2026, 66(10): 4956-4973
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260069
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260069

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

定点突变对一种耐热胶原蛋白水解酶酶学特性的影响

张魁*，朱敏，苏芸芸，王喜龙，郭倩，王志科，刘秀丽，刘海卿

陇东学院 农业与生物工程学院，甘肃省陇东生物资源保护利用与生态修复重点实验室，甘肃 庆阳

张魁, 朱敏, 苏芸芸, 王喜龙, 郭倩, 王志科, 刘秀丽, 刘海卿. 定点突变对一种耐热胶原蛋白水解酶酶学特性的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 4956-4973.
ZHANG Kui, ZHU Min, SU Yunyun, WANG Xilong, GUO Qian, WANG Zhike, LIU Xiuli, LIU Haiqing. Effects of site-directed mutagenesis on the enzymatic properties of a thermostable collagenolytic protease[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 4956-4973.

摘　要：【目的】针对嗜热微生物来源的热稳定枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(thermostable subtilisin-like serine protease, TSS)的 Ca^{2+}结合位点、Leu^{253} 位点和蛋白表面氧化敏感 Met 位点进行定点突变，筛选抗氧化性、热稳定性及催化活性均提高的突变体，并探究三者之间的内在关联。【方法】针对 TSS 的 Ca^{2+}结合位点(Ca1、Ca2 和 Ca3)、Leu^{253} 位点和蛋白表面氧化敏感 Met 残基开展定点突变，通过检测产生的系列突变体对 H_2O_2 的耐受性、相对酶活性和在 70 ℃保温 3 h 后的残余活性，系统研究突变体抗氧化活性、催化活性和热稳定性的变化特征。【结果】3 个 Ca^{2+} 结合位点突变后，TSS 的催化活性和热稳定性均出现不同程度下降；参照 KP-43 构建的 Leu^{253} 系列突变体并未增强 TSS 的抗氧化性；针对氧化敏感残基改造获得的突变体 M302L，在保持热稳定性不变、催化活性提升 13% 的同时抗氧化性提升 61%。研究同时发现，Ca^{2+}可提升 TSS 的高温催化活性和热稳定性，且该作用具有浓度依赖性；2 mol/L 及以上的高盐环境可延长 TSS 在 75 ℃的半衰期，并抑制酶原自加工成熟。【结论】在 TSS 的 Leu^{253} 和 Met 突变体中，抗氧化性和催化活性呈正相关，符合“Trade-off”机制。

关键词：胶原蛋白水解酶；定点突变；催化活性；热稳定性；抗氧化性

资助项目：甘肃省自然科学基金(23JRRM742)；陇东学院博士基金(XYBYZK2215, XYBYZK2216, XYBYZK2217, XYBYZK2229)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (23JRRM742) and the Doctoral Foundation of Longdong University (XYBYZK2215, XYBYZK2216, XYBYZK2217, XYBYZK2229).
*Corresponding author. E-mail: zhangkui27@163.com
Received: 2026-01-24; Accepted: 2026-04-19; Published online: 2026-05-20

Effects of site-directed mutagenesis on the enzymatic properties of a thermostable collagenolytic protease

ZHANG Kui*, ZHU Min, SU Yunyun, WANG Xilong, GUO Qian, WANG Zhike, LIU Xiuli, LIU Haiqing

Gansu Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources and Ecological Restoration in Longdong, School of Agriculture and Bioengineering, Longdong University, Qingyang, Gansu, China

Abstract: [Objective] To conduct site-directed mutagenesis on the Ca^{2+}-binding sites, Leu^{253}, and protein surface oxidation-sensitive Met residues of TSS, a collagenolytic protease derived from thermophiles, thereby screening out the variants with improved antioxidant activity, thermostability, and catalytic activity and revealing the intrinsic connection among them. **[Methods]** Site-directed mutagenesis was conducted on the Ca^{2+}-binding sites (Ca1, Ca2, and Ca3) and Leu^{253} of TSS and the oxidation-sensitive Met residues on the protein surface. The derived variants were further evaluated for H_2O_2 tolerance, relative activity, and residual activity. Changes in antioxidant activity, catalytic activity, and thermostability after mutations were also studied. **[Results]** Mutations in amino acid residues at the three Ca^{2+}-binding sites led to decreases in catalytic activity and/or thermostability of TSS. The Leu^{253} series variants constructed by simulating KP-43 did not enhance the antioxidant activity of TSS. Among the variants of oxidation-sensitive residues, M302L showed increases of 13% and 61% in the catalytic and antioxidant activities, respectively, while remaining unchanged thermostability. Ca^{2+} increased the catalytic activity and thermostability of TSS at high temperatures in a concentration-dependent manner. A high salinity environment with more than 2 mol/L NaCl prolonged the half-life of TSS at 75 ℃ and inhibited the maturation process of TSS proform. **[Conclusion]** The antioxidant and catalytic activities are positively correlated in the Leu^{253} and Met variants of TSS, which conforms to the "Trade-off" mechanism.

Keywords: collagenolytic protease; site-directed mutagenesis; catalytic activity; thermostability; antioxidant activity

胶原蛋白和胶原蛋白水解短肽作为兼具组织修复、抗纤维化和良好生物相容性等多重生物化学与医学功能的生物材料，具备极高的应用价值与市场发展潜力[1-4]。胶原蛋白水解酶已被广泛应用于食品、医疗、制药、化妆品和纺织工业等领域[5-6]；部分细菌胶原蛋白水解酶作为毒力因子参与人类疾病进程，近几十年来也受到越来越多的关注[7-10]。溶组织梭菌胶原酶(*Clostridium histolyticum* collagenase, ChC)是首个被鉴定和系统表征的细菌胶原酶，目前已成为新发现胶原蛋白水解酶研究的标准参照酶[11-12]，也是可实现商品化获取的微生物胶原蛋白水解酶[13]。以 ChC 为代表的中温胶原蛋白水解酶热稳定性较差，仅在生理条件下(37 ℃和中性 pH)表现出胶原蛋白水解活性，在高温环境下降解胶原蛋白存在明显局限性，实际应用场景

受到诸多限制[14]。与之相反，分离自嗜热微生物的胶原蛋白水解酶可在高温条件下降解胶原蛋白，一方面可提升胶原蛋白降解效率，另一方面也能有效降低反应过程中的微生物污染风险[15-17]，因此热稳定胶原蛋白水解酶在皮革生产、食品加工、化妆品加工、纺织品处理和医药等领域具备更为重要的科学研究价值与应用前景。

热稳定枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(thermostable subtilisin-like serine protease, TSS)是一种新发现的嗜热耐盐枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)样胶原蛋白水解酶，兼具优良的耐盐碱特性，在 60−80 ℃均表现出较高的胶原蛋白水解活性[18]。TSS 的低明胶水解活性、“马鞍形”活性曲线以及对不同溶解状态胶原蛋白 α1 和 α2 链的降解位点特异性等特征，与其他已报道的 S8 家族细菌胶原蛋白水解酶存在明显差异[18-19]，同时可耐受多种极端环境条件，因此 TSS 这类热稳定胶原蛋白水解酶在胶原蛋白废弃物处理和皮革工业中的应用前景十分广阔[15]。胶原蛋白水解酶 TSS 来源于短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.) WF146[20]，该菌株最适生长温度约为 58 ℃，可在以鱼鳞胶原蛋白为唯一碳氮源的培养基中正常生长。TSS 与其他 S8 家族来源的胶原蛋白水解酶具有较高的结构域组成相似性，前期实验结果也证实其在高温条件下具备胶原蛋白降解能力。生物信息学分析显示，TSS 的成熟酶(mature enzyme, mTSS)含有 3 个预测的 Ca^{2+}结合位点，且 Ca^{2+}和 NaCl 均对其高温催化活性和热稳定性具有调控作用。本研究拟针对其 Ca^{2+}结合位点、Leu^{253} 位点和蛋白表面氧化敏感 Met 位点开展定点突变，以期筛选获得抗氧化性、热稳定性及胶原蛋白降解活性均提升的突变体，并探究 TSS 中三者之间的内在关联，为开发新型胶原蛋白类固体废弃物降解用蛋白酶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.) WF146 (CCTCC AB209297)于 55 ℃在 LB 培养基中培养，用于基因组 DNA 提取。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 和大肠杆菌 BL21(DE3) 于 37 ℃在 LB 培养基中培养，分别用于基因克隆与表达，培养过程中根据实验需求添加终浓度 30 μg/mL 的卡那霉素。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶(*Nde* I 和 *Xho* I)，ThermoFisher Scientific 公司；2×T8 High-Fidelity Master Mix，北京擎科生物科技股份有限公司；T4 DNA 连接酶，北京全式金生物技术有限公司；Azocasein 和 ChC，Sigma-Aldrich (Shanghai) Trading 有限公司；低分子量蛋白质 Marker，生工生物工程(上海)股份有限公司；质粒 pET-26b、抗 His 标签单克隆抗体，Novagen 公司；山羊抗小鼠 IgG 二抗，亚科因(武汉)生物技术有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；DEAE-Sepharose™ Fast Flow、Sepharose Fast Flow 层析柱，GE Healthcare Bio-Sciences 公司。

PCR 仪、台式高速离心机，Eppendorf 公司；双层空气恒温振荡器，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；水平电泳槽，北京六一生物科技有限公司；紫外可见分光光度计，上海菁华科技仪器有限公司；超声波细胞破碎仪，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 质粒构建与定点突变

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 *Brevibacillus* sp. WF146 的基因组 DNA，采用表 1 所列引物分别扩增携带自身信号肽的 TSS 前体(precursor-TSS 和 pre-TSS)基因、不含自身信号肽的 TSS 酶原(proform-TSS 和 pro-TSS)基因，将扩增片段插入 pET-26b 载体的 *Nde* I−*Xho* I

