DOI:10.12441/spyswjs.20240811002 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0116-12

米曲霉 M30011 来源的丝氨酸羧肽酶 Y 的定点突变及共价有机骨架固定化协同提升酶性能的研究

蒋佳雯[1] 蔡 彬[2] 熊 科[2*] 毛书灿[3] 陈贻强[3] 李松林[2] 张鹏程[1] 杨 威[4] 李泊瑞[3]

(1. 北京工商大学食品质量与安全北京实验室,北京 100048; 2. 北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心,北京 100048; 3. 北京工商大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心,北京 100048; 4. 北京工商大学北京市食品风味化学重点实验室,北京 100048)

摘要:【目的】为提高丝氨酸羧肽酶在酶解过程中的稳定性并拓展其工业应用,针对其易失活的问题,通过理性设计与固定化技术开发高效稳定的酶催化剂。**【方法】**基于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)M30011 来源的丝氨酸羧肽酶 Y(CPY)设计了单突变酶 M517R、I464R、Y271R 以及三突变酶 M517R/I464R/Y271R,并利用大肠杆菌系统进行原核表达与酶活力检测,随后采用共价有机骨架材料(COFs)固定活性最高的突变酶(COFs@突变酶),系统评估游离突变酶与 COFs@突变酶的 pH 稳定性、温度稳定性、半衰期及重复使用性。此外,以米糠蛋白质为底物,探究其与碱性蛋白酶(AP)联用的酶解效果。**【结果】**4 种突变酶被成功表达并纯化,其中三突变酶 M517R/I464R/Y271R 的酶活力最高(1 069.54 U/mg),因此用 COFs 固定化三突变酶 M517R/I464R/Y271R(COFs@三突变酶)。与游离三突变酶相比,COFs@三突变酶在较宽的 pH 与温度范围内具有较强的稳定性,半衰期延长至 498 min,且经过 6 次重复使用后其相对酶活力仍维持在 50% 左右。酶解试验结果显示,AP 与 COFs@三突变酶组合酶解米糠蛋白质制得的低聚肽的费歇尔比(*F* 值)为 34.01,远超制备阈值(>20),表明该组合在低聚肽制备中具有良好的应用潜力。**【结论】**通过突变酶设计与固定化技术协同策略显著提升了丝氨酸羧肽酶的工业适用性,为功能性低聚肽生产和工业酶催化效率优化提供了新方向,展现出广阔的应用前景。

关键词:丝氨酸羧肽酶;米曲霉;共价有机骨架材料;固定化酶

Site-directed Mutagenesis and Covalent Organic Framework Immobilization of Serine Carboxypeptidase Y from *Aspergillus oryzae* M30011 for Synergistic Enhancement of Enzyme Performance

JIANG Jiawen[1] *CAI Bin*[2] *XIONG Ke*[2*] *MAO Shucan*[3] *CHEN Yiqiang*[3] *LI Songlin*[2] *ZHANG Pengcheng*[1] *YANG Wei*[4] *LI Borui*[3]

(1. Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 4. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: [**Objective**] To enhance the stability of serine carboxypeptidase during enzymatic hydrolysis and

基金项目:北京市自然科学基金项目(6242002)。

通信作者:熊科(1981—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术与营养安全研究。E-mail:xiongke@btbu.edu.cn

收稿日期:2024-08-11 **修回日期:**2024-10-01

expand its industrial applicability, the author employed rational design and immobilization technology to develop efficient and stable enzymatic catalysts in view of the easy deactivation of this enzyme. [**Method**] On the basis of the serine carboxypeptidase Y (CPY) derived from *Aspergillus oryzae* M30011, single mutant enzymes M517R, I464R, and Y271R and the triple mutant enzyme M517R/I464R/Y271R were designed. These mutant enzymes were then prokaryotically expressed in *Escherichia coli* and subjected to enzyme activity assays. Subsequently, the mutant enzyme with the highest activity was immobilized with covalent organic framework materials (COFs), yielding the composite designated as COFs@mutant enzyme. The free mutant enzyme and the COFs@mutant enzyme were systematically evaluated in terms of the pH stability, thermal stability, half-life, and reusability. In addition, with rice bran protein as the substrate, the hydrolysis effect of the COFs@mutant enzyme combined with alkaline protease (AP) was investigated. [**Result**] The four mutant enzymes were successfully expressed and purified, with the triple mutant M517R/I464R/Y271R exhibiting the highest enzyme activity (1 069.54 U/mg). Therefore, the triple mutant enzyme M517R/I464R/Y271R was immobilized with COFs (COFs@triple mutant enzyme). Compared with the free triple mutant enzyme, COFs@triple mutant enzyme demonstrated strong stability across wide ranges of pH and temperature, with a half-life extended to 498 min and the relative enzyme activity of approximately 50% after 6 reuse cycles. The results of the enzymatic hydrolysis experiment showed that the Fischer ratio (*F*-value) of the oligopeptides prepared from rice bran protein by AP combined with COFs@triple mutant enzyme was 34.01, far exceeding the preparation threshold (>20), indicating the good application potential of this combination in the preparation of oligopeptides. [**Conclusion**] The synergistic strategy of mutant enzyme design and immobilization technology significantly enhanced the industrial applicability of serine carboxypeptidase, providing a new direction for the production of functional oligopeptides and the optimization of industrial enzyme catalysis efficiency, and demonstrating broad application prospects.

Keywords: serine carboxypeptidase; *Aspergillus oryzae*; covalent organic framework material; immobilized enzyme

羧肽酶是一种从肽链的C端逐个降解、释放游离氨基酸的肽链外切酶[1]，在蛋白质降解和多肽制备中具有重要作用。羧肽酶根据其催化机理的分为金属羧肽酶、丝氨酸羧肽酶和半胱氨酸羧肽酶。然而，由于羧肽酶物理和化学特性的不稳定，其在实际应用中难以长期维持催化活性。因此，选择合适的方法来提高其稳定性尤为重要，而固定化是一种有效的策略[2]。COFs是由各单体通过共价键形成的有序且有机的多孔材料。COFs主要由非金属轻量元素（C、H、O、N和B等）组成，通过强共价键连接形成拓扑结构，并通过对连接单元的预先设计，实现定制化的组成与功能。COFs具有孔道规则、结构易调控、热稳定性与化学稳定性良好以及生物相容性好的特点，因此适合作为酶固定的研究载体，同时也能满足构建理想酶催化微反应器的要求[3]。目前，COFs固定化酶在酶促酯化、手性拆分、分子检测、肿瘤治疗和蛋白质水解等方面都展现出了良好的应用前景[4-7]。COFs优异的性能及其在各领域的广泛应用，为开发高效、可回收的酶催化体系提供了新的策略。

