

北京棒杆菌 *Corynebacterium pekinense* 天冬氨酸激酶 P184M 酶动力学分析及酶学性质表征

王锐楠, 张芷睿, 方丽, 闵伟红*, 刘春雷

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

摘要: **目的** 研究北京棒杆菌天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK)184位点脯氨酸(proline, P)突变为蛋氨酸(DL-methionine, M)对酶动力学及酶学性质的影响。**方法** 对北京棒杆菌 AK 家族同源序列比对, 选择出高度保守且远离底物结合位点的 Pro184 位点, 对其进行饱和和定点突变, 成功构建突变体 P184M。**结果** 动力学和酶学性质研究表明: P184M AK V_{\max} 比 WT(wild type)提高了 5.06 倍; n 值为 0.19, 突变体由 WT 的正协同性变为负协同性, 同时 K_m (mol/L)值增大; 突变体 AK 最适 pH 为 6.5, 低于野生型最适 pH 7.0; 最适反应温度 28 °C, 低于 WT 的 30 °C, 适宜温度区间变窄; 半衰期由 WT 的 2.1 h 降为 1.2 h; 金属离子、有机溶剂和抑制剂 Thr+Met、Lys+Met、Thr+Lys+Met 对突变株 AK 均表现出激活作用。**结论** 突变体天冬氨酸激酶 P184M 的酶动力学性质和酶学性质改变显著, 为构建高产蛋氨酸菌株提供了一定的参考依据。

关键词: 北京棒杆菌; 天冬氨酸激酶; 突变株; 酶学性质

Enzyme kinetics analysis and enzymatic properties of aspartate kinase P184M from *Corynebacterium pekinense*

WANG Rui-Nan, ZHANG Zhi-Rui, FANG Li, MIN Wei-Hong*, LIU Chun-Lei

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

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of site 184 proline (P) of aspartate kinases (AK) mutationed to DL-methionine (M) on enzyme kinetics and enzymatic properties. **Methods** Mutant P184M was successfully constructed by saturation site-directed mutagenesis of highly conserved amino acid and far away from inhibitors binding site P184 which was selected by sequence homology analysis of aspartate kinase family. **Results** The kinetics and enzymatic results showed that the V_{\max} of P184M AK was 5.06 times higher than that of wide type (WT). The n value was 0.19 indicating that mutant changed to negative synergistic reaction from synergistic reaction and K_m value increased simultaneously. The optimum pH of P184M was 6.5, which was lower than that of WT (pH 7.0). The optimum temperature of P184M was 28 °C, which was lower than that of WT (30 °C). The half-life period decreased from 2.1 h to 1.2 h. Furthermore, P184M AK activated significantly by metal ions, organic solvent and inhibitors (Thr+Met, Lys+Met, Thr+Lys+Met). **Conclusion** The kinetics and enzymatic properties of mutant AK P184M are

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

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

*通讯作者: 闵伟红, 教授, 博士, 主要研究方向为发酵工程, 粮食科学与深加工技术。E-mail: minwh2000@163.com

*Corresponding author: MIN Wei-Hong, Professor, Jilin Agricultural University, No.2888, Xincheng Street, Jingyue District, Changchun 130118, China. E-mail: minwh2000@163.com

significantly changed, which provides a reference for the construction of high yield methionine strains.

KEY WORDS: *Corynebacterium pекinense*; aspartate kinase; mutant; enzymatic properties

1 引言

天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK)是生物合成苏氨酸、赖氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸生物途径中关键酶之一,广泛存在于植物、细菌和真菌中^[1-4]。AK 是该合成途径中第一个关键酶,其利用 ATP 将天冬氨酸磷酸化生成天冬氨酰-P,指导碳在代谢中的流通^[5,6],对天冬氨酸族氨基酸的合成与积累具有重要作用。植物中存在的 AK 可以划分为 3 种单功能酶 AKs(AK I、AK II 和 AK III)和 2 种双功能酶 AK-高丝氨酸脱氢酶(AK I-HSDH I 和 AK II-HSDH II)^[7,8]。大肠杆菌中的 AK I 和 AK III 分别受苏氨酸、赖氨酸和亮氨酸的反馈抑制^[9],而谷氨酸棒杆菌中的 AK 属于 AK II^[10],受到赖氨酸和苏氨酸协同抑制^[11,12]。

