

生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的研究进展

孙安然^{1,2,3}, 宋伟^{1,2,3}, 刘佳^{1,2,3}, 罗秋玲^{1,2,3}, 陈修来^{1,2,3}, 刘立明^{1,2,3}

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 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 食品微生物制造工程实验室, 江苏 无锡 214122

孙安然, 宋伟, 刘佳, 等. 生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(2): 165–176.

Sun AR, Song W, Liu J, et al. Enzymatic production of arginine derivatives: a review. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 165–176.

摘 要: L-精氨酸是一种碱性氨基酸, 具有多样化的官能团, 是合成多种有用化合物的前体, 其衍生物广泛应用于医疗、食品和化妆品等领域。L-精氨酸衍生物的合成方法有化学法、发酵法和酶法。在当前绿色经济和可持续发展的背景下, 对比各种生产方法, 生物酶法合成 L-精氨酸衍生物具有明显优势。因此本文重点介绍了 L-精氨酸衍生化的典型产品和合成技术, 并介绍了生物酶法合成 L-精氨酸衍生物未来可能的发展方向。

关键词: 生物酶法, L-精氨酸, 衍生化反应, 鸟氨酸, 瓜氨酸, 胍基丁胺

Enzymatic production of arginine derivatives: a review

Anran Sun^{1,2,3}, Wei Song^{1,2,3}, Jia Liu^{1,2,3}, Qiuling Luo^{1,2,3}, Xiulai Chen^{1,2,3}, and Liming Liu^{1,2,3}

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

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Laboratory of Food Microbial-Manufacturing Engineering, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-arginine (L-Arg) is an alkaline amino acid that possesses various function groups and acts as an important precursor for useful chemical synthesis. L-Arg derivatives are widely applied in pharmaceutical, food and cosmetic industries. Environment friendly and cost-effective production of L-Arg derivatives by enzymatic catalysis provides significant advantages over chemical synthesis and microbial fermentation. In this article, several typical L-Arg derivatives and their enzymatic production processes are highlighted. Furthermore, prospect is also addressed about enzymatic production of L-Arg derivatives.

Keywords: enzymatic production, L-arginine, derivatization, ornithine, citrulline, agmatine

Received: April 14, 2017; **Accepted:** June 19, 2017

Supported by: Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province (No. BE2014652), National Natural Science Foundation of China (No. 21676118), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20160163).

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

江苏省科技支撑计划项目 (No. BE2014652), 国家自然科学基金 (No. 21676118), 江苏省自然科学基金 (No. BK20160163) 资助。

1 L-精氨酸及其衍生物的生产方法

1.1 L-精氨酸的生产方法及比对

L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 是一种碱性半必需氨基酸, 于 1886 年从羽扇豆幼苗中发现, 其在动植物体内具有重要的生理活性 (促进肝功能恢复、减缓血栓形成、减轻神经衰弱、促进伤口恢复等), 在化工、食品和医药等领域有着广泛的应用^[1-2]。

目前, L-精氨酸的生产途径包括化学提取法和微生物发酵法。化学提取法主要是指利用精细化工的手段, 从包括自然资源及有机废液的蛋白质产物中直接提取 L-精氨酸, 主要包括沉淀法、电渗析法和离子交换法, 是早期生产 L-精氨酸所采用的主流方法。中国科学院武汉植物研究所用棉籽饼粕水解液为原料, 通过 732 阳离子交换树脂分离提纯多种氨基酸。以棉籽饼粕水解液中所有蛋白质为基准计算, L-精氨酸的提取率为 1.5%。化学提取法通常会引入有毒沉淀剂, 而且操作过程复杂、能耗高、产物纯度较低, 不利于大规模生产。

微生物发酵法以其环境友好、生产条件温和和生产过程稳定的优势, 逐渐在 L-精氨酸的生产中占据主导地位^[3]。特别是通过传统菌株筛选、代谢工程改造及生物反应器发酵过程优化等手段, 微生物发酵法生产 L-精氨酸在过去几十年里取得了长足的进展, 为 L-精氨酸的高值化生产提供了坚实的基础。生产 L-精氨酸的常用菌株有钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum*、黄色短杆菌 *Brevibacterium flavum* 和谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 等^[4-6]。许正宏团队等^[7-9]采用常见的诱变方法, 筛选得到了 1 株精氨酸高产菌株 *C. crenatum* SYPW50-11, 在 500 L 发酵罐发酵过程中, 96 h 发酵周期精氨酸产量和糖转化率分别为 45 g/L 和 30%。Su 等^[10]利用传

统突变育种的策略, 得到 1 株 2-噻唑丙氨酸和磺胺胍抗性、组氨酸缺陷的 *B. flavum*, 该菌株精氨酸的产量可达 61.6 g/L。Park 等^[5]利用代谢工程的手段, 通过移除 *C. glutamicum* 的精氨酸操纵子的抑制剂、优化辅因子水平、增加 L-精氨酸前体的供应、优化限速反应步骤等策略, 在 1 500 L 分批发酵反应器中, 建立了 *C. glutamicum* 高效生产 L-精氨酸的工艺路线, 产量为 81.2 g/L, 单位质量葡萄糖对应 L-精氨酸的产量为 0.40 g/g。目前, 发酵法生产 L-精氨酸的厂商主要包括日本味之素 (MAXIN)、田边制药 (Tanabe Seiyaku)、协和发酵 (Kyowa Hakko) 及德国德固赛公司 (Degussa)。国内采用发酵法生产 L-精氨酸的厂商较少, 而且所用菌种产酸能力低、稳定性差, 无法与国际上同类产品竞争, 国内市场 L-精氨酸主要依赖于进口。

1.2 L-精氨酸衍生物的生产方法及比对

L-精氨酸衍生物种类繁多, 包括鸟氨酸、瓜氨酸、胍基丁胺、精氨酸琥珀酸等。L-精氨酸衍生物的生产方法有化学法、发酵法和生物酶法。下文将以 L-鸟氨酸为例, 比对化学法、发酵法和生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的异同。化学合成法以氰化氢、丙烯醛、氨气和二氧化碳为原料, 经过多步化学反应得到鸟氨酸^[11]。该方法所选用的原料来源广泛并且成本低廉, 但反应过程中引入的氰化氢为剧毒物质, 使得化学法合成的 L-鸟氨酸难以直接应用于医药、食品和保健品等领域。此外, 该化学合成法步骤繁多, 且合成的产物为 DL-鸟氨酸, 需要进一步的手性拆分才能得到光学纯度的 L-鸟氨酸, 工艺难度大, 生产成本高。发酵法生产 L-鸟氨酸是指通过筛选 L-瓜氨酸或 L-精氨酸营养缺陷型的生产菌株, 采用微生物发酵的方法大量积累 L-鸟氨酸。Tsuchida 等^[12]研究发现, 柠檬酸节杆菌的 L-瓜氨酸或 L-精氨酸营养缺陷型菌株外加霉酚酸抗性后可生产 50 g/L L-鸟氨酸; 谷氨酸棒杆菌的 L-瓜氨酸或 L-精氨酸缺陷

