

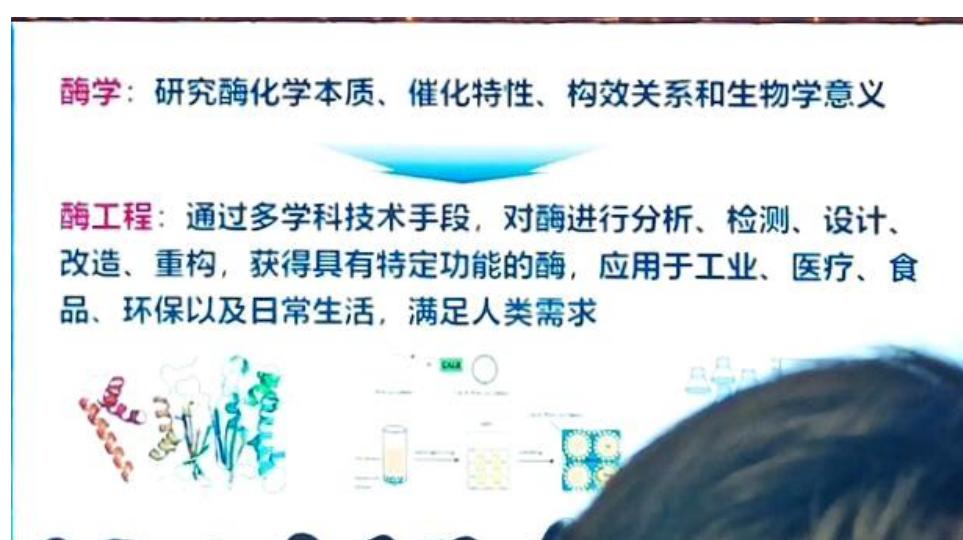
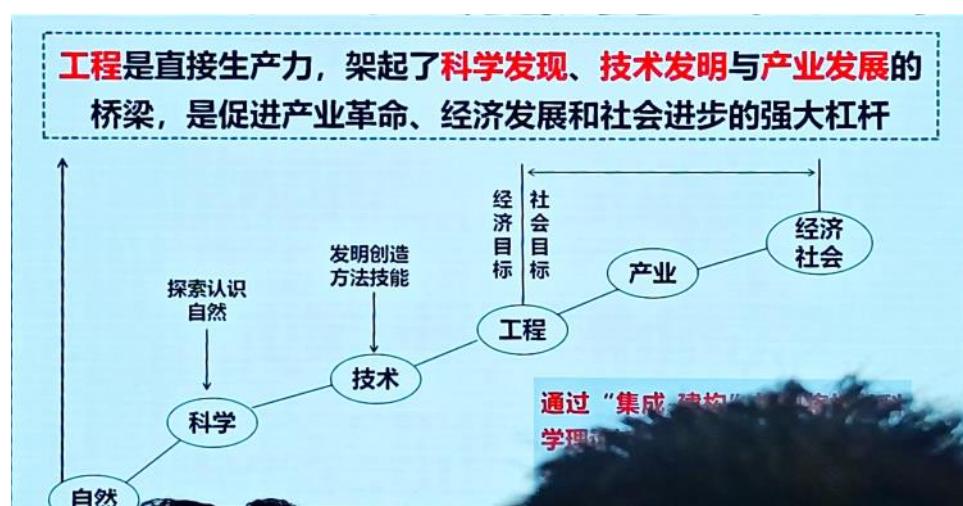
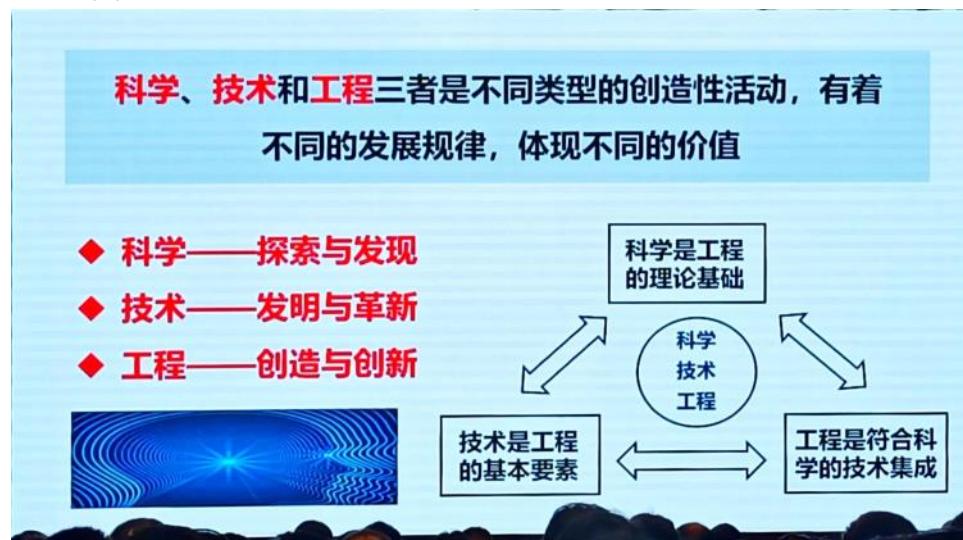
初

2023年8月22日 16:52

# 第十四届-1-郑裕国

2023年8月19日 9:00

1 郑裕国





## 认识酶、发现酶

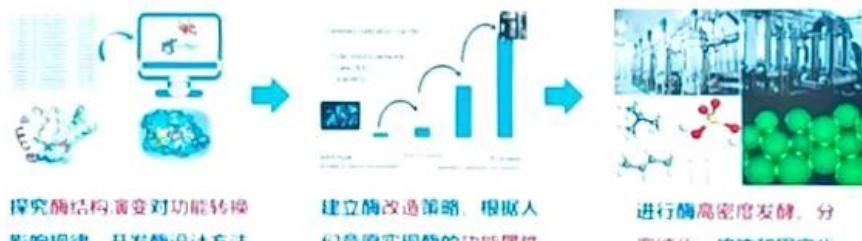


酶的结构? 酶的分类? 酶的构效关系? 酶的催化机制?



科学的发现和认识!

## 设计、改造和创制酶



蛋白质结晶技术

DNA测序技术

酶改造技术

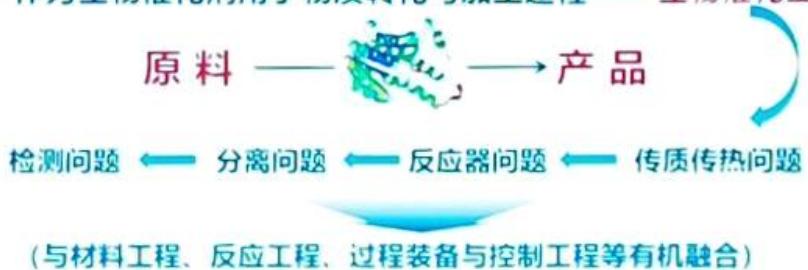
酶固定化技术

高密度发酵技术

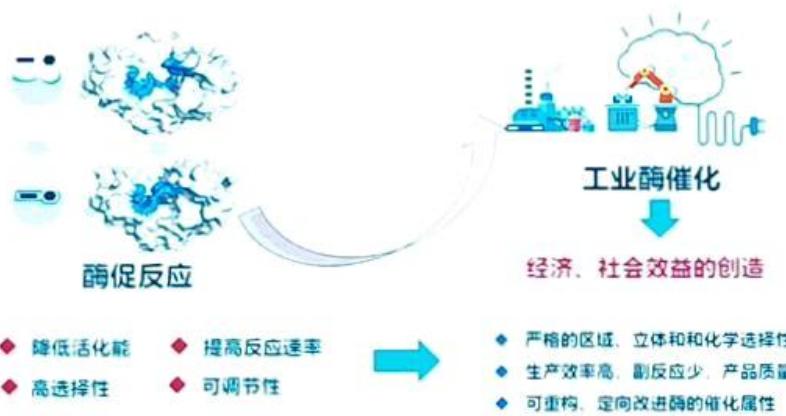
发明和创制  
指导、服务生产

## 应用酶

- ◆ 应用：洗涤用酶、医疗诊断用酶、食品用酶、环境用酶等  
(直接进入生物体、水体、环境等)
- ◆ 作为生物催化剂用于物质转化与加工过程——**生物催化工程**

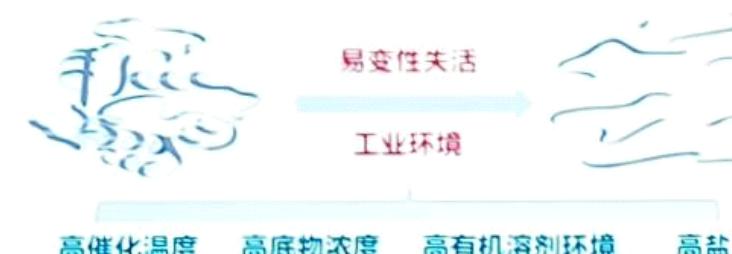


## 从酶促反应到工业酶催化



## 从酶学到酶工程、生物催化工程的关键问题

### 酶与工业生产环境适配性



酶本身为生物大分子，在高强度工业环境下适应性差，无法满足生产需要，是实现高效生物催化的技术瓶颈之一

### ➢ 生物催化与其它合成单元过程关联性



传统生物催化过程强化多聚焦于酶反应本身，忽视了与其它化学操作等合成工序的关联性，导致全合成过程效率低。

### ➢ 酶与其它催化元件及辅因子间协作性



酶与其它催化元件之间稳定性、催化活性、级联效率不匹配；与辅因子间协作效率低是高效多酶生物催化技术瓶颈

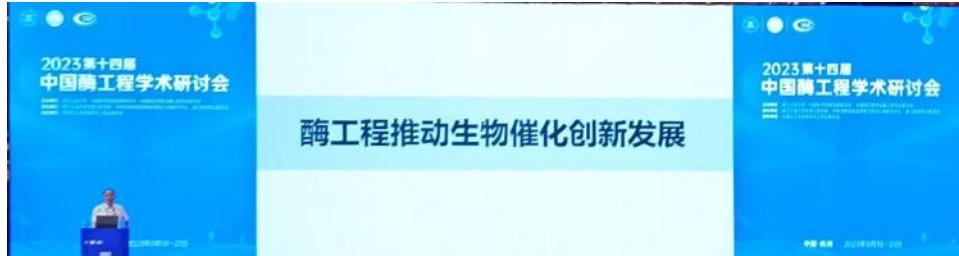
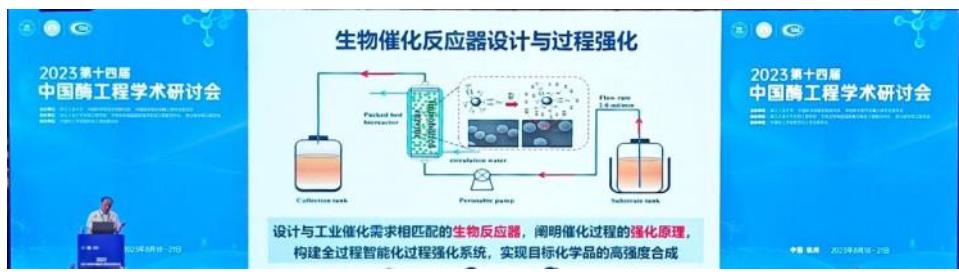
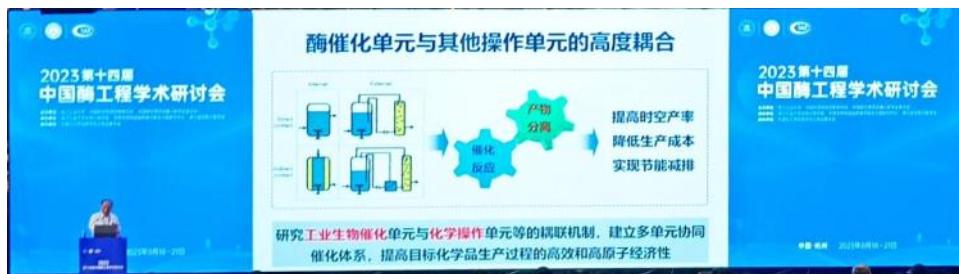
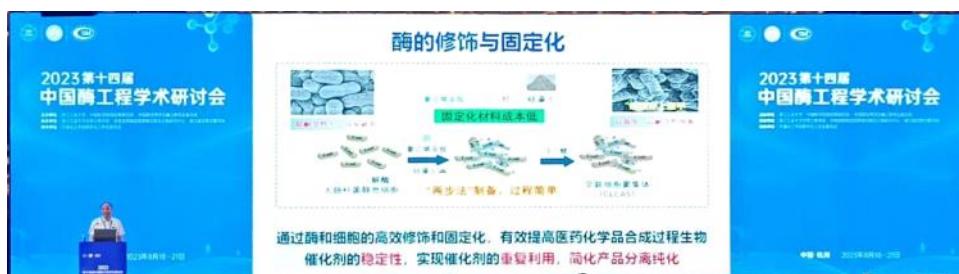
### ➢ 酶工业催化过程放大效应

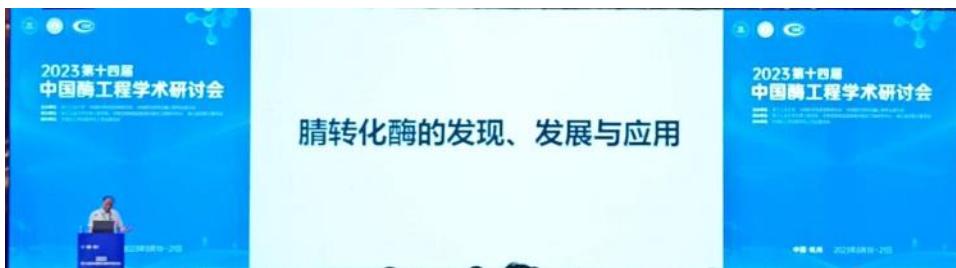


生物催化过程在工业放大时，常面临反应体系不均一、搅拌转速等关键参数非线性放大等难题，限制了目标化学品的高效合成

# 解决瓶颈，实现工业化应用的必经之路： 工程创新！

“酶学” → “酶工程” → “生物催化工程”





**腈转化酶的发现**

1952. 发现腈水合酶: 从大豆种子中提取纯化获得将丙烯-3-乙腈转化为植物生长激素吲哚-3-乙酸的酶  和羧-3-乙酸 又名: 脲酶乙腈水解酶  随后发现对20余种脂肪族和芳香族化合物有活性 <b>命名: 腈水解酶</b>	1977. 山田秀郎 发现 <b>腈水合酶</b> 1985年 第一代催化剂 <i>Rhodococcus</i> sp. 774  1988年 第二代催化剂 <i>P. chlororaphis</i> B23  1991年 第三代催化剂 <i>R. rhadococcus</i> J1  生物催化法生产丙烯酰胺 产能超百万吨	1986. 沈寅初院士 <b>腈水合酶</b> 1986. 从泰山土壤中分离到 <i>Nocardia</i> sp. 86-163  生物催化法生产丙烯酰胺 产能超百万吨
--	---	---

**实现丙烯酰胺生产中的应用**

**腈化合物转化途径**

- 氨基易作为“水稳定负碳离子”引入有机化合物，是一种重要的C1源

$$\text{R-CN} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{腈水合酶}} \text{R-CONH}_2 \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}, \text{-NH}_3]{\text{脱氨酶}} \text{R-COOH}$$

**从腈转化酶的发现和腈水解酶的研究探求酶的应用范围**      **开发腈类化合物生物转化合成羧酸和酰胺的路线，实现从酶学到酶工程的重大跨越**

**腈水合酶-酰胺酶偶联生产(S)-2,2-二甲基环丙甲酰胺**

抗重症感染首选药物——亚胺培南西司他丁钠  
 $\text{S}-2,2-\text{二甲基环丙甲酰胺} \xrightarrow{\text{腈水合酶}} \text{S}-2,2-\text{二甲基环丙甲酰胺}$

● 关键手性源：手性纯度要求较高  
 ● 特殊手性和刚性平面结构，手性合成难度大  
 ● 基于活性结构、标准结构的酶特征结构改造  
 ● 针刺高活性、高立体选择性酰胺酶  
 ● 实施双酶一锅法耦联生物合成与过程强化

**建成国际上第一条化学-酶法生产亚胺培南/西司他丁钠的工业化生产线，实现从非手性到手性的腈转化酶催化合成了重要药物。**

**立体选择性腈水解酶法生成R-扁桃酸的工程创新**

传统化学生工艺  
 $\text{R-扁桃酸} \text{转化率} < 50\%, \text{ee} > 94\%$

固定化腈水解酶催化  
 $\text{R-扁桃酸} \text{转化率} 100\%, \text{ee} > 99\%$

年产500吨规模的R-扁桃酸生产线，腈水解酶生产手性化合物的第一套装置

**立体选择性腈水解酶法生成普瑞巴林的工程创新**

化学合成路线：  
 - 75%原料变成“三废”排放  
 - 总收率20%    ★ 环保因子≤7  
 ★ 无助对映体消旋且用，原子经济性高

腈水解酶立体选择性水解异丁基丁二腈路线  
 ★ 工艺过程简捷    ★ 环保因子≤7  
 ★ 无助对映体消旋且用，原子经济性高

高效酶制剂与调控      生物催化法  
 提高收率      循环与放大

**普瑞巴林工业生产线**  
 (原子经济性最高、环境因子最低的合成路线)

技术指标	原工艺	新工艺
产物光学纯度 (%)	95.2	>99.7
副产物含量 (%)	19	<1
底物/催化剂 (S/C)	4	60

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

### 区域选择性腈水解酶法生产加巴喷丁的工程创新

化学合成路线：  
 - 区域选择性  
 - 使用大规模化菌，纯酶等  
 - 总体收率高，三废排放大

基于酶构效关系，创制了具有高区域选择性和高活性腈水解酶，实现绿色、高效的加巴喷丁合成路线

化学合成路线：E Factor = 0.1  
 E Factor = 0.1  
 化学法(78%)：化学酶法(22%)

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

◆ 琥珀酸还原酶广泛存在于动植物及微生物体内，微生物是工业用琥珀酸还原酶的主要来源  
 ◆ 琥珀酸还原酶主要分布于短链脱氢酶/还原酶，中链脱氢酶/还原酶和脂酰还原酶三个超家族，目前种类已达120000种以上

短链脱氢酶/还原酶

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

### 羧基还原酶在手性醇合成中的应用

阿托伐他汀能够有效抑制胆固醇合成，全球最大的降血脂药

含有双羟二酮侧链结构，理论上存在着四种手性异构体，合成光学纯产物的难度极大

◆ 琥珀酸还原酶，葡萄糖脱氢酶，脂肪酰丙酮三重联构筑第一个手性羟基  
 ◆ 琥珀酸还原酶，葡萄糖脱氢酶双重联构筑第二个手性羟基

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

发明辅酶结合域与底物催化口袋理性设计的羧基还原酶活性和选择性调控技术，实现酶的工业属性，并进行多酶级联催化过程控制与强化

✓ A4浓度为 1653 mM, 产率 97 %, 时空产率 413 mM/h, e.e. > 99 %  
 ✓ A7合成都程彻底革除了镍盐、硼氢化钾、四氯呋喃等使用, de > 99.5 %

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

于浙江乐普药业股份有限公司实施产业化  
 • 阿托伐他汀钙原料药生产线，规模，产量全球第一  
 • 建成30亿片/年阿托伐他汀钙片生产线

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

### 羧基还原酶催化合成孟鲁司特关键手性中间体

孟鲁司特—第三代白三烯受体拮抗剂药物，用于哮喘的预防和治疗，市场需求大

合成方法  
 ● 产物光学纯度不理想  
 ● 反应需耗温高高压条件  
 ● 底物毒性，由氯原子，对位环以及酚基易发生副反应

✓ 高度的立体、化学与区域选择性  
 ✓ 杜绝副反应的发生  
 ✓ 产率ee值>99%  
 ✓ 成本低廉，环境友好

中国·杭州 2023年8月18-20日

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

◆ 筛选获得系列卤化酶，考察影响对不同底物催化性能的关键因素  
◆ 锁定了影响卤化酶催化性能的关键特征结构，建立酶的改造策略

叶啉分子的Mulliken电子密度分布为:  
N1(1.088)>C5(1.030)>C3(0.996)>C4(0.990)>C7(0.989)>C6(0.988)>C8(0.972)>C2(0.962)

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

卤醇脱卤酶在拆分卤代醇和环氧化物过程中具有高区域选择性和立体选择性。同样为制备手性卤代醇、环氧化物和 $\alpha$ -取代醇等化合物开辟了新途径

卤代醇 环氧化物 二醇  
 $\beta$ -羟基酯 脱氯 酰基脱氯酶

环氧化丙烷(ECH)是一种重要含氯化合物，是重要的医药、农药等中间体，需求量大

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

卤醇脱卤酶：从酶学研究到酶工程再到产业化工程科技创新

● 原料还醇生物催化合成：4-氯乙酰乙酸乙酯(A3)到(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(A4)  
● 脱卤氧化生物-化学同步催化合成：(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(A4)到(R)-4-氯基-3-羟基丁酸乙酯(A5)  
● 产业化工程技术创新：多酶-化学“一锅法”组合成从4-氯乙酰乙酸乙酯(A3)到(R)-4-氯基-3-羟基丁酸乙酯(A5)大规模生产过程工程(工艺、设备、控制、操作)

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

环氧化丙烷生产技术：

现有工业生产方法有丙烯高温氧化法、甘油法和乙酸丙烯酯法

酶法合成

理论产率达100% ✓ 产物单一 ✓ 反应条件温和，环境相容性好

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

卤化酶和卤醇脱卤酶的高效偶联催化，将实现从甘油直接制备手性环氧丙烷的生物合成路线，全面革新其生产工艺

甘油 → 卤化酶 + 脱氯剂 → 手性环氧丙烷

具有工业应用属性卤化酶、卤醇脱卤酶的创制、偶联催化体系的构建、催化过程的控制和产品的高效分离纯化  
最终形成手性ECH产业的新结构和生产新方式

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

科学到工程的路径发展

S (science, 科学) - T (technology, 技术) - E (engineering)

认识  
科学发现 → 能力  
技术产生 → 实现  
创新创造

“科学—技术—工程—产业—经济—社会—价值”  
科学到工程的发展符合人类社会发展规律

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

从科学到工程

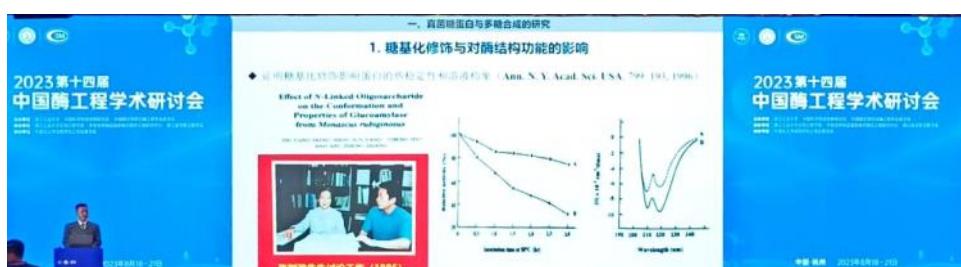
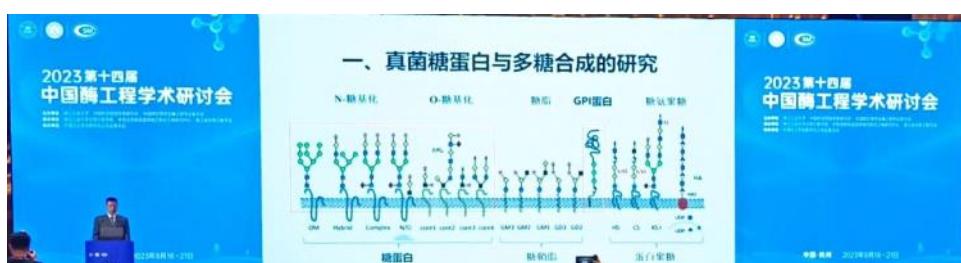
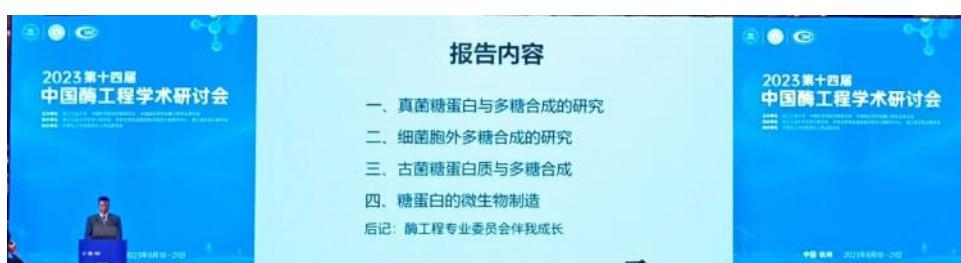
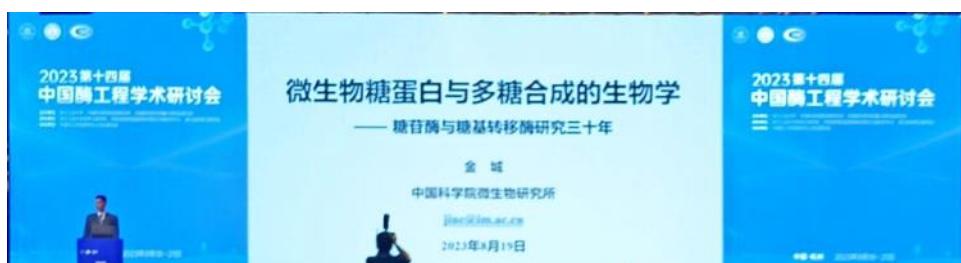
◆ 以现实存在的客观事物规律为基础，建立可实践的、有效的、创造价值的现代技术；  
◆ 以单个技术为构成要素，通过动态、有序地嵌入到工程系统中，发挥各项技术的功能和效率；  
◆ 以社会发展需求为导向，通过对技术-工程-产业的集成，转化为现实生产力，获得最大的经济、社会效益。

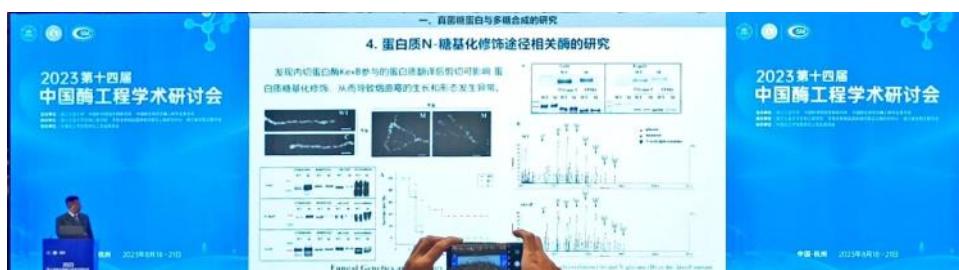
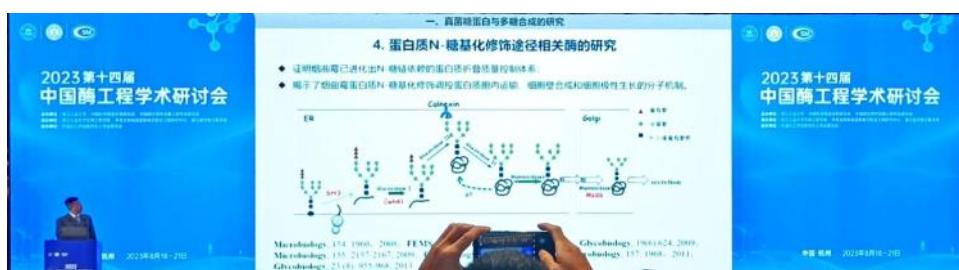
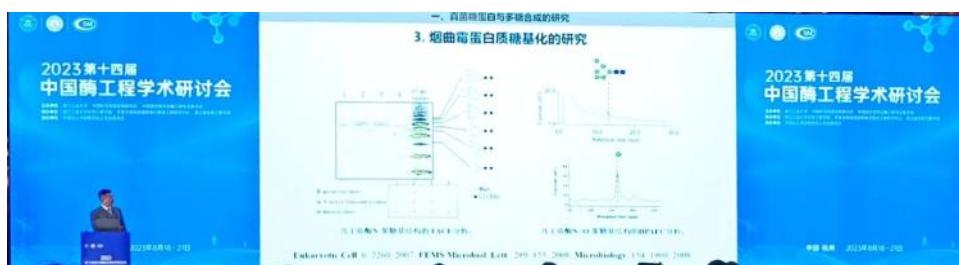
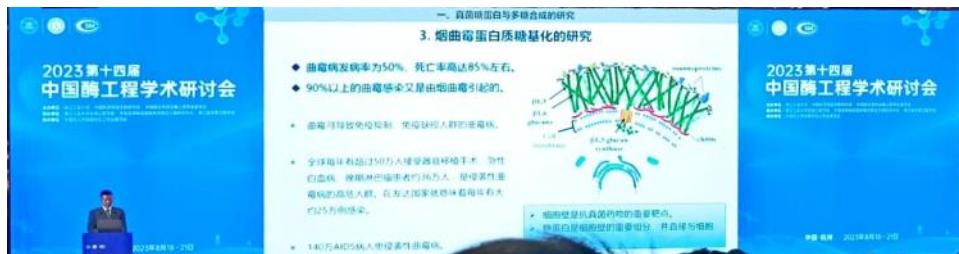
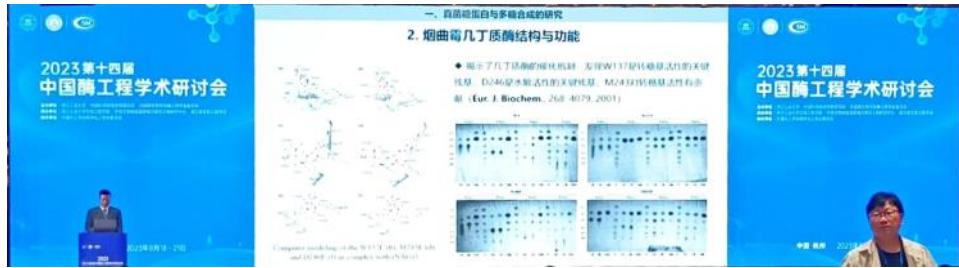


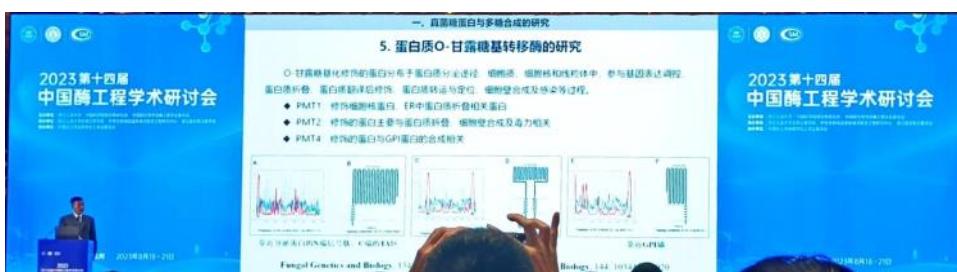
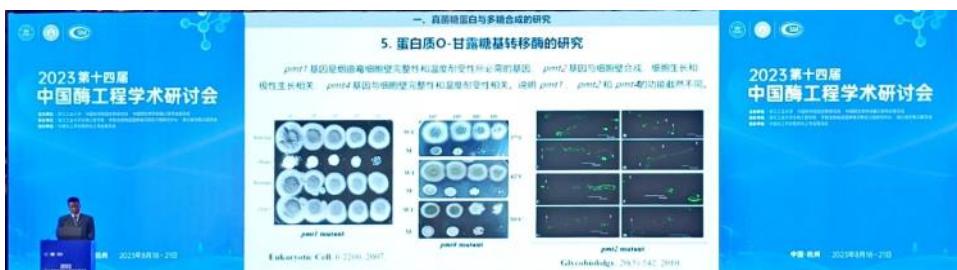
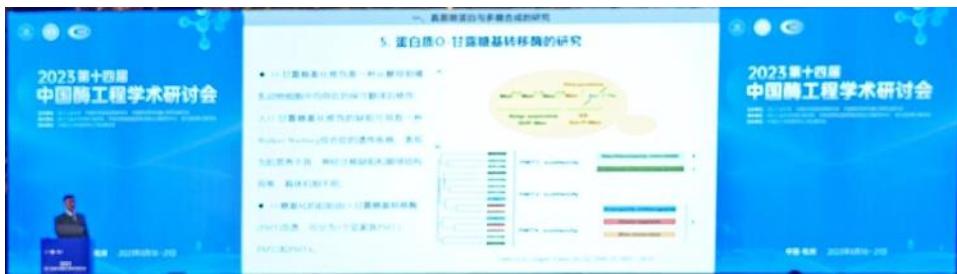
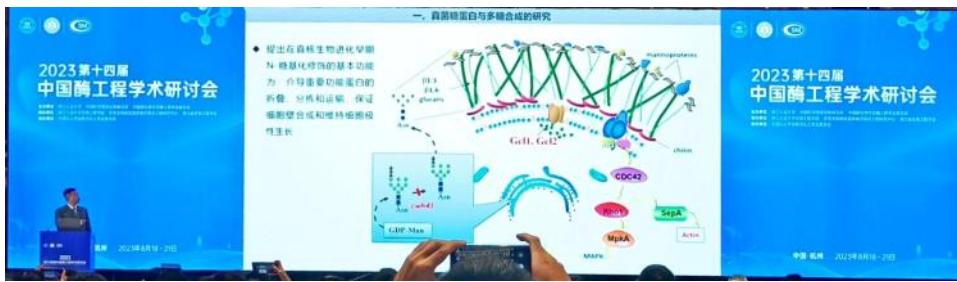
# 第十四届-2-金城

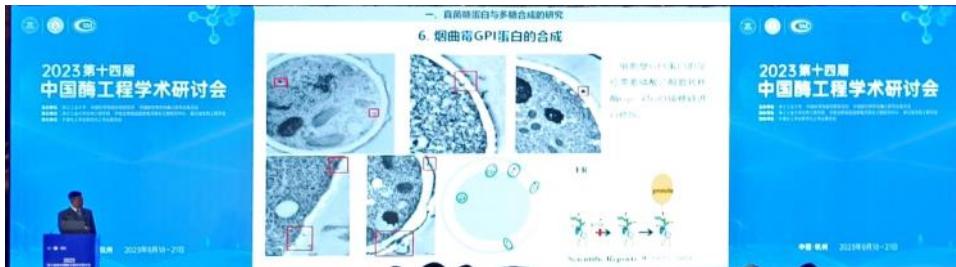
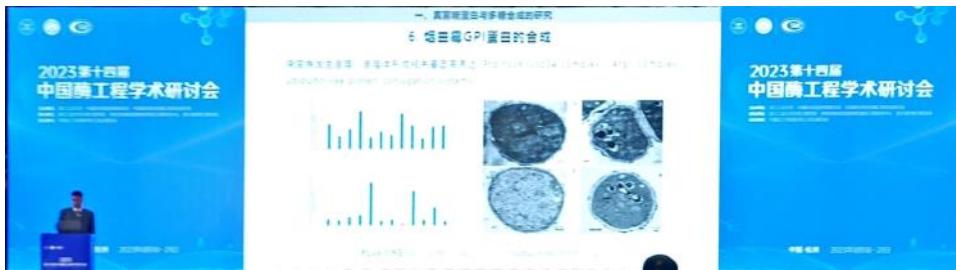
2023年8月19日 9:46

2金城









# 第十四届-海报

2023年8月19日 10:54



Key Laboratory of Green Chemistry and Technology, Ministry of Education,  
Sichuan University, Chengdu, China

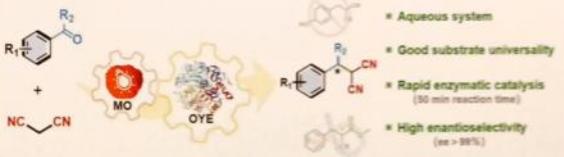
## 一锅法光-酶串联合成手性丙二腈烷基化衍生物

范馨月, 万玉军, 王娜\*

\*E-mail: wnchem@scu.edu.cn; Tel./Fax: 15982138565

### 研究背景

二腈类化合物是合成许多材料、生物活性分子的通用模块，在高分子材料、药物合成等领域都有着重要应用。丙二腈烷基化衍生物本身可作杀虫剂、除草剂、胸腺昔磷酸化酶抑制剂等，也可以进一步用于合成手性氨基酸、手性二胺等，在有机合成领域发挥着重要作用。然而，目前关于手性二腈类化合物的合成研究还比较匮乏。因此，开发绿色高效的光-酶协同催化既丰富了该类化合物的合成路线，又符合绿色化学的基本原则。



- \* Aqueous system
- \* Good substrate universality
- \* Rapid enzymatic catalysis (30 min reaction time)
- \* High enantioselectivity (ee > 99%)

### 研究内容

#### 一、反应条件优化



Entry	Photoradiation (mJ/cm <sup>2</sup> )	Yield(%)
1	Raw Bengal	12.9
2	Irradiation 0	28.8
3	Irradiation 2	1.8
4	Irradiation 4	2.7
5	Irradiation 6	37.8
6	Cryostat Vial	12.8
7	Silicone Seal 40	4.8

#### ➤ OYE1与OYE3对映选择性及反应活性差异的原因



# 第十四届中国酶工程学术研讨会

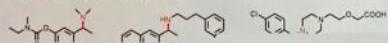
## 胺脱氢酶的改造及其在手性苯丙胺结构类似物合成中的应用

罗宇阳, 陈曦, 李玉银, 冯进辉, 吴治庆, 朱敦明

中国科学院天津工业生物技术研究所

### 介绍

手性胺是一类含有胺基手性中心的小分子化合物, 是众多医药及农药的关键中间体, 大约40%药物含有手性胺结构。



### 实验方法

以对甲氨基苯丙酮为模式底物, 建立200 mM底物浓度, 2 M氯浓度下的反应。对实验室的胺脱氢酶酶库(共58个酶)进行筛选, 获得了一株对模式底物有较好活性的酶, 产物ee值大于99%。通过对 其进行分子改造, 获得了新的突变体。该酶活得到提

# 第十四届中国酶工程学术研讨会

## L-苏氨酸转醛醇酶的高通量筛选方法研究

李宗浩，姚培圆，冯进辉，吴治庆，朱敦明

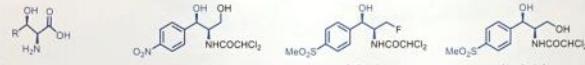
中国科学院天津工业生物技术研究所



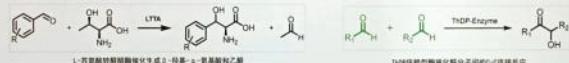
Email: lizh@tib.ac.cn

### 背景简介

手性 $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸是许多天然产物和药物分子的关键结构单元<sup>1</sup>。例如，(2S,3R)-对硝基苯丝氨酸是氯霉素的重要结构单元，(2S,3R)-对甲砜基苯丝氨酸是甲砜霉素和氟苯尼考的关键中间体。化学法制备该类化合物时存在反应条件苛刻、原子经济性差、环境不友好等缺点，生物法则表现出反应条件温和、原子经济性好、操作简便等优势<sup>2</sup>。L-苏氨酸转醛醇酶可以催化不对称合成 $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸，但其活性及稳定性仍难以满足工业化应用的需求。定向进化是提升其工业适应性的有效手段。但是针对该酶的筛选方法仍相对欠缺且效率低下，亟需开发快捷高效、简单廉价的筛选方法。



L-苏氨酸转醛醇酶不能对称催化L-苏氨酸和对甲砜基苯甲酰胺合成(2S,3R)-对甲砜基苯丝氨酸和乙醛。基于此，联想到实验室已有的ThDP(焦磷酸硫胺素)依赖型酶，其可通过C-C键的连接反应将乙醛转化为3-羟基-2-丁酮，随后与红四氮唑发生颜色反应，进而对转醛醇酶突变体进行筛选。



### 内容与结果

#### 1. ThDP(焦磷酸硫胺素)依赖型酶库进行筛选

分别以对甲砜基苯甲酰胺和乙醛为底物对实验室的ThDP依赖型酶库进行筛选，用于转醛酶(LTTA)的串联反应。



通过用红四氮唑显色，发现大多ThDP依赖型酶对副产物乙醛有活性，对底物醛无活性或活性很低，最终选择对乙醛活性高而对旁氏族醛无活性的ThDP-25作为L-TTA的亲酶。

#### 2. 3-羟基-2-丁酮标准曲线的绘制

加入不同浓度乙醛显色：



#### 3. 加入不同比例LTTA进行反应，偶联ThDP-25，通过红四氮唑显色

为了验证显色结果的准确性，通过加入不同比例酶量的LTTA野生型酶，串联ThDP-25进行反应，反应结束后加入红四氮唑显色液进行显色。通过酶标仪测定485nm下的吸光值，通过标准曲线计算乙醛浓度，进一步证明了该方法的准确性。



A: 10μg ThDP-25固定量的对照；B: 1μg LTTA固定量；C: 1μg LTTA固定量；D: 2μg LTTA固定量；E: 3μg LTTA固定量

(注：第一行为野生型对照，其余行为同理)

4. 将该高通量筛选方法应用于LTTA突变体库的筛选

从L-苏氨酸转醛醇酶突变库中随机挑取突变体单克隆于96孔板中培养并收集菌体，加入L-苏氨酸和对甲砜基苯甲酰胺进行反应，偶联ThDP-25并用红四氮唑显色，获得了活性提高的突变体。

中国科学院天津工业生物技术研究所  
Tianjin Institute of Industrial Biotechnology Chinese Academy of Sciences

### 结论

结论：本研究通过将ThDP依赖型酶与转醛酶串联，建立了一种L-苏氨酸转醛醇酶(LTTA)突变体高通量筛选方法，通过颜色的深浅即可反映酶活性。该筛选方法简单快捷、灵敏性好、准确性强。将该方法应用于该酶的定向进化中，获得了一些活性提高的突变体，为实现该酶的工业化应用奠定了基础。

### 参考文献

- (1) Doyen, T. I.; Kumar, P.; Thom, S.; Kim, M.; Bruges, A.; Griggs, A. M.; Madigan, C.; Willoughby, P. H.; Baker, A. R.; Szekely, and Seeliger,  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -Amino Acid Synthesis Catalyzed by Prokaryotic Thermophilic Transaldolase. *ChemBioChem* 2011, 12 (2), e201000775.  
(2) G. Liu, Z., Chen, X., Cen, Q., Feng, J., Wang, M., Wu, Q., Zhu, D. Engineering of L-threonine oxidase for the preparation of 4-(methoxyacetyl)phenylboronic ester, an important intermediate for the synthesis of pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology* 2020, 137, 105511.

# 第十四届中国酶工程学术研讨会

## 高产16-OH-甾体的菌株构建

武琼, 李雪梅, 朱良彦, 刘以银, 冯进辉, 朱敦明, 吴治庆

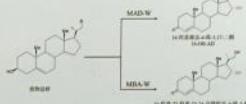
中国科学院大学 101408

工业酶国家工程研究中心, 国家合成生物技术创新中心, 天津市生物催化技术工程中心, 中国科学院天津工业生物技术研究所, 300308, 022-24828703

Email: wuqiong@tib.cas.cn

### 研究背景

甾体化合物是一类重要的化合物, 参与了生殖、大脑发育、稳态调控等重要的生命过程, 也被广泛应用于消炎、抗病毒、抗过敏以及治疗老年性疾病等各个领域, 是仅次于抗生素的第二大类药物, 与人体健康息息相关。羟基化甾体是合成甾体药物的重要中间体, 通过微生物转化可以实现化学方法难以实现的羟基化。同时具有成本低、污染小等优点。16-OH甾体在皮质甾体药物的合成中起着至关重要的作用, 在甾体母核16- $\alpha$ 位引入羟基后, 可以减少电解质的影响, 而不影响抗炎和糖代谢作用。此外, 16-OH甾体也可作为中间体合成氢化的松等药物。目前16-OH甾体需要先合成中间体, 分离纯化后再用特定的P450酶进行羟化, 分离纯化步骤多, 产品得率低。2013年以来, 已经从微生物中鉴定了几种能实现甾体化合物16位羟化的P450酶, 实现了甾体类底物孕烯醇酮、脱氢表雄酮、孕酮、雄烯二酮、睾酮和雌酮到相应16 $\alpha$ 羟化甾体化合物的生物转化。但目前的研究均以分离纯化后的甾体为底物, 步骤复杂。本课题组通过异源表达P450酶及其电子传递链, 实现了从植物甾醇出发, 一步合成16-OH甾体, 省去了分离纯化中间体的步骤。



### 结果与分析

#### 重组菌株的构建

在本实验室构建的两个菌株MAD、MBA中分别表达CYP154C5和CYP154C3基因及其电子传递链, 构建了菌株MAD-W和MBA-W。

#### 发酵条件优化

对菌株MBA-W的发酵温度进行了优化, 当选择在发酵第8天将温度由30°C升高至37°C时, 16-OH-BA的峰面积比例略有提高, 可达80%左右。



MBA-W不同时间提高温度发酵14天结果

#### 启动子优化

选择文献已报道的具有表达量差异的启动子重新构建表达质粒, 并转化至MBA菌株中, 发现不同的启动子对目标产物16-OH-BA的比例有明显的影响, 当启动子P1启动CYP154C3基因的表达时, 16-OH-BA峰面积比例最高, 可达80%以上。

### 结论与展望

本研究通过异源表达P450酶及其电子传递链构建了菌株MBA-W, 该菌株能够以乳化植物甾醇为底物, 一步发酵生成16-OH-BA, 通过条件优化, 产物比例可达80%以上, 实现了以植物甾醇为底物, 通过微生物转化一步生产16-OH甾体化合物, 为这类化合物的高效制备奠定了基础。



# 基因编码人工光酶在不对称催化[2+2]环加成反应方面的应用

孙宁宁, 黄建建, 钟芳锐\*, 吴钰周\*



×

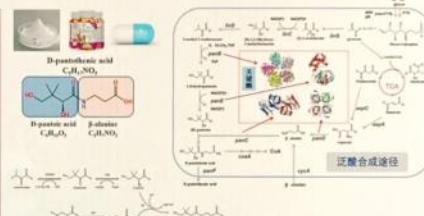


## Modification and optimization of pivotal enzymes involved in the biosynthesis pathway of pantothenic acid for enhanced application.

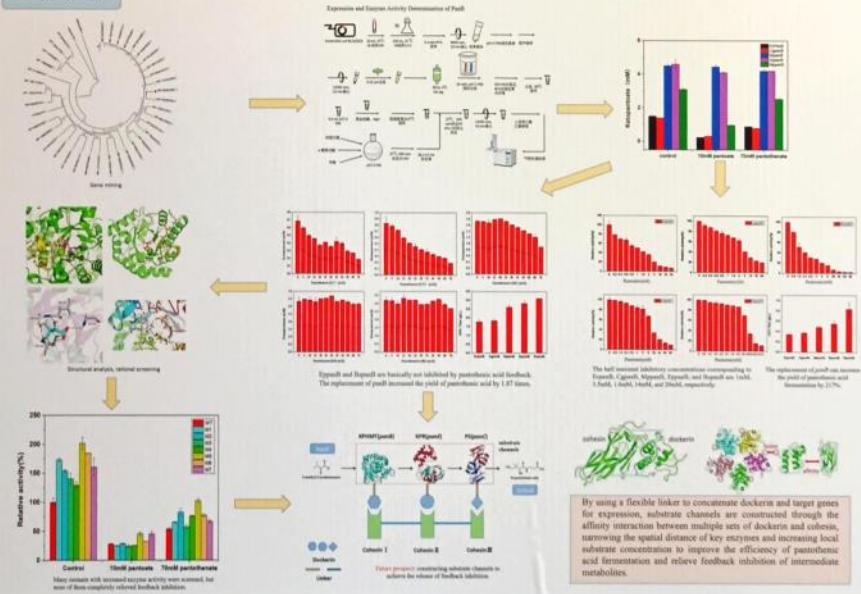
Zheng Ken, Zhu Fangying, Yang Qing, Xiao Bowen, Liu Zhiqiang\* Email:microliu@zjut.edu.cn

### Background

D-Pantothenate(D-PA), also referred to as vitamin B5, is a key precursor of coenzyme A (CoA) and acyl carrier protein (ACP) in living cells. While it can be synthesized by microorganisms and plants, not humans and other animals, thus making it widely used in feed and food additives. In addition, D-PA and its derivatives, including calcium D-pantothenate and D-pantanol, have many applications in medicine, cosmetics and other fields. Presently, the fermentative production routes of D-PA which employ many key enzymes are highly attractive since they have the advantages of simple cultivation methods, abundant raw material sources and environmental friendliness. The first committed step in D-PA biosynthesis is the formation of ketopantoate from N5, N10-methylmethylethylenefolate(5,10-CH<sub>2</sub>-THF) and α-ketoisovalerate (n-KIVA), the immediate precursor of L-valine, catalyzed by *parB*-encoded ketopantoate hydroxymethyltransferase(KPHMT, EC 2.1.2.11). Subsequently, the ketopantoate is converted into pantoate under the reduction of ketopantoate reductase(KPR). The last step of D-PA biosynthesis is catalyzed by pantothenate synthase(PS), which synthesizes D-PA from pantoate and β-alanine obtained by aspartic decarboxylase(ADC).



