

# 通过 N 端引入芳香族氨基酸提高木聚糖酶的热稳定性

柏文琴<sup>1,2</sup>, 杨鲁红<sup>1</sup>, 马延和<sup>2,3</sup>

1 山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041004

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

3 中国科学院微生物研究所 工业酶国家工程实验室, 北京 100101

柏文琴, 杨鲁红, 马延和. 通过 N 端引入芳香族氨基酸提高木聚糖酶的热稳定性. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1217-1224.

Bai WQ, Yang LH, Ma YH. Improving thermal stability of xylanase by introducing aromatic residues at the N-terminus. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1217-1224.

**摘要:**耐热的木聚糖酶具有用于造纸、麻类脱胶和饲料生产等工业领域的巨大潜力, 为了提高 11 家族碱性木聚糖酶 Xyn11A-LC 的热稳定性, 通过理性设计在 N-末端引入了芳香族氨基酸 (T9Y 和 D14F)。测定野生型和突变体的性质表明, 突变体的最适反应温度和热稳定性均获得了提高。突变体的最适反应温度比野生型提高了 5 °C。野生型在 65 °C 的 Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中的半衰期为 22 min, 而突变体在此条件下的半衰期为 106 min。圆二色光谱测定结果显示野生型和突变体的  $T_m$  分别为 55.3 °C 和 67.9 °C。因此, 通过在 N-末端引入芳香族氨基酸可以提高 11 家族木聚糖酶的热稳定性和在高温下的活性。

**关键词:**木聚糖酶, 热稳定性, 芳香族氨基酸, 疏水作用

**Received:** April 1, 2014; **Accepted:** May 19, 2014

**Supported by:** Chinese Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-015), National Natural Science Foundation of China (No. 31301245).

**Corresponding author:** Luhong Yang. Tel: +86-357-2051196; E-mail: ylh1010309@126.com

中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-015), 国家自然科学基金 (No. 31301245) 资助。

网络出版时间: 2014-05-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140194.html>

# Improving thermal stability of xylanase by introducing aromatic residues at the N-terminus

Wenqin Bai<sup>1,2</sup>, Luhong Yang<sup>1</sup>, and Yanhe Ma<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, Shanxi, China

<sup>2</sup> National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>3</sup> National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Thermophilic and alkalophilic xylanases have great potential in the pulp bleaching industry. In order to improve the thermal stability of an alkaline family 11 xylanase Xyn11A-LC, aromatic residues were introduced into the N-terminus of the enzyme by rational design. The mutant increased the optimum temperature by 5 °C. The wild type had a half-time of 22 min at 65 °C and pH 8.0 (Tris-HCl buffer). Under the same condition, the mutant had the half-time of 106 min. CD spectroscopy revealed that the melting temperature ( $T_m$ ) values of the wild type and mutant were 55.3 °C and 67.9 °C, respectively. These results showed that the introduction of aromatic residues could enhance the thermal stability of Xyn11A-LC.

**Keywords:** xylanase, thermal stability, aromatic residues, hydrophobic interaction

木聚糖酶 (EC 3.2.1.8) 是降解植物细胞壁中半纤维素木聚糖的关键酶。由于具有应用于造纸、饲料生产、食品加工、麻类脱胶以及生物燃料开发等工业领域的潜力,木聚糖酶越来越引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。在许多工业应用过程中,由于降温过程耗费能量且工艺繁琐,或者高温可以提高底物的溶解度、降低污染率等原因,嗜热的或耐热的木聚糖酶显示出很强的优势<sup>[1]</sup>。尽管目前分离了大量的木聚糖酶,但是大多数是中温酶。因此,需要通过蛋白质工程对酶进行分子改造,提高其嗜热和/或热稳定性。

目前,通过序列比对,晶体结构分析及突变研究,发现耐热木聚糖酶和非耐热木聚糖酶结构非常相似,热稳定性可能仅由大量的微小修饰累计造成<sup>[1]</sup>。这些修饰包括提高离子键和氢键数目<sup>[2-3]</sup>、增强分子内包装<sup>[2]</sup>、额外的疏水相互作用<sup>[4-6]</sup>、提高表面带电荷氨基酸数目及降低对化学变化敏感的氨基酸数目(Ser、Thr、Asn 及 Qln)<sup>[7-8]</sup>、

