

文章编号: 1000-5013(2010)06-0661-06

应用易错 PCR 定向进化甘油脱氢酶

李梓君, 方柏山, 杨仲丽, 刘嘉

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 经过连续易错聚合酶链式反应(Error-Prone PCR)向克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)甘油脱氢酶基因中引入突变,并构建突变文库.依据突变体催化番红O显色的特性,采用琼脂平板法和96微孔板法相结合的高通量筛选方法,成功获得突变体gldA-74,其酶活力是亲本重组酶的2.73倍.通过软件对突变体gldA-74酶基因和亲本重组酶基因进行分析对比,发现突变体gldA-74酶基因发生了一处点突变(A964T),该突变使一处氨基酸被取代.将亲本重组酶和进化酶的高效表达产物经Ni柱纯化后,酶学性质的测定结果表明,甘油的 K_m 值由 $0.58\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高至 $0.63\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而NAD的 K_m 值由 $0.74\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高至 $0.77\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,并且酶的最适pH值由原来的11.5升高至12.5,而最适温度由 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

关键词: 甘油脱氢酶;克雷伯杆菌;定向进化;易错聚合酶链式反应

中图分类号: Q 554⁺.903

文献标识码: A

甘油脱氢酶(Glycerol Dehydrogenase, GDH)主要催化甘油生成二羟基丙酮(Dihydroxyacetone, DHA).根据催化反应中产物和电子受体的不同,GDH可分为3种类型^[1].第1种为依赖 NAD^+ 的GDH^[2](EC1.1.1.6),主要存在于各种细菌中,如*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*和*Cellulomonas sp.*等.第2种为依赖 NADP^+ 的GDH(EC1.1.1.72和EC1.1.1.56),大多存在于霉菌和动物组织中^[3].第3种为不依赖辅酶位于细胞膜上的GDH,在醋酸菌中发现存在这类GDH^[4].GDH的催化产物DHA因其分子中含3种官能团,化学性质活泼,广泛参与聚合、缩合等反应,所以被广泛应用于轻工、医药和食品等行业^[5].由于应用过程中常常需要酶在长时间内,以及在极端环境中保持较高活性,所以需要天然的甘油脱氢酶进行改造.酶的定向进化是在体外模拟自然进化的过程,不需事先了解酶的空间结构和催化机制,通过人为地创造特殊的条件,模拟自然进化机制(随机突变、重组和自然选择),在体外改造酶基因,并定向选择出所需性质的突变酶.易错PCR以其操作简便、有效等优点成为目前应用最为广泛的进化手段之一^[6].本研究利用易错PCR对克雷伯杆菌中GDH进行定向进化,以期获得酶活大幅提高,酶学性质有所改善的突变酶.

1 实验材料和方法

1.1 菌株与质粒

E. coli BL21 (DE3)(pET-32gldA)的构建,以及表达载体pET-32a(+),菌株和质粒的保存,均由华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室完成.

1.2 试剂

LB培养基, T4 DNA连接酶、dNTPs, 限制酶、rTaq酶, 购自大连TaKaRa公司.胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自美国Omega公司,辅酶I购自Amersco公司,其余试剂均为国产分析纯.

1.3 定向进化方法

1.3.1 甘油脱氢酶基因突变体文库构建 (1) 引物. Primer I 为5'-CGTCGGATCCTACATGCG

收稿日期: 2008-12-28

通信作者: 方柏山(1957-),男,教授,主要从事生物化工的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2006AA020103); 国家自然科学基金资助项目(20676048)

CACTTATTTGAG-3'); Primer II (5'-AATGCTCGAGCGAATTAA CGCGCCAGCCAC-3').

(2) 易错 PCR 反应体系. 20 μL 体系中含 $1 \times \text{Taq DNA 聚合酶缓冲液}$ 、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dATP}$ 和 dGTP 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dCTP}$ 和 dTTP 、 $6.0 \sim 8.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ 、 $0.3 \sim 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Primer I 和 Primer II, 模板 DNA 为质粒 pET-32gldA 约 50 ng. 其中, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度被调整, 可以得到不同突变频率的文库.

