DOI:10.12441/spyswjs.20240224004 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0163-10

多酶一步法还原石胆酸制备熊去氧胆酸

吕 迪[1] 席志文[1] 解修兵[1] 徐 岩[1] 张文池[2] 张荣珍[1*]

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 约翰·霍普金斯大学医学院,美国 马里兰州 巴尔的摩 21205)

摘要:熊去氧胆酸是一种重要的治疗性胆汁酸,特别是在治疗胆囊炎和胆固醇型胆结石方面有重要应用。利用大肠杆菌全细胞系统中的P450单加氧酶CYP107D1(OleP),在石胆酸7β-位置区域进行选择性和立体选择性羟基化反应产生熊去氧胆酸。一步法生物合成熊去氧胆酸可以避免残酷的活熊胆汁提取和低效率的化学合成。通过对OleP的突变体F84Q/S240A/V291G(OlePs)与氧化还原伴侣蛋白的共表达组合设计,构建了一种高效合成熊去氧胆酸的重组表达菌株*Escherichia coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs。基于重组菌株*E. coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs的全细胞催化反应,熊去氧胆酸产量显著提升,产率为88.28%,比未共表达氧化还原伴侣时的产率提升73.96%。该研究结果在一步法还原石胆酸制备熊去氧胆酸方面取得进展,为以生物废料石胆酸为底物制备熊去氧胆酸开辟了新的合成途径。

关键词:P450单加氧酶;理性设计;石胆酸;熊去氧胆酸;全细胞一步催化

Multi-Enzymatic One-Pot Reduction of Lithocholic Acid to Ursodeoxycholic Acid

LYU Di[1] *XI Zhiwen*[1] *XIE Xiubing*[1] *XU Yan*[1] *ZHANG Wenchi*[2] *ZHANG Rongzhen*[1*]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore 21205, USA)

Abstract: Ursodeoxycholic acid is an important therapeutic bile acid, especially in the treatment of cholecystitis and the prevention of cholesterol-type gallstones. The authors produced ursodeoxycholic acid through regioselective and stereoselective hydroxylation at the 7β-position of lithocholic acid using the P450 monooxygenase CYP107D1 (OleP) in *E. coli* whole-cell system. Ursodeoxycholic acid was biosynthesized using an efficient one-step method, avoiding the cruel practice of extracting bile from live bear and the inefficiencies of chemical synthesis. Through the design of the co-expression combination of the mutant F84Q/S240A/V291G (OlePs) of OleP and the redox chaperone, a recombinant expression strain *Escherichia coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs was developed. Utilizing this recombinant strain, the whole-cell catalytic reaction of *E. coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs led to a substantial increase in a significantly increased yield of ursodeoxycholic acid yield at 88.28%, which was 73.96% higher than that of without the co-expression of redox chaperone. The author has made progress in the preparation of ursodeoxycholic acid through one-step reduction of lithocholic acid, offering possibilities for the synthesis of ursodeoxycholic acid from biowaste lithocholic acid.

Keywords: P450 monooxygenase; rational design; lithocholic acid; ursodeoxycholic acid; whole-cell one-step catalysis

---

基金项目:国家“十四五”重点研究计划项目(2023YFA0914500);国家自然科学基金项目(32271487);国家轻工技术与工程一级学科规划项目(LITE2018-12);高校学科人才引进计划项目(111-2-06)。

通信作者:张荣珍(1973—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶催化工程和食品酶生物制备研究。E-mail:rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-02-24 **修回日期:**2024-03-15

熊去氧胆酸（ursodeoxycholic acid，UDCA）副作用较鹅去氧胆酸小[1]，临床上常用于治疗胆囊炎[2]。UDCA因具有抗炎特性，常用于治疗囊性纤维化[3]和原发性胆汁性胆管炎等肝脏疾病[4]。Fiorucci等的研究指出，UDCA对人体抵御SARS-CoV-2和CoV-19具有较好的作用[5]。

石胆酸（lithocholic acid，LCA）是一种常见且廉价的肉类生产废料[6]，广泛存在于绵羊[7]、牛[7]、猪[8]等养殖动物中，与UDCA仅在7位碳原子上相差一个β-OH，是合成UDCA的理想起始原料[9]。一些微生物可催化LCA合成UDCA[10]，但目前还没有已知的酶可以选择性地将LCA 7β-位羟基化来生成UDCA[11]，微生物催化LCA合成UDCA的途径仍然是个谜[10]。因此，需要探索选择性催化LCA 7β-位的酶，在不涉及真菌的复杂代谢情况下将LCA直接转化为UDCA[12]，以避免复杂的下游纯化步骤。

P450单加氧酶CYP107D1（OleP）在自然界中分布广泛[13]，由于其催化反应的多样性及其在前体化合物羟基化方面的潜力[14]，被广泛应用于代谢调节和药物合成等领域[15-16]。天然P450单加氧酶产物选择性低[17]，难以满足工业生产的需要，因此对P450单加氧酶的选择性优化已成为重要研究方向[18]。P450单加氧酶也参与人体内其他物质如脂溶性维生素、类固醇和甾体等的代谢[19]。

OleP在生物合成途径中具有环氧化作用，Agematu等[20]的研究发现，OleP的羟基化反应发生在6β-、7β-、12β-和15β-位。但Grobe等[21]的研究表明，OleP的羟基化反应对于LCA等胆汁酸类底物仅发生在6β-位，形成3α-6β-12α-三羟基-5β-胆烷-24-酸和鼠去氧胆酸。为使OleP催化LCA生成UDCA，Grobe等[22]利用蛋白质工程改造OleP的区域选择性，但会产生许多副产物。因此理性改造OleP，使其催化底物LCA的7β-羟基（7-OH）[23]，具有重要意义。OleP催化反应是使假单胞氧还蛋白（putidaredoxin，PDX）电子转移到P450。Sibbesen等将细胞色素P450cam与黄素蛋白假单胞氧还蛋白还原酶（putidaredoxin reductase，PDR）、PDX以短肽TDGTASS连接[24]，大大提高了从PDR和PDX结构域到外源电子受体的电子转移速率，显著提高了重组P450酶的活性。

