

· 塑料解聚酶的设计与改造 ·

韩旭 中国科学院天津工业生物技术研究所高级工程师。主要从事结构生物学与蛋白酶学的研究工作，在蛋白质表达纯化、分子改造、蛋白晶体培养、数据收集、结构解析以及酶学性质表征等方面具有较为丰富的经验。在 *Nature Catalysis*、*Nature Communications*、*Angew Chem* 等期刊发表 10 余篇文章，申请专利 5 项。



高健 中国科学院天津工业生物技术研究所高级工程师。主要从事酶蛋白结构生物学的研究工作，在分子生物学、蛋白质工程学、结构生物学等方面具备丰富经验。相关成果发表于 *ACS Catalysis*、*Angew Chem* 等期刊上，申请专利 5 项。



来源于海洋宏基因组塑料降解酶 Ple629 的耐热性提升改造

赵夷培^{1,2}，王浩^{2,3,4}，武攀^{1,2}，李志帅^{2,3,4}，刘夫锋¹，顾群^{2,3,4}，刘卫东^{2,3,4}，高健^{2,3*}，韩旭^{2,3*}

1 天津科技大学生物工程学院，天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程研究中心，天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

4 中国科学院大学，北京 100049

赵夷培，王浩，武攀，李志帅，刘夫锋，顾群，刘卫东，高健，韩旭. 来源于海洋宏基因组塑料降解酶 Ple629 的耐热性提升改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2040-2052.

ZHAO Yipei, WANG Hao, WU Pan, LI Zhishuai, LIU Fufeng, GU Qun, LIU Weidong, GAO Jian, HAN Xu. Engineering the plastic degradation enzyme Ple629 from marine consortium to improve its thermal stability[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2040-2052.

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2103600)；天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-PTJJ-008, TSBICIP-KJGG-001, TSBICIP-IJCP-003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103600) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJJ-008, TSBICIP-KJGG-001, TSBICIP-IJCP-003).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Jian, gao_j@tib.cas.cn; HAN Xu, han_x@tib.cas.cn

Received: 2022-12-29; Accepted: 2023-03-09

摘要: 石化来源的聚酯类塑料如聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)以及聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯(polybutylene adipate terephthalate, PBAT)等已被广泛使用,但由于它们在自然界中难以降解或生物降解周期较长导致了严重的环境污染,因此对这些塑料废弃物的处理是亟待解决的问题之一。从循环经济的角度考虑,利用生物酶法对聚酯类塑料如 PET 或 PBAT 等的废弃物进行解聚,再将解聚产物进行循环利用,是一个很有潜力的研究方向。探究近年来关于聚酯塑料降解酶的报道发现,高活性且耐高温的降解酶会有更大的潜在优势。来自海洋微生物宏基因组的中温塑料降解酶 Ple629,在常温下对聚酯类塑料 PET 和 PBAT 均有较好的降解活力,但由于不耐受高温,限制了其潜在应用。在前期获得 Ple629 三维结构的基础上,本研究基于结构比对及能量设计,找到了一些潜在提升其热稳定性的位点进行改造设计,并对突变体进行了表达纯化和热稳定性测定。突变体 V80C 和 D226C/S281C 的熔点温度(T_m)值分别提升了 5.2 °C 和 6.9 °C,突变体 D226C/S281C 的活性也比野生型酶提高了 1.5 倍,为后续对 Ple629 的进一步改造提供了思路和依据。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯; 水解酶; 表达纯化; 耐热性; 突变

Engineering the plastic degradation enzyme Ple629 from marine consortium to improve its thermal stability

ZHAO Yipei^{1,2}, WANG Hao^{2,3,4}, WU Pan^{1,2}, LI Zhishuai^{2,3,4}, LIU Fufeng¹, GU Qun^{2,3,4}, LIU Weidong^{2,3,4}, GAO Jian^{2,3*}, HAN Xu^{2,3*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 National Engineering Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Petrochemical-derived polyester plastics such as polyethylene terephthalate (PET) and polybutylene adipate terephthalate (PBAT) have been widely used. However, the difficulty to be degraded in nature (PET) or the long biodegradation cycle (PBAT) resulted in serious environmental pollution. In this connection, treating these plastic wastes properly becomes one of the challenges of environment protection. From the perspective of circular economy, biologically depolymerizing the waste of polyester plastics and reusing the depolymerized products is one of the most promising directions. Recent years have seen many reports on polyester plastics degrading organisms and enzymes. Highly efficient degrading enzymes, especially those with better thermal stability, will be conducive to their application. The mesophilic plastic-degrading enzyme Ple629 from the marine microbial metagenome is capable of degrading PET and PBAT at room temperature, but it cannot tolerate high temperature, which hampers its potential application. On the basis of the three-dimensional structure of Ple629 obtained from our previous study, we identified some sites which might be important for its

thermal stability by structural comparison and mutation energy analysis. We carried out transformation design, and performed expression, purification and thermal stability determination of the mutants. The melting temperature (T_m) values of mutants V80C and D226C/S281C were increased by 5.2 °C and 6.9 °C, respectively, and the activity of mutant D226C/S281C was also increased by 1.5 times compared with that of the wild-type enzyme. These results provide useful information for future engineering and application of Ple629 in polyester plastic degradation.