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Names	Sequences (5′→3′)	Names	Sequences (5′→3′)
pro-TSS-F	GGAATTCCATATGAAGCGGGAAACAGGG	L253A-F	CTACGCCTATGCCAGCGGGACAAGC
pro-TSS-R	CCGCTCGAGACGGGAGCGGGA	L253A-R	CTGGCATAGGCGTAGAAGGCGTTG
pre-TSS-F	GGCATATGCGGTTGAAATGGCATGCG	L253I-F	CTACGCCTATATCAGCGGGACAAGC
pro-S257A-F	CTATCTCAGCGGGACAGCCATGGCGACG	L253I-R	CTGATATAGGCGTAGAAGGCGTTG
pro-S257A-R	GGCTGTCCCGCTGAGATAGGCGTAGAAGG	L253V-F	CTACGCCTATGTCAGCGGGACAAGC
pro-S257C-F	CTATCTCAGCGGGACATGCATGGCGACG	L253V-R	CTGACATAGGCGTAGAAGGCGTTG
pro-S257C-R	GCATGTCCCGCTGAGATAGGCGTAGAAGG	L253C-F	CTACGCCTATTGCAGCGGGACAAGC
HN-pro-TSS-R	CGCTCGAGGTCGTTGCGCTGTTTTCG	L253C-R	CTGCAATAGGCGTAGAAGGCGTTG
E187A-F	GCCTCCGCAAACGACCGGCCGGAGC	L253G-F	CTACGCCTATGGCAGCGGGACAAGC
E187A-R	GTCGTTTGCGGAGGCGCCCACGGCG	L253G-R	CTGCCATAGGCGTAGAAGGCGTTG
E187Q-F	GCCTCCCAAAACGACCGGCCGGAGC	L253S-F	CTACGCCTATAGCAGCGGGACAAGC
E187Q-R	GTCGTTTTGGGAGGCGCCCACGGCG	L253S-R	CTGCTATAGGCGTAGAAGGCGTTG
D196S-F	GATGAAAGCGAGGCGGACGACCCG	L253K-F	CTACGCCTATAAGAGCGGGACAAGC
D196S-R	GCCTCGCTTTCATCCAGCTCCGGC	L253K-R	CTCTTATAGGCGTAGAAGGCGTTG
D199A-F	GAGGCGGCCGACCCGGACGAGGTAG	L253D-F	CTACGCCTATGACAGCGGGACAAGC
D199A-R	CCGGGTCGGCCGCCTCGTCTTCATC	L253D-R	CTGTCATAGGCGTAGAAGGCGTTG
D199N-F	GAGGCGAACGACCCGGACGAGGTAG	M88A-F	CAAAGGGGCGGCTCCCGACGCGAAG
D199N-R	CCGGGTCGTTCGCCTCGTCTTCATC	M88A-R	GCCGCCCCTTTGTACTGGCCGTCTG
E203H-F	CCGGACCACGTAGCCGCGTTCAGC	M88L-F	CAAAGGGCTGGCTCCCGACGCGAAG
E203H-R	CTACGTGGTCCGGGTCGTCCGCCTC	M88L-R	GCCAGCCCCTTTGTACTGGCCGTCTG
D385A-F	CAACGCCTTTTTCCACTACCCCTACG	M99A-F	CCATTCCGCGCTGGACGAATACGG
D385A-R	GTGGAAAAAGGCGTTGCCGTTCAAGG	M99A-R	GCGCGGAATGGAAGACGAGCTTCG
D385N-F	CAACAACTTTTTCCACTACCCCTACG	M99L-F	CCATTCCCTGCTGGACGAATACGG
D385N-R	GTGGAAAAAGTTGTTGCCGTTCAAGG	M99L-R	GCAGGGAATGGAAGACGAGCTTCG
D393A-F	CTACGACGCCGAAGTGGACAACCTCAAC	M154A-F	GGAACATCCGGACGCGACGGCGCTGGTGG
D393A-R	CACTTCGGCGTCGTAGGGGTAGTGG	M154A-R	GCGCCGTCGCGTCCGGATGTTCCCAGAGG
D393N-F	CTACGACAACGAAGTGGACAACCTCAAC	M154L-F	CATCCGGACCTGACGGCGCTGGTG
D393N-R	CACTTCGTTGTCGTAGGGGTAGTGG	M154L-R	GTCAGGTCCGGATGTTCCCAGAGAAAC
E394A-F	GACGACGCAGTGGACAACCTCAACAAC	M258A-F	GACAAGCGCGGCGACGCCGGTGTTG
E394A-R	GTCCACTGCGTCGTCGTAGGGGTAG	M258A-R	CCGCGCTTGTCCCGCTGAGATAGGC
E394N-F	GACGACAATGTGGACAACCTCAACAAC	M258L-F	GACAAGCCTGGCGACGCCGGTGTTG
E394N-R	GTCCACATTGTCGTCGTAGGGGTAG	M258L-R	CCAGGCTTGTCCCGCTGAGATAGGC
E394Q-F	GACGACCAAGTGGACAACCTCAACAAC	M258C-F	GACAAGCTGTGCGACGCCGGTGTTG
E394Q-R	GTCCACTTGGTCGTCGTAGGGGTAG	M258C-R	CACAGCTTGTCCCGCTGAGATAGGC
N368D-F	CTGGTCAACGACCTGAACCTGCGAG	M290A-F	GGCGGCGCTCATCAGCGGCGCCGAC
N368D-R	CAGGTCGTTGACCAGGGTGCGCTCG	M290A-R	GAGCGCCGCCTTGATCAATGCC
N370D-F	CAACAACCTGGACCTGCGAGTGGTC	M290L-F	GGCGCTGCTCATCAGCGGCGCCGAC
N370D-R	CAGGTCCAGGTTGTTGACCAGGGTG	M290L-R	GAGCAGCGCCTTGATCAATGCC

(待续)

(续表 1)

Names	Sequences (5′→3′)	Names	Sequences (5′→3′)
D396A-F	CGAAGTGGCCAACCTCAACAACGTG	M302A-F	CGAAGACGCGCGCGTGCAGGGGTTC
D396A-R	GAGGTTGGGCCACTTCGTCGTCGTAG	M302A-R	GCGCGTCTTCGTTCAAATCGTCGG
D396N-F	CGAAGTGAACAACCTCAACAACGTG	M302L-F	GAACGAAGACCTACGCGTGCAGG
D396N-R	GAGGTTGTTCACTTCGTCGTCGTAG	M302L-R	CGCGTAGGTCTTCGTTCAAATCG
E402A-F	CAACGTGGCGCAGGTCTGGATCAAG	M425A-F	CGTGCCCGCGGGGCCGCAGCCGTAC
E402A-R	GACCTGCGGCCACGTTGTTGAGGTTG	M425A-R	CCGCGGGCACGTTGTAGCCCTCCAC
E402Q-F	CAACGTGCAGCAGGTCTGGATCAAG	M425L-F	CGTGCCCCTGGGGCCGCAGCCGTAC
E402Q-R	GACCTGCTGCACGTTGTTGAGGTTG	M425L-R	CCAGGGGCACGTTGTAGCCCTCCAC
L253M-F	CGCCTATATGAGCGGGACAAGCATG		
L253M-R	GTCCCGCTCATATAGGCGTAGAAGG		

□/_ indicates site-directed mutagenesis site and (*Nde* I–*Xho* I) restriction site.

酶切位点，构建重组质粒 pET26b-*pre-TSS* 和 pET26b-*pro-TSS*。PCR 反应体系(25.0 μL)：2×T8 High-Fidelity Master Mix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL，DNA 模板 0.5 μL，ddH_2O 10.0 μL。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，共 30 个循环；72 ℃终延伸 5 min。以 pET26b-*pro-TSS* 为模板，扩增编码 TSS 的 N 端前肽缺失蛋白(delta N-terminal propeptide, ΔN)及 N 端前肽(N-terminal propeptide, N)结构域的 DNA 片段，插入 pET-26b 载体构建对应重组蛋白的表达质粒。以 pET26b-*pro-TSS* 为模板，使用表 1 所列诱变引物，采用 QuikChange site-directed mutagenesis (SDM)方法[21]构建 pro-TSS 活性位点突变体(pro-TSS-S257A/C 和 ΔN/S257A)、Ca^{2+}结合位点突变体、Leu^{253} 和氧化敏感 Met 残基突变体的表达质粒。所有重组质粒均以 pET-26b 为载体，在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现重组蛋白异源表达。

1.3 蛋白表达与纯化

将携带不同重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞于 37 ℃、185 r/min 培养 90 min，至菌液 OD_{600} 达到约 0.7 时加入终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导重组蛋白表达，随后在 30 ℃下继续培养 4 h。培养液于 4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体，将菌体重悬于缓冲液(50.0 mmol/L Tris-HCl, 10.0 mmol/L $CaCl_2$, pH 7.5)中，冰浴条件下采用直径 3 mm 的变幅杆进行超声波细胞破碎，探头浸入液面下 5−10 mm，超声功率设置为 100 W，采用脉冲模式工作：超声 1 s、间歇 4 s，总超声时长 5 min。破碎完成后的细胞裂解液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，分别收集可溶性上清组分和不可溶性细胞沉淀组分。收集的上清液采用$(NH_4)_2SO_4$ 进行 50%−80% 饱和度的分段盐析处理，随后采用经相同缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose™ Fast Flow 层析柱进行离子交换层析，纯化成熟 TSS (mTSS)。其余融合 His 标签的重组蛋白，采用经相同缓冲液平衡的 Ni^{2+}螯合 Sepharose Fast Flow 层析柱(可选择添加 3.0 mol/L NaCl)，通过亲和层析法从可溶性上清组分中纯化获得。

1.4 蛋白酶生物信息学分析

1.4.1 两种方法预测 TSS 三级结构后的结构叠加图

通过在线工具 RoseTTAFold (https://robetta.bakerlab.org/submit.php)预测得到的 TSS 三级结构以红色显示[22]；以 KP-43 晶体结构(PDB 登录号 1WMF)为模板进行同源模建得到的 TSS 三级结构以绿色显示[18,23]，使用 Swiss-PdbViewer 软件对 2 种方法预测的 TSS 三级结构进行叠

加比对，TSS 催化三联体(D-H-S)的侧链以黑色标识。

1.4.2 TSS 与 KP-43 三级结构叠加图

使用 SpdbViewer 软件对 TSS 和 KP-43 的三级结构进行叠加比对，TSS 与 KP-43 的催化结构域(catalytic domain, CD)与 β-果冻卷结构域(β-jelly roll domain, βJR)分别以浅蓝色与紫色显示，KP-43 的对应结构域分别以绿色与灰色显示，TSS 催化三联体(D-H-S)的侧链以黑色标识。

