

半理性设计提高甲酸脱氢酶(*Cb*FDH)活力及热稳定性

倪晗朦, 胡孟凯, 张恒维, 张显, 潘学玮, 饶志明, 周楠迪*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)是 NADH 循环再生的最佳酶之一, 广泛应用于食品、医药和化工等行业。但是野生型甲酸脱氢酶普遍存在酶活低、催化效率差等缺点, 导致产品转化率较低, 影响产品的工业化生产。为了获得具有更佳催化性能的甲酸脱氢酶, 作者以博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)来源的甲酸脱氢酶为模板, 利用 HOTSPOT WIZARD v3.1 进行三维结构模拟预测, 构建了 P68G、Q197K 两个突变体, 比酶活较野生型分别提高了 11% 和 33%。这是由于 P68G 氨基酸残基侧链的苯环被氢取代, 减少了甲酸盐底物进入口袋的空间位阻; 而 Q197K 侧链酰胺基突变为胺丁基增强了酶的柔性。然而这两个突变点对甲酸脱氢酶的热稳定性产生了负面影响, 因此在 I239 位引入半胱氨酸突变与 C262 构成二硫键以提高其热稳定性, 最终获得一株热稳定性显著提高, 比酶活较野生型提高 31%、较 I239C 提高 45% 的突变株 *Cb*FDH Q197K/I239C。通过半理性预测蛋白质结构提高了甲酸脱氢酶的活力和热稳定性, 为高效构建性能稳定、还原力强的甲酸脱氢酶提供了理论基础。

关键词: 甲酸脱氢酶; 半理性设计; 博伊丁假丝酵母; 定点突变; 辅酶循环

中图分类号: Q 789

文章编号: 1673-1689(2023)10-0001-08

DOI: 10.12441/spyswjs.20220322002

Enhanced Activity and Thermal Stability of Formate Dehydrogenase (*Cb*FDH) via Semi-Rational Design

NI Hanmeng, HU Mengkai, ZHANG Hengwei, ZHANG Xian,

PAN Xuewei, RAO Zhiming, ZHOU Nandi*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Formate dehydrogenase (FDH) is one of the most effective enzymes for NADH regeneration and is extensively utilized in the food, pharmaceutical and chemical industries. However, wild-type FDH often suffers from low enzyme activity and poor catalytic efficiency, resulting in lower product conversion and hindering industrial production. In order to obtain FDH with improved catalytic performance, FDH from *Candida boidinii* was used as a template and HOTSPOT WIZARD v3.1 was employed for three-dimensional structure simulation and prediction.

收稿日期: 2022-03-22 修回日期: 2022-04-22

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2100900); 国家自然科学基金项目(32171471, 32071470); 中国博士后科学基金资助项目(2021M691280); 江苏省博士后科研资助计划(2021K296B); 江苏高校优势学科建设工程资助项目和江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

* 通信作者: 周楠迪(1974—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物大分子的结构与功能、分子识别与生物分析、纳米生物技术等研究。E-mail: zhounandi@jiangnan.edu.cn

And 2 mutants, P68G and Q197K, were constructed. In comparison to the wild type, they exhibited 11% and 33% higher enzyme activity, respectively. The improved activity was attributed to the replacement of the phenyl ring on the side chain of residue P68G by hydrogen, reducing steric hindrance for formate substrate entry, while the mutation of the side chain amide group in Q197K to aminobutyl enhanced the flexibility of the enzyme. However, these 2 mutations negatively affected the thermal stability of FDH. Hence, a cysteine mutation was introduced at position I239 to form a disulfide bond with C262, thereby enhancing the thermal stability. Ultimately, the mutant strain CbFDH Q197K/I239C was obtained, which exhibited remarkable improvement in thermal stability, displaying a 31% increase in enzyme activity compared to the wild-type and a 45% increase compared to I239C. This study demonstrates that the activity and thermal stability of FDH could be enhanced through semi-rational protein structure prediction, providing a reliable theoretical foundation for the efficient construction of FDH with stable performance and strong reducing power.

