

文章编号: 1006-3080(2026)03-0315-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250920001

基于底物通道的半理性设计实现 *PaBVMO* 催化效率-底物抑制-稳定性的三重协同

冯柯佳^{1,2}, 赵友学^{1,2}, 孟洛冰^{1,2}, 李春秀^{1,2}, 许建和^{1,2}

(1. 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程全国重点实验室, 上海 200237;
2. 上海百福安生物科技有限公司, 上海 200233)

摘要: 来自 *Pseudomonas aeruginosa* 的 Baeyer-Villiger 单加氧酶 (*PaBVMO*) 能选择性地在 10-氧代硬脂酸上羧基的非常规一侧插入氧原子, 生成癸二酸辛酯。为突破癸二酸生物合成中 *PaBVMO* 在高底物浓度下催化效率低与底物抑制显著的双重瓶颈, 本文提出酶的底物通道半理性重塑策略。通过酶-底物的结合自由能与底物受力分析, 解析出底物通道关键门控性环结构。结果表明, 获得的最优突变体 *PaBVMO*_{G398A} 的催化转化数达到 3.45×10^4 , 比母本提升了 5.3 倍, 比活力提升了 0.7 倍, 同时失活半衰期从 1.87 h 延长至 6.14 h, 稳定性显著增强。通过高斯加速分子动力学 (GaMD) 模拟, 解析了 G398A 突变诱导 *PaBVMO*_{G398A} 的活性口袋发生重排, 进而促发 *PaBVMO*_{G398A} 对 10-氧代硬脂酸催化的底物抑制程度降低、对辅因子 FAD 的亲合力增强、同时稳定性提高的协同机制。

关键词: 癸二酸辛酯; 生物催化; *PaBVMO*; 底物通道重塑; GaMD

中图分类号: Q81

文献标志码: A

癸二酸作为脂肪族长链二元酸的代表性化合物, 是合成高性能生物基尼龙 (如 PA510/PA1010)、耐寒增塑剂及生物医用材料 (如聚癸二酸甘油酯) 的关键单体^[1-6], 同时癸二酸还可用于药物递送和血糖控制^[7-8], 在化学合成与医药领域具有巨大的潜在应用价值。

使用废弃食用油作为原料, 基于水合-脱氢-加氧-水解的多酶级联催化体系生产癸二酸是一种非常具有吸引力的绿色合成方案, 该技术路线高度依赖于 *Pseudomonas aeruginosa* 的 Baeyer-Villiger 单加氧酶 (*PaBVMO*, 一种非常规位置选择性单加氧酶) 充当惰性碳链活化剂的角色, 将低成本可再生的底物分子氧化官能化, 形成高附加值化学品^[9-10]。相比于传统的碱熔融裂解法和烷烃微生物发酵法, 多酶级联法催化合成癸二酸的工艺路线具有原料易得可再生、

反应条件温和、分离成本低等优点^[11-15]。目前, 已报道的 *PaBVMO* 酶虽具有卓越的“非常规”区域选择性^[13], 但其催化活性低、稳定性差以及受底物抑制等问题严重限制了其在多酶级联体系的整体催化效率, 极大地阻碍了 *PaBVMO* 的工业应用。

本文提出了一种新颖的 *PaBVMO* 底物通道重塑策略, 并应用于酶催化长链脂肪酮 Baeyer-Villiger 单加氧性能的优化。通过通道结合自由能的计算与配体受力分析, 聚焦通道中的门控残基, 我们设计了“小而精”的突变文库, 筛选获得了最优突变体 *PaBVMO*_{G398A}, 其在催化效率、稳定性和底物抑制 3 个方面的性能获得显著优化, 并通过增强采样方法揭示底物通道中 Loop₃₉₁₋₄₀₁ 环的重要作用, 解析了 G398A 突变诱导 *PaBVMO*_{G398A} 的活性口袋发生重排, 进而缓解 10-氧代硬脂酸对酶的抑制, 增强了酶对

收稿日期: 2025-09-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2025ZD0615000); 国家自然科学基金 (22478116); 上海市关键技术研发计划 (25HC2810400)

作者简介: 冯柯佳 (2000—), 男, 浙江人, 硕士生, 主要研究方向为生物催化、酶工程。E-mail: y30220507@mail.ecust.edu.cn

通信联系人: 许建和, E-mail: jianhexu@ecust.edu.cn

引用本文: 冯柯佳, 赵友学, 孟洛冰, 等. 基于底物通道的半理性设计实现 *PaBVMO* 催化效率-底物抑制-稳定性的三重协同 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2026, 52(3): 315-324.

Citation: FENG Kejia, ZHAO Youxue, MENG Luobing, et al. Semi-Rational Design of Substrate Channels for *PaBVMO* to Achieve Triple Synergy of Catalytic Efficiency-Substrate Inhibition-Stability[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(3): 315-324.

FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) 辅因子的亲和力, 同时兼具强化稳定性的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 工具酶与试剂 辅酶还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)购自深圳邦泰生物工程公司; 辅酶 FAD 和乳化剂吐温-80 购自上海泰坦科技股份有限公司; 诺维信 CALB(Candida Antarctica Lipase B)液体脂肪酶购自上海源叶生物科技有限公司; 10-氧代硬脂酸为本研究室前期工作中所制备的样品^[16]; 癸二酸、9-羟基壬酸购自上海迪佰生物科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自上海毕得医药科技有限公司; (三甲基硅基)重氮甲烷溶液购自 Sigma-Aldrich 公司; DNA Marker、protein ladder及 PrimeSTAR HS 均购自宝日医生物技术(北京)有限公司(Takara)公司; 突变引物、菌株 *Escherichia. coli* BL21 (DE3) 来自北京擎科生物科技股份有限公司(上海分公司)。本实验中使用的 *BmGDH* 为本实验室保存的冻干酶粉。

1.1.2 菌株与质粒 野生型 *PaBVMO* 编码基因(WP_079755356.1)源自 *Pseudomonas aeruginosa*, 经实验室前期工作完成密码子优化及全基因合成, 该基因片段被插入在 pETDuet-1 载体的 *EcoR* I 和 *Nde* I 双酶切位点间, 构成重组表达载体 pETDuet-*Pa*, 并采用 *E. coli* BL21 (DE3) 作为表达宿主。本文在前期改造的 *Pa*_{G142A/M299Q} (*Pa*_{M2}) 的基础上进行。

1.1.3 培养基及缓冲溶液 Luria-Bertan (LB) 培养基配方(g/L): 蛋白胨 10、NaCl 10、酵母提取物 5。配制 LB 固体培养基时补加 15 g/L 琼脂粉。Terrific Broth (TB) 培养基配方(g/L): 酵母提取物 24、蛋白胨 12、甘油 5、KH₂PO₄ 2.31 和 K₂HPO₄ 12.54。

