

التطور الموجه للمحفزات الحيوية الصناعية

DIRECTED EVOLUTION OF INDUSTRIAL BIOCATALYSTS

مارلين شميدت، دومينيك بوتشر، أوفي بورنشويار

Marlen Schmidt, Dominique Böttcher, and Uwe T. Bornscheuer

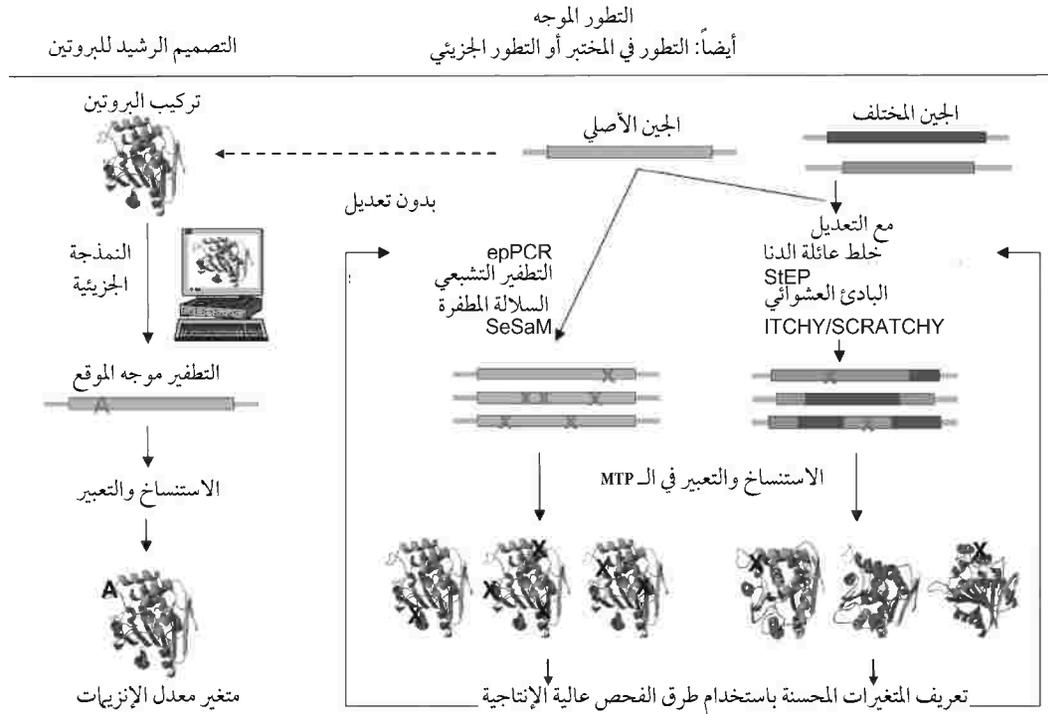
Introduction المقدمة (٤, ١)

تستخدم المحفزات الحيوية على نطاق واسع في الإنتاج الصناعي للمواد الكيميائية الضخمة والدوائية وقد تم تطبيق أكثر من ٣٠٠ عملية في الصناعة [١-٤]. وحتى الآن، فإن معظم تطبيقات الإنزيمات تشمل استخدام الهيدروليزات. ومع ذلك، فمن المتوقع أن يتغير ذلك في المستقبل القريب، حيث أصبحت المحفزات الحيوية من فئات الإنزيمات الأخرى (على سبيل المثال، الليبازات، والأوكسيدوريداكتيزات) موضع البحث المكثف في العقد الماضي وقد تم القيام بالكثير من الاكتشافات الكبرى بالفعل.

بغض النظر عن نظام التفاعل والإنزيم اللذان يتم بحثهما لعملية تحفيز حيوية معينة، فإن الإنزيمات في كثير من الأحيان لا تلبى متطلبات التطبيقات على المستوى الكبير كما أنه يجب تحسين خصائصها. ويشمل هذا عادةً الانتقائية الكيميائية، والتجسيمية، وخاصةً الفراغية للمحفز الحيوي، وأيضاً الجوانب المتصلة بالعملية مثل الثبات طويل المدى عند درجات حرارة معينة أو درجة أس هيدروجيني والنشاط في وجود تركيزات كبيرة من وسط التفاعل التي تحتاج إلى تحسينها لتحقيق أعلى إنتاجية.

بالإضافة إلى الإستراتيجيات الكلاسيكية مثل التقييد، والإضافات، أو هندسة العمليات، فإن تقنيات البيولوجيا الجزيئية تعد الآن أهم المنهجيات المستخدمة لتصميم الإنزيمات بطريقة تفصيلية للعمليات المعينة. وتستخدم إستراتيجيتين مختلفتين (ولكن عادةً مكملتين): تصميم البروتين الرشيد، والتطور (الجزيئي) الموجه. ويتم توضيح المخطط العام لهذه المناهج في الشكل رقم (٤, ١). ويركز هذا الفصل على الإنجازات الكبرى التي تمت في العقد الماضي في مجال التطور الموجه، ولكن أيضاً يتم ذكر تصميم البروتين الرشيد. وتشمل الأمثلة المغطاة

العمليات الصناعية وكذلك المساهمات المهمة من البحوث الأكاديمية التي تتعامل مع المحفزات الحيوية ذات الصلة. وكما يمكن أن نتوقع فإنه لم يتم نشر جميع تحسينات المحفزات الحيوية التي تمت في الصناعة، فمن المتوقع أن توجد عدة عمليات أخرى تستخدم الإنزيمات المحسنة بواسطة أساليب التطور الموجه.



الشكل رقم (١، ٤). مقارنة تخطيطية لتصميم البروتين الرشيد والتطور الموجه. يبدأ التصميم الرشيد من تركيب البروتين (أو نموذج التمثال)، والذي يتم عن طريقه تعريف مجموعات الأحماض الأمينية المهمة. ويتم إدخال هذه المجموعات على مستوى الجين ويتم إنتاج الطفرة الناتجة والتحقق من الخصائص المطلوبة. يبدأ التطور الموجه من جين أو عدة جينات (مماثلة)، والتي تخضع لمجموعة من أساليب الطفرات العشوائية. ومن مكتبات الطفرات الناتجة أو الـ Chimeras يتم تعريف المتغيرات المطلوبة، بعد الإنتاج على مستوى أطباق التركيز الدقيق، بواسطة الفحص أو الاختيار. راجع المتن للاختصارات.

(٤، ٢) إستراتيجيات تصميم البروتين Strategies for Protein Design

(٤، ٢، ١) التصميم الرشيد للبروتين Rational Protein Design

إن فهمنا المتزايد لكيفية هندسة خصائص الإنزيمات يجعل التصميم الرشيد للبروتين أكثر كفاءة بشكلٍ مطرد (الشكل رقم ١، ٤). ومع ذلك، لا تزال العقبات الرئيسة لتصميم البروتين الرشيد هي الحاجة لتوافر تركيب البروتين (أو على الأقل نموذج تماثل جيد بدرجة كافية) والفهم الدقيق لآلية التحفيز. ومن التركيب، فإنه

يمكن تعريف بعض الأحماض الأمينية (النقاط الساخنة) والتي يعتقد أنها تشارك في الخصائص المطلوبة بواسطة تقنيات النمذجة الجزيئية. ويمكن عند ذلك تنفيذ الطفرات موجهة الموقع (SDM) في هذه المواضع باستخدام، على سبيل المثال طريقة الطفرة موجهة الموقع QuikChange™ من شركة ستراتاجين. وقد كان التصميم الرشيد للبروتين ناجحاً بصفة خاصة حيث تم تناول خصائص مثل تغيير النشاط أو انتقائية المتشابهات، ويمكن العثور على أمثلة عديدة في المراجع [٥].

(٢, ٢, ٤) التطور الموجه Directed Evolution

التطور الموجه (أيضاً يسمى التطور في المختبر أو التطور الجزيئي) هو تقنية لتغيير البروتين واختيار الفرد الأنسب. وظهرت هذه التقنية خلال عقدٍ من الزمان بوصفها أداة قوية للغاية وواسعة النطاق لتحسين المحفزات الحيوية. وبشكلٍ عام، تشمل إستراتيجية التطور الموجه التطوير العشوائي متبوعاً بفحص عالي الإنتاجية (HTS) و/أو خطوة اختيار (الشكل رقم ١, ٤).

تبدأ العملية مع اختيار الإنزيم المعروف، والذي يجب توافره في صورة معدلة وله نظام تعبير مناسب في متناول اليد، ثم تعريف الخاصية التي تحتاج إلى تحسين. ويتم إعداد مكتبة كبيرة من الطفرات، غير منحازة قدر الإمكان، من خلال التطوير العشوائي للجينات المرمزة للبروتين، وفقاً للتقنيات المفصلة لاحقاً. بعد الاستنساخ والتعبير، يتم إنشاء مجموعة ضخمة من متغيرات الإنزيم، عادةً في حدود ١٠-١٠٠ متغير. وفي النهاية تتعرض هذه المكتبة إلى تعريف الطفرات ذات الخاصية المتطورة المطلوبة باستخدام أساليب الفحص أو الاختيار. ولاحقاً يمكن أن تستخدم أفضل طفرة ناجحة بصفقتها نقطة انطلاق محسنة للجولات الإضافية من التطوير من أجل تراكم الطفرات المفيدة. وفي كثيرٍ من الأحيان يمكن أن تستخدم المعلومات المستمدة من تحليل الطفرات كأساس لمناهج التصميم الرشيد للبروتين.

في الأجزاء التالية، سوف يتم تقديم أهم أساليب التطوير ونظم الفحص عالي الإنتاجية، متبوعاً بأمثلة على التطبيق الناجح لتجارب التطور الموجه في إنتاج المحفزات الحيوية المحسنة.

(١, ٢, ٢, ٤) طرق التطوير Mutagenesis Methods

يمكن اتباع إستراتيجيتين مختلفتين لإنشاء مكتبات الطفرات: (١) التطور اللاجنسي (غير المعدل)، وفيه يخضع الجين الأصلي للتطوير العشوائي لإنتاج متغيرات ذات طفرات نقطية، و(٢) التطور الجنسي (المعدل)، وفيه يتم تجزئة عدة جينات أصلية بشكلٍ عشوائي ثم يعاد تعديلها لإنتاج مجموعة من مكتبات الطفرات (Chimeras).

في السنوات الـ ١٥ الماضية، تم تطوير عدد كبير من الطرق وسيتم وصف بعضها بإيجاز في الفقرات التالية. ويتوفر الكثير من المراجع والكتب للاستعراض الأعمق والأكثر تفصيلاً [٦-١٠].

الطريقة اللاجنسية الأكثر استخداماً هي تفاعل تسلسل البلمرة عرضي الخطأ (epPCR). وهنا تستخدم ظروف تفاعل غير مثالية لإنشاء مكتبة طفرات [١١، ١٢]. على سبيل المثال، يمكن لزيادة المغنيسيوم +٢، وإضافة المنغنيز +٢، واستخدام تركيزات الـ dNTP غير المتوازنة، أن تزيد من معدل خطأ الـ Taq، إنزيم البلمرة من الثيرموس أكواتيكوس الذي يستخدم عادةً، من ٠,٠٠١٪ إلى ٠,١٪. ومع ذلك، فلا يمكن إنشاء طيف طفرات متجانس (مكتبة غير منحازة) باستخدام إنزيم بلمرة دنا الـ Taq مع المنغنيز +٢ والنيوكليوتيدات غير المتوازنة؛ لأن "إنزيم البلمرة أو تحيز الخطأ" سوف يؤدي إلى وجود اتجاه لتبادل الديسوكسي نيوكليوتيدات A أو T أفضل من G أو C. وحالياً تتواجد إنزيمات بلمرة الدنا محسنة تظهر طيف طفرات أكثر تجانساً تجارياً، على سبيل المثال Mutazyme™ I و II من شركة ستراتاجين مع معدل خطأ عالٍ، وكذلك Taq-Pol I614K [١٣] أو Pfu-Pol D473G (exo-) [١٤]. وقد تم حل المشكلة الأخرى والناجمة من التحام منتج طفرة الـ epPCR إلى ناقل الاستنساخ أو التعبير جزئياً عن طريق تقنية "الجالب" التي طورها بيشيت وزملاؤه [١٥]. ويمكن اعتبار هذه الطريقة كتعديل لطريقة QuikChange™ لشركة ستراتاجين؛ لأنها تستند على تضخيم البلازميد كله تحت ظروف التطفير. وفي تقنية الـ MEGAWHOP المرتبطة، والتي يستخدم فيها الجين المطفّر كبادئ فعال في تفاعل تسلسل البلمرة الثاني؛ لم تعد هناك حاجة للهضم الحصري والالتحام [١٦، ١٧]. ومؤخراً، تم دمج epPCR مع تضخيم الدائرة المتداولة (RCA) [١٨]، والذي يستخدم إنزيم بلمرة من فيروس البكتيريا ϕ في تضخيم متساوي الحرارة [١٩].

والمشكلة الأخرى الكبيرة في epPCR هي ما يسمى بـ "تحيز الشفرة" الناجم من شفرة التحلل الوراثية، والذي يعني أن تغيير حمض أميني معين سوف يكون أقل شيوعاً بكثير من غيره. على سبيل المثال، تؤدي طفرة واحدة في شفرة الفالين فقط إلى ستة بدائل أحماض أمينية بديلة. وهكذا، فإن ترميز جميع الأحماض الأمينية العشرين المشفرة للبروتين يتطلب تبادل الثلاث شفرات المجاورة، وهو حدث غير مرجح للغاية عند تعريض جين كامل مرمز للبروتين (أي ١٠٠٠ زوج قاعدة) إلى الـ epPCR بمعدل خطأ ٠,١٪ [٨].

ويشمل البديل الأسهل لخلق الطفرات العشوائية استخدام السلالات المطفرة. تكون السلالات مثل إيبيكوريان القولون XL1-Red ناقصة في ثلاثة من مسارات إصلاح الدنا الابتدائية (mutD) (التدخل في نشاط إنزيم ٥'٣-إكسونيوكلينيز)، (mutS) (الإصلاح غير المتطابق)، و (mutT) (عدم تحليل الـ 8-oxodGTP) وتظهر معدل طفرات أكثر بـ ٥٠٠٠ مرة من سلالة العائل الأصلية. من الناحية الأولى، يتم مع هذا النهج تجنب خطوة الالتحام، ولكن من الناحية الأخرى، فإنه ليس هناك سيطرة على موقع الطفرة، والتي يمكن أن تؤثر في البادئ الموجود في

البلازميد، وعدد نسخه، وخصائص الناقل الأخرى. وهناك عدة مراجع تصف خلق الطفرات باستخدام هذه التقنية [٢٠-٢٣].

