

基于 Pro 效应提高 GH10 家族耐盐木聚糖酶 XynRBM26 的热稳定性

董盼盼¹, 许海涛², 王中雨¹, 王琳¹, 周星雨¹, 刘林东¹, 张婷婷¹, 张娇娇¹, 汪金萍^{1*}

1 信阳农林学院 药学院, 河南 信阳

2 焦作技师学院, 河南 焦作

董盼盼, 许海涛, 王中雨, 王琳, 周星雨, 刘林东, 张婷婷, 张娇娇, 汪金萍. 基于 Pro 效应提高 GH10 家族耐盐木聚糖酶 XynRBM26 的热稳定性[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 4994-5007.

DONG Panpan, XU Haitao, WANG Zhongyu, WANG Lin, ZHOU Xingyu, LIU Lindong, ZHANG Tingting, ZHANG Jiaojiao, WANG Jinping. Improvement of the thermostability of the salt-tolerant xylanase XynRBM26 from GH10 family based on Pro effect[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(11): 4994-5007.

摘要: 【目的】嗜中温 GH10 家族耐盐木聚糖酶 XynRBM26 在动物饲料等工业领域具有重要的应用价值。本研究基于理性设计方法对其进行蛋白质工程改造以提升其热稳定性, 为后续 XynRBM26 酶制剂的工业化应用奠定基础。【方法】利用生物信息学软件 FoldX 对 AlphaFold 2.0 预测的 XynRBM26 的 3D 结构进行全序列扫描, 将自由能变化小于 -0.5 kcal/mol 的突变体构建成一个初始电子文库; 基于 Pro 效应及潜在突变体的筛选原则构建一个由 Pro 突变组成的电子文库; 利用定点突变技术构建突变体基因, 进一步对突变体进行异源表达和纯化, 通过实验验证筛选出阳性突变体。【结果】初始潜在突变体经筛选后, 构建了一个由 21 个 Pro 效应突变体组成的小而精的突变文库。对所有突变体进行实验验证, 筛选出 T_m 值显著提高的阳性单点突变体 D222P、V182P、D344P 和 A352P。后续通过叠加筛选获得了性质较优的 3 点叠加 Pro 突变体, 并将其与实验筛选的阳性突变体 G115D 叠加, 筛选出稳定性最优的叠加突变体 M4 (G115D-D222P-D344P-A352P)。与 XynRBM26 野生型相比, 其 T_m 值及最适温度分别提高了 6.5 °C 和 5 °C, 在 55 °C 下的半衰期 $t_{1/2}$ 提高了 7.5 倍, 最适温度下的相对活性是野生型的 3.44 倍。【结论】基于 Pro 效应及 2 种不同效应叠加方法筛选热稳定性 GH10 家族耐盐木聚糖酶 XynRBM26 突变体, 是一种有效的策略。

关键词: GH10 家族; 木聚糖酶 XynRBM26; Pro 效应; T_m 值; 半衰期 $t_{1/2}$

资助项目: 河南省高等学校重点科研项目(24B180015)

This work was supported by the Key Scientific Research Project of Universities in Henan Province (24B180015).

*Corresponding author. E-mail: wjpwbg@126.com

Received: 2025-04-07; Accepted: 2025-06-18; Published online: 2025-07-04

Improvement of the thermostability of the salt-tolerant xylanase XynRBM26 from GH10 family based on Pro effect

DONG Panpan¹, XU Haitao², WANG Zhongyu¹, WANG Lin¹, ZHOU Xingyu¹, LIU Lindong¹, ZHANG Tingting¹, ZHANG Jiaojiao¹, WANG Jinping^{1*}

1 School of Pharmacy, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang, Henan, China

2 Jiaozuo Technician College, Jiaozuo, Henan, China

Abstract: [Objective] The mesophilic salt-tolerant xylanase XynRBM26, a member of the GH10 family, holds significant application value in industrial fields such as animal feed. This study improved the thermostability of this enzyme by protein modification *via* rational design, aiming to lay a foundation for the industrial application of XynRBM26 preparations. [Methods] The bioinformatics software FoldX was used to conduct positionscan of the 3D structure predicted by AlphaFold 2.0 for XynRBM26. The mutants with free energy changes less than -0.5 kcal/mol were selected to construct an initial electronic library. According to the Pro effect and screening principles for potential mutants, an electronic library composed of Pro mutations was subsequently established. Finally, site-directed mutagenesis was employed to construct mutant genes, and positive mutants were screened after heterologous expression, purification, and experimental verification. [Results] After screening of the initial potential mutants, a small and precise mutant library consisting of 21 Pro effect mutants was constructed. All the mutants were experimentally validated, and positive single-point mutants D222P, V182P, D344P, and A352P with significantly increased T_m values were screened out. Through subsequent stacking screening, a three-point stacked Pro effect mutant with superior properties was obtained. The combination of this mutant with the experimentally screened positive mutant G115D produced the most stable mutant M4 (G115D-D222P-D344P-A352P). Compared with wild-type XynRBM26, M4 showed increases of 6.5 °C and 5 °C in T_m and optimal temperature, respectively. Moreover, M4 presented the half-life ($t_{1/2}$) at 55 °C 7.5-fold longer than the wild type, and its relative activity at the optimal temperature was 3.44 folds that of the wild type. [Conclusion] Screening thermostable mutants of the salt-tolerant xylanase XynRBM26 of the GH10 family based on the Pro effect and two different effect superimposing strategies is an effective approach.

Keywords: GH10 family; xylanase XynRBM26; Pro effect; T_m value; half-life $t_{1/2}$

木聚糖是植物半纤维素的重要组成部分, 其主要由 β -D-木糖、阿拉伯糖等通过 β -1,4 糖苷键连接而成。由于其结构具有异质性, 因此实现其完全降解需要多种复合酶系共同参与。其中, 内切木聚糖酶(endoxylanase, EC 3.2.1.8)是水解木聚糖的关键酶类, 它作用于木聚糖的主链,

水解吡喃木糖残基之间的 β -1,4 糖苷键, 产生多种低聚木糖, 包括木二糖、木三糖、木四糖及木寡糖^[1]。与木聚糖酶相关的主要糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)家族有 5、7、8、9、10、11、12、16、26、30、43、44、51 和 62^[2], 其中多数木聚糖酶归属于 GH10 和 GH11 家族。

GH10 家族木聚糖酶具有对底物专一性高、活性强和稳定性好等优点,在造纸、纺织、食品加工、生物质能源生产及动物饲料加工等工业应用方面前景广阔。木聚糖酶的热稳定性是其实现工业化应用的前提,例如,动物饲料在加工成型过程中需要超过 80 °C 的高温^[3]。目前,文献中报道的 GH10 家族木聚糖酶主要以嗜中温为主,尽管有部分研究筛选出了嗜热 GH10 家族木聚糖酶,但因其活性和表达量较低等因素难以满足工业需求。因此,直接筛选嗜热木聚糖酶或对文献中报道的嗜中温木聚糖酶进行热稳定性改造是实现 GH10 家族木聚糖酶工业化应用目标的捷径。

