

Katarzyna Hupert-Kocurek, Agnieszka Banaś, Danuta Wojcieszńska, Urszula Guzik*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, Katowice

Wpłynęło w maju 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Udoskonalanie enzymów metodami nierekombinacyjnymi. 3. Udoskonalanie enzymów metodami rekombinacyjnymi. 4. Podsumowanie

Directed evolution of microbial enzymes

Abstract: Enzymes of microbial origin are extensively used in different industrial processes. However, very often these biocatalysts do not meet the requirements for a large-scale application and its properties have to be optimized. This includes not only the chemoselectivity, regioselectivity and stereoselectivity, but also long-term stability of the biocatalyst at certain temperatures or pH-values and activity in the presence of high substrate concentrations. Protein engineering has emerged as an important tool to overcome the limitations of natural enzymes as biocatalysts. There are two general strategies for protein engineering, rational design and directed evolution. In rational design detailed knowledge of the structure and function of the protein is used to make desired changes. Directed evolution involves either a random mutagenesis of the gene encoding the enzyme (e.g. by error-prone PCR) or recombination of gene fragments derived from DNase degradation, random priming recombination, random chimeragenesis on transient templates or recombined extension on truncated templates. In this review the essential methods for directed evolution of enzymes are described and various examples for the application of these protein engineering tools are provided.

1. Introduction. 2. Improvement of enzymes using non-recombinant methods. 3. Improvement of enzymes using gene-recombination methods. 4. Summary

Słowa kluczowe: mutageneza, rekombinacja, tasowanie genów

Key words: mutagenesis, recombination, DNA shuffling

1. Wprowadzenie

Enzymy pochodzenia mikrobiologicznego są powszechnie stosowane w wielu gałęziach przemysłu. Dzięki znacznemu postępowi w dziedzinie inżynierii białek możliwe stało się ich udoskonalanie w warunkach *in vitro*, prowadzące do otrzymania biokatalizatorów o zwiększonej aktywności, stabilności i określonej specyficzności. Modyfikacje właściwości enzymów polegają na wprowadzeniu określonych zmian w ich strukturze pierwszorzędowej, na drodze zmiany sekwencji nukleotydów w genie. Do najczęściej stosowanych metod umożliwiających wprowadzenie tego rodzaju zmian należą racjonalne projektowanie i ukierunkowana ewolucja [12, 19].

Racjonalne projektowanie polega na wprowadzeniu mutacji w określonym miejscu genu kodującego dany enzym, co prowadzi do zamiany ściśle określonych reszt aminokwasowych w obrębie miejsca aktywnego tego enzymu. W wyniku tak przeprowadzonej mutagenezy uzyskuje się enzym o nowych, pożądanych właściwościach [4, 5, 16, 19]. Alternatywą dla racjonalnego projektowania stała się, w ciągu ostatnich kilku lat, ukierunkowana ewolucja. Metoda ta naśladuje naturalny proces ewolucji zachodzący w przyrodzie [6, 7]. Mutacje mogą