缓冲液 A (pH 7.6): 磷酸钠缓冲液 (20 mmol/L)、咪唑 (10 mmol/L)、NaCl (500 mmol/L)。缓冲液 B (pH 7.6): 磷酸钠缓冲液 (20 mmol/L)、咪唑 (250 mmol/L)、NaCl (500 mmol/L)。缓冲液 C (pH 7.6): 磷酸钠缓冲液 (20 mmol/L)、NaCl (150 mmol/L)、二硫苏糖醇 (DTT, 1 mmol/L)、FAD (0.01 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 突变体构建 以重组 pETDuet-*Pa*_{M2} 作为模板, 使用聚合酶链式反应(PCR)方法进行定点突变。PCR 反应体系组成: 2×PrimeSTAR HS 溶液 10 μL, 模板 (50 ng/μL) 1 μL, 上下游引物各 1 μL, DMSO 1 μL, 加双蒸水 ddH₂O 至 20 μL。PCR 程序设置为: 95 °C 3 min, 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 7 min, 共 25 个循环。

1.2.2 突变体基因表达 以 PCR 产物的消化液转化 *E. coli* BL21(DE3) 的感受态细胞, 同时共转化 pKJE7 (表达分子伴侣蛋白组合 DnaK/DnaJ/GrpE) 以促进目标蛋白的可溶性表达。本研究中的重组大肠杆菌在 37 °C 下, 于含有 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)和 50 mg/L 氯霉素(Chl)的 TB 培养基中培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 L-阿拉伯糖, 启动分子伴侣蛋白合成, 37 °C 培养 0.5 h 后, 再加入终浓度为 0.2 mmol/L 的蛋白表达诱导剂(IPTG), 转至 16 °C 诱导 16 h^[17]。随后, 在 8 000 g、4 °C 条件下离心 5 min, 收集菌体供进一步使用。

1.2.3 蛋白纯化与浓度测定 每 1 g 湿菌体中加入 20 mL 缓冲液 A 重悬, 重悬液于冰浴条件下使用超声波破碎仪破碎 10 min (400 W 功率、4 s 工作时间、6 s 间隔时间), 随后在 4 °C 下以 12 000 g 离心 30 min, 收集上清液。用 20 mL 超纯水来冲洗镍柱, 再用 20 mL 缓冲液 A 平衡。使用 30 mL 咪唑溶液 (50 mmol/L) 进行洗脱, 最后用缓冲液 B 将目的蛋白洗脱下来, 收集洗脱液, 用 50 kDa 的超滤管进行浓缩, 用缓冲液 C 置换 3 次除去咪唑, 浓缩后的蛋白质用液氮速冻后储存于 -80 °C 备用。通过电泳验证蛋白的纯度, 结果显示纯化后的蛋白中依然存在 3 条杂条带, 影响了酶蛋白浓度的定量测定, 故结合灰度分析法估算目标蛋白的浓度。本文选择牛血清蛋白 (68 kDa) 作为标准蛋白, 制作标准曲线, 在同一块胶图背景下分别测定不同浓度标准蛋白条带及待测目标蛋白的灰度, 计算待测蛋白的浓度。

1.2.4 酶的动力学参数测定 在含有适量纯酶液、0.20~7.5 μmol/L 10-氧代硬脂酸、0.10 mmol/L NADPH、0.10 mmol/L FAD 的 1.0 mL 反应体系中测定酶的活力, 使用 500 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液维持 pH, 测酶活在 30 °C 下进行, 通过 NADPH 减少导致的 340 nm 处吸光度降低速率来间接表征酶的催化活性^[18]。根据朗伯-比尔定律, 酶活力(*U*)的计算公式如下:

$$U = \frac{\Delta A \times V \times 10^3}{6220 \times l} \quad (1)$$

其中, ΔA 为 340 nm 处 NADPH 在 1 min 内吸光度的变化值; V 为反应液的体积, mL; 6220 为摩尔消光系数, L/(mol·cm); l 代表光程, cm。

基于式(1), 使用 Origin 2025 软件绘制反应动力学曲线。其中, 每个实验设置 3 组平行实验, 并求取 3 组实验的平均值及标准偏差。使用带有底物抑制的动力学模型(式(2))进行数据拟合。

$$v = \frac{v_{\max} c_s}{\left[K_m + c_s \left(1 + \frac{c_s}{K_i} \right) \right]} \quad (2)$$

其中, v 为反应速率, $v_{\max}$ 为最大反应速率, K_m 为米氏常数, K_i 为底物抑制常数, c_s 为底物浓度。

1.2.5 催化反应性能及反应进程的监测 在 500 μL 孔板反应体系中, 含有 10 mmol/L 10-氧代硬脂酸、3 mmol/L NADPH、0.05 mmol/L FAD、125 g/L BmGDH、15 mmol/L 葡萄糖、 $\varphi=1\%$ CALB 液体脂肪酶(缓解催化抑制)、 $\varphi=10\%$ DMSO 和 0.01 mg/mL 纯酶, 以 500 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.0) 维持体系 pH, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 r/min 条件下振荡反应 1 h, 后用 100 μL 、 $w=20\%$ 硫酸终止反应。在优化反应条件时, 添加 $\varphi=1\%$ CALB 液体脂肪酶使得催化性能明显提升, 故将其作为缓解产物抑制的方法之一。对整个反应过程间隔 1、2、4、6、10.5、24 h 分别进行取样, 检测整个反应过程, 每组设置 3 组平行组。同时, 本文使用转化数 (TON) 来量化酶的催化性能。

1.2.6 酶的热稳定性测定 用半衰期 ($t_{1/2}$) 来表征酶的动力学热稳定性, 将 PaBVMO 纯酶液稀释至相同质量浓度 (0.1 mg/mL), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下保温, 每隔 60 min 取样 50 μL , 测定其催化反应速率, 获得不同保温时间下的残余活力, 进而用 Origin 2025 软件拟合得到 $t_{1/2}$ 。酶的一级失活动力学模型见式(3), 活力半衰期见式(4)。

$$-K_d \cdot t = \ln \frac{U}{U_0} \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_d} \quad (4)$$