随着生物技术和食品工业的迅速发展，蛋白质及其衍生物的加工与利用日益受到重视。*F*值是指低聚肽中支链氨基酸和芳香族氨基酸的摩尔比，*F*值>20的低聚肽被称为高*F*值低聚肽。高*F*值低聚肽因其高营养价值和功能特性，被广泛应用于功能性食品中[8]。其富含亮氨酸等疏水性氨基酸，能刺激肠高血糖素的分泌，从而降低血清胆固醇[9]。此外，在特殊情况下，支链氨基酸可直接向肌肉提供能量、减轻疲劳，可及时为高强度工作者及运动员补充支链氨基酸并促进糖异生，使之更快适应高强度的工作和训练[10-11]。目前，国内外生产高*F*值低聚肽的原料来源十分广泛[12]。据不完全统计，我国每年有数千万吨低值副产物蛋白质资源未被充分利用[13-16]。此前这些低值副产物蛋白质主要用于生产饲料、肥料等低附加值产品，

精深加工产品少，资源利用率低。利用生物酶法综合开发利用这些低值副产物蛋白质资源制备功能性低聚肽可提高其营养价值与生物活性，极大提高资源的利用率，具有重要的经济效益与社会效益[17-18]。如大米加工副产物米糠，我国米糠年产量为2 930万t，但其综合利用率却不到10%，导致大量资源浪费[19]。利用米糠中的优质蛋白质资源开发高*F*值低聚肽产品，可以提高资源的利用率，同时满足人们对高营养、健康产品的需求。

虽然采用生物酶解技术制备高*F*值低聚肽是提高低值副产物蛋白质资源价值和资源利用率的重要途径，但低聚肽制备体系本身较复杂。因复杂体系中存在的酸、碱、温度等因素影响，肽酶的催化活性会降低甚至丧失，且无法重复使用。目前普遍采用刚性耦合的方式保护肽酶分子，但肽酶分子经耦合后，其本身的结构会受到不同程度的影响，同时肽酶耦合后参与催化反应的体系也由均相变为非均相，耦合后也限制了肽酶与底物蛋白质的结合，从而影响肽酶的靶向催化活性，甚至造成其催化活性完全丧失。因此在利用酶法制备高*F*值低聚肽的实际应用过程中，目标肽含量低、酶易失活等问题一直未得到有效解决，这严重制约着利用肽酶制备高*F*值低聚肽的实际应用。而基于COFs的优良性能，利用其耦合丝氨酸羧肽酶则有望使其具备良好的催化性能和稳定性。

目前，蛋白质工程策略已被广泛应用于提高靶蛋白质的性能，其中基于结构模拟和计算等理性设计改造蛋白质的方法已被广泛使用[20]。该研究对米曲霉M30011来源的丝氨酸CPY进行突变改造，从而提高其对芳香族氨基酸底物的靶向酶解活性，并利用COFs对酶活力最高的突变酶进行固定化得到COFs@突变酶，随后探究固定化后突变酶的酶活力变化规律。此外，利用COFs@突变酶从副产物米糠蛋白质中制备低聚肽以提高低值副产物蛋白质的利用率，同时为酶解米糠蛋白质高效制备高*F*值低聚肽奠定基础，为米糠资源的高值化利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛋白胨、酵母提取物：安琪酵母股份有限公司；氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）：美国AMRESCO公司；pCold TF质粒：武汉淼灵生物科技有限公司；二甲基甲酰胺、均苯三甲醛、对苯二胺、邻苯二甲醛（OPA）：阿拉丁试剂（上海）有限公司；氢氧化钠、冰乙酸、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠：福晨（天津）化学试剂有限公司；苯丙氨酸标准品：上海源叶生物科技有限公司；四氢呋喃、甲醇：色谱级，美国MREDA公司；五肽底物：生工生物工程（上海）股份有限公司；*β*-巯基乙醇及其他试剂（分析纯）：上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

水平摇床：WD-9405F型，北京六一生物科技有限公司；琼脂糖凝胶电泳仪：DYCP-31DN型，北京六一生物科技有限公司；凝胶成像仪：ImageQuant 300型，美国General Electric公司；小型台式离心机：Sigma1-14型，西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；恒温振荡器：DHZ-DA型，苏州培英实验室设备有限公司；二级生物安全柜：BSC-1300A2型，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；恒温培养箱：PCTHI型，施都凯（上海）仪器设备有限公司；数控超声波清洗器：KQ-500DE型，昆山禾创超声仪器有限公司；高效液相色谱仪（HPLC）：ACQUITY Arc型，沃特世科技（上海）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 米曲霉M30011来源的丝氨酸CPY突变位点的筛选、表达及酶活力测定

1）突变位点的筛选：采用SWISS-MODEL软件预测米曲霉M30011来源的丝氨酸CPY的三级结构，依据蛋白质数据库获取三肽和五肽底物的配体结构。采用AutoDock Vina软件，测定底物与CPY原酶的结合能和熵值。采用Discovery Studio软件分析相互作用力。基于预测酶蛋白的表面熵值、分析二级结构和序列保守性，识别影响酶蛋白构象熵的潜在位点。

2）突变酶的诱导表达：为验证突变酶的酶活力，该研究采用大肠杆菌表达系统对突变酶进行原核表达[21-22]。将突变酶分别进行诱导表达。取500 mL LB液体培养基分装在5个锥形瓶内，121 ℃灭菌20 min。在无菌操作台上，取5 mL液

体培养基，加入8 μL氨苄青霉素，再加入100 μL菌液。将接种有菌液的培养基置于37 ℃、200 r/min的摇床上培养12 h，直至菌液浑浊。将活化后的菌液以体积分数1%转接到100 mL的LB液体培养基中，在37 ℃下孵育至OD_{600}值为0.6~0.8。无菌操作条件下，向发酵液中加入IPTG，使其终浓度达0.5 mmol/L，200 r/min振荡培养18 h，诱导蛋白质表达。将得到的菌液于4 ℃、8 000 r/min离心10 min，收集大肠杆菌的菌体，使用浓度为0.2 mol/L、pH为7.5的磷酸盐裂解缓冲液（PBS）对菌体进行超声破壁，离心后取上清液得到突变酶粗酶液。

3）突变酶的纯化及验证：将粗酶液经0.22 μm滤膜过滤后上镍柱，采用不同浓度的咪唑缓冲液（50、100、200 mmol/L）对结合于柱上的突变酶进行梯度洗脱。将纯化后的突变酶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测，以验证纯化结果。

4）突变酶的酶活力测定：用1 mg/mL的苯丙氨酸标准品母液配制成质量浓度分别为1、5、10、20、50 μg/mL的苯丙氨酸标准品，通过HPLC进行荧光检测分析，并绘制峰高与苯丙氨酸质量浓度之间的标准曲线。使用OPA柱前衍生法处理样品：取100 μL样品于2 mL离心管中，加入300 μL含有*β*-巯基乙醇的OPA衍生化试剂，再加入600 μL硼酸盐缓冲液，使用涡旋仪混匀后用0.22 μm有机滤膜过滤，样品静置15 min，最后进样分析。样品和标准品均进行以上处理。HPLC采用的色谱柱为C18柱，流动相A为pH 5.8、25 mmol/L醋酸钠缓冲液与四氢呋喃（体积比为95∶5），流动相B为甲醇，柱温为32 ℃，流量为1 mL/min，进样量为10 μL，荧光检测的激发波长为340 nm，发射波长为450 nm，根据梯度洗脱条件（见表1），进行线性洗脱。