### methods & results



### conclusions

- ✓ A method for detecting the enzyme activity of KPHMT is provided.
- ✓ Multiple mutants with improved enzyme activity were screened by rational design

\*More suitable enzymes for pantothenic acid fermentation were screened

✓The fermentation yield of pantoate and pantothamate was improved by enzyme modification

# 第十四届-3-杜磊

2023年8月19日 10:59

## 3杜磊

主要研究方向

微生物活性天然产物生物合成与结构多样化

微生物合成生物学、酶学与酶工程、工业微生物菌株改良

微生物产物生物合成  
(系统认识)

真核生物碱  
含氮生物碱  
生物合成途径  
多聚酶  
代谢途径  
结构多样化  
(人工设计)

活性糖类  
糖类化合物  
生物催化途径  
重要生物活性  
糖类新分子  
代谢途径  
代谢途径  
典型药物分子  
代表性的药物分子  
生物合成  
活性药物分子  
衍生化新结构  
代谢途径

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

对甲酚生物降解基因簇

对甲酚生物降解途径  
利用对甲酚作为唯一碳源生长

对甲酚生物降解功能解析

P450酶CreJ与底物磷酸化对甲酚共晶结构解析

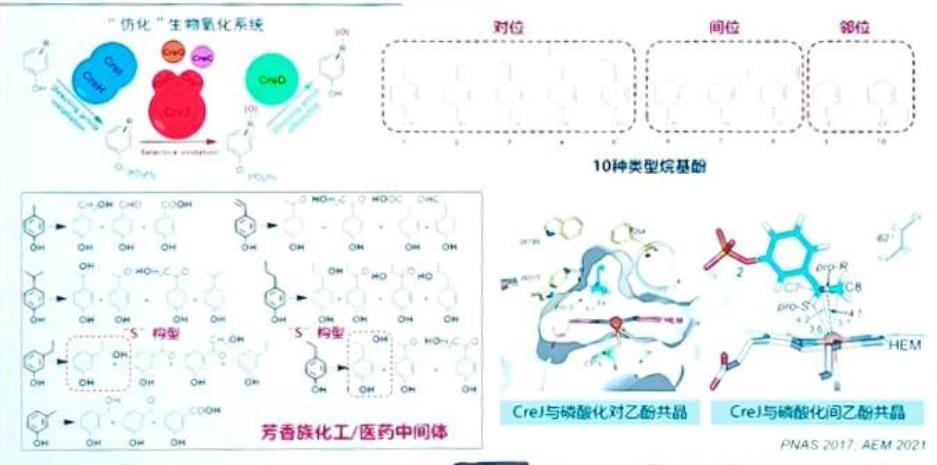
2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

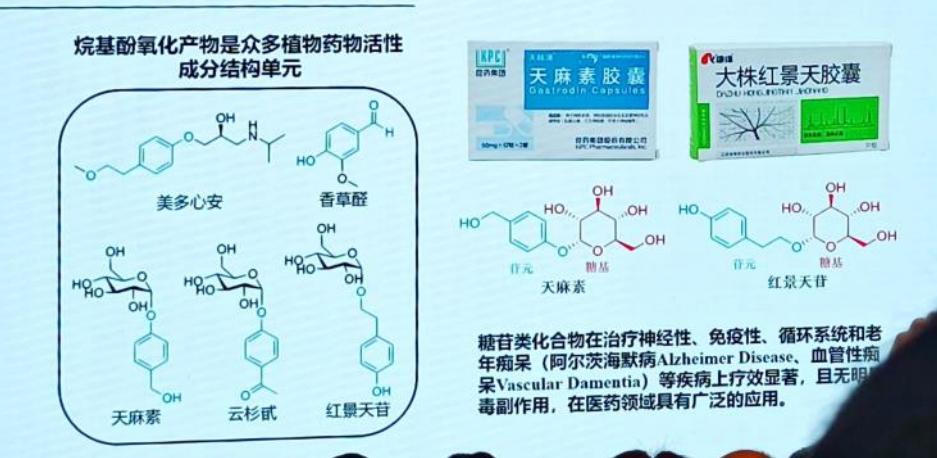
2023第十四届中国酶工程学术研讨会

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

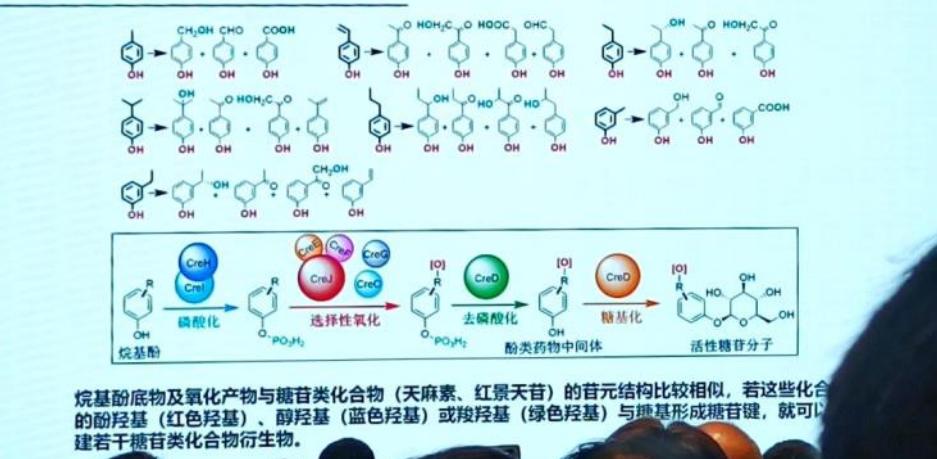
## 烷基酚衍生：“仿化”生物氧化系统



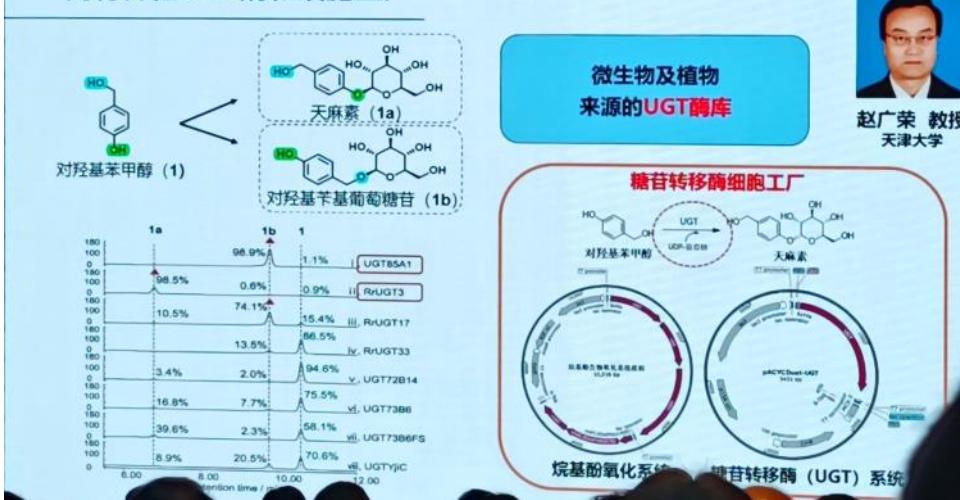
## 烷基酚衍生的活性天然产物



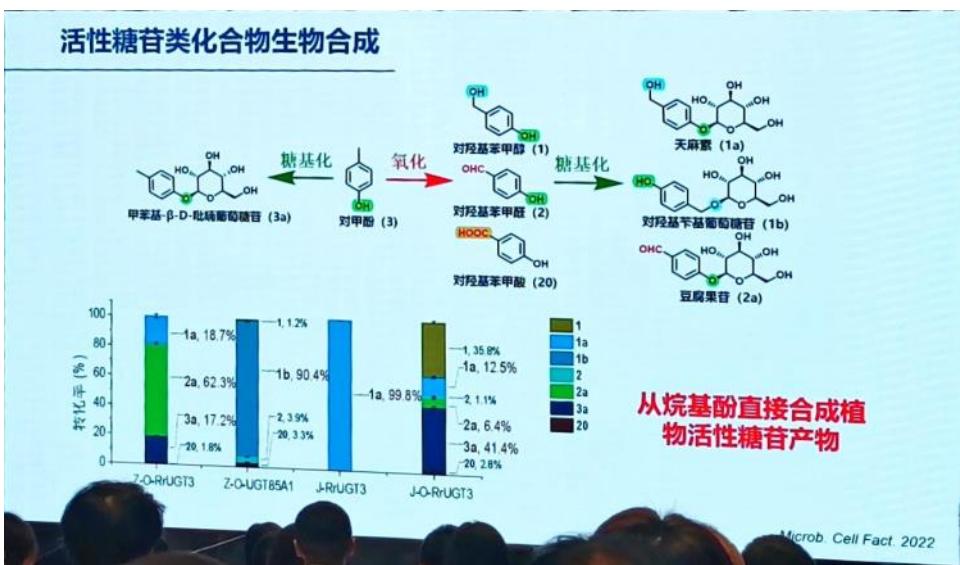
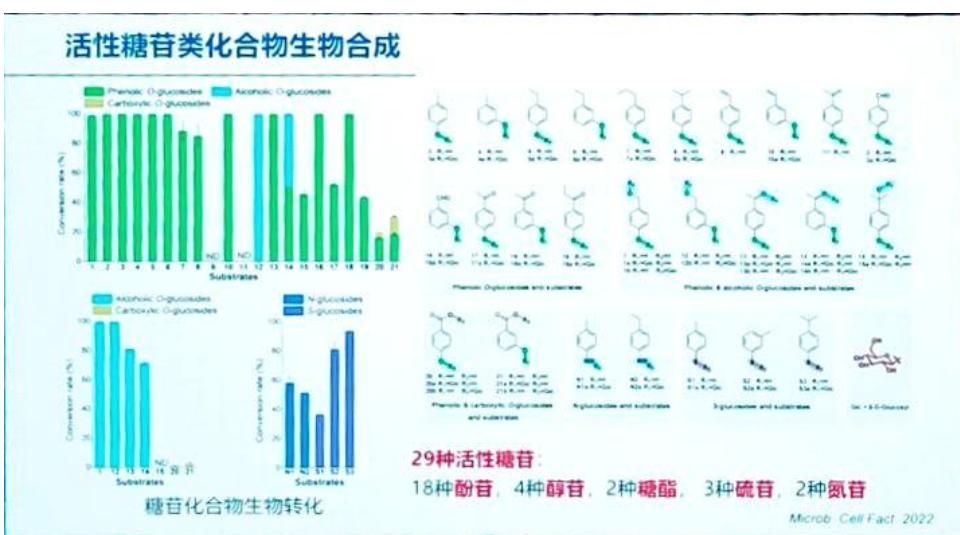
## 烷基酚衍生



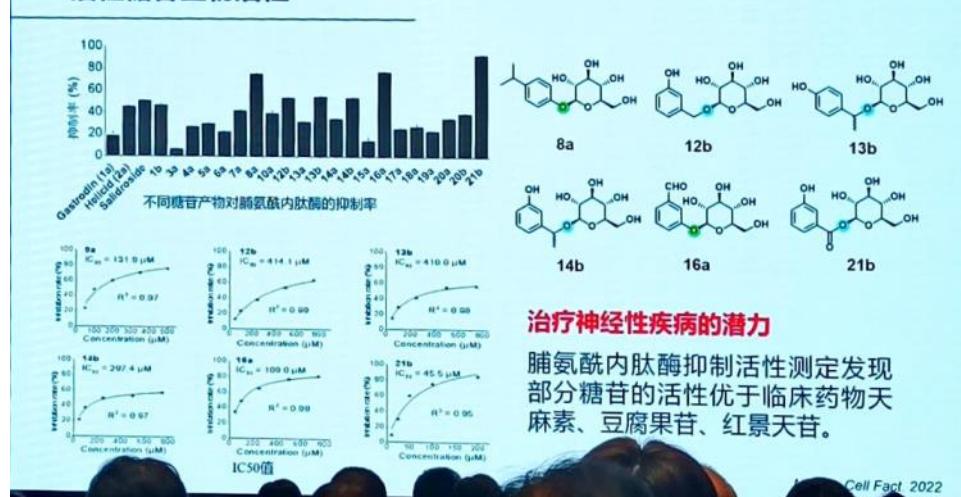
## 高特异性UGT酶和细胞工厂



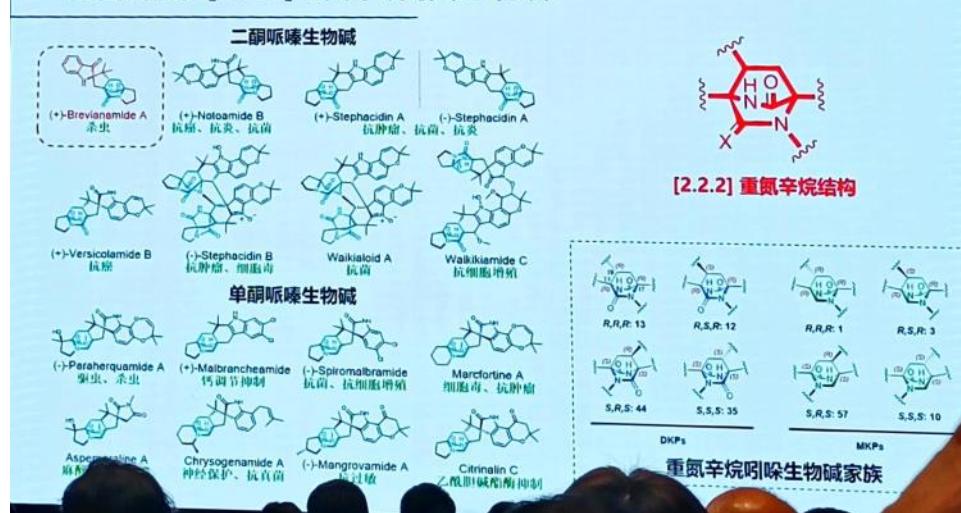
赵广荣 教授  
天津大学



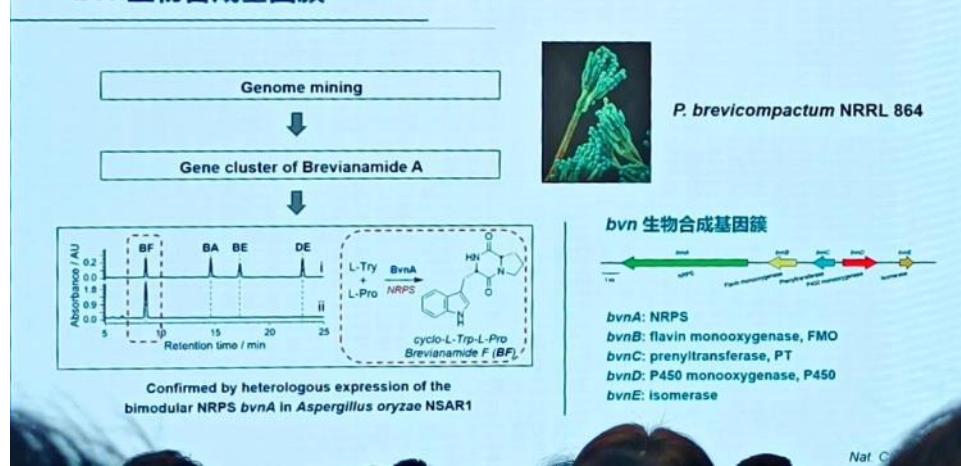
## 活性糖苷生物活性



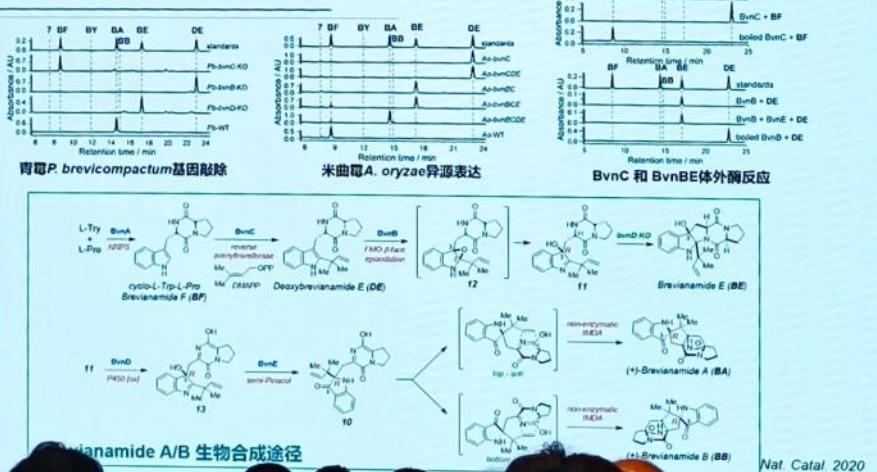
## 真菌代表性[2.2.2]重氮辛烷吲哚生物碱



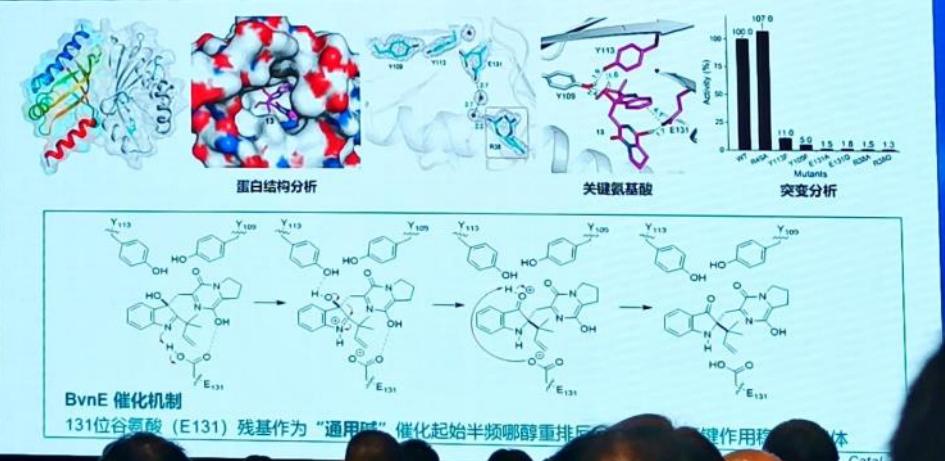
## bvn生物合成基因簇



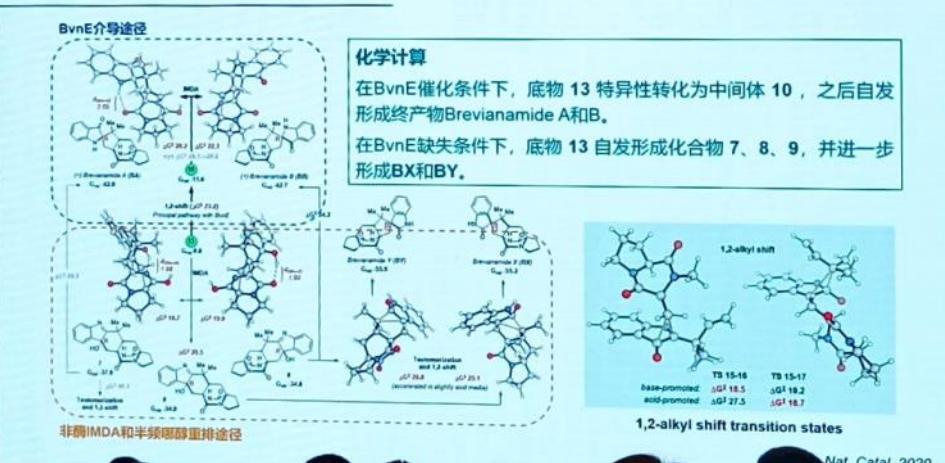
## bvn生物合成途径



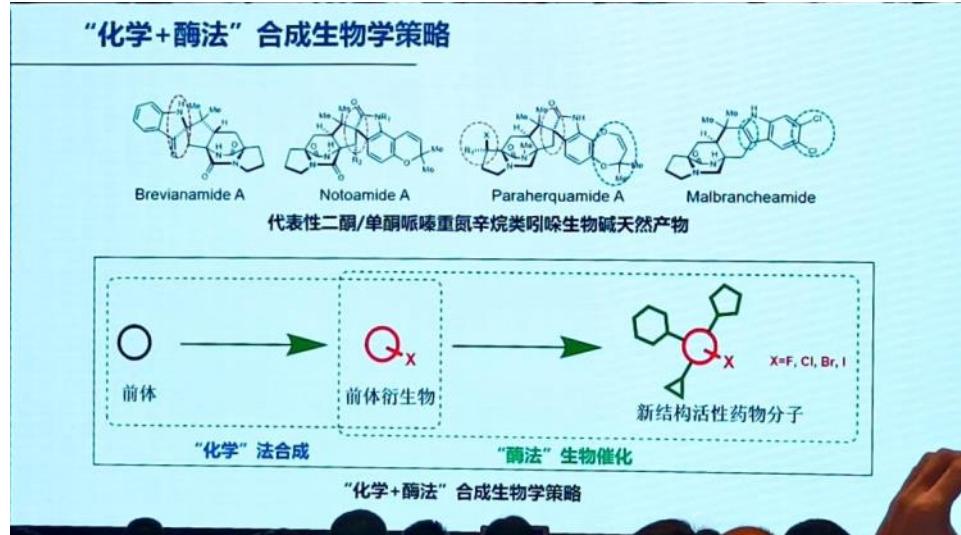
## 关键异构酶BvnE的催化机理



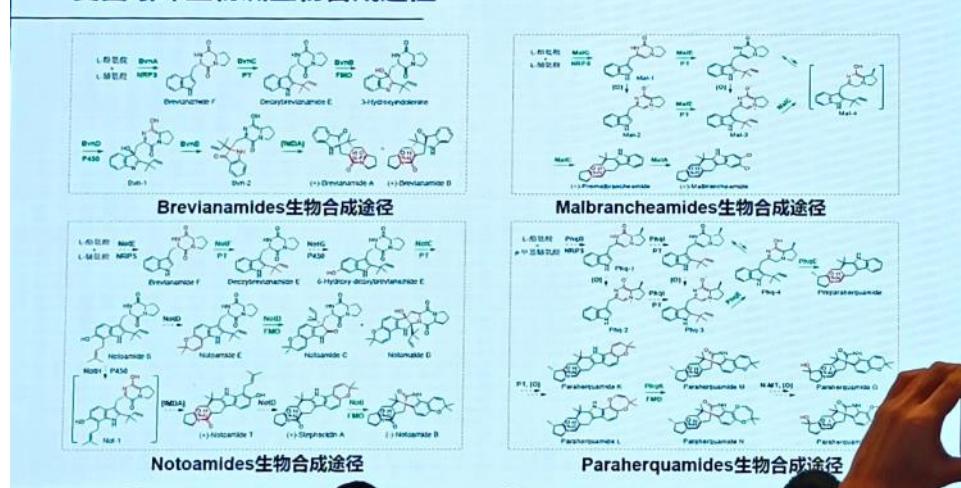
## 量子化学计算



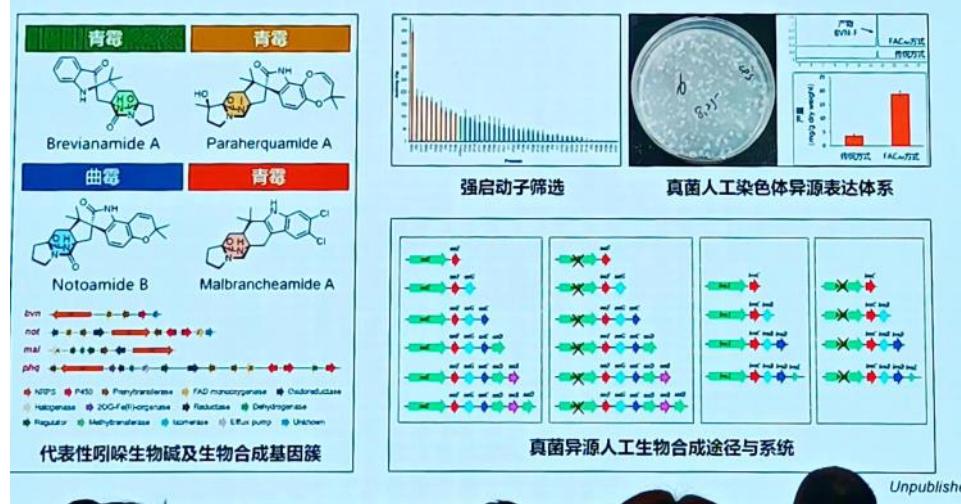
## “化学+酶法”合成生物学策略



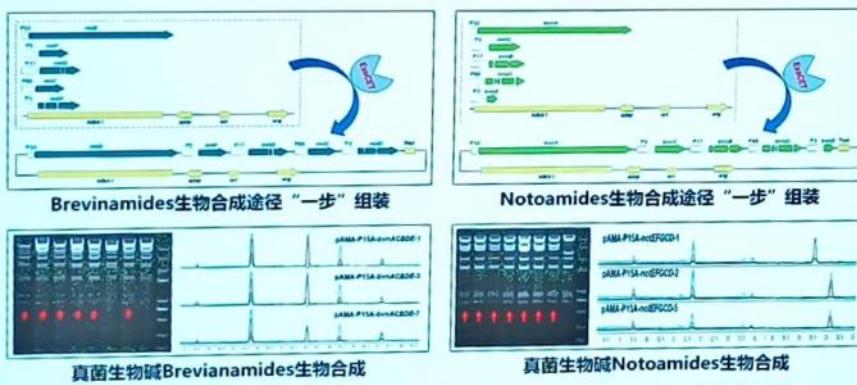
## 真菌吲哚生物碱生物合成途径



## 生物合成途径异源重构



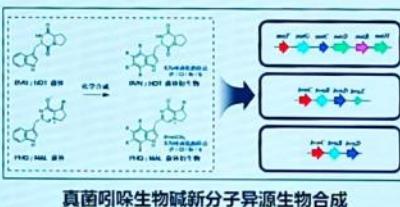
## 多片段DNA重组技术



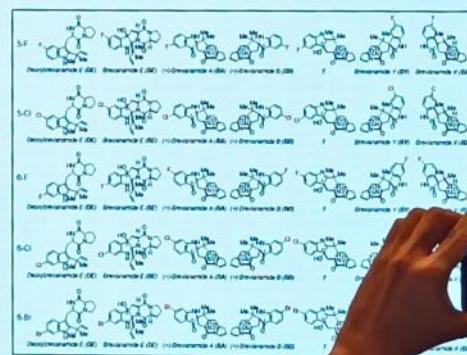
基于“RecET”的多片段DNA重组技术，实现5-10片段“一步”快速组装。

Unpublished

## 真菌吲哚生物碱多样化结构生物合成



通过“化学-酶法”合成策略，快速实现真菌吲哚生物碱新结构创造。



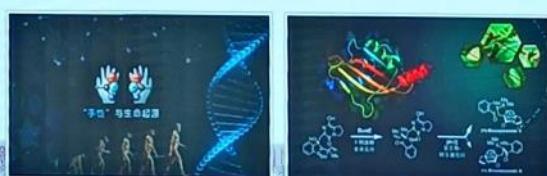
真菌吲哚生物碱结构多样化

Unpublished

## 真菌吲哚生物碱成果展出

### 全国十三五科技创新成就展

该成果作为山东大学代表性成果入选“全国十三五科技创新成就展”，在北京展览馆进行了展示。



现场展

## P450酶



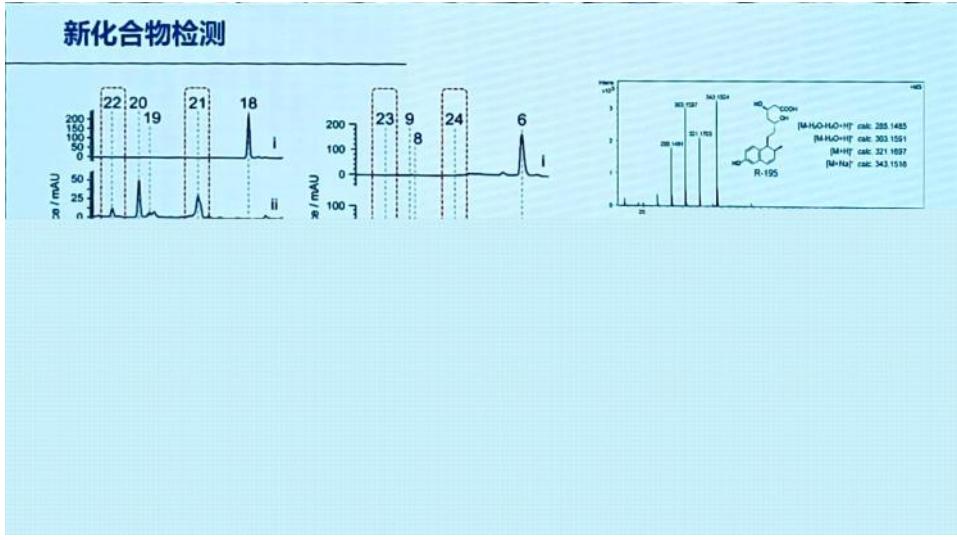
## 代表性药物和还原伴侣

Classification

- plant-like (2Fe-2S)
- bacterial-type (2Fe-2S)
- Adh-like (2Fe-2S)
- cytochrome (2Fe-2S)
- plant-like (2Fe-2S)
- vertebrate-type (2Fe-2S)
- cytochrome-like (2Fe-2S)
- (1-4Fe-4S)
- (4Fe-4S), (3-4Fe-4S)
- ZnFinger proteins (2Fe-2S)

Streptomyces coelicolor A3(2)	Sarcina elongatus PCC 7942	Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
ScfFdR117 ScfFdR2649 ScfFdR2106 ScfFdR0081	SeFdR028 SeFdR7110 SeFdR3135 SeFdR3764 SeFdR0772 SeFdR3687 SeFdR1649	CgFdR0525 CgFdR2658 CgFdR2719
SeFdR0338 SeFdR1499 SeFdR2581 SeFdR3698 SeFdR0814 SeFdR0345 SeFdR1749		

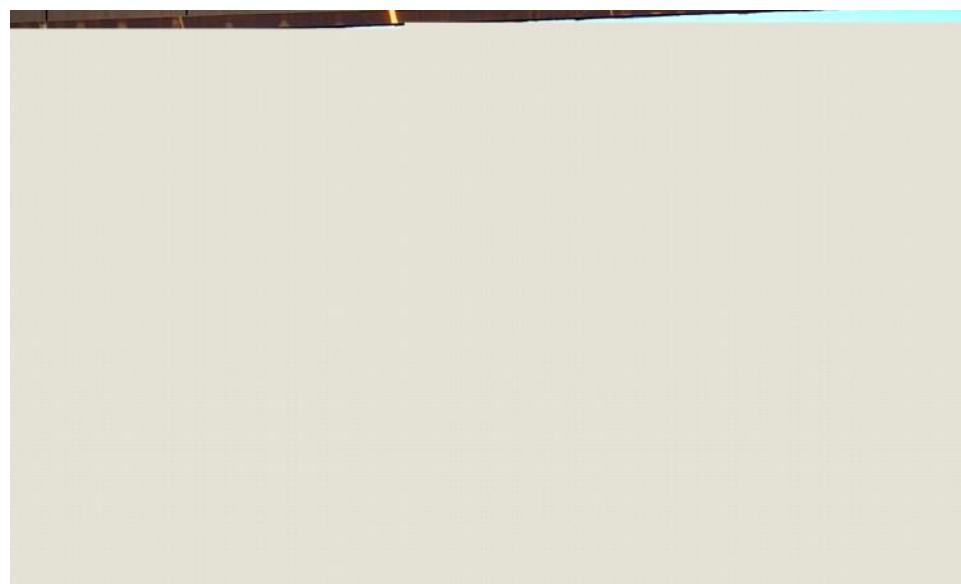
## 新化合物检测



## P450酶与还原伴侣识别机制



## P450酶与还原伴侣识别机制



# 第十四届-4-崔颖璐

2023年8月19日 11:32

**Enzyme** 酶的发现、理解与应用

Enzyme engineering

合成生物学领域人工途径构建的重要内容，也是生物技术产业实现突破的关键

The diagram shows a circular metabolic pathway for the conversion of CO<sub>2</sub> into benzyl alcohol. Key components include FDH, Formic Acid, ACS, ACDH, FLS, BAL, and DHAK. A smartphone displays a computational redesign interface for the benzaldehyde lyase enzyme.

生物酶法催化甲醛专一性聚合，实现无机碳向有机碳转化

ASAP3.0

Computational redesign of the benzaldehyde lyase

FLS

FDH

Formic Acid

ACS

ACDH

BAL

DHAK

DHAP

CO<sub>2</sub>

Benzaldehyde

Benzoin

Science 2021, 373(6562), 1523-1527  
J. Acad. Sci. U.S.A. 2015, 112(12): 3701

荷兰帝斯曼 DSM

丹麦诺维信 novozymes

德国巴斯夫 BASF

美国杜邦 DUPONT

北美+欧洲

我国进入酶制剂快速发展期

全球市场规模达百亿美元，撬动万亿元下游产业发展

亚太地区

**Enzyme** 酶工程第三波浪潮——计算设计

Enzyme engineering

ProteinGAN

基于自注意力机制的生成对抗网络

学习氨基酸之间复杂的进化依赖关系和泛化蛋白质序列空间的能力，产生高度多样化的序列

The diagram shows the ProteinGAN architecture: a template enzyme (malate dehydrogenase, MDH) is used to train a generator (G) and a discriminator (D). The generator produces diverse sequence variants, which are then evaluated by the discriminator.

Template Enzyme malate dehydrogenase (MDH)

Nat. Biotechnol. 2021, 39(3):324-333

**Enzyme** 蛋白质计算设计平台

Enzyme engineering

Active Site Redesign

底物适配器 选择性设计 活性重塑

Global Redesign

稳定性设计 可溶性表达 骨架搭建

功能构筑

The slide compares Active Site Redesign (focusing on the active site environment) and Global Redesign (focusing on the entire protein structure).



# Enzyme

Enzyme engineering

## 蛋白质计算设计平台

**Natural Enzyme Screening based on Structure-Function Relationship (NESSPER)**

**Computational Redesign of Enzyme Active Site (CRAS)**

**Greedy Accumulated strategy for Protein Engineering (GRAPE)**

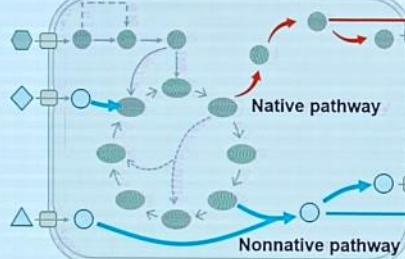
面向酶设计的应用需求，发展了多种酶计算设计工具，对微生物酶“序列-结构-功能”进行更深层次的规律解析和挖掘设计，以期利用计算优势指导微生物掘及功能设计，推动绿色生物制造的发展。



# Enzyme

Enzyme engineering

## 酶的发现、理解与应用



Improved enzyme function

Non-native enzyme function



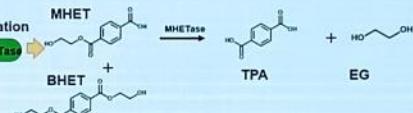
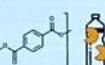
# 碳源利用

PET Biodegradation

## PET塑料生物降解现状

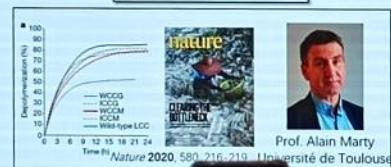
PET生物降解 芳香基团对降解酶惰性极强

已挖掘的PET降解酶不到30种

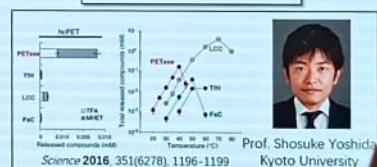


PET降解酶研究现状

Collectable PET waste



Uncollectable PET waste



我国PET饮料瓶的回收率已达94%。Carbios利用改造后的LCC降解酶对废弃物的90%降解。

进水平。2020年，Carbios利用改造后的LCC降解酶对废弃物的90%降解。

约40%的塑料废物并未得到有效处理，每年约有4.8-12.7亿吨进入海洋循环。*s*PETase在30°C下降解活性是其他PET酶的120倍。该酶稳定性极差，不能耐受。

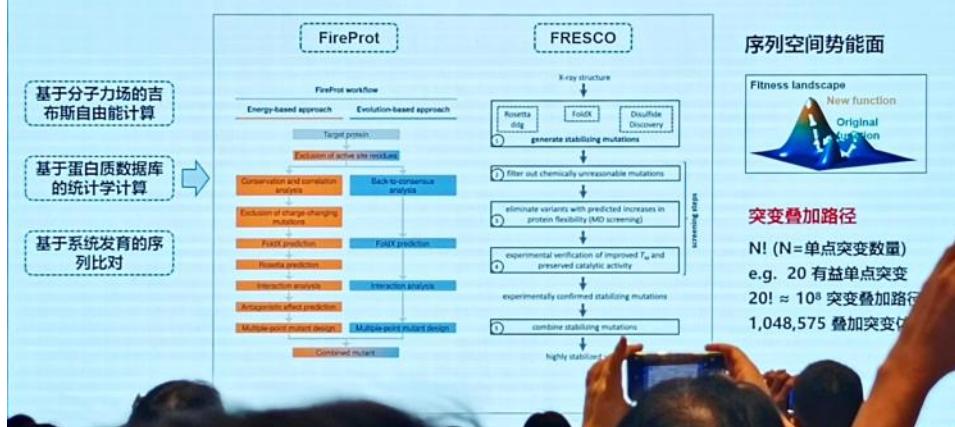


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

### 优势互补混合策略

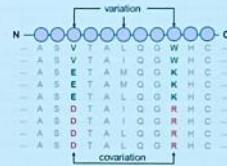
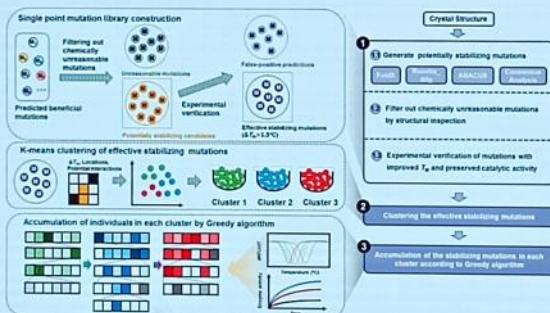


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

### Greedy Accumulated strategy for Protein Engineering, GRAPE



- 将基于空间维度能量函数的设计算法及基于时间维度序列共进化信息算法进行互补结合，显著降低单个方法的采样偏差，增强有益突变的计算预测能力
- 运用聚类算法和贪婪算法优势，大幅规避不同突变位点间的负协同效应



## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

### Step 1: 将4种计算设计方法融合，进行优势互补，建立单突变体文库

#### ABACUS

$$E_{ABACUS}(r_1, r_2, \dots, r_L) = \sum_{i=1}^L E_i(r_i) + \sum_{i=1}^L \sum_{j \neq i} w(i, j) E_{ij}(r_i, r_j)$$

Potential mutations 85

#### FoldX

$$\Delta G_{FoldX} = \Delta G_{pol} + \Delta G_{sterif} + \Delta G_{saltP} + \Delta G_{hydro} + \Delta G_{ewp} + \Delta G_{ewb} + \Delta G_{ref} + \Delta S_{ref}$$

Potential mutations 63

#### Rosetta\_ddg

$$E_{Rosetta} = W_{pol}E_{pol} + W_{ster}E_{ster} + W_{ewp}E_{ewp} + W_{ewb}E_{ewb} + W_{salt}E_{salt} - E_{ref}$$

Potential mutations 65

#### MSA Analysis

$$H(S) = \sum_{i=1}^L h_i(s_i) + \sum_{i=1}^L \sum_{j \neq i} f_{ij}(s_i, s_j)$$

Potential mutations 54

Mutations for experiment 85

Effective stabilizing mutations 21

$\Delta T_m \geq 1.5^\circ\text{C}$



## 碳源利用

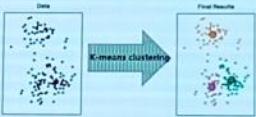
PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

Step 2: 将单突变文库进行分类，进一步降低数据维度

$$\arg \min \sum_{i=1}^k \sum_{x \in S_i} \|x - \mu_i\|^2$$

Parameters  
 $\Delta T_m$  Locations, Potential interactions



Residue number	$\Delta T_m$	Interaction cluster	Region	Distance	Hbonds	Hydrophobic interactions	Entropy change	Binding Region	Cluster
S214H	9	0	1	9.624	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	1
W156H	8.5	1	1	3.808	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	1
I168R	7.5	2	1	12.547	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	1
D186H	7	0	1	7.999	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	1
P189H	0	1	1	7.776	FALSE	TRUE	TRUE	FALSE	2
Q190H	3	1	10.122	FALSE	TRUE	FALSE	TRUE	2	2
L191H	3	1	12.124	FALSE	TRUE	FALSE	TRUE	2	2
S192H	3	1	11.221	FALSE	TRUE	TRUE	FALSE	TRUE	2
N193H	0	1	14.243	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	2
A194H	0	2	21.094	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	1
K195H	0	2	14.793	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	1
T196H	0	3	32.494	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	3
K197H	0	3	29.81	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	3
S198H	4	1	9.651	FALSE	TRUE	TRUE	FALSE	TRUE	2
A199H	0	3	30.218	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	2
K200H	4	1	8.546	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	3
T201H	0	1	11.718	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	2
M202H	2	1	12.984	TRUE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	2
A203H	0	1	8.694	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	2
K204H	1	1	9.045	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	2
				20.624	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	2

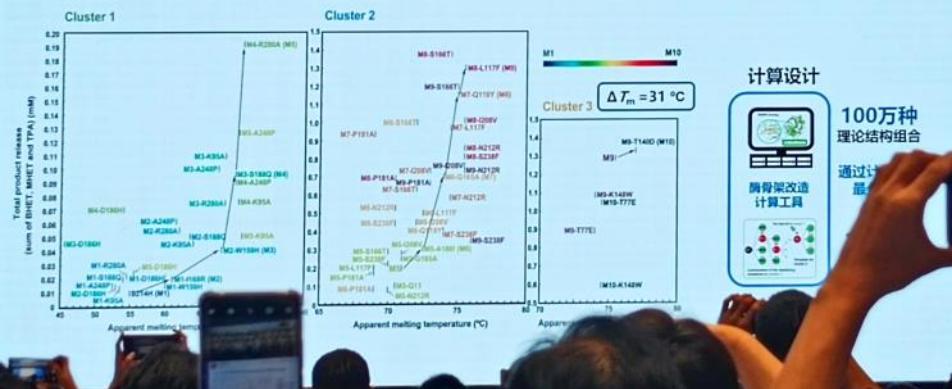


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

Step 3: 利用贪心算法将所求问题的整体最优解分散为局部最优的选择累积



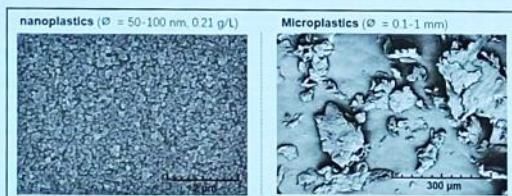


## 碳源利用

PET Biodegradation

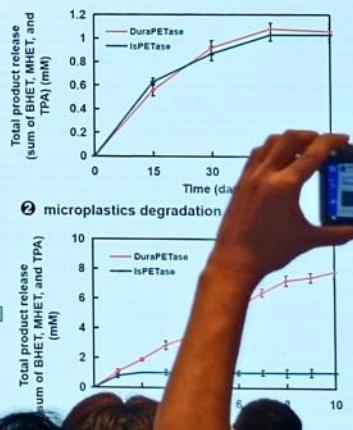
## 针对/sPETase 的功能改造研究

约40%的塑料废物并未得到有效处理，每年约有4.8-12.7吨塑料进入海洋循环  
微塑料能见度低，极难识别和收集，对海洋环境的污染持续增加，对于微塑料的处理仍是目前塑料治理的难点之一

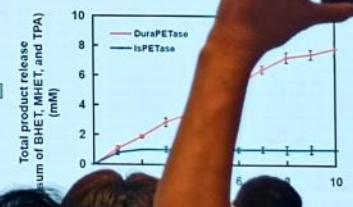


实现2 g/L微塑料(约为污水中微塑料浓度的100倍)在温和条件下的完全降解，为废水中小塑料的预处理提供新的处理思路

### ① nanoplastics degradation



### ② microplastics degradation

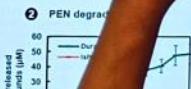
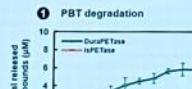
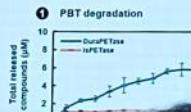
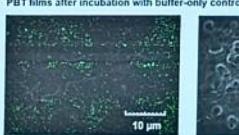
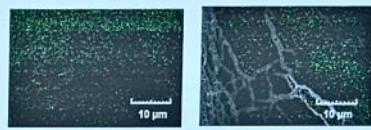
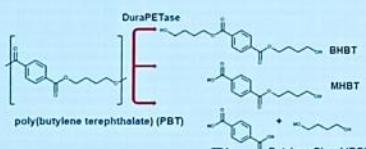


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研究

### 潜在的广谱的芳香聚合物降解酶

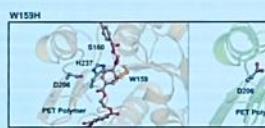


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对/sPETase 的功能改造研

### 排除负协同相互作用，增强氨基酸之间可能存在的协同相互作用



W159H 通过氢键重构活性位点



I168R-S168Q 新的氢键&盐桥相互作用



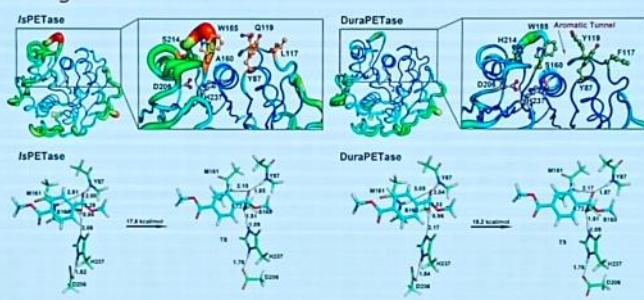
S214H-L117F-Q119Y 形成芳香通道，修饰活性位点，通过π-π堆积作用，增强氨基酸之间可能存在的协同相互作用



## 碳源利用

### PET Biodegradation

### 针对/sPETase 的功能改造研究



- DuraPETase Ser160对PET酯键亲核进攻形成四面体过渡态的活化能并没有显著降低
- DuraPETase与IsPETase在本质上并没有提升催化活性
- 协同的物理吸附作用在增强了稳定性的同时，增强酶活性位点与底物的接触，同时附着在酶表面避免了酶表面无效的吸附作用



## 碳源利用

### PET Biodegradation

### 针对/sPETase 的功能改造研究

**作为Top Paper被ESI收录**

Uwe T. Bornscheuer  
德国格拉茨瓦尔德大学生物技术与酶催化系主任

Beom Soo Kim  
韩国忠北大学教授  
聚合物生物降解专家

“人工改造酶与计算算方法结合，为PET的循环再利用，为塑料废弃物的资源化利用提供了新途径”

“近16年以来PET降解酶改造领域的里程碑工作之一”

“人工改造酶与计算算方法结合，为PET的循环再利用，为塑料废弃物的资源化利用提供了新途径”

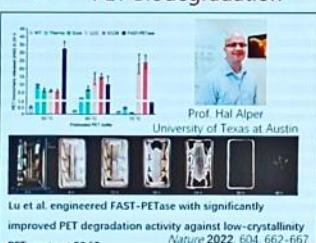
“人工改造酶与计算算方法结合，为PET的循环再利用，为塑料废弃物的资源化利用提供了新途径”



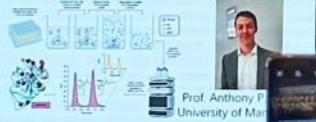
## 碳源利用

### PET Biodegradation

### 兼顾稳定性与降解活性的新功能酶

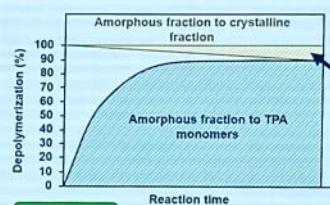


Lu et al. engineered FAST-PETase with significantly improved PET degradation activity against low-crystallinity PET waste at 50 °C.