Keywords: formate dehydrogenase, semi rational design, *Candida boydii*, site directed mutation, coenzyme cycle

NAD⁺依赖型甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH, EC 1.2.1.2) 属于 D-2-羟基酸脱氢酶超家族^[1], 是脱氢酶合成光学活性化合物中 NADH 再生酶之一^[2], 常见于甲基营养型微生物, 例如可利用甲醇的一些酵母及其他真菌、细菌等^[3-7]。甲酸脱氢酶可以将甲酸盐底物的醛基或羧基氧化成 CO₂, 并利用 NAD⁺作为辅因子接受和转移氢从而产生大量 NADH^[8], 故而该酶常被用于不对称合成手性化合物过程中 NADH 的原位再生^[9-10]。早在 1995 年, 甲酸脱氢酶就已经被用于偶联亮氨酸脱氢酶以实现 L-叔亮氨酸的工业化生产^[11], 还被用于多种非天然氨基酸、手性醇及各种衍生物^[12-13]。相比于葡萄糖脱氢酶和亚磷酸脱氢酶等介导的辅酶再生体系, 甲酸脱氢酶的共反应产物 CO₂ 更容易从体系中分离出来, 并且不会引起反应体系 pH 的剧烈变化, 大大降低了生产过程中使用酸碱的成本。然而野生型的甲酸脱氢酶具有稳定性差、酶活低等缺点, 往往会造成反应体系中辅酶 NADH 供应不足, 进而使产品转化效率降低。因此提高甲酸脱氢酶的稳定性和增强其对 NAD⁺/NADH 辅酶再生的催化能力成为当下一大研究热点。

随着基因工程技术日渐成熟, 多种不同来源的甲酸脱氢酶在大肠杆菌中被克隆表达^[14], 其中博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 来源的甲酸脱氢酶研究最为广泛。定向进化技术是甲酸脱氢酶改造的常用手段之一, 通过构建序列多样的突变文库并从中筛选出符合预期效果的突变体。尽管高通量筛选

甲酸脱氢酶的方法已有报道^[15-16], 但正向突变体的筛选过程仍非常复杂且耗时。近年来, 随着蛋白质工程技术的迅速发展, 越来越多的蛋白质三维结构被精确解析^[17-18]。研究者们针对甲酸脱氢酶辅酶特性、酶活力和稳定性等方面进行分子改造, 大量关键氨基酸残基被挖掘以提高 FDH 性能^[19-20]。作者前期基于 CbFDH 二级结构计算预测, 构建了 A10C、I239C 突变株, 通过引入半胱氨酸残基形成二硫键大大提高了 CbFDH 的热稳定性^[21]。Bulut 等对博伊丁假丝酵母来源的甲酸脱氢酶的 Phe285、Gln287 和 His311 位保守氨基酸残基进行定点突变, 验证了其作为热稳定性改造靶点的研究潜力^[22]。Q197 和 P68 位氨基酸残基被认为是影响甲酸脱氢酶辅酶再生能力的重要位点。随着蛋白质理性设计研究的深入, 大量基于生物信息学和人工智能算法的蛋白质预测工具被用于探索蛋白质结构和氨基酸残基特性对酶的影响^[23]。例如, Sumbalova 等设计出 HotSpot Wizard web 服务器 (<http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>), 其主要功能是针对活性位点和底物通道中的具有改造潜能的氨基酸残基, 计算预测诱变“热点”, 之后对“热点”进行饱和突变和性能筛选, 以达到提高蛋白质的稳定性、催化活性、底物特异性和对映体选择性的目的^[24]。

作者首先将博伊丁假丝酵母来源的甲酸脱氢酶 (CbFDH) 在大肠杆菌中异源表达, 然后利用 HOTSPOT WIZARD v3.1 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>) 对 CbFDH 氨基酸序列建模预

10 000 r/min、4 ℃下离心 10 min, 去除沉淀, 上清液即为粗酶液。

蛋白质纯化方法使用镍柱亲和层析法^[9], 粗酶液经 0.22 μm 滤膜过滤后上样至 His GraviTrap 柱, 用 M0 缓冲液 (0.02 mol/L Tris、0.5 mol/L NaCl, pH 为 7.40±0.05) 进行柱平衡, 然后用 M300 缓冲液 (0.02 mol/L Tris、0.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L 咪唑, pH 为 7.40±0.05) 进行梯度洗脱, 洗脱梯度为 20%、80% 和 100%。纯蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定分析。