1.5 蛋白酶活性测定

1.5.1 蛋白酶比活力测定

600 μL 反应体系包含 300 μL 浓度为 5 μg/mL 的酶液和终质量分数 0.50% 的 Azocasein 底物，于 60 ℃反应 30 min 后，将反应体系转移至冰浴中冷却 5 min 终止反应，随后加入等体积的 40% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)，室温静置 15 min 沉淀未反应底物，12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液测定 OD_{335} 值，计算蛋白酶样品的比活力。

酶活力单位(U/mg)定义为：在 Buffer A (50.0 mmol/L Gly-NaOH, pH 9.0, 10.0 mmol/L $CaCl_2$)中，1 min 内使反应体系经 12 000 r/min 离心 10 min 后的上清液在 OD_{335} 处的吸光值升高 0.01 所需要的酶量，即为 1 个酶活力单位。

1.5.2 蛋白酶相对活性测定

各突变体酶液在 Buffer A 中测定各自蛋白酶比活力，以野生型 mTSS 的比活力为 100%，计算各突变体的相对酶活性。

1.6 酶学性质测定

1.6.1 蛋白酶 Ca^{2+}浓度依赖性测定

在 50.0 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲体系中，以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物，测定浓度为 5.0 μg/mL 的 mTSS 在 2.0 mmol/L EDTA 或 0.0−20.0 mmol/L 梯度浓度 Ca^{2+}条件下的酶活性，以 10.0 mmol/L Ca^{2+}条件下测得的酶活性为 100%，计算不同条件下的相对酶活性，所有数据均为 3 次平行实验结果的平均值。

1.6.2 不同盐浓度下蛋白酶热失活曲线测定

将浓度为 5.0 μg/mL 的 mTSS 溶于添加不同浓度 NaCl 的 Buffer A 中，于 75 ℃水浴条件下进行保温处理，在预设时间间隔点取样，取出后立即置于冰水混合物中冷却终止热失活进程。待最后一组样品保温完成后，统一取出所有冷却样品，以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物测定残余酶活性，以未进行 75 ℃保温处理的初始酶活性为 100%，计算不同盐浓度条件下的残余酶活性，采用 Origin2021 软件绘制热失活曲线，所有数据均为 3 次平行实验结果的平均值。

1.6.3 不同温度下 TSS 对鱼鳞胶原蛋白(fish scale collagen, FSC)的降解效率测定

称取 60 mg FSC，采用 Buffer A 润洗 3 次去除杂质后，加入终浓度 10 mg/L 的 mTSS，置于 3 mL Buffer A 反应体系中，在 30−70 ℃梯度温度条件下振荡反应 30 min。反应结束后 12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液测定 OD_{280} 值。另称取 20 mg FSC，加入过量 ChC 胶原酶完全降解，测定降解产物的 OD_{280} 值，折算得到 60 mg FSC 完全降解后的理论 OD_{280} 值，将该值设为 100%，计算不同温度下 mTSS 对 FSC 的降解效率。

1.6.4 Ca^{2+}对 TSS 热稳定性及加工成熟的影响

将含 pro-TSS 表达产物的细胞可溶性组分，在添加 3.0 mol/L NaCl 的条件下进行镍柱亲和层析，洗脱所得样品经透析处理后，分别置于不含(−)或添加(+) 10.0 mmol/L $CaCl_2$ 的 50.0 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲体系中，于 60 ℃条件下保温 1−4 h，取样后进行 SDS-PAGE 检测。剩余保温后的样品同时以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物测定酶活性，以保温 1 h 条件下测得的酶活性为 100%，计算不同条件下的相对酶活性。

1.6.5 盐浓度对 TSS 热稳定性及加工成熟的影响

将含 pro-TSS 表达产物的细胞可溶性组

分，在添加 3.0 mol/L NaCl 的条件下进行镍柱亲和层析，洗脱所得样品用含不同浓度 NaCl (0.0−5.0 mol/L NaCl)的 50.0 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 10.0 mmol/L $CaCl_2$)缓冲液稀释 10 倍，于 60 ℃条件下保温 1 h 后取样进行 SDS-PAGE 检测。剩余保温后的样品同时以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物测定酶活性，以 2.0 mol/L NaCl 条件下测得的酶活性为 100%，计算不同盐浓度条件下的相对酶活性。

1.7 蛋白酶热稳定性测定方法

将浓度为 5.0 μg/mL 的重组蛋白溶于 Buffer A 中，于 70 ℃条件下保温 3 h，随后以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物测定残余酶活性，以未进行 70 ℃保温处理的初始样品活性为 100%，计算相对酶活性，所有数据均为 3 次平行实验结果的平均值。

1.8 蛋白酶抗氧化性测定方法

将浓度为 5.0 μg/mL 的重组蛋白溶于 Buffer A 中，添加终浓度 50.0 mmol/L 的 H_2O_2，于 30 ℃水浴条件下保温 30 min，随后立即转移至冰水混合物中冷却终止氧化反应，以终质量分数 0.25% 的 Azocasein 为底物测定残余酶活性，以未进行 H_2O_2 处理的初始样品活性为 100%，计算相对酶活性，所有数据均为 3 次平行实验结果的平均值。

1.9 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

采用含 12% 聚丙烯酰胺的 Tris-Gly 缓冲体系进行 SDS-PAGE 分析。为避免样品制备与电泳过程中蛋白酶发生自降解，蛋白样品预先用终质量分数 20% 的 TCA 沉淀，经丙酮充分洗涤后再进行 SDS-PAGE 上样分析。免疫印迹检测依次使用稀释比例 1:10 000 的抗 His 标签单克隆抗体、稀释比例 1:50 000 的山羊抗小鼠 IgG 二抗孵育显色。

1.10 明胶印迹活性分析

配制含终质量分数 0.50% 明胶的聚丙烯酰胺凝胶，方法如下：2% 明胶储存液 1.25 mL、30% 丙烯酰胺储存液 2 mL，同时补加 3.30 μL 的 TEMED 和 50 μL 的 10% APS 储存液，其余用 ddH_2O 补足至 5 mL 后混匀制胶。将待检测蛋白样品制样后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后切下分离胶，用 ddH_2O 漂洗 5 min，随后用添加 0.25% Triton X-100 的 Buffer A 漂洗 3 次，每次漂洗时长 20 min，最后用 Buffer A 反复润洗数次，彻底去除残留的 Triton X-100。在保鲜膜上平铺预先用 Buffer A 充分浸泡的 3 层滤纸，依次放置凝胶、另一层分离胶与 3 层滤纸，组装完成“三明治”结构后用保鲜膜完全包裹，置于 60 ℃条件下保温反应 1 h。反应结束后取出凝胶，按常规考马斯亮蓝染色-脱色流程处理后扫描保存图像。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白水解酶 TSS 的生物信息学分析

TSS 前体(pre-TSS)由信号肽(signal peptide, S)、N 端前肽(N)、催化结构域(CD)、β-果冻卷结构域(βJR)和肽酶前体 C 末端结构域(prepeptidase C-terminal domain, PPC)组成(图 1A)。TSS 成熟酶(mTSS)与一株抗氧化碱性蛋白酶 KP-43 具有较高的氨基酸序列一致性，其中催化结构域相似度为 49%，βJR 结构域相似度为 44%。结合 TSS 与其他 S8 家族蛋白酶 Ca^{2+}结合位点的氨基酸多序列比对结果(图 1B)及 KP-43 的晶体结构，可预测 TSS 前体含有 3 个 Ca^{2+}结合位点(Ca1、Ca2 和 Ca3)，其中 Ca1 位于催化功能区，Ca2 和 Ca3 位于 βJR 结构域。

分别采用基于人工智能的蛋白质结构预测方法，包括基于 Rosetta 框架的转换、模板与比对折叠模型(rosetta transform, template, and align fold, RoseTTAFold)与同源模建方法(SWISS-MODEL)预测 TSS 的三级结构，结果显示 2 种方法得到的模型在分子整体结构与结构域分布特征上均呈现良好的匹配度(图 1C)。鉴于 TSS

