通过融合双亲短肽改善 L-天冬酰胺酶酶学特性

杨套伟， 饶志明*， 贾明媚， 张 显， 徐美娟
（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：L-天冬酰胺酶可以将 L-天冬酰胺水解成 L-天冬氨酸与氨，主要应用在医药与食品行业。作者尝试在 L-天冬酰胺酶 N-末端融合不同的自组双亲短肽，改善该酶的酶学特性。首先，利用分子克隆技术将 6 条分别具有不同特征的短肽与 L-天冬酰胺酶的 N-端融合，并在 *Escherichia coli* BL21 中进行表达，最后，利用 Ni^{2+}-NTA 纯化获得纯的重组 L-天冬酰胺酶酶液。结果表明，融合 SAP4 对 L-天冬酰氨酶（ansZ 酶）动力学特征影响较大，融合蛋白 SAP4-ansZ 的比活力较融合前提高约 30%，其中重组蛋白 K_m 值较原始酶下降了 7.5%，而 V_{max} 值得提升了 10%，说明融合 SAP4 可以改善 ansZ 酶对 L-天冬酰胺的水解效率。

关键词：L-天冬酰胺酶；双亲短肽；融合；酶学特征
中图分类号：Q 55　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2015)11—1178—07

Improvement of Characteristic of L-Asparaginase through Fusing Six Self-Assembling Amphipathic Peptides to Its N-Terminal

YANG Taowei， *RAO Zhiming**， *JIA Mingmei*， *ZHANG Xian*， *XU Meijuan*
（Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：L-asparaginase（Asn）can catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. It is mainly applied in pharmaceutical and food industry. In this study，to improve the characteristic of Asn，we fused six self-assembling amphipathic peptides（SAPs）to its N-terminal and expressed the recombinant Asns in *E. coli*，respectively. Compared to wide-type Asn，the SAP4-Asn activity increased by 30%，the value of K_m decreased by 7.5% and the V_{max} increased by 10%. The reaction kinetics analysis showed that the affinity ability and catalytic efficiency of the fusion enzyme towards L-asparagine improved compared to wide-type Asn.

Keywords：L-asparaginase，self-assembling amphipathic peptides，fusion，characterization

收稿日期：2014-05-20
基金项目：国家 863 计划项目（2015AA021004）；国家自然科学基金项目（31400082）；中央高校基本科研业务费专项资金项目（JUSRP11545）；江苏高校优势学科建设工程资助项目；111 引智计划（111-2-06）项目；江苏省现代发酵工业协同创新中心项目。
作者简介：杨套伟（1983—），男，河南漯河人，工学博士，讲师，主要从事代谢工程、酶工程方面的研究。E-mail：ytw1228@163.com
* **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，主要从事代谢工程、发酵工程方面的研究。E-mail：raozhm@jiangnan.edu.cn

L-天冬酰胺酶(L-asparaginase amidohydrolase，E.C. 3.5.1.1）能够将 L-天冬酰胺水解脱氨基形成 L-天冬氨酸和氨[1]。1961 年，Broome 证明豚鼠血清可以有效抑制白血病细胞 6C3HED[2]。目前，L-天冬酰胺酶已经被制成药剂，成为抗癌以及治疗急性淋巴细胞白血病新药之一，在日本以及欧美等国家均已有该商品酶出售[3]。另外，在食品加工前加入天冬酰胺酶可以有效降低丙烯酰胺含量。Kukurova 等研究发现，在面粉高温处理之前加入不同剂量的天冬酰胺酶，油炸食品中丙烯酰胺的含量较对照减少达 90%，面粉中谷氨酸比未处理的样品增加 37%，而加工产品的颜色没有明显的变化[4]。国内学者刘凌等发现油炸膨化产生的丙烯酰胺含量比微波膨化多，加入一定剂量的 L-天冬酰胺酶后，食品中 95% 以上的 L-Asn 都可以转化成 L-Asp，油炸膨化中丙烯酰胺含量可以减少 45%，表明添加 L-天冬酰胺酶可以从源头上有效地抑制食品加工过程中丙烯酰胺的生成[5]。

