李荷月, 郭煜辉, 裴雯雯, 等. 半理性设计提升葡萄糖氧化酶活性与热稳定性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 59−68. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010032

LI Heyue, GUO Yuhui, PEI Wenwen, et al. Enhancing the Activity and Thermostability of Glucose Oxidase Through Semi-rational Design[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 59−68. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010032

·研究与探讨·

半理性设计提升葡萄糖氧化酶活性与热稳定性

李荷月[1,2], 郭煜辉[1,2], 裴雯雯[1,2], 王　倩[1,2], 李　娇[2], 赵　伟[4], 秦慧民[1], 孙媛霞[2,3], 陈　朋[2,3,*]

（1.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2.中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程研究中心, 天津 300308;
3.中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津 300308;
4.山东福洋生物科技股份有限公司, 山东德州 253100）

摘　要: 本研究旨在通过半理性设计策略同时提高黑曲霉（*Aspergillus niger*）来源葡萄糖氧化酶（*An*GOD）酶活性与热稳定性。基于 FireProt 在线工具与序列一致性分析设计突变位点，通过定点突变及两阶段组合突变筛选最优突变体，并利用分子动力学模拟解析其性能提升机制。结果表明，从 83 个设计位点中筛选出 12 个单点优势突变体，经两阶段组合突变获得最优突变体 M5（T276F/T34V/Q90R/S53F/S74T）。M5 的比酶活较野生型（WT）提高 4.2 倍，k_{cat} 值为 755.0 s^{-1}，催化效率（k_{cat}/K_m）为 34.52 $L\cdot mmol^{-1}\cdot s^{-1}$，分别为 WT 的 3.67、2.48 倍。在 65 ℃下，M5 的半衰期为 30 min，较 WT（1 min）提高了 30 倍。分子动力学模拟表明，M5 的 RMSD 均值与非催化区 RMSF 均值较 WT 分别降低了 12.9% 与 12.4%，与底物及辅酶之间的氢键数量分别增加 10.3% 与 8.8%，此外，S74T 新增氢键网络，Q90R 突变引入正电荷，增强表面静电互补，这些因素共同提升了 *An*GOD 的热稳定性与催化活性。本研究通过半理性设计与组合突变策略，显著缓解了 *An*GOD 酶改造中热稳定性与催化活性的权衡问题，为 GOD 的应用奠定了基础。

关键词: 葡萄糖氧化酶, 活性与稳定性权衡, 半理性设计, 一致性分析, 分子动力学模拟
中图分类号: Q71　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0059−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010032
本文网刊:

Enhancing the Activity and Thermostability of Glucose Oxidase Through Semi-rational Design

LI Heyue[1,2], GUO Yuhui[1,2], PEI Wenwen[1,2], WANG Qian[1,2], LI Jiao[2], ZHAO Wei[4], QIN Huimin[1], SUN Yuanxia[2,3], CHEN Peng[2,3,*]

（1.School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2.National Engineering Research Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;
3.Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;
4.Shandong Fuyang Biological Starch Co., Ltd., Dezhou 253100, China）

Abstract: This study aimed to simultaneously enhance the enzymatic activity and thermostability of glucose oxidase

收稿日期: 2025−01−06
基金项目: 国家重点研发计划（2022YFC2104900）; 山东省重点研发计划（重大科技创新工程）项目（2023CXGC010714）; 合成生物学海河实验室重大攻关类项目（22HHSWSS00003）。
作者简介: 李荷月（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: liheyue@tib.cas.cn。
*** 通信作者:** 陈朋（1988−）, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 糖生物学, E-mail: chen_p@tib.cas.cn。

(*An*GOD) derived from *Aspergillus niger* through a semi-rational design strategy. Mutation sites were designed using the FireProt online tool and consensus sequences analysis, and the optimal mutant was screened via site-directed mutagenesis and a two-stage combinatorial mutation approach. Molecular dynamics simulations were then conducted to elucidate the mechanism of performance enhancement. Results showed that from the initial 83 designed sites, 12 single-point advantageous mutants were selected, and the optimal mutant M5 (T276F/T34V/Q90R/S53F/S74T) was obtained through two-stage combinatorial mutagenesis. Compared to the wild-type (WT), M5 exhibited a 4.2-fold increase in specific activity, with a k_{cat} value of 755.0 s^{-1} and a k_{cat}/K_m value of 34.52 $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$, representing 3.67- and 2.48-fold enhancements over WT, respectively. At 65 ℃, the half-life of M5 was 30 min, representing a 30-fold increase compared to WT (1 min). Molecular dynamics simulations revealed that the average RMSD of M5 and the RMSF in non-catalytic regions were reduced by 12.9% and 12.4%, respectively, compared to the wild-type (WT). Additionally, the number of hydrogen bonds between M5 and the substrate/coenzyme increased by 10.3% and 8.8%, respectively. Notably, the S74T mutation introduced a novel hydrogen bond network, while the Q90R mutation introduced a positive charge, enhancing surface electrostatic complementarity. These synergistic effects collectively improved both the thermostability and catalytic activity of *An*GOD. Through semi-rational design and combinatorial mutagenesis, this study significantly alleviated the stability-activity trade-off in *An*GOD enzyme engineering, laying a foundation for the application of GOD.

Key words: glucose oxidase; activity-stability trade-off; semi-rational design; consensus sequences analysis; molecular dynamics simulation

葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, EC 1.1.3.4, GOD)属于葡萄糖/甲醇/胆碱氧化还原酶超家族,为黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin Adenine Denucleotide, FAD)依赖型氧化酶,能以氧气为电子受体,专一性氧化 *β*-D-葡萄糖生成葡萄糖酸内酯和过氧化氢,葡萄糖酸内酯进一步水解生成葡萄糖酸[1]。

基于 GOD 的反应特性,其已成为食品、药物、医疗、饲料等行业使用最广泛的氧化还原酶之一[2]。GOD 可除去食品中的氧气和葡萄糖,减少食品的氧化,因而在食品行业有许多重要应用,包括烘焙行业、饮料生产及食品保鲜等[3]。在医疗行业,基于 GOD 的葡萄糖生物传感器已广泛用于监测糖尿病患者的血糖水平[4−5],其也被用于肿瘤患者的饥饿治疗[6]、糖尿病人伤口愈合[7] 等。作为一种新型饲料添加剂,GOD 因其在改善动物肠道健康方面的有益功能而备受关注[8−9]。此外,GOD 是葡萄糖酸及其盐类工业生产的关键酶[10]。

