



# 粪便微生物宏基因组来源 L-天冬酰胺酶的性质表征及应用研究

梁师思<sup>1</sup>, 夏娆<sup>1</sup>, 高艳<sup>1</sup>, 蒋海波<sup>1</sup>, 张呈波<sup>2</sup>, 黄遵锡<sup>1,2,3</sup>, 许波<sup>1,2,3\*</sup>

1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南 昆明 650500

梁师思, 夏娆, 高艳, 蒋海波, 张呈波, 黄遵锡, 许波. 粪便微生物宏基因组来源 L-天冬酰胺酶的性质表征及应用研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2539-2553.

LIANG Shisi, XIA Rao, GAO Yan, JIANG Haibo, ZHANG Chengbo, HUANG Zunxi, XU Bo. Characterization and application of an L-asparaginase derived from the metagenome of fecal microbiota[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2539-2553.

**摘要:** L-天冬酰胺酶是氨基酸代谢的关键酶, 广泛应用于食品和医药领域, 肠道菌群及其产生的 L-天冬酰胺酶与宿主健康和疾病关系密切。【目的】获取肠道微生物来源的新型 L-天冬酰胺酶, 并对其性质表征和应用研究。【方法】以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组为模板, 克隆 L-天冬酰胺酶基因, 并在大肠杆菌中表达; 对表达出的酶进行酶学性质研究, 并用于处理薯条和癌细胞。【结果】克隆获得 L-天冬酰胺酶基因 *NCasn5*, 全长 996 bp, 重组酶 *NCasn5* 分子量大小为 37.296 kDa, 最适 pH 为 8.0, 最适温度为 60 °C,  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $(3.33 \pm 0.21)$  mmol/L 和  $(836.30 \pm 13.91)$   $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ , 37 °C 体外血清半衰期约 69 h。NCasn5 能降低薯条中 69.35% 的丙烯酰胺含量, 抑制人肝癌细胞 QGY-7703 和人恶性黑色素瘤细胞 A-375 细胞的生长。【结论】本研究获得的新型 L-天冬酰胺酶, 具有良好的热稳定性和较长的血清半衰期, 不仅无谷氨酰胺酶活性, 还能减少油炸薯条中丙烯酰胺的含量, 也能诱导癌细胞 QGY-7703 和 A-375 凋亡, 在食品加工及医药领域具有潜在的应用价值。

**关键词:** L-天冬酰胺酶; 粪便微生物宏基因组; 丙烯酰胺抑制; 抗肿瘤活性

资助项目: 国家自然科学基金(32360034)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360034).

\*Corresponding author. E-mail: xubo128028@163.com

Received: 2024-01-04; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-03-21

# Characterization and application of an L-asparaginase derived from the metagenome of fecal microbiota

LIANG Shisi<sup>1</sup>, XIA Rao<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>1</sup>, JIANG Haibo<sup>1</sup>, ZHANG Chengbo<sup>2</sup>, HUANG Zunxi<sup>1,2,3</sup>, XU Bo<sup>1,2,3\*</sup>

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500, Yunnan, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming 650500, Yunnan, China

**Abstract:** L-asparaginase, a key enzyme in amino acid metabolism, is widely used in the food and pharmaceutical industries. The gut microbiota and its product L-asparaginase are closely associated with host health and diseases. **[Objective]** This study aims to acquire a novel L-asparaginase gene from gut microbiota and explore its enzymatic characteristics and potential applications. **[Methods]** An L-asparaginase gene was cloned from the metagenome of the fecal microbiota of *Nomascus concolor* and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The enzymatic properties of the expressed protein were determined. Furthermore, the potential applications of this protein were explored, including processing potato chips and treating cancer cells. **[Results]** The cloned L-asparaginase gene, *NCasn5*, was 996 bp. It encoded the recombinant enzyme NCasn5 with a molecular weight of 37.296 kDa, optimal activity at pH 8.0 and 60 °C,  $K_m$  of (3.33±0.21) mmol/L,  $V_{max}$  of (836.30±13.91) μmol/(min·mg), and a serum half-life of about 69 h *in vitro* at 37 °C. NCasn5 reduced the acrylamide content in potato chips by 69.35% and inhibited the growth of human liver cancer cells (QGY-7703) and human melanoma cells (A-375). **[Conclusion]** We obtained a novel L-asparaginase demonstrating good thermal stability and a prolonged serum half-life. This enzyme lacks the glutaminase activity and reduces acrylamide levels in potato chips. Moreover, it can induce apoptosis in the cancer cell lines QGY-7703 and A-375. These findings suggest the potential applicability of L-asparaginase in both food processing and pharmaceutical industries.

**Keywords:** L-asparaginase; metagenome of fecal microbiota; acrylamide mitigation; antitumor activity

L-天冬酰胺酶(L-asparaginase, L-ASNase, E.C 3.5.1.1)是氨基酸代谢途径的关键酶,影响赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和异亮氨酸的生物合成<sup>[1]</sup>。其水解 L-天冬酰胺(L-asparagine, L-Asn)的过程分为两个阶段,首先,酶活性中心的 Thr 对底物酰胺键上的碳原子进行亲核攻击,形成共价酶-底物酰基中间体并生成氨(NH<sub>3</sub>),随后

在水分子的攻击下释放 L-天冬氨酸(L-aspartic acid, L-Asp)<sup>[2]</sup>。在尿素循环中 L-Asp 与精氨酸共同作用生成尿素和富马酸,后者进入三羧酸循环,因此 L-ASNase 在维持细胞内氮平衡和能量代谢方面具有重要意义<sup>[3]</sup>。

L-ASNase 广泛存在于细菌、古菌和真核生物,细菌 L-ASNase 主要来自芽孢杆菌属

(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和放线菌属(*Actinomycetes*)等<sup>[4]</sup>。基于结构及理化性质差异,细菌 L-ASNase 分为 I、II 两型, L-ASNase I 的拓扑结构类似环形,在细胞质中表达,对底物 L-Asn 的亲合力较低,无抗肿瘤活性,仅应用于食品加工中<sup>[5-7]</sup>。如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) I 型 L-ASNase 能降低样品中 58.39% 的丙烯酰胺含量<sup>[8]</sup>。L-ASNase II 的拓扑结构高度对称,类似球形,经分泌途径转运至细胞周质空间表达,由于其对底物 L-Asn 的亲合力更高,可用于食品加工与医药领域<sup>[2]</sup>。来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和菊花迪克氏菌(*Dickeya chrysanthemi*) L-ASNase 的  $K_m$  极低(0.010–0.012 mmol/L),已被用于治疗淋巴细胞白血病<sup>[5]</sup>;海绵科贝特氏菌(*Cobetia amphilecti*)<sup>[9]</sup>和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) PCH182<sup>[10]</sup>等 II 型 L-ASNase 也可抑制食品丙烯酰胺的生成。

当前, L-ASNase 的研究主要集中于环境微生物新酶基因的筛选、酶的高效表达、结构性质探究和酶的改造及应用。通过常规分离培养,已从海洋、盐湖及土壤等环境中筛选到产生 L-ASNase 的嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)<sup>[11]</sup>、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)<sup>[12]</sup>、链霉菌(*Streptomyces* spp.)<sup>[13]</sup>等。为实现大规模生产,研究者利用深层发酵、固态发酵提高酶的生产效率, Plackett-Burman 设计法、人工神经网络和响应面法等优化生产参数,以及重组 DNA 技术提高酶的表达量<sup>[4]</sup>。大多数细菌 L-ASNase 为同源四聚体,该结构由两个紧密相连的二聚体组成;每个亚基通过约 20–25 个氨基酸残基的连接子,将一个较大的 N-末端(约 195 个氨基酸残基)和一个较小的 C-末端(约 120 个氨基酸残基)相连;在 N-末端附近有一个活性位点柔性环,是 L-ASNase 的催