其中, K_d 为失活速率常数, U_0 为剩余酶活力。

1.2.7 反应样品的处理及气相色谱分析程序 用 500 μL 乙酸乙酯萃取反应液, 取上层有机相 200 μL 吹干溶剂, 加入 50 μL 、1.0 mol/L KOH 溶液, 溶解于甲醇/水混合溶液(甲醇与水体积比为 4:1), 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴恒温器中加热 2 h 后, 冰浴降温, 用 160 μL 、 $w=20\%$ 硫酸酸化至 pH 2.0 以下, 加入 200 μL 乙酸乙酯萃取。取干燥后的乙酸乙酯相 50 μL 、甲醇/乙醚混合物(体积比 1:1) 50 μL 和 (三甲基硅烷) 重氮甲烷 20 μL 于气相色谱进样瓶中, 室温下反应 30 min (羧酸甲酯化衍生) 后用于气相色谱分析。采用 SHIMADZU GC-2030 进行分析, 具体条件如下: Agilent J&W DB-1701 色谱柱; FID 检测器温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 分流比 20:1; 升温程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 6 min。

1.2.8 酶的蛋白结构与构象分析 以 AlphaFold3^[19]

预测的亲本及突变体的结构作为参考结构, 用 CAVER3^[20] 进行蛋白质的底物通道分析。根据晶体结构 7V8R 和 7V4X, 先将 FAD 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化态)(NADP⁺)对接到 PaBVMO 结构中, 随后使用 Autodock^[21] 将底物 10-氧代硬脂酸 (KTC) 分子对接到酶的活性口袋中。

在 GAFF 力场下, 使用 B3LYP/G D3 def2-TZVP 基组计算 FAD 和 NADP⁺ 的 RESP2 电荷^[22], 使用 sobtop^[23] 和 Multiwfn^[24] 工具生成 top 文件。根据 H++ Web^[25] 计算的酸度系数 (pK_a) 值选择可解离残基 (His、Glu、Asp、Lys) 的质子化状态。常规模拟与拉伸动力学均使用 gromacs_2023.2 软件^[26], 对蛋白质部分采用 Amberff14SB 力场进行描述^[27]。将蛋白置于周期性立方体盒中, 通过最陡下降和共轭梯度法最小化系统能量, 随后在 303 K 下进行 200 ps 的恒温恒容 (NVT) 平衡和 1 ns 的恒温恒压 (NPT) 密度平衡, 恒温器为 V-rescale^[28], 压力耦合使用 Berendsen 控压方法^[29]。最后进行 100 ns 的成品分子动力学模拟, 使用 LINCS 求解器约束含有氢的共价键^[30]。

对于平衡后的体系施加拉伸动力学约束, 参数设置为: 步长 2 fs、牵引力常数 1000 kJ/(mol·nm²)、拉伸速度 0.01 nm/ps^[31]。随后, 根据底物配体质心与 FAD_{C4a} (FAD 异咯嗪环上关键电化学中心) 位置之间的距离作为分窗的反应坐标, 每个窗口分别进行 2000 ps 的 NPT 平衡和 30 ns 的采样, 整个模拟过程中均使用伞形偏置势将底物限制在相应窗口内。使用 Gromacs 软件的 wham 命令拟合平均力势曲线。

1.2.9 高斯加速分子动力学 (GaMD) 增强采样 GaMD^[32] 使用 amber23^[33] 软件包进行, 模拟时使用与常规动力学模拟相同的蛋白与配体结构。GaMD 使用了 Amberff14SB 力场和 TIP3P^[34] 水模型, 温度控制在 303 K, 使用 Langevin 恒温器, 压力各向同性控制。非键相互作用使用 10 Å (1 nm) 的截止值处理。采用双重增强方法 (势能增强和二面角靶向增强), 从而提高采样效率。在模拟前先进行 10 ns 的常规动力学模拟, 进行增强采样参数的计算与验证。GaMD 模拟共 200 ns, 前 10 ns 在传统分子动力学条件下进行平衡, 不进行采样, 随后 190 ns 进行增强采样。使用 PyReweighting 工具包消除额外偏置势的影响^[35]。

2 结果与讨论

2.1 突变设计策略

采用 CAVER3 对蛋白内部通道进行了系统分

析,成功识别出底物进入通道与产物释放通道,如图 1(a)所示。这两组通道在蛋白质内部形成较长的传导路径,与该酶已知的较强底物抑制效应相吻合,说明底物在通道内的扩散效率可能是制约催化效率的关键因素之一。我们进一步对底物通道内部的结合自由能(图 1(b))与分子间作用力(图 1(c)、图 1(d))进行分析,系统识别了影响底物传输的关键位点。分析表明,通道内存在两个明显的自由能垒区域,这些区域对应底物结合较强或传质受阻的位置,是潜在的物质运输瓶颈^[36]。通过对滞留在此区域的配体构象进行分析,精准定位了多个关键氨基酸残基,包括位于通道腔面的 L298、I297、L397、G398、H399 和 L471。值得注意的是,这些残基大部分密集分布在 Loop₃₉₁₋₄₀₁ 周围 3 Å (0.3 nm) 的范围内。此外,考虑到通道入口结构对配体结合的调控作用,通道口的大位阻疏水残基 (F255、M262、G250、V265、R251、L248) 可能通过其空间效应和极性影响通道的开放程度与底物进入效率,因此,这些位点也被纳入半理性性设计的考量范围。

由于缺乏所研究反应的高通量检测技术,因此我们在突变设计策略上借鉴 Chen 等^[37]的研究,向关键位点系统性地引入不同理化性质的氨基酸侧链,构建“小而精”的突变文库。在通道内部尝试不同位阻的氨基酸 (A、V、Y),通道口位置则尽量引入小位阻氨基酸 (A、L),以尝试调整通道口的开放程度,并设计通道内部不同极性的氨基酸 (R、D、S) 以调节活性口袋的溶剂可及性。同时,由于高保守性位点预示着较高的重要性,删除了保守性较高的 L298、I297、L471、H399、V265、R251、L248。基于上述分析,最终设计了以下几种突变用于后续的催化性能测试,分别为 G398A/S/D/V/Y/R、L397A/S/V、F255L/D/S/R/A、G250T/S/R/L/A、M262S/T/N/A。

2.2 突变体的筛选

在底物浓度 10 mmol/L 条件下,反应 60 min 筛选催化性能提升的突变体,测定突变体与母本的 TON 以反映其催化性能,其中 *PaBVMO*_{G398A} 与 *PaBVMO*_{F255L} 的催化性能有明显提升,如图 2(a) 所示。随后通过连续监测酶促反应进程 (图 2(b)),在添加 CALB 的情