GOD 在多种真菌中产生,主要存在于曲霉属和青霉属中[11]。真菌工业生产 GOD 存在产率低、副产物多及对原材料中存在的金属离子高度敏感的问题[12]。利用重组工程菌株异源表达 GOD 有助于解决这一问题,来源于黑曲霉的 GOD 已在解脂耶氏酵母[13]、毕赤酵母[14−16] 等工程菌中实现异源高效表达。天然 GOD 存在酶活力低、热稳定性差等缺点,不能适用于 GOD 的所有应用场景。近年来,已有诸多报道通过酶工程改造获得性能优良的 GOD,以扩大其应用范围。例如,Tu 等[17] 对黑曲霉(*Aspergillus niger*)来源的 GOD 进行定向进化,获得突变体 M4,与野生型 GOD 相比,其 T_m 值升高了 7.5 ℃,在 60 ℃ 和 70 ℃ 下的半衰期分别提升了 8.4 倍和 5.6 倍。Ning 等[18] 通过计算机辅助分子模拟分析预测了与青霉属葡萄糖氧化酶热稳定性密切相关的氨基酸,获得了两个热稳定性显著提高的突变体 S100A 和 D408W,在相同温度下半衰期分别是野生型酶的 5.13 倍和 4.41 倍,但未报道活性变化。Mu 等[19] 使用计算机模拟设计来增强黑曲霉 GOD 的稳定性,突变体的 T_m 值提升了 8.5 ℃,葡萄酸的产量提升了 2 倍。Marín-Navarro 等[20] 随机突变筛选出热稳定性提升的 T554M 突变体,理性设计在二聚体界面引入新盐桥,突变体 Q90R/Y509E 热稳定性显著提升,进一步通过组合突变获得热稳定提升 3 倍的 T554M/Q90R/Y509E 三重突变体。以上策略多聚焦于 *An*GOD 的单一性能提升,提高热稳定性的过程中酶的活性通常会下降,稳定性与活性权衡问题尚未有效解决[21]。目前,通过分子改造提升 GOD 活性的研究较少,因此,选择合理的蛋白质工程策略同时提高 GOD 的热稳定性和活性对扩大其应用范围至关重要。

本研究以黑曲霉(*Aspergillus niger*)来源的 *An*GOD 为研究对象,采用 FireProt 在线网站工具与序列一致性分析等半理性手段设计突变位点,通过定点突变及两阶段组合突变获得活性与热稳定性同时提高的 *An*GOD 突变体,为其工业应用提供更具潜力的酶制剂。进一步,利用分子动力学模拟手段解析其催化性能提升机理,为 GOD 的进一步改造提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5*α*、毕赤酵母 *Pichia pastoris* X33、重组质粒 pPICZ*α* A-*An*GOD 为本实验室保存;Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增试剂盒　南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒小提试剂盒　Omega Bio-Tek 公司;PCR 产物纯化试剂盒　天根生物科技有限公司;SDS-PAGE 试剂盒　天津润泰发展有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、葡萄糖氧化酶活性检测试剂

盒、琼脂粉、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、D-无水葡萄糖　分析纯，北京索莱宝科技有限公司；邻联茴香胺、甲醇　分析纯，Sigma-Aldrich 公司；辣根过氧化物酶　上海麦克林生化科技有限公司；酵母膏、蛋白胨　英国 OXOID公司；YNB　上海生工生物公司；无水乙醇、NaCl、K_2HPO_4、KH_2PO_4　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；博来霉素　分析纯，杭州弗德生物科技有限公司；其他生化试剂均为国产分析纯；所用培养基为 LB 培养基、YPD 培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基[22]　实验室配制。

T100™ 聚合酶链式反应仪(Polymerase Chain Reaction Instrument, PCR 仪)　伯乐生命医学产品(上海)有限公司；Sorvall Stratos 高速冷冻离心机　Thermo Fisher Scientific 公司；JN-MINI PRO 低温超高压细胞粉碎仪　广州聚能纳米生物科技股份有限公司；SW-CJ-2FD 超净工作台　苏州安泰空气科技有限公司；DHP-9082 电热恒温培养箱　上海一恒科技有限公司；ZWY-110X30 恒温水平摇床　北京市六一仪器厂；UV-1900i 紫外分光光度计　日本岛津公司；Synergy LX 酶标仪　Biotek 公司；SQ-510C 台式高压灭菌锅　重庆雅马拓科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　突变位点设计　FireProt 设计突变位点：从 PDB 数据库中获得 *An*GOD 晶体结构(PDB ID: 3QVP)，将其提交至 FireProt 2.0 在线服务器(https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotweb/)[23]，使用默认参数预测和设计预测潜在的有益突变位点。

序列一致性分析设计突变位点：将 *An*GOD 的蛋白质序列提交至 Uniprot 数据库 BLAST 工具，使用默认参数获得 250 条蛋白质氨基酸序列。使用 Jalview 软件中 Clustal 工具进行全局序列比对及一致性分析，根据结果设计突变位点。

1.2.2　突变体构建　前期实验室保存有经密码子优化的 pPICZα A-*An*GOD，其 C 端含有 6×His 标签。设计包含突变位点氨基酸的两条互补引物，进行全质粒 PCR，PCR 产物通过琼脂糖核酸凝胶电泳进行验证，扩增成功的质粒用 Dpn Ⅰ消化，转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞，37 ℃，200 r/min 摇床孵育 1 h 后涂布到含有 Zeocin 抗性的 LB 平板上。37 ℃ 下恒温培养 24 h，筛选得到转化子，挑取部分转化子至含有 Zeocin 抗性的 LB 液体培养基中进行培养，将培养菌液送至测序公司进行 DNA 测序验证。测序验证成功后，提取突变质粒并以其为模板，在启动子 AOX1 内部设计引物进行经 PCR 扩增(95 ℃ 预变性 5 min、循环数 1，95 ℃ 变性 30 s、54 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 60 s、循环数 25，72 ℃ 最终延伸 5 min、循环数 1)，用 Dpn Ⅰ消化质粒模板，试剂盒纯化获得线性化质粒。采用电转化法将线性化质粒转化至毕赤酵母 *P. pastoris* X33感受态细胞并涂布到含有 100 μg/mL Zeocin 抗性的YPD 平板上，30 ℃ 下恒温培养 48 h。设计 *An*GOD 特异性引物，挑取单菌落进行 PCR 扩增(95 ℃ 预变性 5 min、循环数 1，95 ℃ 变性 30 s、54 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 60 s、循环数 25，72 ℃ 最终延伸 5 min、循环数 1)，PCR 产物通过琼脂糖核酸凝胶电泳进行验证，大小正确则证明获得 *An*GOD 突变体重组表达菌株。

1.2.3　酶的异源表达与纯化　对 *An*GOD 突变体重组表达菌株进行诱导表达，具体方法参照毕赤酵母表达手册(Invitrogen, K171001)[24]。诱导表达结束后，离心收集发酵上清液。通过 Ni-NTA 亲和层析对粗酶上清液进行纯化。先用含有 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、30 mmol/L(pH7.0)咪唑的结合缓冲液洗涤杂蛋白，再用含有 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、500 mmol/L(pH7.0)咪唑的洗脱缓冲液洗脱蛋白获得纯酶液。将纯酶液转移至 30 kDa 截留分子量的超滤管中，用 100 mmol/L CH_3COOH-CH_3COONa 缓冲液(pH5.5)在 4 ℃、4000 r/min 下离心 30 min 进行脱盐处理，重复洗脱 3 次。纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 鉴定：采用 12% 分离胶与 5% 浓缩胶，上样量 10 μg/孔，电泳缓冲液为 25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS，初始电压 80 V(浓缩胶阶段)，分离胶阶段调整为 120 V，电泳时间 1.5 h。凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色并脱色至背景清晰。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定目的蛋白浓度，将样品稀释到同一浓度测定酶活。

