

地衣芽孢杆菌来源角蛋白酶 N 端对活力及其热稳定性的影响

刘柏宏^{4,5} 张娟^{1,5*} 堵国成^{3,5} 陈坚^{2,5} 廖祥儒^{1,5*}

- (1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)
- (2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)
- (3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)
- (4. 食品安全与营养协同创新中心 江苏 无锡 214122)
- (5. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】通过对一株地衣芽孢杆菌来源的角蛋白酶 N 端进行分子改造, 研究其对角蛋白酶活力和热稳定性的影响, 进而提高角蛋白酶的热稳定性。【方法】将角蛋白酶 N 端前 5 个氨基酸进行分段缺失, 并通过序列比对将 N 端的前 5 个氨基酸替换为来源于 *Thermoactinomyces vulgaris* 的嗜热蛋白酶的 N 端, 将野生型和突变体角蛋白酶基因在枯草芽孢杆菌 WB600 中进行表达, 并对重组酶进行纯化与酶学性质研究。【结果】角蛋白酶 N 端不同长度的缺失大幅度地降低了角蛋白酶的活力, 其中缺失前 5 个氨基酸完全丧失了酶活力。将角蛋白酶 N 端前 5 个氨基酸替换为嗜热蛋白酶 N 端前 12 个氨基酸, 虽然降低了近 70% 的活力, 但是却增加了角蛋白酶的热稳定性, 60 °C 条件下的半衰期 $t_{1/2}$ 由原来的 9 min 提高到 20 min。【结论】角蛋白酶的 N 端对其酶活力具有较大的影响, 与嗜热蛋白酶来源的 N 端进行替换可以有效提高角蛋白酶的热稳定性。

关键词: 角蛋白酶, N 端, 热稳定性

Effects of the N-terminus of keratinase from *Bacillus licheniformis* on activity and thermostability

LIU Bai-Hong^{4,5} ZHANG Juan^{1,5*} DU Guo-Cheng^{3,5} CHEN Jian^{2,5} LIAO Xiang-Ru^{1,5*}

- (1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
- (2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
- (3. The Key Laboratory of Carbohydrate and Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
- (4. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
- (5. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to functional analysis the N-terminus of keratinase from *Bacillus*

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100905); 国家十二五关键技术研究发展计划项目(No. 2011BAK10B03); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(No. IRT1135); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2012553)

*通讯作者: Tel: 86-510-85913661

✉: 张娟: zhangj@jiangnan.edu.cn; 廖祥儒: xrliao@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-09-21; 接受日期: 2013-11-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

licheniformis and its effect on the activity and thermostability of keratinase, the N-terminus of keratinase was reconstructed by molecular modification. **[Methods]** The N-terminus residues of keratinase were deleted individually and replaced by an N-terminus of thermitase from *Thermoactinomyces vulgaris* through sequence alignment. The recombinant keratinases of wild-type and mutants were production in *Bacillus subtilis* WB600 and then purified for characterization. **[Results]** Deletion of N-terminus of keratinase resulted in enzyme activity decreased prominently, when deficiency of five residues the activity of enzyme was completely abolished. Although replacement of N-terminus from thermitase decreased the activity of keratinase, the thermostability of mutant was enhanced compared with wild-type. The half-live of thermal inactivation ($t_{1/2}$) was enhanced from 9 to 20 min at 60 °C. **[Conclusion]** The N-terminus of keratinase was important for enzyme activity, replacement of N-terminus between keratinase and thermitase could efficient enhanced thermostability of keratinase.

