

(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
2021 年 9 月 23 日 (23.09.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/184809 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/06 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01) C12P 7/40 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/130330

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 20 日 (20.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010185968.1 2020年3月17日 (17.03.2020) CN

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

(72) 发明人: 吴静(WU, Jing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。裴杉杉(PEI, Shanshan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。刘佳(LIU, Jia); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800

号, Jiangsu 214122 (CN)。宋伟(SONG, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。陈修来(CHEN, Xiulai); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。罗秋玲(LUO, Qiuling); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (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, 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,

(54) Title: PREPARATION AND APPLICATION OF L-AMINO ACID DEAMINASE MUTANT

(54) 发明名称: 一种L-氨基酸脱氨酶突变体的制备及其应用

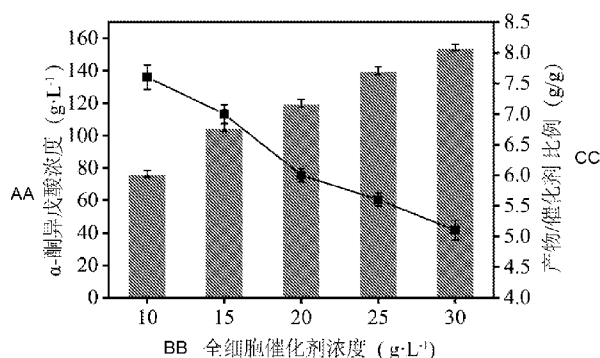


图1

AA α-ketoisovaleric acid concentration (g·L⁻¹)
BB Whole cell catalyst concentration (g·L⁻¹)
CC Ratio of product to catalyst (g/g)

(57) Abstract: Provided are preparation and application of an L-amino acid deaminase mutant. A protein is transformed by analyzing a flexible Loop ring structure around a binding site of a pmirLAAD product, and finally, the optimal mutant pmirLAADM4 is obtained by means of experimental verification. The catalytic efficiency (1.61 mM⁻¹ min⁻¹) and a product inhibition constant (5.4 mM) are improved by 5.2 times and 5.7 times respectively compared with those of a contrast group; a yield of α-ketoisovaleric acid can reach 96.5 g/L, and a conversion rate is greater than 97%. An industrial process of producing the α-ketoisovaleric acid by an enzymatic conversion method is accelerated.

(57) 摘要: 提供一种L-氨基酸脱氨酶突变体的制备及其应用, 通过分析pmirLAAD产物结合位点周围柔性Loop环结构, 对蛋白进行改造, 并通过实验验证, 最终得到最佳突变体pmirLAADM4, 催化效率(1.61mM⁻¹·min⁻¹)和产物抑制常数(5.4mM)较对照分别提高了5.2倍和5.7倍; α-酮异戊酸的产量可达到96.5g/L, 转化率>97%, 加快了酶转化法生产α-酮异戊酸的工业化进程。

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 L-氨基酸脱氨酶突变体的制备及其应用

技术领域

本发明涉及一种 L-氨基酸脱氨酶突变体的制备及其应用，属于基因工程技术领域。

背景技术

L-氨基酸脱氨酶（LAAD）是一种能够催化 L-氨基酸生成 α -酮酸的黄素氧化酶。研究人员对 L-氨基酸脱氨酶的空间结构、底物特异性、以及其对非天然底物的催化能力方面进行过大量的研究，近年来，该酶在生物转化生产 α -酮酸方面的应用逐渐引起研究人员的关注。

α -酮酸是重要的中间体，它主要应用于食品、医药、化妆品等领域，这使得酶法转化 α -酮酸在工业生产上有着广泛的应用。L-氨基酸脱氨酶是黄素蛋白酶，L-氨基酸的氧化脱氨反应可以分为两个步骤：首先将氨基酸 C α 上的氢转移给 FAD，氨基酸变成亚氨基酸，亚氨基酸不稳定分解成 α -酮酸和水。然后 FADH₂ 被氧分子氧化后，变成了还原型 FAD。L-氨基酸脱氨酶底物谱广泛，催化效率高，这为异源表达氨基酸脱氨酶转化 L-缬氨酸生产 α -酮异戊酸提供了可能。

然而，目前利用 L-氨基酸改造的方法一定程度上提高了 α -酮异戊酸的产量和转化率，但是产量依然较低，因此，为提高 α -酮异戊酸的产量和转化率，增强其工业应用价值，急需提高 L-氨基酸脱氨酶对 L-缬氨酸的催化效率。