عند البدء من متغيرات الجينات المختارة مسبقاً ذات التماثل الكافي، فإنه يتم تفضيل طرق التعديل الجيني؛ لأنها قد تجمع بين أفضل سمات كل من المانحين الأصليين. وقد تم تطوير المثال الأول بواسطة ستيمنر وزملاؤه [٢٤] وسمي بخلط الدنا أو الجينات. وهو يتضمن خطوة تحليل تعتمد على إنزيم محلل للدنا والتعديل اللاحق للأجزاء بدون أي بادئ (تفاعل تسلسل بلمرة ذاتي البدء)، متبوعاً بتفاعل تسلسل بلمرة نهائي مع بادئ. وقد تم صقل هذه الطريقة في العقد الماضي، وتسمى أيضاً بخلط عائلة الدنا أو التهذيب الجزئي. وأحد الطرق البديلة هو عملية التوسيع التعاقبي (STEP) التي طورها تشاو وزملاؤه [٢٥]. وهي تتكون من تضخيم الأجزاء القصيرة للجينات الأصلية، بحيث إنه في الدورات اللاحقة، يمكن أن يتم تهجين الأجزاء الصغيرة الناتجة على أي من الجينات الأصلية. وعليه، يمكن تجنب التحيز الناتج من الهضم باستخدام الإنزيم الهاضم I للدنا. وقد تم تطوير المزيد من تحسين منهج الخلط الكلاسيكي بواسطة كوكو وزملاؤه، الذين ابتكروا طريقة بديلة لخلط الدنا تدعي تكوين الطفرات الناتجة عشوائياً في قوالب وقتية (RACHITT) اعتماداً على الترتيب، والتهذيب، وضم أجزاء الجين الأصلي أحادي الخيط المفصولة عشوائياً المهجنة في قالب وقتي أحادي الخيط كامل الطول. وقد أظهرت هذه الطريقة معدلات تعديل عالية و ١٠٠٪ مركبات طفرات [٢٦]. ومن الواضح أن تشابه تسلسل الجينات الأصلية يكون شرطاً ضرورياً مقيداً لتطبيق تقنيات التعديل. ومع ذلك، فقد تم إدخال منهجيات لتعديل عدة تسلسلات أصلية دون الحاجة إلى تسلسل تماثل عالي، والذي يكون ضرورياً لتعديل الجينات ذات التركيب المعقد ولكن مع تناظر التسلسل المنخفض، مثل مونوأوكسيجينز P450 على سبيل المثال. وقد تم تطوير طريقة التماثل المستقلة الأولى بواسطة أوستماير وزملاؤه [٢٧، ٢٨]. وتعتمد طريقة الـ ITCHY (الاقطاع التدريجي لإنشاء الإنزيمات المهجنة) على التحام أجزاء مختلفة الحجم من اثنين من الجينات، والتي تم إنتاجها بواسطة إنزيم إكسونيكوليز III وإنزيم الهضم نيوكليز S1. والعيب الرئيس هو أنه توجد نقطة تعديل واحدة فقط. ومرةً أخرى فقد تم تحسين الطريقة وتم تطوير عدة طرق مستنتجة منها، على سبيل المثال الـ thio-ITCHY [٢٨، ٢٩]، وطريقة إعادة تجميع الجينات [٣٠]، والتعديل العشوائي غير التماثلي (NRR) [٣١، ٣٢]، وتعديل البروتين غير المعتمد على تماثل التسلسل (SHIPREC) [٣٣].

وقد تم تطوير إستراتيجية مختلفة تماماً لتطوير الإنزيمات دون إدخال الطفرات، وهي التطوير الأولي المستدير (CP) الذي اقترح من قبل لوتز وزملاؤه [٣٤]. وقد ربطوا نهايات النيتروجين والكربون للجين الأصلي الذي يرمز لإنزيم الليبيز ب من الكانديدا أنتاركتيكا، ومن ثم تخطيطه بواسطة الهضم العشوائي لإنتاج متغيرات تحمل نهايات نيتروجين وكربون بديلة. ومن المدهش، أن هذا لم يؤد فقط إلى إنزيم ليبيز نشط، ولكن أظهرت بعض المتغيرات

أيضاً كفاءة تحفيزية أعلى من السلالة الأصلية (حتى ١١ ضعف ضد البار-نيتروفيبول بيوتيرات، و١٧٥ ضعفاً ضد ٨،٦-داي فلورو-٤-ميثيل أمبيلديريل أوكتانوات، في حين ظلت قيم الـ K_m ثابتة تقريباً). وقد أوضحت التجارب الحركية لأنشط المتغيرات (cp283) أن التطوير الأولي المستدير لهذا الإنزيم لا تقوم بمعالجة انتقائية المشاهات عند تحليل بعض الكحولات الثانوية الفراغية [٣٥].

وكما تم توضيحه سابقاً، فإنه تتوافر مجموعة واسعة من التقنيات لتطهير الجينات عشوائياً. ومن أجل التنبؤ ومقارنة نوعية مكتبة الطفرات، فقد تم تطوير عدة أدوات برمجيات لتسهيل تجارب تخطيط التطور الموجه. وغالباً ما تستخدم النسبة بين التحولات وتغيير الموقع في تقييم المكتبة، وقد أظهر وونج وزملاؤه باستخدام برنامج مساعد للتطهير (MAP) (والمتاح في الموقع <http://map.iu-bremen.de>)، أن هذا غالباً ما يفشل كتقدير [٣٦]. وقد اقترح المؤلفون بدلاً من ذلك مؤشر تركيب البروتين، ومؤشر الحمض الأميني (يستكمل بمعامل تنوع الشفرات)، ومؤشر التنوع الكيميائي بوصفها مؤشرات أفضل لمقارنات المكتبات.

وكما تم استعراضه مؤخراً [٣٧، ٣٨]، فقد تم ذكر عدة أدوات حاسوبية لمحاكاة عمليات التطهير ولبحث النتائج التجريبية المنشورة. والـ PEDEL (برنامج لتقدير التنوع في مكتبات الـ epPCR) والـ LDP (برنامج تنوع المكتبات) هما من أمثلة النماذج الحاسوبية المستخدمة لمحاكاة طرق التطهير العشوائية، وخاصةً الـ epPCR [٣٨]. وهناك برنامج آخر مفيد وهو الـ GLUE (برنامج للمكتبات التي تضم عينات عشوائية أو متغيرات محتملة بنفس الدرجة)، والذي تم تطويره لتقدير عدد المتغيرات التي تحتويها المكتبة وكيفية إيجاد مكتبة كبيرة من أجل أخذ عينات من جميع المتغيرات [٣٩]. وتتوافر برامج الـ GLUE وكذلك الـ PEDEL والـ DRIVeR في الموقع <http://guinevere.otago.ac.nz/stats.html> [٣٩، ٤٠]. وقد قام موري وماراناس بنمذجة طريقة الخلط وعليه قاموا بتطوير برامج الـ eShuffle والـ eSCRATCHY [٤١-٤٤] (<http://maranas.che.psu.edu/software.html>)، وكذلك طريقة الـ SIRCH لتوصيف اندماج المجموعات الطرفية الكامل المتفق مع تركيب بروتين معين [٤٥]. وقد طور وونج وزملاؤه دليل (مخطط إستراتيجية التطهير العشوائي (RaMuS) الذي ينبغي أن يساعد الباحثين، وخاصةً المبتدئين في مجال التطور الموجه، لاختيار طريقة تطهير عشوائية مناسبة معدلة حسب احتياجاتهم ومهاراتهم [١٠].

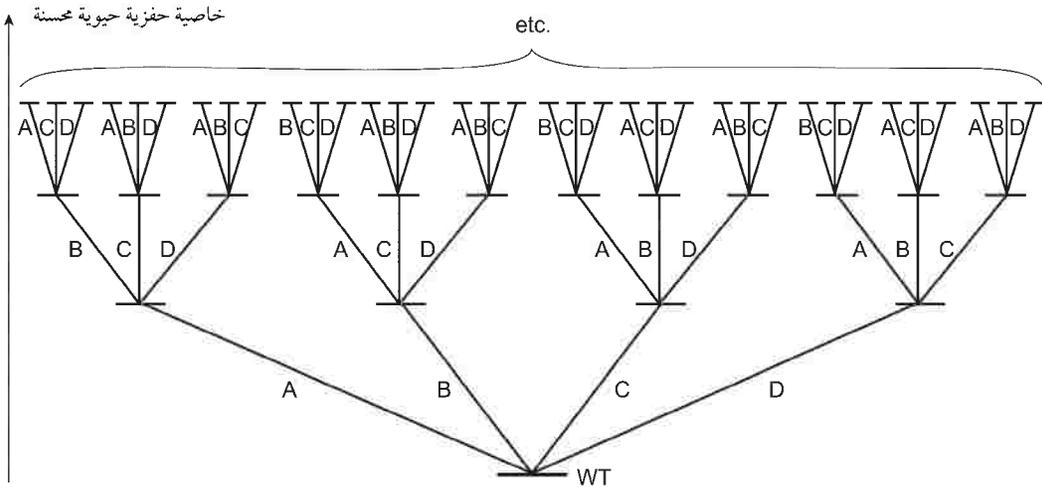
(٣، ٢، ٤) التطور موجه المركز Focused Directed Evolution

كثيراً ما تم نقاش مسألة ما إذا كان التصميم الرشيد أو التطور الموجه هو الإستراتيجية الأفضل ولم يمكن استخلاص أي استنتاج بسيط. في الواقع، تتم إعاقة التصميم الرشيد بواسطة تعقيد البروتينات وتحديد معرفتنا الضئيلة لارتباط التسلسل والوظيفة. أيضاً، فإنه في كثيرٍ من الأحيان لا يوفر النتيجة المطلوبة ويعطي في بعض

الأحيان متغيرات مدهشة جداً، والتي يمكن أن تكون بعيدة جداً عن الخاصية المطلوبة. على سبيل المثال، من الصعب التنبؤ بالثبات الحراري بالطريقة الرشيدة، وعليه يكون التطور الموجه هو الخيار الأفضل [٤٦].

في الآونة الأخيرة، تم اقتراح تركيبات من التطور الموجه والتصميم الرشيد، والتي سميت بالتصميم شبه الرشيد أو التطور الرشيد، على الرغم من أننا نفضل المصطلح التطور الموجه المركز. وقد تم ذكر التطبيق الناجح للتطير الشعبوي التكراري (ISM) بواسطة ريتز وزملاؤه. ويؤدي هذا إلى زيادة الثبات الحراري لإنزيم الليبيز (من النوع B-FIT) [٤٧، ٤٨]، وزيادة انتقائية المتشابهات، وتوسع القبول لأوساط التفاعل، مثل إنزيم الإيبوكسيد هيدروليز (من النوع CASTing) [٤٧-٤٩]. في طريقة ال-ISM يتم تحليل تركيب البروتين (أو نموذج التماثل) أولاً لتحديد مواضع جميع الأحماض الأمينية التي تسهم في خاصية معينة. بعد ذلك، يتم تعريض جميع المواقع (بشكل منفصل) للتطير الشعبوي، متبوعاً بفحص المكتبات للخاصية موضع الاهتمام. ثم يتم استخدام أفضل نتيجة من كل مكتبة كقالب للجولات الأخرى من التطير الشعبوي، وتستمر هذه الإستراتيجية بطريقة تكرارية حتى إيجاد المحفز الحيوي المطلوب (الشكل رقم ٢، ٤).

ويتبع ال-CASTing (اختبار تشعب الموضوع النشط الاندماجي) كنوع من التطير الشعبوي التكراري هذه الإستراتيجية لتحديد النقاط الساخنة، وخاصةً بالنسبة للخصائص مثل انتقائية المتشابهات أو تخصصية وسط التفاعل. وتستخدم هنا المساحة حول الموضوع النشط في دائرة نصف قطرها حوالي ١٠ أنجستروم لتحديد جميع مجموعات الأحماض الأمينية الطرفية التي تتفاعل مع وسط التفاعل. وقد تم تطوير برنامج (CASTER) للتصميم المنهجي والفحص لمكتبات المتغيرات المركزة في جميع أنحاء جيب الارتباط. وهذا البرنامج متوفر على شبكة الإنترنت (http://www.kofo.mpg.de/kofo/institut/arbeitsbereiche/reetz/deutsch/reetz_forschung1.html).



الشكل رقم (٢، ٤). مبدأ التطير الشعبوي التكراري.

وقد استخدم الباحثون في شركة كوديكسيس نهجاً مماثلاً، وخلافاً لبرنامج CASTing، فإن إستراتيجيتهم لا تعتمد على التركيب ثلاثي الأبعاد أو نموذج التماثل، وقد حققوا تحسناً كبيراً في وظيفة التحفيز. والـ ProSAR هو امتداد للـ SAR (علاقة التركيب بالوظيفة)؛ وذلك لتعظيم البروتين الجزئي، وعليه يتم تحليل العلاقة بين تركيب الجزئي المتفاعل (الإنزيم) والخاصية المطلوبة القابلة للقياس ووضعها في معادلة [٥٠]. وقد تم تحليل طفرات المكتبات من طرق التطفير المختلفة عن طريق النشاط والتسلسل، ومن ثم ترتيبها كـ "مفيدة"، و"يحتمل أن تكون مفيدة"، و"محايدة"، أو "مؤذية". ويتم استبعاد طفرات الفئة الأخيرة، وتبقى الطفرات المفيدة وتستخدم كإنزيمات أصلية للجولة التالية من الطفرات. ويتم إعادة اختبار الطفرات الأخرى وقد تستخدم أيضاً كأصول. ويعد تحسين إنزيم الهالوهيدرين ديهالوجينيز، المهم لإنتاج مرادف لعقار الأتورفاستاتين المخفض للكوليسترول، هو مثال ممتاز لفائدة هذه الطريقة (انظر القسم ٣، ٤، ٤).

ومن المحاولات شبه الرشيدة ذات تعديل طرق التطفير يوجد الـ SISDC (التطفير الفراغي موجه الموقع غير المعتمد على التسلسل) [٥١] والـ SCOPE (هندسة البروتين الاندماجية المعتمدة على التركيب) [٥٢] حيث يتم تحديد مواضع عبور اعتماداً على التركيب ثلاثي الأبعاد للبروتينات.

(٣، ٤) نظم الفحص Assay Systems

إن مفتاح نجاح تجربة التطور الموجه هو نظام فحص سريع وموثوق به للغاية. ونظراً لوجود عدد كبير من المتغيرات الممكنة التي تم إنشاؤها بطريقة التطفير العشوائي، فإنه يكون من الصعب تحديد النتائج المطلوبة بعد التعبير الفردي للمتغيرات باستخدام طرق التحليل الكلاسيكية، مثل الفصل الغازي اللوني أو الفصل اللوني السائل ذي الضغط المرتفع. وبناءً على ذلك، فإنه يجب توافر أدوات مناسبة عالية الإنتاجية لتحديد المحفزات الحيوية المطلوبة. ويمكن تقسيم الإستراتيجيات إما إلى أساليب الاختيار وإما إلى الفحص، على النحو المبين بالتفصيل لاحقاً. وكلاً من النهجين لديه مزايا وعيوب، ويجب اتخاذ قرار بشأن الأسلوب الأكثر ملاءمة على أساس كل حالة منفصلة. ويمكن الاطلاع على نظرة عامة واسعة للأدوات التي وصفت مؤخراً في كتاب ريمون [٥٣] وفي عدد من المراجع [٥٤-٥٨].