北京棒杆菌 AK 晶体结构尚未报道,而其与谷氨酸棒杆菌 AK 同源性达到 99%,因此本研究利用谷氨酸棒杆菌 AK 晶体结构(3aaw, Protein Data Bank, PDB)^[13]为模板对北京棒杆菌 AK 进行研究。谷氨酸棒杆菌 AK 是 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体^[14], α 亚基与 β 亚基具有同源性^[15],均包含 2 个 ACT 结构域(ACT 1 和 ACT 2),其催化结构域属于氨基酸激酶家族(Pfam 00696)^[16],该催化结构域 C 端为 ATP 提供了核苷酸结合口袋,AK Pro184 是 ATP 结合位点的第一个氨基酸,位于 β_6 和 β_7 之间的环路上^[17],同时与天冬氨酸激酶家族同源序列比对可知该点为高度保守氨基酸位点,我们推想其对 AK 空间变构有着潜在的远程调控能力。如图 1 所示,Pro184 位点位于 AK α 亚基 loop 8 上,改变该保守位点使得 loop 8 与附近的 loop 6 极有可能改变原有的相互作用关系,以抵消 AK 在结合抑制剂苏氨酸和赖氨酸后产生的变构效应,从而使得 AK 催化结构域受到的变构影响降低或者消除。目前,解除 AK 反馈抑制的研究均集中在配体周围的残基及与其相关的作用力,而对于远离结合位点却影响配体结合的残基的研究未见报道。

因此本研究在北京棒杆菌 AK 基因与载体 pET-28a 实现重组的基础上,运用基因工程技术对 AK 基因 Pro184 进行饱和和定点突变,研究北京棒杆菌中 AK 基因序列 Pro184 位点改变以及潜在的远程调控作用对 AK 活力的影响。Pro184 位点的所有突变体中 P184M 是唯一一个酶的亚基由正协同性改变为负协同性且酶活力提高的突变体,同时,P184M 突变体对各类金属离子、有机溶剂、底物抑制剂及组合适应性较好,为高产天冬氨酸族氨基酸基因工程菌的构建提供新的思路及参考。

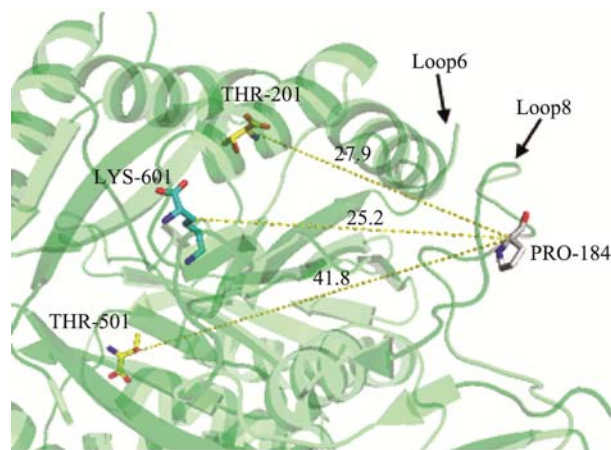


图 1 AK (3aaw, PDB) P184 位点与抑制剂结合位点
Fig. 1 AK (3aaw, PDB) P184 and inhibitors binding sites

2 材料与方法

2.1 试验材料

表达宿主大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)(美国 Novagen 公司); Luria-Bertani 培养基(LB 培养基)(北京奥博星生物技术有限责任公司)。

核酸、蛋白电泳 maker、DNA 聚合酶及定点突变试剂盒、Dpn I 内切酶、质粒抽提试剂盒(大连 TaKaRa 公司); 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、卡那霉素、腺苷三磷酸(ATP)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 非变性镍柱(瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司)。