1.2.4　酶活测定　对传统邻联茴香胺显色法[25]加以改进。用 100 mmol/L CH_3COOH-CH_3COONa 缓冲溶液稀释过氧化氢溶液至不同浓度，取 200 μL 反应体系(含 6.67 μL 过氧化氢稀释液、193.33 μL 经 40 ℃ 预热显色液)混匀后在 460 nm 测吸光度，绘制过氧化氢标准曲线。用同样方法测定稀释后的反应液，采用动力学方法每隔 30 s 测定 460 nm 处吸光值，时长 2 min，获得拟合曲线，依其斜率与标准曲线计算过氧化氢生成速率及酶活力。在 pH5.5、40 ℃ 下每分钟氧化 1 μmol β-D-葡萄糖的酶量为一个活力单位。

1.2.5　酶学性质

1.2.5.1　最适 pH 的测定　40 ℃ 条件下，测定酶在不同 pH 缓冲液(CH_3COOH-CH_3COONa pH3.0~6.0；KH_2PO_4-K_2HPO_4 pH6.0~8.0；Glycine-NaOH pH8.0~10.0)中的活性，将酶活性最高值定义为 100%，计算各 pH 条件下相对酶活力，确定最适 pH。

1.2.5.2　最适温度的测定　在最适 pH 条件下，测定酶在 20、30、40、50、60、70 ℃ 下的酶活力，将酶活性最高值作为 100%，计算各温度条件下相对酶活力，确定最适温度。

1.2.5.3　热稳定性的测定　在最适 pH 条件下，将酶在 55、65、75 ℃ 下恒温保持，不同时间取样测定酶活力，以 0 h 时测定的酶活为 100%，计算不同取样时

间残余酶活力，评估酶的热稳定性。

1.2.5.4 金属依赖性的测定 在 pH5.5 的反应体系中分别添加终浓度 2 mmol/L 的 Ba^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Co^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}，测定酶活力，不添加金属离子时的酶活为 100%，计算添加其他金属离子时的酶活力，研究不同金属离子对酶活的影响。

1.2.5.5 酶动力学参数的测定 用 pH5.5、100 mmol/L CH_3COOH-CH_3COONa 缓冲液配制含不同浓度葡萄糖溶液（25、50、75、100、125、150 mmol/L）的酶反应体系，以葡萄糖为底物，在最适反应温度 40 ℃下反应，计算酶活力。使用 GraphPad Prism 9.3.0 软件拟合酶活力随葡萄糖浓度变化的非线性回归曲线，得到函数拟合 Michaelis-Menten 方程，获得酶动力学参数 K_m 和 V_{max}，通过计算获得 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值。

1.2.6 分子动力学模拟 为了探究 GOD 热稳定性与活性提高的分子机制，在 *An*GOD 野生型的晶体结构（PDB ID:3QVP）基础上，利用 pymol 突变 T276F、T34V、Q90R、S53F 和 S74T 获得突变体 M5 的立体结构。利用薛定谔软件将底物 *β*-D-glucose 对接至酶活性位点中，并选择符合催化机理的对接结果（GlcO1 与 His520Nε2、His563Nδ1 间距离相等且均为 2.8 Å[26−27]）进行动力学模拟。分别利用 Amber 18 中的 GAFF2 和 Amber ff14SB 力场。系统置于 8 Å 的正六面体的 TIP3P 水模型中。加入 Na^+和 Cl^-中和系统的总电荷。利用最陡下降法和共轭梯度算法对整个系统进行优化、能量最小化。随后，在 313 K 的恒温温度和 1.0 atm 的压力下，使用 Langevin-hermostat（ntt=3）以 2 ps^{-1} 的碰撞频率和 1 ps 压力松弛时间将系统保持 50 ps 的密度平衡。随后，将系统进一步平衡 10 ns，以获得稳定的压力和温度。最终，在 313 K、1.0 atm 的压力下，每个系统进行 100 ns 的最终模拟。在整个模拟过程中，使用 SHAKE 算法对氢键进行限制。所有 MD 模拟的收敛性均通过均方根偏差（RMSD）分析进行评估。使用 Maestro-Schrödinger 12.9 做分子对接，PyMOL 展示蛋白三维结构，Amber 2018 进行分子动力学模拟。

1.3 数据处理

所有试验重复 3 次，使用 FireProt 2.0 和 Jalview 的多序列比对预测突变位点。对酶学性质研究实验中，每个实验做 3 个平行，使用软件 Graphpad Prism 9.3.0 进行数据统计分析并做图。

2 结果与分析

2.1 半理性设计突变位点

FireProt 2.0 网络服务器结合了基于能量、进化和祖先重建的策略，是预测和设计热稳定突变体的有效工具，可以设计单点突变体，也可以通过单点变体的合理组合策略预测多点突变体[28]。将 *An*GOD 晶体结构提交至 FireProt 2.0 在线服务器进行计算分析，结果显示共有 53 个可设计位点。为更精准定位优势突变体并减少工作量，基于能量策略，选择 FoldX 和 Rosetta 折叠自由能均小于等于零的位点，基于进化策略，选择保守性小于 7 的位点，进一步选择能量或进化为 YES 选项的位点，共获得 35 个预测位点。

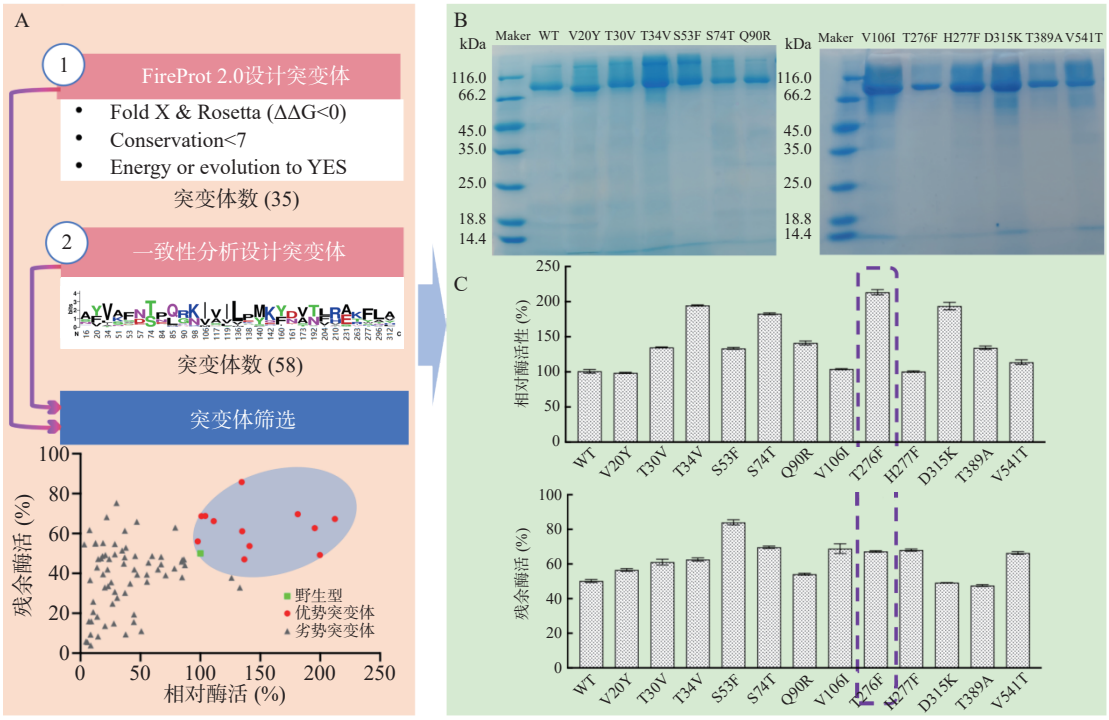


图 1 采用组合策略设计 GOD 突变体以提高其酶活与热稳定性

Fig.1 Designing GOD mutants using combinatorial strategies to enhance enzyme activity and thermal stability

