

基于理性设计的 α -L-鼠李糖苷酶热稳定性与催化活性同步强化及其应用

宋玲玲¹, 闫彤¹, 王露苒¹, 徐滋繁², 赵乐¹, 孙彦君¹, 贾浩宇^{1*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046) (2. 河南中医药大学管理科大联合学院, 河南郑州 450046)

摘要: α -L-鼠李糖苷酶是合成生物活性黄酮类化合物的重要生物催化剂, 然而其工业应用常受限于催化效率较低及热稳定性不足。本研究在前期单点突变体基础上, 通过联合突变策略构建了多个双突变体, 旨在进一步提升酶的性能, 并成功筛选出性能最优的 R783A/R386A 突变体。其相对酶活是野生型酶的 7.63 倍, 且该双突变体酶热稳定性显著提高, 在 70 °C 下孵育 3 h 后, 仍保持 90.4% 的残余活性。酶促反应动力学分析表明, R783A/R386A 的 K_m 降低 73% 使其在低底物浓度下的表观特异性常数 (k_{cat}/K_m) 提高 2.4 倍; 但是该比值提升的同时伴随 k_{cat} 下降 36%, 揭示了该突变在增强亲和力与降低转换数之间的负向平衡, 表明突变主要优化了底物结合步骤。在以芦丁为底物合成异槲皮素的反应中, R783A/R386A 表现出优异的催化性能, 产率达 97.0%。分子机制分析表明, R783A/R386A 突变体通过优化催化结合口袋的构象柔性, 增强了酶与底物的相互作用及催化活性。为 α -L-鼠李糖苷酶的工业化应用及糖苷酶的理性改造提供了重要的酶资源与理论依据。

关键词: α -L-鼠李糖苷酶; 理性设计; 异槲皮素; 分子动力学; 生物催化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.0863

Rational Design for Simultaneous Enhancement of Thermostability and Catalytic Activity of α -L-Rhamnosidase and Its Application

SONG Lingling¹, YAN Tong¹, WANG Luran¹, XU Zifan², ZHAO Le¹, SUN Yanjun¹, JIA Haoyu^{1*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

(2. Institute of Management and Science University at Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: α -L-Rhamnosidase is an important biocatalyst for the synthesis of bioactive flavonoid compounds. However, its industrial application is often limited by low catalytic efficiency and insufficient thermostability. In this study, based on a previously obtained single-point mutants, multiple double mutants were constructed using a combined mutation strategy to further enhance enzyme performance. The best-performing mutant, R783A/R386A, was successfully identified. Its relative enzyme activity was 7.63 times that of the wild-type enzyme, and its thermostability was significantly improved, retaining 90.4% residual activity after incubation at 70 °C for 3 h. Kinetic analysis of the enzymatic reaction showed that the K_m of R783A/R386A decreased by 73%, resulting in a 2.4-fold increase in the apparent specificity constant (k_{cat}/K_m) at low substrate concentrations; however, it should be noted that this increase in the ratio was accompanied by a 36% decrease in k_{cat} , revealing a negative trade-off between enhanced affinity and reduced turnover number, indicating that the mutation primarily optimized the substrate binding step. In the synthesis of isoquercitrin using rutin as a substrate, R783A/R386A exhibited excellent catalytic performance, achieving a yield of 97.0%. Molecular mechanism analysis demonstrated that the R783A/R386A mutant markedly enhanced enzyme-substrate interactions and catalytic activity by optimizing the conformational flexibility of the catalytic binding pocket, which providing an important enzyme resource and a theoretical basis for the industrial application of α -L-rhamnosidase and the rational engineering of glycosidases.

Key words: α -L-rhamnosidase; rational design; isoquercetin; molecular dynamics; biocatalysis

收稿日期: 2026-06-08; 修回日期: 2026-09-14; 接受日期: 2026-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22301068); 河南省科技研发计划联合基金 (优势学科培育类) 项目 (242301420091); 中国博士后科学基金面上项目 (2023M731022)

作者简介: 宋玲玲 (2002-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物化学, E-mail: 18838221762@163.com

通讯作者: 贾浩宇 (1991-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性成分生物合成与生物转化, E-mail: jiahaoyu@hactcm.edu.cn

异槲皮素 (Isoquercitrin, 又称异槲皮苷), 化学名为槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 是天然黄酮醇槲皮素的重要单糖苷衍生物^[1]。它广泛分布于槐米、桑叶、银杏叶、山楂、茶叶等多种植物资源中^[2]。亦可通过芦丁选择性水解脱去鼠李糖残基获得。异槲皮素通常为黄色结晶性粉末, 其水溶性与脂溶性均优于芦丁及槲皮素苷元, 从而具有更高的口服生物利用度^[3]。现代药理学研究证实, 异槲皮素具有显著的抗氧化^[4-9]、抗炎^[10-12]、抗肿瘤^[13-15]、降血糖^[16]、心血管保护及神经保护^[17,18]等多种生物活性。基于其优异的生理功能, 异槲皮素已被广泛应用于功能性食品配料及天然药物先导化合物开发领域。因此, 建立绿色高效的异槲皮素制备方法, 对于其产业化应用具有重要意义, 其中酶法转化芦丁被认为是一条具有良好应用前景的绿色合成途径。

α -L-鼠李糖苷酶 (α -L-rhamnosidase, EC 3.2.1.40) 是一类能够特异性水解糖苷类化合物末端 α -L-鼠李糖基的水解酶^[19], 广泛存在于微生物、植物及动物组织中^[20]。该酶在食品、医药及化工等领域具有重要应用价值, 例如用于降低柑橘果汁苦味^[21]、合成具有生物活性的鼠李糖基衍生物^[22], 以及定向转化天然黄酮苷类化合物以提高其生物活性^[23,24]。然而, 天然来源的 α -L-鼠李糖苷酶普遍存在催化效率较低、热稳定性不足或底物特异性受限等问题^[25], 限制了其工业应用。近年来, 蛋白质工程, 尤其是基于结构指导的定点突变策略, 已成为提升酶催化性能与稳定性的有效手段^[26,27]。同时, 分子对接与分子动力学模拟能够从原子水平解析酶-底物相互作用机制及突变对蛋白构象动态的影响, 为高性能酶的理性设计提供重要理论依据。本研究以来源于 *Dictyoglomus thermophilum* 的 α -L-鼠李糖苷酶 (*DthRha*) 为研究对象, 基于前期结构与功能分析^[28], 设计并构建了一系列联合突变体, 并筛选获得性能最优的 R783A/R386A 突变体。进一步地, 通过分子对接模拟分析突变体与底物芦丁的结合模式, 并结合分子动力学模拟评估突变对酶构象柔性及稳定性的影响。在此基础上, 对 R783A/R386A 突变体的芦丁转化性能进行了系统实验验证, 评估其催化效率及产物生成能力, 以期对 α -L-鼠李糖苷酶的理性改造及其在黄酮苷类化合物生物转化中的应用提供理论依据与实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料来源

α -L-鼠李糖苷酶基因来源于 *Dictyoglomus thermophilum* (*DthRha*, GenBank:WP_012548615), 经密码子优化后, 由金斯瑞 (中国南京) 公司合成并克隆到了载体 pET-28a 中。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21 (DE3) 的感受态细胞以及大肠杆菌 DH5 α 由北京的 TransGen Biotech 公司提供。芦丁、卡那霉素由上海的 Macklin 公司提供。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶由德国的 Thermo Fisher Scientific 公司提供。