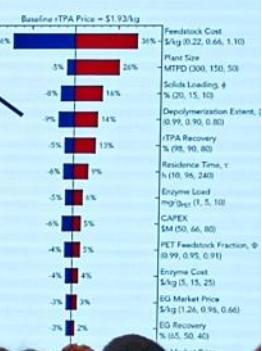
Bell et al. employed a dry-milling recycling process to afford a HotPETase variant at 50 °C.

#### challenges



#### solution

- Physical aging process → Decrease the reaction temperature
- Enhance the enzyme loading
- New enzymes with balance thermostability and high efficiency





## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造研究

蛋白质语言模型 Transformer model

捕获蛋白质变体在进化过程中的功能趋异节点



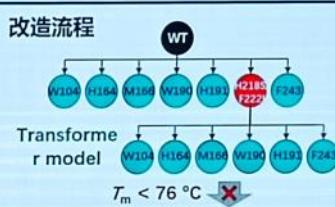
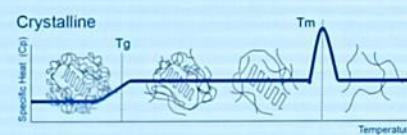
## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造

延缓塑料老化速率 & 提升酶降解效率

功能改造 & 骨架设计



$T_m < 76^\circ\text{C}$



## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造研究

稳定性与活性协同提升 黑箱 & 白箱

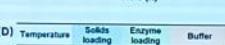
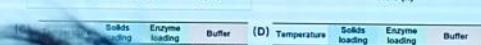
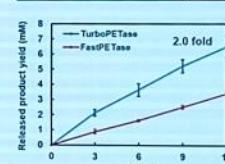
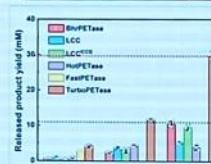
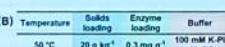
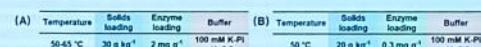
TurboPETase ( $T_m = 84^\circ\text{C}$ )

解聚活性是野生型的4.4倍 ( $65^\circ\text{C}$ )

LCC<sup>45G</sup> (*Nature* 2020)

FastPETase (*Nature* 2022)

HotPETase (*Nat Catal* 2022)



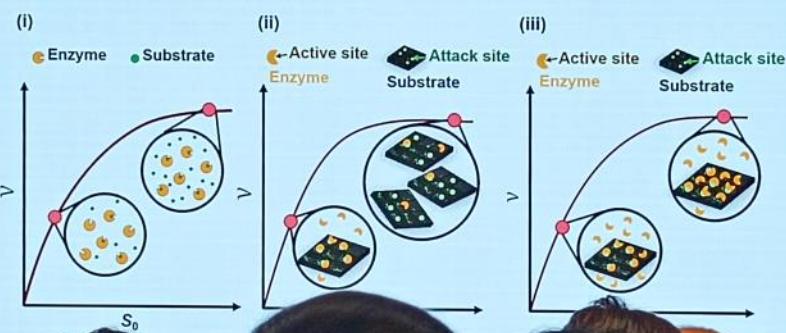


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造研究

TurboPETase性能提升的机制解析 非均相体系催化特征 (反米氏方程)

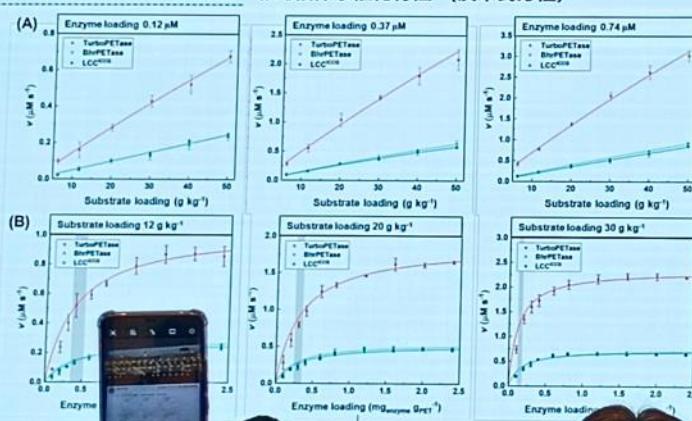


## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造研究

PETase性能提升的机制解析 非均相体系催化特征 (反米氏方程)



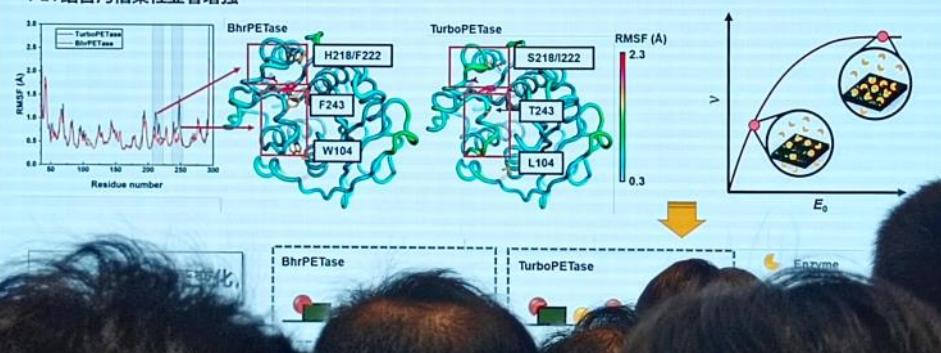
## 碳源利用

PET Biodegradation

## 针对BhrPETase 的功能改造研究

TurboPETase性能提升的机制解析

PET结合沟槽柔韧性显著增强

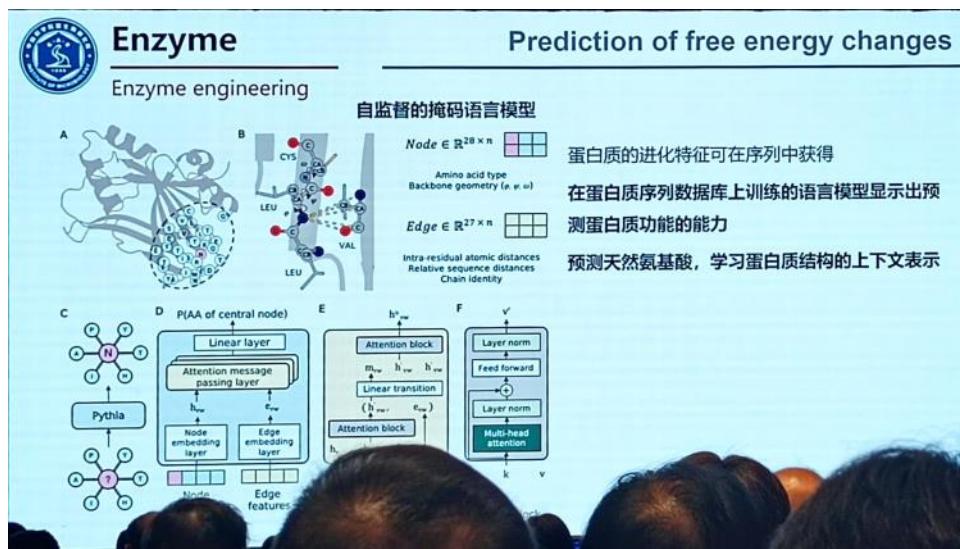




## Enzyme

### Enzyme engineering

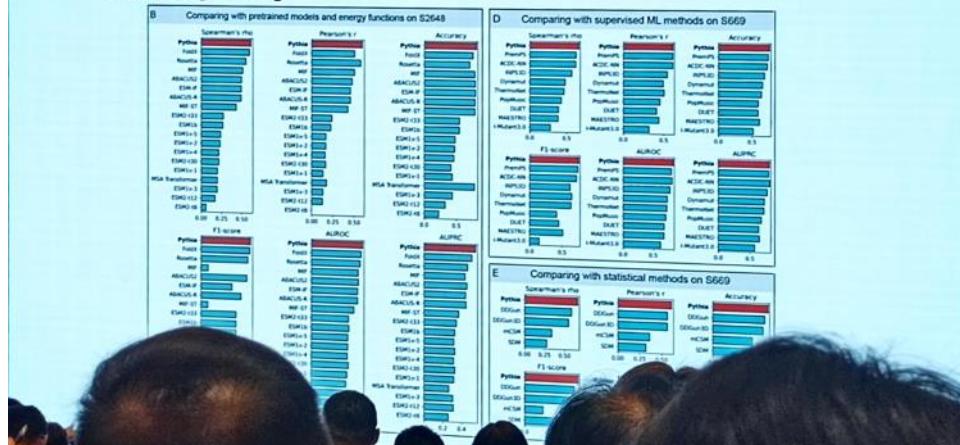
### Prediction of free energy changes



## Enzyme

### Enzyme engineering

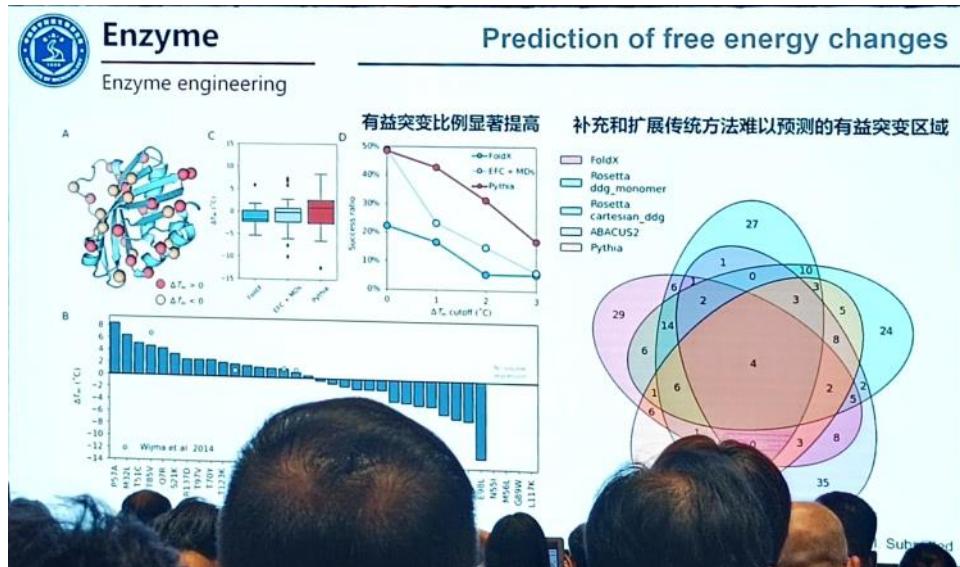
### Prediction of free energy changes



## Enzyme

### Enzyme engineering

### Prediction of free energy changes





## Enzyme

Enzyme engineering

## Prediction of free energy changes

<https://pythia.wulab.xyz>

Inference speed on a single CPU core

Method	Number of mutations per minute
Pythia	~ 50,000
FoldX	~ 1
Rosetta	~ 10
MIF	~ 55
BACUS2	~ 15
ESM-IF	~ 80

Pythia self-supervised prediction of protein functional effects  
Drop and drag file  
Load protein.pdb  
Download file  
User note  
Test note  
Download data as CSV

Pythia energy for each mutation at selected position

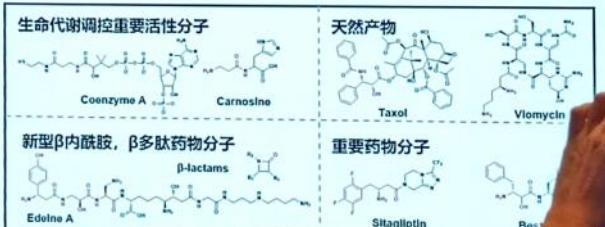
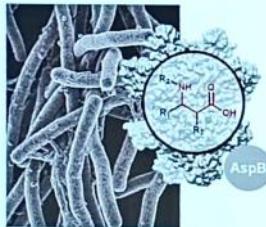


## 氮源利用

versatile C-N lyase platform

## 天冬氨酸裂解酶功能重塑

$\beta$ -amino acids: versatile building blocks for bioactive compounds



通过催化生成富马酸参与三羧酸循环，是微生物氮代谢的重要环节，具备同化无机氨的巨大潜力

催化的不对称氢胺化反应具备极高的原子经济性，为合成非天然氨基酸的最优途径

已知底物特异性最高的酶之一，自上世纪三十年代以来，仅有寥寥数种氢胺化酶被发现。由于功能呈高度专一性，活性位点序列保守程度极高，无法依靠进化信息进行改造，酶分子功能重塑面临突破。



## 氮源利用

versatile C-N lyase platform

## 天冬氨酸裂解酶功能重塑

Challenges: Expanding both electrophile and nucleophile scope simultaneously

No example

双口袋耦合突变瓶颈：

- 为了确保在结合和催化过程中获得合适的构型，羧酸底物和氨底物都需要精确的构象匹配；
- 百万突变组合，传统方法难以高效地对其进行筛选；
- 关键氨基酸位于高度柔性loop区，结合和催化过程中可能发生构象变化带来额外复杂性

Expanded electrophile scope

Li et al. 2018 *Nature Chem Biol*

Raj et al. 2012 *Nature Chem*

Weese et al. 2015 *J Am Chem Soc*

Ahmed et al. 2018 *ACS Chem Int Ed*

Expanded nucleophile scope

Raj et al. 2012 *Nature Chem*

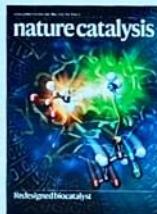
EDDS lyase variant

Chen et al. 2018 *Chem Int Ed*



## 氮源利用

versatile C-N lyase platform



*Nat Catal* 2021, 4, 364–373



Christopher K. Prier  
默克制药集团研究员



在 *Nature Catal.* 发表评论观点：  
“精彩的计算设计与实验协同运用的酶工程案例”  
“该项工作推动了计算设计在重塑酶活性中心方向的发展进程，实现了过去无法完成的非天然反应”

## 天冬氨酸裂解酶功能重塑

Frances H. Arnold  
2018年诺贝尔奖得主



在 *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 发表的综述中评价：  
“计算工具与实验方法的紧密结合能有效地推动蛋白质工程的快速发展”

made it difficult to create more general catalysts. The combination of computational tools and directed evolution methodologies has proven effective in accelerating protein engineering campaigns. Wu and coworkers used a structure-based computational enzyme design to engineer an ammonia-lyase from *Bacillus* sp. YM551, AspB, to accept acrylate electrophiles and amine nucleophiles (Figure 2b) [28,29]. Reshaping the enzyme's

28 Cui Y, Wang Y, Tian W, Bu Y, Li T, Cui X, Zhu T, Li R, Wu B. Development of a versatile and efficient C–N lyase platform for asymmetric hydroamination via computational enzyme redesign. *Nat Catal* 2021, 4 364–373.  
29 Cui Y, Wang Y, Tian W, Bu Y, Li T, Cui X, Zhu T, Li R, Wu B. Directed evolution of a C–N lyase combined with directed evolution have achieved considerable success recently. The authors engineered an ammonia lyase to catalyze the formal hydroamination of

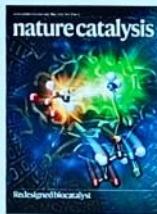
*Nature Catal.* 2021, 4, 348–349

*CheM* 2021, 8, 100701



## 氮源利用

versatile C-N lyase platform



*Nat Catal* 2021, 4, 364–373



Christopher K. Prier  
默克制药集团研究员



在 *Nature Catal.* 发表评论观点：  
“精彩的计算设计与实验协同运用的酶工程案例”  
“该项工作推动了计算设计在重塑酶活性中心方向的发展进程，实现了过去无法完成的非天然反应”

## 天冬氨酸裂解酶功能重塑

Frances H. Arnold  
2018年诺贝尔奖得主



在 *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 发表的综述中评价：  
“计算工具与实验方法的紧密结合能有效地推动蛋白质工程的快速发展”

made it difficult to create more general catalysts. The combination of computational tools and directed evolution methodologies has proven effective in accelerating protein engineering campaigns. Wu and coworkers used a structure-based computational enzyme design to engineer an ammonia-lyase from *Bacillus* sp. YM551, AspB, to accept acrylate electrophiles and amine nucleophiles (Figure 2b) [28,29]. Reshaping the enzyme's

28 Cui Y, Wang Y, Tian W, Bu Y, Li T, Cui X, Zhu T, Li R, Wu B. Development of a versatile and efficient C–N lyase platform for asymmetric hydroamination via computational enzyme redesign. *Nat Catal* 2021, 4 364–373.  
29 Cui Y, Wang Y, Tian W, Bu Y, Li T, Cui X, Zhu T, Li R, Wu B. Directed evolution of a C–N lyase combined with directed evolution have achieved considerable success recently. The authors engineered an ammonia lyase to catalyze the formal hydroamination of

*Nature Catal.* 2021, 4, 348–349

*CheM* 2021, 8, 100701



## Acknowledgement

依托微生物大数据资源，发挥计算设计的核心优势，实现“量体制酶”，进一步扩展微生物物质转化的空间



Prof. Bian Wu



北京市自然科学基金委



IESC

依托微生物大数据资源，发挥计算设计的核心优势，实现“量体制酶”，进一步扩展微生物物质转化的空间

Prof. Bian Wu

北京市自然科学基金委

# 第十四届-5-朱蕾蕾

2023年8月19日 11:53

## 研究内容

定向改造创制高效酶元件

开发高通量筛选方法      发展结构特异性改造策略

借助流式细胞仪和液滴微流控，高效筛选突变库，探索蛋白序列多样性空间

优化活性中心次层loop区，提升酶活性  
改造表面氨基酸，提高酶蛋白稳定性

设计构建化学酶法新路径

基于酶促反应和化学反应原理，设计高原子经济性的化学酶法路径，助力绿色制造

S → E<sub>1</sub> → E<sub>2</sub> → ... → E<sub>n</sub> → P      S → E<sub>1</sub> → E<sub>2</sub> → C<sub>1</sub> → P

- 聚焦蛋白质工程和绿色催化体系，利用定向进化、计算模拟等分子改造技术创制高性能的工业酶和蛋白质。
- 发展高原子经济性绿色催化路线，进行化学品的绿色生物制造。

## 工作一：构建高通量筛选体系

发展液滴微流控高通量筛选技术  
对目标酶进行定向进化

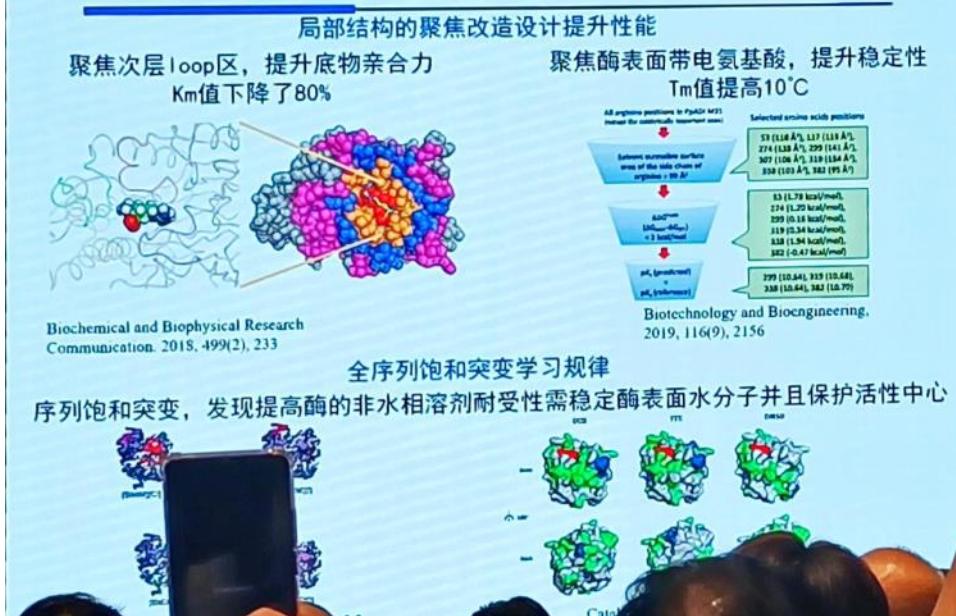
筛选活性：室温、60°C 0.5 h、60°C 1 h  
筛选稳定性：富集率：13倍，分选速率：10<sup>4</sup>/h，可筛选活性和稳定性

探索蛋白结构序列空间  
学习自然进化规律

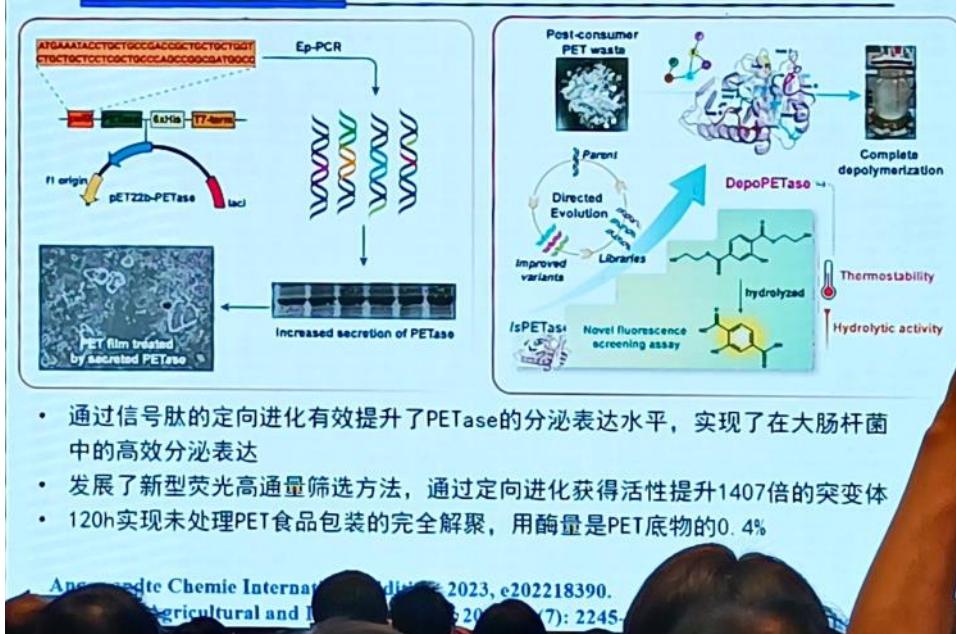
热稳定性大幅提升

Temperature (°C)	Residual activity (%)
54	~55
58	~20倍
60	~15
62	~10
64	~5

## 工作二：发展基于结构的改造策略



## 工作三：酶改造案例-PET解聚酶



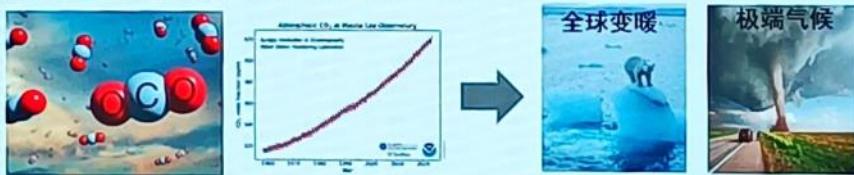
## 一碳化合物的生物转化及关键碳链延长酶



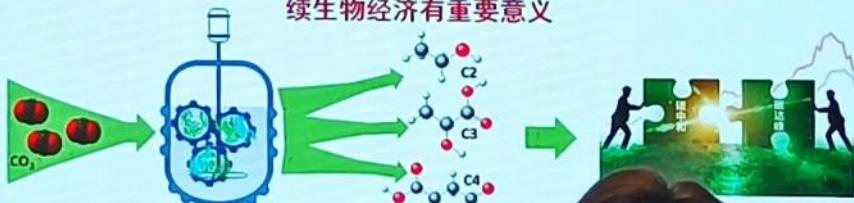


## 研究背景与意义

2020年9月中国明确提出2030年“碳达峰”与2060年“碳中和”目标，控制二氧化碳排放总量，发展碳利用技术，实现碳循环平衡



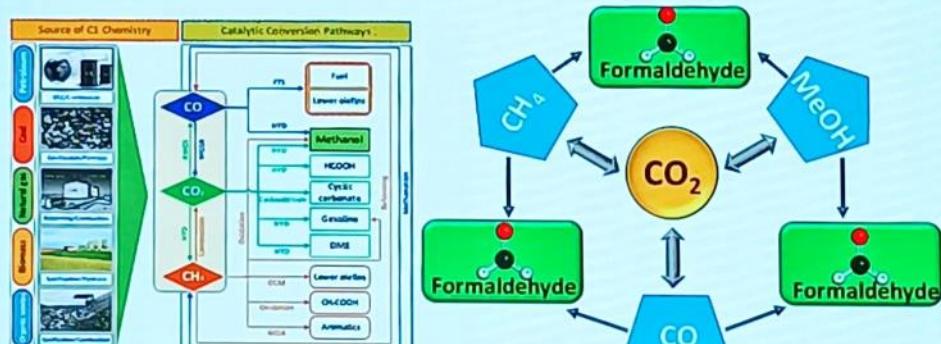
CO<sub>2</sub>等一碳化合物的转化利用对推动实现碳中和目标和发展可持续生物经济有重要意义



## 一碳化合物

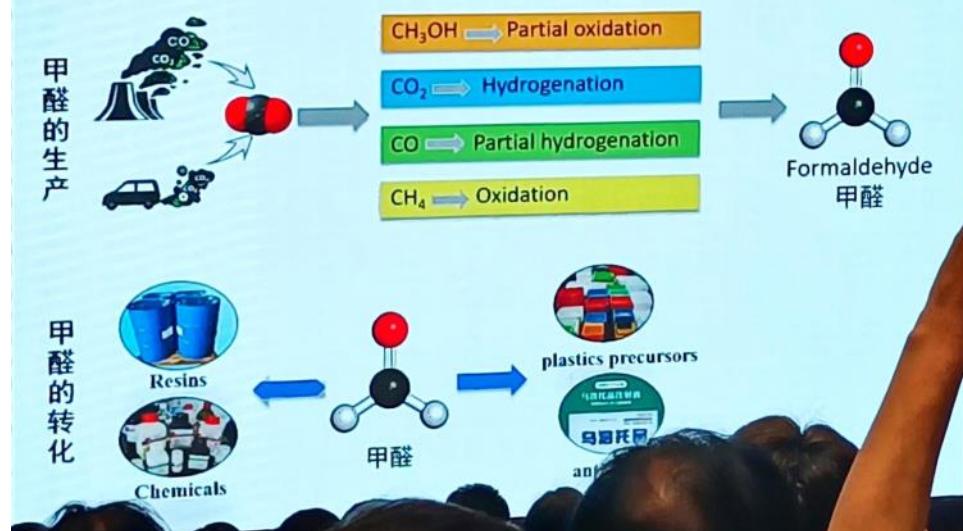
分子中含有一个碳原子的化合物，以CO<sub>2</sub>、CO、CH<sub>4</sub>、甲醇、甲醛、甲酸等为主

- 是非常具有吸引力的原料，有潜力维持每年数亿吨的燃料和化学品的生产
- 一碳化合物的资源化利用有利于摆脱对石油资源的依赖和发展可持续生物经济



## 甲醛

- 全球每年生产超过2000万吨，大宗、廉价
- 一种重要的平台化合物，在50多个行业都有应用



## 酶催化C-C键的形成

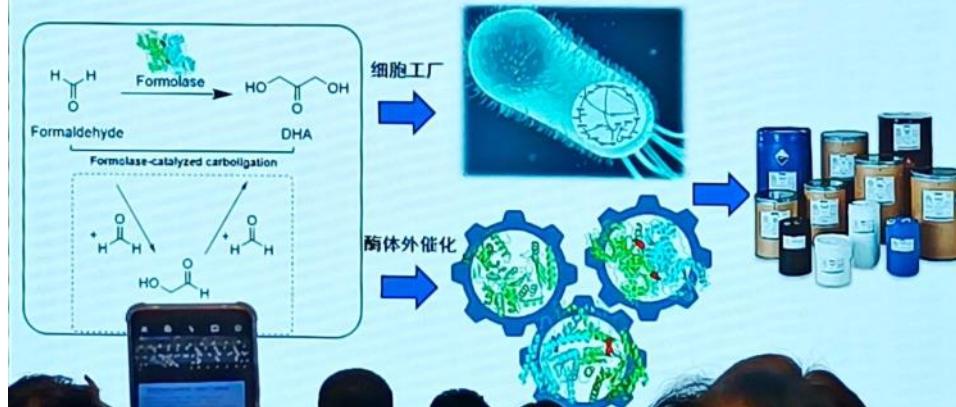
- C-C键是构筑大部分有机分子骨架的最基本结构，是化合物合成的基础
- 通过酶催化实现C1化合物甲醛的C-C链延长对化合物的可持续合成具有重要的前景

酶催化甲醛的碳链延长反应

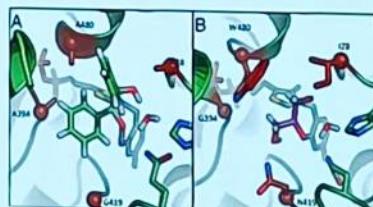
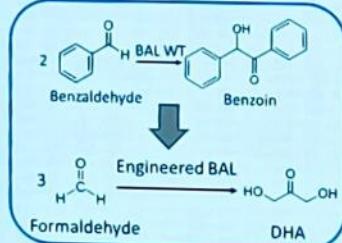
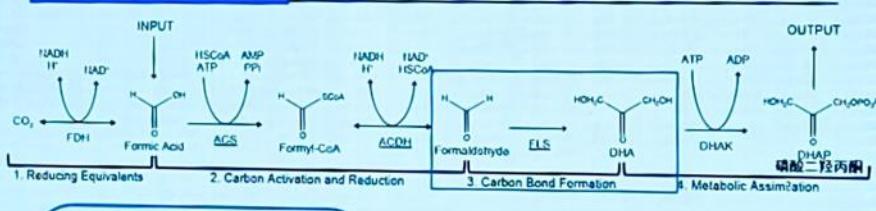


## 甲醛裂合酶催化以甲醛为唯一底物的C-C成键反应

- 甲醛裂合酶Formolase催化甲醛的C-C成键反应，是重要的C链延长酶
- 以甲醛为唯一底物生成C2产物羟基乙醛和C3产物1,3-二羟基丙酮
- 羟基乙醛和1,3-二羟基丙酮可，可通过体外酶催化或胞内代谢进行化学品的合成



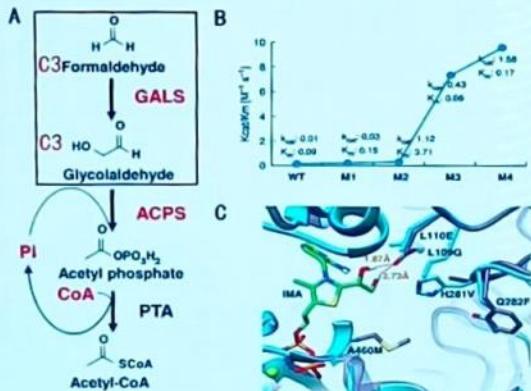
## 甲醛裂合酶Formolase



- 计算机设计甲醛裂合酶BAL, 催化甲醛生成C3产物1,3-二羟基丙酮
- 反应效率提高100倍

Enzyme	Catalytic efficiency, M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	
	Benzoin reaction	Formose reaction
BAL	1.8 × 10 <sup>2</sup> ± 1.1 × 10 <sup>2</sup>	5.0 × 10 <sup>-3</sup> ± 4.0 × 10 <sup>-3</sup>
FLS	n.d.a.	4.7 ± 0.1

## 甲醛裂合酶Formolase

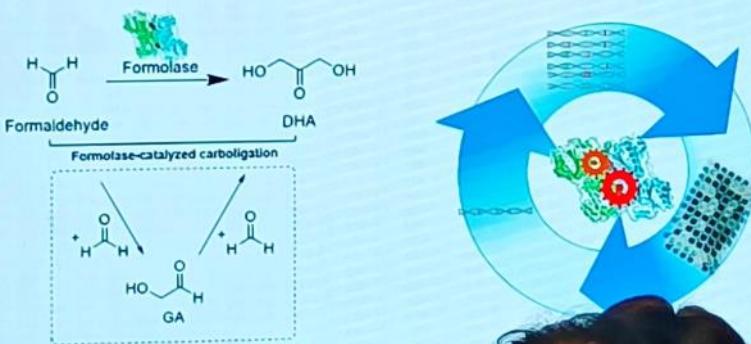


- 通过计算机辅助设计改造苯乙酮酸脱羧酶催化甲醛缩合生成C2产物羟基乙醛
- GALS活性提高了70倍以上

Environ. Biotechnol. 2011, 3(1):1378.

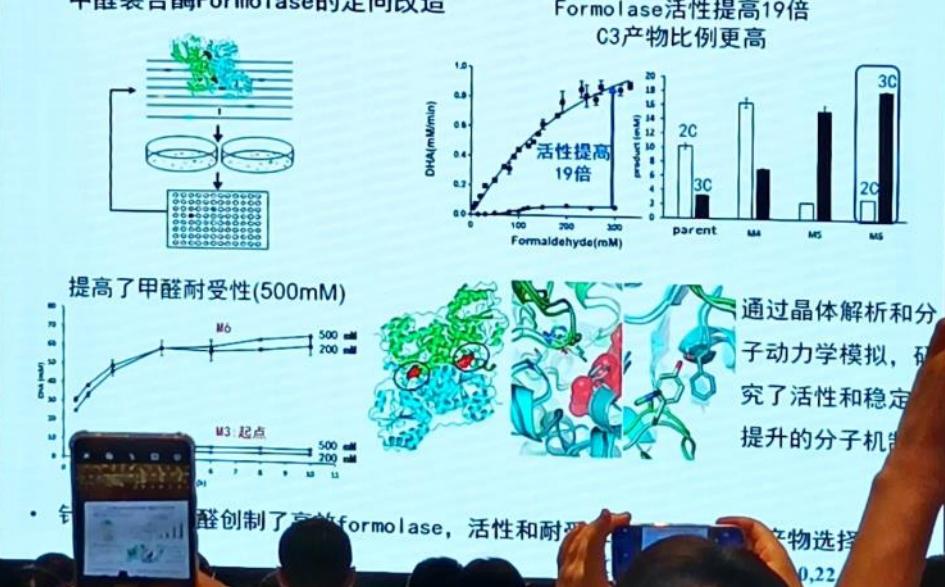
## 甲醛裂合酶Formolase

- 针对甲醛裂合酶对高浓度甲醛活性和耐受性差的问题，通过定向分子改造提高了甲醛裂合酶BFD在高浓度甲醛条件下的催化效率
- 针对甲醛裂合酶底物亲合力差的问题，通过定向分子改造甲醛裂合酶提高了甲醛裂合酶BAL在低浓度甲醛条件下的催化效率



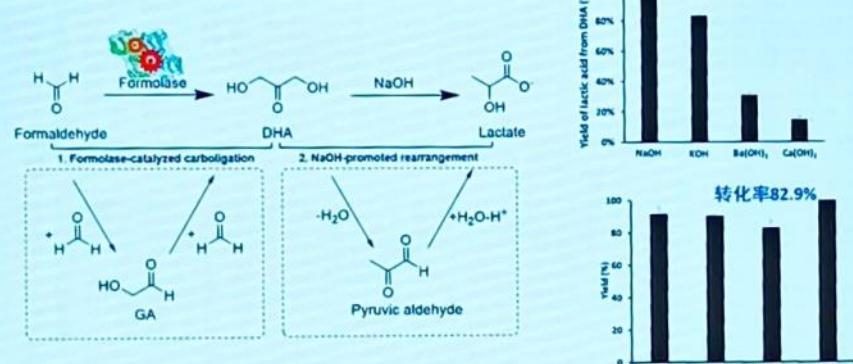
## 工作一：化学酶法转化甲醛为乳酸-酶催化元件层面

甲醛裂合酶Formolase的定向改造



## 工作一：化学酶法转化甲醛为乳酸-转化路径层面

设计构建化学酶法转化甲醛到乳酸（仅两步）

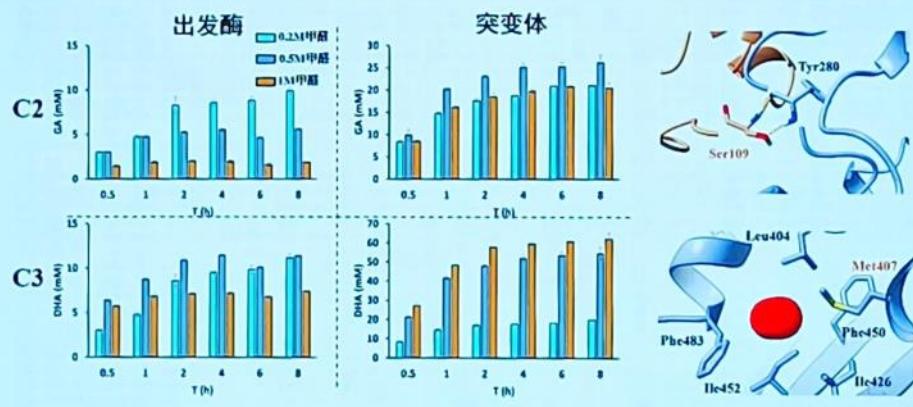


- 设计构建化学酶法两步转化甲醛为乳酸的路径，原子经济性100%
- 为一碳化合物转化利用提供了新思路

Gree... 0,22,6809-6814

## 工作二：化学酶法转化甲醛为乙醇酸-酶催化元件层面

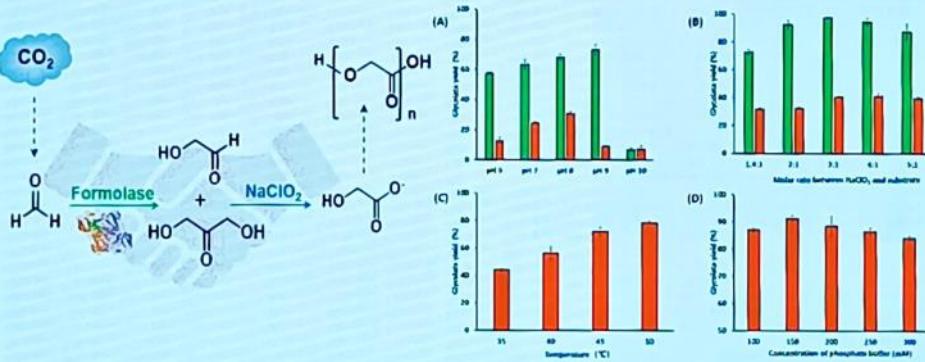
### 酶催化剂的创制和机制解析



- 将碳碳缩合关键酶元件的甲醛耐受性提升至可耐受1M甲醛
- 通过分子动力学模拟解析了突变体的结构功能关系

## 工作二：化学酶法转化甲醛为乙醇酸-转化路径层面

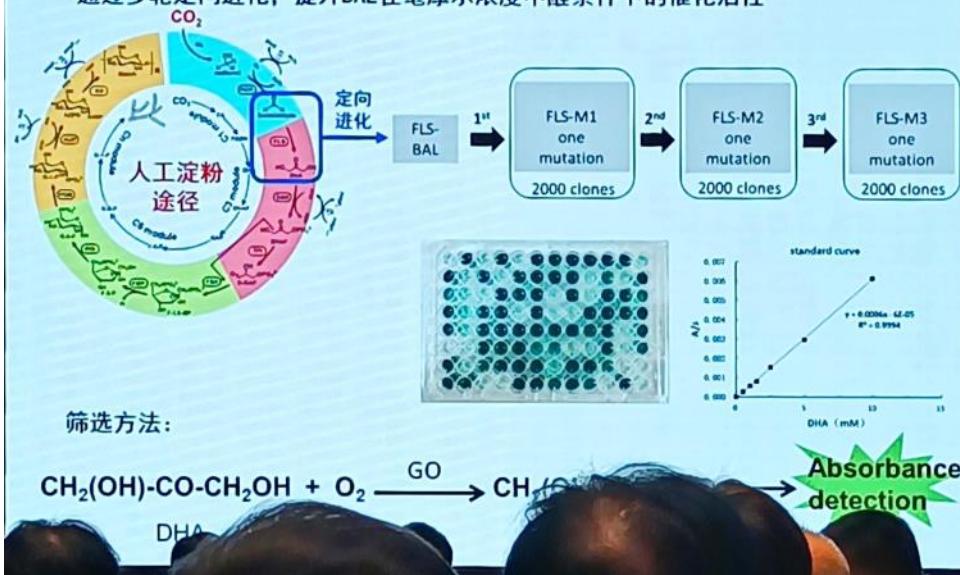
### 设计构建化学酶法转化甲醛到乙醇酸（仅两步）



- 设计了以一锅两步的方式通过化学酶法将甲醛转化为乙醇酸的新路径
- 为一碳化合物的催化利用提供了新路径

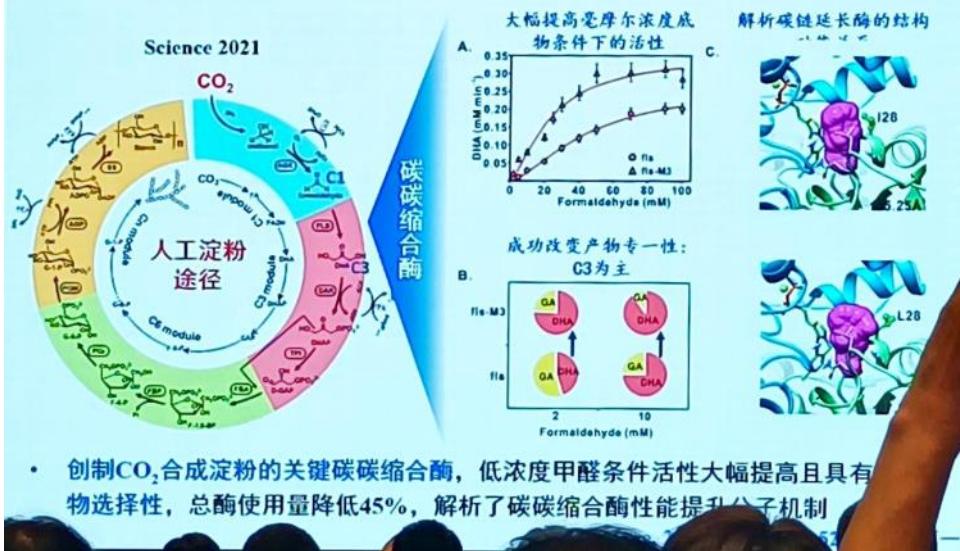
### 工作三：创制CO<sub>2</sub>合成淀粉的甲醛裂合酶BAL

通过多轮定向进化，提升BAL在毫摩尔浓度甲醛条件下的催化活性



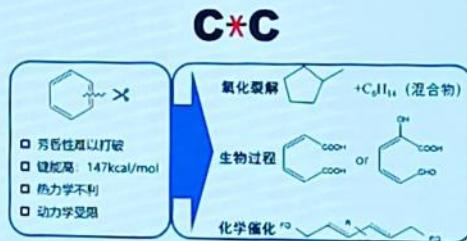
### 工作三：创制CO<sub>2</sub>合成淀粉的甲醛裂合酶Formolase

创制高效Formolase，解除CO<sub>2</sub>到淀粉的从头合成途径中C1到C3的合成瓶颈



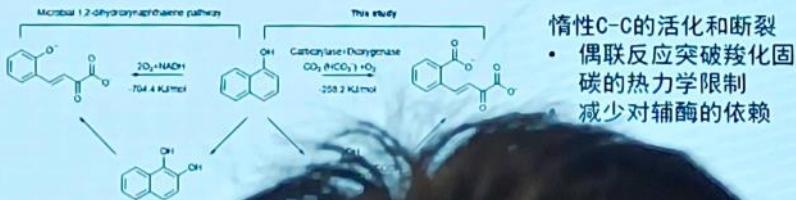
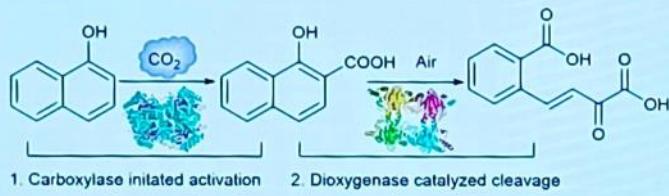
- 创制CO<sub>2</sub>合成淀粉的关键碳碳缩合酶，低浓度甲醛条件活性大幅提高且具有产物选择性，总酶使用量降低45%，解析了碳碳缩合酶性能提升分子机制

## 工作四：羧化酶固定CO<sub>2</sub>引发芳环裂解



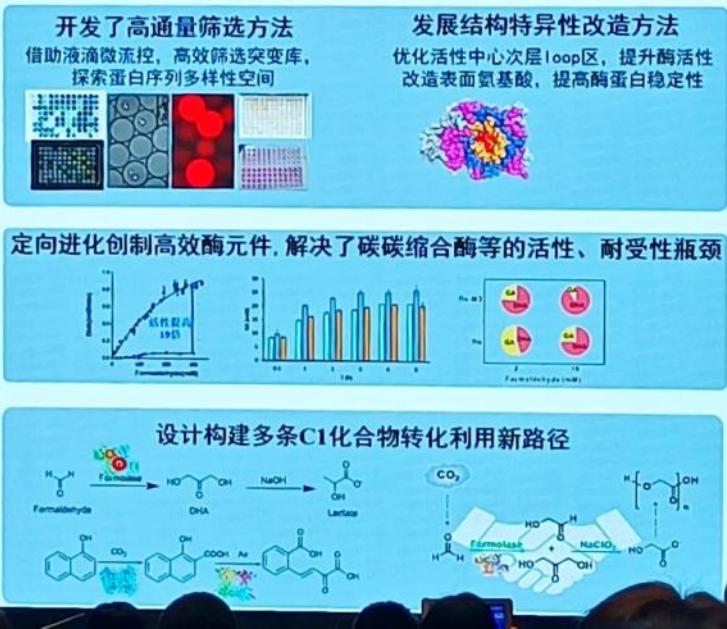
- 石油加工得到的副产物轻质循环油主要含有萘、萘酚及其衍生物，开环后得到单环化合物便可用于大宗芳香族化合物的生产
- 芳环作为有机分子最基本的结构之一，具有共轭、稳定的环状结构，键能高、活性低、选择性难控制，其C-C键的断裂转化是化学领域公认的难题之一