从豚鼠血清中提取 L-天冬酰胺酶，不但含量少，且提取工艺复杂；微生物发酵法生产 L-天冬酰胺酶具有周期短，提取成本低等优点，具有广泛的应用前景。目前，利用微生物法生产 L-天冬酰胺酶研究较多的主要包括 *E. coli*、*E. carotovora* 以及 *E. chrysanthemi* 等，但是这些野生菌株酶活力较低，通过分子改造构建高效合成 L-天冬酰胺酶的重组菌是一个有效的手段之一。Sidoruk 等通过将来源于 *Y. pseudotuberculosis* Q66CJ2(YpA)的 L-天冬酰胺酶在 *E.coli* 中异源表达，重组菌酶活可达到 20 U/mL[6]。孙茂盛等将 *E. coli* L-天冬酰胺酶 II 的 β-转角位置 Asp178 换成 Pro，重组酶的热稳定性得到提高，半衰期温度($T_{1/2}^{60\ min}$)由原 58 ℃提高至 63 ℃，而对酶催化活力以及米氏常数 K_m 和 K_{cat} 无影响[7]。

通过化学或分子修饰能够有效改善酶的特征[8-9]。自组双亲短肽(Self-assembling amphipathic peptides，SAP)是由相互交替的亲水性和疏水性氨基酸形成，能够聚集形成有序的纳米结构[10]。因此，SAP 主要应用于纳米技术领域。近年来研究发现，SAP 可以用于改善酶学特性：例如利用这些短肽形成的氢化作用来固定化酶以提高酶活和稳定性[10]，通过融合双亲短肽提高脂肪氧合酶的热稳定性和比酶活 [11]，融合双亲短肽同样可以提高碱性淀粉酶的催化效率、热稳定性以及抗氧化性[12]，而融合双亲短肽对于对 L-天冬酰胺酶还未见报道。

1 材料与方法

1.1 多肽序列

连有 6 种不同的自组双亲短肽(SAP)的重组质粒 pET-22b (+)/SAPs 由江南大学刘龙教授惠赠，6 个不同序列的多肽特征见表 1[13]。位于短肽 SAP 的 C 端和 *ansZ* N 端之间有一段序列为 PTPPTTPTPPTTPTPT 的连接臂(PT linker)，SAP、PT linker 和 *ansZ* 基因连接至表达载体 pET-22b(+)。

表 1 多肽序列及特征

Table 1 Sequences and characterisitics of the peptides

名称	序列	特征
SAP 1	AEAEAKAKEAEAKAK	高亲水性，水溶液中形成 β-折叠结构
SAP 2	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGQAFQERYTAGTNSFVSGVSGVASGAGSIGRR	高疏水性，形成双亲 α-螺旋结构，N 端和 C 端形成无规卷曲
SAP 3	DWLKAFYDKVAEKLKEAFKVEPLRADWLKAFYDKVAEKLKEAF	双亲，螺旋-转角-螺旋结构，37 ℃、pH 7.6 形成 α-螺旋结构
SAP 4	DWLKAFYDKVAEKLKEAFGLLPVLEDWLKAFYDKVAEKLKEAF	双亲，螺旋-转角-螺旋结构，37 ℃、pH 7.6 形成 α-螺旋结构
SAP 5	DWLKAFYDKVAEKLKEAFKVQPYLDDWLKAFYDKVAEKLKEAF	双亲，螺旋-转角-螺旋结构，37 ℃、pH 7.6 形成 α-螺旋结构
SAP 6	DWLKAFYDKVAEKLKEAFNGGARLADWLKAFYDKVAEKLKEAF	双亲，螺旋-转角-螺旋结构，37 ℃、pH 7.6 形成 α-螺旋结构

1.2 N 端融合多肽菌株的构建

重组质粒 pET-22b (+)/SAP-*ansZ* 的构建过程如下：首先以 实验室保藏 pMD18-T-*ansZ*[14]为模板扩增 *ansZ* 基因。引物设计如下：

上游引物:GACCCATGGATATGAAAAAACAACGAATGC (*Nco* I)

下游引物:GACCTCGAGTTAATACTCATTGAAATAAG(*Xho* I)

