研究论文

定点突变技术提高内切葡聚糖酶基因 F-10 酶活性

唐自钟， 刘默洋， 李雨霏， 孙 蓉， 刘 姗， 陈 惠*， 韩学易

（四川农业大学 生命科学与理学院，四川 雅安 625014）

摘要：利用高酶活 F-10 突变株内切葡聚糖酶基因进行定点突变，对 91 位（K91E）和 369 位（K369R）氨基酸进行突变，构建突变质粒（K91E）；（K369R）和（K91E/K369R），转化大肠杆菌 BL21，经筛选获得突变内切葡聚糖酶基因工程菌株 K91E，K369R 和 K91E/K369R。经 IPTG 诱导后，分离纯化酶学性质分析。结果表明：蛋白质相对分子质量为 53 000；突变前后最适 pH 值未发生变化，为 pH 6.8；突变体 K369R 和 K91E/K369R 的最适温度为 50 ℃，而突变体 K91E 最适温度发生了很大的变化，为 40 ℃；酶的比活力分别为 202、162.8、77.9 U/mg，分别是原始酶（66 U/mg）的 3.0 倍，2.4 倍和 1.2 倍；三个突变酶的热稳定性有较大提高，70 ℃处理 1 h 后，原始酶的活性急剧下降，剩余活力为 12%，而 K91E 的剩余活力为 36% ，K369R 剩余活力为 30%，K91E/K369R 剩余活力为 41%。当经 80 ℃处理 1 h 后，K91E 残余活力仍有 22%。本研究获得了酶活性提高的内切葡聚糖酶菌株，为进一步在分子水平研究内切葡聚糖酶的功能及应用打下了基础，也为高酶活酶分子在其他高表达系统的表达提供了基础材料。

关键词：内切葡聚糖酶；定点突变；分离纯化；热稳定性；酶学性质；结构分析

中图分类号：Q 815　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)08—0870—07

Improving the Character of the F-10 Endoglucanase Gene by Site-Directed Mutation

TANG Zizhong， *LIU Moyang*， *LI Yufei*， *SUN Rong*， *LIU Shan*， *CHEN Hui**， *HAN Xueyi*

（College of Biology and Science，Sichuan Agricultural University，Ya'an 625014，China）

Abstract：Endoglucanase is one of the most important cellulose enzymes，However，the large-scale industrialized application of these enzymes was restricted by the low activity and high cost price. Improving their activity through genetic engineering and protein engineering was considered an efficient approach to cut down the cost price. In this study the site-directed mutation technology was used to improve the activity of the F-10 endoglucanase gene. The cellulose of endoglucanase 91 lysine（AAA） was replaced by glutamic acid（GAA）（K91E），369 lysine（AAA） was replaced by arginine（AGA）（K369R） and the 91 and 369 were replaced by arginine（AGA）. Mutation plasmids were transfored into *E. coli*，the expression product was induced by IPTG. The result showed that

收稿日期：2013-10-31

基金项目：四川省科技厅科技支撑项目（2008Z0150）。

作者简介：唐自钟（1984—），男，四川达州人，生物化学与分子生物学博士研究生。E-mail：3530279123456789@163.com

* **通信作者**：陈　惠（1962—），女，四川雅安人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物酶工程方面的研究。E-mail：chenhui@sicau.edu.cn

protein molecular weight was 53 000. The optimum reaction pH unchanged, was pH 6.8. The optimum temperature of K369R and K91E/K369R were 50 ℃,the optimum temperature of the mutant K91E have great change,is 40 ℃. The specific activity reached 162.8、77.9、202 U/mg. The thermal stability of the three mutants increased,when the temperature reached 70 ℃,the activity of F-10 fell sharply,surplus energy is only 12%,36%,30% and 41%,when the temperature reached 80 ℃,the residual activity of K91E is still about 22%. By site-directed mutation technique,we obtain the efficient expression in *E. coli* and good thermal stability of endoglucanase gene engineering strains. This research can provide the basis for the further investigations of cellulose.

