

• 工业生物技术 •

米黑根毛霉来源 L-天冬酰胺酶的分子改造及高效表达

朱曼迟, 张显, 王志, 林文萱, 徐美娟, 杨套伟, 邵明龙, 饶志明

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

朱曼迟, 张显, 王志, 等. 米黑根毛霉来源 L-天冬酰胺酶的分子改造及高效表达. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3242-3252.

Zhu MC, Zhang X, Wang Z, et al. Molecular modification and highly efficient expression of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei*. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3242-3252.

摘 要: L-天冬酰胺酶能够水解 L-天冬酰胺生成 L-天冬氨酸和氨, 广泛存在于微生物、植物和部分啮齿类动物的血清中, 在医药和食品行业中都具有重要应用。然而无论是在医药还是在食品行业中, L-天冬酰胺酶依然存在一些问题, 如催化效率低、热稳定性差、产量低等。文中通过理性设计及 5'非翻译区 (5' untranslated region, 5' UTR) 改造提高米黑根毛霉 *Rhizomucor miehei* 来源的 L-天冬酰胺酶 (RmAsnase) 的酶活及蛋白表达量。结果显示, 通过同源建模结合序列比对分析构建的 6 个突变菌株中, 突变酶 A344E 比酶活较野生酶提高了 1.5 倍。继而构建食品安全菌株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168/pMA5-A344E, 对其进行 UTR 改造, 获得重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E, 其酶活较原始菌提高了 7.2 倍, 对重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 进行 5 L 罐研究, 最终产量为 489.1 U/mL。该酶活提高的重组菌株对 L-天冬酰胺酶的工业化应用具有重要价值。

关键词: L-天冬酰胺酶, 定点突变, 比酶活, UTR 改造

Molecular modification and highly efficient expression of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei*

Manchi Zhu, Xian Zhang, Zhi Wang, Wenxuan Lin, Meijuan Xu, Taowei Yang, Minglong Shao, and Zhiming Rao

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

Abstract: L-asparaginase hydrolyzes L-asparagine to produce L-aspartic acid and ammonia. It is widely distributed in

Received: November 27, 2020; **Accepted:** March 4, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFA0908300), National Natural Science Foundation of China (No. 32071470), Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region, China (No. 2020BFH01001), Key Research and Development Project of Shandong Province, China (No. 2019JZZY020605), Foundation of Fujian Key Laboratory of Functional Aquafeed and Culture Environment Control, China (No. FACE20200003), State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, China (No. KF201907).

Corresponding authors: Xian Zhang. E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2020YFA0908300), 国家自然科学基金 (No. 32071470), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2020BFH01001), 山东省重点研发项目 (No. 2019JZZY020605), 福建省水产功能性饲料及养殖环境调控重点实验室开放课题 (No. FACE20200003), 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室开放基金 (No. KF201907) 资助。

microorganisms, plants and serum of some rodents, and has important applications in the pharmaceutical and food industries. However, the poor thermal stability, low catalytic efficiency and low yield hampered the further application of L-asparaginase. In this paper, rational design and 5' untranslated region (5' UTR) design strategies were used to increase the specific enzyme activity and protein expression of L-asparaginase derived from *Rhizomucor miehei* (RmAsnase). The results showed that among the six mutants constructed through homology modeling combined with sequence alignment, the specific enzyme activity of the mutant A344E was 1.5 times higher than the wild type. Subsequently, a food-safe strain *Bacillus subtilis* 168/pMA5-A344E was constructed, and the UTR strategy was used for the construction of recombinant strain *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E. The enzyme activity of *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E was 7.2 times higher than that of *B. subtilis* 168/pMA5-A344E. The recombinant strain *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E was scaled up in 5 L fermenter, and the final yield of L-asparaginase was 489.1 U/mL, showing great potential for industrial application.

Keywords: L-asparaginase, site-directed mutation, specific enzyme activity, UTR strategy

L-天冬酰胺酶 (EC.3.5.1.1) 能够催化 L-天冬酰胺水解生成 L-天冬氨酸和氨^[1], 广泛存在于植物、动物和微生物中^[2-4]。细菌、酵母以及丝状真菌在内的许多微生物都是 L-天冬酰胺酶的理想来源, 微生物来源的 L-天冬酰胺酶具有酶学性质优异、易于大规模生产、经济效益好等特点使其成为众多研究者的研究热点。在医药行业中, L-天冬酰胺酶可用于治疗急性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤和淋巴系统恶性肿瘤等多种疾病^[5-6]。细菌来源的 L-天冬酰胺酶根据其表达的位置可以分为 L-天冬酰胺酶 I 和 L-天冬酰胺酶 II, 研究表明, 只有 II 型酶具有抗肿瘤活性^[7-8]。在食品工业中, L-天冬酰胺酶可以减少油炸或烘焙食品中致癌物质丙烯酰胺的生成^[6,9-10]。降低食品中丙烯酰胺含量的有效措施是通过添加 L-天冬酰胺酶^[11-12]降低原料中的 L-天冬酰胺。目前, 商品化的米曲霉 *Aspergillus oryzae* 和黑曲霉 *Aspergillus niger* 来源的 L-天冬酰胺酶已广泛地用于食品行业^[13]。然而, 已在应用的 L-天冬酰胺酶的缺陷也越来越受到人们的关注。无论是在医药行业还是食品行业中, 由于作用环境的复杂性, 需要酶在较广的 pH 和温度范围内保持高的底物转化率和酶活力。