(١، ٣، ٤) الاختيار Selection

تعتمد الاختيارات الحيوية على تكامل خاصية الأوكسوتروف (عدم القدرة على إنتاج مركب عضوي معين) أو مقاومة العوامل السامة للخلية مثل المضادات الحيوية. وعند تطبيقه، فإن الاختيار يكون أداة قوية جداً

لفحص المكتبات الكبيرة واكتشاف طفرات البروتين. ومع ذلك، يقتصر استخدام اختيار الطرز المظهري على عزل محفزات التفاعلات ذات الصلة الحيوية المباشرة أو التي يمكن ربطها بصورة غير مباشرة لاختيار طرز ظاهري. ويمكن أن تتم هذه الاختيارات في المختبر أو داخل الخلايا وإما في طور صلب أو الأتباتق دقيقة المستوى. وتنشئ تقنيات التطفير مكتبات تتراوح عادةً بين ١٠-١٠٠ فرداً. ومن أجل فحص كمية كبيرة من حيز التسلسل، فإنه يمكن استبعاد الأفراد غير النشطة أو غير المطلوبة للحد من حجم المكتبة.

(١, ٣, ٤) تقنيات الاظهار Display Techniques

إن الاظهار بالفيروس البكتيري (الفاج) هو واحدة من التقنيات الأكثر شيوعاً لاختيار الطفرات الأنسب من مكتبة كبيرة في المختبر. وهي تتكون من استنساخ الجين المطلوب (في هذه الحالة كل فرد في مكتبة الطفرات) في انصهار مع جين يرمز لغطاء بروتيني لجزيئات الفيروس. وعندما يتم تجميع الفاغ، يتم اظهار البروتين الأجنبي على سطحه. ولذلك، يتم تحقيق ارتباط مادي بين الجين ونتاج التعبير عن طريق جسيمات الفاغ. ويتم بعد ذلك أسر الفيروسات البكتيرية بواسطة التفاعل الانجذابي للإنزيم الظاهر مع رابط مقيد. وتعتمد طبيعة هذا الرابط على الإنزيم، على سبيل المثال، يمكن أن يكون إنزيم تاج الانصهار وسط تفاعل، أو وسط تفاعل انتحاري مدججاً مع البيوتين (والذي يتم أسره لاحقاً على كريات الاستربتاتيدين)، أو مشابه لحالة التقييد الانتقالية. ويتم إذابة الفيروسات المختارة، ونسخها، وتضخيمها بواسطة العدوى البسيطة [٥٩].

وقد وضح دانييلسن وزملاؤه اختيار الفيروسات المظهرة للـ Lipolase® (ليباز) مع مشط بيوتينيل مفسفر الذي مكن من إثراء المكتبة بـ ١٨٠ ضعف في دورة واحدة [٦٠].

ويمكن أيضاً اظهار مكتبات البروتين على البكتيريا والخميرة وكذلك على سطح الفيروس البكتيري. وللإظهار البكتيري مزايا معينة على الاظهار الفيروسي واسع الانتشار. أولاً، هناك حاجة لعائل مضيف واحد لنشر المكتبة مقارنةً مع اثنين في الاظهار الفيروسي، الفيروس البكتيري والبكتيريا. ثانياً، يمكن تضخيم المتغيرات المختارة مباشرةً دون نقل المزيد من المادة الوراثية إلى عائل مضيف آخر. ثالثاً، يمكن أن يكون خطر الانجذاب الاصطناعي بسبب آثار الشره أقل وضوحاً. وتم تحقيق الإظهار البكتيري لإنزيم الإستيريز من البوركولديريا جلاديولي بواسطة شولزرايس وزملاؤه باستخدام جين اصطناعي يتكون من جين الإستيريز والمجالات الأساسية ذاتية النقل في إيشيريشيا قولون. وقد تم توجيه نشاط الإستيريز بنجاح إلى جزء الغشاء الخارجي كما تم إثباته بواسطة تقنيات مختلفة [٦١].

وقد تم أيضاً تكييف اظهار سطح الخلية البكتيرية إلى جانب الفحص الخلوي لفحص مكتبات الإنزيمات [٦٢]. في الواقع، فإن هذه التقنية تمثل حالياً النهج العام الوحيد للفحص الكمي للنشاط التحفيزي للإنزيمات على

مستوى الخلية الواحدة وفي مجموعات كبيرة جداً من الطفرات. وعلاوةً على ذلك، يوفر اظهار الإنزيمات على سطح البكتيريا حرية وصول وسائط التفاعل التخليقية إلى الإنزيم.

وقد ثبت أن القدرة على تشكيل ارتباط مادي بين منتج تفاعل مستشع والخلية التي تعبر الإنزيم المقابل على سطحها هي المفتاح للتحديد الكمي للنشاط التحفيزي على مستوى الخلية الواحدة. وحالياً تتوفر عدة طرق لإظهار الإنزيمات على سطح الخلية الميكروبية، وقد تم تطوير معظمها لإيشيريشيا القولون [٦٣].

وأحد الأمثلة هو استخدام الـ EstA، إنزيم استيريز من البوسودوموناس إيروجينوزا مرتبط بالغشاء الخارجي. وتم استخدام متغير EstA غير نشط كحافز ارتباط لإظهار سطح خلية إيشيريشيا القولون للإنزيمات المحللة للدهون. وقد أظهر تحليل التدفق الخلوي وقياس نشاط الليبيز أن جميع إنزيمات الليبيز من الباسيلس ساتليس، الفيوزاريوم سولاني بيسي، والسيراتشيا مارسيسينس قد تم تصديرها بكفاءة بواسطة الناقل الذاتي EsaA، وأنها تحتفظ أيضاً بنشاطها المحلل للدهون عند تعريضها لسطح الخلية [٦٤]. ومؤخراً جداً، وضح كولمار وزملاؤه أن بكتيريا إيشيريشيا القولون التي تظهر الإستيريزات أو الليبيزات على سطح الخلية معاً مع بيروكسيداز الفجل (HRP) تكون قادرة على تحليل أسترات الحمض الكربوكسيلي لليبوتين تيراميد. وبقيت شقوق التيراميد التي نتجت من تفاعل الليبيز المقترن بالبيروكسيداز لفترة قصيرة وعليه ارتبطت تساهمياً بمجموعات التيروزين النشطة التي كانت تقع بالقرب من سطح الخلية البكتيرية التي تظهر نشاط الليبيز. وقد وجد أن اختلافات نشاط الاستيريز الخلوي تتطابق جيداً مع كمية الليبوتين تيراميد المتراكمة على سطح الخلية. وقد أتاح هذا التعليم الانتقائي باليبوتين تيراميد للخلايا ذات نشاط الليبيز عزلها عن طريق فرز الخلايا المغناطيسي [٦٥].

(٢, ١, ٣, ٤) الاختيار داخل الخلايا *In Vivo Selection*

يمكن القيام بالاختيار داخل الخلايا عندما يكون النشاط المستهدف ضرورياً للحياة والنمو، على سبيل المثال، التغلب على زيادة تركيزات المضادات الحيوية أو توفير مادة غذائية أساسية [٦٦]. وقد تم توضيح المبدأ بواسطة ريتز وروجيبرج عن طريق مثال والذي اقترن فيه البقاء على قيد الحياة بتحليل متشابه معين والذي يجرر مركب مثبت للنمو [٦٧]. وهكذا، لا تستطيع الكائنات الدقيقة التي تعبر متغير إنزيم الليبيز ذو انتقائية التشابهات المناسبة شق هذا المركب، ولذلك تبقى على قيد الحياة، محفزةً للتخصيب الفعال للمزرعة بمتغير الإنزيم ذي انتقائية التشابهات المطلوبة.

وفي بعض الأحيان يتم إجراء الاختيار كنهج تكاملي: ويتم فقط إنتاج متغير إنزيم مطفر (أي ناتج أبيض أساسي) [٦٨، ٦٩].

وقد عرضت مجموعة ستيمار أربع جينات للسيفالوسبورينيزات من أنواع الإنثيروباكترا، واليرسينيا، والسيتروباكترا، والكليسيلا إلى الـ epPCR أو خلط الدنا. وقد تم فحص مكثبات من أربع أجيال (أي ما مجموعه ٥٠٠٠٠ مستعمرة) عن طريق الاختيار على أطباق الأجار مع تركيز متزايد من الموكسالكتام (مضاد حيوي من البيتا-لاكتام). وقد أمكن فقط للمستنسخات القادرة على تحليل المضاد الحيوي البيتا-لاكتام أن تبقى على قيد الحياة. وأظهرت أفضل متغيرات من الـ epPCR زيادة نشاط تقدر بثمانية أضعاف، ولكن أظهرت أفضل طفرة من خلط الجينات المتعدد مقاومة للموكسالكتام أعلى بـ ٢٧٠-٥٤٠ ضعف [٧٠].

بالنسبة للمكثبات المعبرة في الكائنات الدقيقة، يمكن إجراء الـ HTS على المستعمرات التي تنمو في مزرعة صلبة مثل طبق الأجار. وعادةً تمكن طرق فحص المستعمرات على أطباق أجار من فحص أكثر من ١٠ متغيرات في غضون أيام، لكنها غالباً ما تكون محدودة في الحساسية: تنتشر المنتجات القابلة للذوبان بعيداً عن المستعمرة، وعليه يتم الكشف عن المتغيرات النشطة للغاية فقط. وطرق الفحص القائمة على المنتجات غير القابلة للذوبان تكون عادةً ذات حساسية أعلى، ولكن نطاقها محدوداً إلى حد ما.

ويعتمد فحص المرحلة الصلبة على إذابة المنتج بعد التفاعل الإنزيمي الذي يعطي منطقة راتقة، أو منتج مستشع، أو تغير في الرقم الهيدروجيني يتم ملاحظته بواسطة مؤشر الرقم الهيدروجيني أو منتج قوي الامتصاص (مولد لوني) مثل الإكس-جال أو ألفا-نافثيل أسيتات والأزرق السريع/الأحمر السريع كمثال لتعيين نشاط إنزيم الاستيريز [٧١، ٧٢].

وقد تكشف طريقة الفحص عن منتج الإنزيم مباشرةً أو يمكن دمجها لإنزيم ثانٍ والذي يمكن رصد منتجه بدوره بسهولة، كما هو موضح بالدمج الناجح للسيتوكروم P450 مع بيروكسيد الفجل [٧٣]. وإذا كانت طريقة الفحص سامة أو تتطلب تحليل الخلايا، فإنه يتم نقل جزء من الخلايا من مستعمرة إلى غشاء مرشح، حيث يتم الفحص [٧٤]. في الأعوام الأخيرة، تم توظيف التصوير الرقمي بشكل متزايد لتحقيق إنتاجية أعلى وتقييم كمي للإشارة أعلى [٧٣، ٧٥، ٧٦].

لا يزال من الممكن فحص النشاط المحلل للدهون بصورة عالية الإنتاجية على الأطباق، باستخدام ثلاثي الأولين وثلاثي البوتيرين-أجار من خلال تشكيل هالة. وبدلاً من ذلك، فقد تم مؤخراً تطوير طريقة فحص عالية الإنتاجية في المرحلة الصلبة بواسطة بيباك وريمون عن طريق استخدام استرات الكومارين [٧٧].

(٢، ٣، ٤) الفحص Screening

لا يمكن تطبيق الكثير من طرق الفحص في صورة المرحلة الصلبة. ولذلك يجب زراعة المستنسخات الفردية وفحصها في الأطباق دقيقة المستوى. وتستهلك طرق الفحص هذه المزيد من الوقت بصورة أكبر من طرق

فحص المرحلة الصلبة. ومع ذلك، فإنه يمكن زيادة الإنتاجية بصورة ملحوظة عن طريق استخدام الروبوت الآلي وتقنية اختيار المستعمرة. والميزة الرئيسية هي أن طرق الفحص توفر المعلومات بصورة كبيرة أكثر من طرق الاختيار حيث يمكن قياس النشاط بصورة مباشرة وكمية، وتسمح حتى بتعيين الحركية. وعلاوة على ذلك، تمكن طرق الفحص من التحديد المباشر لانتقائية المتشابهات لإنزيم، والتي تكون في كثير من الأحيان الخاصة الرئيسية التي تحتاج إلى تحسين للمحفزات الحيوية الصناعية.

(١, ٢, ٣, ٤) طرق الفحص بالهيدروليز Hydrolase Assays

يمكن تعيين نشاط تحليل الاسترات باستخدام مجموعة واسعة متنوعة من أوساط التفاعل، وبصورة تفضيلية باستخدام المركبات "الحقيقية" المهمة مقارنة مع البدائل (أوساط التفاعل غير الطبيعية المصممة لتوفير إشارة مكثفة قابلة للكشف عند تحويلها بواسطة إنزيم). ومع ذلك، فلا يمكن إجراء كل طرق فحص النشاط في صورة عالية الإنتاجية اللازمة لفحص المكتبات الكبيرة الناتجة من بروتوكولات التطوير المستخدمة في التطور الموجه. ومثال بسيط هو طريقة فحص حالة الرقم الهيدروجيني باستخدام مستحلبات ثلاثي البوتيرين أو ثلاثي الأولين كأوساط تفاعل. وطرق الفحص اللونية والطيافية هي بلا شك الطرق الأكثر انتشاراً لتحديد الأنشطة التحليلية. وهي تنطوي على انقسام إستر لتنتج مولد لوني/ طيفي يتم قياسه. والمولدات اللونية/الطيافية الأكثر استخداماً هي البار-نيتروفينول، والفلوريسين، والريزورفين، أو الكومارين. والعيوب الرئيسية لاستخدام أوساط التفاعل الاصطناعية هذه هي أنها تختلف عن أوساط التفاعل الحقيقية، وعليه يمكن أن تؤدي إلى نتائج إيجابية كاذبة، وأنها غالباً ما تكون غير متوفرة تجارياً.

وتعتمد إحدى طرق الفحص، والتي يمكن فيها استخدام الخلات مباشرة كوسط تفاعل "حقيقي" على اختبار حمض خليك "متاح تجارياً" (شركة آر-بيوفارم المحدودة، دارمشتات، ألمانيا). ويدمج هذا الاختبار تحليل الخلات مع تتابع إنزيمي يعتمد على الخلات يؤدي إلى تشكيل الـ NADH المتكافئ [٧٨]. وعند استخدام متشابهات الخلات النقية ذات التركيب الفراغي آر، وإس في تجارب منفصلة ولكن باستخدام نفس متغير الإنزيم، فإن الطريقة تسمح بتعيين انتقائية المتشابهات. وعليه يمكن استخدام هذه الطريقة بنجاح لتعريف متغير للإستيريز ذو انتقائية متشابهات عالية في تخليق (إس)-بيوتين-٢-أول [٧٩].

وأحد العيوب المهمة في طرق فحص النشاط التحليلي لإنزيمات الليبازات والاسستيريزات هو أن معظم أوساط التفاعل تكون شحيحة الذوبان في البيئات المائية ومخاطر التحلل الذاتي القوي في درجة الحموضة الشديدة أو الحرارة المرتفعة باستخدام أوساط التفاعل مولدة اللون أو الطيف.