将五肽底物（Phe-Gly-Leu-Gly-Phe）溶解在甲醇中，制备底物溶液。取30 μL底物溶液和含有5 μg酶蛋白的纯化酶溶液，其余加入0.2 mol/L的PBS（pH 7.5），构成一个500 μL的反应体系。反应后立即煮沸灭活以终止反应。用OPA柱前衍生法处理样品，通过HPLC确定反应后形成的游离苯丙氨酸的质量浓度。根据酶活力（U/mg）评价CPY原酶和各突变酶对五肽底物的酶解活性。

表1　HPLC梯度洗脱条件

Table 1　HPLC gradient elution condition

时间/min	流动相A体积分数/%	流动相B体积分数/%
0	90	10
6	72	28
10	70	30
11	65	35
15	63	37
17	53	47
20	45	55
25	35	65
26	90	10
30	90	10

1.3.2　COFs@突变酶合成

取5 mg均苯三甲醛溶于250 μL二甲基甲酰胺中，然后转移到10 mL超纯水中，超声处理3 min。接着加入100 μL突变酶酶液和1 mL冰乙酸到混合物溶液中。将10 mg对苯二胺溶解在1 mL水中，加到混合物溶液中反应10 min，用4 mol/L的NaOH调节pH至4.0。然后在室温下搅拌混合物10 min。沉淀物用去离子水洗涤3次，保存在浓度为0.01 mol/L的PBS中，直至使用，即为COFs@突变酶。

1.3.3　COFs@突变酶的表征

利用透射电子显微镜表征COFs@突变酶的形貌结构，利用共聚焦显微镜沿*z*轴进行不同深度的扫描，记录不同深度的图像。依据被异硫氰酸荧光素（FITC）标记的酶蛋白在COFs中的分布情况，验证突变酶是否被包封在材料内部。

1.3.4　游离突变酶与COFs@突变酶的酶学性质

将马脲酰-*L*-苯丙氨酸溶解于Tris-HCl缓冲液中，制备浓度为0.9 mmol/L的底物溶液，于4 ℃保存。取2.9 mL底物溶液，加入0.1 mL游离突变酶酶液或等效的COFs@突变酶酶液，分别于不同温度（30、40、50、60、70 ℃）和不同pH（3.0、4.0、5.0、6.0、7.5、8.0）条件下反应3 min，之后立即煮沸以终止反应，测定上清液在254 nm波长下每分钟的吸光度变化值（Δ*A*），平行测定3次。

另外，取5份0.1 mL的游离突变酶酶液和5份

等效的COFs@突变酶酶液，分别加入浓度为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mmol/L的底物溶液，反应3 min后煮沸，测定ΔA，平行测定3次。以1/[S]为横坐标、1/[V]为纵坐标绘制Lineweaver-Burk双倒数图。其中，S为底物浓度，单位为mmol/L；V为反应速率，单位为mmol/(L·min)。

1.3.5 酶解米糠蛋白质制备高F值低聚肽

以1 g∶10 mL的料液比在米糠粉中加入正己烷，室温搅拌3 h脱脂，离心去除正己烷。重复此过程，将处理后的米糠粉放置在通风橱中风干12 h。称取5 g脱脂后的米糠粉，以1 g∶19.6 mL的料液比加入1 mol/L的NaOH溶液，恒温摇床振荡4.7 h，离心并收集上清液。向沉淀物中再次加入NaOH溶液，重复提取并合并2次上清液，调节pH至5.4，离心后用蒸馏水洗涤沉淀3次，用PBS复溶沉淀物。

酶解试验以提取的米糠蛋白质为底物，采用AP与游离突变酶组合及AP与COFs@突变酶组合进行两步水解。2种组合的第一步水解条件相同：将米糠蛋白质溶液的pH调至9.0，加入质量分数1%的AP酶液，50 ℃水浴水解4 h，随后煮沸5 min使酶失活。第二步水解条件：将第一步获得的酶解液的pH调至7.5，加入质量分数1%的游离突变酶或COFs@突变酶，在40 ℃水浴中水解4 h，再煮沸5 min使游离突变酶或COFs@突变酶失活。

随后，将酶解处理样品的pH调至4.5，以料液比1 g∶10 mL加入活性炭，25 ℃吸附12 h，过滤除去活性炭，9 000 r/min离心10 min，收集上清液并测定F值。肽键在220 nm波长处呈现特征性吸收峰，而芳香族氨基酸因其苯环共轭结构的特性，在280 nm波长处显示出特征性吸收峰，因此将样品上清液在220 nm波长处的吸光度(OD_{220}值)与在280 nm波长下的吸光度(OD_{280}值)的比值记为F值。所有样品均进行3次平行测定。

1.3.6 游离突变酶与COFs@突变酶的半衰期测定

取14.5 mL底物溶液，加入0.5 mL游离突变酶酶液和等效的COFs@突变酶酶液，于37 ℃下孵育。每隔10 min取样，测定剩余酶活力。剩余酶活力用上清液在254 nm处的吸光度变化值ΔA来表示，平行测定3次，热失活速率常数根据式(1)来计算。

$$K_d=-\frac{\ln(A_t/A)}{t} \quad (1)$$

式中：

K_d——热失活速率常数，min^{-1}；

A_t——时间为t时的吸光度；

A_0——初始吸光度；

t——时间，min。

COFs@突变酶和游离突变酶的半衰期根据式(2)来计算。

$$t_{1/2}=\frac{\ln 0.5}{-K_d} \quad (2)$$

式中：

$t_{1/2}$——半衰期，min；

K_d——热失活速率常数，min^{-1}。

1.3.7 COFs@突变酶的重复使用性测定

取14.5 mL底物溶液，加入等效的COFs@突变酶酶液，37 ℃下反应3 min后离心，测定上清液在254 nm处的吸光度变化值ΔA。使用PBS洗涤3次后保存样品，进行下一个循环。第一个周期中获得的固定化酶的相对酶活力作为对照，定义为100%，平行测定3次。

2 结果与讨论

2.1 突变酶分子对接

采用AutoDock Vina软件，测定设计的3种底物(N-cbz-Gly-Gly-Phe、N-cbz-Gly-Phe-Phe、Phe-Gly-Leu-Gly-Phe)与CPY原酶的结合能和熵值。经Discovery Studio软件分析对接相互作用力，预测酶蛋白的表面熵值，分析二级结构及序列保守性，识别CPY原酶的主要底物结合位点为Tyr271、Ile464、Met517，见图1。