型菌株外加青霉素、霉酚酸和鸟氨酸抗性后可生产 46 g/L L-鸟氨酸；乳酸短杆菌的 L-瓜氨酸或 L-精氨酸缺陷型菌株外加鸟氨酸抗性后可生产 55 g/L L-鸟氨酸。发酵法生产 L-鸟氨酸的育种过程复杂、周期长，且产量较低，不利于 L-鸟氨酸的工业化生产。生物酶法合成 L-鸟氨酸是指通过直接提取或异源表达的手段，利用生物体内的精氨酸酶催化 L-精氨酸胍基水解生产 L-鸟氨酸的过程。Song 等^[11]通过异源表达嗜热菌的精氨酸酶生产 L-鸟氨酸，L-鸟氨酸的产量可达 112.3 g/L，转化率达 87.1%，生产强度为 26.2 g/(L·h)。生物酶法合成 L-鸟氨酸的反应过程条件温和，反应步骤简单，产量和转化率都较高且反应过程不引入有毒有害物质，为 L-鸟氨酸的大规模工业化生产提供了有力的支持。因此，对比化学法和发酵法，生物酶法合成 L-精氨酸衍生物具有明显优势。

2 L-精氨酸的结构及其衍生化反应

2.1 L-精氨酸的结构特征

L-精氨酸具有胍基、羧基和氨基（图 1），这些官能团使其在生理生化功能上展现了非常重要和多元化的作用，同时也是精氨酸衍生化的化学结构基础。其中，胍基是一种碱性基团，易于水解，可被取代，其中的碳氮双键有一定的还原性，可被氧化^[13-15]；羧基是一种弱酸性基团，可与游离氨基发生酰胺反应，也可脱离生成二氧化碳^[16-17]；氨基是一个高活性、易被氧化的手性碱性基团，可参与酰胺类物质和酮的生成以及消旋反应^[18]。此外，L-精氨酸主链碳原子不活泼，但其上氢原子可被羟基取代^[19]。

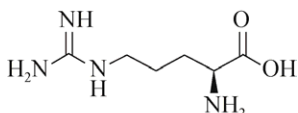


图 1 L-精氨酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of L-arginine.

2.2 L-精氨酸的衍生化反应

L-精氨酸多种多样的官能团使其可以发生丰富的衍生化反应（图 2）：1）胍基基团在精氨酸酶（L-arginine amidinohydrolase, EC 3.5.3.1）、精氨酸脱亚胺酶（L-arginine deiminase, EC 3.5.3.6）和精氨酸琥珀酸裂合酶（Argininosuccinatelyase, EC 4.3.2.1）的作用下，通过水解胍基、亚胺基和取代胍基上的氢而生成鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸琥珀酸^[20-21]；2）羧基基团在 L-氨基酸合酶（L-amino acids ligase, EC 6.3.2.28）和 L-精氨酸脱羧酶（L-arginine decarboxylase, EC 4.1.1.19）的作用下发生酰胺化和脱羧作用，生成 L-丙氨酸-谷氨酰胺等二肽化合物和胍基丁胺^[22-23]；3）氨基基团在 L-精氨酸消旋酶（L-arginine racemase, EC 5.1.1.9）、L-精氨酸合酶（L-amino acids ligase, EC 6.3.2.28）和 L-精氨酸氧化酶（L-arginine oxidase, EC 1.4.3.-）的作用下生成 D-精氨酸^[24]、二肽化合物和 5-胍基-2-氧代戊酸^[25]；4）L-精氨酸主链碳原子上的氢可在 L-精氨酸羟化酶（L-arginine hydroxylase, EC 1.14.11.41）的作用下被取代，生成 3-羟基-L-精氨酸^[26]。L-精氨酸的衍生化反应催化类型、酶种类及产物详细情况列于表 1。

3 L-精氨酸衍生化产品及其生物酶法合成工艺

按衍生化基团的不同，L-精氨酸的典型衍生化产品可分为 4 类：基于胍基基团的衍生化产品、基于羧基基团的衍生化产品、基于氨基基团的衍生化产品和基于碳主链的衍生化产品。其生物酶法合成工艺详述如下。

3.1 基于胍基基团改造的精氨酸衍生化产品

生物酶法合成精氨酸胍基基团所得的衍生化产品有鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸琥珀酸 3 种，本文以典型的鸟氨酸和瓜氨酸为例，讲述其生物酶法合成工艺。