Keywords: polyethylene terephthalate; polybutylene adipate terephthalate; hydrolase; expression and purification; thermal stability; mutagenesis

塑料是一类以不同石化来源单体为原料通过加聚或缩合形成的高分子聚合物, 它们具有绝缘性、耐热性、可塑性及足够的强度, 被广泛地应用于日常生活和其他领域^[1]。聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)由对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)通过酯键聚合而成, 被广泛用作饮料、食品包装材料以及纺织纤维等, 是重要的大规模生产的石化塑料之一^[2], 然而, 塑料的广泛使用带来了大量的环境污染及白色污染, 因为其降解速度极慢, 并且已经严重威胁到全球的生态系统。聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯(polybutylene adipate terephthalate, PBAT)是一种可生物降解的脂肪族芳香族共聚酯, 通过将 1,4-丁二醇与芳香族二羧酸酯化, 然后与琥珀酸缩聚合成^[3], 它既保留了聚酯塑料的一些优良特性, 又可以较快地被生物降解^[4], 所以人们认为它可以作为聚乙烯(polyethylene, PE)等塑料的环保替代品, 具有较广泛的应用潜力^[5]。PBAT 可以单独使用, 也可与聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、聚- β -羟基丁酸- β -羟基戊酸酯(polyhydroxybutyrate-co-valerate, PHBV)和纤维素等其他材料混合使用^[6-12], 并且已经作为商业产品用于工业规模生产, 如地膜、有机垃圾袋或包装材料等^[13]。PBAT 在土壤和堆肥条件下可被微生物降解^[14-16], 在高温堆肥条件下,

可在数月完全分解^[17]。对聚酯类塑料如 PET 和 PBAT, 利用生物酶法进行降解并对降解产物进行高值化利用, 是一个重要的研究方向^[18-19]。

近年来筛选和鉴定出大量聚酯类塑料降解酶, 如酯酶(esterase)、脂肪酶(lipase)和角质酶(cutinase)等, 一些以降解 PET 塑料为主的酶, 对 PBAT 也有降解能力^[20], 随着聚酯类塑料降解酶催化机制和定向改造的突破性进展, 已经获得了一些具有优良性质的突变体酶^[21-23]。较高的反应温度有利于塑料的降解, 因而高温酶在塑料的生物降解中有明显的优势^[24], 提升酶的热稳定性将有助于酶法生物循环的应用^[25]。近年来, 许多研究者通过酶工程对塑料降解酶如来自大阪伊德氏杆菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 的 *IsPETase* 改造来提高其热稳定性^[26]。在蛋白结构中增添二硫键是提升酶的热稳定性的有效方法之一^[27-29], 该方法被成功用在塑料降解酶上, 来自于热裂菌(*Thermobifida fusca*) KW3 聚酯水解酶 *TfCut2* 通过在蛋白结构中引入二硫键(D204C-E253C), 其热稳定性 T_m 提升了 25 °C, 酶的催化效率也提高了 1 倍, 并通过蛋白质晶体学证明了此二硫键的形成^[30-31]。除了上述基于酶结构的改造, 其他技术如人工智能、机器学习, 以及 FoldX 虚拟突变能量计算等也被用来进行辅助研究^[32], 基于贪婪积累策略方法获得的 *DuraPETase*, 比野生

型 IsPETase 的 T_m 增加了 31 °C^[33], 进一步结合卷积神经网络训练后, 得到了目前构建 IsPETase 突变体库中 T_m 最高的突变体 DuraPETase+N233K, T_m 约为 83.5 °C^[34]。

以 PBAT 为唯一碳源的海洋微生物基因组中发现的塑料降解酶 Ple629^[35], 对 PBAT 和 PET 纳米颗粒都具有水解活性, 有较好的应用潜能。近期本团队解析了其空间结构^[36]和底物复合体的结构^[37], 并参照 PET 降解酶的改造^[38], 对该酶进行了活性提升改造, 获得了活性提升的突变体。由于该酶是来源于海洋环境的中温酶, 本研究拟通过设计提升其热稳定性, 以增强其后续应用的潜能。参照已报道的 PET 水解酶利用生成二硫键提升热稳定性的结果, 本研究在 Ple629 中相应位置引入了一对关键二硫键, 并结合虚拟计算设计找到了一些可能的相关位点, 对这些突变蛋白进行表达制备, 验证了突变体热稳定性的变化情况, 获得了一些热稳定性提升的突变体, 并对突变的潜在影响进行了分析。本研究为后续聚酯类塑料的降解研究提供了更多的理论基础和实验依据, 对推进相应塑料的绿色降解具有积极意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)购于北京索莱宝科技有限公司。PET 纳米颗粒由非晶态 PET 薄膜(购自 Goodfellow 公司)制备而成, 对苯二甲酸购自 Sigma 公司。质粒提取试剂盒和 DNA 纯化试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司(Tiangen)。

1.2 Ple629 重组质粒的合成和定点突变

海洋微生物来源的 Ple629 (GenBank 登录号: OK558825)^[28]基因经密码子优化后, 由上海捷瑞生物技术公司合成, 并连接至 pET32a 载体。经过定点突变 PCR, 在 PCR 产物中加入 *Dpn* I 酶进行消化, 去除甲基化模板后, 用 DNA 纯化试剂盒纯化, 纯化后的产物转入 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 测序正确的克隆按照质粒小提试剂盒上的步骤进行质粒抽提, 存放于 -20 °C, 用于后续实验, 突变体引物设计如表 1 所示。

表 1 Ple629 突变体引物设计

Table 1 Primer design for Ple629 mutants

Mutants	Primer sequence (5'→3')
N65D	TATCCGACCGANACCACCGGCACGATGGCG
V80C	CCGGGCTTTTGNAGCCCGAAAGCAGCA
V80M	CCGGGCTTTATGAGCCCGAAAGCAGC
V80C/G108C	CCGGGCTTTATGAGCCCGAAAGCAGC ACCAACAGCTGNTTGTATCAGCCGGCG
G108C	ACCAACAGCTGNTTGTATCAGCCGGCG
Q111D	GGCTTTGATGANCCGGCGAGCCGTGCGA
D226C/S281C	CCGCCACACAGTTCACAAACGCTTTCGCG ATTCACAAATGCTGCGATCGCTTTCATGGTT
S237F	AATGGTAGCTTNGGTTTTGGCGGTAGCTATA
S237W	AATGGTAGCTGGGGTTTTGGCGGTAGCTAT
T231C	CGGCCATTGTTGCGCGAATGGTAGCTC
T231D	CGGCCATGACTGCGCGAATGGTAGCTC