## 工作四：羧化酶固定CO<sub>2</sub>引发的芳环裂解



- 设计构建了通过羧化酶固定CO<sub>2</sub>引发芳环裂解的新途径
- 偶联羧化反应和双加氧反应
- 为芳香多环化合物温和绿色合成提供了新方法

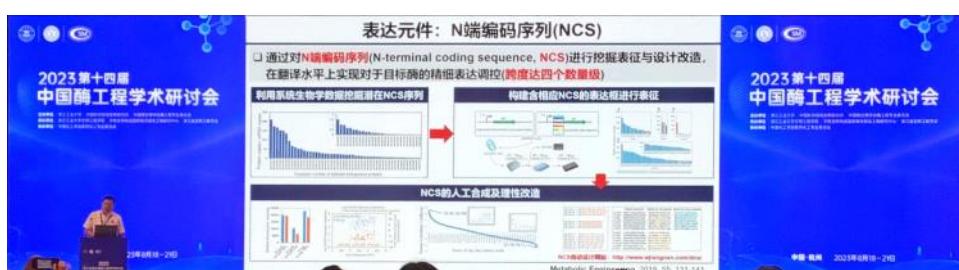
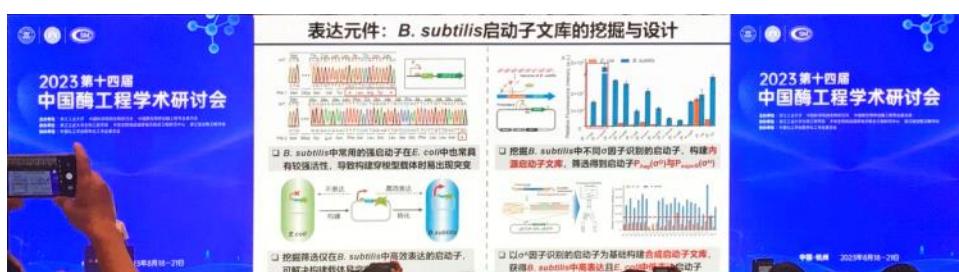
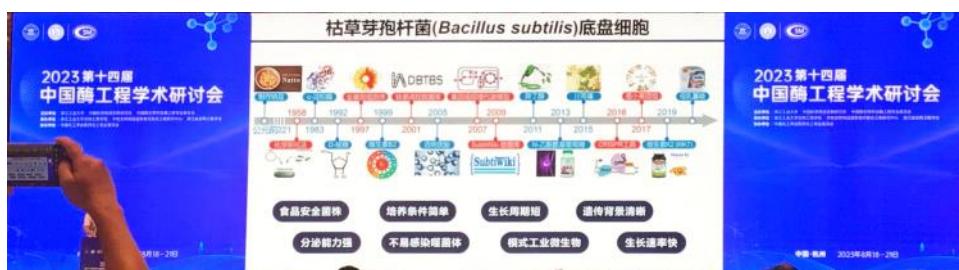
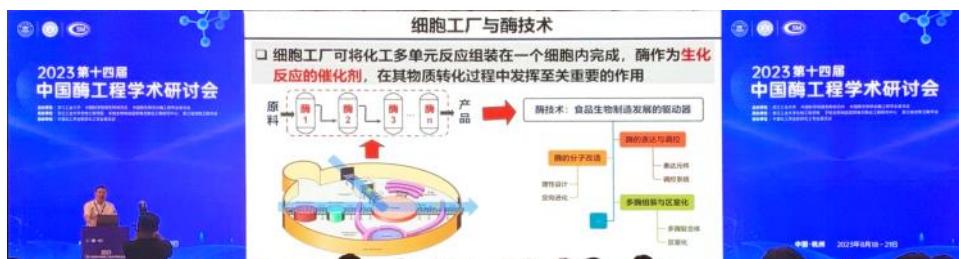
## 小结



# 第十四届-6-刘龙

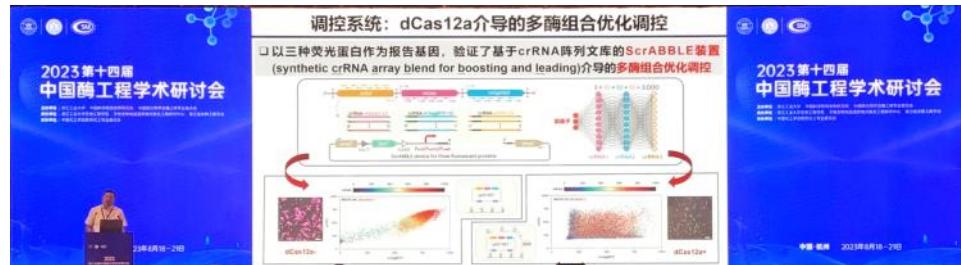
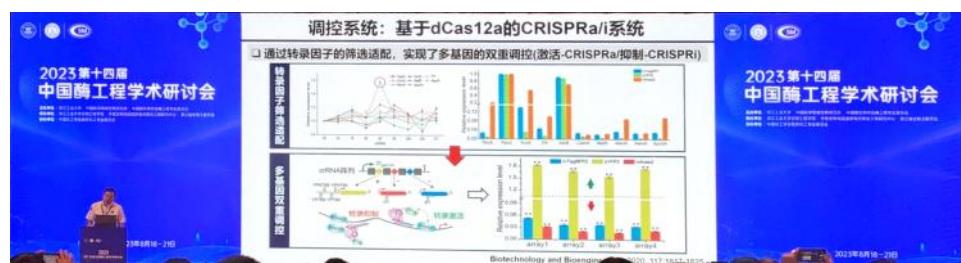
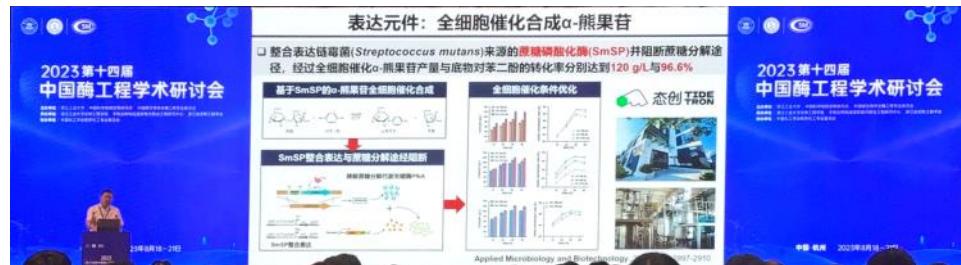
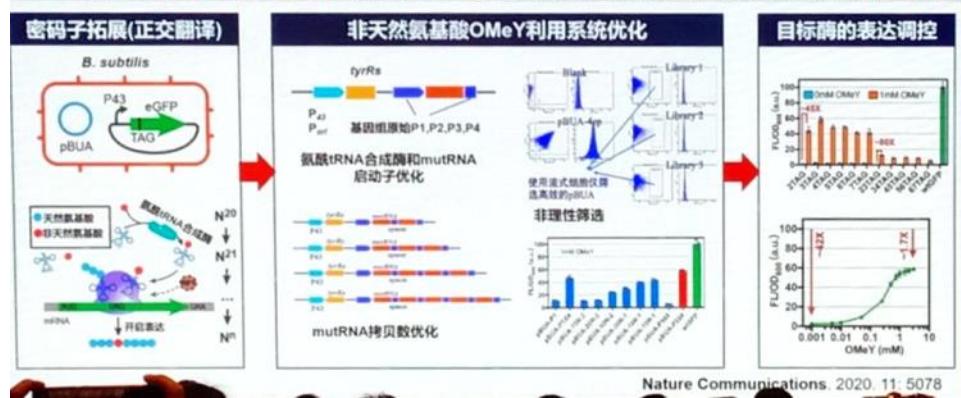
2023年8月19日 星期六 13:34

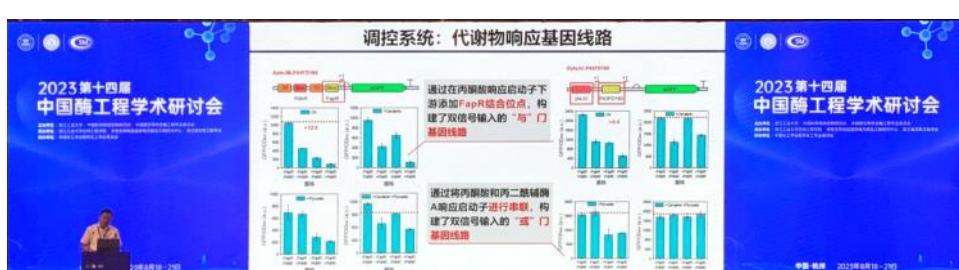
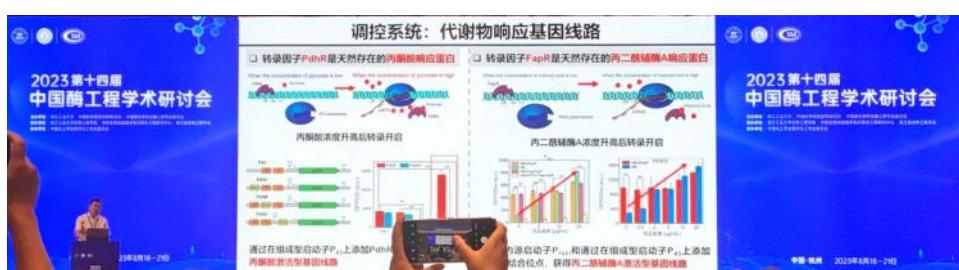
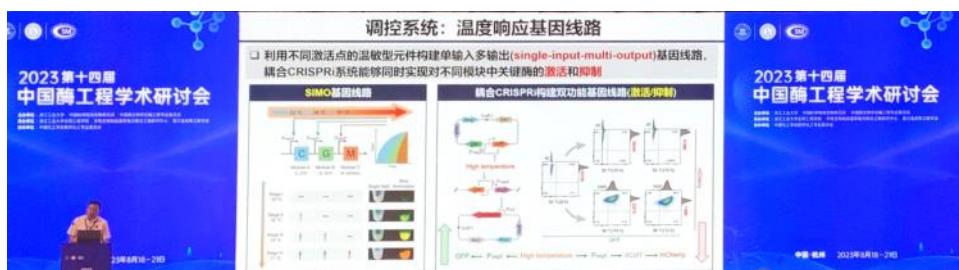
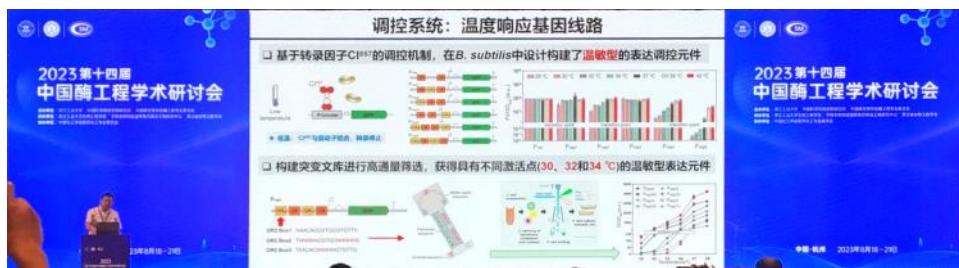
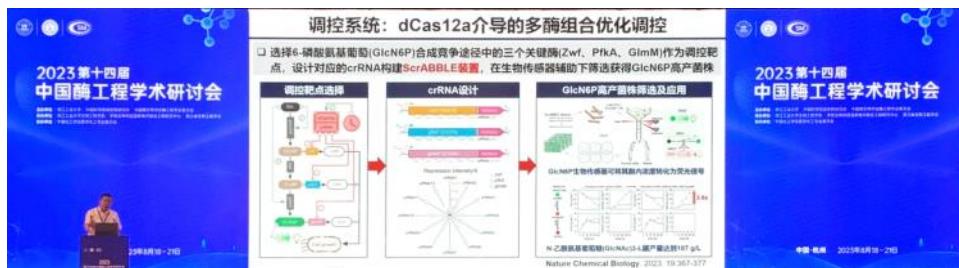
江南大学



## 表达元件：基于密码子拓展的酶表达调控

□ 利用基于**密码子拓展**的正交翻译系统，结合理性设计与非理性筛选，实现了***B. subtilis***对**4-甲氧基-L-苯丙氨酸(OMeY)**的高效利用，通过添加OMeY可对目标酶的表达进行**精细调控**





**2023第十四届中国酶工程学术研讨会**

**调控系统：代谢物响应基因线路**

利用双信号基因线路对相关代谢途径进行重编程，MK-7产量突破1g/L，在南通成功建成年产150吨的维生素K2(MK-7)生产线

① 使用丙酮酸激酶型基因线路动态激活丙酮酸脱羧酶PdhA，平衡丙酮酸向乙酰辅酶A的转化  
② 使用丙二酰辅酶A抑制型基因线路抑制乙酰CoA转化酶AccA和柠檬酸合酶CITZ，从而实现丙酮酸和乙酰辅酶A的积累  
③ 使用“与”门线路开启MVA途径，MEV途径和MK-7合成途径，使代谢流定向MK-7合成

*Metabolic Engineering* 2023, 10, 1016 | eng 2023, 01, 1–10

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：磷酸酶改造增强GlcNAc合成**

GlcNAc合成途径中GlcNAc6P的脱磷酸化反应为主要限速步骤，通过**磷酸酶的理性设计**改造及动态表达调控，可解除该限速步骤并缓解胞内的磷酸糖压力

**GlcNAc合成途径分析**

**基于DBTL的GlcNAc6P脱磷酸系统构建**

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：磷酸酶改造增强GlcNAc合成**

磷酸酶的底物特异性较差，通过磷酸酶-GlcNAc6P复合体的分子动力学模拟确定了底物结合口袋的柔性残基(I49/F125/L129)，结合虚拟突变重塑磷酸酶底物结合口袋的选择性

**磷酸酶底物口袋的理性设计(Design)**

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：磷酸酶改造增强GlcNAc合成**

根据虚拟突变结果，构建**磷酸酶突变体文库**：基于转录因子NagC，构建了具有不同响应阈值的GlcNAc6P生物传感器，以实现磷酸酶的动态表达调控

**突变体库及生物传感器构建(Build)**

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：磷酸酶改造增强GlcNAc合成**

分析测定了突变体的底物选择性，M2对GlcNAc6P的 $K_{cat}/K_m$ 值提高了7.3倍，M1对Glc6P的 $K_{cat}/K_m$ 下降了76.8%

**突变体生物学参数测定(Test)**

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：磷酸酶改造增强GlcNAc合成**

通过量子力学计算解析了GlcNAc6P脱磷酸反应的**催化机理**，其中ASP8的亲核攻击是主要的**反应能量**，基于此构建突变体(I49Q/L129Q)降低反应能量，对GlcNAc6P酶活及选择性进一步提高

**量子力学计算与催化机理解析(Learn)**

Unpublished

中国·杭州 2023年8月18–20日

**理性设计：降低脱乙酰酶Dac的最适pH**

- 脱乙酰酶Dac可将GlcNAc转化为GlcN，GlcN在酸性条件下更为稳定，而Dac的最适pH为7.0-8.0，因此降低Dac的最适pH能够提高GlcN的稳定性
- 通过突变体设计改造以降低酶的表面电荷(-35→-100)，进而降低其最适pH值

**定向进化：基于正交DNA复制系统的体内连续进化**

- 在原核微生物中建立了正交DNA复制系统BacORep，利用易错复制的正交DNA聚合酶能够以高于基因组突变率6700倍的速度进行目的酶的体内连续进化

**定向进化：基于微流控的脱乙酰酶高通量筛选**

- 将含有GlcNAcP生物传感器的菌株作为氨基葡萄糖(GlcN)的检测菌株，用于脱乙酰酶Dac的高通量筛选

**氨基葡萄糖(GlcN)全生物法合成**

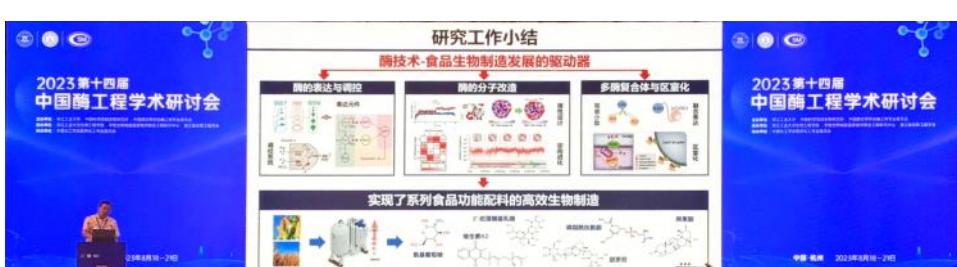
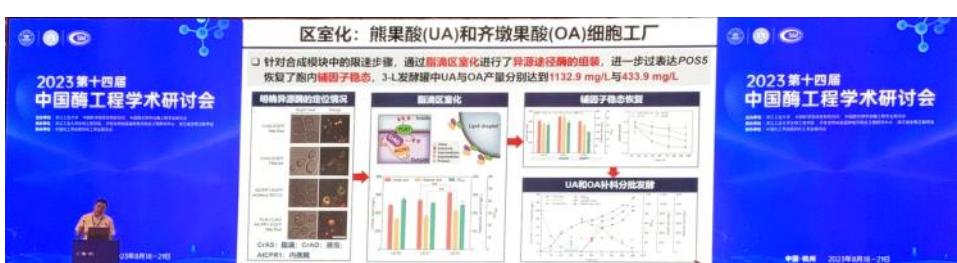
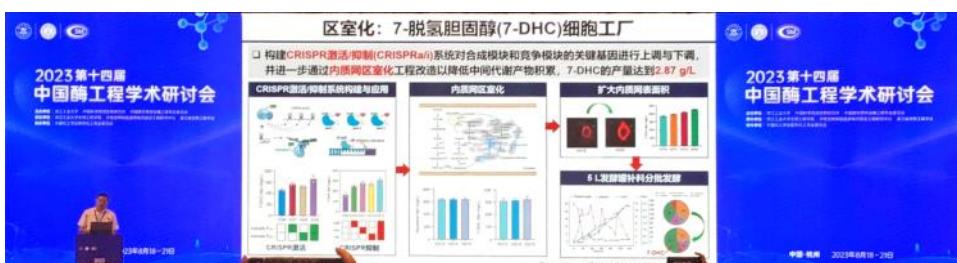
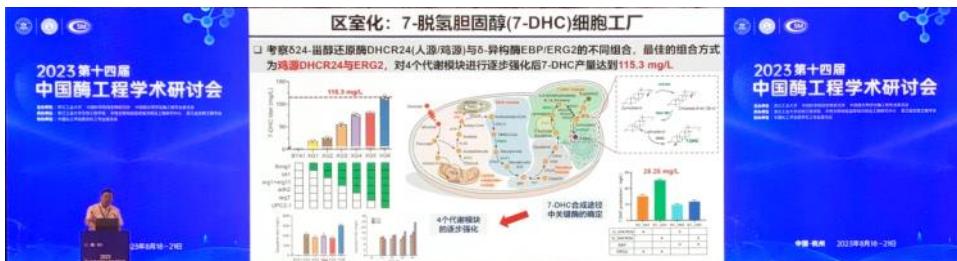
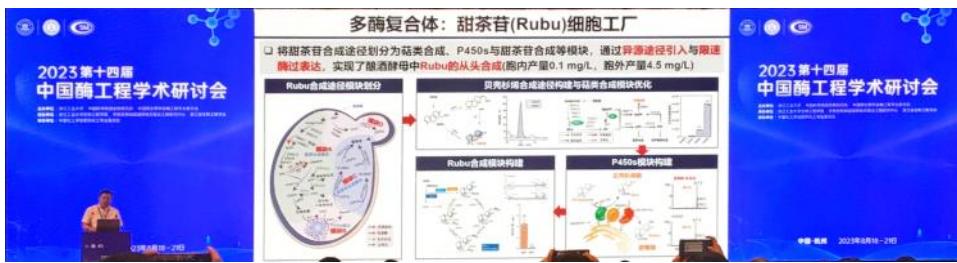
- 将GlcNAc微生物发酵与酶法脱乙酰共偶联，实现了GlcN的全生物法合成，废酸碱液较传统的酸水解法和半生物法分别减少97.3%和89.0%

**氨基葡萄糖(GlcN)全生物法合成**

- 在山东润德生物建成年产1万吨GlcN(全球最大)的工业生产线

**多酶复合体：基于功能膜微域的人工代谢通道**

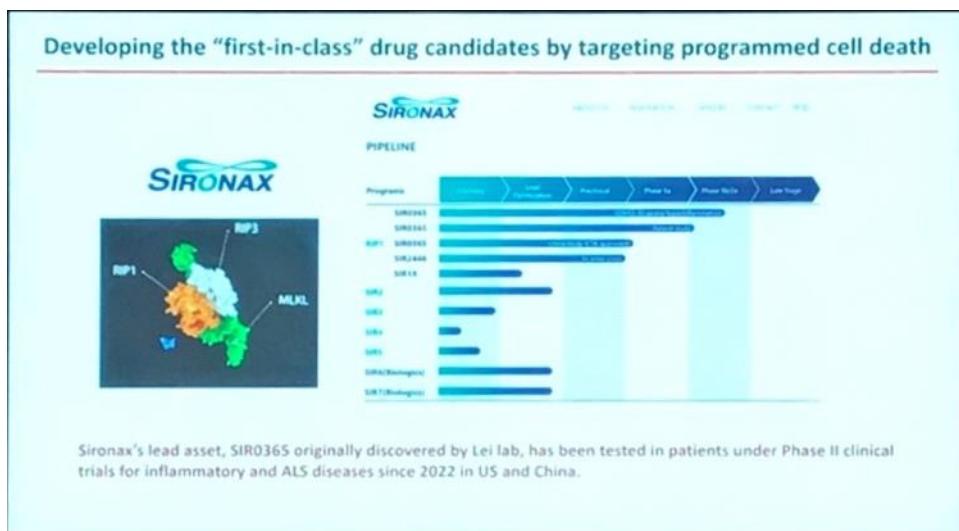
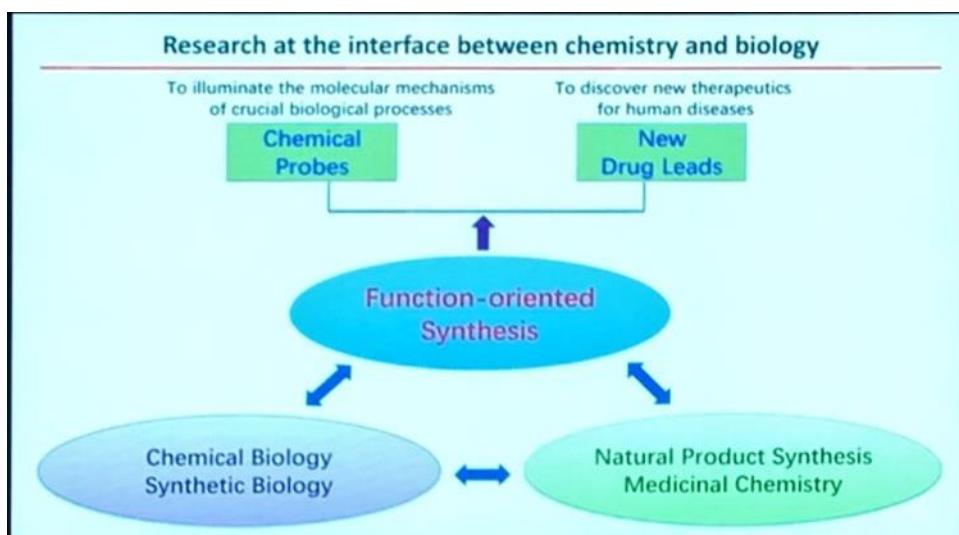
- 细胞膜功能膜微域(FMMs)具有较强的时空稳定性，将相关途径酶固定于FMMs上可构建人工代谢通道，对FMMs进行人工强化后GlcAc产量提高了近3倍并增强了细胞的环境适应性



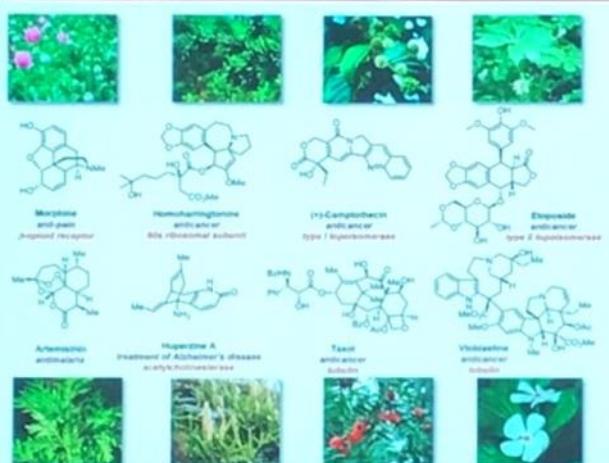
# 第十四届-7-雷晓光

2023年8月19日 星期六 14:00

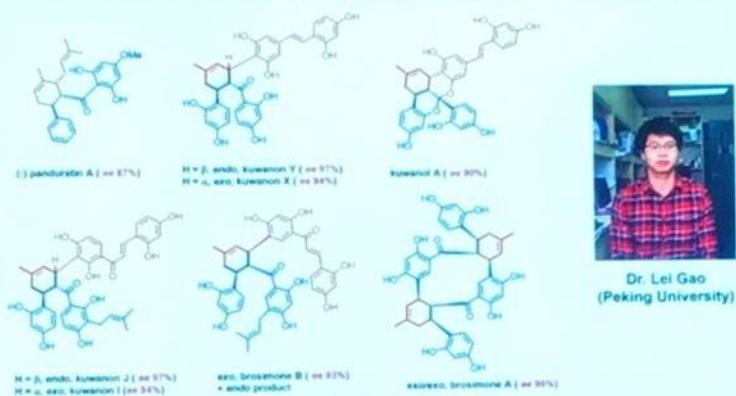
雷晓光



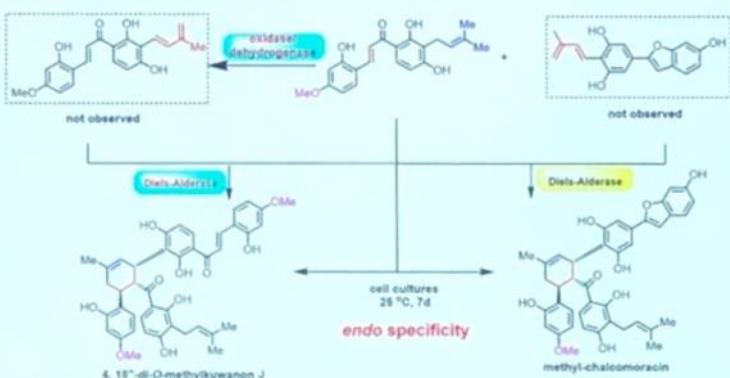
## Plant-derived natural products are essential for human medicine



## Biomimetic and asymmetric syntheses of D-A natural products



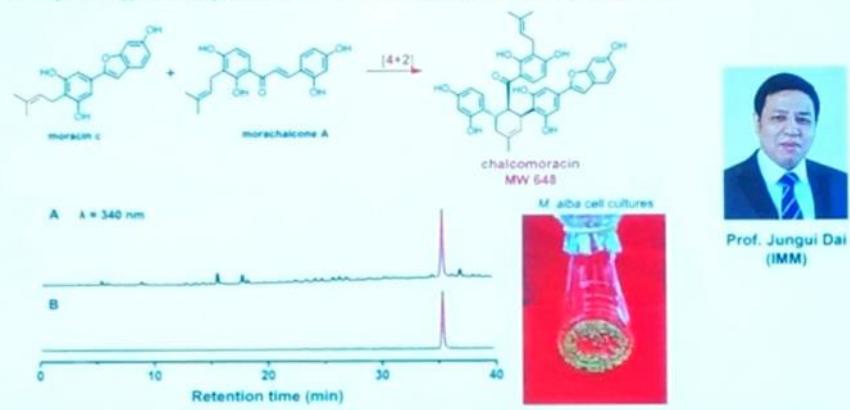
## Nomura's work inspired us to hunt for the Diels-Alderase



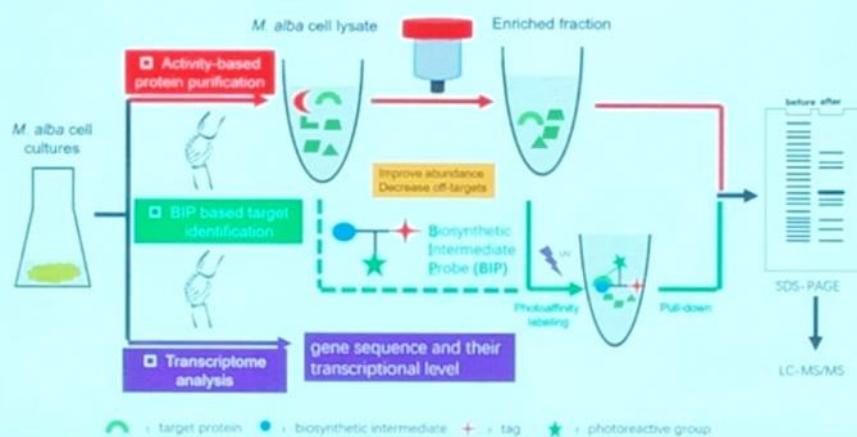
Nomura, T. et al. Chem. Pharm. Bull. 1989, 37, 554; Nomura, T. et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1990, 8, 610

## The existence of intermolecular [4+2] Diels-Alderase in plant cell cultures

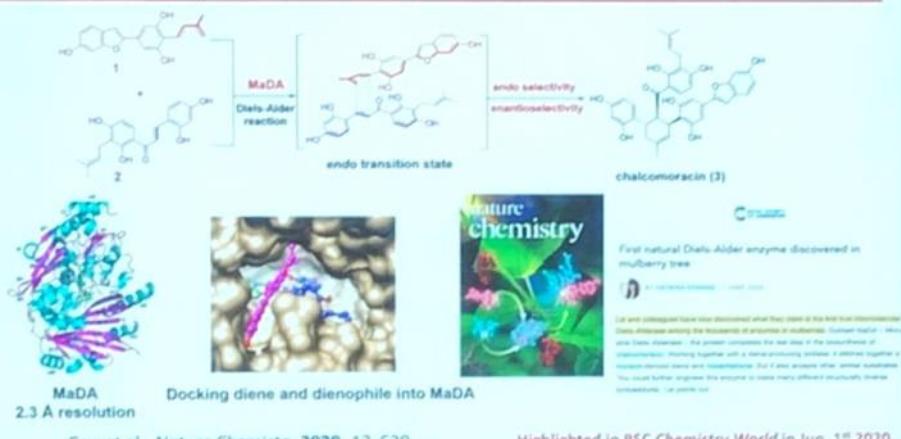
Major D-A type natural product is chalcomoracin (3.86% from the dry callus cells)



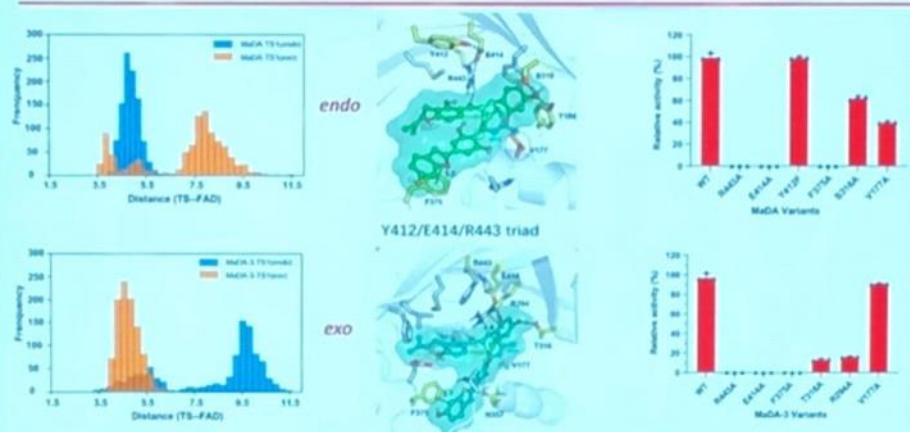
## Our strategy for the identification of Diels-Alderase in *Morus alba*



## Discovery of the first intermolecular Diels-Alderase: MaDA



## Cation- $\pi$ interaction contributes to the exo-selectivity

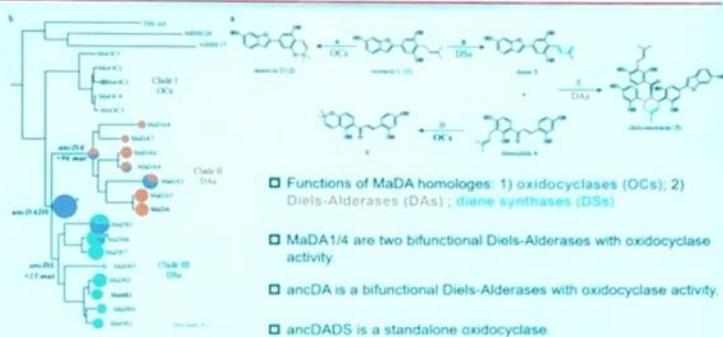


In collaboration with Prof. K.N. Houk

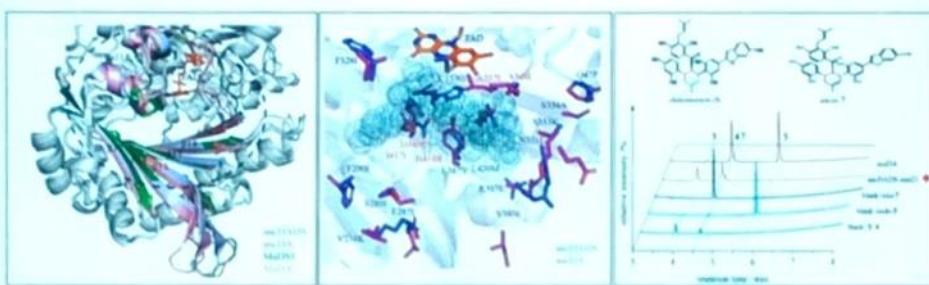
R294/E414/R443 triad

Gao et al., *Nature Catalysis* 2021, 4, 1059

## Function characterization of MaDA homologs and its ancestors



## Key residues of ancDA contribute to the emergence of DA activity from ancDADS

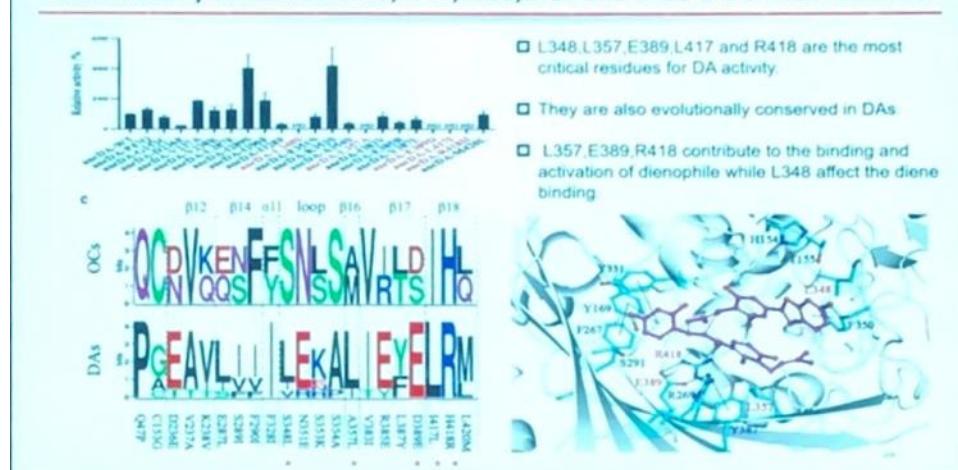


■ Structural comparison of ancDA, ancDADS, MaDS1 and MaDA1

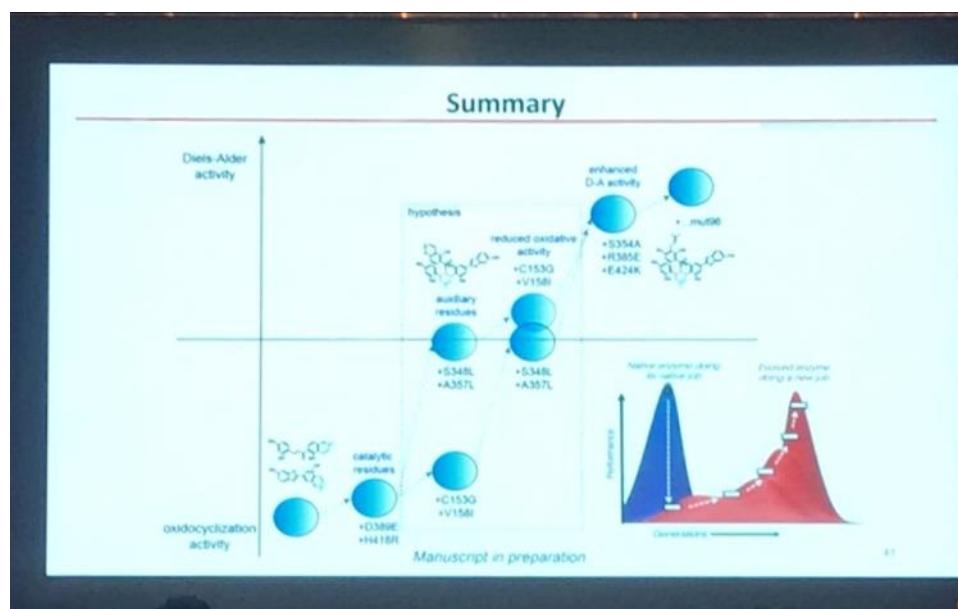
■ 21 Differential residues between ancDA and ancDADS in their pockets

■ ancDADS-mut21 shows the DA activity.

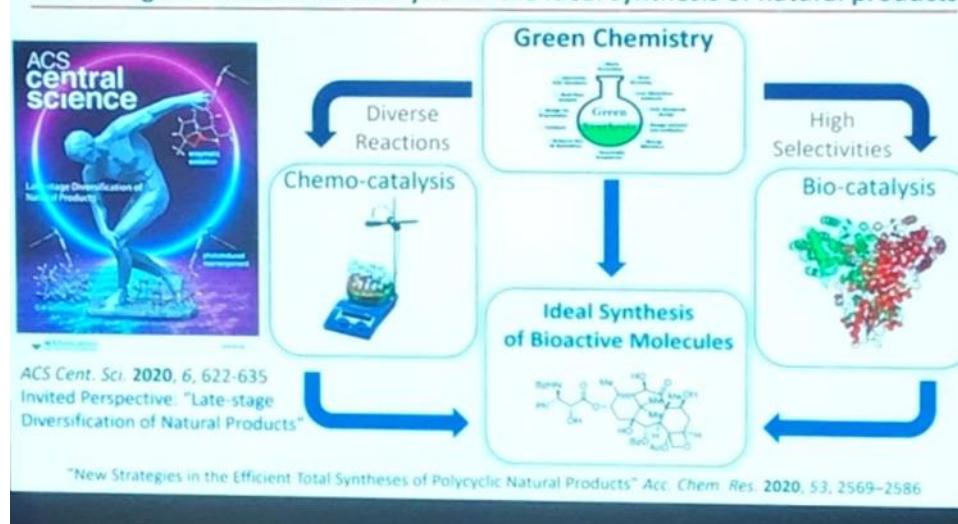
## Evolutionarily conserved L348,L357,E389,L417 and R418 are critical residues



## Summary



## Combining bio- and chemo-catalysis for the ideal synthesis of natural products



## Acknowledgments



### Collaborators

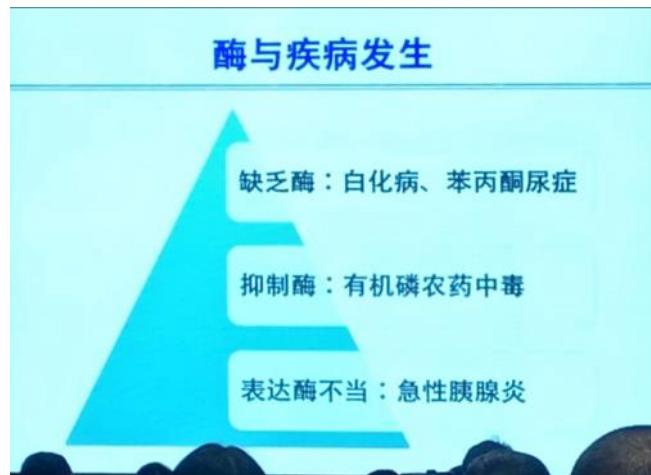
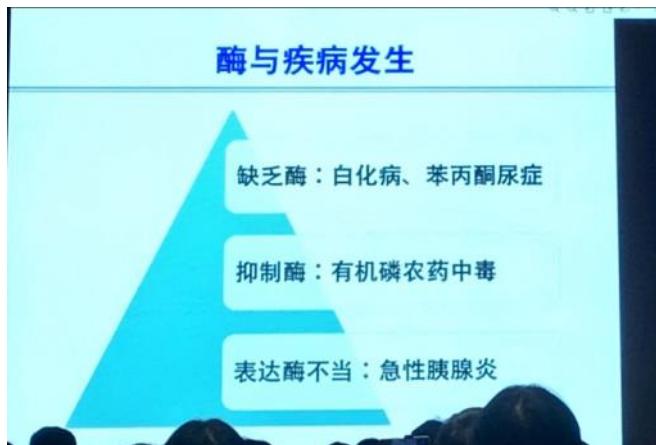
**Clinicians:** Prof. Yong Yang, Prof. Jin Lu, Prof. Minghui Zhao, Prof. Jie Qiao  
**Biologists:** Prof. Xiaodong Wang, Prof. Chu Wang, Prof. Junyu Xiao, Prof. Yulong Li, Prof. Hong Wu, Prof. Ruiping Xiao, Prof. Ning Gao, Prof. Jing Yang, Prof. Zhengfan Jiang, Prof. Jingwei Xiong, Prof. Changtao Jiang, Prof. Daohua Jiang, Prof. Jianmin Zhou, Prof. Yule Liu, Prof. Jianbin Yan



# 第十四届-8-毕利军😊

2023年8月19日 星期六 14:32

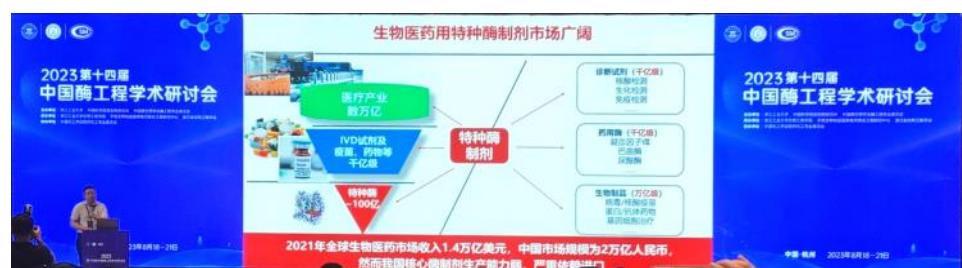
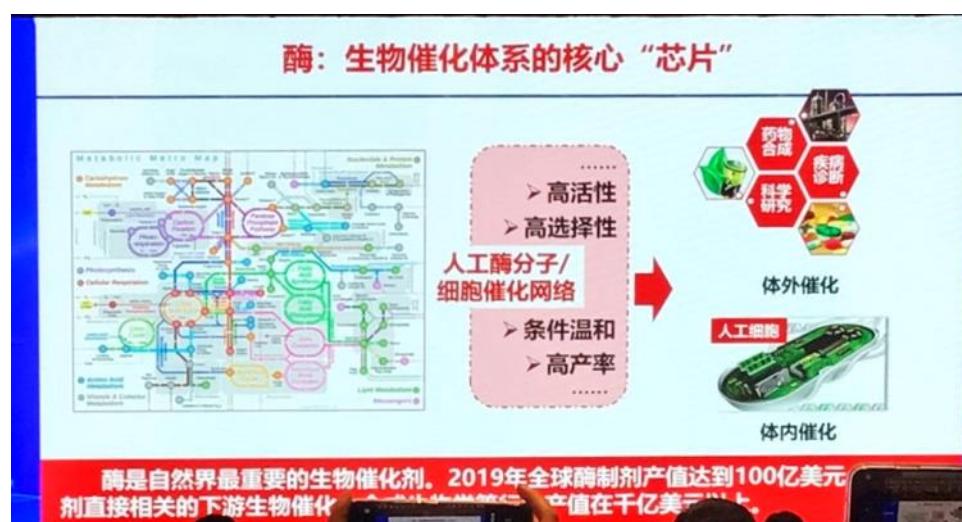
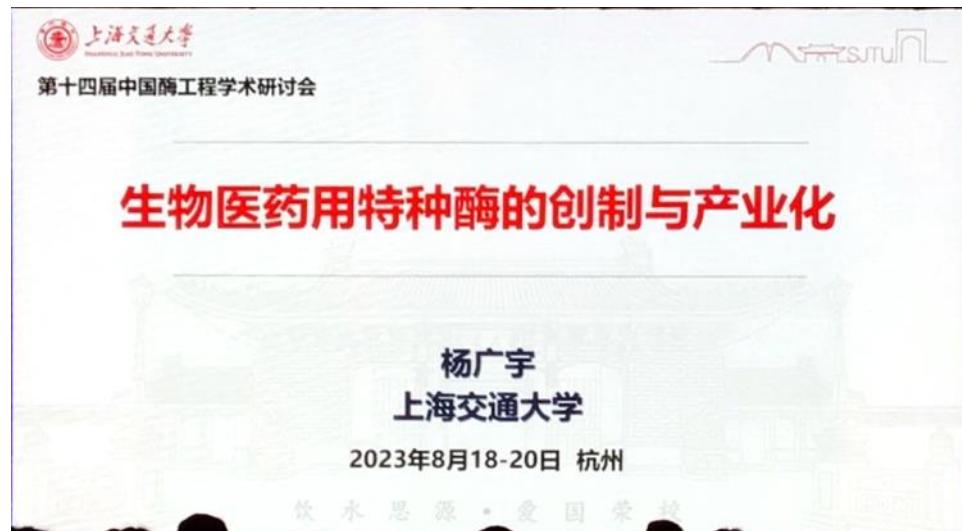
毕利军



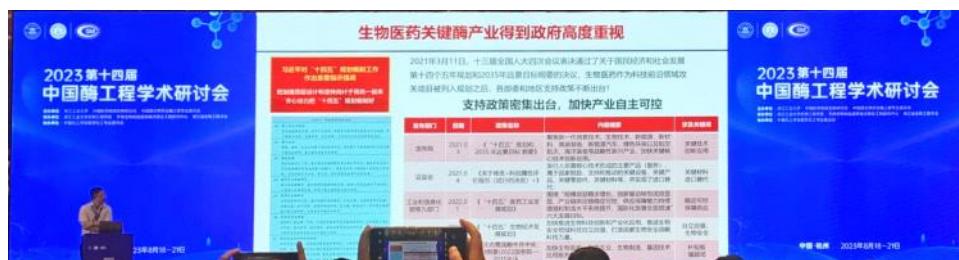
# 第十四届-9-杨广宇

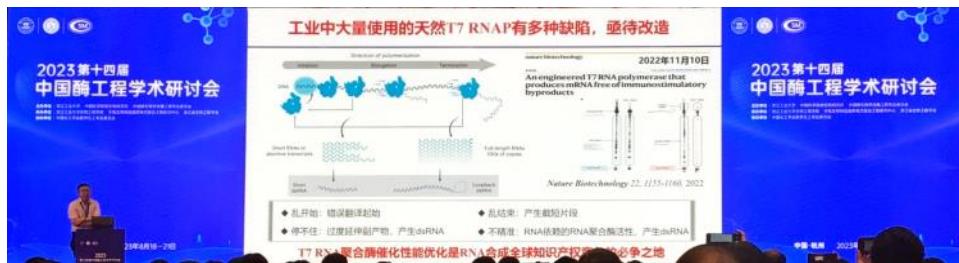
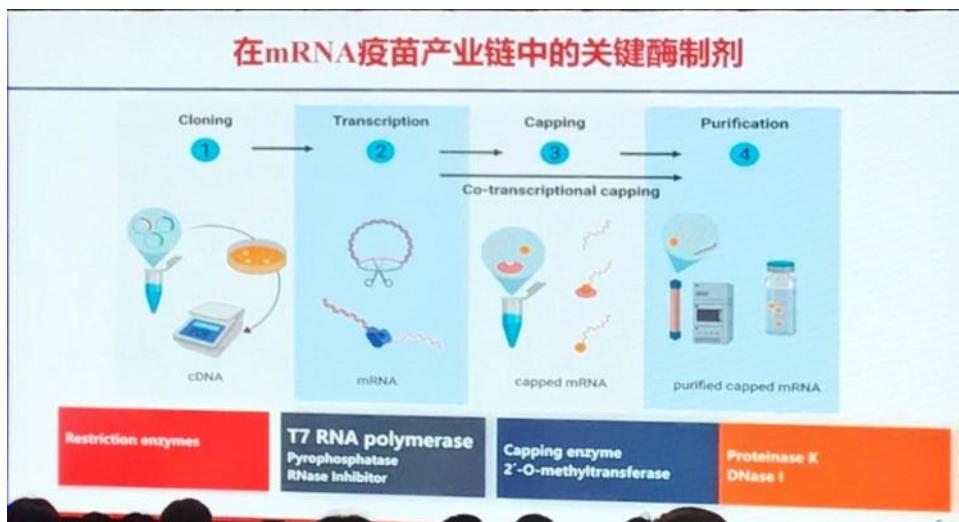
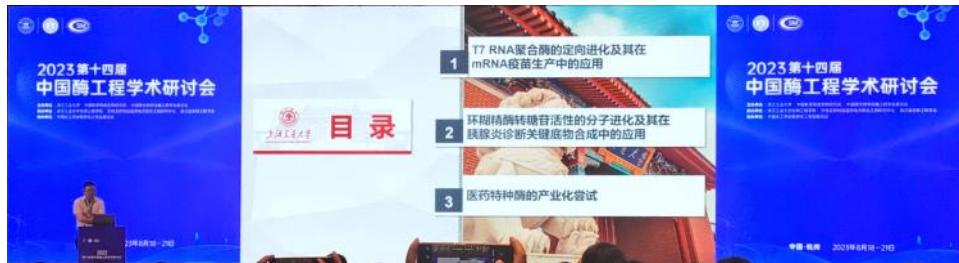
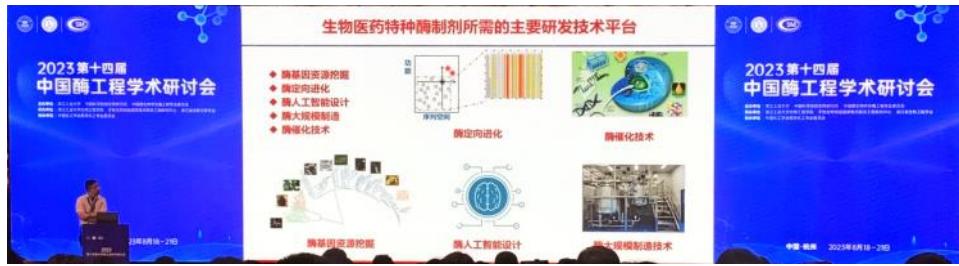
2023年8月19日 星期六 14:56