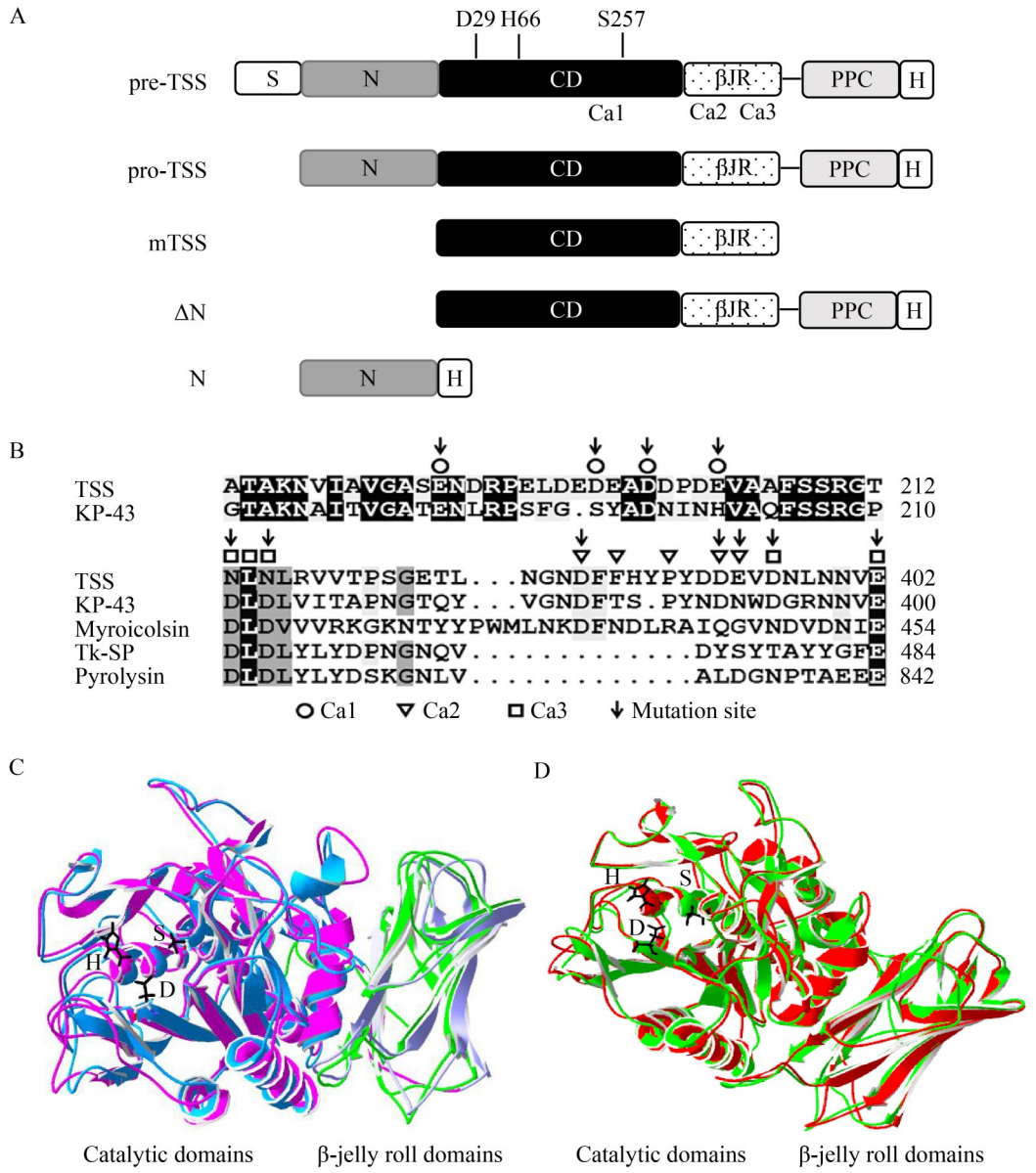


图1 TSS的生物信息学分析

Figure 1 Bioinformatics analysis of TSS. A: Schematic representation of the primary structures of the TSS precursor, proform, mature enzyme, N-terminal propeptide deletion protein and N-terminal propeptide; B: Alignment of amino acid sequence around the Ca^{2+}-binding sites of TSS and other S8 family proteases; C: Superimposition of 3D-structures of TSS predicted by two different methods; D: Superimposition of 3D-structures of TSS and KP-43. In A, the signal peptide (S), the N-terminal propeptide (N), the catalytic domain (CD), βJR and PPC domains, and the fused His-tag (H) are indicated. The locations of the active-site residues (D29, H66, and S257) and the three Ca^{2+}-binding sites (Ca1, Ca2 and Ca3) are also shown. pre-TSS: TSS precursor; pro-TSS: TSS proform; mTSS: Mature TSS. In B, the residues serving as Ca^{2+}-binding ligands in KP-43 (AB051423), Myroicolsin (AEC33275), Tk-SP (Q5JIZ5), Pyrolysin (AAB09761), and TSS (OBR56241) are all marked. Vertical arrows indicate the residues chosen for mutational analysis.

与 KP-43 具有较高的氨基酸序列一致性，本研究进一步使用 SpdbViewer 软件对预测得到的 TSS 三级结构与 KP-43 晶体结构进行叠加比对，结果显示二者在三级结构层面同样具有较高的匹配度(图 1D)。值得注意的是，TSS 与 KP-43 的催化结构域相似度较高，βJR 结构域则存在一定的结构差异，这与二者氨基酸序列一致性的差异特征完全吻合。

2.2 TSS 的酶学性质

在添加 2.0 mmol/L 金属螯合剂 EDTA 的反应体系中，mTSS 的催化活性极低，表明 TSS 的蛋白酶催化活性依赖 Ca^{2+}参与，这与 2.1 节中 TSS 含有 3 个预测 Ca^{2+}结合位点的结果相互印证。随着体系中 Ca^{2+}浓度逐步升高，mTSS 的活性同步提升，在 10.0−20.0 mmol/L Ca^{2+}条件下达到活性峰值(图 2A)。上述结果证实该酶是一种 Ca^{2+}浓度依赖性蛋白酶。值得注意的是，当缓冲液中不额外添加 Ca^{2+}时，测得的相对酶活性较含 2.0 mmol/L EDTA 的对照组高出约 35%，推测是由于 TSS 在大肠杆菌中异源表达过程中，其分子上的多个强 Ca^{2+}结合位点结合了部分来源于培养基的 Ca^{2+}，这些结合态 Ca^{2+}在后续的培养与纯化过程中仍稳定保留在酶分子内部，只有加入 EDTA 才能将其完全螯合去除。

本研究进一步在 75 ℃、pH 9.0 条件下分析不同盐浓度对 mTSS 热失活进程的影响(图 2B)。在 0.0 mol/L NaCl 条件下，mTSS 保温 4 h 后残余酶活约为 20%；随着 NaCl 浓度升高至 1.0−4.0 mol/L 区间，mTSS 保温 4 h 后的残余活性明显提升，在 4.0 mol/L NaCl 条件下达到最高值约 80%，说明盐浓度升高可显著增强 TSS 的热稳定性。综上可知，TSS 是一种 Ca^{2+}浓度依赖性蛋白酶，其催化活性与热稳定性的维持均需要 Ca^{2+}的参与。

前期研究发现 TSS 对大分子底物胶原蛋白(collagen)、偶氮胶原蛋白(azo dye-impregnated collagen, Azocoll)与小分子底物 *N*-琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺

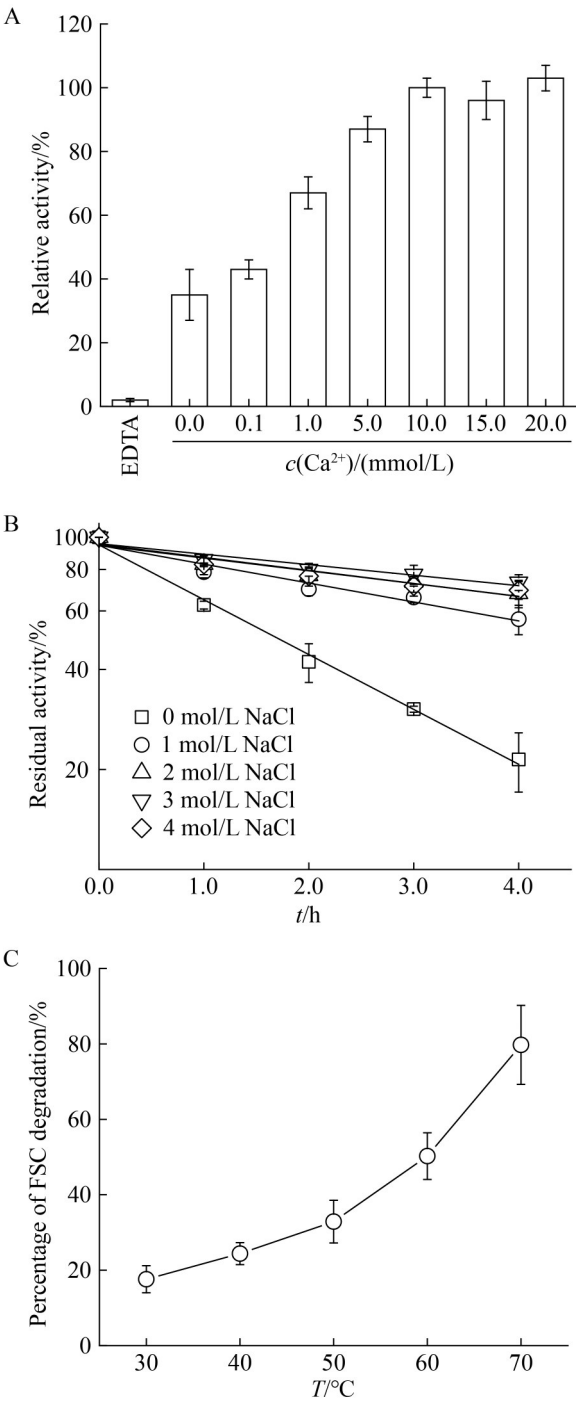


图2 TSS的酶学性质

Figure 2 Enzymatic properties of TSS. A: Effect of Ca^{2+} concentration on catalytic activity of TSS; B: Thermal inactivation curves of TSS at different salt concentrations; C: Percentage of FSC degradation at different temperatures.

(*N*-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide, suc-AAPF-pNA)呈现出差异化的降解行为[18]，本研究进一步使用鱼鳞胶原蛋白FSC模拟其对胶原蛋白类固体废弃物的降解效果(图2C)。在30−70 ℃区间内，TSS对FSC的降解效率呈非线性变化特征，整体随温度升高逐步提升，这也进一步印证了TSS属于嗜热型胶原蛋白水解酶的判定。因此，TSS具备作为胶原蛋白类固体废弃物降解用蛋白酶的潜力，拥有极高的研究与应用价值。

2.3 Ca^{2+}和盐浓度对TSS高温活性及加工成熟的影响

将pro-TSS表达产物的细胞可溶性组分在无额外Ca^{2+}的环境中于60 ℃保温1 h后，样品中的蛋白发生大量降解；而补加10.0 mmol/L Ca^{2+}的pro-TSS对应组分在相同条件下保温1 h后未发生明显降解，且全部完成酶原自加工成熟过程(图3A)；延长保温时间至4 h，蛋白条带仍未发生明显变化。这表明Ca^{2+}可显著提升TSS的热稳定性，同时可促进其酶原(pro-TSS)或中间体(intermediate, I)的加工成熟。

本研究进一步探究了在10.0 mmol/L Ca^{2+}存在的条件下，盐浓度对TSS加工成熟过程的影响(图3B)。pro-TSS表达产物的细胞可溶性组分在0.0−2.0 mol/L NaCl环境中于60 ℃保温1 h后，全部或大部分完成自加工成熟，催化活性在2.0 mol/L NaCl条件下达到峰值；未进行60 ℃保温处理的样品，以及在NaCl浓度高于3.0 mol/L的环境中保温的样品，均未检测到明显的蛋白酶活性；同时在2.0 mol/L NaCl处理组的样品中可检测到中间体(I)与N端前肽(N)的特征蛋白条带。上述结果表明：(1) pro-TSS的自加工成熟过程需要在含Ca^{2+}的高温(如60 ℃)环境中进行，且Ca^{2+}可显著加速该自加工成熟进程；(2)高浓度NaCl (3.0−5.0 mol/L)可抑制pro-TSS的自加工成熟；(3)在2.0 mol/L NaCl/10.0 mmol/L Ca^{2+}的条件下，Ca^{2+}的促进作用与高盐的抑制作用达到动态平衡，酶活性水平达到最高点，同时自加工产生的中间体与被切除的N端前肽(经历部分降解)均可被检测到。