2.2 试验仪器

Scientz-II D 超声波破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司); Z36HK 高速冷冻离心(德国 HERMLE 公司); SE260 蛋白电泳仪(瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司); Jim-X 核酸电泳槽(上海伯泰生物技术有限公司); AG PCR 仪(德国 eppendorf 中国有限公司); CL-32L 高压蒸汽灭菌器(日本 ALP 公司); infinitieM200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 构建突变体重组质粒 pET-28a-P184M

使用 Primer Premier 5 软件进行设计,并交由上海生物工成有限公司合成。引物如下(划线部分为突变位点):上游引物 5'-GTGCATTAGGAACGATGCGCAATGTGTCAGCGG TATAC-3'; 下游产物 5'-GTATACCGCTGACAATGCGCAT

CGTTCCTAATGCAC-3'。

以本实验提供的连接 AK 的重组质粒 pET-28a 为模板, 使用合成的引物进行全质粒 PCR 反应。反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 10 min, 循环 18 次; 72 °C 20 min。PCR 产物用 Dpn I 酶消化除去甲基化的质粒模板, 消化产物用于下一步转染。

取上述消化产物 1 μL 加入 100 μL 大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 °C 金属浴 90 s, 冰浴 2 min 后加入 900 μL LB 培养基(不含卡那霉素)37 °C、180 r/min 培养 1 h, 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清 800 μL, 剩余 200 μL 重悬菌体涂布于 LB 平板上, 37 °C 培养过夜。所得菌落接种至 10 mL LB 培养基中活化并进行下一步菌液 PCR 进行验证并交由上海生物工程有限公司测序。

2.3.2 菌液 PCR 及粗酶液制备

以普通 AK 克隆引物为引物, 上一步获得的菌液为模板, 进行菌液 PCR 扩增。克隆引物: 上游引物 5'-GGAATTCATATGGCCCTGGTCGTACAGAA-3'; 下游引物 5'-GGAATTCTTAGCGTCCGGTGCCTGCAT-3'。反应条件: 94 °C, 4 min; 94 °C 40 s, 58 °C 60 s, 72 °C 90 s, 循环 30 次; 72 °C, 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。

活化上述测序成功的菌种, 以 2% 接种量接入 100 mL LB 培养基中 220 r/min 培养 1.8 h, 待菌液 OD₆₀₀(optical density 600 nm) 值在 0.6~0.8 加入 1 μL IPTG 诱导发酵 10 h, 8000 r/min, 4 °C 离心 10 min 收集菌体。AK 蛋白粗酶液制备方法参考文献^[18]。

2.3.3 纯化和电泳

使用非变性镍柱对粗酶液进行纯化。纯化方法和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳的具体步骤参照文献^[18]。

2.3.4 酶活力测定及酶动力学分析

利用吸光光度法通过检测天冬氨酸异羟肟酸 OD₅₄₀ 值改变来测定天冬氨酸激酶酶活力, 具体测定方法参照文献^[19]。

2.3.5 酶学性质研究

(1) 最适反应 pH: 用 Tris-HCl 调节反应体系 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.5、10, 其他条件不变进行酶活力测定, 每组检测 3 个平行样。

(2) 最适反应温度: 在温度分别为 15、20、25、26、28、30、35、40、45、50 °C, 其他条件不变进行酶活力测定, 每组检测 3 个平行样。

(3) 酶的半衰期: 将纯化得到的酶液保存于 28 °C 水浴中, 每隔 1 h 测定一次酶活力, 反应体系 pH 为 6.5, 其他条件不变进行酶活力测定, 以 0 h 的测定的酶活力定义为 100%。

(4) 金属离子和有机溶剂对酶活力的测定: 测定向反应体系中加入 10% 不同浓度(0.2、1、5、10 mmol/L)的金属

离子(Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Ni²⁺)对酶活力的影响, 不添加金属离子的酶活力定义为 100%。测定向反应体系中加入溶剂体积分数为 1%、5%、10%、20% 的甲醇、乙醇、丙三醇、异丙醇、乙腈、正丁醇、二甲基亚砜等有机溶剂对酶活力的影响, 不添加有机溶剂的酶活力定义为 100%, 以上每组 3 个平行样。