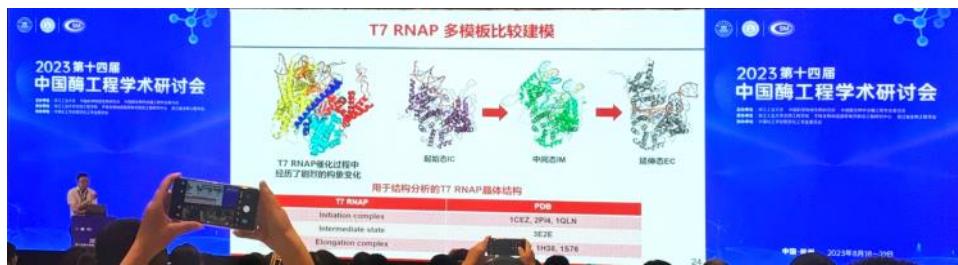
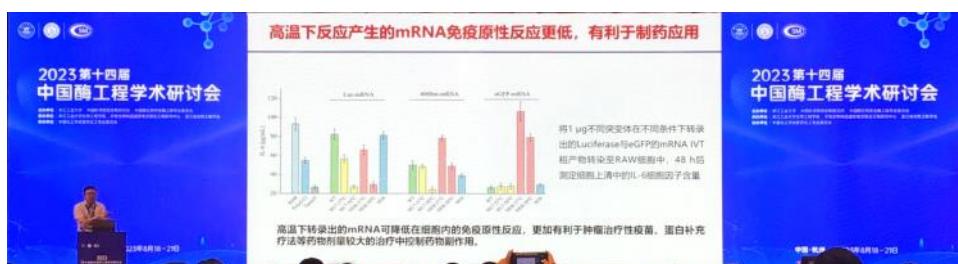
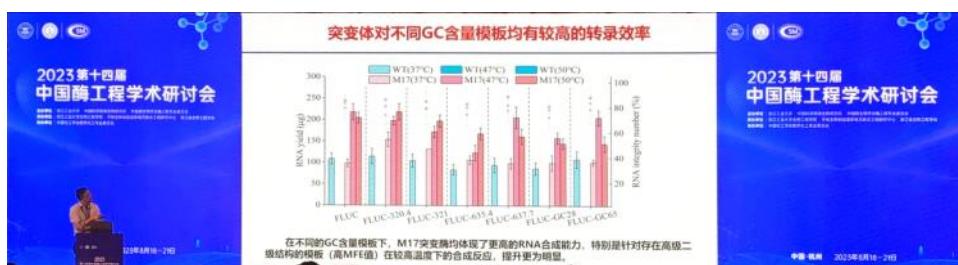
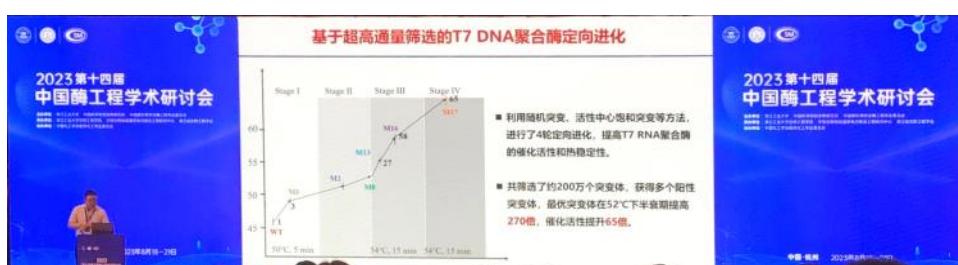
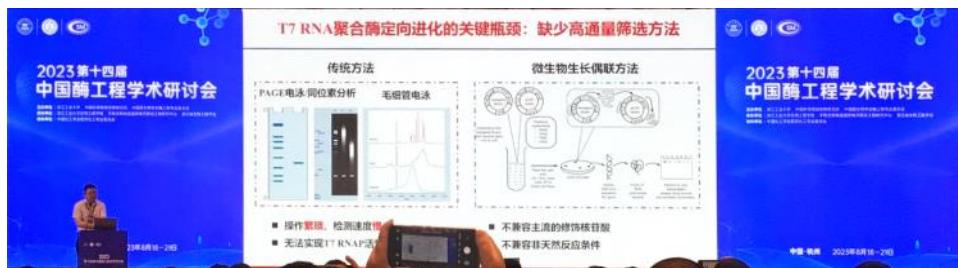
杨广宇

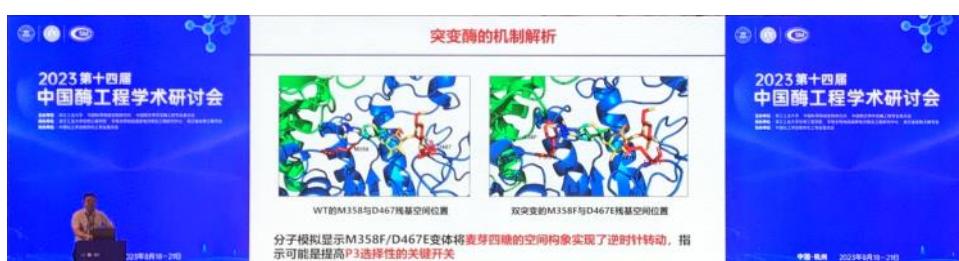
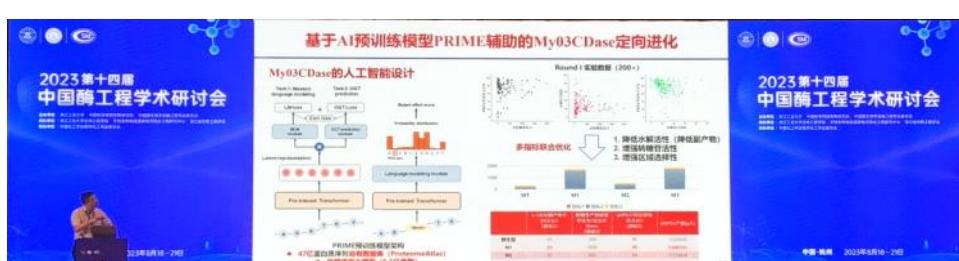
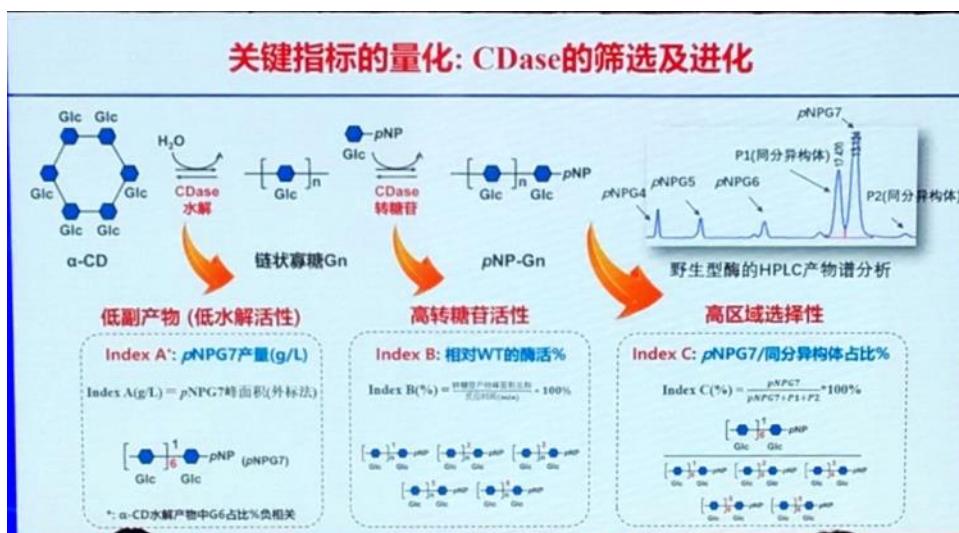
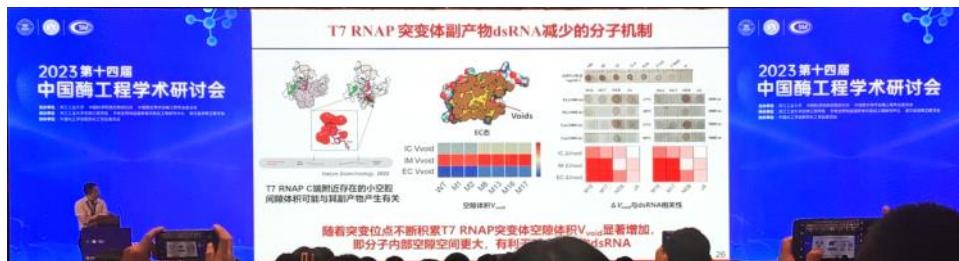
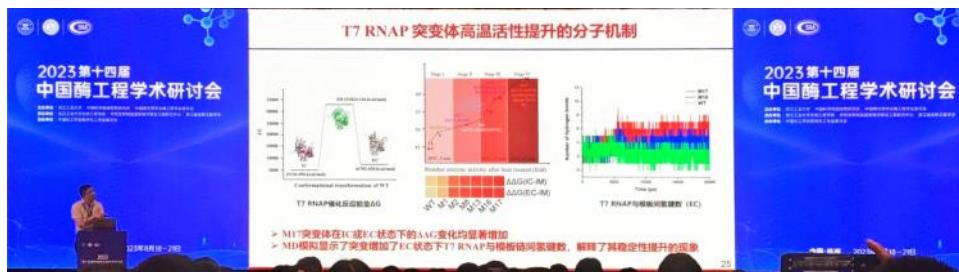


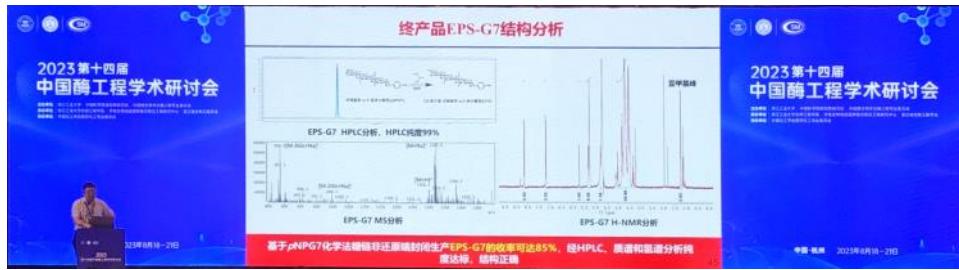
## 新冠疫情催生特种酶应用需求的井喷，也凸显了我国被“卡脖子”的困境











# 第十四届-10-吴起

2023年8月19日 星期六 15:45

吴起

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

## 一、酶催化非专一性简介

- 概念 (Enzymatic promiscuity)
  - 酶催化非专一性、混杂性、多功能性：一个酶的活性位点能催化两种以上不同类型的化学反应能力。
  - 这些化学反应可能在两方面上有所不同：(1) 参与的底物能，即反应过程中形成或断裂的键不同。(2) 可能的催化机理，即键成键或断裂的过程不同。大多数酶催化非专一性的例子都包含以上两个不同点。
- 酶的多功能性  
Enzymatic promiscuity
  - 条件多功能 Enzyme condition promiscuity
  - 产物多功能 Enzyme substrate promiscuity
  - 催化多功能 Enzyme catalytic promiscuity

Bommer, Kazlauskas, Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 42, 6032; Kazlauskas, Curr. Opin. Chem. Biol. 2005, 9, 195; Michael, Curr. Opin. Biotechnol. 2004, 15, 531.

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

## 一、酶催化非专一性简介

- 重要性和意义
  - 酶的底物谱很宽，反应类型很少，拓展酶催化应用范围的最大挑战之一就是发现更多的酶催化非专一性。
  - 催化非专一性是自然界从少量混杂性的祖先酶进化出大量催化新反应的专一性酶的主要驱动力。
- 图示：
  - 左侧展示了酶的底物谱广泛，而反应类型较少。
  - 右侧展示了酶的底物空间分布，显示了广泛的底物选择性和有限的反应活性。

Bonatti, Arnulf, Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 5501.

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

- 图示展示了多种酶促反应类型，包括但不限于：

  - Cyclopropanation, Cyclopropanation, Bicyclobutination, Aldehyde olefination
  - B-H insertion, N-H insertion, Si-H insertion, S-H insertion
  - Michael addition, Markovnikov addition, Aldol reaction, Henry reaction, Mannich reaction, Dieckmann condensation, Hantsch-type reaction, Ugi reaction, Biginelli reaction, Radical polymerization, Si-O-Si bonds
  - 羟基化, 氧化还原, 合成酶类, 脱氢酶, 异构酶类, 聚合酶类
  - 光活化酶类, KEDD酶类, 酶催化非天然的脱羧化反应,  $\alpha$ ,  $\beta$  不饱和脂肪酸的活化反应, 分子内脱羧交叉偶联反应, Cyp2-Cyp2亲核交叉偶联反应, 好氧脱羧NADP<sup>+</sup>脱羧基酶类反应

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

## 一、酶催化非专一性简介

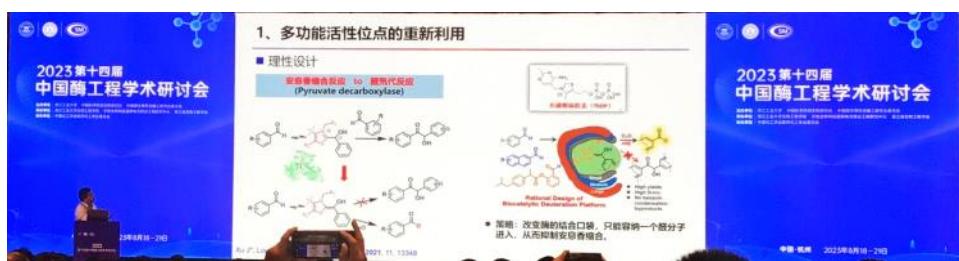
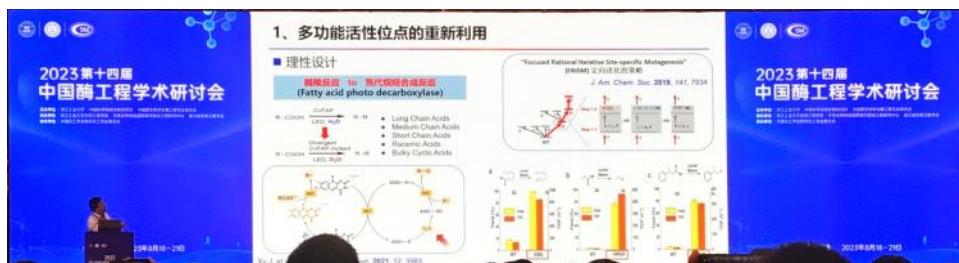
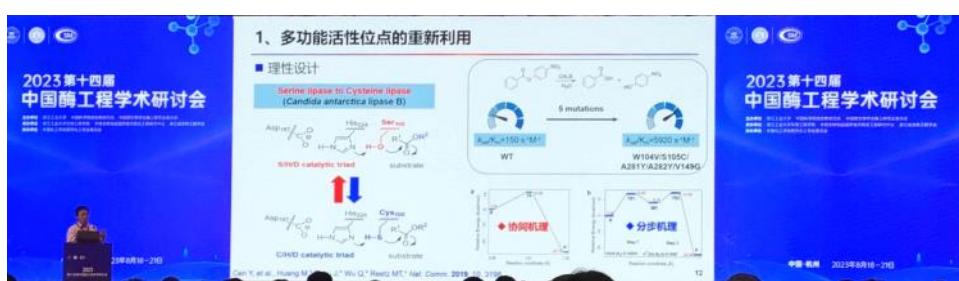
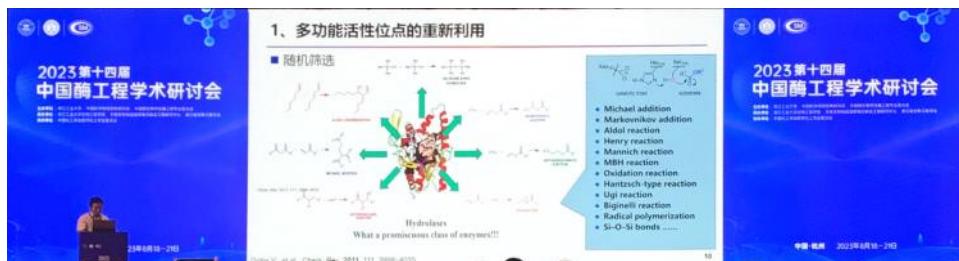
- 关键问题：怎么发现更多的酶催化非专一性反应
  - new-to-nature transformations?

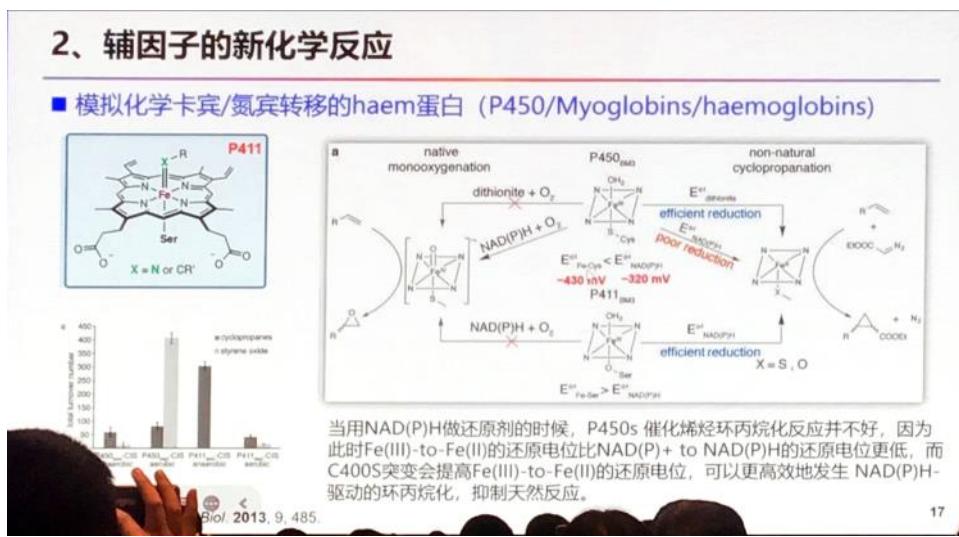
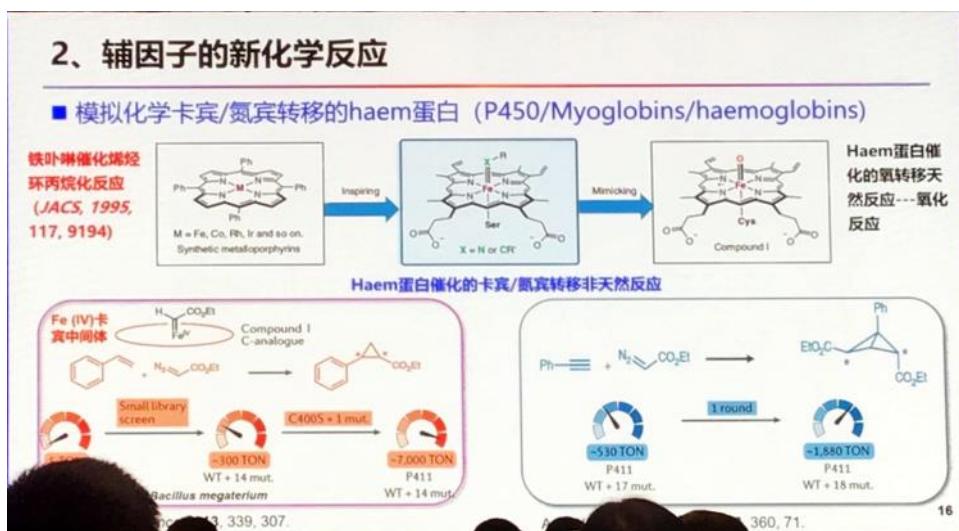
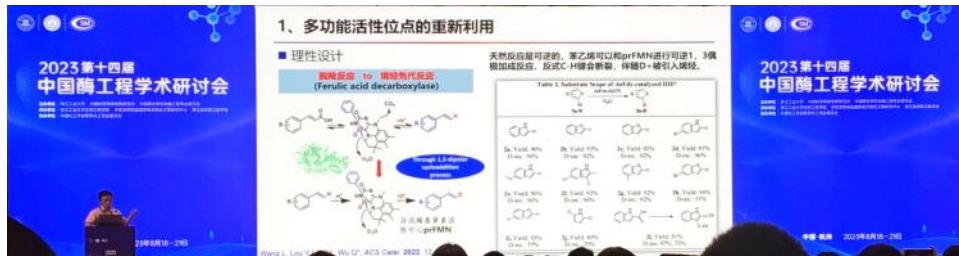
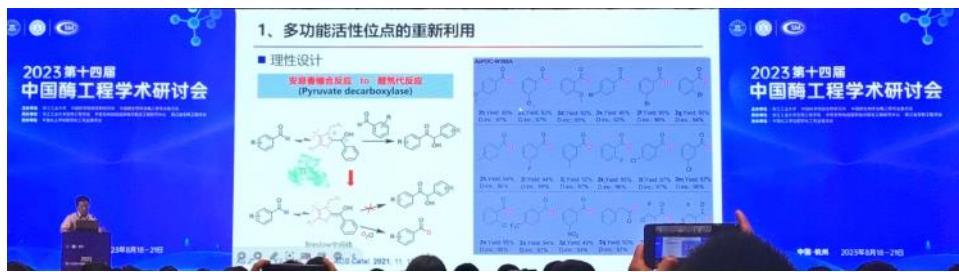
图示展示了一个人站在问号前，以及一个科学家在实验室工作的卡通形象。

2023第十四届中国酶工程学术研讨会

## 二、酶催化非天然新反应的发现与设计

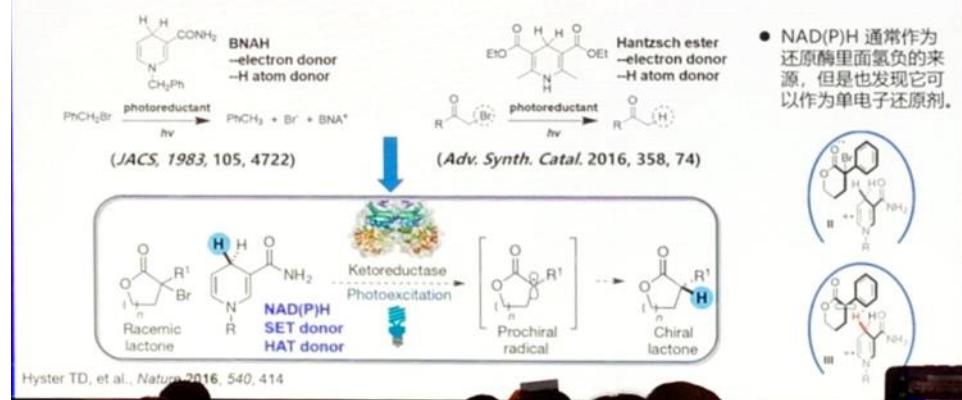
- 多功能活性位点的重新利用
  - 随机筛选
  - 理性设计
- 辅因子的新化学反应
  - 铁卟啉依赖的酶
  - 黄素依赖的酶
  - 烟酰胺依赖的酶
  - ThDP依赖的酶
- 构建人工辅因子，活性位点
  - 人造酶
  - 非叶啉中心金属替换
  - 非天然氨基酸
  - 化学催化基团
- 工具
  - 合成试剂
  - 非天然条件
  - 外界条件
  - MD蛋白设计 AI设计





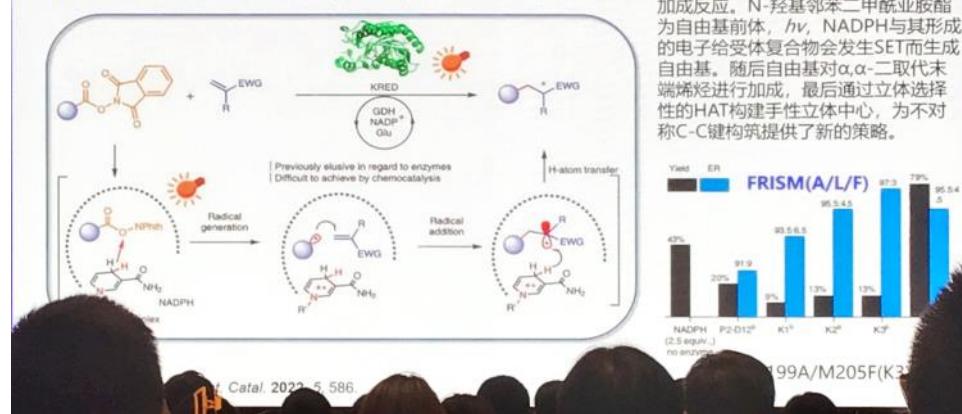
## 2、辅因子的新化学反应

### ■ 烟酰胺辅因子的光活化 (KRED)



## 2、辅因子的新化学反应

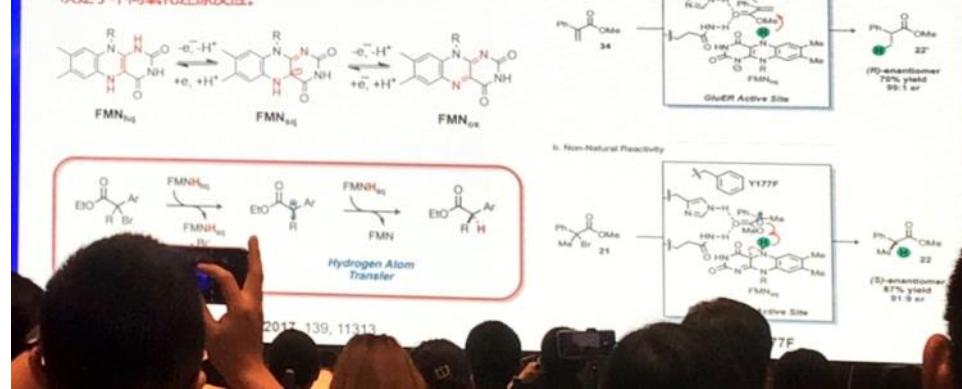
### ■ 烟酰胺辅因子的光活化 (KRED)



## 2、辅因子的新化学反应

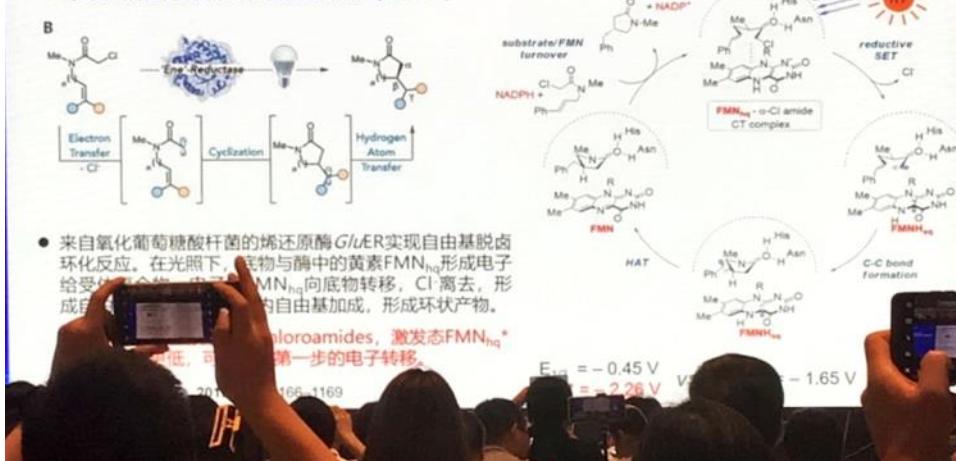
### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (ERED)

黄素有多种不同的状态，不同条件决定了黄素的存在状态，也决定了不同氧化还原反应。



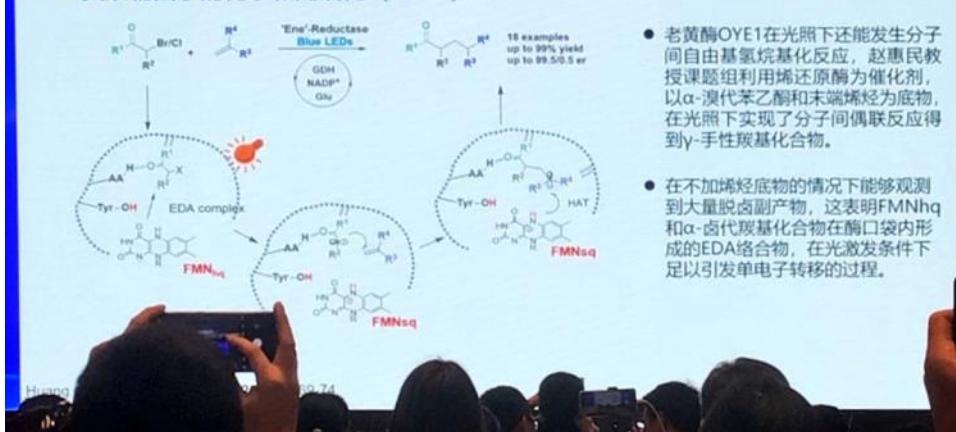
## 2、辅因子的新化学反应

### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (ERED)



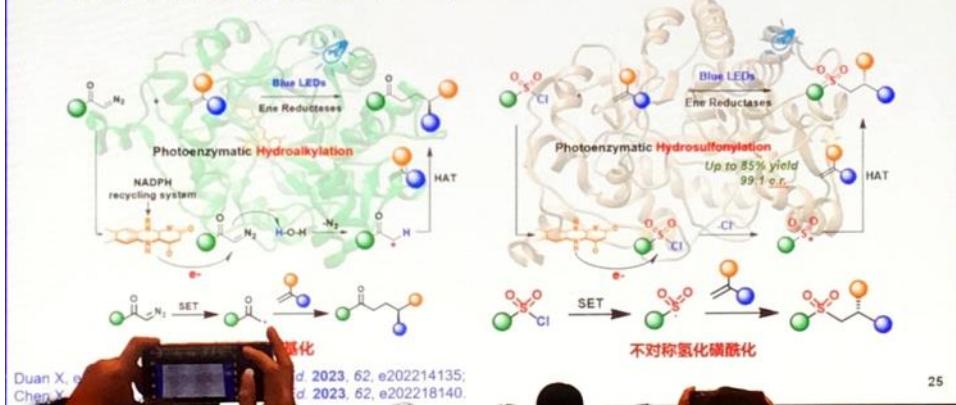
## 2、辅因子的新化学反应

### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (ERED)



## 2、辅因子的新化学反应

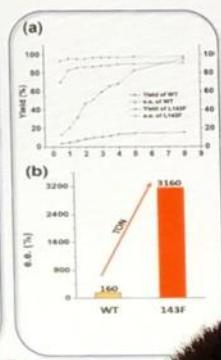
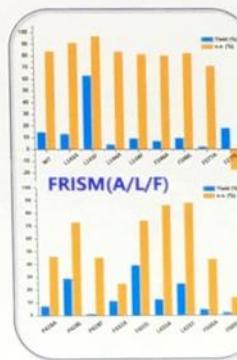
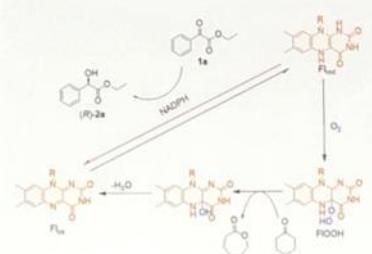
### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (ERED)



## 2、辅因子的新化学反应

### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (CHMO)

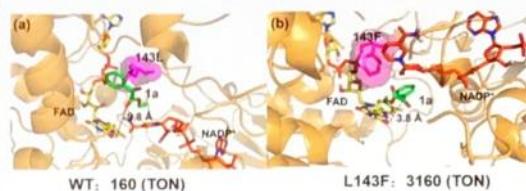
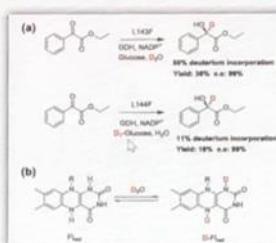
#### Baeyer-Villiger氧化反应 to 脱氢还原反应 (Cyclohexanone monooxygenases)



*J. Am. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 14499.

Table 2: Substrate scope of the promiscuous reduction reaction.<sup>b,c,d</sup>

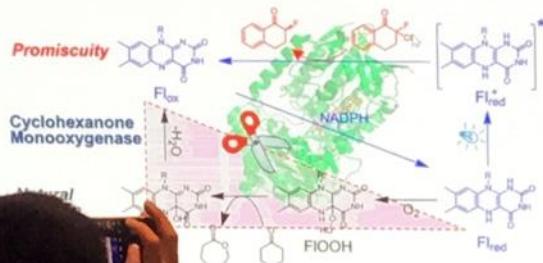
1a-m	2a-m
2a, Yield: 95%, ee: 98%	2a, Yield: 95%, ee: 98%
2b, Yield: 99%, ee: 99%	2b, Yield: 99%, ee: 99%
2c, Yield: 61%, ee: 85%	2c, Yield: 61%, ee: 85%
2d, Yield: 57%, ee: 93%	2d, Yield: 57%, ee: 93%
2e, Yield: 64%, ee: 45%	2e, Yield: 64%, ee: 45%
2f, Yield: 95%, ee: 99%	2f, Yield: 95%, ee: 99%
2g, Yield: 51%, ee: 77%	2g, Yield: 51%, ee: 77%
2h, Yield: 35%, ee: 99%	2h, Yield: 35%, ee: 99%
2i, Yield: 77%, ee: 32%	2i, Yield: 77%, ee: 32%
2j, Yield: 94%, ee: 94%	2j, Yield: 94%, ee: 94%
2k, Yield: 76%, ee: 98%	2k, Yield: 76%, ee: 98%
2l, Yield: 55%, ee: 99%	2l, Yield: 55%, ee: 99%



## 2、辅因子的新化学反应

### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (CHMO)

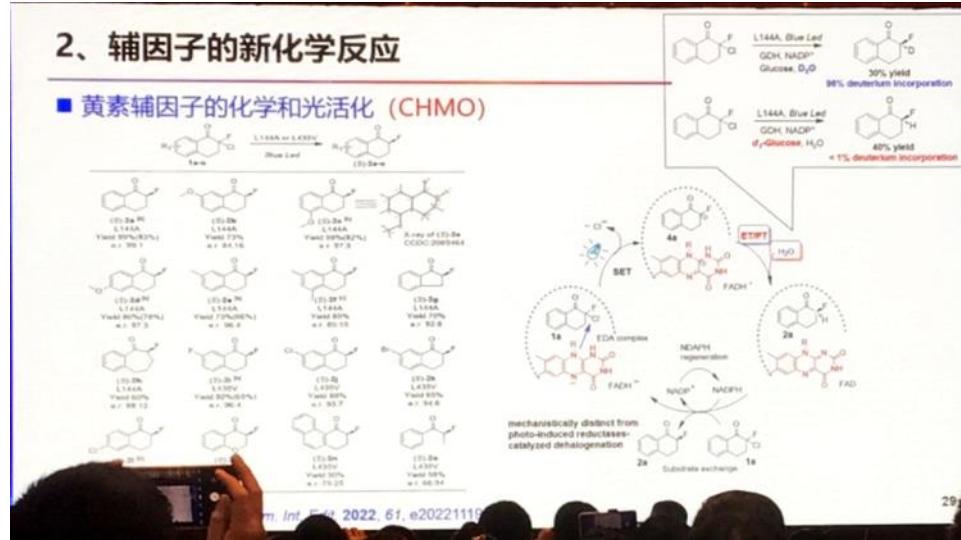
#### Baeyer-Villiger氧化反应 to 脱氢还原反应 (Cyclohexanone monooxygenases)



- 类似脱氢还原反应以前都是ERED, KRED等还原酶催化，氧化酶是否能催化并不清楚。
- 季碳氟中心很容易消旋，立体控制比较困难。
- 基态CHMO不能还原该模型底物( $E_{1/2} = -1.23$  vs. SCE)，降低 FADH<sub>2</sub> ( $E_{1/2} = -0.45$  vs. SCE)还原电位，产生更高还原态 FADH<sub>2</sub> ( $E_{1/2}^* = -2.26$  V)

## 2、辅因子的新化学反应

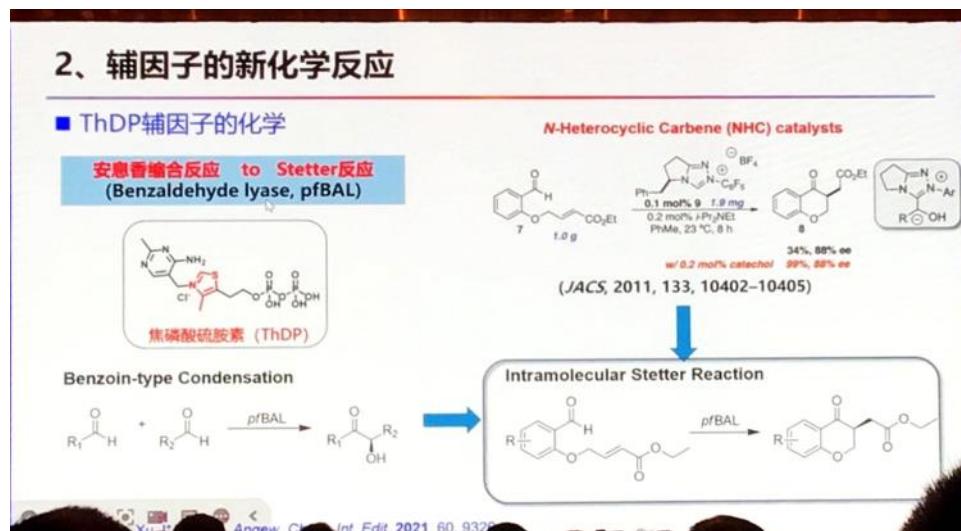
### ■ 黄素辅因子的化学和光活化 (CHMO)



## 2、辅因子的新化学反应

### ■ ThDP辅因子的化学

#### 安息香缩合反应 to Stetter反应 (Benzaldehyde lyase, pfBAL)



## 3、构建人工辅因子、活性位点

### ■ 非天然氨基酸—引入化学三重态光敏剂



## 总结、致谢

### ■ 模拟化学—向化学学习；

- 模拟化学的催化剂结构、催化中间体结构、化学反应底物结构等

### ■ 模拟自然—向自然学习；

- 祖先酶、序列比对、进化树分析等

### ■ 化学催化和酶催化的融合

### ■ 蛋白质设计、计算、AI等工具

32

## 总结、致谢

### ■ 模拟化学—向化学学习；

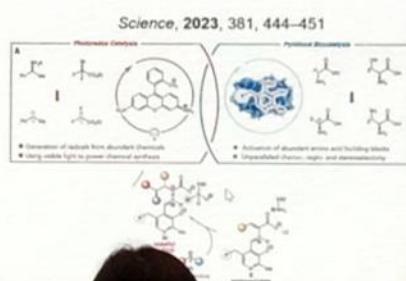
- 模拟化学的催化剂结构、催化中间体结构、化学反应底物结构等

### ■ 模拟自然—向自然学习；

- 祖先酶、序列比对、进化树分析等

### ■ 化学催化和酶催化的融合

### ■ 蛋白质设计、计算、AI等工具



## 总结、致谢

### 浙江大学

- 徐 鉴博士（浙工大教授）；  
陈晓阳博士（浙工大副教授）；  
胡玉静博士（南工大副教授）；  
彭永珍博士（南工大博后）；  
岑一欣博士（上海中医药大学讲师）；  
李丹阳博士（江南大学讲师）；  
徐维华博士（浙江大学博后）；  
张瑜博士（广州微生物所）；  
买买提硕士（中国地质大学）；  
范嘉杰硕士（浙江司太立制药）；  
王婕硕士（上海华谊）。

### 合作者

- M.T. Reetz (马普煤炭所)；  
周佳海研究员（深圳先进院/上海有机所）；  
黄美兰博士（英国女王大学）；  
王志国（杭州师范大学）。



### 基金支持：

- 国家基金重大研究计划培育项目91956128、面上项目22277105  
国家重点研发计划—绿色生物制造重大专项 No. 2021YFC2102000

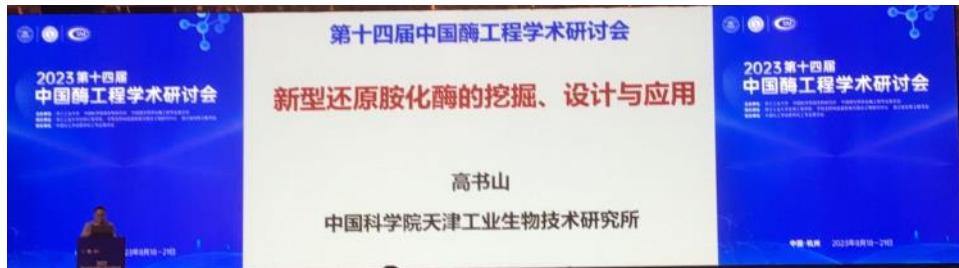
浙江大学 前瞻化学中心资助



# 第十四届-11-高书山

2023年8月19日 星期六 16:14

## 高书山



### 研究背景

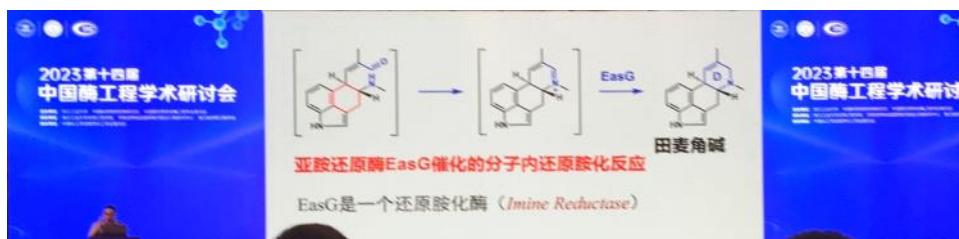
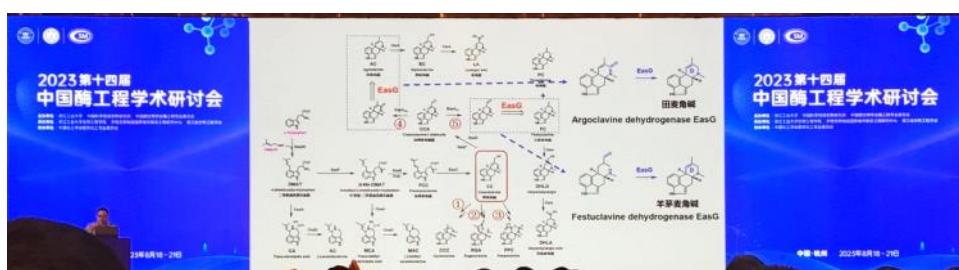
- FDA 批准的小分子药物中约 40% 包含手性胺结构单元。
- 目前生产工艺主要包括：手性拆分，过渡金属催化的还原胺化等方法。
- 生物催化合成手性胺：绿色、经济和高效。

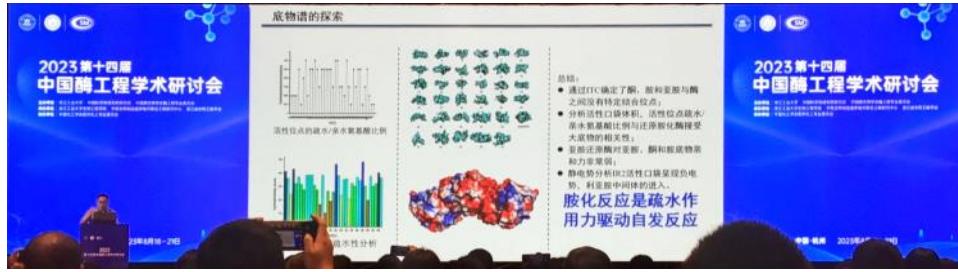
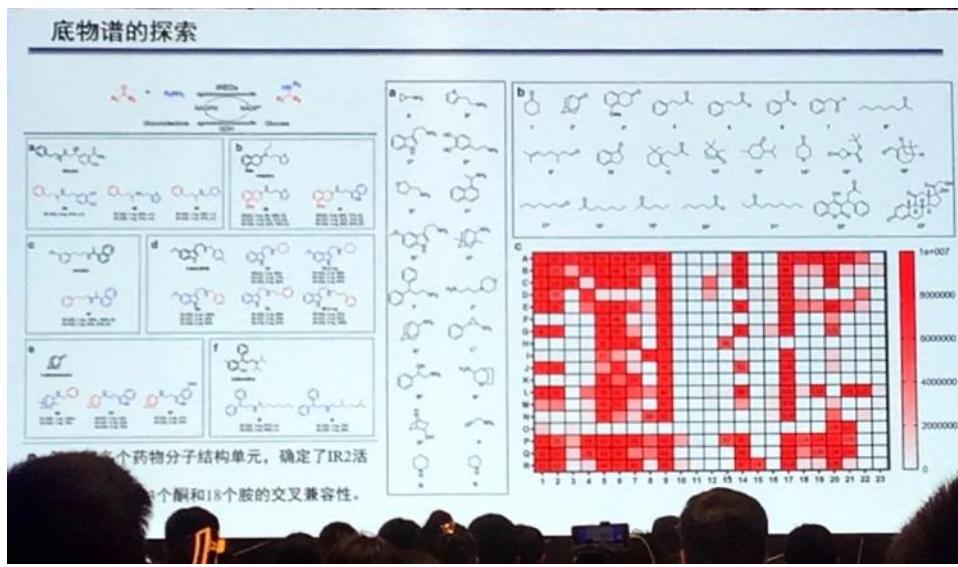
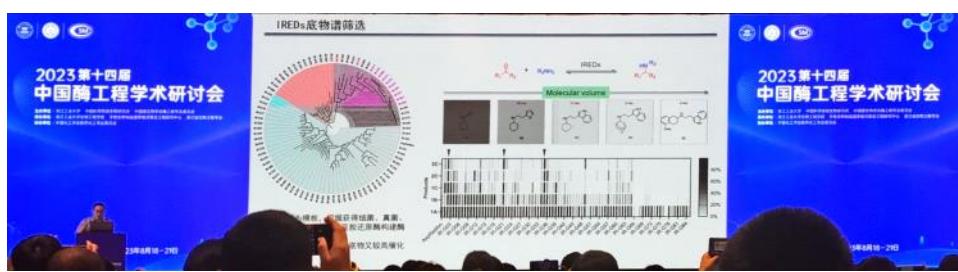
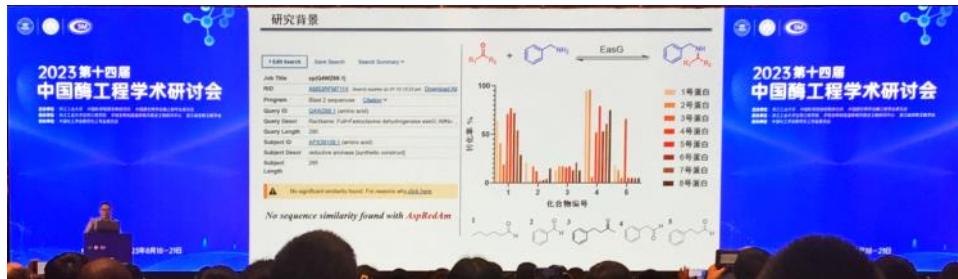
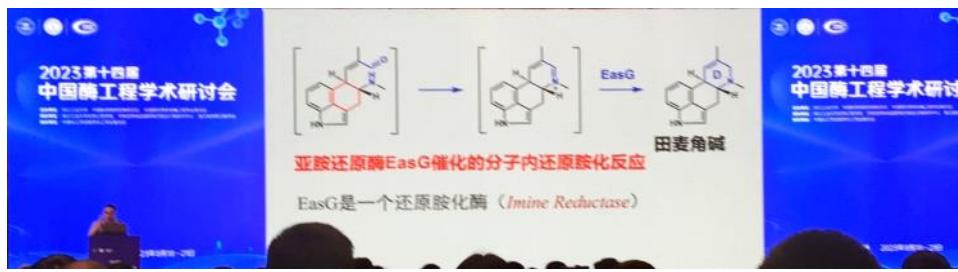
● 莱兰美高公司通过对生物还原酶的氨基酸位点进行点突变和突变组合突变，实现了EasG的工业级生产（千克级）。