1.2.3 酶活及蛋白质浓度测定 甲酸脱氢酶酶活测定采用紫外分光光度法, 反应溶液由 0.05 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.5) 配制, 包括 167 mmol/L 甲酸钠和 1.67 mmol/L NAD⁺溶液。取 1.48 mL 甲酸钠溶液置于石英比色皿, 依次加入 80 μL NAD⁺溶液, 10 μL 适当稀释后的纯酶液, 在 30 ℃条件下启动反应并计时, 每 30 s 记录 OD₃₄₀ 变化值。根据不同浓度 NADH 的 OD₃₄₀ 绘制标准曲线计算每分钟产生的 NADH 量。甲酸脱氢酶酶活力单位定义: 每分钟消耗或生成 1 μmol NADH 所需要的酶量。蛋白质质量浓度测定使用 Bradford 蛋白质测定试剂盒。

1.2.4 酶学性质分析 最适反应温度测定: 用 pH 7.5、0.5 mol/L 的 PBS 缓冲液将纯酶稀释到适合浓度后加入到预热好的反应体系中反应, 按 1.4 中方法计算比酶活, 反应温度梯度设置为 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 ℃。初始酶活为 100%, 计算不同温度下突变体酶的相对比酶活。

最适反应 pH 测定: 将突变体纯酶用不同 pH 缓冲液稀释到适合浓度后加入至预热好的相应 pH 体系中反应, 使用的缓冲液如下: 磷酸氢二钠-柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.0~6.0), 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.0~9.0), 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0~12.0), 缓冲液浓度均为 20 mmol/L。反应温度为最适温度。按初始比酶活为 100% 计算不同 pH 下纯酶的相对比酶活。

热稳定性测定: 将稀释后的纯酶分别在温度梯度为 30、40、50、52、54、56、58、60、62、64、70 ℃的金属浴中保温 20 min 后在最适反应条件下进行酶活测定, 以保温前最适反应温度下比酶活为 100% 计算相对比酶活, 绘制相对酶活曲线。

pH 稳定性测定: 用不同 pH 的缓冲液将纯酶液分别稀释至相同倍数后, 35 ℃孵育 1 h 后取样测酶活, 绘制相对酶活曲线。

1.2.5 突变点预测 CbFDH 的三维结构模型文件 (PDB ID: 5dn9) 从 RCSB 数据库获得。利用 HOTSPOT WIZARD v3.1 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>) 中的 FUNCTIONAL HOT SPOTS (对活性中心及底物通道附近高度可变残基的热点预测) 和 STABILITY HOT SPOTS (柔性残基对应的稳定性热点预测) 两大功能板块对模型进行预测。

1.2.6 三维建模及结构分析 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 以 CbFDH 三维结构模型文件 (PDB ID: 5dn9) 为模板进行同源建模, 利用 PYMOL 软件对突变后蛋白质模型进行结构分析和图形制作。

2 结果与分析

2.1 突变点选择

利用 HOTSPOT WIZARD v3.1 对 CbFDH 的三维结构进行预测。软件根据内置的 Rosetta 和 FoldX 套件对蛋白质模板的热力学稳定性进行计算, 在预测突变点的同时提供可靠的可供替换的氨基酸残基。同时, 根据 2 个具有改造潜能的氨基酸残基位点, 即 P68 和 Q197 用软件对其进行突变方案预测, 最终选择预测突变位点 P68G、Q197K、Y196K、V120S、A172V、G117V、A229S 进一步研究。

2.2 重组载体的构建表达及纯化

为实现大肠杆菌中 CbFDH 的异源表达, 从携带 *Cbfdh* 基因的 pUC19-*Cbfdh* 质粒上扩增出 *Cbfdh* 基因片段, 与线性质粒 pET28a 连接并化转入 *E. coli* BL21 中, 构建重组大肠杆菌 BL21/pET28a-*Cbfdh*。SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳结果显示 (见图 1(a)), BL21/pET28a-*Cbfdh* 重组菌的细胞破碎液上清和沉淀中均出现 $3.5 \times 10^4 \sim 4.5 \times 10^4$ 明显加粗条带, 与 CbFDH 理论相对分子质量 40 000 相符, 这表明 CbFDH 在大肠杆菌中成功表达。

