孙晓瑄, 张瑞婕, 孙雯, 等. 重组微小囊担子菌氨肽酶 DmpA 高效催化生产 L-肌肽 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 226−235. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010059

SUN Xiaoxuan, ZHANG Ruijie, SUN Wen, et al. Recombinant *Cystobasidium minutum* Aminopeptidase DmpA Efficiently Catalyzes the Production of L-Carnosine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 226−235. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010059

·生物工程·

重组微小囊担子菌氨肽酶 DmpA 高效催化生产 L-肌肽

孙晓瑄[1,2], 张瑞婕[2], 孙　雯[1,2], 陈凌宇[1,2], 朱显峰[1,*], 张保国[2,*]

（1.河南大学生命科学学院, 微生物研究所, 河南 开封 475004;
2.中国科学院上海高等研究院, 上海 201210）

摘　要: 本实验研究了一种来自微小囊担子菌 MCA4210（*Cystobasidium minutum* MCA 4210）的氨肽酶基因 *dmpA* 催化合成 L-肌肽的能力，构建基因工程菌株，以 L-组氨酸和 *β*-丙氨酸甲酯盐酸盐为底物催化合成 L-肌肽，旨在提高 L-肌肽的合成效率。将 *Cystobasidium minutum* MCA 4210 来源的 DmpA 经密码子优化后在大肠杆菌 BL21(DE3)（*Escherichia coli* BL21(DE3)）中异源表达，并通过与麦芽糖结合蛋白（Maltose Binding Protein, MBP）进行融合表达提高目的蛋白可溶性表达和粗酶活性，构建重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA，对重组菌株进行诱导表达条件和转化条件的探究。结果表明，实验成功将目的基因片段与 MBP 相连得到重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA，经诱导条件优化粗酶活达到了 145 U；经转化条件优化 L-肌肽产量高达 55.72 g/L，产率达 54.54%。本研究将具有 L-肌肽合成功能的 *Cystobasidium minutum* MCA 4210 来源的 DmpA 在大肠杆菌中异源表达，通过添加助溶标签和条件优化实现了 L-肌肽的高效生产，所得 L-肌肽的产量为目前报道最高，为基因工程菌工业化生产 L-肌肽提供了实验基础，具有良好的应用前景。

关键词: 氨肽酶 DmpA, L-肌肽, 麦芽糖结合蛋白, 异源表达, 酶催化转化

中图分类号: Q814.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0226−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010059　　本文网刊:

Recombinant *Cystobasidium minutum* Aminopeptidase DmpA Efficiently Catalyzes the Production of L-Carnosine

SUN Xiaoxuan[1,2], ZHANG Ruijie[2], SUN Wen[1,2], CHEN Lingyu[1,2], ZHU Xianfeng[1,*], ZHANG Baoguo[2,*]

（1.Institute of Microbial Engineering, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China;
2.Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China）

Abstract: This experiment investigated the ability of an aminopeptidase gene *dmpA* from microcyst basidiomycete MCA 4210 (*Cystobasidium minutum* MCA 4210) to catalyze the synthesis of L-carnosine, and constructed a genetically engineered strain to catalyze the synthesis of L-carnosine with L-histidine and *β*-alanine methyl ester hydrochloride as substrates, aiming to improve the synthesis efficiency of L-carnosine. Codon-optimized DmpA was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and adding a maltose binding protein (MBP) tag further improved solubility and enzyme activity, yielding BL21 (DE3)-MBP-DmpA. Then the recombinant strain BL21(DE3)-MBP-DmpA was further investigated to optimize induced expression and transformation conditions. The results indicated that the target gene fragment was successfully fused with MBP, yielding the recombinant strain BL21(DE3)-MBP-DmpA. After optimization of the induction conditions, the crude enzyme activity reached 145 U. Through optimization of the transformation conditions, the L-

收稿日期: 2025−01−09

基金项目: 福建省中科院 STS 重大项目（2022T3004）。

作者简介: 孙晓瑄（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品和药用微生物, E-mail: sxxnn630@163.com。

*** 通信作者:** 朱显峰（1973−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品和药用微生物, E-mail: zhuxf73@163.com。

张保国（1977−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物代谢与调控, E-mail: zhangbg@sari.ac.cn。

carnosine production reached as high as 55.72 g/L, with a yield of 54.54%. This study successfully expressed DmpA from *Cystobasidium minutum* MCA 4210 in *E. coli*, demonstrating its L-carnosine synthesis capability. The MBP tag and condition optimizations significantly improved production, achieving the highest L-carnosine yield reported to date. These findings provided a strong foundation for industrial-scale L-carnosine production using genetically engineered bacteria and highlighted promising application potential.

Key words: aminopeptidase DmpA; L-carnosine; maltose binding protein; heterologous expression; enzymatic catalytic conversion

L-肌肽(L-Carnosine, L-Car)是由 L-组氨酸和 *β*-丙氨酸两种氨基酸组成的二肽, 在动物体内可以合成, 它最早由 Gulewitsch 和 Amiradzibi 于 1900 年在鉴定牛肉组织时发现[1], 是目前为止发现广泛存在的活性肽之一。自该活性肽发现以来, 已有大量的研究证明其有多种生物学功能。L-肌肽能够中和体内的活性氧分子, 从而减少氧化应激对细胞结构和功能的损害[2], 延缓细胞衰老[3]、调节细胞内 pH 稳态辅助肿瘤治疗[4]。因其具有强大的抗氧化性能, 被用作天然抗氧化剂添加到食品中, 以延长食品保质期并保持食品的新鲜度。L-肌肽具有多种健康益处, 如增强免疫力、抗炎[5]、缓解糖尿病并发症[6]、治疗心血管疾病[7] 等, 因此常被添加到营养补充品、运动饮料和保健品中。且由于其具有丰富的生理活性, L-肌肽的应用和合成研究备受关注。