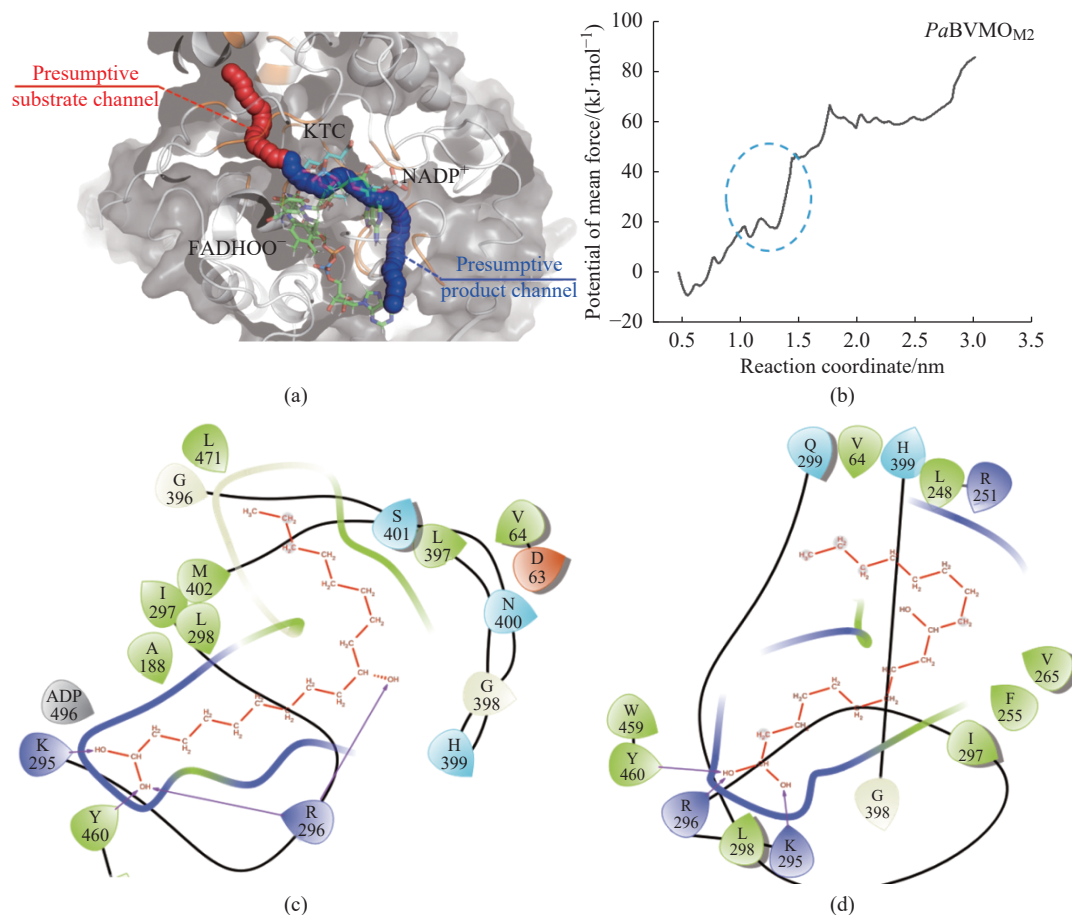


图 1 敏感位点的定位: (a) 用 CAVER3 分析蛋白质通道; (b) 以拉伸动力学探索底物通道,通道依次分为活性口袋区域、结合能突变区域和溶剂接触区域; (c) 和 (d) 结合自由能突变区域的构象分析

Fig. 1 Sensitive site localization: (a) CAVER3 analyzes protein channels; (b) Tensile kinetics explores substrate channels, which are divided into active pocket areas, binding energy mutation areas and solvent contact areas in turn; (c) and (d) Conformational analysis of two areas with radical changes in binding free energy

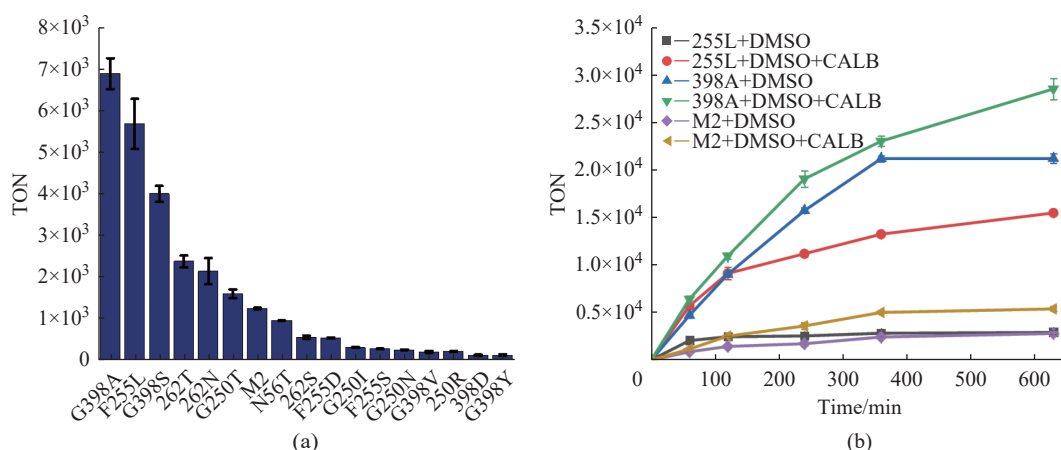


图2 关键突变体的催化性能测定: (a) “小而精”突变文库筛选结果; (b) 催化抑制前后催化性能对比

Fig. 2 Determination of catalytic performance of key mutants: (a) Screening results of "small and smart" mutant library; (b) Comparison of catalytic performances before and after catalytic inhibition

况下, 最优突变体 *Pa*BVMO_{G398A} 的 TON 相较于母本约有 5.3 倍的提升, 达到 3.45×10^4 , 综合催化性能提升明显, 而且 *Pa*BVMO_{G398A} 在 630 min 后仍保留一定催化活性, 但亲本则完全失活。由于酶催化抑制的来源复杂, 故本研究将反应体系视为“灰箱”, 发现添加商品脂肪酶 CALB 可水解反应产物(酯)生成癸二酸和正辛醇, 并使酶的催化性能明显上升。据此将酶添加组视为抑制缓解组, 不添加组则视为受抑制组。突变体 *Pa*BVMO_{G398A} 在有无脂酶添加(即不添加 CALB)的情况下催化性能差异较小(抑制缓解率 25.7%), 而 *Pa*BVMO_{M2} 则差异巨大(抑制缓解率 48.1%), 比较而言, 突变体的抑制耐受能力更高(提升 0.87 倍), 说明 G398A 突变降低了 *Pa*BVMO 受底物/产物抑制的程度, 这为进一步提高底物的上载量奠定了基础。

