

定点突变提高枯草芽孢杆菌 L-天冬酰胺酶的活力及稳定性

张 显^{1,2}, 龙水清^{1,2}, 饶志明^{*1,2,3}, 杨套伟^{1,2}, 徐美娟^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 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. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-天冬酰胺酶可以催化 L-天冬酰胺转化为 L-天冬氨酸和氨。它可以通过降解食品原料中的 L-天冬酰胺而降低高温烹制食品中丙烯酰胺的含量。由于食品预处理环境的复杂性, 只有具有高酶活且稳定的酶才能满足食品生产中的应用。作者通过点突变提高来源于 *Bacillus subtilis* B11-06 的 L-天冬酰胺酶(BsAII)的酶活和热稳定性。通过序列比对和同源模拟选择 5 个点进行突变, 构建 6 个突变菌株。酶活测定结果表明, 突变体酶 S299N_{BSAII} 和 P348A_{BSAII} 的酶活较 BsAII 分别提高 28% 和 32%。其中 P348A_{BSAII} 的热稳定性和 pH 稳定性较 BsAII 均有明显提高。本研究表明, 第 299 和 348 位氨基酸残基对酶的催化作用有较大影响, 对该酶的催化机理的研究提供了一定的基础, 并提高了该酶的工业应用潜力。

关键词: L-天冬酰胺酶; 定点突变; 热稳定性; pH 稳定性

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)11—1128—07

Improving the Activity and Stability of L-Asparaginase from *Bacillus subtilis* by Site-Directed Mutagenesis

ZHANG Xian^{1,2}, LONG Shuiqing^{1,2}, RAO Zhiming^{*1,2,3}, YANG Taowei^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-Asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia, which can hydrolyze free L-Asn to aspartic acid and decrease acrylamide formation during food processing. In order to meet the high requirements and complicated procedures of food processing, the activity and stability of L-Asparaginase need to be improved. In this study, we successfully improved the enzyme activity and stability of L-asparaginase (BsAII) from *Bacillus subtilis* B11-06

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500065); 国家 863 计划项目(SS2015AA021004); 中国博士后科学基金资助项目(2015M570407); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP11545); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF201406)。

作者简介: 张 显(1986—), 男, 江苏徐州人, 工学博士, 讲师, 主要从事微生物代谢工程和生物催化开发方面的研究。

E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事应用微生物与代谢工程方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

by site-directed mutagenesis. Five residues of BsAII were selected and used to construct the mutants by sequence alignment and homology modeling. The enzyme activity assays showed that the enzyme activity of S299N_{ansz} and P348A_{ansz} were increased by 28% and 32%, respectively, as compared to the BsAII. The thermal stability and pH stability of P348A_{ansz} were significantly improved compared to that of BsAII. This study showed that residues 299 and 348 in amino acid sequence of BsAII had a great influence on the catalytic action, which provided a basis for the study of the catalytic mechanism of the enzyme, and extended the application in food industry.

Keywords: L-asparaginase, site-directed mutagenesis, thermal stability, pH stability

L-天冬酰胺酶 II (L-Asparaginase II, EC 3.5.1.1) 可以催化 L-天冬酰胺脱氨基转化成 L-天冬氨酸和氨,该酶具有抗肿瘤活性,已被应用于治疗急性淋巴细胞白血病及霍金森病等。最新报道该酶也可用于减少高温制作食品中丙烯酰胺的生成。近年来,丙烯酰胺由于对人体潜在的致癌作用而引起人们的关注^[1-2]。丙烯酰胺在高温烘烤及油炸食品中含量较高,它主要是由天冬酰胺和还原糖通过美拉德反应生成。美拉德反应是一种普遍的非酶褐变现象,是油炸及烘烤食品色味的主要形成途径^[3]。研究表明,L-天冬酰胺酶通过将天冬酰胺转化成天冬氨酸,有效降低食品中丙烯酰胺的含量而影响其色味的形成^[4-5]。

目前,由 *Aspergillus oryzae* 和 *Aspergillus niger* 所产的 L-天冬酰胺酶由于其优良特性已被人们普遍接受,如在 pH 6.0~7.0、60 ℃ 条件下有较高的酶活^[6-7]。但是由于高温、强酸碱、高盐、溶剂毒性等复杂的食品预处理环境,只有高酶活、耐高温、耐酸碱的天冬酰胺酶才具有较高的应用价值。