(5) 底物抑制剂对酶活力的测定: 测定向反应体系中加入不同浓度(0.2、1、5、10 mmol/L)的底物抑制剂苏氨酸(Thr)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)和抑制剂组合对酶活力的影响, 未添加底物抑制剂的酶活力定义为 100%。

2.4 数据分析

本研究实验数据采用 Origin 8.5 进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 重组菌株的构建及 SDS-PAGE

测序结果显示 184 位点由野生型 Pro 突变为 Met, 表明 P184M 构建成功。将含有 pET-28a-P184M 质粒的大肠杆菌单克隆培养, 提取质粒, 对其 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。结果表明, 在 4000~7000 bp 之间存在目的单带, 与 pET-28a-P184M 的 6822 bp 相符合, 表明突变体构建成功。

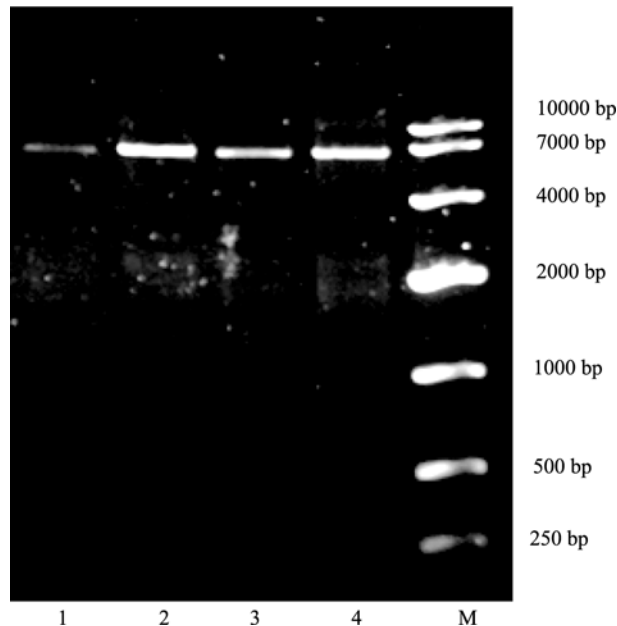


图 2 pET-28a-P184M 质粒 PCR 扩增 1% 琼脂糖凝胶验证结果
Fig. 2 The 1% agarose electrophoresis of PCR amplification products of plasmid pET-28a-P184M

纯化得到的酶液进行 SDS-PAGE, 结果如图 3 所示, 野生型粗酶液和纯化酶液, P184M 纯化酶液在 48 kDa 处都出现了目的条带, 表明 AK 基因表达成功。

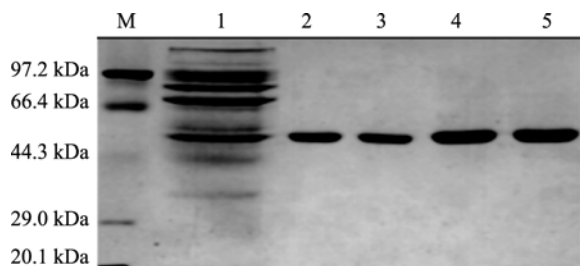


图 3 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophorogram
M: Maker; 1: WT 粗酶液; 2、3: P184M; 4、5: WT

3.2 P184M 动力学分析

所得动力学数据按 Hill 方程 $V=V_{\max}(S^n)/(K^n+S^n)$ 进行拟合, 结果表 1 所示, P184M 的最大反应速率(maximum velocity, V_{\max})比野生型(wide type, WT)的 V_{\max} 提高了 5.06 倍; n 值为 0.19, 远低于野生型 WT 的 2.6, 表明 P184M 由野生型 WT 的正协同反应变为负协同反应, 即酶在结合一个配体之后, 酶对其他配体的结合力减小, n 值减小进一步说明配体分子结合到酶上, 酶对其他配体的亲和力由增大变成减小; K_m 值增大。这可能是 P184 位于 AK 酶的 loop 8 上, 并且是 ATP 结合位点的唯一保守氨基酸, 虽然其远离 AK 酶的底物结合位点和抑制剂结合位点, 但是 Pro 突变为 Met 后使得结合 ATP 的能力和环路构象发生了改变, 使得 AK 酶的构象松弛改为变构抑制效应减弱, 结合配体之后不利于结合其他配体, 导致由正协同反应转变为负协同反应, 确切的机制有待进步证实。