للتحليل على هذه المشكلة، تم وصف إستراتيجيتين في المراجع. أولاً، تم استبدال استرات البار-نيتروفينيل أو الكومارين بإثرات الأسيلوكسي ميثيلين المقابلة أو الداى أسيل جليسرول المناظر. وهذا يجعل أوساط التفاعل أكثر استقراراً، حيث يتم فصل الاستر المعرض للفصل الإنزيمي من مولد اللون (أو الطيف)، متجنباً التحلل الذاتي حيث إن شاردة الكحول الآن تعدُّ مجموعة صعبة المغادرة مقارنة مع أيون الكومارين أو البار-نيتروفينوكسيد. واعتماداً على تركيبه الخاص، فإن الكحول المنفصل ينزع منه مجموعة كربوكسيل مباشرةً أو يتأكسد أولاً مع البرأيدوات ثم يتعرض إلى نزع البيتا المحفز بال-BSA من أجل تحرير مولد اللون/ الطيف [٨٠-٨٢]. ويتم تطبيق هذه الطريقة أيضاً على فحص وتوصيف الإنزيمات ذات انتقائية التشابهات [٨٣]. وتكمن العيوب في الحاجة لتخليق أوساط التفاعل المصممة خصوصاً وأنه يمكن فقط إجراء القياسات عند نقطة النهاية بدلاً من التعيين الكمي لحركيات الإنزيم. ويستخدم تعديل للطريقة الموضحة سابقاً المعايير العكسية مع الإيبينفرين لبرأيدوات الصوديوم التي تستهلك في أكسدة الديول الناتج عن الفصل الإنزيمي [٨٤-٨٥].

وفي عام ١٩٩٧م، وصف جينس وكازلاوسكاس أول طريقة HTS لانتقائية التشابهات استناداً إلى التحليل المنفصل لتشابهات استرات البار-نيتروفينيل لحمض فراغي، المسماة ب-Quick E. وقد عينا في هذه الطريقة انتقائية التشابهات E عن طريق قياس معدلات التحليل الأولية للمتشابه النقي من ٤-نيتروفينيل-٢-فينيل بروبانوات ومركب مرجعي (الريزورفين تتراديكانوات). والمزايا هي وقت القياس القصير، والحاجة لكمية أصغر بكثير من الهيدروليز، وسهولة قياس انتقائية التشابهات العالية. وأيضاً هناك بعض العيوب مثل الحاجة لتشابهات نقية، والحاجة لمحلول رائق، وأنه يمكن فقط استخدام الاختبار لأوساط التفاعل مولدة اللون [٨٦]. وقد تم تطبيق طريقة ال-Quick E بنجاح في اختبار انتقائية وسط التفاعل في سلسلة الهيدروليزات [٨٧-٨٩].

من أجل استخدام راسيات كوسط تفاعل، فإن هناك حاجة لتقنية فصل قبل تعيين كل متشابه. ويمكن أن يكون هذا الفصل وفقاً للفراغية أو يكون وفقاً للكتلة الجزيئية في أوساط التفاعل المعلمة بالنظائر المشعة. وقد تم تكييف الفصل اللوني السائل ذي الضغط العالي والفصل اللوني لتكون طرق عالية الإنتاجية من أجل استخدامها [٩٠]. وبهذه الخطوة، تم إجراء نحو ٧٠٠ قياس يومياً لفحص مكتبة طفرات من ليبيز البوسودوموناس إيروجينوزا لانتقائية التشابهات في أسترة ٢-فينيل بروبانول. ويستخدم قياس طيف الكتلة (MS) مع مركب واحد معلم بالنظائر المشعة في زوج متشابهات في تحليلات الحركية (راسيات زائفة) [٩١] أو في التحويل الحيوي لمركب غير نشط ضوئياً (meso-compound). وقد تم أيضاً تكييف الكهربية الشعرية الموازية التي تستخدم محددات فراغية (على سبيل المثال، السيكلوديسترينات) كطور ثابت زائف في المحلول الكهربائي لمعالجة ما يصل إلى ٩٦ عينة في الوقت نفسه، مما يسمح بتعيين ٧٠٠٠ عينة من الأمينات المشتقة فراغياً في اليوم [٩٢].

(٢, ٣, ٤) طرق الفحص بالأوكسيدوريداكتيز Oxidoreductase Assays

تتبع معظم طرق فحص الأوكسيدوريداكتيز تكوين أو نضوب الـ NAD(P)H عن طريق قياس الامتصاص عند ٣٤٠ نانومتر. وعلى الرغم من أن تركيز العامل المساعد يرتبط مباشرةً بتحول وسط التفاعل، فإنه يجب توخي الحذر، حيث يمكن أن تتأثر النتائج بواسطة تفاعلات الخلفية التي تحدث في المتحولات الخام للخلايا، مما يجعل تنقية الإنزيم المطلوب في كثيرٍ من الأحيان ضرورية.

الدهيدروجينيزات عادةً يقاس نشاط الدهيدروجينيزات بواسطة تتابع من التفاعلات لدمج إنتاج الـ NAD(P)H مع تكوين مركبات ملونة. ومن الأمثلة على ذلك صبغات التترازوليوم مثل نيترو بلو تترازوليوم (NBT). وقد تم وصف طريقة فحص الـ NBT/فينازين ميثوسلفات (PMS) للكشف عن نشاط الدهيدروجينيز [٩٣]. وقد تبين أن طريقة الفحص تعمل في الطور السائل والصلب والأكثر أهميةً من ذلك أنه يمكن تطبيقها على الـ HTS [٩٤]. وتستخدم طريقة أخرى الصورة المختزلة من العامل المساعد. وفي ما يسمى "بطريقة فحص القلوية" يتحلل الـ NAD(P)⁺ تحت ظروف قلوية قوية لتكوين منتج عالي الاستشعاع [٩٥].

ويمكن تتبع النشاط المؤكسد عن طريق دمج الإنتاج الإنزيمي لفوق أكسيد الهيدروجين بتفاعل بيروكسيداز الفجل (HRP). ويتفاعل إنزيم الـ HRP، على سبيل المثال، في وجود فوق أكسيد الهيدروجين مع مركبات مثل الـ ABTS وينتج منتج أخضر قابل للذوبان والذي يمكن تعيينه طيفياً عند ٤٠٥ نانومتر [٩٦]. ويمكن استخدام أوساط تفاعل أخرى مولدة اللون، مثل الأورثو-دايانيزيدين، كبداية للـ ABTS [٩٧].

وفي مثالٍ حديث، تم فحص مكتبات التطور الموجه من الأسبرجلس نيجر التي تعبر إنزيم الجلوكوز أوكسيداز لتحسين الثبات لدرجة الحموضة والحرارة. ومن أجل ذلك فقد طور شفانييرج وزملاؤه طريقة فحص بالأطباق دقيقة المستوى ذات ٩٦ حفرة متوسطة الإنتاجية، والتي تظهر فيها أكسدة الجلوكوز بواسطة الفيروسينميثانول المؤكسد تغيراً في اللون من الأزرق إلى الأصفر الشاحب، والذي يمكن تسجيله عند ٦٢٥ نانومتر [٩٨].

ويمكن أيضاً استخدام الـ ABTS والأورثو-دايانيزيدين مباشرةً لقياس نشاط البيروكسيداز. وقد تم وصف إثبات تطبيق الـ HTS من مكتبات الإنزيمات في عددٍ من الأمثلة [٩٩-١٠٢]. ويمثل فحص الجواياكول طريقة فحص أخرى لتعيين نشاط البيروكسيداز، الذي تم استخدامه لفحص إنزيم البيروكسيداز محسن السيتوكروم ج [١٠٣]. يتأكسد الجواياكول (٢-ميثوكسي فينول) عديم اللون إلى شق الفينوكسي في وجود البيروكسيداز. ويتبلر الشق إلى التترا جواياكول البني، ويمكن الكشف عنه عند ٤٧٠ نانومتر.

وقد تم نشر عدة طرق فحص لنشاط الأوكسيجينيز، مثل أحادي أوكسيجينيز الهيم P450. على سبيل المثال استخدمت طريقة فحص نظير البار-نيترو فينوكسي (p-NA) في مجموعة من تجارب التطور الموجه [١٠٤-١٠٦].

وقد نشر شفانيبيرج وزملاؤه مؤخراً نظام فحص يعتمد على المنتج باستخدام العامل مولد اللون بارا-نيترو ثيوفينولات (pNTP) في التطور الموجه لإنزيم الإيبوكسجينيز كمثال أحادي لأوكسيجينيز P450 BM3. والـ pNTP هو مولد لون أصفر يتفاعل مع إيبوكسيد من خلال هجوم محب للنواة، مما يؤدي إلى فتح الحلقة ومنتج عديم اللون [١٠٧].

(٣, ٢, ٣, ٤) طرق الفحص بالهيدروكسي نيتريل ليز Hydroxynitrile Lyase Assays

تحفز إنزيمات الهيدروكسي نيتريل ليزات (HNL) انشقاق السيانوهيدريانات وعادةً يتم تعيين النشاط بواسطة انشقاق الـ HCN من المانديلونيتريل المحفز بواسطة الإنزيم. ويمكن بعد ذلك تعيين البنزالدهيد الناتج طيفياً عند ٢٨٠ نانومتر. وعلى الرغم من أن طريقة الفحص هذه يمكن تطبيقها بإنتاجية عالية، إلا أنها تقتصر على أوساط التفاعل الأروماتية أو العطرية. والخيار الآخر للكشف عن النشاط هو تحويل البنزالدهيد بواسطة إنزيم الكحول ديهيدروجينيز وتعيين تركيز الـ NADH المتزايد [١٠٨]. وبدلاً من ذلك، يمكن تعيين الـ HCN المتحرر كما وصف من قبل سيلمار وزملاؤه [١٠٩]، على أساس التفاعل الذي وصفه كونيج [١١٠]، والتي يمكن اعتباره طريقة فحص لجميع الأغراض دون التقيد بأي وسط تفاعل معين. في هذه الطريقة يتأكسد الـ CN⁻ أولاً بواسطة الكلوروسكسينيميد، ثم يرتبط بالبيريدين، وبعد حدوث التحليل إلى ألدهيدات الجلوتاتونيك. وأخيراً في تفاعل كونيج، يتكون مركب ملون يمكن الكشف عنه عند ٥٨٠ نانومتر في وجود أمين أولي وحمض الباربيتيوريك ككاشف اقتران. وقد تم تطوير هذه الطريقة مؤخراً لقياسات النشاط في الأطباق دقيقة المستوى للنظم عالية الإنتاجية [١١١]. وتعدُّ الطريقة مفيدة نظرياً للكشف عن النشاط وانتقائية المشابهات للـ HNLs تجاه أي وسط تفاعل سيانوهدريني.

قد تحدث قيود في حالة أوساط التفاعل الكارهة للماء؛ بسبب أنها شحيحة الذوبان في الماء. ويمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق استخدام عوامل الاستحلاب مثل الصمغ العربي. وكما ثبت، فإن زيادة العكارة ليس لها تأثير على التكوين والتعيين الطيفي للصبغة. والعيب الرئيس الآخر هو أنه حتى الآن يمكن فقط استخدام طريقة الفحص للتعين عند نقطة النهاية وليس لقياسات الحركية. ولهذا الغرض ما زالت هناك حاجة لاستخدام تحويل المانديلونيتريل كما ذكر أعلاه.

ويستند مبدأ طريقة فحص أخرى على طريقة فايجل أنجر [١١٢]، والتي تنتج لوناً أزرقاً عندما يلامس غاز الـ HCN ورق الترشيح المشبع بخليط إيثيل أسيتوأسيتات النحاس (٢) وقاعدة رباعية [١١٣]. والملح الأزرق هو منتج أكسدة للقاعدة الرباعية، والتي تتكون في وجود حمض الهيدروسيانيك وإيثيل أسيتوأسيتات النحاس (٢). وقد تم إجراء طريقة الفحص نفسها كتجميع ساندويتش، والذي يتم فيه فصل المستعمرات الملوثة للغشاء التي

يتم تحضينها في محلول وسط التفاعل في القاع، من ورق اختبار فايجل أنجر في القمة بواسطة نسيج نايلون نفاذ. ويسمح هذا التجميع حصرياً بوصول غاز الـ HCN إلى ورق الكشف ويؤدي إلى بقعة زرقاء داكنة مميزة مباشرةً فوق المستعمرة المنتجة للـ HNL.

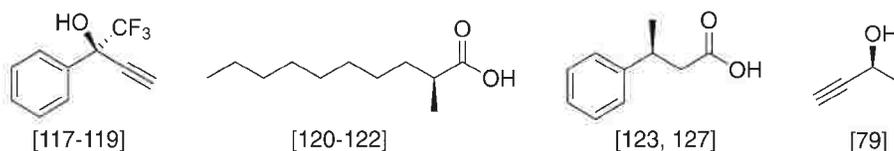
(٤, ٤) أمثلة Examples

(٤, ٤, ١) الاستيريزات، والليبيزات، والفوسفوليبيزات Esterases, Lipases and Phospholipases

إن غالبية الإنزيمات المستخدمة صناعياً هي هيدروليزات (٦٥٪) وعليه يمكن الاطلاع على الكثير من الأمثلة للهيدروليزات المطورة في المراجع. وواحد من أول الأمثلة كان متغير لإنزيم الإستيريز من الباسيلاس ساتليس (BsubpNBE) ذي نشاط أكبر من السلالة الأصلية بـ ١٥٠ ضعف في ١٥٪ ثنائي ميثيل الفورماميد (DMF)، والنتاج من جمع الـ epPCR والخلط. ويمكن تطبيق الإنزيم في نزع حماية المضاد الحيوي اللوراكاريف في وجود الـ DMF كمذيب ثانوي [١١٤]. كما تم أيضاً زيادة الثبات الحراري لنفس الإنزيم بـ ١٤ درجة مئوية في ثمانية جولات من الـ epPCR والتعديل [١١٥].

وقد تم تطوير إستيريز مماثل، BS2، والذي يختلف فقط بـ ١١ حمض أميني عن الـ BsubpNBE، بواسطة التصميم الرشيد في مجموعتنا وأمكن زيادة انتقائية التشابهات تجاه الكحول الرباعي خلات ٢-فينيل-٣-بيوتين-٢-يل بستة أضعاف إلى E=١٩، وتجاه خلات الليناليل المحولة من تفضيل الصورة آر إلى الصورة إس بدرجة E=٦ [١١٦]. وفي دراسة لاحقة، أظهرت هذه الطفرة (G105A) انتقائية متشابهات جيدة تجاه خلات ٢-فينيل-٣-بيوتين-٢-يل (E=٥٤) في ٢٠٪ DMSO (حجم/حجم)، وقيمة E < ١٠٠ تجاه نظير الترايفلورو ميثيل [١١٧] (الشكل رقم ٣، ٤). وأعطت طفرة أخرى، E188D، انتقائية متشابهات مماثلة عالية تجاه كلٍ من وسطي التفاعل فضلاً عن سلسلة من خلات الكحولات الثلاثية الأخرى [١١٨].

