

文章编号:1673-1689(2011)06-0801-05

脂肪酶氨基酸及其二联体与最适温度的相关性分析

李剑芳¹, 张慧敏¹, 邬敏辰^{*2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于 34 条微生物脂肪酶序列, 用多元逐步回归法分析了影响脂肪酶最适温度的氨基酸及其二联体。结果表明: 与最适温度呈正相关性的氨基酸是 Y, 负相关性的有 I、S、K; 呈正相关性的氨基酸二联体有 IR、KS、NY、SA、ST 和 YR, 负相关性的有 DK、DY、IS、KA、WS、YS 和 QI。通过对相关性氨基酸二联体在耐热和不耐热脂肪酶中空间位置的分析发现: 与最适温度呈正相关性的氨基酸二联体多数位于 α -螺旋区, 且分布在酶蛋白表面; 而呈负相关性的多数位于 β -折叠区和无规则卷曲区, 一般分布于酶蛋白内部, 并常出现在多肽链的 N 或 C 端。

关键词: 脂肪酶; 氨基酸二联体; 热稳定性; 最适温度; 多元逐步回归法

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

The Relationship Between Amino Acid and Its Dipeptide with the Optimum Temperature in Lipase

LI Jian-fang¹, ZHANG Hui-min¹, WU Min-chen^{*2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on the lipase sequences from 34 kinds of strain, the relation between amino acids and dipeptides with the optimum temperature were built by a stepwise regression method. The results showed that the positively correlated amino acid was Y, while the negatively correlated ones were I, S and K, and that the positive dipeptides were IR, KS, NY, SA, ST, YR, whereas the negative ones were DK, DY, IS, KA, WS, YS, QI. Through analysis of position information of the related dipeptides in thermophilic and mesophilic lipases, it was found that most positive dipeptides were sited in the α -helix and on the surface of lipases, whereas most negative ones were located in the β -strand or coil, which distributed in buried regions of lipases and often existed in the N or C terminus of lipase chains.

Key words: lipase, dipeptide, thermostability, optimum temperature, stepwise regression method

收稿日期: 2010-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776061)。

作者简介: 李剑芳(1965—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。

Email: lijf@163.com

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。Email: bioch@163.com

脂肪酶(Lipase, EC 3. 1. 1. 3)早已广泛应用于洗涤剂、食品、造纸、香料、医药、纺织、废物处理、化妆品、有机合成和生物柴油等领域^[1-2]。由于多数天然脂肪酶不耐高温,从而限制了它们在高温生物加工环境中的应用。为了提高脂肪酶热稳定性,定点突变^[3]和定向进化^[4]等蛋白质工程技术已被用于酶热稳定性的改造。

目前,采用耐热与不耐热蛋白质之间基因序列或晶体结构的比对等方法,掌握了一些影响蛋白质热稳定性的因素^[5-6]。由于各种蛋白家族拥有不同的热稳定机制,且测定的晶体结构数量有限,所以很难获得统一的策略来提高蛋白质热稳定性。热稳定性并没有一个明确的定义或指标,通常是指蛋白质在一定温度下保持其空间构象的能力。该情况导致在对热稳定性指标的选择上存在诸多可能性,如采用蛋白质半衰期温度或来源微生物最适生长温度。对于半衰期温度,在酶学性质文献中很少报道,数据难以收集;采用最适生长温度表示酶热稳定性,很难反映酶本身的特定属性,且存在很大差距。酶热稳定性是酶蛋白的一种属性,而酶最适温度(T_{opt})在一定程度上反映了该属性^[7],且 T_{opt} 数在文献中常见报道,因此我们选用脂肪酶最适温