N-末端额外的 $\beta$ -链<sup>[2]</sup>、热稳定区的存在<sup>[9]</sup>、高比例的 Ser/Thr 及高含量的 $\beta$ -折叠<sup>[2]</sup>、在 N-末端或 C-末端或 $\alpha$ -螺旋位置引入二硫键<sup>[10-12]</sup>。这些修饰可以加强分子内和/或分子间的相互作用,从而导致酶分子更加稳定。这些信息为提高木聚糖酶的分子改造提供了一定的理论指导。

11 家族木聚糖酶 N-末端的稳定对酶整体结构的稳定起重要作用。研究表明,用来源于褐色高温单孢菌 *Thermomonospora fusca* 的嗜热木聚糖酶 TfxA 的 N-末端 33 个氨基酸替换来源于橄榄绿链霉菌 *Streptomyces olivaceovirdis* 的中温酶 SoxB 相应末端,会提高中温酶的热稳定性。进一步分析发现,热稳定性的提高主要由于 N-末端的 5 个氨基酸的替换 (T11Y、N12H、N13D、F15Y 和 Y16F)<sup>[6]</sup>。

前期工作中,我们从芽胞杆菌 *Bacillus* sp. SN5 中分离了碱性中温木聚糖酶 Xyn11A-LC,该酶是目前报道的具有最高催化活性的碱性木

聚糖酶 (比活力为 4511.9 U/mg), 具有应用在工业领域尤其是纸浆助漂中的巨大潜力 (相关文章待发表)。其晶体结构已经解析 (PDB code: 4IXL)<sup>[13]</sup>。通过与来源于 *T. fusca* 嗜热木聚糖酶 TfxA 的 N-末端序列比对及结构分析, 在 Xyn11A-LC 的 N-末端引入芳香族氨基酸。突变体提高了酶在高温下的活性及热稳定性, 更适合用于工业领域中。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 和质粒 pET28a 购自 Novagen 公司, 分别用作基因表达的宿主和载体。携带碱性木聚糖酶 Xyn11A-LC 基因的质粒作为定点突变的模板。限制性内切酶 *Dpn* I 和 *Pyrobest* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。底物山毛榉木聚糖购自 Sigma 公司。His·Bind 纯化试剂盒购自 Novagen 公司。Quick Start™ Bradford 蛋白检测试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 突 变 位 点 的 选 择

用在线软件 ClustalW2 对 Xyn11A-LC 和来源于 *T. fusca* 嗜热木聚糖酶 TfxA<sup>[14]</sup> 进行 N-末端序列的比对, 寻找 TfxA 中对热稳定性起重要作用的 5 个氨基酸位点 (9Y、10H、11D、13Y 和 14F) 在 Xyn11A-LC 中对应的氨基酸位点。将

其中存在的两个差异位点进行定点突变 (T9Y 和 D14F)。用 Swiss-PdbViewer 软件分析野生型和突变体的结构。用 Pymol 软件制作结构图片。

#### 1.2.2 定 点 突 变

设计以上突变位点 (T9Y 和 D14F) 的突变引物, 序列信息见表 1。以携带 Xyn11A-LC 基因的质粒 pET28a-Xyn11A-LC 为模板<sup>[13]</sup>, 用高保真的 *Pyrobest* 聚合酶, PCR 扩增全质粒实现定点突变。

PCR 循环条件: 预变性: 95 °C 2 min; 扩增循环: 95 °C 35 s, 58 °C 1 min, 68 °C 6.5 min, 循环 16 次; 68 °C 延伸 20 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

#### 1.2.3 PCR 产物的转化

PCR 产物用 *Dpn*I 37 °C 酶切过夜, 80 °C 处理 15 min 使酶失活, 化学转化法转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。挑取克隆测序验证。

#### 1.2.4 野生型及突变体酶的表达及纯化

将含有野生型和突变体基因的转化子分别在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中培养至  $OD_{600}$  约 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 继续诱导培养 6 h。5 000 ×g 离心 10 min 收集细胞, 超声破碎后获得粗酶液。用 His·Bind 纯化试剂盒进行蛋白的纯化, 具体步骤参照操作说明书。用 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测纯化后的蛋白纯度。用 Bio-Rad 蛋白浓度测定试剂盒检测纯化后的蛋白浓度。

表 1 定点突变引物序列

Table 1 The primers in site-directed mutation

The mutant	Amino acid substitution	Base change	Template	The forward primer (5'-3')	The reverse primer (5'-3')
A11	T9Y	ACA→TAT	Wild type	GGAAATGAAATCGGCTATCA TGACGGCTATGAC	GTCATAGCCGTCATGATAGCCG ATTTCATTTC
A12	T9Y; D14F	GAC→TTC	A11	TATCATGACGGCTATTCTAT GAGTTTTGGAAG	CTTCCAAAACATAGAAATAG CCGTCATGATA

