



# Met196 突变提高 *Brucella melitensis* 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的催化效率和稳定性

柳志永, 张荣珍\*, 徐岩

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

柳志永, 张荣珍, 徐岩. Met196 突变提高 *Brucella melitensis* 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的催化效率和稳定性. 微生物学报, 2022, 62(5): 1769–1783.

Liu Zhiyong, Zhang Rongzhen, Xu Yan. Met196 mutation improves catalytic efficiency and stability of *Brucella melitensis* 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1769–1783.

**摘要:**【目的】通过计算机辅助设计, 理性提高羊布鲁氏菌 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的催化效率和稳定性, 实现酶的高效稳定催化合成。【方法】通过同源建模、分子对接和蛋白-配体相互作用分析, 理性设计关键位点的定向突变。结合酶学性质测定、酶促反应动力学分析和圆二色谱测定等实验, 测定突变酶的催化功能和稳定性。【结果】与野生型 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶相比, Met196Ile 和 Met196Val 突变酶的酶活提高了 8.33 倍和 7.41 倍,  $k_{cat}/K_m$  值分别提高了 4.93 和 4.37 倍,  $T_m$  值分别提高了 1.75 °C 和 1.10 °C。Met196Ile 和 Met196Val 突变酶催化底物鹅去氧胆酸, 合成产物 7-氧代-石胆酸所需时间从野生型的 8 h 缩短为 2 h, 最高产率约为 91%。通过全原子动力学模拟分析了均方根偏差、均方根波动以及蛋白-配体相互作用, 阐明了催化性能提高的分子机制。Met196 突变诱导的 B 环(残基 Ala145–Pro157)和  $\alpha 7$  螺旋(残基 Val249–Gly265)的刚性增强有利于提高蛋白的稳定性, 底物与结合位点或活性位点(Tyr208、Lys212)相互作用力的增强有利于改善催化效率。【结论】本研究采用同源建模和定点突变改造 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的催化活力和稳定性, 为工业上高效稳定催化合成 7-氧代-石胆酸奠定了较坚实的基础, 同时为类固醇脱氢酶的理性设计提供了理论指导。

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0900302); 国家自然科学基金(31970045); 江苏省研究生科研与实践创新计划(1012050205205974); 国家轻工技术与工程一流学科(LITE2018-12); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900302), by the National Natural Science Foundation of China (31970045), by the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (1012050205205974), by the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12) and by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06).

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 9 September 2021; Revised: 7 December 2021; Published online: 4 March 2022

**关键词：**羊布鲁氏菌；7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶；理性设计；催化效率；稳定性；分子动力学模拟

## Met196 mutation improves catalytic efficiency and stability of *Brucella melitensis* 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase

LIU Zhiyong, ZHANG Rongzhen<sup>\*</sup>, XU Yan

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] Through computer-aided design, we improved the catalytic efficiency and stability of *Brucella melitensis* 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and realized the efficient and stable synthesis of products. [Methods] Directed-mutagenesis at the key sites was rationally designed via homology modeling, molecular docking, and protein-ligand interaction analysis. Enzymatic property determination, enzymatic reaction kinetic analysis, and circular dichroism characterization were carried out to determine the catalytic function and stability of the enzyme. The root-mean-square deviation, root-mean-square fluctuation, and protein-ligand interactions were analyzed through all atom dynamics simulation to clarify the molecular mechanism of Met196 mutations improving catalytic efficiency and stability. [Results] Compared with the wild-type 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, Met196Ile and Met196Val increased the specific activity to 8.33 and 7.41 folds, the  $k_{cat}/K_m$  values to 4.93 and 4.37 folds, and the  $T_m$  values by 1.75 °C and 1.10 °C, respectively. Furthermore, Met196Ile and Met196Val shortened the duration of the synthesis from chenodeoxycholic acid to 7-oxolithocholic acid from 8 h to 2 h, and the mutants had the highest yield of about 91%. The Met196 mutation-induced rigidity enhancement of loop B (residues Ala145–Pro157) and  $\alpha 7$  helix (residues Val249–Gly265) was beneficial to the protein stability. The enhanced interaction between substrate and binding sites or active sites (Tyr208 and Lys212) was conducive to the catalytic efficiency. [Conclusion] This study employed homology modeling and site-directed mutagenesis to modify 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and thus improved its catalytic efficiency and stability. The findings laid a solid foundation for the efficient and stable synthesis of 7-oxolithocholic acid in industry and provided theoretical guidance for the rational design of steroid dehydrogenase.

**Keywords:** *Brucella melitensis*; 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase; rational design; catalytic efficiency; stability; molecular dynamic simulation

胆汁酸是饱和羟基化的 C-24 环戊烷菲甾醇，在调节葡萄糖、脂质、能量代谢、肠道免疫和肠道炎症中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。7-氧代-石胆酸(7-oxolithocholic acid, 7-oxo-LCA)是合成熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)的重要前体<sup>[3]</sup>。

熊去氧胆酸用于临床治疗人类胆固醇胆结石<sup>[4]</sup>，也是 FDA 批准治疗原发性胆汁酸肝硬化的药物。UDCA 的传统化学合成涉及酯化、氧化和脱保护等一系列化学过程<sup>[5]</sup>，过程效率低、成本高，并伴随多种副产品产生，环境污染严重<sup>[6-7]</sup>。

因此, 开发新型绿色高效制备 UDCA 及其前体的方法具有重要意义。

羟基类固醇脱氢酶(HSDH)在胆汁酸类物质转化、甾体激素转化、胆固醇代谢、非甾体类醛、酮和醌羰基还原过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶(7 $\alpha$ -HSDH, EC 1.1.1.159)是合成 UDCA 前体 7-oxo-LCA 的主要酶之一<sup>[9]</sup>。它是含有罗斯曼折叠 NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>结合域的短链脱氢酶/还原酶<sup>[10-11]</sup>。大多为同源二聚体或四聚体, 在单体的 N 端和 C 端具有辅因子和底物结合催化区域。目前已经报道了多种 7 $\alpha$ -HSDH 基因及其功能, 如来自撒丁岛梭菌(*Clostridium absonum*, GenBank No.: AET80685.1)<sup>[9]</sup>、艰难梭菌(*Clostridium difficile*, GenBank No.: YP001086529)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, GenBank No.: KXH01569.1)<sup>[12]</sup>、南极嗜冷菌(*Psychrobacter* sp. GenBank No.: HAR74729.1)<sup>[8]</sup>和嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*, GenBank No.: KRG42928.1)<sup>[13]</sup>等。这些同源 7 $\alpha$ -HSDH 在催化合成 7-oxo-LCA 时表现出不同的转化效率和热稳定性。然而大多数野生型 7 $\alpha$ -HSDH 酶的催化效率不高, 且热稳定性差。据报道, 来自嗜麦芽黄单胞菌的 7 $\alpha$ -HSDH 在反应 24 h 后, 7-oxo-LCA 产率仅为 80%左右<sup>[13]</sup>。艰难梭菌 7 $\alpha$ -HSDH 催化 7-oxo-LCA 的产率高达 99%, 但转化时间长达 18.5 h<sup>[14]</sup>。撒丁梭菌的 7 $\alpha$ -HSDH 酶在 37 °C 下孵育 2 h 后, 残余活性低于 50%<sup>[15]</sup>。因此 7 $\alpha$ -HSDH 的理性设计提高其催化的工业属性具有重要的研究意义。

生物信息学和蛋白质工程技术促进了自然资源中新型酶的发现, 并大大加速了现有生物催化剂的重新设计<sup>[16-17]</sup>。例如, Bertuletti 等从极端环境中搜索基因组中同源的 7 $\alpha$ -HSDH, 鉴定了来自奇异球菌属的 7 $\alpha$ -HSDH, 催化反应的最