(3) 扩增与鉴定. 94°C , 5 min; 94°C , 1 min; 62°C , 1.5 min; 72°C , 1.5 min; 30 个循环; 72°C , 15 min. 用质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定易错 PCR 产物, 利用胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, 于 -20°C 保存.

(4) 文库构建. 将上述易错 PCR 产物经胶回收纯化后, 经 BamH I-Xho I 双酶切, 与同样双酶切的载体 pET-32a(+) 相连接, 重组子引入 *E. coli* BL21(DE3), 构建突变体文库.

1.3.2 突变体的筛选和鉴定 (1) 筛选模型的建立^[7]. 将菌体用无菌水稀释, 涂布于番红 O 筛选平板 (胰蛋白胨 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母浸膏 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 甘油 $18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 番红 O $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, IPTG $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 氨苄青霉素 $75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 观察平板的单菌落的生长及变色情况. 挑取颜色显示均匀桃红色的单菌落置于含 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养, 经乳糖诱导后收集菌体进行复筛鉴定.

(2) 阳性转化子的鉴定. 按质粒提取试剂盒方法抽提正向重组质粒, 经 Hind III, Pst I 单双酶切, 用质量分数为 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物.

1.4 诱导表达

挑取阳性克隆单菌落接种于含有 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 30°C 培养至吸光度值 (D) 约 0.4 时, 加入乳糖至终质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 30°C 下诱导培养 5 h 后离心收集菌体.

1.5 进化酶活力及菌体蛋白含量测定

酶活力测定具体方法参照文[8]. GDH 使甘油脱氢生成二羟基丙酮, 同时辅酶 I NAD^+ 被还原为 NADH. NADH 在 340 nm 的紫外光下有最大吸收, 根据吸光度的增加情况, 用初速度法可测定 GDH 的活力. 取 1.5 mL 反应液 (含 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAD}$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾缓冲溶液, $\text{pH} = 12.0$), 于 45°C 下恒温后, 加入适量酶液启动反应, 在 340 nm 波长下连续测定酶反应过程中的吸光值 (每隔 6 s 记录一个数据, 时间 1 min), 通过计算可得到 GDH 的酶活 (z). 酶活的定义: 在上述条件下, 每分钟还原 $1 \mu\text{mol}$ 甘油的酶量为 1 个酶活力单位. 蛋白含量按 Bradford 法测定^[9], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

1.6 突变基因序列测定

对筛选到的阳性克隆进行培养复筛, 挑选在高 pH 值条件下仍有较高酶活力的突变体, 提取质粒并用自动序列仪进行测序. 测序由辽宁省大连宝生物公司完成.

1.7 进化酶的纯化

按照常规方法进行镍柱亲和层析纯化^[8]. SDS-PAGE (十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺胶电泳): 采用 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳, 考马斯亮蓝 G-250 染色.

2 实验结果

2.1 易错聚合酶链式反应

在高离子浓度 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在的条件下, Taq DNA 聚合酶的保真性大大降低. 在延伸的过程中, 一些碱基被错误地引入到基因中, 从而使基因发生突变. 通过改变 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度, 可以得到不同突变频率的片段多样性文库. 在其他成分恒定的条件下, 选择不同浓度的 Mg^{2+} , Mn^{2+} 进行易错 PCR, 结果如图 1 所示. 图 1(a) 中, 1~6 表示 Mg^{2+} 浓度分别为 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 图 1(b) 中, 1~6 表示 Mn^{2+} 浓度分别为 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

从图 1 可知, MgCl_2 浓度范围在 7.0~8.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 间均适合该基因易错 PCR 反应. 为了确保易错 PCR 的突变率控制在每个基因 1~3 个碱基突变, 选择 MgCl_2 浓度 7.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为该基因易错

PCR 反应体系的最适浓度. 在以上实验得到的最适 $MgCl_2$ 浓度的基础上, 进一步考察不同 Mn^{2+} 浓度对反应体系的影响. 结果表明, Mn^{2+} 最适浓度为 $0.5\text{ mmol} \cdot L^{-1}$.