通过前期的文献调研，合成了提高7β-位羟基化反应效率的P450单加氧酶突变体F84Q/S240A/V291G（OlePs）[22]，与氧化还原伴侣蛋白PDR、PDX共表达，构建重组大肠杆菌，为催化LCA绿色高效合成UDCA提供了可能。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌*Escherichia. coli* BL21（DE3）和pET-28a质粒：保藏于作者所在课题组，用作宿主菌株和表达载体；NADH：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；LCA、UDCA、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）和羟高铁血红素：上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 单加氧酶OleP的定点突变

从NCBI数据库[25]中挖掘单加氧酶OleP（PDB ID：4XE3），送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行基因序列优化和基因合成。通过同源建模、分子对接以及多重序列比对等方法对OleP酶特定的氨基酸位点进行突变，获得突变体F84Q/S240A/V291G（OlePs）和重组突变株*E. coli* BL21/pET28-F84Q/S240A/V291G。定点突变所需引物见表1。

1.3 重组突变体OlePs表达载体的构建

从NCBI数据库中挖掘另外2种还原伴侣蛋白PDR、PDX，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行基因序列优化和基因合成。设计合成引物，利用PCR技术扩增目的基因。将目的基因与pET-28a表达载体连接获得重组质粒pET-28a-PDR-PDX-SD-AS-OlePs，然后将重组质粒转化到*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，构建重组菌株*E. coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs（*Ec*RXdsP）。为了方便后期用镍柱进行纯化，在终止密码子（TAA）前加上6×His组氨酸标签。基于突变体OlePs对应的基因序列设计了用于靶基因扩增的上下游引物，引物合成在生工生物工程（上海）股份有限公司进行。以梭状芽胞杆菌全基因组DNA为模板，以V-P450-F和V-P450-R为引物进行PCR扩增。PCR产物经纯化后用限制性内切酶*Bam*H Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切，酶切产物与pET-28a载体连接，转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，重组质粒和重组菌均进行了测序验证。

表1　本研究所需的引物

Table 1　Primers used in this study

引物	序列（5′—3′）
F84Q-F	GCGTATGCAGCCGACCCCGCCGGAAC
F84Q-R	GGGTCGGCTGCATACGCGGGGTCGCCGG
S240A-F	CATGGGCGTGGCCCTGCTGATTGCGGGCCATGA
S240A-R	CAATCAGCAGGGCCACGCCCATGTTCACAATTTC
V291G-F	TTATACCCCGCTGGGGAGCGCGGGCAGCTTTGTG
V291G-R	TGCCCGCGCTCCCCAGCGGGGTATAACGCAGC
V-PDR-F	CATCATCATCACATGAACGCGAACGATAAC
L2-P450-F	TGGCCGCTGGAACTGATGACCGATACC
P450-L2-R	TCGGTCATCAGTTCCAGCGGCCACTGA
P450-V-F	GAGCTGGTAACTCGAGCACCACCACCACCA
V-P450-R	GAGTTACCAGCTCACAATCTG
P450-V-R	CATGTGATGATGATGATGATGGCTGC

1.4　条件优化

使用低温和低诱导剂诱导策略进行重组OlePs酶的表达。将共表达*Ec*RXdsP的单菌落接种到含终浓度100 mmol/L卡那霉素的5 mL LB液体培养基中，在37 ℃、200 r/min下孵育8 h。将培养物以体积分数1%转移至含终浓度100 mmol/L卡那霉素的50 mL新鲜LB液体培养基中，在37 ℃、200 r/min下孵育约2 h后，加入1 mol/L的IPTG，在17 ℃、200 r/min下诱导培养12 h。菌液于8 000 *g*离心5 min，收集细菌，重悬和超声处理后，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析重组酶表达情况。

诱导剂浓度和诱导温度是影响载体表达的关键因素。为研究诱导剂浓度和诱导温度对载体表达的影响，分别对*E. coli* BL21/PDR-PDX-SD-AS-OlePs和*E. coli* BL21/pET-28a进行不同的温度与诱导剂浓度的诱导表达。

1.5　基于*Ec*RXdsP生物合成UDCA

构建5 mL反应体系：磷酸缓冲盐溶液（PBS）5 mL、LCA 0.4 mol/L、FAD 0.002 mol/L、NADH 0.8 mol/L、血红素0.1 mol/L和*Ec*RXdsP酶250 mg，在28 ℃、200 r/min下反应20 h，煮沸后，12 000 *g*离心5 min，终止反应。上清液经0.22 μm滤膜过滤，使用HPLC检测UDCA浓度。

在检测波长为195 nm、柱温为25 ℃的条件下，利用Hypersil ODS C_{18}色谱柱，HPLC分析产物UDCA和底物LCA。将流动相A（色谱级乙腈）和流动相B（体积分数0.1%磷酸）以体积比6∶4进行洗脱，流量为1 mL/min，运行时间为20 min。在PBS缓冲液中制备UDCA标准品，经0.22 μm微孔过滤器过滤，取样10 μL进行HPLC分析，得到各浓度UDCA的峰面积，通过线性拟合得到回归方程和相关系数。流动相为水（磷酸体积分数0.1%）和色谱级乙腈，以流量1 mL/min进行梯度洗脱。待测样品产物在相同色谱条件下用HPLC分析，根据测得峰面积，按回归方程计算出相应的样品浓度。