适温度为 60 °C<sup>[8]</sup>。Tonin 等发现嗜麦芽窄食单胞菌的 7 $\alpha$ -HSDH 在 70 °C 时催化效率最高, 在 37 °C 下孵育 24 h 后能保留 70%左右的初始酶活<sup>[4]</sup>。Dhagat 等设计了人源 20 $\alpha$ -HSDH 底物结合区域的 Leu308Val 突变酶, 分别催化底物 5 $\alpha$ -孕烷-3 $\alpha$ -20 $\alpha$ -二醇和 5 $\beta$ -孕烷-3 $\alpha$ -羟基-20-酮, 其  $k_{cat}/K_m$  值增加到约 7 倍和 40 倍<sup>[18]</sup>。Thomas 等报道了 Pro195Arg 的突变能够提高人源 3 $\beta$ -HSD2 对底物 3 $\beta$ , 16 $\beta$ -二羟基-5-雄烯-17-酮的底物亲和力,  $K_m$  值降低至 12.2 倍<sup>[19]</sup>。

本研究基于氨基酸序列和结构的分析, 理性设计 Met196 残基定向突变, 提高了 *Bm7 $\alpha$ -HSDH* 催化 CDCA 合成 7-oxo-LCA 的催化效率, 并通过分子动力学模拟分析了优势突变酶 M196I 和 M196V 提高催化效率和热稳定性的分子催化机制。该策略为羟基类固醇脱氢酶的高效催化和理性改造提供了新的研究思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和 PCR 引物

本研究中所用到的出发菌株为 *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21, 质粒为 pET-21a, 均由实验室内部提供。构建 pET-21a-7 $\alpha$ -HSDH 重组质粒或突变体所用到的 PCR 引物由金唯智生物科技有限公司(中国苏州)合成(表 1)。

#### 1.1.2 试剂

鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)购自阿拉丁试剂有限公司(中国上海)。7-Oxo-LCA 购自百灵威科技有限公司(中国上海)。辅因子 NAD<sup>+</sup>购自西格玛奥德里奇有限公司(中国上海)。限制酶购自宝生物工程有限公司(中国大连)。质粒提取试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司(中国南京)。其他化学品为商业购买的化学纯等级。

表 1 菌株、质粒和 PCR 引物

Table 1 Strains, plasmids and PCR primers

Strains and plasmids	Application	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	Host for gene cloning	This lab
<i>E. coli</i> BL21	Host for gene expression	This lab
<i>E. coli</i> BL21/pET-7 $\alpha$ -HSDH	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET- <i>Bm7<math>\alpha</math>-hsdh</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21/pET-M196C	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-Met196Cys	This study
<i>E. coli</i> BL21/pET-M196I	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-Met196Ile	This study
<i>E. coli</i> BL21/pET-M196L	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-M1et96Lys	This study
<i>E. coli</i> BL21/pET-M196V	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-Met196Val	This study
Plasmids		
pET-21a	Plasmid for gene expression	This lab
pET-21a-7 $\alpha$ -HSDH	pET-21a containing <i>Bm7<math>\alpha</math>-hsdh</i>	This study
pET-21a-M196C	pET-21a containing Met196Cys	This study
pET-21a-M196I	pET-21a containing Met196Ile	This study
pET-21a-M196L	pET-21a containing Met196Lys	This study
pET-21a-M196V	pET-21a containing Met196Val	This study
Primers		
	Sequences (5'→3')	
7 $\alpha$ -HSDH-WT-F	CGCGGATCCATGGGCGCCGATCCGGTTTA	
7 $\alpha$ -HSDH-WT-R	CCGCTCGAGATCCAGTTCCTGAACACC	
M196C-F	CTGAACATCAGCAGCT <b>TGCG</b> CTGGTGAGAATACCAACGTGCGCA	
M196C-R	GTATTCTCACCAGC <b>GCA</b> AGCTGCTGATGTTTCAAGAATT	
M196I-F	CTGAACATCAGCAGC <b>ATA</b> GCTGGTGAGAATACCAACGTGCGCA	
M196I-R	GTATTCTCACCAGC <b>TAT</b> GCTGCTGATGTTTCAAGAATT	
M196K-F	CTGAACATCAGCAGC <b>AAG</b> GCTGGTGAGAATACCAACGTGCGCA	
M196K-R	GTATTCTCACCAGC <b>CTT</b> GCTGCTGATGTTTCAAGAATT	
M196V-F	CTGAACATCAGCAGC <b>GTG</b> GCTGGTGAGAATACCAACGTGCGCA	
M196V-R	GTATTCTCACCAGC <b>AC</b> GCTGCTGATGTTTCAAGAATT	

Restriction sites are shown in italics and underline, and codons of mutant residues are shown in bold and underline.

## 1.2 重组菌的构建

根据大肠杆菌的密码子偏好性,对羊布鲁氏菌的7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶(*Bm7 $\alpha$ -HSDH*)的编码基因(WP\_014489477.1)进行同义突变设计。获得*Bm7 $\alpha$ -hsdh*基因序列的 GenBank 登录号为 MW202238。同义突变设计后的基因由金唯智有限公司(中国苏州)化学合成。将基因*Bm7 $\alpha$ -hsdh*克隆到表达质粒 pET21a 中,构建质粒 pET-7 $\alpha$ -HSDH,转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞。经 DNA 测序确认后,获得重组菌株 *E. coli* BL21/pET-7 $\alpha$ -*hsdh*。

## 1.3 同源比对、结构建模、分子对接和动力学模拟

使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org>)进行 *Bm7 $\alpha$ -HSDH* 序列的同源比对<sup>[20]</sup>、GREMLIN 在线分析工具(<http://gremlin.bakerlab.org>)进行保守序列鉴定及 I-TASSER 工具(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>)进行蛋白质结构和功能预测。通过 Auto Dock Tools 软件(<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>)获得蛋白质与配体的对接,结合 3D 可视化软件 Pymol (<https://www.pymol.org>)生成

蛋白质结构图。采用 GROMACS 5.0.2 软件和 AMBER 力场进行动力学模拟<sup>[21]</sup>。动力学模拟系统建立在立方盒子的 TIP3P 水模型中,定义溶质-盒子的距离为 10 Å,通过添加氯离子或钠离子来中和系统,并根据 pH 7.0 设置残基的质子化状态<sup>[22]</sup>,使用最速下降算法进行 10 000 步的能量最小化,进一步模拟蛋白-配体复合体在 1.01 bar 压力、300 K 温度下 50 ns 的动力学过程<sup>[23]</sup>。采用 MM/GBSA 方法对分子动力学模拟轨迹进行结合自由能计算,定义 $\Delta G_{\text{bind}}=G_{\text{PL}}-G_{\text{P}}-G_{\text{L}}$ <sup>[24]</sup>。

#### 1.4 突变位点设计与构建

首先,通过同源性搜索和多序列比对鉴定保守性氨基酸<sup>[16,25]</sup>。其次,结合蛋白质的结构比对确定明显的相似性和差异性。最后,基于保守序列和结构比对信息来识别底物结合口袋中的潜在位点,并选择合适的氨基酸作为构建模块理性设计突变文库<sup>[26-27]</sup>。使用 PrimeSTAR Max DNA 聚合酶,通过改良的全质粒 PCR 技术进行定点诱变。PCR 程序为 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。所得 PCR 产物用 *Dpn* I 酶消化以去除亲本 pET21-7 $\alpha$ -HSDH。将 1.0  $\mu$ L 消化产物转化到 *E. coli* BL21(DE3)中。通过 DNA 测序验证,构建相应的突变株 *E. coli* BL21/pET-M196C、*E. coli* BL21/pET-M196I、*E. coli* BL21/pET-M196K 和 *E. coli* BL21/pET-M196V。用于定点突变的引物如表 1 所示。