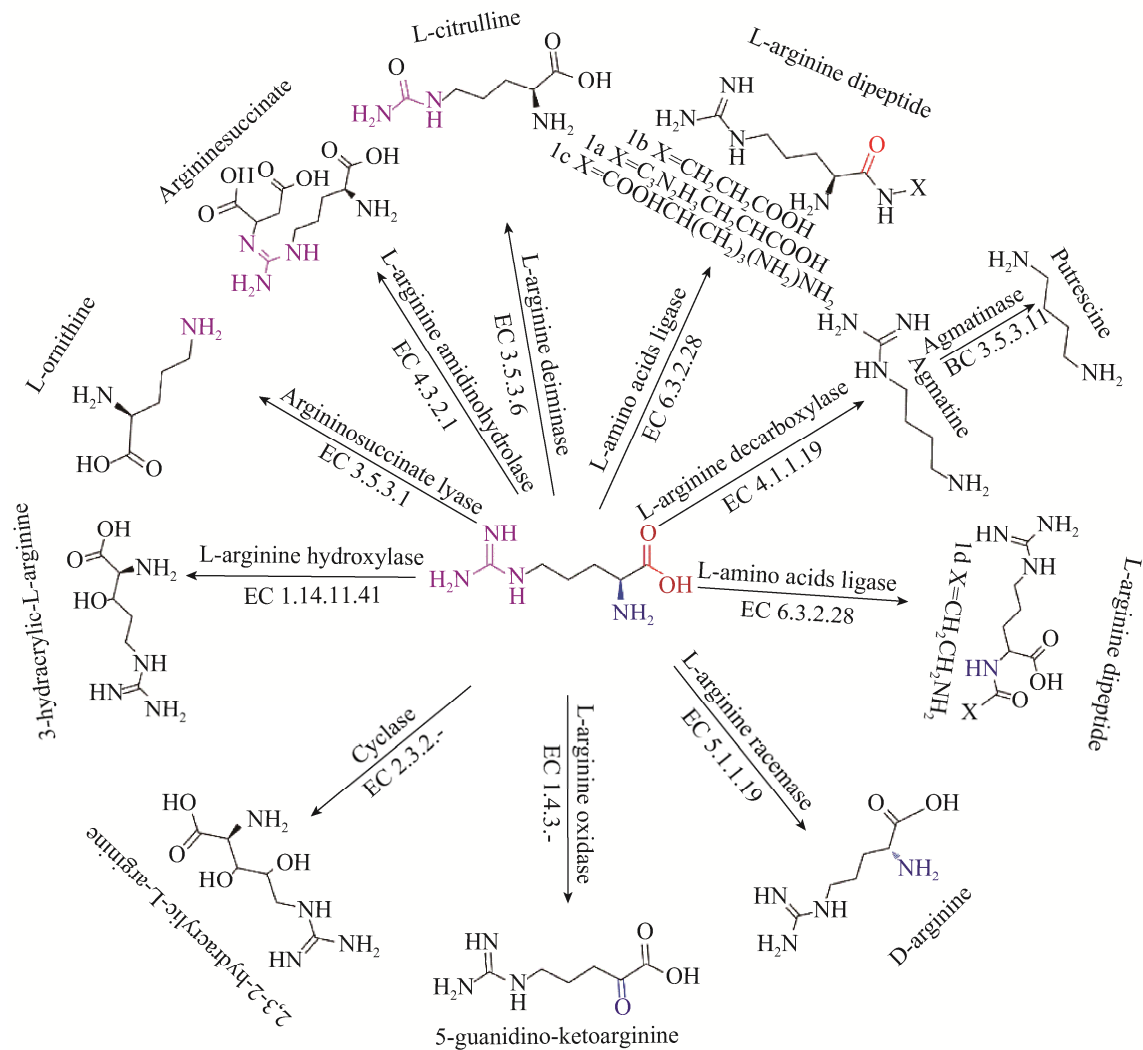


图 2 L-精氨酸的结构特性及其衍生化反应
Fig. 2 Chemical structures of L-arginine and its derivatization reaction.

表 1 L-精氨酸的衍生化反应
Table 1 Derivatization reactions of L-arginine

Group	Reaction type	EC No.	Enzyme	Derivatization product	Reference
Guanidino	Hydrolysis	EC 3.5.3.1	Argininosuccinylase	L-ornithine	[11]
	Hydrolysis	EC 3.5.3.6	L-argdeiminase	L-citrulline	[27]
	Ligation	EC 4.3.2.1	L-argamidinohydrolase	Argininesuccinate	[28]
Carboxyl	Ligation	EC 6.3.2.28	Amino acids ligase	L-Arg dipeptides (eg. L-Arg-His)	[29]
	Lyase	EC 4.1.1.19	L-Arg decarboxylase	Agmatine	[30]
Amidogen	Isomerism	EC 5.1.1.19	L-argracemase	D-Arg	[18]
	Redox	EC 1.4.3.-	L-Arg oxidase	5-guanidino-2-ketoarginine	[25]
	Ligation	EC 6.3.2.28	Amino acids ligase	L-Argdipeptides (eg. L-Arg-Ala)	[31]
Carbon chain	Redox	EC 1.14.11.41	L-Arg hydroxylase	3-hydracrylic-L-Arg	[26]
	Redox	EC 2.3.2.-	Cyclase	2,3-2-hydracrylic-L-Arg	[26]

鸟氨酸是精氨酸酶水解 L-精氨酸的产物。在医药领域, L-鸟氨酸具有伤口消炎的功能^[20-21], 并且可以与其他氨基酸通过离子键形式结晶形成氨基酸盐复合物, 以达到增强药效的目的, 诸如 L-鸟氨酸苯乙酸用作肝性脑病的治疗、天门冬氨酸鸟氨酸用于护肝药^[32]。在食品领域, 鸟氨酸具有促进人体生长激素分泌的作用, 可用作减肥保健品的添加剂^[33], 此外鸟氨酸还具有脱苦味的作用, 可用于食品添加剂中以改善食品风味^[34]。近年来, 生物酶法合成 L-鸟氨酸的研究进展如表 2 所示, 主要包括野生型产酶微生物的筛选和高效酶源的异源表达两部分。早在 1995 年, 人们开始将 L-精氨酸酶用于 L-鸟氨酸合成, 由 Makryaleas 等从动物肝脏中提取并直接用于酶转化^[35]。由于动物肝脏提取精氨酸酶的工艺非常复杂, 一些研究者开始通过传统的土壤筛选方法来筛选微生物来源的 L-精氨酸酶。北京化工大学 Xu^[36]通过添加一定量的碱性氨基酸 L-精氨酸, 控制筛选培养基初始 pH 为 10–11, 只有能够降解精氨酸的菌株才能在强碱环境下生存, 并使培养基的 pH 下降至正常范围。之后再进一步检测精氨酸被降解之后的产物, 与目标反应进行对照。最终筛选得到的菌株可在 24 h 内产 43.57 g/L 鸟氨酸, 摩尔转化率达 90.13%。同样的, Matsui 等^[25]用在培养基中添加高浓度 L-精氨酸的方法, 经过 3 轮富级培养, 在新发现的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 中筛选

到了一株新的产 L-精氨酸酶的菌株。

采用模式菌株异源表达精氨酸酶并用于鸟氨酸合成的研究是近几年才兴起的, 其中最新的成果为本研究室 Song 等的研究^[11]。Song 等结合数据库检索和文献调研对精氨酸酶相关参数进行挖掘, 最终选择芽胞杆菌 *Bacillus caldovelox* DSM411 生产的精氨酸酶作为精氨酸胍基水解生产 L-鸟氨酸的酶制剂。为了克服野生菌株生产精氨酸酶产量低的缺点, 精氨酸酶基因经密码子优化后过量表达于大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 获得一株 L-精氨酸酶高产菌株 FMME096。经培养基和诱导条件优化后, 重组菌株 FMME096 酶活为 177.3 U/mL, 与野生菌株相比提高了 47.9 倍。同时, 建立了 L-精氨酸催化生产鸟氨酸的高效转化体系: 12 g/L 的湿菌体和 170 g/L 的 L-精氨酸在 60 °C、pH 9.0 的条件下转化 4 h, L-鸟氨酸的产量最高可达 112.3 g/L, 转化率 87.1%, 单位菌体 L-鸟氨酸产量为 9.4 g/g。考虑到酶的稳定性, Zhang 等^[37]对精氨酸酶进行了固定化研究。作者将毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 异源表达的鸟氨酸酶以戊二醛为交联剂、以壳聚糖为载体进行固定化。通过比对游离酶与固定化酶的性质发现, 两者均在 pH 10.0、40 °C 下活性最高, 但是固定化酶的热稳定性和 pH 耐受范围更高, 更适合工业化生产。在 36 个催化反应循环之后, 酶活还可以保持在初始酶活的 50% 以上。固定化酶在添加