Keywords: endoglucanase,site-directed mutagenesis,separation and purification,thermostability, enzymatic properties,structure analysis

纤维素主要存在于植物的细胞壁,是广泛分布于大自然界的一种多糖,占植物总量 50%的可再生资源。如何合理利用纤维素这一资源成为现阶段世界各国都普遍观注的问题[1]。纤维素酶是一种能很好降解纤维素成为还原糖,使其能真正成为可再生资源的一种工具。对于纤维素酶的研究也越来越多,其应用也越来越广。近年来,纤维素酶作为一种新型高活性的生物催化剂,在食品业、畜牧业、饲料生产、造纸业和洗涤业、环境污染处理、能源利用等多个领域中得到广泛应用[2-3],纤维素资源和纤维素废料被纤维素酶降解成有用的物质,对于解决能源问题,环境问题等具有重要意义[4]。

天然纤维素酶种类多,催化活性低、生产成本高,催化条件苛刻,真正能够用于工业生产的却很少。生产成本高、酶活低是限制纤维素酶工业生产及应用的瓶颈,通过基因工程及蛋白质工程手段在分子水平上对纤维素酶基因进行合理设计改造,构建高活性纤维素酶基因工程菌,降低纤维素酶的生产成本,提高实用性,成为国内外研究的热点之一。利用定点突变技术提高纤维素酶活性也越来越受到人们的关注,目前主要利用定向进化和定点突变来进行改造,2001 年肖志壮等[5],利用随机突变结合定点突变技术对来源于里氏木霉的 EGIII 进行分子改造,在 30 ℃筛选得到了酶活较高的突变菌株。2004 年王婷等[6]成功对瑞氏木霉 EGIII 的 N321 位点进行定点突变,使其最适 pH 发生了较大变化。目前,定点突变已成为研究酶结构与功能的常规手段,被广泛用于改善酶的性能[7-9]。

作者拟采取蛋白质工程中的合理设计策略(定点突变技术)对易错 PCR 技术得到的高内切葡聚糖酶 F-10 基因进行定点突变改造,合理设计了 K91E,K369R 这两个位点进行突变,以期获得酶活有所提高的内切葡聚糖酶。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用的菌株与载体见表 1。

表 1 菌株与载体

Table 1 Strains and vectors

菌株和载体	功能	来源
大肠杆菌 DH5α	克隆宿主细胞	作者所在实验室保存
pET-32α-F-10 质粒	含 F-10 基因的表达载体	作者所在实验室保存
pET32a	大肠杆菌表达载体	购于英骏生物技术有限公司,并于本实验室保存
BL21	大肠杆菌表达宿主	
pET-C36d	内切葡聚糖酶重组表达载体	作者所在实验构建

1.1.2 酶和试剂 定点突变试剂盒(Fast Mutagenesis System):购自北京全氏金生物技术有限公司;DNA Marker、Protein Marker (Low)、氨苄青霉素钠:均购自天根公司;凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒以及 PCR 产物纯化试剂盒:均购自上海 Omega 生物技术有限公司;酵母粉、蛋白胨:购自 Oxoid 公司;N-亚甲基双丙烯酰胺、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、丙烯酰胺、琼脂糖、IPTG:均购自 Sigma 公司;其它化学和生物试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 突变体引物的设计及载体的构建 以已经克隆并测序的 F-10 内切葡聚糖酶基因为模板,利用 primer 5.0 软件进行相应设计的引物, 同时在上下游引物中引入 *EcoR* I 和 *Not* I 两个酶切位点,将 91 位的赖氨酸变成谷氨酸 (AAA-GAA),369 位的赖氨酸变成精氨酸 (AAA-AGA),以及两个位点同时突变。购自北京全氏金生物技术有限公司的定点突变试剂盒。采用部分重叠引物设计,使PCR 成指数扩增,扩增产物凝胶电泳可见,扩增产物为环状,易于转化。同类产品只利用于体外限制性内切酶或者体内感受态细胞降解非突变型质粒模板。而该试剂盒综合了上述两种方法,能更有效地降解甲基化的质粒模板 ,突变效率更高。此试剂盒的引物设计包含 5′端部分重叠区和 3′ 端延伸区, 突变点位于两条引物上, 分别位于正向突变引物重叠区下游、紧邻重叠区;方向引物 5′端。以 F-10 基因质粒为模板设计引物如下:

91 F:5′-C*TGCCGCTTCAACCGCTT*CTTTTACTTTATTTTTC-3′

91 R:5′-A*AGCGGTTGAAGCGGCA*GAAGAACTTGG-3′

369 F:5′-C*TCGCGTTATACCAATAACG*GGCAGTGACATC-3′

369 R:5′-*CGTTATTGGTATAACGCGA*GAAACAAAGGC-3′

划线的碱基为突变碱基,斜体字母的碱基为 5′端重叠区,其他正体字母的碱基则为 3′ 延伸区。扩增的片段大小为 1 413 bp。以 pet32a-F-10 质粒为模板,按北京全氏金快速定点突变试剂盒使用说明进行 PCR, 扩增条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 40 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 4 min,25 个循环,72 ℃ 10 min。

取 5 μL PCR 产物,1%琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带大小正确后加入 0.5 μL DMT 酶于 PCR 产物中进行消化, 混匀,37 ℃孵育 1 h. 取 2~5 μL DMT 酶消化产物直接转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,涂布固体 LB(含 100 μg/mL 的 Amp)平板,37 ℃培养过夜。

1.2.2 阳性克隆的筛选及鉴定 利用通用引物对阳性转化子进行菌落 PCR 筛选鉴定,在 LB+Amp 平板上随机挑取适量的单菌落加入 PCR 管中作为模板,PCR 反应参数为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 40 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 4 min,30 个循环,72 ℃ 10 min。取 5 μL PCR 产物进行 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测大小为 1.4 kb 左右的初判为阳性克隆菌株。挑取阳性克隆菌株进行液体培养,提取质粒后进行双酶切鉴定。

酶活测定参照农业部标准 [10] 略做改进。以 1 mL 0.8%的羧甲基纤维素钠为底物,加入 1 mL 粗酶液,50 ℃水浴反应 30 min 后, 加入 2.5 mL DNS 显色液,沸水浴煮 5 min,取出后在流水下迅速冷却,定容至 5 mL 摇匀,在 540 nm 处测定吸光值。空白对照是将酶液经高温灭活后,按照标准方法加入底物,与实验组在同一条件下进行保温,并测定。酶活性的定义:1 mL 酶液每分钟产生 1 μmol 还原糖的酶量作为 1 个酶活单位,用 U/mL 表示。

1.2.3 突变株内切葡聚糖酶的诱导表达纯化及 SDS-PAGE 分析 挑取阳性转化子接种到 10 mL LB 液体培养基(含 100 ug/mL 氨苄青霉素),37 ℃、170 r/min 培养过夜,按 1%接种体积分数接种至 25 mL 培养基中,37 ℃培养至 OD 值为 0.6~0.8,为加入 IPTG,使其终浓度 1 mmol/L,诱导培养 3 h。离心收集菌体,超声破碎裂解细胞,裂解液 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释后作为粗酶液测定酶活力。并在相同条件下测定原始菌和突变株,取粗酶液加入 2×SDS-PAGE 电泳上样缓冲液混匀,沸水浴处理 3~5 min,冷却,离心后用于 SDS-PAGE 凝胶进行凝胶电泳分析。蛋白质的分离纯化依据 pET32a 载体的性质,利用 6*HIS 标签,经 Ni^{2+}柱纯化,收集纯化蛋白质进行 SDS-PAGE 分析和酶学性质的分析[11]。

1.2.4 突变株内切葡聚糖酶酶学性质分析

1) 突变株内切葡聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性: 以 1 mL 不同 pH 值的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液为底物,测定酶活,确定酶的最适反应 pH。将原酶液置于不同 pH 值的缓冲液,于 50 ℃保温 30 min,在最适 pH 值条件下测定残余酶活力,从而测定 pH 稳定性[12-13]。

