

饱和突变提高肌酸酶热稳定性

阮洁^{1,2}, 刘松^{1,2}, 李江华^{*1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(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 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为提高肌酸酶 (Creatinase, EC 3.5.3.3, CRE) 的热稳定性, 通过序列比对的方法确定了 *Arthrobacter nicotianae* 23710 CRE 热稳定性相关位点 K195, 并对其进行了饱和突变。与野生酶相比, 突变体 K195V、K195T、K195C 和 K195L 在 50 °C 下的半衰期分别提高 260%、230%、60% 和 20%; 其中, K195V 和 K195C 比酶活分别提高 80.7% 和 88.2%, 其他突变体比酶活无明显变化; 突变体 K195V、K195T、K195C 和 K195L 的催化效率 (k_{cat}/K_m) 分别提高 131%、218%、83% 和 100%。结构分析发现, 突变体 K195V、K195T、K195L 较野生酶分别增加了 7、12 和 13 个氢键。结果表明: 对 Lys195 的突变可有效改变 CRE 的热稳定性及催化效率, 且分子内部氢键的增加可能是 CRE 热稳定性提高的重要原因之一。

关键词: 肌酸酶; 热稳定性; 饱和突变; 分子改造; 氢键

中图分类号: Q 814 文章编号: 1673-1689(2019)10-0008-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.002

Improvement of Creatinase Thermal Stability Through Saturation Mutagenesis

RUAN Jie^{1,2}, LIU Song^{1,2}, LI Jianghua^{*1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To improve the thermal stability of creatinase (EC 3.5.3.3, CRE), the "hot-spot" Lys195 in *Arthrobacter nicotianae* 23710 CRE is identified by sequence alignment, and saturation mutagenesis is conducted at this site. In contrast to wild-type enzyme, the mutants K195V, K195T, K195C, and K195L exhibited 260%, 230%, 60%, and 20% increase in half-life at 50 °C, respectively; the specific activity of K195V and K195C are respectively increased by 80.7% and 88.2%. Furthermore, the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of mutants K195V, K195T, K195C, and K195L are increased by 131%, 218%, 83% and 100%, respectively. As indicated by structure analysis, the number of hydrogen bonds of the K195V, K195T, and K195L are increased by 7, 12 and 13 in comparison with the wild-type enzyme, respectively. The results indicated mutations at Lys195 could affect the thermal stability and catalytic efficiency of CRE, and the increase in hydrogen bonds may account for the improved thermal stability of CRE.

收稿日期: 2017-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401638); 江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 李江华(1966—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶技术等领域的研究。

E-mail: lijiahua@jiangnan.edu.cn

引用本文: 阮洁, 刘松, 李江华, 等. 饱和突变提高肌酸酶热稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 8-14.

Keywords: creatinase, thermal stability, saturation mutagenesis, molecular modification, hydrogen bond

人体内的磷酸肌酸代谢终产物肌酐可以经过肾脏过滤,经由血液进入尿液而排出体外。在肾脏功能或者肌肉功能出现问题时,血清中肌酐含量将从正常的 35~150 μM 上升到 1 000 μM ^[1-2]。因此,血清中肌酐含量成为检测肾的重要指标。当前市场上最常用的酶法检测肌酐含量试剂盒主要涉及 3 种关键酶,肌酐水解酶、肌酸酶(EC 3.5.3.3, CRE)和肌氨酸氧化酶^[3]。其中,CRE 主要用于催化肌酸水解产生尿素和肌氨酸。要制备商品化的且能长久保存的肌酐检测试剂,CRE 的稳定性十分重要。

在酶法测定肌酐含量涉及的 3 种酶中,已报道的肌酐酶水解酶和肌氨酸氧化酶较稳定^[4-5],而其主要来源于恶臭假单胞菌、节杆菌、产碱杆菌和副球菌^[6-9] 等的肌酸酶热稳定性皆不理想,文献 [6]对 *Paracoccus* sp.strain WB1 CRE 分析发现:CRE 最适反应温度在 30~40 $^{\circ}\text{C}$,当温度高于 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,稳定性会显著下降,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后残余酶活仅剩 10%左右。*P. putida* NTU-8 CRE^[10]与 *Alcaligenes* sp. nov CRE^[11]的研究中也具有这一性质。已有研究中关于 CRE 稳定性改造的研究较少,文献[12]对来源于 *P. putida* CRE 分子进行了随机突变改造,其中 V182I 突变株的 T_m 提高 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 。文献[13]通过固定化的方式使得肌酸酶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 200 d 后仍具有较高活性。但若想将 CRE 应用于工业大规模生产,CRE 的热稳定性还有待进一步提高。