1.3 Ple629 野生型与突变体蛋白表达纯化

将重组质粒 pET32a-Ple629 以及相应突变体质粒分别转化至 *E. coli* BL21(DE3), 挑取单菌落于含有 100 $\mu\text{g/L}$ 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的 5 mL Luria-Bertani (LB)小试管中, 220 r/min 培养约 14–16 h, 逐级扩大培养至 1 L 含有相同抗性的 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中以 220 r/min 的转速培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8 左右, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 降温至 16 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 18–22 h, 5 000 r/min 离心 20 min 后, 收集菌体。将菌体重悬于 25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5 的缓冲液中, 混合均匀后利用低温高压均质破碎后, 将破碎后的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 500 r/min 条件下低温高速离心 1 h, 上清液用于后续纯化。上清液载于经上述缓冲液平衡后的 Ni-NTA 亲和柱上, 用含有 25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 7.5 的缓冲液梯度洗脱蛋白, 目的蛋白大约在含有 100 mmol/L 咪唑的条件中洗脱出来, 收集目的蛋白, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 用 25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、pH 7.5 的缓冲液过夜透析, 同时加入适量 TEV 酶切掉其载体标签。将去除标签的目的蛋白重新经过 Ni-NTA 亲和柱进一步纯化, 最后获得较纯蛋白, 透析于 25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、pH 7.5 的缓冲液中, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)确定纯化蛋白的情况, 测定蛋白质浓度后, 保存于 -80°C 冰箱中。

1.4 蛋白结构分析

前期已经解析了 Ple629 的蛋白质晶体结构(PDB ID: 7VPA), 它和已知的 PET 水解酶家族类似, 属于 α/β 水解酶超家族^[39], Ple629 结构上有 9 个 β 折叠, 外围被 8 个 α 螺旋包围, 具

有保守的丝氨酸水解酶序列 Gly-x1-Ser-x2-Gly (G150-W151-S152-M153-G154)和催化三联体 S152-D198-H230。选取和 Ple629 结构及序列较为相似的 PET 水解酶 *Tj*Cut2、枝叶堆肥的宏基因组来源的嗜热 PET 水解酶 LCC 和 *Is*PETase 等为研究对象, 利用多种软件分析比较其蛋白结构、序列和这些高同源蛋白的关系。

1.5 计算设计分析

在有稳定可靠的蛋白质结构信息时, 基于使用能量函数对蛋白能量进行计算, 可以得到理论上自由能更小、更有利于蛋白质稳定的突变设计^[40], 相应方法有成功应用的实例。本文使用 FoldX 软件包^[41]中的 PositionScan 功能, 利用已经解析的 Ple629 蛋白质晶体为模板, 对其所有氨基酸残基进行虚拟饱和突变, 计算得到所有突变的 DDG ($\text{DDG}=\text{DGMut}-\text{DGWt}$), 保留 $\text{DDG}<-0.45$ kcal/mol 的突变, 选择能量最低的突变进行后续实验。

1.6 热稳定性 T_m 值以及活性测定

Ple629 野生型蛋白和突变体蛋白分别通过蛋白质稳定分析仪(unchained labs, model: UNcle)测定其样品的熔点温度(melting temperature, T_m)。将纯化后的蛋白稀释至 1.0 mg/mL (PBS 缓冲液, pH 7.4)后放入样品池中, 分析仪升温参数的起始温度设置为 15 $^{\circ}\text{C}$ 、终点温度为 95 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率为 0.25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。实验结束后用分析软件 UNcle Analysis 5.03 自动计算 T_m 和开始聚集温度(Tagg), 默认 BCM (Barycentric mean)方法分析 T_m 。

检测 Ple629 野生型和最优热稳定性突变体 D226C/S281C 的活性, 将 5 mg PET-NP 溶解在 PBS (pH 7.4)缓冲液中, 每个实验的总反应体积为 1 mL, 加入 0.32 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 条件下反应 24 h, 用相同体积的预冷甲醇稀释终止反应。反应液经过 12 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清通过 0.22 μm 滤膜, 使用

Welch Ultimate XB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行液相检测, 流动相为 19% 的乙腈和 81% 的含有 0.1% 甲酸的水溶液, 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 30 °C, 检测 254 nm 处产物对苯二甲酸单(2-羟乙基) [mono(2-hydroxyethyl)terephthalate, MHET] 和对苯二甲酸(TPA)的吸收峰。

1.7 分子动力学模拟

以 Ple629 野生型晶体结构为模板, 使用 COOT^[42]软件(版本号 0.9.8)对相应氨基酸进行原位突变, 并进行整体链优化以去除潜在冲突。使用 Gromacs^[43]软件包(版本号 2022.3)进行模型准备和分子动力学模拟, 将蛋白分子放置在正方体的水盒子中, 用 TIP3P 模型^[44]的水分子填充溶剂及离子使系统呈中性, 用最速下降法^[45]进行能量最小化, 保持体系温度恒定为 40 °C, 并且使用弱耦合方法控制压力为 1 bar^[46]进行 100 ns 的分子模拟, 模拟的时间步长设置为 2 fs, 使用稳定后的结果进行均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)以及均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)等计算分析。

2 结果与分析

2.1 Ple629 野生型和突变体蛋白表达

在大肠杆菌 BL21(DE3)中对 Ple629 野生型蛋白和 N65D、V80C、V80M、V80C/G108C、G108C、Q111D、D226C/S281C、S237F、S237W、T231C、T231D 突变体蛋白进行诱导表达, 成功表达的蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析洗脱, 透析切除载体标签, 再次经过 Ni-NTA 亲和层析纯化后, 蛋白分子量大小约为 30 kDa, 与目的蛋白的分子量理论值(30.2 kDa)一致, SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示。

2.2 计算设计分析预测结果

利用 FoldX 软件对 Ple629 蛋白进行单位点

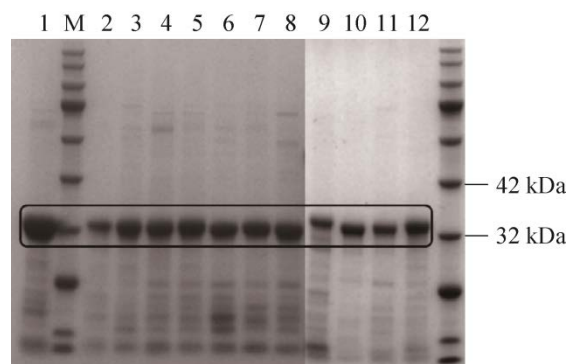


图 1 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified proteins. M: Standard molecular weight protein; 1: WT; 2: N65D; 3: V80V; 4: V80M; 5: V80C/G108C; 6: G108C; 7: Q111D; 8: D226C/S281C; 9: S237F; 10: S237W; 11: T231C; 12: T231D.