#### 1.5 蛋白的表达与纯化

将重组 *E. coli* BL21 菌株接种到含有 1 L LB 培养基的 3 L 摇瓶中,添加氨苄青霉素至终浓度为 50  $\mu$ g/mL,于 37 °C 条件下培养。当培养物的  $OD_{600}$  值为 0.6–0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,于 25 °C 培养 20 h。收集细胞,通过 APV2000 高压匀浆机(SPX Flow Technology, 中国上海)裂解细胞,在 4 °C 环境下 12 000 $\times$ g 离心

30 min 收集上清液。使用 ÄKTA 蛋白质纯化系统(GE Healthcare, 美国)、HisTrap HP 亲和柱和 Superdex 200 层析柱进行纯化,通过 SDS-PAGE 凝胶图观察蛋白纯度。

#### 1.6 酶学性质及酶促动力学测定

通过测定 NADH 在 340 nm 的吸光度变化率,在 30 °C 下测量 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶氧化 CDCA 的酶活力。酶活力测定标准:反应体积 200  $\mu$ L,分别加入终浓度为 100 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  (pH 9.5)、5 mmol/L 的  $\text{NAD}^+$  和 5 mmol/L 的 CDCA,置于 30 °C 金属浴孵育 3 min,加入适量的纯酶(10–200  $\mu$ mol/L),在 Bio-Tek Cytation 5 细胞成像多功能检测系统扫描 340 nm 处吸光度的变化。

酶活力的计算公式为:酶活(U)= $\text{EW} \times V \times 10^3 / (6\ 220 \times 0.5)$

比活的计算公式:比活(U/mg)=酶活(U)/蛋白量(mg)

其中,EW:1 min 内 340 nm 处吸光度的变化; $V$ :反应液的体积(mL);6 220:摩尔消光系数[L/(mol $\times$ cm)];0.5:光程距离(cm)。

酶活力定义:在上述条件下,每分钟催化生成 1  $\mu$ mol NADH 的酶量为 1 个酶活力单位。

通过配制不同 pH 的缓冲溶液(50 mmol/L Tris-NaCl, pH 8.0–9.0; 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.5–10.5),使用配备恒温循环金属浴的 Bio-Tek Cytation 5 设置不同温度(20–40 °C)环境,根据上述酶活力测定的方法,确定酶催化反应的最适 pH 和最适温度。

在 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶的动力学测定过程中,用 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(pH 9.5),配制不同浓度的 CDCA (0.1–10.0 mmol/L)和固定浓度的辅因子  $\text{NAD}^+$  (5.0 mmol/L),在 30 °C 金属浴保温 3 min,加入适量的纯酶(10–200  $\mu$ mol/L),扫描 340 nm 处的吸光度变化。

酶动力学曲线的拟合通过 GraphPad 软件实现, 分别以底物浓度和比酶活为横、纵坐标, 选择 Michaelis-Menten 模型进行非线性拟合, 获得  $V_{\max}$  值与  $K_m$  值, 通过数据换算获得  $k_{\text{cat}}$  值与  $k_{\text{cat}}/K_m$  值。

### 1.7 酶稳定性研究

$7\alpha$ -HSDH 及其突变酶的 pH 稳定性以残余酶活力为特征。将适量的纯蛋白在不同 pH (9.0–10.5) 的缓冲液中稀释 10 倍, 在 4 °C 冰箱静置, 然后在不同时间点(0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h)取样测定酶活。以未经处理的酶液初始酶活为 100%, 计算残余酶活。

$7\alpha$ -HSDH 及其突变酶的热稳定性通过圆二色谱(CD)热变性实验测定。首先将蛋白置换在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中, 浓度约为 100 mg/L。使用 Jasco J720 分光偏振计(Jasco, Inc., Easton, MD)进行圆二色性测量。测定条件设定: 测定波长范围为 190–250 nm, 响应时间: 1 s; 灵敏度: 0.1 °C; 速度: 50 ns/min。选择特征峰 220 nm 处进行变温图谱分析, 在 20 °C 和 80 °C 之间每 3 °C 重复扫描 1 次并记录数据。

### 1.8 生物转化和分析方法

反应混合物(10 mL)由 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(pH 9.5)、2 mmol/L  $\text{NAD}^+$ 、2 mmol/L CDCA 和 20  $\mu\text{g}$  纯化蛋白组成。反应在 30 °C 下以 200 r/min 振荡 12 h。反应结束后, 将反应液在沸水中保温 10 min 终止反应, 在 10 mL 反应液中加入 2 mol/L NaOH 调 pH 至 10, 取 1.0 mL 进行产物测定。产物的产率通过高效液相色谱法(HPLC)在 XBridge  $\text{C}_{18}$  柱上测定。将底物和产物标准品溶解在甲醇溶液中, 然后在 60% 乙腈流动相下用高效液相色谱法检测 195 nm 处的紫外吸光度, 计算得到 CDCA 和 7-oxo-LCA 的标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 $7\alpha$ -HSDH 的突变位点设计

使用同源序列比对<sup>[28]</sup>(图 1A)、多序列保守性分析<sup>[29]</sup>(图 1B)确定  $7\alpha$ -HSDH 功能位点。通过 I-TASSER 服务器构建  $7\alpha$ -HSDH 的结构模型, 以 1FMC 复合体结构为模板<sup>[12]</sup>, 使用 AutoDock 4 获得  $7\alpha$ -HSDH 与辅因子  $\text{NAD}^+$  或底物 CDCA 的分子对接模型。如图 1C 所示, 该结构表明 CDCA 的取向由 Asn200 或 Asn202 与 C3 羟基之间以及 Gly148 与羧基之间的氢键决定。 $\text{NAD}^+$  的 C4 与 CDCA 的 C7 之间的距离为 3.3 Å, 表明存在合理的 C-C 相互作用(图 1D)。 $\text{NAD}^+$  的取向由 Ile241 和烟酰胺、Lys212 和烟酰胺侧核糖的两个氧原子之间, 以及 Asp91 和腺苷核糖的 2'-和 3'-羟基之间的氢键决定(图 1E)。羟基类固醇脱氢酶的催化机制表明<sup>[30]</sup>, Ser195 稳定底物, Tyr208 作为催化碱基, Lys212 降低了 Tyr208 羟基的 pKa。反应过程中, Tyr208 促使底物去质子化, Lys212 与  $\text{NAD}^+$  的 2'和 3'-核糖羟基结合, 使  $\text{NAD}^+$  结合氢原子。此外,  $\alpha 5$  螺旋区域(残基 Met196–Glu199)构成底物通道的重要组成部分, 其中的 Met196 位点与 C 末端相邻, 背向底物通道, 与 Ser195 位点锚定在底物 3'-羟基两侧, 呈犄角之势, 可能在底物结合中起重要作用。基于多序列比对和保守性分析, 选择氨基酸 Cys、Ile、Val 和 Lys 取代 Met196 位点进行突变。

### 2.2 $7\alpha$ -HSDH 及其突变酶的表达、纯化及酶活测定

将  $7\alpha$ -HSDH 按照大肠杆菌密码子偏好性进行序列优化, 按照材料与方法中 1.2 构建重组菌, 经测序验证, 获得重组菌 *E. coli* BL21/pET21a- $7\alpha$ -HSDH。按照材料与方法中 1.4 进行突变位点的设计与构建重组菌 *E. coli* BL21/pET21a-M196C、*E. coli* BL21/pET21a-M196I、*E. coli*

