

氨基酸氧化酶催化合成非天然手性氨基酸研究进展

夏仕文, 熊文娟, 韦燕婵, 何从林, 徐红梅
(重庆邮电大学 生物信息学院, 重庆 400065)

关键词: D-氨基酸氧化酶; L-氨基酸氧化酶; 动力学拆分; 去消旋化; 非天然手性氨基酸
中图分类号: Q814.1 **文献标志码:** A

非天然手性氨基酸是已经上市的和正在研发的手性药物、手性农药和手性食品添加剂的关键中间体^[1-2]。随着相关产业的发展,非天然手性氨基酸的市场需求与日俱增。非天然手性氨基酸不能像天然 L-氨基酸一样采用发酵法生产,主要制备方法包括化学法和生物法。化学法包括化学不对称合成法和化学拆分法。化学不对称合成法采用价格昂贵的手性源、手性助剂或手性金属催化剂。化学拆分法采用手性酸为拆分剂,经历与消旋氨基酸成盐、解盐、多次重结晶等步骤实现消旋氨基酸的动力学拆分。无论是化学不对称合成法或是化学拆分法,都存在收率低、光学纯度不高、生产成本低、环境污染大等缺点。生物法具有反应条件温和、立体选择性高、环境友好等特点^[2b, 2c],已成为非天然手性氨基酸的主流生产技术。生物法包括生物不对称合成法和生物拆分法。生物不对称合成法以较难制备的前手性酮为原料,采用需要辅酶参与的氨基酸脱氢酶、转氨酶为合成催化剂,通过不对称还原胺化、转氨化制备非天然手性氨基酸,理论收率 100%。生物拆分法以海因酶、脂肪酶、酯酶、酰化酶、氨肽酶等为拆分催化剂,通过消旋氨基酸的动力学拆分制备非天然手性氨基酸,不仅涉及前体如海因、氨基酸酯、N-酰化氨基酸、氨基酸酰胺的化学制备,而且涉及衍生氨基酸的化学脱保护等复杂步骤,理论收率仅为 50%。因此,开发工艺简单、对映选择性高、收率高的非天然手性氨基酸生物催化合成技术,对于氨基酸产业升级和相关产业的发展具有重要意义。

氨基酸氧化酶(Amino acid oxidase, AAO)按其底物特异性分为 L-氨基酸氧化酶(L-amino acid oxi-

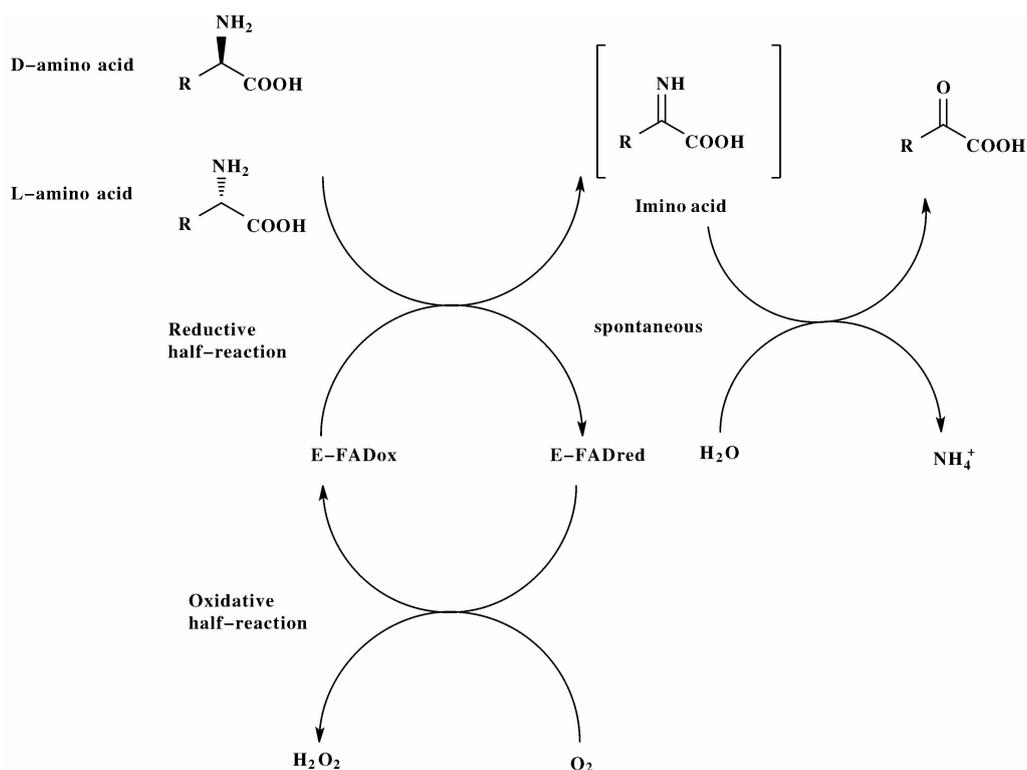
dase, LAAO, EC 1.4.3.2)和 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO, EC 1.4.3.3)两大类,两者均为黄素结合蛋白酶^[3]。在分子氧存在下,L-AAO 和 D-AAO 以严格的立体特异性催化 L-或 D-氨基酸氧化脱氢为 α -亚氨基酸中间体,氧化型黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)还原为还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)。FADH₂ 在分子氧作用下,重新氧化为 FAD,分子氧同时还原为过氧化氢。 α -亚氨基酸中间体进一步自动水解为 α -酮酸和氨。

AAO 广泛存在于哺乳动物、藻类、真菌、细菌、放线菌等物种中。有关 L-AAO 和 DAAO 的酶学性质、结构特征、生物学功能以及在生物传感、疾病诊断和治疗中的应用已有全面评述^[4-8]。动物源 AAO 由于酶源限制以及自身的生物催化性质缺陷如窄的底物特异性、差的稳定性和对映选择性,较少用作有机合成的生物催化剂。微生物源 AAO 不仅能够利用发酵工程大规模生产,而且能够利用现代生物技术如蛋白工程获得比野生酶催化性能更优越的进化 AAO,因而更适合用于有机合成目地^[9]。以微生物源 AAO 为催化剂的生物催化过程具有原料来源广泛、反应条件温和、对映选择性高、环境友好等特性,在 α -酮酸、非天然手性氨基酸合成方面具有很好的应用前景。重组 DAAO 与戊二酰基-7-氨基头孢烷酸酰化酶的组合物已成功用于头孢菌素 C 裂解,工业化生产半合成头孢菌素关键母核-7-氨基头孢烷酸(7-ACA)。近年来,随着更多的结构新颖 AAO 的发现,提出了多个基于 AAO 的催化反应体系并用于非天然手性氨基酸的合成^[10-11]。我们在这里评述了 AAO 催化合成非天然手性氨基酸的研究进展并展望其未来发展方向。

收稿日期: 2015-05-19; 修回日期: 2015-05-30.