目前,使用蛋白质工程提升酶热稳定性主要有 3 种策略:定向进化、半理性设计和理性设计^[4]。定向进化策略是在不了解蛋白质结构的情况下,通过对目标基因进行反复随机突变来改进酶的特性,每轮进化通过替换一个残基来改进酶。半理性设计策略中最重要的一种方法是定点饱和突变,即选择酶结构中的一个残基,并用所有可能的 19 种天然氨基酸代替它进行位点饱和突变以提高热稳定性。在过去的 20 多年中,虽然定向进化和半理性设计策略已成功用于改造酶蛋白,且取得了不错的结果,但这 2 种方法不仅要建立庞大的突变文库,还需要高效的高通量筛选技术或价格昂贵的实验仪器设备,需要极大的人力物力资源作为支撑。近年来,随着蛋白质结晶技术和蛋白质结构预测软件日益成熟,蛋白质三维结构越来越多地被解析或预测出来。结合多种生物信息学软件,使用理性设计策略构建一个小而精的突变文库可大幅提高成功率,加快酶工程研究的进程^[5]。目前,理性设计策略所涉及的方法主要有二硫键引入^[6]、盐桥引入^[7]、蛋白表面电荷分布优化^[8]及 Pro 引入^[9]等。大量文献研究表明,在蛋白质三维结构合适位置引入 Pro 所产生的 Pro 效应能够显著降低蛋白解折叠过程中的构象熵,增加蛋白质的稳定性。目前,完全基于 Pro 效应进行

系统研究以提高 GH10 家族木聚糖酶热稳定性的文献屈指可数。

目前已有部分学者开展了对 GH10 家族木聚糖酶的热稳定性改造研究。Dotsenko 等^[10]基于吉布斯自由能的变化及结构分析改造了来自变灰青霉菌的 GH10 家族木聚糖酶 XylE,筛选出的阳性突变体 S104M 的 T_m 值较野生型提高了 3.1 °C。You 等^[11]将来自密褐褶菌的 GH10 家族木聚糖酶 GtXyn10 中位于底物通道上产生空间位阻的氨基酸进行突变,筛选出热稳定性是野生型 2 倍的叠加突变体 H51K/Q118A。Bai 等^[12]将来自威尼克外瓶霉的 GH10 家族木聚糖酶 Hwxy110A 的灵活性区域进行改造,获得了在 70 °C 下的 $t_{1/2}$ 值是野生型 17 倍的叠加突变体 S21Y/N318W。然而,热稳定性较好的耐热木聚糖酶还需进一步开发,以满足饲料工业的需求。

来源于云南滇金丝猴肠道微生物的 GH10 家族木聚糖酶 XynRBM26 不仅对桦木木聚糖活性较好,而且耐盐性良好,经 5 mol/L NaCl 在 37 °C 下放置 1 h 能保持 86% 的活性,还具有胰蛋白酶抗性,具有较大的工业化应用潜力^[13]。然而,该酶在 55 °C 下的半衰期($t_{1/2}$)仅为 2 min,其热稳定性难以满足动物饲料加工成型过程的高温需求。本研究使用 AlphaFold 2.0^[14]在线软件预测了木聚糖酶 XynRBM26 的 3D 结构,并以此为基础对其进行基于 Pro 效应的热稳定性改造,筛选热稳定性突变体并揭示其耐热机制,以期为其他酶类的热稳定性改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)用于蛋白基因的克隆和表达,该菌株为本实验室保藏。蛋白重组表达质粒 pET28a-XynRBM26 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并构建。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白纯化用镍柱填料、标准蛋白 marker,

北京全式金生物技术有限公司; *Dpn* I 酶、DNA 聚合酶和 DNA marker, 宝生物工程(大连)有限公司; 硫酸卡那霉素和 IPTG, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 山毛榉木木聚糖和木糖, 上海源叶生物科技有限公司; 乙醇和甘油等其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司所产分析纯; 引物, 铂尚生物技术(上海)有限公司, 具体序列如表 1 所示。

蛋白纯化系统, 泰渡生物科技(苏州)有限公司; 落地式高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技公司; 全温大容量恒温摇床, 上海旻泉仪器有限公司; 蛋白电泳仪, 上海一恒科学仪器有限公司; 高压细胞破碎机, 永联生物科技(上海)有限公司。

1.3 木聚糖酶 XynRBM26 的结构分析

使用 ExPASy 网站中的 ProtParam 程序对耐盐 GH10 家族木聚糖酶 XynRBM26 (GenBank 登录号 ALO19936.1)的氨基酸序列进行等电点、分子量等基本性质的预测及分析。使用三维结构预测软件 AlphaFold 2.0 对 XynRBM26 及其突变体进行建模, 利用 Swiss 在线软件对该三维结构进行结构合理性评估。所有的三维结构图均使用 PyMOL 软件绘制。

1.4 热稳定性木聚糖酶 XynRBM26 突变体潜在突变文库的筛选

基于 XynRBM26 的三维结构, 使用 FoldX 软件对其进行全序列虚拟饱和突变, 筛选出一个由自由能小于 -0.5 kcal/mol 的 460 个突变体组成的突变文库, 其中涉及 Pro 突变的突变体共有 30 个。依据文献[15]中热稳定性突变体的筛选原则: Pro 不得出现在 α 螺旋和 β 折叠中(α 螺旋除 N 端帽子结构外), 突变位点不得有较多盐桥和氢键, 且突变后无其他作用力进行能量代偿, 剔除不符合要求的突变体。