2.3 迭代组合突变

迭代组合突变体的催化性能评估结果(图3)揭示了关键残基间存在显著的上位效应。在测试的突变体中, 单点突变体 G398A 与 F255L 仍然保持了最优的催化性能, 表明其单独存在时即可以优化底物通道或活性中心。然而, 当尝试将这些正向突变进行组合时, 绝大多数双重和三重突变均导致 TON 值的急剧下降。特别是包含 G398 位点的组合突变体的活性均低于原始水平, 暗示 398 位残基在维持催化构象中可能扮演关键角色, 存在复杂的联系, 其突变易与其他位点产生负协同效应。

2.4 *Pa*BVMO_{M2} 及其关键突变体的动力学参数测定

本文分别在 7.5~200 $\mu\text{mol/L}$ 底物浓度条件下测定酶的动力学参数, 结果见表1, 半衰期和动力学参数拟合曲线如图4所示。从 k_{cat} 、 K_i 角度比较母本(M2)与 *Pa*BVMO_{G398A} 的差异: *Pa*BVMO_{G398A} 的 k_{cat} 提高约 0.6 倍, 说明突变体在底物饱和状态下的最大转

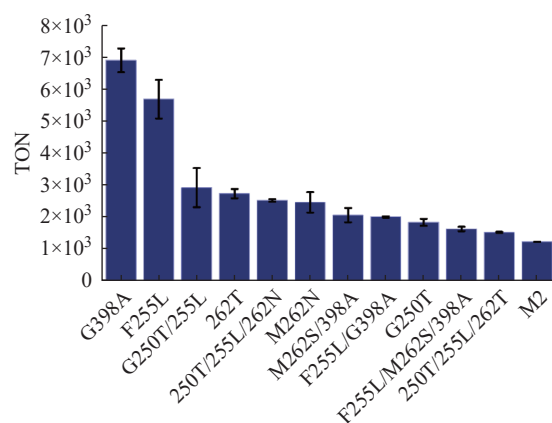


图3 迭代组合突变体的催化性能

Fig. 3 Catalytic performance of iterative combination mutants

化效率明显上升; 同时 *Pa*BVMO_{G398A} 的比活力提升约 0.7 倍, 也说明酶的催化效率显著提升; K_m 的上升表明底物的亲和力有所下降, 但是从 K_i 上升 0.15 倍和催化抑制缓解 0.87 倍来看, 这种结合力的“弱化”反而避免了高底物浓度下的异常结合(如底物分子在酶的通道内堆积)与通道口堵塞, 使催化循环有序性提升。

由于 *Pa*BVMO 在催化长链脂肪酮单加氧反应的过程中存在明显的催化抑制现象, 不适用于工业上高浓度底物的催化需求, 本文在对其通道结构进行优化后, 综合催化性能有了明显提升。这种催化性能的提升是多项性质协同提高的结果: (1) 半衰期从 1.87 h 延长至 6.14 h, 稳定性显著增强; (2) *Pa*BVMO_{G398A} 的 TON 为 3.45×10^4 , 相较于母本提升了 5.3 倍, 比活力提升约 0.7 倍; (3) 催化抑制程度缓解了 0.87 倍。

2.5 借助动力学模拟解析酶的突变效应

从构象分布角度进行了分析, 以回转半径(R_g)和底物羰基碳与 FAD_{C4a} 间的原子距离为特征绘制 2D 自由能景观图(图5), 可以发现 G398A 的构象空

表 1 *Pa*BVMO 母本及通道突变体的动力学参数表征

Mutation	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$K_{\text{m}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_{\text{i}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Specific activity/(U·mg ⁻¹)	Fold of TON
<i>Pa</i> BVMO _{M2}	1.94 ± 0.32	4.24 ± 3.27	200.3 ± 92.7	0.46 ± 0.07	1.33 ± 0.17	1.0 ^{a,b}
<i>Pa</i> BVMO _{M2} _F255L	3.77 ± 0.07	6.05 ± 0.55	325.4 ± 7.7	0.62 ± 0.01	2.77 ± 0.14	4.9 ^a , 2.8 ^b
<i>Pa</i> BVMO _{M2} _G398A	3.06 ± 0.23	10.31 ± 1.5	260.0 ± 4.2	0.30 ± 0.02	2.22 ± 0.06	5.5 ^a , 6.3 ^b
<i>Pa</i> BVMO _{M2} _G250T	6.72 ± 3.82	5.60 ± 2.92	105.7 ± 7.1	1.20 ± 0.89	4.38 ± 0.06	1.5 ^a
<i>Pa</i> BVMO _{M2} _F255L/G398A	1.69 ± 0.07	7.17 ± 1.68	690.9 ± 225.0	0.24 ± 0.10	1.47 ± 0.03	1.6 ^a
<i>Pa</i> BVMO _{M2} _G250T/F255L	10.87 ± 1.56	26.91 ± 3.91	176.1 ± 7.1	0.40 ± 0.06	4.91 ± 0.12	2.5 ^a , 2.9 ^b

a—Yield increase ratio after 60 min reaction at 25 °C; b—Yield increase ratio after 1 440 min reaction at 25 °C

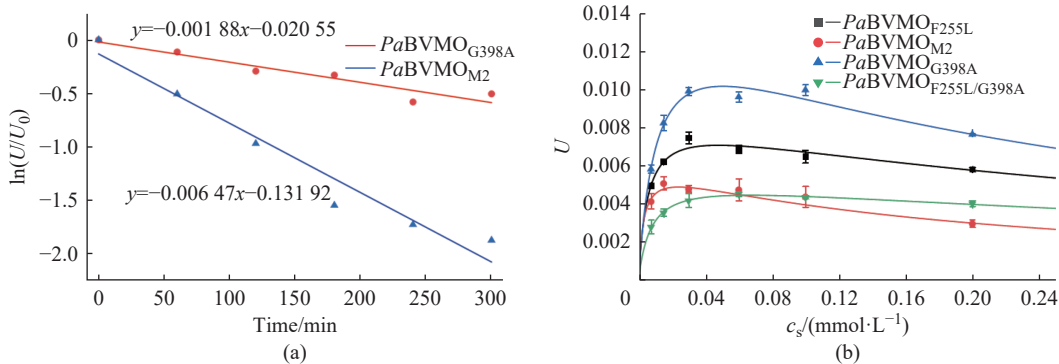


图 4 动力学参数拟合曲线: (a) 关键突变体半衰期拟合; (b) 动力学参数拟合

Fig. 4 Parameter fitting curves: (a) Key mutant half-life fitting; (b) Kinetic parameter fitting

间有了明显的扩展,底物羰基碳与FAD_{C4a}的原子间距明显增加,形成一个新的基态构象C2,同时原本的基态构象C1明显减少,其中C2构象中底物离FAD更远且结合更弱,导致底物 K_{m} 增大,底物亲和力下降,但同时也能有效提升BVMO进入催化构象(Rotated构象)^[38]前对非生产性结合的纠错能力。