目前有多种蛋白质工程方法可以克服天然酶的缺陷并提高其工业性能^[14]。在 L-天冬酰胺酶的分子修饰中, 理性设计是提高酶性能的主要策略。Long 等^[15]通过定点突变的方式构建突变菌株

G107D, 突变酶的催化活力较野生型提高了 85%。Sudhir 等^[16]对活性中心外的残基进行突变, 构建突变体 D103V, 突变酶的半衰期及底物亲和力均有所增加。Verma 等^[17]通过替换亚基结合表面氨基酸残基得到几株酶活提高的突变体。

本文首先将来源于米黑根毛霉 *Rhizomucor miehei* 的 L-天冬酰胺酶基因 *RmAsnase* 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行克隆表达, 结合同源建模得到的 L-天冬酰胺酶三维结构以及多序列比对结果, 选择了活性中心、保守区域以外的部分位点进行定点突变, 筛选得到酶活提高的突变体。进一步对野生酶以及突变酶的酶学性质进行研究。在此基础上, 将酶活提高的突变酶基因导入食品安全菌株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中, 同时进行 UTR 改造, 得到酶活提高的重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E, 这为后续的工业化应用奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* JM109、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168 以及质粒 pET28a、pMA5 均由本实验室保存, 含经密码子优化的 *R. miehei* 来源的 L-天冬酰胺酶 *RmAsnase* 编码基因的重组质粒 pET28a-*RmAsnase* 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I、Ex *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 *Dpn* I 等购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒等购自上海捷瑞生物工程有限公司；氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖 (IPTG) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；甘油、咪唑、氯化钠、L-天冬酰胺等均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10 (固体培养基添加 1.5% 的琼脂粉)。

发酵培养基 (g/L): 甘油 47; 酵母粉 35; 氯化铵 1.5; 氯化钠 5; 玉米浆 15; 磷酸二氢钾 2.04; 磷酸氢二钾 2.61; 七水合硫酸镁 1.85; L-天冬酰胺 1。

补料培养基 (g/L): 酵母粉 75; 甘油 500。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据文献报道的 UTR 序列, 选择合适的酶切位点, 设计合成两对同源臂引物, 序列见表 1。

1.2.2 重组表达菌株的构建

以合成的重组质粒 pET28a-*RmAsnase* 为模板, 通过重叠延伸 PCR 引进突变点^[18]。将重叠延伸 PCR 产物转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布于卡那霉素抗性的 LB 固体平板上进行培养, 挑取菌落形态正确的转化子进行培养并提取质粒送至天霖生物科技无锡有限公司进行测序分析, 测序正确的突变体则用于表达。以重组质粒 pET28a-A344E 为模板, pMA5-RMA-F 和 pMA5-RMA-R 为引物, PCR 扩增, 并用 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切质粒 pMA5。将酶切产物与 PCR 扩增产物通过同源重组进行连接, 将连接产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中涂布于氨苄青霉素抗性的 LB 固体平板上过夜培养, 挑取菌落形态正确的转化子进行 PCR 鉴定, 验证正确的进行培养并提取质粒送至天霖生物科技无锡有限公司进行测序分析。挑选测序正确的菌株进行培养并抽提质粒 pMA5-A344E。将质粒 pMA5-A344E 转化到 *B. subtilis* 168 感受态细胞中, 涂布在卡那霉素抗性的 LB 固体平板上过夜培养。挑菌落形态正确的转化子进行 PCR 鉴定, 验证正确的进行培养送

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
R135GF	AACGTATTGGCTACTCTATCTTAGAATACGATCCACTACTAGATAGCTGC
R135GR	GATAGAGTAGCCAATACGTTTGCCGTACAAAGAAACAGGTG
A171GF	TACTTCGACGGTTTCATCGTTCTTCACGGTACTGACACAATGGCATAAC
A171GR	CGATGAAACCGTCAAGTACTCATAGTTAGCTTCGATGTCACGAGCGTT
I173VF	GACGCTTTCGTTGTTCTTCACGGTACTGACACAATGGCATAAC
I173VR	TGAAGAACAACGAAAGCGTCGAAGTACTCATAGTTAGCTTCGATGTC
V206LF	GATCTCAATTACCTTTAACTGAAGTACGCAACGACGCTG
V206LR	AGTTAAAGGTAATTGAGATCCAGTGATGATTACCGTTTACCTAGTT
V281PF	GGCCTTTACCATTCAGCCCAACACATATCGCTAAATTCGTTCTCAC
V281PR	TGGGCGTAATGGTAAAGGCCATTTAACGTCGATATCAATACCTAAGTTAACT
A344EF	CTTTTAGCTGAAATTAAGAAAGCTTGTGATCGTGGAGTTGTA
A344ER	TCTTTTAATTTCAGCTAAAAGACCTTGACGAGCAGGTGC
pMA5-RMA-F	TGCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCATGGATTCTCGTACTACAGCTCACGTACC
pMA5-RMA-R	GTGAATTCGACCTCTAGAACGCGTTTATTCTTTACCAAGAAGTTGAGCGATTTC
pMA5 UTR-RMA-F	AGAGCGAAAATGCCTCACATTTGTGTATATTAGAAAGGAGGAATATATAATGGATTCTCGTACT
pMA5 UTR-RMA-R	ACAGCTCACGTA
pMA5 UTR-RMA-R	CGAGGTGAATTCGACCTCTAGAACGCGTTTATTCTTTACCAAGAAGTTGAGCGATTCTT

The underlined sequences are the mutated sites.