1.5 木聚糖酶 XynRBM26 突变体的构建

使用表 1 中的引物对, 以野生型质粒 pET28a-XynRBM26 为模板, 通过重叠延伸 PCR

表1 本实验所用的PCR引物对

Table 1 Pairs of the primers used in this study

Primers	Mutation	Oligonucleotide sequences (5'→3')
BF1F	A32P	CAAGACGCAGGTCCGCCGCTGAAAG
BF1R		TTGCCAGATCTTTCAGCGCGGACC
BF2F	A117P	AATTCGCGGTCACCCGCTGATTGG
BF2R		TCTTGCCAAATCAGCGGGTGACCGC
BF3F	A99P	TCAGTGGGGTCCGCCGACGAAATG
BF3R		GCAAACATTTTCGTCGCGGACCCC
BF4F	A128P	CGAAATGGCTGCCGCCGTGGGTAAAC
BF4R		AGTGC GTTTACCCACGGCGGCAGCC
BF5F	V140P	TCTGAAAAGCAAACCGCCGGCACAT
		GC
BF5R		TGCTTCAGCATGTGCCGGCGGTTTG
BF6F	D222P	CCGGGTCTGGGCGATCCGGCAAAC
BF6R		CTGCGCGATGTTTTGCCGATCGCC
BF7F	D221P	CCGGGTCTGGGCGCGGATGCAAAC
BF7R		CGCGATGTTTTGCATCCGGGCCAG
BF8F	V190P	CAAACGTATGGGCGCGCCGGAACAG
BF8R		CAAATTCGATCTGTTCCGGCGCGCC
BF9F	A189P	ACCAAACGTATGGGCGCGGTTGAAC
BF9R		TCGATCTGTTCAACCGGGCCATAC
BF10F	V182P	TAGCCTGATTCAGAACCCGTTTACC
BF10R		CCAATACGTTTTGGTGAACGGGTTCTG
BE11F	T323P	ACCCTGAGTTATCCGCCGTGTCCGG
BF11R		CAGAAAATCGCGACCGCGGATAA
		CTC
BF12F	A141P	AAAAGCAAACCGGTCCCGCATGCTG
BF12R		GAATTGCTTCAGCATGCGGGACCGG
BF13F	A254P	AAGTCACGTTTCTCCGGCGATATG
BF13R		AGACATCATATCGCCCGGAGAAACG
BF15F	A295P	ACGTCAACGATAAACCGTTCGCCGC
BF15R		CAAAATCCGCCGGGAACGGTTTATC
BF16F	A298P	ATAAAGCGTTCCCGCGGATTTTGC
BF16R		ACGTTTTGCAAATCCGGCGGGAAC
BF17F	F300P	GCGTTCGCCGGATCCGGCAAAC
BF17R		TGCGTCACGTTTTGCCGGATCCGCC
BF18F	S360P	CCGACCCCGTACGATCCTCAACTGC
BF18R		TAGCGCGCAGTTGAGGATCGTACG
BF19F	G350P	GCAAACGTCCGGACCCGCTGGCAC
BF19R		GGACGTTGTGCCAGCGGGTCCGGAC
BF20F	D344P	CTGCAAGTTTGGGCACCGGCAAAA
		CG
BF20R		CCGGACGTTTTGCCGGTGCCAAAC
BF21F	A352P	GTCCGGACGGTCTGCCGCAACGTCC
BF21R		ACGGGGTCGGACGTTGCCGACAGCC
BF22F	H335P	GGGGTATGGCTGATCCGGTTAACTGG
BF22R		TTGCAGCCAGTTAACCGGATCAGCC

引入突变。PCR 反应体系：2×PrimeSTAR DNA Polymerase with GC Buffer 12.5 μL，模板 0.5 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL，上、下游引物 (5 μmol/L) 各 1 μL，ddH₂O 3 μL。PCR 扩增条件：95 °C 3 min；95 °C 10 s，不同的引物对的退火温度不同，退火时间为 15 s，72 °C 6 min，共 20 个循环；72 °C 10 min。使用 *Dpn* I 酶对 PCR 产物在 37 °C 下酶切 2 h。直接将酶切产物转入到 *Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。突变后的基因经生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.6 木聚糖酶 XynRBM26 及突变体的诱导表达及纯化

吸取 100 μL 野生型及突变体的工程菌株菌液，接种于 10 mL 含卡那霉素(Kana)抗性的 LB 培养基中，在 37 °C、240 r/min 条件下振荡培养 6 h 左右，至菌液 OD_{600} 值达到 0.6–0.9。随后将菌液转移至 1 L LB 液体培养基中，220 r/min 摇菌 4 h，待培养菌液 OD_{600} 达到 0.6–0.9 时将摇床温度设置为 16 °C，待温度降至设定值后，加入 300 μL 1 mol/L IPTG (终浓度 0.3 mmol/L)，于 16 °C、200 r/min 培养 13 h，在 4 000 r/min 下离心 10 min，去掉上清后，加入 50 mL 预冷的裂解液 buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 150 mmol/L NaCl) 均匀重悬菌体。采用匀浆机在 650 MPa 下匀浆 3 min，随后将蛋白倒入 2 个 50 mL 离心管中，4 °C、15 000 r/min 离心 20 min，将蛋白和细胞碎片分离，目的蛋白粗酶液在上清中，分别留取上清和沉淀各 40 μL。参考重力 Ni 亲和层析柱使用说明书，利用亲和层析法进行目的蛋白的纯化，使用 SDS-PAGE 判断目的蛋白的纯度，并使用 Bradford 法测定野生型与突变体纯化后酶液的蛋白浓度。

1.7 木聚糖酶酶活的测定

将榉木木聚糖底物溶解于 50 mmol/L 缓冲液中，使木聚糖终浓度为 0.5 mg/mL。酶的反应体系：将 100 μL 酶液加入到 900 μL 木聚糖底物

中。在反应开始前，需将底物预热 5–10 min，随后加入酶液在最适温度下反应 10 min，稍后加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)试剂，随即在沸水中煮沸 5 min，最后用自来水将样品冷却至室温，吸取 200 μL 溶液到 96 孔板中，设置 3 个平行，在 540 nm 特定波长下测定样品吸光值。对照为在同样的反应体系中用 100 μL 缓冲液替代酶液。酶活定义为：在最适温度、最适 pH 条件下，每分钟催化水解木聚糖生成 1 μmol 还原糖所需要的酶量为 1 U。

1.8 热稳定性提高的木聚糖酶突变体的筛选

本研究采用 NanoDSF 检测方法进行热稳定性的快速初筛，其基本原理是 NanoDSF 检测无需染料，通过色氨酸在 350 nm 和 330 nm 波长下荧光值的微量变化来揭示蛋白折叠状态转化过程，以 2 个波长下荧光值比值与温度的关系来确定解链温度(T_m)。在测定 T_m 前需对蛋白浓度进行摸索，确定实验蛋白样品浓度为 1 mg/mL，检测温度范围为 20–95 °C，升温斜率为 1 °C/min。通过比较突变体的 T_m 值与野生型蛋白的 T_m 值，若突变体的 T_m 值增加则代表其热稳定性提高。

1.9 木聚糖酶和突变体最适温度、 $t_{1/2}$ 及相对酶活的测定

在 30–65 °C (间隔 5 °C) 的温度范围内以 5 mg/mL 榉木木聚糖作为底物，在金属浴中测定 XynRBM26 的最适温度，以吸光值最高温度下的酶活力为 100%，对照组用相同体积的 buffer 替代加入的酶蛋白。在最适 pH 条件下将稀释好的酶在 55 °C 下分别加热 1、2、2.5、5、10、15、20、25、30 min，加热完后在冰上冷却 20 min，分别测定不同处理时间下的活性，以加热后酶蛋白酶活力与未加热的酶蛋白活力的比值的百分数定义为残余酶活(residual activity)，以此计算酶蛋白的失活速率 k_d ，计算如公式(1)

所示。最终计算酶蛋白的半衰期, 如公式(2)所示。

$$\ln(\text{Residual activity}) = k_d \times t \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d \quad (2)$$

式中: Residual activity 为残余酶活; k_d 为酶蛋白的失活速率。

1.10 分子动力学模拟

使用 Gromacs 4.5.6^[16] 分别对 AlphaFold 2.0 预测的野生型及突变体三维结构进行分子动力学模拟。使用 YASARA 软件去除结构中的水分子和氢原子。使用 CHARMM27 作为力场来生成蛋白的坐标文件和拓扑数据。将目的蛋白加入到 Space 水盒子中(周期性边界条件), 目的蛋白距离设置的水盒子边缘为 1.0 nm。向水溶液中加入 Na^+ 或者 Cl^- 来中和体系中的离子, 使体系维持电中性。系统的能量最小化采用最陡下降法, 时间为 100 ps。NVT 平衡时间为 100 ps, 体系的温度在恒温恒压下提升至 55 °C。在 328 K、105 kPa 压力下进行 NPT 体系平衡 100 ps。对体系进行长达 50 ns 的分子动力学模拟(molecular dynamics), 计算木聚糖酶 XynRBM26 骨架碳原子的均方根偏差(root mean square deviation)、回旋半径(radius of gyration)及体系平