度作为酶热稳定性的指标。

Anfinsen 的蛋白质折叠原理指出蛋白质空间结构信息完全包含在其氨基酸序列之中^[8]。一直以来人们就认为蛋白质热稳定性与其氨基酸组成有关^[9],同时受氨基酸之间相互作用的影响^[4]。基于这种认识,作者拟采用多元逐步回归法分析脂肪酶氨基酸及其二联体与酶 T_{opt} 的相关性。由此分析结果不仅能确定与脂肪酶热稳定性相关性氨基酸,而且还可以从有代表性的脂肪酶晶体结构中找到相关性氨基酸二联体所处的空间位置。通过分析相关性氨基酸在耐热和不耐热脂肪酶中的空间位置,能为脂肪酶热稳定机制的阐明、热稳定性的蛋白质工程改造等奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 脂肪酶最适温度数据库的构建

从 Swiss-Prot 蛋白质数据库中收集微生物脂肪酶序列,然后查阅相关文献来查找对应的脂肪酶最适温度(T_{opt}),经过筛选和整理,获得了 34 个具备最适温度数据的脂肪酶序列,见表 1。

表 1 Swiss-Prot 中 34 个脂肪酶的实测最适温度及计算最适温度

Tab. 1 The value of measured and calculated optimum temperatures of 34 lipases in Swiss-Prot

序列号	来源微生物	$T_{\text{opt}}/^{\circ}\text{C}$	氨基酸最优回归方程		二联体最优回归方程	
			$T_{\text{cal}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta(T_{\text{opt}} - T_{\text{cal}})$	$T_{\text{cal}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta(T_{\text{opt}} - T_{\text{cal}})$
Q2QFX1	<i>Rhizopus oryzae</i>	37	29.81	7.19	36.4	0.6
P61871	<i>Rhizopus niveus</i>	35	27.93	7.07	35.26	-0.26
A3FM73	<i>Rhizopus chinensis</i>	35	41.53	-6.53	35.18	-0.18
P19515	<i>Rhizomucor miehei</i>	60	45.72	14.28	59.9	0.1
O59952	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	45	37.97	7.03	45.55	-0.55
P79066	<i>Geotrichum fermentans</i>	35	45.47	-10.47	38.01	-3.01
P17573	<i>Geotrichum candidum</i>	35	44.77	-9.77	34.13	0.87
Q02351	<i>Fusarium heterosporum</i>	47.5	38.61	8.89	44.07	3.43
A8QM10	<i>Antrodia cinnamomea</i>	37	36.4	0.6	35.74	1.26
A7UM95	<i>Aureobasidium pullulans</i>	35	43.58	-8.58	34	1
Q5XTQ4	<i>Botrytis cinerea</i>	32.5	38.29	-5.79	29.54	2.96
Q9P451	<i>Penicillium cyclopium</i>	25	33.05	-8.05	27.41	-2.41
Q7Z9K8	<i>Penicillium allii</i>	25	37.12	-12.12	25.5	-0.5
Q0ZAX7	<i>Aspergillus niger</i> F044	45	39.77	5.23	47.12	-2.12
B8YIE6	<i>Aspergillus niger</i> F044	50	50.11	-0.11	48.32	1.68
Q9P8F7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	40	33.16	6.84	40.09	-0.09
Q872L4	<i>Yarrowia lipolytica</i>	40	46.44	-6.44	41.19	-1.19

续表 1

序号	来源微生物	$T_{\text{opt}}/^\circ\text{C}$	氨基酸最优回归方程		二联体最优回归方程	
			$T_{\text{cal}}/^\circ\text{C}$	$\Delta(T_{\text{opt}} - T_{\text{cal}})$	$T_{\text{cal}}/^\circ\text{C}$	$\Delta(T_{\text{opt}} - T_{\text{cal}})$
Q872L3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	45	44.66	0.34	46.92	-1.92
P20261	<i>Candida rugosa</i>	37.5	34.31	3.19	39.12	-1.62
Q5GMI6	<i>Arxula adeninivorans</i>	30	39.81	-9.81	30.63	-0.63
Q9EV86	<i>Pseudomonas fragi</i>	29	35.42	-6.42	29.94	-0.94
P22088	<i>Pseudomonas cepacia</i>	57.5	55.52	1.98	58.35	-0.85
P26876	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	40.23	9.77	51.3	-1.3
P26504	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50	40.07	9.93	48.2	1.8
Q2TPV1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	45	40.33	4.67	44.59	0.41
Q93MW7	<i>Streptomyces rimosus</i>	55	46.49	8.51	53.03	1.97
Q93J06	<i>Streptomyces coelicolor</i>	50	49.55	0.45	52.6	-2.6
Q9S2A5	<i>Streptomyces coelicolor</i>	25	41.36	-16.36	24.23	0.77
P37957	<i>Bacillus subtilis</i>	35	37.44	-2.44	32.73	2.27
Q79F14	<i>Bacillus subtilis</i>	37	38.08	-1.08	36.84	0.16
Q9L6D3	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	55	55.67	-0.67	55.34	-0.34
O66015	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	62.5	57.75	4.75	61.36	1.14
Q59260	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	60	55.53	4.47	58.98	1.02
P40600	<i>Aeromonas hydrophila</i>	37	37.45	-0.45	37.63	-0.63