化核心<sup>[6]</sup>。研究表明许多 L-ASNase 在 pH 6.0–9.5 活性较高,最适反应温度为 30–60 °C<sup>[1]</sup>。在应用方面, L-ASNase 主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、肝癌、黑色素瘤等疾病<sup>[14]</sup>。此外, L-ASNase 还能降低食品中 L-Asn 的含量,减少潜在致癌物丙烯酰胺的生成,被用于烘焙、烤制和油炸含淀粉食品中丙烯酰胺的去除<sup>[15]</sup>。目前 L-ASNase 面临的主要挑战包括 L-谷氨酰胺酶活性引起的副作用(超敏反应、神经毒性及高氨血症等)及在血液系统中较短的半衰期。此外,该酶窄的 pH 范围和热不稳定性限制了它在食品领域的应用<sup>[7]</sup>。尽管研究者应用化学修饰(聚乙二醇化和糖基化等)、生物酶工程策略(定点突变、定向进化、融合蛋白连接体等)以及固定化技术(交联、物理包封和共价结合等)对其进行改造<sup>[16]</sup>,但优化效果仍依赖于酶分子本身的特性<sup>[17]</sup>。因此需要不断探索新的 L-ASNase 来源,以期发现具有更优稳定性和较少副作用的酶。

宏基因组技术避开微生物的分离培养,有助于从环境样本中发现新型 L-ASNase,近年来研究者开始关注环境微生物宏基因组来源的 L-ASNase。2018 年, Haldar 等<sup>[18]</sup>分析红树林沉积物宏基因组发现,蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、解木聚糖类芽孢杆菌(*Paenibacillus xylanilyticus*)和依利诺类芽孢杆菌(*Paenibacillus illinoisensis*)能产生 L-ASNase。Sobat 等<sup>[19]</sup>和 Arjun 等<sup>[20]</sup>分别从里海和土壤微生物组中获得能抑制癌细胞增殖的 L-ASNase。2022 年, Johny 等<sup>[21]</sup>从鱼肠道宏基因组中获得 L-ASNase SlpA,不仅能抑制癌细胞增殖,还能降低食品中丙烯酰胺的含量。

厌氧肠道环境定殖有丰富的微生物群落,通过分离培养已获得具有新特征或改良特性的 L-ASNase,如霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)能产耐盐 and 高温的 L-ASNase<sup>[22]</sup>;唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)能高产底物专一性强

的 L-ASNase<sup>[23]</sup>; *Actinomyces* LA-29 的 L-ASNase 能有效抑制大鼠白血病细胞的生长<sup>[24]</sup>。此外, 肠道菌群来源的 L-ASNase 与宿主健康关系密切。例如, 多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 胞外囊泡富含 ASNase, 影响宿主细胞的生物合成途径并维持胃肠道稳态<sup>[25]</sup>; 嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*) 促进肠道向肝脏运输 L-Asp 的水平, 从而改善异常的胆汁酸代谢<sup>[26]</sup>。

因此, 发现并鉴定肠道微生物来源的 L-ASNase, 对肠道菌群与宿主健康和疾病关系的深入研究具有重要意义, 同时为食品和医药领域新型 L-ASNase 的开发提供酶及基因资源。前期宏基因组功能注释发现, 西黑冠长臂猿(*Nomascus concolor*) 粪便样本中氨基酸生物合成相关基因丰度较高, 因此从中筛选、克隆和异源表达 L-ASNase, 并对其酶学性质和功能表征。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品、菌株和细胞

西黑冠长臂猿粪便宏基因组 DNA 和 *pEASY-E2* 表达载体本实验室保存。QGY-7703 (人肝癌细胞) 和 A-375 (人恶性黑色素瘤细胞) 购自中国科学院细胞库。

### 1.2 主要试剂

商业 L-ASNase (Acrylaway<sup>®</sup>) 购自 Novozymes Investment Co Ltd.; 底物、Nessler 试剂和三氯乙酸购自上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清购自伊娃(苏州)生物医药科技有限公司; C18 柱购自湖南比克曼生物科技有限公司; PCR 引

物的合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.3 序列分析

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组文库中筛选含有完整序列的 L-ASNase 基因 *NCasn5*。使用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质理化性质; BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比较氨基酸序列相似性; MEGA 6.0 构建系统发育进化树; ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行多序列对比。

### 1.4 天冬酰胺酶基因的克隆

西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN 公司) 提取, 并以此为模板扩增目的基因 *NCasn5*, 引物设计如表 1 所示。

*NCasn5* 的 PCR 反应体系: DNA 模板 5  $\mu$ L, *Ex Taq* (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, *NCasn5-F* (10  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, *NCasn5-R* (10  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.5 载体构建及重组酶的表达

PCR 产物与 *pEASY-E2* 载体连接, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中构建重组体 BL21(DE3)/*NCasn5*, 并测序验证。重组体在含 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}$ C、180 r/min

表 1 基因克隆引物

Table 1 Primers used for gene cloning

Primer name	Sequences (5'→3')
<i>NCasn5-F</i>	TAAGAAGGAGATATAC <u>CATATG</u> GAATTGATGGATAAGATACTAGTTGTTTTAACTGGAG
<i>NCasn5-R</i>	GTGGTGGTGGTGGT <u>GCTCGAG</u> TAATTCCTCATAATACATTGTGTTGTTTATATC

The underlined sections represent the restriction sites for *Nde* I and *Xho* I.

培养 12 h 活化, 随后取 2 mL 转入 200 mL 同条件的培养基培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.7。加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG 在 25 °C、180 r/min 下诱导 20 h 后, 菌体用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 悬浮, 150 W 超声波破碎。在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 后的上清经 Ni-NTA 柱纯化, 用 12% SDS-PAGE 分析目标蛋白。

## 1.6 重组天冬酰胺酶活性测定

采用 Nessler 试剂测定重组酶的酶活力。首先制备 200  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 和 200  $\mu$ L 200 mmol/L L-Asn 混合液, 37 °C 孵育 5 min 后加入 50  $\mu$ L 稀释酶液 (0.25 mg/mL), 继续反应 10 min, 再加入 50  $\mu$ L 1.5 mol/L 三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 终止反应, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后, 收集 200  $\mu$ L 上清液与 1.2 mL 双蒸水 (ddH<sub>2</sub>O) 混合制得待显色样品。最后加入 100  $\mu$ L Nessler 试剂静置 10 min 后测定  $OD_{450}$  值。一个酶活单位 (U) 定义为在 1 min 内催化生成 1  $\mu$ mol 氨的酶量。

## 1.7 重组天冬酰胺酶酶学性质分析

### 1.7.1 最适 pH 及 pH 稳定性测定

为了确定重组酶的最适 pH, 在 pH 4.0–11.0 的不同缓冲液 (pH 4.0–6.0: 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 7.0–8.0: 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0–11.0: 0.5 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠溶液) 中测试其催化活性, 以最适 pH 下的酶活定义为 100%。此外, 为了评估酶的 pH 稳定性, 将重组酶置于缓冲液 (pH 5.0–11.0) 中 37 °C 孵育 1 h, 以未处理的酶液作为对照, 在最适反应条件下测试其酶活, 将对照组的酶活定义为 100%。

### 1.7.2 最适温度及温度稳定性测定

为确定重组酶的最适温度, 在 30–70 °C 下测试其酶活力。为了测试温度稳定性, 将酶分别置于 30、35、40、45、50、55、60 °C 中孵育

1 h, 以 0 min 的酶活为对照, 于最适反应条件下测定相对酶活力。

## 1.7.3 底物特异性及动力学参数测定

在最适条件下, 以终浓度为 200 mmol/L 的 L-天冬酰胺 (L-Asn)、D-天冬酰胺 (D-asparagine, D-Asn)、L-谷氨酰胺 (L-glutamine, L-Gln)、L-天冬氨酸 (L-Asp)、D-天冬氨酸 (D-aspartic acid, D-Asp)、L-谷氨酸 (L-glutamic acid, L-Glu) 和 D-谷氨酸 (D-glutamic acid, D-Glu) 作为底物, 分析其底物特异性活力。此外, 以 2–40 mmol/L 的 L-Asn 作为底物, 于最适反应条件下测试酶活力, 利用 GraphPad Prism 5 计算米氏常数 ( $K_m$ ) 及最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 值。

