima T, *et al.* Structure of L-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1784**(3): 563-571
- [25] Niefind K, Schomburg D, Faust A, *et al.* The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. *J Mol Biol*, 2007, **367**(1): 234-248
- [26] Amano M, Mizuguchi H, Sano T, *et al.* Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. *J Biochem*, 2015, **157**(6): 549-559
- [27] Du Y L, Eltis L D, Ryan K S, *et al.* Snapshots of the catalytic cycle of an O₂, Pyridoxal phosphate-dependent hydroxylase. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(4): 965-974
- [28] Okazaki S, Nakano S, Matsui D, *et al.* X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *J Biochem*, 2013, **154**(3): 233-236
- [29] Nakano S, Niwa M, Asano Y, *et al.* Following the evolutionary track of a highly specific L-arginine oxidase by reconstruction and biochemical analysis of ancestral and native enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2019, **85**(12): 1-32
- [30] Chen W M, Lin C Y, Chen C A, *et al.* Involvement of an L-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enzyme Microb Technol*, 2010, **47**(1-2): 52-58
- [31] Rao B, Liao X Q, Liu F, *et al.* Expression and characterization of a new L-amino acid oxidase AAO producing α -ketoglutaric acid from L-glutamic acid. *Biotechnol Bioproc E*, 2019, **24**(6): 56-62
- [32] Soares T G, Santos J L D, Alvarenga V G, *et al.* Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. *Int J Biol Macromol*, 2020, **154**: 1517-1527
- [33] Yang H, Johnson P M, Ko K C, *et al.* Cloning, characterization and expression of escapin, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*. *J Exp Biol*, 2005, **208**(18): 3609-3622
- [34] Yang C A, Cheng C H, Lo C T, *et al.* A novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 associated with Antagonism of *Rhizoctonia solani*. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(9): 4519-4526
- [35] Nishiya Y, Imanaka T. Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett*, 1998, **438**(3): 263-266
- [36] Campillo-Brocal J C, Lucas-Elio P, Sanchez-Amat A. Identification in *Marinomonas mediterranea* of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity. *Microbiol Open*, 2013, **2**(4): 684-694
- [37] Nishizawa T, Aldrich C C, Sherman D H. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *J Bacteriol*, 2005, **187**(6): 2084-2092
- [38] Koyama, Hirokazu. Purification and characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from