2)突变株内切葡聚糖酶的热稳定性分析:在最适反应 pH 环境下, 将适当稀释的酶液分别在不同温度梯度下测定酶活,确定酶的最适反应温度。将适当稀释的酶液置于相对稳定的 pH 值, 分别在不同温度梯度下保温 30 min, 再在 50 ℃测定残余酶活力[12-13]。

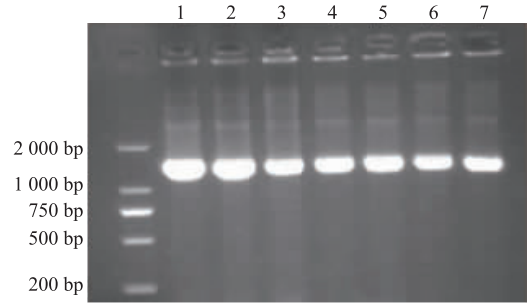
3)金属离子对突变株内切葡聚糖酶的影响:在酶与底物反应混合物中加入 1 mmol/L 的各种金属

离子,在标准条件下测定其酶活,以不加金属离子的酶活为 100%作为实验对照组[14]。

2 结果与分析

2.1 突变体载体的构建及阳性转化子的鉴定

以 pET32a-F-10 质粒为模板,经 PCR 后,获得含突变位点的目的片段,目的片段,将产物中加入 1 μLDMT 酶消化,混匀,37 ℃孵育 1 h,然后转化大肠杆菌 BL21,经 Amp 抗性筛选后得到阳性转化子,进行菌落 PCR。在含有 Amp 的 LB 培养基中随机挑选几个单菌落进行菌落 PCR 鉴定,电泳结果见图 1。由图 1 可知,菌落 PCR 电泳得到大小为 1 400 bp 的单一条带,初步鉴定这几个随机挑选的大肠杆菌转化子均为阳性转化子。

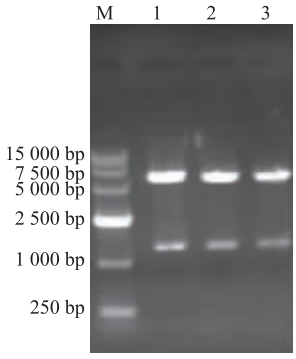


1~7:突变菌株,M:DNA 标准

图 1 菌落 PCR 电泳的检测图

Fig. 1 Electrophoresis results of colony PCR

将菌落 PCR 初步鉴定为阳性的转化子菌株通过 LB+Amp 液体培养,提取其质粒用 *EcoR* Ⅰ和 *Not* Ⅰ对该质粒进行双酶切鉴定,电泳结果见图 2。



M,DNA 标准;1: 突变 K91E;2: 突变 K369;3: 突变 K91E/K369R

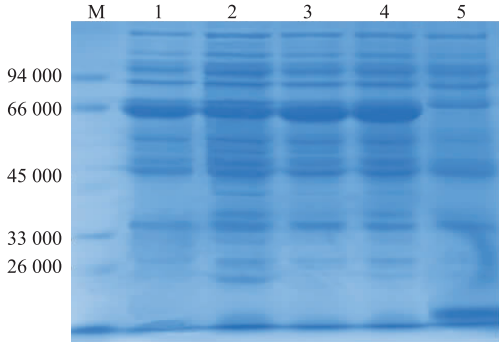
图 2 突变质粒双酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of digestion of mutant plasmid

由图 2 可知,361 位突变子和 91 位突变子双酶切得到了一条与 pET32a 载体基因片段大小一致的约为 5 900 bp 的条带和一条与酶切酶葡聚糖基因片段大小一致的约为 1 400 bp 的条带。将阳性菌株送去测序结果与设计定点突变结果一致,成功将 361 和 91 位的氨基酸进行了突变。

2.2 突变内切葡聚糖酶的诱导表达与纯化

将含有突变基因的大肠杆菌表达菌株和原始菌株及含有 pET32a 空质粒的大肠杆菌表达菌株经终浓度为 1 mmol/L IPTG 37 ℃诱导 3 h 后收集菌液,经过超声波破碎,进行 SDS-PAGE 电泳。结果见图 3。原始菌株和突变菌株均表达出大小约为 53 000 的蛋白质,含有载体 pET32a 的菌株也表达出硫氧还蛋白,大小约为 20 000。