发明内容

本发明提供了一种可以高效制备 LAAD 突变体及其改造方法，并利用该突变体蛋白催化 L-缬氨酸制备 α -酮异戊酸，本发明所构建的菌株在 α -酮异戊酸制备中具有高催化活性，极大提高了工业化生产的生产效率。

本发明提供了一种 L-氨基酸脱氨酶的突变体，所述突变体以来源于奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 的 L-氨基酸脱氨酶 (*pmirLAAD*) 为亲本，亲本 L-氨基酸脱氨酶氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

在本发明的一种实施方式中，编码所述 L-氨基酸脱氨酶亲本的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 *pmirLAAD* 亲本，将其第 98 位氨基酸发生突变，将丝氨酸变为丙氨酸，获得突变体 S98A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 *pmirLAAD* 亲本，将其第 105 位氨基酸发生突变，将苏氨酸变为丙氨酸，获得突变体 T105A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 $pmirLAAD$ 亲本，将其第106位氨基酸发生突变，将丝氨酸突变为丙氨酸，获得突变体S106A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 $pmirLAAD$ 亲本，将其第341位氨基酸发生突变，将亮氨酸突变为丙氨酸，获得突变体L341A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 $pmirLAAD$ 亲本，将第98位丝氨酸变为丙氨酸并将第105位苏氨酸变为丙氨酸，获得突变体S98A/T105A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 $pmirLAAD$ 亲本，将第98位丝氨酸变为丙氨酸、将第105位苏氨酸变为丙氨酸并将第106位丝氨酸突变为丙氨酸，获得突变体S98A/T105A/S106A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体相对于 $pmirLAAD$ 亲本，将第98位丝氨酸变为丙氨酸、将第105位苏氨酸变为丙氨酸、将第106位丝氨酸突变为丙氨酸并将第341位苏氨酸变为丙氨酸，获得突变体S98A/T105A/S106A/L341A。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体S98A、T105A、S106A、L341A、S98A/T105A、S98A/T105A/S106A、S98A/T105A/S106A/L341A的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15所示。

本发明提供了一种编码所述突变体的基因，编码所述突变体S98A、T105A、S106A、L341A、S98A/T105A、S98A/T105A/S106A、S98A/T105A/S106A/L341A的基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16所示。

本发明提供了含有所述突变体的基因的重组质粒，所述重组质粒以pET系列载体、pRSFDuet系列或pGEX系列载体为表达载体。

本发明提供了一种获得所述 $pmirLAAD$ 突变体的方法，所述方法包括：

(1) 在奇异变形杆菌 L-氨基酸脱氢酶 $pmirLAAD$ 氨基酸序列的基础上确定突变位点；设计定点饱和突变和定点突变的引物，以携带 L-氨基酸脱氢酶 $pmirLAAD$ 基因的载体为模板进行定点突变；构建含所述突变体的重组质粒；

(2) 将突变体质粒转化进宿主细胞；

(3) 挑选阳性克隆进行发酵培养、诱导，进而获得 $pmirLAAD$ 突变体的蛋白，用于后续转化实验。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主细胞为 *E. coli* BL21 (DE3)。

本发明提供了一种表达所述突变体、或所述基因、或含有所述重组载体的宿主菌。

本发明提供了一种生产 α -酮异戊酸产量的方法，所述方法以 L-缬氨酸为反应底物，将所述宿主菌加入反应液，在 pH7.5~9.5、20~40°C、通气量为 1~5vvm 条件下反应 22~26 h。

在本发明的一种实施方式中，在 pH8.5~9.5、25~35°C、通气量为 1~2 vvm 条件下反应 22~25 h。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主菌在体系中的终浓度为 10~30 g/L。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主菌在体系中的终浓度为 10~15 g/L。

本发明提供了一种生产 α -酮异戊酸产量的方法，所述方法以 L-缬氨酸为反应底物，将所述突变体加入反应液，在 pH7.5~9.5、20~40°C、通气量为 1~5vvm 条件下反应 22~26 h。