本研究前期来源于 *Arthrobacter nicotianae* 23710 CRE 表达基因与 pET-20b(+)相连,并转入 *Escherichia coli* (DE3),获得高效表达重组菌 pET-20J^[14]。且 *A. nicotianae* 23710 CRE 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 热稳定性较好、比酶活较高,但仍不能达到工业应用的标准。蛋白质工程能有效改善天然酶的性能,通常蛋白质改造的策略主要包括:DNA shuffling^[15], 易错 PCR^[16], 体外随机重组、定点突变^[17]等。本研究拟结合同源序列比对与计算机同源建模确定改造位点,对 *A. nicotianae* 23710 CRE 的进行饱和突变,得到热稳定性显著提高的 CRE 突变体,为分子改造提高 CRE 稳定性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本研究前期构建保存的表达质粒 pET-20J,用于表达 CRE。*E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* JM109 来自 Qiagen 公司(美国)。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*Dpn* I 均购自 Thermo 公司。Primer star DNA 聚合酶、感受态制备试剂盒、柱回收试剂盒均购与 TaKaRa 公司。异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)、质粒提取试剂盒与氨苄青霉素均购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.3 培养基 种子培养基(LB):酵母粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L;发酵培养基(TB):酵母粉 24 g/L,胰蛋白胨 12 g/L,甘油 10 g/L, K_2HPO_4 16.43 g/L, KH_2PO_4 2.32 g/L,(pH 7.0)。

1.2 方法

1.2.1 CRE 突变体的构建 以前期实验室保存的 pET-20J 质粒为模板^[14],设计两条引物(见附表 1),利用突变引物通过重叠延伸 PCR 引进突变点。将相应的重叠延伸 PCR 产物 *Dpn* I 消化 2 h,除去模板质粒后进行柱回收并转入感受态 *E. coli* JM109 中,挑取单菌落培养并提质粒测序。将正确突变质粒利用化学法转入 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞中进行表达。实验所需的突变引物均由上海生工合成。

表 1 K195 位点饱和突变引物

Table 1 Saturation mutagenesis-primer of K195 site

引物名称	引物序列(5'-3')
K195F-sense	AAGCCATC TTT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195F-antisense	ATCGCTGC AA GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195L-sense	AAGCCATC CTG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195L-antisense	ATCGCTGC CAG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195M-sense	AAGCCATC ATG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195M-antisense	ATCGCTGC CAT GATGGCTTCGCCGCCAG GT

续表 1

引物名称	引物序列(5'-3')
K195V-sense	AAGCCATC CTG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195V-antisense	ATCGCTGCC ACG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195S-sense	AAGCCATC TCT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195S-antisense	ATCGCTGCC AGA GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195P-sense	AAGCCATC CCG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195P-antisense	ATCGCTGCC CGG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195T-sense	AAGCCATC ACC GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195T-antisense	ATCGCTGCC GCT GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195A-sense	AAGCCATC CGG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195A-antisense	ATCGCTGCC CGG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195Y-sense	AAGCCATC TAT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195Y-antisense	ATCGCTGCC ATA GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195H-sense	AAGCCATC CAT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195H-antisense	ATCGCTGCC ATG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195N-sense	AAGCCATC AAC GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195N-antisense	ATCGCTGCC TTG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195D-sense	AAGCCATC CAT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195D-antisense	ATCGCTGCC ATG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195E-sense	AAGCCATC GAA GCAGCGATCCGCGAAGG CATC
K195E-antisense	ATCGCTGCC TTG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195C-sense	AAGCCATC TCC GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195C-antisense	ATCGCTGCC GCA GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195R-sense	AAGCCATC CGT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195R-antisense	ATCGCTGCC ACG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195G-sense	AAGCCATC GGC GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195G-antisense	ATCGCTGCC CCG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195W-sense	AAGCCATC TGG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195W-antisense	ATCGCTGCC CA =CTTCGCCGCCAGGT
K195Q-sense	AAGCCATC CAG GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195Q-antisense	ATCGCTGCC CTG GATGGCTTCGCCGCCAG GT
K195I-sense	AAGCCATC ATT GCAGCGATCCGCGAAGGC ATC
K195I-antisense	ATCGCTGCC AAT GATGGCTTCGCCGCCAG GT