注: T_{opt} 为实测最适温度; T_{cal} 为计算最适温度; $\Delta(T_{\text{opt}} - T_{\text{cal}})$ 为实测与计算最适温度之差值。

1.2 与脂肪酶最适温度相关的氨基酸

采用 DNAMAN 软件(6.0 版本)计算各条脂肪酶序列中的氨基酸含量。以氨基酸百分含量为自变量,对应的 T_{opt} 为因变量,用 SAS 软件(8.1 版本)中的逐步回归法进行分析,从而找到与脂肪酶最适温度有显著相关性的氨基酸。根据最优回归方程,可获得脂肪酶的计算最适温度(T_{cal})。

1.3 与脂肪酶最适温度有关的氨基酸二联体

利用 Delphi 语言编程计算各条脂肪酶序列中的氨基酸二联体个数;基于 1.2 中获得的相关性氨基酸,利用 Python 语言编程从所有氨基酸二联体中筛选出含相关性氨基酸的二联体;用 SAS 软件(8.1 版本)中的逐步回归法对氨基酸二联体个数与最适温度进行多元逐步回归分析,找到与脂肪酶最适温度有显著相关性的氨基酸二联体。根据氨基酸二联体最优回归方程,可获得脂肪酶的计算最适温度(T_{cal})。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶最适温度数据库的分析

我们发现源自于同一种微生物的不同脂肪酶

具有各自的最适温度,如 *Streptomyces coelicolor* 的 Q93J06 和 Q9S2A5,最适温度分别为 50 $^\circ\text{C}$ 和 25 $^\circ\text{C}$ ^[10],类似情况也发生在 *Aspergillus niger* F044, *Yarrowia lipolytica*, *Bacillus subtilis* 和 *Bacillus stearothermophilus*,见表 1。这些现象表明,微生物最适生长温度并不能作为脂肪酶热稳定性的指标。从有关文献中可知酶的最适温度与热稳定性同步^[9],虽然以最适温度作为热稳定性指标也存在因测量方法不同引起的误差,但该指标同半衰期温度或最适生长温度等指标相比已有了很大改善,且具有易在文献中查到的优越性。

2.2 氨基酸的最优回归方程

以脂肪酶氨基酸百分含量为自变量,对应的 T_{opt} 为因变量,经过多元逐步回归法分析得到氨基酸最优回归方程。根据 F -检验,方程中每个变量均达到显著水平($P_r < 0.15$),而所得回归方程是高度显著的($P_r < 0.001$);回归方程中各回归系数保留小数点后面二位有效数字。

$$T_{\text{cal}} = 51.6 - 4.07[\text{I}] - 2.86[\text{K}] - 1.28[\text{S}] + 7.02[\text{Y}] \quad (R = 0.49) \quad (1)$$

由方程(1)可见,与脂肪酶最适温度有相关性的氨基酸是 I、K、S 和 Y。其中呈正相关性的氨基

酸是 Y, 呈负相关性的有 I、K 和 S。计算每个脂肪酶的 T_{cal} , 并与文献中查到的 T_{opt} 相比较, 结果如表 1 所示。其中有 4 个脂肪酶的计算结果与实验数据的差距较大 ($|\Delta(T_{opt} - T_{cal})| > 10\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

