



## 北京棒杆菌天冬氨酸激酶突变体 Q316P 的酶学性质

张芷睿, 陈晨, 韩彩静, 高云娜, 刘春雷, 闵伟红\*

吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林 长春 130118

**摘要:**【目的】对北京棒杆菌(*Corynebacterium pекinense*)天冬氨酸激酶(Aspartate kinase, AK)进行改造, 期望获得具有较高酶活力且酶活性质改善的高产天冬氨酸族氨基酸的优良突变株, 并削弱甚至解除 Thr 对 AK 的反馈抑制作用。【方法】利用定点突变技术对 Gln(Q)316 位点进行突变, 高通量筛选获得活力提高明显的突变体, 并将其在大肠杆菌 BL21 中高效表达, 对野生型(Wild type, WT)和突变体 Q316P AK 用镍柱纯化, 进行酶动力学及酶学性质研究。【结果】获得突变体 Q316P, 并在大肠杆菌 BL21 中成功表达。与野生型相比, 突变体 Q316P 的  $V_{\max}$  提高 8.53 倍,  $n$  值由 2.15 降低为 1.29, 正协同性减弱; 最适温度由 25 °C 升高至 30 °C; 最适 pH 由 8.0 降低至 7.5, 半衰期由 3.8 h 延长至 5.0 h; 且在实验范围浓度内, 底物抑制剂苏氨酸对突变体 Q316P 表现出激活作用; Q316P AK 对金属离子  $K^+$  和有机溶剂甲醇表现出良好抗性。【结论】获得酶活力提高、酶学性质改善的突变体, 并一定程度上解除苏氨酸对 AK 的反馈抑制, 为构建高产天冬氨酸族氨基酸工程菌提供参考。

**关键词:** 北京棒杆菌, 天冬氨酸激酶, 定点突变, 动力学, 酶学性质

天冬氨酸激酶(Aspartate kinase, AK)是天冬氨酸族氨基酸合成途径的首个关键酶<sup>[1]</sup>, 对天冬氨酸族氨基酸生产具有重要意义, 该途径合成人体必需氨基酸, 如苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸以及异亮氨酸<sup>[2-3]</sup>。由天冬氨酸代谢途径<sup>[4-5]</sup>可知, AK 受到 Thr 和 Lys 的协同反馈抑制作用, 限制了天冬氨酸族氨基酸的积累。因此解除对 AK 的反馈抑制, 对提高其酶活力, 改善其酶学性质具有重要意义。

北京棒杆菌(*Corynebacterium pекinense*)最初由我国鉴定并用于生产 L-谷氨酸<sup>[6]</sup>, 其天冬氨酸族氨基酸的生产潜力有待进一步挖掘。2011 年, 汪一名<sup>[7]</sup>对北京棒杆菌天冬氨酸激酶(CpAK)进行基因克隆, 并与其他已知棒杆菌中天冬氨酸激酶序列比对分析, 结果表明, CpAK 与谷氨酸棒杆菌天冬氨酸激酶(AK from *Corynebacterium glutamicum*, CgAK)氨基酸同源性高达 99.58%, 且反馈抑制机制相似。Yoshida<sup>[8]</sup>通过对 CgAK 抑制机制分析表

基金项目: 吉林省玉米生物高效转化及精深加工创新团队(20150519012JH)

\*通信作者。Tel: +86-431-84533329; E-mail: minwh2000@vip.163.com

收稿日期: 2017-06-23; 修回日期: 2017-07-29; 网络出版日期: 2017-09-27

明, Gln298 的氮原子与抑制剂 Thr 的羟基端以离子键直接相连。通过序列分析可知, CgAK 中 Gln298 对应于 CpAK 中 Gln(Q)316, 我们推测, 破坏 Gln298 与抑制剂 Thr 之间的作用力有利于削弱甚至解除 Thr 对 AK 的反馈作用。因此本研究采用定点突变技术, 通过高通量筛选, 获得重要突变体, 研究其酶动力学及酶学性质, 期望获得发酵能力较强、性质改善并稳定遗传的突变菌株, 为构建高产天冬氨酸族氨基酸工程菌提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** 北京棒杆菌 *C. pekinense* E31, 由中国科学院微生物研究所提供; 重组质粒 pET-28a-AK<sup>[7]</sup>, 由吉林农业大学发酵工程实验室提供; 表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基<sup>[9]</sup>, 本研究中除特殊说明外, 均含 50 µg/mL 卡那霉素。

**1.1.3 试剂:** 引物合成和菌液测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 质粒抽提试剂盒、PCR 试剂盒、电泳 Marker, 购于大连 TaKaRa 公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒, 购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 卡那霉素、IPTG 购于 Genview 公司; 非变性镍柱柱料, 购于 GE 公司。

### 1.2 引物设计及饱和定点突变

用 Primer Premier 5 引物设计软件对 CpAK 中 Q316 位点进行设计, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成, 引物设计如下, 上游引物 5'-CAACATTGACATGGTTCTGNNNAACGTCTCCTC-3', 下游引物 5'-CTTCCACAGAGGAGACGTTNNNCAGAACCATG-3'。其中划线部分为突变位