## 1.8 体外血清半衰期测试

将 L-ASNase 与 2.4 mL 动物血清混合, 用力摇匀, 在水浴锅中 37 °C 孵育, 每隔 12 h 测一次酶活力。

## 1.9 重组天冬酰胺酶处理对薯条中丙烯酰胺含量的影响

### 1.9.1 样品处理

新鲜马铃薯清洗、去皮, 切成 0.5 cm×0.5 cm×7 cm 条状, 用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗表面淀粉。在样品中分别加入 0–50 U/mL NCasn5 和商业酶 L-ASNase, 35 °C 孵育 30 min, 以加 ddH<sub>2</sub>O 处理的样品作为对照。处理结束后用 ddH<sub>2</sub>O 洗净酶液, 60 °C 烘干 20 min, 160 °C 油炸 3 min 后室温冷却, 用纸巾吸取表面油脂后备用。

### 1.9.2 样品中丙烯酰胺的提取及检测

参考郝亚楠等<sup>[27]</sup>方法, 称取 1 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇混合均匀后, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 此步骤共重复 3 次。吸取 5 mL 上清液先过 0.45  $\mu$ m 聚偏氟乙烯 (poly vinylidene fluoride, PVDF) 滤膜, 再过预活化的 C18 柱 (先后用 2 mL 甲醇和 2 mL ddH<sub>2</sub>O 洗柱), 弃去前 0.5 mL 滤液, 余液用于

分析测定, 并进行独立样本  $t$  检验( $\alpha=0.05$ )。

## 1.10 重组天冬酰胺酶抑制癌细胞增殖

### 1.10.1 细胞培养

QGY-7703 和 A-375 细胞分别用含有 10% 新生牛血清(newborn bovine serum, NCS)、1% L-Gln、10% 青霉素和 10% 链霉素溶液的 RPMI-1640 和 DMEM 完全培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱(Eppendorf 公司)中培养。

### 1.10.2 MTT 法测试 NCasn5 对细胞的毒性

参考 Ameen 等<sup>[28]</sup>方法, 略有改动。将  $5 \times 10^4$  个细胞接种至 96 孔板中, 贴壁后用 2–10 U/mL 的 NCasn5 处理 24 h。弃去培养基后用 PBS 清洗 2 遍, 加入 20  $\mu$ L 的 MTT 染料(5 mg/mL)及 180  $\mu$ L 培养基继续培养 4 h。移除液体, 加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)后置摇床上缓慢摇匀 10 min 溶解结晶, 用酶标仪在 490 nm 处测定其光吸收值, 计算细胞的存活率, 采用  $t$  检验进行数据分析( $\alpha=0.05$ )。

### 1.10.3 DAPI 荧光染色的细胞核形态

为探究 NCasn5 对细胞凋亡的作用, 在 24 孔板中培养约  $1.5 \times 10^5$  个细胞, 并用 2–10 U/mL 浓度的 NCasn5 处理后在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。用 PBS (pH 7.0) 洗涤, 再用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 0.1% Triton X-100 和 PBS 洗涤各 3 次。加入 1.25  $\mu$ g/mL 4',6-二氨基-2-苯基吲哚二盐酸(4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloric acid, DAPI)染色 10 min, 在倒置荧光显微镜(放大 100 倍)下观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中筛选获得 L-ASNase 基因 *NCasn5*, 编码 331 个氨基酸, 理论分子量为 37.296 kDa, 等电点为 5.18。BLAST 结果显示, 与 NCasn5 氨基酸序列相似

度最高的依次是真杆菌(*Eubacterium* sp.) (MBS4868370)、梭菌(*Clostridia bacterium*) (MDO4300458)和毛螺菌科细菌(*Lachnospiraceae bacterium*) (MBR5799555)的 L-ASNase, 序列相似性分别为 80.36%、63.25%和 46.61%, 上述序列均来自动物胃肠道宏基因组测序数据, 尚无相关研究报道。选取不同细菌来源的 L-ASNase 氨基酸序列构建系统进化树(图 1), 其中第 1 个和第 2 个分支分别为 II 型和 I 型 L-ASNase, 而 NCasn5 与上述 3 个 L-ASNases 以 100% 置信度单独聚为一个分支。此外, 多序列对比发现(图 2), 虽然 NCasn5 与其他 L-ASNase 具有多个保守区域, 如 T-G-G-T-I、H-G-[ST]-D-T 和 P-V-V, 然而, 第 26、88 和 159 位点的关键催化氨基酸残基并不同。因此, NCasn5 可能属于新型的 L-ASNase。

### 2.2 天冬酰胺酶基因的克隆与表达

以西黑冠长臂猿粪便微生物基因组为模板扩增得到 *NCasn5* 基因(GenBank 登录号: OR905595), 琼脂糖凝胶电泳检测显示条带大小约 1 000 bp, 符合理论值 996 bp(图 3A)。将目的基因与 *pEASY-E2* 载体连接, 构建重组质粒 *pEASY-E2/NCasn5*, 将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 经 IPTG 诱导表达后获得 NCasn5 粗酶, 经 Ni-NTA Agarose 纯化后, 在 12% SDS-PAGE 下分析, NCasn5 的分子量在 29.0–44.3 kDa 之间, 与理论值相符(图 3B)。

### 2.3 重组天冬酰胺酶 NCasn5 的酶学性质表征

#### 2.3.1 pH 及温度对 NCasn5 的影响

研究表明, NCasn5 最适 pH 值为 8.0(图 4A), 随 pH 值增加酶活性逐渐下降。在 pH 5.0–11.0 孵育 1 h 后测定重组酶的稳定性发现(图 4B), NCasn5 在较宽的 pH 范围内(pH 5.0–10.0)均保持 70% 以上酶活力, 稳定性较好。

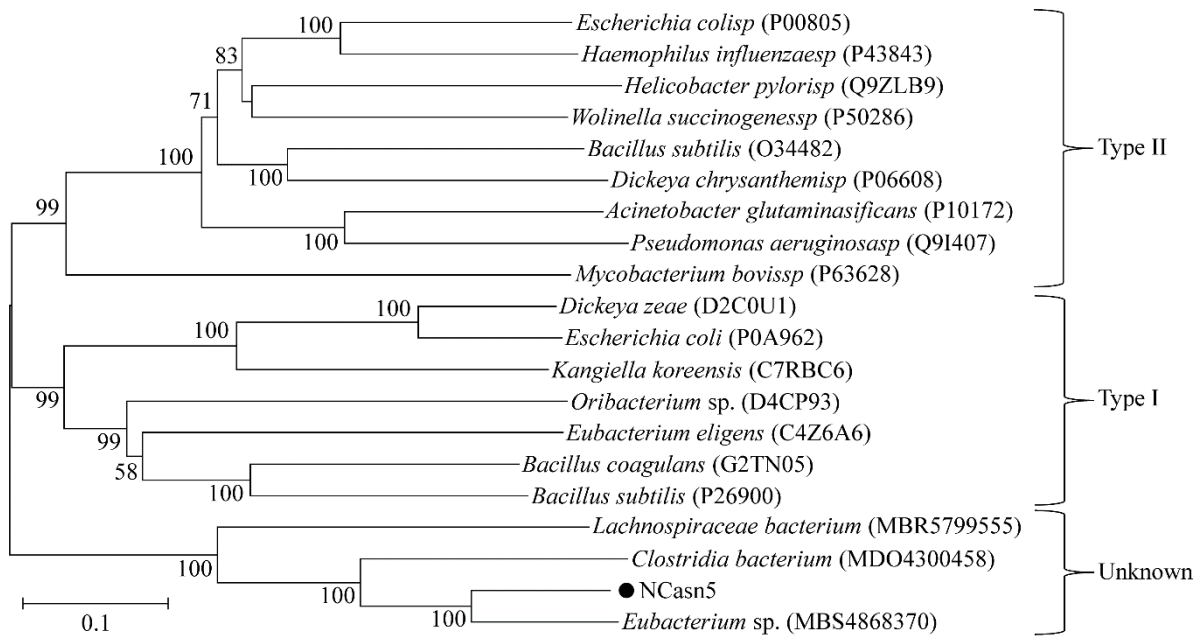


图 1 NCasn5 与其他微生物来源的 L-ASNase 氨基酸序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of NCasn5 and L-ASNases from various sources. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method in MEGA 6.0. Numbers in parentheses from NCBI and UniProt protein databases. Numbers near the branches indicate the confidence levels of the branches, and the scale bar represents a substitution rate of 0.1 per nucleotide position.