2.3 氨基酸二联体的最优回归方程

以脂肪酶氨基酸二联体个数为自变量, 对应的 T_{opt} 为因变量, 经过多元逐步回归法分析得到氨基酸二联体最优回归方程。方程中每个变量均达到显著水平 ($P_r < 0.15$), 而所得回归方程是高度显著的 ($P_r < 0.0001$); 回归方程中各回归系数保留小数点后二位有效数字。

$$T_{cal} = 49.16 + 4.18 [\text{IR}] + 4.88 [\text{KS}] + 6.02 [\text{NY}] + 1.02 [\text{SA}] + 1.62 [\text{ST}] + 3.45 [\text{YR}] - 4.48 [\text{DK}] - 3.41 [\text{DY}] - 3.78 [\text{IS}] - 2.71 [\text{KA}] - 4.49 [\text{QI}] - 11.35 [\text{WS}] - 3.43 [\text{YS}] \quad (R = 0.98) \quad (2)$$

由方程(2)可见, 与脂肪酶最适温度呈正相关性的氨基酸二联体有 IR、KS、NY、SA、ST 和 YR, 呈负相关性的有 DK、DY、IS、KA、QI、WS 和 YS。将每个脂肪酶的 T_{cal} 与文献中查到的 T_{opt} 相比较 (表 1)。结果表明氨基酸二联体最优回归方程的准确性较高。

2.4 相关性氨基酸二联体的分析

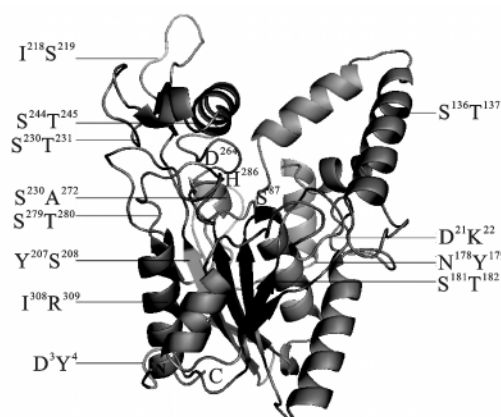
由方程(2)可知, 当正相关性氨基酸二联体增加、负相关性氨基酸二联体减少时, 脂肪酶热稳定性将提高。从 13 种氨基酸二联体组成上发现, 一种氨基酸对热稳定性的影响会因邻近氨基酸不同而改变, 如 I 在 IR 中起到有利影响, 在 IS 和 QI 中起到不利影响, 在 K、S 和 Y 中也存在该现象。这说明一种氨基酸与邻近氨基酸的相互作用以及在蛋白质中的不同位置均可能对热稳定性有影响^[11]。

对脂肪酶热稳定性有利的氨基酸二联体 YR 和 NY, 推测是精氨酸与天冬酰胺之间形成的氢键和酪氨酸之间形成的疏水作用的原因; ST 和 SA 可能是由于极性较强的苏氨酸或较小侧链的丙氨酸所起的作用; KS 可能是由于赖氨酸和丝氨酸之间形成的氢键作用; IR 是由于含有带正电荷能形成盐键的精氨酸。起不利作用的氨基酸二联体 WS 和 YS, 推测是由于 S 的柔性作用或由于 Y 和 W 都有增加构象空间位阻作用的较大侧链; QI 可能是含有在高温条件下会发生脱氨基作用的谷氨酰胺, 其它负相关性的氨基酸二联体 DK、DY、IS 和 KA 可能与它们在空间中的位置有关。