点。利用合成的引物, 以重组质粒 pET-28a-AK 为模板, 进行突变 PCR 扩增, 反应体系及条件见参考文献[10]。将 PCR 产物经 0.1% 琼脂糖凝胶电泳验证。成功扩增的 PCR 产物用 *Dpn* I 酶消化, 以去除甲基化模板, 消化后产物可直接用于转化实验。

### 1.3 消化质粒转化

取 1.2 µL 消化产物转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 冰浴 10 min, 42 °C 热激 90 s, 再冰浴 2 min, 后加入 900 µL 不含卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C、160 r/min 培养 1 h, 8000 r/min 离心 1 min, 吸取 800 µL 上清液, 弃去, 在剩余上清液中将菌体重悬, 涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 对照组为不含卡那霉素的空感受态。

### 1.4 突变株高通量筛选及 AK 基因验证

将转化成功的单菌落接种至含有 200 µL LB 液体培养基的 96 孔板中, 于 37 °C、180 r/min 过夜培养。吸取 10 µL 菌液接种至新的 96 孔板中, 37 °C、200 r/min 培养 4.5 h, 加入 IPTG 诱导剂(终浓度为 1 mmol/L), 30 °C、130 r/min 诱导 8 h。诱导后 3500 r/min 离心 45 min, 弃上清, 收集菌体。加入 100 µL PBS 重悬菌体, 于 -80 °C、30 min 与 30 °C、30 min 反复冻融 3-5 次。用酶标仪在波长 540 nm 下测其吸光度。选择酶活力提高明显的突变株转入 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 过夜培养。在克隆引物作用下, 以活化菌体为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系及条件见参考文献[10]。将 PCR 产物进行 0.1% 琼脂糖凝胶电泳验证。将成功验证的菌株送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 确定突变型。

### 1.5 AK 诱导表达及蛋白纯化

取 2 mL 菌液转入 100 mL LB 液体培养基中扩

大培养, 加 IPTG 诱导蛋白表达, 诱导发酵 8 h, 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 后弃掉上清液, 收集菌体。参照朱运明<sup>[11]</sup>实验方法将粗酶液经非变性镍柱纯化, 所得即为 AK 纯化液。将粗酶液和纯化液进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 验证, 方法见参考文献[12]。

## 1.6 AK 酶活力测定

以 L-天冬氨酸为底物, 对天冬氨酸激酶进行酶活力测定。酶活力表示为  $U=1000 \times A_{540nm}$ , 以每分钟每毫克蛋白质(考马斯亮蓝法)生成稳定的异羟肟酸微摩尔数为比活力<sup>[13]</sup>。酶活测定体系为: 800 mmol/L KCl、10 mmol/L L-Asp、100 mmol/L Tris-HCl、800 mmol/L NH<sub>4</sub>OH、10 mmol/L β-巯基乙醇、10.4 mmol/L ATP、1.6 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 每孔加入 10 μL 酶液, 28 °C、130 r/min 反应 30 min<sup>[13-15]</sup>。反应后加入等体积的三氯化铁终止试剂混匀, 于波长 540 nm 下测其吸光度。

## 1.7 AK 酶动力学研究

酶活力测定方法为反应体系中其他条件不变的情况下, 改变底物浓度(分别为 0.5、1、3、5、7、9、10、12、14、16 mmol/L), 测定 AK 的活力。以 Hill 方程  $V=V_{max}(S^n)/(K^n+S^n)$  进行线性拟合。

## 1.8 AK 酶学性质研究

**1.8.1 最适 pH 研究:** 反应体系其他条件不变, 改变 Tris-HCl 的 pH(从 6.0–10.0, 每组间隔 0.5), 设置 10 组实验, 测定 AK 最适 pH。以最高酶活定义为 100%。

**1.8.2 最适温度研究:** 反应体系不变, 在不同温度下(15、20、25、26、28、30、35、40、45、50 °C)测定 AK 最适温度, 以最高酶活定义为 100%。

**1.8.3 稳定性研究:** 在最适 pH 和最适温度下, 相同反应体系, 每隔 1 h 测定 1 次酶活。以 0 h 相对

酶活定义为 100%。

**1.8.4 底物抑制剂对 AK 活力的影响:** 向反应体系中添加不同浓度(0.2、1.0、5.0、10.0 mmol/L)的底物抑制剂, 分别为 Thr、Lys、Met、Thr+Lys、Thr+Met、Lys+Met、Thr+Lys+Met, 测定其对 AK 活力的影响, 以不添加底物抑制剂的对照组相对酶活定义为 100%。

**1.8.5 金属离子对 AK 活力的影响:** 反应体系其他条件不变, 分别测定在不同浓度(0.2、1.0、5.0、10.0 mmol/L)的金属离子(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>)存在的条件下, 对 AK 活力的影响, 以不添加金属离子的对照组相对酶活定义为 100%。