逐个虚拟饱和突变后, 共获得了 5 691 个不同的突变体及相关能量参数, 其中有 215 虚拟突变的位点 $DDG < -1$, 进一步筛选了 9 个潜在突变体, 相应点突变的能量(DDG)计算结果如下: Q111D=-5.08 kcal/mol, V80C=-2.73 kcal/mol, G108C=-2.26 kcal/mol, V80M=-1.58 kcal/mol, S237F=-1.41 kcal/mol, S237W=-1.32 kcal/mol, T231D=-1.05 kcal/mol, N65D=-0.83 kcal/mol, T231C=-1.06 kcal/mol。

2.3 结构比较分析及二硫键位置确定

比较蛋白质结构数据库中和 Ple629 (PDB: 7VPA) 同源性较近的蛋白结构, 选取蛋白序列一致性 40% 以上的 65 个结构, 分析了它们的序列主链一致性以及二硫键的情况, 结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出, Ple629 和上述同源结构蛋白都很类似, 主链均方根偏差 RMSD 均小于 1 Å; 其中大部分蛋白结构中仅有一个二硫键, 少数蛋白结构中有 2 个二硫键, Ple629 蛋白结构中含有 3 个二硫键。

目前已知聚酯类塑料降解酶的结构都比较类似^[38], 有研究表明可以在蛋白结构的相应位点引入二硫键以提高其性能, 如 PET 塑料降解

表 2 Ple629 蛋白质结构同源比对分析

Table 2 Comparison and analysis of Ple629 structure homology

The type of enzyme	Source	PDB ^[47]	Main chain RMSD (Å)	Numbers and location of disulfide bonds	References
Lipase EC 3.1.1.3	<i>Streptomyces foliatus</i>	1JFR	0.559	1, (CYS 242-CYS 258)	[48]
	Metagenome library in gelatin degradation reactor	7EC8	0.475	2, (CYS 218-CYS 255, CYS 289 -CYS 306)	[49]
Cutinase EC 3.1.1.74	<i>Thermobifida alba</i> AHK119	3VIS	0.701	1, (CYS 280-CYS 298)	[50]
	<i>Thermobifida fusca</i>	4CG1	0.675	1, (CYS 241-CYS 259) x	[51]
	Metagenome library in leaf-branch compost	4EB0	0.834	1, (CYS 275-CYS 292)	[52]
	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	4WFI	0.602	1, (CYS 287-CYS 302)	[53]
	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	5LUI	0.712	1, (CYS 242-CYS 260)	[54]
Hydrolase EC 3.1.1.101	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	5XFY	0.565	2, (CYS 174-CYS 210, CYS 244-CYS 260)	[55]
	Burkholderiales bacterium	7CWQ	0.533	2, (CYS 333-CYS 370, CYS 404-CYS 424)	[56]
	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	6SCD	0.382	2, (CYS 214-CYS 251, CYS 285-CYS 302)	[57]
	<i>Rhizobacter gummiphilus</i>	7DZT	0.552	2, (CYS 200-CYS 236, CYS 270-CYS 290)	[58]
	Compost metagenome library Marine microbial consortium	7CUV 7VPA	0.653 0.000	1, (CYS 242-CYS 257) 3, (CYS 17-CYS 21, CYS 195- CYS 232, CYS 270- CYS 287)	[59] [37]

酶 *TfCut2*、PET2^[49]、LCC^[60-61]以及 *IsPETase*^[62]等。Ple629 和这几个蛋白的结构主链很相似(主链 RMSD 见表 2), 而且上述引入二硫键区域的

主链走势都很类似(图 2), 参照上述聚酯类塑料降解酶引入二硫键的位点, 本研究在 Ple629 对应位置上尝试引入二硫键(D226C/S281C)。

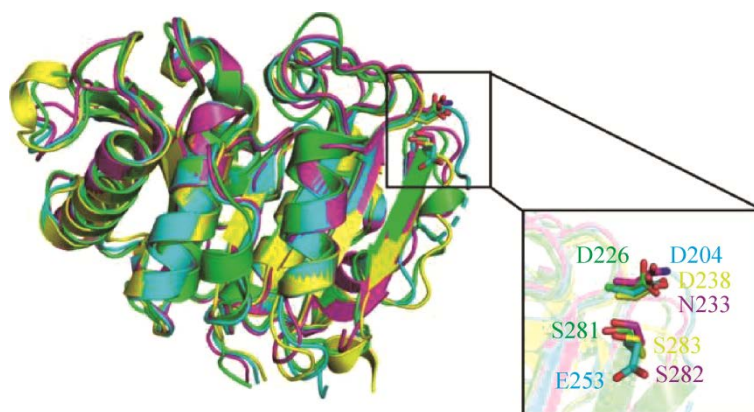


图 2 Ple629 和同源蛋白比对以及二硫键位置的确定

Figure 2 Structural comparison with homolog proteins and determination of disulfide bond positions. Green: Ple629; Cyan: *Tfcut2*; Yellow: LCC; Pink: *IsPETase*; Stick: Disulfide bond.