利用PyMOL软件对CPY原酶进行突变设计，设计单突变酶M517R、I464R和Y271R以及三突变酶M517R/I464R/Y271R，即517位点的蛋氨酸残基、464位点的异亮氨酸残基和271位点的酪氨酸残基分别突变为可以用作质子供体的精氨酸，以及同时将3个位点突变为精氨酸。CPY原酶和单突变酶与肽底物的结合能见表2。分子对接研究表明，与三肽底物N-cbz-Gly-Gly-Phe和五肽底物Phe-Gly-Leu-Gly-Phe相比，CPY原酶与三肽底物N-cbz-Gly-Phe-Phe的结合能更大。而单突变酶均对三肽底物N-cbz-Gly-Gly-Phe表现出更大的结合能。

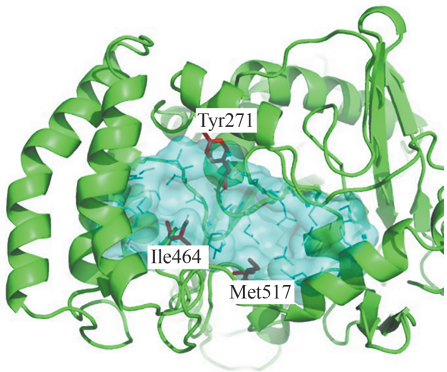


图1　CPY原酶的主要底物结合位点在疏水空腔中的位置

Fig. 1　Location of the primary substrate-binding sites within the hydrophobic cavity of the wild-type CPY

根据三维对接构象，非共价相互作用（如氢键和较弱的静电相互作用等）对酶分子疏水空腔与底物的特异性结合至关重要。配体对突变酶的疏水空腔有相当大的结合作用。CPY原酶和单突变酶I464R的疏水空腔信息见表3，其中单突变酶I464R的疏水空腔体积大于CPY原酶。因此，单突变酶I464R的疏水比高于CPY原酶。由于五肽底物相较于三肽底物更接近于天然状态的底物，适合评估酶在更真实、复杂环境中的整体催化性能，因此选用五肽底物进一步探究突变酶的结构与酶解特异活性的关联。

表2　CPY原酶及单突变酶与三肽、五肽底物的结合能

Table 2　Binding energy of the wild-type CPY and its single mutant enzymes with with tripeptide and pentapeptide substrates　　单位：kJ/mol

酶	结合能		
	N-cbz-Gly-Gly-Phe	N-cbz-Gly-Phe-Phe	Phe-Gly-Leu-Gly-Phe
CPY原酶	−9.1	−10.2	−9.0
单突变酶Y271R	−10.6	−7.6	−9.1
单突变酶I464R	−10.3	−8.0	−7.8
单突变酶M517R	−10.4	−8.9	−9.1

表3　CPY原酶及单突变酶I464R疏水空腔的对比

Table 3　Comparison of the hydrophobic cavities between the wild-type CPY and its single mutant enzyme I464R

酶	体积/Å^3	表面积/Å^2	深度/Å	主轴比1（c/a）	主轴比2（b/a）	包封度	口袋原子	氢键供体	氢键受体	疏水相互作用力/（kJ/mol）	疏水比
CPY原酶	642.50	694.33	24.68	0.05	0.09	0.08	184	16	62	28	0.26
单突变酶I464R	656.77	677.83	24.18	0.05	0.09	0.10	182	18	60	32	0.29

如图2所示，氢键的增加提高了突变酶对五肽底物的酶解特异活性。单突变酶M517R、Y271R和三突变酶M517R/I464R/Y271R通过增加氢键增强了与五肽底物Phe-Gly-Leu-Gly-Phe的相互作用力。因此，在271、464、517位点突变为精氨酸可显著提高CPY原酶对芳香族氨基酸的酶解特异活性。

2.2　突变酶的表达

对单突变酶M517R、I464R、Y271R和三突变酶M517R/I464R/Y271R进行诱导表达。将诱导表达的突变酶粗酶液进行SDS-PAGE验证，结果见图3。相对分子质量为60 000附近有清晰可见的蛋白质条带，表明突变酶被成功诱导表达。

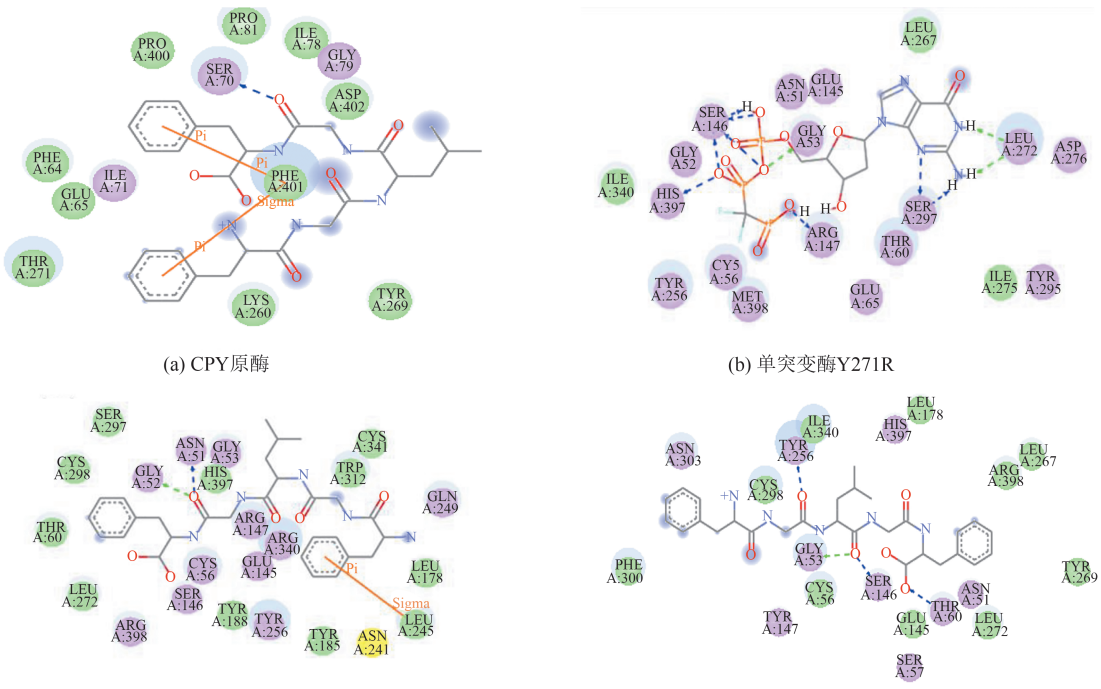
对不同浓度咪唑缓冲液洗脱的突变酶进行SDS-PAGE分析，探究洗脱目的蛋白质适宜的咪唑缓冲液浓度。如图4所示，咪唑缓冲液浓度为200 mmol/L的洗脱效果最佳。在低浓度的咪唑缓冲液下，杂蛋白质先被洗脱下来；当咪唑缓冲液浓度升高至适宜值时，咪唑缓冲液与Ni^{2+}结合，竞争取代含组氨酸标签的突变酶，从而将突变酶洗脱下来。如图5所示，诱导表达出的突变酶经镍柱纯化之后，无其他杂带，表明获得了纯的突变酶。