在本发明的一种实施方式中，在 pH8.5~9.5、25~35°C、通气量为 1~2 vvm 条件下反应 22~25 h。

本发明提供了所述突变体，或编码所述突变体的基因，或所述重组质粒在食品、医药、化工领域中制备 α -酮异戊酸或提高 α -酮异戊酸产量中的应用。

本发明提供了所述宿主菌，或所述制备 α -酮异戊酸的方法在食品、医药、化工领域中制备 α -酮异戊酸中的应用。

本发明的有益效果

本发明构建了一种 L-氨基酸脱氨酶突变体及其制备办法，用于催化生产 α -酮异戊酸。本发明的催化效率 ($1.61 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 和产物抑制常数 (5.4 mM) 较对照分别提高了 5.2 倍和 5.7 倍。提高了单位催化剂的生产能力，有效降低了生产成本，并且反应溶液仅以水为催化介质，具有反应条件温和，操作简便，易于分离，对环境友好等优势，且工艺简单，便于控制，易于推广应用。本发明得到的突变体在 3 L 发酵罐中以 L-缬氨酸为底物时， α -酮异戊酸的产量可达到 96.5 g/L，转化率>97%，该产量是目前最高的产量，加快了酶转化法生产 α -酮异戊酸的工业化进程。

附图说明

图 1 为全细胞催化剂浓度和 α -酮异戊酸生产量的关系图。

具体实施方式

基因来源：本专利所涉及到的生物酶 *pmirLAAD* 基因来源于 *Proteus mirabilis*, pET28a(+) 质粒购自 Novagen (Madison, WI, U.S.A.)，限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、primeSTAR 等购自 TaKaRa (Dalian, China)。标样购自 SIGMA。*pmirLAAD* 突变体均为分子改造所得，其余试剂均为市场购买所得。

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，氯化钠 10 g，蒸馏水定容到 1 L。

发酵培养基：(TB 培养基)：蛋白胨 12g，酵母提取物 24g，甘油 4 mL，磷酸二氢钾 2.31 g，磷酸氢二钾 16.42 g，蒸馏水定容到 1 L。

HPLC 法测定 α -酮异戊酸含量的样品制备：取 1 mL 转化后的转化溶液，在 12000 rpm 下离心 5 min，取上清液稀释后，经过 0.45 μ m 滤膜过滤，过滤液供液相色谱分析。

HPLC 法测定 α -酮异戊酸的含量：waters 高效液相色谱仪（配紫外可见检测器），采用伯乐 Aminex HPX-87H（300×7.8 mm，9 μ m）色谱柱，流动相为浓度 2.5 mmol/L 的稀硫酸，流动相经 0.22 μ m 滤膜过滤，超声脱气，流速为 0.6 mL/min，柱温为 35 °C，在紫外检测波长 210 nm 下检测。

实施例 1：单突变体的构建和筛选

(1) 突变体构建：设计第 98、第 105 位、106 位、341 位突变位点的引物，如表 1 所示，通过全质粒 PCR 进行构建。

表 1 突变引物序列

Primer	Sequence (5'-3')	
S98-S	GGCCGTGCATACNNKCAAATTATTAGT	SEQ ID NO.17
S98-A	ACTAATAATTTGMNNGTATGCACGGCC	SEQ ID NO.18
T105-S	ATTAGTTACCAANNKTCGCCAGAAATC	SEQ ID NO.19
T105-A	GATTTCTGGCGAMNNTTGGTAACTAAT	SEQ ID NO.20
S106-S	AGTTACCAAACANNKCCAGAAATCTTC	SEQ ID NO.21
S106-A	GAAGATTTCTGGMNNTGTTTGGTAACT	SEQ ID NO.22
L341-S	GGTGGCGGAGAGNNKCCGTTGGAATTC	SEQ ID NO.23
L341-A	GAATTCCAACGGMNNTCTCCGCCACC	SEQ ID NO.24

构建反应 PCR 扩增体系：PrimSTAR 酶 0.5 μ L、5×PrimeSTAR Buffer 10 μ L、dNTP 4 μ L 每个突变位点的两条引物各 1 μ L、模板（*pmirLAAD* 的核苷酸序列）4 μ L、水 32.5 μ L；反应条件为：①94°C 3 min；②98°C 10 s；③55°C 30 s；④72°C 3 min；⑤将②~④三个步骤循环 29 次；⑥72°C 5 min；⑦12°C 保温。

将上述反应体系在 37°C 孵育 3 h 以消化质粒模板（消化体系为：DpnI 0.5 μ L、上述反应 PCR 产物 45 μ L、10×T Buffer 5 μ L），消化结束后得到的消化产物通过化学转化方法导入大肠杆菌 BL21 感受态细胞，化学转化法具体步骤：