**1.8.6 有机溶剂对 AK 活力的影响:** 向反应体系中添加不同浓度(0.2、1.0、5.0、10.0 mmol/L)的有机溶剂, 分别为甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、乙腈、二甲基亚砜、甘油, 测定其对 AK 活力的影响, 以不添加有机溶剂的对照组相对酶活定义为 100%。

## 1.9 数据分析

每组实验重复 3 次, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。采用软件 Origin Pro 8.5 作图。

# 2 结果和分析

## 2.1 天冬氨酸激酶突变体 Q316P 重组菌的构建

以 pET-28a-AK 提取的质粒为模板, 在引物的作用下, 选择 54、56、58 °C 3 个退火温度, 进行突变 PCR。将突变 PCR 产物在 1% 琼脂糖核酸电泳下进行验证, 验证结果如图 1-A 显示, 突变 PCR 产物在 7000 bp 处具有明亮条带, 这与 pET-28a-AK 质粒长度 6822 bp (pET-28a 5369 bp, CpAK 1453 bp) 相符, 证明质粒在引物作用下实现了大量的复制。

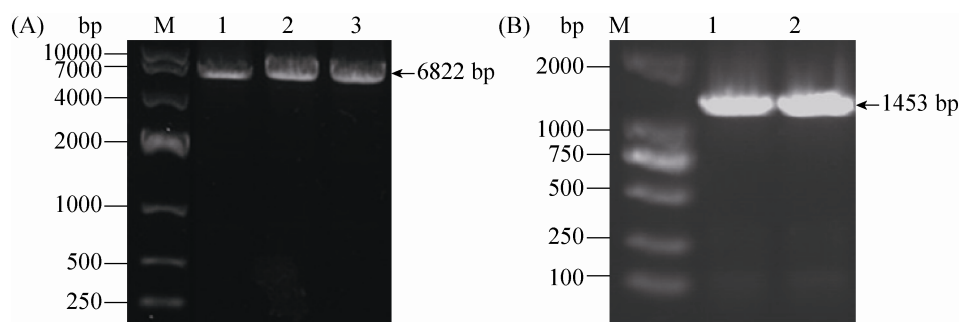


图 1. PCR 产物的 1%琼脂糖核酸电泳验证

Figure 1. 1% agarose electrophoresis of PCR products. A: the result of PCR mutant products. M: 10000 bp DNA marker; lane 1: annealing temperature 54 °C; lane 2: annealing temperature 56 °C; lane 3: annealing temperature 58 °C. B: verification of the AK gene; M: 2000 bp DNA marker; lane 1: WTAK; lane 2: mutant.

将挑取的单克隆菌落,在液体 LB 培养基中活化后,以其为模板进行 PCR 扩增,经 1%琼脂糖核酸电泳验证,验证结果如图 1-B 显示,在 1000–2000 bp 之间有明亮条带,突变体与野生型一致,符合 AK 长度 1453 bp,证明 AK 基因已成功导入大肠杆菌 BL21 感受态中。将验证成功的突变株测序,结果显示突变株为 Q316P,即由极性不带电荷的氨基酸谷氨酰胺(Gln)突变为非极性氨基酸脯氨酸(Pro)。

## 2.2 野生型和突变体 Q316P 蛋白表达与纯化

野生型和突变体 Q316P 经非变性镍柱纯化后,SDS-PAGE 和 Western blotting 验证结果如图 2,野生型粗酶液、纯化液和突变体 Q316P 纯化液在 48 kDa 左右处均存在明亮条带,这与 Kalinowski 等<sup>[16]</sup>所报道的结果相符。Western blotting 结果显示,在同一位置处野生型和突变体 Q316P 具有目的条带,表明 AK 蛋白表达成功。

## 2.3 野生型和突变体 Q316P 的动力学结果

以 L-天冬氨酸为底物,利用紫外可见分光光度计分别对野生型和突变体 Q316P 中 AK 活力进行测定。测定结果用 OriginPro8.5 软件进行动力学

曲线拟合,结果如图 3 所示。突变体 Q316P AK 的最大反应速率  $V_{\max}$  为 30.62 U/(mg·min),较野生型 [ $V_{\max}$  为 3.59 U/(mg·min)] 提高了 8.53 倍。野生型 AK 的动力学参数  $K_m$  为 4.15,突变体 Q316PAK 的  $K_m$  值为 5.69,表明突变后酶与底物的亲和力有所降低。结果显示,野生型 AK 的希尔系数  $n$  值为 2.15,属于别构酶,突变体 Q316P AK 的  $n$  值为 1.29,突变后 AK 的正协同性降低,趋于米氏酶,表明突变后不利于与抑制剂相结合,这可能是由于 Gln316 为极性不带电氨基酸,突变后 Pro316