1.2 主要试剂

5000 DNA Marker, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小提试剂盒 (离心柱型)、位点特异性突变导入试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷 (*pNPR*), 美国 Sigma 公司; 其余化学试剂 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司。所有化学试剂均从商业渠道购买并直接使用。

1.3 仪器与设备

XM-650DT 超声波细胞破碎机, 小美超声仪器 (昆山) 有限公司; UV-2600 i 紫外分光光度计、LC-20A 二元高压液相色谱仪, 日本岛津仪器有限公司; Mastercycler nexus X1 聚合酶链反应基因扩增仪、Centrifuge 5810 R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; AKTA Pure 25 蛋白纯化系统, 美国 General Electric 公司。

1.4 方法

1.4.1 联合突变体质粒的构建与转化

以课题组前期通过丙氨酸扫描获得的优良单点突变体质粒为模板, 采用定点突变策略构建联合突变体质粒。引物序列见表 1。突变质粒经扩增与纯化后, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 并在含卡那霉素的液体培养基上进行抗性筛选。对获得的阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 并通过琼脂糖凝胶电泳验证目标片段的正确性。随后, 将验证正确的重组质粒送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序确认。测序结果正确的联合突变体质粒进一步转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 筛选单菌落进行扩大培养, 并建立甘油保种菌株, 用于后续蛋白

表达及功能分析实验。

表 1 定点突变引物序列

Table 1 The PCR primers used in this study

Name	Primers (5'-3')
R386A-F	AACTATAGCACTAACGCTACCGCGCTGG
R386A-R	GCGTTAGTGCTATAGTTTAATGTACCG
R477A-F	ACTGATTGTCCGCAGGCTGACGAACGTA
R477A-R	GCCTGCGGACAATCAGTCGGGATGGACA
E479A-F	TGTCCGCAGCGTGACGCACGTATGGGTT
E479A-R	GCGTCAGCCTGCGGACAATCAGTCGGGA
D523A-F	AACGGCAGCCTGAGCGCTGTTATTCCAC
D523A-R	GCGCTCAGGCTGCCGTTTTCTTTTTGGG
S530A-F	ATTCCACCGTATTGGGCCATCTACCCGG
S530A-R	GCCCAATACGGTGGAATAACATCGCTCA
Y587A-F	GTCAGCTTCTACAAAGCCGGCGACTGGT
Y587A-R	GCTTTGTAGAAGCTGACGATATAGTCCGG
W590A-F	TACAAATACGGCGACGCGTGTCAGCCGG
W590A-R	GCGTCGCCGTATTTGTAGAAGCTGACGA
R783A-F	ACTACGCTGTGGGAAGCCTGGGAAAAGC
R783A-R	GCTTCCCACAGCGTAGTCGCGCCTTCTT

1.4.2 联合突变体的表达与纯化

依据已报道的方法，略有修改^[29,30]。采用 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态作为宿主菌种，将重组质粒导入菌种细胞；将菌株接种至 5 mL 卡那霉素质量浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的液体培养基，37 ℃ 条件下进行过夜培养；诱导条件沿用课题组前期实验条件，将种子液以 1% 接种量接种到 250 mL 的摇瓶中扩大培养，当菌液密度（以 OD₆₀₀ 计）达到 0.6~0.8 时，加入 20 μL 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（50 mmol L⁻¹）溶液，20 ℃ 条件下诱导反应 20 h；诱导结束后，离心（8 000 r min⁻¹，20 min），弃去上清液；使用 20 mL 磷酸缓冲液（100 mmol L⁻¹，pH 7.4）复溶菌体沉淀，细胞破碎（功率 40%，工作 3 s，停止 2 s，20 min），再次离心（12 000 r min⁻¹，20 min，4 ℃），保留上清液，利用亲和层析镍柱对目的蛋白进行纯化。为评估纯化效果，对所有收集样品进行了十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE）电泳分析，相对酶活力检测和蛋白质量浓度测定。

1.4.3 分子对接

使用 Autodock Tools-1.5.7 对蛋白质、底物结构文件进行前处理；采用 Autodock Vina 进行分子对接，采用盲点对接，对接盒子覆盖蛋白质分子，对接盒子大小为 32.6 Å×27.0 Å×27.4 Å，对接中心坐标为（-34.379，-63.868，17.13）。使用 PyMOL 和 Ligplot 分析酶-底物相互作用力并进行可视化作图。

1.4.4 联合突变体酶学性质的测定

1.4.4.1 相对酶活力的测定

将 WT 与突变体的蛋白质稀释到 0.5 mg mL⁻¹，以 WT 作为对照组，在 1.2 mL 磷酸缓冲液（100 mmol L⁻¹，pH 8.0）反应体系中，含 5 mmol L⁻¹ pNPR 和适当稀释的酶液。于 50 ℃ 下反应 5 min，待反应结束后迅速测定其在 405 nm 下的吸光度。

1.4.4.2 最适温度的测定

测定方法同 1.4.4.1，分别在 30、40、50、60、70、80、90 ℃ 进行反应，测定反应液的吸光度，以最适温度为参照，测定其相对酶活力。

1.4.4.3 温度稳定性的测定

测定方法同 1.4.4.1，将酶液分别于最适温度下置于恒温水浴锅中处理一定时间，测定反应液的吸光度，以 0 min 为参照，测定相对酶活力。

1.4.4.4 最适 pH 值的测定

测定方法同 1.4.4.1, 在 pH 值为 3.0~9.0 的条件下分别进行反应, 测定反应液的吸光度, 以最适 pH 值为参照, 计算相对酶活力。

1.4.4.5 pH 值稳定性的测定

测定方法同 1.4.4.1, 在 pH 值为 3.0~9.0 的条件下分别进行反应, 测定反应液的吸光度, 以 WT 在最适 pH 值下的酶活为参照, 计算相对酶活力。

1.4.4.6 金属离子对酶活性影响

测定方法同 1.4.4.1, 分别加入体积分数为 10%的 5 mmol L⁻¹ 金属离子溶液, 包括含 Fe²⁺、Cu²⁺、Na⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Mg²⁺的溶液, 以不添加金属离子的体系作为空白对照, 测定并计算各组对应的相对酶活力。

1.4.4.7 有机溶剂对酶活性影响

酶活力测定方法参照 1.4.4.1, 本实验分别向反应体系中加入体积分数为 10%的有机溶剂, 包括甲醇(Methanol, MeOH)、乙醇(Ethanol)、乙腈(Acetonitrile, ACN)及二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO), 以不添加有机溶剂的体系作为空白对照, 测定并计算各组对应的相对酶活力。

1.4.4.8 酶动力曲线的测定

参照相对酶活力的测定方法同 1.4.4.1, 在 pNPR 摩尔浓度为 0~5 mmol L⁻¹ 的条件下分别进行反应, 反应 2 min, 测定反应液的吸光度。计算反应速率, 并绘制酶动力曲线。