注：A：突变体的设计与筛选；B：GOD 野生型与突变体纯化后的 SDS-PAGE；C：GOD 野生型与突变体活性筛选与热稳定性筛选。

以共识概念为指导的突变设计：共识概念是一种基于生物信息学的蛋白质设计方法，通过目标酶序列与其对应序列之间的多重序列比对，用相应位置出现频率最高的氨基酸替换目标酶中与其不一致的氨基酸[29]。将 *An*GOD 的氨基酸序列在 Uniprot 数据库进行 BLAST 检索，获得 250 条蛋白质氨基酸序列，使用 Clustal 进行序列比对，首先选择单个氨基酸出现频率大于 40% 的位点，进一步选出 *An*GOD 序列中与出现频率最高的氨基酸不一致的位点，共获得 58 个位点，其中 10 个位点与 FireProt 2.0 预测位点重复，因此结合两种策略共获得 83 个设计位点，如图 1A 所示。

2.2　优势单点突变体筛选

根据设计的突变位点，构建表达载体及重组菌株，诱导表达纯化获得重组葡萄糖氧化酶。将酶稀释至相同浓度，测定其比酶活。经实验验证，野生型的酶活在 55 ℃ 下的半衰期约为 40 min，因此将其与重组酶在 55 ℃ 下保温 40 min，测定保温前后酶活性，计算残余酶活。结果如图 1A 所示，最终从 83 个突变体中获得 12 个比酶活不低于野生型 90% 且 55 ℃ 处理 40 min 残余酶活高于野生型的优势单点突变体。其中 T30V、T276F、D315K、T389A 为 FireProt 2.0 在线网络服务器设计所获位点，V20Y、S53F、S74T、Q90R、H277F、V541T 为一致性分析所获位点，T34V、V106I 为两种策略重复设计的位点。

由图 1C 可知，突变体 T276F 酶活提高最为明显，达到野生型的 2.1 倍，S74T、T34V、D315K 酶活力为野生型的 1.8~2.0 倍，T30V、S53F、Q90R、T389A 酶活力为野生型的 1.3 倍，V20Y、V106I、H277F、V541T 的酶活未见明显提升。稳定性方面，突变体 S53F 稳定性提高最为明显，能够保持 80% 以上的初始活性。T30V、T34V、S74T、V106I、T276F、H277F、V541T 能够保持 60%~70% 以上的初始活性；V20Y、Q90R、D315K、T389A 热稳定性提升效果不明显。

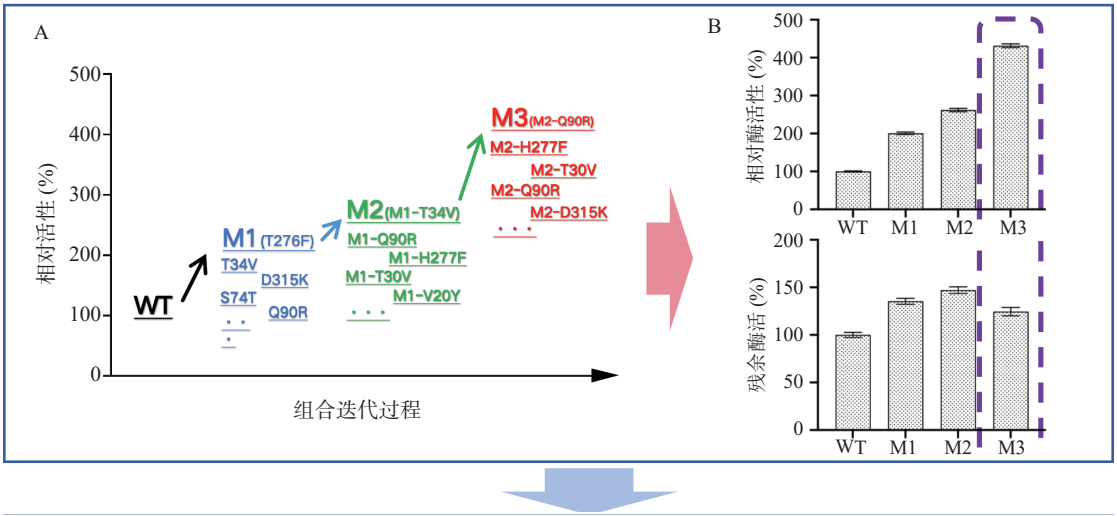
FireProt 2.0 在线设计工具结合了多种计算工具，提供了基于能量、进化及祖先重建三种策略，可设计单点突变体及多点组合突变体，仅需要设计者提供蛋白质序列或三维结构。已有腈水合酶[30]、蔗糖磷酸化酶[31]、羰基还原酶[32]、菊粉蔗糖酶[33] 等多种酶的催化性能通过 FireProt 策略获得了提升。一致性分析是一种基于生物信息学的蛋白质设计方法，它用蛋白质家族中该位置最常出现的氨基酸替换特定的氨基酸，仅依赖于序列信息，可以通过目标酶序列与其对应序列之间的多重序列比对来实现，简单高效[34]。基于一致性分析，超氧物歧化酶[35]、纳豆激酶[36]、腈水解酶[37] 等多种酶的热稳定性与酶活性得以提高。

2.3　组合突变体筛选

在蛋白质工程领域，酶的热稳定性与活性之间的权衡问题是一个巨大的挑战。为同时提高 *An*GOD 的酶活性与热稳定性，分阶段进行组合突变。

第一阶段以酶活性提高为筛选标准，由图 1C 可知，T276F 比酶活为野生型(WT)的 2.1 倍，为比酶活最高的单点优势突变体，同时 55 ℃ 下处理 40 min 残余酶活为 67.3%，因此在 T276F(M1)的基础上叠加其他 11 个单点突变体，获得两位点突变体(图 2A)。结果显示，突变体 M2(T276F/T34V)的比酶活较 M1 进一步提高，为野生型(WT)的 2.6 倍，55 ℃ 处理 40 min 残余酶活进一步提升至 75%(图 2B)。在 M2 的基础上叠加剩余 10 个单点突变体，获得三位点突变体(图 2A)。突变体 M3(T276F/T34V/Q90R)的比酶活为 M2 的 1.7 倍，为 WT 的 4.3 倍，其在 55 ℃ 处理 40 min 残余酶活降至 62.3%，但高于野生型 51.1% 的残余酶活(图 2B)。

第二阶段以热稳定提升且同时保持酶活性基本不变为筛选标准，在 M3 的基础上叠加剩余单点突变体(图 2C)。结果图 2D 所示，突变体 M4(T276F/T34V/Q90R/S53F)55 ℃ 处理 40 min 残余酶活提升至 89.2%，比酶活略有下降，原因可能是 S53F 位点