为进一步解析构象转变机制,本文提取两类基态构象并进行结构叠加,如图6(a)所示。结果表明,除了底物结合构象的变化之外,FAD结合域中两个关键区域(Loop₁和Helix₁)的构象也发生了显著重排。进一步使用无偏模拟来计算FAD的结合自由能(ΔG_{β}),结果显示*Pa*BVMO_{G398A}对FAD具有更高亲

和力(表2),其中4个关键残基(G21、S23、E43、K44)的能量变化贡献最为突出(图6(b),图中 $\Delta\Delta X(\text{Mut-WT})$ 为突变前后的能量变化, X 为EEL、EGB、ESURF、G、VDWAALS),且其主导的静电相互作用项(ΔEEL)和极性溶剂项(ΔEGB)的变化尤为显著。图6(a)结果显示,在C2构象下,蛋白质表面的电荷分布呈现出更集中的特征,尤其富集于发生显著构象重排的Loop1和Helix1区域。该趋势与 ΔEEL 和 ΔEGB 的变化趋势高度吻合,表明电荷的集中化影响了局部静电吸引力。因此,提出一个串联的变构机制:底物通道内关键环Loop₃₉₁₋₄₀₁的偏转通过重构电荷分布,直接驱动FAD辅因子之间的静电

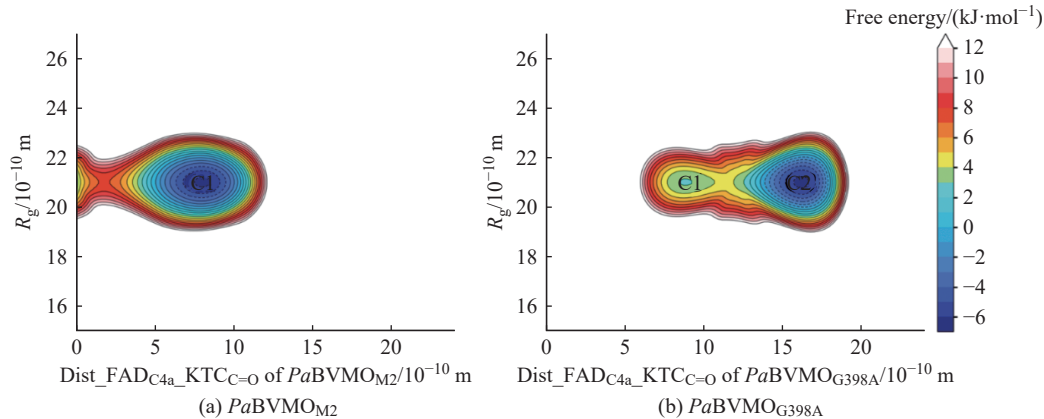


图 5 *Pa*BVMO_{M2} 与 *Pa*BVMO_{G398A} 的构象分布

Fig. 5 Conformational distribution of *Pa*BVMO_{M2} and *Pa*BVMO_{G398A}

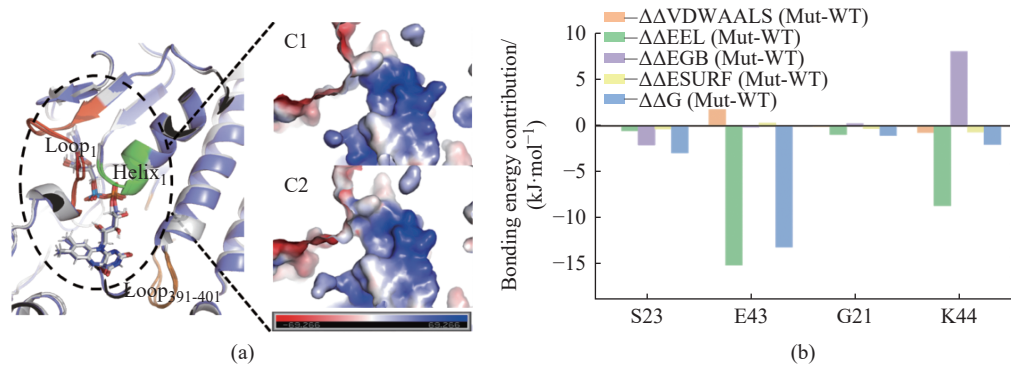


图 6 (a) C1 与 C2 构象中的电荷分布变化(白, C1; 蓝, C2); (b) 残基分解能量的贡献变化

Fig. 6 (a) Changes in charge distribution in conformations C1 and C2 (white, C1; Blue, C2); (b) Changes in energy contribution of residue decomposition

表 2 结合自由能的计算结果汇总

Table 2 Summary of calculation results of binding free energy

Mutation	Group	Δ TOTAL/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ VDWAALS/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ EEL/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ EGB/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ ESURF/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ GGAS/ (kJ·mol ⁻¹)	Δ GSOLV/ (kJ·mol ⁻¹)
<i>Pa</i> BVMO _{M2}	FAD	-316.8 ± 31.8	-317.7 ± 3.8	-3477.8 ± 29.3	3523.7 ± 8.4	-42.2 ± 0.4	-3795 ± 29.3	3481.9 ± 8.4
	KTC	-121.6 ± 20.1	-168.0 ± 2.1	-1538.2 ± 16.7	-1538.2 ± 12.5	-28.0 ± 0.8	-1705 ± 16.7	1584.2 ± 12.5
<i>Pa</i> BVMO _{G398A}	FAD	-370.8 ± 29.7	-336.9 ± 7.1	-3757.8 ± 29.3	3766.2 ± 8.4	-43.9 ± 1.7	-4096.4 ± 29.3	3724.4 ± 8.4
	KTC	-58.5 ± 5.9	-168.0 ± 3.8	-1463.0 ± 4.2	1600.9 ± 4.2	-26.8 ± 0.8	-1634.4 ± 4.2	1575.9 ± 4.2

Δ VDWAALS—Van der Waals interaction energy; Δ ESURF—Nonpolar solvation energy; Δ GGAS—Gas-phase molecular mechanical free energy; Δ GSOLV—Total solvation free energy; Δ TOTAL—Sum of all components

吸引力和溶剂化效应的变化, 进而导致结合口袋的微环境优化, 从而增强了酶对 FAD 的亲合力。

利用 ProteinTools 工具对 C1 与 C2 构象的差异性进行分析, 发现在母本 M2 中, 螺旋内部残基 L440 与 L442 之间形成了一个面积约为 68.7 Å²