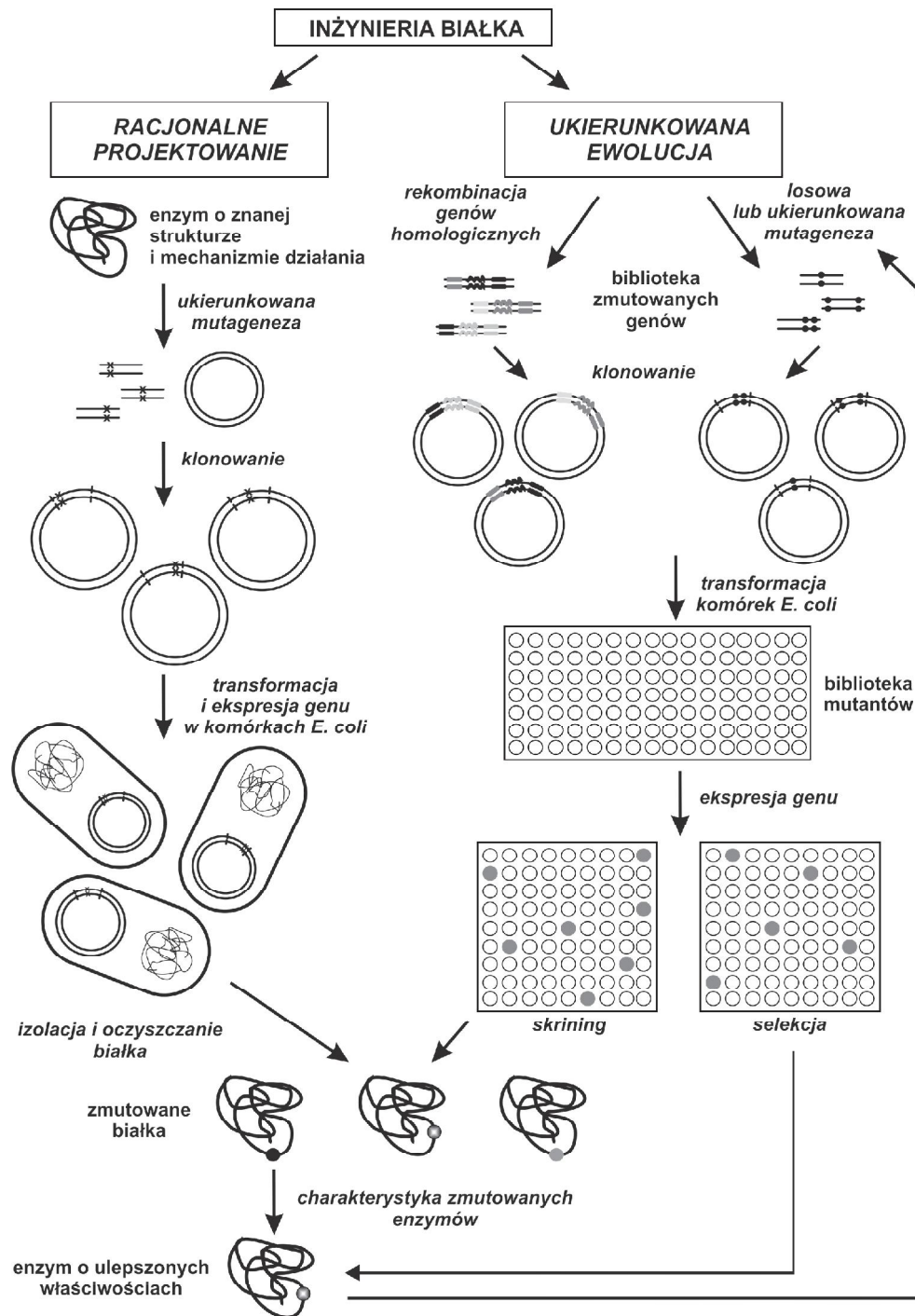
być wprowadzane w konkretnych miejscach przy użyciu ukierunkowanej mutagenezy, bądź w obrębie całego genu poprzez losową mutagenezę [8, 18, 23]. Po przeprowadzonej mutagenezie, zmodyfikowane geny wprowadza się do komórek gospodarza dla uzyskania ekspresji różnych wariantów genu. Pozwala to na stworzenie biblioteki wariantów, którą należy przeszukać w celu identyfikacji mutantów kodujących enzymy o ulepszonych właściwościach [4, 7]. Następnie geny kodujące udoskonalone enzymy są wykorzystywane w kolejnej rundzie ukierunkowanej ewolucji, co może prowadzić do akumulacji pożądanych cech w jednym organizmie gospodarza (Rys. 1).

2. Udoskonalanie enzymów metodami nierekombinacyjnymi

Metody nierekombinacyjne polegają na wprowadzaniu w obrębie genu mutacji punktowych, które prowadzą do substytucji pojedynczych aminokwasów, insercji lub delecji więcej niż jednego aminokwasu, jak również losowej mutagenezy wzdłuż całego genu [19].

Najbardziej popularną nierekombinacyjną metodą wprowadzania różnorodności genetycznej jest podatna

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 454, email: urszula.guzik@us.edu.pl



Rys. 1. Porównanie metod stosowanych w inżynierii białek, umożliwiających uzyskanie enzymów o ulepszonych właściwościach

na błędy łańcuchowa reakcja polimerazy (error-prone Polymerase Chain Reaction; epPCR). Metoda ta polega na wprowadzeniu mutacji punktowych podczas reakcji PCR z użyciem termostabilnej polimerazy *Taq*, która w warunkach *in vitro* nie ma zdolności naprawy swoich błędów [8, 11, 19, 23]. Dokładność tej polimerazy można dodatkowo zmniejszyć poprzez zwiększenie stężenia jonów magnezu Mg^{2+} lub użycie nierównych stężeń nukleotydów dNTP. Wadą epPCR jest generowanie często takich samych mutacji w obrębie genu lub mutacji

milczących, które ze względu na degenerację kodu genetycznego nie powodują zmiany aminokwasu [11, 19].