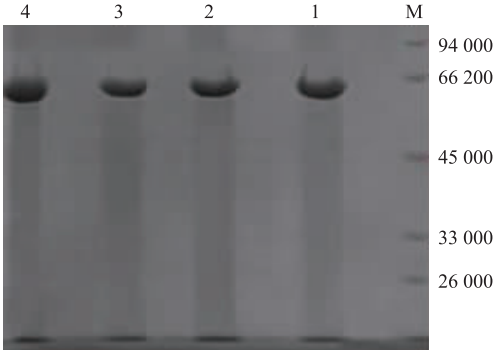


M:蛋白质相对分子质量标准;1:突变 K91E/K369R;2:突变 K91E;3:突变 K369R;4:F-10 对照株;5:空载体 pET32a

图 3 粗酶液 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of the crude enzyme

突变菌株和原始菌株经 1 mmol/L IPTG 诱导后,按镍柱亲和层析纯化方法纯化获得原始内切葡聚糖酶的和突变的内切葡聚糖酶蛋白,见图 4,纯化后的蛋白相对分子质量约为 53 000,与预计大小一致。



1:F-10 对照株;2:K369R 突变株;3:K91E 突变株;4:K91E/K369R 突变株;M:蛋白质相对分子质量标准

图 4 纯化酶的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE of the purified enzyme

2.3 酶比活力的测定及性质分析

2.3.1 酶比活力的测定 按标准酶活力的测定方法,比活就是每毫克酶蛋白的酶活力,经过镍柱亲和层析分离纯化的酶,测定其总酶活力并用考马斯亮蓝方法测出蛋白质浓度后即可求出比活。测得原始与突变的比活力见图 5。K91E、K369R、K91E/K369R 比活力分别是原始酶 F-10 的 3.0 倍,2.4 倍和 1.2 倍。

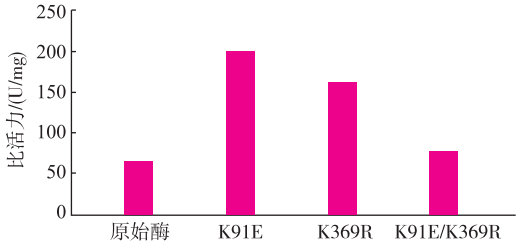


图 5 原始酶与突变酶的比活

Fig. 5 Specific activity of wild endoglucanase and mutant endoglucanase

2.3.2 酶促反应的最适 pH 值 将稀释一定倍数的酶液分别与用 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液配制的底物混合后,在 50 ℃水浴保温 30 min,然后分别在标准条件下测定在这些 pH 条件下内切葡聚糖酶的酶活。以酶活最高者为 100%计,算出相对酶活,结果见图 6。突变酶与原始酶的最适 pH 均一致,没有发生变化,均为 6.8。

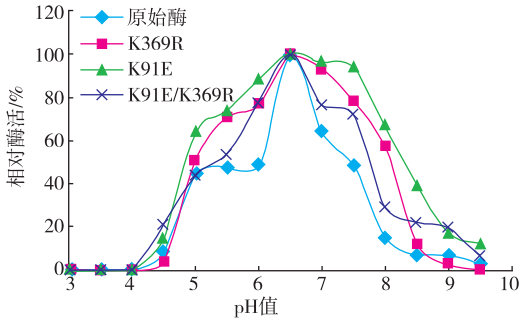


图 6 反应 pH 对内切葡聚糖酶酶活性的影响

Fig. 6 Effection of reaction pH on activity of wide-type endglucanase and its mutant

2.3.3 酶促反应的最适温度 在 pH 6.8 下,将稀释一定倍数的酶液与 CMC-Na 底物混合后,分别在 30、40、50、60、70、80、90 ℃下水浴保温 30 min 后,在标准条件下测定在不同反应温度下的酶活。以酶活力最高者为 100%计,算出相对酶活力,结果见图 7。