PCR 产物经纯化后分别连接于同样酶切的 pET-22b(+)/SAP 质粒上,构建重组质粒 pET-22b(+)/SAP-*ansZ*, 重组表达载体通过 $CaCl_2$ 法转化 *E.coli*,获得重组菌 *E.coli*/pET-22b(+)/SAP-*ansZ*,提取质粒并酶切验证,验证正确的转化子,采用甘油法保藏。

1.3 重组酶的纯化

按照 *E. coli* 培养方法, 发酵结束后,4 ℃、8 000 *g* 离心 10 min,弃上清液,收集菌体并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 超声波破碎菌体,4 ℃、10 000 *g* 离心 30 min,收集上清液并用 0.45 μm 无机滤膜过滤。过滤液采用 Ni^{2+}-NTA 纯化,上样至已用 McAc-0 溶液平衡的 Ni^{2+}亲和吸附柱,用 McAc-0 洗去杂蛋白,目的蛋白采用 0~1.0 mol/L 的咪唑溶液进行线性梯度洗脱洗脱, 收集最大吸收峰处的洗脱液, 用于 SDS-PAGE 分析和酶学性质研究。

1.4 酶学性质研究

1.4.1 重组酶的分离纯化

1) 硫酸铵分级沉淀: 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*ansZ* 于最优条件下发酵培养 24 h,于 4 ℃、8 000 *g* 离心 10 min,收集上清液,低温条件下向上清液中添加研碎的 $(NH_4)_2SO_4$ 粉末至 6 个不同饱和度 (30%~80%),0 ℃静置,4 ℃、10 000 *g* 离心 30 min,收集上清液,沉淀用含有 1.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)溶解,分别测定上清液与沉淀的酶活。

2)疏水层析:重新溶解的沉淀采用 0.45 μm 无机滤膜过滤, 过滤液上样至 Butyl Sepharose HP 层析柱,用含 1.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 Tris-HCl 缓冲液清洗杂蛋白至基线平衡,目的蛋白用 0~1.5 mol/L 的 $(NH_4)_2SO_4$ 缓冲液线性梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min,收集目标蛋白,透析袋透析去除盐离子,透析后的蛋白用于 SDS-PAGE 分析和酶学性质研究。

1.4.2 重组酶的酶学性质研究

1)Asn 的最适反应 pH 和反应温度: 将纯酶液分别加入到不同 pH 缓冲液中 (pH 3.0~6.5,0.05 mol/L citrate-sodium citrate buffer;pH 6.5~9.0,0.05 mol/L Tris-HCl buffer;pH 9.0~10.0,0.05 mol/L borax-sodium hydroxide buffer), 于 37 ℃反应 15 min,氨气敏电极测定酶活,考察不同 pH 缓冲液对天冬酰胺酶催化反应的影响,获得重组酶的最适反应 pH。在最优 pH 条件下,将纯酶液添加到反应体系中, 将反应体系分别置于 20~70 ℃(每隔 5 ℃为一个梯度)反应 15 min,反应结束后测定酶活,分析不同反应温度对天冬酰胺酶催化反应的影响,获得此酶的最适反应温度。

2)Asn 的 pH 稳定性和热稳定性: 将该酶放置于不同 pH 缓冲液中,0 ℃保温 24 h,每隔一段时间取样,测定酶活,考察 *ansZ* 在不同 pH 缓冲液中的稳定性。将纯酶液分别在-20、0、20、30、40、50、60 ℃放置 10 h,每隔一段时间取样,于最适反应 pH 和温度下反应 15 min,测定酶活,考察 *ansZ* 在不同温度下的稳定性。

3)Asn 反应动力学常数 K_m 值和 V_{max}:配制不同浓度的 L-Asn 和 L-Gln 缓冲液, 加入过量的纯酶液,反应体系置于最适条件下反应,通过氨气敏电极测定产物氨的增加量, 通过 Lineweaver-Burk 作图法计算获得 K_m 值和 V_{max}。

1.5 Asn 的结构模拟和分析

Asn 的结构采用 EasyModeller2.0 软件模拟,以 L-天冬酰胺酶 1hg0B 为模板,模拟出的 3-D 结构采用 Discovery studio 2.5 软件进行分析。