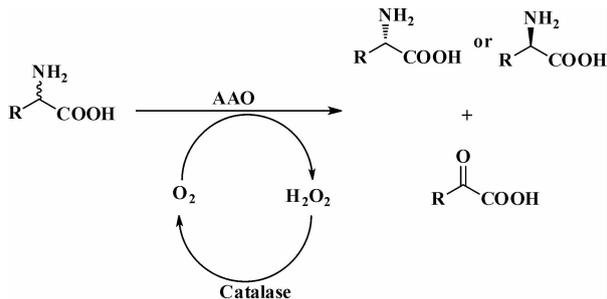
基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(CSTC2009AC5088), 重庆市“企业科技特派员-百人计划行动”项目(CSTC2009DA-B21).

作者简介: 夏仕文,男(1964-),博士,研究员,主要研究方向:生物催化与生物转化、手性合成. E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn



1 AAO/过氧化氢酶体系动力学拆分

LAAO 和 DAAO 分别催化消旋氨基酸的 L-对映体和 D-对映体氧化脱氨为 α -酮酸, 另一个对映体完全保留. 因此, 氨基酸氧化酶催化消旋氨基酸动力学拆分可同时合成 D-氨基酸或非天然 L-氨基酸和 α -酮酸. 反应过程中产生的过氧化氢一方面抑制 AAO 活性, 另一方面催化 α -酮酸氧化脱羧形成有机酸. 为了保持 AAO 的高活性和增大 α -酮酸的累积量, 通常采用共表达 AAO 和过氧化氢酶的整细胞为生物催化剂或 AAO 与外源过氧化氢酶组合, 实现过氧化氢的原位分解.

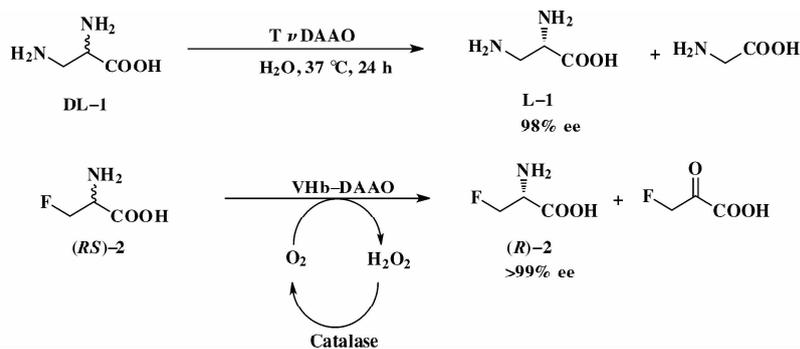


AAO 催化合成非天然手性氨基酸的适应性决定于酶的底物特异性. LAAO 和 DAAO 具有对映互补性, 从同一消旋氨基酸出发可合成对映互补的非天然手性氨基酸. 具有窄底物特异性的 AAO 仅适

合极少数非天然手性氨基酸合成, 具有宽底物特异性的 AAO 适合以同一个生物催化剂合成多个结构不同的非天然手性氨基酸, 表现出很大的灵活性.

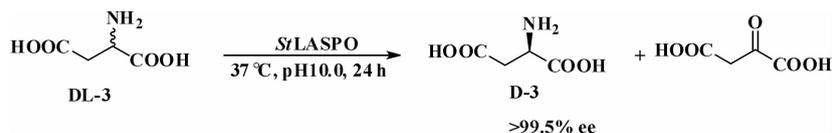
源于 *Trigonopsis variabilis* 和 *Rhodotorula gracilis* 的 DAAO 具有宽的底物谱, 可用于拆分消旋氨基酸合成非天然 L-氨基酸. Dobrovinskaya 等^[12] 以 N^α -Boc-DL-天冬酰胺为原料合成 DL-2,3-二氨基丙酸 (合欢氨基酸, **1**), 以 10% 固定化 *Trigonopsis variabilis* DAAO 催化拆分 DL-**1**, 得到广谱抗生素 Zwittermicin A 的关键手性中间体 L-**1**. 两步反应总收率为 65%, ee 98%. 其中, 3 位氨基不被氧化, 3-氨基-2-羰基丙酸进一步转化为副产物甘氨酸. Seo 等^[13] 在 *E. coli* 中构建了一个由 *Rhodotorula gracilis* DAAO 和 *vitreoscilla* 血红蛋白 (Vhb) 组成的融合蛋白, 纯化得到的融合蛋白酶活性是 DAAO 的 2 倍. 利用融合蛋白/过氧化氢酶体系拆分 500 mmol/L (RS)-3-氟丙氨酸, 得到具有抗菌和抗高血压活性的 (*R*)-**2**, 转化率 52%, ee > 99%.

具有窄底物特异性的 LAAO 如 L-谷氨酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-丙氨酸氧化酶、L-苯丙氨酸氧化酶、L-赖氨酸氧化酶等可用于拆分相应的消旋氨基酸合成 D-氨基酸. Singh 等^[14] 利用 *Aspergillus fumigatus* LAAO 实现了 DL-丙氨酸的完全拆分, DL-苯丙氨酸、DL-酪氨酸不能完全拆分, DL-天



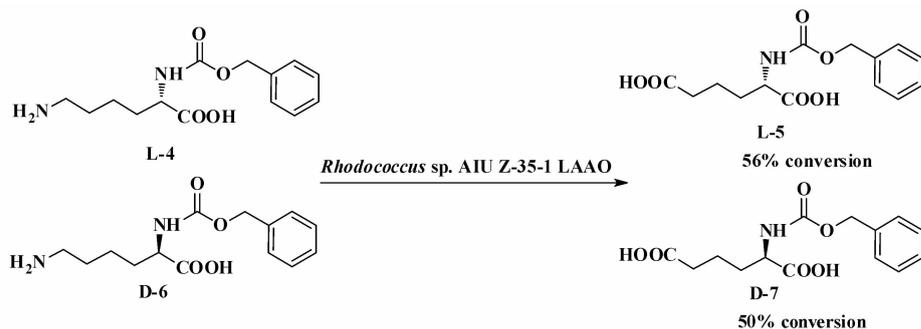
冬氨酸完全不能拆分. Bifulco^[15] 构建了嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* 重组 L-天冬氨酸氧化酶 (*StLASPO*). 该重组酶在高的温度 (80 °C) 和宽的 pH (7.0 ~ 10.0) 范围内表现出高的活性和稳定性, 产

物 D-天冬氨酸 (**3**) 和草酰乙酸对酶的抑制作用微弱. 50 mmol/L DL-天冬氨酸在 24 h 内完全拆分为半合成抗生素阿扑西林的关键中间体 D-天冬氨酸 (**3**) 和草酰乙酸, ee>99.5%.



