

定点突变提高食品新型 L-天冬酰胺酶的活力及热稳定性

徐书琴^{1,2}, 胡静怡^{1,2}, 张恒维^{1,2}, 赵浩东^{1,2}, 刘 鹏^{1,2},
席毓淋^{1,2}, 李 谔^{1,2}, 张 显^{*1,2}, 饶志明^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-天冬酰胺酶(L-asparaginase II, EC 3.5.1.1)可将 L-天冬酰胺转化为 L-天冬氨酸,减少高温加工食品中丙烯酰胺的形成,因而受到人们的广泛关注。该酶在食品加工及预处理阶段的使用已受到人们广泛的关注,但是由于食品加工及预处理过程中环境的复杂性,对 L-天冬酰胺酶的性质、热稳定性和酶活等方面有较高的要求。通过序列对比和同源模拟对嗜热菌 *Pyrococcus yayanosii* CH1 来源的编码 L-天冬酰胺酶的基因 *PyAsnase* 进行了 3 个位点的突变,并在 *Bacillus subtilis* 168 中进行表达,提高了该酶的热稳定性及比酶活。其中突变株 E22K 较原始菌株相比所得突变体比酶活提高了约 37.3%,突变株 R111L 较原始菌株相比所得突变体的比酶活提高了约 31.1%,突变株 M92A 较原始突变菌株相比所得突变体在 85 °C 时的半衰期延长了约 30 min。本研究结果为探索 L-天冬酰胺酶结构和功能的相互关系提供了借鉴,提高了其在食品工业中的应用前景。

关键词: L-天冬酰胺酶;定点突变;比酶活;热稳定性

中图分类号:Q 789 文章编号:1673-1689(2020)09-0099-06 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.09.014

Improving the Activity and Thermal Stability of *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-Asparaginase by Site-Directed Mutagenesis

XU Shuqin^{1,2}, HU Jingyi^{1,2}, ZHANG Hengwei^{1,2}, ZHAO Haodong^{1,2},
LIU Peng^{1,2}, XI Yulin^{1,2}, LI Xu^{1,2}, ZHANG Xian^{*1,2}, RAO Zhiming^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-asparaginase II (EC 3.5.1.1), which can convert L-asparagine, the precursor of carcinogenic acrylamide, to L-aspartic acid, is attracting much attention in food industry. The use of L-asparaginase II can reduce the formation of acrylamide during the pretreatment of foods. However, the application of this enzyme is limited due to variant requirements of commercial use, especially

收稿日期: 2018-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500065);中国博士后科学基金资助项目(2015M570407,2016T90421);江苏省青年自然科学基金项目(BK20150142);国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助项目(LITE2018-06);宁夏回族自治区科技创新团队项目(KJT2017001);江苏高校品牌专业建设工程资助项目;江苏高校优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 张 显(1986—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,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

for its activity and thermostability. In this study, by sequence aligning and homology modeling, three mutants of *PyAsnase* gene from the thermophilus *Pyrococcus yamanosii* CH1 was constructed and over-expressed in *Bacillus subtilis*. According to the results, the specific activities of the mutants E22K and R111L were increased by 37.3% and 31.1%, respectively, and the half-life of the mutant obtained by the mutant M92A was extended by 30 min at 85 °C. This work provides references for studying the interrelationship between function and structure of L-asparaginase, and also develops the application of L-asparaginase in food industry.

Keywords: L-asparaginase, site-directed mutagenesis, specific activity, thermal stability

L-天冬酰胺酶能够通过水解脱氨基反应,将L-天冬酰胺催化形成L-天冬氨酸和氨^[1]。目前 *E. coli*、*Erwinia chrysanthemi* 及 *Erwinia carotovora* 等微生物来源的L-天冬酰胺酶已经被广泛应用于治疗多种疾病,如急性淋巴白血病和淋巴肉瘤等^[2]。但是,该酶的半衰期短、酶活性低、具有副催化反应等缺陷导致在临床应用时会出现一些较严重不适应性。