作者所在实验室在前期研究工作中将来源于枯草芽孢杆菌中的 L-天冬酰胺酶 II (BsAII) 基因通过表达质粒载体 pMA5 在 *Bacillus subtilis* 168 中实现过量表达,经发酵优化后在 5 L 发酵罐中酶活达到 89.48 U/mL。Gilbert 将来源于 *Erwinia chrysanthemi* 中的天冬酰胺酶基因在 *E. coli* 和 *Erwinia carotovora* 中实现重组表达酶活分别为 49、20.2 U/mL^[8-9]。Hatanaka 等克隆来源于 *Streptomyces* 中的天冬酰胺酶基因并在 *E. coli* 中实现重组表达,酶活达到 23.02 U/mL。因此与其它研究相比,作者所在实验室的重组菌所产 L-天冬酰胺酶具有更高的酶活,并且枯草芽孢杆菌为 GRAS 菌株,已被广泛应用于食品发酵行业,其安全性已得到广泛认

可^[10]。但是与已经工业化的 L-天冬酰胺酶相比,本研究得到的 L-天冬酰胺酶 II 的酶活和热稳定性还有待提高。

蛋白质工程是用于克服天然酶在工业应用过程中缺陷的重要手段,通常改造蛋白质的策略主要包括定点突变、定向进化等^[11]。II 型 L-天冬酰胺酶属于同源四聚体,相邻两个单体形成两个活性中心区域^[12]。每个催化中心由一个单体的 C 端区域与相邻单体的 N 端区域形成^[13]。虽然每个“二聚体”都有两个活性中心区域,但只有具有四聚体结构的酶才有酶活^[14]。由此,我们推断在该蛋白三维结构中距离酶催化活性中心区域较近的氨基酸残基对酶的稳定性和酶活可能具有重要的影响。近年来,研究者已经对 L-天冬酰胺酶的催化机理进行了深入的研究,通过分析不同来源的 L-天冬酰胺酶的晶体结构并结合点突变研究明确了该酶的催化活性中心位点。例如来源于 *E. coli* 的天冬酰胺酶的活性位点分别为:T12、Y25、S58、T89、D90、K162^[14-17]。通过序列比对发现,不同来源的 L-天冬酰胺酶的活性位点高度保守。因此,我们决定采用定点突变手段改造 L-天冬酰胺酶 II 来提高其酶活和热稳定性,以提高其工业应用价值。采用序列比对和同源模拟来选择突变位点,试验结果表明,突变体酶 S299N_{ansz} 和 P348A_{ansz} 的酶活和稳定性较原始酶都有所提高。

1 材料与方法

1.1 材料

pMA5 载体,大肠杆菌 JM109、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168:作者所在实验室保存。BamHI、MluI 等限制性内切酶,T4 DNA 连接酶等:购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒等:购自 Generay 公司;其余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 定点突变和重组质粒的构建 以实验室已构建的重组质粒 pMA5-*ansz* 为模板,设计两条相互有重叠部分的含突变点的引物,见表 1,利用突变引物通过重叠延伸 PCR 引进突变点^[18]。

表 1 基因克隆及定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis and gene cloning

引物名称	引物核苷酸 (5'-3')
PF: <i>ansz</i>	cgggatccatgaaaaaacgaatgct (<i>Bam</i> HI)
PR: <i>ansz</i>	cgacgcgttaataactcattgaaataag (<i>Mlu</i> I)
PF: G177A	agccatcagcgcgtgatgcgccttctaa
PR: G177A	gcacacagcgcgtgatgcgtgtggaaggtct
PF: P178A	atcagcgcgtgatgggcttctaacct
PR: P178A	ccccatcagcgcgtgatggctgtggaa
PF: P348A	atcgaaactcttaaacgccccaaaagca
PR: P348A	cgtttaaagagttcgtatgccagcaagt
PF: S299N	gcccgttctgggaacgggaattatctgatgcag
PR: S299N	ttcccgttcccagaaccggcaataacaatcccctt
PF: D334G	cgtcacaccaaaccaaggctatgcggaaaaggac
PR: D334G	ccttgggttggtgtgacgacacatttcccggtgc
PF: D334E	tcgtcacaccaaaccaagagtatgcggaaaagg
PR: D334E	ctcttgggttggtgtgacgacacatttcccggtg