天霖生物科技无锡有限公司进行测序分析,若测序正确,即重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-A344E 构建成功。以相同的方法构建重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E。

1.2.3 L-天冬酰胺酶在大肠杆菌中的表达和纯化

将重组菌接种于 10 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h 后,按 1% 接种量转接至 50 mL 含相同抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 条件下,培养至 OD_{600} 达 0.8–1.0 时,加入 IPTG 置于 25 °C 摇床中培养 12 h 之后,在 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min 收集细胞,用 PBS (pH 7.4,浓度为 0.05 mol/L) 缓冲液洗涤并悬浮,并在冰水浴的条件下用超声破碎仪破碎细胞,破碎液在低温条件下离心 25 min,去除细胞破碎杂质后获得的上清液用于后续的蛋白纯化。蛋白纯化的方法采用 Ni-NTA 柱亲和层析,具体过程根据公司提供的仪器操作步骤进行。

1.2.4 L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的表达

将重组菌接种于 10 mL 含有终浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h 后,按 1% 接种量转接到 50 mL 的 LB 液体培养基 (含终浓度为 50 μ g/mL 的卡那霉素)中,37 °C 培养 24 h,培养结束后,离心收集菌体,超声破碎后收集上清即为粗酶液,用于酶活测定。

1.2.5 L-天冬酰胺酶活性的测定

L-天冬酰胺酶酶活测定通过计量酶促反应生成的氨气的量来计算。参考 Nessler 试剂法^[19]测定酶活。酶促反应体系 1 mL: 800 μ L 含终浓度 0.025 mol/L 底物 L-Asn 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 调到酶的最适 pH, 100 μ L 稀释酶液,置于酶的最适温度的水浴锅中反应 10 min,加入 100 μ L 质量体积百分浓度为 15% 的三氯乙酸溶液终止反应。在 10 000 r/min 转速下,离心 10 min。显色的反应体系含有 200 μ L 奈斯勒试剂、200 μ L 离心的上

清液、4.8 mL 的 ddH₂O,室温静置反应 10 min,测 A_{450} 。空白对照为先加入三氯乙酸终止反应,再进行后续的水浴处理。酶活单位:在一定的反应条件下,1 个酶活单位为每分钟产生 1 μ mol 产物 (氨气) 所需要的酶量。

1.2.6 酶的最适温度及温度稳定性

最适温度:在 pH 7.0 的条件下,将反应体系分别置于 30、35、40、45、50、55、60 °C 条件下反应 10 min,测定酶活。

温度稳定性:将纯酶先置于 30、45 °C 水浴锅中热处理 35 h,定点取样,测定酶活,以放置 0 h 酶活为 100%。

1.2.7 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

最适 pH:将纯酶分别置于含有 0.025 mol/L 终浓度 L-天冬酰胺的不同 pH 缓冲液中 (0.05 mol/L 醋酸盐缓冲液, pH 4.0–6.0; 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.0–8.0; 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 9.0–10.0),于 45 °C 条件下反应 10 min,测定酶活。

pH 稳定性:将纯酶置于 pH 5.0–10.0 的缓冲液中,在 4 °C 下放置 15 h,最终在 45 °C、pH 7.0 的条件下测定残余酶活,以放置 0 h 酶活为 100%。

1.2.8 5 L 罐发酵培养

发酵罐发酵条件:以 10% 的接种量将种子培养基装入 5 L 发酵罐中,装液量 2.0 L,培养温度 37 °C,通气量 4.0 vvm,转速为 600 r/min, pH 7.0 (通过 50% 氨水和补料培养基偶联实现 pH 的自动控制)。

2 结果与分析

2.1 米黑根毛霉 L-天冬酰胺酶基因 *RmAsnase* 的克隆与表达

从 NCBI 数据库中检索 *R. miehei* 来源 L-天冬酰胺酶的基因序列,长度为 2 043 bp,合成重组质粒 pET28a-*RmAsnase*,利用该质粒进行 PCR 扩增,电泳结果如图 1A 所示,特异性条带位置与

目标一致。将重组质粒 pET28a-*RmAsnase* 转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 构建重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*RmAsnase*, 按照方法 1.2.3 对重组菌株进行诱导表达及纯化, SDS-PAGE 分析结果见图 1B, 菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*RmAsnase* 在分子量 75 kDa 处有明显的蛋白表达条带, 纯化酶液条带单一, *RmAsnase* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达, 比酶活为 509.1 U/mg。