注:蓝色字体为突变位点

1.2.2 CRE 突变体的表达 将突变体质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)得到表达 CRE 的突变菌株。挑取单个菌落至 LB 培养基(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄抗生素)中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床振荡培养 8 h。之后将种子液以体积比为3%的接种量接入 TB 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床振荡培养至菌浓 $\text{OD}_{600}=3$,并加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床振荡培养 10 h。

1.2.3 CRE 突变体的纯化 将突变菌株的发酵液经过超声破碎,在低温下 12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液。在冰浴条件下将上清液进行逐级硫酸铵沉淀,离心收集沉淀。向获得的沉淀中加入少量的磷酸缓冲液(0.05 mol/L NaH_2PO_4 及 0.05 mol/L Na_2HPO_4 混合液, $\text{pH}=7.0$)以溶解沉淀,装入透析袋(截留分子量为 10 kDa)后在同样的磷酸缓冲液中透析 24 h。透析后,透析除盐后用微孔滤膜(0.25 μm)去除酶液中的杂质,利用阴离子交换柱(HiPrep 16/10 Q-XL)进行蛋白纯化。上样缓冲液(A液)为 50 mmol/L 的磷酸缓冲液,而洗脱缓冲液(B液)为加有 1 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液(50 mmol/L)。

1.2.4 CRE 的酶活测定 在试管中加入 0.1 mol/L 肌酸溶液 900 μL ,在室温条件下平衡 5 min 后加入待测酶液 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后加入 2 mL 终止剂终止反应,并置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,在 435 nm 处测定吸光度值。空白管是在肌酸溶液中先加入对-二甲氨基苯甲醛,后加入待测酶液,其他步骤与测定管一致。终止剂为对-二甲氨基苯甲醛溶液:2 g 对-二甲氨基苯甲醛固体粉末溶于 100 mL 二甲亚砷溶液中,待完全溶解后加入 15 mL 浓盐酸。

单位酶活定义为单位时间内将肌酸水解产生 1 μmol 尿素所需要的酶量。计算如下

$$\text{酶活力 (U/L)} = \frac{(A_{\text{测}} - A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \times 1\,000}{t \times V_{\text{样}} \times \varepsilon} \quad (1)$$

式中: $V_{\text{样}}$ 为反应体系中酶液体系; $V_{\text{总}}$ 为反应总体积; ε 为毫摩尔吸光系数; t 为反应时间。

1.2.5 酶学参数的测定 半衰期检测 ($t_{1/2}$, min):将纯化后的突变 CRE 稀释到同一浓度,放置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 25 min,其中每隔 3 min 取样并按照 1.2.4 节方法测定 CRE 的残余酶活,确定蛋白的半衰期。

K_m 和 k_{cat} 测定: 配制不同浓度的肌酸溶液 (0~120 mmol/L),加入过量的酶液,按照 1.2.4 测定酶活力,并用 GraphPad Prism 5 软件(GraphPad Software)

计算。

1.2.6 软件分析 利用在线服务器 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), 以 PDB 数据 1CHM^[18] 晶体结构为模板, 同源模拟 *A. nictotianae* 23710 CRE 晶体结构。CRE 晶体结构由软件 Discovery studio 4.1 分析。