值得注意的是，I、M和N在SDS-PAGE检测胶中均呈现为双条带特征(图3A、3B)，为明确该现象的产生机制，本研究开展了针对性验证实验。已有研究表明，将枯草杆菌蛋白酶类(subtilases)的催化Ser残基突变为Ala后，可使蛋白酶完全丧失催化活性；而将催化Ser残基突变为Cys后，可大幅降低蛋白酶活力但无法完全抑制其自加工活性，这类突变体在自加工切除N端前肽后难以进一步降解游离的N端前肽，因此无法完成完全成熟过程[24-25]，据此可通过构建SA/SC突变体解析subtilases的自加工成熟机制。本研究分别构建了TSS的SA/SC突变体(图3C)，其中pro-S257A在SDS-PAGE与免疫印迹分析中仅显示1条相对分子质量为110 kDa的条带，对应TSS的酶原形式；而pro-S257C样品中额外出现了78 kDa与22 kDa的特征条带，推测是由于TSS酶原发生自加工，切除22 kDa的N端前肽后生成78 kDa的中间体所致；由于pro-S257C的His-tag融合在C端，因此被切除的N端前肽无法在免疫印迹分析中被检测到(图3C)。

图3B中的样品a对应TSS的成熟酶(M)，由于TSS自加工成熟过程需要先后切除N端前肽与C端PPC结构域[18]，因此M无法在免疫印迹分析中被检测到(图3C)。本研究利用TSS具备明胶水解活性，且经/不经TCA预处理后在SDS-PAGE中的迁移率存在差异的特性，设计开展明胶印迹活性分析实验(图3D)，结果显示MTCA与MNon在SDS-PAGE和明胶印迹活性分析中均呈现双条带特征，说明MNon的2条条带均为具有催化活性的成熟酶(M)形式，MTCA的2条条带也符合该特征，同理可解释图3A中M的双条带现象。本研究推测，mTSS在较低浓度条件下(图3D中样品a经5倍稀释)会呈现双条带，而在较高浓度条件下(图3B中

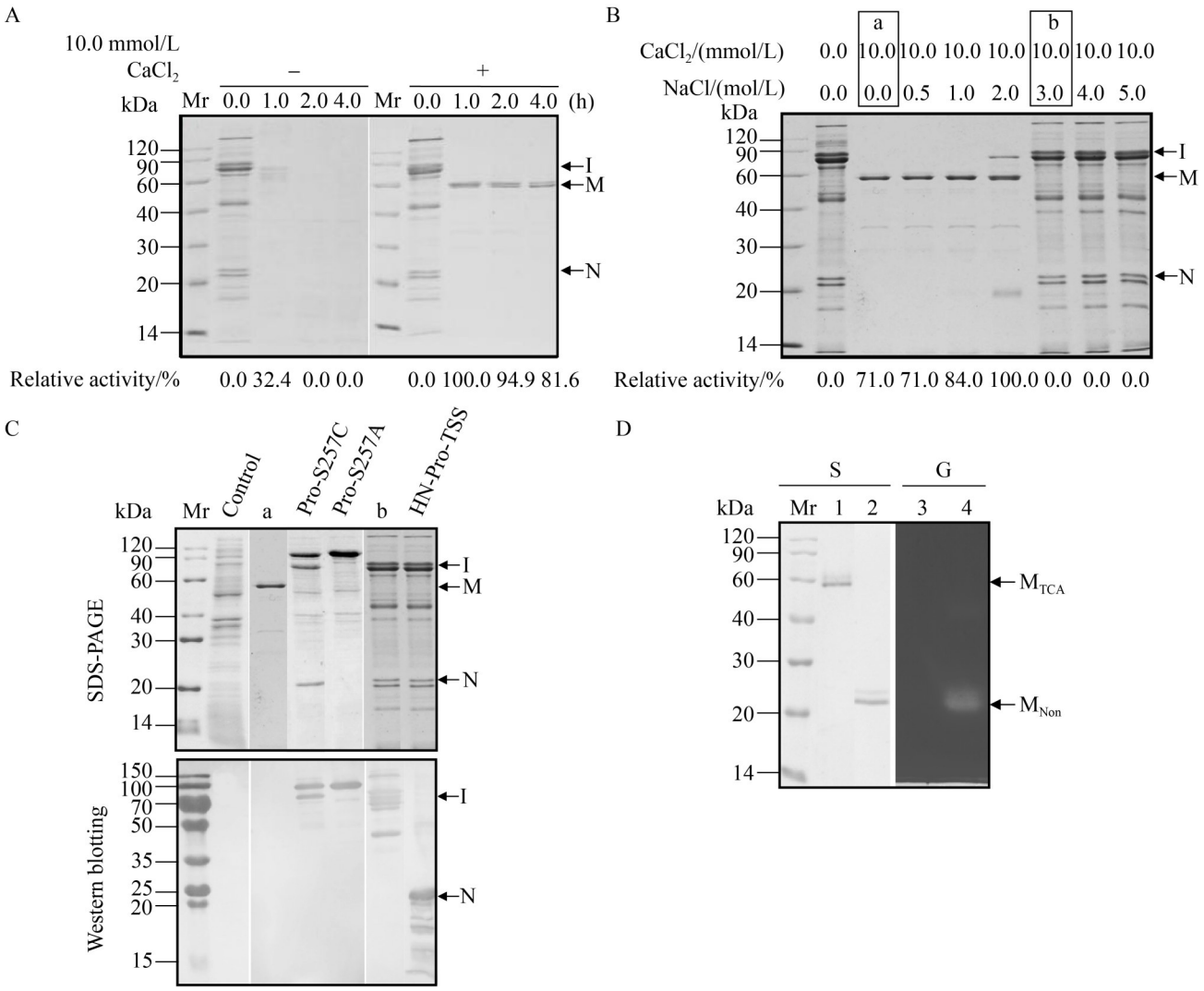


图3 Ca^{2+}和盐浓度对TSS热稳定性及加工成熟的影响

Figure 3 Effects of Ca^{2+} and salinity on thermostability and maturation of TSS. A: Effects of Ca^{2+} on thermostability and maturation of TSS; B: Effects of salinity on thermostability and maturation of TSS; C and D: Investigation of the dual-band phenomena observed for I, M and N. I, M and N indicate the positions of intermediates, mature enzymes and N-terminal propeptides on SDS-PAGE and Western blotting, respectively; Mr represents low molecular weight protein marker. In C, after IPTG, the total proteins from *Escherichia coli* cells harboring the empty pET-26b plasmid (Control) or expressing each recombinant protein were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (using an anti-His-tag antibody), samples a and b were derived from the conditions in Figure 3B. In D, sample a from Figure 3B was diluted 5-fold with Buffer A and analyzed *via* SDS-PAGE (S) and gelatin overlay assay (G), both with (lanes 1 and 3) and without (lanes 2 and 4) TCA pre-treatment. Control: The empty pET-26b plasmid; Pro-S257A: The active-site variant of TSS with the catalytic residue Ser^{257} mutated to Ala; Pro-S257C: The active-site variant of TSS with the catalytic residue Ser^{257} mutated to Cys; HN-Pro-TSS: recombinant TSS with the His-tag fused to the N-terminus (all other variants harbor a C-terminal His-tag); M_{TCA} and M_{Non} represent the band positions of mTSS in SDS-PAGE (S) and gelatin overlay assay (G) with/without TCA pre-treatment, respectively.

样品 a) 2 条条带发生重叠而显示为单一条带，图 3A 中 M 因蛋白浓度较低呈现双条带的结果，进一步印证了上述推测的合理性。

图 3B 中样品 b 的 I 组分在 SDS-PAGE 中呈现双条带，在免疫印迹分析中呈现多条带(图 3C)，这表明 pro-TSS 表达产物的细胞可溶性组分即使在高盐的抑制作用下，仍发生了部分加工成熟，生成了多个不同的中间体，本研究将样品 b 中与 pro-S257C 产生的 78 kDa 产物相对分子质量一致的条带定义为中间体(I)。由于 pro-TSS 的 His-tag 融合在 C 端，因此 SDS-PAGE 中可检测到的 2 条 N 端前肽条带无法在免疫印迹分析中被识别(图 3C)。本研究进一步构建了 N 端融合 His-tag 的 HN-pro-TSS，由于其发生了部分加工成熟，在免疫印迹分析中同样呈现多条带特征，本研究将样品 b 中与 pro-S257C 产生的 22 kDa 产物相对分子质量一致的条带定义为 N 端前肽(N)。

综上所述，78 kDa 产物为 TSS 的中间体(I)，58 kDa 产物为其成熟酶(M)，22 kDa 产物为酶原(pro-TSS)自加工切除下的 N 端前肽(N)(图 3A−3C)。

2.4 Ca^{2+}结合位点对 TSS 高温活性及热稳定性的影响

2.4.1 TSS 相关 Ca^{2+}结合位点定点突变体的构建

结合 TSS 与 KP-43、Myroicolsin、Tk-SP 和 Pyrolysin 的 Ca^{2+}结合位点氨基酸多序列比对结果(图 1B)及 KP-43 的晶体结构，可预测 TSS 共含有 3 个 Ca^{2+}结合位点(Ca1、Ca2 和 Ca3)，其中 Ca1 位于催化结构域，Ca2 和 Ca3 位于 βJR 结构域。本研究对每个 Ca^{2+}结合位点内的配位氨基酸残基进行定点突变[18]，构建了系列重组突变体(图 1A、1B)。其中针对 Ca1 位点构建了 6 个突变体(E187A、E187Q、D196S、D199A、D199N 和 E203H)；针对 Ca2 位点构建了 7 个突变体(D385A、D385N、D393A、D393N、E394A、E394N 和 E394Q)；针对 Ca3 位点构建了 6 个突变体(N368D、N370D、D396A、D396N、E402A 和 E402Q)。将上述突变体分别在大肠杆菌中异源表达，纯化获得各重组蛋白样品后开展系统的酶学性质检测。