Keywords: Keratinase, N-terminus, Thermostability

角蛋白是一种不可溶的纤维状蛋白质,由于其富含二硫键使角蛋白具有较强的结构稳定性因而很难被一般的蛋白酶如枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶等降解。角蛋白酶是一种特殊的可以降解角蛋白的蛋白酶,可以由细菌、真菌、放线菌等多种微生物产生^[1]。角蛋白酶可以将羽毛角蛋白转化为可溶性蛋白以及氨基酸,可以代替粮食作物作为饲料喂养家禽。另外,角蛋白酶处理方法也可以应用在纺织物处理上,取代污染较严重的化学处理方法,进而在保护环境的前提下改善织物的性能。同样,角蛋白酶在其他领域如清洁剂、医药、化妆品、皮革等行业也具有广泛的应用价值^[2]。以往对角蛋白酶的研究主要集中于菌种筛选以及酶的分离纯化,对角蛋白酶的结构分析研究较少。在前期研究中,本课题组将一株产角蛋白酶的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* BBE11-1)中的角蛋白酶基因进行克隆,并在枯草芽孢杆菌中成功实现胞外分泌表达,发现该酶在 60 °C 处理 30 min 的条件下完全失活^[3]。热稳定性较好的酶可以在相对较高的温度下进行反应,有利于提高酶的反应速率、减少其他微生物的污染以及促进酶分子充分渗透到底物中进行反应^[4]。通过对该地衣芽孢杆菌来源的角蛋白酶氨基酸序列分析发现,其与枯草杆菌蛋白酶具有较高的相似性,但是目前对枯草杆菌蛋白酶成熟区域的 N 端功能分析未见详细报道。本文作者利用基因工程手段,对地衣芽孢杆菌来源的角

蛋白酶 N 端进行分子改造,研究其对角蛋白酶活力以及热稳定性的影响,为其他来源的角蛋白酶分子改造提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* BBE11-1)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 及质粒 pMA5 均由本实验室保存。质粒 pMD19-T、定点突变试剂盒 (MutanBEST Kit)、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、各种 DNA 限制性内切酶,为大连宝生物公司产品。角蛋白(来源羊毛)购自百灵威(上海)公司。引物和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。其他常规生化试剂为国产分析纯。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌采用 LB 培养基培养,抗性筛选时加入氨苄青霉素(Ampicillin),终浓度为 100 mg/L。角蛋白酶表达培养基为在 LB 培养基基础上添加 0.1 g/L $MgSO_4$ 及 10 g/L 葡萄糖,培养时加入卡那霉素(Kanamycin),终浓度为 25 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 定点突变: 利用 MutanBEST Kit 定点突变试剂盒的方法。(1) 以先前构建好的带有角蛋白酶基因 *ker* 的质粒 pMD19-T-*ker* 为模板,用目的引物(表 1)进行 PCR 扩增。(2) 应用 Blunting kination

表 1 突变引物 Table 1 Oligonucleotide primers used for site-directed mutagenesis	
Primers	Nucleotide sequences (5'→3')
Del1	CAAACCGTTCCTTACGGCAT
Del1-2	ACCGTTCCTTACGGCATTCC
Del1-3	G TTCCTTACGGCATTCTCTCA
Del1-4	CCTTACGGCATTCTCTCATTA
Del1-5	TACGGCATTCTCTCATTAAGC
N-YTPND	TATACGCCTAATGACCCCTATTCTCATCAAGACAATACGGCATTCTCTCATTAAGC

酶对 PCR 产物在 37 °C 条件下处理 30 min , 后在 70 °C 条件下处理 5 min 使酶失活。加入 T4 DNA 连接酶在 16 °C 条件下进行连接。(3) 将连接液接入大肠杆菌 JM109 中进行转化 , 最后通过测序来检验正确的突变体。N 端前 5 位氨基酸的分段缺失分别命名为 Del1、Del1-2、Del1-3、Del1-4 和 Del1-5。角蛋白酶 N 端替换为嗜热蛋白酶 N 端是将角蛋白酶的前 5 个氨基酸 AQTVP 替换为嗜热蛋白酶 N 端 YTPNDPYFSSRQ ,突变体命名为 N-YTPND。