具有宽底物特异性的 LAAO 存在于 *Rhodococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Alcaligenes* sp. 等微生物中, 可用于大量的具有不同结构的消旋氨基酸动力学拆分合成 D-氨基酸. Geueke 等^[16-18] 发现 *Rhodococcus opacus* DSM 43250 LAAO 具有极宽底物特异性, 能够催化 39 个 L-氨基酸氧化脱氨. 其中碱性、芳香族、脂肪族 L-氨基酸是最好的底物. 与过氧化氢酶的组合体系用于 DL-苯丙氨酸、DL-亮氨酸动力学拆分, D-苯丙氨酸和 D-亮氨酸的 ee 分别为 >99.5% 和 99.2%. Isobe^[19-23] 发现 *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 LAAO 具有宽的底物特异性, 能够催化 32 个 L-氨基酸氧化脱

氨. 利用该酶对氨基的非对映选择性氧化作用, N^α -苄氧羰基-L-赖氨酸 (**4**) 通过 N^α -苄氧羰基-L-2-氨基己酸- δ -半醛中间体转化为 N^α -苄氧羰基-L-2-氨基己二酸 (**5**), N^α -苄氧羰基-D-赖氨酸 (**6**) 也通过 N^α -苄氧羰基-D-2-氨基己酸- δ -半醛中间体转化为 N^α -苄氧羰基-D-2-氨基己二酸 (**7**). 两者可通过苄氧羰基脱除得到新的抗生素和生理活性肽的手性中间体 L-或 D-2-氨基己二酸. 进一步地, 利用该酶催化拆分 DL-瓜氨酸、DL-谷氨酰胺、DL-高丝氨酸和 DL-精氨酸. 在 24 h 内 100 mmol/L 消旋氨基酸完全拆分, 以 100% ee 合成了相应的 D-氨基酸.



我们小组^[24] 筛选到一株产 LAAO 菌株 *Alcaligenes faecalis* 1.1799. 以共表达 LAAO 和过氧化氢酶的整细胞为生物催化剂拆分 DL-丙氨酸、DL-亮氨酸、DL-缬氨酸、DL-蛋氨酸、DL-丝氨酸、DL-天

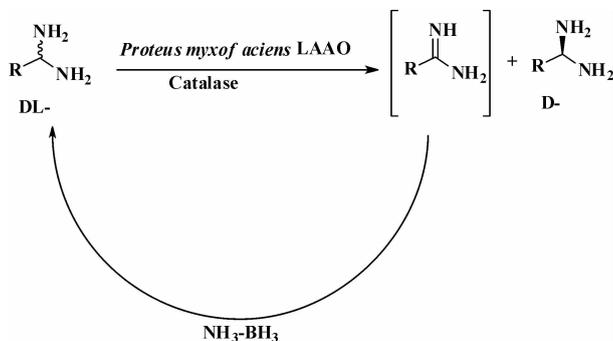
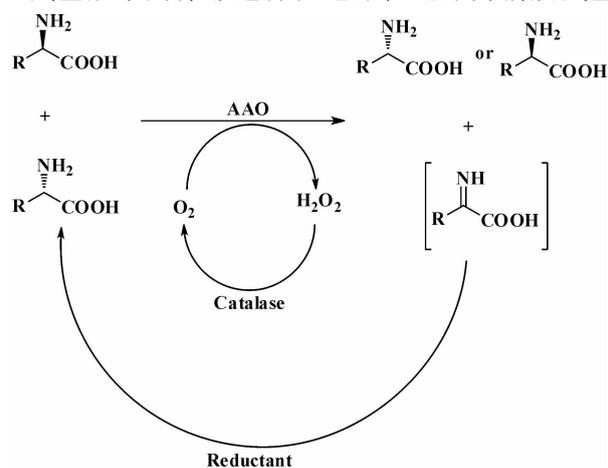
冬氨酸、DL-谷氨酸、DL-苯丙氨酸、DL-酪氨酸、DL-色氨酸、DL-赖氨酸、DL-鸟氨酸等 12 个消旋氨基酸. 所有的消旋氨基酸完全拆分, 相应的 D-氨基酸 ee>99%.

2 AAO 催化消旋氨基酸去消旋化

AAO/过氧化氢酶体系催化消旋氨基酸动力学拆分适合非天然手性氨基酸和 α -酮酸的同时合成, 非天然手性氨基酸的理论收率仅为 50%。为了获得收率大于 50% 的对映纯非天然手性氨基酸, 提出了 AAO/过氧化氢酶/化学还原体系、AAO/过氧化氢酶/氨基酸脱氢酶体系和 AAO/过氧化氢酶/转氨酶体系, 通过消旋氨基酸的去消旋化, 非天然手性氨基酸的理论收率 100%, ee100%。

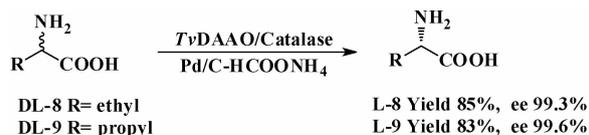
2.1 AAO/过氧化氢酶/化学还原体系

AAO/过氧化氢酶/化学还原体系利用化学还原剂将 AAO 催化消旋氨基酸一个对映体脱氢产生的亚氨基酸中间体非选择性地原位还原为消旋氨基酸



酸, 通过酶氧化-化学还原循环, 实现消旋氨基酸的去消旋化. Turner 小组^[25]对这一反应体系进行了深入研究, 发现氨-硼烷和化学氢转移体系如 Pd/C-HCOONH₄ 比硼氢化钠和氰基硼氢化钠等化学还原剂更适合与 AAO/过氧化氢酶组合用于消旋氨基酸去消旋化.