注:引物 PF:*ansz* 及 PR:*ansz* 为基因 *ansz* 上下游引物,其余引物用来引入相应的突变位点,核苷酸序列中斜体加粗碱基表示引入的突变碱基。

将相应的重叠延伸 PCR 产物及大肠-枯草穿梭质粒 pMA5 用 *Bam*HI、*Mlu*I 进行双酶切,连接产物转入感受态大肠杆菌 JM109 中,挑单克隆提质粒,并将质粒送往上海生工进行测序。经测序后,将正确突变质粒利用化学法转入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 感受态细胞中进行表达^[19]。

1.2.2 L-天冬酰胺酶的表达和纯化 将重组菌接种至含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基中,培养温度 37 $^{\circ}$ C,摇床转速为 160 r/min,培养 24 h,离心收集菌体,上清液作为胞外粗酶液,菌体破碎液为胞内粗酶液,粗酶液可以用于酶活测定、SDS-PAGE 分析或者-20 $^{\circ}$ C 保藏。酶的纯化采用文献[20]所述方法。

1.2.3 L-天冬酰胺酶酶活的测定 L-天冬酰胺酶酶活测定采用奈斯勒试剂法^[12]。酶促反应体系 1 mL:400 μ L 50 mmol/L L-Asn、400 μ L 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl、100 μ L 适当稀释酶液,在 40 $^{\circ}$ C 水

浴中反应 15 min,加入 100 μ L 15 g/dL 三氯乙酸终止反应,对照管在水浴反应之前加入 100 μ L 15 g/dL 三氯乙酸。反应终止后在 20 000 r/min 条件下离心 10 min,取 200 μ L 上清液加入到 4.8 mL 去离子水中,加入 200 μ L 奈斯勒试剂,利用分光光度计测定 450 nm 下的吸光度。酶活单位:在酶反应条件下,单位时间内产生 1 μ mol/L NH_3 所需的酶量为 1 个酶活单位。蛋白质浓度采用 Bradford 法测定^[21]。

1.2.4 最适温度及温度稳定性 在 pH 7.5 条件下,将纯酶液添加到反应体系中,将反应体系分别置于 20、30、35、40、50、60 $^{\circ}$ C 下反应 15 min,反应结束后测定酶活,分析不同反应温度对重组 L-天冬酰胺酶催化反应的影响,获得此酶的最适反应温度。将纯酶液分别放置在 30、40、50、60 $^{\circ}$ C 水浴锅中,每隔一段时间取样,测定酶活,考察重组酶在不同温度下的稳定性。

1.2.5 最适 pH 及 pH 稳定性 将纯酶液分别加入到不同 pH 缓冲液中(pH 4.0~6.0, 0.05 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH 6.0~7.0, 0.05 mmol/L 磷酸盐缓冲液;pH 7.0~9.0, 0.05 mmol/L Tris-HCl 缓冲液;pH 9.0~10.0, 0.05 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液)于 40 $^{\circ}$ C 反应 15 min,奈斯勒试剂测定酶活,考察不同 pH 缓冲液对重组 L-天冬酰胺酶催化反应的影响,获得重组酶的最适反应 pH。将纯酶液加入到 pH 6.0~10.0 的缓冲液中,在 4 $^{\circ}$ C 下放置 12 h,测剩余酶活,考察重组酶在不同 pH 下的稳定性。

1.2.6 动力学参数测定 配制不同浓度的 L-Asn 溶液,加入过量的纯酶液,反应体系置于最适条件下反应,通过奈斯勒试剂测定产物氨的增加量,通过 Lineweaver-Burk 作图法计算获得的 K_m 和 k_{cat} 值。

1.2.7 三维结构模拟及分析 将 BsAII 的氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL 服务器得到其三维结构。利用 ClustalW2 软件进行序列比对。利用 PYMOL 软件分析氨基酸残基间氢键相互作用。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的选择

将 BsAII 的氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL 服务器,以其序列相似度达到 59.75%的同源四聚体蛋白(PDB id:1jsr,分辨率为 1.70 $\text{\AA}$)为模板得到其三维结构模型,见图 1。Chou-Fasman 根据各个氨