- 1) 将 10 μ L 同源重组产物导入 100 μ L BL21 感受态细胞；
- 2) 冰浴 15-30min；

3) 42°C水浴热激 90s, 取出后迅速放入冰中静置冰浴 3-5min;
 4) 加入 800μl 无抗性 LB 培养基混匀, 于 37°C, 200rpm 培养 1h;
 5) 5000rpm 离心 2min 收菌;
 6) 移去上清, 剩余 100-200μl 吹吸混匀涂布至含 0.05 mg/mL 卡那霉素抗性平板上, 37°C恒温培养 12 h 左右。

7) 挑取单克隆于含 0.05 mg/mL 卡那霉素抗性 LB 中, 200rpm、37°C恒温培养 12 h 后, 送去公司测序, 测序正确的即为阳性转化子 (突变体菌株), 突变的位点分别为将第 98 位的 S 突变为 A, 将第 105 位的 T 突变为 A, 将第 106 位的 S 突变为 A, 将第 341 位的 L 突变为 A。

(2) 单突变体的摇瓶筛选: 将得到的 4 个突变体菌株和含有野生型 L-氨基酸脱氨酶的菌株分别接种至 LB 种子培养基, 200 rpm、37°C培养培养 10 h 左右, 分别以培养基体积的 5%的接种量接种至摇瓶发酵培养基, 在 200 rpm、37°C培养至 OD₆₀₀ = 0.8 左右, 加入终浓度为 0.04 mmol/L 的 IPTG 诱导, 诱导条件为 200 rpm、25°C诱导 14 h, 6000 rpm 离心 8 min 收集菌体, 离心收集的菌体用于后期转化实验。

转化条件为: 转化温度 25°C, 反应 pH 为 8.0, 转化时间为 24 h。

将转化结束后的转化液用 HPLC 方法进行测定 α-酮异戊酸的产量, 结果如表 2 所示, 最终 S98A 生产得到 α-酮异戊酸产量最高。

表 2 单突变体摇瓶筛选结果

突变体	α-酮异戊酸 (g/L)
WT	39.8
<i>Pmir</i> LAAD ^{S98A}	46.9
<i>Pmir</i> LAAD ^{T105A}	44.6
<i>Pmir</i> LAAD ^{S106A}	44.9
<i>Pmir</i> LAAD ^{L341A}	43.6

实施例 2: 双突、三突及四突突变体的构建和筛选

(1) 双突突变体构建: 在突变体 *Pmir*LAAD^{S98A} 的基础上, 利用突变引物 T105A-S 和 T105A-A、S106A-S 和 S106A-A、L341A-S 和 L341A-A, 分别构建双突突变体; 在突变体 *Pmir*LAAD^{T105A} 的基础上, 利用突变引物 S106A*-S 和 S106A*-A、L341A-S 和 L341A-A, 分别构建双突突变体; 在突变体 *Pmir*LAAD^{S106A} 的基础上, 利用突变引物 L341A-S 和 L341A-A (表 3); 通过全质粒 PCR 进行双突突变体构建, 具体实施方式参见实施例 1 中步

骤 (1), 制备得到 6 个双突变体 $PmirLAAD^{S98A/T105A}$ 、 $PmirLAAD^{S98A/S106A}$ 、 $PmirLAAD^{S98A/L341A}$ 、 $PmirLAAD^{T105A/S106A}$ 、 $PmirLAAD^{T105A/L341A}$ 、 $PmirLAAD^{S106A/L341A}$ 。

表 3 双突变体突变引物序列

Primer	Sequence (5'-3')	
T105A-S	ATTAGTTACCAAGCCTCGCCAGAAATC	SEQ ID NO.25
T105A-A	GATTTCTGGCGAGGCTTGCTAACTAAT	SEQ ID NO.26
S106A-S	AGTTACCAAACAGCACCAGAAATCTTC	SEQ ID NO.27
S106A -A	GAAGATTTCTGGTGCTGTTTGGTAACT	SEQ ID NO.28
L341A-S	GGTGGCGGAGAGGCACCGTTGGAATTC	SEQ ID NO.29
L341A -A	GAATTCCAACGGTGCCTCTCCGCCACC	SEQ ID NO.30
S106A*-S	AGTTACCAAGCCGCACCAGAAATCTTC	SEQ ID NO.31
S106A*-A	GAAGATTTCTGGTGCGGCTTGCTAACT	SEQ ID NO.32