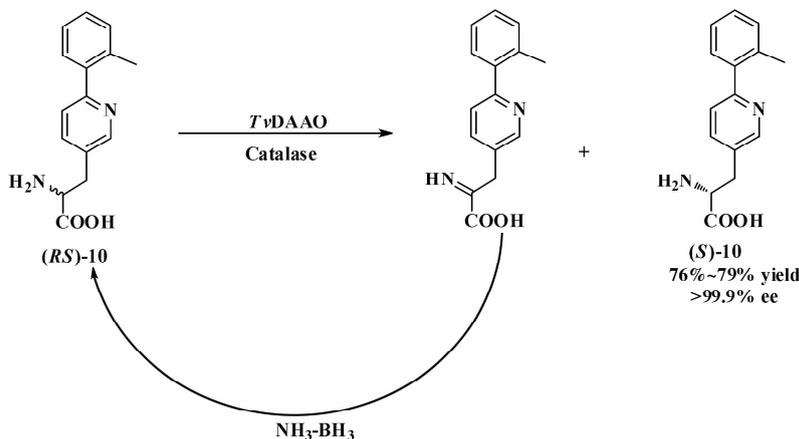
L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸分别是抗癫痫药左乙拉西坦和抗高血压药培哌普利手性中间体. Fotheringham 等^[26]以产重组 DAAO 整细胞和 Pd/C-HCOONH₄ 组合体系催化 100 mmol/L DL-2-氨基丁酸去消旋化, L-2-氨基酸丁酸产率为 95%, ee 99%. 我们小组^[27]采用固定化 TvDAAO/过氧化氢酶/Pd/C-HCOONH₄ 组合体系催化消旋 2-氨基丁酸和 2-氨基戊酸去消旋化, L-2-氨基丁酸(**8**)、L-2-氨基戊酸(**9**)的收率分别为 85% 和 83%, ee 分别为 99.3% 和 99.6%.



Alexandre 等^[28]采用 *Proteus myxofaciens* LAAO/氨-硼烷组合体系催化消旋氨基酸去消旋化, D-氨基酸的收率高达 90%, ee 高达 99%. D-缬氨酸和 D-组氨酸的低 ee 值源于其消旋体拆分不完全.

Substrate	Yield /%	ee /%	Substrate	Yield /%	ee /%
Norvaline	81	>99	<i>O</i> -Benzyl serine	87	93
Norleucine	86	>99	Aminobutyric acid	64	96
Tryptophan	82	>99	Valine	64	28
Phenylalanine	82	>99	Histidine	67	65
Allylglycine	79	>99	Cyclopentylglycine	87	>99
Methionine	90	>99	Tyrosine	79	>99

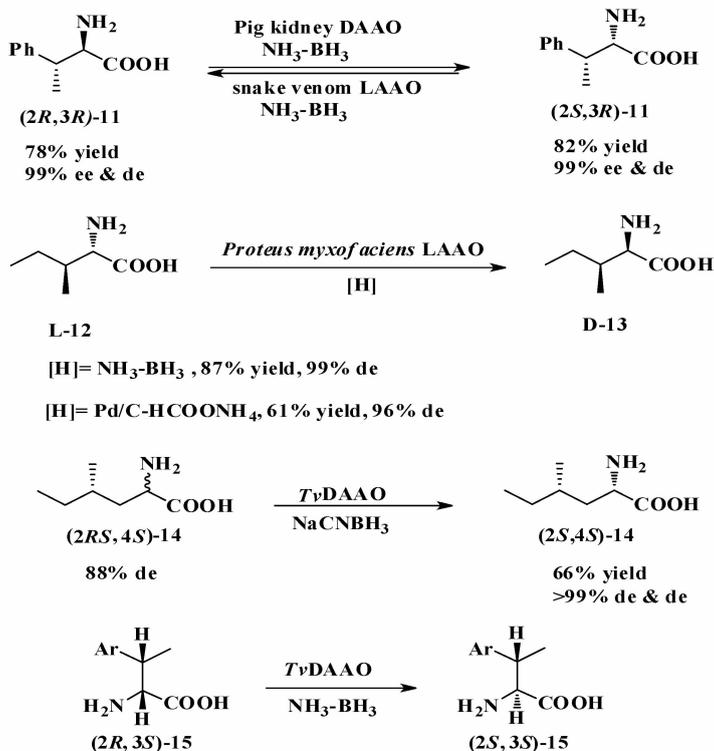
(*S*)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸(**10**)是抗 II 型糖尿病的类型高血糖素肽-1 (GLP-1)类似物或 GLP-1 受体调节剂的关键手性中间体. Chen 等^[29]利用硅藻土固定化的重组 *TvDAAO* 和氨-硼烷(10 当量)组合体系,在 pH 6.0~7.0 的磷



手性 β -和 γ -取代 α -氨基酸也是多肽模拟物和酶抑制剂的重要砌块. Turner 小组^[30]将 AAO/过氧化氢酶/化学还原体系扩展至含多个手性中心 α -氨基酸的去消旋化. 在所有这些转化中,除了 α -氨基所在手性中心立体反转外,其他手性中心不受影响. 利用猪肾 D-AAO/氨-硼烷、蛇毒 LAAO/氨-硼烷实现了 (2*R*,3*R*)-和 (2*S*,3*R*)- β -甲基苯丙氨酸(**11**)的相互转化. 利用 *Proteus myxofaciens* LAAO/

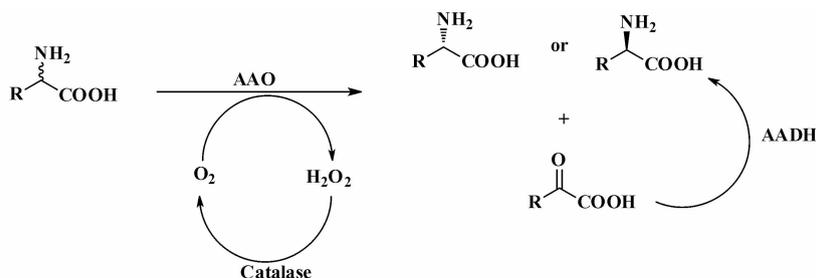
酸盐缓冲液中催化消旋体中 (*R*)-对映体的氧化和亚胺原位还原,实现 (*RS*)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸的去消旋化, (*S*)-对映体(**10**)产率为 76%~79%, ee>99.9%.