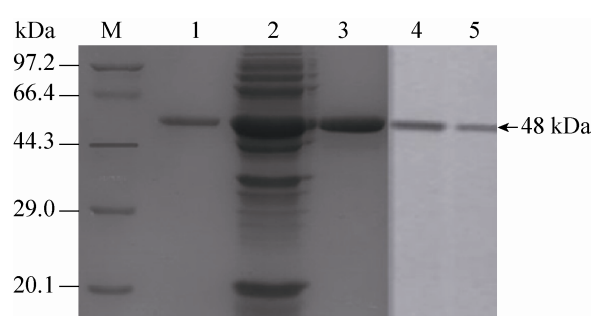


图 2. 12% SDS-PAGE 和 Western blotting 验证结果  
Figure 2. Results of 12% SDS-PAGE and Western blotting. M: protein marker; lane 1: the purification of WTAK; lane 2: the mixing of WTAK; lane 3: the purification of Q316P AK; lane 4: the Q316P AK result of Western blotting; lane 5: the WTAK result of Western blotting.

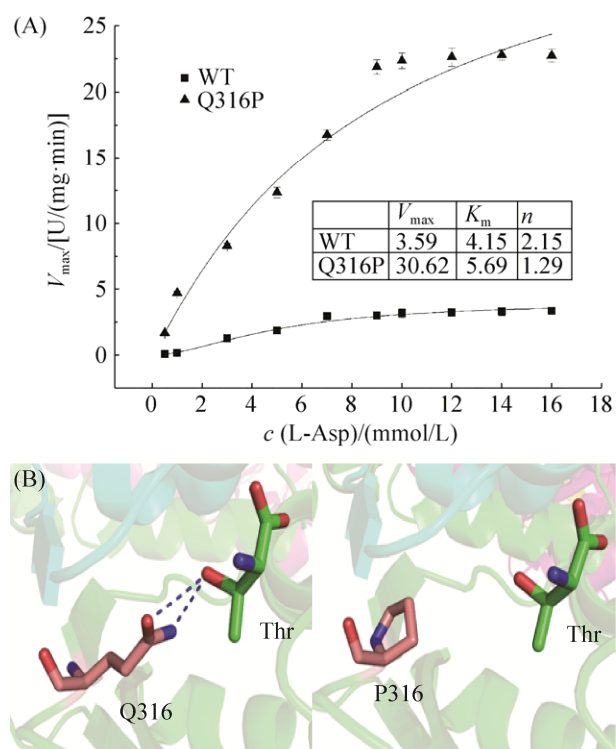


图 3. 野生型和突变体 Q316P 动力学结果

Figure 3. Dynamics result of WT and mutant Q316P. A: dynamics curves of WT and mutant Q316P; B: position change diagram of mutant and WT.

为非极性脂肪族氨基酸(图 3-B), 且突变后与抑制剂 Thr 间离子键断裂, 氨基酸侧链缩短, R 基远离抑制剂 Thr, 使抑制剂 Thr 稳定性降低。

## 2.4 野生型和突变体 Q316P 酶学性质表征

**2.4.1 最适温度和 pH 值:** 由图 4-A 可知, 突变体 Q316P 最适温度为 30 °C, 比野生型 AK 提高了 5 °C。突变体 Q316P 在 15–30 °C 范围内, 酶活力随温度升高而增高, 在 30–50 °C 范围内酶活力随之升高而降低, 与野生型相比, 突变体 Q316P 表现出良好的耐热性。由图 4-B 可知, 突变体 Q316P 最适 pH 为 7.5, 比野生型 AK 降低了 0.5, pH 小于 7.5 时, 酶活力随 pH 升高而增高, 表现出良好的耐酸性, 当 pH 大于 7.5 时, 酶活力急剧下降, pH 为 10 时, 酶活力已不足 10%。

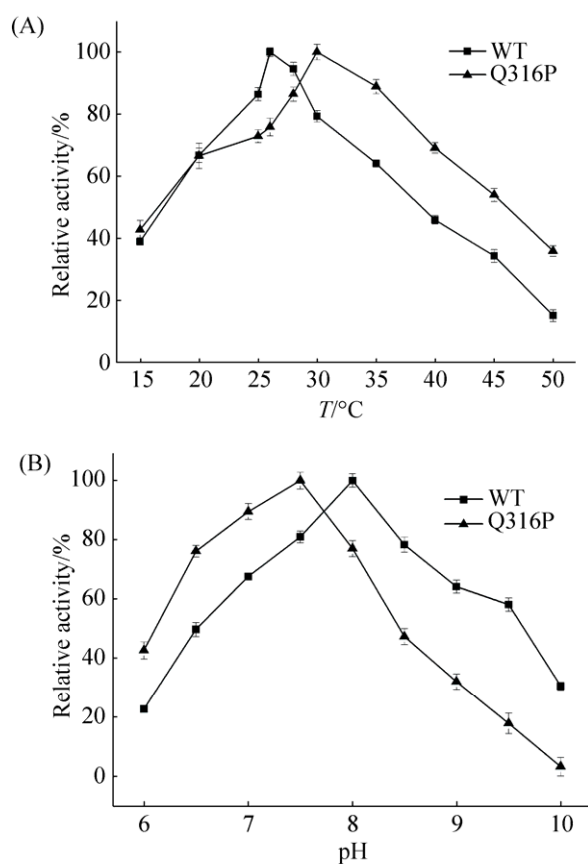


图 4. 野生型和突变体 Q316P 最适温度(A)和最适 pH 值(B)

Figure 4. The effect of optimum temperature (A) and pH (B) to WT and mutant Q316P. Results are means $\pm$ SD of three parallel measurements.