2.2 突变位点的选择

为提高 *RmAsnase* 的比酶活, 根据 *RmAsnase* 的氨基酸序列, 利用在线服务器 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), 以 PDB 数据 4R8L^[20] 晶体结构为模板, 同源模拟 *RmAsnase* 的三维结构, 同时将 *RmAsnase* 的氨基酸序列与其他 3 种不同来源的酶活较高的 L-天冬酰胺酶进行对比分析, GenBank 登录号如下所示: *Thermococcus gammatolerans* EJ3 (WP_015859055.1); *Thermococcus kodakarensis* (WP_011250607.1); *Escherichia coli* (WP_047644811.1)。通过序列比对显示 *RmAsnase* 的活性位点氨基酸为: T44、Y55、S147、T178、D179、K250。据文献报道, 改变距离活力中心较近的点, 能较大地影响酶活力^[21]。通过 *RmAsnase* 的三维结构分析结合序列比对的结果, 确定突变

原则为避开活性位点, 在其附近寻找保守区内的非保守位点。

2.3 突变体酶的构建、表达及纯化

根据突变原则, 按照 1.2.2 所述方法构建了 R135G、A171G、I173V、V206L、V281P 和 A344E 共 6 个突变株。将突变菌株进行诱导表达及纯化后, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示蛋白条带大小均在 75 kDa 左右, 与理论值相符 (图 2)。对收集到的纯酶进行活性测定 (图 3), 酶活测定条件为以 L-天冬酰胺为底物, 在 pH 7.0、45 °C 条件下, 检测突变酶和野生酶的酶活。结果表明, 突变酶 A344E 的比酶活与野生型相比显著提高, 其比酶活为 786.8 U/mg, 为野生型比酶活的 1.5 倍。因此, 下一步将对 A344E 进行酶学性质分析及三维结构模拟分析。

2.4 野生酶与突变酶的酶学性质比较

2.4.1 温度对野生酶与突变酶 A344E 酶活及稳定性影响

野生酶及突变酶在不同温度下的酶活结果见图 4A, 从结果来看, 野生酶最适温度为 45 °C, 而突变酶 A344E 的最适温度发生了偏移为 40 °C, 温度为 40–50 °C 时, 突变酶 A344E 仍能

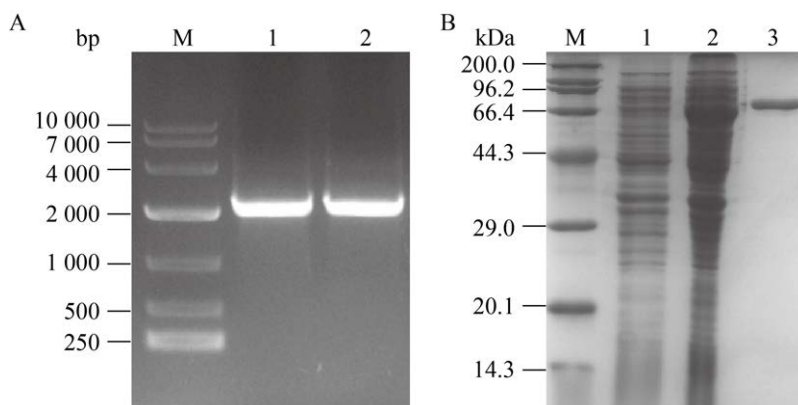


图 1 *RmAsnase* 的基因克隆 (A)、表达及纯化分析 (B)

Fig. 1 The cloning (A), expression and purification (B) of *RmAsnase* gene. (A) M: 10 000 marker; 1–2: gene *RmAsnase*. (B) M: protein marker; 1: *E. coli* BL21/pET28a crude enzyme; 2: *E. coli* BL21/pET28a-*RmAsnase* crude enzyme; 3: purified *RmAsnase*.

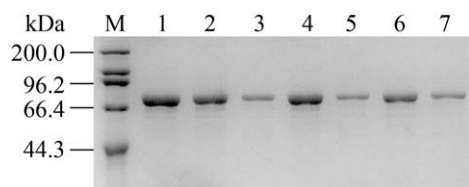


图 2 野生型 RmAsnase 和突变型 RmAsnase 的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of wild type and mutant enzymes. M: protein marker; 1: wild type enzyme; 2: mutant enzyme R135G; 3: mutant enzyme A171G; 4: mutant enzyme I173V; 5: mutant enzyme V206L; 6: mutant enzyme V281P; 7: mutant enzyme A344E.

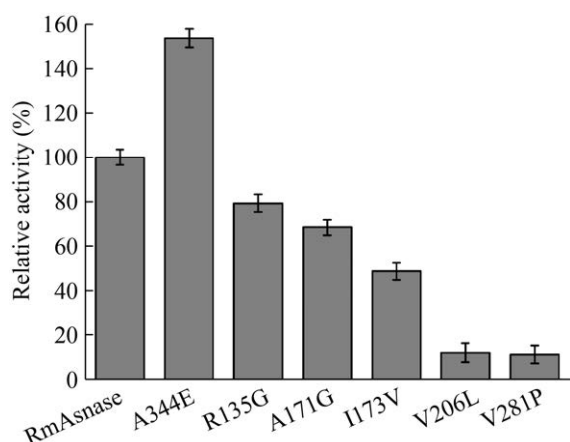


图 3 野生型 RmAsnase 和突变型 RmAsnase 的比酶活对比

Fig. 3 Comparison of specific enzyme activity between wild type and mutant enzymes.