2.4.2 Ca1 位点的作用

为明确 Ca1 位点对 TSS 热稳定性的调控作用，将该位点的系列突变体在 70 ℃条件下保温 3 h 后测定残余酶活性，并与野生型 mTSS 进行平行对比。结果显示，野生型 mTSS 经该热处理后仍可保留 80% 以上的残余活性；Ca1 位点各突变体(D196S、D199N 和 E203H)的残余活性均低于野生型 mTSS，其中 E187A、E187Q 和 D199A 在 70 ℃保温 3 h 后已完全丧失催化活性(图 4)。

本研究进一步测定了上述突变体的相对酶活性，结果显示 Ca1 位点不同突变体的催化活性相较于 mTSS 呈现出差异化的变化趋势(图 4)。例如，E187A 的催化活性仅为 mTSS 的 45% 左右，且在 70 ℃保温 3 h 后完全失活，推测该突变体的分子结构稳定性急剧下降，直接干扰了其正常催化功能的发挥。D196S 的热稳定性明显下降，但其相对酶活性较野生型提升约 30%，该现象可通过酶活性与稳定性的“代偿(Trade-off)”机制进行解释：酶分子的结构刚性与柔性呈负相关，结构刚性下降会伴随分子柔性提升，反之亦然，在酶学性质层面即表现为热稳定性与催化活性此消彼长的关联特征[26]。

对于其余突变体(E187Q、D199A、D199N 和 E203H)，其热稳定性下降的同时催化活性较 mTSS 出现小幅降低，该结果同样可通过“Trade-off”机制解释：这类突变体分子柔性提升带来的活性增益，不足以抵消结构稳定性下降对酶催化功能造成的负面影响，因此最终酶活性未超过野生型水平。上述结果表明，Ca1 位点对 TSS 的高温催化活性与热稳定性均具有关键调控作用。

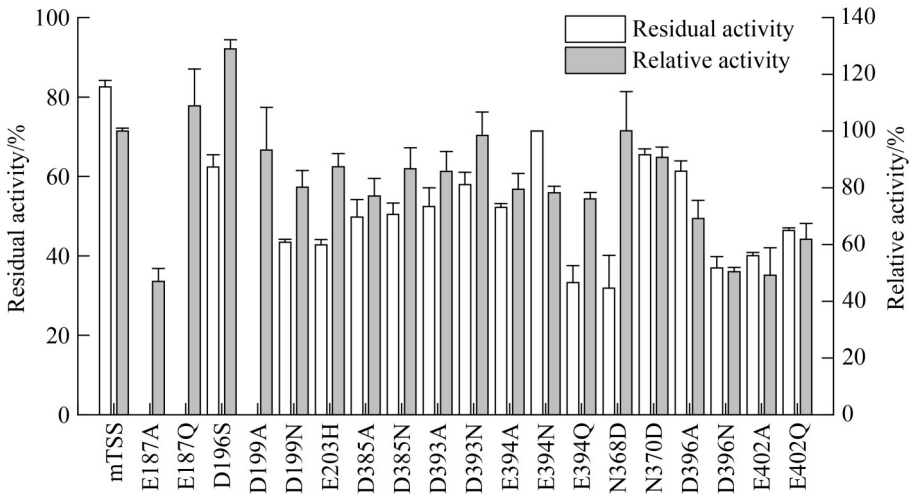


图4 TSS的Ca^{2+}结合位点定点突变体相对酶活性与热稳定性

Figure 4 Relative enzymatic activity and thermostability of TSS Ca^{2+}-binding site variants. White bars represent thermostability or residual activity, gray bars represent relative enzymatic activities.

2.4.3 Ca2 和 Ca3 位点的作用

与 Ca1 位点不同，Ca2 和 Ca3 位点均位于 TSS 的 βJR 结构域内(图 1A)。Ca2 与 Ca3 位点所有突变体的热稳定性和催化活性均低于野生型 mTSS (图 4)。该结果表明，Ca2 和 Ca3 位点对 TSS 的热稳定性与高温催化活性均具有重要影响，其作用机制可能是通过调控 βJR 结构域的自身稳定性，或调控 βJR 结构域与催化功能区的相互作用，最终影响酶分子的整体结构稳定性与催化功能。

TSS 的 Ca3 位点在多种同源酶的 βJR 结构域中高度保守，例如 KP-43[23]、Myroicolsin[27-28]、Tk-SP[29]以及 Pyrolysin[30]的对应 PPC 结构域中均存在该保守 Ca^{2+}结合位点(图 1B)。值得注意的是，其他同源酶中该位点保守存在的 2 个 Asp 残基，在 TSS 的 Ca3 位点中被替换为 Asn 残基(Asn^{368} 和 Asn^{370}) (图 1B)。将 TSS 中的 Asn^{368} 与 Asn^{370} 分别突变为 Asp 残基后，获得的突变体 N368D 和 N370D 的热稳定性较突变前进一步下降(图 4)，这说明在 Ca3 位点额外引入带负电荷的羧基基团会破坏 TSS 的分子结构稳定性，进而干扰酶分子的整体构象与催化功能。曾静等[31-32]的研究发现，来源于 *Pyrococcus furiosus* 的 Pyrolysin，其 PPC 结构域中对应 Ca^{2+}结合位点的 Asp^{818} 和 Asp^{820} 残基替换为 Asn 残基后，酶的热稳定性显著提升，该位点恰好对应 TSS Ca3 位点的 Asn^{368} 和 Asn^{370} 残基，其机制可能是 Asp 突变为 Asn 后消除了该 Ca^{2+}结合位点内不合理的静电斥力。由此推测，TSS 通过引入不带电荷的 Asn 替代 Asp 作为 Ca3 位点的配位残基，消除了位点内不适宜的静电斥力，最终实现酶热稳定性的提升，这可能是 TSS 适应高温环境的一种特殊进化策略。

2.5 TSS 系列突变体抗氧化性与高温催化活性及热稳定性的关系

TSS 与抗氧化蛋白酶 KP-43 具有较高的氨基酸序列一致性，参考 KP-43 已报道的抗氧化分子机制[23,33]，本研究针对 TSS 的特定位点 Leu^{253} 及蛋白分子表面易被氧化的 Met 残基构建系列突变体，通过测定各突变体的酶活力相关参数，系统探究 TSS 抗氧化性与催化活性、热稳定性之间的内在关联。

已有研究表明，subtilases 家族蛋白酶的催化残基 Ser 通常紧邻一个 Met 残基，该 Met 残

基被氧化后会阻碍水解反应四面体中间体的形成，进而抑制酶的催化活性；KP-43 的催化残基 Ser^{255} 紧邻 Met^{256}，在其上游不远处还存在另一个 Met^{251}。Nonaka 等[23]认为在氧化胁迫条件下，KP-43 中的 Met^{251} 会优先被氧化，从而延缓 Met^{256} 的氧化进程，最终提升 KP-43 的整体抗氧化能力；同时氧化型 KP-43 中 Met^{256} 上的亚砜氧原子与氧离子洞周围水分子的距离较远，进一步强化了 KP-43 的抗氧化特性。在 TSS 中，催化残基 Ser^{257} 紧邻 Met^{258}，而与 KP-43 的 Met^{251} 相对应的位点在 TSS 中为 Leu^{253}[18]。基于该序列特征，本研究构建了 TSS 针对 Leu^{253} 位点的系列突变体，同时对 TSS 分子表面全部 7 个 Met 残基进行逐一突变构建系列突变体，以期筛选出抗氧化性能提升的 TSS 突变体。

结果显示(图 5A、5B)，在抗氧化性发生改变的 Leu^{253} 系列突变体中，L253M 和 L253C 的催化活性和热稳定性与野生型 mTSS 相比无明显变化；L253A、L253I、L253G 和 L253S 的两项酶学性质均出现不同程度的下降；L253V 的热稳定性下降幅度远大于催化活性的下降幅度；L253D 的催化活性显著降低，同时热稳定性仅出现小幅下降；L253K 的抗氧化性与热稳定性均有所提升，但催化活性仅为野生型的 15%。上述结果表明，参考 KP-43 的抗氧化机制将 TSS 催化 Ser^{257} 上游的 Leu^{253} 突变为其他氨基酸