1.4.5 分子动力学模拟

使用 sobtop^[31]在 GAFF 立场下生成底物分子的拓扑文件, 在拓扑参数生成过程中, Sobtop 调用 Antechamber 程序, 并采用 AM1-BCC 方法计算分子原子电荷, 随后生成包含原子类型、键参数及电荷信息的拓扑文件。采用 GROMACS 2023.4 软件并选择 GROMOS96 54a7 力场计算原子参数对野生型 WT 与双突变体 R783A/R386A 分别进行 30 ns 纯蛋白质和酶-底物复合体系的分子动力学模拟, 分析主链均方根偏差(Root Mean Square Deviation, RMSD)、回转半径(Radius of Gyration, Rg)及残基均方根波动(Root Mean Square Fluctuation, RMSF), 复合物的溶剂及表面积等, 评估两者的结构稳定性、紧凑性与刚性差异。通过 MM-PBSA 方法, 分析酶与底物结合时各个氨基酸相互作用的能量变化。

1.4.6 联合突变体催化合成异槲皮苷

在 1 mL 反应体系, 芦丁浓度分别为 5、10、50 mmol L⁻¹, 酶添加量为 3 mg mL⁻¹, 酶与底物各 500 uL 中, 在 60 ℃、180 r min⁻¹ 条件下进行底物浓度对催化反应影响实验; 芦丁浓度 50 mmol L⁻¹, 酶添加量 4、5、6 mg mL⁻¹, 酶与底物各 500 uL 中, 在 60 ℃、180 r min⁻¹ 条件下进行酶浓度对催化反应影响实验。在不同反应时间下从反应混合物中取样, 然后用乙腈:水(3:7)稀释, 离心过滤膜后用于 HPLC 分析, 计算产物产率。

产率定义为产物实际生成的摩尔浓度与产物理论生成的摩尔浓度的比值, 即

$$Y = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \tag{1}$$

式中:

Y——表示产率, %;

C₁——表示实际产物浓度, mmol L⁻¹;

C₂——表示根据底物初始浓度计算的产物理论浓度, mmol L⁻¹。

HPLC 检测条件: 流动相: 体积分数为 0.1%甲酸溶液和乙腈, 流速 1 mL min⁻¹, 进样量 10 μL, 在 270 nm 梯度洗脱, 梯度洗脱程序(洗脱程序见表 2), 柱温 35 ℃。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Binary gradient elution program of the mobile phase		
Time/min	Mobile phase A(0.1% methane acid)	Moble phase B(acetonitrile)
0.01	72	28
12.00	72	28
17.00	10	90
18.00	10	90

1.4.7 数据处理

每组试验设置 3 个平行，取平均值，采用 Excel 2019 和 Origin 2023 软件进行数据处理及相关图表的绘制。

2 结果与讨论

2.1 联合突变体的构建及酶学性质分析

2.1.1 联合突变体的构建与纯化

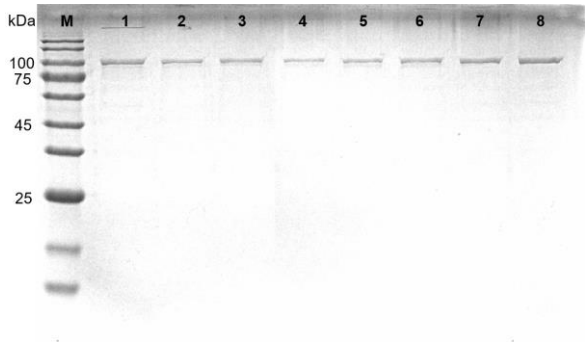


图 1 WT 和各突变体酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE of WT and combined mutants

注：Lane M：蛋白分子量标准（Marker）；Lane 1-8：经镍柱分离纯化得到的酶液，依次为 WT、Y587A/W590A、R783A/R386A、R783A/Y587A、R783A/W590A、R783A/S530A、D523A/S530A 和 E477A/E479A。

α -L-鼠李糖苷酶可催化芦丁选择性脱去鼠李糖残基生成异槲皮素。为提高 *DthRha* 对芦丁的催化活性，基于结构分析，对 Arg783、Arg386、Asp523 及 Ser530 位点分别进行定点突变（Ala 替换），构建相应重组表达质粒。重组菌株细胞在诱导表达后，经超声破碎后离心收集上清，利用亲和层析镍柱对目标蛋白进行纯化，获得较高纯度的重组 α -L-鼠李糖苷酶。纯化后的蛋白通过 SDS-PAGE 进行分析验证。结果如图 1 所示，纯化蛋白在约 102 kDa 处出现单一条带，与理论分子量一致，表明目标蛋白表达正确且纯化效果良好。

2.1.2 联合突变体的酶活性测定

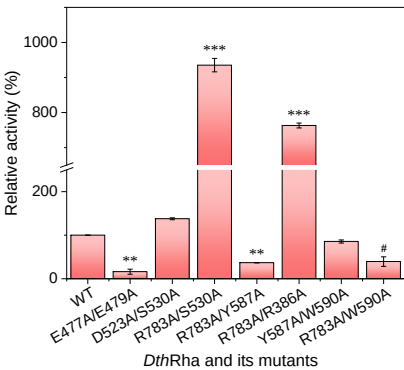


图 2 WT 及突变体酶的酶活性测定

Fig.2 Determination of enzyme activity of WT and mutant enzymes

注：数据分析采用单因素方差分析及 Dunnett 多重比较进行统计学差异分析。***表示差异极显著（ $P<0.001$ ），**表示差异高度显著（ $P<0.01$ ），#表示边缘显著（ $P<0.1$ ），无标记则表示没有显著差异。

为评价不同联合突变对酶催化性能的影响，将野生型 WT 及各联合突变体蛋白调整至相同适宜浓度，并在统一反应条件下测定其相对酶活力。结果如图 2 所示，与 WT 相比，部分联合突变体的相对酶活力呈一定程度提升。其中，R783A/S530A 与 R783A/R386A 提升极显著，显著性差异大于 99.9%，其活性分别为 WT 的 9.35 倍和 7.63

倍。WT、R783A/S530A 和 R783A/R386A 的比酶活分别为 30.74、239.55 和 187.64 U mg⁻¹。结果表明, Arg783、Ser530、Arg386 位点的联合突变能够显著增强酶的催化性能, 其中 R783A/S530A 和 R783A/R386A 表现出最优催化增强效果, 但在酶的热稳定性实验中发现 R78A/R386A 的温度稳定性优于 R783A/S530A (图 3b), 故选择该酶进行后续研究。