表 2 生物酶法合成 L-鸟氨酸的研究进展

Table 2 Recent development of enzymatic production of L-ornithine

Type	Year	Microorganism	Reaction time (h)	Yield (g/L)	Conversion rate (%)	Space time yield (g/(L·h))	Reference
Wide strain	1995	<i>Animal liver</i>	20	96.7	97.7	4.8	[35]
	2009	<i>Bacillus thuringiensis</i>	24	43.5	90.1	1.8	[36]
	2013	<i>Bacillus thuringiensis</i>	10	72.7	95.8	7.2	[38]
	2016	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR	NR	NR	NR	[25]
Engineered strain	2013	<i>Bostaurus</i>	15	111.5	98.0	7.4	[39]
	2014	<i>Bacillus caldovelox</i> DSM411	4	112.3	87.1	28.0	[11]
	2015	<i>Pichia pastoris</i> GS115	10	149.9	98.0	14.9	[37]

NR: not reported.

1%戊二醛、1 mmol/L Mn^{2+} 、40 °C、pH 10 的条件下可转化 200 g/L L-精氨酸为 149.9 g/L 鸟氨酸，摩尔转化率达 98%。国内已有一些企业实现了 L-鸟氨酸的生物酶法合成，其中包括上海汉飞生化科技有限公司、山东民强生物科技股份有限公司、宁波镇海海德生化科技有限责任公司和天津启仁医药科技有限公司等。山东民强生物科技股份有限公司通过陶瓷滤膜和 711 氨基树脂纯化底物 L-精氨酸溶液，在 30 °C 下经含有精氨酸酶的菌体催化反应 24 h 后，L-精氨酸的转化率可达 98%。

L-瓜氨酸是 L-精氨酸在 L-精氨酸脱亚胺酶作用下的产物。瓜氨酸常用作医药保健的添加剂，用于预防前列腺疾病^[40]；用作健身补剂，增强肌肉力量和持久力^[41]；用作食品的抗氧化剂和抗衰老保健品及化妆品^[42]。生物酶法合成 L-瓜氨酸的研究进展如表 3。早在 1974 年，Yamamoto 等^[43]开始将高产 L-精氨酸脱亚胺酶的恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* ATCC4359 固定化细胞用于 L-鸟氨酸的工业化生产 (Tanabe Seiyaku 公司，日本)，其产量和时空产率可达 87.59 g/L 和 9.73 g/(L·h)。2010 年之后，对于 L-精氨酸脱亚胺的研究开始增多，主要集中于酶动力学性质的考察 (表 3) 与蛋白表达策略。在表达载体的选择上，李娜^[44]比较了 *P. pichia* 和 *E. coli* 两种不同的宿主分泌表达相同 L-精氨酸脱亚胺酶的能力。首先，作者根据不同宿主密码子偏好性对脱亚胺酶序列进行了优化。之后，对于 *P. pichia* 表达宿主，作者将优化

后的基因与表达载体 pPIC9K 连接，成功构建重组表达载体 pPIC9K-ADI，检测重组蛋白酶活为 29.0 U/L；对于 *E. coli* 表达宿主，作者将优化后的基因克隆与表达载体 pBAD 相连接 (pBAD 具有阿拉伯糖启动子)，经鉴定得到重组质粒 pBAD-ADI，经检测重组蛋白酶活为 68.0 U/L，为酵母表达体系的 2.34 倍。在此基础上，作者采用 Osmotic Shock 法使 L-精氨酸脱亚胺酶从细胞周质空间释放，定位在细胞周质空间的重组蛋白活性为 53 U/L，定位在细胞内的重组蛋白酶活为 34 U/L，总酶活提高了 27.9%。在增加目的蛋白可溶性方面，Wang 等^[45]在单一载体上构建了一个精氨酸脱亚胺酶的 GroES-GroEL 融合蛋白 (其中 GroES 为 *P. putida* ATCC4359 来源精氨酸脱亚胺酶，GroEL 可以协助目的蛋白正确折叠)，使得脱亚胺酶的可溶性增加了 6 倍。

生物酶法合成瓜氨酸的最新成果为本研究室 Song 等^[27]的研究。他构建了一株食品安全级乳酸杆菌 *Lactobacillus lactis* 来源的精氨酸脱亚胺酶高产菌株，之后以易错 PCR 技术对精氨酸脱亚胺酶进行定向进化，突变文库里筛选获得一株性质明显改善的精氨酸脱亚胺酶生产菌株 FMME106 (R127T、R395M)，相对于出发菌株比活力提高了 38.3%，达到 195.7 U/mg。之后建立了精氨酸脱亚胺生产 L-瓜氨酸高效催化体系 (15 g/L 菌体细胞、190 g/L L-精氨酸、50 °C、pH 7.2)，转化反应 8 h 后，L-瓜氨酸的产量达到最大，为 176.9 g/L，转

表 3 生物酶法合成 L-瓜氨酸的研究进展

Table 3 Recent development of enzymatic production of L- citrulline

Year	Microorganism	K_m (mmol/L)	Reaction time (h)	Yield (g/L)	Conversion rate (%)	Space time yield (g/(L·h))	Reference
1974	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC4359	NR	9	87.5	NR	9.7	[43]
2010	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.6	NR	NR	NR	NR	[46]
2014	<i>Aeromonas</i> sp.	0.6	NR	NR	NR	NR	[47]
2015	<i>Pseudomonas putida</i> ACCC 10185	0.2	NR	NR	NR	NR	[48]
2015	<i>Enterococcus faecalis</i>	NR	24	95.6	95.1	3.9	[27]
2015	<i>Lactobacillus lactis</i>	8.6	8	176.9	92.3	22.1	[27]

化率为 92.3%。上海聚瑞生物技术有限公司、滨州生物技术研究有限责任公司和上海凯圣生物科技有限公司等已实现了生物酶法合成瓜氨酸的工业化生产。上海凯圣生物科技有限公司从环境微生物中克隆得到了精氨酸脱亚胺酶的基因,构建了 *E. coli* BL21 的基因工程菌,并验证了其在生产 L-瓜氨酸上的用途, L-精氨酸的转化率可达 99%。