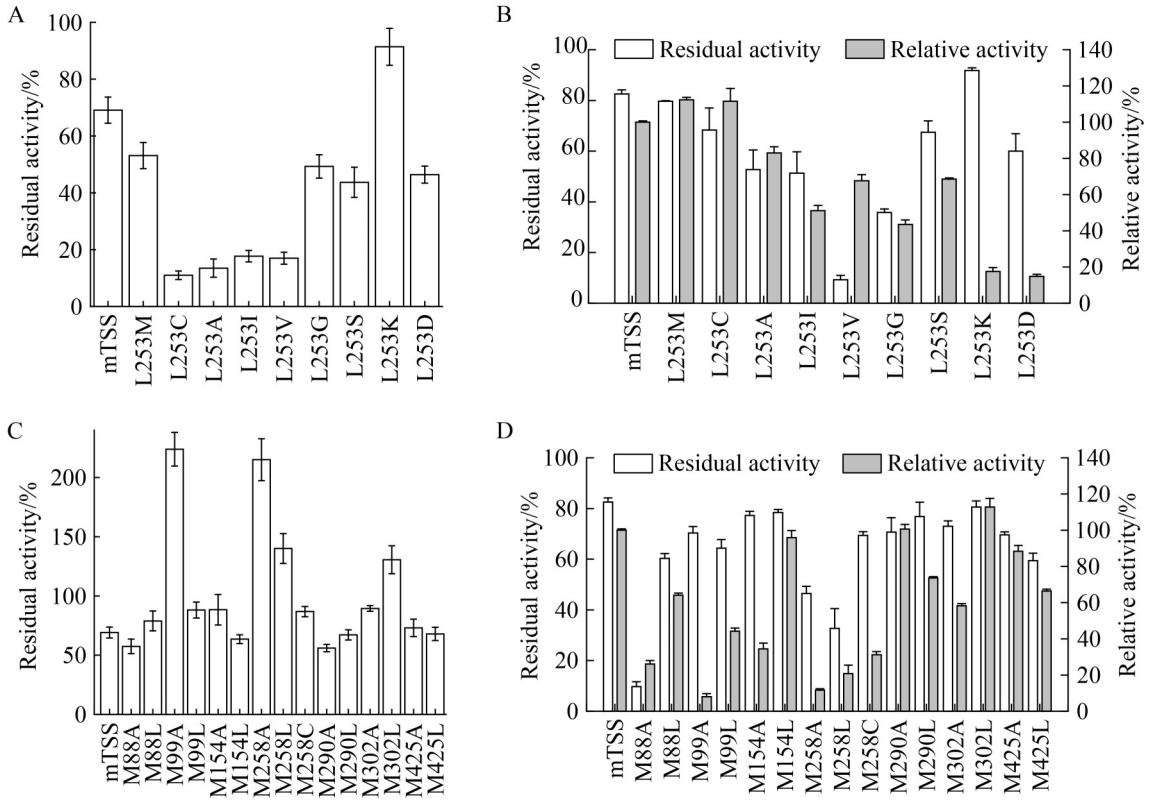


图5 Leu^{253}及Met系列突变体的抗氧化性、酶活性及热稳定性

Figure 5 Antioxidation properties, enzymatic activity and thermostability of Leu^{253} and Met variants. A: Antioxidant properties of Leu^{253} variants; B: Enzymatic activity and thermostability of Leu^{253} variants; C: Antioxidant properties of Met variants; D: Enzymatic activity and thermostability of Met variants. In A and C, Bars represent the antioxidant activities of different variants. In B and D, White bars represent thermostability or residual activity, while gray bars represent relative enzymatic activity.

残基时，受突变残基本身的电荷特性与空间位阻效应影响，突变体酶分子刚性提升带来的稳定性增益不足以抵消分子柔性下降对酶催化功能产生的负面效应。综上，在 Leu^{253} 系列突变体中，TSS 的抗氧化性与酶分子稳定性存在关联。

通过替换酶分子表面氧化敏感残基 Met 构建的系列突变体中(图 5C、5D)，M99A 和 M258A 的抗氧化能力较 mTSS 提升约 3 倍，热稳定性仅小幅下降，但二者的催化活性仅为野生型的 10% 左右。类似地，M88L、M99L、M154A、M258L/C 和 M302A 也呈现出同样的性质特征。这表明在 TSS 蛋白表面的 Met 位点引入突变会对酶分子的整体构象产生较大影响，推测其抗氧化能力的提升是由于该位点被氧化后在一定程度上维持了酶分子结构的完整性与稳定性。因此在 Met 系列突变体中，TSS 的抗氧化能力同样与酶分子稳定性密切相关。其中突变体 M302L 在热稳定性保持不变、催化活性提升 13% 的同时，抗氧化能力较 mTSS 提高 61%，说明该突变体的酶分子结构未发生破坏性改变，同时实现了抗氧化性能的提升。由此可见，对 TSS 特定位点的氧化敏感残基 Met^{302} 进行替换，可在不降低热稳定性的前提下有效提升该酶的抗氧化能力。

综上所述，蛋白结构柔性是酶发挥催化活性的基础，蛋白结构刚性是酶维持热稳定性的核心，热稳定性与催化活性之间完全符合“Trade-off”代偿机制，因此在 Leu^{253} 和 Met 两类抗氧化突变体中，TSS 的抗氧化性与催化活性也基本符合该“Trade-off”机制。

3 讨论与结论

TSS 的一级结构分析结果显示，其酸性氨基酸残基(Asp 和 Glu)占比高达 16.4%，直接导致其等电点(pI)低至 4.38。低 pI 的 mTSS 中，大量酸性氨基酸残基分布于酶分子表面，使得分子大部分区域带负电荷，活性位点周边区域的负电荷分布尤为密集；同时碱性氨基酸残基也集中分布在分子表面，在局部形成正电荷富集区域。经计算，mTSS 分子表面共形成 5 个键长≤4 Å 的盐桥和 19 个键长为 4–8 Å 的长距离离子对，其中 21 个离子对分布于酶分子表面，剩余 3 个位于催化功能区与 βJR 结构域的夹缝区域[18]。已有大量研究证实，分子表面的离子对与离子网络是调控蛋白酶热稳定性的关键因素[34-36]，极端嗜热蛋白酶的晶体结构解析结果也进一步表明，离子对在维持极端嗜热酶的结构稳定性中发挥重要作用[37-38]。TSS 分子表面密集的正负电荷区域与丰富的离子对网络，共同赋予了该蛋白酶较高的结构刚性，使其能够有效适应高温环境。

TSS 同时展现出优异的耐盐特性，随着 NaCl 浓度逐步升高至 4.0 mol/L，其热稳定性持续提升，这种高耐盐表型在其他嗜热微生物来源的胶原蛋白水解酶中尚未见报道[39-44]。Ding 等[45]研究发现，高浓度 NaCl 可提升来源于 *Thermoactinomyces vulgaris* CDF 枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶 Als (QBK13760)的热稳定性。已有研究证实，分子表面的酸性氨基酸残基可在蛋白外围形成致密的水化膜，这是嗜盐蛋白酶在高盐环境下维持结构稳定性的核心机制；但嗜盐蛋白酶在低盐条件下会因分子表面过多负电荷基团间的静电斥力引发构象破坏，最终导致结构失活[46-49]。由此可见，高比例的酸性氨基酸残基赋予 TSS 更多形成 Ca^{2+}结合位点的潜在可能，同时大幅增加了分子内离子对与离子网络的数量。在该层面上，TSS 与 Als 均采用了类似嗜盐蛋白酶的进化策略，通过提升酸性氨基酸残基占比来适应高盐环境[18,45-46,50]，同时同步实现了酶热稳定性的提升。

TSS 的 3 个 Ca^{2+}结合位点(Ca1、Ca2 和 Ca3)对该酶的成熟加工、催化活性维持与结构稳定性均具有关键调控作用[18]。参与形成 Ca^{2+}结合位点的氨基酸残基发生改变后，会影响酶分子对 Ca^{2+}的结合能力，同时破坏位点周边的局部

静电平衡，进而干扰酶分子的结构刚性，以及催化功能区与 βJR 结构域之间的相互作用，最终表现为酶活性或热稳定性的改变。绝大多数 Ca^{2+}结合位点定点突变体的活性与稳定性之间的关联特征均可通过“Trade-off”代偿机制得到合理解释[26,51]，即催化活性的提升通常伴随热稳定性的下降，反之热稳定性的提升也往往以催化活性的降低为代价。

与 TSS 具有较高氨基酸序列一致性、进化距离较近的蛋白酶 KP-43 具备优异的抗氧化性能[18,23,52]，其抗氧化机制已被明确：在氧化胁迫条件下，Met^{251} 优先发生氧化，从而延缓了 Met^{256} 的氧化进程，最终实现 KP-43 整体抗氧化能力的提升[23]。本研究参考 KP-43 的抗氧化机制构建的 TSS Leu^{253} 位点系列突变体，并未获得抗氧化能力提升的突变体，其原因是该位点的突变直接干扰了酶分子的结构刚性与催化柔性的平衡。本研究进一步将 mTSS 分子表面 7 个易被氧化的 Met 残基分别突变为 Ala、Leu 和 Cys，构建了系列突变体，酶学性质检测结果显示，与其他突变体相比，突变体 M302L 的抗氧化性和催化活性较 mTSS 分别提高 61% 和 13%，且热稳定性与野生型完全相当。这说明对 TSS 特定位点的氧化敏感残基 Met^{302} 进行替换，可在完全不降低酶热稳定性的前提下，有效提升其抗氧化性能。因此在 TSS 的两类抗氧化突变体(Leu^{253} 系列与 Met 系列突变体)中，其抗氧化性与催化活性之间的关联特征也基本符合“Trade-off”代偿机制。

综上所述，本研究针对 TSS 的多个关键功能位点开展系统的定点突变研究，得到以下核心结论：(1)验证了 TSS 中预测的 3 个 Ca^{2+}结合位点(Ca1、Ca2 和 Ca3)的功能有效性，对其中任意配位氨基酸残基进行突变，均会导致 TSS 的热稳定性与催化活性降低；(2)在保持热稳定性不变的前提下，筛选获得了催化活性提升 13%、抗氧化能力提升 61% 的优良突变体 M302L；(3)酶学性质表征结果证实，TSS 是一种 Ca^{2+}依赖性蛋白酶，NaCl 和 Ca^{2+}均可提升该酶的热抵抗能力并促进其催化活性，但二者在 TSS 酶原的自加工成熟过程中发挥完全相反的调控作用：Ca^{2+}起促进作用，高浓度 NaCl 起抑制作用。系统解析 TSS 抗氧化性、高温催化活性与热稳定性之间的内在关联，对推动该酶在高温高盐、强氧化等极端环境下实现胶原蛋白类固体废弃物的降解与高值化循环利用具有重要意义，同时可为胶原蛋白活性短肽的绿色生产、海洋来源鱼鳞胶原蛋白固体废弃物的无害化处理等应用领域提供直接的实验参考与理论支撑。

作者贡献声明

张魁：总体构思、数据管理与初稿写作；朱敏、苏芸芸、王喜龙：调查研究；郭倩、王志科：提供资源；刘秀丽、刘海卿：项目管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本研究所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] 厉盈颖, 张俊杰, 吴志明, 马德蓉. 胶原蛋白的制备、生物学特性及应用[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 192-196.
Li YY, Zhang JJ, Wu ZM, Ma DR. The preparation, biological characteristics and application of collagen[J]. The Food Industry, 2021, 42(8): 192-196 (in Chinese).

[2] 何杏杏, 赵越, 鲁朝刚, 李想. 胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白在化妆品中的功效及评价研究[J]. 精细与专用化学品, 2023, 31(10): 39-43.
He XX, Zhao Y, Lu CG, Li X. Study on the efficacy and evaluation of collagen, elastin and fibronectin in cosmetics[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2023, 31(10): 39-43 (in Chinese).