### 1.2.5 野生型及突变体酶活性及热稳定性的测定

采用 DNS 法,具体参照文献[15]。底物溶液为用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /柠檬酸缓冲液 (pH 7.5) 配制 1% 浓度的山毛榉木聚糖。野生型和突变体的最适温度测定条件为,酶在 50、55、60、65 °C 分别反应 10 min。

野生型及突变体动力学参数测定条件:用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /柠檬酸缓冲液 (pH 7.5) 配制浓度分别 1、2、4、6、8、10 和 12 mg/mL 的山毛榉木聚糖,20  $\mu\text{L}$  酶液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入到 480  $\mu\text{L}$  上述不同浓度的底物溶液中,置于最适反应温度下反应 5 min。用 Graphpad Prism 5.0 计算出  $V_{\max}$  和  $K_m$ 。

热失活的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 测定条件:将 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的野生型或突变体蛋白,在 Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中 65 °C 保温不同时间取样,测定残余酶活。用 Excel 软件拟合热失活曲线,计算半衰期  $t_{1/2}$ [6]。

用圆二色光谱仪 (英国光物理公司产品) 测定野生型及突变体的  $T_m$  值。测定光谱范围为 200–260 nm,温度范围为 36–82 °C。测定溶液为含有 8  $\mu\text{mol}/\text{L}$  蛋白样品的 20 mmol/L Tris/HCl (pH 8.0)。实验数据的分析用 Global 3™ 分析软件 (<http://www.photophysics.com/software/global-3-analysis-software>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变位点的选择

将 Xyn11A-LC 与 TfxA 进行 N-末端序列比对发现,对 TfxA 的热稳定性起重要作用的 5 个位点 (9Y、10H、11D、13Y 和 14F) 在 Xyn11A-LC 中对应的分别为 9T、10H、11D、13Y 和 14F。5 个氨基酸中有 2 个位点存在差异,即 T9Y 和 D14F。因此,选择这两个位点定点突变。前期研究工作中已经解析了 Xyn11A-LC 的三维结构[15],我们利用野生型的结构分析两个位点突变后的

突变体 AI2 的结构,发现这两个芳香族氨基酸分别位于  $\beta$  链 B1 和 B2 上,两个苯环中心距离为 6.67 Å,可能存在芳香环的相互作用,见图 1。因此,选定这两个突变位点 (T9Y 和 D14F),可能会增强  $\beta$ 1- $\beta$ 2 链之间的稳定性。

### 2.2 定点突变

利用 PCR 法扩增全质粒进行定点突变,获得突变体 AI2 (T9Y 和 D14F) 的 PCR 产物,大小约为 6 kb,与预测结果基本一致。PCR 产物经 *Dpn* I 37 °C 酶切过夜并热处理使酶失活后,化学法转入 *E. coli* BL21(DE3),测序验证了序列的正确。

### 2.3 野生型与突变体酶的表达和纯化

将转入野生型和突变体质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 菌株,在 0.5 mmol/L IPTG 的诱导下,37 °C 培养 6 h 后,超声破碎获得粗酶液。用 Ni 柱亲和层析纯化,SDS-PAGE 电泳检测纯化的效果见图 2。从图中可以看出,尽管只采用 Ni 柱亲和层析纯化,但是得到电泳纯的野生型和突变体酶。目标条带与预期的分子量保持一致,突变体的分子量 (27.4 kDa) 略大于野生型 (27.3 kDa)。

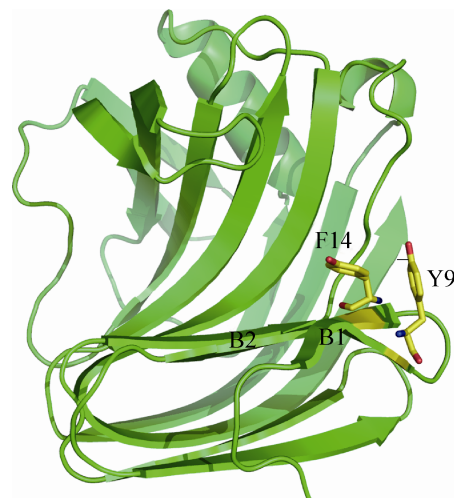


图 1 N-端芳香族氨基酸的引入结构图

Fig. 1 Introduction of aromatic acid residues in the N-terminus.