1.2.2 重组表达质粒的构建与表达: 根据 *ker* 序列引物 ,并引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点 :Prime-f1 : 5'-GGAATTCCATATGATGAGGAAAAAGAGTTT TTGG-3' , *Nde* I ; Prime-r2 : 5'-CGCGGATCCTT ATTGAGCGGCAGCTTCG-3' , *Bam*H I ; 以携带不同突变体基因的质粒 pMD19-T-*ker* 为模板 , 用引物进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化后 , 采用 *Nde* I、*Bam*H I 进行双酶切。将酶切产物纯化后与表达载体 pMA5 相连接 , 筛选阳性克隆。提取质粒 , 进行测序并双酶切验证 , 获得重组质粒 pMA5-*ker*。将重组质粒 pMA5-*ker* 转入枯草芽孢杆菌 WB600 中获得转化子 ,接入表达培养基在 37 °C、200 r/min 条件下培养 30 h 后离心取得发酵上清液进行纯化及酶学性质测定。

1.2.3 重组角蛋白酶的纯化: 采用 Pellicon® XL 过滤仪(Millipore 公司 , 美国)将含有粗酶的发酵上清液通过 10 kD 的超滤膜进行超滤除杂 , 加入终浓度为 1 mol/L 的硫酸铵后注入到配有 HiTrap 琼脂糖苯基快流速疏水色谱柱(5 mL , GE 公司 , 美国)的

AKTA 纯化仪中(GE 公司 , 美国)。洗脱未结合蛋白 , 用硫酸铵(1.0 mol/L)对结合蛋白进行梯度洗脱 , 收集洗脱样品。

1.2.4 重组角蛋白酶最适作用温度及热失活半衰期($t_{1/2}$)的测定: 在 pH 值为 10.5 的条件下 , 测定 20–80 °C 温度范围内的酶活 , 以酶活最高值为 100%来计算相对酶活。将纯化后的突变角蛋白酶稀释到同一浓度 , 置于 60 °C 水浴保温 , 处理 30 min , 每隔 5 min 取样检测角蛋白酶残余活力。作 Ln (活力)-时间关系图 , 由曲线末端直线部分的斜率(k)求得蛋白的半衰期($t_{1/2}$)。

1.2.5 晶体结构模型构建及结构分析: 利用在线服务器 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) , 以 PDB 数据库 Subtilisin Carlsberg (PDB 3unxA , 1.26 Å resolution)的晶体结构为模板 , 同源模拟角蛋白酶野生型(WT)的晶体结构。应用在线软件 PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>)对地衣芽胞来源角蛋白酶(KB)与 *Thermoactinomyces vulgaris* 来源的嗜热蛋白酶 (ThermitaseTv , PDB 1THM)进行氨基酸序列对比分析。角蛋白酶 N 端替换为嗜热蛋白酶 N 端的突变体晶体结构模型由软件 Modeller 9.11 构建 , 以角蛋白酶以及嗜热蛋白酶的晶体模型为模板。晶体结构由软件 Discovery studio 2.5 分析。

1.2.6 角蛋白酶酶活及 K_m 的测定: 角蛋白酶酶活测定根据 Yamamura 等^[5]的方法并加以修改 , 将发酵液离心 10 min (10 000× g , 4 °C) , 取上清液进行适当稀释 , 吸取 200 μ L 与 300 μ L 0.05 mol/L

Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.0)溶解 1%的底物(角蛋白)混匀, 50 °C 反应 10 min, 加入 500 μ L 4 mol/L TCA 溶液以终止反应。离心 10 min, 吸取 200 μ L 上清液, 依次加入 1 mL 福林酚试剂和 200 μ L 0.5 mol/L Na_2CO_3 , 50 °C 反应 10 min。以零时间的反应液作为空白, 于 660 nm 处检测吸光值。以角蛋白为底物, 每 1 min 催化分解角蛋白生成 1 μ g 酪氨酸所需要的酶量为一个酶活单位。

以不同浓度的底物 (100–600 mmol/L) *N*-succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (AAPF), 在 40 °C 条件下利用双倒数法(Lineweaver- Burk)^[6]对 K_m 值进行计算。