2.4 突变体性质测定结果

Ple629 野生型和突变体蛋白分别用 Uncle 测定其 T_m 值, 结果如表 3 所示。野生型蛋白的 T_m 为 38.6 °C, 与文献报道^[36]的 38.1 °C 较为接近, 突变体中 T_m 提升较多的是 V80C 和 D226C/S281C, 分别提升了 5.2 °C 和 6.9 °C。其中 D226C/S281C 的活性比野生型的活性提高了 1.5 倍(野生型=0.77 mmol/L, D226C/S281C=1.925 mmol/L)。

2.5 分子动力学模拟结果

为了进一步研究相关突变对蛋白质整体结构的潜在影响, 对野生型 Ple629 及热稳定性提升以及能量计算应该稳定但实际没有提升的突变体进行了分子动力学模拟, 温度为 40 °C, 模拟时长为 100 ns。本研究利用整体蛋白主链的均方根偏差 RMSD 表征系统考量的稳定性(图 3A), 从图中可以看出, 所有突变稳定的体系其 RMSD 都比较小, 从 RMSD 的变化趋势可以看出, 野生型及所有突变体均在 60 ns 后达到了比较稳定的平衡状态, 表明模拟是稳定的。选择模拟达到平衡后即 100 ns 的主链 Calpha 的均方根涨落 RMSF 来表征单个残基波动对蛋白

质整体动力学的影响(图 3B–3C)。除了少数特殊区域(红色虚线方框)外, 野生型蛋白和突变体的大多数残基波动大小相似。热稳定性提升的突变体的整体 RMSF 都小于野生型(图 3B), 表明突变之后蛋白质的整体结构更加趋于稳定, 因而有更好的耐温能力; 而在活性降低的突变体中(图 3C), 大部分区域的波动情况和野生型类似, 但是 235–242 区域(图 3C 红色虚线框)的波动明显比野生型及活性提升的突变体大(最高差别 0.3 Å 左右)。从晶体结构上看, 该 235–242 区域的 B 值相对整体结构较高(图 3D 中红色 loop), 这些活性降低的突变位点虽然有些离该区域较远, 但实际突变中通过间接离子键等作用的影响, 增加了这个区域构象的波动性, 从整体结构上导致更加不稳定, 因而热稳定性下降。本文中所选择的突变位点均位于结构的表面(图 3D)。

3 讨论与结论

对塑料降解酶的性能改造是提升塑料降解效率重要因素之一, 本研究针对来源于海洋的中温塑料降解酶 Ple629 进行了研究, 在前期获得蛋白质结构的基础上, 通过结构比较以及相应能量分析, 设计了一些可能对热稳定性有提升的突变体, 并对它们进行了表达纯化和性质鉴定。研究者通过在蛋白结构增添二硫键来提升酶的热稳定性, 通过在聚酯水解酶 *TfCut2* 蛋白结构中引入二硫键(D204C/E253C), 其熔点温度 T_m 提升了 25 °C, 酶的催化效率提高了 1 倍^[30-31]; LCC 在相同位点引入二硫键(D238C/S283C), 熔点温度 T_m 提升了 9.8 °C^[60-61]; *IsPETase* 在其相同位点引入一对二硫键 N233C/S282C, 突变体 TS-PETase (ThermoPETase+N233C/S282C) 比 ThermoPETase ($T_m=57.6$ °C)的 T_m 提高了 11.8 °C^[25,62], D1 (DuraPETase+N233C/S282C)比

表 3 Ple629 野生型和突变体熔点温度比较

Table 3 Comparison of thermal stability among Ple629 wild type and mutants

Items	T_m (°C)
WT	38.6
N65D	35.7
V80C	43.8
V80M	38.1
G108C	34.1
Q111D	38.5
D226C/S281C	45.5
S237F	35.3
S237W	35.2
T231C	30.5
T231D	36.3