Technika epPCR została zastosowana przez Liu i wsp. [15] w celu poprawy aktywności enzymatycznej bakteryjnej lakazy Lac591 uczestniczącej w dekoloryzacji barwników tekstylnych. Lakazy bakteryjne, w odróżnieniu od grzybowych, charakteryzują się wysoką aktywnością i stabilnością w wysokich wartościach pH oraz katalizują reakcje bezpośredniego utlenienia substratów, w tym barwników, o różnym potencjale redoks bez

obecności mediatorów – niskocząsteczkowych związków pośredniczących w przekazywaniu elektronów z substratu do centrum aktywnego enzymu. W wyniku trzech rund losowej mutagenazy otrzymano mutanta Lac3T93, z czterema substytucjami aminokwasów (N40S, V55A, F62L, E316V), który charakteryzował się 4,8-krotnie wyższą aktywnością względem 2,6-dimetoksyfenolu (2,6-DMP) niż enzym dzikiego typu. Wprowadzone mutacje spowodowały również przesunięcie optimum pH mutowanego enzymu z 7,5 do 8,0 oraz optimum temperatury z 55°C do 60°C.

Stosowanie lipaz w procesach przemysłowych uzależnione jest od ich specyficzności i stabilności, oraz zdolności katalizy w obecności rozpuszczalników organicznych. K h u r a n a i wsp. [13] zastosowali technikę epPCR w celu modyfikacji lipazy wyizolowanej z *Bacillus subtilis*. Lipaza pochodząca z tego szczepu bakterii wykazywała optimum aktywności w temperaturze $33 \pm 4^\circ\text{C}$ i w pH 8.0. Czas półtrwania ($T_{1/2}$) tego enzymu w temperaturze 50°C wynosił około siedem minut. W wyniku zastosowania jednej rundy epPCR uzyskano siedem mutantów, wśród których cztery wykazywały zwiększoną termostabilność. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji aminokwasowej jednego z nich wykazała, że wprowadzona mutacja spowodowała zamianę izoleucyny na treoninę w pozycji 56, w N-końcowej części łańcucha polipeptydowego. Mutacja ta nie wpłynęła na profil pH zmutowanego enzymu natomiast spowodowała przesunięcie jego optimum temperatury do $38 \pm 3^\circ\text{C}$. Dodatkowo czas półtrwania tej formy enzymu w temperaturze 50°C wzrósł do 21 minut.

W 2009 roku N a k a z a w a i wsp. [17] zastosowali ukierunkowaną ewolucję w celu zwiększenia aktywności katalitycznej endoglukanazy III, enzymu z grupy celulaz, względem karboksymetylocelulozy. Optimum pH działania tego enzymu wynosi 4,8, podczas gdy procesy przemysłowe prowadzone są w pH neutralnym bądź zasadowym. cDNA genu *egl3* kodującego endoglukanazę III poddano dwóm rundom losowej mutagenazy. Otrzymany mutant 2R4 był aktywny w szerszym zakresie pH 4,4–8,8 niż jego forma dzika. Zmutowane białko zawierało sześć podstawień aminokwasów (G41E, T110P, K173M, Y195F, P210S, N2181), a jego aktywność względem karboksymetylocelulozy zwiększyła się 1,4-razy w porównaniu z enzymem typu dzikiego. Ponadto wzrosła jego termostabilność, dzięki czemu enzym nie tracił swojej aktywności przez 30 minut w temperaturze 55°C.