1.6　*Ec*RXdsP的酶学性质测定

*Ec*RXdsP催化LCA转化UDCA的反应时，辅酶NADH转化为NAD^+，利用这一特点，参照文献[21,26]的方法，酶活测定方法如下：

反应体系（200 μL）为：5 mmol/L的底物石胆酸，250 mmol/L的PBS（pH 8.5）、5 mol/L的NADH、0.5 mol/L的FAD、2.5 mol/L的血红素和适量的纯酶液。在28 ℃下，利用酶标仪连续测定10 min内340 nm处的吸光度变化，间隔30 s测定一次。酶活力定义：28 ℃下每分钟催化底物生成0.005 mol/L的UDCA所需的酶量为一个酶活力单位（）。比酶活的计算见公式（1）：

$$y=M/x \qquad (1)$$

式中：

M——28 ℃下每分钟催化底物生成0.005 mol/L的UDCA所需酶量，U；

y——比酶活，U/mg；

x——蛋白质质量，mg；

在不同pH条件下测定*Ec*RXdsP酶活力，确定*Ec*RXdsP的最适反应pH。缓冲液为0.2 mol/L的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠（pH 7.0~9.5）。用不同pH缓冲液稀释纯酶液，于4 ℃静置2 d，测定重组酶残余酶活力，探究*Ec*RXdsP的pH稳定性。

在最适反应pH条件下，将除*Ec*RXdsP外的反应组分于18~48 ℃（间隔5 ℃）保温10 min，加入适量酶液，测定不同温度条件下重组酶的酶活力，确定酶的最适反应温度。将等量酶液于18~48 ℃（间

隔 5 ℃）分别放置 1 h 后，于冰上冷却 3 min，然后加入其余反应组分，于 28 ℃测定 *Ec*RXdsP 的残余酶活力。以在冰上静置相同时间测定的酶活力为 100%，计算相对酶活力，探究 *Ec*RXdsP 的温度稳定性。

1.7 全细胞催化合成 UDCA 反应条件的优化

为了研究 pH 和反应温度对全细胞催化 7-羟基化反应的影响，控制反应 pH（pH 7.0~9.5）和反应温度（10~37 ℃），用 HPLC 分析反应结果。为了研究辅因子浓度对 7-羟基化反应的影响，在反应体系中加入不同浓度的辅酶 NADH（0.2~1 mol/L）、血红素（0.1~5 mol/L）、FAD（0.004~0.5 mol/L），并用 HPLC 分析产物产率。所有试验重复 3 次，取平均值进行数据分析。

1.8 全细胞催化合成 UDCA 的生物反应器及条件分析

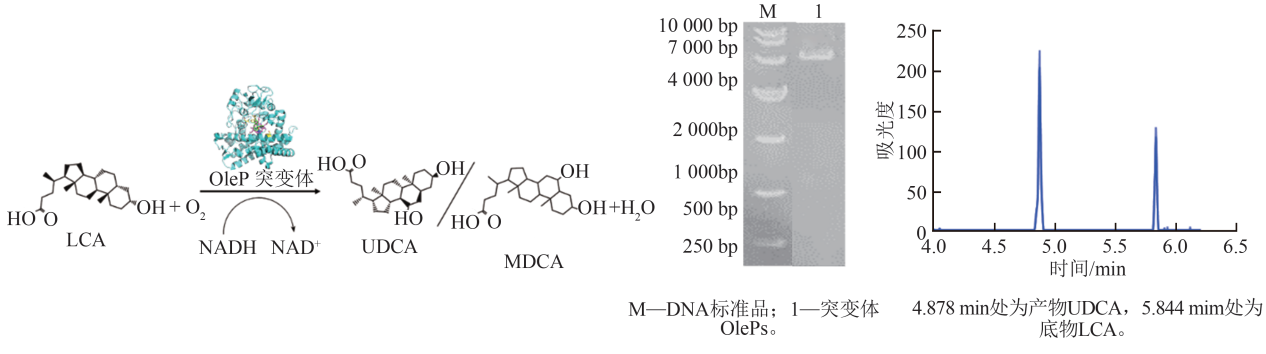
在 28°C 和 500 r/min 条件下，全细胞催化合成 UDCA，反应时间为 24 h，反应液为 200 mL 的 PBS 缓冲液（0.02 mol/L、pH 8.5），其中包含 0.6 mol/L 的 NADH、0.5 mol/L 的血红素和 0.1 mol/L 的 FAD。每隔 2 h 取样一次，通过 HPLC 分析检测 UDCA 的产率，绘制全细胞催化合成 UDCA 的时间反应曲线。

2 结果与讨论

2.1 OleP 野生型与突变体分析比较

对天然 OleP（WT）及其突变体进行表征，分析了突变体 OlePs 在 LCA 羟基化过程中的立体选择性变化，结果见图 1（a）~（b）。HPLC 结果显示，UDCA 的保留时间约为 4.87 min。通过不同浓度的 UDCA 与其相应的峰面积线性拟合，获得 UDCA 的标准曲线，并推导出对应的回归方程为 y_1=138.75x_1−2.463，r=0.999 5。

在浓度线性范围内，UDCA 的浓度与峰面积有良好的线性相关性。相同分析条件下 LCA 和 UDCA 的保留时间差异为 1.11 min，见图 1（c），表明该方法可用于产物的分析。



M—DNA标准品；1—突变体OlePs。

4.878 min处为产物UDCA，5.844 mim处为底物LCA。

(a) OleP酶突变体催化反应模型　(b) 突变体琼脂糖凝胶电泳分析　(c) 底物LCA和产物UDCA的HPLC图谱

图 1 OleP 突变体催化反应模型构建与分析

Fig. 1 Catalytic reaction model construction and analysis of OleP mutant

HPLC 分析结果见表 2。野生型酶（WT）催化 0.4 mol/L 的 LCA 产生相对较低水平的 6-OH 和 7-OH 代谢物，产率分别为 38.42% 和 9.48%，而 OlePs 相对 WT 对 LCA 的代谢产生的 6-OH 和 7-OH 产物，产率分别提高 8.14% 和 4.84%。据报道，天然 OleP 催化 LCA 转化 UDCA 的产率维持在 8.2% 左右[22]。这种天然酶与突变体之间的对比结果表明，羟基化过程的区域选择性发生了显著变化，突变体更有利于 LCA 的 7-OH 产物形成。但是 OlePs 催化 LCA 合成 7-OH 产物的产率仅为 14.32%，因此考虑将其与相关氧化还原伴侣蛋白进行连接，构建重组 OlePs 以提高 7-OH 产物的合成效率。