2 结果与分析

2.1 角蛋白酶与嗜热蛋白酶 N 端的分析比较

由图 1 可以看出, 角蛋白酶与嗜热蛋白酶具有较高的相似性, 其中序列比对根据不同的保守度 (1–10) 划分。可以看出, 这两种酶在 N 端的保守度较低, N 端的晶体结构模型(图 2A、B)显示, 在第一个保守区域(YG)之前, 角蛋白酶的 N 端为一段无规则卷曲及 α 螺旋组成, 而嗜热蛋白酶的 N 端与角蛋白酶相比多出了一段无规则卷曲和 α 螺旋结构。所以本研究将角蛋白酶的前 5 个氨基酸 AQTVP 替换为嗜热蛋白酶的 N 端 YTPNDPYFSSRQ 来考察其对角蛋白酶活力和热稳定性的影响。

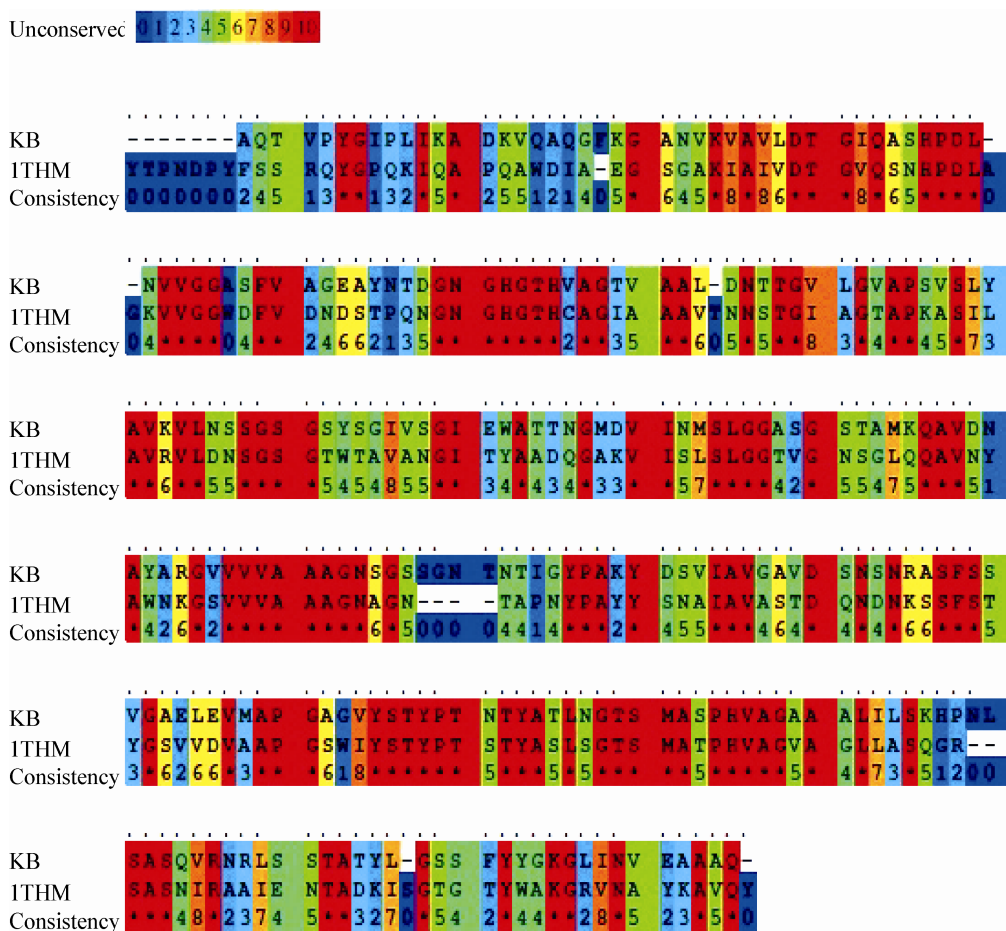


图 1 地衣芽孢杆菌来源角蛋白酶(KB)与嗜热蛋白酶(PDB 1THM)氨基酸序列对比图

Figure 1 Protein sequence alignment of keratinase from *B. licheniformis* BBE11-1 (KB) and ThermitaseTv (PDB 1THM)