3.3 P184M 酶学性质表征

3.3.1 温度和 pH 对酶活力的影响

如图 4(a)所示, P184M 最适温度为 28 °C, 低于 WT 的最适温度 30 °C; 30 ~ 50 °C, P184M 的酶活力急剧降低, 在

30 °C 时, 酶活降低了约 80%, 而 WT 呈缓慢下降的趋势。如图 4(b)所示, P184M 的最适 pH 为 6.5, 低于 WT 的最适 pH 7.0, 在 pH > 7 时, P184M 的酶活力出现了急剧的降低。

3.3.2 AK 酶稳定性的研究

如图 5 所示, P184M 的半衰期为 1.2 h, 低于 WT 的半衰期 2.1 h, 在 7 ~ 10 h, P184M 的酶活力为 0, 完全失去活力。这可能是因为 P184M 的构象较 WT 更加松弛。

3.3.3 金属离子对 AK 酶活力的影响

从表 2 可知, 与 WT 相比, P184M 对各种浓度金属离子均表现出良好的抗性。几乎所有浓度的离子都对 P184M 产生了激活作用, 对于 P184M, 10 mmol/L Ca^{2+} 的激活作用最强, 相对酶活力达到 246.09%, 1 mmol/L 的 Cu^{2+} 次之, 相对酶活力达到 171.28%。

3.3.4 有机溶剂对 AK 酶活力的影响

表 3 为有机溶剂对 WT 和 P184M 中 AK 活力的影响。由表可知, 大部分有机溶剂对 WT 产生了抑制作用, 而不同浓度的有机溶剂对 P184M 均表现出良好的激活作用, 其中甲醇、乙腈、二甲基亚砜和甘油激活作用明显。

3.3.5 底物抑制剂及组合对 AK 酶活力的影响

表 4 为不同底物抑制剂及组合对 WT 和 P184M 中 AK 活力的影响。与 WT 对比可知, 高浓度抑制剂及组合(除 10 mmol/L Lys)对 AK 酶均有不同程度的解除。明显解除了 Thr+Met、Lys+Met、Thr+Lys+Met(除 0.2 mmol/L Lys+Met)3 种抑制剂组合。