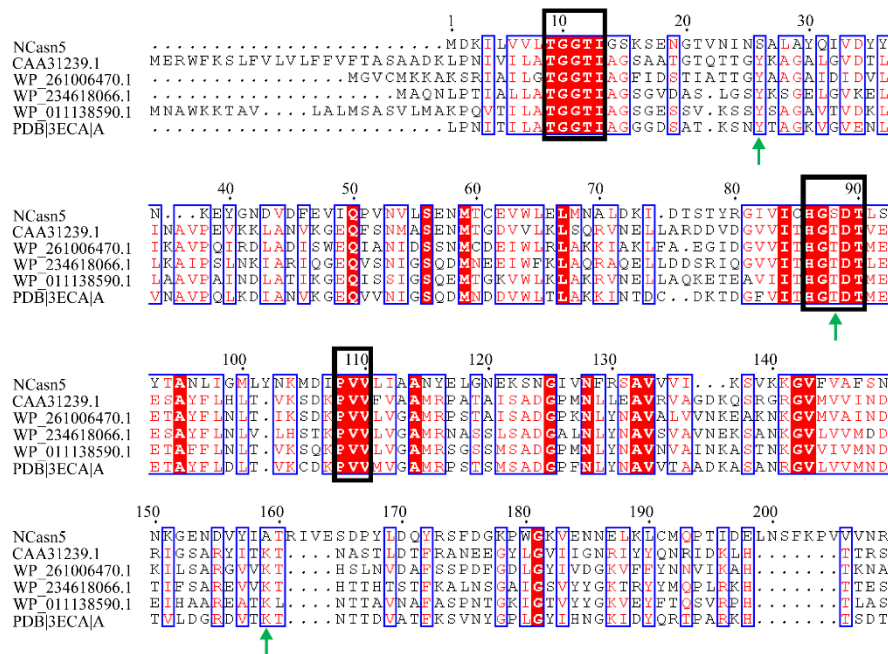
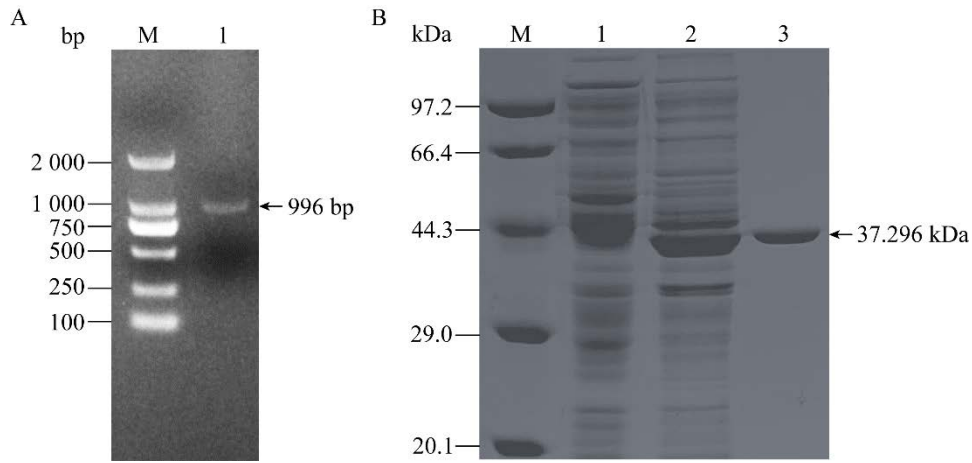


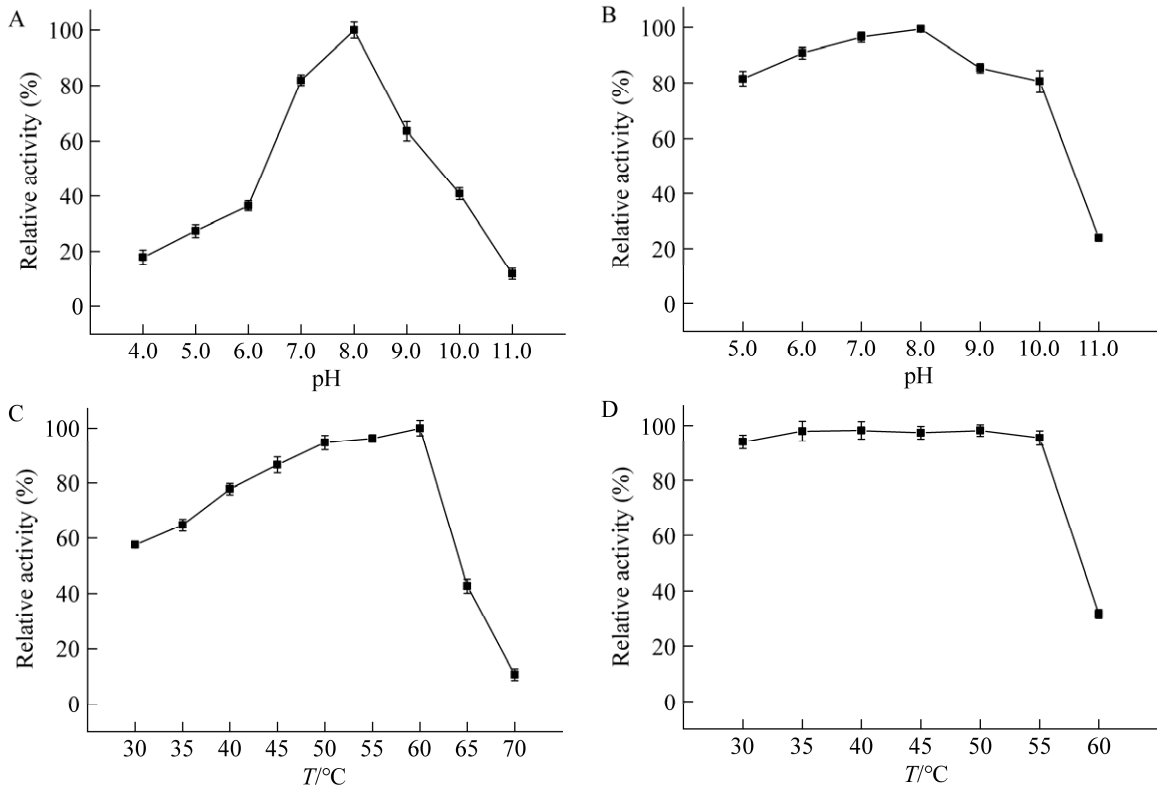
图 2 NCasn5 氨基酸序列与部分已报道的 L-ASNase 氨基酸序列比对分析

Figure 2 Alignment analysis of the amino acid sequences of NCasn5 with partially reported L-ASNase amino acid sequences. The black box indicates the conserved amino acid residues, and the green arrows indicate differences in some of the amino acid residues in the catalytic sites of L-ASNase.