2 结果与讨论

2.1 CRE 饱和突变位点的选择及构建

随机突变的结果显示,V182 突变为异亮氨酸使

P. putida CRE 的 T_m 提高 0.2 °C^[12], 表明 V182 对与 *P. putida* CRE 热稳定性有重要影响。氨基酸序列比对显示, *A. nictotianae* 23710 与 *P. putida* 来源的 CRE 同源性达到 62%。以 *P. putida* 晶体结构(PDB ID. 1CHM)为模板, 通过 SWISS-MODEL 在线服务器构建得到 *A. nictotianae* CRE 的模拟结构。通过一级及二级序列比对发现, V182 位点对应于 *A. nictotianae* CRE 的 K195 位点, 两位点同处于 α 螺旋(图 1)。因此, 为研究 K195 对 *A. nictotianae* CRE 热稳定性的影响, 对此 K195 进行饱和突变。

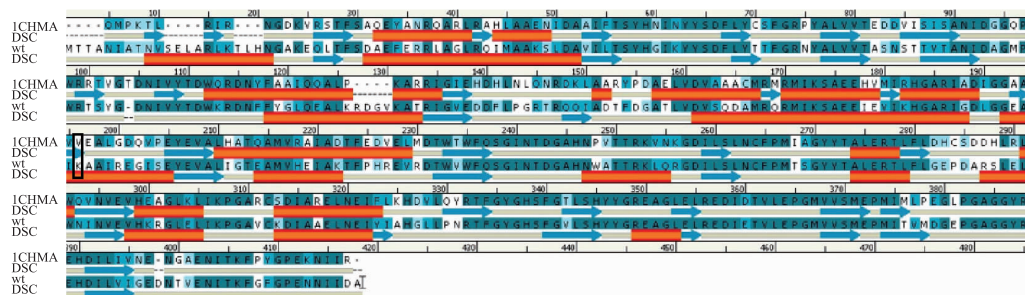
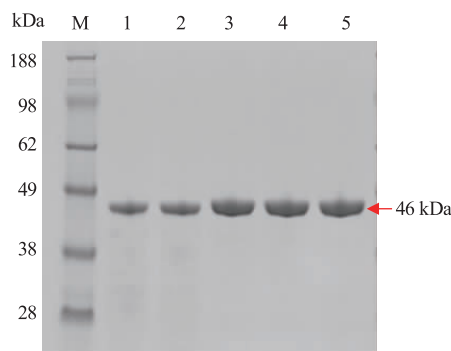
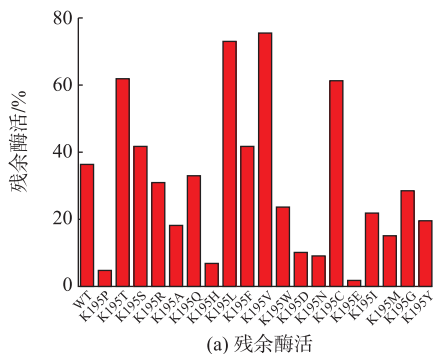


图 1 CRE 序列比对

注:红色区域代表 α 螺旋,蓝色箭头代表 β 折叠,黑色边框为突变位点

2.2 CRE的表达及酶学性质分析

以 pET-20J 质粒为模板,设计两条含突变点的引物,利用突变引物通过重叠延伸 PCR 引进突变点。将测序正确的转化子转入 *E. coli* BL21(DE3) 中,用于发酵表达 CRE 突变体。发酵结束后收集菌体,测定胞内上清中 CRE 的热稳定性。如图 2(a)所示,相同条件下,突变体的粗酶液在 45 °C 保温 30 min 后,CRE 突变体 K195V、K195T、K195C 和 K195L 较野生酶(WT)热稳定性明显提高。通过硫酸铵沉淀及阴离子柱纯化得到 K195V、K195T、K195C 和 K195L 纯酶液(图 2(b)),进一步分析其酶学性质。



M: 蛋白质标准分子量, 1-5: WT、K195V、K195T、K195C、K195L
(b) 纯酶液

图 2 粗酶液中 CRE 及其突变体的热稳定性及优势突变体纯化蛋白的电泳分析

Fig. 2 Crude enzyme thermostability analysis of CRE and its mutants;SDS-PAGE analysis of CRE and its positive mutants