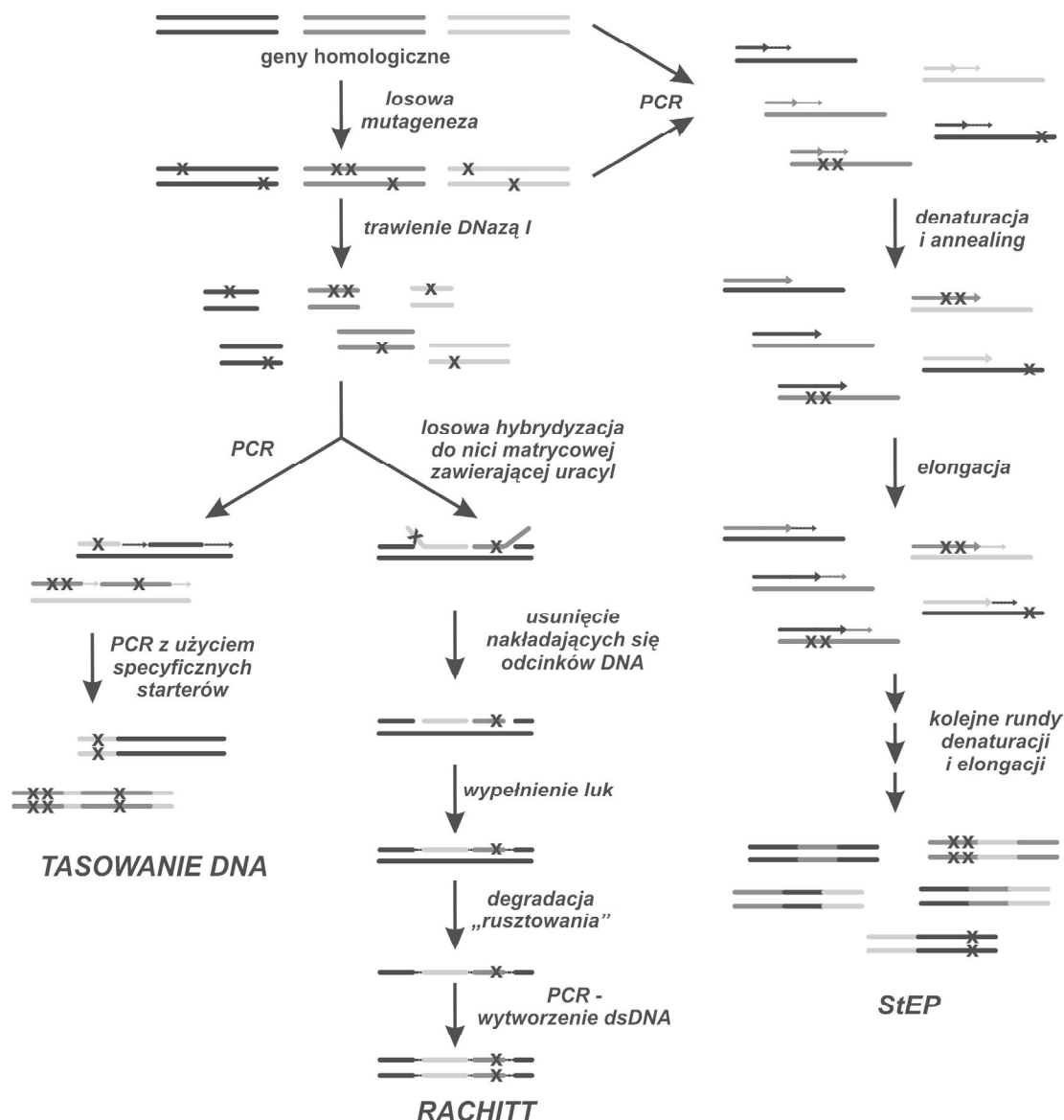
Losowa mutagenaza techniką epPCR umożliwiła również zwiększenie aktywności subtylizyny E w rozpuszczalniku organicznym – dimetyloformamidzie [21]. Subtylizyna E jest proteazą serynową efektywnie działającą w alkalicznym środowisku, niewykazującą jednak aktywności w rozpuszczalnikach organicznych. Kataliza w rozpuszczalnikach organicznych daje większe zastosowania subtylizyny E w syntezach organicznych, między innymi w stereo selektywnych acy-

lacjach racemicznych. Stąd poszukiwanie enzymów aktywnych w tym środowisku. W 1993 roku A r n o l d i wsp. [3] otrzymali mutantą z czterema substytucjami aminokwasów (D60N, D97G, Q103R, N218S). W celu zwiększenia liczby mutacji przeprowadzono trzy rundy losowej mutagenazy, w wyniku czego wygenerowano kolejne 6 mutacji (G131D, E156G, N181S, S182G, S188P i T225A). Mutant z dziesięcioma substytucjami aminokwasów hydrolizował białkowe substraty 256-razy efektywniej niż dziki typ enzymu, w 60% dimetyloformamidzie. Wszystkie mutacje wpływające na aktywność katalityczną tego mutantą w rozpuszczalniku organicznym znajdowały się w tym samym rejonie białka, w obrębie centrum aktywnego i kieszeni wiążącej substrat.