保持较高酶活, 保留了 80% 以上的活性。将野生酶以及突变酶在 30 °C 条件下热处理 35 h 后, 测残余酶活, 从结果来看, 野生酶与突变酶 A344E 相对稳定, 酶活基本没有损失。45 °C 条件下热处理 20 h 后野生型酶残余活性为 58% (图 4B), 而突变体酶的酶活性仅剩 33% (图 4B)。这表明 A344 位点对 L-天冬酰胺酶的热稳定性有一定的影响。

2.4.2 pH 对野生酶与突变酶 A344E 酶活及稳定性的影响

由图 4C 可知, 突变酶 A344E 与野生型酶的最适 pH 均为 7.0, 当 pH 在 4.0–5.0 之间时, 酶活几乎为 0, 在 pH 6.0–9.0 之间时, 突变酶 A344E

的相对酶活与野生酶对比相对较高, 仍保持 80% 以上的酶活性。在 pH 稳定性实验中, 由图 4D 可以得出, 野生型酶和突变酶则呈现类似的规律, 但突变酶 A344E 较野生酶更为耐酸和耐碱。

2.5 三维结构模拟分析

利用在线服务器 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), 以 PDB 数据 4R8L^[20] 晶体结构为模板, 同源模拟 RmAsnase 以及 A344E 的三维结构, 根据建立的三维结构模型, 从氨基酸残基空间结构变化来分析突变酶 A344E 酶活提高的原因。图 5A 显示 A344 位于 α -螺旋处, 突变后 E344 仍可形成 α -螺旋, 表明单点突变并没有引起蛋白结构较大的变化。为进一步探究 A344E 比酶活提高的原因, 利用软件 GROMACS 5.0.2 版, 对蛋白分子动力学进行模拟, 检测其均方根涨落值 (Root-mean-square fluctuation, RMSF), RMSF 的高低能很好地表征蛋白质稳定性的好坏。如图 6 所示, 突变酶 A344E 的整体 RMSF 值高于野生酶, 说明突变后的残基使酶蛋白残基整体变得松散进而导致酶的稳定性降低。344 位氨基酸位于酶活性中心附近 (图 5), 由图 6 可知, 将 344 位氨基酸从丙氨酸突变成谷氨酸后, 344 位附近区域柔韧性增加, 有利于底物进入, 提高酶与底物结合区域结构的灵活性, 从而导致比酶活增加。

2.6 RmAsnase 在枯草芽孢杆菌中的高效表达

枯草芽孢杆菌是一种传统的模式菌株, 它的发酵基础和生产技术相对成熟, 且在发酵过程中不会产生毒副产物, 通常被认为是食品安全菌株, 因此, 我们选择枯草芽孢杆菌作为宿主, 用来生产 L-天冬酰胺酶。Xiao 等^[22]设计了一个 5' UTR 序列, 以提高工业菌株地衣芽孢杆菌 DW2 的蛋白质产量。这个序列只包含约 30 nt, 并在打开的阅读框之前形成一个发夹结构。该元件能够提高纳豆激酶和角蛋白酶等靶蛋白的表达量。这种 5' UTR 可以促进 SD 序列和起始密码子的可及性,