(2) 双突变体的筛选: 具体实施方式参见实施例 3 中步骤 (3), 结果如表 4 所示, 最终 S98A/T105A 生产得到 α -酮异戊酸产量最高。

表 4 双突变体摇瓶筛选结果

突变体	α -酮异戊酸 (g/L)
$PmirLAAD^{S98A/T105A}$	52.6
$PmirLAAD^{S98A/S106A}$	50.9
$PmirLAAD^{S98A/L341A}$	51.5
$PmirLAAD^{T105A/S106A}$	49.4
$PmirLAAD^{T105A/L341A}$	47.1
$PmirLAAD^{S106A/L341A}$	46.5

(3) 三突变体的构建: 在突变体 $PmirLAAD^{S98A/T105A}$ 的基础上, 利用突变引物 S106A*-S 和 S106A*-A、L341A-S 和 L341A -A, 分别构建三突变体; 在突变体 $PmirLAAD^{S98A/S106A}$ 和 $PmirLAAD^{T105A/S106A}$ 的基础上, 利用突变引物 L341A-S、L341A -A, 分别构建三突变体 (表 4), 通过全质粒 PCR 进行三突变体的构建, 具体实施方式参见实施例 3 中步骤 (1), 制备得到四种三突变体 $PmirLAAD^{S98A/T105A/S106A}$ 、 $PmirLAAD^{S98A/T105A/L341A}$ 、 $PmirLAAD^{S98A/S106A/L341A}$ 、 $PmirLAAD^{T105A/S106A/L341A}$ 。

(4) 三突变体的筛选: 具体实施方式参见实施例 1 中步骤 (2), 结果如表 5 所示, 最终 S98A/T105A/S106A 生产得到 α -酮异戊酸产量最高。

表 5 三突变体摇瓶筛选结果

突变体	α -酮异戊酸 (g/L)
-----	----------------------

<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/T105A/S106A}	60.6
<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/T105A/L341A}	56.1
<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/S106A/L341A}	53.5
<i>PmirLAAD</i> ^{T105A/S106A/L341A}	59.6

(5) 四突变体构建：在突变体 *PmirLAAD*^{S98A/T105A/S106A} 基础上对 L341A 进行突变：以在突变体 *PmirLAAD*^{S98A/T105A/S106A} 为模板，利用突变引物 L341A-S 和 L341A-A（表 3）进行全质粒 PCR，PCR 产物进行消化，PCR 体系与消化体系和实施例 3 相同。

实施例 3：亲本酶及突变体的动力学参数、产物抑制常数测定

为了对突变体进行评价，本发明测定了突变亲本 *PmirLAAD*^{WT} 及突变体 *PmirLAAD*^{M1}、*PmirLAAD*^{M2}、*PmirLAAD*^{M3}、*PmirLAAD*^{M4} 在 25℃ 下的动力学参数。

k_{cat}/K_m 通过在 25℃ 条件下测定不同浓度的水解 L-缬氨酸底物所产生 α -酮异戊酸的初始速率计算。通过转化过程中的产物抑制常数测定实验来确定亲本酶和突变体的产物抑制情况，分别将 *PmirLAAD*^{WT} 亲本酶菌株和突变体菌株各以 10 g/L 终浓度的湿细胞加入反应液中，以 60 mM 的 L-缬氨酸为底物，在转化体系中加入 10-100 mM 的 α -酮异戊酸，反应 30 min 左右测定初始反应率 V_0 ，反应 2 h 左右测定最大反应率 V_{max} ，并根据如下公式计算产物抑制常数 K_{PI} ：

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_{PI}}\right) + [S]}$$

V_0 ：初始反应速率， V_{max} ：最大反应速率， K_m ：米氏常数， $[S]$ ：底物浓度， $[P]$ ：产物浓度， K_{PI} ：产物抑制常数。

如表 6 所示，在 25℃ 下，所有的突变体与亲本酶相比， K_{cat}/K_m 值均提高，其中突变体 *PmirLAAD*^{M4} 的 k_{cat}/K_m 值提高 5.2 倍，导致 *PmirLAAD* 的催化效率变大。与之一致的是各突变体的产物抑制常数与亲本酶相比均得到提高，其中突变 *PmirLAAD*^{M4}（以下简称 M4 菌株）的产物抑制常数增加了 5.7 倍。