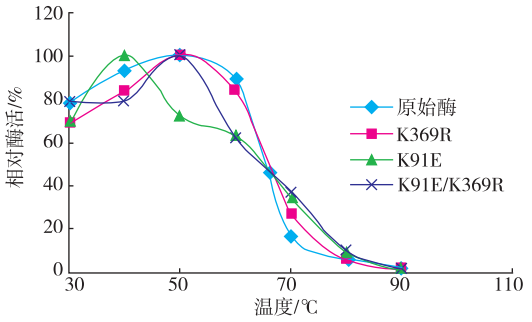


图 7 反应温度对内切葡聚糖酶酶活性的影响

Fig. 7 Effection of reaction temperature on activity of wide-type endglucanase and its mutants

由图 7 可知,K91E 突变酶的最适温度相比原始酶下降了 10 ℃,降到 40 ℃,而 K369R,K91E/K369R 突变酶的最适温度没有发生变化,跟原始酶的一样均为 50 ℃。

2.3.4 酶促反应的热稳定性 在 pH 6.8 下,将稀释一定倍数的酶液分别在 30、40、50、55、60、65、70、75、80 ℃下水浴反应 30 min 后,恢复至室温,在标准条件下测定剩余酶活力。以酶活力最高者的酶活力为 100%,得出相对酶活力,结果见图 8。

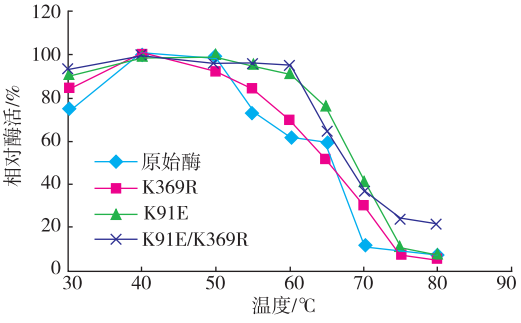


图 8 内切葡聚糖酶的热稳定性

Fig. 8 Thermostability of wide-type endglucanase and its mutants

由图 8 可知,当温度达到 65 ℃时,原始酶的活性急剧下降,而 K91E,K91E/K369R 处于稳定状态,剩余活力为 90%,K369R 的剩余活力在 50%;当温度达到 70 ℃时,原始酶的剩余活力只有 12%,而 K369R 有 30%,K91E 有 36%,K91E/K369R 还有 41%;当温度达到 80 ℃时,原始酶将近失活,而 K91E 残余活力仍有 22%。

2.3.5 金属离子对酶活性的影响 在酶与底物反应混合物中加入 1 mmol/L 的各种金属离子,按酶活力测定方法测定其酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100%。由表 2 可以看出,Ca^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}对内切

葡聚糖酶有明显的激活作用;Cu^{2+}、Zn^{2+}、Al^{3+}有一定的抑制作用,尤其是 Cu^{2+}和 Zn^{2+}可使酶活力降至50%。其它金属离子对内切葡聚糖酶的影响不大(影响作用在±10%以内)。本研究结果与胥兵、陈惠等对研究枯草芽孢杆菌 C-36 纤维素酶的酶学性质研究得出的结果基本一致[12]。

表 2　金属离子对内切葡聚糖酶活力的影响

Table 2　Effect of metal ions on?Endoglucanase activity

金属离子	终浓度/(mol/L)	相对酶活/%	结果
Fe^{2+}	10^{-3}	88	0
Ba^{2+}	10^{-3}	90	0
Ca^{2+}	10^{-3}	124	+
Mn^{2+}	10^{-3}	117	+
Cu^{2+}	10^{-3}	50	-
Co^{2+}	10^{-3}	130	+
Zn^{2+}	10^{-3}	51	-
Li^{+}	10^{-3}	101	0
Na^{+}	10^{-3}	106	0
Al^{3+}	10^{-3}	56	-

注:+表示激活作用;-表示抑制作用;0 表示作用不显著(正负 10%以内)

3 结　语

利用 SOPM 方法对原始酶和突变酶成熟蛋白的二级结构预测分析结果可知,突变内切葡聚糖酶中 α-螺旋 (Helix),β-折叠 (Sheet) 和 β 转角 (Turn) 以及无规则卷曲 (Coil) 的含量与原始酶相比没有多大的改变,由此可以说明突变后的内切葡聚糖酶的二级结构基本没有发生变化[14-17]。