衡状态下原子的均方根波动(root mean square fluctuation)值。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶 XynRBM26 的三维结构分析

木聚糖酶 XynRBM26 的基因序列(ALO19936.1)含 1 152 bp, 编码 383 个氨基酸, NCBI 将其注释为木聚糖酶。XynRBM26 蛋白预测分子量为 42.35 kDa, 等电点为 8.95, 280 nm 的消光系数为 64 065 [mol/(L·cm)], 疏水性平均系数(GRAVY)为-0.297, 不稳定指数(instability index)为 31.34。使用 AlphaFold 2.0 对木聚糖酶 XynRBM26 进行同源建模, 结果如图 1 所示。与几乎所有 GH10 家族的木聚糖酶一致, XynRBM26 的整体三维结构呈现出 Tim 桶状结构, 具有木聚糖酶第 10 家族经典的 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel 拓扑结构。其三维结构上端的直径明显大于下端, 呈现出一种类似于沙拉碗的形状。XynRBM26 主要由内部正向平行的 8 个 β 折叠和位于外部环绕 β 折叠的 8 个 α 螺旋组成。活性中心氨基酸 Glu169 和 Glu288 分别作为酶催

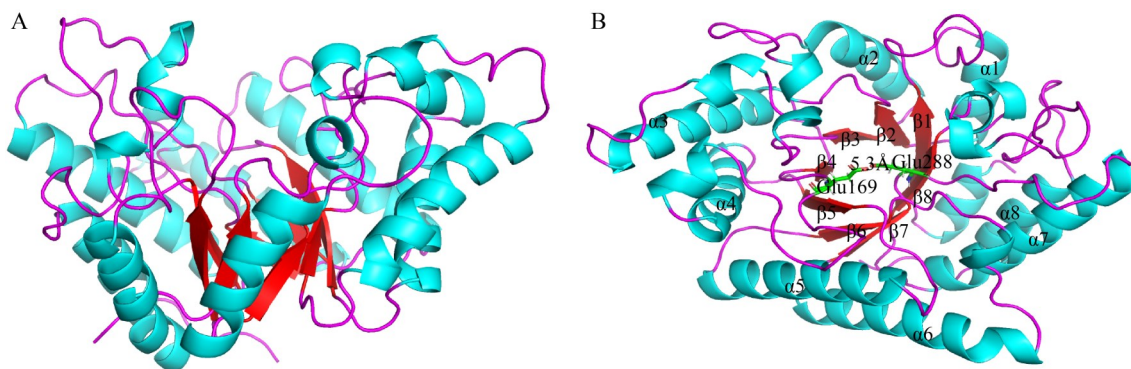


图1 XynRBM26蛋白三维结构。A: 以卡通形式展现XynRBM26的沙拉碗状结构; B: 以卡通形式展现XynRBM26内部8个正向平行的 β 折叠和外部的8个 α 螺旋。

Figure 1 3D structure of XynRBM26. A: Present the salad bowl-shaped structure of XynRBM26 in a cartoon form; B: Present the eight parallel β -sheets inside and the eight α -helices outside of XynRBM26 in a cartoon form.

化过程中的酸/碱和亲核试剂，位于蛋白结构的中心位置，2个氨基酸残基之间的距离为 5.3 Å，这表明 XynRBM26 对底物的催化遵循保留机制。利用 SAVES 预测的拉式图评估 XynRBM26 三维结构模型质量，结果表明有 91.8% 的氨基酸残基位于核心区域，8.2% 的氨基酸位于其他允许区。上述结果说明，木聚糖酶 XynRBM26 的三维模型结果较为可靠。

2.2 突变文库的构建

依据 FoldX 预测结果，从 460 个自由能小于 -0.5 kcal/mol 的突变体中筛选出 30 个具有 Pro 效应的突变体，其结果如表 2 所示。

基于 1.4 节中的筛选原则，剔除不符合筛选原则的突变体 R61P、A64P、Q85P、A78P、D122P 和 A143P。由于在前期研究中突变体 A343P、A364P 和 M380P 已经构建，所以不在本研究的筛选范围内。最终创建了一个由 21 个 Pro 突变体组成的突变文库。突变体的组成及突变位点所在二级结构中的位置如表 3 所示。

表2 FoldX软件预测具有Pro效应的突变体

Table 2 FoldX software predicts mutants with Pro effect

Mutant	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Mutant	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
A32P	-1.077	T323P	-2.128
R61P	-0.754	A141P	-1.065
A64P	-0.724	A254P	-0.991
A78P	-0.759	A295P	-0.538
Q85P	-0.926	A298P	-1.273
A99P	-0.968	F300P	-1.275
A117P	-3.111	M380P	-1.187
D122P	-2.238	A364P	-1.566
A128P	-1.561	S360P	-1.531
V140P	-1.547	G350P	-0.987
D222P	-1.785	D344P	-1.782
D221P	-0.510	A352P	-1.141
V190P	-0.748	A343P	-1.611
A189P	-1.168	H335P	-0.873
V182P	-1.118		
A143P	-0.549		

2.3 野生型及突变体的构建、表达与纯化

表达并纯化所有的单点突变体，除 G350P 不能正常表达外，其余 20 个单点突变体均能正常表达。SDS-PAGE 图显示，在 40 kDa 附近存在单一条带且较为清晰，与目的蛋白 42 kDa 的分子量相符(图 2)。

2.4 单点突变体 T_m 值测定

XynRBM26 野生型与单点突变体的 T_m 测定结果如表 4 所示，有 14 个突变体的热稳定性下降，1 个保持不变，6 个有所提高。其中，突变体 D222P、V182P、D344P 和 A352P 分别较野生型提高 1.7、1.0、1.8 和 2.8 °C，这 4 个突变体被选定用于下一步的叠加。

2.5 叠加突变体 T_m 值测定

分别将 V182P、D222P、D344P 和 A352P 这 4 个阳性单点突变体进行 2 点、3 点、4 点叠加，叠加突变体的 T_m 值如表 5 所示。叠加突变体的 T_m 值提高幅度从 1.6 °C (V182P-D222P) 到 6.2 °C (D222P-D344P-A352P)。V182P 突变体在与其余 3 个突变体进行叠加时并未表现出明显的累积效应。表 5 中提高最多的是 3 点叠加突变体 D222P-D344P-A352P，其 T_m 值明显高于其

表3 Pro效应突变电子文库的构建

Table 3 Construction of Pro effect mutation electronic library

Mutant	Secondary structure motif	Mutant	Secondary structure motif
A32P	α -helix N cap	A254P	β -turn
A99P	α -helix N cap	A298P	Loop
A117P	Loop	A295P	Loop
A128P	α -helix N cap	F300P	α -helix N cap
V140P	α -helix N cap	T323P	β -turn
A141P	α -helix N cap	H335P	β -turn
A189P	α -helix N cap	D344P	β -turn
V182P	α -helix N cap	G350P	Loop
V190P	α -helix N cap	A352P	Loop
D221P	α -helix N cap	S360P	β -turn
D222P	α -helix N cap		