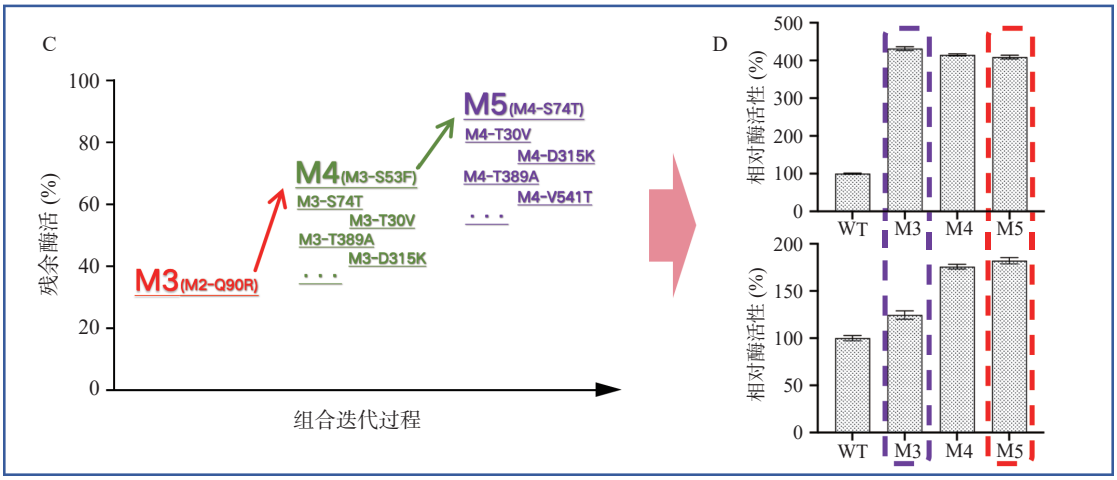


图 2 优势突变体的组合筛选过程

Fig.2 Combinatorial screening process of advantageous mutants

注: A: 组合突变提升 GOD 酶活性; B: 突变体比酶活及热稳定性; C: 组合突变进一步提升 GOD 热稳定性; D: 突变体热稳定性及比酶活。

是热稳定提升最明显的单点突变体, 对 M4 热稳定性贡献较大。在 M4 基础上继续叠加其他单点突变体, 突变体 M5(T276F/T34V/Q90R/S53F/S74T)55 ℃ 处理 40 min 残余酶活提升至 91.0%, 同时比酶活较 M4 略有下降, 为 WT 比酶活的 4.1 倍(图 2D)。

在 M5 的基础上进一步叠加其他单点突变体, 获得的突变体比酶活及热稳定性全部下降, 由此确定最佳突变体为 M5。M5 突变体中仅 T276F 为 FireProt 2.0 所设计位点, T34V、Q90R、S53F、S74T 位点均为序列一致性分析所设计位点。该结果表明, 通过序列一致性分析完成单点突变, 进一步通过简单的迭代组合突变可有效解决蛋白质工程改造过程中热稳定性和酶活性权衡问题, Charoenwongpaiboon 等[33] 通过序列一致性分析获得酶活性与热稳定性同时提升的超氧物歧化酶。

2.4 突变酶与野生型葡萄糖氧化酶酶学性质分析

2.4.1 最适反应温度 在 20~70 ℃ 下测定了 *An*GOD 野生型与突变体的酶活力, 结果如图 3(A)所示, 野生型与突变体 M1~M5 的最适反应温度基本一致, 均为 40 ℃, 与文献 [38] 报道的黑曲霉来源葡萄糖氧化

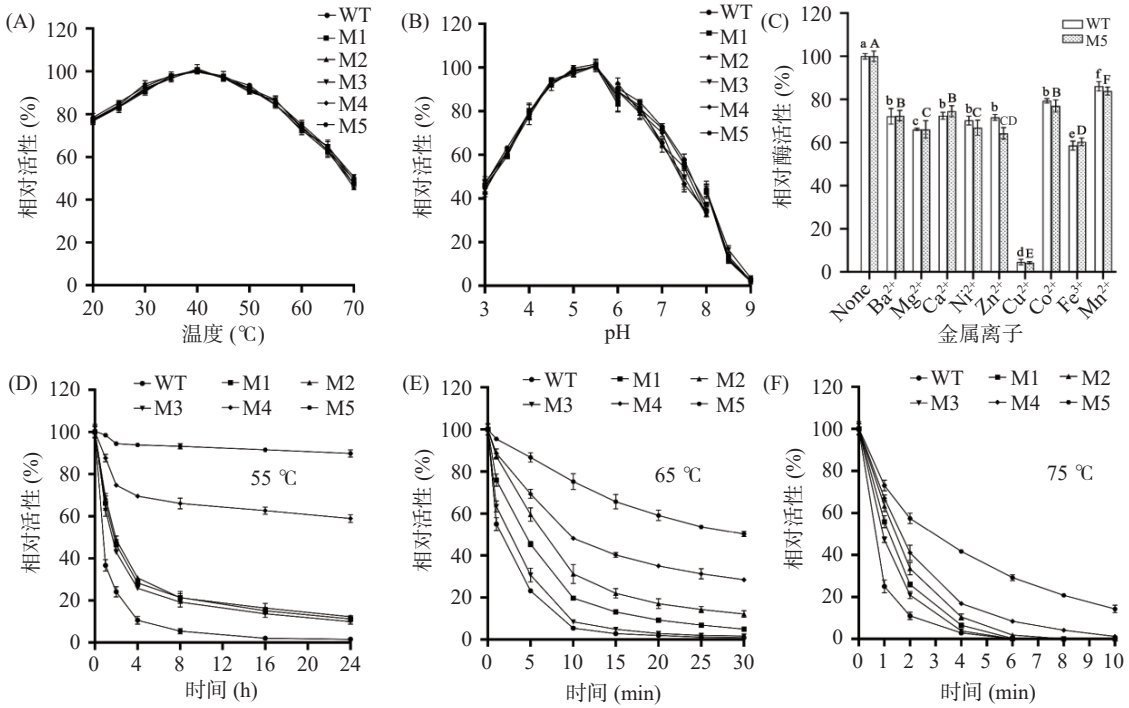


图 3 *An*GOD 野生型及其突变体的最适温度、最适 pH、金属离子依赖性与热稳定性

Fig.3 Optimal temperature, optimal pH, metal ion dependence, and thermostability of *An*GOD wild-type and its mutants

注: A: 最适反应温度; B: 最适反应 pH; C: 金属离子依赖性; D: 55 ℃ 下的热稳定性; E: 65 ℃ 下的热稳定性; F: 75 ℃ 下的热稳定性, 不同上标字母的数值表示差异显著 $P<0.05$。

酶最适温度类似。

2.4.2　最适 pH　在最适温度 40 ℃ 下，测定 *An*GOD 与突变体 M1~M5 在 pH3.0~9.0 条件下酶活力。结果如图 3(B)所示，所有酶均在 pH5.5 时表现出最佳的催化活性，在 pH4.0~6.5 时催化活性保持在 80% 以上，pH 低于 4.0 或高于 6.5，酶活力下降明显，由此可知 GOD 适宜在 pH4.5~6.0 的偏酸性环境下进行催化反应。