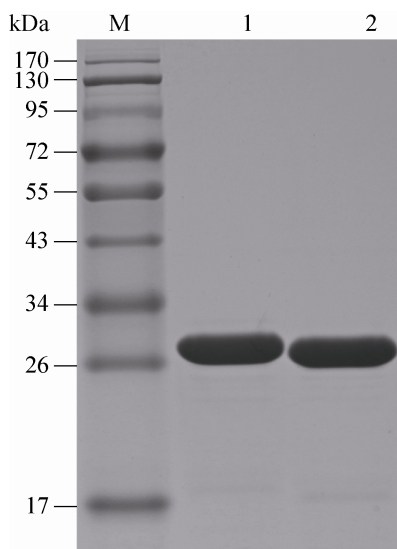


图 2 纯化的 Xyn11A-LC 及突变体的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified AI2 and Xyn11A-LC. M: the standard protein molecular mass markers; 1-2: the purified AI2 and Xyn11A-LC, respectively.

## 2.4 野生型和突变体酶的性质测定

### 2.4.1 最适温度测定

为了测定野生型和突变体的最适反应温度,在相同的 pH 条件下,分别测定不同温度下的酶活性,以各自的最高酶活性为 100%,计算相对酶活性。如图 3 所示,突变体 AI2 的最适温度都为 60 °C,比野生型提高了 5 °C。

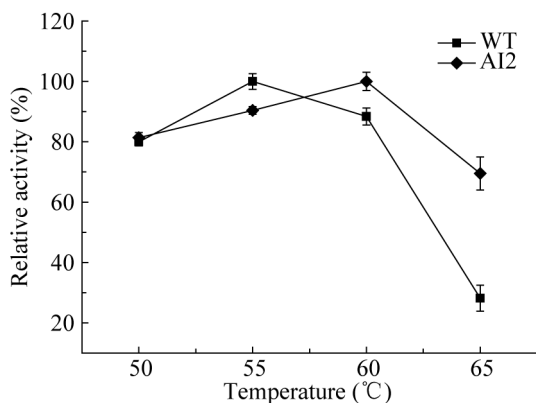


图 3 温度对野生型及突变体 AI2 的活性影响  
Fig. 3 Effects of temperature on the activity of Xyn11A-LC and AI2.

### 2.4.2 野生型和突变体的热稳定性半衰期测定

用 Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.0) 将野生型和突变体稀释到相同浓度,分别置于 65 °C 保温不同时间取样,测定残余酶活。用 Excel 软件拟合热失活曲线 (图 4),计算出野生型和突变体的  $t_{1/2}$  分别为 22 min 和 106 min。说明 N-末端芳香族氨基酸的引入大大提高了酶的热稳定性。

### 2.4.3 野生型和突变体的 $T_m$ 值测定

圆二色光谱结果显示野生型与突变体的 AI2 的  $T_m$  值分别为 55.3 °C 和 67.9 °C,见图 5 和表 2。与野生型相比较,突变体 AI2 的  $T_m$  值

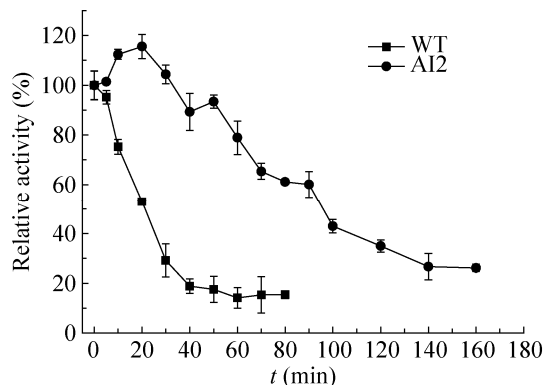


图 4 Xyn11A-LC 及突变体 AI2 在 65 °C、pH 8.0 条件下的热失活曲线图

Fig. 4 Thermal inactivation of Xyn11A-LC and AI2 at 65 °C and pH 8.0.