2.3　突变酶的酶活力结果

4种突变酶的酶活力结果见图6。单突变酶Y271R的酶活力为103.53 U/mg，单突变酶I464R的酶活力为140.70 U/mg，单突变酶M517R的酶活力为371.83 U/mg，三突变酶M517R/I464R/Y271R的酶活力为1 069.54 U/mg。故三突变酶M517R/I464R/Y271R的酶活力最高，依据突变酶的结构分析，精氨酸作为质子受体形成氢键，增强了酶与底物的结合力。因此，采用COFs对三突变酶M517R/I464R/Y271R进行固定化，旨在进一步开发其应用潜力。

2.4　COFs@三突变酶的表征

经过工艺优化制备的COFs@三突变酶的形貌表征见图7。透射电子显微镜结果显示，



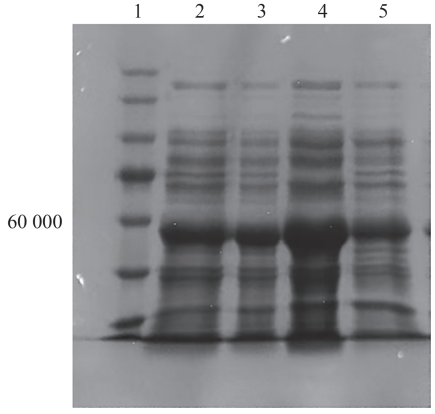
(a) CPY原酶　(b) 单突变酶Y271R

(c) 单突变酶M517R　(d) 三突变酶M517R/I464R/Y271R

绿色虚线—氢键；蓝色点划线—疏水键；粉红色圈—静电相互作用力。

图 2　CPY 原酶和单突变酶 Y271R、M517R 以及三突变酶 M517R/I464R/Y271R 与五肽底物 Phe-Gly-Leu-Gly-Phe 的相互作用力

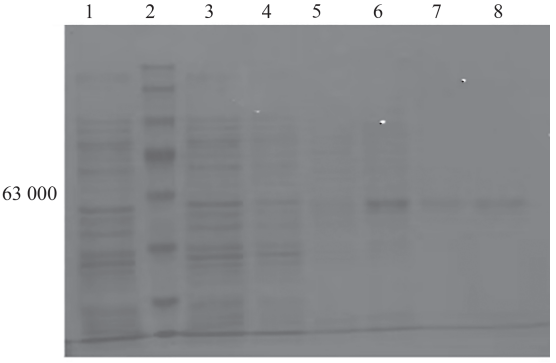
Fig. 2　Interactions of the pentapeptide Phe-Gly-Leu-Gly-Phe with the wild-type CPY and its mutant enzymes (single mutant enzyme Y271R, M517R, and the triple mutant M517R/I464R/Y271R)



1—低相对分子质量标准蛋白质；2—单突变酶 Y271R；3—单突变酶 I464R；4—单突变酶 M517R；5—三突变酶 M517R/I464R/Y271R。

图 3　突变酶的表达验证

Fig. 3　Verification of mutant enzymes expression



1—粗酶液；2—低相对分子质量标准蛋白质；3~4—50 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的 CPY 原酶；5~6—100 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的 CPY 原酶；7~8—200 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的 CPY 原酶。

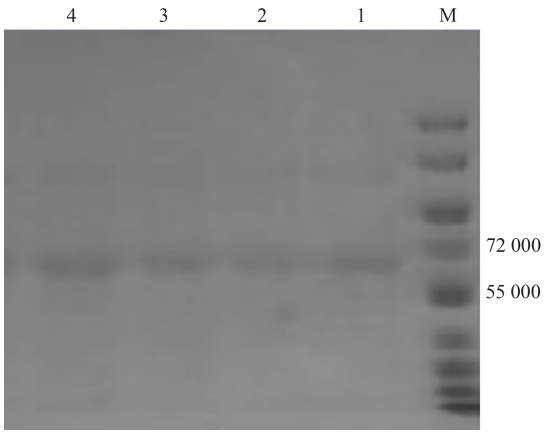
图 4　纯化 CPY 原酶的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4　SDS-PAGE results of purified wild-type CPY

COFs@三突变酶具有均一的球形纳米簇结构，粒径约为 200 nm。如图 7(b)所示，共聚焦显微镜显示了被 FITC 标记的三突变酶在 COFs 内部的分布情况，证明三突变酶被包封在 COFs 内部。

2.5　游离三突变酶与 COFs@三突变酶的温度稳定性

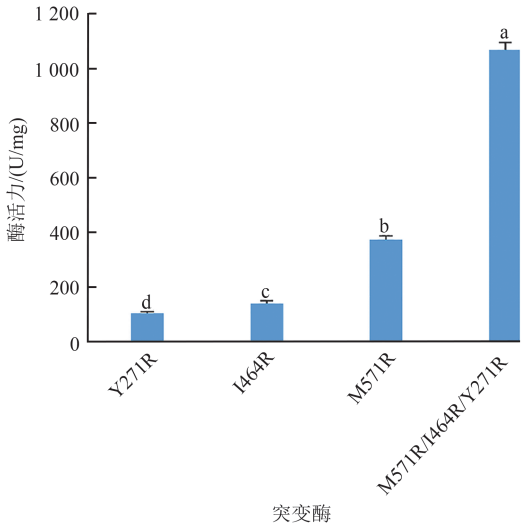
游离三突变酶与 COFs@三突变酶温度稳定性测定结果见图 8。将游离三突变酶的最佳酶活力设定为 100%，结果表明游离三突变酶和 COFs@三突变酶的最适温度均为 37 ℃。在最适温度范围（30~37 ℃）内，游离三突变酶和 COFs@三突变酶的相对酶活力均随温度的升高而增强。当温度高于最适温度时，游离三突变酶和 COFs@三突变酶的相对酶活力开始下降，



M—低相对分子质量标准蛋白质；1—单突变酶Y271R；2—单突变酶I464R；3—单突变酶M517R；4—三突变酶M517R/I464R/Y271R。

图5　纯化突变酶的SDS-PAGE结果

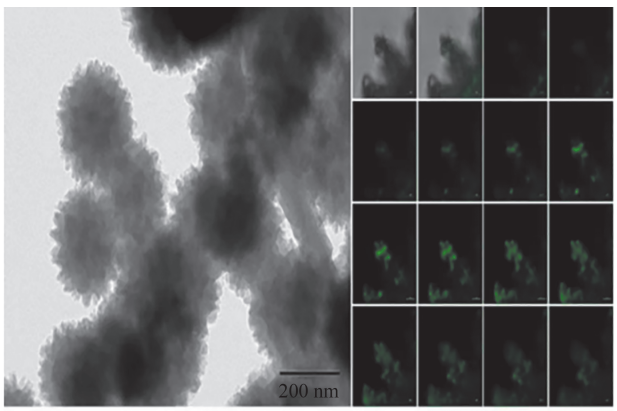
Fig. 5　SDS-PAGE results of purified mutant enzymes