1.6 Asn 酶活测定

酶活测定采用氨电极法,氨电极可以测定溶液中的溶解氨[15-16]。检测设备包括连接至数显 pH 计的氨气敏电极和磁力搅拌器。25 mL 反应体系:10 mL、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液,10 mL、0.05 mol/L L-Asn, 加入 0.5~1.0 mL 的酶液,37 ℃水浴反应 15 min,加入 5 mL、15% 三氯乙酸终止反应,对照管在水浴反应之前加入 5 mL、15% 三氯乙酸。氨电极采用不同浓度的 NH_4Cl 溶液校正并获得铵离子标准曲线。酶活单位:按照以上条件,单位体积酶催化 L-天冬酰胺产生 1 μmol/L 的氨所消耗的酶量为 1 个酶活单位。蛋白质浓度采用 Bradford 法测定[17]。

1.7 Asn 酶纯化指标的计算

总活力=活力单位数/mL 酶液×总体积(mL)

比活力 (U/mg 蛋白质)=活力单位数/mg 蛋白质=总活力单位数/mg 总蛋白质

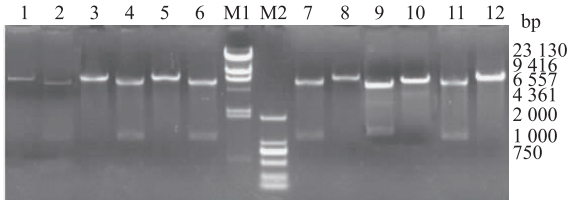
纯化倍数=第一次的比活力/每次的比活力

回收率(%)=第一次总活力/每次总活力×100%

2 结果与讨论

2.1 重组菌 *E. coli* BL21/pET-22b(+)-SAP-*ansZ* 的构建

将表 1 所述的 6 条 SAP 分别与 *ansZ* 的 N 端接，多肽与 *ansZ* 之间采用 PT linker 连接。重组载体转化 *E. coli* BL21，通过 Amp 抗性筛选阳性转化子，酶切验证结果见图 1。由图 1 可知，6 条多肽菌连接至载体 pET-22b(+)，经过 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切后获得 1.1 kb 和 5.7 kb 左右大小的线性化基因片段。



M1：λ Hind III DNA Marker；M2：DL2000 DNA Marker
1，3，5，7，9，11：pET-22b(+)/SAP-*ansZ* digested by *Xho* I；
2，4，6，8，10，12：pET-22b (+)/SAP-*ansZ* digested by *Xho* I and *Nco* I.

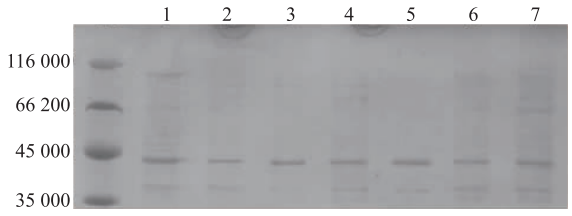
图 1 多肽融合重组质粒酶切验证图

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmids by enzyme digestion

2.2 重组蛋白的表达与纯化

按照 2. 3 方法，采用 Ni^{2+}-NTA 进行纯化，获得纯酶液，对纯酶液进行酶活测定及 SDS-PAGE 分析，融合蛋白的纯化结果见表 2。以不融合多肽的重组蛋白 Asn 作为对照，融合 SAP5 和 SAP6，重组酶的比活力较对照有所下降，SAP6 下降最明显。融合 SAP1 对比酶活基本没有影响，融合 SAP2、SAP3 和 SAP4，重组蛋白的比酶活菌有所提高，其中 SAP4-*ansZ* 比酶活是对照的 1.3 倍。

纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析结果见图 2，由电泳结果可知，经过 Ni^{2+}-NTA 纯化后，获得单一的条带，相对分子质量大小约为 38 000 左右。



M：Protein Marker；1：*E. coli* BL21/pET-22b (+)-SAP1-*ansZ*；2：*E. coli* BL21/pET-22b (+)-SAP2-*ansZ*；3：*E. coli* BL21/pET-22b (+)-SAP3-*ansZ*；4：*E. coli* BL21/pET-22b (+)-SAP4-*ansZ*；5：*E. coli* BL21/pET-22b (+)-SAP5-*ansZ*；6：*E. coli* BL21/pET-22b(+)-SAP6-*ansZ*；7：*E. coli* BL21/pET-22b-*ansZ*