表 1 WT 和 P184M 动力学参数
Table 1 Kinetic parameters of WT and P184M

菌株类型	V_{\max} (U/mg·s)	K_m (mol/L)	n
WT	15.11	9.6	2.6
184L	76.44	12.6	0.19

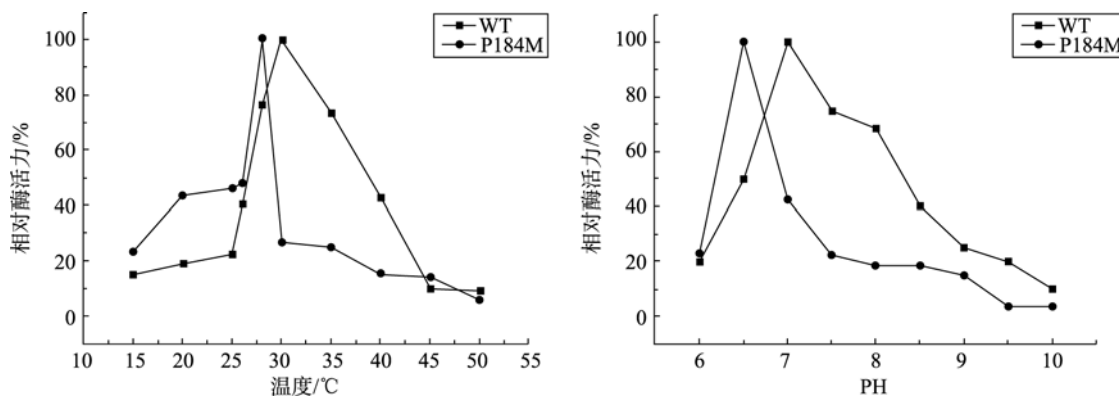


图 4 不同温度(a)和 pH 值(b)对 P184M AK 活力的影响

Fig. 4 Effects of temperature (a) and pH (b) on the activity of AK from P184M

表 2 金属离子对 WT 和 P184M 中 AK 活力的影响(% , n=3)
Table 2 Effect of metal ions on the enzyme activity of AK from WT and P184M (% , n=3)

Enzyme	P184M				WT			
金属离子 (mmol/L)	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Na ⁺	107.68±1.3	110.45±1.6	119.02±2.8	113.66±1.1	110.22±0.9	115.98±1.5	19.57±2.4	19.28±1.6
K ⁺	97.17±1.8	104.38±1.9	102.58±3.3	97.92±1.3	69.35±1.4	43.16±2.1	63.43±4.3	21.59±0.8
Ca ²⁺	246.09±0.6	114.60±2.3	106.73±4.3	102.39±2.2	187.04±1.1	169.20±3.4	99.74±0.7	56.08±2.1
Mg ²⁺	138.47±3.5	102.58±0.6	102.77±2.4	103.84±0.4	117.97±2.6	134.82±1.2	66.38±0.5	50.73±0.7
Zn ²⁺	106.22±4.0	110.39±5.0	113.41±1.6	106.42±0.7	125.90±2.6	153.24±1.3	81.81±1.6	45.16±0.9
Mn ²⁺	149.43±1.7	113.03±3.1	107.52±1.8	106.48±0.7	98.17±1.0	96.78±1.5	71.65±2.2	22.41±0.9
Cu ²⁺	127.89±1.3	163.53±3.5	171.28±1.1	131.42±1.2	119.86±0.6	92.61±2.0	147.80±2.7	33.90±1.6
Ni ²⁺	121.34±2.2	159.69±0.8	137.59±1.6	162.34±1.3	75.47±0.7	83.92±3.3	78.12±0.7	33.99±1.7
Fe ³⁺	134.63±3.1	104.28±1.5	145.65±1.8	119.71±0.9	120.23±0.3	96.39±1.8	59.45±0.6	36.10±2.1

表 3 有机溶剂对 WT 和 P184M 中 AK 活力的影响(% , n=3)
Table 3 Effect of organic solvents on the enzyme activity of AK from WT and P184M (% , n=3)

Enzyme	P184M				WT			
有机溶剂 (mmol/L)	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
甲醇	174.35±0.5	115.79±0.7	96.17±1.6	95.16±2.1	81.40±3.3	107.61±1.4	92.05±1.2	14.57±0.4
乙醇	104.58±0.9	99.98±0.4	110.97±0.7	136.41±0.4	152.60±2.8	115.31±2.4	94.03±1.7	14.26±0.8
异丙醇	99.64±1.8	119.82±1.6	142.18±0.6	101.27±0.3	63.91±1.6	26.31±0.8	27.29±2.0	14.26±1.2
正丁醇	100.65±1.5	100.45±1.7	91.57±0.6	98.75±1.6	76.30±2.0	103.70±1.1	17.18±1.6	14.90±1.0
乙腈	192.29±4.6	116.07±2.6	177.91±1.1	102.28±0.4	15.85±2.9	14.75±2.9	15.16±0.7	14.79±2.3
二甲基亚砜	130.58±1.5	111.36±1.3	107.15±1.7	93.93±3.1	16.06±1.3	15.26±4.3	17.41±0.9	15.66±0.6
甘油	152.16±1.1	157.99±2.3	91.65±1.0	100.22±1.4	14.92±0.9	15.10±1.5	24.48±1.8	16.77±0.6

表 4 底物抑制剂及组合对 WT 和 P184M 中 AK 活力的影响(% , n=3)
Table 4 Effect of substrate inhibitors on the enzyme activity of AK from WT and P184M (% , n=3)