2.4.3　金属离子对酶活的影响　测试了 *An*GOD 野生型与突变体 M5 对金属离子的依赖性，结果如图 3(C)。金属离子对突变前后 GOD 的酶活具有普遍的抑制作用，抑制程度基本一致。其中添加 Ba^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}后，相对活性降低至 60%~80%。Cu^{2+}的抑制作用最强，使 GOD 相对活性不足 5%。由此可知，GOD 的催化活性不依赖于上述常见的金属离子。

2.4.4　热稳定性的分析　将野生型和各突变体稀释至相同蛋白浓度后，分别于 55、65、75 ℃ 下保温，在不同时间取样测定残余酶活，结果如图 3(D)~图 3(F)，M1~M5 在以上各温度下的热稳定性均优于野生型，突变体酶的热稳定性排序为 M5>M4>M2>M1>M3。以酶活为筛选标准，WT、M1、M2 的热稳定逐渐提升，比酶活最高的 M3 热稳定性较 M1、M2 明显下降。以热稳定性为筛选标准，在 M3 的基础上叠加 S53F 突变体获得热稳定性大幅提升的 M4，通过进一步叠加 S74T 获得热稳定进一步提升的 M5 突变体。

具体来看，WT 在 55 ℃ 下放置 1 h，残余酶活降至 40% 以下，M1、M2、M3 在 55 ℃ 下的半衰期约为 2 h。在 55 ℃ 放置 24 h，M4、M5 的残余酶活分别达到 60% 与 90%。在 65 ℃ 条件下，WT 的半衰期约为 1 min，M5 的半衰期约为 30 min，较野生型提高了 30 倍。在 75 ℃ 条件下，M5 热稳定远高于 WT 及其他突变体，处理 10 min 残余酶活接近 20%。Zhou 等[39] 通过理性设计与组合突变，获得热稳定提升的葡萄糖氧化酶突变体，其在 55 ℃ 下处理 3 h 残余酶活为 37.5%。Peng 等[40] 筛选尼崎青霉来源的葡萄糖氧化酶，通过计算机辅助设计获得突变体，在 60 ℃ 下的半衰期提升了 2.6 倍。本研究获得的 M5 突变体，在 55 ℃ 放置残余酶活可达 90%，在 65 ℃ 条件下的半衰期较野生型提高了 30 倍。

2.4.5　酶动力学参数　测定了 *An*GOD 野生型与各组合突变体的酶动力学参数，结果如表 1 所示，野生型的 K_m 值为 14.76 mmol/L，各突变体的 K_m 值均略有升高，范围在 20.93~23.47 mmol/L 之间，表明突变体与底物的亲和力略有降低。野生型的 k_{cat} 值为 205.7 s^{-1}，以比酶活为筛选标准获得的 M1、M2、M3 突变体 k_{cat} 值逐渐升高，其中 M3 的 k_{cat} 值为 804.0 s^{-1}，催化效率为 36.30 $L\cdot mmol^{-1}\cdot s^{-1}$，分别为 WT 的 3.90、2.60 倍，为催化效率最高的突变体，但热稳定性显著下降，出现了酶活性与热稳定性权衡问题。进一步以热稳定性为筛选标准，最终获得 M5 突变体，k_{cat} 值为 755.0 s^{-1}，催化效率为 34.52 $L\cdot mmol^{-1}\cdot s^{-1}$，分别为 WT 的 3.67、2.48 倍，仅比 M3 略微下降。

2.5　分子动力学模拟

为探究 *An*GOD 突变体热稳定性与酶活性提高的分子机制，对野生型 *An*GOD 与突变体 M5 进行了分子动力学模拟。首先分析其均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)和均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)值，在 100 ns 的模拟时间内，M5 的 RMSD 均值为 1.25 Å相较于野生型的 1.55 Å降低了 12.9%(图 4A)，说明突变体 M5 的整体分子结构变化程度较小，同时，M5 在非催化区域的 RMSF 均值为 0.404 Å相较于野生型的 0.454 Å 降低了 12.4%(图 4B)，说明 M5 非催化区域的氨基酸波动程度较小，RMSD 与 RMSF 值结果说明 M5 的稳定性增强，与实验结果相符。进一步对酶与底物、辅酶之间的氢键进行了分析，结果如图 4C、图 4D 所示，野生型 *An*GOD 与底物 *β*-D-glucose 的氢键数量平均为 2.9 条，与 FAD 的氢键数量为 9.1 条，M5 与底物 *β*-D-glucose 的氢键数量平均为 3.2 条，与 FAD 的氢键数量为 9.9 条，较野生型分别增加了 10.3% 和 8.8%。氢键是一种较强的非共价相互作用，当酶与底物、辅酶之间形成更多的氢键时，往往预示它们之间亲和力的增强[41]。因此，相比野生型，M5 与底物、辅酶间的亲和力更强，结合更为紧密，从而提升了酶活。

之后对 WT 与 M5 突变结果进行构象分析，如图 4E，野生型中第 74 位的丝氨酸只与第 71 位的异亮氨酸和第 77 位的天冬氨酸间存在氢键，而突变后

表 1　野生型与各突变体的酶动力学参数

Table 1　Enzyme kinetic parameters of wild type and various mutants

酶	突变体	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($L\cdot mmol^{-1}\cdot s^{-1}$)
WT	none	14.76±1.24^{a}	205.75±4.03^{a}	13.94±1.18^{a}
M1	T276F	20.93±1.96^{b}	396.73±9.42^{b}	18.95±0.91^{b}
M2	T276F/T34V	22.67±1.56^{b}	501.39±7.95^{c}	22.11±0.80^{c}
M3	T276F/T34V/Q90R	22.15±1.32^{b}	804.01±10.34^{f}	36.30±1.02^{e}
M4	T276F/T34V/Q90R/S53F	23.47±1.18^{b}	778.93±8.54^{e}	33.16±0.93^{d}
M5	T276F/T34V/Q90R/S53F/S74T	21.87±1.67^{b}	755.06±7.50^{d}	34.52±1.48^{de}