2.2 基于氧化还原伴侣共表达系统的构建

研究表明，OleP 的底物羟基化需要 2 个氧化还原伴侣来提供电子。PDR 接受来自 NADH 的 2 个

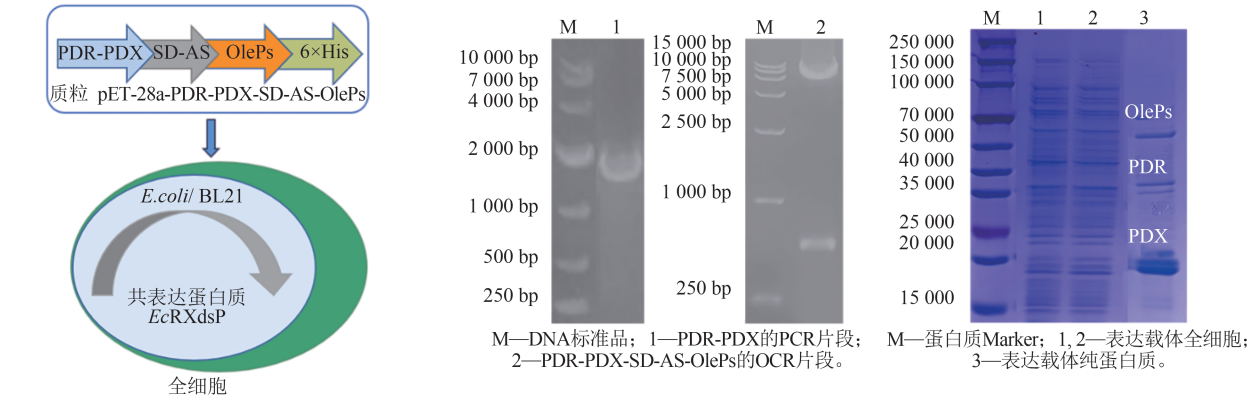
表2　WT与突变体OlePs催化产物的HPLC分析结果

Table 2　HPLC result of metabolites of WT and OlePs mutant

蛋白质	6-OH产物产率/%	7-OH产物产率/%
WT	38.42±1.74	9.48±2.13
OlePs	46.56±1.68	14.32±1.97

电子，通过PDX的介导，这些电子逐一转移到OleP上[27]。在共表达体系的构建过程中，影响酶功能的关键参数包括接头的密码子组成和接头的长度[28-29]。选择合适的接头类型和长度对于调整共表达蛋白质中各个亚基的活性具有重要意义[30-31]。此外，共表达蛋白质中亚基的顺序对于底物亲和力、中间产物转移和蛋白质的表达水平至关重要[32]。

作者设计了PDR-PDX-SD-AS-OlePs共表达系统，使得OlePs和PDR结构域在*E.coli*中表达，见图2(a)。PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图2(b)。在1 200 bp左右和8 200 bp左右有清晰的单一条带，与理论相对分子质量相符。其中PDR-PDX单元位于OleP结构域之前的三元融合蛋白中。SDS-PAGE分析结果见图2(c)，PDR-PDX-SD-AS-OlePs为共表达蛋白质，OlePs、PDR和PDX均在*E.coli*中成功表达。



(a) PDR-PDX-SD-AS-OlePs氧化还原伴侣共表达系统构建　(b) 基于氧化还原伴侣共表达载体的琼脂糖凝胶电泳分析　(c) PDR-PDX-SD-AS-OlePs氧化还原伴侣蛋白的SDS-PAGE分析

图2　PDR-PDX-SD-AS-OlePs氧化还原伴侣共表达系统的构建与分析

Fig. 2　Construction and analysis of redox chaperone co-expression system PDR-PDX-SD-AS-OlePs

2.3　*Ec*RXdsP酶学性质测定

在不同pH缓冲液条件下测定*Ec*RXdsP的酶活力，确定*Ec*RXdsP的最适反应pH。如图3(a)所示，*Ec*RXdsP和WT在pH 8.5时酶活力最高。将*Ec*RXdsP分别置于pH 7.0~9.5之内的不同缓冲液中，4 ℃孵育2 d，测定*Ec*RXdsP的残余酶活力，探究pH对酶稳定性的影响。*Ec*RXdsP和WT在pH 8.0~9.0时酶活力非常稳定，孵育2 d后，*Ec*RXdsP残余酶活力保持在75%以上，见图3(b)。与WT相比，*Ec*RXdsP表现出较强的pH稳定性。据报道，天然OleP酶在pH 7.5~9.0条件下孵育30 min后残余酶活力维持在70%以上[13]。这些结果表明，*Ec*RXdsP比天然OleP的pH稳定性更好，能够在较宽的pH范围内发挥催化功能。

在最适反应pH下，测定不同温度(18~48 ℃)下*Ec*RXdsP的酶活力，确定其最适反应温度。如图3(c)所示，*Ec*RXdsP和WT的最适反应温度为28 ℃。在最适反应条件下，*Ec*RXdsP和WT的比酶活分别为20.04 U/mg和12.93 U/mg，前者是后者的1.55倍。

将*Ec*RXdsP置于不同温度下水浴1 h，测定残余酶活力，探究*Ec*RXdsP的温度稳定性。如图3(d)所示，温度不超过33 ℃时，*Ec*RXdsP仍保留90%以上的残余酶活力，而WT的酶活力几乎不受影响。温度高于33 ℃时，*Ec*RXdsP的酶活力急剧下降；温度达到48 ℃时，酶的结构遭到破坏，酶活力完全丧失。