Miejscowo specyficzna mutagenaza wysycenia (Site-Specific Saturation Mutagenesis; SSSM) umożliwiła wprowadzenie wszystkich możliwych podstawień w określonej pozycji sekwencji nukleotydowej danego białka warunkujących zastąpienie konkretnego aminokwasu przez 19 pozostałych [11]. W mutagenезie wysycenia reakcję PCR przeprowadza się z uniwersalnymi starterami oraz mieszaniną dwóch mutagenicznych starterów, które zawierają określoną mutację i pozwalają zmodyfikować docelowy gen. W wyniku amplifikacji z użyciem obu typów starterów otrzymuje się fragmenty DNA mające komplementarne, nakładające się na siebie końce. W kolejnych cyklach reakcji PCR następuje wydłużanie otrzymanych fragmentów z użyciem uniwersalnych starterów, co umożliwiła ostatecznie uzyskanie zmodyfikowanego genu o pełnej długości [11].

Ukierunkowana ewolucja umożliwiła zmianę właściwości katalitycznych dioksygenazy anilinowej izolowanej z *Acinetobacter* sp. Enzym ten kodowany jest przez pięć genów: *atdA1*, *atdA2*, *atdA3*, *atdA4* i *atdA5*. Gen *atdA3* ma wpływ na aktywność enzymu oraz jego specyficzność substratową. Mutacja w obrębie tego genu prowadząca do zamiany V205A umożliwiła wykorzystanie przez zmutowany enzym 2-izopropylalaniny (2IPA) jako substratu, podczas gdy dziki typ enzymu nie był w stanie degradować tego związku [1]. Zwiększenie specyficzności substratowej enzymu zmniejszyło jednak jego aktywność względem aniliny i 2,4-dimetyloalaniny (2,4DMA) odpowiednio o 8,4- i 28 razy w porównaniu z dziką formą enzymu. Przeprowadzając jedną rundę SSSM i epPCR genu mutantą V205A A n g i wsp. [2] dodatkowo zwiększyli aktywność dioksygenazy anilinowej względem aniliny, 2,4DMA i 2IPA oraz poszerzyli jej specyficzność substratową w stosunku do 2-sekbutyloaniliny. W sekwencji uzyskanego mutantą 3-R21 zlokalizowano trzy mutacje: V205A, I248L i S404C.

W a n g i wsp. [22] podjęli próby zmiany optimum pH z kwasowego na neutralne endoglukanazy III z *Trichoderma reesei*. Otrzymany w wyniku epPCR mutant N321T z substytucją nukleotydów powodującą zamianę asparaginy na treoninę wykazywał optymalną aktywność przy pH 5,4. Po przeprowadzeniu „mutagenезy



Rys. 2. Etapy uzyskiwania zrekombinowanych genów metodą tasowania DNA, RACHITT i StEP. Opis w tekście

wysycenia” otrzymano dwa mutanty. Mutant N321D charakteryzował się optimum pH 4,0, natomiast mutant N321H wykazywał maksymalną aktywność w pH 5,5, jednak utrzymywał 84% aktywności w pH 6,0.

3. Udoskonalanie enzymów metodami rekombinacyjnymi

Rekombinacyjne metody ukierunkowanej ewolucji wprowadzające zmiany w obrębie genu polegają na rekombinacji homologicznych genów [19]. Metody te obejmują między innymi tasowanie DNA, w którym gen kodujący docelowe białko poddaje się mutagenizie, na przykład metodą epPCR, a otrzymany zestaw homologicznych genów zawierających różne mutacje punktowe trawi się za pomocą DNazy I. Uzyskane fragmenty genów o dużej homologii pełnią rolę starte-

rów dla reakcji PCR, w wyniku czego uzyskuje się gen o pełnej długości. Ze względu na homologię uzyskanych fragmentów, podczas reakcji ich składania może dochodzić do rekombinacji między nimi. Ponieważ liczba tak zrekonstruowanych sekwencji jest niewielka, w drugim etapie tasowania DNA przeprowadza się reakcję PCR z użyciem starterów specyficznych dla rekombinowanego genu, co pozwala na zwiększenie ilości złożonych sekwencji (Rys. 2) [7, 11, 19]. Stosowanie tej metody jest wydajne tylko dla regionów o wysokiej homologii sekwencji, gdyż geny o niskiej homologii dają niewielką liczbę zrekombinowanych wariantów [11].