目前, 国内外 L-肌肽的合成方法分为化学合成法和生物合成法。化学合成法工艺较为复杂[8−9], 但依然是目前工业生产最为常用的方法, 如邻苯二甲酸酐法[10] 和混合酸酐法[11], 具有副产物多, 溶剂消耗较大, 环境污染严重等缺点。L-肌肽的生物合成主要为酶催化法, 酶法相较于传统的化学合成方法, 具有反应条件温和、产物纯度高、收率高、环境污染小等优点。目前, 已有多种生物酶被用于 L-肌肽的合成, 如 L-氨基酸连接酶[12]、二肽水解酶[13] 和氨肽酶[14] 等。2018 年, Kino 等[15] 在枯草芽孢杆菌中发现 L-氨基酸连接酶可以用于 L-肌肽的合成, 但反应需要等摩尔量 ATP 参与, 成本较高。Yin 等[16] 通过基因组挖掘获得来自粘质沙雷氏菌的二肽水解酶 *Sm*PepD, 经优化后的酶可以催化得到 L-肌肽 15.20 g/L; Zhang 等[17] 对产气荚膜梭菌二肽酶基因 *CpPepD* 进行突变, 获得了合成活性提高 2.2 倍的突变体, 在底物浓度为 6 mol/L *β*-丙氨酸和 0.2 mol/L L-组氨酸时, 生产 15.16 g/L L-肌肽。研究报道微生物氨肽酶具有催化合成 L-肌肽的功能[18], 例如, Jan 等[19] 在大肠杆菌中过表达来自 *Ochrobactrum anthropi* 的 DmpA 和来自 *Sphingosinicella xenopeptidilytica* 的 BapA 氨肽酶, 得到 L-肌肽 3.70 g/L, 产率高达 71%; She 等[20] 通过深海沉积物宏基因组筛选得到一种合成 L-肌肽的新型氨肽酶, 合成了 2.26 g/L L-肌肽; Xing 等[21] 基于定点突变提高了 *β*-酯酰基转移酶(作为 DmpA)合成 L-肌肽的底物特异性, 当 L-组氨酸和 *β*-丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度分别为 140 mmol/L 和 210 mmol/L 时, L-肌肽的浓度达到 23.75 g/L; 郭宝松等[22] 也从鄄县豆瓣中分离获得了一株高产氨肽酶菌株 *B. subtilis* LBJ4-5, 经发酵后酶活达到 179.23 U/mL。氨肽酶是一类能从蛋白质和多肽 N 端选择性切除氨基酸残基产生游离氨基酸的外切蛋白酶[23], 绝大部分属于碱性氨肽酶[24]。微生物氨肽酶可以应用于氨基酸和多肽的合成[25], *β*-氨肽酶[26] 具有催化水解 *β*-肽和 *α*, *β* 混合肽的功能, 还可以催化逆向反应生成肽类, 在动力学控制[27] 下 L-肌肽可以由 *β*-氨肽酶逆向催化合成, 图 1 为氨肽酶催化合成 L-肌肽的反应式。

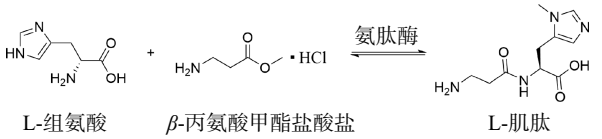


图 1　氨肽酶催化合成 L-肌肽

Fig.1　Aminopeptidase catalyzes the synthesis of L-Car

氨肽酶相较于其他酶具有反应条件更温和、处理多样化的肽链更灵活等优势, 且生物界广泛存在, 来源丰富, 通过筛选比较不同来源的氨肽酶发现, 来源于 *Cystobasidium minutum* MCA4210 的氨肽酶 DmpA 可以在异源系统中高效表达, 且通过初步实验表明, 该来源的氨肽酶在特定条件下表现出更高的催化效率。鉴于此, 本研究将来源于 *Cystobasidium minutum* MCA4210 的氨肽酶 DmpA 在 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达, 构建重组菌株 BL21(DE3)-DmpA。但许多重组蛋白在大肠杆菌表达系统中容易形成不溶性的包涵体, 除了改变诱导条件还可以通过添加助溶标签来改善这一问题, 麦芽糖结合蛋白(MBP)能够显著提高目标蛋白的溶解性, 因为它自身具有高度可溶的特点, 并且可以促进目标蛋白正确折叠, 从而可能增加酶的活性。其机制包括提供结构稳定性、屏蔽疏水区域以及促进有利的分子伴侣交互, 这些都有助于维持或增强蛋白质的功能状态[28]。因此为进一步提高蛋白表达水平和粗酶活, 本研究将 MBP 与目的蛋白融合表达, 构建重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA, 利用 SDS-PAGE 检验蛋白表达情况, 并以 L-组氨酸和 *β*-丙氨酸甲酯盐酸盐作为底物, 用粗酶液进行催化转化反应, 对重组菌株的诱导条件和转化条件进行探究, 以期提高 L-肌肽的产量和产率。本研究首次利用微小囊担子菌来源的氨肽

酶催化合成 L-肌肽，旨在为开发更多具有 L-肌肽合成功能的酶资源提供参考，通过蛋白融合表达有效提高酶的活性，为构建稳定高效生产 L-肌肽的重组菌株提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 DH5α 感受态、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态、同源重组试剂盒、高保真酶 2×Phanta Max Master Mix、2×Flash Hot Start Master Mix 诺唯赞生物科技(南京)股份有限公司；pET28a 质粒、含 MBP 标签的 pET28a 质粒 实验室保存；限制性核酸快切酶 Q.Cut EcoR Ⅰ(酶活为 10~20 U/μL)、Q.Cut Hind Ⅲ(酶活为 10~20 U/μL)、10×Q.Cut Buffer、DNA Marker 5000 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒、PCR 产物清洁试剂盒 康宁生命科学(吴江)有限公司；SDS-PAGE 试剂盒、Protein Marker10~18 kDa、50×TAE Buffer、琼脂糖、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 生工(生物)上海有限公司；甘油、十二水磷酸氢二钠、氯化铵、七水硫酸镁、氯化钠、氯化锌、乙酸、甲醇 上海泰坦科技股份有限公司；磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水硫酸钠、β-丙氨酸甲酯盐酸盐、硫酸卡那霉素 上海麦克林生化科技有限公司；L-组氨酸、氯化镁、氯化钙、氯化锰、三氯化铁 阿达玛斯试剂有限公司；L-肌肽标准品 上海源叶生物科技有限公司；考马斯亮蓝快速染料 擎科生物科技有限公司。LB 培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母粉 5 g/L，氯化钠 10 g/L，固体培养基在此基础上加入琼脂粉 15 g/L。发酵培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母粉 5 g/L，甘油 10 mL/L，十二水磷酸氢二钠 17.9 g/L，磷酸二氢钾 6.8 g/L，氯化铵 5.3 g/L，无水硫酸钠 1.4 g/L，七水硫酸镁 1 g/L，消泡剂 0.5 mL/L。

H1750R 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；DK-8D 型三孔电热恒温水浴锅 上海飞域实业国际贸易有限公司；EPS-100 核酸电泳仪 上海天能科技有限公司；GET3XG 基因扩增仪 杭州柏恒科技有限公司；LC-20A 高效液相色谱仪 Shimadzu(日本)公司；MLS-3780 高压蒸汽灭菌器 SANYO(日本)公司；ZQZY-78BES 振荡培养箱、ZCPS-600 细胞超声破碎仪 上海知楚仪器有限公司；InertSustain NH_2 5 μm 液相色谱柱(4.6 I.D.×250 mm) 技尔(上海)商贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微小囊担子菌来源的 DmpA 氨肽酶基因的获得 本实验委托上海生工生物工程有限公司对来自微小囊担子菌 MCA4210(*Cystobasidium minutum* MCA4210)的氨肽酶基因 *dmpA* 的氨基酸序列(GeneBank：XP_066821481.1)根据大肠杆菌偏好性进行目的基因密码子优化，并构建到 PUC57 质粒上得到克隆载体 PUC57-DmpA。

1.2.2 重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的构建 以质粒 pET28a 作为表达载体，用限制性快切酶 EcoR I 和 Hind Ⅲ双酶切质粒，酶切体系如下：质粒 pET28a 2 μL，酶切缓冲液 2 μL，限制性快切酶 EcoR I 和 Hind Ⅲ各 1 μL，无菌水 14 μL，将上述酶切体系放入 37 ℃ 水浴中酶切 1 h，用 AxyPrep PCRTM 清洁试剂盒对上述酶切产物进行纯化回收。在基因 *dmpA* 的 5'和 3'分别设计带有载体 pET28a 同源臂 15 bp 和酶切位点 EcoR I 和 Hind Ⅲ的引物 DmpA-F、DmpA-R，以公司合成的菌株 BL21(DE3)-PUC57-DmpA 为模板，扩增 *dmpA* 基因，PCR 扩增体系见表 1，扩增程序见表 2，引物序列见表 3。