(0.687 nm²) 的疏水簇。然而, A398 突变诱导了底物口袋的构象重排, 致使疏水相互作用模式发生显著转变: 一个新的、面积约为 (150.7 Å²) (1.507 nm²) 的疏水簇在螺旋区与柔性环 (残基 L440 与 L471) 之间形成 (图 7(a))。这个结果表明, 突变不仅引发了构象

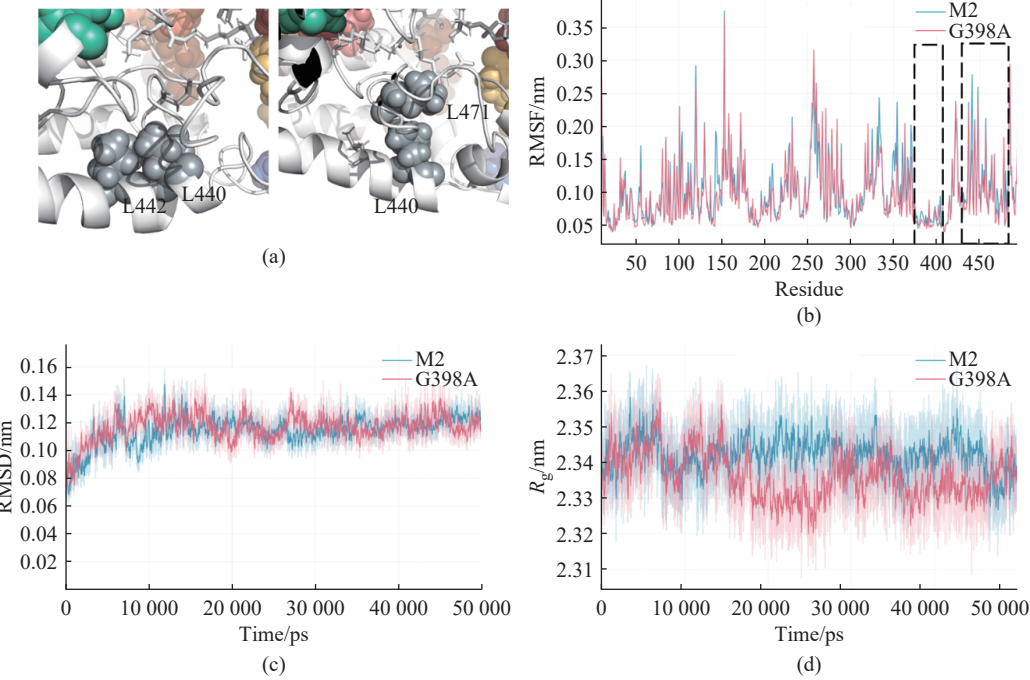


图 7 (a) 疏水簇分析; (b) RMSF (Root-Mean-Square Deviation) 的时间变化曲线; (c) RMSD (Root-Mean-Square Fluctuation) 的时间变化曲线; (d) R_g 的时间变化曲线

Fig. 7 (a) Hydrophobic cluster analysis; (b) RMSF versus time curves; (c) RMSD versus time curves; (d) R_g versus time curves

转变,还促进了更大规模疏水界面的形成,同时有助于稳定相邻的柔性环结构(图 7(b))。常规分子动力学模拟显示,在体系趋于稳定(图 7(c))的前提下,突变体整体结构的致密性显著增加(图 7(d))。综上,A398 突变体通过诱导构象变化,介导了新疏水簇的形成与结构稳定性的增强,从而显著提升了酶在高温胁迫条件下的抗逆性能。

3 结束语

(1)通过半理性设计重塑 PaBVMO 的底物通道结构,实现稳定性明显提升(半衰期延长至 6.14 h),催化效率显著提升(TON 提升 5.3 倍,比活力提升 0.7 倍)与抑制效应同步缓解(底物抑制常数 K_i 提升 0.15 倍,抑制缓解 0.87 倍)。

(2)通过整合 GaMD 增强采样、结合自由能计算与常规分子动力学模拟,初步探讨了通道重塑提升催化效率的分子机制。结果表明,底物结合构象的变化是催化效率提升的关键因素之一:通道重塑可能诱导了底物预结合态的构象转变,一方面通过降低非生产性结合模式的亲和力,增强酶对错误结合底物的“纠错”与释放能力;另一方面,导致底物结合构象改变的 Loop₃₉₁₋₄₀₁ 与 FAD 结合域之间还存在构象协同效应——通道改造可重构电荷分布、优化酶的辅因子 FAD 结合口袋微环境,有利于提升酶的催化效率。

尽管抑制机理的微观解析仍有待突破,但所提出的改造策略及靶点,可为 BVMO 家族酶的工程化改造及绿色生物制造的应用,提供兼具理论与应用价值的案例。后续研究可从蛋白质及其复合物的晶体结构解析、元动力学模拟底物解离等角度进一步攻克催化抑制机制这一灰箱问题,加深对 BVMO 通道结构及物质转运机制的认识,推动 BVMO 底物通道的理性设计与性能提升。

参考文献:

- [1] LI G, HUANG D, SUI X, *et al.* Advances in microbial production of medium-chain dicarboxylic acids for nylon materials[J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2020, 5(2): 221-238.
- [2] ZHU M, GUO S, MANG R, *et al.* Biocatalytic synthesis of dioctyl sebacate in toluene using an immobilised lipase[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2022, 41(5): 395-402.
- [3] 李敢. 癩二酸的制备及应用发展趋势[J]. *中小企业管理与科技(上旬刊)*, 2015(4): 324-325.
- [4] VOGT L, RUTHER F, SALEHI S, *et al.* Poly(glycerol sebacate) in biomedical applications: A review of the recent literature[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(9): 2002026.
- [5] ZAMBOULIS A, NAKIOU E A, CHRISTODOULOU E, *et al.* Polyglycerol hyperbranched polyesters: Synthesis, properties and pharmaceutical and biomedical applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 1045.
- [6] BASU A, DOMB A J. Recent advances in polyanhydride based biomaterials[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(41): 1706815.
- [7] MINGRONE G, CASTAGNETO-GISSEY L, MACÉ K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 75(3): 671-676.
- [8] BREM H. Polymers to treat brain tumours[J]. *Biomaterials*, 1990, 11(9): 699-701.
- [9] LIEPINS J, BALINA K, SOLOHA R, *et al.* Glycolipid biosurfactant production from waste cooking oils by yeast: Review of substrates, producers and products[J]. *Fermentation*, 2021, 7(3): 136.
- [10] CHONG G G, DING L Y, QIU Y Y, *et al.* Building flexible *Escherichia coli* modules for bifunctionalizing *n*-octanol: The byproduct of oleic acid biorefinery[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(34): 10543-10551.
- [11] SINGH S, SHARMA S, SARMA S J, *et al.* A comprehensive review of castor oil-derived renewable and sustainable industrial products[J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2023, 42(2): e14008.
- [12] WERNER N, DREYER M, WAGNER W, *et al.* *Candida guilliermondii* as a potential biocatalyst for the production of long-chain α , ω -dicarboxylic acids[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(3): 429-438.
- [13] YU J M, LIU Y Y, ZHENG Y C, *et al.* Direct access to medium-chain α , ω -dicarboxylic acids by using a Baeyer-Villiger monooxygenase of abnormal regioselectivity[J]. *ChemBioChem*, 2018, 19(19): 2049-2054.
- [14] LEE H, SUGIHARTO Y E C, LEE H, *et al.* Biotransformation of dicarboxylic acids from vegetable oil-derived sources: Current methods and suggestions for improvement[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(4): 1545-1555.
- [15] JEON W Y, JANG M J, PARK G Y, *et al.* Microbial production of sebacic acid from a renewable source: Production, purification, and polymerization[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(23): 6491-6501.
- [16] 吴艳霞. 油酸水合酶与脱氢酶级联催化制备 10-癸基硬脂酸[D]. 上海: 华东理工大学, 2019.
- [17] ESTABRAGH A M, SADEGHI H M M, AKBARI V.