基酸在一些已知结构的蛋白中的表现,按构象参数由大到小分组,总结出 Gly 和 Pro 是 α -螺旋的强破坏者,而 Ala 是 α -螺旋的强形成者^[22]。Gly 由于侧链太小,构象不稳定,而 Pro 由于其亚氨基少一个氢原子,无法形成氢键,也是 α -螺旋的强破坏者。与 Gly 相比,Ala 能够在折叠时包埋更大的极性区域,以及其更低的折叠熵,因而能够稳定 α -螺旋;与 Pro 相比,Ala 由于侧链较小,不会增加蛋白骨架的构象变化,从而稳定 α -螺旋^[23]。因此我们根据同源模拟结果选择位于 α -螺旋区域且距离活性中心较近的 Gly 和 Pro 将其突变为 Ala,分别构建突变菌株 G177A、P178A、P348A。

近年来,许多研究者已经对 L-天冬酰胺酶的催化机理进行了深入的研究,活性位点较为明确,因此我们选择几个活性较高的 L-天冬酰胺酶的氨基酸序列与 BsAII 进行序列对比,结果见图 2。图 2 黑色框中的氨基酸残基为活性中心位点,在 BsAII 中为 T61、Y75、S108、T141、D142、K214、S299、D334。通过序列比对我们发现除了第 299 与 334 位外,其

余活性中心位点在不同来源的 L-天冬酰胺酶氨基酸序列中非常保守。鉴于其它三个来源的 L-天冬酰胺酶活性较高,因此我们把 BsAII 的第 299 和 334 位氨基酸残基突变成相应的氨基酸残基,分别构建突变菌株:S299N、D334E、D334G。

●代表活性中心位点,●代表突变位点

图 1 BsAII 三维结构

Fig. 1 Stereo representation of the native enzyme BsAII

图中黑色框所示氨基酸残基为活性中心位点残基,空心三所标记残基位点为突变位点;每个氨基酸序列来源及 GenBank 登录号如下所示:seq 1,*Escherichia coli* (1NNS_A);seq 2,*Wolinella succinogenes* (1WSA_A);seq 3,*Bacillus subtilis* B11-06 (KF444946);seq 4,*Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 (AFA36648.1)

图 2 不同来源 L-天冬酰胺酶氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Sequences alignment of L-asparaginases from different bacteria

2.2 L-天冬酰胺酶的表达与纯化

将 6 个突变株表达纯化后, 通过分析 SDS-PAGE 电泳图谱发现, 蛋白质目的条带均在 38 000 左右, 与理论值相符, 见图 3。

1. Protein marker, 2. G177A_{msz}, 3. P178A_{msz}, 4. S299N_{msz}, 5. D334E_{msz}, 6. D334G_{msz}, 7. P348A_{msz}

图 3 突变体蛋白质纯化结果

Fig. 3 Purification of mutant enzymes

2.3 L-天冬酰胺酶最适温度及温度稳定性

在 40 ℃、pH 7.5 条件下测定 6 个突变体酶及原始酶酶活, 结果表明 S299N_{msz} (115.78 U/mg)、P348A_{msz} (119.39 U/mg) 比酶活分别比原始酶 (90.45 U/mg) 提高 28% 和 32%, 而其余突变体酶比酶活均比原始酶有所降低。第 299 和 334 位氨基酸残基的改变并没有引起酶活的大幅度降低, 这说明这两个位点可能不是酶催化所必须的, 或者是突变后其它位点的氨基酸残基补偿了这两个位点的结构变化。因此, 我们选择突变体酶 S299N_{msz} 和 P348A_{msz} 做进一步研究。如图 4 所示, 突变体酶 S299N_{msz}、P348A_{msz} 和原始酶 BsAII 的最适温度均为 40 ℃。在 20~50 ℃ 之间酶活都在 60% 以上, 到 60 ℃ 时酶活急剧下降, 说明高温已经开始破坏蛋白质结构, 对酶促反应造成较大的影响。

为了比较这三个酶的温度稳定性, 我们测定了它们在不同温度下的半衰期, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 在 30~50 ℃ 之间突变体酶 P348A_{msz} 的温度稳定性较 BsAII 都有较大的提高, 而 60 ℃ 时, P348A_{msz} 的稳定性较 BsAII 有所下降, 而突变体酶 S299N_{msz} 的热稳定性较原始酶变化不大。这说明第 348 位氨基酸残基所在的 α 螺旋结构对酶的温度稳