表 1 PCR 扩增体系

Table 1 PCR amplification system

试剂	体积(μL)
模板	1
DmpA-F	1
DmpA-R	1
2×Phanta Master Mix	10
dd H_2O	Up to 20

表 2 PCR 扩增程序

Table 2 PCR amplification procedure

程序	时间	循环数
预变性95 ℃	5 min	1
变性95 ℃	15 s	30
退火55 ℃	15 s	30
延伸72 ℃	1 min 20 s	30
终延伸72 ℃	5 min	1
16 ℃	∞	1

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	大小(bp)
DmpA-F	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTATGGAACGTAAACGTATCCGCG	43
DmpA-R	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCTTAGTAAGCATGGCGGGTCACG	43
PD-F	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTT	22
PD-R	GCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAAT	26
MD-F	GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTA	22
MD-R	CCTCAAGACCCGTTTAGAGGCC	22

注：酶切位点用下划线表示。

PCR 产物进行纯化回收后和线性化载体 pET28a 通过无缝克隆连接，无缝克隆反应体系如下：纯化后的 PCR 片段 20~200 ng，线性化载体 pET28a 50~200 ng，5×CE Ⅱ Buffer 4 μL，Exnase Ⅱ 2 μL，ddH_2O 加至终体积 20 μL，将体系混匀后置于 37 ℃ 精确反应 30 min，然后置于冰上终止反应，得到重组质粒 pET28a-DmpA。取重组质粒 10 μL 加入 100 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态中，于冰上放置 30 min，42 ℃ 水浴 90 s，再于冰上放置 5 min，加

入 500 μL LB 培养基，37 ℃，200 r/min 恢复培养 45 min，8000 r/min，25 ℃ 离心 1 min 去上清，涂布于含 25 μg/mL 含卡那霉素的 LB 抗性平板上，37 ℃ 过夜培养。

得到重组质粒 pET28a-DmpA 后，在目的基因 *dmpA* 前后 150 bp 处分别设计验证引物 PD-F、PD-R，引物序列见表 3，挑取上述步骤所得大肠杆菌单菌落作为模板，进行菌落 PCR，PCR 体系见表 4，程序见表 5，验证目的基因片段与质粒连接情况，并送至上海杰李生物技术有限公司测序。

表 4　菌落 PCR 体系
Table 4　Colony PCR system

试剂	体积
单菌落	牙签挑取涂于PCR管壁
PD-F	1 μL
PD-R	1 μL
2×Flash Hot Start Master Mix	10 μL
dd H_2O	Up to 20 μL

表 5　菌落 PCR 程序
Table 5　Colony PCR procedure

程序	时间	循环数
预变性95 ℃	5 min	1
变性95 ℃	15 s	30
退火55 ℃	15 s	30
延伸72 ℃	2 min	30
终延伸72 ℃	5 min	1
16 ℃	∞	1

挑取测序正确的单菌落，在 LB 培养基中 37 ℃ 过夜培养，用质粒提取试剂盒提取 pET28a-DmpA 质粒，取质粒 10 μL 加入 100 μL *E. coli* BL21(DE3)感受态中，热激转化，涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板上过夜培养。挑取单菌落进行验证及测序，构建好的重组菌株命名为 BL21(DE3)-DmpA。

将目的基因按照上述无缝克隆的方法与含有 MBP 助溶标签的 pET28a 质粒相连，分别在目的基因前后约 150 bp 处设计引物 MD-F、MD-R 验证并测序，PCR 反应体系同表 4，反应程序同表 5，引物序列见表 3，构建好的重组菌株命名为 BL21(DE3)-MBP-DmpA。

1.2.3　重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的生长情况测定　参照刘帆[29] 的方法，从甘油管中分别蘸取重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 划线至含卡那霉素抗性的 LB 固体平板上，37 ℃ 过夜培养；挑取单菌落接种至 4 mL 抗性 LB 液体培养基中，于 37 ℃，200 r/min 培养 12 h，得到一级种子液；按体积分数 1% 的接种量将两重组菌分别接种至发酵培养基中，37 ℃，200 r/min 培养，接种后开始测定两重组菌的生长曲线，在发酵的前 2 h，每隔 20 min取一次样测定 OD_{600} 处的吸光值，2 h 后，每隔 1 h 取一次样测定 OD_{600}，取至 16 h，比较两重组菌的生长情况。

1.2.4　两重组菌的诱导表达及 SDS-PAGE 检测　按体积分数 1% 的接种量将重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 分别接种至发酵培养基中，37 ℃，200 r/min 培养至 OD_{600}=3.8~4.0，降温至 25 ℃，添加终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG，25 ℃，200 r/min 诱导 12 h，8000 r/min，4 ℃ 离心 10 min 收集菌体，用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液清洗菌体 2 遍。

湿菌体按终浓度 100 g/L 用 50 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 重悬菌体，在冰水浴条件下进行超声波破碎，超声参数为：超声 4 s，间隔 5 s，功率为 150 W，共进行 15 min，破碎液 12000 r/min，4 ℃ 离心处理 30 min，所得上清即为粗酶液。沉淀用 Tris-HCl 重悬，分别吸取 40 μL 破碎前的全细胞、上清液和沉淀与 10 μL 5×蛋白上样缓冲液混合后 100 ℃ 加热 10 min，每孔添加 5 μL 样品到蛋白胶上样孔中。电泳条件为 160 V 电泳 45 min。电泳结束后使用考马斯亮蓝溶液染色 1 h，随后使用脱色液进行过夜脱色处理。

1.2.5　粗酶转化合成 L-肌肽的反应体系和粗酶活测定　按照 1.2.4 的方法制备粗酶液，转化反应体系为 10 mL：L-组氨酸 0.5 g，*β*-丙氨酸甲酯盐酸盐 1.0 g，9 mL 粗酶液，并用纯水定容至 10 mL，在 pH8.0，20 ℃，150 r/min 条件下反应 10 min，滴加2 mol/L HCl 终止反应。转化产物离心取上清液，用流动相稀释制成待测样品：转化产物 12000 r/min 离心 5 min，取上清液 10 μL，加入流动相 A 171.5 μL，流动相 B 318.5 μL 混合均匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤处理。HPLC 进行检测，酶活定义为：每分钟生成1 μmol L-肌肽定义为一个酶活单位(U)，酶活计算公式为：

$$U = \frac{c \times V}{T}$$

式中：U 为酶活力(μmol/min)，c 为产物 L-肌肽的浓度(μmol/mL)，V 为反应总体积(mL)，T 为反应时间(min)。

1.2.6　重组菌 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的诱导表达条件优化　在大肠杆菌的诱导表达过程中，有多种条件会影响酶的表达，选取不同的诱导剂添加时间(1、2、3、4、5、6 h)添加 0.2 mmol/L IPTG，25 ℃ 诱导 12 h；不同诱导温度(16、20、25、30、37 ℃)，在最优的添加时间加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导 12 h；不同诱导剂浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)，在最优添加时间和最适温度下加入诱导剂诱导 12 h；诱导时间(8、12、16、20、24、28 h)，在以上三个最优条件下进行诱导。测定粗酶活，选取最优诱导条件。