不同小写字母表示差异极显著（P<0.001）。

图6　4种突变酶的酶活力

Fig. 6　Activities of four mutant enzymes



(a) 透射电子显微镜　　(b) 共聚焦显微镜

图7　COFs@三突变酶的表征

Fig. 7　Characterization of COFs@triple mutant

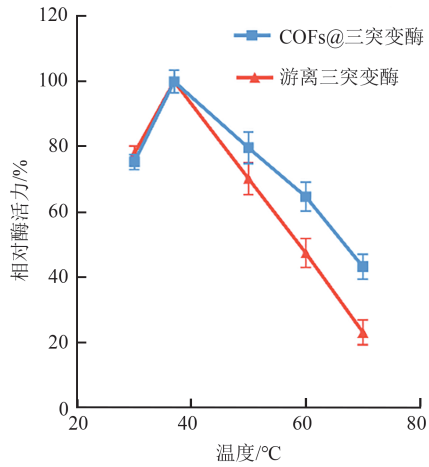


图8　游离三突变酶与COFs@三突变酶的温度稳定性

Fig. 8　Thermal stability of free triple mutant and COFs@triple mutant

COFs@三突变酶的相对酶活力下降速率较慢。当温度达到70 ℃时，游离三突变酶的相对酶活力降至23.22%，而COFs@三突变酶的相对酶活力可保持在43.33%。表明经COFs固定化的三突变酶具有更强的热稳定性，COFs固定化改变了三突变酶的微环境并提高了反应所需的活化能，从而增强了其热稳定性[23]。

2.6　游离三突变酶与COFs@三突变酶的pH稳定性

游离三突变酶与COFs@三突变酶的pH稳定性见图9。将游离酶三突变酶的最佳酶活力设定为100%，结果表明游离三突变酶和COFs@三突变

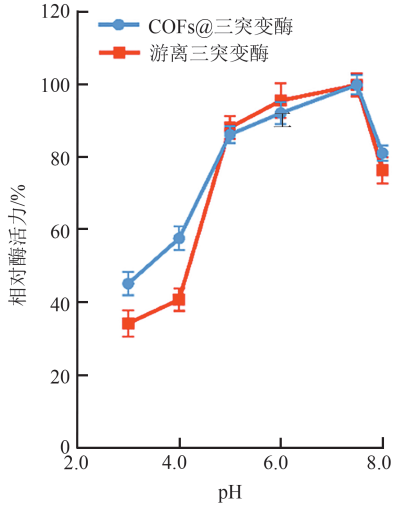


图9　游离三突变酶与COFs@三突变酶的pH稳定性

Fig. 9　pH stability of free triple mutant and COFs@triple mutant

酶的最适 pH 均为 7.0。当 pH 为 3.0 时，游离三突变酶的相对酶活力为 34.35%，而 COFs@三突变酶的相对酶活力可维持在 45.33%；当 pH 为 8.0 时，游离三突变酶的相对酶活力为 76.56%，而 COFs@三突变酶的相对酶活力可维持在 81.22%。结果表明，经 COFs 复合固定化处理后的三突变酶具有更好的 pH 稳定性，这是由于 COFs 固定化后的三突变酶改变了周围电离微环境，提高了其对 pH 的适应能力[24]。

2.7 游离三突变酶与 COFs@三突变酶的酶动力学

探究 COFs@三突变酶与底物之间亲和力的变化，对于优化酶的固定化条件和提高酶的催化效率至关重要。如图 10 所示，根据 2 条直线的方程计算得到 COFs@三突变酶和游离三突变酶的米氏常数（K_m）分别为 0.407、0.283 mmol/L。K_m 是酶对其底物的亲和力的量度，最大反应速度（V_{max}）是酶催化效率的量度[25]。结果表明，COFs@三突变酶的 K_m 大于游离三突变酶，说明 COFs@三突变酶与底物的亲和力减小。这种亲和力的降低可能与三突变酶的固定化过程影响了空间结构和活性中心的位点有关。

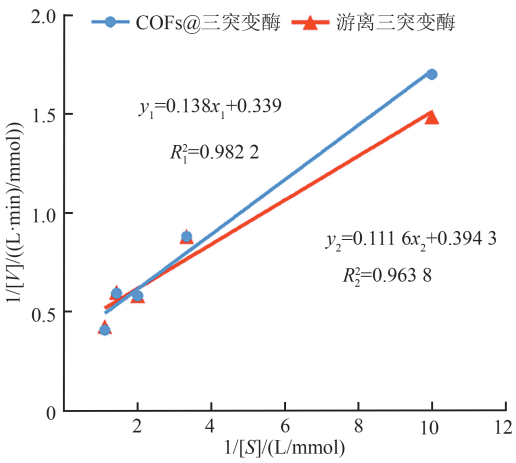
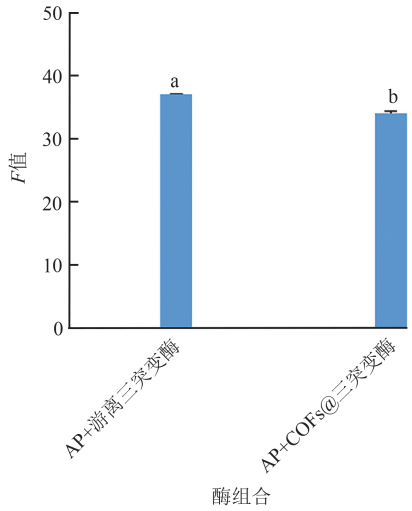


图 10 游离三突变酶和 COFs@三突变酶的酶解反应双倒数曲线

Fig. 10 Double reciprocal curves of enzymatic hydrolysis of free triple mutant and COFs@triple mutant

2.8 酶解米糠蛋白质制备高 *F* 值的低聚肽结果

酶法制备高 *F* 值低聚肽通常采用内切酶和外切酶进行复合酶解。内切酶先作用于蛋白质肽链，暴露出氨基酸残基，外切酶切除暴露的芳香族氨基酸，最后通过活性炭吸附去除酶液中的芳香族氨基酸。陶静等[26]采用固定化双酶水解技术，从带鱼中制备的低聚肽的 *F* 值达 28.06。王秋萍等[27]采用固定化双酶水解技术，从鱿鱼碎肉中制备了 *F* 值>20 的低聚肽。作者以粮油加工副产物米糠中的米糠蛋白质为底物，探究 AP 分别与 COFs@三突变酶、游离三突变酶组合后的酶解效果。如图 11 所示，AP 与游离三突变酶联合水解后得到的低聚肽 *F* 值为 37.11（>20），达到了较高的水平。相比之下，AP 与 COFs@三突变酶联合水解后得到的低聚肽 *F* 值为 34.01，该结果和固定化酶与底物的亲和力减小的结论一致。将 COFs@三突变酶与游离三突变酶制备的低聚肽进行比较，两者的 *F* 值差异极显著（P<0.001），但是仍>20，表明 COFs@三突变酶具有高效制备高 *F* 值低聚肽的潜力。