与野生酶相比,突变体 K195V、K195T、K195C 和 K195L 的 $t_{1/2}$ (50 ℃) 分别提高 260%、230%、60% 和 20%; 其中, K195V 和 K195C 的比酶活分别提高了 80.7%, 88.2% (表 2)。突变体中 T_m 值较 WT 增加了 4~5.9 ℃; K195V 的 T_m 达到 55.4 ℃。与 *P. putida*

CRE 的组合突变体 A109V/ V182I/V355M 相比^[12], K195V 高 0.7 °C。表明本研究得到的 K195V 在稳定性方面更具有优势。

此外,部分突变体的 K_m 值较突变前降低,其中 K195C 突变体的 K_m 值降低幅度较大,降低了28%,

与报道的 *A. nictotianae* 02181^[19] 来源 CRE 基本一致。突变体 K195V、K195T、K195C 和 K195L 的 k_{cat}/K_m 值与野生型相比,分别提高了131%、218%、83%和 100%。表明,K195 对 CRE 底物亲和力及酶催化速率有较大影响。

表 2 突变体的酶学性质

Table 2 Kinetic constants of CRE

突变体	K_m / (mmol/L)	半衰期/ ($t_{1/2}$, 50 °C)	k_{cat} / (10^3 min^{-1})	k_{cat}/K_m ($10^3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	比酶活/ (U/mg)	T_m /°C
WT	53.2±4.1	2.3±0.5	123.9±8.9	2.2±0.2	20.3±0.7	49.5
K195V	43.4±3.6	8.3±0.1	286.7±2.2	6.6± 0.1	36.7±0.2	55.4
K195T	47.3 ± 4.1	7.7±0.6	394.3±1.0	8.3±0.0	31.5±0.6	53.5
K195C	39.9±2.3	3.6±0.1	226.8±7.5	5.7±0.2	38.2±0.1	54.7
K195L	43.0±3.7	2.7±0.1	248.3±1.9	5.8±0.1	29.6±0.1	53.9

2.3 K195 突变体的稳定化机制分析

研究表明,蛋白质分子的热稳定性、催化活性的变化与蛋白质分子间作用力的种类和数量有关^[20]。为分析突变体热稳定性提高的原因,构建了 *A. nictotianae* CRE 结构模型并用在线软件 Protein Interaction calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/job.html>)分析 CRE 分子间作用力的变化。如表 3 所示,突变体 K195V、K195T、K195L 较 WT 分别增加 2、3、4 个疏水作用力。研究表明,疏水作用力是影响蛋

白稳定性的重要因素,降低蛋白表面的疏水性或者增强分子内部的疏水性有利于蛋白质的稳定^[21-22]。因此,疏水作用力的增加极有可能是 CRE 热稳定性提高的一个原因。此外,突变体 K195V、K195T、K195L 较 WT 分别增加了 7、12、13 个氢键。文献[23]研究表明增加一个氢键可提供 $0.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的能量,且氢键增加是酶分子稳定性增加的重要原因之一^[24]。因此,氢键的增加可能是 CRE 热稳定性提高的重要原因。

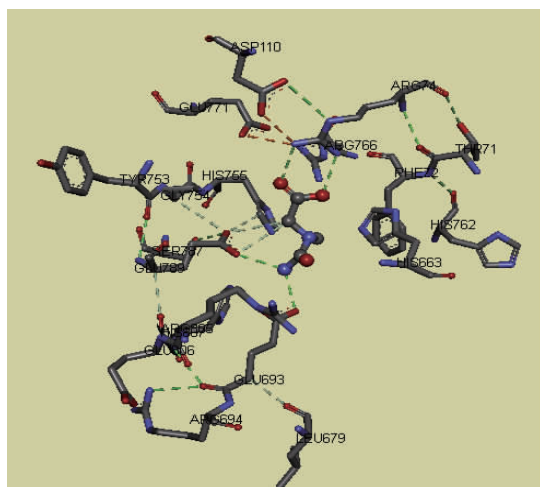
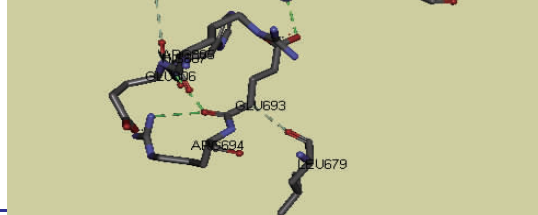
表 3 突变前后 CRE 作用力变化