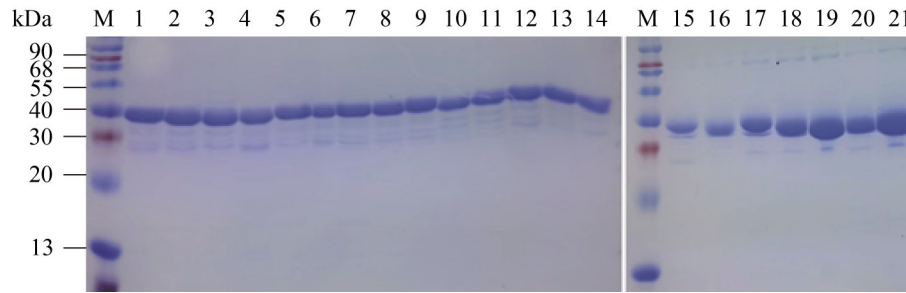


图2 单点突变体的SDS-PAGE图

Figure 2 SDS-PAGE diagram of a single point mutant. M: Protein marker; 1–21 are respectively the wild type of XynRBM26, mutant A32P, A117P, A99P, A128P, V140P, D222P, D221P, V190P, A189P, V182P, T323P, A141P, A254P, A295P, A298P, F300P, S360P, D344P, A352P, H335P, respectively.

表4 XynRBM26野生型和单点突变体的 T_m 值

Table 4 The melting temperature of XynRBM26 wild type and single point mutants

Enzyme	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$	Enzyme	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
Wild-type	55.5				
A32P	56.3	+0.8	T323P	52.5	-3.0
A117P	54.9	-0.6	A141P	55.3	-0.2
A99P	55.2	-0.3	A254P	53.3	-2.2
A128P	55.6	+0.1	A295P	54.0	-1.5
V140P	53.8	-1.7	A298P	52.4	-3.1
D222P	57.2	+1.7	F300P	54.3	-1.2
D221P	49.5	-6.0	S360P	48.5	-7.0
V190P	54.5	-1.0	D344P	57.3	+1.8
A189P	55.5	+0.0	A352P	58.3	+2.8
V182P	56.5	+1.0	H335P	49.1	-6.4

他叠加突变体, 这表明由 3 个 Pro 单点突变组成的组合突变协同增加了 XynRBM26 的热稳定性。众所周知, 不同效应的突变体之间的协同作用对热稳定性提高较单个效应更为显著, 而筛选得到的突变体 D222P-D344P-A352P 只有一种 Pro 效应, 所以将 D222P-D344P-A352P 与之前实验筛选的具有盐桥效应的阳性突变体 G115D 进行进一步叠加得到突变体 G115D-D222P-D344P-A352P。为了实验方便将其命名为 M4 进行后续的实验。

表5 叠加突变体 T_m 值测定

Table 5 The superimposed mutant T_m value was determined

Enzyme	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
Wild type	55.5	0.0
V182P-D222P	57.1	+1.6
V182P-D344P	58.3	+2.8
V182P-A352P	58.6	+3.1
D222P-D344P	59.0	+3.5
D222P-A352P	60.3	+4.8
D344P-A352P	61.2	+5.7
V182P-D222P-D344P	60.6	+5.1
V182P-D222P-A352P	59.7	+4.2
D222P-D344P-A352P	61.7	+6.2
V182P-D222P-D344P-A352P	61.3	+5.8
M4 (G115D-D222P-D344P-A352P)	62.0	+6.5

2.6 XynRBM26 野生型及其叠加突变体 M4 的酶学性质

同样采用 NanoDSF 测定出的 T_m 值来评估野生型及叠加突变体 M4 的热力学稳定性(图 3A)。突变体 M4 的 T_m 值增加至 62.0 $^\circ\text{C}$, 比 XynRBM26 高 6.5 $^\circ\text{C}$, 这表明 G115D 的盐桥效应与 D222P-D344P-A352P 的 Pro 效应在提高酶热稳定性方面具有协同作用。

最适温度的升幅低于 T_m 值的升幅, M4 的最适温度为 55 $^\circ\text{C}$, 较 XynRBM26 野生型提高了 5 $^\circ\text{C}$,

野生型在 65 °C 下几乎完全丧失活性，而突变体 M4 在 70 °C 下仍保留超过 40% 的活性(图 3B)。

如图 4A 所示，在 55 °C 下，与 XynRBM26 野生型相比 M4 的动力学稳定性也得到了改善。XynRBM26 野生型的半衰期 $t_{1/2}$ 为 1.9 min，而 M4 的半衰期 $t_{1/2}$ 为 14.3 min，是野生型的 7.5 倍。如图 4B 所示，在 55 °C、pH 6.5 条件下测定 M4 的相对酶活，结果表明与 XynRBM26 野生型相

比叠加突变体 M4 的活性是野生型的 3.44 倍。

2.7 M4 热稳定性提高机制的分析

为更好地解释组合突变体 M4 热稳定性提高的机制，对 M4 和 XynRBM26 野生型的三维结构进行对比分析并作图。如图 5 所示，115 位点位于组成蛋白核心区域的 β_3 上。突变前 G115 能与 β_3 正向平行的 β_4 的组成氨基酸 S163 和 D165 形成 2 个氢键(图 5A)；突变后 D115 不仅

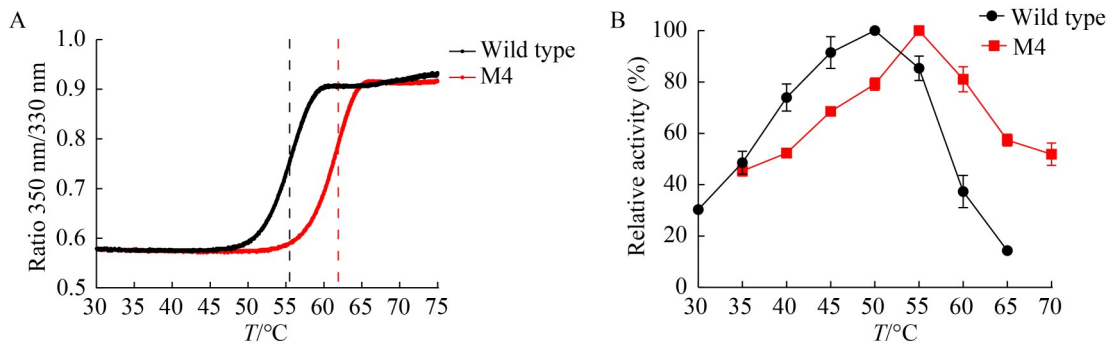


图3 XynRBM26野生型与叠加突变体M4的 T_m 值和最适温度。A: XynRBM26野生型与叠加突变体M4的 T_m 值；B: XynRBM26野生型与叠加突变体M4的最适温度。

Figure 3 T_m values and optimal temperature of XynRBM26 wild type and combined mutant M4. A: The T_m values of XynRBM26 wild type and combined mutant M4; B: The optimal temperature of XynRBM26 wild type and combined mutant M4.