C a n a d a i wsp. [5] zastosowali tasowanie DNA w celu zwiększenia specyficzności substratowej *orto*-monooksygenazy toluenowej (TOM) względem chlorowanych związków alifatycznych i naftalenu. Monooksygenaza ta, wyizolowana z *Burkholderia cepacia* G4 składa się z trzech komponentów białkowych, na które

składają się hydroksylaza, oksydoredukraza oraz białko przenoszące elektrony pomiędzy hydroksylazą i oksydoreduktazą. Enzym ten katalizuje utlenianie toluenu, trichloroetyleny (TCE) oraz chlorku winylu, jak również utlenianie naftalenu do naftolu, ważnego intermediatu w syntezie herbicydów, insektycydów, leków oraz barwników. Monooksygenaza TOM wykorzystywana jest również często w bioremediacji ze względu na zdolność do utleniania trichloroetyleny, który jest najczęstszym związkami zanieczyszczającym wody gruntowe. Otrzymany mutant TOM-green, wykazywał dwukrotnie wyższą aktywność względem trichloroetyleny (TCE) w porównaniu z dzikim typem enzymu. Hydroksylacja 0,1 mM naftalenu z udziałem zmutowanego enzymu następowała 6-krotnie szybciej niż z udziałem formy dzikiej. Ponadto enzym ten wykazywał aktywność dla wyższych stężeń substratu.

Zastosowanie ukierunkowanej ewolucji obejmującej epPCR, a następnie trzy rundy tasowania DNA, przeprowadzone przez Fang i wsp. [9] umożliwiły poprawę aktywności alkalicznej lipazy pochodzącej z *Proteus vulgaris* (PVL). Uzyskany mutant, u którego stwierdzono trzy substytucje aminokwasowe (V102I, G197S i ZR229H) wykazywał aktywność 5,8-razy wyższą w porównaniu z aktywnością białka dzikiego typu. Badając strukturę przestrzenną zmutowanej formy enzymu wykazano, że za wzrost aktywności odpowiada zmiana aminokwasu w pozycji 102.

Synteza rekombinowanego genu poprzez losowe przyłączanie starterów do matrycy DNA (Random Priming Recombination; RPR) jest metodą opartą na reakcji PCR. W metodzie tej w wyniku losowego przyłączania startera do matrycy uzyskuje się mieszaninę krótkich fragmentów DNA, które ze względu na występowanie sekwencji homologicznych, rekombinują tworząc gen o pełnej długości [19, 23]. RPR zastosowano w celu zwiększenia specyficzności substratowej dioksygenazy bifenylowej szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. W wyniku dwóch rund rekombinacji wyselekcjonowano mutant o aktywności względem nie tylko bifenyli, ale także ich chlorowych pochodnych, dibenzofuranu, dibenzo-*para*-dioksyn, dibenzotiofenu oraz fluorenu. Wykazano, że za zmiany w specyficzności substratowej enzymu odpowiadała substytucja aminokwasu w pozycji 376 [20].

Synteza chimerycznego genu na tymczasowej matrycy DNA (Random Chimeragenesis on Transient Templates; RACHITT) pozwala na uzyskanie rekombinowanego genu w wyniku losowej hybrydyzacji jednoniciowych fragmentów homologicznych genów z matrycą DNA. Matrycą jest zmodyfikowana nić DNA, niosąca gen homologiczny pochodzący z innego gatunku, zawierająca uracyl. Pierwszy etap rekombinacji obejmuje fragmentację pojedynczej nici DNA z udziałem DNazy I. Następnie uzyskane jednoniciowe fragmenty DNA hybrydują z komplementarną matrycą