**图 3** L-天冬酰胺酶 NCasn5 的基因扩增(A)及其 SDS-PAGE 分析(B)

Figure 3 Gene amplification and SDS-PAGE analysis of L-asparaginase NCasn5. A: PCR amplification. Lane M: DNA marker; Lane 1: NCasn5 gene. B: SDS-PAGE profile. Lane M: Protein molecular weight standard; Lane 1: *Escherichia coli* cell lysate containing empty plasmid pEASY-E2; Lane 2: Unpurified NCasn5; Lane 3: Purified NCasn5.



**图 4** pH 和温度对重组 L-天冬酰胺酶 NCasn5 活性的影响

Figure 4 Effects of pH and temperature on recombinant L-asparaginase NCasn5 activity. A: Optimal pH of NCasn5. B: pH stability of NCasn5. C: Optimum temperature of NCasn5. D: Temperature stability of NCasn5. Data are expressed as the mean value ( $\pm$ SD) for three independent experiments.



NCasn5 最适温度为 60 °C, 在 40–60 °C 条件下保持 70% 以上的酶活, 而在 65–70 °C 条件下酶活力不足 40% (图 4C)。温度稳定性研究表明, NCasn5 在中至较高温度范围内表现出良好的稳定性, 在 30–55 °C 下保温 1 h 后仍保持 90% 左右酶活力, 但在 60 °C 时酶活力急速下降 (图 4D)。

### 2.3.2 底物特异性和动力学参数

纯化后的 NCasn5 对 L-Asn 有最高特异性, 酶活为 162.13 U/mL, 比活力为 645.73 U/mg; 对 D-Asn、L-Asp、D-Asp、L-Gln、L-Glu 和 D-Glu 均无活性。使用 GraphPad Prism 5 计算其  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为 (3.33±0.21) mmol/L 和 (836.3±13.91)  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

### 2.3.3 体外血清半衰期

NCasn5 在 37 °C 血清中孵育约 12 h, 其相对酶活力维持在约 90%。随着孵育时间的延长, 酶活力逐渐下降, 在孵育约 69 h 后下降至初始活性的 50% (图 5)。

## 2.4 NCasn5 对炸薯条中丙烯酰胺含量的影响

用不同浓度的 NCasn5 和商业酶处理后, 薯条中的丙烯酰胺含量与对照组相比显著降低

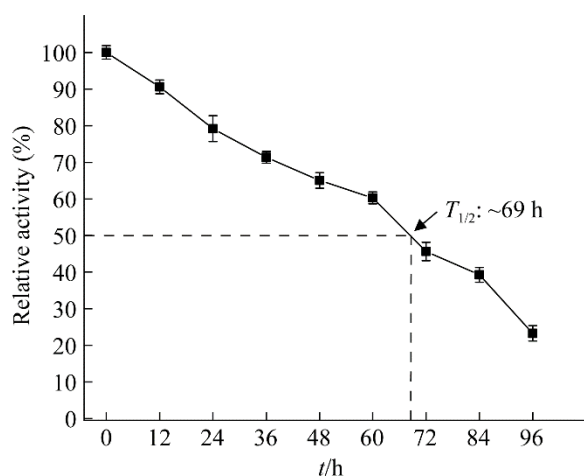


图 5 NCasn5 的血清半衰期

Figure 5 The serum half-life of NCasn5. Data are expressed as the mean value ( $\pm$ SD) for three independent experiments.

( $P<0.05$ ), 并随着酶浓度的增加, 呈现先下降后平缓的趋势 (图 6)。在 10–40 U/mL 范围内, NCasn5 与同等浓度的商业酶相比有显著差异 ( $P<0.05$ )。NCasn5 处理后的丙烯酰胺含量分别降低了 27.76%、48.78%、57.30% 和 64.83%; 经相同浓度的商业酶处理后, 丙烯酰胺降解率分别为 52.92%、66.86%、72.17% 和 73.34%。而将酶浓度提高至 45 U/mL 和 50 U/mL 时, 两种酶的降解率差异不再显著。NCasn5 和商业酶处理后的丙烯酰胺降低率分别为 67.58%–69.35% 和 73.73%–74.96%。

## 2.5 NCasn5 的抑癌活性

### 2.5.1 MTT 法测试 NCasn5 的抑癌活性

用 MTT 法评估了 NCasn5 对人肝癌细胞 QGY-7703 和人恶性细胞瘤细胞 A-375 的毒性作用 (图 7)。与对照组相比, 2 U/mL NCasn5 处理的 QGY-7703 细胞未记录到显著的细胞毒性, 而对 A-375 细胞抑制率为 35%; 用 4 U/mL

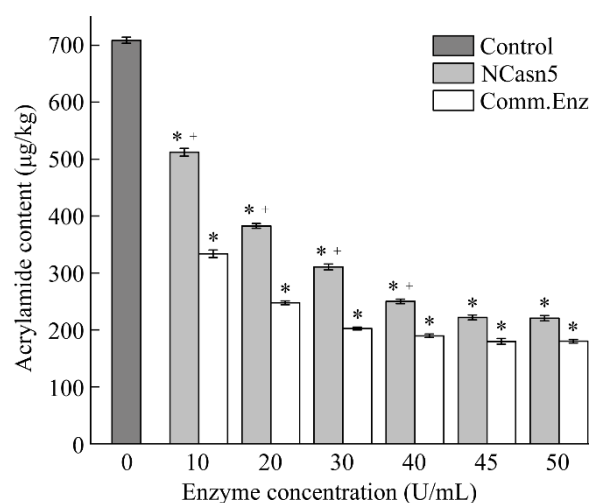
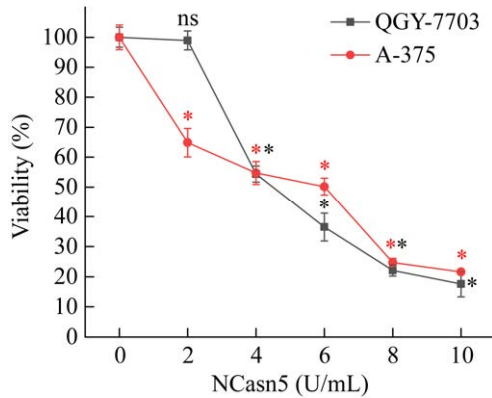


图 6 NCasn5 对丙烯酰胺含量的影响

Figure 6 Impact of NCasn5 on acrylamide levels. Comm.Enz indicate commercial asparaginase. Data are expressed as the mean value ( $\pm$ SD) for three independent experiments. \*:  $P<0.05$  vs. control group; †:  $P<0.05$  vs. commercial enzymes of the same concentration.