氨-硼烷以及 *Proteus myxofaciens* LAAO/ Pd/C-HCOONH₄ 体系, L-异亮氨酸(**12**)以高的产率和 ee/de 转化为 D-别异亮氨酸(**13**). 采用 *TvDAAO* 和氰基硼氢化钠体系, (2*RS*,4*S*)-4-甲基-2-氨基己酸转化为 (2*S*,4*S*)-4-甲基-2-氨基己酸(**14**). 进一步地,采用 *TvDAAO* 和/氨-硼烷组合体系以 68%~92% 收率和 >98% ee 将 (2*R*,3*S*)- β -甲基- β -芳基丙氨酸 (2*S*,3*S*)- β -甲基- β -芳基丙氨酸(**15**)^[31].

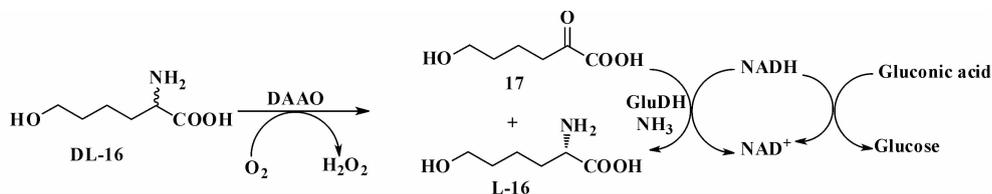


2.2 AAO/过氧化氢酶/氨基酸脱氢酶体系

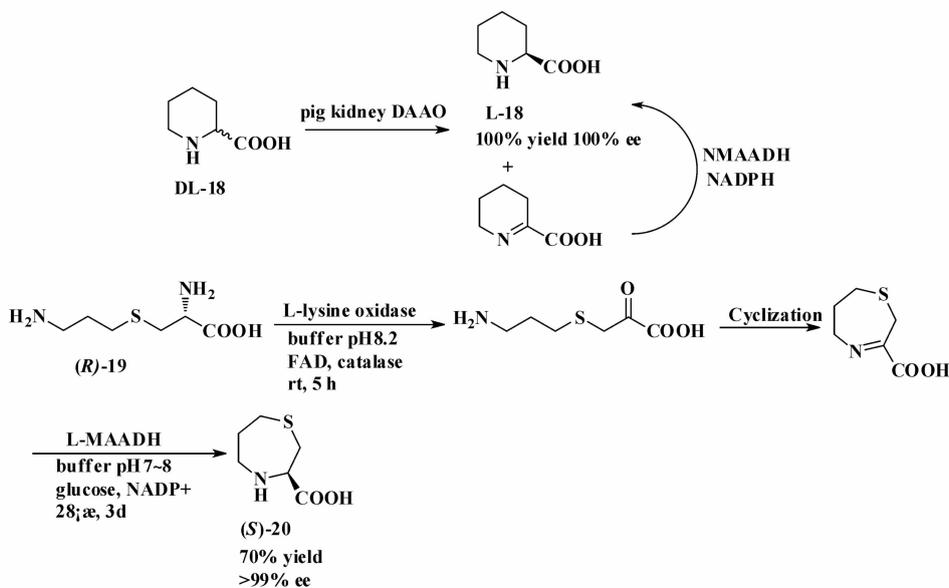
在AAO/过氧化氢酶/氨基酸脱氢酶体系中, AAO催化消旋氨基酸的一个对映体氧化脱氨为 α -酮酸. α -酮酸利用与AAO具有相反对映选择性的氨基酸脱氢酶(amino acid dehydrogenase, AADH)原



Hanson等^[32]提出了一个独特的DAAO和L-谷氨酸脱氢酶体系用于合成抗高血压药物奥马曲拉(Omapatrilat)手性砌块L-6-羟基正亮氨酸(**16**). 反应分两步进行, 第一步, 利用DAAO和过氧化氢酶(猪肾DAAO/牛肝过氧化氢酶或共表达两种酶的



Yasuda等^[33]采用猪肾DAAO/重组N-甲基-L-氨基酸脱氢酶(NMAADH, *Pseudomonas putida* ATCC12633)体系从DL-哌啶-2-羧酸合成L-哌啶-2-羧酸(**18**), 收率和ee均为100%. L-脂环氨基酸亦是很多手性药物的中间体. 以L-赖氨酸氧化酶催化



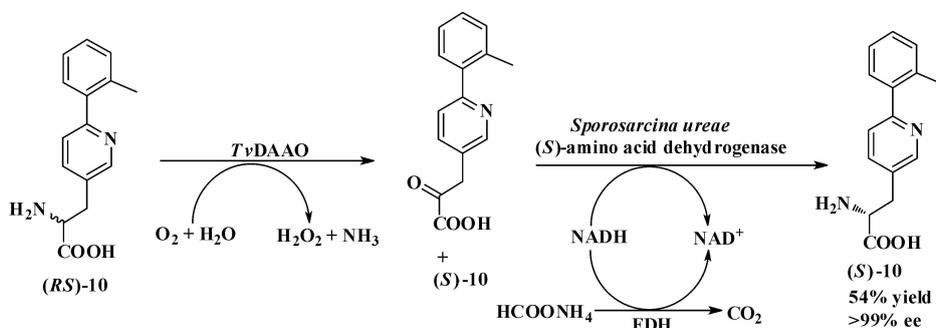
位还原氨化为非天然手性氨基酸. 氨基酸脱氢酶所需的辅因子NADH或NADPH采用甲酸脱氢酶/甲酸铵或葡萄糖脱氢酶/葡萄糖再生. 由于D-氨基酸脱氢酶缺乏, 主要集中于采用DAAO/LAADH体系合成非天然L-氨基酸.

Trigonopsis variabilis 整细胞)产生**16**和2-酮-6-羟基己酸(**17**). 第二步, L-谷氨酸脱氢酶催化**17**还原氨化为**16**. 产物浓度达100 g/L规模, 总产率97%, ee>98%.

(R)-2-氨基-3-(3-氨基-丙硫基)丙酸(**19**)氧化脱氨形成相应的 α -酮氨基酸. α -酮氨基酸原位自动关环为稳定的脂环亚氨基酸. 然后利用重组NMAADH将脂环亚氨基酸原位还原为L-[1,4]-噻嗪环庚烷-3-羧酸(**20**), 收率70%, ee>99%.