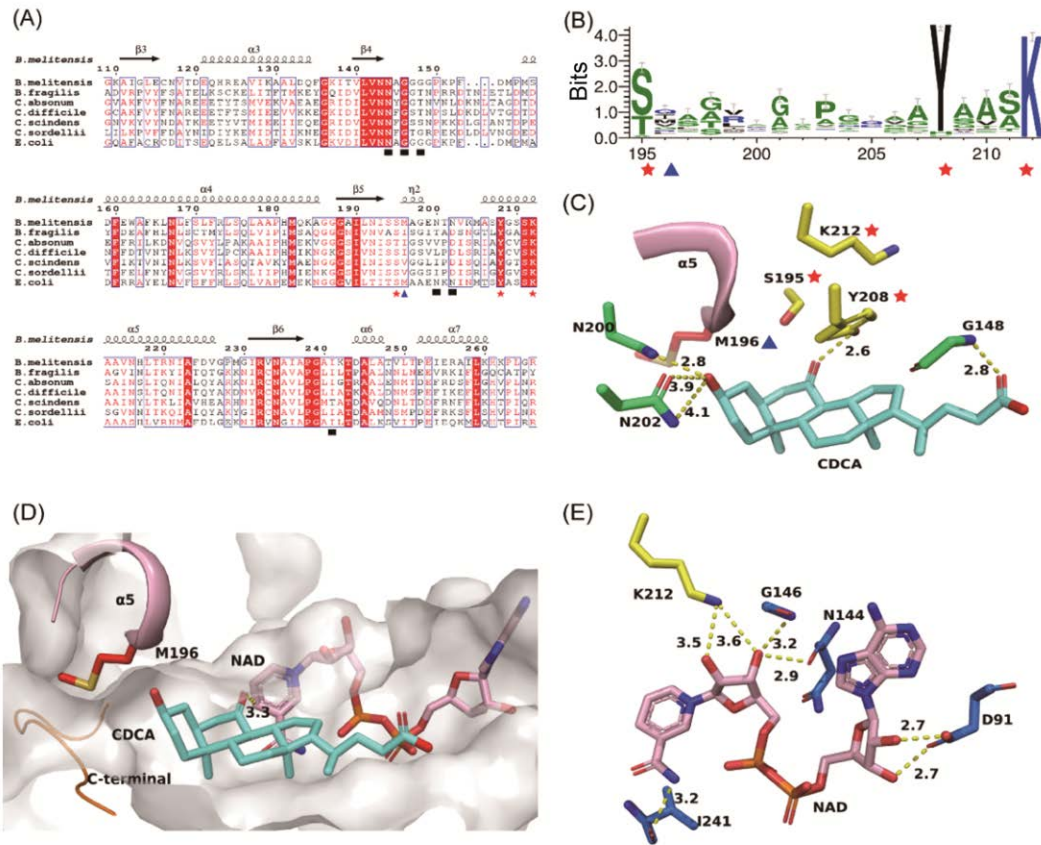


图 1 7α-HSDH 的序列和结构分析

Figure 1 Sequence and secondary structural analysis of 7α-HSDH. A: multiple sequence alignment and second structural analysis of reported 7α-HSDHs sequences. The residue Met196 is marked in blue triangle. The catalytic triad Ser195-Tyr208-Lys212 is marked in red star. The substrate binding sites (Asn200, Asn202, and Gly148) and cofactor binding site (Asp 91, Asn144, Gly146, and Ile 241) are marked in black squares. B: conservative sequence analysis of 7α-HSDH across enzyme families. The stacking height of amino acids means the conserved degree of the site, and the height of one single amino acid in the stack show its relative frequency at this position. The character color is used to show hydrophobicity (blue: hydrophilic, green: neutral, black: hydrophobic). C: the residues Gly148, Ser195, Asn200, Asn202 and Tyr208 are formed hydrogen bonds with CDCA (cyan), and showed as sticks. In addition, the residue Met196 and catalytic triad are marked in blue triangle and red star, respectively. D: the α5 helix (pink) and C-terminal region (brown) are distributed around the substrate binding tunnel, forming an arched structure. The residue Met196 (red) is located in α5 helix. E: the residues Asp91, Asn144, Gly146, Lys212, and Ile241 form hydrogen bonds with NAD<sup>+</sup> (pink), and are showed as sticks.

BL21/pET21a-M196K 和 *E. coli* BL21/pET21a-M196V。重组菌在 25 °C 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导, 细胞上清经 SDS-PAGE 检测, 均发现一条明显的表达条带, 大小与目标酶的理论分子大小 (32 kDa)一致, 表明 7α-HSDH 及其突变酶蛋白

在 *E. coli* BL21 中获得表达(图 2A)。

经 HisTrap HP 亲和层析和 Superdex 200 层析, 获得单一条带的纯蛋白 7α-HSDH 及突变酶蛋白(图 2B)。酶活性检测分析表明, 7α-HSDH、M196C、M196I、M196K 和 M196V 的酶活分别



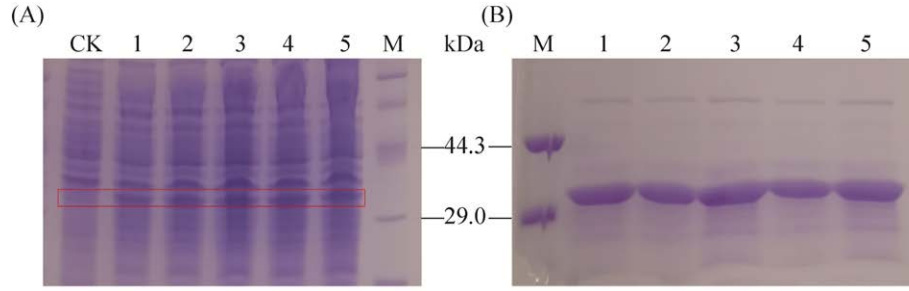


图2  $7\alpha$ -HSDH 及其突变酶的表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of expression (A) and purification (B) of  $7\alpha$ -HSDH and mutants. A: CK: the cell-free extracts of *E. coli* BL21/pET21a. M: protein molecular weight markers; lane 1–5: the cell-free extracts of *E. coli* BL21/pET21a- $7\alpha$ -HSDH, *E. coli* BL21/pET21a-M196C, *E. coli* BL21/pET21a-M196I, *E. coli* BL21/pET21a-M196K and *E. coli* BL21/pET21a-M196V. B: lane 1–5: the purified  $7\alpha$ -HSDH, M196C, M196I, M196K and M196V.