图 2 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified fusion proteins

表 2 融合蛋白的纯化结果

Table 2 Purification of the fusion proteins

样品	纯化步骤	总蛋白质量/mg	总活力/U	比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
E.coli BL21/	粗酶液	2.96	48.67	16.44	100	1.0
pET-22b(+)-*ansZ*	Ni-NTA	0.50	41.76	82.19	85.80	4.99
E.coli BL21/	粗酶液	3.02	51.84	17.16	100	1.0
pET-22b(+)-SAP1-*ansZ*	Ni-NTA	0.54	44.15	81.75	85.16	4.76
E.coli BL21/	粗酶液	2.38	54.56	22.92	100	1.0
pET-22b(+)-SAP2-*ansZ*	Ni-NTA	0.45	38.40	84.67	70.38	3.69
E.coli BL21/	粗酶液	3.16	56.96	18.02	100	1.0
pET-22b(+)-SAP3-*ansZ*	Ni-NTA	0.51	48.24	94.03	84.69	5.22
E.coli BL21/	粗酶液	2.90	73.12	25.20	100	1.0
pET-22b(+)-SAP4-*ansZ*	Ni-NTA	0.40	42.75	106.70	58.46	4.20
E.coli BL21/	粗酶液	3.06	52.64	17.20	100	1.0
pET-22b(+)-SAP5-*ansZ*	Ni-NTA	0.51	38.05	74.60	72.28	4.33
E.coli BL21/	粗酶液	3.10	32.16	10.32	100	1.0
pET-22b(+)-SAP6-*ansZ*	Ni-NTA	0.59	23.17	39.01	72.06	3.78

2.3 重组蛋白酶学性质研究

2.3.1 重组蛋白的最适反应 pH 及 pH 稳定性 从图 3(a) 可知,融合 SAP1、SAP2、SAP5 和 SAP6 的重组酶的最适 pH 没有产生变化,最适 pH 值 7.5,与不融合多肽的重组蛋白 Asn 相似,融合 SAP3 和 SAP4 的重组蛋白最适 pH 由 7.5 上升至8.0。由 3 (b) 可知,融合多肽后,重组酶的 pH 稳定性改变不明显,融合蛋白稳定性范围与 Asn 较一致。

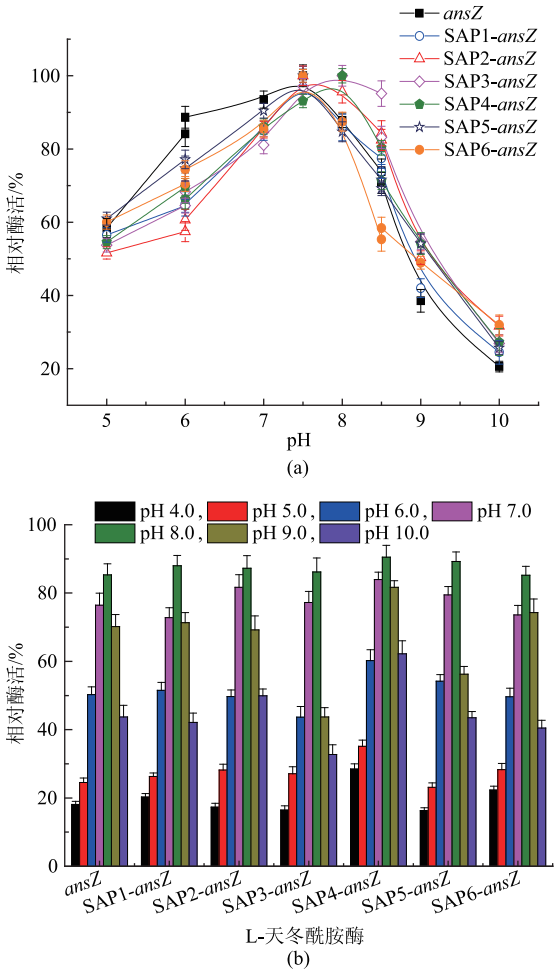


图 3 融合蛋白的最适 pH(a)及 pH 稳定性(b)