3.2 基于羧基基团改造的精氨酸衍生化产品

生物酶法合成 L-精氨酸羧基所得衍生化产品包括胍基丁胺和含酰胺键的二肽。胍基丁胺 (Agmatine, AGM) 是一种重要的生物胺类物质,是生物体内 L-精氨酸-一氧化氮和生物胺代谢途径及多种神经受体的关键调节因子,广泛分布在哺乳动物的胃、肠道、脾脏、骨骼肌和脑中,具有丰富的生理功能^[49]。1994 年在哺乳动物脑中得到分离纯化后,胍基丁胺的生理功能、代谢及合成得到了越来越多的关注^[50]。胍基丁胺是 L-精氨酸重要的代谢产物之一,经 L-精氨酸脱羧酶 (L-arginine decarboxylase, ADC, EC 4.1.1.19) 催化 L-精氨酸脱羧生成。同时产物胍基丁胺可经胍基丁胺水解酶 (Agmatinase, EC 3.5.3.11) 的催化降解为腐胺。

目前,胍基丁胺的生产方法包括化学法和生物酶法。化学法通常以 1,4-丁二胺、己二酸二乙酯、1,4-二溴丁烷和 1,4-二氯-2-丁烯为底物。反应过程易引入有毒有害物质,反应过程复杂,反应安全性低。生物酶法合成胍基丁胺的方法主要是指 L-精氨酸脱羧酶催化 L-精氨酸脱羧,生成目标产物的过程。L-精氨酸脱羧酶属于氨基酸脱羧酶家族,PLP 依赖型,广泛分布在植物微生物体内。Zhang 等^[51]通过分子生物学的手段,构建了一株可以过表达 *E. coli* K12 来源精氨酸脱羧酶基因的 *E. coli* BL21 菌株,并建立了一个连续转化生产胍基丁胺的生物过程 (100 mmol/L L-Arg、50 mmol/L PLP、pH 7.0、45 °C、15 h),使得胍基丁胺的最高产量可达 20 g/L。同时,采用海藻酸盐对细胞

进行固定化,固定化细胞循环使用 6 次后,平均转化率可达 55.6%。

本研究室 Sun 等^[30]构建了一株 *E. coli* BL21 来源精氨酸脱羧酶 *EcC2* 的重组表达菌株,经过酶学性质测定和转化条件优化 (20 g/L L-Arg、3.5 g/L 湿菌体、4 mmol/L Mg^{2+} 、30 mmol/L PLP、pH 7.0、37 °C),使得胍基丁胺的产量在 6 h 内可达 14.3 g/L,转化率达 95.3%。上述转化过程普遍存在精氨酸脱羧酶活力低、转化过程底物载量少、时空产率低的问题,不利于胍基丁胺进一步的放大生产与规模化制备。本研究室 Sun 等在之前的研究基础上,通过基因组数据库挖掘的策略,以 *EcC2* 为探针,筛选到一个与 *EcC2* 氨基酸序列一致性为 55.37%、来自腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* 的脱羧酶 *SpA9*。在相同条件下,*SpA9* 的酶活力为 15.8 U/mg,是探针 *EcC2* 酶活力的 29.8 倍。经过酶学性质研究、产酶条件优化及转化条件优化,得到 L-精氨酸转化的最佳体系为 90 g/L L-Arg, 18 mmol/L Mg^{2+} 、31.5 mmol/L PLP、135 g/L 湿菌体、2% 曲拉通 X-100。在 3.5 L 罐体上,控制 pH 8.5、温度 37 °C、通气 1 vvm、搅拌转速 400 r/min。2 h 后胍基丁胺的产量达到最大,为 52.66 g/L,转化率为 78.27%,时空产率为 26.33 g/(L·h)。河南华荣生物技术有限公司建立了一种生物酶法联产胍基丁胺和 D-精氨酸的工艺路线。首先分别构建了表达精氨酸消旋酶基因 *argR* 的 *E. coli* 重组菌,和表达精氨酸脱羧酶基因 *speA* 的 *E. coli* 重组菌。将含有 L-精氨酸、表达精氨酸消旋酶的基因工程菌湿菌体的转化体系,搅拌反应后得到 DL-精氨酸的混旋物,除去精氨酸消旋酶后,补加表达 L-精氨酸脱羧酶的湿菌体继续搅拌反应,至 L-精氨酸被完全消耗,最后经分离纯化得到 D-精氨酸和胍基丁胺。

含酰胺键的二肽化合物主要由 L-氨基酸合酶催化合成。Senoo 等^[31]发现一种来源于枯草芽胞杆

菌 *Bacillus subtilis* 的 YwfE 酶, 具有催化非保护氨基酸形成二肽化合物的能力, 而且 YwfE 底物谱很广, 可以催化形成 41 种不同的二肽化合物, 并为此建立了一个新的酶种类 (EC 6.3.2.28)。之后人们对 L-氨基酸合酶的研究越来越深。L-氨基酸合酶又称 Lal 酶, 是一种 ATP 依赖型、具有广谱底物特性、催化非基团保护氨基酸成肽的连接酶。常见 L-氨基酸合酶可催化合成的二肽种类如表 4 所示。为了进一步拓宽 L-氨基酸合酶的底物谱范围, Senoo 等^[31]使用计算机模拟筛选的方法 (基于模型分析的 Hidden Markov 算法), 筛选了 5 个新的

L-精氨酸合酶 (变形链球菌 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, SMU 1321.c; 发光杆菌 *Photobacterium luminescens*, Plu 1218; 齿垢密螺旋体 *Treponema denticola* ATCC 35405, TDE 2209; 胸膜肺炎放线杆菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Aple 02000835; 肺炎双球菌 *Streptococcus pneumoniae*, SP 0885), 其底物范围及产物种类如表 4 所示。Arai 等^[16]发现来自丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* NBRC14081 的 *tabS* 基因所编码的 Lal 酶可以催化形成 136 种氨基酸二肽化合物 (表 4), 并以较高的转化率合成 L-精氨酸的衍生物 L-Arg-Phe (62%)。