Chen 等^[29] 采用重组 *Trigonopsis variabilis* DAAO/*Sporosarcina ureae* (S)-AADH 体系, 实现了 (RS)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸

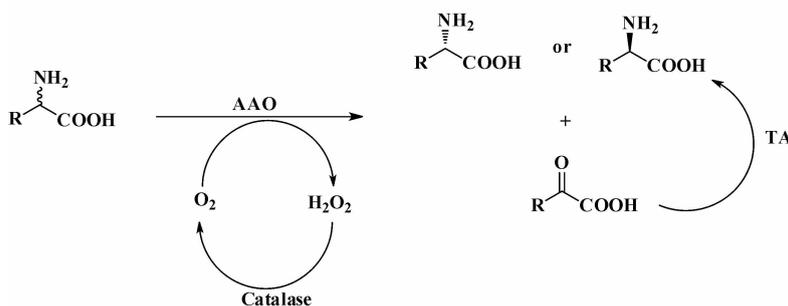
的去消旋化. (S)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸(**10**)收率和 ee 分别为 54% 和 >99%.



2.3 AAO/过氧化氢酶/转氨酶体系

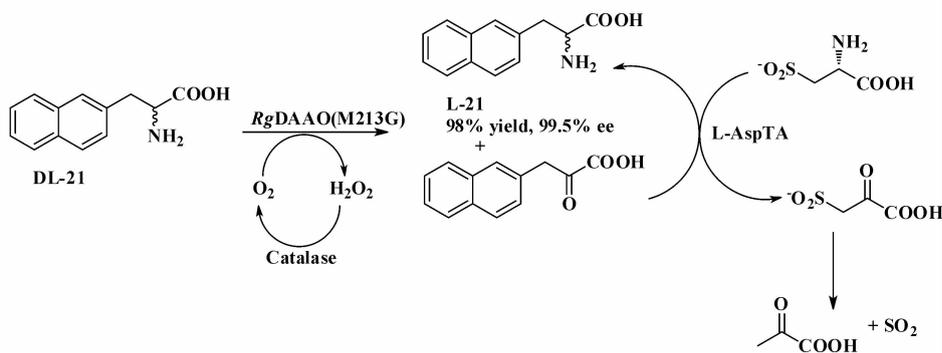
在 AAO/过氧化氢酶/转氨酶体系中, AAO 催化消旋氨基酸的一个对映体氧化脱氨为 α -酮酸. 利

用与 AAO 具有相反对映选择性的转氨酶 (transaminase, TA) 和氨授体, 通过转氨化将作为氨授体的 α -酮酸原位转化为非天然手性氨基酸.



L-2-萘丙氨酸(**21**)是治疗子宫内膜异位症、子宫肌瘤和多毛症药物那法瑞林的手性砌块. Caligiuri 等^[34-35] 组合通过单点突变产生的 *Rhodotorula*

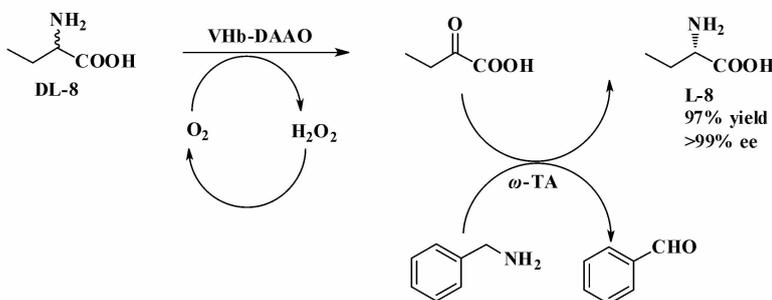
gracilis DAAO 突变酶 M213G 和大肠杆菌 L-天冬氨酸转氨酶催化 DL-2-萘丙氨酸去消旋化, L-2-萘丙氨酸(**21**)产率为 98%, ee 99.5%.



Seo 等^[36] 提出了一个由 *Rhodotorula gracilis* DAAO 和 *vitreoscilla* 血红蛋白 (VHb) 组成的融合蛋白. 利用融合蛋白和重组 *Vibrio fluvialis* JS17 ω -转氨酶体系, D-AAO 催化 DL-2-氨基丁酸中的 D-对映

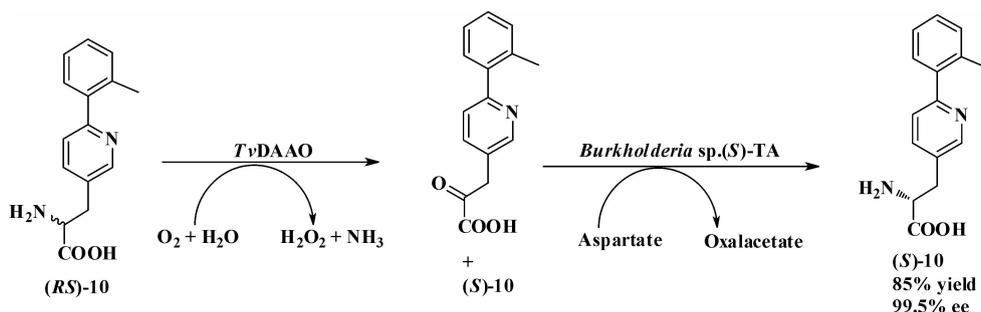
体氧化为相应的 2-丁酮酸, ω -转氨酶催化氨授体苯乙胺的氨基转移至作为氨授体的 2-丁酮酸. 在异辛烷/磷酸盐缓冲液 (1 : 1, V/V) 两相体系中, 500 mmol/L 底物转化为 485 mmol/L L-氨基丁酸 (**8**),

收率 97% , ee>99% .



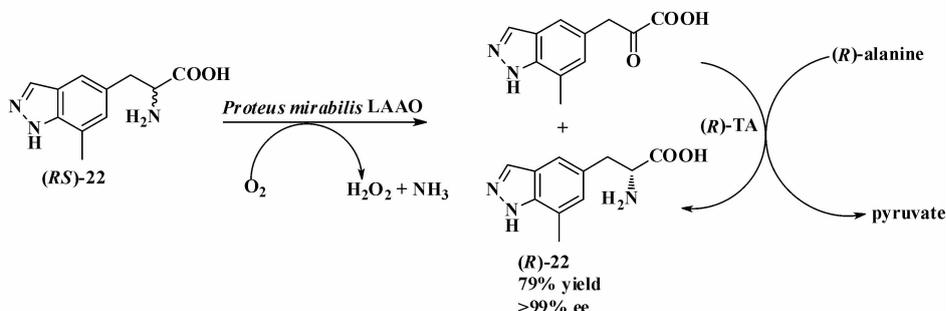
Chen 等^[29] 采用重组 *Trigonopsis variabilis* DAAO/*Burkholderia* sp. (S)-TA 体系, 实现了(*RS*)-氨基-3-[3-(6-(2-甲基苯基))吡啶基]-丙酸的去消

旋化. (*S*)-氨基-3-[3-(6-(2-甲基苯基))吡啶基]-丙酸(**10**) 收率和 ee 分别为 85% 和 99.5% .