2.5 氨基酸二联体空间位置的分析

选择两个最适温度相差较大的脂肪酶晶体结

构进行比对分析。其中: *Pseudomonas cepacia* 嗜热脂肪酶 (PDB: 2LIP), 最适温度为 $57.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[12]; *Bacillus subtilis* 常温脂肪酶 (PDB: 1ISP), 最适温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[13]。采用 PYMOL 软件处理, 分别标注了 *P. cepacia* 脂肪酶 (PCL) 和 *B. subtilis* 脂肪酶 (BSL) 晶体结构中热稳定性相关的氨基酸二联体的空间位置 (图 1 和图 2)。比对后发现, 在 PCL 中比 BSL 多 4 个正相关性的二联体, 少 3 个负相关性的二联体; 在这两个结构中, 与酶热稳定性呈正相关性的氨基酸二联体多数位于 α -螺旋区, 反之呈负相关性的氨基酸二联体多数位于 β -折叠片和无规则卷曲区域。在嗜热 PCL 晶体结构中, 呈正相关性的 S¹³⁶T¹³⁷、N¹⁷⁸Y¹⁷⁹、S²⁴⁴T²⁴⁵、S²⁷¹A²⁷² 和 I³⁰⁸R³⁰⁹ 分别位于第 5、7、9、10 和 11 个 α -螺旋区; 而呈负相关性的 D³Y⁴、D²¹K²²、Y²⁰⁷S²⁰⁸ 和 I²¹⁸S²¹⁹ 分别位于不同的 β -折叠片和无规则卷曲区域 (图 1)。在常温 BSL 晶体结构中, 呈正相关性的 K²³S²⁴、N⁴⁸Y⁴⁹ 和 N¹³⁸Y¹³⁹ 分别位于第 1、2 和 4 个 α -螺旋区; 而呈负相关性的 Y¹²⁹S¹³⁰ 和 Q¹⁵⁰I¹⁵¹ 位于第 5 和第 6 个 β -折叠片, D⁴³K⁴⁴ 和 K¹¹²A¹¹³ 则位于不同的无规则卷曲区域 (图 2)。有报道称 (α -螺旋区能增加蛋白质结构的刚性, 蛋白质结构的刚性越强, 就越不容易散链^[14]。

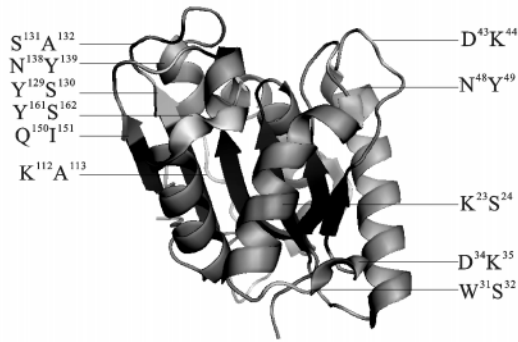


酶活性中心 Ser⁸⁷-His²⁸⁶-Asp²⁶⁴; 正相关性氨基酸二联体: S¹³⁶T¹³⁷、N¹⁷⁸Y¹⁷⁹、S¹⁸¹A¹⁸²、S²³⁰T²³¹、S²⁴⁴T²⁴⁵、S²⁷¹A²⁷²、S²⁷⁹T²⁸⁰ 和 I³⁰⁸R³⁰⁹; 负相关性氨基酸二联体: D³Y⁴、D²¹K²²、Y²⁰⁷S²⁰⁸ 和 I²¹⁸S²¹⁹

图 1 *Pseudomonas cepacia* 嗜热脂肪酶 (PDB: 2LIP) 的晶体结构

Fig. 1 The crystal structure of thermophilic lipase from *Pseudomonas cepacia*

尽管脂肪酶氨基酸序列的同源性相差很大, 但其空间结构却具有高度的相似性, 均属于 α/β 结构水解酶家族, 该结构的 β -折叠片在中间被 α -螺旋包围^[15]。结合上述对嗜热 PCL 和常温 BSL 中与热稳定性相关性氨基酸二联体位置的分析得出结论: 与



酶活性中心 Ser⁷⁷-His¹⁵⁶-Asp¹³³; 正相关性氨基酸二联体: K²³S²⁴、N⁴⁸Y⁴⁹、S¹³¹A¹³² 和 N¹³⁸Y¹³⁹; 负相关性氨基酸二联体: W³¹S³²、D³⁴K³⁵、D⁴³K⁴⁴、K¹¹²A¹¹³、Y¹²⁹S¹³⁰、Q¹⁵⁰I¹⁵¹ 和 Y¹⁶¹S¹⁶²