表 6 *PmirLAAD* 亲本酶及其突变体的动力学参数

突变体	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	变化倍数	K_{PI} (mM)	变化倍数
<i>PmirLAAD</i> ^{WT}	0.26	1	0.8±0.6	1
<i>PmirLAAD</i> ^{M1} (<i>PmirLAAD</i> ^{S98A})	0.75	2.9	2.08±0.9	2.6
<i>PmirLAAD</i> ^{M2} (<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/T105A})	0.98	3.8	3.12±0.4	3.9
<i>PmirLAAD</i> ^{M3} (<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/T105A/S106A})	1.25	4.8	3.7±0.3	4.6

<i>PmirLAAD</i> ^{M4} (<i>PmirLAAD</i> ^{S98A/T105A/S106A/L341A})	1.61	6.2	5.4±0.2	6.7
--	------	-----	---------	-----

实施例 4：1 L 体系水平优化 L-缬氨酸生产 α -酮异戊酸

将平板上测序正确的突变体M4菌株接种至含0.05 mg/mL卡那霉素抗性LB中，200 rpm、37°C培养10-12 h，以体积比5%的接种量接种至TB培养基中，200 rpm、37°C培养至OD₆₀₀为3时加入0.04mmol/L终浓度IPTG诱导，诱导温度为25°C，诱导时间14 h后以6,000×g离心8 min收集细胞，放置-40°C冰箱用于转化。

(1) 不同全细胞催化剂浓度对 α -酮异戊酸浓度的影响

在发酵罐中配制转化反应体系：将 L-缬氨酸溶解于一定量 Tris-HCl 缓冲液中，将 L-缬氨酸溶液倒入发酵罐中（使得 L-缬氨酸在反应体系中的终浓度为 160 g/L），调节温度至 25°C，转速为 300 rpm，10 g、15 g、20 g、25 g、30 g 突变体湿菌体细胞（即为全细胞催化剂）同样使用缓冲液溶解均匀，待转化液温度升至 25°C，将溶解的菌液倒入发酵罐（全细胞催化剂的浓度分别为 10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L）。

在 25°C、600 rpm、通气量为 1 vvm 条件下进行转化反应，转化反应后总体积为 1 L。

转化反应结束后取部分转化液 12,000×g 离心 15 min，上清液用 0.22 μ m 的微滤膜过滤后进行 HPLC 分析。结果如图 1 所示，当催化剂的浓度从 10 g/L 提高至 30 g/L， α -酮异戊酸的浓度从 76.7 g/L 提高至 154.3 g/L。但是产物/催化剂的比值从 7.6 g/g 降低至 5.1 g/g。考虑到工业对高产量以及低催化剂（菌体）用量，10 g/L 的全细胞催化剂浓度同时具备较高 α -酮异戊酸浓度及高产物/催化剂比例（即单位菌体生产 α -酮异戊酸能力）7.6 g/g，被用于转化实验。

(2) 不同转化反应pH对 α -酮异戊酸浓度的影响

具体步骤同（1），将全细胞化剂浓度控制为10 g/L，将L-缬氨酸浓度控制为100 g/L，通气量为1 vvm，且将转化反应过程中的pH分别控制为7.5、8.0、8.5、9.0、9.5。结果如表7所示，在弱酸碱性的条件下更适合 α -酮异戊酸的合成，因此选择转化pH控制在8.5~9.0，此时 α -酮异戊酸浓度为78.9 g/L。

表 7 转化 pH 优化结果

pH	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
α -酮异戊酸 (g/L)	61.7	67.1	78.9	74.3	70.4

(3) 不同转化反应温度对 α -酮异戊酸浓度的影响

具体步骤同（1），将转化pH控制为8.5，全细胞化剂浓度控制为10 g/L，通气量为1 vvm，将转化反应过程中的温度分别控制为20°C、25°C、30°C、35°C、40°C。结果如表8所示，在温度为30°C时更适合 α -酮异戊酸的合成，因此选择转化温度pH控制在30°C左右，此时 α -酮异戊

酸浓度为78.9 g/L。

表 8 转化温度优化结果

温度℃	20	25	30	35	40
α -酮异戊酸 (g/L)	71.2	79.1	88.9	81.3	76.4

(4) 不同转化反应通气量对 α -酮异戊酸浓度的影响

具体步骤同(1)，将转化pH控制为8.5，全细胞化剂浓度控制为10 g/L，温度控制为 30℃、将通气量控制为1vvm、1.5vvm、2vvm、2.5vvm、3vvm。结果如表9所示，在通气量为1.5vvm时更适合 α -酮异戊酸的合成，因此选择通气量控制在1.5vvm左右，此时 α -酮异戊酸浓度为96.5 g/L。