定性有重要作用。在低温时可以较好地维持蛋白质的三维结构, 而在高温时三维结构受到急剧破坏。

图 4 突变体酶的最适反应温度

Fig. 4 Optimal temperature of the wild-type enzyme and its variants

表 2 突变体酶在不同温度下的半衰时间

Table 2 Half-lives of wild-type enzyme and its mutants for thermal inactivation

酶	$t_{1/2}/h$			
	30 ℃	40 ℃	50 ℃	60 ℃
BsAII	14.1	7.3	1.3	1.1
S299N _{msz}	14.5	6.9	1.5	1.3
P348A _{msz}	20.3	17.2	16.5	0.5

2.4 L-天冬酰胺酶最适 pH 及 pH 稳定性

如图 5 所示, 突变体酶 S299N_{msz} 的最适 pH 为 7.5, 而 P348A_{msz} 的最适 pH 为 8.0。突变体酶 S299N_{msz} 与 P348A_{msz} 在 pH 5~9 之间都具有 50% 以上的酶活。

图 5 突变体酶的最适 pH 值

Fig. 5 Optimal pH of the wild-type enzyme and its variants

为了比较三个酶的 pH 稳定性, 我们测定了三个酶在 pH 6~10 范围内放置 12 h 后的残余酶活, 见图 6。从图 6 可以看出, 三个酶在 pH 8~10 范围内放

置 12 h 后都保留 70%以上的酶活,这表明该酶在偏碱性的条件下较稳定。突变体酶 P348A_{msz} 在 pH 6~10 范围内酶活均在 70%以上,这说明突变后酶的耐酸碱能力也得到了较大的提高。

这可能是引起酶活提高的主要原因。

第 348 位氨基酸氨基位于 α -螺旋中,将 P348 突变为 A348 后,酶的热稳定性和 pH 稳定性都得到大幅度提高,这表明该位点对酶维持三维结构的稳定具有重要的作用。这一结果也与文献[22]相符。

图 6 突变体酶 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of the wild-type enzyme and its variants

2.5 L-天冬酰胺酶的动力学参数

作者对突变体酶和原始酶的动力学参数进行了研究。如表 3 所示,突变体酶 S299N_{msz} 与 P348A_{msz} 的 K_m 值均比原始酶有所提高,这表明突变后酶对底物的亲和力有所下降。而 k_{cat}/K_m 值均比原始酶高,这表明突变后酶促反应的催化效率有所提高,催化效率的提高可能是引起酶活提高的主要原因。

表 3 突变体酶的动力学参数

Table 3 Kinetics of the wild-type enzyme and its variants

酶	$K_m/(\text{mmol/L})$	k_{cat}/min^{-1}	$k_{cat}/K_m/(\text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{min}))$
BsAII	0.50 ± 0.025	110.75 ± 5.20	221.50
S299N _{msz}	0.64 ± 0.01	149.90 ± 5.64	234.22
P348A _{msz}	0.66 ± 0.01	158.68 ± 6.64	240.42

2.6 突变体酶的三维结构分析

酶活性中心及其附近区域的高柔性可能会表现出高的比酶活和低的活化能^[24]。为了解释比酶活提高的原因,我们分析了点突变前后氢键的变化。从图 7 可以看出,突变前 S299 与周围氨基酸残基形成 4 个氢键,而突变后 N299 仅与周围氨基酸残基形成 1 个氢键。由于第 299 位氨基酸残基可能参与酶与底物的结合^[18],其与周围氨基酸残基氢键相互作用的减弱,可能造成酶与底物结合区域柔性的增大,从而增强酶对底物的捕捉或对产物的释放,

(a)Ser299 与周围氨基酸残基的氢键相互作用;(b)Asn299 与周围氨基酸残基的氢键相互作用;图中红色虚线表示氢键。

图 7 第 299 位氨基酸残基突变前后氢键变化

Fig. 7 Changes of hydrogen bond interactions between residue at 299 and other residues after mutation