Fig. 3 Effects of pH (a) and pH stability on the fusion proteins(b)

2.3.2 重组蛋白的最适反应温度及热稳定性 由图 4 (a) 可知, 融合蛋白的最适反应温度为 37~40 ℃。融合 SAP4 和 SAP5 的重组酶最适反应温度与对照 *ansZ* 一致,均为 40 ℃,融合 SAP1、SAP2、SAP3 和 SAP6 最适反应温度稍微下降, 由 40 ℃变为 37 ℃。图 4(b) 为融合蛋白的热稳定性结果。融合多肽后, 重组酶的热稳定性较对照仅发生细微的变化,热稳定性范围与对照较相似。

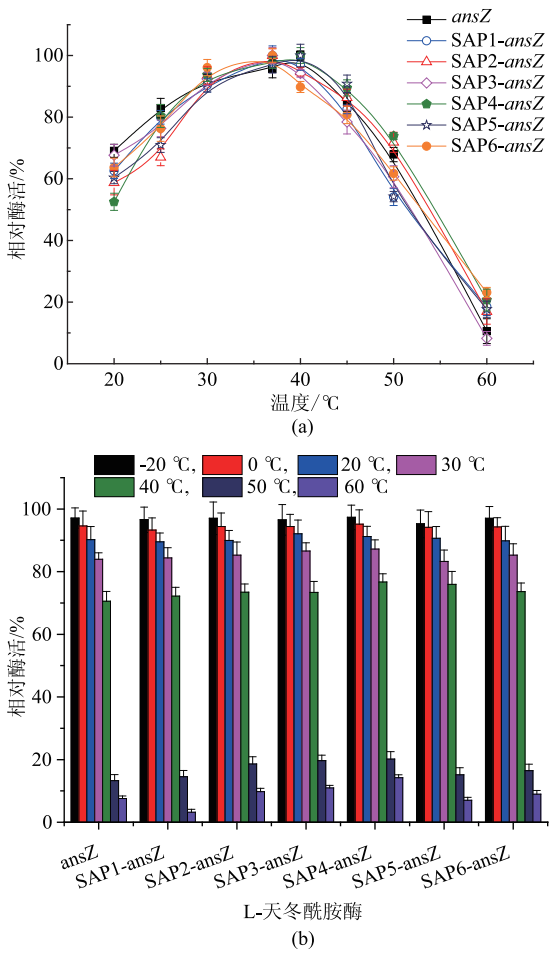


图 4 融合蛋白的最适温度(a)及热稳定性(b)

Fig. 4 Effects of temperature(a) and thermal stability on the fusion proteins(b)

2.3.3 重组蛋白的动力学常数 按照米氏方程,采用 Lineweaver-Burk 作图法求得融合蛋白的动力学常数,结果见表 3。从表 3 可知,融合 SAP1、SAP2、SAP3、SAP4 和 SAP6 重组蛋白的米氏常数 K_m 均下降, 其中融合 SAP1 变化最大,K_m 值由 0.68 mmol/L 下降为 0.49 mmol/L, 而融合 SAP5 酶的 K_m 值有所上升, 其 K_m 值为 0.75 mmol/L。只有融合 SAP2 和 SAP4 的重组蛋白最大反应速率 V_{max} 较对照有所增大,其中融合 SAP4 V_{max} 由 60.24 μmol/(L·min)上升至66.22 μmol/(L·min),其他多肽的融合均导致 V_{max} 不同程度下降,SAP3 下降最明显,V_{max} 值仅为 25.25 μmol/(L·min)。因此,融合 SAP4 对 Asn 酶动力学特征影响较大, 其中重组蛋白 K_m 值较原始酶下降了 7.5%,而 V_{max} 值得提升了 10%,说明融合 SAP4 可以

改善 *ansZ* 酶对 L-天冬酰胺的水解效率。

表 3　融合蛋白的动力学常数

Table 3　Kinetic parameters of the fusion proteins

样品	K_m/(mmol/L)	V_{max}/(μmol/(min·L))
pET-22b(+)-*ansZ*	0.68±0.03	60.24±2.53
pET-22b(+)-SAP1-*ansZ*	0.49±0.02	57.80±2.18
pET-22b(+)-SAP2-*ansZ*	0.67±0.03	64.93±2.65
pET-22b(+)-SAP3-*ansZ*	0.56±0.02	25.25±0.89
pET-22b(+)-SAP4-*ansZ*	0.63±0.03	66.22±2.83
pET-22b(+)-SAP5-*ansZ*	0.75±0.03	60.97±2.42
pET-22b(+)-SAP6-*ansZ*	0.59±0.02	51.02±2.26