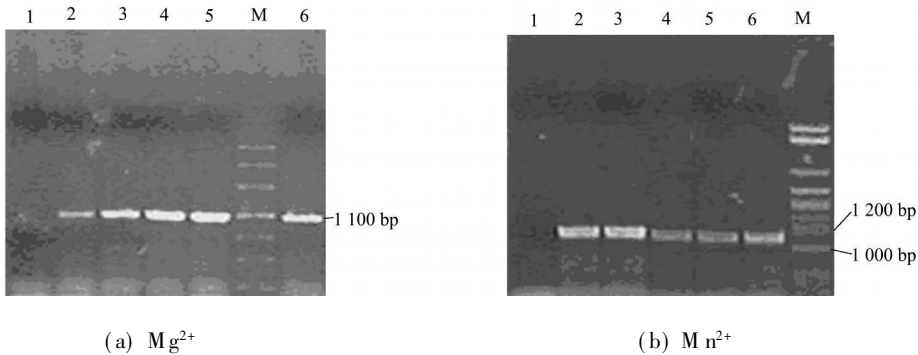


图 1 不同离子浓度下的易错 PCR

Fig. 1 Error-prone PCR conducted with different ion concentration

2.2 突变体文库的构建及突变株的筛选和鉴定

在确定的易错 PCR 条件下扩增甘油脱氢酶基因, 经连续易错 PCR, 产物经纯化后用 $BamH\ I-Xho\ I$ 双酶切, 与经过同样双酶切的表达载体 $pET-32a(+)$ 相连接. 连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中构建突变文库. 研究中共获得 5 000 余株的突变株.

2.2.1 突变株的初筛 将转化后的 *E. coli* BL21(DE3) 细胞涂布于番红 O 筛选平板上, 在 $37\text{ }^{\circ}C$ 下培养约 12 h, 对突变体进行筛选. 甘油脱氢酶在催化甘油生成二羟基丙酮的同时, 把 NAD^{+} 转化成 $NADH$. 所生成的 $NADH$ 会通过呼吸链使电势升高, 产生强质子流, 增强了大肠杆菌细胞对番红 O 的摄入, 并使得番红 O 在大肠杆菌内聚集^[7, 10]. 通过番红 O 筛选平板涂布, 具有甘油脱氢酶活性的克隆显示均匀的桃红色, 而无活性的克隆外围则有一个透明圈, 如图 2 所示.