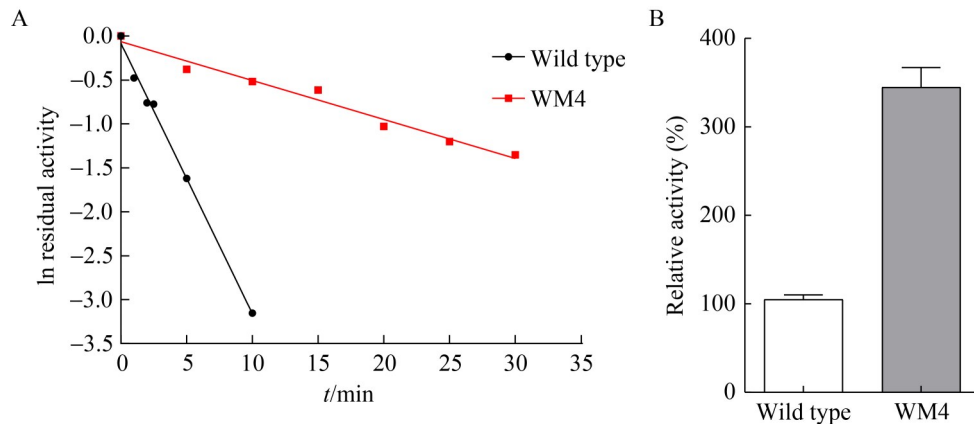


图4 XynRBM26野生型与叠加突变体M4的半衰期($t_{1/2}$)及活性。A: XynRBM26野生型与叠加突变体M4的半衰期($t_{1/2}$)；B: XynRBM26野生型与叠加突变体M4的相对酶活。

Figure 4 Half-life ($t_{1/2}$) and activity of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4. A: The half-life ($t_{1/2}$) of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4; B: The relative activity of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4.

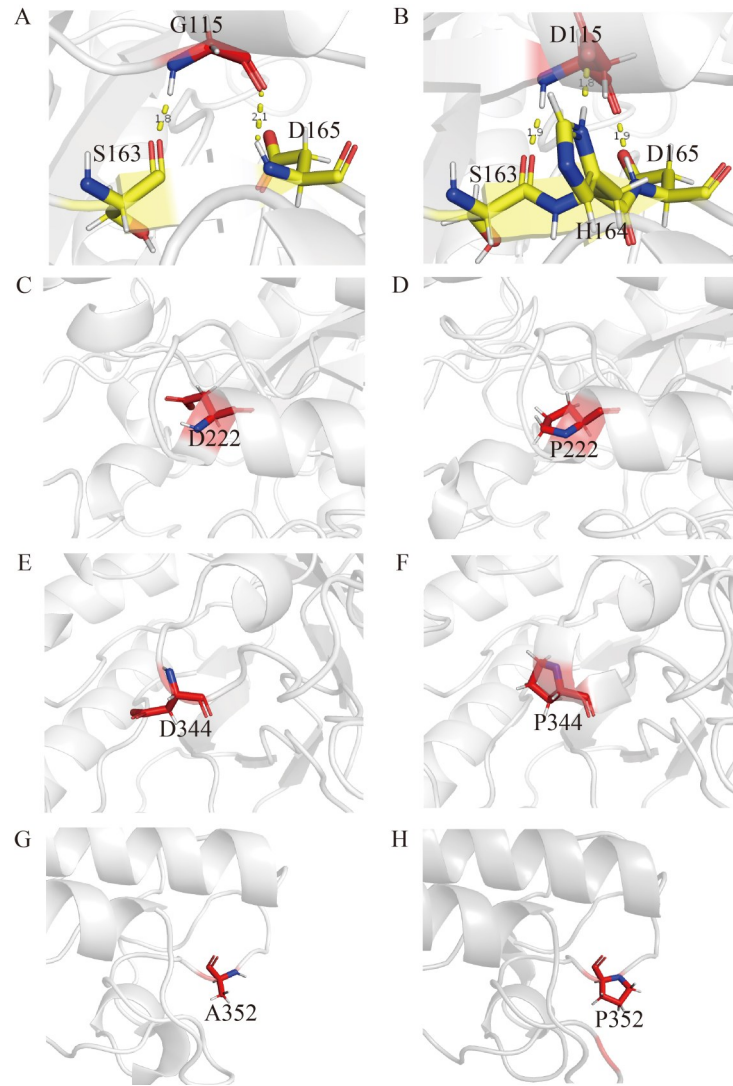


图5 XynRBM26野生型与叠加突变体M4各突变位点局部结构特征。A: XynRBM26野生型G115残基形成的氢键; B: 叠加突变体M4 D115残基形成的氢键及盐桥; C: XynRBM26野生型D222残基所处的二级结构位置; D: 叠加突变体M4 P222残基所处的二级结构位置; E: XynRBM26野生型D344残基所处的二级结构位置; F: 叠加突变体M4 P344残基所处的二级结构位置; G: XynRBM26野生型A352残基所处的二级结构位置; H: 叠加突变体M4 P352残基所处的二级结构位置。

Figure 5 Local structural characteristics of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4 mutation sites. A: The hydrogen bond formed by the G115 residue of the XynRBM26 wild type; B: The hydrogen bonds and salt bridges generated by superimposed mutant M4 D115 residue; C: The secondary structure position of the D222 residue in the XynRBM26 wild type; D: The secondary structure position of the P222 residue in the superimposed mutant M4; E: The secondary structure position of the D344 residue in the XynRBM26 wild type; F: The secondary structure position of the P344 residue in the superimposed mutant M4; G: The secondary structure position of the A352 residue in the XynRBM26 wild type; H: The secondary structure position of the P352 residue in the superimposed mutant M4.

与上述 2 个氨基酸形成氢键，还能与 $\beta 4$ 的组成氨基酸 H164 形成一个距离为 1.8 Å 的盐桥(图 5B)。D222 位于 α 螺旋的 N 端帽子结构上，D222 所在位置附近的氨基酸较为灵活，D221 的 B 值排名第 12，D220 的 B 值排名第 15 位，D222 的 B 值排名第 33，由于 Pro 具有独特而稳定的吡咯环结构，不仅能刚化 D222 位置，还能限制其前面 221 所在位置的灵活性，使该区域的灵活性降低(图 5C、5D)。D344 不仅位于 β 转角的第二个位置，且其灵活性较高(B 值排名第二)。一方面， β 转角在第二个位置具有 Pro 偏好性；另一方面，突变后存在 Pro 效应，在这双重叠加效应下该突变的稳定性增强(图 5E、5F)。A352 位于一个灵活的 Loop 区域，突变为 Pro

后同样由于 Pro 效应增加了 Loop 区的局部刚性(图 5G、5H)。

2.8 野生型及叠加突变体 M4 的分子动力学模拟

采用 Gromacs 软件进行分子动力学模拟，结合 RMSD 值、RMSF 值和 Rg 值分析引入的盐桥和 Pro 效应对 XynRBM26 热稳定性的贡献。如图 6A 所示，随着分子动力学模拟的持续进行，XynRBM26 野生型和突变体 M4 的 RMSD 值在开始阶段均有一个显著上升的过程。突变体 M4 在 10 ns 时达到平衡，而野生型在 25 ns 时才达到平衡。在野生型和突变体均处于平衡状态的 25–50 ns 时间段内，野生型的 RMSD 值一直高于叠加突变体 M4。这表明与野生型相比