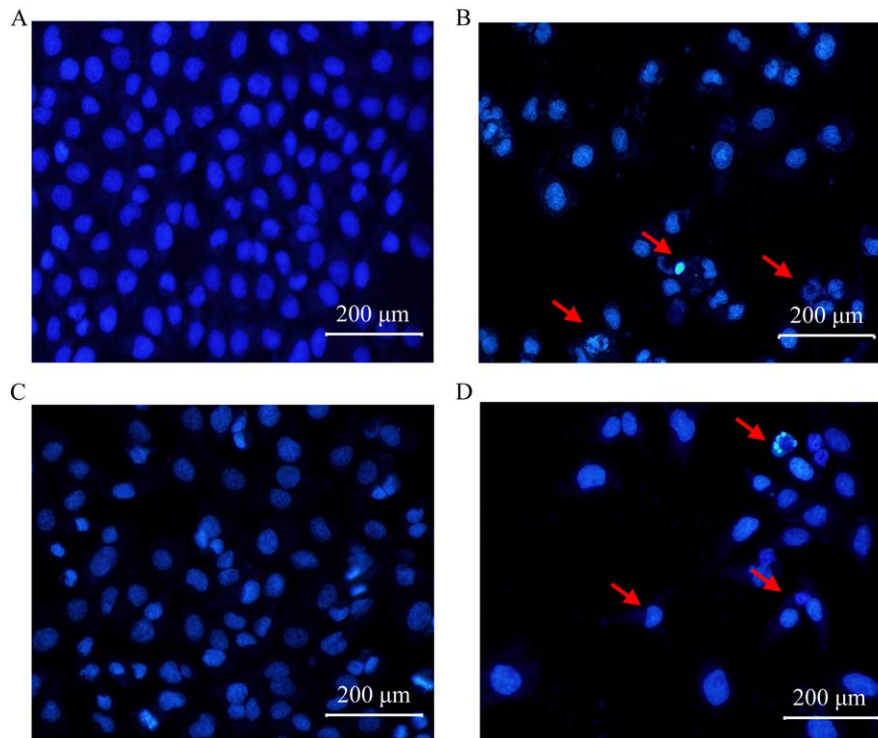


**图 7 NCasn5 对 QGY-7703 和 A-375 细胞生长的影响**  
 Figure 7 Impact of NCasn5 on the viability of QGY-7703 and A-375 cells. Data are expressed as the mean value ( $\pm$ SD) for three independent experiments. ns: No significance vs. QGY-7703 control group; Black \*:  $P < 0.05$  vs. QGY-7703 control group; Red \*:  $P < 0.05$  vs. A-375 control group.

NCasn5 处理后, QGY-7703 和 A-375 细胞的存活率都降至约 54%。这表明不同浓度的 NCasn5 对两种癌细胞展示出了不同程度的抑制作用, 并以剂量依赖的方式影响细胞系的活力( $P < 0.05$ )。

### 2.5.2 细胞形态及 DAPI 染色评估

在倒置荧光显微镜下观察 NCasn5 对癌细胞的抑制作用(图 8)。NCasn5 处理后的细胞数量减少, 显示出凋亡的细胞核形态学迹象, 如细胞核波纹状、染色质高度凝聚和细胞核碎裂成大小不等的圆形小体。然而, 对照组细胞核呈现均匀的荧光分布, 形状为规则的椭圆形或圆形, 这表明在 L-ASNase 处理下, 细胞凋亡可能是细胞死亡的主要方式。



**图 8 NCasn5 对细胞 QGY-7703 和 A-375 细胞核的影响**

Figure 8 Effects of NCasn5 on the nuclei of QGY-7703 and A-375 cells. A: DAPI staining of untreated QGY-7703 cells. B: DAPI staining of QGY-7703 cells treated with 4 U/mL NCasn5. C: DAPI staining of untreated A-375 cells. D: DAPI staining of A-375 cells treated with 4 U/mL NCasn5. Red arrowhead indicates cells exhibiting morphological features of apoptosis.

### 3 讨论与结论

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得 L-ASNase NCasn5, 系统发育树上聚类于独立的未知类型分支, 与未表征的真杆菌 (*Eubacterium* sp.) L-ASNase 同源性最高(图 1)。真杆菌是人类肠道的核心微生物、丁酸盐的主要产生菌, 该属多个物种是微生物治疗中有前景的靶点, 对调节宿主炎症、血糖水平、免疫反应和胆固醇稳态等有重要作用<sup>[29]</sup>。Zielezinski 等<sup>[30]</sup>构建细菌 L-ASNase 的系统发育树后发现, 一些细菌 L-ASNase 的氨基酸序列与已知类型 L-ASNase 相似性低, 可能是细菌间水平基因转移或酶功能区域的序列变异所致, 是目前尚未被发现的新型 L-ASNase。

多序列对比显示, 不同细菌 L-ASNase 中第 88 位亲核氨基酸残基(Thr)高度保守, 本研究的 NCasn5 在此位点的氨基酸为 Ser(图 2)。Palm 等<sup>[31]</sup>将 *E. coli* L-ASNase 相应位点的 Thr 突变为 Ser 后发现, Ser 仍可以通过亲核攻击与底物形成共价酰-酶中间体, 促进产物释放。因此, NCasn5 的 S88 可能不影响其催化功能。此外, NCasn5 第 26 位和第 159 位的催化氨基酸残基也不同于其他 L-ASNase, 可能与低频率的氨基酸替换有关<sup>[30]</sup>。

研究表明, 已报道细菌 L-ASNase 的最适 pH 介于 6.0–9.5, 多数属于中温酶<sup>[32]</sup>, 本研究获得的 NCasn5 最适 pH 为 8.0, 与用于治疗的黑萝卜软腐坚固杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*) L-ASNase 一致<sup>[5]</sup>。NCasn5 在缓冲液(pH 5.0–9.0)中 37 °C 孵育 1 h 仍保持 80% 以上酶活力, 与巴伦氏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus barengoltzii*) L-ASNase 的稳定性相似<sup>[33]</sup>。NCasn5 不仅在生理 pH 范围内高度稳定, 而且在弱酸性 (pH 5.0–6.0) 条件下也保持良好活性, 突出了 NCasn5 作为食品加工和医疗领域候选剂的潜

力。NCasn5 最适温度为 60 °C, 与水杆状菌 (*Aquabacterium* sp.) A7-Y 和 *C. amphilecti* L-ASNase 一致(表 2), 但低于小宝岛热球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) L-ASNase (85 °C)<sup>[44]</sup>, 可能是 NCasn5 中催化和非催化氨基酸残基之间的相互作用影响了其催化结构域及最适温度<sup>[45]</sup>。NCasn5 在 30–55 °C 孵育 1 h 后酶活力几乎不变, 与鱼肠道微生物组来源的 SlpA 在 40 °C 孵育 1 h 后仅有 60% 以上酶活相比, 表现出更好的热稳定性<sup>[21]</sup>。而谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) L-ASNase 孵育温度超过 35 °C 时急剧下降, 40 °C 5 min 后完全失活<sup>[42]</sup>。由于 L-ASNase 治疗癌症是通过注射给药, 血清会降低其生物利用度, 因此高稳定和较长的半衰期能减少多次给药引起的过敏反应和酶活性损失<sup>[34]</sup>。37 °C 条件下, NCasn5 的体外血清半衰期约 69 h, 比阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) L-ASNase (约 39 h)<sup>[34]</sup> 和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) L-ASNase (约 44 h)<sup>[46]</sup> 更长, 为其用于医药领域提供可能。

NCasn5 对底物 L-Asn 高度专一, 可能与其 N 末端柔性环内负责底物结合的氨基酸残基间的相互作用有关, 此作用引起的构象限制可能影响了酶对底物的特异性<sup>[47]</sup>。研究表明, 一些 L-ASNase 因具有谷氨酰胺酶活性, 可能在食品加工过程中促进丙烯酰胺的形成<sup>[48]</sup>, 这些酶在临床治疗中也可能引发过敏反应、神经毒性及胰腺炎等副作用<sup>[14]</sup>。因此, 无谷氨酰胺酶活性的 NCasn5 成为制药和食品工业中潜在的候选制剂。此外, NCasn5 的  $K_m$  为 (3.33±0.21) mmol/L, 低于齐氏热球菌 (*Thermococcus zilligii*) 和戈登分枝杆菌 (*Mycobacterium goodii*) 等来源的 L-ASNase, 但比大部分 L-ASNase II 高(表 2)。不同微生物 L-ASNase 的  $K_m$  值范围在 0.012–35.000 mmol/L 之间<sup>[15]</sup>, 该值可能受到酶的来源、底物类型和实验条件等因素的影响<sup>[49]</sup>。

表 2 NCasn5 与部分微生物来源的天冬酰胺酶酶学性质比较

Table 2 Comparative enzymatic properties of NCasn5 with asparaginases from various microbial sources