为 1.14、0.87、9.50、0.92、8.45 U/mg。M196I 和 M196V 比野生型  $7\alpha$ -HSDH 酶活提高了 8.33 倍和 7.41 倍。Met196 突变后的氨基酸侧链性质不同，Val、Ile、Met 属于非极性氨基酸，侧链长度增加，Cys 属于极性氨基酸，Lys 为碱性氨基酸。酶活性的差异可能是由于 Met196 位点氨基酸侧链性质的变化，从而引起侧链与底物的相互作用力的改变<sup>[31]</sup>。

### 2.3 $7\alpha$ -HSDH 催化反应的最适温度和最适 pH

如图 3 所示，野生型和突变酶在温度 30 °C，pH 9.5 条件下酶活力最高，表明 Met196 位点没有改变酶的最适催化温度和最适 pH 值。但是在

不同温度下，以最适温度或最适 pH 下的酶活力作为参比，野生型和突变酶的相对酶活力存在明显的差异。其中，M196I 突变酶在 20–25 °C 相对酶活力较高，且高于 80%，而 M196K 酶在 35–40 °C 相对酶活力较低，且低于 70%。除此之外，在 pH 8.0–9.0 条件下，M196C 维持较高的相对酶活，而野生型酶活力明显低于突变酶。结果表明 M196 突变可能引起蛋白的热稳定性或 pH 稳定性发生改变。据报道，来源于 *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii* 和 *E. coli* HB101 的  $7\alpha$ -HSDH 催化反应的最适温度为 22–37 °C，最适 pH 为 7.4–8.5<sup>[32–34]</sup>，与之相比，本研究的 *Bm7\alpha-HSDH*

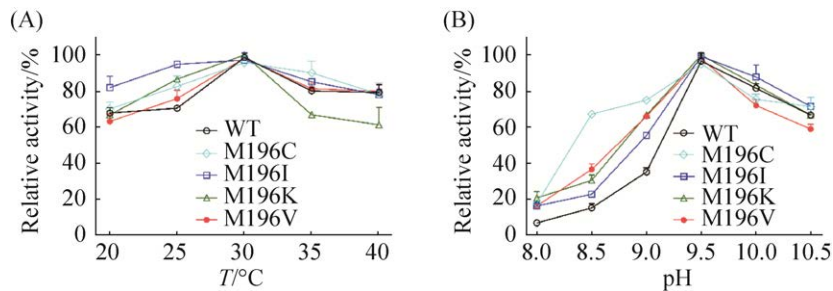


图3 温度(A)和 pH (B)对  $7\alpha$ -HSDH 及其突变酶活性的影响

Figure 3 Effects of temperature (A) and pH values (B) on the activities of purified  $7\alpha$ -HSDH and its mutants. Activities were measured in 50 mmol/L Tris-NaCl buffer from 20 to 40 °C (at pH 8.0) to determine the optimum temperature and at 50 mmol/L Tris-NaCl (pH 7.0–9.0) or 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  (pH 9.5–10.5) buffer at 30 °C to determine the optimum pH. The optimum specific activity was regarded as 100%.



在较高的碱性环境下(pH 9.5)显示出最高催化活性。由于鹅去氧胆酸在碱性条件下(pH>9.0)的溶解性较好, *Bm7 $\alpha$ -HSDH* 更利于实现底物 CDCA 的高效催化, 合成 7-oxo-LCA。

#### 2.4 7 $\alpha$ -HSDH 的热稳定性和 pH 稳定性

根据材料与方法 1.7 进行酶热稳定性研究, 分别获得了野生型与突变酶的圆二色谱(图 4A)、变温曲线(图 4B)和二级结构信息(表 2)圆二色谱结果显示, 突变酶 M196I 和 M196V 与其他蛋白的 CD 响应值存在差异, 表明它们的二级结构可能发生了变化。变温曲线显示, M196I 和 M196V 突变酶比野生型 7 $\alpha$ -HSDH 酶的  $T_m$  值分别提高了 1.75 °C 和 1.10 °C, 而 M196C 和 M196K 突变酶的  $T_m$  值分别下降了 1.37 °C 和 0.51 °C。通过计算不同蛋白中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲等二级结构的百分含量, 发现 M196I 和 M196V 在  $\beta$ -折叠的分布比例降低,  $\beta$ -转角的分

布比例提高。二级结构的变化可能与不同突变体表现出稳定性的差异相关<sup>[35]</sup>。

由于底物 CDCA 在碱性条件下溶解度较好, 测定了 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶在碱性环境中的稳定性。将 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶在 4 °C 条件下, pH 9.5、10.0、10.5 的 100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液中孵育 24 h, 测定不同时间的酶活力变化。结果如图 5 所示, 野生 WT 及突变酶在 pH 9.5 条件下稳定性最好。以 pH 9.5 的稳定性曲线为对照, M196V 在 pH 10.0 条件下的稳定性几乎不变, 在 pH 10.5 条件下维持在 50% 以上, 而其他酶在 pH 10.0 和 pH 10.5 条件下的稳定性均显示出显著的下降。酶蛋白孵育 24 h 后, 在 pH 9.5 条件下的相对残余酶活分别为 WT 66.4%、M196I 78.2%、M196V 83.9%、M196C 30.4%、M196K 29.9%, 由此表明突变酶 M196V 稳定性最好。

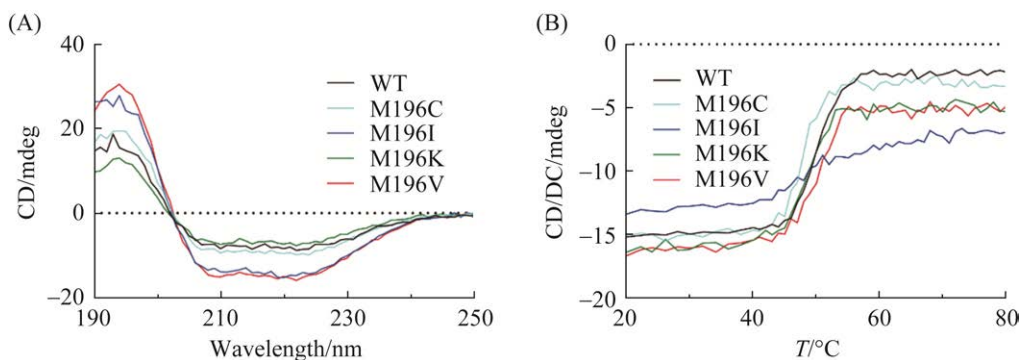


图 4 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶的 CD 光谱和变温曲线

Figure 4 CD spectra (A) and thermal denaturation (B) analysis of the 7 $\alpha$ -HSDH and its mutants. The CD spectra were recorded by measuring the ellipticity as a function of wavelength at 0.1 nm increasements between 190 nm and 250 nm at 20 °C. The thermal denaturation was determined by measuring the ellipticity at 220 nm as a function of temperature at increasements of 3 °C between 20 °C and 80 °C.

表 2 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶的二级结构分析

Table 2 The Secondary structure analysis of the 7 $\alpha$ -HSDH and its mutants

Enzymes	Helix	Strand	Turns	Unordered	Total	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
7 $\alpha$ -HSDH	0.35	0.18	0.18	0.33	1.04	0
M196C	0.35	0.19	0.20	0.29	1.02	-1.37
M196I	0.35	0.11	0.23	0.32	1.01	1.75
M196K	0.35	0.19	0.19	0.28	1.01	-0.51
M196V	0.35	0.11	0.23	0.32	1.01	1.10