وقد تمكنا أيضاً باستخدام نهج مركز عشوائي من عكس انتقائية التشابهات [١١٩]. وتم خلال الفحص بطريقة خلات المذكورة سابقاً تعريف طفرة مزدوجة (E188W/M193C) ذات تفضيل للصورة إس وقيمة E حوالي ٧٠ تجاه ١، ١، ١-ثلاثي فلورو-٢-فينيلبيوت-١-ين-٣-أول. ومن الجدير بالذكر أن الطفرات الفردية E188W أو M193C التي يمكن أيضاً الحصول عليها بواسطة التطوير العشوائي، تظهر فقط E=١٦ لمتشابه الصورة إس أو انتقائية منخفضة للصورة آر، على التوالي، وأن الجمع فقط، والذي لم يكن من المرجح الحصول عليه بالتطير العشوائي "الطبيعي"، هو الذي أدى إلى العكس الجوهري لانتقائية التشابهات. وعليه فإن هذه النتيجة التآزرية هي حجة ممتازة لاستخدام التطور الموجه المركز (الشكل رقم ٣، ٤).



الشكل رقم (٣، ٤). أمثلة مختارة للمركبات الفراغية الناتجة من استخدام الاستيريزات أو الليبيزات المصممة.

وبوقتٍ قصير بعد ذكر الاستيريز المطور الأول من قبل مجموعة أرنولد، تم ذكر التطور الموجه لإنزيم ليبيز من البسودوموناس إيروجينوزا من قبل ريتز وزملائه. وكانت انتقائية المتشابهات الأولية في التحليل الحركي لإستر البار-نيتروفينيل لحمض ٢-ميثيل-ديكانويك (MDA) $E=1$ ، ١ (مع تفضيل حمض الصورة إس)، وبعد أربع جولات من ال-epPCR تم الحصول على $E=1.1$. وقد تم إنتاج المزيد من الطفرات عن طريق الجمع بين الطفرات في المواضيع التي تم تعريفها على أنها حرجة لإنتاج أفضل المتغيرات في كل جولة، مما أدى إلى تعريف متغير أكثر انتقائية للمتشابهات $E=21$ [١٢٠]. وللتفاعل نفسه، أثبت نهج خلط الدنا أنه فعال، منتجاً متغيراً أظهر $E=32$. وعلاوةً على ذلك، تم تطبيق نسخة معدلة من التطوير الاندماجي متعدد الشرائط لستيار على اثنتين من الطفرات الناتجة والشريط الأحادي التطويري، والذي سمح بالعشوائية في الوقت نفسه المناطق المحددة سابقاً كـ "نقاط ساخنة". وقد أدى هذا إلى المتغير الأكثر في انتقائية المتشابهات (إكس، ذو ستة طفرات)، مظهراً عامل انتقائية ذو $E=5.1$. وبالإضافة إلى ذلك، أمكن أيضاً تعريف متغيرات ذات انتقائية جيدة للصورة أر ($E=30$) [١٢١]. ومن المثير للاهتمام، أنه تقع طفرة واحدة فقط إلى جانب الموقع النشط، في حين أن جميع الاستبدالات الأخرى تكون بعيدة. وبعد دراسة نظرية، تم تحضير ١٠ متغيرات جديدة وأعطت الطفرة المزدوجة M8 (S53P/L162G) التي كان من المفترض أن تظهر انتقائية متشابهات عالية قيمة $E=64$ عند تحويل يقدر بـ ٢٠٪ [١٢٢] (الشكل رقم ٣، ٤).

وقد تم أيضاً ذكر المحاولات لتحليل المخاليط الراسمية لإسترات الكحوليات الثانوية باستخدام طفرات الاستيريز من البسودوموناس فلوريسينس (PFE-I). وقد استخدمت مجموعتنا السلالة المطفرة إيشيريشيا القولون XL-1 أحمر، لتطوير تفضيل متشابهات في تحليل ميثيل-٣-فينيل بيوتيرات [١٢٣]. وقد تم أيضاً تطوير نفس الإنزيم بواسطة ال-epPCR وطريقة فحص الخلات لتطبيقه في التحليل الانتقائي للمتشابهات لوحدة البناء المهمة جداً (إس)-٣-بيوتانين-٢-أول مع زيادة تماثل (زت) $<99\%$ [٧٩]. وهنا كانت دورة واحدة فقط من ال-epPCR لازمة للحصول على متغير يحتوي على طفرات ثلاثية النقطة والتي أظهرت انتقائية متشابهات أعلى بدون التحليل الزائد. وفي وقتٍ لاحق، تم دراسة تأثير كل طفرة على انتقائية المتشابهات، ومعدل التفاعل، وذوبان الطفرة. وكان الاستنتاج النهائي من هذا العمل أن الطفرات القريبة من الموقع النشط يمكن أيضاً أن يكون لها تأثير كبير (سليبي) على طي البروتين، والذي ينبغي أن يتلقى المزيد من الاهتمام في مجال هندسة البروتين.

يعد الليبيز ب من الكانديدا أنتاركتيكا (CAL-B) أحد أكثر المحفزات الحيوية استخداماً في الكيمياء العضوية [١٢٤]. ومع ذلك، لم يكن من الممكن الحصول على مزيدٍ من المتغيرات الثابتة حرارياً بالتطهير الرشيد. وعند استخدام منهج التطور الموجه، تم الحصول على متغيرات بعد جولتين من التطهير بال-epPCR، والتي كانت أكثر ثباتاً ب-٢٠ ضعف عند ٧٠ درجة مئوية من السلالة الأصلية. وقد وجد أن الموضوعين ٢٢١ و ٢٨١ كانا حاسمين لمنع التثبيط غير العكسي وتجميع البروتين لهذه المتغيرات المحسنة، والتي ثبت أيضاً أنها أكثر نشاطاً ضد البار-نيروفينيل بيوتيرات وال-٦،٨-داي فلورو-٤-ميثيل أميليفير ايل أوكتانوات [١٢٥].

وقد تم تصميم ال- CAL-B بواسطة خلط الجين الخاص به مع جينات الليبيز من جنس الهيفوزايا CBS 648.91 والكريتوكوكاس تسوكوباينسيس ATCC 24555 من أجل خلق متغير لإنزيم الليبيز ب ذو زيادة في نشاط تحليل الداى إيثيل-٣-(٣،٤-داى كلوروفينيل) جلوتارات، والذي يعطي وحدة تخليق فراغية لتحضير لإعداد مقاوم NK1/NK2 مزدوج [١٢٦].

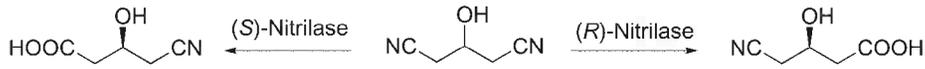
وقد تم تطوير انتقائية المتشابهات لإنزيم الليبيز من البوركولديريا سيباسيا KWI-56 تجاه انتقائية متشابه الصورة آر في تحليل إستر البار-نيروفينيل لحمض ٣-فينيل بيوتريك باستخدام تقنية جديدة لتركيب وفحص مكتبة البروتينات بواسطة تضخيم جزيء دنا واحد بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة متبوعاً بنظام تعبير/ترجمة مزدوج في المختبر. وقد تم إنشاء المكتبة عن طريق تشيع أربعة مواضع (إل١٧، إف١١٩، إل١٦٧، وإل٢٦٦)، ثم التخفيف حتى يوجد فقط خمسة جزيئات دنا لكل حفرة في طبق المستوى الدقيق. وقد تم تضخيم هذه الجزيئات باستخدام جزيء واحد ناتج من تفاعل تسلسل البلمرة وتعبيره في المختبر، حيث إن كل جزء من الجين يحمل بالفعل بادئ ال- T7، وموضع ارتباط الريبوسوم، ومنهي ال- T7. ويتم مرةً أخرى تخفيف الحمض النووي الدنا الموافق للحفر التي تظهر انتقائية المتشابهات المطلوبة ليعطي جزيء واحد لكل حفرة، ثم يعاد تضخيمه، ويعاد فحصه. وقد أظهر أفضل متغير عامل انتقائية E=٣٨ تجاه متشابه الصورة آر، في حين أظهرت السلالة الأصلية E=٣٣ لمتشابه الصورة المضادة [١٢٧] (الشكل رقم ٣، ٤).

تم تحسين نشاط إنزيم الفسفوليباز ١١ الموجود بالفعل في الكثير من الليبيزات كنشاط غير مميز بصورة جوهريّة في لبيز الستافيلوكوكاس أورياس بواسطة جولات متعاقبة من ال-epPCR. بعد أربع جولات، تم الحصول على منتج، يظهران زيادة تقدر ب-٩، ٥، ٩ و ٦ ضعف في نسبة نشاط الفسفوليباز/ الليبيز. وقد تم إجراء جولة نهائية من خلط الدنا من إنزيم الليبيز هذين المنتجين والسلالة الأصلية لدمج الطفرات المفيدة وللقضاء على الطفرات المحايدة أو الضارة. وقد أعطت هذه الطريقة متغيراً يحتوي على ستة طفرات في الأحماض الأمينية ويظهر زيادة تقدر ب-٦، ١١ ضعف في نشاط الفسفوليباز المطلق وزيادة تقدر ب-٥، ١١ ضعف في نسبة الفسفوليباز/ الليبيز مقارنةً مع نقطة البداية

[١٢٨]. وبطريقةٍ مماثلة، أسفرت جولة واحدة من الـ epPCR عن زيادة في نسبة الفسفوليبيز/ الليبيز تقدر بـ ١٧ ضعف لإنزيم الليبيز المحب للحرارة والقلوية من الباسيلاس ثيرموكاتينولاتوس [١٢٩]. ويمكن تغيير انتقائية طول السلسلة لإنزيمات الليبيز عن طريق التطهير موجه الموقع، كما تم توضيحه بواسطة يورجار وهاس لإنزيم الليبيز من الريزوباس أورايزي (سابقاً ريزوباس ديليمار) [١٣٠]، ولكن أيضاً عن طريق التطور الموجه [٦٠]. خلال محاولة عزل متغيرات إنزيمية جديدة لإنزيم الليبيز المفرز خارج خلايا الثيرمومايسيس لانوجينوزا ذات نشاط محسن في وجود المنظفات، وقد قام دانييلسن وزملاؤه بتوزيع تسعة أحماض أمينية عشوائياً في منطقتين تربطان غطاء الألفا المرن. وقد وجدت طفرة S83T في ستة من المتغيرات السبعة الأكثر نشاطاً، والتي ثبت أنها تغير تفضيل طول السلسلة في الريزوباس أورايزي المتماثل.

(٢, ٤, ٤) النيتريلاز Nitrilase

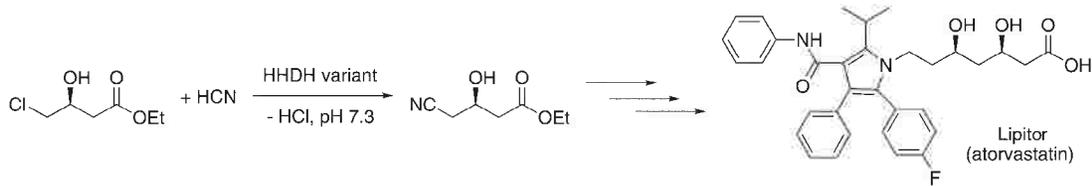
تم الحصول على إنزيم نيتريلاز محسناً بصورة كبيرة يمكن استخدامه في الإنتاج الصناعي لحمض (أر)-٤-سيانو-٣-هيدروكسي بيوتريك (الشكل رقم ٤, ٤)، وهو مركب وسيط مهم للأتورفاستاتين (الليبتور)، بواسطة التصميم التطوري باستخدام طريقة التطهير التشبهي لموقع الجين (GSSM) التي تم تطويرها من قبل شركة ديفيرسا [١٣١]. في الـ GSSM يتم استبدال كل حمض أميني في البروتين مع واحد من الأحماض الأمينية الـ ١٩ المخلفة للبروتين [١٣٢، ١٣٣]. ويتم هذا على المستوى الجيني مع مجموعة بادئ تشمل إما ٣٢ أو ٦٤ متغيرات الشفرة لكل مجموعة حمض أميني طرفية للإنزيم الأصلي. وهكذا، تسمح الـ GSSM بالوصول غير المنحاز إلى كافة متغيرات الشفرة. ومع ذلك، قد لا تنطبق هذه الطريقة على معظم المختبرات الأكاديمية؛ بسبب تكلفتها العالية وعدم وجود معدات الفحص عالي الإنتاجية المتطورة. في هذا المثال، حفز النيتريلاز الأصلي إلغاء أو نزع التناظر من الـ ٣-هيدروكسي جلوتارايل النيتريل مع منتج زيادة تماثل (زت) ٩٥٪ عند تركيز وسط تفاعل ١٠٠ ملي مولار. ولكن عند استخدام التركيز الأكثر ارتباطاً بالصناعة ٣ مولار، فقد لوحظ وجود فائض متشابه غير مرضٍ يقدر بـ ٦, ٨٧٪ زيادة تماثل. لذا فقد تم إنشاء مكتبة تصل إلى كل متغير حمض أميني واحد للإنزيم الأصلي ذي ٣٣٠ حمض أميني مع عدد متغيرات نظري يقدر بـ ١٠٥٢٨، وتم فحصها مع زيادة أخذ عينات ثلاث مرات في طريقة فحص عالية الإنتاج اعتماداً على قياس طيف الكتلة باستخدام مزيج من وسط التفاعل الفراغي الطبيعي والمعلم بنظائر النيتروجين المشعة. وقد أدى ذلك إلى تعريف متغير ذي طفرة واحدة (A109H) والذي أظهر انتقائية متشابهات ممتازة ومكن من إنتاجية حجمية تقدر بـ ٦١٩ جم/ لتر في اليوم الواحد. وكان هذا مستبعداً جداً باستخدام الـ epPCR أو تعديل الجينات؛ وذلك لأن طفرة الألانين إلى الهيستيدين تتطلب تبادل قاعدتين في ثلاثيات الشفرة.



الشكل رقم (٤, ٤). نزع التناظر من الـ ٣-هيدروكسي جلوتارونيتريل الفراغي باستخدام النيتريلازات المطورة.

(٤, ٤, ٣) الهالوهيدرين ديهالوجينيز Halohydrin Dehalogenase

تم تحسين الوظيفة الحفزية لإنزيم الهالوهيدرين ديهالوجينيز (HHDH) من الأجروباكتريوم رادياكتر بواسطة التطور المدفوع بالـ ProSAR، والذي أدخله فوكس وزملاؤه للحصول على إيثيل (أر)-٤-سيانو-٣-هيدروكسي بيوتيرات، والتي تشارك أيضاً في تخليق الأتورفاستاتين (ليبيتور) (الشكل رقم ٤, ٥) [٥٠]. وكان للإنزيم الجديد ٤٠٠٠ ضعف إنتاجية حجمية في الأسيئة (إدخال مجموعة السيانيد) مقارنةً مع السلالة الأصلية. ويوضح هذا المثال أيضاً كفاءة الجمع بين الاعتبار النظري والطرق المعملية من أجل تحسين وظيفة المحفز الحيوي.