1.2.7　重组菌 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的转化条件优化　以最优诱导条件对 BL21(DE3)-MBP-DmpA 诱导表达得到粗酶液，反应体系 10 mL，选取不同转

化温度(10、15、20、25、30、35 ℃),添加 L-组氨酸 0.5 g、β-丙氨酸甲酯盐酸盐 1.0 g,粗酶液 9 mL,纯水定容至 10 mL,用氨水调 pH8.0 进行转化反应;不同 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0),在最适温度条件下进行转化;添加不同金属离子(Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}),以不添加金属离子的反应体系作为对照,终浓度均为 1 mmol/L,在最适温度和 pH 环境下反应;在确定最适温度、pH 后,改变 L-组氨酸和 β-丙氨酸甲酯盐酸盐的投料量(g)(L-组氨酸:β-丙氨酸甲酯盐酸盐=0.2∶0.4、0.4∶0.4、0.5∶0.5、0.5∶1.0、0.6∶1.0、0.7∶1.0、0.8∶1.0)进行探究。

1.2.8 L-肌肽含量的测定 高效液相色谱条件:色谱柱:InertSustain NH_2 柱,进样量 20 μL,流速为 0.7 mL/min,柱温 35 ℃,紫外检测波长为 215 nm。流动相 A:50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液,磷酸调 pH4.0,抽滤并超声脱气,流动相 B:乙腈(A∶B=35∶65)。

L-肌肽标准曲线:L-肌肽标准曲线线性回归方程为 y=49461x+320278,相关系数 R^2=0.9993,x 为 L-肌肽的浓度,y 为测得峰面积,标准曲线线性回归方程的相关系数大于 0.999。

反应样品经 HPLC 检测,由所得 L-肌肽峰面积代入 L-肌肽标曲中计算产量;以 L-组氨酸的投量为标准计算 L-肌肽的产率,产率计算公式如下:

$$产率(\%)=\frac{c_{L-肌肽产量}\times M_{L-组氨酸}}{c_{L-组氨酸投量}\times M_{L-肌肽}}\times 100$$

式中:$c_{L-肌肽产量}$为产物 L-肌肽的浓度(g/L);$M_{L-组氨酸}$为 L-组氨酸的相对分子质量;$c_{L-组氨酸投量}$为底物 L-组氨酸的投料浓度(g/L);$M_{L-肌肽}$为 L-肌肽的相对分子质量。

1.3 数据处理

每组实验进行三次重复实验,采用 Excel 2021 进行数据统计,选择线性相关较高的数据,即 R^2 在 0.99~0.999 之间,SPSS 进行显著性分析,数据绘图采用 Origin 2024 软件,质粒绘图采用 SnapGene 和 Adobe Illustrator CS5 软件。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的构建

重组质粒 pET28a-DmpA 和 pET28a-MBP-DmpA 的结构如图 2 所示,扩增出的 *DmpA* 基因片段条带大小约为 1100 bp,与目的基因 1152 bp 大小吻合,证明扩增正确;双酶切 pET28a 质粒和目的基因同源重组后,挑取多个单克隆菌落进行 PCR 验证,均扩增出约为 1452 bp 的条带,且测序结果正确无突变,证明重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 构建成功,结果见图 3(a)。*dmpA* 目的基因插入到 pET28a-MBP 质粒后进行验证,核酸胶条带大小在 1500 bp 附近,与预期大小 1452 bp 符合,且测序结果均正确,证明重组菌 BL21(DE3)-MBP-DmpA 构建成功,结果见图 3(b)。

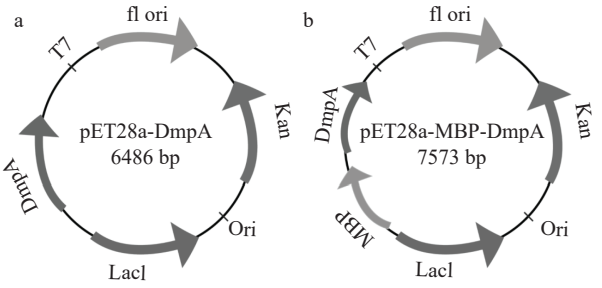


图 2 质粒 pET28a-DmpA(a)和质粒 pET28a-MBP-DmpA(b)结构示意图

Fig.2 Structure diagram of plasmid pET28a-DmpA (a) and pET28a-MBP-DmpA (b)

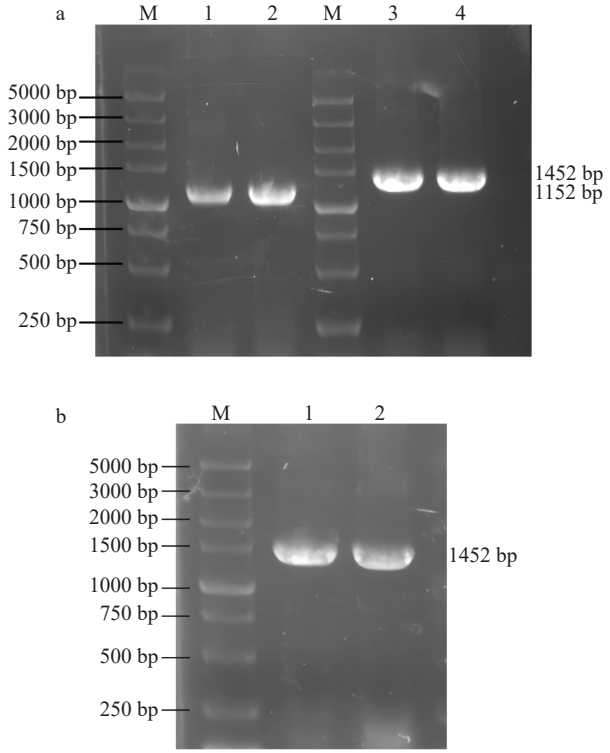


图 3 目的基因 PCR、BL21(DE3)-DmpA 菌重组验证(a)和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 菌重组验证(b)

Fig.3 PCR of target gene and BL21(DE3)-DmpA bacteria recombination verification (a) and BL21(DE3)-MBP-DmpA bacteria recombination verification (b)

注:(a)M:DNA Marker,1~2:目的基因扩增条带,3~4:菌落 PCR 验证 BL21(DE3)-DmpA;(b)M:DNA Marker,1~2:菌落 PCR 验证 BL21(DE3)-MBP-DmpA。

2.2 重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的生长情况对比

同时测定重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 在转接 100 mL 发酵培养基后的 OD_{600} 吸光值,以时间为横坐标,OD_{600} 测得吸光值为纵坐标,绘制生长曲线,由图 4 可知在发酵 1 h 后,两重组菌均进入对数生长期,发酵 6 h 后菌株生长速度减慢,BL21(DE3)-MBP-DmpA 在 4.5 h 后生长趋势优于 BL21(DE3)-DmpA,这可能是由于 MBP 标签增强了细胞稳定性,降低了细胞内蛋白质