此外,有研究表明,L-天冬酰胺酶除了在医药方面有非常广泛的应用,其在食品行业也有较好的应用前景。在食品加工处理过程中会产生一种致癌物质丙烯酰胺,而在食品加工处理前加入适量的L-天冬酰胺酶可以有效降低食品中丙烯酰胺的含量。Pedreschi 研究显示,在食品预处理过程中加入L-天冬酰胺酶可以使丙烯酰胺的含量下降约 92.28%^[3]。由于酶促反应的条件一般较温和,在食物加工预处理阶段加入L-天冬酰胺酶,不仅能达到减少丙烯酰胺含量的目的,还不会对食品风味产生较大的影响^[4]。并且经过前期的研究证实,在该反应过程中不会生成对人体有害的物质,因此利用酶法预处理需高温加工的食品原料,是一种可从源头上减少食物中丙烯酰胺生成的有效方法。

近年来,L-天冬酰胺酶在食品产业的应用研究及开发已经受到越来越多的关注,也面临着一些新的挑战。由于食品加工预处理环境条件的复杂性,这就要求酶在较广的 pH 和温度范围保持高的催化活力。目前,耐高温、耐酸碱、高比酶活的L-天冬酰胺酶在食品工业方面具有更高的潜在应用价值。

为了获得具有满足工业生产及应用需求的蛋白质分子,蛋白质工程手段已被广泛应用于对酶蛋白功能和结构进行改良的研究中^[5]。2013 年 Vidya 等研究发现对 *Escherichia sp.* 中 L-天冬酰胺酶进行

点突变后,蛋白质表面环上电荷得到优化,且有效增加了酶的热稳定性^[6]。龙水清等对 *Bacillus subtilis* B11-06 的L-天冬酰胺酶(BsAII)进行定点突变,筛选得到的L-天冬酰胺酶突变体具有更高的比酶活以及热稳定性^[7-8]。

作者基于课题组前期将 *Pyrococcus yamanosii* CH1 来源的L-天冬酰胺酶在 *Bacillus subtilis* 168 中成功克隆表达的基础上,进一步采用分子模拟、定点突变等手段对其进行改造以期提高其比酶活和热稳定性,进一步提高其工业应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

E. coli 和 *B. subtilis* 穿梭质粒 pMA5、克隆宿主 *E. coli* JM109、表达宿主 *B. subtilis* 168 由作者所在实验室保存。限制性核酸内切酶、PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶和 T₄ DNA 连接酶: 购自 TaKaRa 生物公司(大连,中国);小型质粒快速分离试剂盒、DNA 提取试剂盒和 Mini DNA 快速纯化试剂盒等: 购自 Sangon Biotech Co., Ltd(上海,中国);HisTrap™ HP 柱: 购自 GE Healthcare, Inc(英国)。其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 L-天冬酰胺酶基因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-asn 为模板,每一个拟突变株设计 2 条含有突变位点及重叠部分的引物(见表 1)^[9],利用这些突变引物通过 PCR 的方法,使基因在重叠延伸的过程中携带上目的突变点。将获得的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Mlu* I 限制性核酸内切酶进行双酶切,并利用琼脂糖凝胶电泳回收该双酶切产物,与同样进行了双酶切及琼脂糖

凝胶电泳回收的线性化穿梭质粒 pMA5, 利用 T4 DNA 连接酶于 16 ℃ 连接 12 h, 并将所得连接产物用热激法转入大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞, 挑选阳性转化子, 提取质粒酶切验证后, 再进行测序, 检测是否正确引入突变点, 并将突变正确的质粒转化入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 感受态细胞中。

表 1 基因克隆及定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis and

引物名称	引物序列(5'-3')
F1	CGGGATCCATGAGACTGCTGATCCTGG
R1	GCACGCGTTTAACTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGC CGATTCCCAATTTTCG
F2:E22K	CAAGTGTGCCTTCAGAAGAGGGATACAAATC AT
R2:E22K	GGATCTCCTCCACAGACAGTGTATTTTGTAT CCCTCT
F3:M92A	CACGGTACAGACAGCTCGCTTACACAGCTTC CGCGCTTAGC
R3:M92A	GGAGGGTTTCTCACCATAAAGCTAAGCGCCG AAGCTGTGTAA
F4:R111L	CCTGTGCCTATCCTACTCACGGGAGCAATGTT GCCTATTACAG
R4:R111L	TGGTGCQTCCGAACCTGGCTCTGTAAAGGCAAC ATTGCTC

注: 引物 F1 及 R1 分别为 L-天冬酰胺酶基因的上游引物和下游引物, 其他引物用来引入 L-天冬酰胺酶上对应的突变位点; 加粗部分的核苷酸序列对应的突变位点; 下划线部分的核苷酸序列为引物上的限制性核酸内切酶切位点。