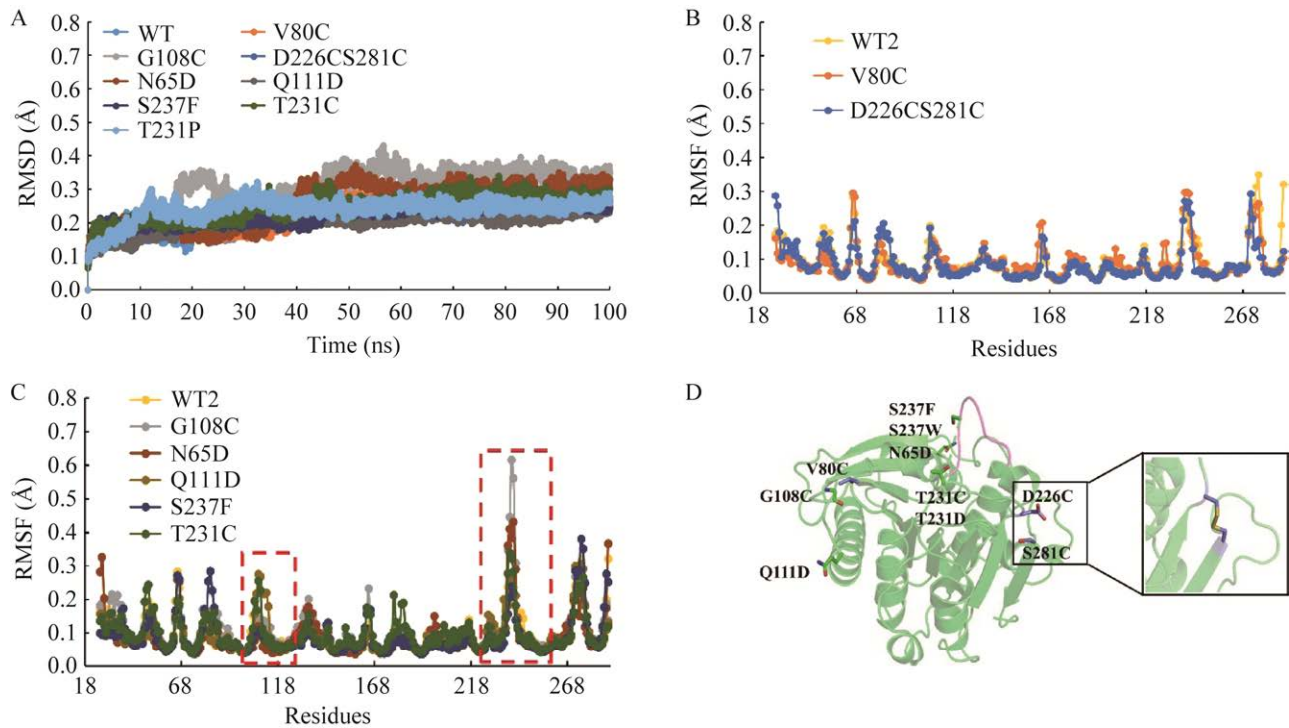


图3 Ple629 野生型和突变分子模拟结果比较

Figure 3 Comparison of molecular simulations between Ple629 wild-type and mutants.

DuraPETase ($T_m=77.0\text{ }^\circ\text{C}$)的 T_m 提高了 $4.1\text{ }^\circ\text{C}$ ^[26]。根据上述同源酶的结构分析比对,在 Ple629 结构中相应位点引入二硫键,其突变体 D226C/S281C 热稳定性明显提升, T_m 比野生型提高 $6.9\text{ }^\circ\text{C}$, 活性也提高了 1.5 倍。通过虚拟突变能量计算设计出来的突变体中,虽然也获得了性能提升的突变体, V80C 的 T_m 提升了 $5.2\text{ }^\circ\text{C}$, 但其他突变体的相关性能并没有显著提升,这也与文献报道的一致^[63]。分子动力学模拟的结果表明,热稳定性提升的突变体整体结构更加趋于稳定,而虚拟计算能量较低的许多突变体的 235–242 区域 loop 明显柔性更强,无法保证稳定的热稳定性,因而导致实际 T_m 并没有比理论值升高。本研究将通过进一步研究探索其在工业上的应用价值,为酶法绿色降解聚酯类塑料及回收再利用提供理论基础。

REFERENCES

- [1] RODRIGUES MO, ABRANTES N, GONÇALVES FJM, NOGUEIRA H, MARQUES JC, GONÇALVES AMM. Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: what is known?[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 7(2): 103239-103299.
- [2] NICHOLSON SR, RORRER NA, CARPENTER AC, BECKHAM GT. Manufacturing energy and greenhouse gas emissions associated with plastics consumption[J]. Joule, 2021, 5(3): 673-686.
- [3] JIANG L, WOLCOTT MP, ZHANG JW. Study of biodegradable polylactide/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends[J]. Biomacromolecules, 2006, 7(1): 199-207.
- [4] WITT U, YAMAMOTO M, SEELIGER U, MÜLLER RJ, WARZELHAN V. Biodegradable polymeric materials—not the origin but the chemical structure determines biodegradability[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1999, 38(10): 1438-1442.
- [5] GUPTA A, CHUDASAMA B, CHANG B, MEKONNEN T. Robust and sustainable PBAT-Hemp

- residue biocomposites: reactive extrusion compatibilization and fabrication[J]. *Composites Science and Technology*, 2021, 215: 109014.
- [6] PINHEIRO IF, FERREIRA FV, SOUZA DHS, GOUVEIA RF, LONA LMF, MORALES AR, MEI LHI. Mechanical, rheological and degradation properties of PBAT nanocomposites reinforced by functionalized cellulose nanocrystals[J]. *European Polymer Journal*, 2017, 97: 356-365.
- [7] PAVON C, ALDAS M, dela ROSA-RAMÍREZ H, LÓPEZ-MARTÍNEZ J, ARRIETA MP. Improvement of PBAT processability and mechanical performance by blending with pine resin derivatives for injection moulding rigid packaging with enhanced hydrophobicity[J]. *Polymers*, 2020, 12(12): 2891.
- [8] PAL AK, WU F, MISRA M, MOHANTY AK. Reactive extrusion of sustainable PHBV/PBAT-based nanocomposite films with organically modified nanoclay for packaging applications: compression moulding vs. cast film extrusion[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2020, 198: 108141.
- [9] PAGNO V, MÓDENES AN, DRAGUNSKI DC, DENISE FIORENTIN-FERRARI L, CAETANO J, GUELLIS C, GONÇALVES BC, dos ANJOS EV, PAGNO F, MARTINELLI V. Heat treatment of polymeric PBAT/PCL membranes containing activated carbon from Brazil nutshell biomass obtained by electrospinning and applied in drug removal[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8(5): 104159.
- [10] OGUZ H, DOGAN C, KARA D, OZEN ZT, OVALI D, NOFAR M. Development of PLA-PBAT and PLA-PBSA bio-blends: effects of processing type and PLA crystallinity on morphology and mechanical properties[C]//AIP Conference Proceedings. Dresden, Germany. Author(s), 2019: 0300031-0300035.
- [11] NUNES FC, RIBEIRO KC, MARTINI FA, BARRIONI BR, SANTOS JPF, CARVALHO B. PBAT/PLA/cellulose nanocrystals biocomposites compatibilized with polyethylene grafted maleic anhydride (PE-g-MA)[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2021, 138(45): 51342-51352.
- [12] NOBILE MR, CROCITTI A, MALINCONICO M, SANTAGATA G, CERRUTI P. Preparation and characterization of polybutylene succinate (PBS) and polybutylene adipate-terephthalate (PBAT) biodegradable blends[C]//AIP Conference Proceedings. Ischia, Italy. Author(s), 2018: 0201801-0201804.
- [13] PIETROSANTO A, SCARFATO P, Di MAIO L, INCARNATO L. Development of eco-sustainable PBAT-based blown films and performance analysis for food packaging applications[J]. *Materials*, 2020, 13(23): 5395.
- [14] GAMBARINI V, PANTOS O, KINGSBURY JM, WEAVER L, HANDLEY KM, LEAR G. Phylogenetic distribution of plastic-degrading microorganisms[J]. *mSystems*, 2021, 6(1): e01112-e01120.
- [15] KANWAL A, MIN Z, SHARAF F, LI CT. Screening and characterization of novel lipase producing *Bacillus* species from agricultural soil with high hydrolytic activity against PBAT poly (butylene adipate co terephthalate) co-polyesters[J]. *Polymer Bulletin*, 2022, 79(11): 10053-10076.
- [16] KANWAL A, ZHANG M, SHARAF F, LI CT. Polymer pollution and its solutions with special emphasis on poly (butylene adipate terephthalate (PBAT))[J]. *Polymer Bulletin*, 2022, 79(11): 9303-9330.
- [17] QI X, REN YW, WANG XZ. New advances in the biodegradation of poly(lactic) acid[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 117: 215-223.
- [18] KAKADELLIS S, ROSETTO G. Achieving a circular bioeconomy for plastics[J]. *Science*, 2021, 373(6550): 49-50.
- [19] 段广宇. Carbios: 消费后聚酯的生物循环再利用[J]. *国际纺织导报*, 2019, 47(6): 59.
- DUAN GY. Carbios: biorecycling of post-consumer polyester[J]. *Melliand China*, 2019, 47(6): 59 (in Chinese).
- [20] MÜLLER RJ, SCHRADER H, PROFE J, DRESLER K, DECKWER WD. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26(17): 1400-1405.
- [21] LIU C, SHI C, ZHU S, WEI R, YIN C. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 289-294.
- [22] 陈纯琪, 韩旭, 刘卫东, 马立新, 刘珂, 郭瑞庭. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌 201-F6 的 PET 水解酶[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3268-3275.
- CHEN CQ, HAN X, LIU WD, MA LX, LIU K, GUO RT. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Chinese Journal of*