2.4　重组蛋白结构模拟与分析

由酶学性质研究结果发现，融合 SAP4 的重组酶比活力较对照获得提高，酶的催化效率获得一定程度提高，底物亲和力也有所提高。采用计算机模拟获得了原始酶 Asn 和重组酶 SAP4-*ansZ* 的结构，和其他已报道结构的 L-天冬酰胺酶一样，该酶是一个四聚体复合物，含有四个亚基[18]，每个亚基含有 14 个 β 折叠和 8 个 α 螺旋结构。为了便于观察，我们将连接多肽的亚基结构单独显示出来，见图 5，并探讨短肽的加入对其活性位点结构的影响。L-天冬酰胺酶 N 端的活性位点包括 Thr 36、Ser 84、Glu 87、Thr 109、Asp 112 和 Ala 148，除了 Ser 84 和 Glu 87 位点外，其它氨基酸残基都是非常保守的[18-19]。在催化反应过程中亲核试剂主要为 Thr 残基，酶活性中心的 Thr 残基上的羟基亲核攻击底物 β-羰基上的 C 原子，形成四面体中间构型[18]。

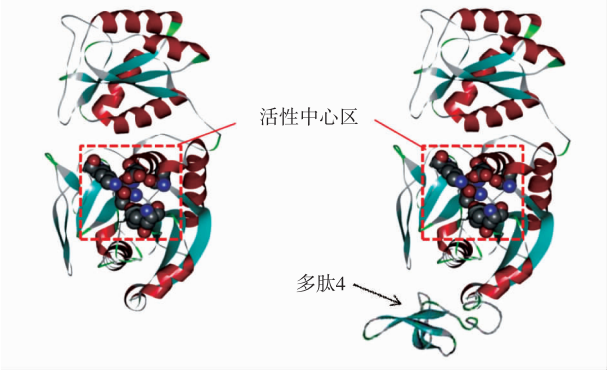
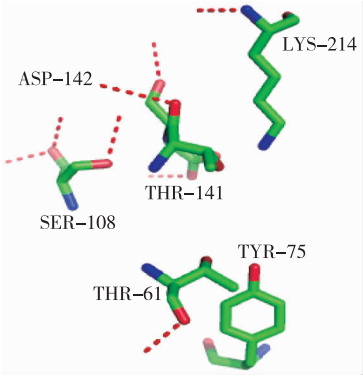


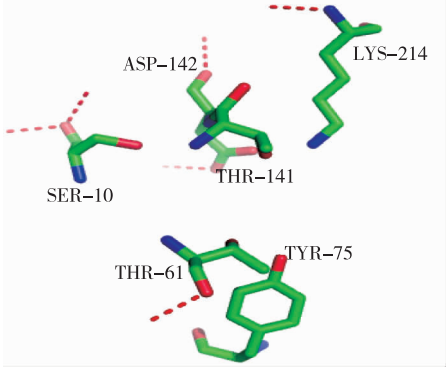
图 5　Asn(a)和 SAP4-*ansZ*(b)的 3-D 结构

Fig. 5　3-D structure of Asn(a) and SAP4-*ansZ*(b)

图 6 为酶的活性位点分析结果，SAP4-*ansZ* 的活性位点与 Asn 相比较，构象有细微的改变，而且融合后活性位点周围的氢键数及盐离子键也减少，氢键和离子键的减少会使活性位点之间的催化残基变得更灵活。因此，氢键和离子键的改变可能会使酶的催化效率及对底物亲和力提高[20]。



(a)



(b)

图 6　Asn(a)和 SAP4-*ansZ*(b)的活性位点分析

Fig. 6　Analysis of the active site of Asn (a) and SAP4-*ansZ*(b)

3　结　语

作者通过融合 SAP4 双系短肽改善 L-天冬酰氨酶对 L-天冬酰胺的水解效率，而对该酶其它特征影响并不明显。另外，该方法对于改善其它酶的特征提供了借鉴。

参考文献:

[1] Ferrara M A,Severino N M B,Mansure J J,et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2006,39(7):1457-1463.