不同小写字母表示差异极显著（P<0.001）。

图 11 不同组合酶解米糠蛋白质制备低聚肽的 *F* 值

Fig. 11 *F*-values of preparing oligopeptides from rice bran protein with different enzyme combinations

2.9 游离三突变酶与 COFs@三突变酶的半衰期结果

半衰期是指在特定条件下，酶活力下降至初始酶活力一半时所需要的时间。较长的半衰期意味着酶在反应过程中的酶活力能够维持更长时间，较低的 K_d 表明酶变性速率较低[28]。如表 4 所示，三突变酶经过固定化处理后，K_d 由 0.001 9 min^{-1} 降至 0.001 4 min^{-1}，半衰期由 364 min 延长至 498 min。结果表明，固定化显著提高了酶的稳定性，提升了酶解效率，并延长了酶的使用时间，在实际生产中更具经济效益。

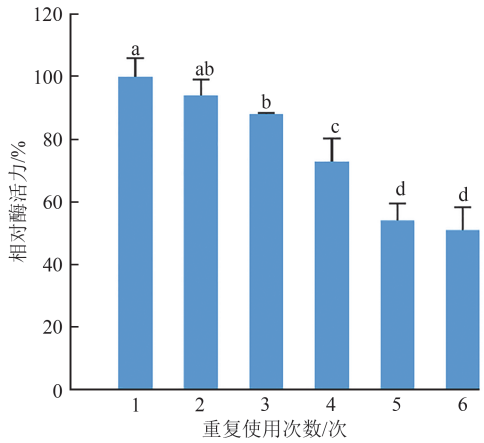
表4　游离三突变酶与COFs@三突变酶的半衰期

Table 4　Half-lives of free triple mutant and COFs@triple mutant

酶	K_d/(min^{-1})	$t_{1/2}$/min
游离三突变酶	0.001 9	364
COFs@三突变酶	0.001 4	498

2.10　COFs@三突变酶的重复使用性结果

固定化酶的重复使用次数及酶活力的保持率是评估其工业应用潜力的重要指标。由于固定化酶在重复使用过程中，底物更换和搅拌所施加的机械力可能导致酶的损失和失活，因此固定化酶的重复使用次数通常为5~15次[29]。将固定化酶在第一个周期中的相对酶活力设定为100%，由图12可知，在经过6个重复使用周期后，COFs@三突变酶的相对酶活力仍为50%左右。这一结果表明，尽管其相对酶活力在多次使用过程中有所下降，但仍具备较好的稳定性和耐用性。这是因为经COFs固定化处理保护了三突变酶的三维构象，防止其在重复使用过程中性能的过度损伤[30]。COFs@三突变酶不仅有助于降低生产成本，提高经济效益，还为酶在工业应用中的广泛应用提供了有力支持。



不同小写字母表示差异极显著（P<0.001）。

图12　COFs@三突变酶的重复使用性

Fig. 12　Reusability of COFs@triple mutant

3　结论

以米曲霉M30011来源的CPY的单突变酶M517R、I464R、Y271R以及三突变酶M517R/I464R/Y271R为研究对象，探究COFs固定化对酶活力的影响。作者对4种突变酶进行诱导表达与纯化，用SDS-PAGE验证目的条带，结果在相对分子质量为60 000周围出现了明显的蛋白质条带，符合预期，证明成功诱导表达了突变酶。镍柱纯化时，使用200 mmol/L的咪唑缓冲液洗脱可获得纯的突变酶。4种突变酶的酶活力结果显示三突变酶M517R/I464R/Y271R的酶活力最高，为1 069.54 U/mg。因此，选用COFs对三突变酶M517R/I464R/Y271R进行固定化。进一步的研究结果表明，三突变酶M517R/I464R/Y271R可以被较好地包裹在COFs内部，且可以成功制备F值>20的低聚肽。此外，与游离三突变酶相比，COFs@三突变酶表现出更优异的热稳定性和pH稳定性，同时具有更长的半衰期和更高的重复使用性，这些特性使得COFs@三突变酶在多种反应条件下具备显著优势，能够有效提升催化效率并延长使用寿命。该研究为通过COFs固定化突变酶以维持其高效酶解活性提供了技术支持，为利用低值副产物米糠蛋白质制备低聚肽提供了新策略，同时也为采用生物酶法制备低聚肽的相关技术应用奠定了基础。

参考文献

[1] 吴静，闵柔，邬敏辰，等. 羧肽酶研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2012，31(8)：793-801.
WU J，MIN R，WU M C，et al. Research progresses on the carboxypeptidase [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2012，31(8)：793-801.(in Chinese)

[2] 于晓婷，陈晓艺，李苗，等. 海藻酸钙/硅胶/羧甲基壳聚糖复合微球固定化柚苷酶的研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(1)：93-101.
YU X T，CHEN X Y，LI M，et al. Study on immobilization of naringinase on calcium alginate/silica gel/carboxymethyl chitosan composite microspheres [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(1)：93-101.(in Chinese)

[3] 晁昊. 基于共价有机骨架胶囊材料的酶原位封装方法研究及其分析应用[D]. 北京：北京化工大学，2022.

[4] ZHONG C，MA W D，HE Y T，et al. Controllable synthesis of hollow microtubular covalent organic frameworks as an enzyme-immobilized platform for enhancing catalytic activity[J]. ACS Applied Materials & Interfaces，2021，13(44)：52417-52424.

[5] FENG M C，NIU Z R，XING C Y，et al. Covalent organic framework based crosslinked porous microcapsules for enzymatic catalysis[J]. Angewandte Chemie International Edition，2023，62(33)：e202306621.

[6] WANG L，LIANG H H，XU M L，et al. Ratiometric electrochemical biosensing based on double-enzymes loaded on two-dimensional dual-pore COFETTA-TPAL [J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2019，298：126859.

[7] XU S J，WANG Y Y，LI W，et al. Covalent organic framework incorporated chiral polymer monoliths for capillary electrochromatography [J]. Journal of Chromatography A，2019，1602：481-488.