表 4 L-精氨酸合酶的底物谱及产物

Table 4 Substrate spectrum and products of L-amino acids ligase

Year	Name	Substrate	Product	Reference
2010	YwfE	Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Tyr, Trp, Val	Ala-Ala/Ser/Cys/Val/Leu/Ile/Met/Phe/Tyr/Trp/Gln/His; Gly-Cys/Leu/Met/Phe; Phe-Met/Asn/Gln/Arg; Ser-Ser/Cys/Val/Leu/Ile/Met/Phe/Tyr/Trp/His; Thr-Cys/Leu/Ile/Met/Phe/Trp/His	[31]
2013	TabS	Ala, β -Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Cys-Met/Leu; Pro-Trp/Phe/Tyr/ β -Ala; Met-His/Arg/Lys/Ile/Phe/Leu/Trp/Ala/Met/Pro/Cys/Met-Asn/Val/Gly/Ser/Gln/Tyr/Asp/Glu/Thr/ β -Ala; Val-His/Arg/Lys/Ile/Phe/Leu/Trp/Ala/Met/Pro/Cys/Val-Asn/Val/Gly/Ser/Gln/Tyr/Thr/ β -Ala; Leu-His/Arg/Lys/Phe/Leu/Trp/Ala/Met/Pro/Cys; Leu-Asn/Val/Gly/Ser/Gln/Asp/Thr/ β -Ala; Ile-His/Arg/Lys/Ile/Phe/Leu/Trp/Ala/Met/Pro/Cys; Ile-Asn/Val/Gly/Ser/Gln/Tyr/Asp/Thr/ β -Ala; Ala-His/Arg/Lys/Ile/Phe/Leu/Trp/Ala/Met/Pro/Cys; Ala-Val/Ser/Gln/Asp/Thr; Gly-Pro/Trp/Phe; Ser-His/Arg/Lys/Ile/Phe/Leu/Trp/Asn/Met/Pro/Cys; Ser-Val/Ser/Gln/Thr; Gln-Asn/Pro/Trp/Phe/Tyr; Thr-His/Arg/Ile/Phe/Leu/Trp/Asn/Met/Pro/Cys; Thr-Val/Gln/Thr/Tyr/ β -Ala; Trp- Trp/Phe/Tyr/ β -Ala; Arg-Gln/Trp/Phe/Tyr/ β -Ala; Phe-Phe/Tyr; Glu- β -Ala; Lys-Phe/Trp; His-Gln/Tyr/Phe/Trp; Trp-Glu/Asp	[16]
2014	SMU 1321.c	Ala, Arg, Cys, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr	Leu-Cys; Tyr-Gly/Cys; Gln-Phe; Phe-Gly/Ala/Cys/Val/Met/Phe/Lys/Arg; Trp-Ala/Cys/Leu/Met/Phe; His-Gly/Ala/Ser/Cys/Met/Pro/Phe/Trp/Gln/His	[31]
2014	Aple 02000835	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, Val.	Gly-Leu/Met/Phe/Tyr/Trp/His; Ala-Phe/Tyr/Trp/His; Ser-Phe/Trp/His; Cys-Leu/Met/Phe/Tyr/Trp/His; Val-Met/Phe/Trp/His; Leu-Met/Trp/Glu/Asn/Gln; Ile-Met/Phe/Trp; Met-Met/Phe/Tyr/Typ/Gln/His/Arg; Phe-Phe/Tyr/Trp/Asp/Asn/Gln/His/Lys/Arg; Tyr-Arg; Trp-Trp/Asn/Gln/His/Arg; His-Asn/Gln/His/Lys/Arg	[31]
2014	SP 0885	Ala, Arg, Cys, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Trp	Leu-Gly; Phe-Gly/Cys/Phe; Trp-Gly/Ala/Cys; His-Pro/Phe; Arg-Phe/Trp	[31]

3.3 基于氨基基团改造的精氨酸衍生化产品

基于氨基基团改造的精氨酸衍生化产品有 D-精氨酸、5-胍基-2-氧代戊酸以及含酰胺键的氨基酸二肽 (见 3.2 基于羧基基团改造的精氨酸衍生化产品)。

D-精氨酸是一种非蛋白组成类氨基酸, 在自然界中含量稀少, 具有抑制癌细胞扩散、降低生长激素和胰岛素释放速率的作用, 是合成治疗心脑血管疾病、抗肿瘤药物和减肥药的重要中间体^[24]。D-精氨酸的生物酶法合成一般伴随其他氨基酸衍生物的联产。南京大学 Li 等在利用精氨酸脱亚胺酶转化联产 D-精氨酸和 L-瓜氨酸的过程中, 发现当培养基中有一定量的 L-精氨酸时, 菌体生长与精氨酸脱亚胺酶的生产是偶联的。作者进一步进行了发酵条件的优化 (发酵培养基组成、接种量、培养温度、发酵初始 pH、通气量、搅拌转速、表面活性剂的种类及加量、金属离子)。最终, 在最优的发酵和转化条件下, 100 g DL-精氨酸经催化反应生成 D-精氨酸 30.3 g、L-鸟氨酸 33.1 g, 分别为理论收率的 60.6% 和 68.2%, 产品质量符合日本味之素公司 AJI 药用级标准。

对于 5-胍基-2-氧代戊酸的生产, Matsui 等^[25]以含有高浓度 L-精氨酸的培养基为筛选培养基, 通过传统土壤筛选的方法, 经过 3 轮富集培养后, 通过 HPLC-MS 鉴定转化产物, 筛选得到一株可以氧化 L-精氨酸为 5-胍基-2-氧代戊酸的菌株。通过 16S rDNA 基因和进化树分析, 鉴定该菌属假单胞菌属 *Pseudomonas*, 命名为 *Pseudomonas* sp. TPU 7192。

3.4 基于碳主链改造的精氨酸衍生化产品

生物酶法修饰精氨酸碳主链的主要产物为 3-羟基-L-精氨酸。目前已报道可以催化 L-精氨酸羟基化生成 3-羟基-L-精氨酸的酶来源于链霉菌 *Streptomyces* sp. ATCC11861^[52]。 *Streptomyces* sp. 中存在一条由 VioC 和 VioD 两个酶组成的卷曲霉

素合成路径, 其中 VioC 为 Fe^{2+} 依赖型, 具有 L-精氨酸羟化酶的功能, 可以催化 L-精氨酸生成 3-羟基-L-精氨酸。同时 3-羟基-L-精氨酸也是卷曲霉素的前体物质。Ju 等^[19]对上述研究进行了实验验证, 在 *E. coli* BL21 中异源表达 *Streptomyces* sp. ATCC11861 中的 VioC 基因, 并对其催化 L-精氨酸的产物进行质谱分析, 结果表明 VioC 具有 L-精氨酸羟化酶活性, 可以催化 L-精氨酸生成 3-羟基-L-精氨酸。