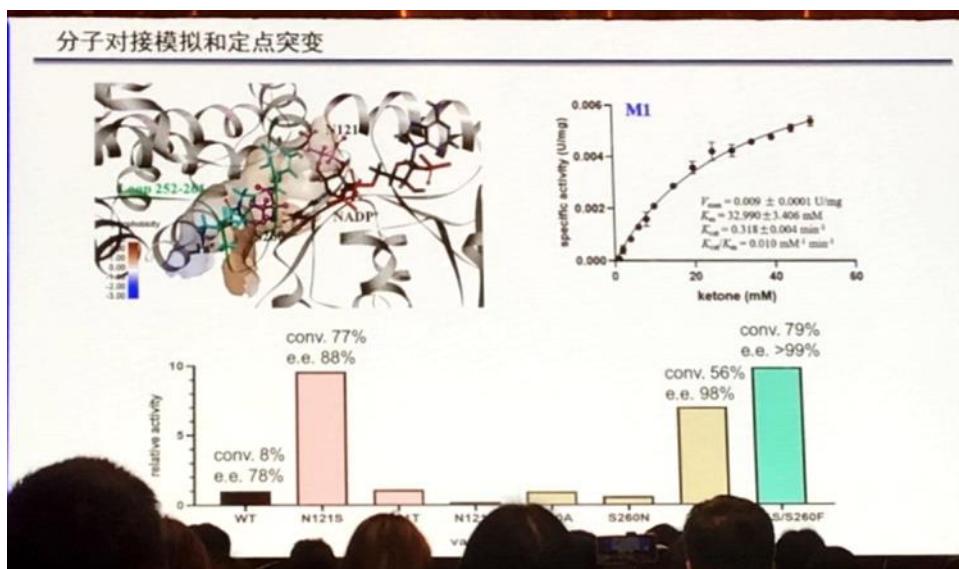
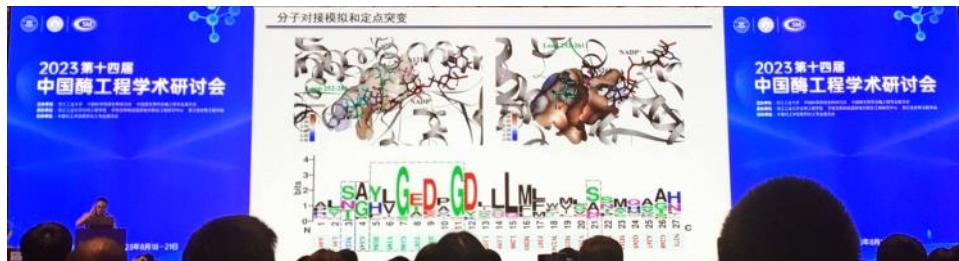
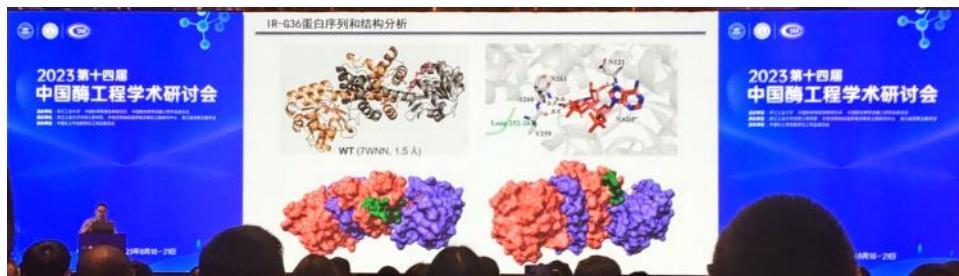
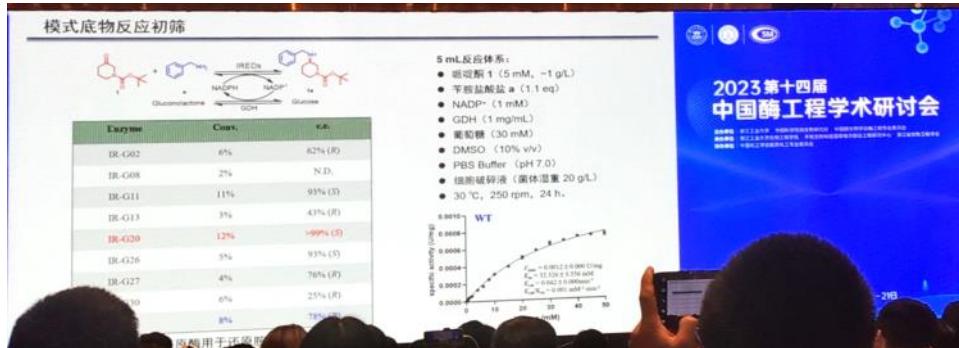
Nature Catalysis 2018, 2, 909-913  
Nature Catalysis 2021, 4, 771-782

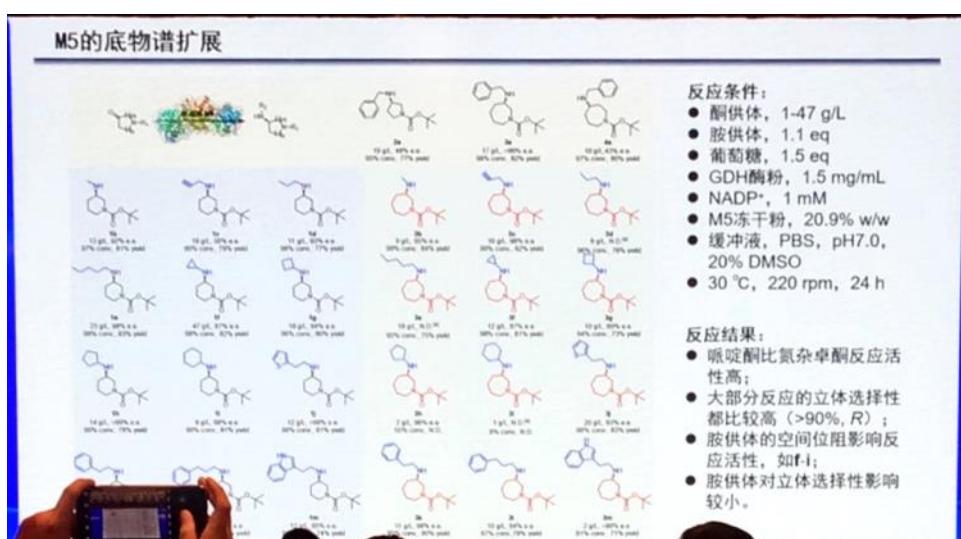
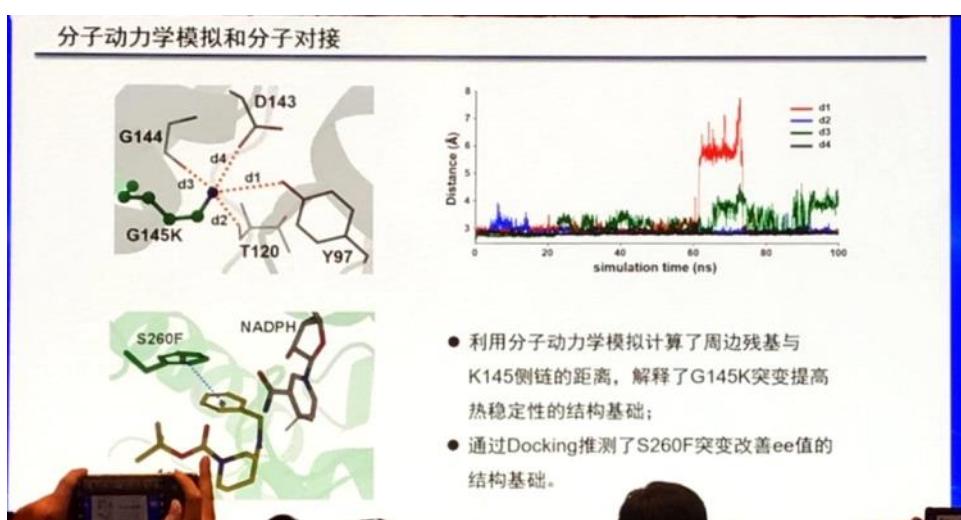
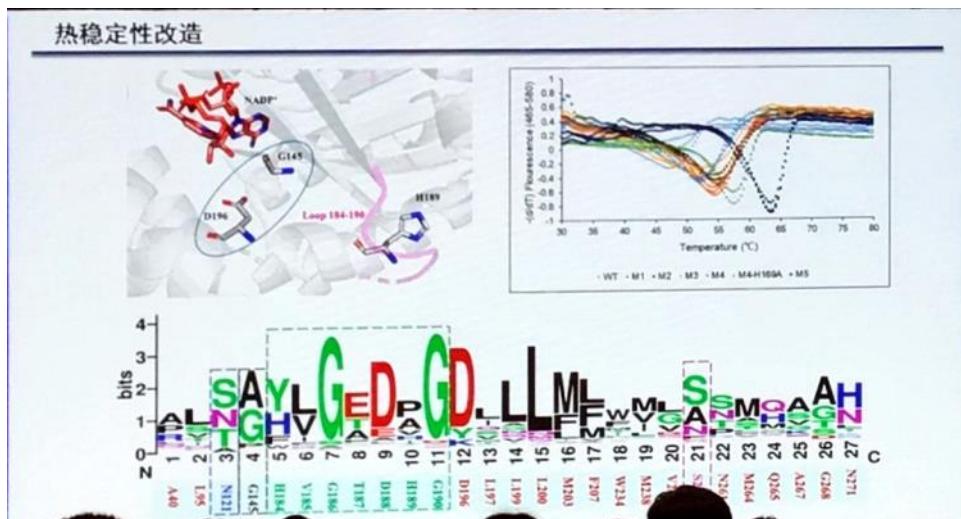
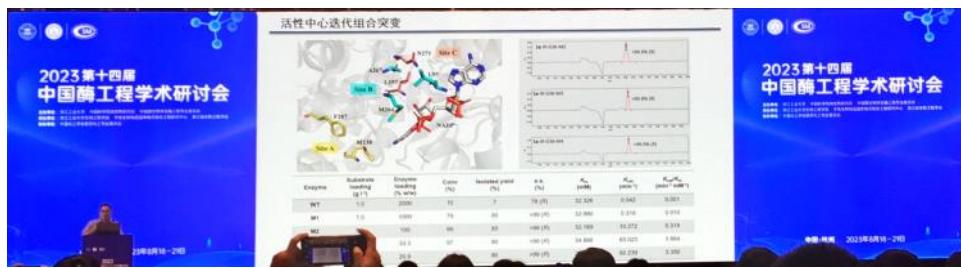
● 莱兰美高公司通过对生物还原酶的位点的单点突变和突变组合突变，实现了Argoclavine的工业级生产（吨级）。

Nature Catalysis 2018, 2, 909-913  
Nature Catalysis 2021, 4, 771-782









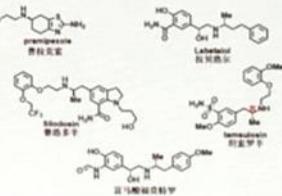


## Tuning an Imine Reductase for the Asymmetric Synthesis of Azacycloalkylamines by Concise Structure-Guided Engineering

Jun Zhang\*, Daohong Liao\*, Rongchang Chen\*, Fangfang Zhu, Yaqing Ma, Lei Gao,  
 Ge Qu, Chengsen Cui, Zhoutong Sun,\* Xiaoguang Lei,\* and Shu-Shan Gao\*

该研究为制备多功能、高效的IREDs提供了一个令人信服的例子，在医药和过程化学以及合成生物学方面都有令人兴奋的机会。

纳米人/科学网



感谢参与本研究的雷晓光研究员（实验方案设计与化学合成）与孙周通研究员（理论计算）。  
 感谢吴边研究员对本研究的帮助。  
 感谢青云瑞晶提供蛋白质晶体服务。

## 问题3：能否通过理性设计控制手性选择性？

**Identification of suitable IREDS.** The GSK IRED panel<sup>13</sup> was screened to identify enzymes competent for the desired transformation. Compared to previous screening efforts<sup>13</sup>, 10% DMSO was added as co-solvent due to the low solubility of aldehyde 3 in phosphate buffer at pH 7.0. Several enzymes catalysed the reductive amination of 3 and enantiomerically pure (1*R*,2*S*)-2-phenylcyclopropanamine mandelic acid salt (1*R*,2*S*)-1 to afford

*Nature Catalysis* 2019, 2, 909–915

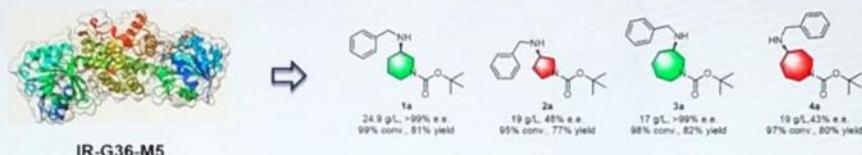
(Figure 1). A screen of the Pfizer in-house enzyme panel, consisting of over 80 wild type IRED enzymes from various sources, was performed to identify an enzyme capable of performing reductive amination of ketone 2 with methyl amine to give desired *N*-methyl amine 1. Several enzymes were identified with reductive amination activity that resulted in the formation of desired *cis* isomer 1. A few enzymes also showed activity for undesired

### 通过“筛酶”模式解决手性问题

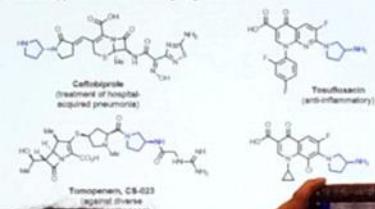


*Nature Catalysis* 2021, 4, 775–782.

## Structure-guide Rational Design of an Imine Reductase for Enantio-complementary Synthesis of Pyrrolidinamine



A. Selected pyrrolidinamine containing drug molecules

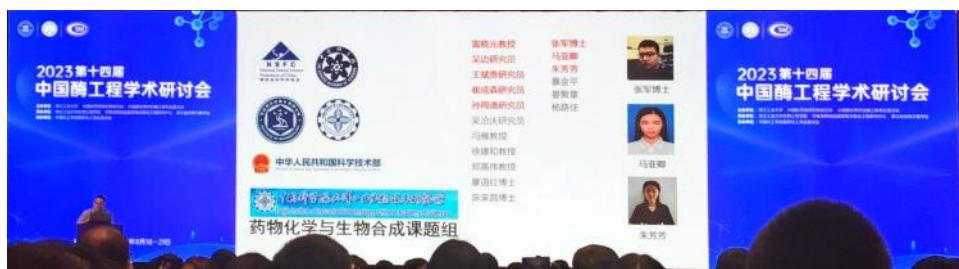
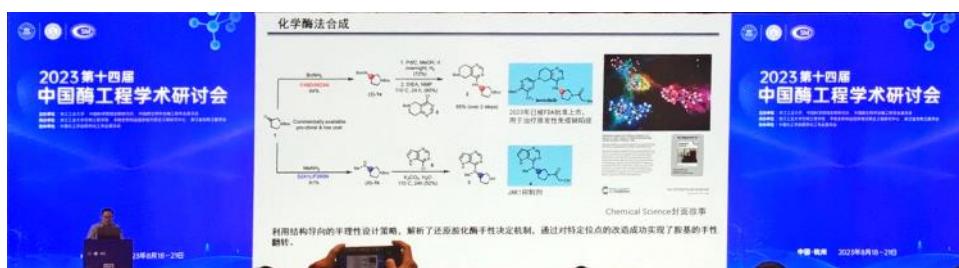
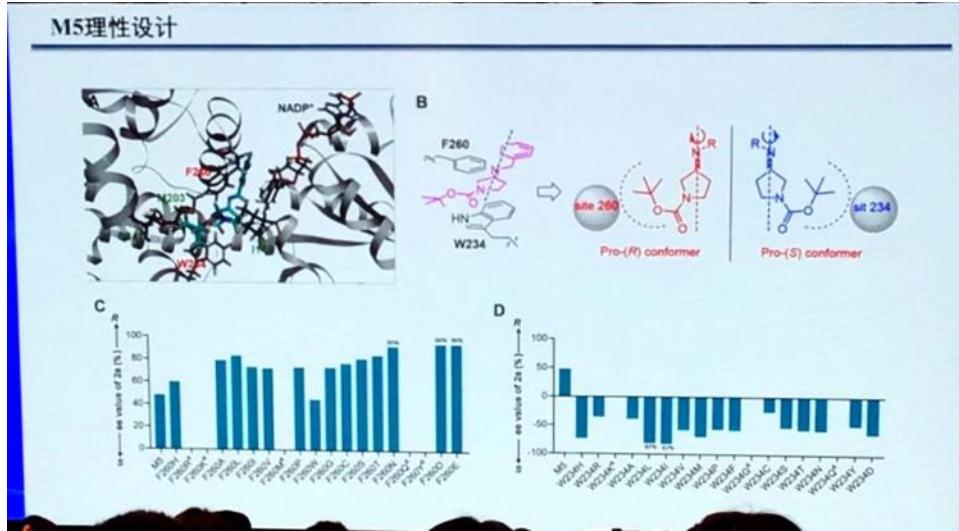


### Rational Design

13 different amines, up to 99% ee



## MS理性设计



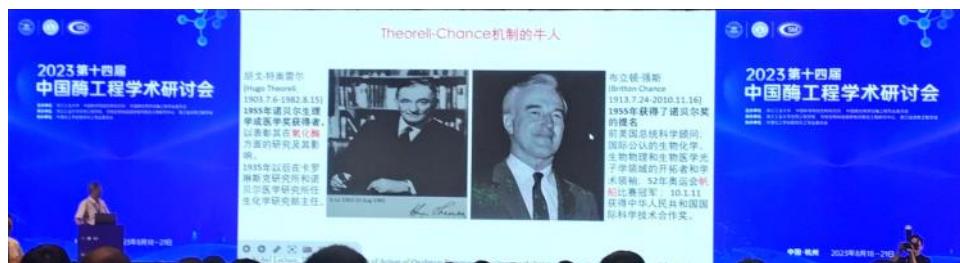
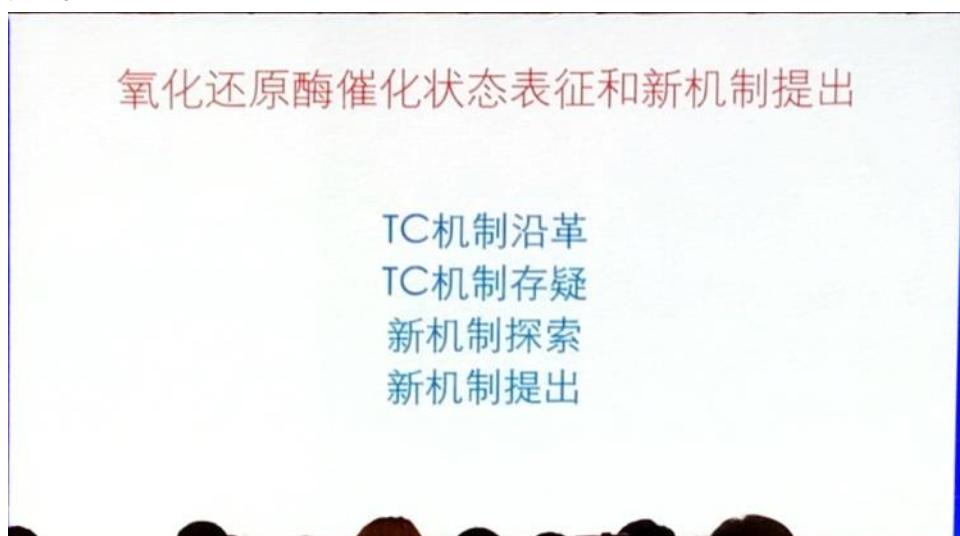
# 第十四届-12-方柏山

2023年8月19日 星期六 16:35

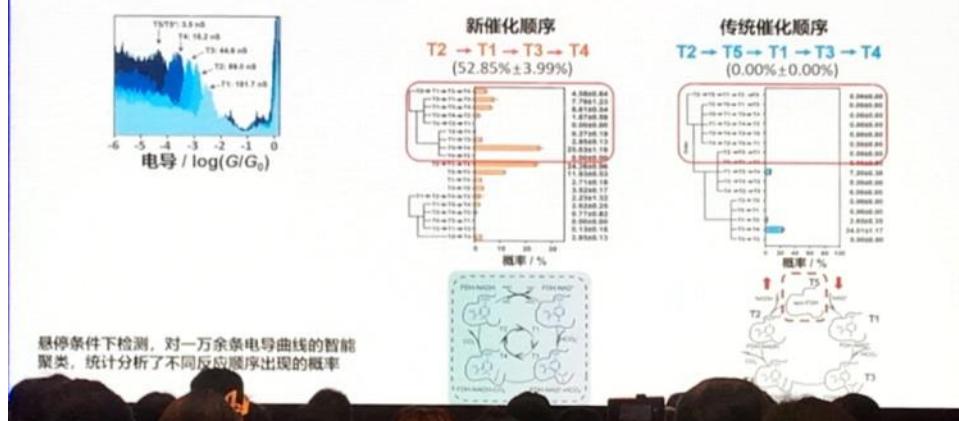
## 方柏山



## 少年才俊

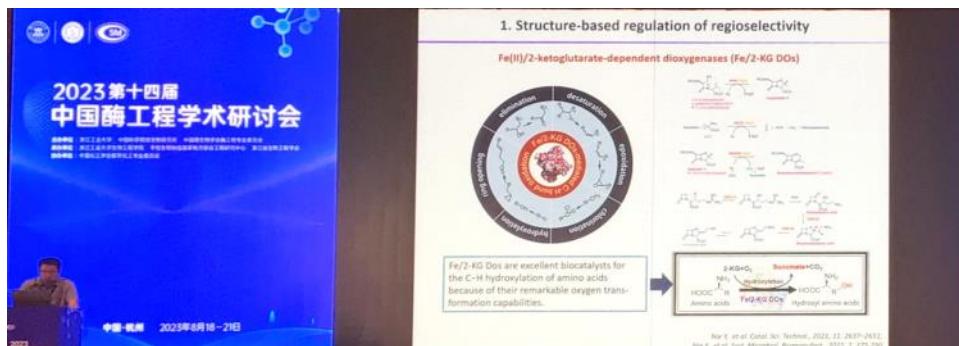


## 六、提出氧化还原酶催化新机制

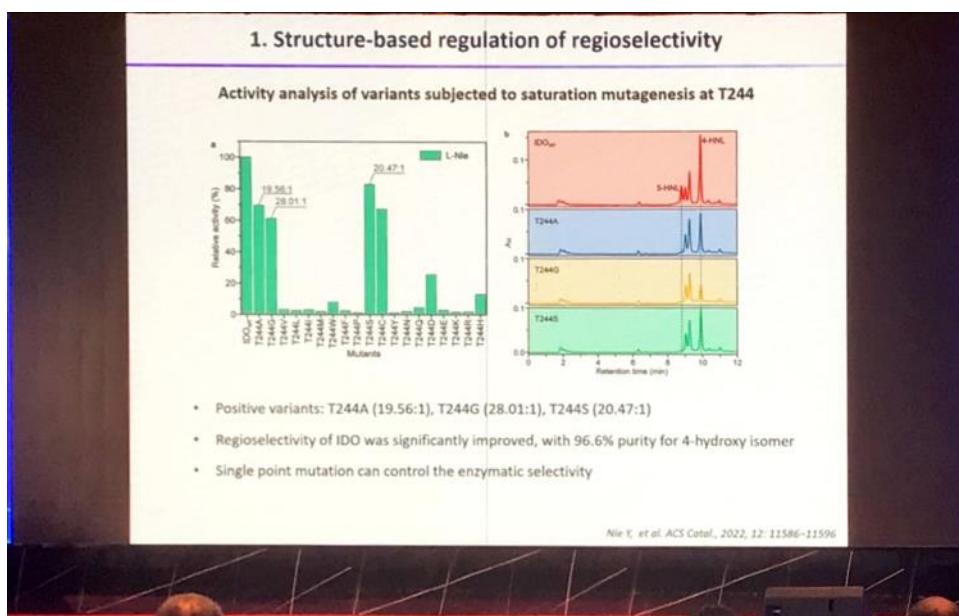
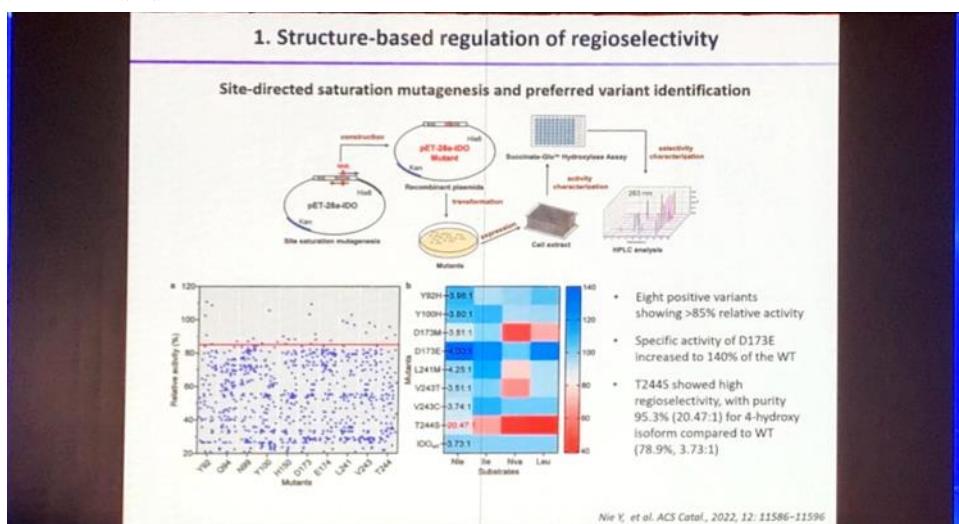


# 第十四届-13-聂尧

2023年8月20日 星期日 08:35

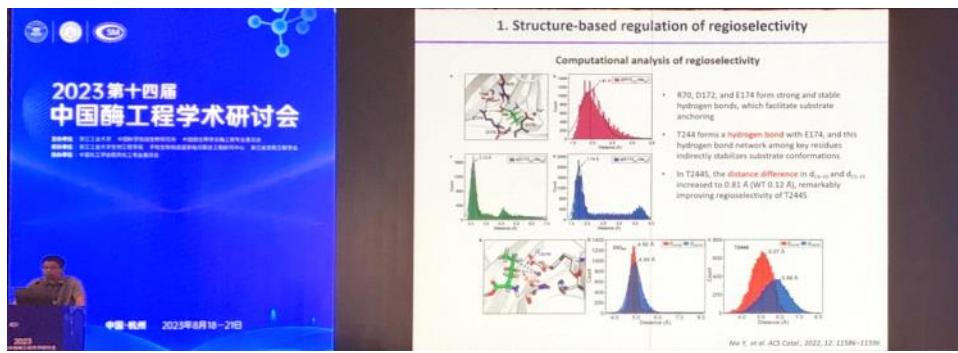
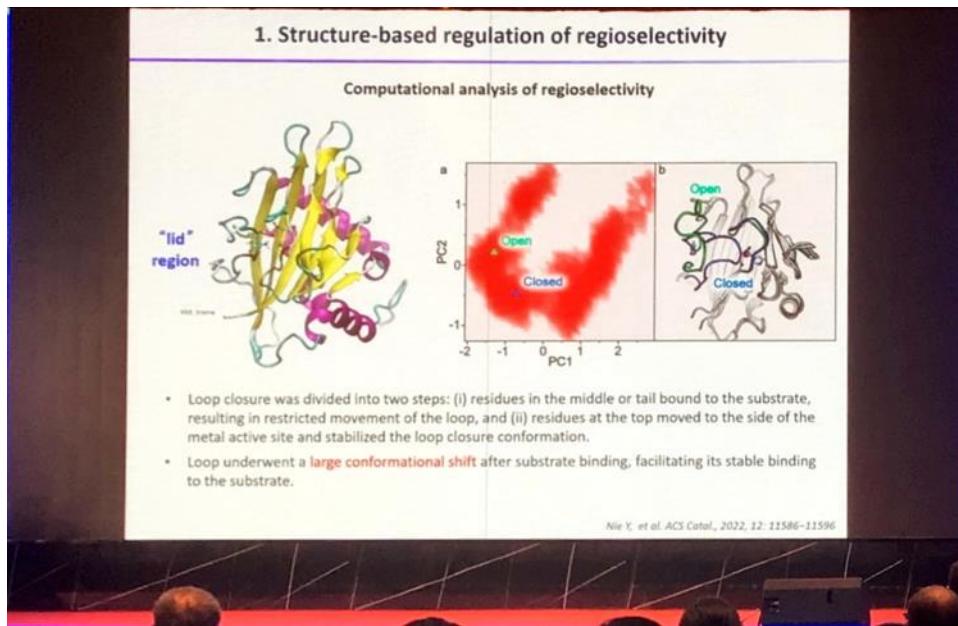


## 羟基化反应

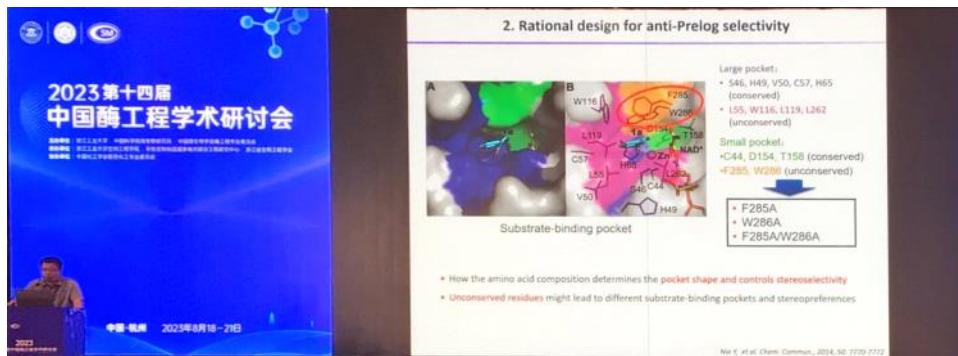
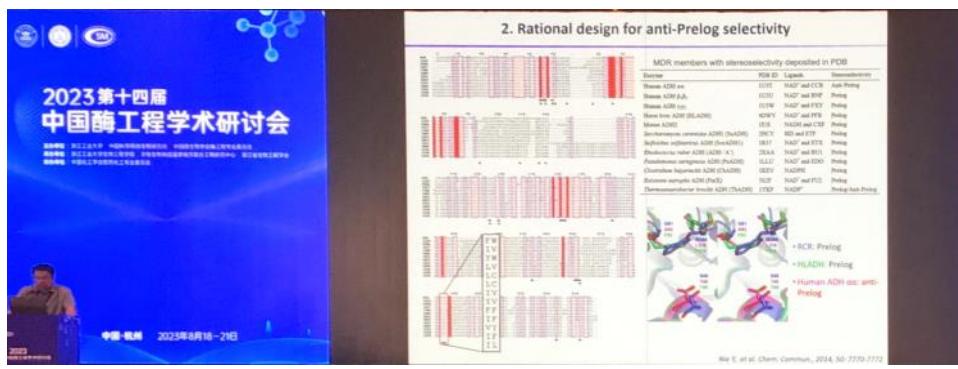


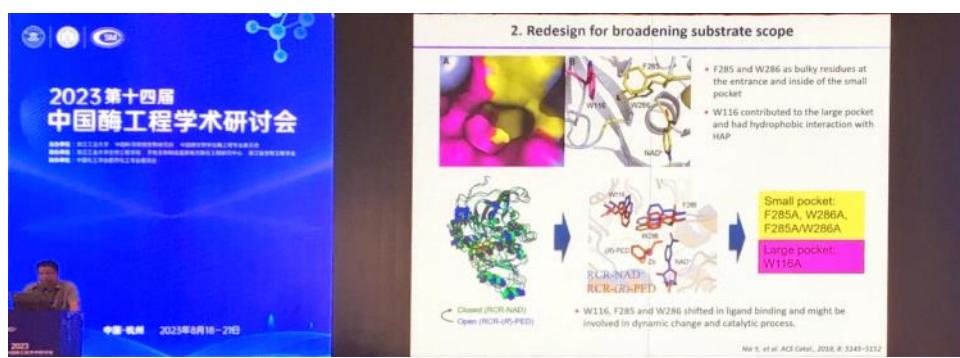
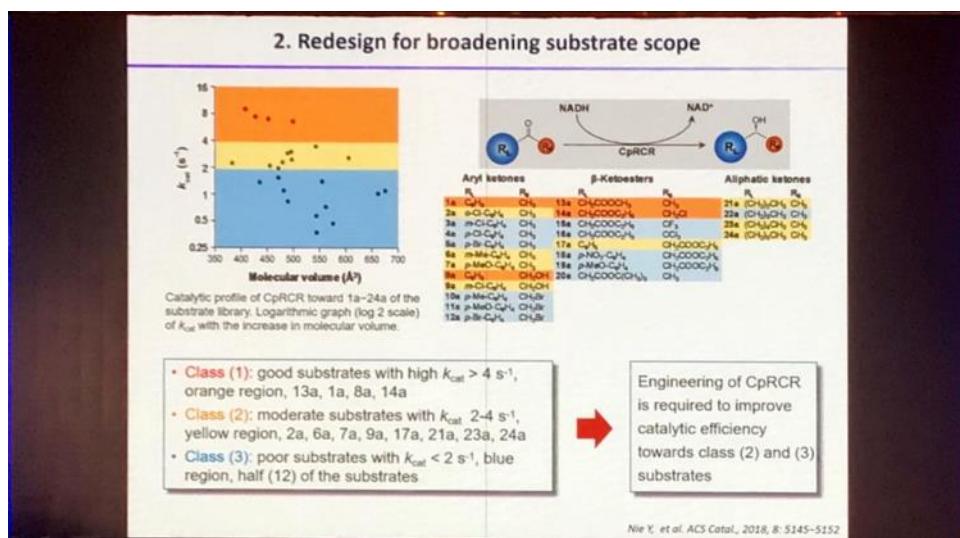
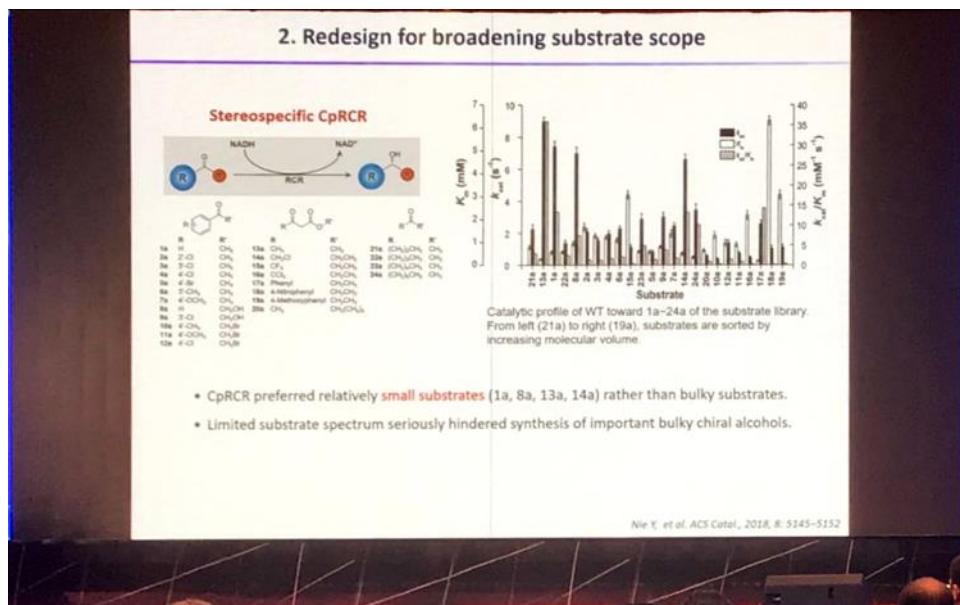
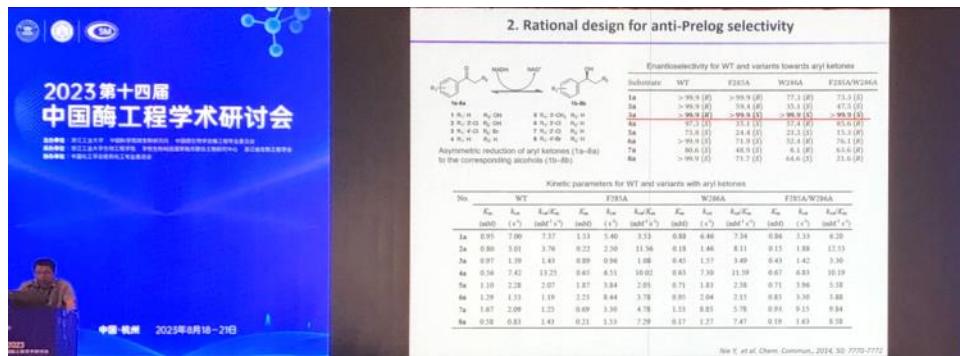
## 四位羟化选择性

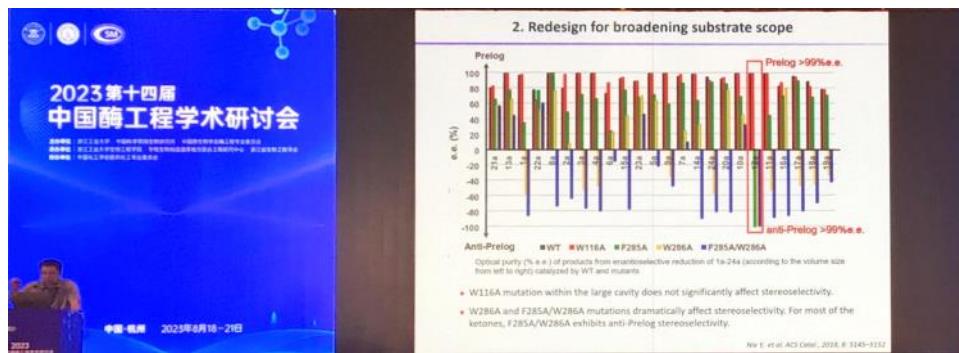
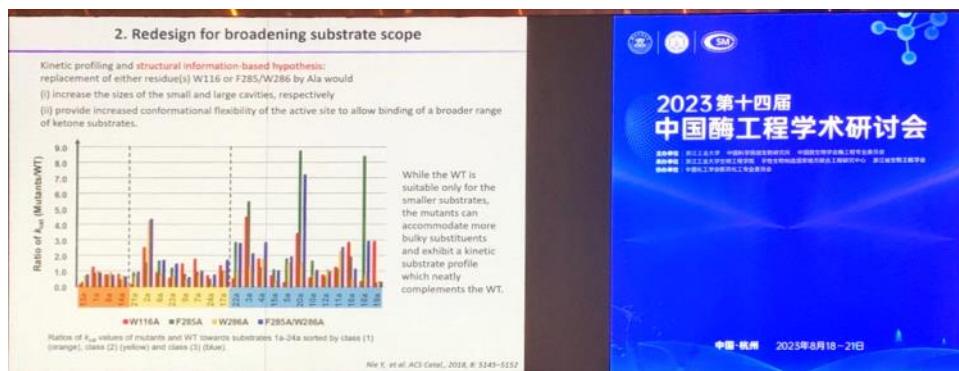
Md



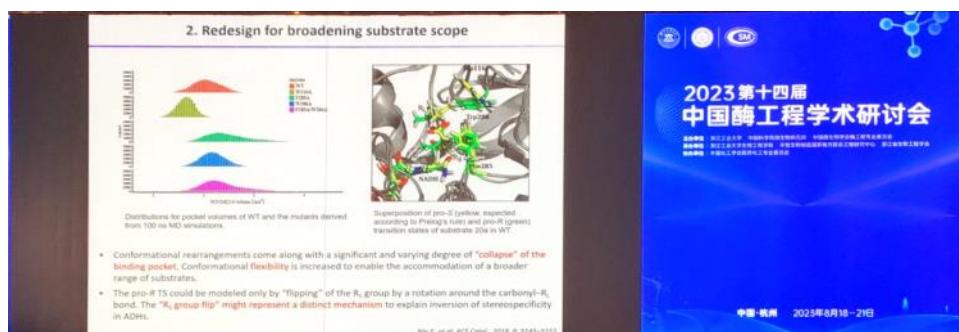
这张图要学会



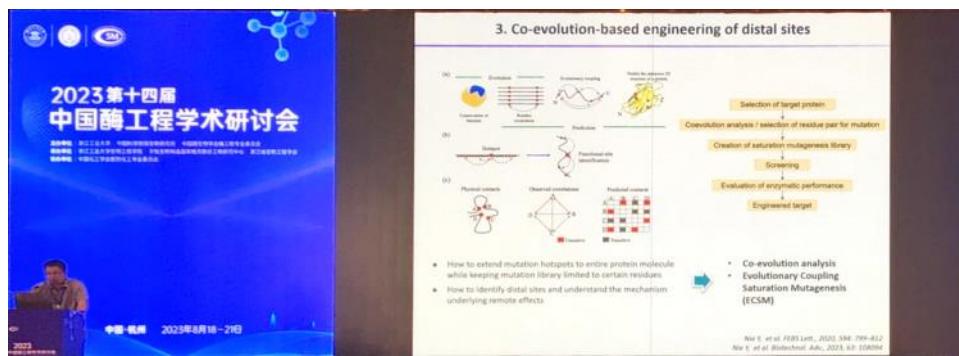
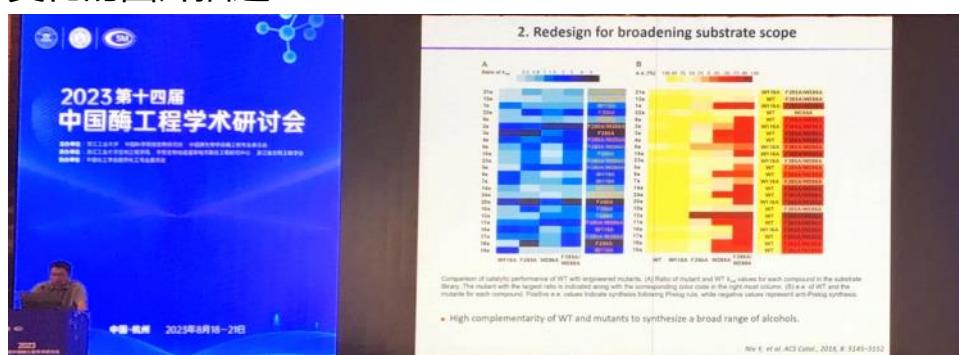




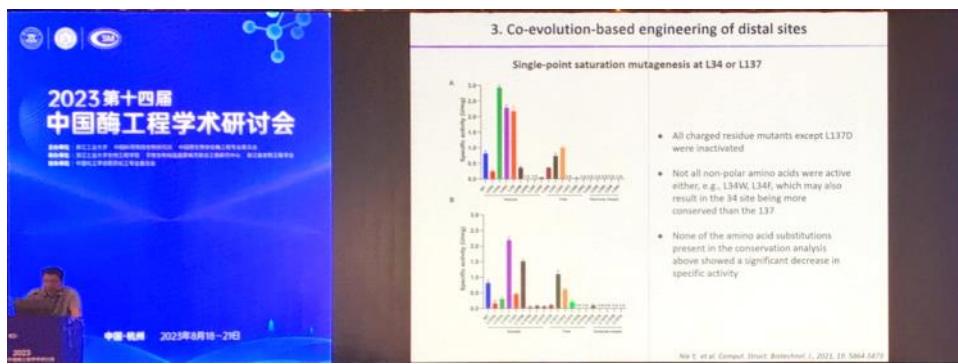
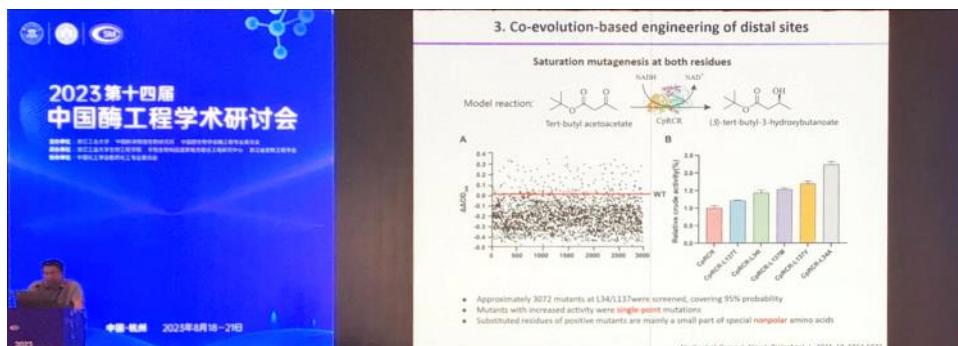
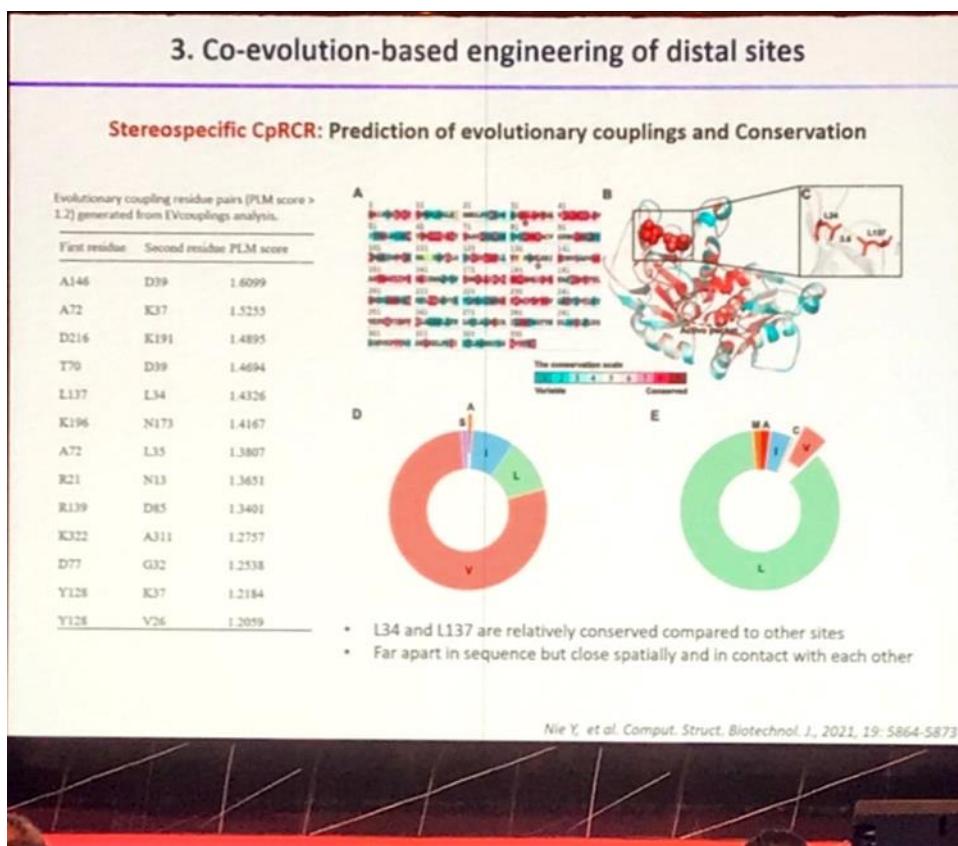
## 选择性的变化