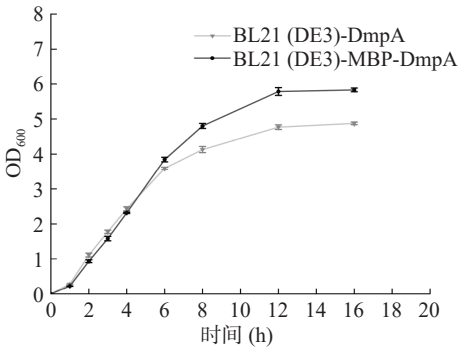


图 4　重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 生长曲线

Fig.4　Growth curve of recombinant strains BL21(DE3)-DmpA and BL21(DE3)-MBP-DmpA

合成的代谢负担[30]，使得 BL21(DE3)-MBP-DmpA 能够在更长时间内维持较高的生长速率。菌株的生长情况反映了菌体的生长规律，为添加诱导剂的时间提供了实验依据。

2.3　两重组菌株的诱导表达结果及粗酶活对比

对诱导后的重组菌 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 进行超声破碎处理，取破碎全细胞、破碎上清、破碎沉淀制成蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测蛋白诱导表达效果，BL21(DE3)-DmpA 目的蛋白大小为 41.4 kDa，BL21(DE3)-MBP-DmpA 目的蛋白大小为 83.4 kDa，由图 5(a)可知 BL21(DE3)-MBP-DmpA 上清液中含有几乎全部的目的蛋白，而沉淀中几乎没有检测到目的蛋白，表达效果明显优于 BL21(DE3)-DmpA，这表明添加 MBP 标签显著提高了目的蛋白的可溶性表达，有效减少了包涵体的形成。分别取两重组菌的粗酶液进行转化反应，HPLC 检测产物 L-肌肽浓度，比较二者的粗酶活，结果如图 5(b)所示，BL21(DE3)-MBP-DmpA 的粗酶活高于 BL21(DE3)-DmpA，且二者差异极显著(P<0.01)，进一步证明了 MBP 标签对蛋白质功能性的积极影响。由于 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的诱导表达效果和粗酶活性均优于 BL21(DE3)-DmpA，本研究将选择重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 进行后续诱导表达条件和转化条件的探究。

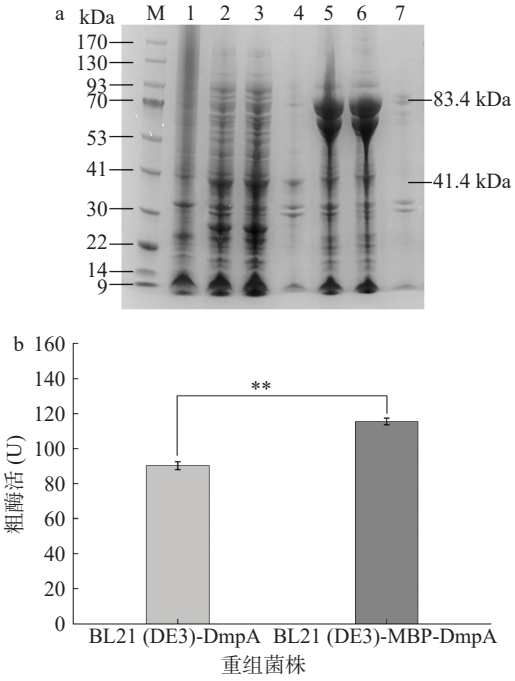


图 5　BL21(DE3)-DmpA、BL21(DE3)-MBP-DmpA 蛋白诱导 SDS-PAGE 电泳图(a)和 BL21(DE3)-DmpA、BL21(DE3)-MBP-DmpA 的粗酶活对比(b)

Fig.5　SDS-PAGE electrophoresis images of BL21(DE3)-DmpA and BL21(DE3)-MBP-DmpA proteins (a), and a comparison of the crude enzyme activity between BL21 (DE3)-DmpA and BL21(DE3)-MBP-Dmp (b)

注：(a) M：蛋白 Marker，1：pET28a 总蛋白对照，2：BL21(DE3)-DmpA 表达总蛋白，3：BL21(DE3)-DmpA 表达可溶性蛋白，4：BL21(DE3)-DmpA 表达不可溶蛋白，5：BL21(DE3)-MBP-DmpA 表达总蛋白，6：BL21(DE3)-MBP-DmpA 表达可溶性蛋白，7：BL21(DE3)-MBP-DmpA 表达不可溶蛋白；(b)重组菌株 BL21(DE3)-DmpA 和 BL21(DE3)-MBP-DmpA 粗酶活；**表示差异极显著，P<0.01。

2.4　重组菌 BL21（DE3）-MBP-DmpA 的诱导表达条件对酶活力的影响

2.4.1　诱导剂添加时间对酶活力的影响　诱导剂的添加时机通常在菌体生长旺盛期，可以充分利用菌体生长过程中积累的底物和能量，促进目标产物的合成。根据重组菌 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的生长情况，在菌株对数生长期选择了发酵 1、2、3、4、5、6 h 六个时间点添加诱导剂，图 6 为重组菌 BL21(DE3)-MBP-DmpA 在发酵不同时间添加诱导剂的粗酶酶活情况，发酵 1 h 时添加诱导剂的酶活最低，由图 4 可知此时菌体刚进入对数生长期，过早的加入 IPTG 影响了菌体生长；发酵 4 h 时加入诱导剂酶活最高，且 4 h 和 1 h 的酶活差异显著(P<0.05)，说明发酵时间对粗酶活性具有重要影响，随着发酵时间继续增加，酶活反而呈下降趋势，可能是由于细胞老化和代谢减慢、营养物质耗尽等因素共同作用的结果，酶对诱导剂的响应能力减弱，不能充分发挥 IPTG 的作用[31]。因此，发酵 4 h 时是加入诱导剂的最佳时间。

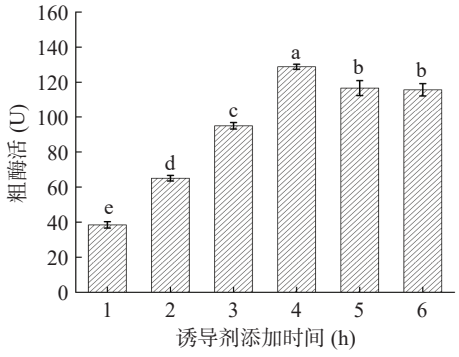


图 6　不同诱导剂添加时间的粗酶活检测结果

Fig.6　Detection results of crude enzyme activity with different inducer addition times

注：不同字母表示各组间差异显著(P<0.05)，图 7~图 13 同。

2.4.2 诱导温度对酶活力的影响 诱导温度对菌体的生长速率和酶活有着重要影响,在一定范围内随着温度的升高有利于菌体的生长和蛋白的表达,而超过此范围则会起到抑制作用。图 7 为重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 在不同温度下诱导后的粗酶酶活情况,在较低的诱导温度 16~20 ℃ 时,随着温度升高,酶活也有所提高,当温度为 25 ℃ 时,酶活降低,30 ℃ 和 37 ℃ 时酶活骤降,与 20 ℃ 时活性差异显著(P<0.05),可能是由于温度过高影响了蛋白的正确折叠,导致菌体产生包涵体,降低可溶性酶的表达[32]。由图 7 可知 20 ℃ 为重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的最适诱导温度。