**2.4.2 热稳定性:** 图 5 为在最适温度 30 °C 和最适 pH 为 7.5 的条件下, 野生型和突变体 Q316P 相对酶活力与时间变化的关系, 当相对酶活力下降至最初状态的一半时的时间即为酶的半衰期。由图 5 可知, 野生型的半衰期为 3.8 h, 突变体 Q316P 的半衰期较野生型提高了 1.2 h, 在 5.0 h 时相对酶活力达到 50%。突变后半衰期升高可能是由于突变是从亲水性氨基酸 Q316 变为疏水性氨基酸 P316, 增加了蛋白质的堆叠, 从而提高稳定性<sup>[17–18]</sup>。

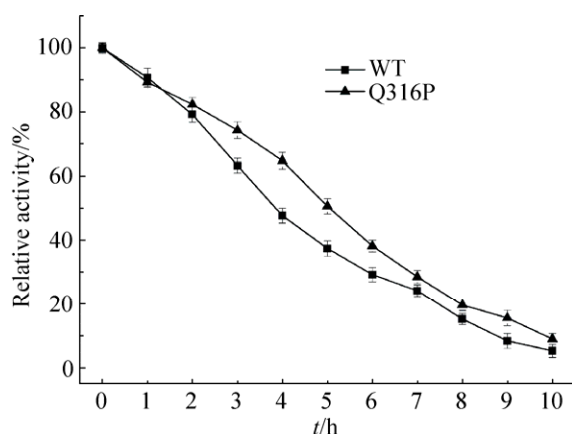


图 5. 野生型和突变体 Q316P 的热稳定性

Figure 5. Thermostability curves of WT and mutant Q316P. Results are means $\pm$ SD of three parallel measurements.

**2.4.3 底物抑制剂对 AK 活力的影响:** 由表 1 可知, 野生型中 AK 受到 Thr 和 Lys 以及二者协同抑制, 受 Met 影响较小。对于突变体 Q316P, Thr 存在下, AK 活力极显著提高( $P<0.01$ ), 尤以 Thr 单独存在时酶活力提高明显, 且不同浓度均表现出激活作用。低浓度的 Thr+Met 对酶活力表现出激活作用, 高浓度下虽轻微抑制, 但酶活力较野生型相比仍有明显提高。结果显示, Lys 对突变体 Q316P 仍起到抑制作用, Met 对其影响较野生型相差不大。因此, 只有 Thr 存在下, 对其产生激

活作用, 这与本研究目的相符。

**2.4.4 金属离子对 AK 活力的影响:** 天冬氨酸激酶是金属酶, 因而其活性受金属离子的影响。本研究探讨了部分金属离子对野生型和突变体 Q316P 中 AK 酶活力的影响, 研究结果见表 2。对于野生型, 一价金属离子  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  对酶并未产生明显的抑制或激活作用; 二价金属离子中, 除了  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  以及低浓度的  $\text{Mg}^{2+}$  起到激活作用外, 其他金属离子均对酶有不同程度的抑制作用; 三价金属离子  $\text{Fe}^{3+}$  也起到抑制作用, 且随着浓度的升高抑制作用增强。对于突变体 Q316P, 一价  $\text{Na}^+$  随着浓度升高相对酶活力极显著降低( $P<0.01$ ), 在高浓度的  $\text{K}^+$  存在下相对酶活力极显著提高( $P<0.01$ ), 且起到激活作用, 二价金属离子  $\text{Ca}^{2+}$  在低浓度下对酶活力有极显著提高( $P<0.01$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  激活作用较野生型略有下降, 三价金属离子  $\text{Fe}^{3+}$  对 Q316P 相对酶活力有极显著提高( $P<0.01$ ), 低浓度时由抑制作用变为激活作用。其他金属离子较野生型均无显著变化。

**2.4.5 有机溶剂对 AK 活力的影响:** 由表 3 可知, 所有有机溶剂对野生型 AK 均表现出抑制作用, 对于突变体 Q316P, 不同浓度的甲醇对 AK 活力均有极显著提高( $P<0.01$ ), 尤以浓度为 1% 时表现

表 1. 底物抑制剂对野生型和突变体 Q316P 中 AK 活力的影响

Table 1. The influence of substrate inhibitors on the enzyme activity (%) of WT and Q316P