2.1.3 联合突变体的酶学性质

2.1.3.1 最适温度和温度稳定性

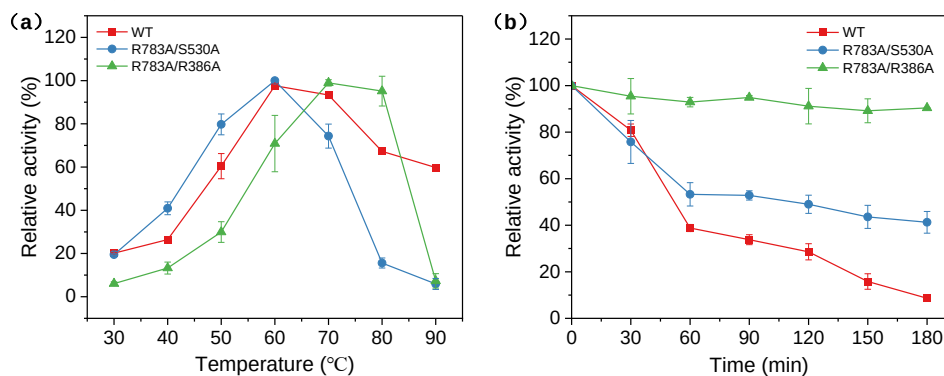


图 3 WT 及联合突变体的最适温度与热稳定性

Fig.3 Optimal temperature and thermostability of WT and double mutants

注: (a) 最适温度; (b) 热稳定性。

为考察联合突变对酶最适温度及热稳定性的影响, 在 30~90 °C 范围内测定野生型 WT 及联合突变体 R783A/S530A 和 R783A/R386A 的相对酶活力, 并以各自最适温度下的酶活力定义为 100%。如图 3a 所示, WT 与 R783A/S530A 的酶活性均随温度升高在 30~60 °C 范围内逐渐增加, 并在 60 °C 达到最高值; 当温度超过 60 °C 后, 酶活力显著下降。相比之下, R783A/R386A 的最适温度向高温方向偏移, 在 30~70 °C 范围内酶活持续升高, 并于 70 °C 达到最高; 当温度超过 70 °C 后, 其酶活迅速下降。

为进一步研究酶的热稳定性, 将 WT 及突变体在各自最适温度下孵育 3 h, 并每 30 min 测定一次残余酶活力, 以初始活性为 100%。结果如图 3b 所示, WT 与 R783A/S530A 的酶活随孵育时间延长均明显下降; 而 R783A/R386A 在 3 h 孵育后仍保留 90.4% 的残余活性, 展现较好热稳定性。此外, 当反应温度超过最适温度后, 所有酶活均出现不同程度下降, 这可能归因于高温诱导的蛋白构象热变性, 从而破坏酶活性口袋的局部或整体构象平衡^[32]。其中, R783A/S530A 在 60 °C 以上迅速失活, WT 在 60 °C 以上缓慢下降并在 90 °C 时仍保留约 60% 活性, 而 R783A/R386A 在 80 °C 以上活性急剧下降至 10% 以下, 表明其在高温区间仍保持一定结构稳定性, 但超过临界温度后发生快速失活。R783A/R386A 突变显著提升了酶的热稳定性, 而 Arg386 位点可能在维持酶结构稳定性及调控热适应性方面具有关键作用。

2.1.3.2 联合突变体的最适 pH 值和 pH 稳定性

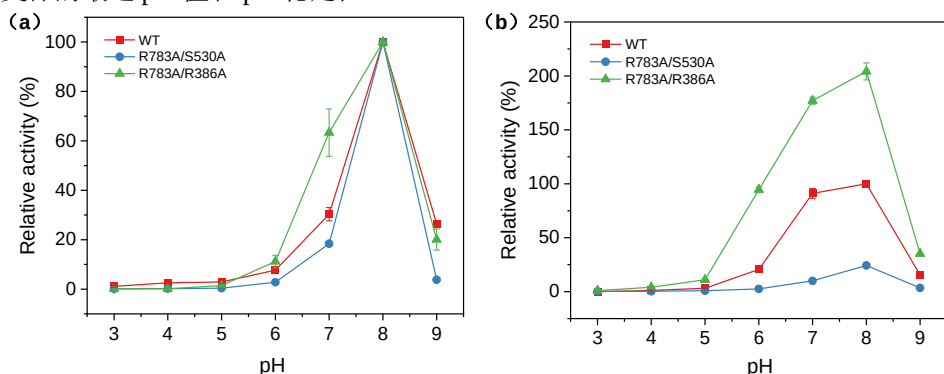


图 4 WT 及联合突变体的最适 pH 值和 pH 值稳定性

Fig.4 Optimal pH and pH stability of WT and double mutants

注: (a) 最适 pH 值; (b) pH 值稳定性。

为研究联合突变对酶最适 pH 值及 pH 稳定性的影响, 在 pH 3.0~9.0 值范围内测定野生型 WT 及联合突变体

的相对酶活力。以各酶在最适 pH 值条件下的酶活力定义为 100%，结果如图 4a 所示。WT 及各联合突变体的酶活性均随反应体系 pH 值由酸性向碱性变化呈现先升高后降低的趋势，且三者的最适 pH 值均为 8，表明联合突变未改变酶的最适 pH 值特性。进一步地，将 WT 及联合突变体分别置于不同 pH 值条件下，于 4℃ 保存 24 h 后测定残余酶活力，以 WT 在 pH 8 条件下保存后的酶活力作为 100%。结果如图 4b 所示，三种酶在 pH 8 条件下均表现出最佳稳定性，说明弱碱性环境更有利于维持酶的结构稳定性及活性，并适合作为酶的储存条件。

2.1.3.3 金属离子和有机溶剂对 R783A/R386A 酶活性的影响

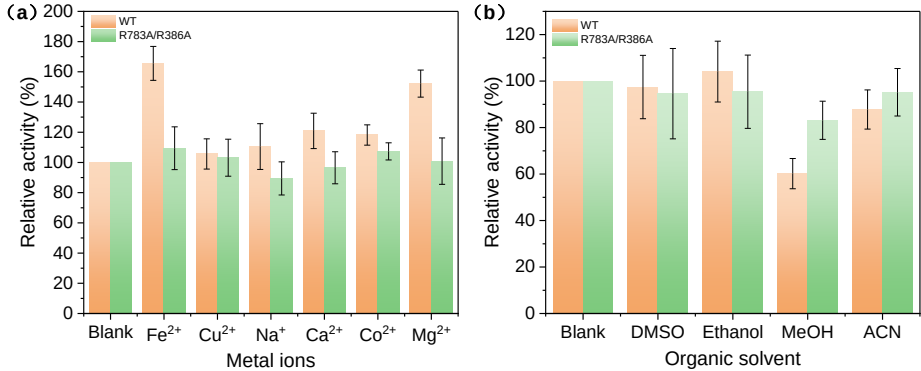


图 5 金属离子和有机溶剂对 WT 及联合突变体酶活性的影响

Fig.5 Effect of metal ions and Organic solvent on the relative activity of WT and R783A/R386A

注：（a）金属离子对酶活性影响；（b）有机溶剂对酶活性影响。

金属离子可通过作为电子供体或受体参与催化过程，也可与酶分子中的氨基、羧基等基团相互作用，从而对酶活性产生激活或抑制作用。为评估金属离子对酶催化性能的影响，研究了添加 5 mmol L⁻¹ Na⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺及 Co²⁺对 WT 和 R783A/R386A 酶活性的影响。结果如图 5a 所示，Fe²⁺和 Mg²⁺对 WT 展现一定的激活作用。而大多数金属离子对 R783A/R386A 酶活性影响较小。进一步研究了体积分数为 10%的有机溶剂对 WT 和 R783A/R386A 酶活性的影响。结果如图 5b 所示，在所测试的有机溶剂条件下，两种酶整体表现出较好的耐受性，大多数有机溶剂对酶活性的影响较小。其中，甲醇对 WT 及 R783A/R386A 均表现出一定程度的抑制作用。在该条件下，WT 与 R783A/R386A 在甲醇中的相对酶活力分别降至 60.19%、83.13%，表明突变体酶 R783A/R386A 对甲醇的耐受性明显增强。根据分子动力学模拟结果（图 9），突变后活性口袋周围柔性环区的动态性增强，同时体系维持更多的氢键数量（图 9d），形成了更稳定的分子内氢键网络。增强的氢键网络可在甲醇环境中维持活性中心关键残基的空间取向。另外，双突变体整体构象的适度舒展（图 9b）及表面暴露区域的增加（图 9e）可能促使甲醇分子更倾向于分布在蛋白表面而非渗入活性中心内部，从而减轻了甲醇对催化构象的直接影响。