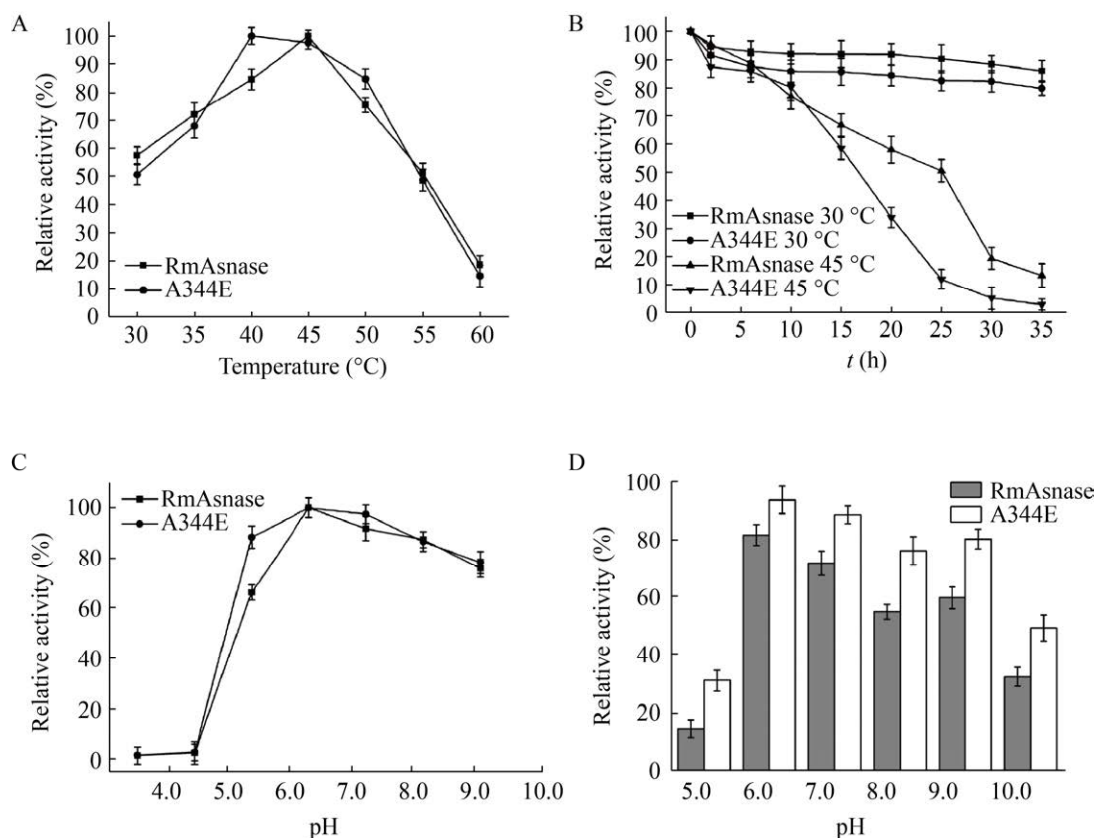


图 4 温度及 pH 对 L-天冬酰胺酶活性和稳定性的影响

Fig. 4 Optimal temperature (A), thermal stability (B), optimal pH (C) and pH stability (D) of wild type and mutant enzymes.

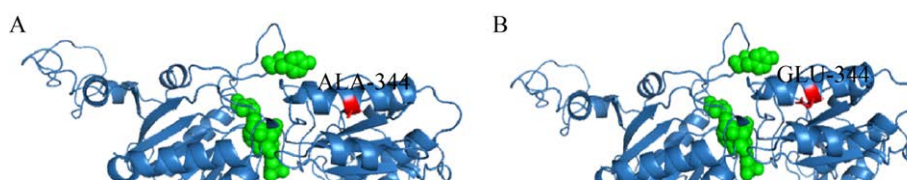


图 5 氨基酸残基突变前后 RmAsnase 三维结构的对比

Fig. 5 Comparison of protein 3-D structure between the wild type (A) and mutant enzyme (B). The green ball is the active site amino acid.

从而提高翻译起始的效率。按照 1.2.2 的方法, 以 *B. subtilis* 168 为宿主, 以质粒 pET28a-A344E 为模板扩增基因片段, 构建重组菌株 *B. subtilis*168/pMA5-A344E。根据文献报道的 UTR 序列 (GTATATTAGAAAGGAGGAATATATA), 设计包含 UTR 序列的引物 pMA5 UTR-RMA-F、pMA5 UTR-RMA-R (表 1), 以 *B. subtilis* 168 为宿主, 以

质粒 pMA5-A344E 为模板扩增基因片段, 构建菌株 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E, 对原始菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-A344E 以及 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 于 37 °C 发酵 24 h, 收集菌体破碎细胞, 获得粗酶液进行酶活测定。由图 7 可知, *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 酶活显著提高, 经测定, 酶活由原始的 1.7 U/mL 提高

到 12.2 U/mL, 破碎细胞上清液中粗酶液比活力由 0.5 U/mg 提高到 3.1 U/mg。

2.7 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 的 5 L 罐发酵

利用发酵罐进行发酵可以更好地对溶氧、pH、消除泡沫及补料等进行实时控制, 从而有利于 L-天冬酰胺酶的生产。根据方法 1.2.8, 对 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 在 5 L 发酵罐中的发酵酶活情况进行研究。从图 8 可以看出, 22–26 h 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E 处于稳定期, 30 h 后重组菌进入衰亡期。从各个

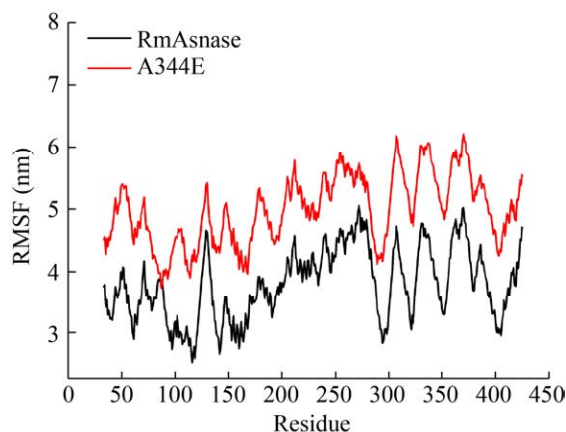


图 6 氨基酸残基突变前后 RmAsnase RMSF 值
Fig. 6 RMSF values between wild type and mutant enzymes.

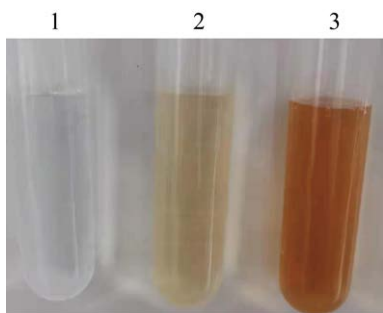


图 7 重组枯草芽孢杆菌的酶活测定图
Fig. 7 Enzyme activity of recombinant *Bacillus subtilis*. 1: blank control; 2: *B. subtilis* 168/pMA5-A344E crude enzyme. 3: *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E crude enzyme.