3 结 语

本研究通过定点突变提高了枯草芽孢杆菌 L-天冬酰胺酶的活力及稳定性,提高了该酶的工业应用潜力。通过蛋白质结构模拟和分子间作用力分析,证明了 L-天冬酰胺酶催化活性中心底物结合区域的柔性结构对酶活力有较大的促进作用,而位于 α -螺旋上的脯氨酸(P348)对该酶的热稳定性有较大影响。本研究为其它来源的 L-天冬酰胺酶的改造提供了相应的理论依据。

参考文献:

[1] Hendriksen H V, Kornbrust B A, Ostergaard P R, et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in orange of

- Food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*[J]. **J Agr Food Chem**, 2009, 57(10):4168-4176.
- [2] Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review[J]. **J Agr Food Chem**, 2003, 51(16):4504-4526.
- [3] Mottram D S, Wedzicha B L, Dodson A T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction[J]. **Nature**, 2002, 419(6906):448-449.
- [4] Capuano E, Ferrigno A, Acampa I, et al. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies[J]. **Food Research International**, 2009, 42(9):1295-1302.
- [5] Ciesarová Z, Kiss E, Boegl P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products [J]. **Journal of Food and Nutrition Research**, 2006, 45(4):141-146.
- [6] Hendriksen H V, Kornbrust B A, Ostergaard P R, et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*[J]. **J Agric Food Chem**, 2009, 57(10):4168-4176.
- [7] Beate A. Kornbrust MAS, Niels Erik Krebs Lange, et al. Asparaginase an enzyme for acrylamide reduction in food products[J]. **Enzymes in Food Technology**, 2010, 57:60-87.
- [8] Hatanaka T, Usuki H, Arima J, et al. Extracellular production and characterization of two *Streptomyces* L-Asparaginases [J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2010, 163(7):836-844.
- [9] Eisele N, Linke D, Bitzer K, et al. The first characterized *Asparaginase* from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*[J]. **Bioresour Technol**, 2011, 102(3):3316-3321.
- [10] Schallmeyer M, Singh A, Ward O P. Developments in the use of *Bacillus species* for industrial production[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2004, 50(1):1-17.
- [11] Haiquan Yang, Xinyao Lu, Long Liu, et al. Fusion of oligopeptide to the N terminus of an alkaline α -amylase from *alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(9):3049-3058.
- [12] Verma S, Mehta R K, Maiti P, et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II[J]. **BBA-Proteins Proteom**, 2014, 1844(7):1219-1230.
- [13] Miller M, Rao J K M, Wlodawer A, et al. A left-handed crossover involved in amidohydrolase catalysis crystal structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase with bound L-aspartate[J]. **Febs Lett**, 1993, 328(3):275-279.
- [14] Swain A L, Jaskolski M, Housset D, et al. Crystal Structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy [J]. **P Natl Acad Sci USA**, 1993, 90(4):1474-1478.
- [15] Palm G J, Lubkowski J, Derst C, et al. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: crystal structure of a Thr-89-val mutant[J]. **Febs Lett**, 1996, 390(2):211-216.
- [16] Derst C, Wehner A, Specht V, et al. States and functions of tyrosine residues in *Escherichia coli* asparaginase II [J]. **Eur J Biochem**, 1994, 224(2):533-540.
- [17] Kozak M, Jaskolski M. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a new crystal form of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Ser58Ala mutant)[J]. **Acta Crystallogr D**, 2000, 56:509-511.
- [18] Derst C, Henseling J, Rohm K H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248[J]. **Protein Sci**, 2000, 9(10):2009-2017.
- [19] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. **P Natl Acad Sci USA**, 1958, 44(10):1072-1078.
- [20] Jia M, Xu M, He B, et al. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06[J]. **J Agr Food Chem**, 2013, 61(39):9428-9434.
- [21] Kruger N J. Basic protein and peptide protocols[M]. New York: Humana Press, 1994:9-15.
- [22] Chou P Y, Fasman G D. Empirical predictions of protein conformation[J]. **Annu Rev Biochem**, 1978, 47(1):251-276.
- [23] 邓壮梅. 分子改造提高碱性淀粉酶热稳定性[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [24] Siddiqui K S, Parkin D M, Curmi P M G, et al. A novel approach for enhancing the catalytic efficiency of a protease at low temperature: reduction in substrate inhibition by chemical modification[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2009, 103(4):676-686.