为进一步探究 CbFDH 的酶学性质, 将 CbFDH 和突变体酶分别进行了镍柱纯化。纯酶 SDS-PAGE 分析如图 1 (b) 所示。条带 1 为野生型 BL21/pET28a-*Cbfdh* 重组菌株细胞破碎上清液, 纯化后纯酶蛋白质条带在 40 000 左右, 与理论蛋白质相对分子质量基本相符, 突变体酶相对分子质量无明显变化。

2.3 酶活测定

将纯突变体酶用 0.5 mol/L PBS 缓冲液 (pH

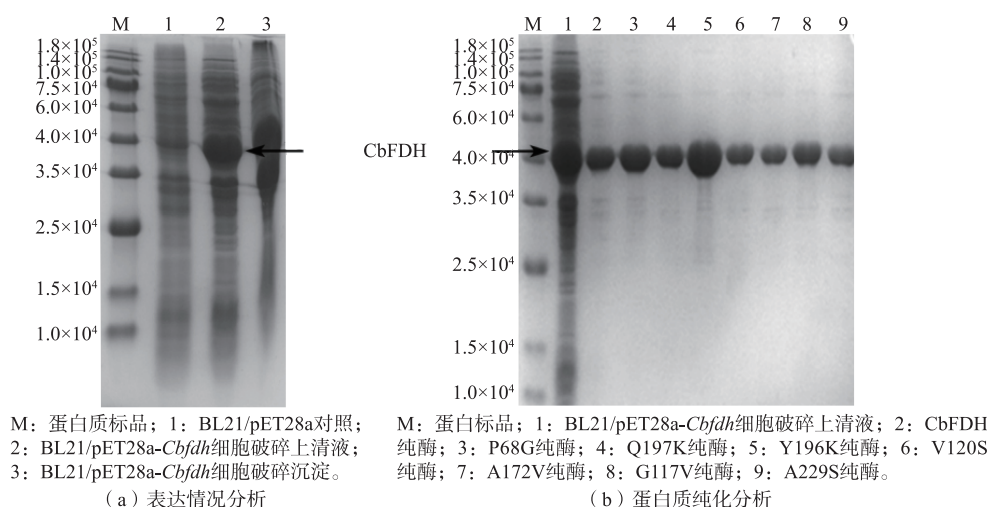


图1 甲酸脱氢酶表达及纯化情况 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of FDHs expression and purification

7.5)作适当稀释,根据1.4中方法测定酶活和蛋白质质量浓度,计算比酶活。如图2所示,P68G和Q197K为正向突变体,酶活分别为6.92 U/mg和8.27 U/mg,较野生型*CbFDH*分别提高了11%和33%,其余突变体酶活均有明显下降。其中,A229S突变体纯化后在SDS-PAGE电泳分析中显示出单一且完整的条带,但是以NAD⁺和甲酸钠为底物和辅底物进行酶活检测时没有活性。



图2 突变体比酶活

Fig. 2 Enzyme specific activity of mutants

2.4 酶学性质分析

根据1.2.4中方法对不同突变体酶的酶学性质进行分析,结果如图3所示。由于G117V和A172V突变体酶活过低导致测量误差过大,其酶学性质数据未展示。

突变体酶的最适温度如图3(a)所示,当温度为25~55℃时,野生型*CbFDH*的酶活随着温度升高而不断增高;当温度为55℃时酶活最高;当温度高于55℃酶活不断降低。因此*CbFDH*最适温度为

55℃,这一结果与戚云龙等结果一致^[25]。Y196K和Q197K突变体的最适温度分别降低为45、50℃,V120S突变体上升至60℃,其余突变体明显变化。如图3(b)所示突变体酶的热稳定性较亲本*CbFDH*均变差,且随温度的升高而加快,55℃保温20 min后亲本酶活可保留近60%,而Q197K仅残余50%,其余突变体酶活残余不足40%。