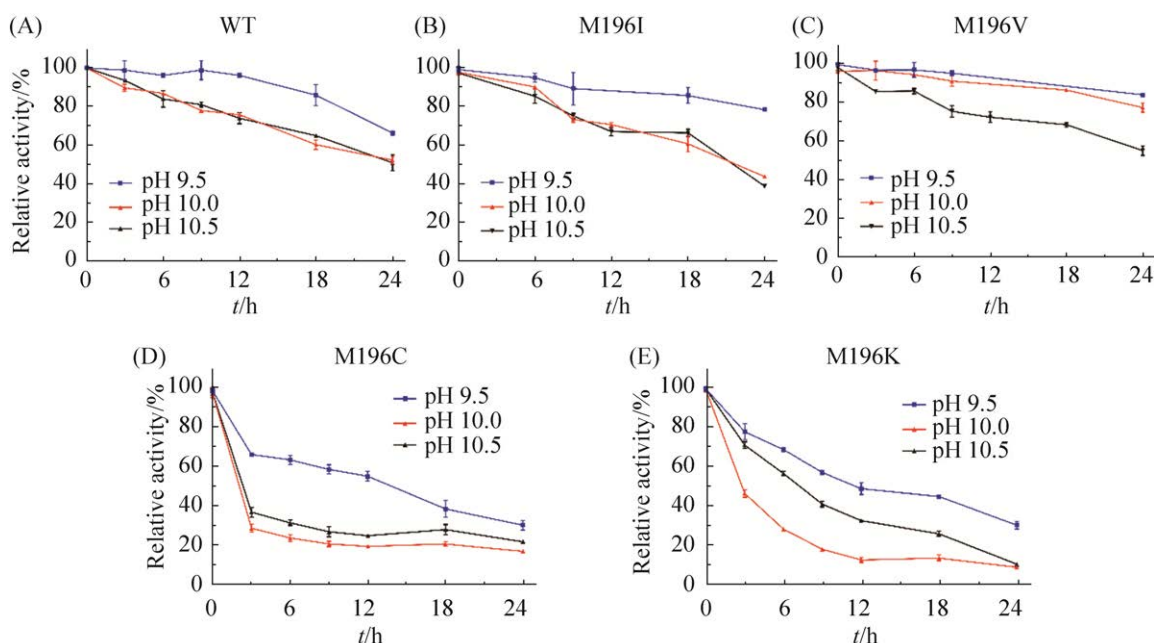


图5 野生型 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶的 pH 稳定性

Figure 5 The pH stability of wild-type 7 $\alpha$ -HSDH and its mutants. The purified enzymes were incubated in 100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5, pH 10.0, and pH 10.5) at 4 °C. The residual activity was assayed at a certain time (0–24 h) at the optimum condition (30 °C, pH 9.5). The initial specific activity was regarded as 100%.

## 2.5 突变酶 M196I 和 M196V 显著提高了酶的催化效率

通过测定不同浓度的底物 CDCA (0.1–10.0 mmol/L)条件下,野生型 7 $\alpha$ -HSDH 和突变酶的比活变化,使用 GraphPad Prism 软件处理初始比活数据,通过 Michaelis-Menten 方程拟合非线性回归曲线,计算酶的动力学参数。如表 3 所示,与野生型 7 $\alpha$ -HSDH 相比,M196I 和 M196V 突变酶的  $k_{cat}$  值分别提高了 10.06 和 8.69 倍,  $K_m$  值分别提高了 2.01 和 1.96 倍,引起  $k_{cat}/K_m$  值分别提高了 4.93 倍和 4.37 倍。M196C 和 M196K 突变使得其  $k_{cat}$  值分别下降了 18.1% 和 4.8%,  $K_m$  值分别提高了 1.04 和 1.35 倍,从而导致  $k_{cat}/K_m$  值分别降低了 25.0% 和 44.9%。这些结果表明,与野生酶 7 $\alpha$ -HSDH 相比, M196I 和 M196V 的位点突变显著提高了  $k_{cat}$  值,但降低了酶对底物

表3 野生型 7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶对底物 CDCA 的动力学参数

Table 3 Kinetics of wild-type 7 $\alpha$ -HSDH and its mutants towards CDCA

Enzymes	$K_m$ (mmol/L), app*	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ), app	$k_{cat}/K_m$ , app	Relative value
7 $\alpha$ -HSDH	1.18±0.10	0.65±0.02	0.5	1.00
M196C	1.23±0.19	0.55±0.03	0.45	0.80
M196I	2.37±0.32	6.54±0.34	2.76	4.93
M196K	1.60±0.33	0.62±0.04	0.39	0.69
M196V	2.31±0.23	5.65±0.22	2.45	4.37

\*: apparent kinetic parameters.

CDCA 的亲合力( $K_m$  值),最终显著提高了酶的催化效率。

## 2.6 突变酶 M196I 和 M196V 显著提高转化效率

7 $\alpha$ -HSDH 及其突变酶催化底物 CDCA,合成产物 7-oxo-LCA,经 HPLC 检测分析(图 6),

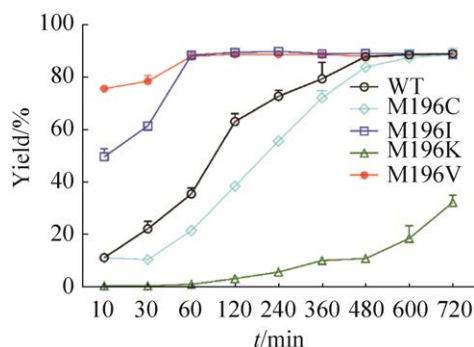


图6 野生型7 $\alpha$ -HSDH及其突变酶催化CDCA生成7-oxo-LCA的时间过程曲线

Figure 6 Time-course profiles of the production of 7-oxo-LCA from CDCA by wild-type 7 $\alpha$ -HSDH and its mutants. The reactions were carried out in 100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> buffer at optimum pH and temperature (pH 9.5, 30 °C). At different time intervals, the yield of 7-oxo-LCA was assayed by HPLC analysis.

突变酶 M196I 和 M196V 将催化反应时间缩短了 4 倍, 从野生型的 8 h 缩短为 2 h, 最高产率约为 91%, 显著提高了 7-oxo-LCA 的转化效率。另外 M196C 和 M196K 突变酶在催化底物 CDCA 合成产物 7-oxo-LCA 效率上表现出不同程度的下降, 可能是催化活力与稳定性下降共同作用的结果<sup>[4]</sup>。

## 2.7 分子动力学模拟分析

通过对野生型 7 $\alpha$ -HSDH、M196I 和 M196V 进行全原子动力学模拟, 阐明了通过突变实现的催化效率和热稳定性显著提高的原因。均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)用于测量蛋白质构象与原始结构之间的平均偏差<sup>[36]</sup>。如图 7A 所示, 野生型及其突变体 M196I、M196V 的 RMSD 曲线整体上保持一致, 在 3 ns 后趋于相对平衡, 表明分子结构均达到稳定状态。均方根波动(root-mean-square fluctuation, RMSF)分析结果(图 7B)表明突变酶 M196I 和 M196V 的 A 环(N 端残基 Asp41–Glu53)的柔性增加, B 环(残基 Ala145–Pro157)和  $\alpha$ 7 螺旋(残基 Val249–Gly265)的刚性增加。同时 M196I 和 M196V 突

变导致 Gly148、Ser195、Asn200、Asn202 和 Tyr208 残基与 CDCA 之间的相互作用发生明显变化(图 7C)。突变酶中 M196I 和 M196V 的 Gly148、Tyr208 残基显示出 3 种作用力(氢键、水桥和疏水作用)的增强, M196I 突变酶的 Asn200 残基与 M196V 突变酶的 Asn202 残基表现出氢键作用力的显著减弱, Ser195 残基几乎无作用力生成, 由此引起了酶与底物 3'-羟基相互作用力的减弱, 与 7'-羟基和羧基相互作用力的增强。底物结合环境的改变同时诱发了蛋白与辅酶相互作用力(图 7D)的变化, 与野生型相比, M196I 与 M196V 突变酶的 Asn144、Gly146 和 Lys212 残基与 NAD<sup>+</sup>显示出氢键作用力的增强, 水桥作用力减少, 由此增强了突变酶与辅酶烟酰胺侧核糖的 2 个氧原子之间的相互作用。除此之外, 野生型及其突变酶的 Asp91、Ile241 残基与辅酶之间均表现出较强的氢键相互作用。与野生型相比, M196V 突变酶作用力维持不变, M196I 突变酶的 Ile241 残基显示出氢键作用力的减弱。采用 MM/GBSA 对分子动力学轨迹进行结合自由能计算<sup>[24]</sup>, WT、M196I 和 M196V 的  $\Delta G_{\text{bind}}$  值分别为 -101.84、-103.08 和 -118.82 kJ/mol, 结果表明 196Ile 和 196Val 氨基酸侧链改变了 Bm7 $\alpha$ -HSDH 与 CDCA 和 NAD<sup>+</sup>的相互作用力的环境, 从而增强了酶与配体的结合。