1.2.2 L-天冬酰胺酶的表达和纯化 将重组枯草芽孢杆菌接种至含有终质量浓度为 20 μg/mL 的卡那霉素的 LB 培养基中(成分(g/L): NaCl 10, 蛋白胨 10, 酵母浸出物 5), 于 37 ℃、200 r/min 培养 12 h, 作为种子液。取 1 mL 该种子液接种在 100 mL 的新鲜 LB 培养基上, 并在相同条件下培养 24 h, 得到扩增后的重组枯草芽孢杆菌细胞。将获得的细胞于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液作为胞外粗酶液, 用于胞外 L-天冬酰胺酶酶活测定。取其细胞用裂解缓冲液 (50 mmol Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0) 重复洗涤细胞 2~3 次后, 然后在细胞裂解缓冲液中加入 6 mg/mL 溶菌酶, 放置 2 h, 再于 20 MHz, 45% 功率下, 超声处理细胞 30 min。将所得细胞裂解物在 12 000 r/min 下离心 25 min, 收集上清液作为胞内粗酶液, 于 -20 ℃ 保藏。

胞内粗酶液的分离纯化采取 Ni²⁺亲和层析和 AKTA 纯化系统(GE Healthcare, 瑞典)。以 0.5 mL/min 的流速将粗酶液加载到利用结合缓冲液 (0.02 mol Tris-HCl 缓冲液, 0.5 mol NaCl, pH 7.4) 平衡后的 1 mL HisTrap TMHP 柱上。采用 0~0.5 mol 的咪唑线性梯度, 1 mL/min 的流速洗脱 L-天冬酰胺酶。然后将纯化后的酶用 PB 缓冲液 (0.05 mol, pH 7.0) 或 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol, pH 7.0) 透析, 除去酶液中残存的咪唑。并将最终纯化后的酶进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.2.3 L-天冬酰胺酶酶活的测定 L-天冬酰胺酶活力采用 Long 和 Zuo 等人的奈斯勒试剂法, 通过测定酶促反应所生成氨的量来计算酶促反应速率^[10-11]。酶活力单位定义: 在一定条件下, 每分钟内产生 1 μmol 氨气所需的酶量为 1 个酶活单位, 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度^[12]。在 95 ℃ 下对底物 (1 mL 的 25 mmol/L-天冬酰胺和 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 混合物) 进行预热后, 加入 100 μL 酶溶液, 反应进行 10 min 后加入 100 μL 15 g/dL 的三氯乙酸 (TCA) 终止反应。反应后的混合物体系以 20 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 澄清上清液加入 4.8 mL 去离子水中, 并加入 200 μL 奈斯勒试剂反应, 在 450 nm 的分光光度计下检测系统中释放的氨的量。对照组在酶促反应前加入 100 μL 的 15 g/dL 三氯乙酸提前终止反应, 以除去由于高温下 L-天冬酰胺自水解带来的误差。

1.2.4 L-天冬酰胺酶最适温度、最适 pH 及温度稳定性测定 最适温度测定: 在 pH 8.0 条件下, 40~100 ℃ 的温度范围内进行酶反应, 测定不同温度下的 L-天冬酰胺酶酶活, 并依此确定其最适温度。

最适 pH 测定: 保持温度为 95 ℃, 在不同 pH 值条件下进行酶反应测定其对应的 L-天冬酰胺酶酶活。根据所需的 pH 值范围采用的不同 pH 缓冲液分别为: 0.05 mol 乙酸盐缓冲液, pH 4.0~6.0; 0.05 mol 磷酸盐缓冲液, pH 6.0~7.0; 0.05 mol Tris-HCl 缓冲液, pH 7.0~9.0; 0.05 mol 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 9.0~10.0。

温度稳定性检测: 将含 L-天冬酰胺酶的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol, pH 7.0), 置于 85 ℃ 水浴锅中 15~120 min, 再在冰上重新折叠 15 min, 并在 95 ℃、pH 8.0 的条件下测定体系中残余的 L-天冬酰胺酶酶活性。

1.2.5 L-天冬酰胺酶三维结构模拟及分析 使用 Prot Param 来预测 L-天冬酰胺酶的相对分子质量、理论 pI 和不稳定指数。通过使用 SWISS-MODEL 同源建模获得 L-天冬酰胺酶的结构模型, 并使用 VERIFY_3D 服务器对模型质量进行检测^[13-14]。利用 PYMOL 软件分析氨基酸残基之间的相互作用^[15]。