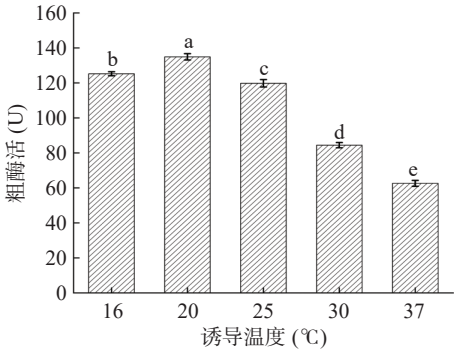


图 7 不同诱导温度下的粗酶活情况

Fig.7 Crude enzyme activity under different induction temperatures

2.4.3 诱导剂浓度对酶活力的影响 诱导剂浓度对菌体生长有显著影响,诱导剂浓度低时可能不足以完全启动目标蛋白的表达,但对菌体生长的抑制作用较小,诱导剂浓度过高时其细胞毒性会抑制菌体的生长。分别添加 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L IPTG,比较 BL21(DE3)-MBP-DmpA 粗酶酶活,结果如图 8 所示,各条件下的粗酶活性具有明显差异,随着 IPTG 浓度的增加,酶活也随之提高,这是因为诱导剂浓度的增加可以促进目标蛋白基因的转录和翻译过程,从而提高蛋白表达水平;当 IPTG 为 0.4 mmol/L 时酶活最高,之后诱导剂浓度增加,酶活明显下降,因为较高浓度的诱导剂会导致蛋白合成速率过快,无法形成正确折叠,从而形成包涵体等无活性或低活性的蛋白聚集体,导致酶活力降低[33]。

2.4.4 诱导时间对酶活力的影响 诱导时间影响菌体生长和酶活力,诱导时间过短不利于菌体的生长和蛋白的积累,诱导时间过长可能导致蛋白酶的释放,使表达的重组蛋白被部分降解,进一步导致蛋白表达量下降。图 9 为不同诱导时间下 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的粗酶酶活,在诱导时间 8~16 h 之间,随着诱导时间的增加,酶活随之提高,16 h 时酶活最高可达到约 145 U,而诱导时间大于 16 h 后,可能是诱导时间过长影响菌体活性和蛋白表达,粗酶酶活下降,与 16 h 相比具有显著差异(P<0.05)。综上所述,诱导 16 h 为最优条件。经以上四个诱导条件的优化,重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 粗酶液的酶活由 115 U 提高至 145 U。

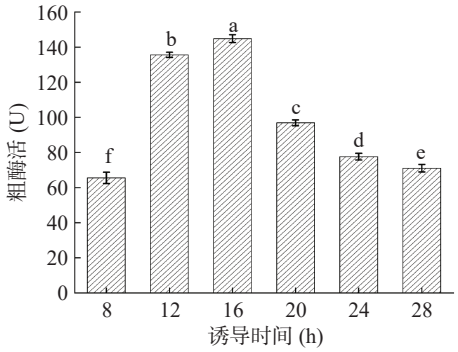


图 9 不同诱导时间时的粗酶活情况

Fig.9 Crude enzyme activity under different induction times

2.5 重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 的转化条件优化结果

2.5.1 转化温度的优化 温度与酶催化反应速率和酶的稳定性密切相关,在一定温度范围内,酶促反应速率会随温度升高而加快,而温度过高则会对酶的活性产生影响。氨肽酶 DmpA 催化合成 L-肌肽是一个可逆反应,该酶对温度敏感性高,若温度过高会导致酶活性降低且反应逆向进行。因此本研究探究了

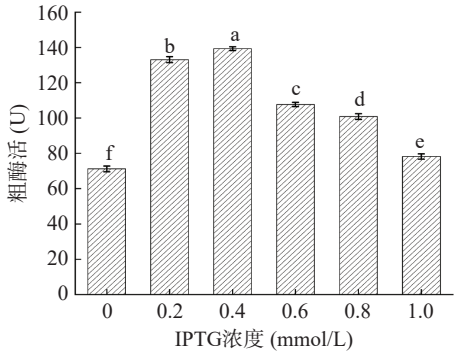


图 8 不同诱导剂浓度时的粗酶活情况

Fig.8 Crude enzyme activity under different inducer concentrations

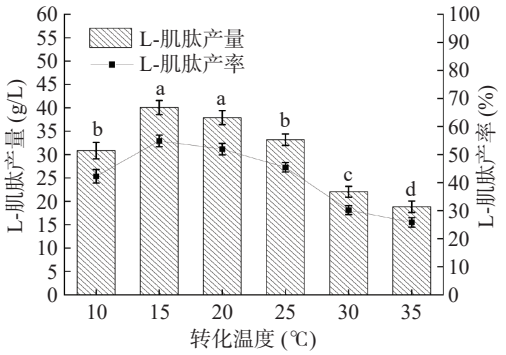


图 10 不同转化温度条件下 L-肌肽的产量和产率

Fig.10 Yield and productivity of L-carnosine under different conversion temperature conditions

10~35 ℃ 时酶催化生成 L-肌肽的产量和产率, 图 10 表明当温度为 15 ℃ 时 L-肌肽的产量和产率最高, 当温度高于 15 ℃ 后, L-肌肽产量和产率都逐渐下降, 20 ℃ 时的产量和 15 ℃ 差异不显著, 说明该酶在 15~20 ℃ 范围内都具有较好的催化能力。35 ℃ 时产量仅有 18.84 g/L, 这可能是由于高温条件下, 氨肽酶 DmpA 的活性显著下降, 导致其对底物的利用率降低, 减弱了合成 L-肌肽的能力。因此 15 ℃ 为转化反应的最适温度。

2.5.2　转化 pH 的优化　pH 变化会改变酶分子和底物分子的带电状态, 从而影响酶与底物的结合及催化。过高或过低的 pH 还可能影响酶的稳定性, 导致酶分子构象的改变, 甚至引起酶的变性, 进而使酶丧失活性。为了使反应更高效, 分别探究了在 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的条件下重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA 生成 L-肌肽的情况, 图 11 结果显示, 当 pH 偏酸性时, L-肌肽的产量和产率非常低, 说明氨肽酶 DmpA 在酸性环境下酶活性下降, 不利于催化反应的进行, 随着 pH 升高, L-肌肽的产量和产率都随之增加, 在 pH 为 9.0 时达到最大值, 此后, 随着 pH 升高但 L-肌肽的产量和产率有所下降, 但与 pH9.0 时的差异不显著。由结果可知, 最适转化 pH 为 9.0, 此酶适宜偏碱性环境, 且在酸性环境中转化效果差, 因此在转化过程中要严格控制 pH。

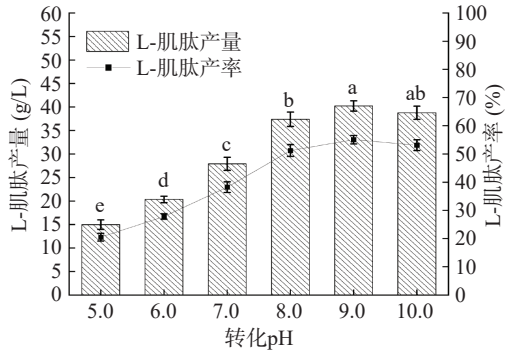


图 11　不同转化 pH 条件下 L-肌肽的产量和产率

Fig.11　Yield and productivity of L-carnosine under different conversion pH conditions