表 9 转化通气量优化结果

通气量 vvm	1	1.5	2	2.5	3
α -酮异戊酸 (g/L)	88.9	96.5	87.4	80.3	75.2

对比例 1

具体实施方式参见实施例 4，不同之处在于，将突变体 M4 菌株替换为野生型 WT 菌株去进行发酵与转化实验。转化结束后，取部分转化液 12,000×g 离心 15 min，上清液用 0.22 μ m 的微滤膜过滤后进行 HPLC 分析。HPLC 色谱图结果显示 α -酮异戊酸产量为 40 g/L，转化率为 40.3%。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

1. 一种 L-氨基酸脱氨酶的突变体，其特征在于，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 L-氨基酸脱氨酶的第 98 位、第 105 位、第 106 位和第 341 位进行突变，所述突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.15。

2. 一种 L-氨基酸脱氨酶的突变体，其特征在于，所述突变体是在氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 L-氨基酸脱氨酶的第 98 位、第 105、第 106 位、第 341 位的氨基酸中的一个或多个位点突变。

3. 根据权利要求2所述的突变体，其特征在于，所述突变体为以下 (a) ~ (g) 任一：

(a) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第98位突变为丙氨酸；
(b) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第105位突变为丙氨酸；
(c) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第106位突变为丙氨酸；
(d) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第341位突变为丙氨酸；
(e) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第98位和105位均突变为丙氨酸；

(f) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第98位、第105位和第106位进行突变，获得的突变体氨基酸序列如SEQ ID NO.13；

(g) 将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的L-氨基酸脱氨酶的第98位、第105位、第106位和第341位进行突变，获得的突变体氨基酸序列如SEQ ID NO.15。

4. 编码权利要求 1-3 任一所述突变体的基因。

5. 含有权利要求 4 所述基因的重组质粒。

6. 表达权利要求 1-3 任一所述突变体，或含有权利要求 4 所述载体的宿主菌。

7. 一种生产 α -酮异戊酸的方法，其特征在于，利用权利要求1-3任一所述突变体催化L-缬氨酸转化生成 α -酮异戊酸。

8. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于，将所述突变体加入含有100-200 g/L L-缬氨酸的转化体系中，在通气量为1-5vvm的条件下反应22-26 h。

9. 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述转化体系的反应条件为20-40 °C、pH7.5~9.5。

10. 一种生产 α -酮异戊酸的方法，其特征在于，以权利要求6所述的宿主菌作为催化剂，催化L-缬氨酸得到 α -酮异戊酸。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，将所述宿主菌添加至含有 100-200 g/L L-缬氨酸的转化体系中，在通气量为 1-5vvm 的条件下反应 22-26 h。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述宿主菌在转化体系中的终浓度为

10~30g/L。

13. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述转化体系的反应条件为 20-40 °C、pH7.5~9.5