2 结果与分析

2.1 L-天冬酰胺酶分子建模突变点选择

Pyrococcus yayanosii CH1 L-天冬酰胺酶是由 987 个碱基编码而成的具有 328 个氨基酸的蛋白质酶。经 ProtParam 预测得到 L-天冬酰胺酶相对分子质量大小约为 3.61×10^4 , 理论 pI 值约为 5.16, 不稳定指数约为 29.80, 可认为该酶有较好的稳定性^[16]。为了对获得的实验结果进行更深层次的分析, 将 L-天冬酰胺酶 PyAsnase 的氨基酸序列上传到 SWISS-MODEL 服务器, 选择了与其序列相似度达到 65% 的同源二聚体蛋白为模板, 得到了 L-天冬酰胺酶的三维结构模型。并利用 VERIFY_3D 服务器对获得模型的质量进行数据分析, 结果显示 92.02% 的残基的平均 3D-1D 的评分大于 0.2, 已达到了质量检测的标准 ($\geq 80\%$ 的残基的 3D-1D 评分大于 0.2)^[9], 可以用于更进一步的研究分析。

为了提高 *Pyrococcus yayanosii* CH1 来源的 L-天冬酰胺酶的比酶活和热稳定性, 挑选 3 条酶活较高且为嗜热来源的 L-天冬酰胺酶, 将这些酶的氨基酸序列进行对比 (见图 1), 从而确定与酶活性有关的氨基酸位点以及在高度保守序列附近可能会提高 *P. yayanosii* CH1 来源 L-天冬酰胺酶的比酶活或热稳定性的突变位点。其中, 结合近年来学者们对 L-天冬酰胺酶的活性位点的研究, 作者认为高度保守的 11T、21Y、52S、83T、84D、154K 位点为该 L-天冬酰胺酶与酶活性有关的位点。在高度保守序列附近, 我们发现 *P. yayanosii* CH1 来源的 L-天冬酰胺酶的氨基酸序列中 E22、M92、R111 位点与其他 3 个嗜热来源 L-天冬酰胺酶的氨基酸序列差别较大, 且其余 3 个嗜热来源的氨基酸序列在这些位点具有较好的保守性, 因此选择这 3 个位点作为突变位点。突变位点在酶空间结构上的位置如图 2 所示。

2.2 L-天冬酰胺酶突变后酶学性质的研究

按照上述实验方法测定酶的最适温度及最适 pH, 所得结果如表 2 所示。可以看出, 突变前后酶的最适

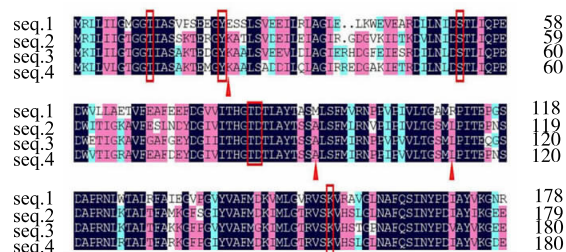
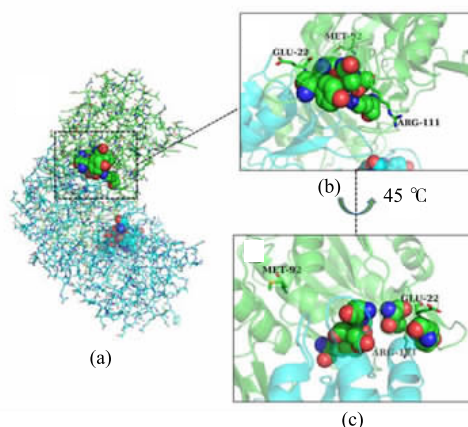


图 1 不同来源 L-天冬酰胺酶氨基酸序列对比结果

Fig. 1 Sequences alignment of L-asparaginases from different bacteria



(a) *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-天冬酰胺酶的整体结构示意图, 二聚体分别由蓝色和绿色线性模型表示, 活性中心的氨基酸由球型模型表示; (b) *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-天冬酰胺酶活性中心部分, E22、M92、R111 位点的氨基酸残基由棍棒模型表示; (c) *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-天冬酰胺酶逆时针旋转 45° 后示意图。

图 2 来自 *Pyrococcus yayanosii* CH1 的 L-天冬酰胺酶三级结构及突变位点示意图

Fig. 2 Tertiary structure of the *P. yayanosii* CH1 L-asparaginase and schematic diagram of the mutation sites