各突变体酶最适pH如图3(c)所示,突变体与亲本*CbFDH*最适pH均为7。pH稳定性测试如图3(d)所示,突变酶pH稳定性相比于亲本无明显损失。当pH<6.0时,突变体酶活快速下降,但在pH5孵育1 h后酶活仍可保留50%以上,说明突变体酶的耐酸性较好;当pH在6~10时,亲本和各突变体残余酶活均保留80%以上,说明突变体酶具有良好的pH稳定性及强耐碱性。

2.5 结构分析

P68G突变的氨基酸残基位于NAD⁺的底物结合口袋内,图4(b)和图4(c)可以看出,由于P68G的突变使得原本位于氨基酸残基侧链的苯环被氢取代,这一变化减少了氨基酸残基侧链上苯环对甲酸盐底物分子进入结合口袋时的空间位阻,提高了活性中心和底物分子间的亲和力。此外,P68G突变后酶活的升高也可能是因为甘氨酸取代后该位点的疏水性增强,有助于活性中心与NAD⁺的结合。Q197K突变点的氨基酸残基侧链由酰胺基变为直链胺丁基,图4(d)和图4(e)显示197位氨基酸残基位于底物结合口袋入口的一段环状无规则卷曲的loop环上,这一突变增强了肽链的摆动性和酶的