图 2 *Bacillus subtilis* 常温脂肪酶(PDB: 1ISP)的晶体结构

Fig. 2 The crystal structure of mesophilic lipase 似乎这
是中温脂肪酶 from *Bacillus subtilis*

酶热稳定性呈正相关性的二联体多数分布在酶蛋白的表面; 反之呈负相关性的二联体多数位于酶蛋白内部, 与先前报道的文献相一致^[16]。由图 1 和图 2

中可见, 呈负相关性的氨基酸二联体常位于脂肪酶多肽链的 N 或 C 端。有人将 N 或 C 端缩短或在蛋白链的两端引入突变, 其热稳定性有不同程度的提高^[17]。在 BSL 的 N 和 C 端有 4 个负相关性的二联体 W³¹S³²、D³⁴K³⁵、Q¹⁵⁰I¹⁵¹ 和 Y¹⁶¹S¹⁶², 而 PCL 只有 2 个负相关性的二联体 D³Y⁴ 和 D²¹K²² 在 N 端。于是, 我们推测采用蛋白质工程技术改造脂肪酶的 N 或 C 端能提高脂肪酶的热稳定性。

3 结 语

从 34 条微生物脂肪酶序列出发, 采用计算分子生物学分析了影响脂肪酶最适温度的氨基酸及其二联体; 并通过比对嗜热脂肪酶(PDB: 2LIP)和常温脂肪酶(PDB: 1ISP)的晶体结构, 确定了与最适温度相关性氨基酸二联体的空间位置。本研究结果能为脂肪酶热稳定机制的阐明、脂肪酶热稳定性的蛋白质工程改造等奠定理论基础。

参考文献(References):

- [1] Wu M C, Qian Z K, Jiang P H, et al. Cloning of an alkaline lipase gene from *Penicillium cyclopium* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Lipids*, 2003, 38: 191—199.
- [2] 张慧敏, 李剑芳, 邬敏辰. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29: 602—608. ZHANG Hui-min, LI Jian-fang, WU Min-chen. Bioinformatics analysis on the sequence of lipase gene from *Penicillium cyclopium*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29: 602—608. (in Chinese)
- [3] Han Z L, Han S Y, Zheng S P, et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85: 117—126.
- [4] Gatti-Lafronconi P, Caldarazzo S M, Villa A, et al. Unscrambling thermal stability and temperature adaptation in evolved variants of a cold-active lipase[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582: 2313—2318.
- [5] Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis[J]. *FEBS Letters*, 2000, 470: 65—69.
- [6] Panasiak Jr N, Brenchley J E, Farber G K. Distributions of structural features contributing to thermostability in mesophilic and thermophilic α/β barrel glycosyl hydrolases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543: 189—201.
- [7] Liu L W, Wang M L, Shao W L, et al. A novel model to determine the dipeptides responsible for optimum temperature in F/10 xylanase[J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 1389—1394.
- [8] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chains[J]. *Science*, 1973, 181: 223—230.
- [9] Vieille C, Zeikus G J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65: 1—43.
- [10] Cote A, Shareck F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 42: 381—388.
- [11] Pack S P, Yoo Y J. Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins[J]. *J Biotechnol*, 2004, 111: 269—277.
- [12] Schrag J D, Li Y, Cygler M, et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase[J]. *Structure*, 1997, 5: 187—202.
- [13] Kawasaki K, Kondo H, Suzuki M, et al. Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, 58: 1168—1174.
- [14] Li W F, Zhou X X, Lu P. Structural features of thermozymes[J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 271—281.
- [15] Sayari A, Frikha F, Miled N, et al. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579: 976—982.
- [16] Reddy B V, Ramesh P, Tiwari S. MEICPS: substitution mutations to engineer intracellular protein stability[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14: 225—226.
- [17] Acharya P, Rajakumara E, Sankaranarayanan R, et al. Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase[J]. *J Mol Biol*, 2004, 341: 1271—1281.