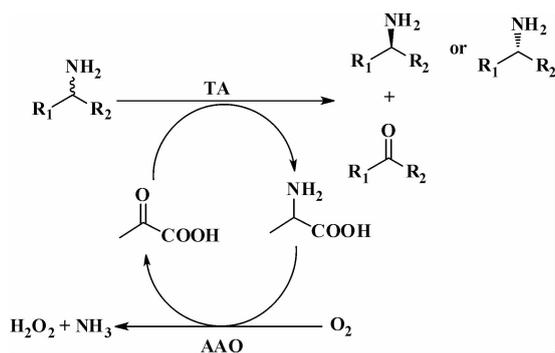
(*R*)-2-氨基-3-(7-甲基-1*H*-吡唑-5-基)丙酸(**22**)是合成治疗偏头痛的降钙素基因相关受体拮抗剂的关键中间体. Hanson 等^[37] 组合重组 *Proteus*

mirabilis LAAO 和市售(*R*)-转氨酶, 以(*R*)-丙氨酸为氨授体, 以 79% 的分离收率和>99% ee 制备了(*R*)-**22**.



Truppo 等^[38] 提出一个独特的 TA/AAO 体系用于手性胺拆分. TA 催化消旋胺动力学拆分为手性胺和酮, 作为氨受体的酮酸如丙酮酸协同氨化为丙氨酸. AAO 在分子氧作用下, 催化丙氨酸氧化脱氨, 原位再生出氨受体丙酮酸. 在这个反应体系中, 丙酮酸只需催化量, 消旋胺和丙酮酸的摩尔比仅为 1 000 : 1, 显著减少了丙酮酸对 TA 的抑制作用. 由于 AAO 提供了一个不可逆反应步骤, 克服了

对转氨化不利的反应平衡. 采用(*R*)-转氨酶 ATA117/DAAO、(*S*)-转氨酶 ATA113/LAAO 体系, 以 2 mmol/L 丙酮酸为氨受体, 25 mmol/L 消旋胺以 50% 转化率和大于 99% ee 获得完全拆分. 消旋 2-氨基苯丙胺和 2-氨基苯丁胺由于空间位阻, 未能利用(*R*)-转氨酶 ATA117/DAAO 体系获得相应的(*S*)-胺.



Substrate	(<i>R</i>)-amine	(<i>S</i>)-amine
	>99% ee (ATA113)	>99% ee (ATA117)
	>99% ee (ATA113)	>99% ee (ATA117)
	>99% ee (ATA113)	>99% ee (ATA117)
	>99% ee (ATA113)	>99% ee (ATA117)
	>99% ee (ATA113)	-
	>99% ee (ATA113)	-

3 展望

非天然手性氨基酸是已经上市和正在研发的手性药物、手性农药和其他工业化学品的重要中间体。D-氨基酸氧化酶和L-氨基酸氧化酶具有高度的对映选择性和对映互补性，与化学还原剂或其他酶如氨基酸脱氢酶或转氨酶的组合是灵活有效的消旋氨基酸去消旋化反应体系，能够有效提高非天然手性氨基酸的合成收率。目前对基于氨基酸氧化酶的催化反应进行了大量研究，但除了固定化重组D-氨基酸氧化酶用于半合成头孢菌素母核-7-氨基头孢烷酸的双酶法规模化生产外，其他基于氨基酸氧化酶的生物催化过程尚未用于非天然手性氨基酸的大规模合成，原因在于氨基酸氧化酶缺乏工业应用需

要的宽底物特异性、高酶活性和成本竞争力。未来的发展方向是利用生物信息学中的基因挖掘技术从自然界中发现更多的具有独特催化性能的氨基酸氧化酶，通过对氨基酸氧化酶结构-催化性能研究，利用蛋白质工程技术、定向进化技术和基因重组技术，创造具有宽底物谱、高活性和高稳定性的氨基酸氧化酶催化剂，建立基于氨基酸氧化酶的高效生物催化过程，实现非天然手性氨基酸的绿色规模化生产。

参考文献：

- [1] Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez A I, Rodríguez-Vico F, *et al.* Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview[J]. *Chem Biodiv*, 2010, 7(6): 1531-1548.