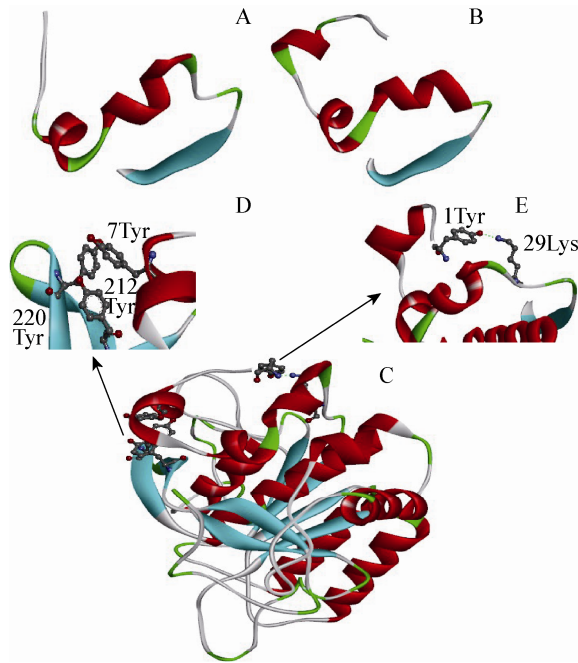


图 2 角蛋白酶及嗜热蛋白酶模型结构图

Figure 2 The model structure of keratinase and ThermitaseTv

注：A：角蛋白酶 N 端模型结构图；B：嗜热蛋白酶 N 端结构图；C：N-YPTND 突变体模型结构图；D：苯环间相互作用结构图；E：Cation-Pi 作用模型结构图。

Note: A: The model structure of N-terminus from keratinase; B: The model structure of N-terminus from ThermitaseTv; C: The model structure of N-YPTND mutant; D: The model structure of aromatic-aromatic interactions; E: The model structure of Cation-Pi interaction.

2.2 角蛋白酶 N 端突变体在枯草芽孢杆菌中的表达

角蛋白酶 N 端的缺失大幅度降低了酶活力(表 2)，比酶活只有野生型的 2%–12%。将角蛋白酶 N 端前 5 个氨基酸缺失后，角蛋白酶的酶活力完全丧失。而将角蛋白酶 N 端替换为嗜热蛋白酶的 N 端，比酶活同样损失较大，与野生型相比保留了近 27% 的比活力，说明角蛋白酶的 N 端对酶活力影响较大。SDS-PAGE (图 3A)显示，除了突变体 Del1-5 以外，其他突变体在约 32 kD 处有一条明显的条带，与野生型成熟酶大小相一致^[3]，说明有成熟酶的分泌。但是在约 37 kD 处仍然有一条明显的条带，说明角蛋白酶前体并未有效的进行自加工并切割，仍然以无活性的前体形式存在。

表 2 突变体对角蛋白酶酶活及热稳定性的影响 Table 2 Effects of mutants on activities and thermostability of keratibase			
类型 Type	比酶活 Specific activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	$t_{1/2}$ (60 °C) (min)
野生型 WT	1 286	2.42	9.0
Del1	107	2.66	8.2
Del1-2	97	3.30	7.5
Del1-3	166	4.42	7.2
Del1-4	30	—	—
Del1-5	0	—	—
N-YTPND	358	3.86	20.0

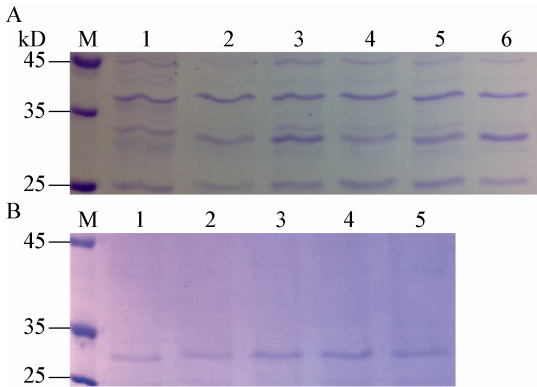


图 3 角蛋白酶野生型与突变体的表达与纯化 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE of expression protein and purified wild-type and mutant keratinase

Note: A: Expression protein of mutant keratinases. M: Marker; 1: Del1-5; 2: Del1-4; 3: Del1-3; 4: Del1-2; 5: Del1; 6: N-YTPND. B: Purified wild-type and mutant keratinase. M: Marker; 1: Del1-3; 2: Del1-2; 3: Del1; 4: N-YTPND; 5: Wild-type.