[8] 刘海梅，王芸，裴继伟，等. 活性炭法制备高*F*值栉孔扇贝酶解液的工艺条件[J]. 食品与发酵工业，2020，46(22)：167-172.
LIU H M，WANG Y，PEI J W，et al. Process conditions of enzymatic hydrolysis of scallop *Chlamys farreri* with high Fischer ratio by activated carbon method[J]. Food and Fermentation Industries，2020，46(22)：167-172.(in Chinese)

[9] 李小勇，李洪军. 高*F*值低聚肽研究进展[J]. 粮食与油脂，2006，19(6)：9-11.
LI X Y，LI H J. Research progress in high Fischer ratio oilgo-peptide[J]. Cereals & Oils，2006，19(6)：9-11.(in Chinese)

[10] 李婷婷，田亚平，周楠迪，等. 超声振荡改性玉米醇溶蛋白及高*F*值寡肽制备[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(11)：104-111.
LI T T，TIAN Y P，ZHOU N D，et al. Modification of zein by ultrasound oscillation and preparation of oligopeptides with a high Fischer's ratio[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(11)：104-111.(in Chinese)

[11] 尤孝鹏，陈智仙. 运动营养食品的营养素、功能及酵母蛋白在其中的应用前景[J]. 食品工业科技，2024，45(8)：366-371.
YOU X P，CHEN Z X. Nutrients，functions and application prospects of yeast protein in sports nutrition foods[J]. Science and Technology of Food Industry，2024，45(8)：366-371.(in Chinese)

[12] 秦于思，程明，陈平华，等. 基于乳源性蛋白制备高*F*值寡肽的研究进展[J]. 乳业科学与技术，2020，43(6)：31-35.
QIN Y S，CHENG M，CHEN P H，et al. Recent progress in preparation of oligopeptides with high *F* value from milk proteins [J]. Journal of Dairy Science and Technology，2020，43(6)：31-35.(in Chinese)

[13] 韩昊天，李晓彤，吴澎，等. 花生多肽研究进展[J]. 中国粮油学报，2019，34(10)：140-146.
HAN H T，LI X T，WU P，et al. Research progress of peanut peptide[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association，2019，34(10)：140-146.(in Chinese)

[14] 周德庆，李娜，王珊珊，等. 水产加工副产物源抗氧化肽的研究现状与展望[J]. 水产学报，2019，43(1)：188-196.
ZHOU D Q，LI N，WANG S S，et al. Research progress of antioxidant peptides from aquatic by-product[J]. Journal of Fisheries of China，2019，43(1)：188-196.(in Chinese)

[15] JIANG X Y，DING H Y，LIU Q，et al. Effects of peanut meal extracts fermented by *Bacillus natto* on the growth performance，learning and memory skills and gut microbiota modulation in mice[J]. British Journal of Nutrition，2020，123(4)：383-393.

[16] ROHIMAH A，SETIAWAN B，PALUPI E，et al. Comparison of peanut and black oncom biscuit：nutritional characteristics and aflatoxin evaluation with the potential health benefits[J]. Annals of Agricultural Sciences，2021，66(1)：87-92.

[17] 杨华青，侯威，赵磊，等. 玉米黄粉二步酶解制备高*F*值寡肽的工艺优化[J]. 食品科学技术学报，2019，37(6)：100-107.
YANG H Q，HOU W，ZHAO L，et al. Optimization on preparation of high Fischer ratio oligopeptides by two-step enzymolysis from corn yellow powder[J]. Journal of Food Science and Technology，2019，37(6)：100-107.(in Chinese)

[18] ZHEN H M，LIU J L，XIONG K，et al. Engineering a carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae* M30011 to improve the terminal-specific enzymatic hydrolysis of aromatic amino acids[J]. Process Biochemistry，2023，126：186-199.

[19] SHARIF M K，BUTT M S，ANJUM F M，et al. Rice bran：a novel functional ingredient[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2014，54(6)：807-816.

[20] MUGISHA S，杨套伟，徐美娟，等. 定点突变提高过氧化氢酶热稳定性和催化效率[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(3)：104-111.

SAMSON M，YANG T W，XU M J，et al. Enhanced thermo-stability and catalytic efficiency of catalase by site-directed mutagenesis[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(3)：104-111.(in Chinese)

[21] ROSANO G L，MORALES E S，CECCARELLI E A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*：a 5-year update[J]. Protein Science，2019，28(8)：1412-1422.

[22] 刘丽琴，陈婷婷，李少伟，等. 大肠杆菌表达系统在基因工程疫苗研发中的应用与策略优化[J]. 中国新药杂志，2020，29(21)：2434-2442.
LIU L Q，CHEN T T，LI S W，et al. *Escherichia coli* expression system applied in the development of recombinant human vaccines and its potential improvement[J]. Chinese Journal of New Drugs，2020，29(21)：2434-2442.(in Chinese)

[23] AFSHARI O，SALEHI Z. *β*-Cyclodextrin and APTES functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for improved lipase immobilization，transesterification efficiency，and reusability[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry，2025，144：476-486.

[24] TIAN P J，YANG M X，MUHMOOD A，et al. *In situ* immobilization multi-enzyme biocatalytic system on covalent organic frameworks for efficient conversion of lignocellulose to glucose[J]. Environmental Technology & Innovation，2024，36：103796.

[25] AL-HARBI S A，ALMULAIKY Y Q. Cu-trimesic acid-based metal organic frameworks for improved *β*-galactosidase immobilization：enhanced stability，reusability and lactose hydrolysis[J]. Journal of Molecular Liquids，2023，392：123456.

[26] 陶静，丁冬各，陈荫，等. 带鱼高*F*值寡肽的制备工艺及活性[J]. 水产学报，2018，42(10)：1648-1660.
TAO J，DING D G，CHEN Y，et al. Preparation and bioactivity evaluation of high Fischer ratio oligo-peptide from *Trichiurus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China，2018，42(10)：1648-1660.(in Chinese)

[27] 王秋萍，余新威，童晓倩，等. 固定化酶水解鱿鱼碎肉制备高*F*值寡肽的工艺优化[J]. 中国食品学报，2017，17(3)：113-119.
WANG Q P，YU X W，TONG X Q，et al. Process optimization of high Fischer ratio oligo-peptide from hydrolysates of squid minced meat by immobilized enzyme[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2017，17(3)：113-119.(in Chinese)

[28] YANDRI Y，SUHARTATI T，SATRIA H，et al. Increasing stability of *α*-amylase obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by immobilization with chitosan[J]. Mediterranean Journal of Chemistry，2020，10(2)：155-161.

[29] 张华伟，樊帅，杨兆勇，等. 来源于*Anoxybacillus* sp. SK3-4的普鲁兰酶PulASK固定化及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(4)：24-30.
ZHANGH W，FANS，YANGZ Y，et al. Immobilization of pullulanase PulASK from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 and its enzymatic properties[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(4)：24-30.(in Chinese)

[30] SAHIN B，OZBEY-UNAL B，DIZGE N，et al. Optimization of immobilized urease enzyme on porous polymer for enhancing the stability，reusability and enzymatic kinetics using response surface methodology[J]. Colloids and Surfaces B：Biointerfaces，2024，240：113986.

（责任编辑：闫林红）