2.1.3.4 动力学分析

表 3 酶动力学参数

Table 3 Enzyme kinetic parameters

Enzyme name	$V_{max}/(\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1})$	$K_m/(\text{mmol L}^{-1})$	$k_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$k_{cat} K_m^{-1}/(\text{L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1})$	Ref
WT	21.37±0.01	1.68±0.08	4.61±0.001	2.74±0.13	This study
R783A/R386A	9.80±0.01**	0.45±0.02***	2.97±0.001**	6.69±0.30**	This study
<i>Streptomyces</i> -K276A	—	0.01±0.00	0.02±0.00	2.83±0.29	[33]
<i>Penicillium</i> <i>griseoroseum</i>	—	0.65	43.65	—	[34]
MTCC-9224	—	12.77	5.60	0.44	[35]

注：数据分析采用独立样本 t 检验进行统计学差异分析。***表示差异极显著（ $P<0.001$ ），**表示差异高度显著（ $P<0.01$ ）。

为深入探究野生型 WT 及 R783A/R386A 双突变对酶催化性质的影响，本研究进行了动力学参数分析，结果如表 3 所示。与 WT 相比，R783A/R386A 的 K_m 值降低了 73.2%，表明该双突变显著增强了对底物的亲和力。同时，WT 与 R783A/R386A 的 $k_{cat} K_m^{-1}$ 值分别为 2.74±0.13 L mmol⁻¹ s⁻¹ 和 6.69±0.30 L mmol⁻¹ s⁻¹，对比动力学参数可发现，双突变体 R783A/R386A 的 $k_{cat} K_m^{-1}$ 升高主要源于 K_m 降低带来的底物亲和力增强，但其周转数 k_{cat} 较野生型

下降约 36%，表明该突变在改善底物结合的同时降低了催化转化速率。这一权衡使突变体在低底物浓度条件（如代谢物低的细胞区室或底物成本高昂的工业应用）下具有底物捕获优势，但在底物饱和的高通量场景（如工业发酵或高浓度底物生物转化）中， k_{cat} 下降直接限制了最大产物生成速率，因此需进一步优化该酶以平衡亲和力与转换数；同时 k_{cat} 受损提示 Arg783 和 Arg386 在野生型酶中可能参与过渡态稳定，为后续进一步的酶工程改造提供了思路。与已报道的其他鼠李糖苷酶相比，R783A/R386A 在底物亲和力方面优于 *Penicillium griseoroseum* MTCC-9224 及 *St-Rha*^[34,35]，催化效率也有显著提升。尽管其催化常数略低于 *Penicillium griseoroseum* MTCC-9224^[34]，但相较于 *Streptomyces*-K276A^[33]，该突变体在底物亲和力方面表现更优，尽管后者的转换数和催化效率略高。上述差异主要源于不同来源酶的氨基酸组成、活性中心微环境存在区别，也说明 R783A/R386A 位点突变是优化该酶底物识别能力的有效策略。

2.2 R783A/R386A 催化合成异槲皮苷

为探究联合突变体 R783A/R386A 在实际转化工艺中的应用潜力，测定了其催化芦丁水解制备异槲皮素的效能，结果如图 6、7 所示。由图 6a 可知，当底物浓度为 5 mmol L⁻¹，10 mmol L⁻¹ 时，R783A/R386A 均能实现底物完全转化，产率均达到 97% 以上。然而，当底物浓度提升至 50 mmol L⁻¹，酶浓度为 3 mg mL⁻¹ 时，产率下降至约 50%，进一步分析图 6b 可知，在固定底物浓度为 50 mmol L⁻¹ 的条件下，将酶浓度分别提高至 4、5 及 6 mg mL⁻¹，反应 24 h 后，各组的产率均超过 90%。上述结果表明，相较于单一突变或野生型酶，该联合突变体在突变后显著增强了对芦丁的催化活性。通过对反应条件的系统优化（加酶量 4~6 mg mL⁻¹，底物浓度 50 mmol L⁻¹），R783A/R386A 突变酶可使高浓度底物转化率由约 50% 大幅提升至 90% 以上，展现出优异的底物耐受性与催化效率。因此，R783A/R386A 突变酶为异槲皮素的绿色、高效酶法制备提供了一条兼具高催化活性与工艺适应性的可行技术路径。

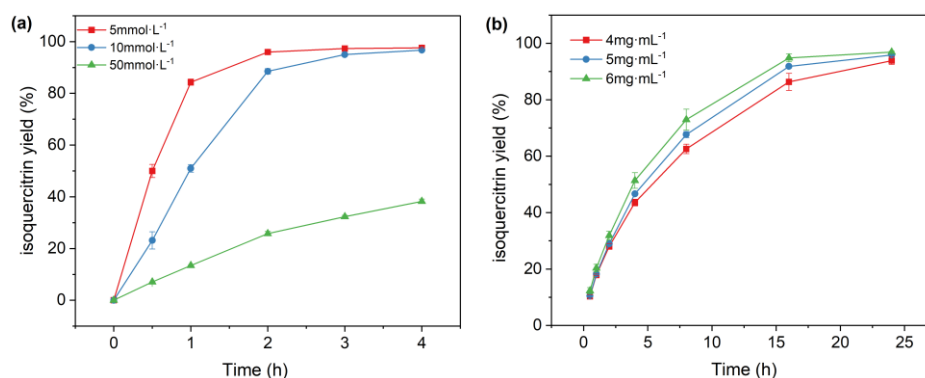


图 6 R783A/R386A 催化芦丁制备异槲皮素

Fig.6 Conversion of rutin to isoquercitrin by R783A/R386A

注：（a）不同底物浓度对 R783A/R386A 催化反应的影响；（b）不同酶浓度对 R783A/R386A 催化反应的影响。

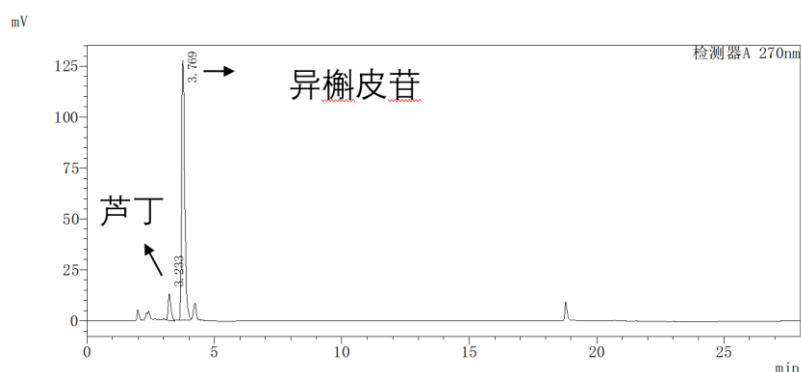


图 7 R783A/R386A 催化芦丁生成异槲皮苷 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC chromatograms showing the conversion of rutin to isoquercitrin catalyzed by R783A/R386A