Type	Source	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	$K_m$ (mmol/L)	Specific activity (U/mg)	Application Acrylamide reduction (%)	Cancer type	References
Unknown	<i>Nycticebus pygmaeus</i> faecal metagenome	8.0	60	3.33±0.21	645.73	69.35	QGY-7703, A-375	This study
	<i>Enterobacter cloacae</i>	7.0–8.0	35–40	1.58	105.07	–	HL60, MOLT4, MDAMB231, T47D	[34]
I	<i>Palaeococcus ferrophilus</i>	8.5	95	5.00	1 631.00	79.00	–	[35]
	Fish gut microbiome	8.0	30	3.01	478.81	63.00	K562, MCF7	[21]
	<i>Acinetobacter soli</i>	8.0	40	3.22	400.00	55.90	–	[36]
	<i>Mycobacterium gordonae</i>	9.0	50	6.03	486.65	65.09	–	[37]
	<i>Thermococcus zilligii</i>	8.5	90	6.08	5 278.00	80.50	–	[38]
II	Soil metagenome	7.0	35	2.00	696.00	–	HL60, MOLT3, MOLT4	[20]
	Caspian Sea metagenome	7.5	–	0.15	100.00	–	Jurkat	[19]
	<i>Bacillus velezensis</i>	7.5	37	0.04	31.77	–	MDAMB231, MCF7	[12]
	<i>Bacillus licheniformis</i>	6.5	37	49.99	36.08	–	HepG2, MCF7	[39]
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	8.5	55	0.49	250.60	–	Hep3B, HCC SNU387	[40]
	<i>Melioribacter roseus</i>	9.3	70	1.40	1 530.00	–	K562, Jurkat, LnCap, SCOV-3	[41]
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	9.0	45	4.66	1 979.08	84.00	–	[42]
	<i>Cobetia amphilecti</i>	7.0	60	2.05	778.00	81.93	–	[9]
	<i>Pseudomonas</i> sp. PCH182	8.5	45	0.52	41.50	73.00	–	[10]
	<i>Aquabacterium</i> sp. A7-Y	9.0	60	1.80	458.90	88.20	–	[43]

–: None or not mentioned in the literature.

L-ASNase 可降低不同食品中约 55.90%–88.20% 的丙烯酰胺含量(表 2), 一些 L-ASNases II 对各种类型的癌细胞有抑制作用, 如白血病(K562、HL60、MOLT3、MOLT4 和 Jurkat)、乳腺癌(MCF7、MDAMB231 和 T47D)、肝癌(HepG2 和 Hep3B)、卵巢癌(SCOV-3)及前列腺癌(LnCap)的细胞。本研究用不同浓度的 NCasn5 处理薯条, 可以明显减少油炸过程中丙烯酰胺的生成。40 U/mL NCasn5 可使丙烯酰胺减少 64.83%, 而增加 NCasn5 的浓度至 45–50 U/mL 时, 与商业酶 L-ASNase 的降解率相比无显著差

异。用 50 U/mL 酶液处理 0.5 h 后, 丙烯酰胺降解率最高可达 69.35%, 高于 *M. gordonae* 和鱼肠道来源的 SlpA 的降解率, 但低于 *T. zilligii*、*C. glutamicum* 和 *C. amphilecti* (表 2)。这可能是由于 60 °C 条件下酶的稳定性不佳, 无法同时对薯条进行酶水解和热烫处理, 进而限制了丙烯酰胺的减少<sup>[50]</sup>。此外, NCasn5 以浓度依赖性抑制 QGY-7703 和 A-375 细胞的生长, 其作用机制已被阐明, L-ASNase 通过消耗血清中合成糖蛋白及其他营养物质所必需的 L-Asn, 抑制了癌细胞的代谢活性, 从而诱导癌细胞凋亡<sup>[51]</sup>。

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中成功获得新型的 L-ASNase NCasn5, 该酶无谷氨酰胺酶活性, 在 37 °C 血清中具有高稳定性( $T_{1/2}$ : 约 69 h), 抑制肝癌细胞及人恶性黑色素瘤细胞的增殖, 并能减少油炸薯条中丙烯酰胺的含量, 为 L-ASNase 在药物开发及食品工业领域提供了一个新的方向。为提高其应用潜力, 需要进一步通过生物信息学分析、结构诱变和固定化等方法提高重组酶的稳定性和与底物的亲和力。

## 致谢

感谢云南师范大学生命科学学院汪旭教授和倪娟副教授在细胞实验上给予的帮助。

## 参考文献

- [1] ZUO SH, ZHANG T, JIANG B, MU WM. Recent research progress on microbial L-asparaginases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1069-1079.
- [2] LOCH JI, JASKOLSKI M. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity[J]. *IUCrJ*, 2021, 8(Pt 4): 514-531.
- [3] YUN MK, NOURSE A, WHITE SW, ROCK CO, HEATH RJ. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 369(3): 794-811.
- [4] PATEL PG, PANSERIYA HZ, VALA AK, DAVE BP, GOSAI HB. Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 121: 529-541.
- [5] GHASEMIAN A, AL-MARZOQI AH, AL-ABODI HR, ALGHANIMI YK, KADHUM SA, SHOKOUHI MOSTAFAVI SK, FATTAHI A. Bacterial L-asparaginases for cancer therapy: current knowledge and future perspectives[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 19271-19279.
- [6] LUBKOWSKI J, WLODAWER A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase[J]. *FEBS Journal*, 2021, 288(14): 4183-4209.
- [7] KRISHNAPURA PR, BELUR PD, SUBRAMANYA S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, 42(5): 720-737.
- [8] 陈菊花, 焦琳舒, 谢亚娟, 陆兆新, 张充, 吕凤霞. 地衣芽孢杆菌 L-天冬酰胺酶I型的克隆表达及其在降低薯条中丙烯酰胺的应用[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 20-26.
- CHEN JH, JIAO LS, XIE YJ, LU ZX, ZHANG C, LÜ FX. Cloning, expression and characterization of a novel type I L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* and its application in reduction of acrylamide in French fries[J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 20-26 (in Chinese).
- [9] FARAHAT MG, AMR D, GALAL A. Molecular cloning, structural modeling and characterization of a novel glutaminase-free L-asparaginase from *Cobetia amphilecti* AMI6[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 685-695.
- [10] PATIAL V, KUMAR V, JOSHI R, GUPTA M, SINGH D. Acrylamide mitigation in foods using recombinant L-asparaginase: an extremozyme from Himalayan *Pseudomonas* sp. PCH182[J]. *Food Research International*, 2022, 162(Pt A): 111936.
- [11] ABDELRAZEK NA, ELKHATIB WF, RAAFAT MM, ABOULWABA MM. Production, characterization and bioinformatics analysis of L-asparaginase from a new *Stenotrophomonas maltophilia* EMCC2297 soil isolate[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 71.
- [12] MOSTAFA Y, ALRUMMAN S, ALAMRI S, HASHEM M, AL-IZRAN K, ALFAIFI M, ELBEHAIRI SE, TAHA T. Enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 42: 6-15.
- [13] BASHA NS, REKHA R, KOMALA M, RUBY S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: purification and characterisation[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2009, 8(4): 353-360.
- [14] DARVISHI F, JAHANAFROOZ Z, MOKHTARZADEH A. Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(17): 5335-5347.
- [15] JIA RY, WAN X, GENG X, XUE DM, XIE ZX, CHEN CR. Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: current research status and future perspectives[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1659.