对原始酶和突变酶的蛋白质三级结构预测分析结果可知,突变前与突变后的内切葡聚糖酶的三级结构及其中心骨架基本没有发生改变,3D 结构建模显示,其主要折叠方式为为 (β/α) 8 桶状结构,在所有的 α/β 桶结构中,活性部位均处于一个相似的位置,即位于由连接 β 折叠链羧基端与 α 螺旋氨基端的八个环所构成的口袋底部中,而参与结合和催化的残基在这些环区 (100p) 中[18]。内切葡聚糖酶属于水解酶基因家族 5,它的保守氨基酸 (ARG109,HIS148,ASN186,HIS254,TYR256) 主要位于活性中心[19]。

91 位氨基酸和 369 位氨基酸突变并没有影响高级结构上的明显变化,但是这两个突变位点一个位于催化结构域,一个位于结合结构域,91 位的氨基酸位于催化结构域的 α 螺旋上,当 91 位的赖氨酸突变成谷氨酸后,内切葡聚糖酶的比活比原始酶的提高了 3 倍,最适反应温度降低到 40 ℃,最适 pH 没有发生改变,热稳定性相对原始酶也有所提高。该位点由碱性氨基酸 (赖氨酸) 变为酸性氨基酸 (谷氢酸) 产生了强烈的电荷变化,可能对整个酶分子的电荷分布产生影响,进而改变活性中心的催化特性[20-22]。当 369 位的赖氨酸突变成精氨酸后,内切葡聚糖酶的比活相对原始酶的提高了 2.4 倍,最适温度和最适 pH 均没有发生改变,热稳定性跟原始酶相比,也有所提高,此突变导致此位点氨基酸残基侧链的变化,可能使其更容易接近纤维素分子,同时可能改变了结合结构域与催化结构域间的相互作用,从而提高了酶活性 。与带同等电荷的氨基酸相比,精氨酸 (Arg),谷氨酸 (Glu) 有更大的的侧链,增加了包埋效应,而且侧链所提供的离子键相互作用能提高蛋白质的热稳定性。同样一些学者也报道结合结构域可以通过不同作用域之间的作用影响催化域的活性和稳定性[20-22]。近年来的研究也表明,单一氨基酸位点的突变也可以提高酶蛋白的比活力。如陈琪等对绿色木霉葡聚糖内切酶 I 基因的氨基酸残基 291 进行定点突变 (G291S),比活力为原始酶的 2.2 倍。本研究为进一步阐明纤维素酶的催化机理积累了实验数据,此外,还为构建高效表达基因工程菌用于中性内切葡聚糖酶酶工业化生产提供了基础材料[25]。

参考文献:

[1] 杨友坤,朱凤香,王卫平,等. 纤维素酶及其应用现状[J]. 安徽农学通报,2009,15(13):59-62.
YANG Youkun,ZHU Fengxiang,WANG Weiping,et al. Applications status of cellulase [J]. **Anhui Agricultural Science Bulletin**,2009,15(13):59-62.(in Chinese)

[2] Li H M,Mei L H,Urlacher V B,et al. Cytochrome P450 BM-3 evolved by random and saturation mutagenesis as an effective indole-hydroxylating catalyst[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2008,144(1):27-36.

[3] Tomme P. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi[J]. **Advances in Microbial Physiology**,1995,37:71-81.

[4] 汪天虹. 瑞氏木霉分子生物学研究进展[J]. 菌物系统,2000:121-127.
WANG Tianhong. The molecular biology progress of *Trichoderma reesei*[J]. **Mycosystema**,2000:121-127. (in Chinese)

[5] 唐自钟,刘姗,韩学易,等. 易错 PCR 提高中性内切葡聚糖酶活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(7):754-761.
TANG Zizhong,LIU Shan,HAN Xueyi,et al. Improving endoglucanase activity from *Bacillus subtilis* by error-prone PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(7):754-761. (in Chinese)

[6] 陈祺,韦宇拓. 绿色木霉葡聚糖内切酶 I 基因的定点突变及酶学性质的研究[J]. 广西农业生物科学,2008,27:123-131.
CHEN Qi,WEI Yutuo. Research of the characters of site-directed mutagenesis of *Trichoderma viride* endoglucanase I[J]. **Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science**,2008,27:123-131.(in Chinese)

[7] Tomschy A,Lehmann M. Engineering of phytase for improved activity at low pH [J]. **Appl Environ Microbiol**,2002,68(4):1907-1913.