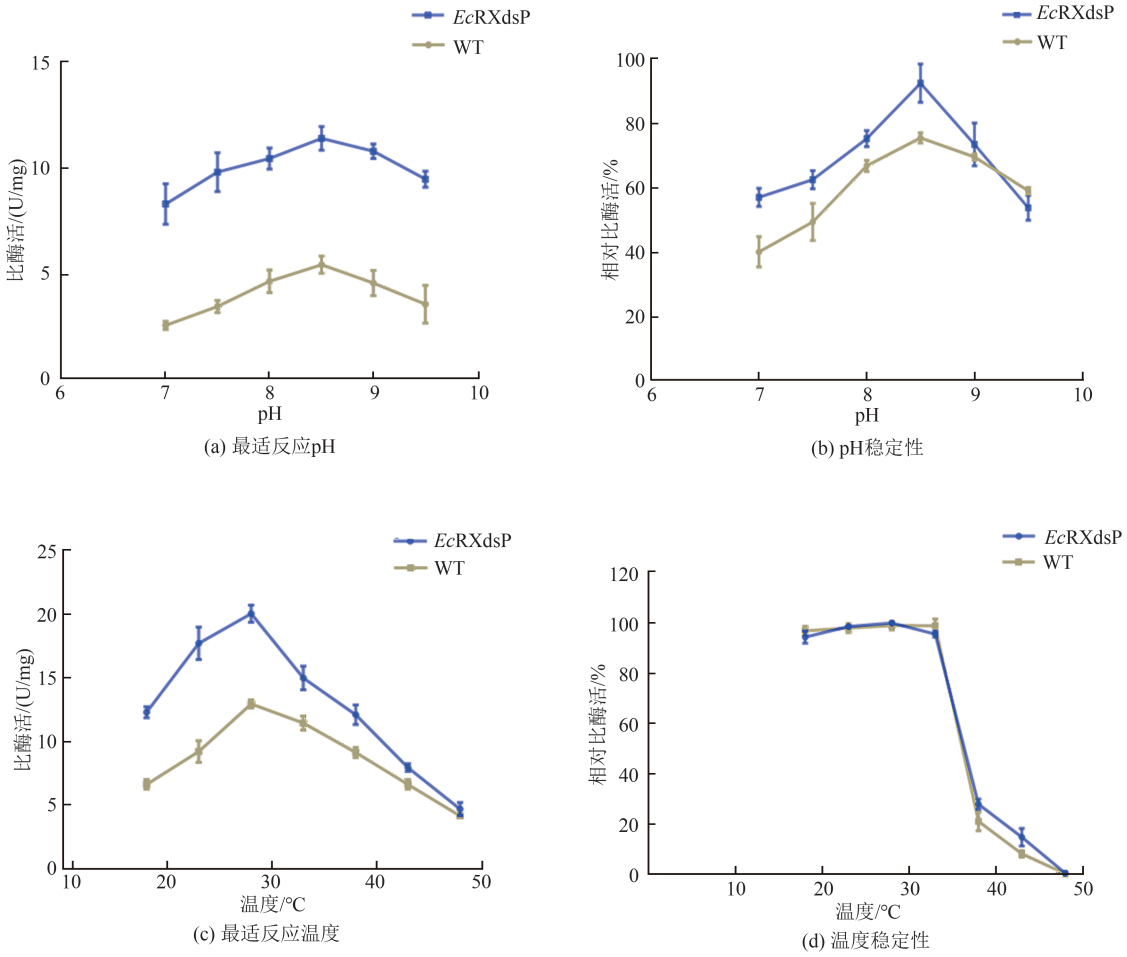


图 3　*Ec*RXdsP 与 WT 的酶学性质

Fig. 3　Enzymatic properties of *Ec*RXdsP and WT

2.4　全细胞催化合成 UDCA 反应条件的优化

以表达 *Ec*RXdsP 的全细胞为催化剂，催化 0.4 mol/L 底物 LCA，在 24 h 时取样，对催化产物的浓度进行分析计算。如图 4(a)所示，加入氧化还原伴侣蛋白可以进一步促进 OlePs 的底物羟基化反应，部分 LCA 已转化为 UDCA，*Ec*RXdsP 催化 LCA 合成 UDCA 的产率为 64.81%，比 OlePs 高 50.24%；*Ec*RXdsP 催化 LCA 合成 6-OH 产物产率为 32.84%，这可能是由于全细胞催化 LCA 合成 UDCA 时，产物 UDCA 的增加抑制了 6-OH 副产物的生成[33]。当 PDX 的 C 末端连接到 OleP 的 N 末端时，PDR-PDX-SD-AS-OlePs 构建体的活性较高。

为研究反应 pH 和温度对全细胞合成 UDCA 的影响，首先将反应温度控制在 28 ℃，反应时间为 24 h，pH 分别为 7.5、8.0、8.5 和 9.0，在 0.4 mol/L 的 LCA 条件下，全细胞催化合成 UDCA。HPLC 结果显示，*Ec*RXdsP 在 pH 为 8.5 的条件下，催化合成的产物产率最高，为 62.34%，见图 4(b)。在 pH 为 8.5 的条件下，反应时间为 24 h，温度分别设定为 10、15、20、25、28、32、37 ℃，在 0.4 mol/L 的 LCA 条件下，全细胞催化合成 UDCA。HPLC 结果显示，*Ec*RXdsP 在 28 ℃时 *Ec*RXdsP 催化合成的产物产率最高，为 63.91%，见图 4(c)。

选取全细胞催化生物产率最高的 *Ec*RXdsP 作为研究对象，分别研究了辅酶浓度、血红素与底物辅因子 FAD 对全细胞催化合成 UDCA 的影响。

在反应温度 28 ℃、反应初始 pH 为 8.5、反应时间 24 h、底物 LCA 为 0.4 mol/L、FAD 为 0.004 mol/L、血红素为 0.1 mol/L 的条件下，研究了 NADH 添加