Substrate inhibitor	WT				Q316P			
	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Thr	90.28 $\pm$ 0.40	83.97 $\pm$ 1.20	60.36 $\pm$ 1.30	51.33 $\pm$ 0.80	156.23 $\pm$ 1.80**	135.69 $\pm$ 2.40**	114.78 $\pm$ 1.40**	106.23 $\pm$ 1.00**
Lys	83.86 $\pm$ 1.80	65.61 $\pm$ 1.30	58.92 $\pm$ 2.10	38.55 $\pm$ 3.60	85.25 $\pm$ 1.10	72.36 $\pm$ 0.90	64.95 $\pm$ 1.50	54.36 $\pm$ 2.70*
Met	97.63 $\pm$ 1.90	94.34 $\pm$ 0.80	89.89 $\pm$ 2.30	86.34 $\pm$ 3.30	88.23 $\pm$ 3.10*	90.67 $\pm$ 1.50	85.28 $\pm$ 1.90	80.85 $\pm$ 1.60
Thr+Lys	77.22 $\pm$ 1.60	54.76 $\pm$ 3.70	25.26 $\pm$ 1.10	20.36 $\pm$ 1.50	108.23 $\pm$ 1.60**	95.35 $\pm$ 2.30**	71.58 $\pm$ 1.00**	69.22 $\pm$ 1.80**
Thr+Met	86.34 $\pm$ 2.90	76.51 $\pm$ 1.40	51.89 $\pm$ 0.70	42.67 $\pm$ 0.90	136.58 $\pm$ 0.80**	116.13 $\pm$ 0.40**	98.69 $\pm$ 2.60**	88.16 $\pm$ 0.90**
Lys+ Met	85.47 $\pm$ 2.00	58.44 $\pm$ 0.50	48.26 $\pm$ 1.40	36.34 $\pm$ 1.20	91.51 $\pm$ 1.20*	69.26 $\pm$ 0.40*	45.49 $\pm$ 1.30	38.44 $\pm$ 1.50
Thr+Lys+Met	59.76 $\pm$ 1.50	40.51 $\pm$ 0.90	20.13 $\pm$ 1.70	15.23 $\pm$ 1.60	86.63 $\pm$ 0.70*	85.39 $\pm$ 1.30*	41.66 $\pm$ 1.60*	35.48 $\pm$ 1.70*

Q316P compared to WT at the same substrate inhibitor and concentration; \*\*means the difference is significant at the 0.01 level;

\*means the difference is significant at the 0.05 level; Results are means $\pm$ SD of three parallel measurements.

表 2. 金属离子对野生型和突变体 Q316P 中 AK 活力的影响  
Table 2. The influence of metalions on the enzyme activity of WT and Q316P

Metalion	WT				Q316P			
	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Na <sup>+</sup>	81.53±0.30	90.24±1.40	97.42±1.30	93.72±1.60	78.28±1.60	71.17±1.30**	66.00±2.30**	58.94±1.40**
K <sup>+</sup>	89.34±1.50	87.97±2.00	91.65±0.70	95.69±0.80	91.94±0.50	90.44±0.60	132.45±1.90**	126.56±1.50**
Ca <sup>2+</sup>	50.68±3.20	65.47±1.10	79.54±2.20	86.23±3.10	79.06±1.40**	77.94±2.40**	77.56±1.70	80.00±0.80
Mg <sup>2+</sup>	127.83±0.80	115.36±0.50	75.26±0.80	69.47±2.20	122.22±2.50	119.22±3.20	84.56±1.90*	63.72±1.30
Zn <sup>2+</sup>	105.23±1.90	115.13±3.10	132.66±1.90	159.65±1.50	90.44±1.50**	102.89±1.60**	112.94±0.30**	126.50±0.60**
Mn <sup>2+</sup>	74.58±1.80	72.46±0.90	54.65±0.20	58.46±1.00	88.22±2.60*	56.72±1.80*	49.00±1.80	52.72±1.70
Cu <sup>2+</sup>	77.29±0.70	69.47±0.60	51.54±0.60	44.23±1.50	82.83±1.70	70.21±0.60	53.83±1.30	47.06±1.10
Ni <sup>2+</sup>	132.35±0.40	119.22±1.50	102.58±0.80	98.67±0.90	133.11±1.30	107.33±1.40*	106.22±0.90	89.56±2.40*
Fe <sup>3+</sup>	76.54±2.50	73.33±1.30	64.59±1.70	40.04±1.60	105.23±0.80**	102.39±1.10**	85.17±1.20**	78.50±2.60**

Q316P compared to WT at the same metalion and concentration; \*\*means the difference is significant at the 0.01 level; \*means the difference is significant at the 0.05 level; Results are means±SD of three parallel measurements.