2.3 分子对接分析

为探究野生型 WT 中 Arg783 及 Arg386 残基对催化活性的影响机制,本研究首先对 WT-底物复合物进行了分子对接分析,结果如图 8a 所示。对接结果表明,WT 与底物之间形成高度稳定的刚性结合构象,该构象主要由 Arg783 和 Arg386 等残基通过密集的短距氢键网络(1.8~2.9 Å)所维系。亲和力过强也可能式限制催化效率的因素之一^[36],而 WT 和芦丁的结合模式便具有较强的亲和力,可将配体构象锁定于催化前态,严重限制了催化循环所必需的构象弛豫及过渡态的形成,构成了动力学障碍,从而限制了催化效率。双突变通过截断侧链胍基,消解了局部氢键约束与正电荷排斥,促使活性口袋柔性扩张,解除了对底物构象自由度的过度限制,显著降低了催化过渡态的结构能量壁垒并加速催化周转。MM-PBSA 能量分解(表 4)表明,R783A/R386A 双突变通过降低极性溶剂化能(ΔE_{PB}),减少了底物结合时的去溶剂化惩罚,同时略微增强了静电相互作用,重构了结合驱动力,最终实现了更优的总结合自由能^[37]。

该突变策略有效优化了活性口袋的理化环境,增强了酶与芦丁的结合稳定性,为催化效率的提升提供了结构基础。能量计算结果显示,WT-芦丁复合物的结合自由能 ΔE_{bind} 为-10.63 kcal mol⁻¹,而 R783A/R386A 突变体复合物的 ΔE_{bind} 为-17.24 kcal mol⁻¹,较野生型降低了 6.61 kcal mol⁻¹。这表明双突变显著增强了酶与底物的结合亲和力,在酶动力学参数测定中,双突变后的 K_m 值显著下降,虽然双突变的 k_{cat} 值比野生型小,证明其催化常数小,但 $k_{cat} K_m^{-1}$ 仍显著比野生型高,与实验观察到的亲和力和催化效率提升趋势一致。

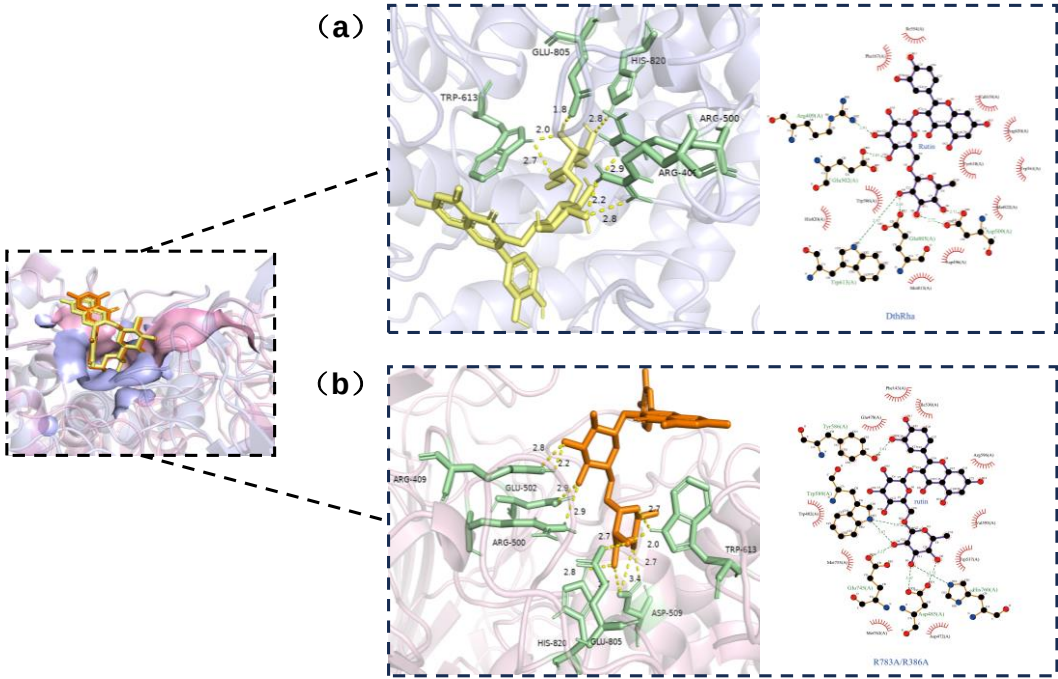


图 8 WT、R783A/R386A 对接芦丁复合体系构象及相互作用力

Fig.8 Complex conformation, and interaction forces of WT and R783A/R386A docked with rutin

注: (a) WT-rutin 复合体系构象及相互作用力; (b) R783A/R386A-rutin 复合体系构象及相互作用力。

表 4 WT, R783A/R386A 与 rutin 复合物体系结合自由能

Table 4 Binding free energy of complex systems of WT and R783A/R386A with rutin

Contribution terms	WT-rutin complex	R783A/R386A-rutin complex
ΔE_{PB}	232.53	217.10
ΔE_{SASA}	-5.17	-3.88
ΔE_{vdw}	-49.56	-34.91
ΔE_{elec}	-188.43	-195.54
ΔE_{bind}	-10.63	-17.24

注: ΔE_{vdw} 为酶与底物的范德华力; ΔE_{elec} 为酶与底物的静电相互作用力; ΔE_{PB} 为酶与底物的极性溶剂化能; ΔE_{SASA} 为酶与底物的非极性溶剂化能; ΔE_{bind} 为复合物体系总结合自由能。