## 3 讨论

催化效率和稳定性是衡量酶的工业属性的重要参数。酶促反应动力学是研究酶促反应速率酶及其影响因素的科学, 动力学参数  $k_{\text{cat}}$  衡量的是在最优条件下酶催化生成底物的速率,  $K_m$  值衡量的是酶与底物之间的亲和力, 两者比值是衡量一个酶催化效率的最重要参数<sup>[37]</sup>。本研究中的动力学参数表明, 与野生酶 7 $\alpha$ -HSDH 相比, M196I 和 M196V 的位点突变显著提高  $k_{\text{cat}}$  值的

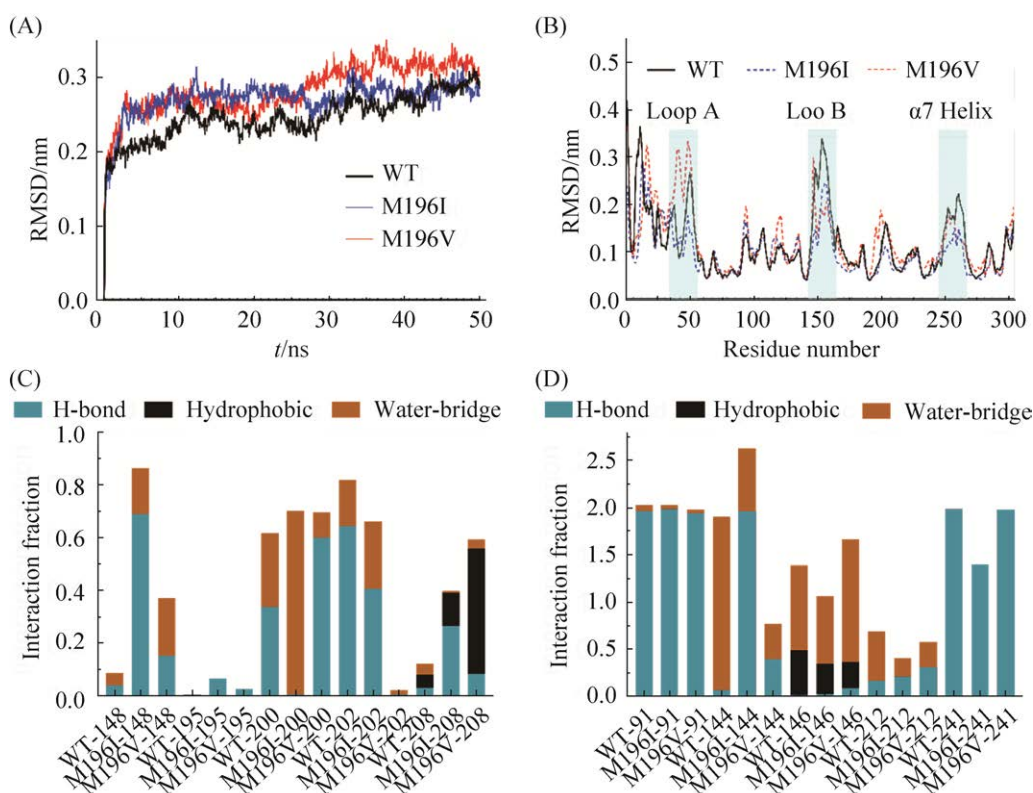


图 7 基于动力学模拟的  $7\alpha$ -HSDH 与突变酶 M196I 和 M196V 差异对比分析

Figure 7 Comparison and analysis of differences between  $7\alpha$ -HSDH and its mutants M196I and M196V based on molecular dynamic simulation. A: the above plot shows the RMSD evolution of the WT enzyme (black) and its mutants of M196I (blue) and M196V (red) during the 50 ns simulation at 300K and 1.01 bar pressure. The first frame is used as the reference. All protein frames are first aligned on the reference frame backbone, and then the RMSD of  $C\alpha$  (red) were calculated. B: the RMSF results of the WT enzyme (black) and its mutants of M196I (blue) and M196V (red) are shown in the line chart. They were calculated for all frames in the trajectory. The regions of loop A (residues 41–53 of N-terminal), loop B (residues 145–157), and  $\alpha 7$  helix (residues 249–265) changed significantly and were colored in cyan shadow. Protein interactions with the substrate CDCA (C) and cofactor  $NAD^+$  (D) of *Bm7\alpha*-HSDH were monitored throughout the simulation. As shown in the plot, protein-ligand interactions are categorized into three types: water bridges (orange), hydrophobic (brown), and hydrogen bonds (cyan). The interaction fraction value indicates that percent of the interaction is maintained in the simulation time. Values over 1.0 represent multiple contacts of the same subtype with the ligand.

同时引起了酶对 CDCA 的亲合力减弱,但最终表现出催化效率( $k_{cat}/K_m$  值)的显著提高,且分别增加了 4.93 倍和 4.37 倍。动力学模拟表明突变位点残基的改变同时引起了底物与活性位点(Tyr208、Lys212)和其他结合位点相互作用力的变化,与催化效率的改善密切相关<sup>[38]</sup>。

温度对酶促反应的影响包括两个方面,一方面温度升高可以加快反应速度,另一方面温度升

高而促使酶逐步变性。热变性曲线显示, M196I 和 M196V 突变酶  $T_m$  值相比野生型分别提高了 1.75 °C 和 1.10 °C, 而 M196C 和 M196K 突变酶的  $T_m$  值分别下降了 1.37 °C 和 0.51 °C。结果表明, Met196 可能是  $7\alpha$ -HSDH 热稳定性相关的关键氨基酸之一, 热稳定性的提高可能是由于 Met196 位点疏水相互作用、盐桥或氢键作用力的变化引起的<sup>[39]</sup>。此外, pH 对酶促反应速率的



影响主要体现在酶与底物的结合与活性中心的催化过程,反应介质的 pH 可以通过影响底物和辅酶的解离程度从而影响酶与底物或辅酶的结合,从而引起催化活力的变化<sup>[40]</sup>。野生型 7 $\alpha$ -HSDH 及 M196I 和 M196V 突变酶在 pH 9.5 条件下稳定性较好,蛋白孵育 24 h 后,相对残余酶活分别为 66.4%、78.2%和 83.9%,其中突变酶 M196V 稳定性最好。表明碱性环境更有利于 7 $\alpha$ -HSDH 与底物和辅酶的结合,特别是 Met196 临近活性中心位点 Ser195,可能影响了活性中心基团的解离程度和催化基团中质子供体和质子受体所需的离子化状态,从而改变催化活力。

分子动力学模拟结果表明, M196I 和 M196V 突变增强了 Asn144、Gly146 和 Lys212 残基与烟酰胺侧核糖的 2 个氧原子之间的相互作用,同时维持了 Asp91 残基与腺苷核糖 2'-和 3'-羟基之间以及 Ile241 残基与烟酰胺之间的结合的强相互作用。MM/GBSA 结合自由能结果表明, 196Ile 和 196Val 氨基酸侧链整体上提高了 Bm7 $\alpha$ -HSDH 与 CDCA 和 NAD<sup>+</sup>的结合力。另一方面,RMSF 结果显示 B 环(残基 145–157)、和  $\alpha$ 7 螺旋(残基 249–265)的刚性增加,可能是导致稳定性增强的关键因素<sup>[39]</sup>。本研究基于计算机辅助酶的理性设计进行序列和结构分析,从而确定了分子改造的候选位点和突变方向。通过酶学性质测定、酶促反应动力学分析和圆二色谱表征,获得了催化效率和稳定性提高的 M196I、M196V 突变酶,然后结合分子动力学模拟,从原子层面分析了蛋白与配体的结合机制,提出了催化效率提高和热稳定性增强的结构见解。该研究为羟基类固醇脱氢酶工业属性的理性改造提供了理论指导和奠定了较坚实的研究基础。