量对全细胞催化合成UDCA的影响。HPLC结果表明，在NADH为0.6 mol/L时，UCDA产率最大，为64.43%；继续提高NADH浓度，产率几乎不变，见图4(d)。

在反应温度为28 ℃、反应pH为8.5，反应时间为24 h，LCA为0.4 mol/L、FAD为0.004 mol/L、NADH为0.6 mol/L的条件下，研究了不同血红素添加量对全细胞催化合成UDCA的影响。结果表明，在血红素添加量为0.5 mol/L时，全细胞催化合成UDCA产率最高，为73.58%，见图4(e)。随着血红素浓度的提高，产率下降，考虑为血红素浓度过高存在负反馈效应，抑制5-氨基乙酰丙酸的生成，从而进一步抑制OleP的羟基化反应。因此，确定血红素的最适添加量为0.5 mol/L。

在LCA添加量为0.4 mol/L时，反应温度、反应pH、NADH添加量和血红素添加量最佳时，FAD添加量分别为0.004、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mol/L，进行全细胞催化反应。结果表明，在底物添加量为0.4 mol/L的条件下，反应温度28 ℃，反应初始pH为8.5，NADH为0.6 mol/L，血红素为0.5 mol/L，FAD为0.1 mol/L时，全细胞催化合成UDCA产率最高，为77.53%。与WT相比，UDCA产率提高了68.05%，见图4(f)。

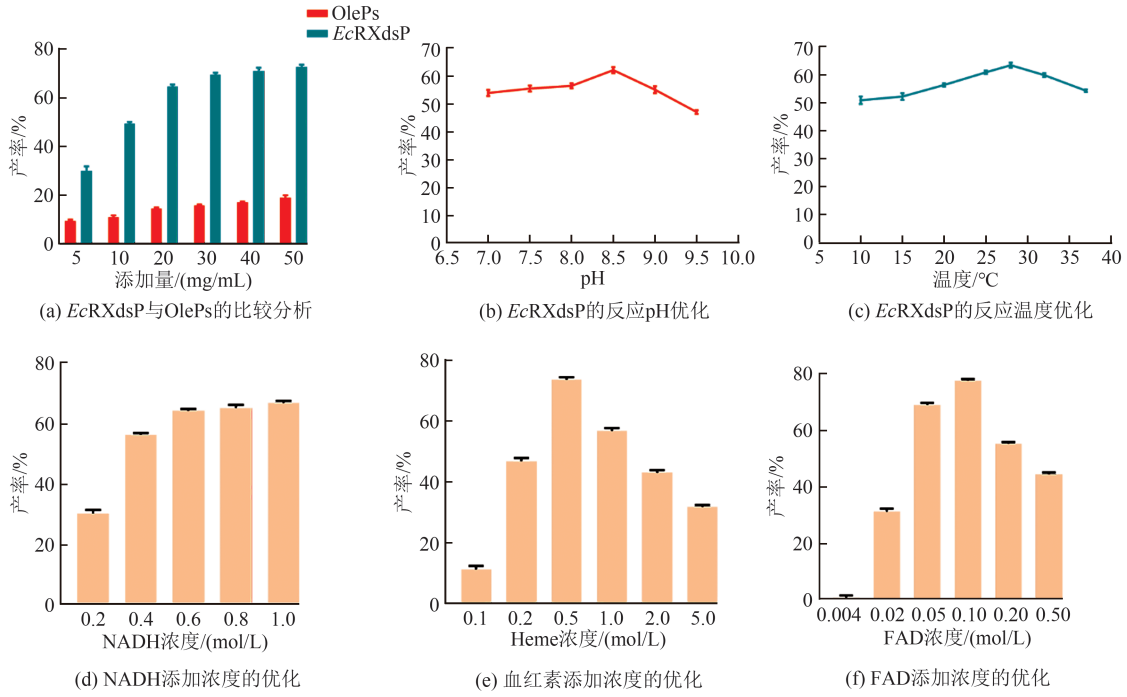


图4　重组大肠杆菌全细胞催化合成熊去氧胆酸反应条件的优化

Fig. 4　Optimization of conditions for recombinant *E. coli* whole-cell catalytic synthesis of ursodeoxycholic acid

2.5　500 mL生物反应器中反应时间对UDCA合成的影响

基于上述全细胞催化合成UDCA反应条件的优化结果，在最优反应条件：温度28 ℃，初始pH为8.5，NADH添加量为0.6 mol/L，血红素添加量为0.5 mol/L，FAD添加量为0.1 mol/L，使用*Ec*RXdsP在500 mL的生物反应器中研究全细胞催化合成UDCA的时间曲线。如图5所示，当反应至16 h时，*Ec*RXdsP催化合成UDCA的产率较高，为81.87%；反应至22 h时，UDCA产率达到最大值，为88.28%。据报道，当OleP与氧化还原伴侣系统pACYCDuet-1-PDR/PDX共转化时，UDCA的产率可达72.8%[34]。这可能是由于LCA合成UDCA的同时，一部分LCA生成副产物鼠去氧胆酸，导致UDCA产率降低[33]。在500 mL反应器中的研究结果为大规模一步法催化LCA合成UDCA奠定了较坚实的基础，具有较好的工业应用前景。