2.3 角蛋白酶突变体的最适作用温度及热稳定性

将纯化后的突变体 N-YTPND (图 3B)在 60 °C 条件下温育 30 min 来分析其热稳定性，结果表明(表 2)：分别缺失 N 端前 3 位氨基酸对角蛋白酶的热稳定性影响较小，略微降低了半衰期($t_{1/2}$)值，由 9 min 分别降为 8.2、7.5 和 7.2 min (突变体 Del1-4 由于酶活力非常低，不便于纯化，所以没有对其热稳定性进行分析)。研究发现将角蛋白酶 N 端替换为嗜热蛋白酶的 N 端明显的提高了角蛋白酶的热稳定性，在 60 °C 条件下的 $t_{1/2}$ 值由 9 min 提高到 20 min，提高了近两倍。同时，最适作用温度(图 4)也由原来的 40 °C 提高到 50 °C。

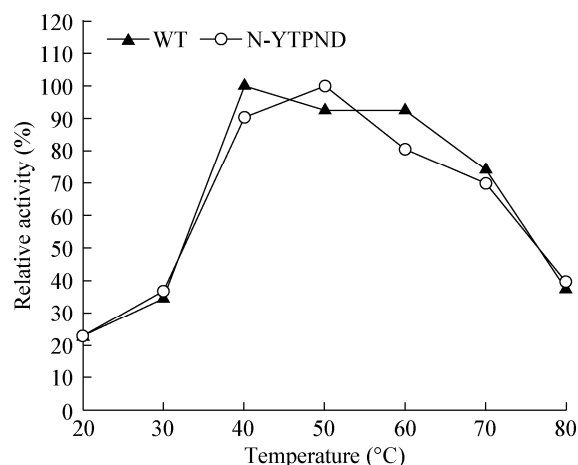


图4 温度-活力曲线图

Figure 4 Effects of temperature on activities of WT and N-YTPND

3 讨论

来源于地衣芽胞杆菌的角蛋白酶与枯草杆菌蛋白酶拥有较高的同源性,属于枯草杆菌蛋白酶家族(Subtilisin family),其催化部位以催化三分子的形式存在^[7]。地衣芽胞杆菌来源的角蛋白酶同枯草杆菌蛋白酶一样,以信号肽-前导肽-成熟酶区域(Pre-pro-subtilisin precursor)的前体结构进行分泌。角蛋白酶的成熟酶区域由274个氨基酸组成,包括催化三分子结构(D32, H63, S220)。在角蛋白酶的前体未进行折叠前成熟酶的N端与前导肽的C端以非共价形式连接,在前导肽进行自加工切割并被降解后,才能形成具有活性的成熟酶^[8],所以N端对角蛋白酶的活性及热稳定性可能具有一定的影响。本文通过对角蛋白酶成熟区域的N端进行缺失及替换,考察其对角蛋白酶活力和热稳定性的影响。角蛋白酶N端的缺失大幅度降低了酶活力,其中N端前5位氨基酸残基的缺失会造成酶活力的完全丧失。表2显示突变体的 K_m 值高于野生型角蛋白酶,N端的缺失会造成酶与底物亲和力的降低。角蛋白酶N端前5位氨基酸残基的结构为无规则卷曲,说明此段区域的二级结构对于角蛋白酶成熟酶的形成是必需的,该结构的缺失会造成角蛋白酶前导肽无法充分地进行自加工及切