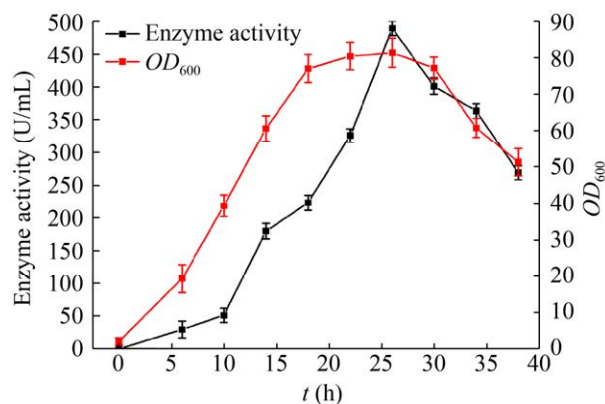


图 8 重组菌 5 L 罐发酵结果
Fig. 8 The fermentation profile of *B. subtilis* 168/pMA5 UTR-A344E in 5 L fermenter.

阶段的发酵情况可以看出, L-天冬酰胺酶的产量随着菌体生物量的升高而升高, 发酵 26 h 时菌体生物量达到最大值, 此时 L-天冬酰胺酶酶活高达 489.1 U/mL。

3 讨论

现已报道的 L-天冬酰胺酶中, 其最适反应条件在温度和 pH 偏好性方面与商业化应用条件不匹配。本研究作为前人研究的补充, 重点关注温度在 40–50 °C 以及 pH 在 6.0–9.0 范围的酶。将 *R. miehei* 来源的 L-天冬酰胺酶编码基因 *RmAsnase* 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 将 *RmAsnase* 的氨基酸序列与其他 3 种不同来源的酶活较高的 L-天冬酰胺酶进行对比分析, 根据序列比对结果以及三维结构模拟结果, 选取了活性中心附近保守区内的非保守位点进行突变。突变酶 A344E 的比酶活为 786.8 U/mg, 是野生酶的 1.5 倍, 根据分子动力学模拟结果, 突变酶 A344E 的整体 RMSF 值高于野生酶, 推测突变体 A344E 底物结合区域结构的柔韧性增加, 有利于底物进入, 从而导致比酶活增加。对此还需对该点进行饱和突变及晶体结构解析。对 A344E 酶学性质进行研究, 如表 2 所示, 该酶在温度 40–50 °C、pH 6.0–9.0 范围内仍能保持较高

表 2 不同来源 L-天冬酰胺酶酶学性质及微生物发酵情况比较

Table 2 Comparison of enzymatic properties and microbial fermentation of L-asparaginase from different sources

Classification	Source	Optimal pH	Optimal temperature (°C)	Specific activity (U/mg)	Expression host	Enzyme production (U/mL)	References
Thermophilic L-asparaginase	<i>Pyrococcus yayanosii</i>	8.0	95	1 483.00	<i>B. subtilis</i>	6 324.00	[23]
	<i>Thermococcus gammatolerans</i>	8.5	85	5 381.00	nr	nr	[23]
Non-thermophilic L-asparaginase	<i>B. subtilis</i>	7.5	40	92.00	<i>B. subtilis</i>	407.60	[24]
	<i>Erwinia carotovora</i>	8.0–8.5	37	430.00	<i>E. coli</i>	96.78	[25–27]
	<i>Vibrio succinogenes</i>	7.3	45	200.00	nr	nr	[28]
	<i>Nocardiopsis alba</i>	8.0	37	93.28	<i>E. coli</i>	158.10	[29–30]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.8	37	196.20	<i>P. pastoris</i>	86.50	[31]
	<i>Rhizomucor miehei</i>	6.0–9.0	40–50	786.80	<i>B. subtilis</i>	489.10	This study

nr means not reported.

的催化活力。根据来源可将 L-天冬酰胺酶人为地分为嗜热菌 L-天冬酰胺酶和非嗜热菌 L-天冬酰胺酶。嗜热菌 L-天冬酰胺酶的比酶活及发酵罐水平酶活产量较高,但其作用温度要求较高,在 60 °C 以下基本没有酶活,难以满足工业化应用。目前已报道的非嗜热菌来源的 L-天冬酰胺酶 pH 作用范围往往为中性或偏碱性,本研究构建的重组 L-天冬酰胺酶最适 pH 范围为 6.0–9.0,在弱酸性条件下也能保持 80%以上的酶活,进一步拓宽了 L-天冬酰胺酶在食品、医药行业中的应用,且其比酶活与大部分非嗜菌热来源的 L-天冬酰胺酶相比处于较高水平(表 2),其对环境变化高度适应,这与大部分报道的 L-天冬酰胺酶相比具有明显的优势,初步具备了工业化应用特征。

目前商业化的 L-天冬酰胺酶主要由非食品级菌株大肠杆菌及生长周期较长的曲霉生产,大肠杆菌发酵生产 L-天冬酰胺酶产量低且容易产生内毒素等有害物质,不利于其在食品及医药行业中的应用。为契合实际应用,进一步将突变体基因导入食品安全菌株枯草芽孢杆菌中,在此基础上利用