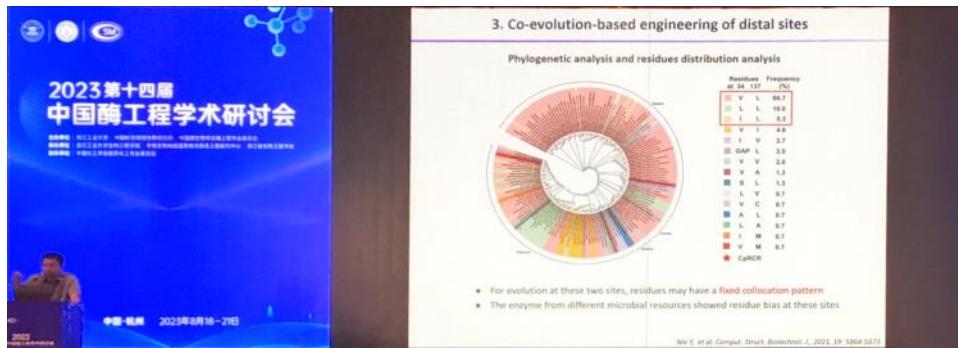
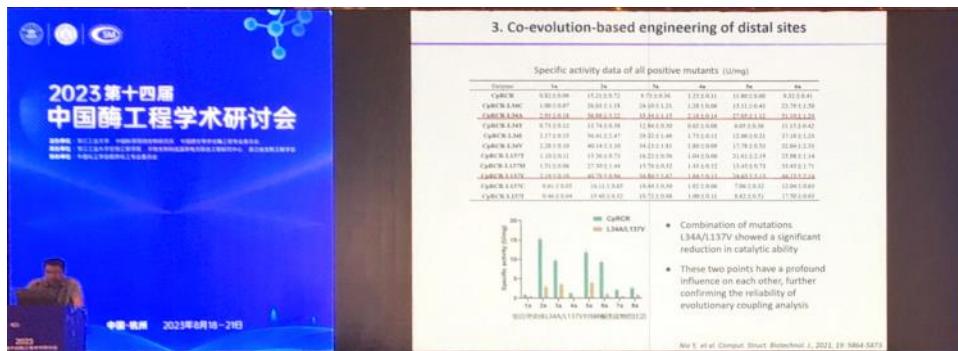
### 变化的图片描述



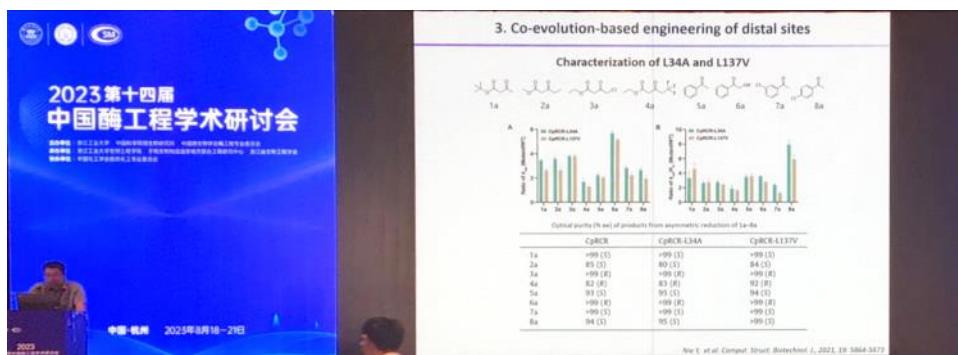
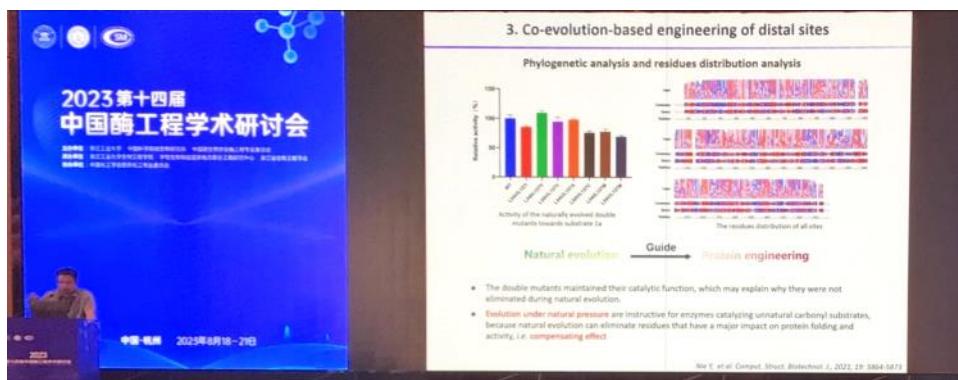
远端位点。//这个concept不够新  
共进化， a变b变

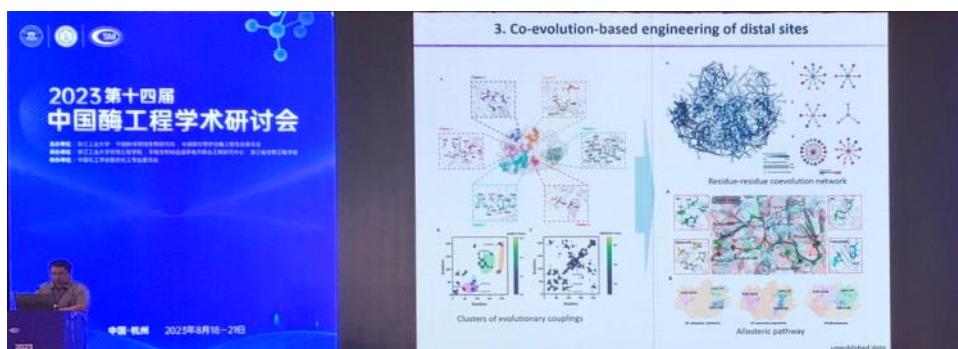
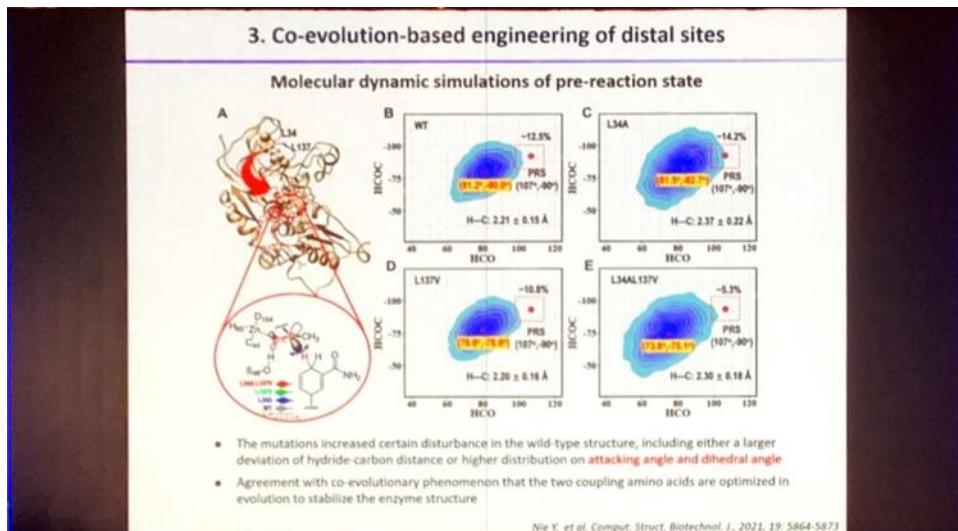


规律性

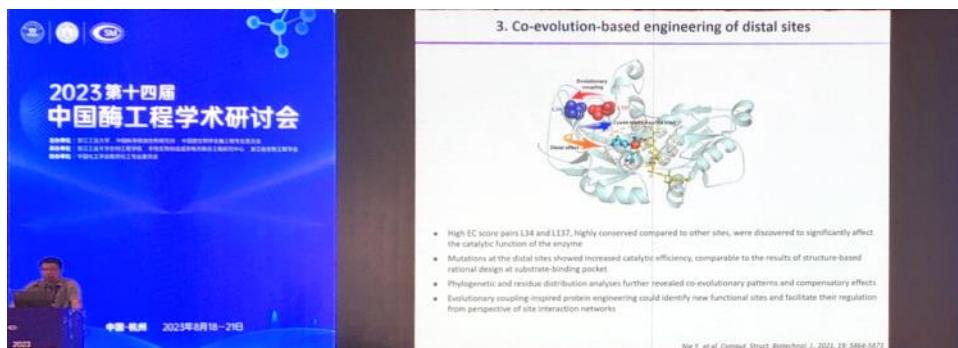


这幅图可以搞一下





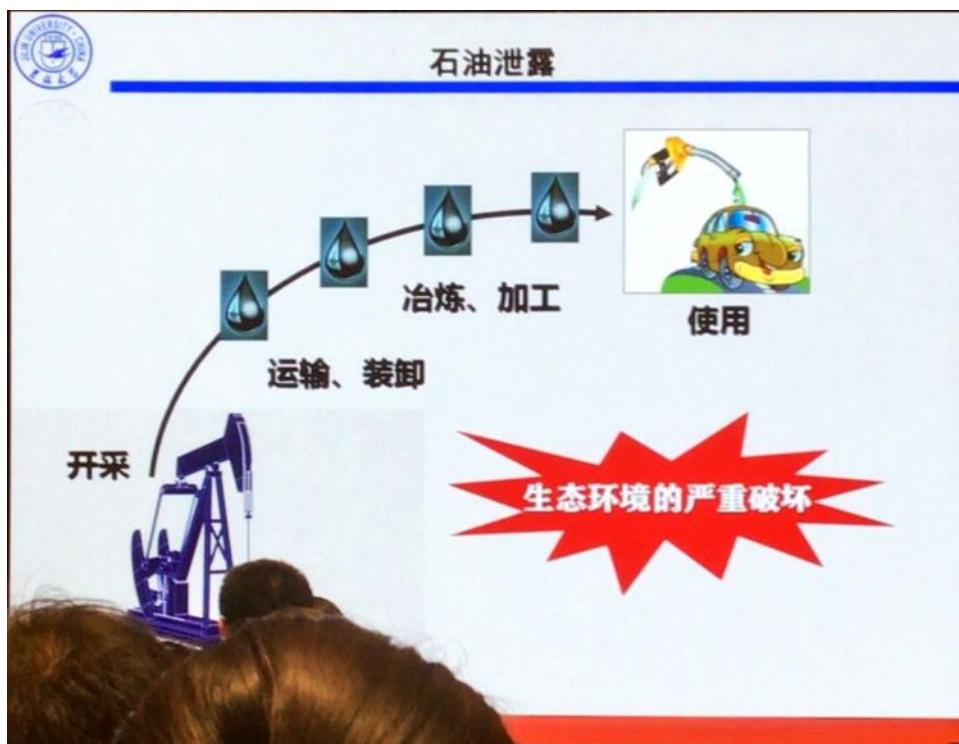
## 最短通路怎么阐述





# 第十四届-14-张应玖

2023年8月20日 星期日 08:54





## 微生物中降解石油的酶

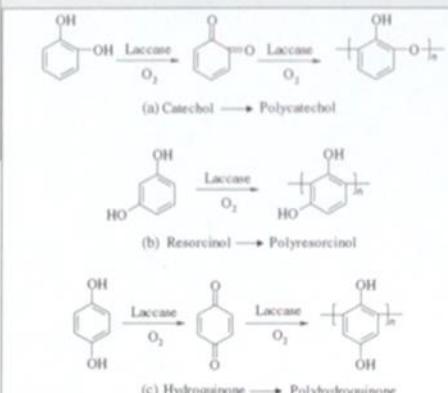
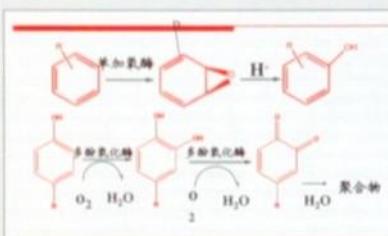


Fig. 3 Proposed schematic and chemical structure of laccase-catalyzed polymers

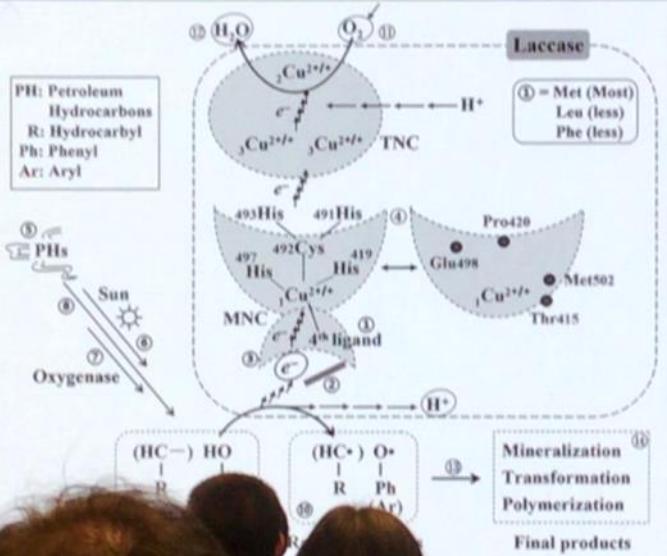
- 微生物降解石油的酶  
主要包括加氧与漆酶



细菌漆酶。



## 漆酶对芳香烃的催化转化



- 石油的生物降解性因其所含烃分子的类型和大而异。烯烃最易分解，烷烃次之，芳香烃最难降解，多环芳烃更难。

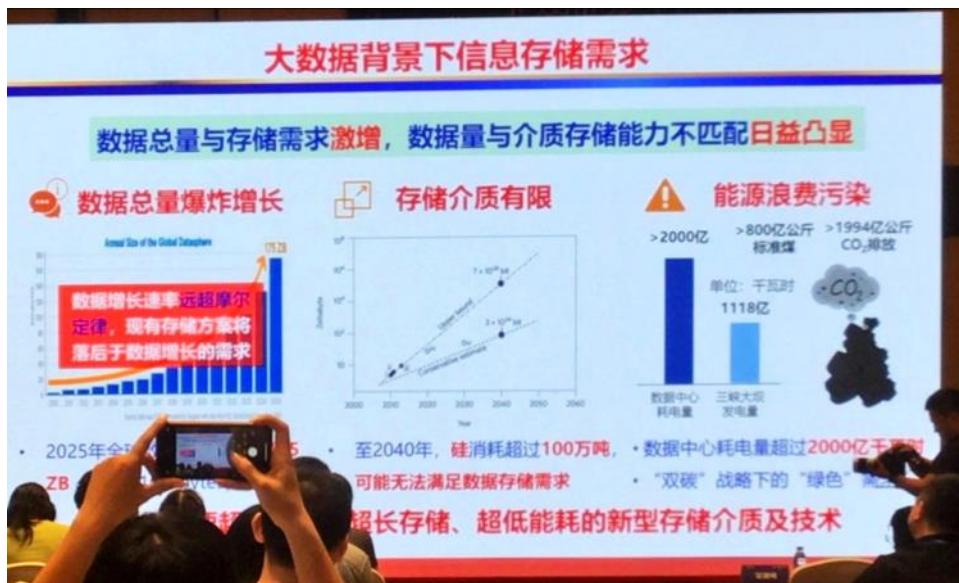
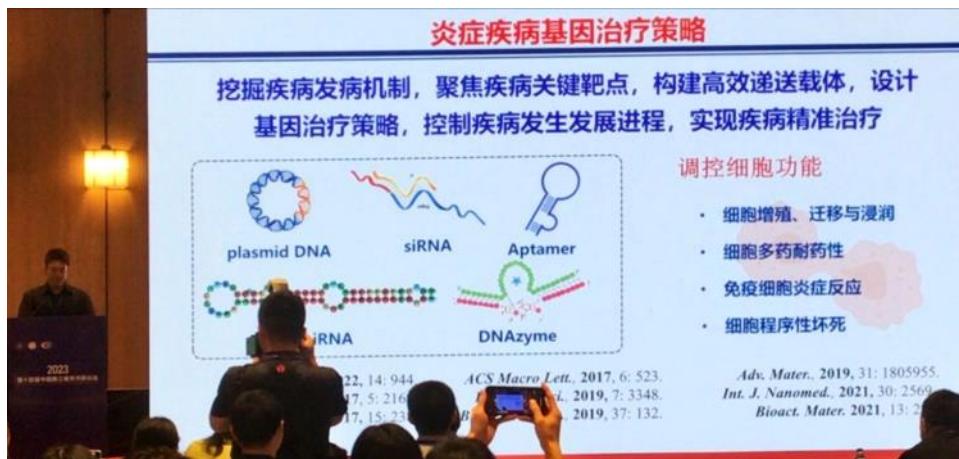
# 第十四届-15-汤晓玲

2023年8月20日 星期日 09:14



# 第十四届-16-韩浩博

2023年8月20日 星期日 09:17

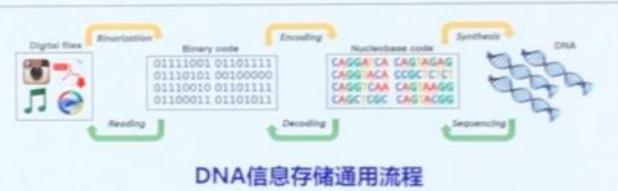


## BT与IT深度融合的存储技术：DNA信息存储

以碳基分子为骨架的DNA有望成为下一代数据存储介质



在自然界中，DNA作为基础的遗传物质，承载着生命体生长和发育的所有信息。通过将计算机1/0二进制信息转化成为A/T/G/C碱基序列，能够有效实现计算机信息在DNA介质中的存储。



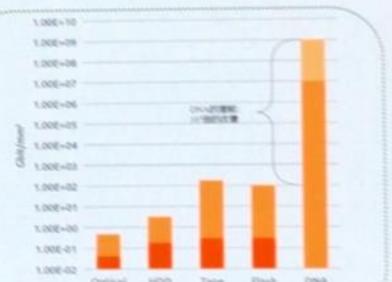
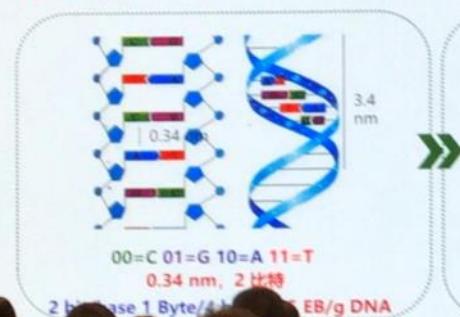
Nat. Mater. 2016, 15: 336-370.

Science 2012, 337: 1628.

Nucleic Acid Res. 2010, 38: 1541-1546.

利用DNA信息存储技术，可以将信息（二进制比特流（DNA，四进制碱基流）的形式永久保存。

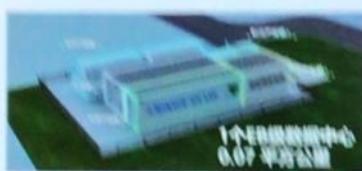
### 口 存储密度高



### DNA信息存储优势与意义

#### 口 近零能耗存储，维护成本低

EB级数据中心占地几万平方米，安全隐患多



- 功耗: 200瓦/算
- 媒介使用寿命: 5年
- 10年总拥有成本: 10亿美元

160 ZB=6个杭州市

- 占地面积小，去中心化存储
- 冰箱存储，近零能耗

## DNA信息存储优势与意义

### 口 存储安全稳定

#### 传统介质

- 温度和湿度变化可能影响磁性和光敏性存储介质，降低数据的稳定性和可读性
- 振动和机械冲击可能影响传统存储介质的读写操作，导致数据损坏
- 传统存储介质如对电磁辐射较为敏感，可能导致数据损坏或丢失



#### DNA分子

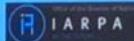
- DNA分子的化学稳定性使其在不同温度条件下都能保持数据的完整性和稳定性
- DNA信息存储不受外部磁场和机械振动的影响，意味着数据即使在恶劣的环境下也能保持稳定
- DNA分子在自然界中长期存在，具有一定耐光性，更能抵御光照和紫外辐射的影响



## DNA信息存储发展历程



“分子信息学”计划  
2017年  
寻求数据存储、检索和处理的新范例



“分子信息存储”计划  
2018年  
构建容量达1EB的DNA存储设施



“半导体合成生物学”项目群  
2017年一期、2019年二期  
研发数据存储时间超过100年且存储容量超过当前存储技术1000倍的下一代信息存储技术



Catalog将DNA存储推向市场



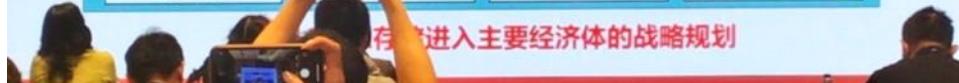
华盛顿大学实现DNA存储机读取



微软实现DNA存储自动化



微软将DNA存储规模提高到200MB

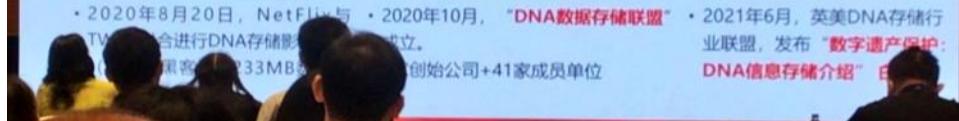


## DNA信息存储发展历程

### DNA数据存储大事记



- 2020年8月20日，Netflix与TWIST合作进行DNA存储电影《鸟黑客》发布。
- 2020年10月，“DNA数据存储联盟”成立。
- 2021年6月，英美DNA存储行业联盟，发布“数字遗产保护：DNA信息存储介绍”白皮书。



## DNA信息存储的关键瓶颈及解决策略

**成本高**  
每个存储文件均需单独合成DNA，无法重复利用

**易出错**  
DNA序列合成和读取过程中都容易出错

**通量低**  
受限于合成技术，导致无法大量DNA信息存储

**设计适用DNA信息存储的高效工具酶分子**

**HOW?**

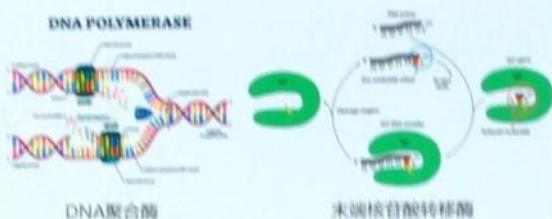
**构建基于微生物的分布式存储系统**

**开发支持分布式DNA信息存储阵列的纠删码技术**

The slide illustrates the challenges of DNA information storage (high cost, errors, low throughput) and proposes two main strategies to address them: designing efficient enzymes for DNA storage and developing distributed storage systems based on microorganisms.

## 适用DNA信息存储的高效工具酶分子开发

### 酶促DNA合成技术优势



- ✓ 环境友好度高；
- ✓ 反应条件温和；
- ✓ 副反应少；
- ✓ 产物保真性高。

以不同的酶分子相互补充，可以实现从短片段到长片段，从高错误率到低错误率的合成

## DNA聚合酶在DNA信息存储中的应用

DNA聚合酶是一种能够以亲本DNA为模板催化底物dNTP分子聚合形成子代DNA的酶，在生物体内遗传信息的复制与传递过程中发挥重要作用。

### DNA聚合酶的优势：

- > 实现存储文件的量级扩增，降低成本
- > 具有高保真性，其纠错能力能够提高复制准确度
- > 通过引物设计同时扩增多种序列，实现存储信息的高通量复制
- > 实现微尺度随机数据访问

## DNA聚合酶在DNA信息存储中的应用

寡核苷酸池

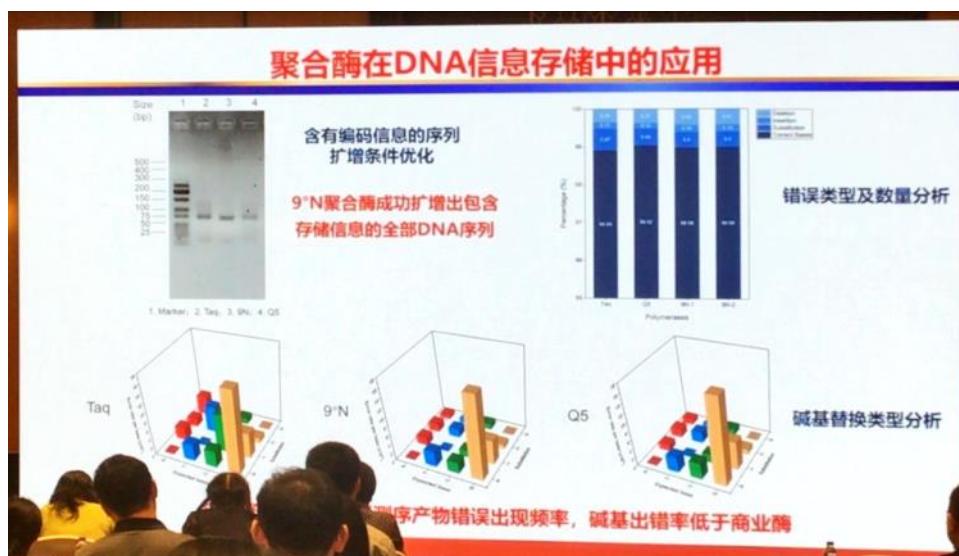
1次 PCR扩增

10次 PCR扩增

商业化DNA聚合酶的缺陷：

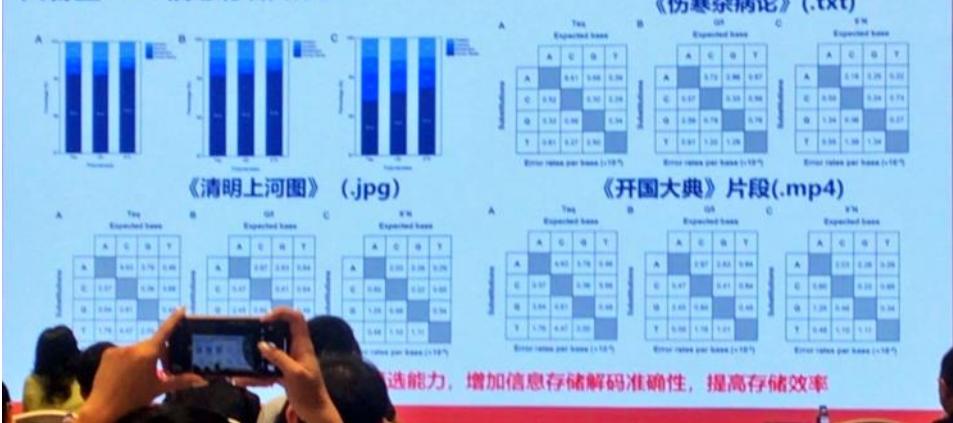
- 高含量核酸文库才能实现有效的信息存储
- DNA序列不均一性；DNA序列拷贝数差
- 异过大，加深测序深度，造成算力浪费，测序成本增加
- DNA序列错误越大，造成信息丢失；纠删码可以解决碱基突变等问题，但增加测序资源，浪费测序时间

开发合适的DNA聚合酶，适配DNA信息存储，提高存储效率



## 聚合酶在DNA信息存储中的应用

### 大容量DNA信息存储研究



## DNA聚合酶催化关键残基分析

### 关键残基接触分数差异性分析

根据RMSD值对整个模拟过程划分了结合阶段，并计算了底物dNTP与蛋白质活性位点重要残基的接触分数，以热图形式呈现分析结果。

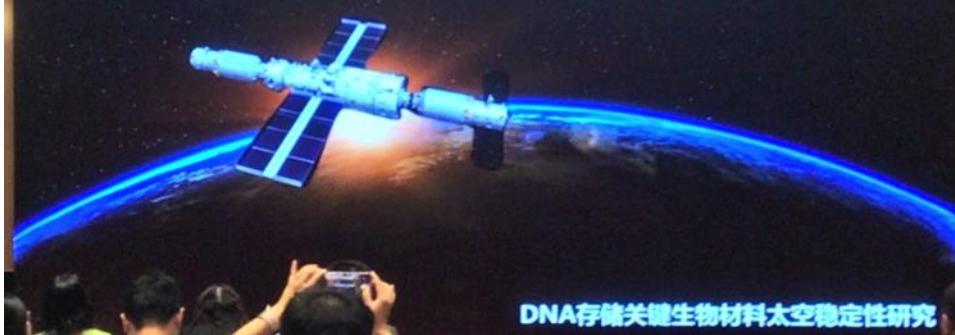
#### 重要残基：

- D404/D542 催化三联体
- K487/N491 与传入dNTP三磷酸处于氢键距离
- Y409/Y494 辨别脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸

成功筛选得到9°N DNA聚合酶，并进行了主要酶学性质的表征和催化机制的初步解析，结合其在体外信息存储应用中的高保真性，有望成为应用于大容量体内信息存储的高效工具酶。

## 未来应用场景：空天数据中心

体积小 重量轻 抗辐射 低能耗



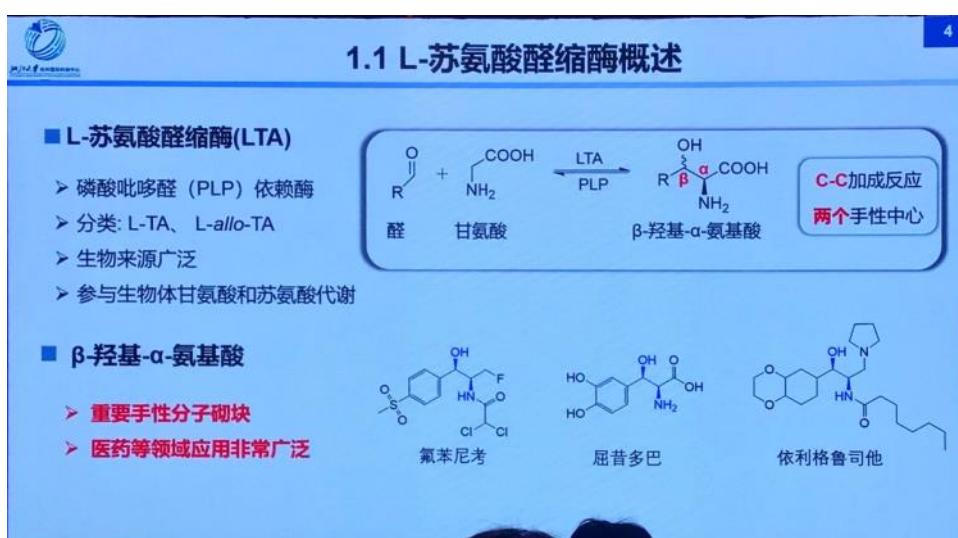
# 第十四届-17-郑文隆

2023年8月20日 星期日 09:34



报告内容 CONTENTS

- 1 L-苏氨酸醛缩酶概述
- 2 LTA非对映体选择性机理解析及改造
- 3 LTA选择性/活性trade-off机制
- 4 LTA热稳定性改造
- 5 LTA固定化及应用
- 6 总结



## 1.1 L-苏氨酸醛缩酶概述

4

■ L-苏氨酸醛缩酶(LTA)

- 磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖酶
- 分类: L-TA、L-*allo*-TA
- 生物来源广泛
- 参与生物体甘氨酸和苏氨酸代谢

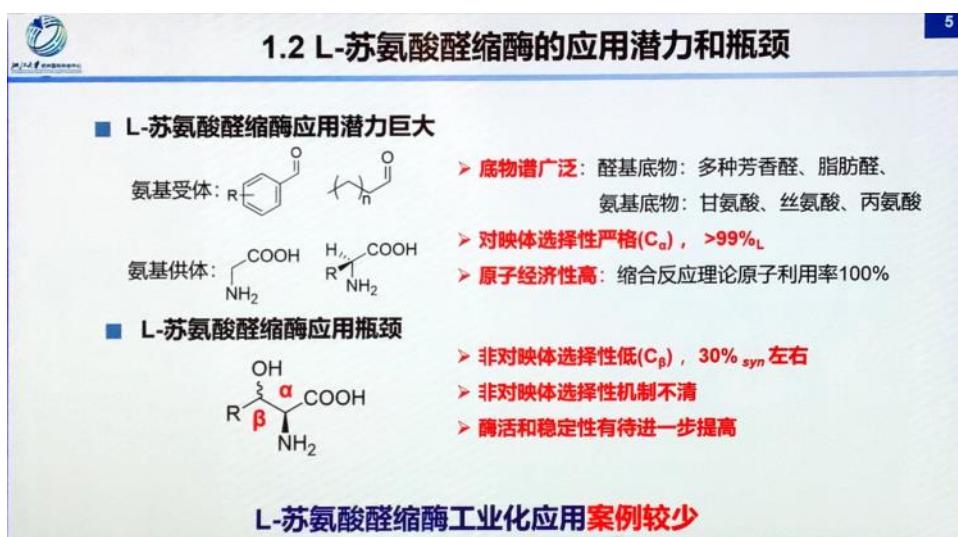
醛 + 甘氨酸  $\xrightarrow[\text{PLP}]{\text{LTA}}$   $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸

C-C加成反应  
两个手性中心

■  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸

- 重要手性分子砌块
- 医药等领域应用非常广泛

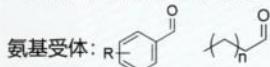
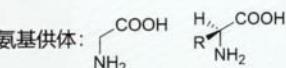
氟苯尼考 屈昔多巴 依利格鲁司他



## 1.2 L-苏氨酸醛缩酶的应用潜力和瓶颈

5

■ L-苏氨酸醛缩酶应用潜力巨大

氨基受体:  氨基供体: 

- 底物谱广泛: 醛基底物: 多种芳香醛、脂肪醛、氨基底物: 甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸
- 对映体选择性严格( $C_o$ )，>99%<sub>L</sub>
- 原子经济性高: 缩合反应理论原子利用率100%

■ L-苏氨酸醛缩酶应用瓶颈

$\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸

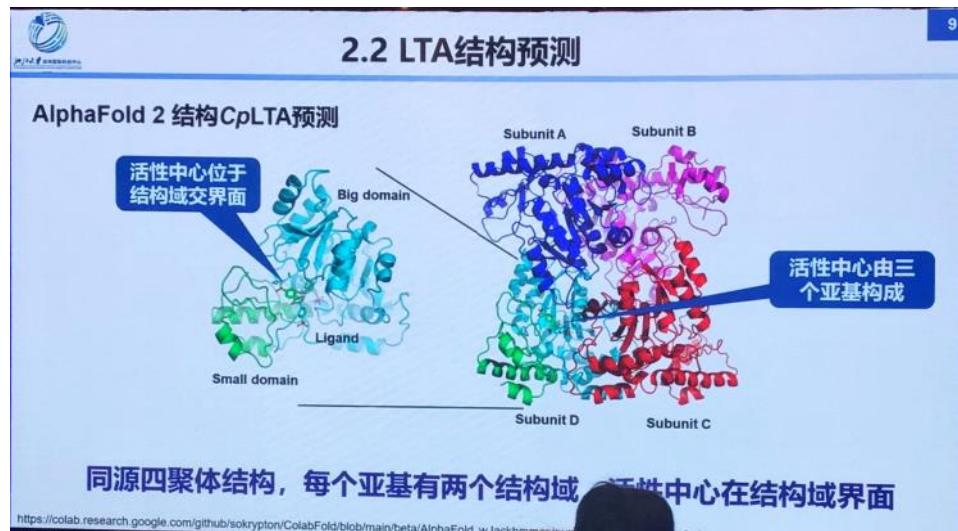
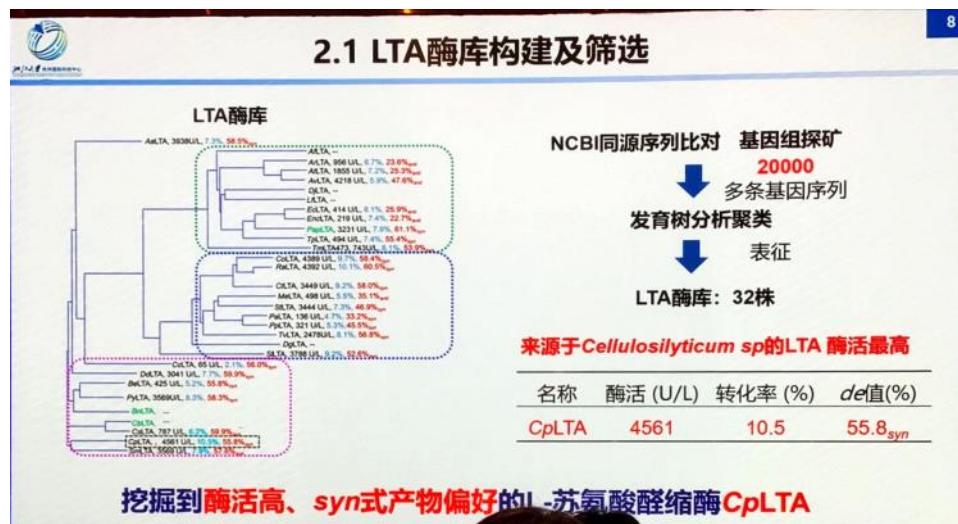
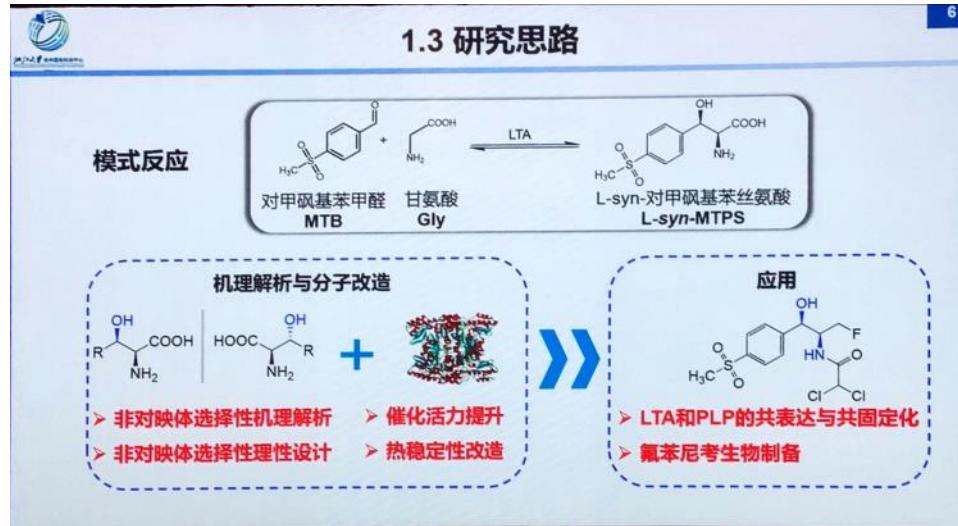
- 非对映体选择性低( $C_\beta$ )，30%<sub>syn</sub>左右
- 非对映体选择性机制不清
- 酶活和稳定性有待进一步提高

L-苏氨酸醛缩酶工业化应用案例较少



## 1.3 研究思路

6

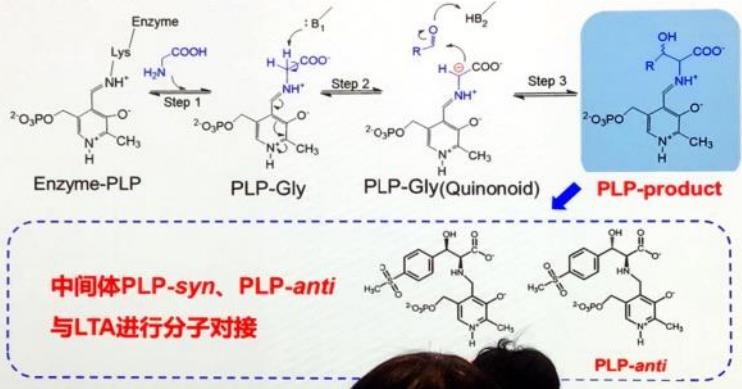




## 2.3 LTA催化机理分析-对接配体选择

10

### 分子对接：配体选择

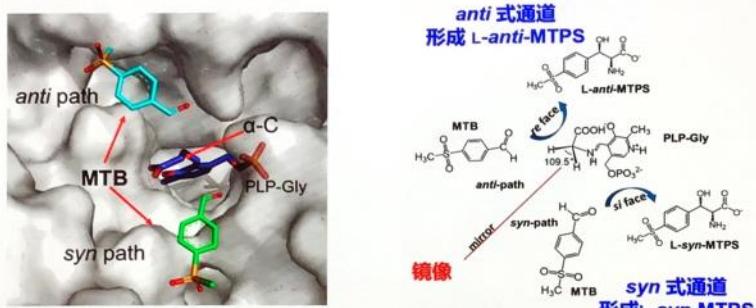


## 2.5 LTA非对映体选择性机理初探

12

### 路径假说：LTA存在两个底物通道

底物从不同的通道进入活性中心产生不同构型的产物



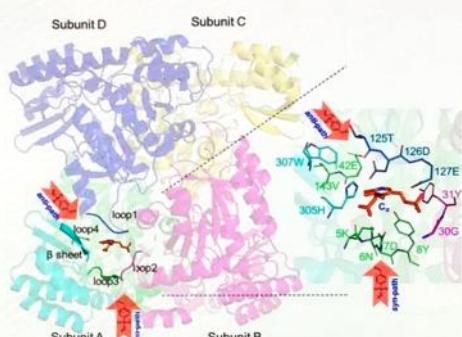
ACS catal, 2021, 11, 3198–3205.

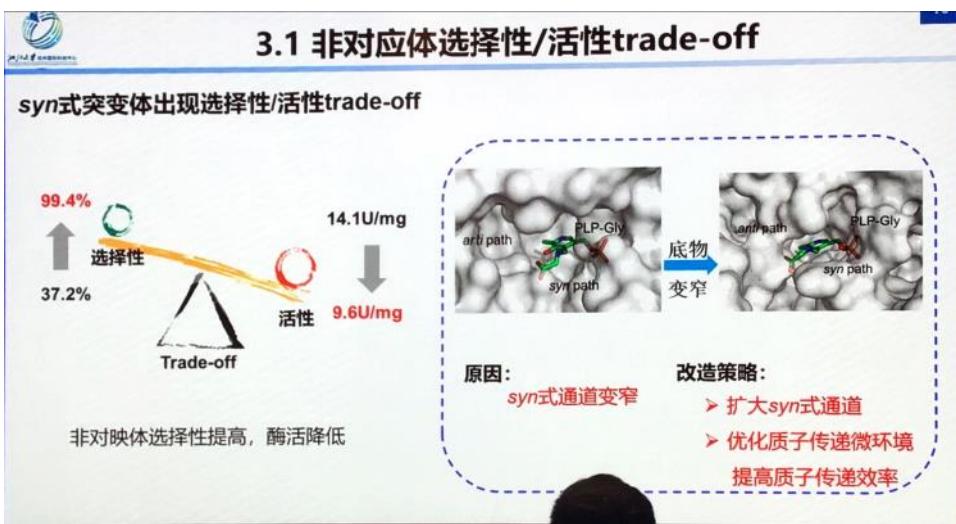
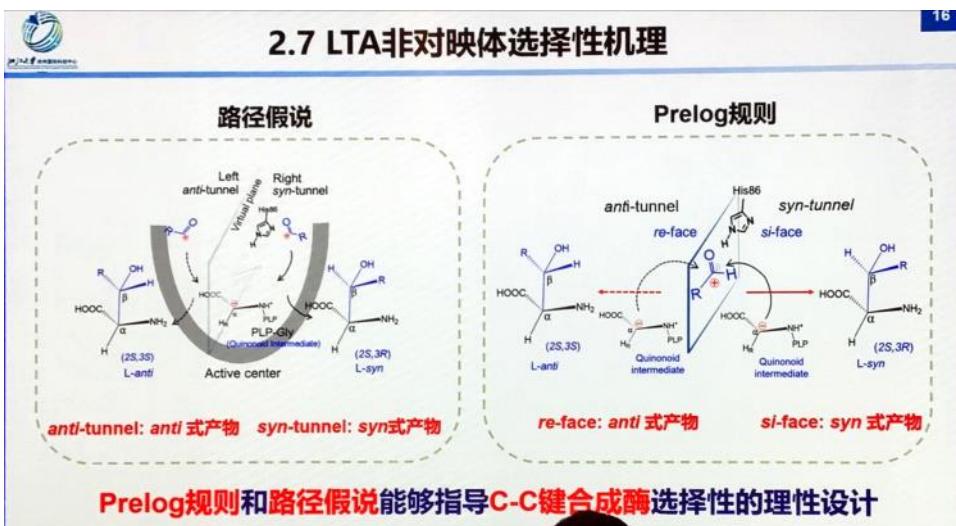
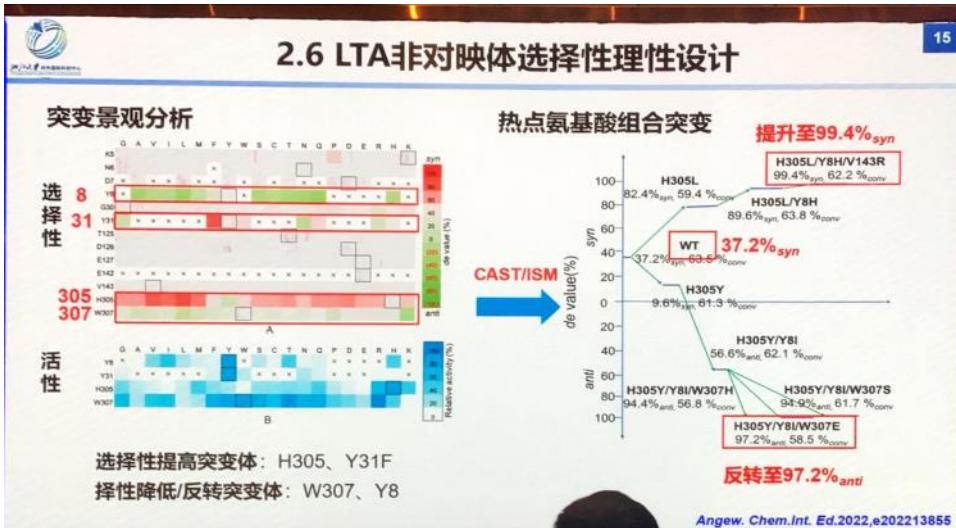


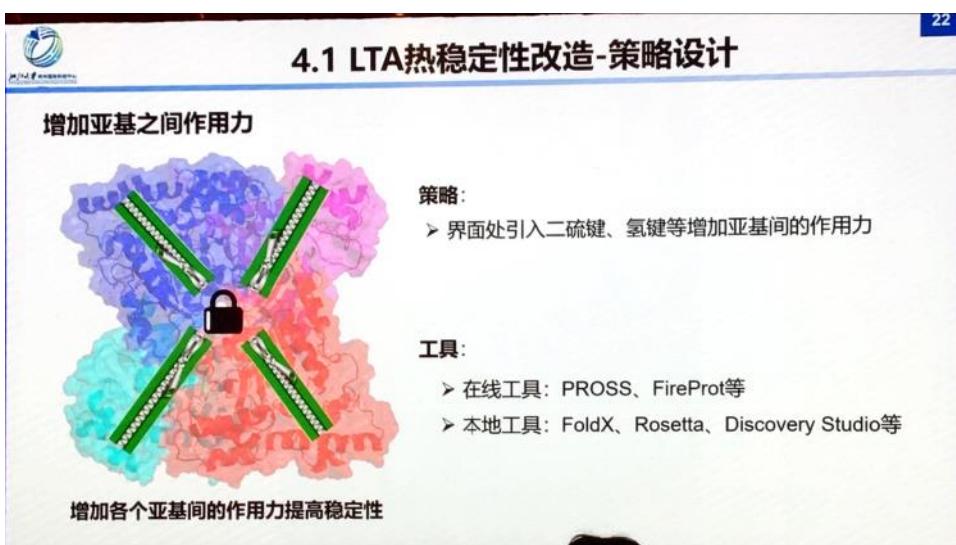
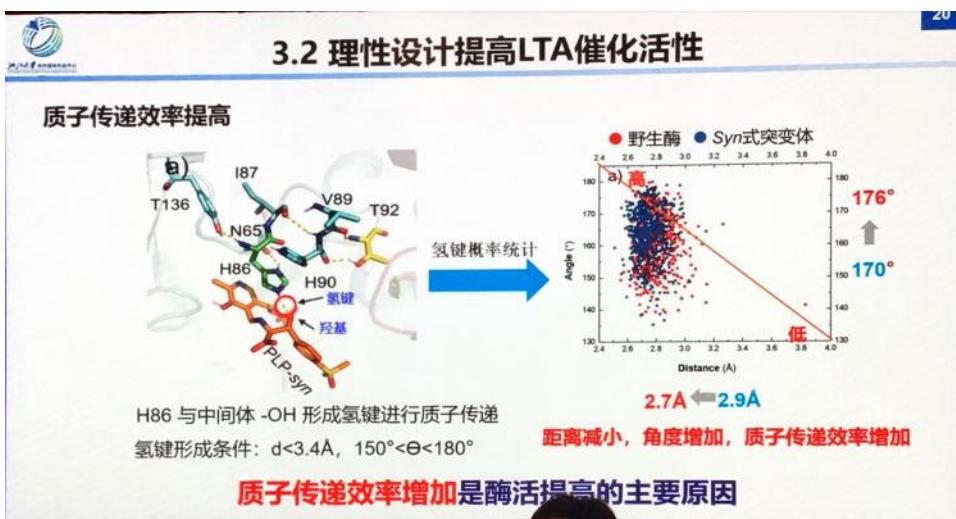
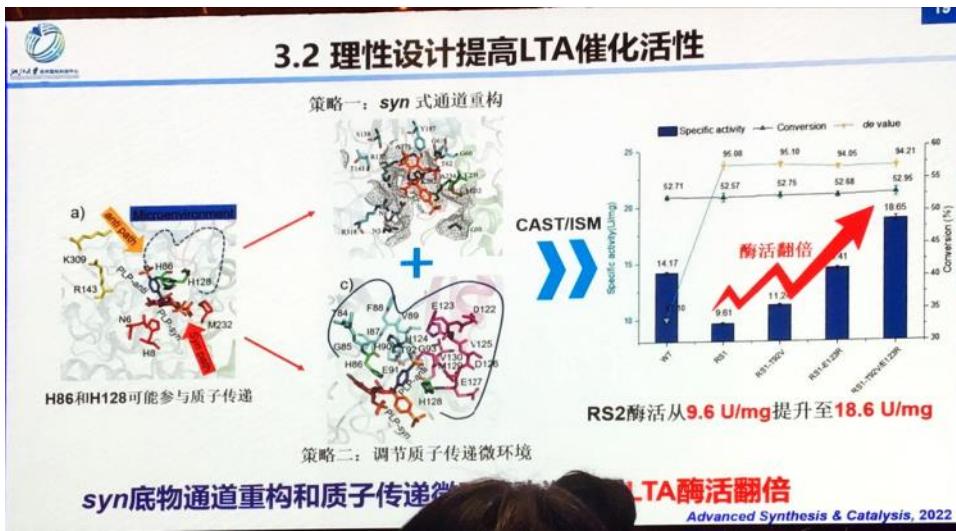
## 2.6 LTA非对映体选择性理性设计