- [2] a. Patel R N. Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals[J]. *Biomol*, 2013, **3**(4): 741-777.
- b. Xu Hong-mei, He Cong-lin, Xiong Wen-juan, *et al.* preparation of (R)-o-chloromandelic acid via dynamic kinetic resolution of o-chloromandelonitrile by whole cells of *alcaligenes faecalis* CGMCC1.2006 [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(2): 174-181.
- c. Xu Hong-mei, He Cong-lin, Xia Shi-wen. Racemization of L-Tyrosine methyl ester and preparation of o-Tyrosine via alcalase 2.4L-catalyzed enantioselective hydrolysis[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(3): 212-217.
- [3] Dijkman WP, Gonzalo G de, Mattevi A *et al.* Flavoprotein oxidases: classification and applications [J]. *Appl Micro Biotech*, 2013, **97**(12): 5177-5188.
- [4] Yu Z L Qiao H. Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2012, **167**(1): 1-13.
- [5] Pollegioni L, Motta P, Molla G. L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? [J]. *Appl Micro Biotech*, 2013, **97**(21): 9323-9341.
- [6] Hossain G S, Li J H, Shin H D *et al.* L-Amino acid oxidases from microbial sources: types, properties, functions, and applications [J]. *Appl Micro Biotech*, 2014, **98**(4): 1507-1515.
- [7] Guo Jiao-jie(郭皎洁), Xue Yong-chang(薛永常), Xu Shu-jing(徐书景), *et al.* D-amino Acid Oxidase: Update and Review(D-氨基酸氧化酶研究进展)[J]. *Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2010, **30**(11): 106-111.
- [8] Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, *et al.* Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives[J]. *Appl Micro Biotech*, 2008, **78**(1): 1-16.
- [9] Pollegioni L, Molla G. New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases[J]. *Tre Biotech*, 2011, **29**(6): 276-283.
- [10] Servi S, Tessaro D, Pedrocchi-Fantoni G. Chemo-enzymatic deracemization methods for the preparation of enantiopure non-natural α -amino acids[J]. *Coord Chem Rev*, 2008, **252**: 715-726.
- [11] Turner N J. Enantioselective oxidation of C-O and C-N bonds using oxidases [J]. *Chem Rev*, 2011, **111**(7): 4073-4087.
- [12] Dobrovinskaya N A, Archer I, Hulme A N. Chemoenzymatic and chemical routes to the nonproteinaceous amino acid albizziine and its amide derivative [J]. *Synlett*, 2008, **4**: 513-516.
- [13] Seo Y M, Khang Y H, Yun H, *et al.* Kinetic resolution of 3-fluoroalanine using a fusion protein of a D-amino acid oxidase with *Vitroschilla* hemoglobin [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2011, **75**(4): 820-822.
- [14] Singh S, Gogoi B K, Bezbaruah R L, *et al.* Racemic resolution of some DL-amino acids using *Aspergillus fumigatus* L-amino acid oxidase [J]. *Curr Micro*, 2011, **63**(1): 94-99.
- [15] Bifulco D, Pollegioni L, Tessaro D, *et al.* A thermostable L-aspartate oxidase: a new tool for biotechnological applications [J]. *Appl Micro Biotech*, 2013, **97**(16): 7285-7295.
- [16] Geueke B, Hummel W. A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization [J]. *Enz Micro Technol*, 2002, **31**(1): 77-87.
- [17] Geueke B, Hummel W. Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans* [J]. *Prot Expr Pur*, 2003, **28**: 303-309.
- [18] Faust A, Niefind K, Hummel W, *et al.* The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation [J]. *J Mol Biol*, 2007, **367**(1): 234-248.
- [19] Isobe K, Tokuta K, Narita Y S, *et al.* Production of N^α -benzyloxycarbonyl-L-aminoadipic acid and N^α -benzyloxy carbonyl-D-aminoadipic acid with *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2004, **32**(1/2): 27-32.
- [20] Isobe K, Nagasawa S. Characterization of N^α -benzyloxycarbonyl-L-lysine oxidizing enzyme from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, **104**(3): 218-223.
- [21] Isobe K, Fukuda N, Nagasawa S, *et al.* Enzymes responsible for the conversion of N^α -[(benzyloxy) carbonyl]-D-lysine to N^α -[(benzyloxy) carbonyl]-D-aminoadipic acid by *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 [J]. *Chem Biod*, 2010, **7**: 1549-1554.
- [22] Isobe K, Tamauchi H, Fuhshuku K I, *et al.* A simple enzymatic method for production of a wide variety of D-amino acids using L-amino acid oxidase from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 [J]. *Enzy Res*, 1-6.
- [23] Isobe K, Satou S, Matsumoto E, *et al.* Characterization and application of a L-specific amino acid oxidase from *Rhodococcus* sp. AIU LAB-3 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, **115**(6): 613-617.

- [24] Xia Shi-wen(夏仕文), Fang Guang-lan(方国兰), He Cong-lin(何从林) *et al.* A biocatalytic deracemization method of DL-amino acid for the preparation of D-amino acids(一种通过 DL-氨基酸去消旋化制备 D-氨基酸的生物催化方法)[P]. *Faming Zhuanli*(发明专利), ZL 201210049258.1, 2014-07-09.
- [25] Turner N J. Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8**(2): 114-119.
- [26] Fotheringham I, Archer I, Carr R, *et al.* Preparative deracemization of unnatural amino acids [J], *Biochem Soc Trans*, 2006, **34**: 287-290.
- [27] Xu Hong-mei(徐红梅), He Cong-lin(何从林), Xia Shi-wen(夏仕文). Preparation of non-natural L-amino acids *via* deracemization of DL-amino acids catalyzed by immobilized D-amino acid oxidase(固定化 D-氨基酸氧化酶催化 DL-氨基酸去消旋化制备非天然 L-氨基酸) [J]. *J Mol Catal(Chin)*(分子催化), 2012, **26**: 192-196.
- [28] Alexandre F R, Pantaleone D P, Taylor P P, *et al.* Amine-boranes: effective reducing agents for the deracemisation of DL-amino acids using L-amino acid oxidase from *Proteus myxofaciens* [J]. *Tetra Lett*, 2002, **43**: 707-710.
- [29] Chen Y, Goldberg S L, Hanson R L, *et al.* Enzymatic preparation of an (*S*)-amino acid from a racemic acid [J], *Org Proc Res & Dev*, 2011, **15**: 241-248.
- [30] Enright A, Alexandre F R, Roff G J, *et al.* Stereo-inversion of β - and γ -substituted α -amino acids using a chemo-enzymatic oxidation-reduction procedure [J]. *Chem Comm*, 2003, **39**: 2636-2637.
- [31] Roff G J, Lloyd R C, Turner N J. A versatile chemo-enzymatic route to enantiomerically pure β -branched α -amino acids [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 4098-4099.
- [32] Hanson R L, Schwinden M D, Banerjee A, *et al.* Enzymatic synthesis of 1-6-hydroxynorleucine [J]. *Bioorg Med Chem*, 1999, **7**: 2247-2252.
- [33] Yasuda M, Ueda M, Muramatsu H, *et al.* Enzymatic synthesis of cyclic amino acids by N-methyl-L-amino acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida* [J]. *Tetra: Asy*, 2006, **17**: 1775-1779.
- [34] Caligiuri A, D'Arrigo P, Rosini E, *et al.* Enzymatic conversion of unnatural amino acids by yeast D-Amino acid oxidase [J]. *Adv Synth Catal*, 2006, **348**(15): 2183-2190.
- [35] Caligiuri A, D'arrigo P, Gefflaut T, *et al.* Multistep enzyme catalysed deracemisation of 2-naphthylalanine [J]. *Biocat Biotrans*, 2006, **24**(6): 409-413.
- [36] Seo Y M, Mathew S, Bea H S, *et al.* Deracemization of unnatural amino acid: homoalanine using D-amino acid oxidase and ω -transaminase [J]. *Org Biomol Chem*, 2012, **10**: 2482-2485.
- [37] Hanson R L, Davis B L, Goldberg S L, *et al.* Enzymatic preparation of a D-amino acid from a racemic amino acid or keto acid [J]. *Org Pro Res Dev*, 2008, **12**(6): 1119-1129.
- [38] Truppo M D, Turner N J, Rozzell J D. Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase [J]. *Chem Comm*, 2009, **16**: 2127-2129.