nić DNA. Nakładające się na siebie odcinki DNA są usuwane, a powstałe luki uzupełniane przez polimerazę DNA. W kolejnym etapie matrycowy DNA ulega degradacji. Zrekombinowana nić zostaje zamplifikowana w reakcji PCR, co prowadzi ostatecznie do uzyskania genu o pełnej długości [19]. Etapy uzyskiwania rekombinowanego genu metodą RACHITT przedstawiono na rysunku 2. Cocco i wsp. [19] zastosowali opisaną metodę w celu zwiększenia powinowactwa substratu do enzymu i poszerzenia specyficzności substratowej monooksygenazy dibenzotiofenowej, kluczowego enzymu w biodesulfurylacji paliw. W wyniku procesu rekombinacji dwóch homologicznych genów *dszC* uzyskano 175 chimer mających aktywność monooksygenazy dibenzotiofenowej, z których niektóre charakteryzowały się szerszą specyficznością substratową i większym powinowactwem do substratu (do 320%).

W przeciwieństwie do RACHITT, metoda rekombinacyjnego wydłużania DNA na skróconych matrycach (Recombined Extension on Truncated Templates; RETT) pozwala na uzyskanie fragmentów DNA bez udziału DNazy I. W metodzie tej stosuje się endonukleazę I, która rozpoznaje i trawi DNA w miejscach przylegających do nukleotydów pirymidynowych. Pozwala to na większą różnorodność uzyskanych fragmentów. W metodzie RETT matrycą dla rekombinowanego genu są jednoniciowe, syntetyzowane w jednym kierunku fragmenty DNA, uzyskane w wyniku przeprowadzonej *in vitro* reakcji odwrotnej transkrypcji. Dzięki mutacjom wprowadzonym przez odwrotną transkryptazę podczas syntezy tych ssDNA uzyskuje się większą różnorodność genetyczną fragmentów. Po zsyntetyzowaniu przez odwrotną transkryptazę puli jednoniciowych fragmentów DNA, miesza się je z primerami rozpoznającymi fragmenty zawierające koniec 3' docelowego genu i przeprowadza pierwszą rundę reakcji PCR. Wydłużany ze specyficznego primera fragment DNA, w kolejnej reakcji PCR, przyłącza się do kolejnego ssDNA na zasadzie komplementarności, co prowadzi do dalszego wydłużania nici. Reakcje te powtarzane są aż do uzyskania pełnej długości nici kodującej gen docelowy [14].

Lee i wsp. [14] wykorzystali metodę RETT w celu poprawienia termostabilności chitynazy. W badaniach poddali oni rekombinacji dwa homologiczne geny kodujące ten enzym w komórkach szczepów *Serratia marcescens* ATCC21074 i *S. liquefaciens* GM1403. W wyniku reakcji uzyskano chimeryczny gen o ponad 70% homologii z genami macierzystymi. Chimeryczna chitynaza odznaczała się 4-krotnie dłuższym czasem półrozdpadu w temperaturze 60°C niż obie formy rodzicielskie.

Kolejną rekombinacyjną metodą umożliwiającą wprowadzenie zmian w obrębie danego genu jest proces naprzemiennego wydłużania DNA (Staggered Extension Process; StEP). Pozwala ona na utworzenie biblioteki chimerycznych genów, w których jeden gen powstaje w wyniku rekombinacji kilku innych genów. W wyniku

naprzemiennie powtarzających się cykli denaturacji matrycy DNA i wydłużania fragmentów DNA powstają zrekombinowane geny. Rosnące fragmenty DNA przyłączają się do innej matrycy w każdym kolejnym cyklu reakcji (Rys. 2) [11, 19].

Metoda tasowania genów z użyciem zdegenerowanych oligonukleotydów (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling; DOGS) umożliwia tasowanie genów różniących się między sobą sekwencją nukleotydową, w tym zawartością par G-C. W pierwszym etapie sekwencje homologicznych genów porównuje się w celu identyfikacji konserwatywnych fragmentów. Następnie geny dzieli się na segmenty i dla każdego segmentu projektuje zdegenerowane primery. Każdy segment zostaje zamplifikowany z udziałem mieszaniny zdegenerowanych primerów, a uzyskane fragmenty DNA są rozdzielane i izolowane z żelu. W celu uzyskania odpowiedniego poziomu rekombinacji badanego genu, uzyskane fragmenty miesza się w ściśle określonych proporcjach i używa jako matrycy w reakcji PCR z dodatkiem wspólnych primerów powodujących wydłużenie segmentów, tak aby zachodziły na siebie. Otrzymane produkty stanowią matrycę w kolejnych cyklach reakcji PCR, w których powstaje gen o pełnej długości. Gen oflankowany jest sekwencjami rozpoznawanymi przez wybrane enzymy restrykcyjne. Amplifikacja zrekombinowanego genu z udziałem primerów z wbudowanymi sekwencjami dla enzymów restrykcyjnych pozwala na wklonowanie uzyskanych rekombinantów do wektora, ich ekspresję i screening w kierunku posiadanej cechy [10].