- Pseudomonas* sp. P-501. J Biochem, 1982, **92**(4): 1235-1240
- [39] Boulland M L, Marquet J, Valérie M F, *et al.* Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. Blood, 2008, **110**(1): 220-227
- [40] Wachiratianchai S, Bhumiratana A, Udomsopagit S. Isolation, purification, and characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. 18G. Electron J Biotechnol, 2004, **7**(3): 277-284
- [41] Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T, *et al.* Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. Agric Biol Chem, 1983, **47**(6): 1323-1328
- [42] Tsubasa W, Tadao O. Thermostable and highly specific L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning, overexpression, and enzymological properties. Extremophiles, 2018, **22**(1): 59-71
- [43] Yasushi T, Ryoma M, Ryoichi Y, *et al.* Functional expression of L-lysine α -oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of L-pipecolic acid from DL-lysine. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, **99**(12): 5045-5054
- [44] Gómez D, Lucas-Elío P, Sanchez-Amat A, *et al.* A novel type of lysine oxidase: L-lysine- ϵ -oxidase. Biochim Biophys Acta, 2006, **1764**(10): 1577-1585
- [45] Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, *et al.* A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*: purification and enzymological properties. J Biol Chem, 1980, **255**(3): 976-981
- [46] Du Y L, Singh R, Alkhalaf L M, *et al.* A pyridoxal phosphate-dependent enzyme that oxidizes an unactivated carbon-carbon bond. Nat Chem Biol, 2016, **12**(3): 194-199
- [47] Nasu S, Wicks F D, Gholson R K. L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme of *Escherichia coli*, is the B protein of quinolinate synthetase. J Biol Chem, 1982, **257**(2): 626-632
- [48] 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
- [49] Sakuraba H, Satomura T, Kawakami R, *et al.* L-Aspartate oxidase is present in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3: characteristics and role in the de novo biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide proposed by genome sequencing. Extremophiles, 2002, **6**(4): 275-281
- [50] Kamei T, Asano K, Suzuki H, *et al.* L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens*. I. production, isolation and some properties. Chem Pharm Bull, 1983, **31**(4): 1307-1314
- [51] Krupyanko V I, Medentsev A G, Lukasheva E V, *et al.* Kinetic characteristics of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D: substrate specificity and allosteric effects. Biochem Biophys Rep, 2017, **9**: 9-12
- [52] Füller J J, Röpke R, Krausz J, *et al.* Biosynthesis of violacein, structure and function of L-tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. J Biol Chem, 2016, **291**(38): 20068-20084
- [53] Onaka H, Tanifguchi S I, Igarashi Y, *et al.* Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. J Antibiot(Tokyo), 2002, **55**(12): 1063-1071
- [54] Furuya Y, Sawada H, Hirahara T, *et al.* A novel enzyme, L-tryptophan oxidase, from a Basidiomycete, *Coprinus* sp. SF-1: purification and characterization. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, **64**(7): 1486-1493
- [55] Kameya M, Onaka H, Asano Y. Selective tryptophan determination using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis. Anal Biochem, 2013, **438**(2): 124-132
- [56] Maity D, Kumar R T R. Highly sensitive amperometric detection of glutamate by glutamic oxidase immobilized Pt nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs)/polypyrrole composite. Biosens Bioelectron, 2019, **130**(1): 307-314
- [57] Chen C Y, Su Y C. Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 3304. Anal Chim Acta, 1991, **243**(1): 9-15
- [58] Saudubray J M, Rabier D. Biomarkers identified in inborn errors for lysine, arginine, and ornithine. J Nutr, 2007, **137**(6): 1669S-1672S
- [59] Isobe K, Matsui D, Asano Y. Comparative review of the recent enzymatic methods used for selective assay of L-lysine. Anal Biochem, 2019, **584**: 113335
- [60] Kiba N, Koga A, Tachibana M, *et al.* Flow-injection determination of L-histidine with an immobilized histidine oxidase from *Brevibacillus borstelensis* KAIT-B-022 and chemiluminescence detection. Anal Sci, 2006, **22**(1): 95-98
- [61] Singh S, Gogoi B K, Bezbaruah R L. Racemic resolution of some DL-Amino acids using *Aspergillus fumigatus* L-amino acid oxidase. Curr Microbiol, 2011, **63**(1): 94-99
- [62] Wu J, Fan X C, Liu J, *et al.* Promoter engineering of cascade biocatalysis for α -ketoglutaric acid production by coexpressing L-glutamate oxidase and catalase. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, **102**(11): 4755-4764
- [63] Chen H S, Wang Y M, Huang W T, *et al.* Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom L-amino acid oxidase: insights into its catalytic mechanism. Biochimie, 2012, **94**(2): 335-344
- [64] Matsui D, Asano Y. Heterologous production of L-lysine ϵ -oxidase by directed evolution using a fusion reporter method. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, **79**(9): 1473-1480
- [65] Matsui D, Im D H, Sugawara A, *et al.* Mutational and crystallographic analysis of L-amino acid oxidase/monooxygenase from *Pseudomonas* sp. AIU 813: interconversion between oxidase and monooxygenase activities. FEBS Open Bio, 2014, **4**: 220-228
- [66] Leese C, Fotheringham I, Escalettes F, *et al.* Cloning, expression, characterisation and mutational analysis of L-aspartate oxidase from *Pseudomonas putida*. J Mol Catal B-Enzym, 2013, **85-86**: 17-22

L-Amino Acid Oxidases, Recent Advances on Molecular Structure, Substrate Spectrum, Family Evolution, and Applications*

LU Ze-Lin^{1,2)**}, YUE Hao^{1)**}, ZHANG Yi-Fan²⁾, YU Shan-Shan¹⁾,
YANG Guang-Yu^{3)***}, MA Fu-Qiang^{2)***}

¹⁾Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

²⁾CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;

³⁾State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences,
School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract L-amino acid oxidases (LAAOs) are an important class of oxidoreductases that participate in the metabolism of amino acids. Employing oxygen molecule as the electron acceptor, LAAOs catalyze the oxidative deamination of L-amino acids and produce corresponding alpha keto acids, ammonia (NH₃) and hydrogen peroxide (H₂O₂). LAAOs with high substrate specificity can recognize the preferred amino acid specially. Therefore, LAAOs with high substrate specificity are promising in the application of chiral amine compounds resolution, alpha keto acid biosynthesis, and especially, in the detection of certain amino acids in clinical and food samples. Therefore, specific LAAOs has attracted wide attention in recent years. In this review, we will focus on the recent progress in LAAOs researches. We will emphasize the substrate specificity, structure-function relationship, and family evolution of these enzymes. We will also discuss the applications of these enzymes in biocatalysis and amino acid detection. This review will provide guidance for molecular mechanism research and industrial applications of LAAOs.

Key words L-amino acid oxidase, substrate specificity, enzyme family evolution, amino acid detection, biocatalysis

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0161

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31900911, 21627812), Jiangsu Basic Research Plan of Natural Science (SBK2019041665), China Postdoctoral Science Foundation (2019M660129) and Cultivated Foundation of Changchun University of Chinese Medicine (2018KJ02).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Ma Fu-Qiang. Tel: 86-512-69588303, E-mail: mafuqiang318@sibet.ac.cn

Yang Guang-Yu. Tel: 86-21-34207189, E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn

Received: May 29, 2020 Accepted: July 17, 2020