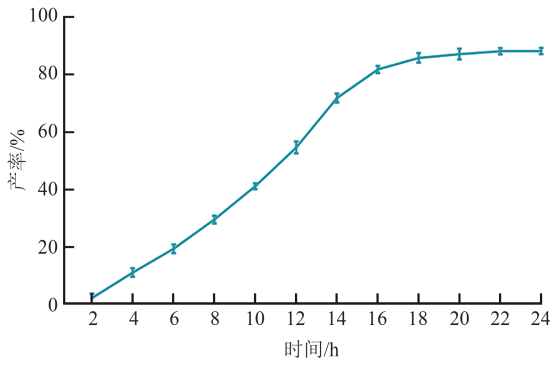


图 5 *Ec*RXdsP 高效合成 UDCA 的时间过程

Fig. 5 Time course of efficient synthesis of UDCA by recombinant *Ec*RXdsP enzyme

3 结论

在本研究中，突变体 F84Q/S240A/V291G（OlePs）催化 LCA 生物合成 7-OH 产物的产率达到 14.32%，较 WT 产率提高了 4.84%。利用表达载体 pET-28a，通过连接 OlePs 与假单胞菌来源的 PDR 和 PDX，设计了 PDR-PDX-SD-AS-OlePs 共表达系统，构建了重组大肠杆菌，优化了全细胞催化 LCA 合成 UDCA 过程，提高了产物产率；对构建的 PDR-PDX-SD-AS-OlePs 共表达系统全细胞催化 LCA 合成 UDCA 的反应条件进行优化，确定在底物为 0.4 mol/L 的条件下，反应温度 28 ℃、反应初始 pH 为 8.5、NADH 为 0.6 mol/L、血红素为 0.5 mol/L、FAD 为 0.1 mol/L 时，全细胞催化合成 UDCA 产率最高，为 77.53%。与 WT 全细胞催化合成 UDCA 结果相比，本研究中的 UDCA 产率提高了 68.05%，提高 OleP 的立体选择性，为构建 OleP 与氧化还原伴侣蛋白共表达系统提供了新思路。在生物反应器中显著提升了全细胞催化 LCA 合成 UDCA 的产率，产率高达 88.28%，为生物法大规模工业化制备 UDCA 奠定了扎实的研究基础。

参考文献

[1] FISCHER S，NEUBRAND M，PAUMGARTNER G. Biotransformation of orally administered ursodeoxycholic acid in man as observed in gallbladder bile，serum and urine [J]. European Journal of Clinical Investigation，1993，23（1）：28-36.

[2] TONIN F，ARENDS I W C E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid（UDCA）：a critical review[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry，2018，14：470-483.

[3] HOPF C，GRIESHABER R，HARTMANN H，et al. Therapeutic equivalence of ursodeoxycholic acid tablets and ursodeoxycholic acid capsules for the treatment of primary biliary cirrhosis [J]. Clinical Pharmacology in Drug Development，2013，2（3）：231-236.

[4] GOOSSENS J F，BAILLY C. Ursodeoxycholic acid and cancer：from chemoprevention to chemotherapy [J]. Pharmacology & Therapeutics，2019，203：107396.

[5] FIORUCCI S，URBANI G，DISTRUTTI E. Bile acids and SARS-CoV-2：ursodeoxycholic acid as a potential treatment of COVID-19 [J]. Recent Advances in Inflammation & Allergy Drug Discovery，2023，17（1）：2-6.

[6] OWEN R W，HILL M J，BILTON R F. Biotransformation of chenodeoxycholic acid by *Pseudomonas* species NCIB 10590 under anaerobic conditions [J]. Journal of Lipid Research，1983，24（9）：1109-1118.

[7] TSAI S J，ZHONG Y S，WENG J F，et al. Determination of bile acids in pig liver，pig kidney and bovine liver by gas chromatography-chemical ionization tandem mass spectrometry with total ion chromatograms and extraction ion chromatograms [J]. Journal of Chromatography A，2011，1218（3）：524-533.

[8] OWEN R W，BILTON R F. The biotransformation of hyodeoxycholic acid by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under anaerobic conditions [J]. Journal of Steroid Biochemistry，1983，19（3）：1355-1362.

[9] KOLLEROV V，DONOVA M. Ursodeoxycholic acid production by *Gibberella zeae* mutants[J]. AMB Express，2022，12（1）：105.

[10] KOLLEROV V V，MONTI D，DESHCHEREVSKAYA N O，et al. Hydroxylation of lithocholic acid by selected *Actinobacteria* and filamentous fungi[J]. Steroids，2013，78（3）：370-378.

[11] YANG B L，ZHA R F，ZHAO W Y，et al. Comparative transcriptome analysis of the fungus *Gibberella zeae* transforming lithocholic acid into ursodeoxycholic acid [J]. Biotechnology Letters，2021，43（2）：415-422.

[12] KULPRECHA S，UEDA T，NIHIRA T，et al. Optimum conditions for ursodeoxycholic acid production from lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41[J]. Applied and Environmental Microbiology，1985，49（2）：338-344.

[13] PADAYACHEE T，LAMB D C，NELSON D R，et al. Structure-function analysis of the biotechnologically important cytochrome P450 107（CYP107）enzyme

family[J]. Biomolecules，2023，13(12)：1733.

[14] YUN C H，KIM K H，KIM D H，et al. The bacterial P450 BM3：a prototype for a biocatalyst with human P450 activities[J]. Trends in Biotechnology，2007，25(7)：289-298.

[15] PARK H，PARK G，JEON W，et al. Whole-cell biocatalysis using cytochrome P450 monooxygenases for biotransformation of sustainable bioresources (fatty acids，fatty alkanes，and aromatic amino acids)[J]. Biotechnology Advances，2020，40：107504.

[16] WEI Y F，ANG E L，ZHAO H M. Recent developments in the application of P450 based biocatalysts[J]. Current Opinion in Chemical Biology，2018，43：1-7.

[17] SUN W T，XUE H J，LIU H，et al. Controlling chemo- and regioselectivity of a plant P450 in yeast cell toward rare licorice triterpenoid biosynthesis[J]. ACS Catalysis，2020，10(7)：4253-4260.

[18] QU G，LI A T，ACEVEDO-ROCHA C G，et al. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes[J]. Angewandte Chemie-International Edition in English，2020，59(32)：13204-13231.