4. Podsumowanie

Stosowanie enzymów w procesach przemysłowych jest ważnym aspektem nowoczesnej biotechnologii ze względu na korzystne właściwości biokatalizatorów. Najważniejsze z nich to wysoka selektywność i specyficzność umożliwiające syntezę różnych związków, w tym pojedynczych enancjomerów. Kolejnym aspektem przemawiającym za stosowaniem enzymów są łagodne warunki procesu, które nie mają negatywnego wpływu na środowisko. Jednak dostępność odpowiednich enzymów do konkretnych procesów przemysłowych jest ograniczona, dodatkowo warunki ich prowadzenia często są skrajne, w których enzymy tracą stabilność i aktywność. Ukierunkowana ewolucja jest kluczową metodą pozwalającą na tworzenie enzymów o ulepszonych właściwościach lub zupełnie nowych, mających duże znaczenie dla przemysłu.

Piśmiennictwo

1. Ang E.L., Obbard J.P., Zhao H.M.: Probing the molecular determinants of aniline dioxygenase substrate specificity by saturation mutagenesis. *FEBS J.* **274**, 928–939 (2007)

2. Ang L.E., Obbard P.J., Zhao H.: Directed evolution of aniline dioxygenase for enhanced bioremediation of aromatic amines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 1063–1070 (2009)
3. Arnold F.H., Georgious G.: Directed evolution library creations: methods and protocols. Humana Press Inc, New Jersey, 2003
4. Bornscheuer T.U., Pohl M.: Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 137–143 (2001)
5. Canada K.A., Iwashita S., Shim H., Wood T.K.: Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.* **184**, 344 (2002)
6. Dalby A.P.: Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 500–505 (2003)
7. Dalby P.A.: Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Pat. Biotechnol.* **1**, 1–9 (2007)
8. Dalby A.P.: Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 473–480 (2011)
9. Fang Y., Lu Y., Lv F., Bie X., Zhao H., Wang Y., Lu Z.: Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. *Enzyme Microb. Technol.* **44**, 84–88 (2009)
10. Gibbs M.D., Nevalainen K.M., Bergquist P.L.: Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene*, **271**, 13–20 (2001)
11. Jeager K.E., Eggert T., Reetz M.T.: Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519–530 (2001)
12. Kalinowska H., Buchowiecka A., Bielecki S.: Biokataliza. *Kosmos*, **56**, 327–334 (2007)
13. Khurana J., Singh R., Kaur J.: Engineering of *Bacillus* lipase by directed evolution for enhanced thermal stability: effect of isoleucine to threonine mutation at protein surface. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 2919–2926 (2011)
14. Lee S.H., Ryu J.K., Kang M.J., Wang E.S., Piao Z., Choi Y.J., Jung K.H., Jeon J.Y.J., Shin Y.C.: A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **26**, 119–129 (2003)
15. Liu H.Y., Ye M., Lu Y., Zhang X., Li G.: Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 667–675 (2011)
16. Morley K.L., Kazlauskas R.J.: Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **23**, 231–237 (2005)
17. Nakazawa H., Okada K., Onodera T., Ogasawara W., Okada H., Morikawa M.: Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 649–657 (2009)
18. Otten L.G., Quax W.J.: Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* **22**, 1–9 (2005)
19. Sen S., Venkata Dasu V., Mandal B.: Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **143**, 212–223 (2007)
20. Suenaga H., Goto M., Furukawa K.: Emergence of multifunctional oxygenase activities by random priming recombination. *J. Biol. Chem.* **276**, 22500–22506 (2001)
21. Tao H., Cornish V.W.: Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 858–864 (2002)
22. Wang T., Liu X., Yu Q., Zhang X., Qu Y., Gao P., Wang T.: Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomol. Eng.* **22**, 89–94 (2005)
23. Zhang H., Kong X., Zhang J.: New strategies of protein engineering – directed evolution of enzyme *in vitro*. *Chin. Sci. Bull.* **44**, 1641–1648 (1990)