الشكل رقم (٤, ٥). تخليق مرادف رئيس لليبيتور باستخدام الهالوهيدرين ديهالوجينيز (HHDH). احتوت المتغيرة الأفضل على ٣٥ طفرة.

(٤, ٤, ٤) المونوأوكسيجينيز P450 Monooxygenase

السيتوكروم P450 مونوأوكسيجينيز هو إنزيم مهم جداً في الصناعة وقد أدت التقنيات الكثيرة التي تنطوي على تطفير الـ P450 BM-3 (من الباسيلاس ميجاتيريوم، بروتين انصهار طبيعي لإنزيم المونوأوكسيجينيز P450 وبيتيدات الريداكتيز) إلى مجموعة متنوعة من المحفزات الحيوية ذات مميزات مهمة صناعياً (تطوير الأدوية، وعمليات التحلل الحيوي، والتحفيز الحيوي). فعلى سبيل المثال تم استخدام التطور الموجه من قبل وونج وزملاؤه لزيادة نشاط التحفيز للسيتوكروم P450 BM-3 في المذيبات العضوية الثانوية. وكان الإنزيم الأولي طفرة معزولة سابقاً، P450 BM-3 F87A، ذات نشاط مرتفع [١٠٥]. وتم الحصول على الطفرات باستخدام الـ epPCR متبوعاً بالتطفير الشعبي وتم فحص نشاطها التحفيزي في أطباق ذات ٩٦ حفرة مع وبدون المذيب العضوي الثانوي الدايميثيل سلفوكسيد (DMSO) ورباعي هيدرو فيوران (THF). وأظهرت الطفرة F87A5F5، المعزولة في الجولة الثانية من التطفير العشوائي، زيادةً في النشاط النوعي (٥, ٥) ضعف في ١٠٪ DMSO؛ ١٠ أضعاف في ٢٪

(THF). وأعطت الطفرة 5F5، حيث تم تطهير الألانين في الموضع ٨٧ عكسياً إلى الفينيل ألانين، ما يقرب من ستة أضعاف أعلى في النشاط النوعي في ٢٥٪ DMSO، ولكن فقط زيادة تقدر بـ ٤, ٣ ضعف في ٢٪ THF. وقد تم أيضاً تعيين الأنشطة النوعية للطفرات في مذيبات ثانوية قابلة للامتزاج بالماء: الأسيتون، الأسيتونيترييل، داي ميثيل فورماميد (DMF)، والإيثانول. وفي جميع الحالات زاد النشاط وبصورة قابلة للمقارنة بالتحسينات الملاحظة للـ DMSO والـ THF.

(٤, ٤, ٥) الألدوليزات Aldolases

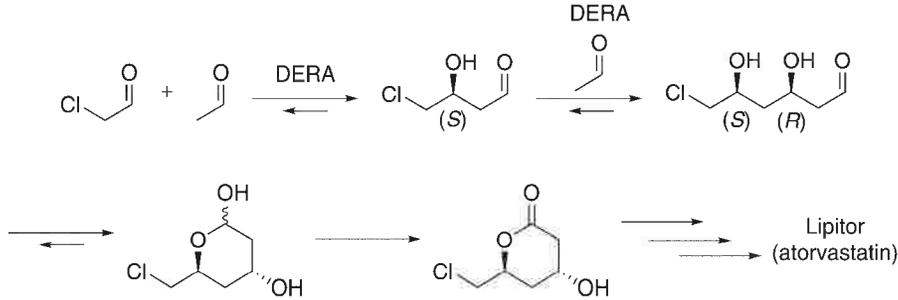
تم وصف مجموعة واسعة من الألدوليزات في المراجع، والتي تسمح بتكوين رابطة الكربون-الكربون بين ألدهيد وجزء مانح (على سبيل المثال، داي هيدروكسي أسيتون فوسفات (DHAP)، والبيروفات، والفسفواينول بيروفات، وما إلى ذلك) وعليه تخلق ما يصل إلى مركزين تجسيميين في خطوة تفاعل واحدة. وهذا يجعل هذه المحفزات الحيوية جذابة جداً للتخليق العضوي [١٣٤، ١٣٥]. ومع ذلك، فإن مجالات وسط التفاعل الضيقة وتثبيط الإنزيم في ظل ظروف التخليق تمثل العقبات الرئيسة لتطبيق الألدوليزات على المستوى الكبير.

ومرة أخرى، يمكن التغلب على هذه القيود بواسطة التطور الموجه. وقد تم تطوير طريقة أنيقة جداً للتخليق المحفز بالألدوليز لمركب وسيط رئيس لليبيتور مبدئياً من قبل مجموعة وونج [١٣٦] والتي حفز فيها الـ DERA (٢-ديوكسي-دي-ريبوز-٥-فوسفات الألدوليز) تفاعل تاندوم ألدول عالي انتقائية المتشابهات بين الكلوروأستيتالدهيد واثنين من مكافئات الأستيتالدهيد (الشكل رقم ٦, ٤).

ومع ذلك، فإن الإنزيم يفتقر للاستقرار الكافي في وجود الأستيتالدهيد وتم تحسين التفاعل في تعاون مع شركة ديفيرسا [١٣٨] ومن قبل باحثين في الـ DSM. وقد قاموا بتعريف متغيرات أكثر استقراراً في مكتبات الطفرات بواسطة الفحص لأفضل استقرار وأحسن إنتاجية. وعند دمج أفضل المتغيرات، تم الوصول إلى تحسين يقدر بعشرة أضعاف تحت الظروف المهمة صناعياً [١٣٧]. وقد وصفت مجموعة وونج أيضاً طريقة اختيار داخل الخلية للتطور الموجه لإنزيم إل-رامنولوز ألدوليز بدءاً من إنزيم إل-رامنولوز-١-فوسفات ألدوليز (RhaD) [١٣٩]. وقد مكنت هذه الطريقة من تعريف متغير إنزيم الـ RhaD المطلوب من مكتبة مشتقة من الـ epPCR، والتي على النقيض من الإنزيم الأصلي قبلت الداى هيدروكسي أسيتون بدلاً من المناظر الـ DHAP المكلف للغاية وغير المستقر في سفرته كمانح. أيضاً، أمكن تحسين الألدوليز الـ KDPG (دي-٢-كيتو-٣-ديوكسي-٦-فوسفوجلوكونات) فيما يتعلق بنشاطه التحفيزي، وتخصيصه لوسط التفاعل، وانتقائيته التجسيمية عن طريق

التطور الموجه [١٤٠]. وقد تم تعريض إنزيم مرتبط يستخدم مشتقات الجالكتوز (KDPGal) لمزيج من ال-epPCR، وخلط الدنا والتطهير موجه الموقع، مما أسفر عن متغير ذو كفاءة تحفيزية محسنة بـ ٦٠ ضعف في تخليق منتج مسار الشيكيمات [١٤١].

ويمكن العثور على مجموعة واسعة من الأمثلة الأخرى على الأدوليزات المحسنة بواسطة التطور الموجه في عددٍ من المراجع الحديثة [١٤٢-١٤٤].



الشكل رقم (٦، ٤). تخليق مرادف رئيس للبيبتور باستخدام ٢-ديوكسي-دي-ريبوز-٥-فوسفات أدوليز (DERA) في تفاعل ثانوم أدول مع الكلوروأستاتالدهيد واثنين من مكافئات الأستاتالدهيد كمواد بادئة [١٣٧].

(٤، ٥) الاستنتاجات

لقد برزت هذه التقنية، فقط بعد بضع سنوات من ذكر التطور الموجه لأول مرة لهندسة البروتينات، باعتبارها أداة قوية جداً لتصميم وتعديل خصائص الإنزيمات. وسرعان ما وجدت هذه الطريقة تطبيقها في مجموعة واسعة من البروتينات، مع كون الغالبية العظمى مفيدة في التحفيز الحيوي. وبناءً على ذلك، فقد تم تطوير مجموعة متنوعة من أدوات البيولوجيا الجزيئية لخلق مكتبات طفرات متوازنة جداً وكذلك أساليب فحص عالية الإنتاجية مناسبة لجعل تطبيق التطور الموجه أسهل وأكثر جدوى. وفي غضون عقد من الزمن فقط، برز التطور الموجه كطريقة قياسية في هندسة البروتينات وعليه يمكن استخدامها تكميلياً أو مع تصميم البروتين الرشيد لتلبية الطلب على المحفزات الحيوية القابلة للتطبيق الصناعي والتي تظهر الانتقائية الكيميائية والفراغية والتجسيمية، فضلاً عن تحمل ظروف العملية (على سبيل المثال، تركيزات وسط التفاعل العالية، والمذيبات، ودرجات الحرارة، والثبات طويل المدى). وعلاوةً على ذلك، فقد وجدت هذه الطريقة بالفعل طريقها إلى مختلف التطبيقات الصناعية، كما تم ذكر أعلاه للأمثلة التفصيلية المختارة وكما هو ملخص في الجدول رقم (١، ٤).

المراجع	التطبيقات	الخاصية المحسنة	طريقة المحسن	طريقة التطوير	الهدف	الإنزيم (المصدر)
[79]	إنتاج (إس) -3- بيوتانين-3- أول مع 99% زيادة تماثل (وحدة بناء فراغية)	زيادة إنتاجية التماثلات	فحص الحالات	FqPCR	إنتاجية التماثلات ضد 3- بيوتانين-3- أول	إستيريز من يسودوموناس فلوريسينس
[89]	إنتاج (MBMP) وحدة تماثل فراغية مهمة	زيادة إنتاجية التماثلات بـ 5 أضعاف	فحص الـ QuickE-qNPA	التطوير العشوائي بالقرب من الوضع النشط	إنتاجية التماثلات ضد ميثيل-3-برومو-2- ميثيل بروتينات	إستيريز من يسودوموناس فلوريسينس
[145]	(إس)-كيتروفين	زيادة التباين الحارزي وانخفاض تثبيط وسط التفاعل	الأطباق دقيقة المستوى مع المعايرة الحرارية	epPCR و SHEP	تحسين التباين	إستيريز من يسودوموناس فلوريسينس
[122-120]	-	زيادة قيمة الـ E من 1 إلى 64	الأطباق دقيقة المستوى مع إسترات البار-نيتروفيل	epPCR، التطوير العشوائي، التطوير المبرمطي	إنتاجية التماثلات	إستيريز من يسودوموناس إيزو-جوزوا
[114]	المحفز الحيوي الصناعي	زيادة النشاط بـ 150 ضعف في 15٪ DMF، زيادة التباين الحارزي	الأطباق دقيقة المستوى مع إسترات البار-نيتروفيل	epPCR، التطوير العشوائي، المخطط	نشاط عالي في الـ DMF تجاه إسترات بار-NB في اللوراكازيف	إستيريز من ياسيلاس سابيليس
[100]	صناعة الغسيل	زيادة التباين الموكسب بـ 100 ضعف، زيادة التباين الحارزي بـ 170 ضعف	المحسّن في الأطباق دقيقة المستوى عند درجة pH عالية مع فرق أكسيد الهيدروجين، قياس النشاط البقي	epPCR، التطوير العشوائي، المخطط	التباين والنشاط تحت ظروف الغسيل	هم بيروكسيداز من كزيريتوس ستيريتوس
[146]	إنتاج الأحماض الأمينية في الصورة إل صناعياً	إنتاجية الصورة إل، ونشط بـ 5 أضعاف	مؤشر الـ pH	epPCR، التطوير العشوائي	إنتاجية التماثلات المحكوسة	هيدالتونيز من جنس الأرتروباكتز
[147]	صناعة الغسيل	زيادة حتى 20 درجة	ببتيد البار-نيترو وأينيد المحالفة (s-AAPF-pNA)	epPCR، التطوير العشوائي	التباين الحارزي	سابيليسين
[148,149]	صناعة الغسيل	تحسين خصائص جميع العوامل	مناطق رافعة في آجار اللين FRET (BODIPY-FL-كازين)	مخطط العائلات	النشاط، التباين الحارزي، تحمل اللذيذات المحموضة، تغيرات الـ pH	سابيليسينات من -25 جنس ياسيلاس (Savimase)
[150]	صناعة أعلاف الحيوانات	انخفاض درجة الـ pH التل بحوالي 5، 10، 15 وحدة	بار-نيتروفيل ورسومات	خط التصميم الرتيب، التطوير موجه الوضع	تحسين النشاط في درجات الـ pH المنخفضة	فيتيز من أسبرجلاس فريجيلاس

الجدول رقم (11، 4). أمثلة مختارة من تحسين بالطرق البيولوجية المحفزة التطور الموجه.