表 3. 有机溶剂对野生型和突变体 Q316P 中 AK 活力的影响  
Table 3. The influence of organic solvent on the enzyme activity of WT and Q316P

Organic solvent	WT				Q316P			
	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L	0.2 mmol/L	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Methanol	85.80±1.30	63.42±0.60	47.02±0.60	35.37±0.70	113.75±1.20**	91.74±1.40**	71.60±0.50**	69.17±1.60**
Ethanol	73.84±1.60	54.54±0.80	46.12±0.50	34.03±0.60	99.28±1.60**	89.17±1.30**	64.93±0.40*	48.13±1.40*
Isopropyl alcohol	67.37±1.20	47.73±1.00	48.77±1.10	48.03±1.30	91.25±1.80**	69.93±1.60**	58.75±0.80*	48.01±1.10
N-butanol	90.42±0.50	89.30±0.70	68.11±1.50	43.71±0.90	90.88±0.90	82.86±1.40*	71.64±0.70	57.67±1.70*
Acetonitrile	79.71±1.20	45.56±0.80	45.99±1.20	35.59±1.10	63.75±1.30*	52.40±0.70	42.08±0.70	33.63±1.10
Dimethyl sulfoxide	93.93±1.10	82.09±1.70	63.36±0.70	66.51±0.80	95.76±1.40	72.43±0.30*	69.58±0.50	55.83±1.50*
Glycerin	95.73±1.30	85.92±0.60	59.33±1.60	45.68±1.60	90.23±0.90	88.26±0.40	71.21±0.40*	65.00±0.60*

Q316P compared to WT at the same organic solvent and concentration; \*\*means the difference is significant at the 0.01 level; \*means the difference is significant at the 0.05 level; Results are means±SD of three parallel measurements.

出激活作用。其他有机溶剂如乙醇、异丙醇对 AK 活力有显著提高( $P<0.05$ ), 且在低浓度时有极显著提高( $P<0.01$ ), 在高浓度的甘油存在下, 对突变体 Q316P 中 AK 的活力提高显著( $P<0.05$ )。综上分析, 突变体 Q316P 较野生型相比对有机溶剂表现出良好抗性。

### 3 讨论

本研究对北京棒杆菌天冬氨酸激酶中 Q316 位点进行定点突变, 以达到解除抑制剂 Thr 对其的反馈抑制、提高酶活力并获得优良突变株的目的。通过软件 Primer Premier 5 进行突变引物设计,



并以重组质粒 pET-28a-AK 为模板, 成功构建突变体 Q316P。将突变体 Q316P 成功在大肠杆菌 BL21 中表达, 并由 12% SDS-PAGE 及 Western blot 得到验证。动力学结果显示, 突变体 Q316P 的  $V_{\max}$  较野生型提高 8.53 倍, 酶活力改善明显。并且突变后正协同性降低, 可能不利于与抑制剂相结合。同时在底物抑制剂 Thr 存在时, 对突变体 Q316P 表现出激活作用, 表明突变后 AK 与抑制剂 Thr 结合的稳定性降低, 这与动力学结果相符。

微生物在发酵过程中, 由于本身代谢产热会导致环境温度升高, 并随着目标产物氨基酸的积累, 发酵液会趋于酸性。此外, 在工业发酵生产中, 热稳定性较高的酶具有较高的催化效率, 可以降低微生物污染的风险。因此理想型突变株应耐高温、耐酸且具有稳定遗传性。本研究中对突变体 Q316P 酶学性质结果显示, 与野生型相比最适温度升高 5 °C, 最适 pH 降低 0.5, 半衰期延长至 5 h, 表明该突变株相比于野生型有较强适应能力, 更有利于发酵生产。

综上所述, 北京棒杆菌天冬氨酸激酶突变体 Q316P 能在大肠杆菌 BL21 中高效表达, 并使酶活力提高, 酶学性质改善, 同时在抑制剂苏氨酸存在下, 对其抑制作用有一定程度的解除, 但由于酶的反馈抑制机制较为复杂, 且本研究只针对 Thr 对北京棒杆菌天冬氨酸激酶的反馈抑制, 所以对于整个天冬氨酸族氨基酸合成途径的反馈机制有待进一步探讨。由此, 本研究为优化天冬氨酸激酶代谢途径以及天冬氨酸族氨基酸合成途径的调控系统提供参考, 同时为构建高产天冬氨酸族氨基酸工程菌提供借鉴。

## 参 考 文 献

[1] Manjasetty BA, Chance MR, Burley SK, Panjekar S, Almo

SC. Crystal structure of *Clostridium acetobutylicum* aspartate kinase (CaAk): an important allosteric enzyme for amino acids production. *Biotechnology Reports*, 2014, 3: 73–85.