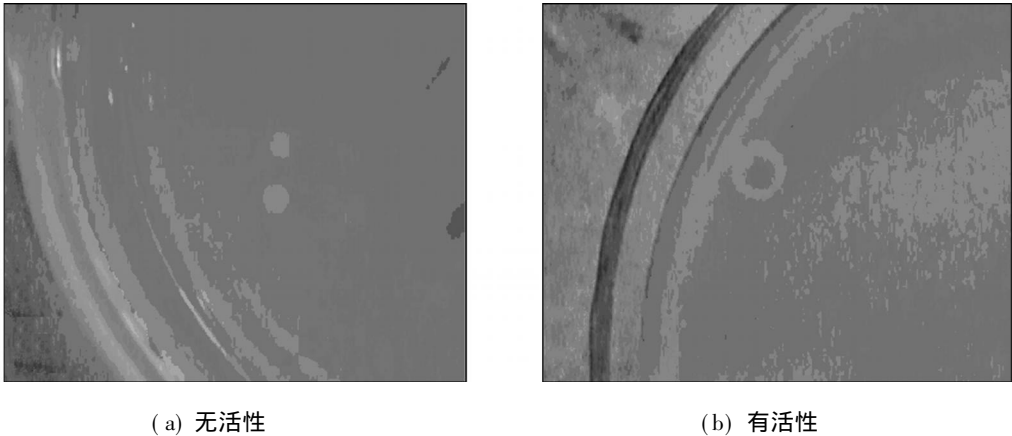


图 2 番红 O 筛选平板初筛结果

Fig. 2 The screening result in safranin O plates

2.2.2 突变株的复筛 将初筛获得的克隆子接种于 LB 培养基(含 $75\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 氨苄青霉素)中, 在 $30\text{ }^{\circ}C$ 下培养至 D 约 0.4 时, 加入乳糖至终质量浓度为 $2\text{ g} \cdot L^{-1}$; $30\text{ }^{\circ}C$ 诱导培养 5 h 后, 超声破碎菌体并离心收集上清液. 采用 96 孔板结合酶标仪, 测定初筛获得的菌株在不同 pH 值下的酶活, 最终获得最佳突变体 $gldA-74$, 其甘油脱氢酶活力为 $2.202\text{ mkat} \cdot L^{-1}$.

相比由张婷婷等^[8]构建的亲本重组酶(酶活为 $0.805\text{ mkat} \cdot L^{-1}$), 酶活提高 2.73 倍; 而相比于陈宏文等^[1]由出发菌克雷伯杆菌经培养基和培养条件优化后, 所测得无细胞抽提液的酶活 $0.062\text{ mkat} \cdot L^{-1}$, 酶活提高 35.7 倍.

2.2.3 突变株酶切鉴定结果 将均匀桃红色的克隆子在 LB 液体培养基中进行培养, 然后抽提重组质粒. 重组质粒用 $Hind\ II$ 进行单酶切鉴定时, 应出现约 6 987 bp 大小的一条带; 而用 $Hind\ III/Pst\ I$ 进行双酶切鉴定时, 由于 $gldA-74$ 上还存在两个 $Pst\ I$ 酶切位点, 应得到两条 DNA 条带, 其大小分别约为 4 808, 1 584 bp.

酶切鉴定结果表明连接正确, 如图 3 所示. 图 3 中: 1, 2 分别为经 Hind II 和经 Hind III/Pst I 进行酶切 pET-32gldA-74

2.2.4 进化酶与亲本重组酶序列比较结果 突变后的基因委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序, 将进化酶与亲本重组酶基因序列进行对比. 测序结果表明, 利用易错 PCR 的方法, 成功地向甘油脱氢酶基因引入了突变, 其中酶活力增高、最适 pH 值增大的 gldA-74 突变体酶基因有 1 个碱基发生了突变(即 964 位的 A 变为 T). 这处突变使得 322 位的 I(异亮氨酸)突变为 F(苯丙氨酸).

2.3 甘油脱氢酶的分离与纯化

选用的表达载体 pET-32a(+) 中含有表达 His6-T agged 的基因序列, 进化酶含有该融合标签, 可以用镍柱纯化. 另外, 在该进化酶的 N 端还含有一个 Rrx-T agTM, 该融合标签有利于提高目的蛋白的可溶部分比例及活性. 研究中, 进化酶经镍柱亲和层析纯化后可见单一条带, 而穿透液几乎不含该条带, 基本上可以认为得到比较纯的蛋白.

当以 pET-32a(+) 为表达载体时, 表达的目标蛋白所含的融合基因的相对分子质量约为 20.4 ku, 而研究中的 GDH 的相对分子质量约为 34 ku^[1]. 因此, 突变质粒所表达的融合蛋白的相对分子质量应为 54 ku, 如图 4 所示. 图 4 中: 1, 2, 3 分别为纯蛋白、穿透液和粗蛋白.

表 1 为纯化结果. 表 1 中: m_t 为总蛋白量; z_t 为总活力; ρ 为蛋白质量浓度; σ 为比活力; η 为回收率; n 为纯化倍数. 从表 1 可以看出, 纯化后进化酶的回收率为 24.1%, 纯化倍数是 2.1.