4 小结与展望

围绕“生物酶法合成 L-精氨酸衍生物”这一研究主题, 国内外的研究者在 L-精氨酸衍生物种类的挖掘、衍生化用酶的筛选、衍生化用酶的表达策略和催化转化体系的建立与优化等方面开展了大量卓有成效的研究, 极大地丰富了生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的种类, 并且部分产品已实现了生物酶法的工业化生产。然而, 目前生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的产量、转化率和生产强度仍较低, 其根本原因在于酶对工业生产环境的耐受性差, 难以长期保持高的催化活力; 另外现有的 L-精氨酸衍生物合成的催化体系单一, 酶的催化活力难以彻底地发挥。因此如何利用酶工程的新技术与方法提高酶的催化能力和环境耐受性, 如何优化催化反应体系的组成是未来研究的重点和热点, 主要包括: 1) 利用蛋白质工程的策略对催化用酶的缺陷进行分子改造, 提高催化用酶对工业生产环境的耐受性; 2) 多酶级联反应的开发与应用, 构建体外多酶反应途径, 优化催化反应体系; 3) 辅酶再生系统的构建, 降低催化反应成本; 4) 摆脱单一水相催化的模式, 利用介质工程的手段建立高效催化体系。

REFERENCES

- [1] Heffernan KS, Vieira VJ, Valentine RJ.

- Microvascular function and ageing: L-arginine, tetrahydrobiopterin and the search for the fountain of vascular youth. *J Physiol London*, 2008, 586(8): 2041–2042.
- [2] Karami R, Hosseini M, Khodabandehloo F, et al. Different effects of L-arginine on morphine tolerance in sham and ovariectomized female mice. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12(12): 1016–1023.
- [3] Wang X, Tao WY, Sun ZH, et al. The progress of L-arginine fermentation. *Ind Microbiol*, 2000, 30(4): 50–54 (in Chinese).
王霞, 陶文沂, 孙志浩, 等. L-精氨酸发酵研究进展. *工业微生物*, 2000, 30(4): 50–54.
- [4] Guo J, Man ZW, Rao ZM, et al. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum*. *J Ind Microbiol Biot*, 2017, 44(3): 443–451.
- [5] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nat Commun*, 2014, 5: 4618.
- [6] Su LM, Li S. Preservation method for L-arginine-producing strain of *Brevibacterium flavum*. *Ind Microbiol*, 2009, 39(1): 60–62 (in Chinese).
苏令鸣, 李爽. 产精氨酸的黄色短杆菌菌种保藏方法的研究. *工业微生物*, 2009, 39(1): 60–62.
- [7] Huang JH, Wang XC, Wang HN, et al. Isolation of highly productive strain of L-arginine. *Amino Acids Bio Res*, 2005, 27(3): 46–48 (in Chinese).
黄继红, 王新春, 王华南, 等. L-精氨酸高产菌株的选育. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(3): 46–48.
- [8] Xiong XJ, Dou WF, Xu ZH, et al. L-Arginine production by arginine analog-resistant mutant of microorganisms. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2003, 22(2): 10–13 (in Chinese).
熊筱晶, 窦文芳, 许正宏, 等. L-精氨酸高产菌的诱变育种及其摇瓶产酸条件. *无锡轻工大学学报*, 2003, 22(2): 10–13.
- [9] Xu ZH, Dou WF, Wang X, et al. Effects of nitrogen source and its supply manner on production of L-arginine by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75. *Chin J Appl Environ Biol*, 2006, 12(3): 381–385 (in Chinese).
许正宏, 窦文芳, 王霞, 等. 氮源及其添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 合成 L-精氨酸的影响. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(3): 381–385.
- [10] Su LM, Wang YM, Li S. Fermentative production of L-arginine by mutant AN78. *Ind Microbiol*, 2003, 33(2): 1–3 (in Chinese).
苏令鸣, 王宜敏, 李爽. 黄色短杆菌变异株 AN78 的发酵生产 L-精氨酸的研究. *工业微生物*, 2003, 33(2): 1–3.
- [11] Song W, Niu PQ, Chen XL, et al. Enzymatic production of L-ornithine from L-arginine with recombinant thermophilic arginase. *J Mol Catal B-Enzym*, 2014, 110: 1–7.
- [12] Tsuchida TC, Uchibori HC, Nishimoto YC. Process for producing L-ornithine by fermentation: EP, 0393708. 1994-06-29.
- [13] Li L, Li ZM, Chen DQ, et al. Inactivation of microbial arginine deiminases by L-canavanine. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(6): 1918–1931.
- [14] Tsai M, Sampaleanu LM, Greene C, et al. A duck $\delta 1$ crystallin double loop mutant provides insight into residues important for argininosuccinate lyase activity. *Biochemistry*, 2004, 43(37): 11672–11682.
- [15] Yu JJ, Park KB, Kim SG, et al. Expression, purification, and biochemical properties of arginase from *Bacillus subtilis* 168. *J Microbiol*, 2013, 51(2): 222–228.
- [16] Arai T, Arimura Y, Ishikura S, et al. L-amino acid ligase from *Pseudomonas syringae* producing tabtoxin can be used for enzymatic synthesis of various functional peptides. *Appl Environ Microb*, 2013, 79(16): 5023–5029.
- [17] Falasca G, Franceschetti M, Bagni N, et al. Polyamine biosynthesis and control of the development of functional pollen in kiwifruit. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(7): 565–573.
- [18] Matsui D, Oikawa T. Detection and function of the intramolecular disulfide bond in arginine racemase: an enzyme with broad substrate specificity. *Chem Biodivers*, 2010, 7(6): 1591–1602.
- [19] Ju JH, Ozanick SG, Shen B, et al. Conversion of (2S)-arginine to (2S, 3R)-capreomycinidine by VioC and VioD from the viomycin biosynthetic pathway of *Streptomyces* sp. strain ATCC11861. *Chembiochem*, 2004, 5(9): 1281–1285.
- [20] Lu DM. Progress in metabolic engineering for microbial synthesis of ornithine. *Microbiol China*,