2.4 分子动力学模拟

为探究野生型 WT 与 R783A/R386A 突变体与芦丁复合物的整体结构稳定性,本研究对两个体系进行了分子动力学模拟,结果如图 9 所示。复合体系的均方根偏差结果如图 9a 所示,15 ns 内,WT 和突变体的 RMSD 都快速上升并逐渐趋于稳定,进入平衡状态,平衡后突变体 R783A/R386A 的 RMSD 明显高于 WT,分别为 0.18 nm 和 0.15 nm,且波动更大。表明该突变体与芦丁结合后整体骨架的构象波动较 WT 更为显著,柔性更强。回转半径 R_g 随时间的变化结果如图 9b 所示,平衡后,突变体 R783A/R386A 的 R_g 整体高于 WT,提示该复合物的整体构象较 WT 更为舒展、松散度更高。这种适度的结构膨胀反映了蛋白构象动态性的增强,为底物结合及催化构象的调整提供了空间。均方根波动(RMSF)分析结果如图 9c 所示。与 WT 相比,R783A/R386A 突变体整体骨架柔性有所增加,在 N 端 1~20 残基及 150~200 残基区间出现两处明显的高柔性峰。进一步结合结构定位分析(图 9)发现,上述两个区段均位于底物结合口袋附近的柔性环区域,而 Arg386 和 Arg783 突变位点与其空间位置相邻。双突变后局部相互作用网络发生调整,使口袋周围环区动态性增强,从而提高了底物结合口袋的构象柔性。氢键数量分析如图 9d 所示,与 WT 相比,R783A/R386A 突变体体系在整个模拟过程中保持了更高的平均氢键数量,尤其在 7.5 ns 之前,其氢键数量明显高于 WT,说明突变后体系中残基间相互作用增强,形成了更加稳定的氢键网络。溶剂可及其表面积(Solvent accessible surface area, SASA)分析如图 9e 所示,与 WT 相比,R783A/R386A 体系表现出更高的 SASA 值,说明突变后复合物表面暴露区域增加,蛋白构象可能发生一定程度的开放变化,使部分原本埋藏的区域与溶剂接触增加。双突变体的构象动态变化贯穿于“结合-催化-释放”完整催化循环的多个环节。在底物结合阶段,R783A/R386A 突变体口袋局部柔性提升及构象舒展,降低了底物进入活性中心的空间位阻,促进底物分子有效进入结合口袋^[38]。在过渡态稳定化阶段,Arg783 和 Arg386 残基位于催化环区与活性口袋的交界处,双突变后局部氢键网络发生重排(图 9d),催化环区的动态波动适度增强(图 9c),使得活性中心能够在底物结合后快速重排形成适配反应过渡态的构象。这种动态机制通过降低催化环区的构象刚性、允许关键催化残基在过渡态形成时达到最优空间取向,从而降低过渡态自由能垒^[39,40]。在产物释放阶段,蛋白表面区域构象调整弱化了口袋与产物之间非特异性氢键束缚,缓解产物在口袋内部的滞留,有利于催化产物快速解离释放。

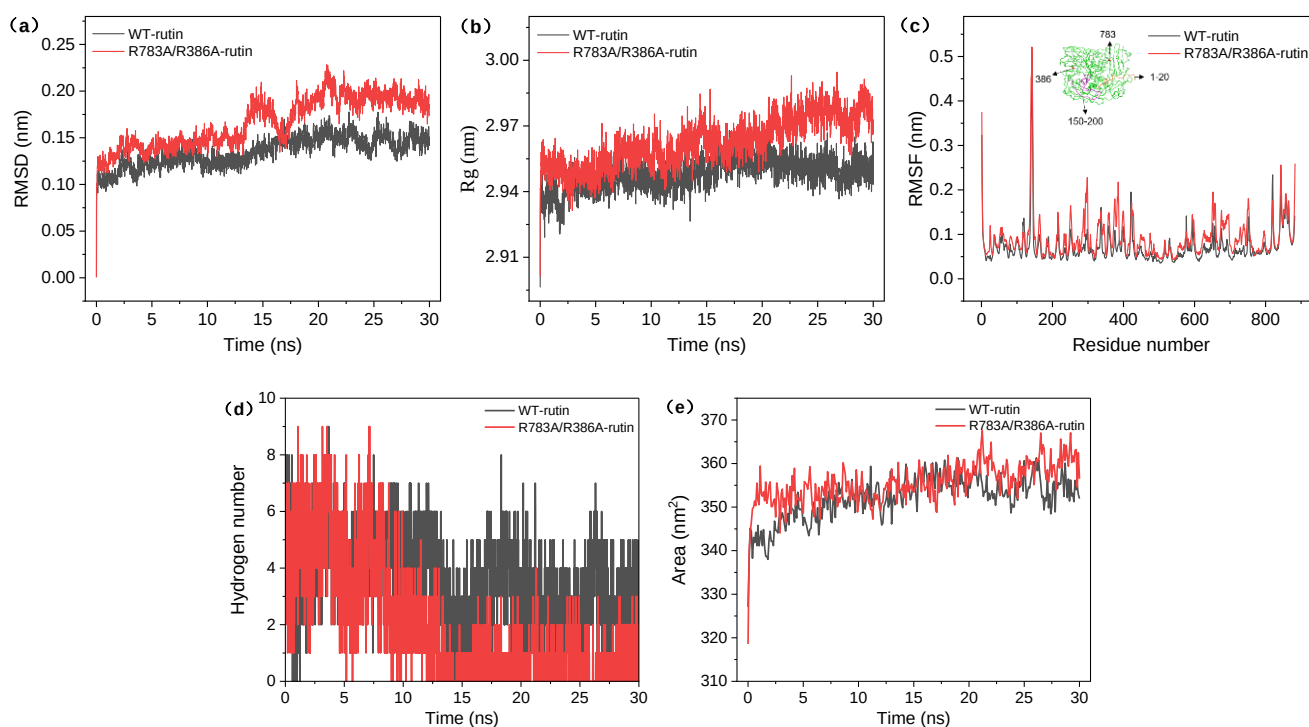


图 9 WT、R783A/R386A 与芦丁复合物体系的 RMSD、 R_g 、RMSF、氢键数量和溶剂可及表面积分析

Fig.9 RMSD, R_g , RMSF, hydrogen number and area of the complex systems of WT and R783A/R386A with rutin

注: (a) 复合物体系的 RMSD 分析; (b) 复合物体系的 R_g 分析; (c) 复合物体系的 RMSF 分析; (d) 复合物体系的氢键数量分析; (e) 复合物体系的溶剂可及表面积分析。

3 结论

本研究以 α -L-鼠李糖苷酶 *DthRha* 为研究对象,通过联合突变策略构建了多个双突变体,并成功筛选出催化活性与热稳定性最优的 R783A/R386A 突变体。对该突变体的系统酶学性质表征表明,Arg386 和 Arg783 双位点突变后,酶活力较野生型显著提升 7.63 倍,热稳定性亦明显增强,在 70 °C 下孵育 3 h 后仍保持 90.4% 的残余活性。动力学分析显示,该突变体的 K_m 值为 0.45 mmol L⁻¹, k_{cat}/K_m 值为 6.69 L mmol⁻¹ s⁻¹,表明其对底物芦丁具有较高的亲和力,并在一定条件下表现出更优的底物利用能力。在以芦丁为底物合成异槲皮素的反应中,产率达到 97%,展现出优异的催化性能。分子机制研究表明,R783A/R386A 突变通过截断精氨酸侧链消解活性口袋刚性约束,重构氢键-疏水杂化互作网络,优化结合自由能组分,实现了从刚性结合向柔性催化的转变,从而协同提升催化活性与稳定性。本研究不仅为其应用于异槲皮素的绿色生物制造提供了优良酶资源和理论依据,也为 α -L-鼠李糖苷酶的理性改造提供了可行策略。本研究不仅为其应用于异槲皮素的绿色生物制造提供了优良酶资源和理论依据,也为 α -L-鼠李糖苷酶的理性改造提供了可行策略,未来可进一步探索饱和突变策略,以定向提升其催化性能。