[8] 陈惠,王红宁,吴琦,等. 饲用植酸酶蛋白质工程研究进展[J]. 微生物学通报,2004,31(3):106-110.
CHEN Hui,WANG Honglin,WU Qi,et al. Research progress of feed phytase protein engineering [J]. **Microbiology China**,2004,31(3):106-110.(in Chinese)

[9] Lehmann M,Kostrewa D. From DNA sequence to improved functionality:using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase.[J]. **Protein Engineering**,2000,13(1):49-57.

[10] Shuang Zhang,Qiu-yu Yin,Yan-hong Li,et al. Molecular and biochemical characterization of Ba-EGA,a cellulase secreted by *Bacillus sp*. AC-1 from *Ampullaria crosseans*.[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,75(6):1327-1334.

[11] Qin Y,Wei X,Song X,Qu Y. Engineering endoglucanase II from Trichoderma reesei to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum[J]. **Biotechnol Bioeng**,2008,135:190-195.

[12] 胥兵,陈惠,韩学易. 枯草芽胞杆菌 C-36 纤维素酶的纯化及酶学性质[J]. 四川农业大学学报,2006,24(4):398-401.
XU Bing,CHEN Hui,HAN Xueyi. Purification and Properties of Cellulase from Bacillus subtilis C-36 [J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**,2006,24(4):398-401.(in Chinese)

[13] 吴振芳 陈惠,曾民. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究[J]. 农业生物技术学报,2009,17(3):529-535.
WU Zhenfang,CHEN Hui,ZENG Min. Over-expression of endoglucanase gene in *Pichia pastoris* [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**,2009,17(3):529-35.(in Chinese)

[14] PING Y. Enhancing the enzymatic activity of the endochitinase by the directed evolution and its enzymatic property evaluation[J]. **Process Biochemistry**,2012(15):1089-1094.

[15] Cooper V. Molecular analysis of the major cellulose (celv) of Erwinia carotovora:evidence for an evolutionary "mix-and match" of enzyme domains[J]. **Mol Gen Genet**,2000,241:341-350.

[16] Linder M. The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution[J]. **Protein Sic**,1995,4:1056-1064.

[17] Saloheimo M,Lehtovaara P,Penttila M,et al. A new endoglucanase from *Trichoderma reesei*:the characterization of both gene and enzyme[J]. **Gene**,1988,63:(1):11-22.

[18] 卡尔布兰登,约翰图兹. 蛋白质结构导论[M]. 上海:上海科学出版社,2005:42-43.

[19] Wang Q,Tull D,Meinke A,et al. Glu280 is the nucleophile in the active site of Clostridium thermocellumCelC,a family A endo-β-1,4glucanase[J]. **J Biol Chem**,1993,268:14096-14102.

[20] Takeshi F,Tomoko I,Mariko O,et al. Enhancement of cellulase activity by clones selected from the *Combinatorial* library of the cellulose-binding domain by cell surface[J]. **Engineering,Biotechnology Progress**,2006,22(4):933-938.

[21] Takamitsu A,Rie A,Akiyoshi T,et al. Characterization of a cellulase containing a family 30 carbohydrate-binding module (CBM) derived from *Clostridium thermocellum* celJ:importance of the CBM to cellulose hydrolysis[J]. **Journal of Bacteriology**,2003,185(2):504-512.

[22] Park J S,Nakamura A,Horinouchi S. Indentification of the cellulose binding domain of a *Bacillus subtilis* endoglucanase distinct from its catalytic domain[J]. **Biosci-Biotech Biochem**,1993,57:260-264.