表 1 进化 GDH 的纯化

Tab.1 Purification of evolved GDH

项目	m_t /mg	z_t /μkat	ρ /g · L ⁻¹	σ /mkat · g ⁻¹	η /%	n
细胞提取物	20.35	22.788	0.93	1.120	100	1.0
His Trap TM HP	2.34	5.484	0.12	2.344	24.1	2.1

2.4 甘油脱氢酶的酶学性质分析

2.4.1 酶动力学参数比较 亲本重组酶与进化酶都以 1/ V 和 1/ S 作 Lineweaver Burk 双倒数图, 结果如图 5 所示. 由此计算, 得到亲本重组酶的 K_m (甘油) 为 0.58 mmol · L⁻¹, K_m (NAD) 为 0.74 mmol · L⁻¹, V_{max} (甘油) 为 0.75 mmol · (L · min)⁻¹, V_{max} (NAD) 为 0.96 mmol · (L · min)⁻¹; 进化酶的 K_m (甘油) 为 0.63 mmol · L⁻¹, K_m (NAD) 为 0.77 mmol · L⁻¹, V_{max} (甘油) 为 3.69 mmol · (L · min)⁻¹, V_{max} (NAD) 为 4.75 mmol · (L · min)⁻¹.

2.4.2 最适温度比较 亲本重组酶与进化酶的最适反应温度, 如图 6 所示. 从图 6 可见, 亲本重组酶的

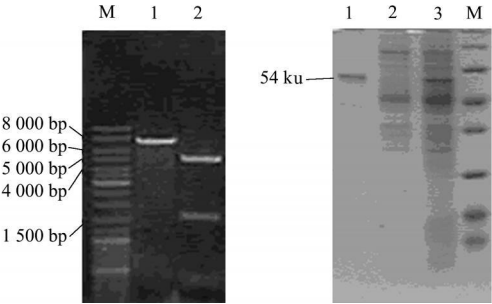
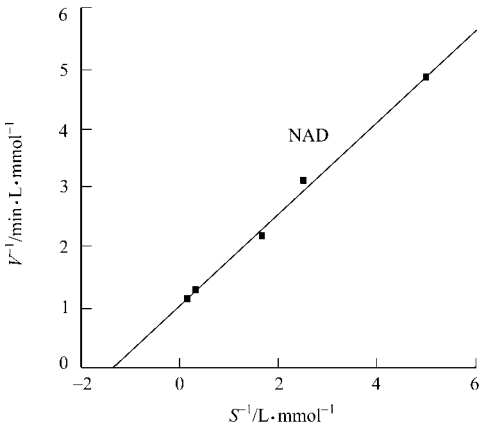
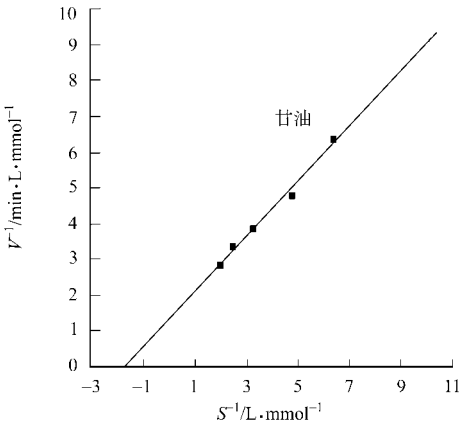
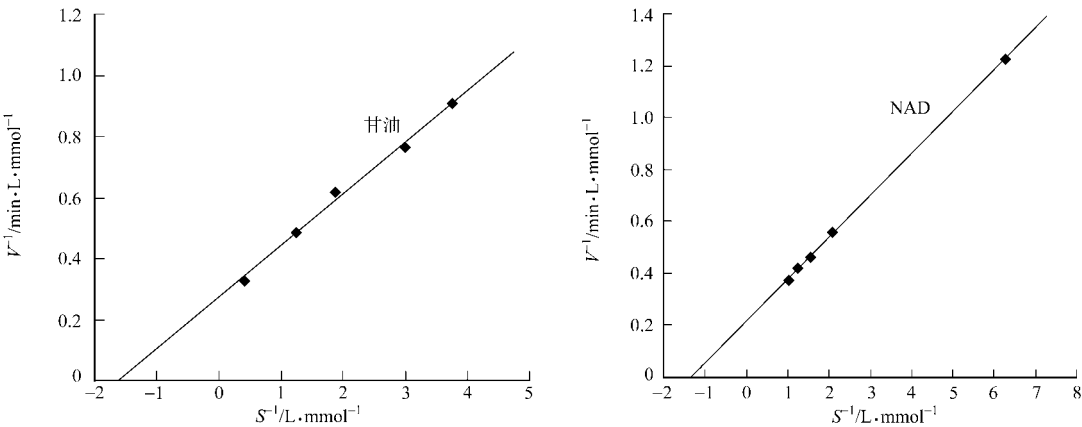