注：同列不同上标字母的数值表示差异显著(P<0.05)。

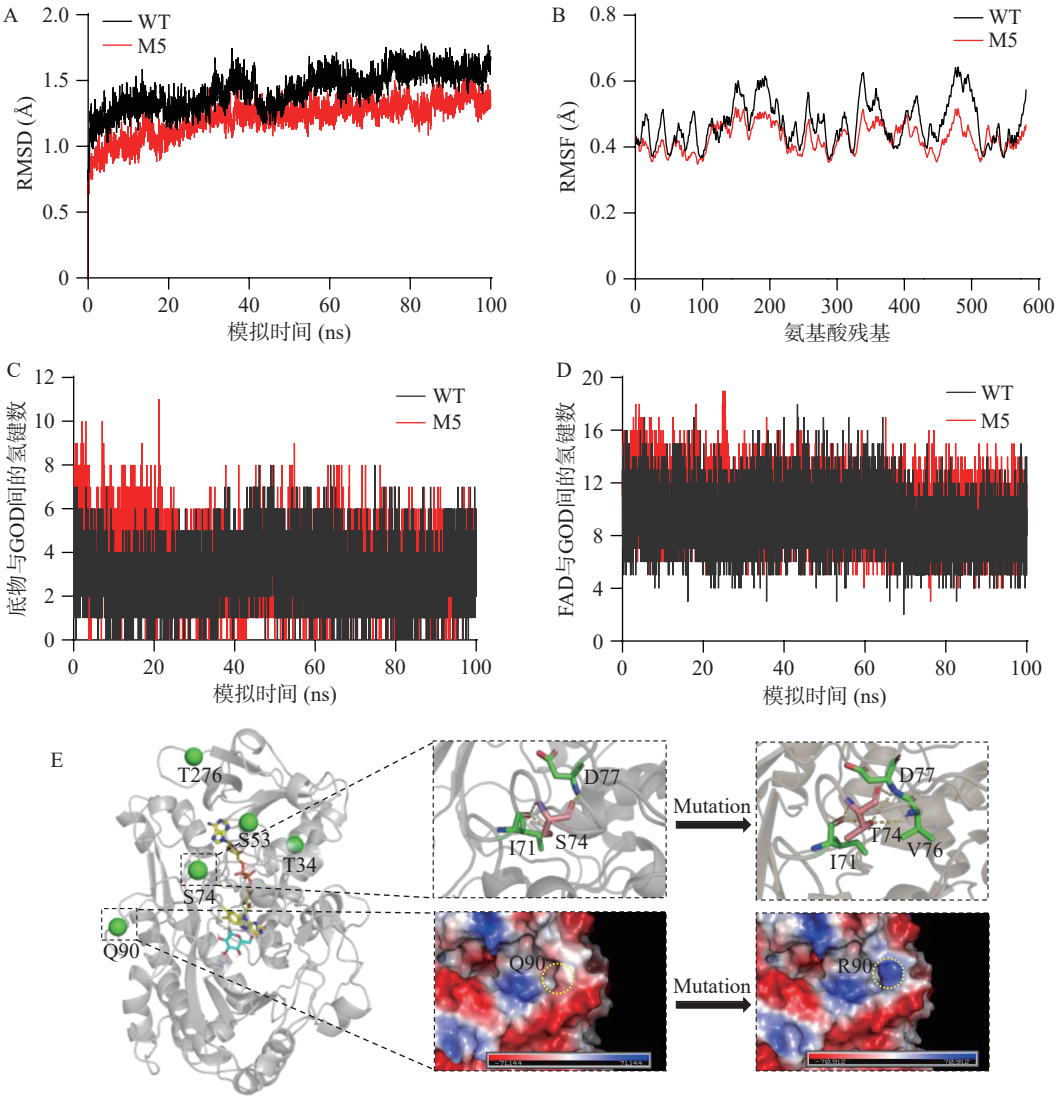


图 4　GOD 的分子动力学模拟与构象分析

Fig.4　Molecular dynamics simulation and visualization of GOD

注: A: WT 和 M5 的 RMSD 值; B: WT 和 M5 的 RMSF 值; C: 底物 Glc 与 GOD 间氢键数量分析; D: 辅酶 FAD 与 GOD 间氢键数量分析; E: WT 与 M5 的氢键变化和表面静电电荷变化; 黄色虚线为氢键, 粉色为第 74 位氨基酸, 绿色为与之有氢键相互作用的氨基酸。

的苏氨酸与第 76 位的缬氨酸间形成了新的氢键, 增强了该区域的稳定性, 而将第 90 位的谷氨酰胺替换为带正电荷的精氨酸, 则增强了该区域的静电相互作用, 提高了 GOD 的热稳定性[40−41]。以上结果表明突变体 M5 实现了刚性与活性的平衡, 同时提升了热稳定性与催化活性, 能够更好的满足了工业用酶需求。

Mu 等[19]利用 FRESCO 计算设计策略结合 FoldX、Rosetta_ddg 和 ABACUS 工具预测稳定突变, 显著缩短实验筛选周期, 获得突变体 AnGOD-m, 其 T_m 值提升 8.5 ℃, 并改善了 pH 耐受性, 实现了葡萄糖到葡萄糖酸 98% 的转化。本研究通过 FireProt、一致性分析等半理性设计实现 AnGOD 活性与热稳定性的协同提升, 解决了传统酶工程中活性与稳定性的矛盾。通过分子动力学模拟, 揭示了 M5 突变体结构波动减少、氢键增加的机制, 为未来酶工程提供了理论基础。未来可借助 FRESCO 计算设计策略, 进一步推动葡萄糖氧化酶的工程化改造。

3　结论

本研究以来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶 *An*GOD 为研究对象, 通过 FireProt 与序列一致性分析设计 83 个突变位点, 筛选获得 12 个酶活性与热稳定性同时提高的单点突变体。在此基础上, 进行两阶段的组合突变。首先, 以酶活性提高为筛选标准进行迭代组合突变, 获得组合突变体 M3(T26F/T34V/Q90R)。进一步, 以热稳定性为筛选标准进行迭代组合突变, 获得组合突变体 M5(T276F/T34V/Q90R/S53F/S74T)。酶学性质研究表明, WT 及各突变体的最适温度均为 40 ℃、最适 pH 均为 5.5、金属离子依赖性基本一致。M3 的催化效率最高, 为 WT 的 4.3 倍, 但热稳定性提升不明显。M5 的比酶活为 WT 的 4.2 倍, k_{cat} 值为 755.0 s^{-1}, 催化效率为 34.52 $L·mmol^{-1}·s^{-1}$, 分别为 WT 的 3.67、2.48 倍。55 ℃ 下处理 24 h 残余酶活高达 90%, 65 ℃ 下的半衰期提升至 WT 的 30 倍。分子动力学模拟显示, 突

变体 M5 的 RMSD 和非催化结构 RMSF 值低于 WT，结构稳定性增强，其与底物、辅酶氢键增多，亲和力提升，特定位置氨基酸突变增强区域稳定性和静电作用，实现热稳定性与催化活性同时提升。

综上，本研究基于半理性设计策略，通过两阶段组合突变，获得了酶活性与热稳定性同时提高的 *An*GOD 突变体 M5，克服了酶改造过程中的稳定性与活性的权衡难题，为葡萄糖氧化酶的进一步应用奠定了基础。尽管本研究成功提高了 AnGOD 的酶活性和热稳定性，但仍存在一些挑战，突变体的酶活与热稳定之间的平衡问题仍然需要进一步优化。未来的研究可以考虑通过更多的计算模拟与实验筛选，进一步挖掘新的突变位点，提升 GOD 的综合性能。与此同时，如何将这些改良的酶应用于更广泛的工业领域，仍是需要解决的重要问题。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] JACOB A B, MONIKA Z, JURAJ M, et al. Glucose oxidase, an enzyme "Ferrari": Its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 472.

[2] WANG Y, CAO X, JIANG S, et al. Engineering the substrate preference of glucose oxidase for the enzymatic oxidation of xylose[J]. Green Chemistry, 2024, 26(8): 4851−4859.

[3] DUBEY M K, ZEHRA A, AAMIR M, et al. Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): Current updates[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1032.

[4] ANDREA P S, MARTA G, GIOVANNA B M, et al. Glucose biosensors in clinical practice: principles, limits and perspectives of currently used devices[J]. Theranostics, 2022, 12(2): 493−511.