14. 权利要求 1-3 任一所述突变体，或权利要求 4 所述基因，或权利要求 5 所述重组质粒在食品、医药、化工领域制备 α -酮异戊酸中的应用。

15. 权利要求 6 所述宿主菌，或权利要求 7-13 任一所述方法在食品、医药、化工领域制备 α -酮异戊酸中的应用。

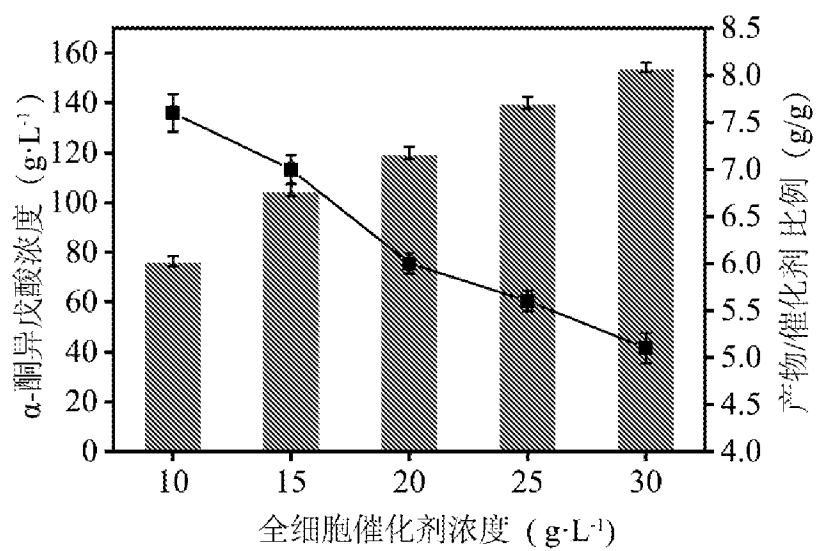


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/130330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/06(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/40(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, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, 百度学术, 读秀, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: SEQ ID NO: 1-15, amino acid deaminase, proteus mirabilis, 氨基酸脱氨酶, 奇异变形杆菌, 缬氨酸, α -酮异戊酸, Val, 突变, mutat+.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111269900 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 12 June 2020 (2020-06-12) claims 1-10	1-15
X	CN 108841844 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 20 November 2018 (2018-11-20) claims 1-10, sequence 3, description, paragraphs 41-44	1-6
Y	CN 108841844 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 20 November 2018 (2018-11-20) claims 1-10, sequence 3, description, paragraphs 41-44	7-15
Y	张权 等 (ZHANG, Quan et al.). "酶法转化生产 α -酮酸的研究进展 (Recent Advances in Enzymatic Production of Alpha-Keto Acids)" <i>生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)</i> , Vol. 35, No. 7, 25 July 2019 (2019-07-25), page 1200, sections 4.1-4.2	7-15
A	CN 109321541 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 12 February 2019 (2019-02-12) entire document	1-15
A	KR 20090088630 A (BIOTOPIA CO., LTD.) 20 August 2009 (2009-08-20) entire document	1-15



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

28 January 2021

Date of mailing of the international search report

23 February 2021

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/CN2020/130330

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王越 等 (WANG, Yue et al.). "L-氨基酸脱氨酶的分子改造及其用于全细胞催化法生产 α -酮戊二酸条件的优化 (Molecular Modification of L-amino Acid Deaminase and Optimization of α -ketoglutaric Acid Production by Whole-cell Biocatalysis)" 中国生物工程杂志 (<i>China Biotechnology</i>), Vol. 59, No. 3, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 56-64	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/130330

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/CN2020/130330

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	111269900	A	12 June 2020	None	
CN	108841844	A	20 November 2018	None	
CN	109321541	A	12 February 2019	None	
KR	20090088630	A	20 August 2009	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/130330

A. 主题的分类

C12N 9/06(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i

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. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, 百度学术, 读秀, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: SEQ ID NO:1-15, amino acid deaminase, proteus mirabilis, 氨基酸脱氨酶, 奇异变形杆菌, 缬氨酸, α -酮异戊酸, Val, 突变, mutat+.

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
PX	CN 111269900 A (江南大学) 2020年 6月 12日 (2020 - 06 - 12) 权利要求1-10	1-15
X	CN 108841844 A (江南大学 等) 2018年 11月 20日 (2018 - 11 - 20) 权利要求1-10, 序列3, 说明书第41-44段	1-6
Y	CN 108841844 A (江南大学 等) 2018年 11月 20日 (2018 - 11 - 20) 权利要求1-10, 序列3, 说明书第41-44段	7-15
Y	张权 等. “酶法转化生产 α -酮酸的研究进展” 生物工程学报, 第35卷, 第7期, 2019年 7月 25日 (2019 - 07 - 25), 第1200页 4.1-4.2节	7-15
A	CN 109321541 A (江南大学 等) 2019年 2月 12日 (2019 - 02 - 12) 全文	1-15
A	KR 20090088630 A (拓邦生物科技有限公司) 2009年 8月 20日 (2009 - 08 - 20) 全文	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 1月 28日

国际检索报告邮寄日期

2021年 2月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李有朝

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	王越 等. “L-氨基酸脱氢酶的分子改造及其用于全细胞催化法生产 α -酮戊二酸条件的优化” 中国生物工程杂志, 第59卷, 第3期, 2019年 12月 31日 (2019 - 12 - 31), 第56-64页	1-15

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/CN2020/130330

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	111269900	A	2020年 6月 12日	无	
CN	108841844	A	2018年 11月 20日	无	
CN	109321541	A	2019年 2月 12日	无	
KR	20090088630	A	2009年 8月 20日	无	