[2] Broome J D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects[J]. **Nature**,1961,191(4793):1114-1115.

[3] Pieters R,Hunger S P,Boos J,et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia:a focus on *Erwinia asparaginase* [J]. **Cancer**,2011,117(2):238-249.

[4] Kukurova K,Morales F J,Bednarikova A,et al. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model [J]. **Molecular Nutrition & Food Research**,2009,53(12):1532-1539.

[5] 刘凌,王文艳,薛毅,等. 膨化板栗片中丙烯酰胺的形成与其前体物质的酶法控制[J]. 食品科技,2012(9):77-81.
LIU Ling,WANG Wenyan,XUE Yi,et al. Acrylamide formation in preparing puffed chestnut chips and controlling the precursors by asparaginase[J]. **Food Science and Technology**,2012(9):77-81.(in Chinese)

[6] Sidoruk K V,Pokrovsky V S,Borisova A A. Creation of a producent,optimization of expression,and purification of recombinant yersinia pseudotuberculosis L-asparaginase.[J]. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**,2011,152(2):219-223.

[7] Li L Z,Xie T H,Li H J,et al. Enhancing the thermostability of *Escherichia coli* L-asparaginase II by substitution with pro in predicted hydrogen-bonded turn structures[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2007,41(4):523-527.

[8] 张静,田亚平. 丁二酸酐修饰对枯草芽孢杆菌氨肽酶结构及酶学特性的影响[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(6):622-627.
ZHANG Jing,TIAN Yaping. Chemical modification of the bacillus subtilis aminopeptidase by succinic anhydride and its enzyme properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(6):622-627.(in Chinese)

[9] 吴丹,郑贤良,吴敬. 不同宿主来源的α-环糊精葡萄糖基转移酶分离纯化及化学修饰提高其热稳定性[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(3):287-292.
WU Dan,ZHENG Xianliang,WU Jing. Purification of α-cyclodextrin glycosyltransferase and study of thermal stability improvement by chemical modification[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(3):287-292.(in Chinese)

[10] Wang Q,Yang Z,Gao Y,et al. Enzymatic hydrogelation to immobilize an enzyme for high activity and stability[J]. **Soft Matter**,2008,4(3):550-553.

[11] Lu X,Liu S,Zhang D,et al. Enhanced thermal stability and specific activity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase by fusing with self-assembling amphipathic peptides[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(21):9419-9427.

[12] Yang H,Lu X,Liu L,et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α-amylase from *Alkalimonas amylolytica* smultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency,thermal stability,and resistance to oxidation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2013,79(9):3049-3058.

[13] Yang H,Lu X,Liu L,et al. Fusion of an 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.

[14] Jia M,Xu M,He B,et al. Cloning,expression,and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2013,61(39):9428-9434.

[15] Karmali M A,Roscoe M,Fleming P C. Modified ammonia electrode method to investigate D-asparagine breakdown by *Campylobacter* strains[J]. **Journal of Clinical Microbilolgy**,1986,23(4):743-747.

[16] Karmali M A,Williams A,Fleming P C,et al. Use of an ammonia electrode to study bacterial deamination of amino acids with special reference to D-asparagine breakdown by *Campylobacters*[J]. **The Journal of Hygiene**,1984,93:189-196.

[17] Walker J M. Basic protein and peptide protocols[M]. Totowa:Humana Press,1994.

[18] Kislitsyn Y A,Kravchenko O V,Nikonov S V,et al. Three-dimensional structure of *Erwinia carotovora* L-asparaginase [J]. **Crystallography Reports**,2006,51(5):811-816.

[19] Kravchenko O V,Kislitsin Y A,Popov A N,et al. Three-dimensional structures of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* complexed with aspartate and glutamate[J]. **Acta Crystallographica Section D**,2008,64(3):248-256.

[20] 杨海泉. 碱性淀粉酶的异源表达及分子改造[D]. 无锡:江南大学,2013.