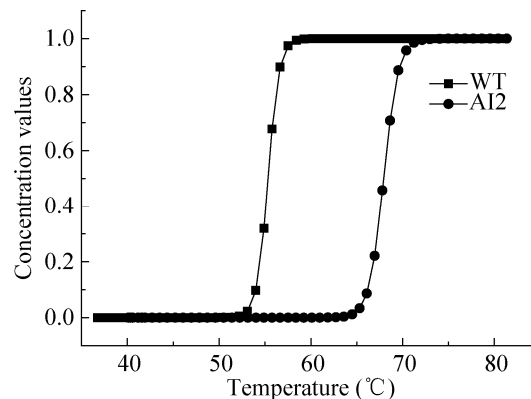


图 5 圆二色光谱测定  $T_m$  值的蛋白变性拟合曲线图  
Fig. 5 The melting temperature measurement using CD spectroscopy.

表 2 野生型和突变体的酶学性质比较

Table 2 Comparison of the enzymatic properties of wild type Xyn11A-LC and the mutant

	Optimal temperature (°C)	$t_{1/2}$ (min)	$T_m$ (°C)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )	$K_m$ (mg/mL)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ (mL/(mg·s))
WT	55	22	55.3	7 177.6	3.3	3 229.6	978.7
AI2	60	106	67.9	5 898.0	2.5	2 654.1	1 061.6

提高了 12.6 °C。这表明芳香族氨基酸的引入明显提高了热稳定性。

#### 2.4.4 野生型和突变体的动力学参数测定

野生型及突变体在各自最适反应条件下,以山毛榉木聚糖为底物,测定动力学参数,测定结果见表 2。与野生型相比较,突变体 AI2 降低了催化活性。芳香族氨基酸的引入增加了酶分子的刚性,但是刚性增加的同时会造成酶活性的下降。此外,突变体的  $K_m$  值下降为 2.5 mg/mL,而野生型的  $K_m$  值为 3.3 mg/mL,表明突变体与底物的亲和力上升。推测可能引入的芳香族氨基酸在增强疏水作用的同时,还可能是潜在的与底物结合的位点。尽管突变体 AI2 的催化活性下降,但由于  $K_m$  值也下降,导致其催化效率 ( $k_{cat}/K_m$ ) 反而高于野生型。

### 3 讨论

理性设计是继 DNA 重组技术和定点突变技术之后发展的最早的蛋白质工程研究策略,至今仍广泛应用。理性设计需要蛋白的详细结构信息、结构与功能的关系。嗜热蛋白是通过结构的微小变化可以获得较高的稳定性。疏水作用、表面离子键、缩小疏水表面积和末端的稳定对嗜热蛋白的热稳定性起重要作用<sup>[16-19]</sup>。另外氢键、二硫键和金属离子结合力等分子内作用力,蛋白质的结构构型和氨基酸的组成对蛋白质的稳定性都有一定的影响<sup>[20-23]</sup>。蛋白嗜热

机制的研究,为理性设计提高木聚糖酶热稳定性改造提供了一定的理论指导。

11 家族木聚糖酶具有  $\beta$ -果冻卷 ( $\beta$ -jelly roll) 折叠结构,这种结构由 15 个  $\beta$ -链形成两个互相缠绕的围绕催化中心的反向平行  $\beta$ -片层 A 和 B。其 C-末端包埋在  $\beta$ -片层的内部,而 N-末端位于  $\beta$ -片层的侧面,直接暴露在亲水环境中,见图 1。因此提高 N-末端的稳定性对于酶的整体稳定性起重要作用。目前突变结果表明,在 N-末端引入二硫键及疏水作用都可以提高 11 家族木聚糖酶的嗜热性<sup>[6,11]</sup>。来源于 *T. fusca* 的木聚糖酶 TfxA 是极少数的 11 家族嗜热酶之一<sup>[14]</sup>。Georis 等以通过定点突变证明了 TfxA 的热稳定区主要在 N-末端<sup>[4]</sup>。用 TfxA 的 N 末端序列替换来源于 *S. olivaceoviridis* 的中温木聚糖酶 XynB 的相应序列,融合蛋白的热稳定性明显提高<sup>[24-25]</sup>。近一步发现,N-末端的 5 个氨基酸对酶的热稳定性起关键作用<sup>[6]</sup>。

前期研究中获得了 11 家族碱性木聚糖酶 Xyn11A-LC,该酶是目前分离的具有最高催化活性的碱性木聚糖酶,具有应用于工业领域的巨大潜力。但是 Xyn11A-LC 为中温酶,最适反应温度 55 °C,在 65 °C 时的半衰期仅 22 min。为了提高酶的热稳定性,本文通过与嗜热酶 TfxA 的 N-末端序列比对及结构分析,选定两个定点突变位点 (T9Y 和 D14F),构建了突变体 AI2,分析突变体的结构发现,两个突变位点分