- [16] MIRANDA J, LEFIN N, BELTRAN JF, BELÉN LH, TSIPA A, FARIAS JG, ZAMORANO M. Enzyme engineering strategies for the bioenhancement of L-asparaginase used as a biopharmaceutical[J]. *BioDrugs*, 2023, 37(6): 793-811.
- [17] KNOP K, HOOGENBOOM R, FISCHER D, SCHUBERT US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives[J]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2010, 49(36): 6288-6308.
- [18] HALDAR S, NAZARETH SW. Taxonomic diversity of bacteria from mangrove sediments of Goa: metagenomic and functional analysis[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(10): 436.
- [19] SOBAT M, ASAD S, KABIRI M, MEHRSHAD M. Metagenomic discovery and functional validation of L-asparaginases with anti-leukemic effect from the Caspian Sea[J]. *iScience*, 2021, 24(1): 101973.
- [20] ARJUN JK, ANEESH BP, KAVITHA T, HARIKRISHNAN K. Characterization of a novel asparaginase from soil metagenomic libraries generated from forest soil[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(2): 343-348.
- [21] JOHNY TK, PUTHUSSERI RM, SAIDUMOHAMED BE, SHEELA UB, PUTHUSSERI SP, SASIDHARAN RS, BHAT SG. Appraisal of cytotoxicity and acrylamide mitigation potential of L-asparaginase SlpA from fish gut microbiome[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(9): 3583-3598.
- [22] SUDHA K, JOHN R, SIVANSANKARIT R. Extracellular L-asparaginase production by halotolerant strain of *Enterobacter hormaechei* isolated from marine fishes[J]. *International Journal of Advanced Research*, 2017, 5(1): 2619-2625.
- [23] BHARGAVI M, JAYAMADHURI R. Isolation and screening of marine bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase[J]. *Science and Education Publishing*, 2016, 4(1): 1-3.
- [24] SAHU MK, POORANI E, SIVAKUMAR K, THANGARADJOU T, KANNAN L. Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase enzyme of the actinomycete strain LA-29 isolated from the estuarine fish, *Mugil cephalus* (Linn.)[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2007, 28(3): 645-650.
- [25] STENTZ R, JONES E, JUODEIKIS R, WEGMANN U, GUIRRO M, GOLDSOHN AJ, BRION A, BOOTH C, SUDHAKAR P, BROWN IR, KORCSMÁROS T, CARDING SR. The proteome of extracellular vesicles produced by the human gut bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron in vivo* is influenced by environmental and host-derived factors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(16): e0053322.
- [26] RAO Y, KUANG ZQ, LI C, GUO SY, XU YH, ZHAO DD, HU YT, SONG BB, JIANG Z, GE ZH, LIU XY, LI CD, CHEN SB, YE JM, HUANG ZS, LU YJ. Gut *Akkermansia muciniphila* ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by regulating the metabolism of L-aspartate via gut-liver axis[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-19.
- [27] 郝亚楠, 费永乐, 张文玲, 马楠楠, 李书国. 紫外分光光度法快速测定油炸食品中丙烯酰胺的含量[J]. *粮食加工*, 2013, 38(1): 73-75.
- HAO YN, FEI YL, ZHANG WL, MA NN, LI SG. Rapid determination of acrylamide in fried food by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Grain Processing*, 2013, 38(1): 73-75 (in Chinese).
- [28] AMEEN F, ALSHEHRI WA, AL-ENAZI NM, ALMANSOB A. L-asparaginase activity analysis, *ansZ* gene identification and anticancer activity of a new *Bacillus subtilis* isolated from sponges of the Red Sea[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(12): 2576-2584.
- [29] MUKHERJEE A, LORDAN C, ROSS RP, COTTER PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1802866.
- [30] ZIELEZINSKI A, LOCH JI, KARLOWSKI WM, JASKOLSKI M. Massive annotation of bacterial L-asparaginases reveals their puzzling distribution and frequent gene transfer events[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 15797.
- [31] PALM GJ, LUBKOWSKI J, DERST C, SCHLEPER S, RÖHM KH, WLODAWER A. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: crystal structure of a Thr-89-Val mutant[J]. *FEBS Letters*, 1996, 390(2): 211-216.
- [32] BATOOL T, MAKKY EA, JALAL M, YUSOFF MM. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(5): 900-923.
- [33] SHI R, LIU Y, MU Q, JIANG ZQ, YANG SQ. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 93-99.

- [34] HUSAIN I, SHARMA A, KUMAR S, MALIK F. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*: *in-vitro* evaluation of cytotoxic potential against human myeloid leukemia HL-60 cells[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148877.
- [35] WANG YM, WU H, ZHANG WL, XU W, MU WM. Efficient control of acrylamide in French fries by an extraordinarily active and thermo-stable L-asparaginase: a lab-scale study[J]. Food Chemistry, 2021, 360: 130046.
- [36] JIAO LS, CHI HB, LU ZX, ZHANG C, CHIA SR, SHOW PL, TAO Y, LU FX. Characterization of a novel type I L-asparaginase from *Acinetobacter soli* and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 129(6): 672-678.
- [37] CHI HB, CHEN MR, JIAO LS, LU ZX, BIE XM, ZHAO HZ, LU FX. Characterization of a novel L-asparaginase from *Mycobacterium gordonae* with acrylamide mitigation potential[J]. Foods, 2021, 10(11): 2819.
- [38] ZUO SH, ZHANG T, JIANG B, MU WM. Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing[J]. Extremophiles, 2015, 19(4): 841-851.
- [39] ALRUMMAN SA, MOSTAFA YS, AL-IZRAN KA, ALFAIFI MY, TAHA TH, ELBEHAIRI SE. Production and anticancer activity of an L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the red sea, Saudi Arabia[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 3756.
- [40] ÖZDEMİR Fİ, DIDEM ORHAN M, ATASAVUM ZT, TÜLEK A. Biochemical characterization and detection of antitumor activity of L-asparaginase from thermophilic *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263<sup>T</sup>[J]. Protein Expression and Purification, 2022, 199: 106146.
- [41] DUMINA M, ZHGUN A, POKROVSKAYA M, ALEKSANDROVA S, ZHDANOV D, SOKOLOV N, EL'DAROV M. Highly active thermophilic L-asparaginase from *Melioribacter roseus* represents a novel large group of type II bacterial L-asparaginases from chlorobi-ignavibacteriae-bacteroidetes clade[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13632.
- [42] CHI HB, XIA BJ, SHEN J, ZHU XY, LU ZX, LU FX, ZHU P. Characterization of a novel and glutaminase-free type II L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum* and its acrylamide alleviation efficiency in potato chips[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 221: 1384-1393.
- [43] SUN ZB, QIN R, LI D, JI K, WANG T, CUI ZL, HUANG Y. A novel bacterial type II L-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in French fries[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 232-239.
- [44] CHOCHAN SM, SAJED M, NAEEM SU, RASHID N. Heterologous gene expression and characterization of TK2246, a highly active and thermostable plant type L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 131-137.
- [45] LONG SQ, ZHANG X, RAO ZM, CHEN KY, XU MJ, YANG TW, YANG ST. 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.
- [46] AISHWARYA SS, SELVARAJAN E, IYAPPAN S, RAJNISH KN. Recombinant L-asparaginase II from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and its anticancer activity[J]. Indian Journal of Microbiology, 2019, 59(3): 313-320.
- [47] NGUYEN HA, DURDEN DL, LAVIE A. The differential ability of asparagine and glutamine in promoting the closed/active enzyme conformation rationalizes the *Wolinella succinogenes* L-asparaginase substrate specificity[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41643.
- [48] CLAEYS WL, VLEESCHOUWER KD, HENDRICKX ME. Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(5): 1525-1530.
- [49] EL-NAGGAR NEA, DERAZ SF, EL-EWASY SM, SUDDEK GM. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brollosae* NEAE-115[J]. BMC Pharmacology & Toxicology, 2018, 19(1): 51.
- [50] 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: 江南大学硕士学位论文, 2015.  
ZUO SH. Characterization of thermostable L-asparaginases and enzymatic control of acrylamide level in food[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese).
- [51] STORY MD, VOEHRINGER DW, STEPHENS LC, MEYN RE. L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1993, 32(2): 129-133.