Table 3 Interactions potentially involved in the stability of wild-type and mutants

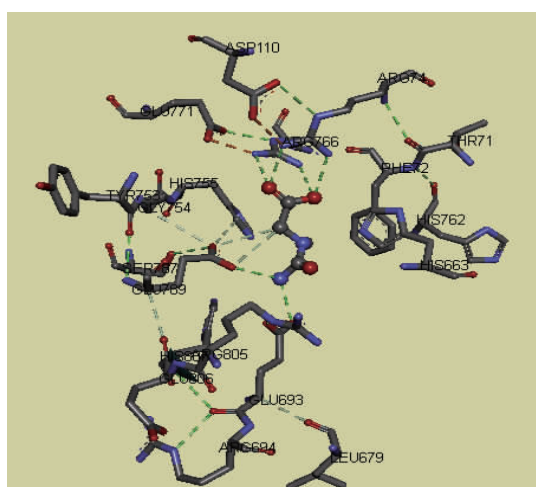
相互作用	WT	K195L	K195T	K195C	K195V
疏水相互作用	578	582	581	558	580
二硫键	0	0	0	0	0
主链-主链间氢键	1054	1060	1065	1061	1064
主链-端链间氢键	319	312	315	320	322
端链-端链间氢键	286	296	291	278	280
离子相互作用	90	80	87	97	89
芳香族相互作用	47	44	45	44	45
芳香族-硫键相互作用	8	5	8	6	4
阳离子-Pi 相互作用	17	19	18	13	20

运用软件 Discovery studio 4.1 对 CRE 的活性位点及催化区域分析发现:突变体 K195T 的活性位点 Phe 72、Arg 74、His 663、Glu 693、Glu 789、Arg 766 与周围氨基酸形成的氢键较 WT 有所增加。如图 3 所示,在 K195T 中,Arg 74 与 Thr 71 形成 2 个氢键,且 Arg 766 与催化区域形成的氢键由原来的 2 个增至 4 个。据报道,氢键对于在高温条件下维持

酶的稳定性具有重要作用^[25]。文献[26]研究中表明,增加分子间的作用力特别是主链氢键的增加有利于酶的稳定,且增强活性位点的刚性有利于酶的催化。文献[27]的研究中也表明了这一观点。因此,氢键的增加极有可能是 K195T 催化效率提高及热稳定性提高的重要因素。



(a) WT

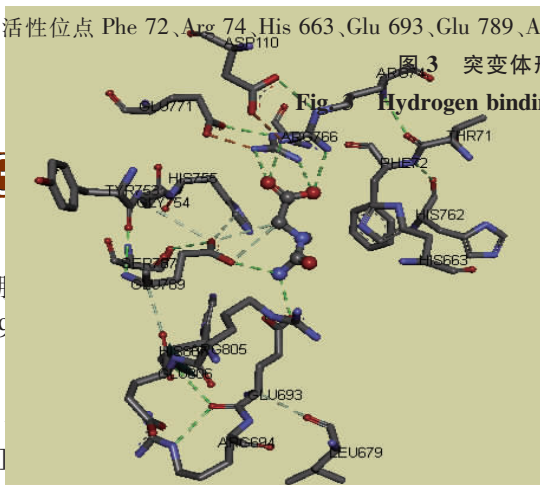


(b) K195T

注:活性位点 Phe 72、Arg 74、His 663、Glu 693、Glu 789、Arg 766,催化区域为“ball and stick”

图3 突变体形成新的氢键作用分布情况

Fig. 3 Hydrogen binding network newly formed of mutants



分提高 260%、230%、60%和 20%。其中,K195V 和 K195C 的比酶活分别提高了 80.7%,88.2%。获得高热稳定性及高催化活性的 CRE 突变体将有助于其工业化应用。

高
K19

参

[1]

151-158.