图 3 表达载体酶切鉴定
Fig. 3 Enzyme digestion
of expression vector

图 4 进化酶的纯化
Fig. 4 Purification
of evolved enzyme



(a) 亲本重组 GDH



(b) 进化 GDH

图 5 酶动力学参数的 Lineweaver Burk 双倒数图

Fig. 5 Enzyme kinetic parameters of the Lineweaver Burk double reciprocal graph

最适温度为 65 ℃, 说明 GDH 能在较高的温度下进行反应. 但是, 再继续升高温度, 酶活力迅速下降; 在 70 ℃时, 残留的相对酶活力仅有 20%. 由图 6 又可知, 进化酶的最适温度为 55 ℃, 比亲本重组酶的最适温度降低了 10 ℃. 在 50~ 60 ℃范围内, 进化酶的相对酶活均维持在 80% 以上.

2. 4. 3 最适 pH 值的比较 在 45 ℃, 不同 pH 值的缓冲液中, 检测亲本重组酶和进化酶活力, 结果如图 7 所示. 由图 7 可以看出, 甘油脱氢酶的酶活随着反应液 pH 值的变化而变化. 亲本重组酶在 pH 值为 11.0 时, 甘油脱氢酶的酶活最大; 而在 pH 值为 10~ 12 时, GDH 的相对活性能保持在 70% 以上.

由图 7 还可以看出, 进化酶在 pH 值为 12.5 时酶活最大, 比亲本重组酶的最适 pH 值高. 在 pH 值为 10~ 13 时, 进化酶的相对活性能保持在 70% 以上. 中性环境酶活损失很大, 在 pH 值为 7 的条件下, 酶活仅为 20% 左右. 进化酶催化反应耐强碱, 说明 GDH 存有较大的工业应用价值.

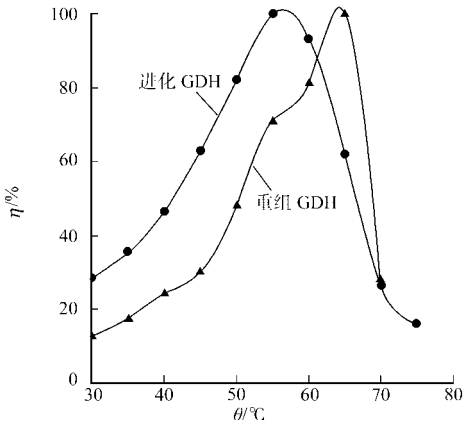


图 6 温度对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of reaction temperature on the activity of recombinant GDH and evolved GDH

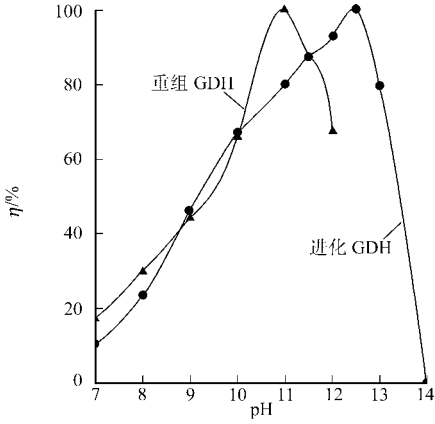


图 7 pH 值对酶活力的影响

Fig. 7 the effect of reaction pH on the specific activity of recombinant GDH and evolved GDH

3 讨论

易错 PCR 操作简单, 容易引入点突变. 其突变频率高于传统的物理和化学诱变, 是目前定向进化领域最为常用的随机突变手段. 因此, 采用易错 PCR 对 GDH 进行定向进化.