[5] ZHANG Y, CHEN J, WANG H, et al. Electrochemical biosensor based on copper sulfide/reduced graphene oxide/glucose oxidase construct for glucose detection[J]. Analytical Biochemistry, 2024, 696: 115696.

[6] WANG M, WANG D, CHEN Q, et al. Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for tumor therapy[J]. Small, 2019, 15(51): 1903895.

[7] LIAO Y, ZHANG Z, ZHAO Y, et al. Glucose oxidase: An emerging multidimensional treatment option for diabetic wound healing[J]. Bioactive Materials, 2025, 44: 131−151.

[8] WANG W, XIE R, CAO Q, et al. Effects of glucose oxidase on growth performance, clinical symptoms, serum parameters, and intestinal health in piglets challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 994151.

[9] WANG Y, WANG B, ZHAN X, et al. Effects of glucose oxidase and its combination with *B. amyloliquefaciens* SC06 on intestinal microbiota, immune response and antioxidative capacity in broilers[J]. Animal: an International Journal of Animal Bioscience, 2022, 16(3): 100473.

[10] TOMOTANI E J, DAS NEVES L C M, VITOLO M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in a membrane bioreactor[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005, 121: 149−162.

[11] KHATAMI S H, VAKILI O, AHMADI N, et al. Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022, 69(3): 939−950.

[12] LI C B, YANG X Y, LANG Y J, et al. Effect of artificially designed short peptide addition strategy on glucose oxidase activity[J]. Process Biochemistry, 2023, 134.

[13] FATEMEH K D, FARSHAD D, MEHROUZ D, et al. Expression and characterization of glucose oxidase from *Aspergillus niger* in yarrowia lipolytica[J]. Molecular Biotechnology, 2017, 59(8): 341−350.

[14] QIU Z, GUO Y, BAO X, et al. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016, 30(5): 998−1005.

[15] BELYAD F, KARKHANEI A A, RAHEB J. Expression, characterization and one step purification of heterologous glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 9029 in *Pichia pastoris*[J]. EuPA Open Proteomics, 2018, 19: 1−5.

[16] YU S, MIAO L, HUANG H, et al. High-level production of glucose oxidase in *Pichia pastoris*: Effects of Hac1p overexpression on cell physiology and enzyme expression[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109671.

[17] TU T, WANG Y, HUANG H, et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution[J]. Food Chemistry, 2019, 281: 163−170.

[18] NING X, ZHANG Y, YUAN T, et al. Enhanced thermostability of glucose oxidase through computer-aided molecular design[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 425.

[19] MU Q, CUI Y, TIAN Y, et al. Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* for efficient gluconic acid production via computational design[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 1060−1068.

[20] MARÍN-NAVARRO J, ROUPAIN N, TALENS-PERALES D, et al. Identification and structural analysis of amino acid substitutions that increase the stability and activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase[J]. PLoS one, 2017, 10(12): e0144289.

[21] GHAHREMANI N N, ABD R R N Z R, MOHD Y N, et al. Recent advances in simultaneous thermostability-activity improvement of industrial enzymes through structure modification[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 232: 123440.

[22] CREGG J M, HIGGINS D R. *Pichia protocols*[M]. New Jersey: Humana Press, 2007.

[23] MILOS M, ANDREJ J, JANA H, et al. FireProt 2.0: web-based platform for the fully automated design of thermostable proteins[J]. Briefings in Bioinformatics, 2023, 25(1): 1−10.

[24] 聂金梅, 李阳源, 刘金山, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因改造及其在毕赤酵母中的表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 17−21. [NIE Jinmei, LI Yangyuan, LIU Jinshan, et al. Genetic modification of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene and its expression in *Pichia pastoris*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(20): 17−21.]

[25] 周利伟, 郜赵伟, 张宇宏, 等. 重组葡萄糖氧化酶毕赤酵母高产菌株的高通量快速筛选方法[J]. 中国农学通报, 2012, 28(21): 183−188. [ZHOU Liwei, GAO Zhaowei, ZHANG Yuhong, et al. A rapid and high throughput method for screening *Pichia pastoris*

with recombinant glucose oxidase[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(21): 183−188.]
[26] 郭周航. 葡萄糖氧化酶和 β-D-葡萄糖作用机制的分子动力学研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017. [GUO Zhouhang. Molecular dynamics investigation on the action mechanism of glucose oxidase with β-D-glucose[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.]
[27] ASAAD K, MOHNAD A, MARIA S, et al. Sarcorucinine-D inhibits cholinesterases and calcium channels: Molecular dynamics simulation and *in vitro* mechanistic investigations[J]. Molecules, 2022, 27(11): 3361.
[28] MILOS M, JAN S, JAROSLAV B, et al. FireProt: web server for automated design of thermostable proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W393−W399.
[29] QIAN H, ZHANG C, LU Z, et al. Consensus design for improved thermostability of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 57.
[30] CHENG Z, LAN Y, GUO J, et al. Computational design of nitrile hydratase from pseudonocardia thermophila JCM3095 for improved thermostability[J]. Molecules, 2020, 25(20): 4806.
[31] XIA Y, LI X, YANG L, et al. Development of thermostable sucrose phosphorylase by semi-rational design for efficient biosynthesis of alpha-D-glucosylglycerol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(19): 7309−7319.
[32] LIU H T, WENG C Y, XU S Y, et al. Directed evolution of a carbonyl reductase LsCR for the enantioselective synthesis of (1S)-2-chloro-1-(3,4-difluorophenyl) ethanol[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 127: 105991.
[33] CHAROENWONGPAIBOON T, WANGPAIBOON K, PUANGPATHANACHAI M, et al. Energy- and evolution-based design of inulosucrase for enhanced thermostability and inulin production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(22): 6831−6843.
[34] STERNKE M, TRIPP K W, BARRICK D. Consensus sequence design as a general strategy to create hyperstable, biologically active proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(23): 11275−11284.
[35] ZHAO Y, CHEN K, YANG H, et al. Semirational design based on consensus sequences to balance the enzyme activity-stability trade-off[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(12): 6454−6462.
[36] LUO J, SONG C, CUI W, et al. Counteraction of stability-activity trade-off of nattokinase through flexible region shifting[J]. Food Chemistry, 2023, 423: 136241.
[37] XIONG N, LÜ P J, SONG J W, et al. Engineering of a nitrilase through consensus sequence analysis and conserved site substitution to improve its thermostability and activity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 184: 108475.
[38] 郝小静, 苑明雪, 赵兵欣, 等. 葡萄糖氧化酶的研究与应用进展[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(12): 218−224. [HAO Xiaojing, WAN Mingyue, ZHAO Bingxin, et al. Progress in development and application of glucose oxidase[J]. Journal of Food Research and Development, 2024, 45(12): 218−224.]
[39] ZHOU H, ZHENG P, CHEN P C, et al. Enhanced thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase in *Pichia pastoris* [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 2(2): 1−9.
[40] PENG Y, ZHU X, HE X, et al. Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* for efficient antimicrobial performance through computer-aided molecular design[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 284(P1): 137932.
[41] DANISH I, SALMAN K M, MOHD W, et al. Exploring the binding pattern of geraniol with acetylcholinesterase through *in silico* docking, molecular dynamics simulation, and *in vitro* enzyme inhibition kinetics studies[J]. Cells, 2021, 10(12): 3533.