- [2] KIM E J, HARUYAMA T, YANAGIDA Y, et al. Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 394(2/3): 225-231.
- [3] BURKE D G, MACLEAN P G, WALKER R A, et al. Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 1999, 732(2): 479-485.
- [4] GUO K, MA X, SUN G, et al. Expression and characterization of a thermostable sarcosine oxidase (SOX) from *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(3): 559-566.
- [5] ZHAO G F, MA X H, JIA X M, et al. Purification and characteristics of creatininase from *Arthrobacter* sp[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(21): 250-253.
- [6] WANG Y, MA X, ZHAO W, et al. Study on the creatinase from *Paracoccus* sp. strain WB1 [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(9): 2072-2077.
- [7] YOSHIMOTO T, OKA I, TSURU D. Creatine amidinohydrolase of *Pseudomonas putida*; Crystallization and some properties[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1976, 177(2): 508-515.
- [8] GOREN M P, OSBORNE S, WRIGHT R K. A peroxidase-coupled kinetic enzymatic procedure evaluated for measuring serum and urinary creatinine[J]. *Clinical Chemistry*, 1986, 32(3): 548-551.
- [9] LUO Kan, CUI Youhong, ZENG Zhinan, et al. Purification and characteristics of creatinase from *Arthrobacter nicotianae* 02181 [J]. *Journal of GanSu Sciences*, 2006, 18(1): 60-63. (in Chinese)
- [10] HSU W F, NG I S, TSAI S W, et al. Purification and characterization of creatinase by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2003, 34(3): 305-310.

- [11] MATSUDA Y, WAKAMATSU N, INOUE Y, et al. Purification and characterization of creatine amidinohydrolase of *Alcaligenes origin*[J]. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 1986, 34(5):2155-2160.
- [12] SCHUMANN J, BOHM G, JAENICKE R, et al. Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis[J]. **Protein Science**, 1993, 2(10):1612-1620.
- [13] YADAV S, DEVI R, BHAR P, et al. Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012, 50(4/5):247-254.
- [14] DAI J, ZHANG L, KANG Z, et al. High-level production of creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* 23710 in *Escherichia coli*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2015, 175(5):2564-2573.
- [15] PARK Y M, PHI Q T, SONG B H, et al. Thermostability of chimeric cytidine deaminase variants produced by DNA shuffling[J]. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2009, 19(12):1536-1541.
- [16] YU H, LI J, ZHANG D, et al. Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by error-prone PCR[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2009, 82(2):279-285.
- [17] BUETTNER K, HERTEL T C, PIETZSCH M. Increased thermostability of microbial transglutaminase by combination of several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis[J]. **Amino Acids**, 2012, 42(2):987-996.
- [18] COLL M, KNOF S H, OHGA Y, et al. Enzymatic mechanism of creatine amidinohydrolase as deduced from crystal structures[J]. **J Mol Biol**, 1990, 214(2):597-610.
- [19] QIANG Z, KONG P Y, ZANG J T, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel high activity creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* strain 02181[J]. **Process Biochemistry**, 2009, 44(4):460-465.
- [20] XIE Y, AN J, YANG G, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(11):7994-8006.
- [21] KELLIS J T, NYBERG K, BREVEAIL D, et al. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability [J]. **J Mol Biol**, 1988, 408(3):514-528.
- [22] CRISWELL A R, BAE E, STEC B, et al. Structures of thermophilic and mesophilic adenylate kinases from the genus *methanococcus*[J]. **J Mol Biol**, 2003, 330(5):1087-1099.
- [23] BEN M S, AGHAJARI N, BEN A M, et al. Enhancement of the thermostability of the maltogenic amylase MAUS149 by Gly312Ala and Lys436Arg substitutions[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(2):1740-1746.
- [24] TANNER J J, AND R M H, KRAUSE K L. Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase at 2.5 Å resolution[J]. **Biochemistry**, 1996, 35(8):2597-2609.
- [25] VOGT G, ARGOS P. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing?[J]. **Folding and Design**, 1997, 2(S):40-46.
- [26] XIE Y, AN J, YANG G, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site [J]. **J Biol Chem**, 2014, 289(11):7994-8006.
- [27] ZHANG Xian, LONG Shuiqiang, RAO Zhiming, et al. Improving the activity and stability of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(11):1128-1134. (in Chinese)