- [2] Mitsuhashi S. Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 38–44.
- [3] Sanders JPM, Sheldon RA. Comparison of the sustainability metrics of the petrochemical and biomass-based routes to methionine. *Catalysis Today*, 2015, 239: 44–49.
- [4] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(5): 718–726.
- [5] Wang LY, Min WH. Progress and prospects for methionine bioproduction. *Food Science*, 2016, 37(3): 280–285. (in Chinese)  
王隆洋, 闵伟红. 利用生物技术生产甲硫氨酸的研究进展. *食品科学*, 2016, 37(3): 280–285.
- [6] Chen Q, Zhang ZY, Li LG. A new L-glutamic acid-producing species of *Corynebacterium*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1973, 13(1): 1–6. (in Chinese)  
陈琦, 张震元, 李玲阁. 产生 L-谷氨酸的棒状杆菌新种. *微生物学报*, 1973, 13(1): 1–6.
- [7] 汪一名. 北京棒杆菌突变株 E31 天冬氨酸激酶基因的克隆与表达分析. 吉林农业大学硕士学位论文, 2011.
- [8] Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, Nishiyama M. Mechanism of concerted inhibition of  $\alpha\beta\gamma$ -type hetero-oligomeric aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(35): 27477–27486.
- [9] Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, Bott M, Frunzke J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(4): 449–457.
- [10] Li HY, Zhu YM, Min WH, Zhan DL, Ren J. Construction and characterization of R169H mutant of aspartokinase from *Corynebacterium pectinense*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(6): 663–669. (in Chinese)  
李慧颖, 朱运明, 闵伟红, 詹冬玲, 任军. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶突变体 R169H 的构建及酶学性质表征. *微生物学报*, 2014, 54(6): 663–669.
- [11] Zhu YM, Wang XF, Min WH, Zhan DL, Wang LY. Site-directed mutagenesis and characterization of aspartate kinase G377 from *Corynebacterium pectinense*. *Food Science*, 2014, 35(9): 192–197. (in Chinese)  
朱运明, 王晓飞, 闵伟红, 詹冬玲, 王隆洋. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶 G377 定点突变及酶学性质表征. *食品科学*, 2014, 35(9): 192–197.
- [12] Min WH, Li HY, Li HM, Liu CL, Liu JS. Characterization of



- aspartate kinase from *Corynebacterium pekinense* and the critical site of Arg169. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 28270–28284.
- [13] Follettie MT, Peoples OP, Agoropoulou C, Sinskey AJ. Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13 *ask-asd* operon. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(13): 4096–4103.
- [14] Yoshida A, Tomita T, Kurihara T, Fushinobu S, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural insight into concerted inhibition of  $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 368(2): 521–536.
- [15] Zhang Y, Shang XL, Deng AH, Chai X, Lai SJ, Zhang GQ, Wen TY. Genetic and biochemical characterization of *Corynebacterium glutamicum* ATP phosphoribosyltransferase and its three mutants resistant to feedback inhibition by histidine. *Biochimie*, 2012, 94(3): 829–838.
- [16] Kalinowski J, Cremer J, Bachmann B, Eggeling L, Sahm H, Pühler A. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 1991, 5: 1197–1204.
- [17] Gallardo O, Javier Pastor FI, Polaina J, Diaz P, Łysek R, Vogel P, Isorna P, González B, Sanz-Aparicio J. Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(4): 2721–2733.
- [18] Koudelakova T, Chaloupkova R, Brezovsky J, Prokop Z, Sebestova E, Hesseler M, Khabiri M, Plevaka M, Kulik D, Smatanova IK, Rezacova P, Ettrich R, Bornscheuer UT, Damborsky J. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(7): 1959–1963.

## Characterization of Q316P mutant of aspartate kinase from *Corynebacterium pekinense*

Zhirui Zhang, Chen Chen, Caijing Han, Yunna Gao, Chunlei Liu, Weihong Min\*

National Engineering Laboratory on Wheat and Corn Further Processing, College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

**Abstract:** [Objective] To obtain a new aspartate kinase (AK) with higher activity and better properties of highly produced aspartic acid family from *Corynebacterium pekinense* by spatial structure transformation, and attenuate or release the feedback inhibition of AK. [Methods] The Gln(Q)316 of AK was mutated by site-directed mutagenesis, and mutant strain with the highest activity was selected by high throughput screening. The mutant was expressed in *Escherichia coli* BL21. AK of the wild type and mutant strain was purified by  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column and then the characterized. [Results] The mutant Q316P was constructed, and successfully expressed in *E. coli* BL21. Compared with the wild type,  $V_{\max}$  of Q316P was increased by 8.53 times, and the  $n$  values was decreased from 2.15 to 1.29. The optimum temperature was increased from 25 °C to 30 °C, the optimum pH was decreased from 8.0 to 7.5 and the half-time period was increased from 3.8 h to 5.0 h. The inhibition of the substrate inhibitor threonine was not only relieved but also threonine had an active effect on the activity of Q316P. Q316P had better resistance to methanol and  $\text{K}^+$ . [Conclusion] Our findings provided a reference for the construction of high-yield aspartic acid family engineering strain.

**Keywords:** *Corynebacterium pekinense*, aspartate kinase, site-directed mutagenesis, kinetics, characterization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Efficient Transformation of Corn and Intensive Processing Innovation Team of Jilin Province (20150519012JH)

\*Corresponding author. Tel: +86-431-84533329; E-mail: minwh2000@vip.163.com

Received: 23 June 2017; Revised: 29 July 2017; Published online: 27 September 2017