المرجع	التطبيقات	الخاصية المحسنة	طريقة الفحص	طريقة التطهير	الهدف	الإيزيم (المصدر)
[١٥١]	تبيض اللب	زيادة التباين الحراري بـ ٤ إلى ٥ أضعاف عند ٢٠-٢٥ درجة	مناطق (ثلاثة) بيضاء في أطباق الأجار المحتوية على الزيلان مع الريازول بورينات بلو	التصميم المرجع التطهير موجه الموضع	تحمل الحرارة، تغير درجات الـ pH المثلي	زيلانين من ترايكودورما ريزي
[١٥٢، ١٥٣]	صناعة الأظفانية	تغير الـ pH من ٤ إلى ٢-٣، ١	طريقة فحص قاديانس المعالة (فارماسيا)	التصميم المرجع التطهير موجه الموضع	تغير درجات الـ pH التي النشاط النوعي والنشاط في درجات الـ pH القلوية	بيتا-أميلين من قول الصويا ألفا-أميلين من باسيلاس أميلوليكوفانثيانيس
[١٥٤]	صناعة النسيل	تحسين النشاط عند pH ١٠	طريقة فحص قاديانس المعالة (فارماسيا)	التطهير موجه الموضع، الخطط epPCR	تحسين النشاط مع الجلوكون في درجات الحرارة والـ pH المنخفضة	زيلوزاينزوميز من ثيرموتوجا نيموليككا
[١٥٥]	التحفيز الحيوي الصناعي	خفض درجة الحرارة، المثل (٢٠ درجة)، وزيادة النشاط بـ ١٢ ضعف	فحص الأطباق دقيقة المستوى باستخدام طريقة الرينزورسنيتول-جدايديك (NH ₄ SO ₄ /HCl)	EpPCR	تحسين مجموعة هيدروكسيل للألكانات قصيرة السلسلة مثل الأوكتان	P450 BM3
[١٥٦]	التحفيز الحيوي والتحلل الحيوي	التحسين بـ ١٠٠ ضعف الأوكتان، أسرع هيروكسيليز الألكان معروف حالياً	الاختبار مع منظر أو كنان، فحص استهلاك الـ NADH مع البروان	STEP, epPCR	ادخال مجموعة هيدروكسيل للألكانات العطرية	P450 BM3
[١٥٧]	التطبيقات غير المتناظر	تحسين الانتقائية الفراغية والتجسيمية في تخليق أوكسالون (إرس) و (أر)	فحص استهلاك الـ NADPH مع البروان	STEP, التطهير موجه الموقع، الخطط epPCR	ادخال مجموعة هيدروكسيل بأنتاغية فراغية وتحسسية للألكانات العطرية	P450 BM3
[١٥٨]	التحفيز الحيوي المركب	زيادة بـ ٥، ٥ ضعف في النشاط في الـ DMF، ١٠ ضعف في الـ THF	الأطباق دقيقة المستوى مع الـ PNCA واللدبيات الأنتوية	epPCR، التطهير العشوائي، الخطط SEP /	النشاط في اللدبيات العنقوية تخصصية وسط التفاعل	P450 BM3
[١٥٩]	التحلل الحيوي للملوثات القوية	تحسين النشاط تجاه البايثيلات عديدة الكلور، البنزين والتولوين	المحصن اللوني لأطباق الأجار باستخدام البايثيل أو PCB	الخطط	تحسين تحيول الثنائيل وتحليل اللدبيات الكلورة (TCE)	بايثيل دايلوكسيجينيز من باسيلاس سيباسيا/ يسودوموناس يسودوكاليجينيز تولوين مونوكسيجينيز من باسيلاس سيباسيا

المراجع	التطبيقات	الخاصية المحسنة	طريقة الفحص	طريقة التطوير	الهدف	الإنزيم (المصدر)
[١١٠]	تحليل اللزجات السامة والقرية	زيادة ٨ أضعاف في تنوع الهالوجين من ثلاثي كلور البروبان (TCDF)	مؤشر الـ pH	المطاط، epPCR	تحسين تحليل اللزجات الكلورية (TCP)	هالو ألكان ديهاي جينيز من جنس رودوكوكاس
[١١١]	إنتاج الأحماض الأمينية في الصورة دي صناعياً	زيادة البقايا الحراري والوكسد	مؤشر الـ pH	المطاط	البقايا الحراري والوكسد	إن-كاربانوبلايز من أسبرجلاس توميفاشيانس
[١٢٢، ١٢٣]	إنتاج المضادات الحيوية شبه المطافئة	زيادة ٣-١٠ أضعاف في نشاط الأوبيل أسيليز	فحص النمو (الاختبار على الأوبيل سيرين)	epPCR أو أيجو المرتفع، المطاط	مخصصة وسط التفاعل	جلوتاترايل أسيليز من جنس بسوموناس
[١٢٤]	التخليق الحيوي للمواد النرافية	تحسين في زيادة التآكل من ٨٢ إلى ٩٣٪، نشاط كاربوليجيز جديد على البتر المهيئات المستبدلة في الوضع أوردو	مؤشر الـ pH	EpPCR	مخصصة وسط التفاعل	بنز ويلفونومات ديكاريزوكسيليز من بسودوموناس بوتيلا
[١٢٥]	المعالجة الحيوية لمياه الصرف	تحسين النشاط تجاه الفوسفات العضوية	الفحص اللوني الأطلاق الأجار باستخدام نظير أوردو- كورمانوس	epPCR، المطاط، التطوير موجه الرفع	مخصصة وسط التفاعل	فوسفوتراي أستيريز من بسوموناس ديميتونا وأسبرجلاس رافوبياكتر
[١٣١]	تحليل مركب وسيط للبيبتوز	نشاط وانتقائية منتقاهات أعلى في محلول وسط تفاعل ٣ مولار	تعيين طيف الكتلة للمنتجات المختلفة المعلمة بالمطاط المشعة	GSSM	انتقائية المنتقاهات/ الانتاجية الحرجية	نيتز بلايز
[٢١، ٢٢]	إلغاء راسمية ألفا-ميثيل بنزيل أمين والأحماض المطافئة الثانوية	نشاط أعلى ٤٧ ضعف، انتقائية أعلى ٥،٨ ضعف	الفحص المزدوج مع بيروكسيد الفحل	سلالة مطفرة من إيشيريشيا القولون XII-Red	النشاط وانتقائية المنتقاهات الحرجية	موتو أمين أو كسيديز من أسبرجلاس نجر (MAO-N)
[٥٠]	تحليل مركب وسيط للبيبتوز	تحسين ٤٠٠٠ ضعف	اختبارات النشاط المختلفة	ProSAR التطوير المذوق ب-	الإنتاجية الحرجية	هالو هيدزين ديهاي جينيز (HHDH) من أجزوناكتريوم رادوبياكتر
[١٦٨-١٧١]	إنتاج مواد فرعي للكربويات الصيدانية والدقيقة	تحسين انتقائية منتقاهات يصل لـ ١٣ ضعف ضد NPGE-pH، وكذلك تجاه إيني كلوروهيدزين و ٢١- إيبوكسي هيكتان	محص أطباق الأجار وفحص النشاط تجاه إيثر الديرا- نيترو فينيل جليسيديل (pNPGF)	المطاط، epPCR	انتقائية المنتقاهات	إيبوكسيد هيدزوليز من أجزوناكتريوم رادوبياكتر

References المراجع

- Schoemaker, H.E., Mink, D., and Wubbolts, M.G. (2003) Dispelling the myths—biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, **299**, 1694–1697. [١]
- Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C. (2006) *Industrial Biotransformations*, 2nd edn, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. [٢]
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258–268. [٣]
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßler, M., Stürmer, R., and Zelinski, T. (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 788–824. [٤]
- Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 137–143. [٥]
- Kurtzmann, A.L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J.T., Heinrichs, V., and Patten, P.A. (2001) Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 361–370. [٦]
- Lutz, S. and Patrick, W.M. (2004) Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 291–297. [٧]
- Neylon, C. (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1448–1459. [٨]
- Otten, L.G. and Quax, W.J. (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.*, **22**, 1–9. [٩]
- Wong, T.S., Zhurina, D., and Schwaneberg, U. (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **9**, 271–288. [١٠]
- Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, **2**, 28–33. [١١]
- Leung, D.W., Chen, E., and Goeddel, D.V. (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, **1**, 11–15. [١٢]
- Patel, P.H., Kawate, H., Adman, E., Ashbach, M., and Loeb, L.A. (2001) A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5044–5051. [١٣]
- Biles, B.D. and Connolly, B.A. (2004) Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e176. [١٤]
- Bichet, A., Bureik, M., Lenz, N., and Bernhardt, R. (2004) The “Bringer” strategy: a very fast and highly efficient method for construction of mutant libraries by error-prone polymerase chain reaction of ring-closed plasmids. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **117**, 115–122. [١٥]
- Miyazaki, K. and Takenouchi, M. (2002) Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *BioTechniques*, **33**, 1033–1038. [١٦]
- Miyazaki, K. (2003) Creating random mutagenesis libraries by megaprimer PCR of whole plasmid (MEGAWHOP), in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, vol. **231** (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 23–28. [١٧]
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.*, **11**, 1095–1099. [١٨]
- Fujii, R., Kitaoka, M., and Hayashi, K. (2004) One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e145. [١٩]
- Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, **21**, 474–478. [٢٠]
- Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., and Turner, N.J. (2002) Deracemization of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 3177–3180. [٢١]
- Carr, R., Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., and Turner, N.J. (2003) Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 4807–4810. [٢٢]
- Bornscheuer, U.T., Enzelberger, M.M., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1998) Mutator strain *Epilurian coli* XL1-red generates variants. *Strategies*, **11**, 16–17. [٢٣]

- Stemmer, W.P.C. (1994) Rapid evolution of a protein by *in vitro* DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, **370**, 389–391. [٢٤]
- Zhao, H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 258–261. [٢٥]
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Plenkos, P.T., Squires, C.H., and Monticello, D.J. (2001) DNA shuffling methods for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 354–359. [٢٦]
- Ostermeier, M., Shim, J.H., and Benkovic, S.J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1205–1209. [٢٧]
- Lutz, S., Ostermeier, M., and Benkovic, S.J. (2001) Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e16. [٢٨]
- Ostermeier, M., and Lutz, S. (2003) The creation of ITCHY hybrid protein libraries, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols* (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 129–141. [٢٩]
- Short, J.M. (2003) Synthetic ligation reassembly in directed evolution, US Patent 6605449. [٣٠]
- Bittker, J.A., Le, B.V., Liu, J.M., and Liu, D.R. (2004) Directed evolution of protein enzymes using nonhomologous random recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 7011–7016. [٣١]
- Bittker, J.A., Le, B.V., and Liu, D.R. (2002) Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1024–1029. [٣٢]
- Udit, A.K., Silberg, J.J., and Sieber, V. (2003) Sequence homology-independent protein recombination, SHIPREC, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols* (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 153–164. [٣٣]
- Qian, Z. and Lutz, S. (2005) Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13466–13467. [٣٤]
- Qian, Z., Fields, C.J., and Lutz, S. (2007) Investigating the structural and functional consequences of circular permutation on lipase B from *Candida antarctica*. *ChemBioChem*. **8**, 1989–1996. doi: 10.1002/cbic.200700373. [٣٥]
- Wong, T.S., Roccatano, D., Zacharias, M., and Schwaneberg, U. (2006) A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.*, **355**, 858–871. [٣٦]
- Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2004) Computational challenges in combinatorial library design for protein engineering. *AIChE J.*, **50**, 262–272. [٣٧]
- Wong, T.S., Roccatano, D., and Schwaneberg, U. (2007) Steering directed protein evolution: Strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environ. Microbiol.*, **9**, 2645–2659. [٣٨]
- Patrick, W.M., Firth, A.E., and Blackburn, J.M. (2003) User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Eng. Des. Sel.*, **16**, 451–457. [٣٩]
- Firth, A.E. and Patrick, W.M. (2005) Statistics of protein library construction. *Bioinformatics*, **21**, 3314–3315. [٤٠]
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., and Benkovic, S.J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 11248–11253. [٤١]
- Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2002) Predicting out-of-sequence reassembly in DNA shuffling. *J. Theor. Biol.*, **219**, 9–17. [٤٢]
- Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2000) Modeling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. *J. Theor. Biol.*, **205**, 483–503. [٤٣]
- Moore, G.L., Maranas, C.D., Lutz, S., and Benkovic, S.J. (2001) Predicting crossover generation in DNA shuffling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 3226–3231. [٤٤]
- Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2003) Identifying residue-residue clashes in protein hybrids by using a second-order mean-field approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 5091–5096. [٤٥]
- Adamczak, M. and Krishna, S.H. (2004) Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.*, **42**, 251–264. [٤٦]
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D., and Vogel, A. (2006) Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7745–7751. [٤٧]
- Reetz, M.T. and Carballeira, J.D. (2007) Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Biotechnol.*, **2**, 891–903. [٤٨]

- Reetz, M.T., Wang, L.W., and Bocola, M. (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1236–1241, Erratum 2494. [٤٩]
- Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A., and Huisman, G.W. (2007) Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 338–344. [٥٠]
- Hiraga, K. and Arnold, F.H. (2003) General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis. *J. Mol. Biol.*, **330**, 287–296. [٥١]
- O' Maille, P.E., Bakhtina, M., and Tsai, M.D. (2000) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.*, **321**, 677–691. [٥٢]
- Reymond, J.L. (2005) *Enzyme Assays*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. [٥٣]
- Bornscheuer, U.T. (2004) High-throughput-screening systems for hydrolases. *Eng. Life Sci.*, **4**, 539–542. [٥٤]
- Schmidt, M. and Bornscheuer, U.T. (2005) High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol. Eng.*, **22**, 51–56. [٥٥]
- Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 535–544. [٥٦]
- Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) Novel methods for biocatalyst screening. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **5**, 152–158. [٥٧]
- Goddard, J.P. and Reymond, J.L. (2004) Recent advances in enzyme assays. *Trends Biotechnol.*, **22**, 363–370. [٥٨]
- Soumillon, P. (2004) Selection of phage-displayed enzymes, in *Evolutionary Methods in Biotechnology. Clever Tricks for Directed Evolution* (ed. A. Schwienhorst), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 47–64. [٥٩]
- Danielsen, S., Eklund, M., Deussen, H.J., Graslund, T., Nygren, P.A., and Borchert, T.V. (2001) *In vitro* selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor. *Gene*, **272**, 267–274. [٦٠]
- Schultheiss, E., Paar, C., Schwab, H., and Jose, J. (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **18**, 89–97. [٦١]
- Olsen, M.J., Stephens, D., Griffiths, D., Daugherty, P., Georgiou, G., and Iverson, B.L. (2000) Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1071–1074. [٦٢]
- Becker, S., Schmoldt, H.U., Adams, T.M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004) Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 323–329. [٦٣]
- Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett.*, **579**, 1177–1182. [٦٤]
- Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2007) Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *ChemBioChem*, **8**, 943–949. [٦٥]
- Lorenz, P. and Eck, J. (2004) Screening for novel industrial biocatalysts. *Eng. Life Sci.*, **4**, 501–504. [٦٦]
- Reetz, M.T. and Rüggeberg, C.J. (2002) A screening system for enantioselective enzymes based on differential cell growth. *Chem. Commun.*, 1428–1429. [٦٧]
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Sterner, R. (2000) Directed evolution of a (beta alpha)(8)-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 9925–9930. [٦٨]
- MacBeath, G., Kast, P., and Hilvert, D. (1998) Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science*, **279**, 1958–1961. [٦٩]
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P.C. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, **391**, 288–291. [٧٠]
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1999) Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2169–2173. [٧١]

- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1998) Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 554–559. [٧٢]
- Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z.L., and Arnold, F.H. (1999) A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chem. Biol.*, **6**, 699–706. [٧٣]
- Matsumura, I., Wallingford, J.B., Surana, N.K., Vize, P.D., and Ellington, A.D. (1999) Directed evolution of the surface chemistry of the reporter enzyme beta-glucuronidase. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 696–701. [٧٤]
- Joo, H., Lin, Z.L., and Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, **399**, 670–673. [٧٥]
- Bylina, E.J., Coleman, W.J., Dilworth, M.R., Robles, S.J., Tanner, M.A., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (2000) Solid-phase enzyme screening. *ASM News*, **66**, 211–217. [٧٦]
- Babiak, P. and Reymond, J.L. (2005) A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support. *Anal. Chem.*, **77**, 373–377. [٧٧]
- Baumann, M., St ü rmer, R., and Bornscheuer, U.T. (2001) A high-throughput-screening method for the identification of active and enantioselective hydrolases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 4201–4204. [٧٨]
- Schmidt, M., Hasenpusch, D., K ä hler, M., Kirchner, U., Wiggenghorn, K., Langel, W., and Bornscheuer, U.T. (2006) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBioChem*, **7**, 805–809. [٧٩]
- Grognux, J., Wahler, D., Nyfeler, E., and Reymond, J.L. (2004) Universal chromogenic substrates for lipases and esterases. *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 2981–2989. [٨٠]
- Klein, G. and Reymond, J.L. (1998) An enantioselective fluorimetric assay for alcohol dehydrogenases using albumin-catalyzed beta-elimination of umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1113–1116. [٨١]
- Leroy, E., Bensel, N., and Reymond, J.L. (2003) A low background high-throughput screening (HTS) fluorescence assay for lipases and esterases using acyloxymethylethers of umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2105–2108. [٨٢]
- Grognux, J. and Reymond, J.L. (2004) Classifying enzymes from selectivity fingerprints. *ChemBioChem*, **5**, 826–831. [٨٣]
- Wahler, D., Boujard, O., Lefevre, F., and Reymond, J.L. (2004) Adrenaline profiling of lipases and esterases with 1,2-diol and carbo-hydrate acetates. *Tetrahedron*, **60**, 703–710. [٨٤]
- Wahler, D. and Reymond, J.L. (2002) The adrenaline test for enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1229–1232. [٨٥]
- Janes, L.E. and Kazlauskas, R.J. (1997) Quick E. A fast spectroscopic method to measure the enantioselectivity of hydrolases. *J. Org. Chem.*, **62**, 4560–4561. [٨٦]
- Somers, N.A. and Kazlauskas, R.J. (2004) Mapping the substrate selectivity and enantioselectivity of esterases from thermophiles. *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 2991–3004. [٨٧]
- Liu, A.M.F., Somers, N.A., Kazlauskas, R.J., Brush, T.S., Zocher, F., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Horsman, G.P., Mezzetti, A., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R.D. (2001) Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenuatus* and *Phiostruma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*. *Tetrahedron Asymmetry*, **12**, 545–556. [٨٨]
- Horsman, G.P., Liu, A.M.F., Henke, E., Bornscheuer, U.T., and Kazlauskas, R.J. (2003) Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase toward methyl 3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3-phenylbutyrate. *Chem. Eur. J.*, **9**, 1933–1939. [٨٩]
- Reetz, M.T., Kühling, K.M., Wilensek, S., Husmann, H., Häusig, U.W., and Hermes, M. (2001) A GC-based method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Catal. Today*, **67**, 389–396. [٩٠]
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Klein, H.W., and Stöckigt, D. (1999) A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1758–1761. [٩١]
- Reetz, M.T., Kühling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H., and Belder, D. (2000) Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3891–3893. [٩٢]
- Fibla, J. and Gonzalezduarte, R. (1993) Colorimetric assay to determine alcohol-dehydrogenase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **26**, 87–93. [٩٣]

- Mayer, K.M. and Arnold, F.H. (2002) A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates. *J. Biomol. Screen.*, **7**, 135–140. [٩٤]
- Tsotsou, G.E., Cass, A.E.G., and Gilardi, G. (2002) High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bio-electron.*, **17**, 119–131. [٩٥]
- Yang, G.Y. and Shamsuddin, A.M. (1996) Gal-GalNAc: a biomarker of colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.*, **11**, 801–806. [٩٦]
- Gabler, M., Hensel, M., and Fischer, L. (2000) Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 605–611. [٩٧]
- Zhu, Z., Wang, M., Gautam, A., Nazor, J., Momeu, C., Prodanovic, R., and Schwaneberg, U. (2007) Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. *Biotechnol. J.*, **2**, 241–248. [٩٨]
- Lin, Z.L., Thorsen, T., and Arnold, F.H. (1999) Functional expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 467–471. [٩٩]
- Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A.H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 379–384. [١٠٠]
- Morawski, B., Quan, S., and Arnold, F.H. (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 99–107. [١٠١]
- Iffl and, A., Gendreizig, S., Tafelmeyer, P., and Johnsson, K. (2001) Changing the substrate specificity of cytochrome c peroxidase using directed evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 126–132. [١٠٢]
- Wilming, M., Iffland, A., Tafelmeyer, P., Arrivoli, C., Saudan, C., and Johnsson, K. (2002) Examining reactivity and specificity of cytochrome c peroxidase by using combinatorial mutagenesis. *ChemBioChem*, **3**, 1097–1104. [١٠٣]
- Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, M., Schmitt, J., Pleiss, J., Lutz-Wahl, S., and Schmid, R.D. (2001) Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. *Biochim. Biophys Acta*, **1545**, 114–121. [١٠٤]
- Wong, T.S., Arnold, F.H., and Schwaneberg, U. (2004) Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 351–358. [١٠٥]
- Farinas, E.T., Schwaneberg, U., Glieder, A., and Arnold, F.H. (2001) Directed evolution of cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 601–606. [١٠٦]
- Tee, K.L. and Schwaneberg, U. (2006) A screening system for the directed evolution of epoxidases: importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxidation. *Angew. Chem. Int Ed.*, **45**, 5380–5383. [١٠٧]
- Reisinger, C., van Assema, F., Schürmann, M., Hussain, Z., Remler, P., and Schwab, H. (2006) A versatile colony assay based on NADH fluorescence. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **39**, 149–155. [١٠٨]
- Selmar, D., Catvalho, F.J.P., and Conn, E.E. (1987) A colorimetric assay for α -hydroxynitrile lyase. *Anal. Biochem.*, **166**, 208–211. [١٠٩]
- K ö nig, W. (1904) *J. Prakt. Chem.*, **69**, 105–137. [١١٠]
- Andexer, J., Guterl, J.K., Pohl, M., and Eggert, T. (2006) A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. *Chem. Commun.*, 4201–4203. [١١١]
- Feigl, F. and Anger, V. (1966) Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetra base as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst*, **91**, 282–284. [١١٢]
- Krammer, B., Rumbold, K., Tschemmernegg, M., Pöchlauer, P., and Schwab, H. (2006) A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening. *J. Biotechnol.*, **129**, 151–161. [١١٣]
- Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 458–467. [١١٤]
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.O., and Arnold, F.H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 12809–12813. [١١٥]
- Henke, E., Bornscheuer, U.T., Schmid, R.D., and Pleiss, J. (2003) A molecular mechanism of enantio-recognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *ChemBioChem*, **4**, 485–493. [١١٦]
- Heinze, B., Kourist, R., Fransson, L., Hult, K., and Bornscheuer, U.T. (2007) Highly enantioselective kinetic resolution of two tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 125–131. [١١٧]

- Kourist, R., Bartsch, S., and Bornscheuer, U.T. (2007) Highly enantioselective synthesis of arylaliphatic tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1393–1398. [١١٨]
- Bartsch, S., Kourist, R., and Bornscheuer, U.T. (2008) Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chem Int. Ed. Engl.*, **47**, 1508–1511. [١١٩]
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., and Jaeger, K.E. (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.*, **7**, 709–718. [١٢٠]
- Reetz, M.T., Wilensek, S., Zha, D., and Jaeger, K.E. (2001) Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 3589–3591. [١٢١]
- Reetz, M.T., Puls, M., Carballeira, J.D., Vogel, A., Jaeger, K.E., Eggert, T., Thiel, W., Bocola, M., and Otte, N. (2007) Learning from directed evolution: further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem*, **8**, 106–112. [١٢٢]
- Henke, E. and Bornscheuer, U.T. (1999) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.*, **380**, 1029–1033. [١٢٣]
- Anderson, E.M., Larsson, K.M., and Kirk, O. (1998) One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransformation*, **16**, 181–204. [١٢٤]
- Zhang, N., Suen, W.C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2003) Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Eng.*, **16**, 599–605. [١٢٥]
- Suen, W.C., Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2004) Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Eng., Des. Sel.*, **17**, 133–140. [١٢٦]
- Koga, Y., Kato, K., Nakano, H., and Yamane, T. (2003) Inverting enantioselectivity of *Butkholderia cepacia* KWI-56 Lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and *in vitro* expression. *J. Mol. Biol.*, **331**, 585–592. [١٢٧]
- van Kampen, M.D., and Egmond, M.R. (2000) Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**, 717–726. [١٢٨]
- Kauffmann, I., and Schmidt-Dannert, C. (2001) Conversion of *Bacillus thermocatenuatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. *Protein Eng.*, **14**, 919–928. [١٢٩]
- Joerger, R.D., and Haas, M.J. (1994) Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids*, **29**, 377–384. [١٣٠]
- DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Tan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K., and Burk, M.J. (2003) Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11476–11477. [١٣١]
- Gray, K.A., Richardson, T.H., Kretz, K., Short, J.M., Bartnek, F., Knowles, R., Kan, L., Swanson, P.E., and Robertson, D.E. (2001) Rapid evolution of reversible denaturation and elevated melting temperature in a microbial haloalkane dehalogenase. *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 607–617. [١٣٢]
- Short, J.M. (2001) Saturation mutagenesis in directed evolution, US Patent 6171820. [١٣٣]
- Breuer, M. and Hauer, B. (2003) Carbon-carbon coupling in biotransformation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 570–576. [١٣٤]
- Fessner, W.D. (2000) Enzymatic synthesis using aldolases, in *Stereoselective Biocatalysis* (ed. R.N. Patel), Marcel Dekker, New York, pp. 239–265. [١٣٥]
- Liu, J., Hsu, C.C., and Wong, C.H. (2004) Sequential aldol condensation catalyzed by DERA mutant Ser238Asp and a formal total synthesis of atorvastatin. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2439–2441. [١٣٦]
- Jennwein, S., Schürmann, M., Wolberg, M., Hilker, I., Luiten, R., Wubbolts, M., and Mink, D. (2006) Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.*, **1**, 537–548. [١٣٧]
- Greenberg, W.A., Varvak, A., Hanson, S.R., Wong, K., Huang, H., Chen, P., and Burk, M.J. (2004) Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 5788–5793. [١٣٨]

- Sugiyama, M., Hong, Z., Greenberg, W.A., and Burk, M.J. (2007) *In vivo*. selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose - 1-phosphate aldolase (Rha D). *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5905–5911. [١٣٩]
- Fong, S., Machajewski, T.D., Mak, C.C., and Wong, C.H. (2000) Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D-and L-sugars. *Chem. Biol.*, **7**, 873–883. [١٤٠]
- Ran, N. and Frost, J.W. (2007) Directed evolution of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6130–6139. [١٤١]
- Dean, S.M., Greenberg, W.A., and Burk, M.J. (2007) Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1308–1320. [١٤٢]
- Samland, A. and Sprenger, G.A. (2006) Microbial aldolases as C-C bonding enzymes—unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 253–264. [١٤٣]
- Franke, D., Hsu, C.C., and Wong, C.H. (2004) Directed evolution of aldolases. *Methods Enzymol.* **388**, 224–238. [١٤٤]
- Kim, J.S., Choi, G.S., Kim, S.B., Kim, W.H., Lee, J.Y., Ryu, Y.W., and Kim, G.J. (2004) Enhanced thermostability and tolerance of high substrate concentration of an esterase by directed evolution. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **27**, 169–175. [١٤٥]
- May, O., Nguyen, P.T., and Arnold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 317–320. [١٤٦]
- Miyazaki, K., Wintrobe, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N., and Arnold, F.H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.*, **297**, 1015–1026. [١٤٧]
- Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P.C., and Minshull, J. (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 893–896. [١٤٨]
- Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., and Minshull, J. (2002) Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1251–1255. [١٤٩]
- Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, D., Lassen, S.F., Burger, D., Kronenberger, A., van Loon, A.P.G.M., Pasamontes, L., and Wyss, M. (2002) Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1907–1913. [١٥٠]
- Turunen, O., Vuorio, M., Fenel, F., and Leisola, M. (2002) Engineering of multiple arginines into Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng.*, **15**, 141–145. [١٥١]
- Hirata, A., Adachi, M., Utsumi, S., and Mikami, B. (2004) Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* β -amylase: conversion of the pH optimum from abacterial type to a higher-plant type. *Biochemistry*, **43**, 12523–12531. [١٥٢]
- Hirata, A., Adachi, M., Sekine, A., Kang, Y.N., and Utsumi, S. (2004) Structural and enzymatic analysis of soybean β -amylase with increased pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7287–7295. [١٥٣]
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H., and Schmid, R.D. (2003) Directed evolution of a bacterial α -amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Sci.*, **12**, 2141–2149. [١٥٤]
- Sriprapundh, D., Vieille, C., and Zeikus, J.G. (2003) Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng.*, **16**, 683–690. [١٥٥]
- Glieder, A., Farinas, E.T., and Arnold, F.H. (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1135–1139. [١٥٦]
- Peters, M.W., Meinhold, P., Glieder, A., and Arnold, F.H. (2003) Regio-and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13442–13450. [١٥٧]
- Bruhlmann, F. and Chen, W. (1999) Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 544–551. [١٥٨]
- Canada, K.A., Iwashita, S., Shim, H., and Wood, T.K. (2002) Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.*, **184**, 344–349. [١٥٩]
- Bosma, T., Damborsky, J., Stucki, G., and Janssen, D.B. (2002) Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3582–3587. [١٦٠]

- Oh, K.H., Nam, S.H., and Kim, H.S. (2002) Improvement of oxidative and thermostability of *N*-carbonyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng.*, **15**, 689–695. [١٦١]
- Otten, L.G., Sio, C.F., Vrieling, J., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2002) Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the beta-subunit. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42121–42127. [١٦٢]
- Sio, C.F., Riemens, A.M., van der Laan, J.M., Verhaert, R.M.D., and Quax, W.J. (2002) Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4495–4504. [١٦٣]
- Lingen, B., Kolter-Jung, D., Dunkelmann, P., Feldmann, R., Grotzinger, J., Pohl, M., and Muller, M. (2003) Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution. *ChemBioChem*, **4**, 721–726. [١٦٤]
- Yang, H., Carr, P.D., McLoughlin, S.Y., Liu, J.W., Horne, I., Qiu, X., Jeffries, C.M.J., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., and Ollis, D.L. (2003) Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.*, **16**, 135–145. [١٦٥]
- Carr, R., Alexeeva, M., Dawson, M.J., Gotor-Fernandez, V., Humphrey, C.E., and Turner, N.J. (2005) Directed evolution of an amine oxidase for the preparative deracemisation of cyclic secondary amines. *ChemBioChem*, **6**, 637–639. [١٦٦]
- Alexeeva, M., Carr, R., and Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes: new biocatalysts for asymmetric synthesis. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 4133–4137. [١٦٧]
- Genzel, Y., Archelas, A., Spelberg, J.H.L., Janssen, D.B., and Furstoss, R. (2001) Microbiological transformations. Part 48: Enantioselective bihydrolysis of 2-, 3- and 4-pyridyloxirane at high substrate concentration using the *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolase and its Tyr215Phe mutant. *Tetrahedron*, **57**, 2775–2779. [١٦٨]
- Spelberg, J.H.L., Rink, R., Archelas, A., Furstoss, R., and Janssen, D.B. (2002) Biocatalytic potential of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 and a mutant with enhanced enantioselectivity. *Adv. Synth. Catal.*, **344**, 980–985. [١٦٩]
- Rink, R., Spelberg, J.H.L., Pieters, R.J., Kingma, J., Nardini, M., Kellogg, R.M., Dijkstra, B.W., and Janssen, D.B. (1999) Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7417–7418. [١٧٠]
- van Loo, B., Spelberg, J.H.L., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., and Janssen, D.B. (2004) Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem. Biol.*, **11**, 981–990. [١٧١]