[19] OTAKE Y，WALLE T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1，CYP1A2，and CYP2C9[J]. Drug Metabolism and Disposition：the Biological Fate of Chemicals，2002，30(2)：103-105.

[20] AGEMATU H，MATSUMOTO N，FUJII Y，et al. Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry，2006，70(1)：307-311.

[21] GROBE S，WSZOŁEK A，BRUNDIEK H，et al. Highly selective bile acid hydroxylation by the multifunctional bacterial P450 monooxygenase CYP107D1 (OleP)[J]. Biotechnology Letters，2020，42(5)：819-824.

[22] GROBE S，BADENHORST C P S，BAYER T，et al. Engineering regioselectivity of a P450 monooxygenase enables the synthesis of ursodeoxycholic acid *via* 7*β*-hydroxylation of lithocholic acid[J]. Angewandte Chemie-International Edition in English，2021，60(2)：753-757.

[23] SAWADA H，KULPRECHA S，NILUBOL N，et al. Microbial production of ursodeoxycholic acid from lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41[J]. Applied and Environmental Microbiology，1982，44(6)：1249-1252.

[24] SIBBESEN O，DE VOSS J J，MONTELLANO P R. Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome p450cam triple fusion protein：construction of a self-sufficient *Escherichia coli* catalytic system[J]. The Journal of Biological Chemistry，1996，271(37)：22462-22469.

[25] 周霞，景晓冉，顾洁，等. 脲酶基因挖掘及其在枯草芽孢杆菌中的重组表达[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(5)：28-37.
ZHOU X，JING X R，GU J，et al. Gene mining of urease and recombinant expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(5)：28-37.(in Chinese)

[26] 潘蕾蔓，张祎，贺萍，等. 预酶解对玛咖蛋白胃肠消化及免疫调节活性的影响[J]. 现代食品科技，2023，39(2)：253-263.
PAN L M，ZHANG Y，HE P，et al. Effects of pre-hydrolysis on the gastrointestinal digestion and immunomodulatory activity of maca proteins[J]. Modern Food Science and Technology，2023，39(2)：253-263.(in Chinese)

[27] BRACCO P，JANSSEN D B，SCHALLMEY A. Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5，a bacterial cytochrome P450[J]. Microbial Cell Factories，2013，12：95.

[28] LU P，FENG M G. Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2008，79(4)：579-587.

[29] LI G，HUANG Z L，ZHANG C，et al. Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2016，100(1)：215-225.

[30] SHAMRIZ S，OFOGHI H，MOAZAMI N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application[J]. Computers in Biology and Medicine，2016，76：24-29.

[31] WU X，ZHANG C，XING X H，et al. Construction and characterization of novel bifunctional fusion proteins composed of alcohol dehydrogenase and NADH oxidase with efficient oxidized cofactor regeneration[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry，2022，69(4)：1535-1544.

[32] HUANG Z L，YE F C，ZHANG C，et al. Rational design of a tripartite fusion protein of heparinase I enables one-step affinity purification and real-time activity detection[J]. Journal of Biotechnology，2013，163(1)：30-37.

[33] LI A T，ACEVEDO-ROCHA C G，D'AMORE L，et al. Regio- and stereoselective steroid hydroxylation at C7 by

cytochrome P450 monooxygenase mutants [J]. Angewandte Chemie-International Edition in English, 2020, 59(30): 12499-12505.

[34] CHURBANOVA I Y, POULOS T L, SEVRIOUKOVA I F. Production and characterization of a functional putidaredoxin reductase-putidaredoxin covalent complex [J]. Biochemistry, 2010, 49(1): 58-67.

（责任编辑：龚梦月）

（上接第 132 页）

CHEN M M, WU X Z. Research progress of ethanol-tolerant lactic acid bacteria in traditional fermented vegetable[J]. China Brewing, 2023, 42(1): 9-14.

[26] 纪晓燚. 优良乳酸菌的筛选及其发酵蔬菜的应用研究[D]. 杭州：浙江大学，2014.

[27] ZHAO N, HUANG Y L, LAI H M, et al. The role of abiotic and biotic factors of aged brine in directing microbial assembly and volatile profiles of Paocai during fermentation[J]. Food Bioscience, 2024, 57: 103592.

[28] 张锡茹，关慧，邢少华，等. 泡菜微生物演替与风味物质变化的研究进展[J]. 食品科学，2021，42(23)：294-305.
ZHANG X R, GUAN H, XING S H, et al. Advances in research on microbial succession and flavor changes in pickles[J]. Food Science, 2021, 42(23): 294-305.

[29] 冯宁，白亚磊，徐庆阳，等. 氮源及其补加策略对*L*-缬氨酸发酵的影响[J]. 食品与发酵工业，2011，37(4)：1-6.
FENG N, BAI Y L, XU Q Y, et al. The effect of nitrogen sources and its additional strategies on *L*-valine fermentation by *Brevibacterium flavum* XV0505 [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(4): 1-6.

[30] 黄盛蓝，杜木英，周先容，等. 发软泡菜品质及风味物质主成分分析[J]. 食品与机械，2017，33(12)：36-44.
HUANG S L, DU M Y, ZHOU X R, et al. Quality indifferent degrees of softness of pickles and its principal components analysis of volatiles[J]. Food & Machinery, 2017, 33(12): 36-44.

[31] 王蕾，田方，孙志栋，等. 芥菜传统腌制发酵工艺优化研究进展[J]. 食品与发酵工业，2022，48(1)：324-329.
WANG L, TIAN F, SUN Z D, et al. Research progress on optimizing the traditional fermentation process of pickled mustard[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(1): 324-329.

[32] 欧雪. 接种乳酸菌发酵低盐泡酸菜工艺优化及辐照杀菌对其品质的影响[D]. 雅安：四川农业大学，2022.

（责任编辑：闫林红）