## 参考文献

- [1] Olivera ER, Luengo JM. Steroids as environmental compounds recalcitrant to degradation: genetic mechanisms of bacterial biodegradation pathways. *Genes*, 2019, 10(7): 512.
- [2] Hang S, Paik D, Yao L, Kim E, Trinath J, Lu J, Ha S, Nelson BN, Kelly SP, Wu L, Zheng Y, Longman RS, Rastinejad F, Devlin AS, Krout MR, Fischbach MA, Littman DR, Huh JR. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*, 2019, 576(7785): 143–148.
- [3] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(2): 241–259.
- [4] Tonin F, Otten LG, Arends IWCE. NAD<sup>+</sup>-dependent enzymatic route for the epimerization of hydroxysteroids. *ChemSusChem*, 2019, 12(13): 3192–3203.
- [5] Huang XM, Cao XJ. Preparation of ursodeoxycholic acid from 7-ketone lithocholic acid by stereoselective electroreduction. *Bioresources and Bioprocessing*, 2015, 2: 27.
- [6] Eggert T, Bakonyi D, Hummel W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *Journal of Biotechnology*, 2014, 191: 11–21.
- [7] Tonin F, Arends IWCE. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2018, 14: 470–483.
- [8] Bertuletti S, Ferrandi EE, Marzorati S, Vanoni M, Riva S, Monti D. Insights into the substrate promiscuity of novel hydroxysteroid dehydrogenases. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2020, 362(12): 2474–2485.
- [9] Ferrandi EE, Bertolesi GM, Polentini F, Negri A, Riva S, Monti D. In search of sustainable chemical processes: cloning, recombinant expression, and functional characterization of the 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases from *Clostridium absonum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(5): 1221–1233.
- [10] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han LY, He J, Lanczycki CJ, Lu SN, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang ZX, Yamashita RA, Zhang DC, Zheng CJ, Geer LY, Bryant SH. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(D1): D200–D203.

- [11] Penning TM. Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: insights into inhibitor design and evaluation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 125(1/2): 46–56.
- [12] Tanaka N, Nonaka T, Tanabe T, Yoshimoto T, Tsuru D, Mitsui Y. Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1996, 35(24): 7715–7730.
- [13] Medici A, Pedrini P, Bianchini E, Fantin G, Guerrini A, Natalini B, Pellicciari R. 7 $\alpha$ -OH epimerisation of bile acids via oxido-reduction with *Xanthomonas maltophilia*. *Steroids*, 2002, 67(1): 51–56.
- [14] Bakonyi D, Hummel W. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel NADP<sup>+</sup>-dependent 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium difficile* and its application for the oxidation of bile acids. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 99: 16–24.
- [15] Ji QZ, Tan J, Zhu LC, Lou DS, Wang BC. Preparing tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) using a double-enzyme-coupled system. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 105: 1–9.
- [16] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485: 185–194.
- [17] Zhang RZ, Xu Y, Xiao R. Redesigning alcohol dehydrogenases/reductases for more efficient biosynthesis of enantiopure isomers. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1671–1684.
- [18] Dhagat U, Endo S, Soda M, Hara A, El-Kabani O. Factorizing the role of a critical leucine residue in the binding of substrate to human 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1): molecular modeling and kinetic studies of the Leu308Val mutant enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(17): 5274–5276.
- [19] Thomas JL, Mack VL, Sun JP, Terrell JR, Bucholtz KM. The functions of key residues in the inhibitor, substrate and cofactor sites of human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are validated by mutagenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 120(4/5): 192–199.
- [20] Zhang RZ, Geng YW, Xu Y, Zhang WC, Wang SS, Xiao R. Carbonyl reductase SCRII from *Candida parapsilosis* catalyzes anti-Prelog reaction to (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol with absolute stereochemical selectivity. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 483–489.
- [21] Ganjoo A, Tripathi A, Chetti P. Structural assessment and identification of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020, 38(16): 4928–4937.
- [22] Zhou JP, Zhang RZ, Yang TW, Liu QL, Zheng JX, Wang F, Liu F, Xu MJ, Zhang X, Rao ZM. Relieving allosteric inhibition by designing active inclusion bodies and coating of the inclusion bodies with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials for sustainable 2-oxobutyric acid production. *ACS Catalysis*, 2018, 8(9): 8889–8901.
- [23] Son M, Park C, Kwon SG, Bang WY, Kim SW, Kim CW, Lee KW. Structural importance of the C-terminal region in pig aldo-keto reductase family 1 member C1 and their effects on enzymatic activity. *BMC Structural Biology*, 2015, 15: 1.
- [24] Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015, 10(5): 449–461.
- [25] Höhne M, Schätzle S, Jochens H, Robins K, Bornscheuer UT. Rational assignment of key motifs for function guides *in silico* enzyme identification. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(11): 807–813.
- [26] Sun ZT, Wu L, Bocola M, Chan HCS, Lonsdale R, Kong XD, Yuan SG, Zhou JH, Reetz MT. Structural and computational insight into the catalytic mechanism of limonene epoxide hydrolase mutants in stereoselective transformations. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(1): 310–318.
- [27] Hessels J, Detz RJ, Koper MTM, Reek JNH. Rational design rules for molecular water oxidation catalysts based on scaling relationships. *Chemistry: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2017, 23(65): 16413–16418.
- [28] Anishchenko I, Ovchinnikov S, Kamisetty H, Baker D. Origins of coevolution between residues distant in protein 3D structures. *PNAS*, 2017, 114(34): 9122–9127.
- [29] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320–W324.
- [30] Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu XQ, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jörnvall H. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 143/144: 247–253.
- [31] Khazanov NA, Carlson HA. Exploring the composition

- of protein-ligand binding sites on a large scale. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(11): e1003321.
- [32] Huang B, Zhao Q, Zhou JH, Xu G. Enhanced activity and substrate tolerance of 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase by directed evolution for 7-ketolithocholic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(6): 2665–2674.
- [33] Giovannini PP, Grandini A, Perrone D, Pedrini P, Fantin G, Fogagnolo M. 7 $\alpha$ - and 12 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus* lwoffii: a new integrated chemo-enzymatic route to ursodeoxycholic acid. *Steroids*, 2008, 73(14): 1385–1390.
- [34] Yoshimoto T, Higashi H, Kanatani A, Lin XS, Nagai H, Oyama H, Kurazono K, Tsuru D. Cloning and sequencing of the 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(7): 2173–2179.
- [35] Burra PV, Zhang Y, Godzik A, Stec B. Global distribution of conformational states derived from redundant models in the PDB points to non-uniqueness of the protein structure. *PNAS*, 2009, 106(26): 10505–10510.
- [36] Hyndman RJ, Koehler AB. Another look at measures of forecast accuracy. *International Journal of Forecasting*, 2006, 22(4): 679–688.
- [37] Lancaster L, Abdallah W, Banta S, Wheeldon I. Engineering enzyme microenvironments for enhanced biocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(14): 5177–5186.
- [38] Lee J, Goodey NM. Catalytic contributions from remote regions of enzyme structure. *Chemical Reviews*, 2011, 111(12): 7595–7624.
- [39] Yu HR, Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 308–315.
- [40] Blanco A, Blanco G. Medical Biochemistry, Chapter 8-Enzymes. Academic Press, 2017: 153–175.

(本文责编 李磊)