温度与最适 pH 基本保持不变, 最适温度约为 95 °C, 最适 pH 值约为 8.0。在最适温度 (95 °C) 及最适 pH (8.0) 条件下分别测定突变体酶与原始酶的酶活, 结果显示, E22K 突变体酶的酶活约为 2 037.13 U/mg, 较原始酶酶活 (约 1 483.81 U/mg) 相比提高了约 37.3%。R111L 突变体酶的酶活约为 1 945.11 U/mg, 相比于原始酶提高了 31.3%。M92A 突变体酶的酶活约为 1 421.78 U/mg, 是原始酶的 95%。即可以认为, E22、R111 位点的突变可以进一步提高酶的比酶活。M92 号位点的突变虽然导致酶活降低, 但是波动幅度较小。

表 2 突变体酶的酶学性质

Table 2 The enzymatic properties of the wild-type and its variants

酶	酶活/(U/mg)	倍数	$t_{(1/2, 85\text{ }^{\circ}\text{C})}/\text{min}$	最适温度/ $^{\circ}\text{C}$	最适 pH
原始酶	1 483.81±63.61	1	105±5	95	8.0
E22K	2 037.13±83.23	1.37	105±5	95	8.0
M92A	1 421.78±78.36	0.95	135±5	95	8.0
R111L	1 945.11±91.75	1.31	105±5	95	8.0

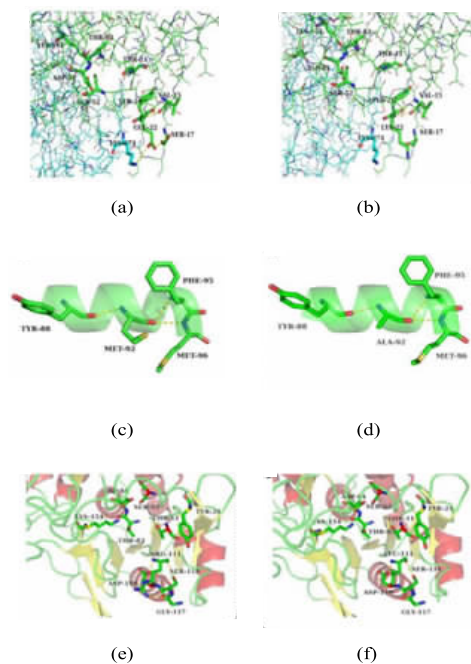
为了进一步了解酶的热稳定性变化,将含突变体酶与原始酶的缓冲液在 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中放置 15~120 min,再在冰上重新折叠 15 min,并在 95 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 的条件下测定体系中残余的 L-天冬酰胺酶酶活性。其中,原始酶、E22K 和 R111L 突变体酶在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下,放置 105 min 仍有较高的酶活,热稳定性基本保持不变。M92A 突变体酶在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 135 min 仍有较高的酶活,相比于原始酶延长了 30 min。因此,将 M92 号位点突变成 A92 在提高酶的热稳定性方面有较好的效果。

2.3 突变体酶三维结构分析

为了分析突变体酶 E22K、M92A、R111L 的酶活或者热稳定性提高的原因,根据建立的 L-天冬酰胺酶蛋白质结构模型,从氨基酸残基间的相互作用力和空间的结构变化的角度来对实验结果进行分析,其变化情况见图 3。

一般认为,活性区域附近的高柔性及更利于底物、产物进入活性口袋的酶结构会使酶出现较高的比酶活和较低的活化能^[17-18]。而从图 3 可以看出,突变残基 E22K 与 R111L 分别位于不同的柔性环上。突变前 E22 与 S17、K274 残基形成氢键,而突变后, K22 与这 2 个氨基酸残基不能再形成氢键,这种与周围氨基酸残基氢键相互作用的减弱,可能会增加酶活性中心的柔韧度,更有利于对底物的捕捉以及产物的释放,进而提高酶的比活力。同样,突变后的 L111 不能再与 G117 形成氢键,增加了酶活性中心的柔韧度,而且突变后的 L111 的残基比突变前 R111 的残基小,产生的空间位阻相对较小,进一步促进了底物和产物的进出,从而提高了酶的比活力。