割,SDS-PAGE(图3A)显示仍有前体角蛋白酶的分泌(37 kD),这与先前的报道一致^[9]。以上结果可能为突变体比酶活降低的原因。

研究发现缺失N端第2位氨基酸降低了角蛋白酶的热稳定性,半衰期($t_{1/2}$)由9 min降为7.5 min。应用软件对其结构进行分析,与野生型相比,2Gln位置氨基酸的缺失减少了Gln与74Leu、76Asn、78Thr以及80Val位置氨基酸之间的氢键作用力,这可能是缺失N端第2位氨基酸后热稳定性降低的原因。虽然目前对提高枯草杆菌蛋白酶热稳定性已有较为深入的研究,如引入二硫键^[10]、定向进化^[11]、引入离子键^[12],增加氢键^[13]等策略,但是对成熟酶区域N端的分子改造研究未见相关报道。本研究将角蛋白酶成熟区域的前5个氨基酸AQTVP替换为嗜热蛋白酶N端YTPNDPYFSSRQ,虽然突变体的比酶活低于野生型,但是却提高了热稳定性,半衰期($t_{1/2}$)由9 min提高到20 min。Sun等^[14]将*Aspergillus niger*来源的中温木聚糖酶N端替换为*T. fusca*来源的嗜热木聚糖酶N端,同样也提高了中温木聚糖酶的热稳定性。通过软件对突变体的结构分析发现(图2C、D、E),与野生型相比,突变体N-YTPND增加了一个Cation-Pi作用(1Tyr-29Lys)以及芳香环之间的相互作用(7Tyr-212Tyr-220Tyr),同时氢键总数也由野生型的264个提高到288个,增加了24个氢键。有研究通过系统的比较900个中温蛋白质以及300个嗜热蛋白质的晶体结构发现,嗜热蛋白质结构中的Cation-Pi作用力要远远多于中温蛋白质,而且这种作用力的能量较离子键要高两倍^[15]。通过在线分析网站PIC(<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/index.html>)对野生型和突变体N端的疏水相互作用进行了分析,结果发现突变体N-YTPND较野生型增加了3个分子间疏水相互作用力,而疏水相互作用力可以对蛋白质的稳定性提供60%的贡献^[16]。以上作用力的增加可能是角蛋白酶热稳定性提高的原因。

本试验利用基因工程手段,对地衣芽胞杆菌来

源的角蛋白酶 N 端进行了分析, 将角蛋白酶 N 端替换为嗜热蛋白酶的 N 端可以有效提高角蛋白酶的热稳定性, 为角蛋白酶分子改造提供了理论基础。对角蛋白酶 N 端进行分子改造提高其催化活力, 是下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1735-1750.
- [2] Gupta R, Sharma R, Beg QK. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2013, 33(2): 216-228.
- [3] Liu BH, Zhang J, Li B, et al. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(5): 825-832.
- [4] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 140-147.
- [5] Yamamura S, Morita Y, Hasan Q, et al. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(6): 595-600.
- [6] Jaouadi B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, et al. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency[J]. Biochimie, 2008, 90(9): 1291-1305.
- [7] Siezen RJ, Leunissen JA. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases[J]. Protein Science, 1997, 6(3): 501-523.
- [8] Takagi H, Koga M, Katsurada S, et al. Functional analysis of the propeptides of subtilisin E and aqualysin I as intramolecular chaperones[J]. Febs Letters, 2001, 508(2): 210-214.
- [9] Egnell P, Flock JI. The autocatalytic processing of the subtilisin carlsberg pro-region is independent of the primary structure of the cleavage site[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(9): 1115-1119.
- [10] Pantoliano MW, Ladner RC, Bryan PN, et al. Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond[J]. Biochemistry-US, 1987, 26(8): 2077-2082.
- [11] Zhao H, Arnold FH. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase[J]. Protein Engineering, 1999, 12(1): 47-53.
- [12] Kobayashi T, Kageyama Y, Sumitomo N, et al. Contribution of a salt bridge triad to the thermostability of a highly alkaline protease from an alkaliphilic *Bacillus* strain[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6): 961-967.
- [13] Brayan PN, Rollence ML, Pantoliano MW, et al. Proteases of enhanced stability: characterization of a thermostable variant of subtilisin[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004, 1(4): 326-334.
- [14] 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[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 42(1): 122-130.
- [15] Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: A structural genomics based study[J]. Biochemistry-US, 2002, 41(25): 8152-8161.
- [16] Pace CN, Fu H, Fryar KL, et al. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 408(3): 514-528.