首先运用番红 O 筛选平板对 5 000 余株突变体进行初筛; 然后, 再利用 96 孔板结合酶标仪测定经初筛所得的菌株在不同 pH 值条件下的酶活, 最终成功获得突变体 gldA-74. 该突变体有一个有益突变 (即 I322F), 使得进化酶的酶活是亲本重组酶的 2. 73 倍.

将亲本重组酶和进化酶的高效表达产物经镍柱纯化后, 其酶学性质测定表明: K_m (甘油) 由 0. 58 mmol • L⁻¹ 升高至 0. 63 mmol • L⁻¹, K_m (NAD) 由 0. 74 mmol • L⁻¹ 升高至 0. 77 mmol • L⁻¹, 并且酶

的最适 pH 值也由 11.5 升高至 12.5, 最适温度由 65 °C 降至 55 °C. 综上所述, 最终获得的突变体 gldA-74 与亲本重组酶相比, 具有较高的催化活力和偏碱的最适 pH 值, 更适合在偏碱的环境中应用.

今后的研究方向有以下几个方面: (1) 应用生物信息学工具, 对定向进化后的突变基因库、蛋白质序列、3D 结构、活性与功能的变化等做比对分析; (2) 从根本上揭示突变酶的催化机理和折叠机制、蛋白质一级序列与三级结构的关系, 以及结构与功能的关系等, 为探索酶法同时合成 DHA 和 1,3-PD 的新途径提供理论依据.

参考文献:

- [1] 陈宏文, 吴雅红, 吴振华, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质[J]. 无锡轻工大学学报, 2005, 24(1): 1-5.
- [2] RUXHEINIKOV I S N, BURKE I J, SEDELNIKOVA I S, et al. Glycerol dehydrogenase structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase[J]. Structure, 2001, 9(9): 789-802.
- [3] YAMADA H, NAGAO A, NISHISE H, et al. Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(9): 2325-2331.
- [4] AMEYAMA M, SHINAGAWA E, MATSUSHITA K, et al. Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*[J]. Agric Biol Chem, 1985, 49(4): 1001-1010.
- [5] KAWASHIMA K, ITOH H, CHGATE J. Nonenzymatic browning reactions of dihydroxyacetone with amino acids or their esters[J]. Agri Biol Chem, 1980, 44(7): 1595-1599.
- [6] MOORE J C, JIN H M, KUCHNER O, et al. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: Enzyme evolution by random recombination of improved sequences[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 272(3): 336-347.
- [7] LOO V B, HARALD J, SPELBERG L. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(7): 981-990.
- [8] 张婷婷, 方柏山, 王耿, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶基因的克隆表达与纯化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 495-499.
- [9] 汪家政, 汪明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 42-47.
- [10] 方柏山, 郑媛媛. 酶体外定向进化(I): 突变基因文库构建技术及其新进展[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2004, 25(4): 337-342.

Directed Evolution of Glycerol Dehydrogenase by Error Prone PCR

LI Zi-jun, FANG Bai-shan,
YANG Zhong-li, LIU Jia

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology Fujian Province, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The GDH enzyme gene from *Klebsiella pneumoniae* was repeatedly amplified by two sequential error-prone polymerase chain reaction (PCR), and the gene library was built. The mutant can catalyze safranin O to show colors, and on the base of this property, the gldA-74 mutant was obtained by high throughput screening method using active agar plates in combination with 96-well microplates. The activity of the gldA-74 mutant was showed 2.73 fold of that of the parent recombinase. Gene analysis of the gldA-74 mutant indicated that the mutant enzyme had a point mutation (A964T) which resulted in an amino acid being replaced. Then, the highly expressed productions of recombinase GDH and evolved GDH were purified by Ni-NTA and the enzymatic properties were determined. The results showed that the K_m of GDH increased from $0.58 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the K_m of NAD increased as well, from $0.71 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The optimum pH of mutant enzyme also increased from 11.5 to 12.5 while the optimum temperature decreased from 65 °C to 55 °C.

Keywords: glycerol dehydrogenase; *Klebsiella pneumoniae*; directed evolution; error-prone polymerase chain reaction

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)