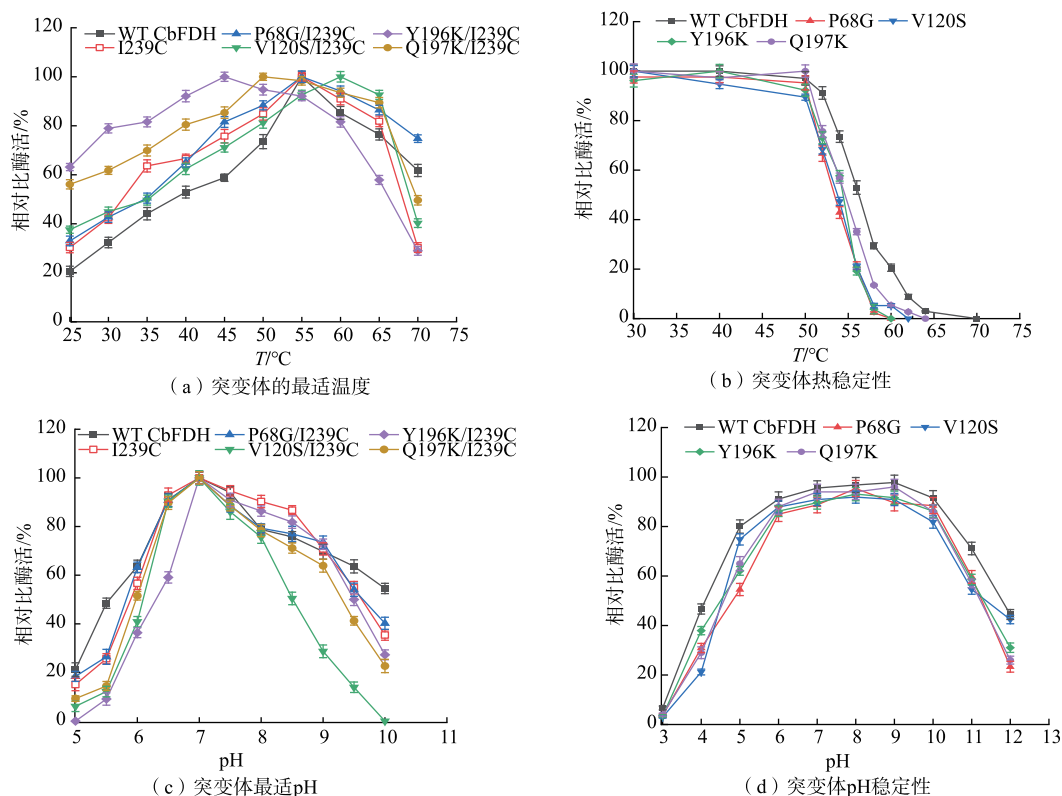


图3 突变体酶学性质

Fig. 3 Enzymatic properties of mutants

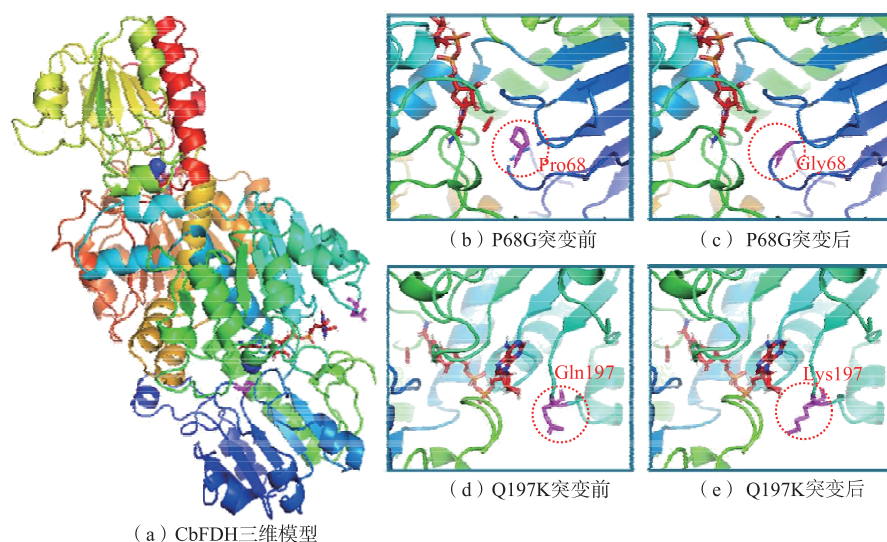


图4 单突变体酶蛋白三维结构

Fig. 4 Three-dimensional structure of mutants

柔性,使得酶分子在反应中更易捕获相对分子质量较大的 NAD^+ 进入口袋,从而提高了突变体的酶活。

2.6 突变体稳定性优化

虽然 P68G 和 Q197K 突变体表现出比野生型 *CbFDH* 更高的催化活性,但其热稳定性较野生型明显降低。为进一步提高突变体酶的热稳定性,基于

研究室前期工作^[21],引入 I239C 突变构建了 P68G/I239C、Q197K/I239C 2 个组合突变株。组合突变体酶均表现出比野生型更高的热稳定性(见图 5),在 60 °C 野生型 *CbFDH* 和 2 个单突变体迅速失活,而 P68G/I239C 和 Q197K/I239C 的热稳定性明显提高,3 min 时相对酶活仍可保持 60% 以上。

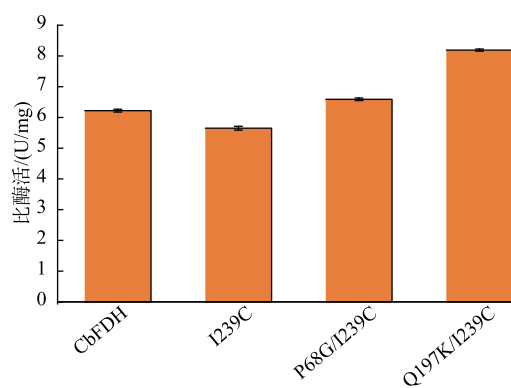


图5 组合突变体酶活

Fig. 5 Enzymatic activity of combined mutants

尽管组合突变体热稳定性都显著增强,但其中 Q197K/I239C 的比酶活较野生型 *Cb*FDH 提高了 31%、较 I239C 提高了 45%,为 8.15 U/mg;而 P68G/I239C 酶活相对野生型 *Cb*FDH 提高了 6%,相较于单点突变株酶活提升有所下降。为了解释这一现象,分析组合体酶蛋白的三维结构,如图 7 所示。野生型 *Cb*FDH 序列中仅包含 C23 和 C262 两个半胱氨酸残基,其中 C262 位于 I239 位氨基酸残基附近,氨基酸残基 I239 和 C262 位于罗斯曼折叠基序的一段无规则卷曲中。在突变体酶中构建二硫键 I239C-C262,降低了酶分子蛋白质结构的柔性,导致对 NAD^+ 亲和力减弱。因此,组合体在稳定性提高的同时较单突变体的酶活有所降低,但同时一定程度上固定了活性中心与催化相关的氨基酸残基。