Enzyme	P184M				WT			
底物抑制剂 (mmol/L)	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Thr	104.97±1.4	119.20±0.8	99.03±4.9	87.62±0.7	11.45±1.0	13.11±1.6	11.48±0.6	29.95±1.1
Lys	83.86±2.1	104.23±1.3	128.15±3.8	88.43±1.0	89.70±0.6	90.83±4.2	65.33±2.6	16.35±0.7
Met	107.00±3.1	123.08±2.2	84.17±3.1	84.22±2.2	38.39±2.5	90.09±0.5	81.49±2.1	17.78±0.3
Thr+Lys	104.67±1.6	121.05±1.0	95.83±2.7	84.62±3.5	13.00±2.8	32.11±1.7	82.42±1.4	11.83±1.8
Thr+Met	140.63±3.1	137.36±1.2	103.95±2.2	102.99±0.4	91.43±1.5	50.93±1.9	80.37±2.0	13.35±2.0
Lys+Met	123.03±0.8	169.07±0.2	115.52±1.8	93.86±1.8	28.75±0.9	52.08±0.8	25.37±3.4	12.62±1.9
Thr+Lys+Met	121.30±1.7	119.42±1.9	134.55±1.4	130.03±1.4	48.37±1.1	87.73±1.6	76.11±1.9	14.57±0.7

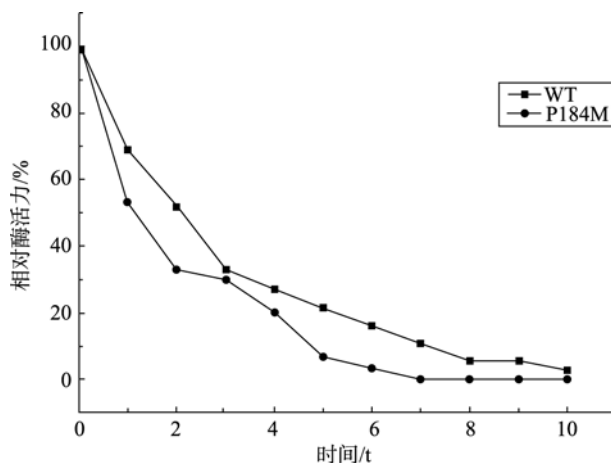


图 5 WT 和 P184M 中 AK 的稳定性
Fig. 5 Stability of AK from WT and P184M

4 结 论

本实验对北京棒杆菌中 AK 基因 Pro184 位点进行饱和和定点突变, 成功构建突变菌株 P184M。并对 P184M 的 AK 进行纯化和 10% SDS-PAGE 验证。酶动力学及酶学性质结果表明: 突变体 P184M 和 WT AK 分子质量均为 48 kDa, P184M AK V_{max} 较 WT 提高了 5.06 倍, 且正协同性转变为负协同性。酶学性质研究表明, P184M AK 最适 pH 值为 6.5, 最适反应温度 28 °C; 半衰期由 WT 的 2.1 h 降低到 1.2 h; 同时, P184M 对金属离子和有机溶剂均表现出良好的抗性, 解除底物抑制剂 Thr+Met、Lys+Met、Thr+Lys+Met(除 0.2 mmol/L Lys+Met)对 AK 酶活力的抑制作用。