UTR 改造策略,提高突变体酶蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达量,其酶活相比于原始菌株提高了 7.2 倍,对重组菌 *B. subtilis*168/pMA5 UTR-A344E 进行 5 L 罐研究,最终产量为 489.1 U/mL。本研究构建的重组 L-天冬酰胺酶生产菌的比酶活及发酵罐产酶水平还有一定的提升空间,接下来可以尝试分子改造、发酵过程优化等策略来进一步提高其比酶活及发酵罐产酶水平。

REFERENCES

- [1] Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide: a review. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(16): 4504–4526.
- [2] Eisele N, Linke D, Bitzer K, et al. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3316–3321.
- [3] Oza VP, Parmar PP, Patel DH, et al. Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. *Biotech*, 2011, 1(1): 21–26.
- [4] Sahu MK, Sivakumar K, Poorani E, et al. Studies on

- L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *J Environ Biol*, 2007, 28(2 Suppl): 465-474.
- [5] Vidya J, Sajitha S, Ushasree MV, et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: an overview. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1775-1781.
- [6] Paul T, Mondal A, Bandyopadhyay TK. Isolation, purification, characterisation and application of L-ASNase: a review. *Recent Pat Biotechnol*, 2019, 13(1): 33-44.
- [7] Yano S, Minato R, Thongsanit J, et al. Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterisation of recombinant type I L-asparaginase. *Ann Microbiol*, 2008, 58(4): 711-716.
- [8] Onishi Y, Yano S, Thongsanit J, et al. Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. *Ann Microbiol*, 2010, 61(3): 517-524.
- [9] Vinci RM, Mestdagh F, De Meulenaer B. Acrylamide formation in fried potato products-present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chem*, 2012, 133(4): 1138-1154.
- [10] Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, et al. Dietary acrylamide and human cancer: a systematic review of literature. *Nutr Cancer*, 2014, 66(5): 774-790.
- [11] 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. *Food Res Int*, 2009, 42(9): 1295-1302.
- [12] Hedegaard RV, Frandsen H, Skibsted LH. Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose. *Food Chem*, 2008, 108(3): 917-925.
- [13] 左少华. 耐热 L-天冬酰胺酶的性质鉴定及酶法控制食品中丙烯酰胺含量的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- Zuo SH. Characterization of thermostable L-asparaginases and enzymatic control of acrylamide level in food[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015 (in Chinese).
- [14] Lehmann M, Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(4): 371-375.
- [15] Long SQ, Zhang X, Rao ZM, et al. Amino acid residues adjacent to the catalytic cavity of tetramer L-asparaginase II contribute significantly to its catalytic efficiency and thermostability. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 82: 15-22.
- [16] Sudhir AP, Agarwal VV, Dave BR, et al. Enhanced catalysis of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 86: 1-6.
- [17] Verma S, Mehta RK, Maiti P, et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(7): 1219-1230.
- [18] 张显, 龙水清, 饶志明, 等. 定点突变提高枯草芽孢杆菌 L-天冬酰胺酶的活力及稳定. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(11): 1128-1134.
- Zhang X, Long SQ, Rao ZM, et al. Improving the activity and stability of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *J Food Sci Biotechnol*, 2015, 34(11): 1128-1134 (in Chinese).
- [19] Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, et al. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity *in vitro*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(7): 1759-1774.
- [20] Schalk AM, Antansijevic A, Caffrey M, et al. Experimental data in support of a direct displacement mechanism for type I/II L-asparaginases. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 5088-5100.
- [21] Xie Y, An J, Yang GY, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7994-8006.
- [22] Xiao J, Peng B, Su ZW, et al. Facilitating protein expression with portable 5'-UTR secondary structures in *Bacillus licheniformis*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(5): 1051-1058.
- [23] 李谓. *Pyrococcus yamanosii* CH1 L-天冬酰胺酶的分子改造及表达优化[D]. 无锡: 江南大学, 2019.

- Li X. Molecular modification and expression optimization of *Pyrococcus yanosii* CH1 L-asparaginase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [24] Feng Y, Liu S, Jiao Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(4): 1509-1520.
- [25] Warangkar SC, Khobragade CN. Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzyme Res*, 2010, 2010: 165878.
- [26] Kotzia GA, Lappa K, Labrou NE. Tailoring structure-function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochem J*, 2007, 404(2): 337-343.
- [27] Goswami R, Hegde K, Dasu VV. Production and characterization of novel glutaminase free recombinant L-asparaginase II of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCRI 1043 in *E. coli* BL21(DE3). *Brit Microbiol Res J*, 2015, 6(2): 95-112.
- [28] Distasio JA, Niederman RA, Kafkewitz D, et al. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem*, 1976, 251(22): 6929-6933.
- [29] Meena B, Anburajan L, Vinithkumar NV, et al. Molecular expression of L-asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: a prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. *Gene*, 2016, 590(2): 220-226.
- [30] Meena B, Anburajan L, Dheenan PS, et al. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Biopr Biosyst Eng*, 2015, 38(2): 373-388.
- [31] Ferrara MA, Severino NMB, Mansure JJ, et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(7): 1457-1463.

(本文责编 陈宏宇)