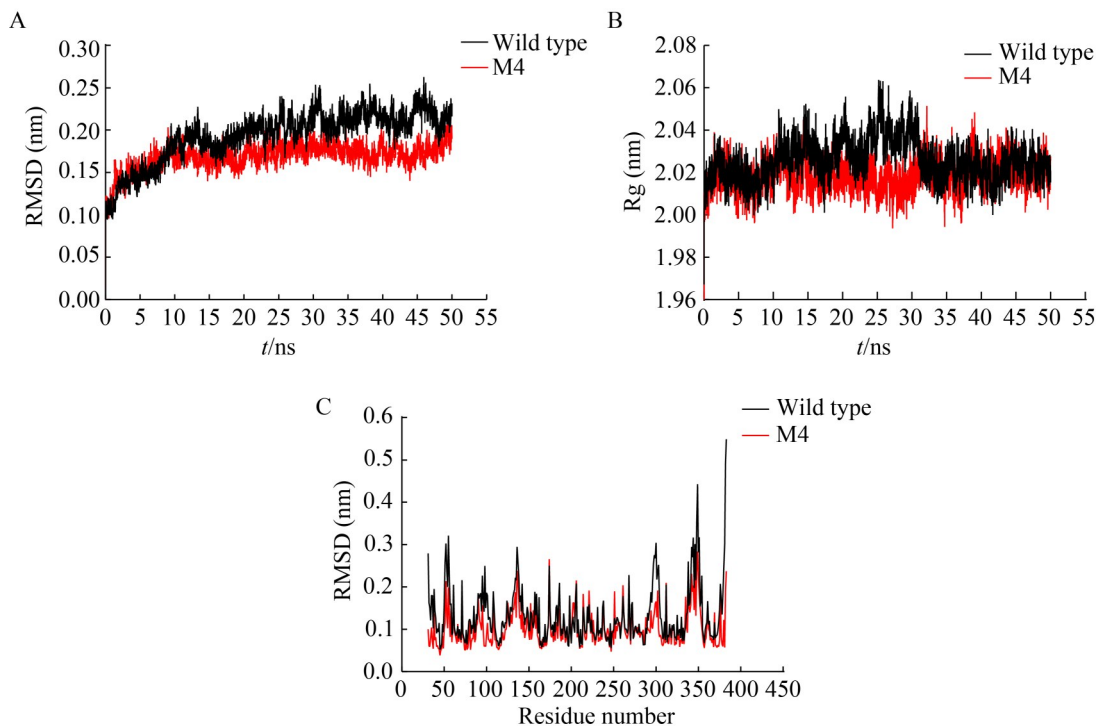


图6 XynRBM26野生型及叠加突变体M4的分子动力学模拟。 A: XynRBM26野生型及叠加突变体M4的RMSD值；B: XynRBM26野生型及叠加突变体M4的Rg值；C: XynRBM26野生型及叠加突变体M4的RMSF值。

Figure 6 Molecular dynamics simulation of XynRBM26 wild type and its superimposed mutant M4. A: The RMSD values of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4; B: The Rg values of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4; C: The RMSF values of XynRBM26 wild type and superimposed mutant M4.

M4 的整体柔性显著下降, 其结构更为稳定。如图 6B 所示, 野生型和突变体 M4 的 R_g 值相差不大, 说明突变对该酶的 R_g 值几乎无影响。

如图 6C 所示, 选取野生型和突变体 M4 均处于平衡状态的 25–50 ns 轨迹文件计算每一个氨基酸残基的 RMSF 值。结果发现, 突变体 M4 在 Loop 286–300、Loop 340–349、N 端 31–44 及 C 端 377–383 等区域的柔性相较于野生型显著降低。这说明引入的 4 点突变可能通过提升该酶部分区域的刚性进而提高酶蛋白的整体稳定性。

3 讨论与结论

Pro 因其独特的侧链结构在组成蛋白的氨基酸中较为特殊。Pro 的结构具有 2 个独有特征: (1) 与酰胺氮共价结合, 这意味着该氮不能参与氢键的形成; (2) 脯氨酸的吡咯五元环结构使中心碳原子与主链氮之间的共价键更强, 更不易旋转。基于上述原因, Pro 在 β 折叠和 α 螺旋中不稳定。由于 Pro 独特的四氢吡咯环状结构能够对肽链及其周围的氨基酸残基起到加强限制作用, 其构象的改变已成为一些蛋白质三维结构折叠与解折叠的限速步骤。由其引起的氨基酸替换所产生的结构限制可在一定程度上增强蛋白质三维结构中原本存在的各种作用, 从而提高蛋白的热稳定性^[17-19]。研究表明在 β 转角的第二个位置、 α 螺旋的 N 端帽子区域和柔性 Loop 区域引入 Pro 通常会增加酶的热稳定性^[20]。因此, 将 Pro 引入上述有利区域可能是提高热稳定性的有效策略。Pro 突变筛选热稳定性突变体的难点在于正确寻找突变引入的位置。研究表明适合引入 Pro 的突变位点具有一个二面角范围 ($\varphi = -90^\circ - -40^\circ$, $\psi = 120^\circ - 180^\circ$ 或 $\psi = -50^\circ - 10^\circ$)^[21]。统计本研究的 4 个阳性 Pro 突变位点的二面角如表 6 所示, 所有阳性突变体的二面角均符合上述范围, 进一步印证了文献的可靠性。

由热稳定性相关文献可知, 单一突变效应引起的热稳定性提升是有限的。Huang 等^[22]通

表6 阳性突变体二面角统计

Table 6 Dihedral angle statistics of positive mutants

Mutation site	$\Phi/^\circ$	$\Psi/^\circ$
182	-55.829	-32.765
222	-55.015	-37.362
344	-68.529	-15.345
352	-64.594	148.177

过对来源于米曲霉的脂肪酶 ROL 的底物结合腔的关键非保守性氨基酸使用 Rosetta 软件进行虚拟饱和突变, 筛选出阳性突变体, 进而与二硫键阳性突变体进行叠加, 筛选出热稳定性叠加突变体 M6, 其中叠加的 2 点突变体 E265V/S267W 的 T_m 仅比野生型提高 1.2 $^\circ\text{C}$, 而叠加突变体 M6 的 T_m 较野生型提高 8.5 $^\circ\text{C}$ 。由此可见, 单个突变体引入的单个效应对提高酶热稳定性的幅度有限, 而基于多个效应的多点叠加突变能大幅度提升酶的热稳定性。本研究在 3 点叠加的 Pro 效应基础上进一步引入了盐桥效应, 得到的 4 点叠加突变体 M4 的热稳定性得到进一步提高。目前, 关于通过改造提高 GH10 家族木聚糖酶热稳定性的研究相对较少。De Souza 等^[23]在 GH10 家族木聚糖酶 XynA 中引入突变体 H209N, 其 T_m 值较野生型仅提高 0.4 $^\circ\text{C}$, 而本研究构建的叠加突变体 M4 的 T_m 值较野生型提高 6.5 $^\circ\text{C}$ 。本研究证实了基于 FoldX 计算和 Pro 效应的相结合方法是获得热稳定性酶的有效策略, 为动物肠道微生物来源的耐盐酶热稳定性改造提供借鉴和参考。