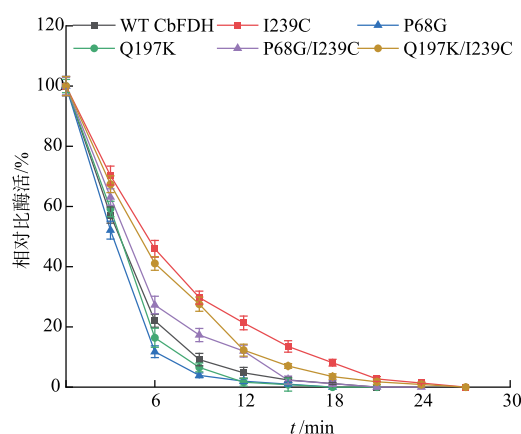


图6 组合突变体酶热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of combined mutants

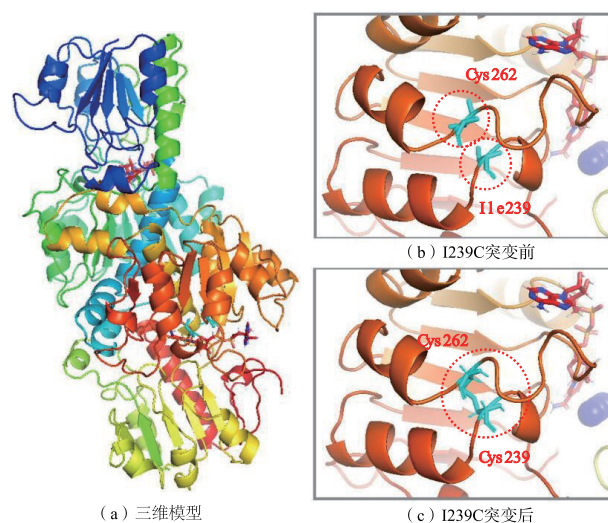


图7 组合突变体酶蛋白三维结构

Fig. 7 Three-dimensional structure of combined mutants

3 结语

作者为了获得性能优良的甲酸脱氢酶,首先在大肠杆菌中异源表达博伊丁假丝酵母来源的甲酸脱氢酶 *Cb*FDH,然后用 HOTSPOT WIZARD v3.1 对 *Cb*FDH 进行模拟计算并构建了一系列突变体,测定其酶活并进行酶学性质分析,筛选出 2 个酶活较高的突变体 P68G、Q197K,酶活分别较野生型提高了 11%和 33%。这是因为 P68G 突变后该位点氨基酸残基疏水性加强,提高了底物口袋与 NAD^+ 的亲和力,残基侧链对甲酸盐底物的空间位阻减小;而 Q197K 增强了 loop 环的摆动性和酶的柔性使得 NAD^+ 更容易进入底物口袋。然而,P68G、Q197K 这 2 点突变使酶的热稳定性降低,因此引入已报道能形成二硫键使 FDH 热稳定性增强的 I239C 突变,构建了 P68G/I239C、Q197K/I239C 这 2 个突变株。经酶学性质测定,Q197K/I239C 突变体不仅保留了野生型 *Cb*FDH 较高的催化活性,其热稳定性也得到了显著提高。通过半理性设计对甲酸脱氢酶结构进行模拟、计算和预测以提高其酶活及热稳定性,简化了酶筛选的工作量,为今后甲酸脱氢酶及其他相关酶的改造提供了更高效的策略。

参考文献:

- [1] TISHKOV V I, POPOV V O. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase[J]. **Biochemistry. Biokhimiia**, 2004, 69(11):1252-1267.
- [2] TISHKOV V I, POPOV V O. Protein engineering of formate dehydrogenase[J]. **Biomolecular Engineering**, 2006, 23(2/3):89-110.
- [3] ALLEN S J, HOLBROOK J J. Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylolica*[J]. **Gene**, 1995, 162(1):99-104.
- [4] OVERKAMP K M, KÖTTER P, VAN DER HOEK R, et al. Functional analysis of structural genes for NAD(+)-dependent formate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 2002, 19(6):509-520.
- [5] DING H T, LIU D F, LI Z L, et al. Characterization of a thermally stable and organic solvent-adaptative NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Bacillus* sp. F1[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2011, 111(5):1075-1085.
- [6] ALEKSEEVA A A, SAVIN S S, TISHKOV V I. NAD (+)-dependent formate dehydrogenase from plants[J]. **Acta Naturae**, 2011, 3(4):38-54.
- [7] CHOE H, HA J M, JOO J C, et al. Structural insights into the efficient CO₂-reducing activity of an NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA[J]. **Acta Crystallographica**, 2015, 71(2):313-323.
- [8] CASTILLO R, OLIVA M, MARTÍ S, et al. A theoretical study of the catalytic mechanism of formate dehydrogenase[J]. **The Journal of Physical Chemistry**, 2008, 112(32):10012-10022.
- [9] ZHANG L K, XIAO Y M, YANG W H, et al. Synthesis of L-2-aminobutyric acid by leucine dehydrogenase coupling with an NADH regeneration system[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2020, 36(5):992-1001.
- [10] FU Y, ZHANG J X, FU X R, et al. Production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine using a trienzyme cascade[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2020, 36(4):782-791.
- [11] BOMMARIUS A S, SCHWARM M, STINGL K, et al. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine[J]. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1995, 6(12):2851-2888.
- [12] LIU Q, YANG T, ZHOU J, et al. Improve the synthesis of L-phenylglycine by increasing the intracellular coenzyme level[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2019, 38(3):46-53.
- [13] MUGISHA S, YANG T, XU M, et al. Enhanced thermo-stability and catalytic efficiency of catalase by site-directed mutagenesis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2020, 39(3):104-111.
- [14] WEI P, XU X, JIA H, et al. High expression of acid dehydrogenase gene in *Escherichia coli* Rosetta[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2007, 33(5):5-8.
- [15] ZHANG Z, JIE Y, WANG T, et al. Directed evolution of catalytic activity of formate dehydrogenase and its high expression[J]. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, 2021, 38(06):704-712.
- [16] ABDELLAOUI S, BEKHOUCHE M, NOIRIEL A, et al. Rapid electrochemical screening of NAD-dependent dehydrogenases in a 96-well format[J]. **Chemical Communications**, 2013, 49(51):5781-5783.
- [17] GUO Q, GAKHAR L, WICKERSHAM K, et al. Structural and kinetic studies of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* [J]. **Biochemistry**, 2016, 55(19):2760-2771.
- [18] YILMAZER B, ISUPOV M N, DE ROSE S A, et al. Structural insights into the NAD⁺-dependent formate dehydrogenase mechanism revealed from the NADH complex and the formate NAD⁺ ternary complex of the *Chaetomium thermophilum* enzyme [J]. **Journal of Structural Biology**, 2020, 212(3):107657.
- [19] ALEKSEEVA A A, FEDORCHUK V V, ZARUBINA S A, et al. The role of ala198 in the stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases[J]. **Acta Naturae**, 2015, 7(1):60-69.
- [20] TISHKOV V I, GONCHARENKO K V, ALEKSEEVA A A, et al. Role of a structurally equivalent phenylalanine residue in catalysis and thermal stability of formate dehydrogenases from different sources[J]. **Biochemistry Biokhimiia**, 2015, 80(13):1690-1700.
- [21] ZHENG J X, YANG T W, ZHOU J P, et al. Elimination of a free cysteine by creation of a disulfide bond increases the activity and stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2017, 83 (2):e02624-e02616.
- [22] BULUT H, YUKSEL B, GUL M, et al. Conserved amino acid residues that affect structural stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021, 193(2):363-376.
- [23] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL S E, et al. Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability[J]. **Molecular Cell**, 2018, 70(2):380.
- [24] SUMBALOVA L, STOURAC J, MARTINEK T, et al. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information[J]. **Nucleic Acids Research**, 2018, 46(W1):W356-W362.
- [25] 戚云龙, 杨套伟, 周俊平, 等. 多酶催化拆分 DL- 正缬氨酸生产 L- 正缬氨酸[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(6):1015-1021.
- QI Y L, YANG T W, ZHOU J P, et al. Multi-enzymatic resolution of DL-norvaline for L-norvaline production [J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2017, 23(6):1015-1021. (in Chinese)