参考文献

- [1] Black S, Wright NG. Aspartic β -semialdehyde dehydrogenase and aspartic β -semialdehyde [J]. Chem, 1955, 213(1): 39–50.
- [2] Mas-Droux C, Curien G, Robert GM, *et al.* A novel organization of ACT domains in allosteric enzymes revealed by the crystal structure of *Arabidopsis* aspartate kinase [J]. Plant Cell, 2006, 18(7): 1681–1692.
- [3] NRdal I, Netzer R, Ellingsen TE, *et al.* Analysis and manipulation of aspartate pathway genes for L-lysine overproduction from methanol by *Bacillus methanolicus* [J]. Appl Environ Microb, 2011, 77(17): 6020–6026.
- [4] Kumar D, Gomes J. Methionine production by fermentation [J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(1): 41–61.
- [5] Wang X, Lopez-Valenzuela JA, Gibbon BC, *et al.* Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm [J]. J Exp Bot, 2007, 58(10): 2653–2660.
- [6] Yoshioka Y, Kurei S, Machida Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression [J]. Genes Genet Syst, 2001, 76(3): 189–198.
- [7] Curien G, Ravel S, Robert M, *et al.* Identification of six novel allosteric effectors of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase homoserine dehydrogenase isoforms physiological context sets the specificity [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 41178–41183.
- [8] Zhen C, Rappert S, Jibin S, *et al.* Integrating molecular dynamics and co-evolutionary analysis for reliable target prediction and deregulation of the allosteric inhibition of aspartokinase for amino acid production [J]. J Biotechnol, 2011, 154(4): 248–254.
- [9] Shioo I, Miyajima R. Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum* [J]. J Biochem, 1969, 65(6): 849–859.
- [10] Kalinowski J, Cremer J, Bachmann B, *et al.* Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum* [J]. Mol Microbiol, 1991, 5(5): 1197–1204.
- [11] Dong X, Quinn PJ, Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(1): 11–23.
- [12] Kalinowski J, Bachmann B, Thierbach G, *et al.* Aspartokinase genes *LysC α* and *LysC β* overlap and are adjacent to the aspartate β -semialdehyde dehydrogenase gene *asd* *Corynebacterium glutamicum* [J]. Mol General Genetics, 1990, 224(3): 317–324.
- [13] Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, *et al.* Mechanism of concerted inhibition of $\alpha_2\beta_2$ -type hetero-oligomeric aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Mol Chem, 2010, 285: 27477–27486.
- [14] Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, *et al.* Crystal structures of the regulatory subunit of Thr-sensitive aspartate kinase from *Thermus thermophilus* [J]. Febs J, 2009, 276(11): 3124–3136.
- [15] Lo CC, Bonner A, Xie G, *et al.* The alternative translational profile that underlies the immune-evasive state of persistence in chlamydiae exploits differential tryptophan contents of the protein repertoire [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2012, 76(2):405.
- [16] Renaud D, David C, Adeline Y, *et al.* The many faces of aspartate kinases [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 519: 186–193.
- [17] Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, *et al.* [J]. Structural Insight into concerted inhibition of $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Mol Chem. 2007, 368(2): 521–536.
- [18] 郭永玲. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶的定点突变及突变株酶学性质表征 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
Guo YL. Site directed mutagenesis and enzymology properties characterization of mutant strains from aspartokinase in *Corynebacterium pекinense* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014
- [19] 任军. 天冬氨酸激酶定点突变及酶学性质表征 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
Ren J. Site-directed mutagenesis of gene encoding aspartokinase and theirs enzymatic characterization [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013

(责任编辑: 姜姗)

作者简介



王锐楠, 硕士研究生, 研究方向为发酵微生物的选育与代谢调控。
E-mail: 523387098@qq.com



闵伟红, 博士, 教授, 研究方向为发酵工程, 粮食科学与深加工技术。
E-mail: minwh2000@163.com

《功能性食品研究》专题征稿函

功能性食品是指具有营养功能、感觉功能和调节生理活动功能的食品。目前已研发的功能性食品主要包括: 增强人体体质(增强免疫能力, 激活淋巴系统等)的食品; 防止疾病(高血压、糖尿病、冠心病、便秘和肿瘤等)的食品; 恢复健康(控制胆固醇、防止血小板凝集、调节造血功能等)的食品; 调节身体节律(神经中枢、神经末梢、摄取与吸收功能等)的食品和延缓衰老的食品等。由于其特殊的营养功能, 越来越得到人们的关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“**功能性食品研究**”专题, 由南昌大学食品学院副院长邓泽元教授担任专题主编, **围绕功能性食品的营养研究、开发应用、安全质量控制等问题展开讨论**, 计划在2017年8月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及邓教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在**2017年6月30日**前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部