蛋白质的热稳定性一般与蛋白质内部疏水性、表面的亲水性、表面电荷分布以及分子内氨基酸残基的相互作用等有关。从氨基酸残基的蛋白质三维结构图可以看出第 92 位氨基酸位于 α -螺旋中,且将 M92 换成 A92 后,酶的热稳定性得到了较大幅度的提高,这表明 92 号位点对 *P. yayanosii* CH1 来



(a,c,e) 分别是 E22、M92、R111 的原始酶三维结构图;(b,d,f)分别是 E22K、M92A、R111L 的突变体酶三维结构图。

图 3 突变前后氨基酸残基的蛋白质三维结构对比

Fig. 3 Tertiary structures of the wild-type and mutant enzymes

源的 L-天冬酰胺酶维持三维结构的稳定性有重要的作用。

3 结 语

在前期的研究中,学者们大多对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等来源的 L-天冬酰胺酶进行蛋白质工程改造,获得的 L-天冬酰胺酶突变体热稳定性虽然有所提高,但受到酶来源的限制,其稳定性仍有较高的提升空间。而本实验中利用热稳定性良好的嗜热 *P. yayanosii* CH1 来源的 L-天冬酰胺酶,通过分子模拟、定点突变等技术对其进行分子改造,进一步提高了该酶的比活力和热稳定性,提高了其在工业、食品方面的应用潜力。证明了 L-天冬酰胺酶催化活性中心的柔

韧度对比酶活有一定影响,其中的 E22K 与 R111L 突变株所得酶的比酶活分别提高了 37%和 31%,并且证明了位于 α -螺旋上的 92 号位氨基酸对 L-天冬酰胺

酶的热稳定性有较大影响,将 M92 突变成 A92 能使其在 85 °C 下的半衰期延长 30 min。本研究对其他来源的 L-天冬酰胺酶的改造具有相应的参考价值。

参考文献:

- [1] MOTTRAM D S, WEDZICHA B L, DODSON A T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction[J]. **Nature**, 2002, 419(6906): 448-449.
- [2] PIETERS R, HUNGER S P, BOOS J, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia[J]. **Cancer**, 2011, 117(2): 238-249.
- [3] PEDRESCHI F, MARIOTTI S, GRANBY K, et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2011, 44(6): 1473-1476.
- [4] HENDRIKSEN H V, KORNBRUST B A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae* [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57(10): 4168-4176.
- [5] YANG H Q, LU X Y, LIU L, 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.
- [6] VIDYA J, USHASREE M V, PANDEY A. Effect of surface charge alteration on stability of L-asparaginase II from *Escherichia sp* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2013, 56(6): 15-19.
- [7] 龙水清, 张显, 张荣珍, 等. 点突变 H125L 和 E145A 对 L-天冬酰胺酶酶活和热稳定性的改善[J]. **食品与发酵工业**, 2016, 42(5): 6-11.
- [8] 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性[J]. **食品与生物技术学报**, 2015, 34(11): 1128-1134.
- [9] LI X, ZHANG X, XU S Q, et al. Simultaneous cell disruption and semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of thermostable L-asparaginases[J]. **Scientific Reports**, 2018, 8(1): 7915.
- [10] LONG S Q, ZHANG X, RAO Z M, et al. Amino acid residues adjacent to the catalytic cavity of tetramer L-asparaginase II contribute significantly to its catalytic efficiency and thermostability[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2016, 82: 15-22.
- [11] ZUO S, XUE D, ZHANG T, et al. Biochemical characterization of an extremely thermostable L-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. **Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic**, 2014, 109: 122-129.
- [12] KRUGER N J. Basic Protein and Peptide Protocols[M]. New York: Humana Press, 1994: 9-15.
- [13] BOWIE J, LUTHY R, EISENBERG D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure [J]. **Science**, 1991, 253(5016): 164-170.
- [14] LOVELL S C, DAVIS I W, ADRENDALL W B, et al. Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation[J]. **Proteins**, 2003, 50(3): 437-450.
- [15] ALEXANDER N, WOETZEL N, MEIER J, et al. BclCluster: a method for clustering biological molecules coupled with visualization in the Pymol Molecular Graphics System[J]. **IEEE International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences**, 2011, 2011: 13-18.
- [16] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIRDCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. **Methods in Molecular Biology**, 1999, 112: 531-552.
- [17] 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]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2009, 103(4): 676-686.
- [18] YAO M, YASUTAKE Y, MORITA H, et al. Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 angstroms resolution[J]. **Biological Crystallography**, 2005, 61: 294-301.