- Biotechnology, 2021, 37(9): 3268-3275 (in Chinese).
- [23] 李磊, 高鑫, 齐宏斌, 李超, 路福平, 毛淑红, 秦慧民. 现代生物技术推动塑料中聚对苯二甲酸乙二醇绿色降解的研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 763-780 (in Chinese).
- LI L, GAO X, QI HB, LI C, LU FP, MAO SH, QIN HM. Research progress of modern biotechnology-promoted green degradation of polyethylene terephthalate in plastics[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 763-780 (in Chinese).
- [24] KAWAI F. The current state of research on PET hydrolyzing enzymes available for biorecycling[J]. Catalysts, 2021, 11(2): 206.
- [25] SON HF, CHO IJ, JOO S, SEO H, SAGONG HY, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(4): 3519-3526.
- [26] BROTT S, PFAFF L, SCHURICHT J, SCHWARZ JN, BÖTTCHER D, BADENHORST CPS, WEI R, BORNSCHEUER UT. Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation[J]. Engineering in Life Sciences, 2022, 22(3/4): 192-203.
- [27] WIJMA HJ, FLOOR RJ, JANSSEN DB. Structure- and sequence-analysis inspired engineering of proteins for enhanced thermostability[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2013, 23(4): 588-594.
- [28] QIAO ZN, XU MJ, SHAO ML, ZHAO YX, LONG MF, YANG TW, ZHANG X, YANG ST, NAKANISHI H, RAO ZM. Engineered disulfide bonds improve thermostability and activity of L-isoleucine hydroxylase for efficient 4-HIL production in *Bacillus subtilis* 168[J]. Engineering in Life Sciences, 2020, 20(1/2): 7-16.
- [29] JEONG M, KIM S, YUN C, CHOI Y, CHO S. Engineering a *de novo* internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 127(2): 300-309.
- [30] THEN J, WEI R, OESER T, BARTH M, BELISÁRIO-FERRARI MR, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. Ca²⁺ and Mg²⁺ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(4): 592-598.
- [31] THEN J, WEI R, OESER T, GERDTS A, SCHMIDT J, BARTH M, ZIMMERMANN W. A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate[J]. FEBS Open Bio, 2016, 6(5): 425-432.
- [32] WANG R, WANG S, XU Y, YU XW. Enhancing the thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by rational design and MD simulations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 160: 1189-1200.
- [33] CUI YL, CHEN YC, LIU XY, DONG SJ, TIAN YE, QIAO YX, MITRA R, HAN J, LI CL, HAN X, LIU WD, CHEN Q, WEI WQ, WANG X, DU WB, TANG SY, XIANG H, LIU HY, LIANG Y, HOUK KN, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [34] LU HY, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, ZHU CZ, KIM W, SHROFF R, ACOSTA DJ, ALEXANDER BR, COLE HO, ZHANG Y, LYND NA, ELLINGTON AD, ALPER HS. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. Nature, 2022, 604(7907): 662-667.
- [35] MEYER-CIFUENTES IE, WERNER J, JEHLICH N, WILL SE, NEUMANN-SCHAAL M, ÖZTÜRK B. Synergistic biodegradation of aromatic-aliphatic copolyester plastic by a marine microbial consortium[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5790.
- [36] MEYER-CIFUENTES IE, WU P, ZHAO YP, LIU WD, NEUMANN-SCHAAL M, PFAFF L, BARYS J, LI ZS, GAO J, HAN X, BORNSCHEUER UT, WEI R, ÖZTÜRK B. Molecular and biochemical differences of the tandem and cold-adapted PET hydrolases Ple628 and Ple629, isolated from a marine microbial consortium[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 930140.
- [37] LI ZS, ZHAO YP, WU P, WANG H, LI Q, GAO J, QIN HM, WEI HL, BORNSCHEUER UT, HAN X, WEI R, LIU WD. Structural insight and engineering of a plastic degrading hydrolase Ple629[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 626: 100-106.
- [38] 李志帅, 高健, 陈纯琪, 郭瑞庭, 刘卫东, 韩旭. 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)塑料水解酶结构、功能及改造[J]. 生物加工过程, 2022, 20(4): 374-384.
- LI ZS, GAO J, CHEN CQ, GUO RT, LIU WD, HAN X. Structure, function and application of hydrolases for polyethylene terephthalate (PET) degradation[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2022,