别位于  $\beta$  链 B1 和 B2 上,二者可能通过形成疏水作用,增加 N-末端 B1 和 B2 之间的稳定性,进而提高整个酶分子的稳定性。测定结果表明,突变体的最适温度和热稳定性获得明显的提高,但是催化活性下降。说明在增加蛋白分子的刚性的同时,酶分子的柔性下降,进而造成酶活性的下降。此外,突变体的  $K_m$  值比野生型低,可能由于引入的芳香族氨基酸位于酶分子催化裂隙,是酶与底物结合的潜在位点,使底物在较高的温度下与酶的结合力提高,从而提高酶的嗜热性及热稳定性<sup>[4]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(1): 3–23.
- [2] Hakulinen N, Turunen O, Janis J, et al. Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J Biochem*, 2003, 270(7): 1399–1412.
- [3] Gruber K, Klintschar G, Hayn M, et al. Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies. *Biochemistry*, 1998, 37(39): 13475–13485.
- [4] Georis J, de Lemos Esteves F, Lamotte-Brasseur J, et al. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Sci*, 2000, 9(3): 466–475.
- [5] Harris GW, Pickersgill RW, Connerton I, et al. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins*, 1997, 29(1): 77–86.
- [6] Zhang S, Zhang K, Chen X, et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(2): 200–206.
- [7] Turunen O, Vuorio M, Fenel F, et al. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng*, 2002, 15(2): 141–145.
- [8] Umemoto H, Ihsanawati, Inami M, et al. Improvement of alkaliphily of *Bacillus* alkaline xylanase by introducing amino acid substitutions both on catalytic cleft and protein surface. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4): 965–967.
- [9] Zverlov V, Piotukh K, Dakhova O, et al. The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Appl Microbiol Biot*, 1996, 45(1/2): 245–247.
- [10] Turunen O, Etuaho K, Fenel F, et al. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the alpha-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J Biotechnol*, 2001, 88(1): 37–46.
- [11] Wang Y, Fu Z, Huang H, et al. Improved thermal performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge. *Bioresour Technol*, 2012, 112: 275–279.
- [12] Wakarchuk WW, Sung WL, Campbell RL, et al. Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng*, 1994, 7(11): 1379–1386.
- [13] Bai W, Zhou C, Xue Y, et al. Three-dimensional structure of an alkaline xylanase Xyn11A-LC from alkalophilic *Bacillus* sp. SN5 and improvement of its thermal performance by introducing arginines substitutions. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(7): 1495–1501.
- [14] Irwin D, Jung ED, Wilson DB. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl Environ Microb*, 1994, 60(3): 763–770.
- [15] Bai WQ, Xue YF, Zhou C, et al. Cloning,

- expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(11): 2093–2099.
- [16] Pace CN. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J Mol Biol*, 1992, 226(1): 29–35.
- [17] Chan CH, Yu TH, Wong KB. Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21624.
- [18] Connerton I, Cummings N, Harris GW, et al. A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1433(1/2): 110–121.
- [19] Gao SJ, Wang JQ, Wu MC, et al. Engineering hyperthermostability into a mesophilic family 11 xylanase from *Aspergillus oryzae* by in silico design of N-terminus substitution. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(4): 1028–1038.
- [20] Yu XW, Tan NJ, Xiao R, et al. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase: increased thermostability and altered acyl chain length specificity. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46388.
- [21] Zheng B, Yang W, Zhao X, et al. Crystal structure of hyperthermophilic endo-beta-1,4-glucanase: implications for catalytic mechanism and thermostability. *J Biol Chem*, 2012, 287(11): 8336–8346.
- [22] Zeng J, Gao X, Dai Z, et al. Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysins and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca<sup>2+</sup>-binding site. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(9): 2763–2772.
- [23] Mrabet NT, Van den Broeck A, Van den brande I, et al. Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry*, 1992, 31(8): 2239–2253.
- [24] Yang HM, Meng K, Luo HY, et al. Improvement of the thermostability of xylanase by N-terminus replacement. *Chin J Biotech*, 2006, 22(1): 26–32 (in Chinese).  
杨浩萌, 孟昆, 罗会颖, 等. 通过 N 端替换提高木聚糖酶的热稳定性. *生物工程学报*, 2006, 22(1): 26–32.
- [25] Sun JY, Liu MQ, Xu YL, et al. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement. *Protein Expres Purif*, 2005, 42(1): 122–130.

(本文责编 郝丽芳)