- Co-expression of chaperones for improvement of soluble expression and purification of an anti-HER2 scFv in *Escherichia coli*[J]. *Advanced Biomedical Research*, 2022, 11: 117.
- [18] SUSKE W A, VAN BERKEL W J, KOHLER H P. Catalytic mechanism of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a flavoprote in from *Pseudomonas azelaica* HBP1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(47): 33355-33365.
- [19] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630: 493-500.
- [20] CHOIVANCOVA E, PAVELKA A, BENES P, *et al.* CAVER 3.0: A tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures[J]. *PLOS Computational Biology*, 2012, 8(10): e1002708.
- [21] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8): 3891-3898.
- [22] SCHAUPERL M, NERENBERG P, JANG H, *et al.* Non-bonded force field model with advanced restrained electrostatic potential charges (RESP2)[J]. *Communications Chemistry*, 2020, 3(1): 44.
- [23] LU T. Sobtop (Version 1.0) [CP/OL]. (2024-06-05) [2025-05-18]. Beijing: Keinsci Research Center. <http://sobereva.com/soft/Sobtop>.
- [24] LU T, CHEN F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2012, 33(5): 580-592.
- [25] GORDON J C, MYERS J B, FOLTA T, *et al.* H++: A server for estimating pK_a s and adding missing hydrogens to macromolecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: w368-w371.
- [26] ABRAHAM M J, MURTOLA T, SCHULZ R, *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers [J]. *SoftwareX*, 2015, 1-2: 19-25.
- [27] MAIER J A, MARTINEZ C, KASAVAJHALA K, *et al.* ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, 11(8): 3696-3713.
- [28] BROOKS C L. Computer simulation of liquids[J]. *Journal of Solution Chemistry*, 1989, 18(1): 99-101.
- [29] VAN GUNSTEREN W F, BERENDSEN H J C. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1990, 29(9): 992-1023.
- [30] HESS B, BEKKER H, BERENDSEN H J C, *et al.* LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 1997, 18(12): 1463-1472.
- [31] 齐人睿, 李明昊, 常浩, 等. 基于拉伸分子动力学模拟的黄嘌呤氧化酶抑制剂解离途径的理论研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2021, 42(3): 758-766.
- [32] MIAO Y, FEHER V A, MCCAMMON J A. Gaussian accelerated molecular dynamics: Unconstrained enhanced sampling and free energy calculation[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, 11(8): 3584-3595.
- [33] SALOMON-FERRER R, CASE D A, WALKER R C. An overview of the Amber biomolecular simulation package[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2013, 3(2): 198-210.
- [34] MARK P, NILSSON L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001, 105(43): 9954-9960.
- [35] MIAO Y, SINKO W, PIERCE L, *et al.* Improved reweighting of accelerated molecular dynamics simulations for free energy calculation[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2014, 10(7): 2677-2689.
- [36] JOHNSON Z L, LEE J H, LEE K, *et al.* Structural basis of nucleoside and nucleoside drug selectivity by concentrative nucleoside transporters[J]. *eLife*, 2014, 3: e03604.
- [37] CHEN H, LIU Y, REN X, *et al.* Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase through a size/polarity guided triple-code strategy with enhanced α -glycosyl hesperidin synthesis ability[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(17): e0102722.
- [38] YACHNIN B J, SPRULES T, MCEVOY M B, *et al.* The substrate-bound crystal structure of a Baeyer-Villiger monooxygenase exhibits a Criegee-like conformation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(18): 7788-7795.

Semi-Rational Design of Substrate Channels for *PaBVMO* to Achieve Triple Synergy of Catalytic Efficiency-Substrate Inhibition-Stability

FENG Kejia^{1,2}, ZHAO Youxue^{1,2}, MENG Luobing^{1,2}, LI Chunxiu^{1,2}, XU Jianhe^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Bioforany Biotechnology Corporation Limited, Shanghai 200233, China)

Abstract: Baeyer-Villiger monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBVMO*) selectively inserts an oxygen atom into the unconventional side of the carbonyl group of 10-carbonyl stearic acid to produce octyl sebacate, which can be used for synthesizing material monomers sebacic acid and 8-hydroxyoctanoic acid. To break through the dual bottlenecks of low catalytic efficiency and significant substrate inhibition of *PaBVMO* under high substrate concentrations in sebacic acid biosynthesis, this study proposed a semi-rational remodeling strategy for the enzyme's substrate channel. By analyzing enzyme-substrate binding free energy and substrate force, the key gating loop structure of the substrate channel was resolved. Based on this strategy, the optimal mutant *PaBVMO*_{G398A} was obtained. It exhibited a catalytic turnover number (TON) of 3.45×10^4 , which was 5.3 times higher than that of the parent, and about 0.7 times higher in specific activity. Meanwhile, the inactivation half-life was prolonged from 1.87 h to 6.14 h, and the stability is significantly enhanced. Gaussian-accelerated molecular dynamics (GaMD) simulations further revealed the synergistic mechanism of G398A mutation inducing the rearrangement of the active pocket of *PaBVMO*_{G398A}. This rearrangement effectively alleviated substrate inhibition by 10-carbonyl stearic acid, enhanced affinity for FAD and improved stability.

Key words: octyl sebacate; biocatalysis; *PaBVMO*; substrate channel remodeling; GaMD

(责任编辑: 李娟)