- 20(4): 374-384 (in Chinese).
- [39] OLLIS DL, CARR PD. α/β hydrolase fold: an update[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2009, 16(10): 1137-1148.
- [40] GUEROIS R, NIELSEN JE, SERRANO L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1 000 mutations[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(2): 369-387.
- [41] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, NYS R, ROUSSEAU F, SERRANO L. The FoldX web server: an online force field[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl_2): W382-W388.
- [42] EMSLEY P, COWTAN K. Coot: model-building tools for molecular graphics[J]. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2004, 60(12): 2126-2132.
- [43] van D, LINDAHL E, HESS B, GROENHOF G, MARK AE, BERENDSEN HJC. GROMACS: fast, flexible, and free[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16): 1701-1718.
- [44] JORGENSEN WL, CHANDRASEKHAR J, MADURA JD, IMPEY RW, KLEIN ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1983, 79(2): 926-935.
- [45] BUSSI G, DONADIO D, PARRINELLO M. Canonical sampling through velocity rescaling[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(1): 014101-014122.
- [46] BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, van GUNSTEREN WF, DiNOLA A, HAAK JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1984, 81(8): 3684-3690.
- [47] BERMAN HM, WESTBROOK J, FENG Z, GILLILAND G, BHAT TN, WEISSIG H, SHINDYALOV IN, BOURNE PE. The protein data bank[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 235-242.
- [48] WEI YY, SWENSON L, CASTRO C, DEREWENDA U, MINOR W, ARAI H, AOKI J, INOUE K, SERVIN-GONZALEZ L, DEREWENDA ZS. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution[J]. *Structure*, 1998, 6(4): 511-519.
- [49] NAKAMURA A, KOBAYASHI N, KOGA N, IINO R. Positive charge introduction on the surface of thermostabilized PET hydrolase facilitates PET binding and degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(14): 8550-8564.
- [50] KITADOKORO K, THUMARAT U, NAKAMURA R, NISHIMURA K, KARATANI H, SUZUKI H, KAWAI F. Crystal structure of cutinase Est119 from *Thermobifida alba* AHK119 that can degrade modified polyethylene terephthalate at 1.76 Å resolution[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97(5): 771-775.
- [51] ROTH C, WEI R, OESER T, THEN J, FÖLLNER C, ZIMMERMANN W, STRÄTER N. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7815-7823.
- [52] SULAIMAN S, YOU DJ, KANAYA E, KOGA Y, KANAYA S. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [53] MIYAKAWA T, MIZUSHIMA H, OHTSUKA J, ODA M, KAWAI F, TANOKURA M. Structural basis for the Ca^{2+} -enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4297-4307.
- [54] RIBITSCH D, HROMIC A, ZITZENBACHER S, ZARTL B, GAMERITH C, PELLIS A, JUNGBAUER A, ŁYSKOWSKI A, STEINKELLNER G, GRUBER K, TSCHELIESSNIG R, HERRERO ACERO E, GUEBITZ GM. Small cause, large effect: structural characterization of cutinases from *Thermobifida cellulosilytica*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(11): 2481-2488.
- [55] HAN X, LIU WD, HUANG JW, MA JT, ZHENG YY, KO TP, XU LM, CHENG YS, CHEN CC, GUO RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2106-2118.
- [56] CHEN CC, HAN X, LI X, JIANG PC, NIU D, MA LX, LIU WD, LI SY, QU YY, HU HB, MIN J, YANG Y, ZHANG LL, ZENG W, HUANG JW, DAI LH, GUO RT. General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 425-430.
- [57] BOLLINGER A, THIES S, KNIEPS-GRÜNHAGEN E, GERTZEN C, KOBUS S, HÖPPNER A, FERRER M, GOHLKE H, SMITS SHJ, JAEGER KE. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri*-structural and functional

- insights[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 114-118.
- [58] SAGONG H, SON H, SEO H, HONG, H, LEE D, KIM K. Implications for the PET decomposition mechanism through similarity and dissimilarity between PETases from *Rhizobacter gummiphilus* and *Ideonella sakaiensis*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 126075-126084.
- [59] PFAFF L, GAO J, LI ZS, JÄCKERING A, WEBER G, MICAN J, CHEN YP, DONG WL, HAN X, FEILER CG, AO YF, BADENHORST CPS, BEDNAR D, PALM GJ, LAMMERS M, DAMBORSKY J, STRODEL B, LIU WD, BORNSCHEUER UT, WEI R. Multiple substrate binding mode-guided engineering of a thermophilic PET hydrolase[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(15): 9790-9800.
- [60] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAUX ML, TEXIER H, GAVALDA S, COT M, GUÉMARD E, DALIBEY M, NOMME J, CIOCI G, BARBE S, CHATEAU M, ANDRÉ I, DUQUESNE S, MARTY A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.
- [61] ZENG W, LI XQ, YANG YY, MIN J, HUANG JW, LIU WD, NIU D, YANG XC, HAN X, ZHANG LL, DAI LH, CHEN CC, GUO RT. Substrate-binding mode of a thermophilic PET hydrolase and engineering the enzyme to enhance the hydrolytic efficacy[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(5): 3033-3040.
- [62] ZHONG-JOHNSON EZL, VOIGT CA, SINSKEY AJ. An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 928-934.
- [63] 张碧飞, 吕成, 张萌, 许菲. 基于多重计算设计策略提高奇异变形杆菌脂肪酶的热稳定性[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1537-1553.
- ZHANG BF, LÜ C, ZHANG M, XU F. Improving the thermal stability of *Proteus mirabilis* lipase based on multiple computational design strategies[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1537-1553 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)