参考文献

- [1] 谭正熙,袁志,於洪建.酶处理异槲皮苷的研究进展[J].中草药,2026,57(10):4080-4088.
- [2] 刘思宇,于璐婧,张传艺,等.异槲皮苷调控 PTP1B 改善胰岛素抵抗的网络药理学研究及体外实验验证[J].现代药物与临床,2022,37(11):2444-2456.
- [3] ZHANG Y, WANG X J, WANG L, et al. Interactions of the baicalin and baicalein with bilayer lipid membranes investigated by cyclic voltammetry and UV-Vis spectroscopy [J]. Bioelectrochemistry, 2014, 95: 29-33.
- [4] 周星辰,闫可欣,李玉芳,等.夏枯草提取物、芦丁和槲皮素体外生物活性对比研究[J].农业研究与应用,2025,38(6):595-602.
- [5] 甘小娜,李廷钊,李波.基于 UPLC-ABTS-PDA-Triple TOF/MS 的辣木叶中抗氧化活性成分在线筛选[J].中国现代中药,2022,24(6):1003-1008.
- [6] 庄桂娟,管怀进.芦丁对氧化损伤环境下晶状体透明度的影响及其作用机制[J].眼科新进展,2026,46(3):173-177.
- [7] 王晓花,买尔哈巴·买买提,骈继鑫,等.乳苣不同部位异槲皮苷含量测定及其抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2024,41(4):55-59.
- [8] 佟俊硕.异槲皮素对猪卵巢颗粒细胞增殖及小鼠激素分泌和卵巢抗氧化能力的研究[D].佛山:佛山科学技术学院,2023.
- [9] 柳浩琪.异槲皮素提高番茄耐贮性及对灰霉病的抗性[D].泰安:山东农业大学, 2022.
- [10] 张卓颖,郑福增,王琳,等.中药黄酮类化合物治疗强直性脊柱炎作用机制的研究进展[J].中医正骨,2026,38(1):44-50.
- [11] ELSAYED N A, MARZOUK M A, MOAWED F S, et al. Flavone attenuates nicotine-induced lung injury in rats exposed to gamma radiation via modulating PI3K/Nrf2 and FoxO1/NLRP3 inflammasome [J]. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2024, 38: 1-15.
- [12] 王瑜彤,文嫒媛,庄友毅,等.基于网络药理学和转录组学探索异槲皮苷治疗实验性类风湿关节炎的机制[J].天然产物研究与开发, 2026,38(1):158-170.
- [13] ZHANG N, YANG J, LI K, et al. Synthesis of flavone derivatives via n-amination and evaluation of their anticancer activities [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2723.
- [14] JEONG S H, KIM H H, HA S E, et al. Flavones: six selected flavones and their related signaling pathways that induce apoptosis in cancer [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10965.
- [15] JEONG S H, KIM H H, PARK M Y, et al. Flavones: The apoptosis in prostate cancer of three flavones selected as therapeutic candidate models [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11):9240.
- [16] BIRT D F, JEFFERY E. Flavonoids [J]. Advances in Nutrition, 2013, 4(5): 576-577.
- [17] 师嘉浩,王鑫晶,成日青,等.黄酮类化合物治疗心脑血管疾病机制及其新型递送系统研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2024,46(1):84-90.
- [18] 曹衡.异槲皮素对心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡的作用及其机制研究[D].南京:南京医科大学,2018.
- [19] BAN Y L, YANG H W, JIANG J X, et al. A α -L-rhamnosidase from *Echinacea purpurea* endophyte *Simplicillium sinense* EFF1 and its application in production of Calceorioside B [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270(1): 132090.
- [20] PAN L X, ZHANG Y T, ZHANG F, et al. α -L-rhamnosidase: production, properties, and applications[J]. World Journal of Microbiology

- & Biotechnology, 2023, 39(7): 191.
- [21] ZHANG F, WANG X, PAN L X, et al. Homologous expression of *Aspergillus niger* α -L-rhamnosidase and its application in enzymatic debittering of Ougan juice [J]. Biotechnology Letters, 2024, 46(6): 1187-1198.
- [22] 张凤亭,胡坦,潘思轶.橙皮苷生物学活性及其改性技术的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(10):442-449.
- [23] KUO C H, CHEN B Y, LIU Y C, et al. Production of resveratrol by piceid deglycosylation using cellulose [J]. Catalysts, 2016, 6(3): 32.
- [24] FUJIMOTO Z, JACKSON A, MICHIKAWA M, et al. The structure of a *Streptomyces avermitilis* α -L-Rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(17): 12376-12385.
- [25] HUANG J J, HU H X, LU Y J, et al. Computer-aided design of α -L-Rhamnosidase to increase the synthesis efficiency of icaraside I [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 926829.
- [26] ZHANG S S, LUO J N H, DONG Y R, et al. Biotransformation of the total flavonoid extract of epimedium into icaritin by two thermostable glycosidases from *Dictyoglomus thermophilum* DSM3960 [J]. Process Biochemistry, 2021, 105: 8-18.
- [27] 陈宇琛,杨李,谷敏,等.哈茨木霉酸性蛋白酶基因的克隆表达及其水解应用[J].现代食品科技,2024,40(5):84-91.
- [28] YU S Q, SHAN X Y, LYV Y, et al. Bioproduction of quercetin using recombinant thermostable glycosidases from *Dictyoglomus thermophilum* [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 48.
- [29] HU J Y, SONG L L, ZHAO L, et al. An organic solvent-tolerant α -L-Rhamnosidase from *Dictyoglomus thermophilum* and its application in production of icaraside I from icariin [J]. Molecules, 2025, 30(13): 2847.
- [30] KO D S, JEONG H M, SHIN Y J, et al. Comparison of novel α -glucosidases in glycoside hydrolase family 97 isolated from *Bacteroides thetaiotaomicron* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2025, 190: 110696.
- [31] LU T. Sobtop [EB/OL]. (2016-01-16) [2026-06-04]. <http://sobereva.com/soft/Sobtop>.
- [32] ZHANG Z Q, CHEN S H, YANG R Z, et al. Modeling Enzyme Temperature Stability from Sequence Segment Perspective [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2025, 65(20): 10932-10944.
- [33] LI X P, CHEN P, CHEN L, et al. Catalytic-difference elucidating of hesperidin and naringin by Rhamnosidase and prunin production enhancing through enzyme mutation [J]. Food Bioscience, 2025, 69: 106885.
- [34] YADAV S, YADAVA S, YADAV K D S. α -L-rhamnosidase selective for rutin to isoquercitrin transformation from *Penicillium griseoroseum* MTCC-9224 [J]. Bioorganic Chemistry, 2017, 70: 222-228.
- [35] LUO C M, KE L F, HUANG X Y, et al. Efficient biosynthesis of prunin in methanol cosolvent system by an organic solvent-tolerant α -L-rhamnosidase from *Spirochaeta thermophile* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 175: 110410.
- [36] HUANG M, PENGTHAISONG S, CHAROENWATTANASATIEN R, et al. Systematic functional and computational analysis of glucose-binding residues in glycoside hydrolase family GH116 [J]. Catalysts, 2022, 12(3): 343.
- [37] YANG S J, LI M L, ZHANG T, et al. Enhancement of isomerization activity and thermostability of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* using semi-rational design [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 311(4): 144061.
- [38] ZHENG L, ZHOU X J, JIN T Y, et al. Computer-aided multidimensional strategy to improve the thermostability of d-allulose 3-epimerase from *Christensenellaceae Bacterium* for the production of d-allulose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(22): 13699-13709.
- [39] LI Z, XIE D, SONG C, et al. The open-closed transitions within dynamic conformational changes of enzyme loops [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2026, 6(1): 2.
- [40] SONG C, GU J, REN H, et al. Loop engineering in enzymes from structure to function: Mechanisms, methodologies, and engineering strategies [J]. Biotechnology Advances, 2025, 85: 108716.