- 2015, 42(7): 1391–1399 (in Chinese).
卢冬梅. 微生物合成鸟氨酸的代谢工程研究进展. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1391–1399.
- [21] Wang JB, Zou YL, Xue HY. Studies on biological function and production of L-ornithine. Food Res Dev, 2007, 28(3): 166–169 (in Chinese).
汪江波, 邹玉玲, 薛海燕. L-鸟氨酸的生物功能及生产研究. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 166–169.
- [22] Rossi FR, Marina M, Pieckenstein FL. Role of arginine decarboxylase (ADC) in *Arabidopsis thaliana* defence against the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. Plant Biol, 2015, 17(4): 831–839.
- [23] Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stroobant V, et al. Metabolite proofreading in carnosine and homocarnosine synthesis molecular identification of PM20D2 as β -alanyl-lysine dipeptidase. J Biol Chem, 2014, 289(28): 19726–19736.
- [24] Guo TT, Peng JM, Hou YY, et al. Production of D-arginine and L-ornithine by enzymatic conversion of L-arginine amidinase. Fine Chem, 2012, 29(7): 656–659 (in Chinese).
郭婷婷, 彭佳敏, 侯媛媛, 等. 精氨酸酶转化生产 D-精氨酸和 L-鸟氨酸. 精细化工, 2012, 29(7): 656–659.
- [25] 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 Tech, 2016, 82: 151–157.
- [26] Han LL, Schwabacher AW, Moran GR, et al. *Streptomyces wadayamensis* MppP is a pyridoxal 5'-phosphate-dependent L-arginine α -deaminase, γ -hydroxylase in the enduracididine biosynthetic pathway. Biochemistry, 2015, 54(47): 7029–7040.
- [27] Song W, Sun X, Chen XL, et al. Enzymatic production of L-citrulline by hydrolysis of the guanidinium group of L-arginine with recombinant arginine deiminase. J Biotech, 2015, 208: 37–43.
- [28] Engel K, Vuissoz JM, Eggimann S, et al. Bacterial expression of mutant argininosuccinate lyase reveals imperfect correlation of *in-vitro* enzyme activity with clinical phenotype in argininosuccinic aciduria. J Inher Metab Dis, 2012, 35(1): 133–140.
- [29] Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, et al. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). J Biol Chem, 2010, 285(13): 9346–9356.
- [30] Sun X, Song W, Liu LM. Enzymatic production of agmatine by recombinant arginine decarboxylase. J Mol Catal B-Enzym, 2015, 121: 1–8.
- [31] Senoo A, Tabata K, Yonetani Y, et al. Identification of novel L-amino acid α -ligases through hidden markov model-based profile analysis. Biosci Biotech Biochem, 2010, 74(2): 415–418.
- [32] Wan HG, Zhu C, Xiong Y, et al. L-ornithine phenylacetate, a new medicine to treat hepatic encephalopathy. Chin J New Drug, 2013, 22(11): 1274–1277 (in Chinese).
万红贵, 朱超, 熊洋, 等. 一种新型治疗肝性脑病的药物: L-鸟氨酸苯乙酸. 中国新药杂志, 2013, 22(11): 1274–1277.
- [33] Horiuchi M, Kanesada H, Miyata T, et al. Ornithine ingestion improved sleep disturbances but was not associated with correction of blood tryptophan ratio in Japanese antarctica expedition members during summer. Nutr Res, 2013, 33(7): 557–564.
- [34] Kawabe H, Shibasaki T, Uchida T. Beverage containing amino acid and method of diminishing bitterness of amino acid: Japan, WO/052125. 2004-06-24.
- [35] Makryaleas K, Drauz K. Method for the preparation of salts of L-ornithine: US, 5405761. 1995-04-11.
- [36] Xu T. Study on producing L-ornithine by arginase in microorganism[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2009 (in Chinese).
徐焘. 微生物酶法生产 L-鸟氨酸的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2009.
- [37] Zhang X, Liu J, Yu XH, et al. High-level expression of human arginase I in *Pichia pastoris* and its immobilization on chitosan to produce L-ornithine. BMC Biotechnol, 2015, 15: 66.
- [38] Zhang T, Guo YJ, Zhang H, et al. Arginase from *Bacillus thuringiensis* SK 20.001: purification, characteristics, and implications for L-ornithine biosynthesis. Process Biochem, 2013, 48(4): 663–668.
- [39] Zhan YP, Liu JZ, Mao PT, et al. Biotransformation of L-ornithine from L-arginine using whole-cell recombinant arginase. World J Microb Biot, 2013, 29(11): 2167–2172.

- [40] El-Sayed A, Hassan MN, Nada HMS. Purification, immobilization, and biochemical characterization of L-arginine deiminase from thermophilic *Aspergillus fumigatus* KJ434941: anticancer activity *in vitro*. *Biotechnol Progr*, 2015, 31(2): 396–405.
- [41] Ruiz E, Tejerina T. Relaxant effects of L-citrulline in rabbit vascular smooth muscle. *Brit J Pharmacol*, 1998, 125(1): 186–192.
- [42] Prestes CC, Sgaravatti AM, Pederzoli CD, et al. Citrulline and ammonia accumulating in citrullinemia reduces antioxidant capacity of rat brain *in vitro*. *Metab Brain Dis*, 2006, 21(1): 61–72.
- [43] Yamamoto K, Sato T, Tosa T, et al. Continuous production of L-citrulline by immobilized *Pseudomonas putida* cells. *Biotechnol Bioeng*, 1974, 16(12): 1589–1599.
- [44] Li N. Studies on the secretory expression of arginine deiminase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
李娜. 精氨酸脱亚胺酶的分泌型表达研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [45] Wang Y, Li YZ. Cultivation to improve *in vivo* solubility of overexpressed arginine deiminases in *Escherichia coli* and the enzyme characteristics. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 53.
- [46] Liu YM. Identification and directed evolution of arginine deiminase from *Pseudomonas plecoglossicida*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
刘咏梅. 产精氨酸脱亚胺酶变形假单胞菌的筛选鉴定及酶的定向改造[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [47] Ran S. Cloning, expression and site-mutation of a arginine deminase from *Aeromonas* sp.[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
冉诗. 气单胞菌精氨酸脱亚胺酶基因的克隆、表达与定点突变研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [48] Ma Y. Recombinant expression, fermentation optimization and application of arginine deiminase from *Pseudomonas putida*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015 (in Chinese).
马越. 恶臭假单胞菌精氨酸脱亚胺酶的重组表达、发酵优化及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [49] Raasch W, Regunathan S, Li G, et al. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci*, 1995, 56(26): 2319–2330.
- [50] Li G, Regunathan S, Barrow CJ, et al. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 1994, 263(5149): 966–969.
- [51] Zhang WG, Zhao GH, Liu JZ, et al. Enzymatic synthesis of agmatine by immobilized *Escherichia coli* cells with arginine decarboxylase activity. *Chem Res in Chin Univ*, 2011, 27(6): 992–995.
- [52] Helmetag V, Samel SA, Thomas MG, et al. Structural basis for the *erythro*-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis. *FEBS J*, 2009, 276(13): 3669–3682.

(本文责编 陈宏宇)