酶常常表现出热稳定性和活性之间的平衡^[24-27], 这意味着增强一种属性通常是以牺牲另一种属性为代价的, 这是研究人员在为工业应用设计酶时面临的一个挑战。然而, 本研究筛选的叠加突变体 M4 的稳定性和活性均有一定程度的提高, 这表明高热稳定性和高活性并不总是相互矛盾的。

作者贡献声明

董盼盼: 开展试验及论文撰写; 许海涛:

数据分析; 王中雨: 负责部分试验; 王琳: 提供试验经费; 周星雨: 试验数据的验证; 刘林东: 文献查询; 张婷婷: 分子动力学模拟; 张娇娇: 试验仪器平台的提供; 汪金萍: 论文审阅及修订。

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文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CHANG XY, XU B, BAI YG, LUO HY, MA R, SHI PJ, YAO B. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171111.
- [2] NGUYEN STC, FREUND HL, KASANJIAN J, BERLEMONT R. Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4): 1629-1637.
- [3] YOU S, XIE C, MA R, HUANG HQ, HERMAN RA, SU XY, GE Y, CAI HY, YAO B, WANG J, LUO HY. Improvement in catalytic activity and thermostability of a GH10 xylanase and its synergistic degradation of biomass with cellulase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 278.
- [4] EIJSINK VGH, GÅSEIDNES S, BORCHERT TV, van den BURG B. Directed evolution of enzyme stability[J]. *Biomolecular Engineering*, 2005, 22(1/2/3): 21-30.
- [5] ZHU CH, CHEN YY, ISUPOV MN, LITTLECHILD JA, SUN LF, LIU XD, WANG QC, GONG H, DONG PP, ZHANG N, WU YK. Structural insights into a novel esterase from the East Pacific Rise and its improved thermostability by a semirational design[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(3): 1079-1090.
- [6] WU T, DU ZP, LI HB, JIANG ZD, ZHENG MJ, LI ZP, HONG T, DU XP, NI H, ZHU YB. A disulfide bond mutant of *Pseudoalteromonas porphyrae* κ -carrageenase conferred improved thermostability and catalytic activity and facilitated its utilization in κ -carrageenan industrial waste residues recycling[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 280: 135573.
- [7] ZAMANI R, RAHPEYMA SS, ALIAKBARI M, NADERI M, YAZDANEI M, AMINZADEH S, KHEZRI J, HAGHBEEN K, KARKHANE AA. Enhancing the thermostability of cellulase from *Clostridium thermocellum* via salt bridge interactions[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2023, 28(4): 684-694.
- [8] STRICKLER SS, GRIBENKO AV, GRIBENKO AV, KEIFFER TR, TOMLINSON J, REIHLE T, LOLADZE VV, MAKHATADZE GI. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(9): 2761-2766.
- [9] CHAROENWONGPAIBOON T, SOMMANAT N, WANGPAIBOON K, PUANGPATHANACHAI M, PONGSAWASDI P, PICHYANGKURA R. Improving the thermostability and modulating the inulin profile of inulosucrase through rational glycine-to-proline substitution[J]. *RSC Advances*, 2024, 14(4): 2346-2353.
- [10] DOTSENKO AS, DENISENKO YA, ROZHKOVA AM, ZOROV IN, KOROTKOVA OG, SINITSYN AP. Enhancement of thermostability of GH10 xylanase E *Penicillium canescens* directed by $\Delta\Delta G$ calculations and structure analysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 152: 109938.
- [11] YOU S, ZHANG WX, GE Y, LU Y, HERMAN RA, CHEN YW, ZHANG S, HU YH, BAI ZY, WANG J. Improvement of GH10 xylanase activity based on channel hindrance elimination strategy for better synergistic cellulase to enhance green bio-energy production[J]. *Renewable Energy*, 2023, 215: 118967.
- [12] BAI ZY, YOU S, ZHANG F, DONG ZW, ZHAO YF, WEN HJ, WANG J. Efficient fermentable sugar production from mulberry branch based on a rational design of GH10 xylanase with improved thermal stability[J]. *Renewable Energy*, 2023, 206: 566-573.
- [13] XU B, DAI LM, LI JJ, DENG M, MIAO HB, ZHOU JP, MU YL, WU Q, TANG XH, YANG YJ, DING JM, HAN NY, HUANG ZX. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from *Massilia* sp. RBM26 isolated from the feces of *Rhinopithecus bieti*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1): 9-19.
- [14] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [15] ZHOU C, XUE YF, MA YH. Enhancing the thermostability of α -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 by single proline substitution[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(1): 12-17.
- [16] ABRAHAM MJ, MURTOLA T, SCHULZ R, PÁLL S, SMITH JC, HESS B, LINDAHL E. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. *SoftwareX*, 2015, 1: 19-25.
- [17] WANG HY, CHEN J, ZHAO JY, LI HW, WEI X, LIU JD. Improved thermostability of D-allulose 3-epimerase from *Clostridium boltea* ATCC BAA-613 by proline residue substitution[J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 199: 106145.
- [18] XIE ZH, ZHAI LX, MENG D, TIAN QP, GUAN ZB, CAI YJ, LIAO XR. Improving the catalytic thermostability of *Bacillus altitudinis* W3 ω -transaminase by proline substitutions[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(7): 323.

- [19] ÓSKARSSON KR, SÆVARSSON AF, KRISTJÁNSSON MM. Thermostabilization of VPR, a kinetically stable cold adapted subtilase, via multiple proline substitutions into surface loops[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 1045.
- [20] SUZUKI Y. The proline rule: a strategy for protein thermal stabilization[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 1999, 75(6): 133-137.
- [21] ALLEN MJ, COUTINHO PM, FORD CF. Stabilization of *Aspergillus awamori* glucoamylase by proline substitution and combining stabilizing mutations[J]. Protein Engineering, 1998, 11(9): 783-788.
- [22] HUANG JS, DAI SH, CHEN XY, XU L, YAN JY, YANG M, YAN YJ. Alteration of chain-length selectivity and thermostability of *Rhizopus oryzae* lipase via virtual saturation mutagenesis coupled with disulfide bond design[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(1): e0187822.
- [23] De SOUZA AR, de ARAÚJO GC, ZANPHORLIN LM, RULLER R, FRANCO FC, TORRES FAG, MERTENS JA, BOWMAN MJ, GOMES E, da SILVA R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 20-26.
- [24] ZHAO Y, CHEN K, YANG HX, WANG YT, LIAO XJ. 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.
- [25] JIANG X, WANG YR, WANG Y, HUANG HQ, BAI YG, SU XY, ZHANG J, YAO B, TU T, LUO HY. Exploiting the activity-stability trade-off of glucose oxidase from *Aspergillus niger* using a simple approach to calculate thermostability of mutants[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128270.
- [26] ZHENG GS, YANG JX, ZHOU L, SINELSHCHIKOVA A, LEI Q, LIN JG, WUTTKE S, JEFFREY BRINKER C, ZHU W. Multivariate silicification-assisted single enzyme structure augmentation for improved enzymatic activity-stability trade-off[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2024, 63(29): e202406110.
- [27] ZHANG YL, ZHANG T, MIAO M. Semi-rational design in simultaneous improvement of thermostability and activity of β -1,3-glucanase from *Alkalihalobacillus clausii* KSMK16[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283: 137779.