2.5.3　转化时添加金属离子种类的优化　酶催化反应中, 金属离子可能会影响酶的活性、选择性以及底物的结合效果, 且有文献报道某些生产 L-肌肽的酶可通过添加金属离子来提高产量[16], 为了探究本研究中的氨肽酶 DmpA 是否具有金属离子依赖性, 分别在反应体系中添加了终浓度为 1 mmol·L^{-1} 的 Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}, 结果如图 12 所示, 不同金属离子之间相比结果均无显著差异, 且与未添加金属离子的对照组相比也无显著差异(P>0.05), 表明该氨肽酶 DmpA 无金属离子依赖性, 反应无需添加金属离子来激活。

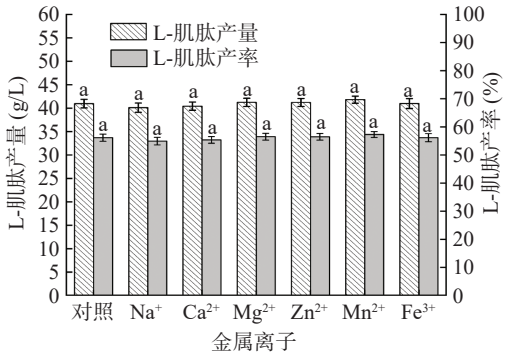


图 12　添加不同金属离子时 L-肌肽的产量和产率

Fig.12　Yield and productivity of L-carnosine with the addition of different metal ions

2.5.4　L-组氨酸和 β-丙氨酸甲酯盐酸盐投料量的优化　L-组氨酸和 β-丙氨酸甲酯盐酸盐的投料量对酶催化反应有非常显著的影响, 在保持酶浓度一致的条件下, 底物浓度的改变会影响酶促反应速度和结果。本研究中保持总反应体系 10 mL, 添加粗酶液 9 mL, 改变 L-组氨酸和 β-丙氨酸甲酯盐酸盐的投料量, 结果如图 13 所示, 当 L-组氨酸为 0.2 g, β-丙氨酸甲酯盐酸盐为 0.4 g 时, L-肌肽产量最低, 提高底物浓度, L-肌肽的产量也随之增加, 其中 L-组氨酸为 0.8 g, β-丙氨酸甲酯盐酸盐为 1.0 g 时有最高产量, 但产率较其他条件低, 而 L-组氨酸为 0.7 g, β-丙氨酸甲酯盐酸盐为 1.0 g 时的产率要高于它, 且产量两组相差不大, 说明投入 L-组氨酸 0.7 g 时对底物的利用率更高, 综合因素考虑, L-组氨酸 0.7 g, β-丙氨酸甲酯盐酸盐 1.0 g 为最佳底物投料量。经过上述四个转化条件的优化, L-肌肽的产量达到 55.72 g/L, 产率约为 54.54%。

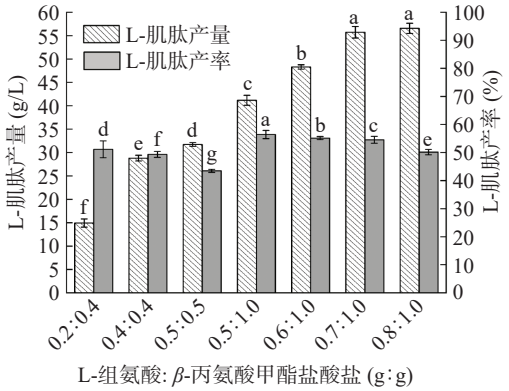


图 13　不同底物浓度时 L-肌肽的产量和产率

Fig.13　Yield and productivity of L-carnosine at different substrate concentrations

将本实验所得 L-肌肽产量与文献报道 L-肌肽产量相比, 具体见表 6, 氨肽酶与 L-氨基酸连接酶和二肽水解酶相比, 不需要 ATP 或 Mn^{2+}参与反应, 能耗和成本较低; 与其他来源氨肽酶相比, 本文所用 DmpA 催化生产 L-肌肽产量为目前报道最高。

表 6 L-肌肽产量对比

Table 6 Comparison of the L-carnosine production yields

酶	L-肌肽产量(g/L)	特点
L-氨基酸连接酶[15]	2.58	合成L-肌肽的反应是单向的,但反应需要ATP的参与
粘质沙雷氏菌来源二肽水解酶*Sm*PepD[16]	15.2	需Mn^{2+}激活
产气荚膜梭菌来源二肽水解酶*Cp*PepD[17]	15.16	–
*Sphingosinicella xenopeptidilytica*来源氨肽酶BapA[19]	3.7	产率高达71%
新型氨肽酶[20]	2.26	–
β-酯酰基转移酶(作为DmpA)[21]	23.75	底物特异性高
Cystobasidium minutum MCA 4210来源的DmpA	55.72	产量为目前报道最高,反应条件简单温和

3 结论

本研究以大肠杆菌 BL21(DE3)为表达宿主,成功构建了重组菌株 BL21(DE3)-DmpA,为了提高蛋白的可溶性和粗酶活,进一步构建了重组菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA。通过对两菌株的诱导表达及粗酶活测定验证,MBP 标签的引入显著提高了 DmpA 蛋白的可溶性表达水平及粗酶活性。针对高效表达菌株 BL21(DE3)-MBP-DmpA,研究完成了诱导条件优化,确定最优方案为:摇瓶发酵 4 h 后,添加 0.4 mmol/L IPTG,20 ℃ 诱导 16 h,酶活由 115 U 提高至 145 U。在此基础上,进一步优化酶催化转化 L-肌肽的反应条件,在 10 mL 总反应体系中,添加 0.7 g L-组氨酸、1.0 g *β*-丙氨酸甲酯盐酸盐及 9 mL 粗酶液,于 15 ℃、pH9.0 的条件下反应,L-肌肽产量可达 55.72 g/L,产率约为 54.54%。此外,研究发现该 DmpA 氨肽酶的催化反应不受金属离子影响,无需额外添加金属离子激活酶活,有效降低了反应成本。本研究首次探究了微小囊担子菌来源的 DmpA 氨肽酶在 L-肌肽生物合成中的应用,不仅为 L-肌肽的生物催化合成提供了优质酶资源,且经多环节优化实现了高效生产,所得 L-肌肽产量为目前已报道的最高水平,具备显著实用价值。由于本研究所投入的底物利用率仍有提升空间,为进一步实现 L-肌肽的高效、经济转化,后续研究将在深化底物与菌体浓度优化、拓展酶学特性与催化机制研究等方面展开,通过调控关键物质浓度,最大化提升底物转化率。

© 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] GULEWITSCH W, AMIRADZIBI S. Carnosine, a new organic base from meat extracts[J]. Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Pétersbourg, 1900, 5(2): 21−24.

[2] KUMAR A, SURYAKUMAR G, SINGH N S, et al. A comprehensive review on physiological and biological activities of carnosine: Turning from preclinical facts to potential clinical applications[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2025, 398(2): 1341−1366.

[3] GASMI A, MUJAWDIYA P K, LYSIUK R, et al. The possible roles of *β*-alanine and L-carnosine in anti-aging[J]. Current Medicinal Chemistry, 2025, 32(1): 6−22.