[3] Azhar MS, Abdullah S, Poh A, Soh E, Lim CH.. Ovine tendon collagen as dermal substitute for hand wound coverage: a case report[J]. Malaysian Orthopaedic Journal, 2025, 19(3): 135-138.

[4] 董烨. 鱼鳔胶原蛋白肽的制备及其促皮肤创面愈合的机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2024.
Dong Y. Preparation of swim bladder collagen peptide and study of its mechanisms in promoting skin wound healing[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2024 (in Chinese).

[5] Li J, Cheng JH, Teng ZJ, Sun ZZ, He XY, Wang P, Shi M, Song XY, Chen XL, Zhang YZ, Tian XM, Zhang XY.

Taxonomic and enzymatic characterization of *Flocculibacter collagenilyticus* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium with high collagenase production[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 621161.

[6] Xiao H, Liu XF, Feng YZ, Zheng L, Zhao MM, Huang MT. Secretion of collagenases by *Saccharomyces cerevisiae* for collagen degradation[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 89.

[7] Ku G, Kronenberg M, Peacock DJ, Tempst P, Banquerigo ML, Braun BS, Reeve JR Jr, Brahn E. Prevention of experimental autoimmune arthritis with a peptide fragment of type II collagen[J]. European Journal of Immunology, 1993, 23(3): 591-599.

[8] Myers LK, Tang B, Rosloniec EF, Stuart JM, Chiang TM, Kang AH. Characterization of a peptide analog of a determinant of type II collagen that suppresses collagen-induced arthritis[J]. The Journal of Immunology, 1998, 161(7): 3589-3595.

[9] Sayeed S, Fernandez-Miyakawa ME, Fisher DJ, Adams V, Poon R, Rood JI, Uzal FA, McClane BA. Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(11): 7413-7421.

[10] Nitulescu G, Mihai DP, Zanfirescu A, Stan MS, Gradinaru D, Nitulescu GM. Discovery of new microbial collagenase inhibitors[J]. Life, 2022, 12(12): 2114.

[11] Harrington DJ. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(6): 1885-1891.

[12] MacLennan JD, Mandl I, Howes EL. Bacterial digestion of collagen[J]. Journal of Clinical Investigation, 1953, 32(12): 1317-1322.

[13] Duarte AS, Correia A, Esteves AC. Bacterial collagenases: a review[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2016, 42(1): 106-126.

[14] Gao BY, Tan CM, Roshani D, Yang RQ, Lv ZH, Li PL, Shang N. Microbial collagenases: an updated review on their characterization, degradation mechanisms, and current applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2025, 65(29): 6269-6293.

[15] Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102(2): 73-81.

[16] Vadillo J, Montes S, Grande HJ, Beeckman E, Verstichel S, Almqvist J. Impact of steam-exploded feather incorporation on the biodegradation performance of renewable biocomposites[J]. Polymers, 2025, 17(7): 910.

[17] Peng HX, Liang MY, Zhang J, Liu WB, Yang YH, Sun YJ, Ke FM, Wen YJ, Liu SY, Xu BL, Gao XW. Identification and characterization of a versatile keratinase, KerZJ, from *Stenotrophomonas* sp. LMY[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(1): 30.

[18] Zhang K, Huang QQ, Li Y, Liu LH, Tang XF, Tang B. Maturation process and characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin-like protease with high collagenolytic activity but low gelatinolytic activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(3): e02184-21.

[19] Li J, Cheng JH, Teng ZJ, Zhang X, Chen XL, Sun ML, Wang JP, Zhang YZ, Ding JM, Tian XM, Zhang XY. A novel gelatinase from marine flocculibacter collagenilyticus SM1988: characterization and potential application in collagen oligopeptide-rich hydrolysate preparation[J]. Marine Drugs, 2022, 20(1): 48.

[20] Wu J, Bian Y, Tang B, Chen XD, Shen P, Peng ZR. Cloning and analysis of WF146 protease, a novel thermophilic subtilisin-like protease with four inserted surface loops[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(2): 251-258.

[21] Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82: 488-492.

[22] Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, Wang J, Cong Q, Kinch LN, Schaeffer RD, Millan C, Park H, Adams C, Glassman CR, DeGiovanni A, Pereira JH, Rodrigues AV, van Dijk AA, Ebrecht AC, Opperman DJ, Sagmeister T, Buhlheller C, Pavkov-Keller T, Rathinaswamy MK, Dalwadi U, Yip CK, Burke JE, Garcia KC, Grishin NV, Adams PD, Read RJ, Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network[J]. Yearbook of Paediatric Endocrinology, 2021, 373(6557): 871-876.

[23] Nonaka T, Fujihashi M, Kita A, Saeki K, Ito S, Horikoshi K, Miki K. The crystal structure of an oxidatively stable subtilisin-like alkaline serine protease, KP-43, with a C-terminal β-barrel domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(45): 47344-47351.

[24] Tanaka SI, Saito K, Chon H, Matsumura H, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Crystal structure of unautoprocessed precursor of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon evidence for Ca^{2+}-induced folding[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(11): 8246-8255.

[25] Zhu H, Xu BL, Liang XL, Yang YR, Tang XF, Tang B. Molecular basis for auto- and hetero-catalytic maturation of a thermostable subtilase from thermophilic *Bacillus* sp. WF146[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(48): 34826-34838.

[26] Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes[J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75: 403-433.

[27] Ran LY, Su HN, Zhou MY, Wang L, Chen XL, Xie BB, Song XY, Shi M, Qin QL, Pang XH, Zhou BC, Zhang YZ, Zhang XY. Characterization of a novel subtilisin-like protease myroicolsin from deep sea bacterium *Myroides profundi* D25 and molecular insight into its collagenolytic mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(9): 6041-6053.

[28] Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(18): 6098-6107.

[29] Foophow T, Tanaka S, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* kodakaraensis with N- and C-terminal propeptides[J]. Protein Engineering Design and Selection, 2010, 23(5): 347-355.
[30] Voorhorst WGB, Eggen RIL, Geerling ACM, Platteeuw C, Siezen RJ, de Vos WM. Isolation and characterization of the hyperthermostable serine protease, pyrolysin, and its gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(34): 20426-20431.
[31] Zeng J, Gao XW, Dai Z, Tang B, Tang XF. Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca^{2+}-binding site[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2763-2772.
[32] Dai Z, Fu HT, Zhang YF, Zeng J, Tang B, Tang XF. Insights into the maturation of hyperthermophilic pyrolysin and the roles of its N-terminal propeptide and long C-terminal extension[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4233-4241.
[33] Denesyuk AI, Denessiouk K, Johnson MS, Uversky VN. Structural catalytic core in subtilisin-like proteins and its comparison to trypsin-like serine proteases and alpha/beta-hydrolases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(22): 11858.
[34] Voorhorst WG, Warner A, de Vos WM, Siezen RJ. Homology modelling of two subtilisin-like proteases from the hyperthermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus stetteri*[J]. Protein Engineering Design and Selection, 1997, 10(8): 905-914.
[35] Karshikoff A, Nilsson L, Ladenstein R. Rigidity versus flexibility: the dilemma of understanding protein thermal stability[J]. The FEBS Journal, 2015, 282(20): 3899-3917.
[36] Pierpont CL, Baroch JJ, Church MJ, Miller SR. Idiosyncratic genome evolution of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* at the limits of phototrophy[J]. The ISME Journal, 2024, 18(1): wrae184.
[37] Vetriani C, Maeder DL, Tolliday N, Yip KS, Stillman TJ, Britton KL, Rice DW, Klump HH, Robb FT. Protein thermostability above 100 ℃: a key role for ionic interactions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(21): 12300-12305.
[38] Kumar A, Dutt S, Bagler G, Ahuja PS, Kumar S. Engineering a thermo-stable superoxide dismutase functional at sub-zero to >50 ℃, which also tolerates autoclaving[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 387.
[39] Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H, Oyama H, Oda K, Nishino T. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 162-169.
[40] Okamoto M, Yonejima Y, Tsujimoto Y, Suzuki Y, Watanabe K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(1/2): 103-108.
[41] Petrova DH, Shishkov SA, Vlahov SS. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties[J]. Journal of Basic Microbiology, 2006, 46(4): 275-285.
[42] Zhao GY, Chen XL, Zhao HL, Xie BB, Zhou BC, Zhang YZ. Hydrolysis of insoluble collagen by deseasin MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(52): 36100-36107.
[43] Kurata A, Uchimura K, Kobayashi T, Horikoshi K. Collagenolytic subtilisin-like protease from the deep-sea bacterium *Alkalimonas collagenimarina* AC40T[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 589-598.
[44] 赵国琰. 深海适冷蛋白酶MCP-01对胶原蛋白的催化机制及其在肉类嫩化中的应用基础研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
Zhao GY. Collagenolysis mechanism of deep-sea cold-adapted protease MCP-01 and its potential in meat tenderization[D]. Jinan: Shandong University, 2011 (in Chinese).
[45] Ding YD, Yang Y, Ren YX, Xia JY, Liu F, Li Y, Tang XF, Tang B. Extracellular production, characterization, and engineering of a polyextremotolerant subtilisin-like protease from feather-degrading *Thermoactinomyces vulgaris* strain CDF[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 605771.
[46] Mokashe N, Chaudhari B, Patil U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 493-522.
[47] Lanyi JK. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1974, 38(3): 272-290.
[48] Bandyopadhyay AK, Islam RNU, Mitra D, Banerjee S, Yasmeen S, Goswami A. Insight into the salt bridge of malate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* and *Escherichia coli*[J]. Bioinformation, 2019, 15(2): 95-103.
[49] Yavari-Bafghi M, Ali Amoozegar M. Pharmaceutical applications of halophilic enzymes[J]. Heliyon, 2025, 11(4): e42754.
[50] Falkenberg F, Voß L, Bott M, Bongaerts J, Siegert P. New robust subtilisins from halotolerant and halophilic *Bacillaceae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(12): 3939-3954.
[51] Liu Y, Jia KZ, Chen HY, Wang ZL, Zhao W, Zhu LW. Cold-adapted enzymes: mechanisms, engineering and biotechnological application[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2023, 46(10): 1399-1410.
[52] Biver S, Portetelle D, Vandenbol M. Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics[J]. SpringerPlus, 2013, 2: 410.