[4] YAN Ronghui, ZHANG Pinggen, SHEN Shengqi, et al. Carnosine regulation of intracellular pH homeostasis promotes lysosome-dependent tumor immunoevasion[J]. Nature Immunology, 2024, 25(3): 483−495.

[5] NAZARI S, HOSSEINI M, TALEBI M R, et al. Antioxidant/anti-inflammatory xanthan-based hydrogel containing L-carnosine/berberine with the potential for periodontal applications[J]. Polymer Bulletin, 2025, 82(5): 1385−1412.

[6] HOUJEGHANI S, KHEIROURI S, FARAJI E, et al. L-Carnosine supplementation attenuated fasting glucose, triglycerides, advanced glycation end products, and tumor necrosis factor-*α* levels in patients with type 2 diabetes: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial[J]. Nutrition Research, 2018, 49: 96−106.

[7] 张丹妮, 王洪新. 肌肽对高糖诱导的大鼠 H9C2 心肌细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(4): 437−442. [ZHANG Danni, WANG Hongxin. Protective effect of carnosine on H9C2 cardiomyocyte injury induced by high glucose and its underlying mechanism[J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2021, 39(4): 437−442.]

[8] SACHDEVA S. Peptides as 'drugs': The journey so far[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2017, 23(1): 49−60.

[9] EL-DAKDOUKI M H, DAOUK N, ABDALLAH H. Synthesis and characterization of a series of orthogonally protected l-carnosine derivatives[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2019, 25(1): 379−390.

[10] TURNER R A. Synthesis of carnosine and related peptides by the phthaloyl method[J]. Journal of the American Chemical Society, 1953, 75(10): 2388−2390.

[11] 王长斌, 刘文涛, 任文杰, 等. L-肌肽的合成方法改进[J]. 食品与药品, 2015, 17(3): 190−192. [WANG Changbin, LIU Wentao, REN Wenjie, et al. Improvement of synthetic method of L-carnosine[J]. Food and Drug, 2015, 17(3): 190−192.]

[12] WANG Tao, ZHANG Yufei, NING Lixiao, et al. L-amino acid ligase: A promising alternative for the biosynthesis of l-dipeptides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 136: 109537.

[13] HUANG Xiaowen, LI Yan, JIANG Lina, et al. Comprehensive pan-cancer investigation of carnosine dipeptidase 1 and its prospective prognostic significance in hepatocellular carcinoma[J]. Open Medicine, 2024, 19(1): 20240982.

[14] LIU Yunran, PAN Xuewei, ZHANG Hengwei, et al. Combinatorial protein engineering and transporter engineering for efficient synthesis of L-carnosine in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129628.

[15] KINO K, KOMABAYASHI T, HASHIDA A, et al. Improving the enzymatic activity of L-amino acid *α*-ligase for imidazole

dipeptide production by site-directed mutagenesis[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2023, 87(4): 389−394.
[16] YIN Dongya, PAN Jiang, ZHU Jie, et al. A green-by-design bioprocess for L-carnosine production integrating enzymatic synthesis with membrane separation[J]. Catalysis Science & Technology, 2019, 9(21): 5971−5978.
[17] ZHANG Xiaohan, LIU Xiangtao, CHEN Xi, et al. Identification and structure-based engineering of a dipeptidase *Cp*PepD from *Clostridium perfringens* for the synthesis of l[J]. Journal of Biotechnology, 2024, 389: 86−93.
[18] HECK T, GEUEKE B, KOHLER H E. ChemInform abstract: Bacterial *β*-aminopeptidases: Structural insights and applications for biocatalysis[J]. ChemInform, 2013, 44(10): 201310262.
[19] JAN H, ANTWEILER N, LUTZ J, et al. Simple enzymatic procedure for L-carnosine synthesis: Whole-cell biocatalysis and efficient biocatalyst recycling[J]. Microbial Biotechnology, 2010, 3(1): 74−83.
[20] SHE Jiajia, FU Lihong, ZHENG Xiaowei, et al. Characterization of a new L-carnosine synthase mined from deep-sea sediment metagenome[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 129.
[21] XING Ben, LI Zhiwei, CHANG Junzhang, et al. Molecular modification based on site-directed mutagenesis improves the substrate specificity of *β*-ester acyltransferase for L-carnosine synthesis[J]. Process Biochemistry, 2024, 137: 1−9.
[22] 郭宝松, 张玉姣, 代艺伟, 等. 氨肽酶生产菌株 *Bacillus subtilis* LBJ4-5 的全基因组测序及基因功能分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(24): 32−41. [GUO Baosong, ZHANG Yujiao, DAI Yiwei, et al. Whole-genome sequencing and sequence analysis of an aminopeptidase-producing *Bacillus subtilis* LBJ4-5[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(24): 32−41.]
[23] OHNISHI A, TSUJIMOTO M. Characterization of the enzymatic properties of human RNPEPL1/aminopeptidase Z[J]. Journal of Biochemistry, 2023, 173(4): 307−316.
[24] NANDAN A, NAMPOOTHIRI K M. Molecular advances in microbial aminopeptidases[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1757−1765.
[25] MERZ T, HECK T, GEUEKE B, et al. Autoproteolytic and catalytic mechanisms for the *β*-aminopeptidase BapA: A member of the Ntn hydrolase family[J]. Structure, 2012, 20(11): 1850−1860.
[26] JOHN-WHITE M, DUMSDAY G J, JOHANESEN P, et al. Crystal structure of a *β*-aminopeptidase from an Australian *Burkholderia* sp[J]. Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications, 2017, 73(Pt 7): 386-392.
[27] HECK T, MAKAM V, LUTZ J, et al. Kinetic analysis of L-carnosine formation by *β*-aminopeptidases[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2010, 352(2-3): 407−415.
[28] 吴晓晓, 王淑珍. 融合 MBP 标签的重组人 CD137L 蛋白可溶性表达与纯化[J]. 药物生物技术, 2022, 29(4): 338−343. [WU Xiaoxiao, WANG Shuzhen. Soluble expression and purification of recombinant human CD137L protein by fusion to a MBP tag[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2022, 29(4): 338−343.]
[29] 刘帆. 祖先氨肽酶的制备及酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [LIU Fan. Preparation and enzymatic characterization of an ancient aminopeptidase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]
[30] DIPPEL R, BOOS W. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: Metabolism and transport[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(24): 8322−8331.
[31] 秦梦, 王力源, 刘春卯, 等. 基于复合诱导剂诱导枯草工程菌产饲用蛋白酶的响应面优化研究[J]. 饲料研究, 2024, 47(16): 112−117. [QIN M, WANG L Y, LIU C M, et al. Response surface optimization study on production of feed proteinase by *Bacillus subtilis* with composite inducers[J]. Feed Research., 2024, 47(16): 112−117.]
[32] 赵越, 王新秀, 吴思, 等. KlacPNP 基因密码子优化及在枯草芽胞杆菌中的高效表达[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(19): 53−59. [ZHAO Yue, WANG Xinxiu, WU Si, et al. *Codon* optimization and efficient expression of KlacPNP gene in *Bacillus subtilis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(19): 53−59.]
[33] XU Jianmiao, WU Zhousheng, ZHAO Keji, et al. IPTG-induced high protein expression for whole-cell biosynthesis of L-phosphinothricin[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(9): 2300027.