14

### 底物通道热点氨基酸残基





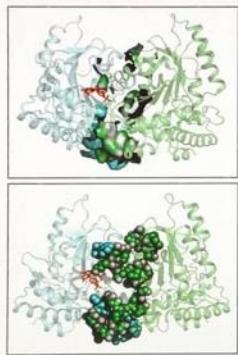




## 4.2 LTA热稳定性改造-定向进化

23

### 介面残基搜索与改造



亚基界面处热点氨基酸残基

能量计算推荐

S9、E10、G11、**A12**、H13、P14、R15、I16、L17、Q18、A19、L20、G91、**V21**、E22、S23、N24、**L25**、Q26、Q27、**V59**、**G85**、T92、G93、A94、I95、E96、A97、T98、G99、**E123**、L206、**M207**、G208、K227、Q228、L229、G230、**A231**、S235、G236、R237

定点饱和突变

S9R、A12C、V21C、L25F、V59  
G85、E123、M207L、A231G

组合突变/  
迭代突变

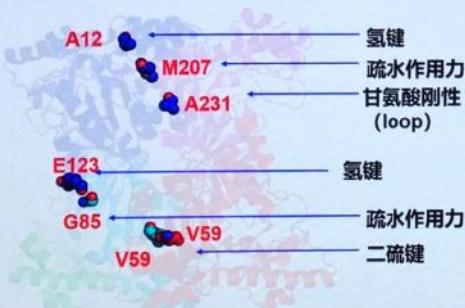
(A3)



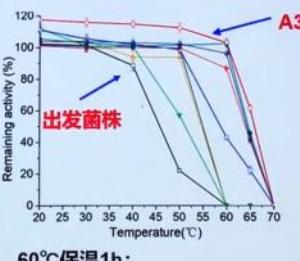
## 4.3 LTA热稳定性改造-结果分析

24

### 结果分析



### 不同温度下保温1h残余酶活比较



60℃保温1h:  
 > 出发菌株失活  
 > 突变体A3酶活残余85%

界面残基改造使LTA的热稳定性大幅提高，Tm值增加16°C



## 5.1 LTA固定化策略

26

### PLP/LTA共固定化

#### 工业化应用问题:

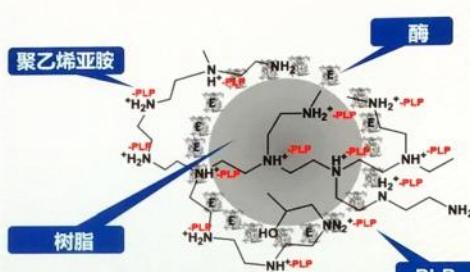
- > 酶和PLP循环使用

#### 解决方案:

- > 共固定化LTA和PLP

#### 策略:

- > 聚乙烯亚胺处理固定化材料
- > LTA通过共价键与固定化材料连接
- > PLP与聚乙烯亚胺静电吸附解离平衡

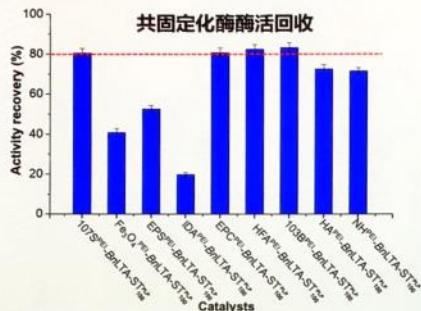


PLP/LTA共固定化模型

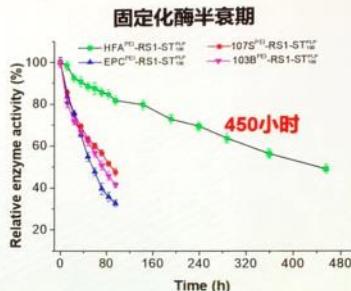


## 5.2 固定化酶筛选

共固定化酶表征



107S, 103B, ECP, HFA等4个共固定化酶活回收超过80%



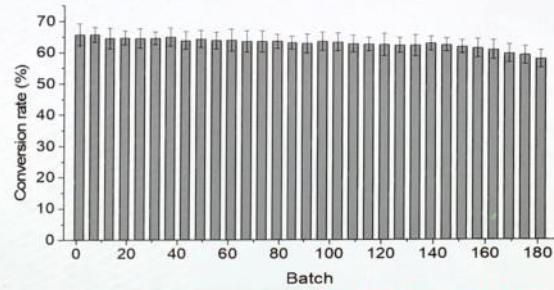
HFA共固定化酶半衰期达到450小时

Enzyme and Microbial Technology, 141, (2020) 109667



## 5.2 固定化酶筛选

L-syn-对甲砜基苯丝氨酸生物制备



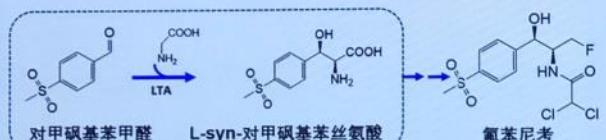
HFA共固定化酶能够连续使用180批次，产物de>97%

反应条件：20 L搅拌罐 MTB 0.1 M, Gly 0.8 M, 固定化酶100 g/L, pH 8.0, 30°C, t: 60-120 min.



## 5.3 生物法制备氟苯尼考

首次实现LTA工业化应用，建成千吨级氟苯尼考生产线



技术开发（合作）合同

项目名称：化学-微生物制备L-syn-对甲砜基苯丝氨酸  
或乙酰的合成研究  
甲方：江西新药（集团）有限公司  
乙方：浙江大学  
签订地点：浙江省杭州市西湖区  
执行期限：2021年7月26日至2021年12月31日

专利：202010050853.1B

氟苯尼考：兽用抗生素类药物，抗菌谱广，主要应用于水产养殖



## 总 结

➤ **酶挖掘：**

构建酶库，获得了酶活高、*syn*式产物偏好的CpLTA

➤ **非对映体选择性机理解析及改造：**

“路径假说”和“Prelog规则”共同影响LTA 非对映体选择性

获得LTA非对映体选择性提高和反转的突变体，实现选择性理性调控

➤ **催化活性改造：**

通过“底物通道重构”和“调节质子传递微环境”策略，解决活性和选择性之间的Trade-off问题

➤ **热稳定性改造：**

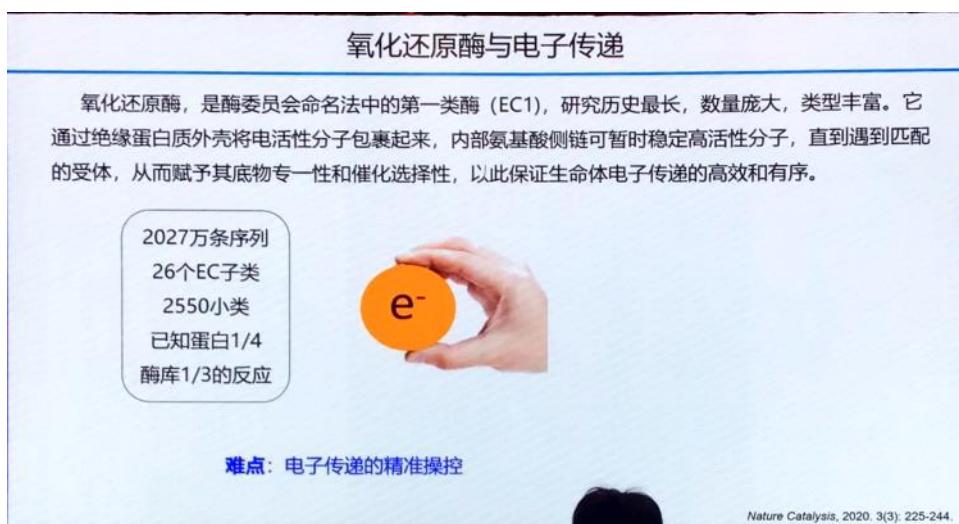
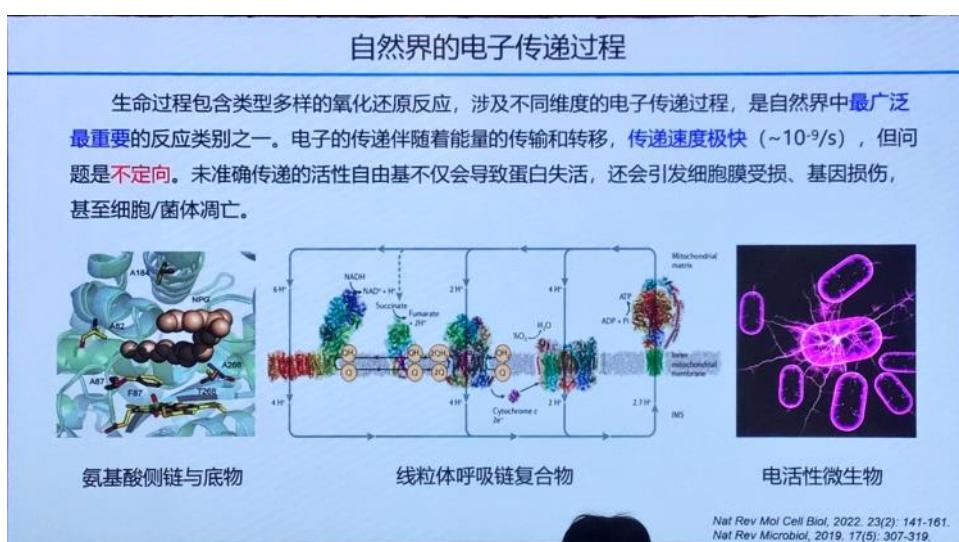
LTA界面残基改造，增加亚基间相互作用，大幅提高LTA的热稳定性

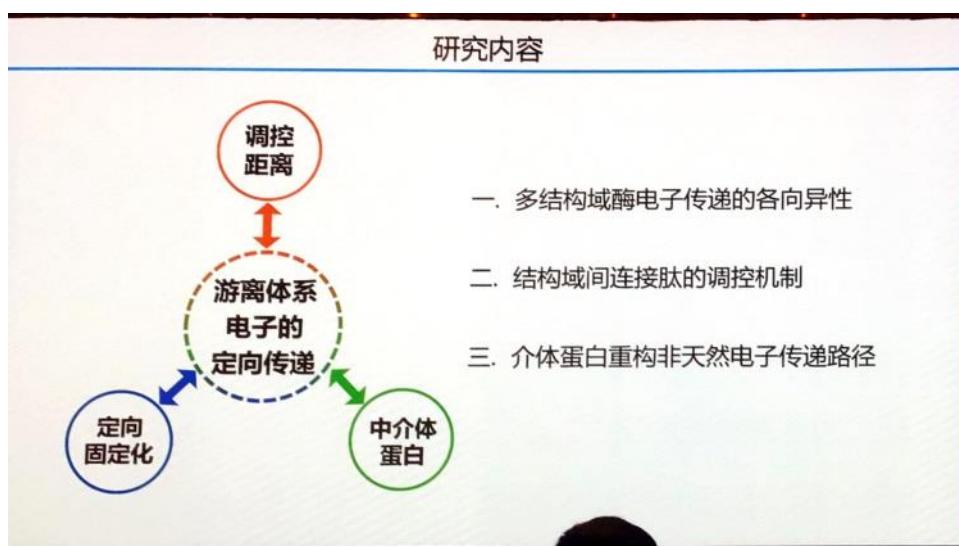
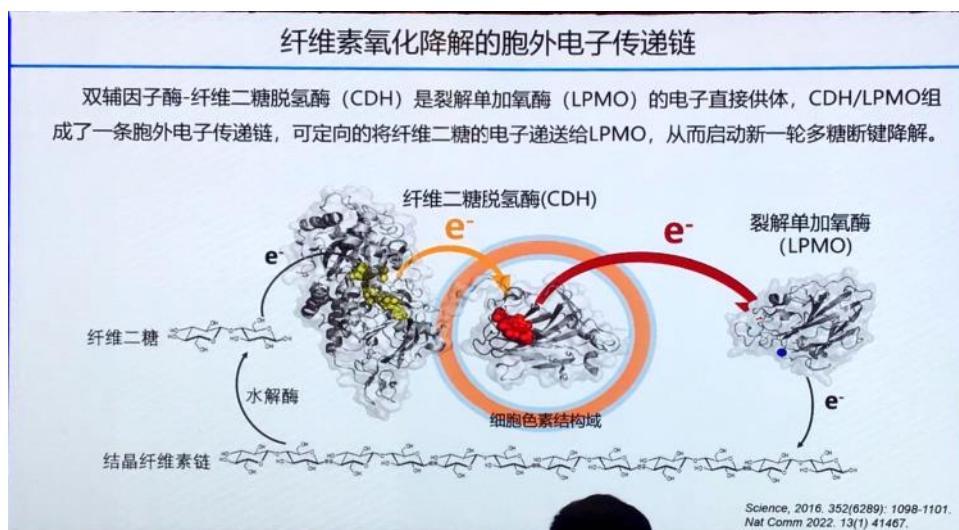
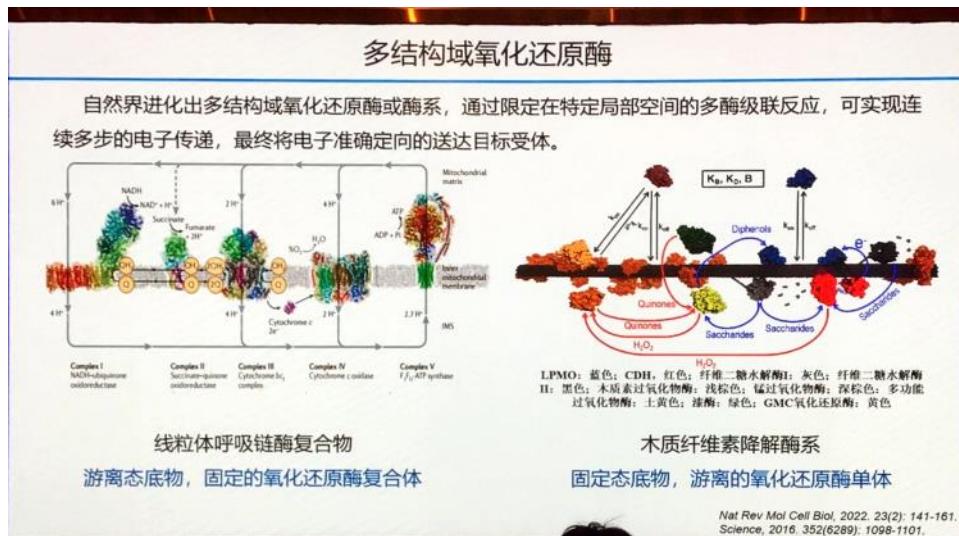
➤ **应用：**

首次实现LTA工业化应用，建成千吨级氟苯尼考生产线

# 第十四届-18-马素

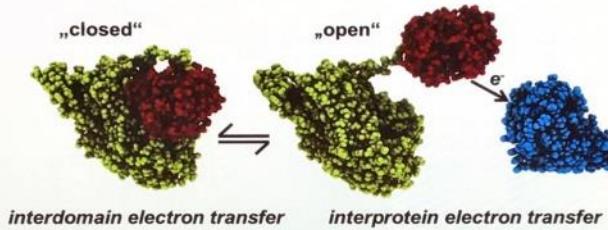
2023年8月20日 星期日 09:48





## 一. 多结构域酶电子传递的各向异性

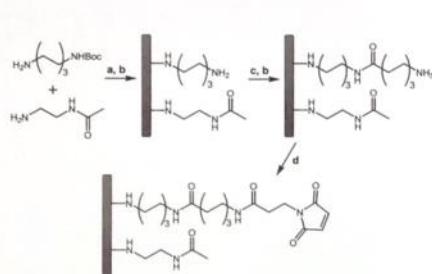
CDH的两个结构域呈现打开/闭合的动态构象变化，闭合构象是结构域间电子传递的必要条件，而打开构象可促进分子间的电子传递，也就是电子从细胞色素传递给下游受体LPMO



Nat. Commun 2015, 6:7542

## 一. 多结构域酶电子传递的各向异性

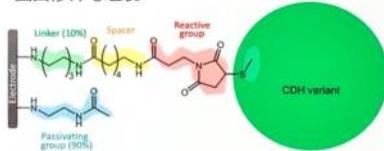
### 固相序贯电化学法修饰电极



### 马来酰亚胺和巯基反应

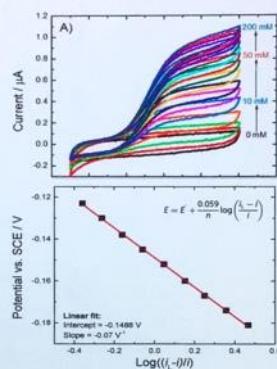
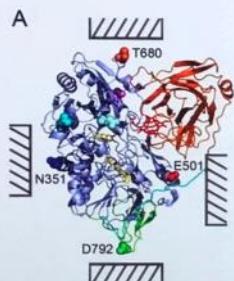


### 蛋白修饰与组装



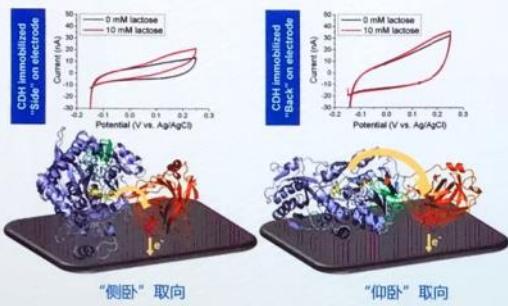
## 一. 多结构域酶电子传递的各向异性

### 催化结构域表面位点选择



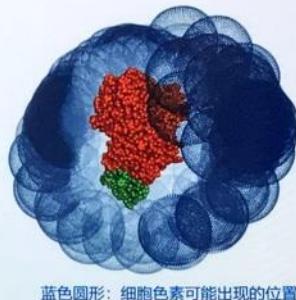
## 一. 多结构域酶电子传递的各向异性

电化学表征



“侧卧”取向

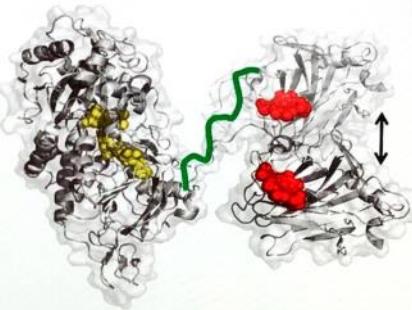
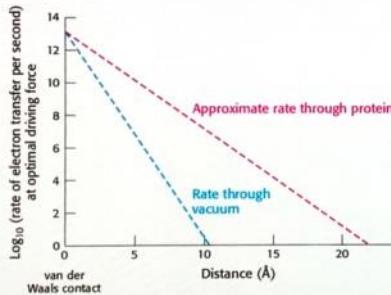
分子动力学模拟



蓝色圆形：细胞色素可能出现的位置

## 二. 结构域间连接肽的调控机制

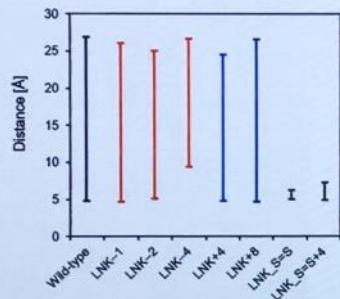
根据Marcus理论，电子传递速率与电子授受体间的距离呈指数型负相关，因此拉近距离可大幅提高电子传递效率。双辅因子酶CDH在进化中形成了柔性的连接肽结构，既拉近了两个结构单元中辅因子的空间距离，又为下游电子递出提供了灵活性。



*Biochimic et Biophysica Acta, 1985, 811:256-322*

## 二. 结构域间连接肽的调控机制

分子动力学模拟

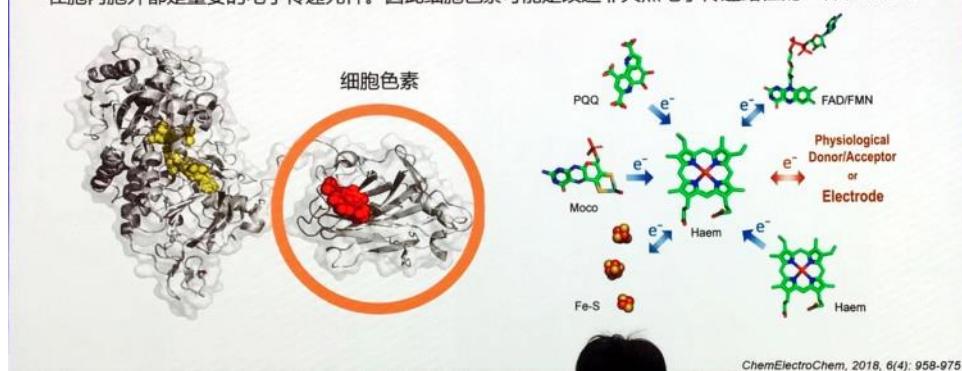


生化及电化学表征

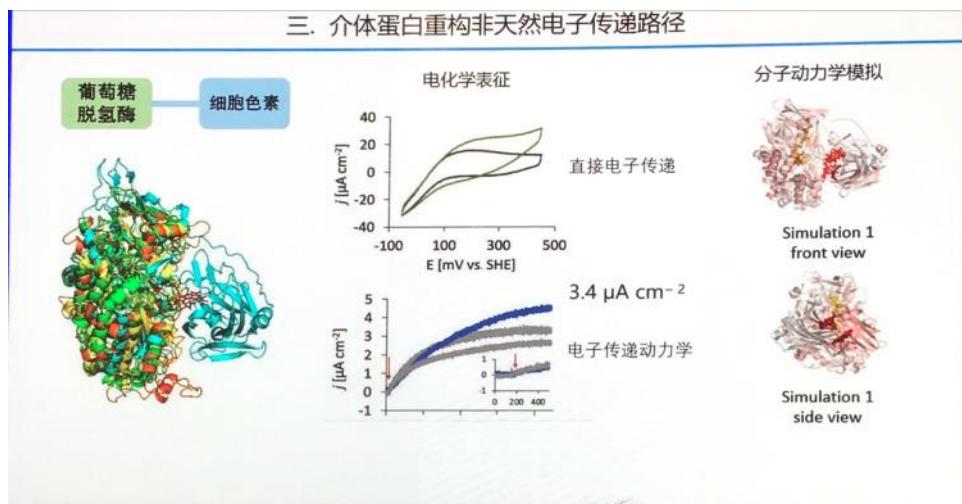
variants	Specific DCIP activity	Specific cyt c activity	FAD (449 nm)	heme b (563 nm)	I nA
wild-type	9.79	2.851	88 ± 4	28.4 ± 1.5	237
LNK-1	7.09	0.9	72 ± 4	4.3 ± 0.2	88
LNK-2	7.4	0.003	72 ± 3	n.d.	n.d.
LNK-4	6.1	0.004	74 ± 7	n.d.	n.d.
LNK+4	6.66	2.603	70 ± 5	30.9 ± 3.5	120
LNK+8	7.44	1.457	82 ± 4	11.5 ± 0.4	151
LNK_S=S	8.73	4.063	86 ± 4	32.5 ± 2.0	177
LNK_S=S+4	11.5	5.349	80 ± 3	33.9 ± 1.2	273

### 三. 介体蛋白重构非天然电子传递路径

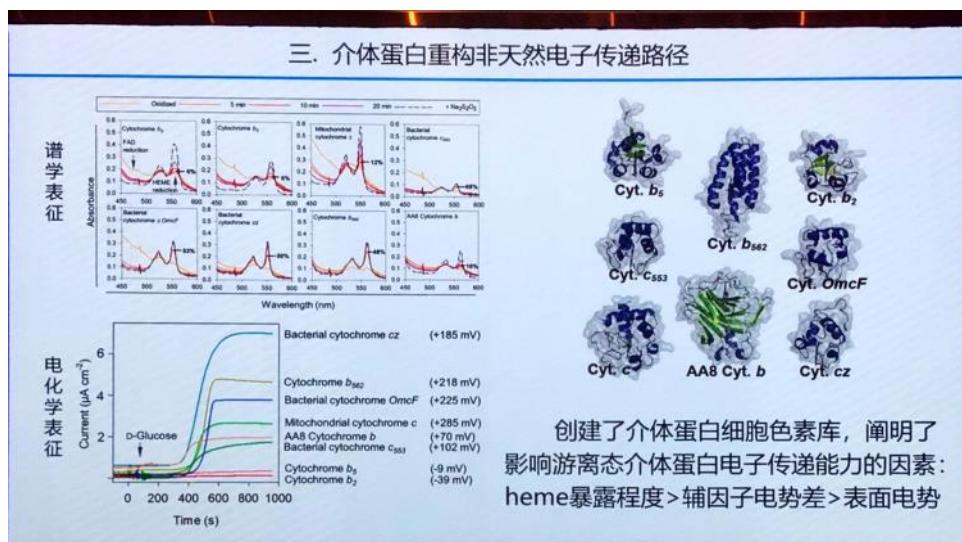
CDH具有一个嵌入的电子穿梭介体——细胞色素结构域，在胞外电子定向传递中发挥重要作用。自然界存在一些天然多结构域酶，其细胞色素的辅因子heme能够与多种辅因子进行有效的电子传递，在胞内胞外都是重要的电子传递元件。因此细胞色素可能是改造非天然电子传递路径的一种有效手段。



### 三. 介体蛋白重构非天然电子传递路径



### 三. 介体蛋白重构非天然电子传递路径



## 总 结

### 糖基化水平

*Microbial Cell Factories* 2017, 16 (1)

电子传递各向异性

*ACS Catalysis* 2019, 9(8): 7607-7615

### 连接肽的调控机制

*ACS Catalysis* 2023, 13: 8195-8205

### 细胞色素类型

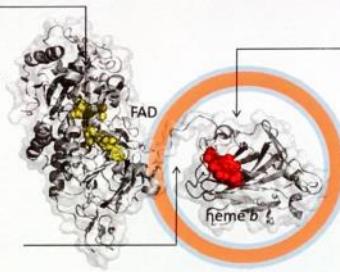
*ChemElectroChem* 2019, 6 (4), 958-975

游离态介体蛋白

*Electrochimica Acta*, 2023, 458, 142485

嵌合型介体蛋白

*Biosensors&Bioelectronics*, 2022, 195, 113704



天然多结构域酶CDH电子传递机制的研究，揭示了柔性结构域间电子传递的作用机制和调控原理。介体蛋白库、连接肽库、特异取向酶库的构建，为游离体系电子定向传递的精准设计提供了独特思路及可行性方案。



**山东大学微生物技术国家重点实验室**

STATE KEY LABORATORY OF MICROBIAL TECHNOLOGY

### 生物质资源的生物转化团队

生态

生理

生信

生化

1. 有机固体废弃物的生物降解与资源转化利用
2. 碳水化合物活性酶分子的理性设计
3. 海洋多糖代谢途径的挖掘及相关裂解酶的机制研究
4. 微生物胞外氧化还原酶的机制解析与智能设计

### 招生专业：

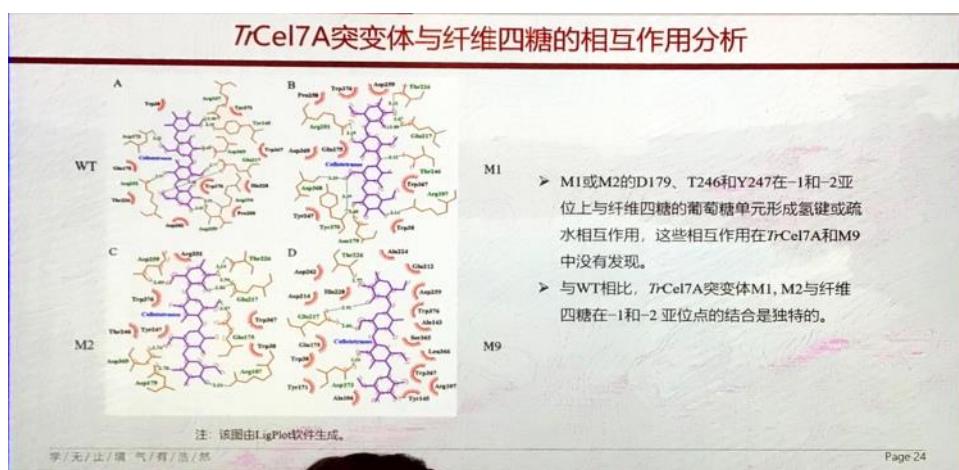
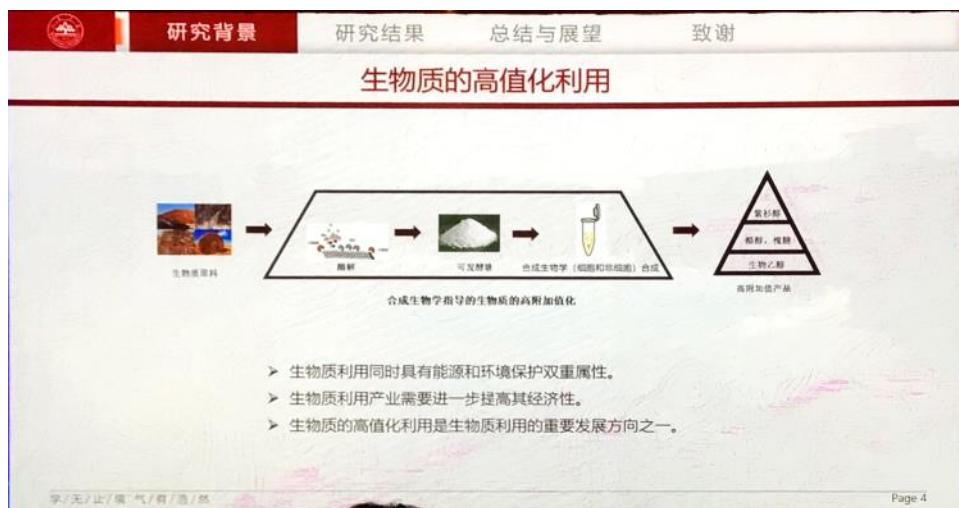
微生物学  
生化与分子生物学

**招聘硕士，博士，博士后**  
欢迎加入我们！！

[masu@sdu.edu.cn](mailto:masu@sdu.edu.cn)

# 第十四届-19-牛康乐

2023年8月20日 星期日 10:26





## *TrCel7A*的催化活性对比

Variant	Method	Production of the product <sup>a</sup>	Cellobiose hydrolysis performance 1.D <sub>W<sub>0</sub></sub>	<i>TrCel7A</i> variant performance μ <sup>b</sup>	Reference
WT-1	RAFEA	0% <sup>c</sup>	258.8	0	This study
K166A	RAFEA	48% <sup>c</sup>	110.1	0.57	This study
T97A	RAFEA	37% <sup>c</sup>	152.3	0.41	This study
S168A	RAFEA	-37% <sup>c</sup>	441.3	-0.71	This study
WT-2	Loop Truncating and double bond removing	0% <sup>c</sup>	23.2	0	Taylor et al., 2017
T1	Loop Truncating and double bond removing	6.7% <sup>c</sup>	20.2	0.13	Taylor et al., 2018
T3	Loop Truncating and double bond removing	7.9% <sup>c</sup>	20.0	0.14	Taylor et al., 2019
T1/T3	Loop Engineering and double bond removing	-0.7% <sup>c</sup>	17.1	0.26	Taylor et al., 2020
WT-3	Mutation	0% <sup>c</sup>	189.7	0	Nakamura et al., 2013
W46A	Mutation	61.4% <sup>c</sup>	166.1	0.16	Nakamura et al., 2013
WT-4	Glycosylation removing	0% <sup>c</sup>	30228.4	0	Aldrey et al., 2009
N270A	Glycosylation removing	2.4% <sup>c</sup>	27322.2	0.10	Aldrey et al., 2009
N384A	Glycosylation removing	18.7% <sup>c</sup>	2844.0	0.91	Aldrey et al., 2009
WT-5	Loop Engineering	0% <sup>c</sup>	183.9	0	von Ossowski et al., 2003
Y247F	Loop Engineering	-7.2% <sup>c</sup>	347.4	-0.89	von Ossowski et al., 2003
D241C/D249C	Loop Engineering	20.4% <sup>c</sup>	146.3	0.24	von Ossowski et al., 2003
A632G-Y252D	Loop Engineering	-30% <sup>c</sup>	462.5	-1.51	von Ossowski et al., 2003

➤ 与WT相比，本研究获得*TrCel7A*突变体M1的产物的产量的提高百分比大于文献报道的*TrCel7A*的产物的产量提高百分比。

➤ 从纤维素水解性能 $\mu$ 来说，本研究获得*TrCel7A*突变体M1的纤维素水解性能高于文献报道其它*TrCel7A*突变体的纤维素水解性能，但是小于T1, T3, T1/T3的纤维素水解性能。

➤ 从*TrCel7A*突变体的催化性能 $\mu$ 来说，与WT相比，本研究获得*TrCel7A*突变体M1的催化性能高于文献报道其它*TrCel7A*突变体的催化性能，但是小于N385A的催化性能。

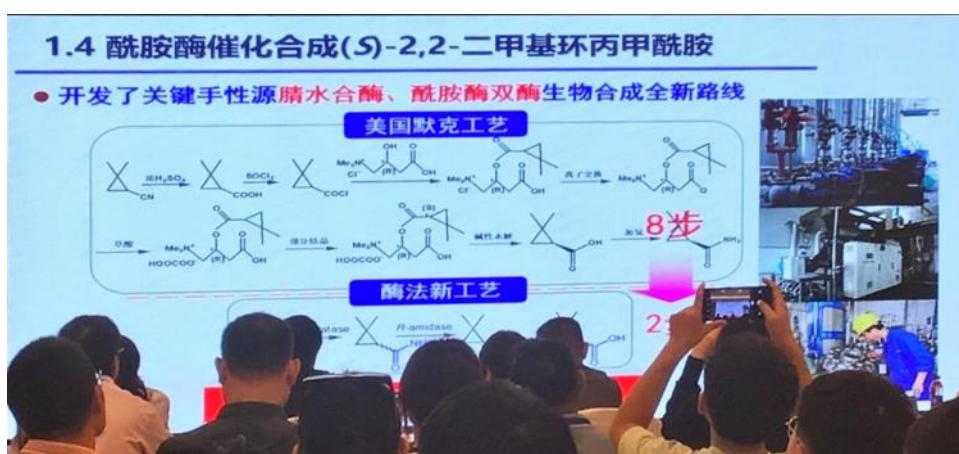
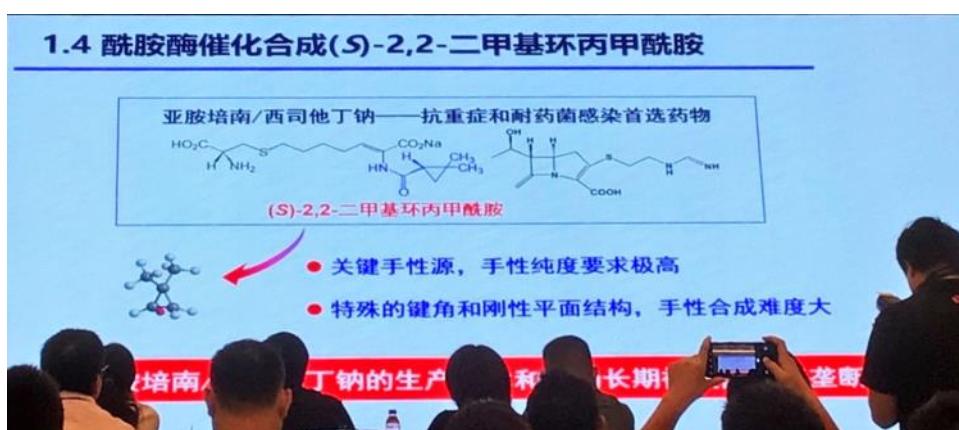
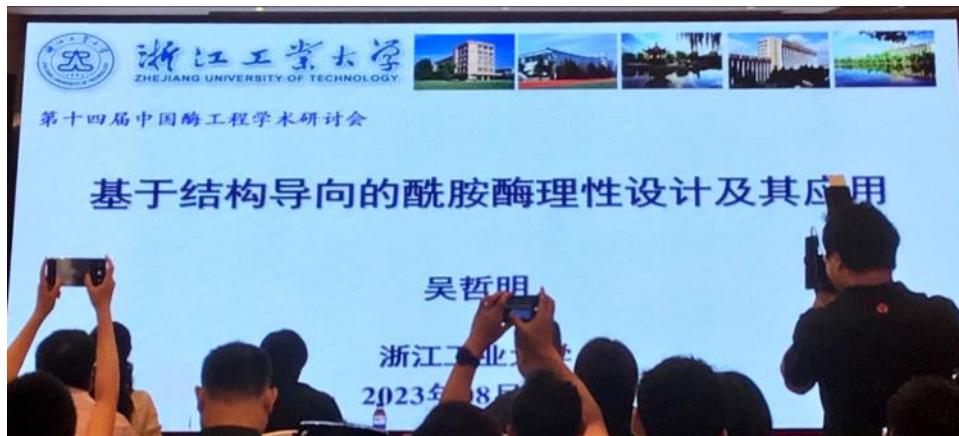
$$\Delta \text{Production of the product} = (Y_{\text{variant}} - Y_{\text{WT}}) / Y_{\text{WT}} * 100\%$$

$$\mu = (\lambda_{\text{WT}} - \lambda_{\text{variant}}) / \lambda_{\text{WT}} * 100\%$$

Biotechnology Journal. 2015, 10: 1424-1433.

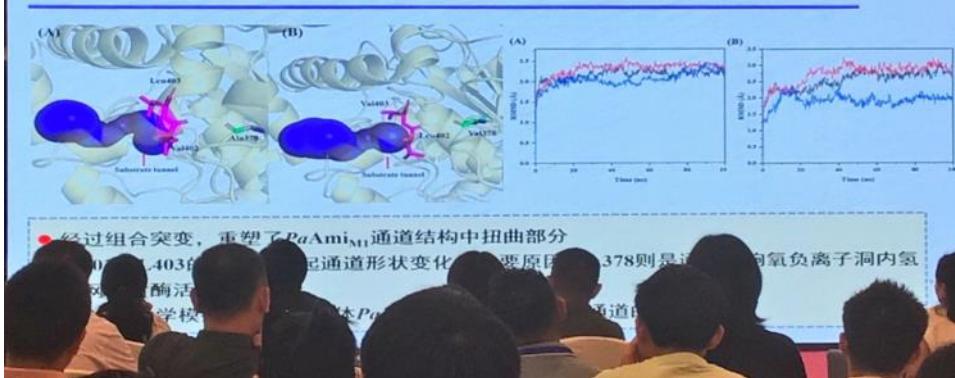
# 第十四届-20-吴哲明

2023年8月20日 星期日 11:17

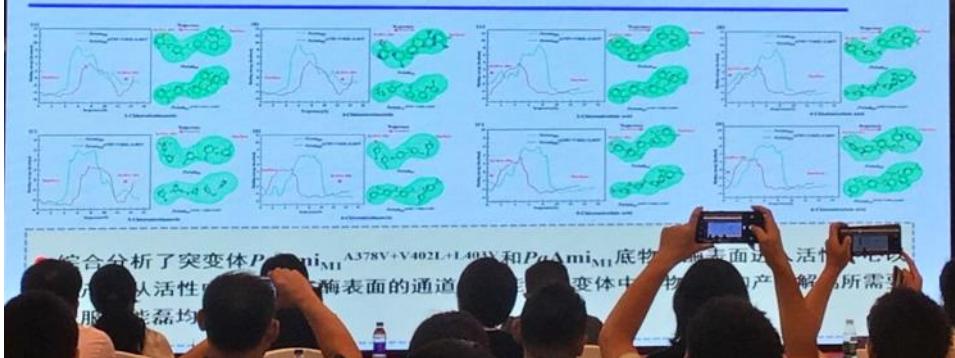


空间位阻  
亲和进攻距离  
caver通道预测，通道形状变化，通道柔性

### 2.3 基于通道结构重塑的酰胺酶设计

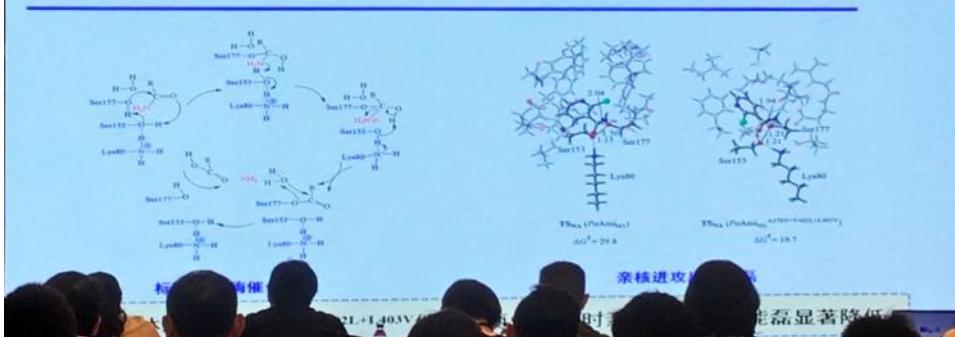


### 2.3 基于通道结构重塑的酰胺酶设计



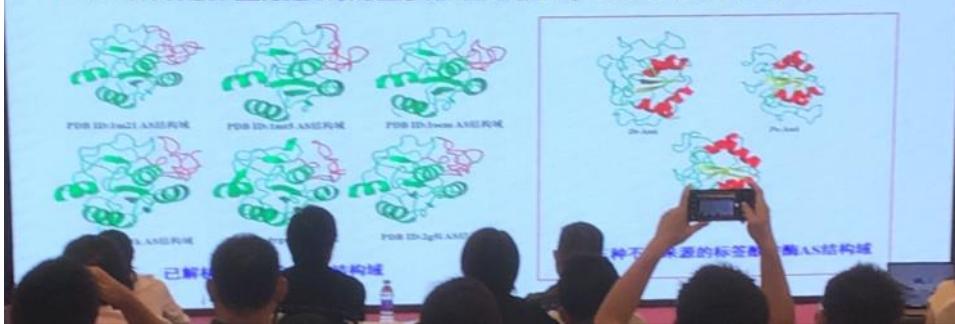
氢键网络

### 2.3 基于通道结构重塑的酰胺酶设计



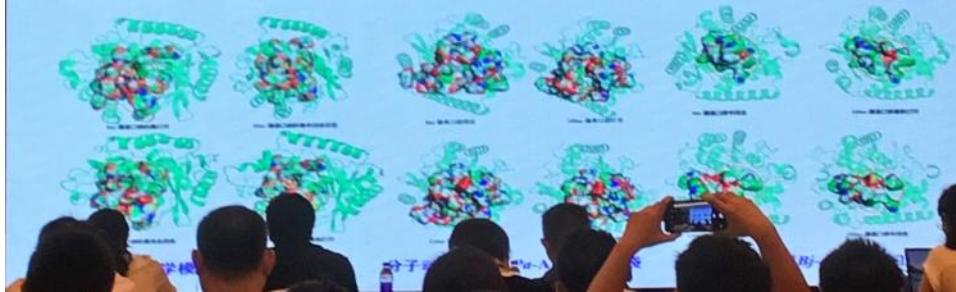
### 3.1 标签家族酰胺酶的标签（AS）结构域

- AS结构是标签酰胺酶的重要催化功能域，且具有高度保守性



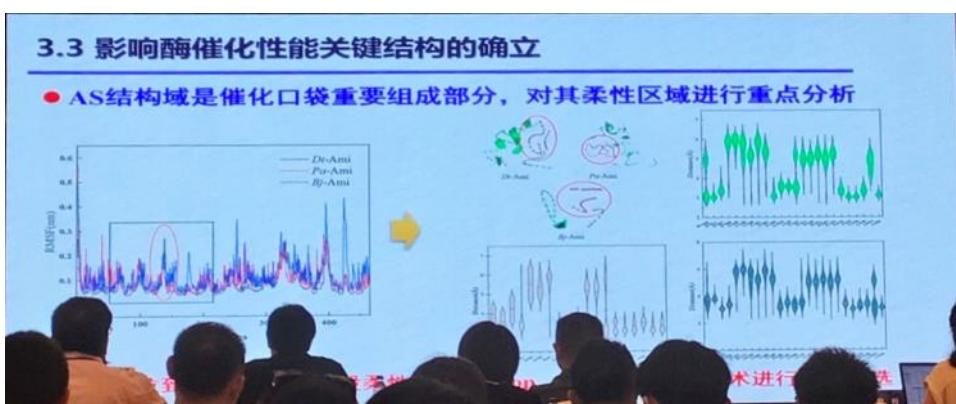
### 3.2 标签酰胺酶催化口袋的“呼吸现象”

- 300ns分子动力学模拟标签酰胺酶，其催化口袋均存在“呼吸现象”

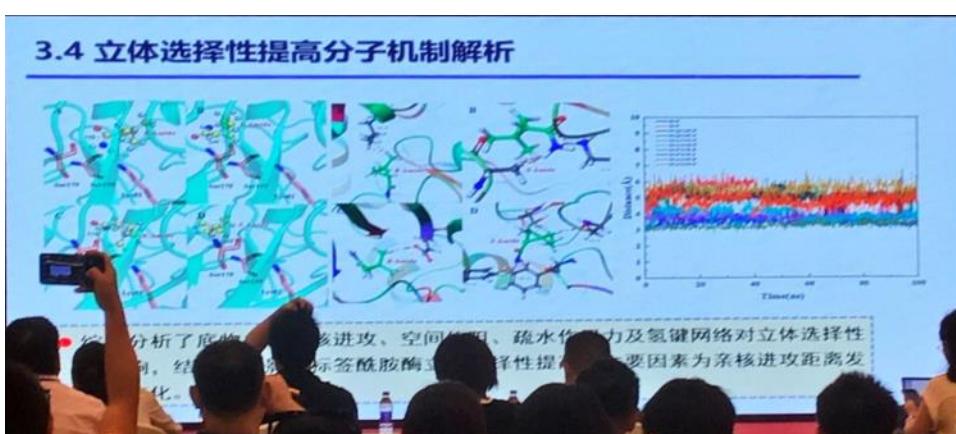


### 3.3 影响酶催化性能关键结构的确立

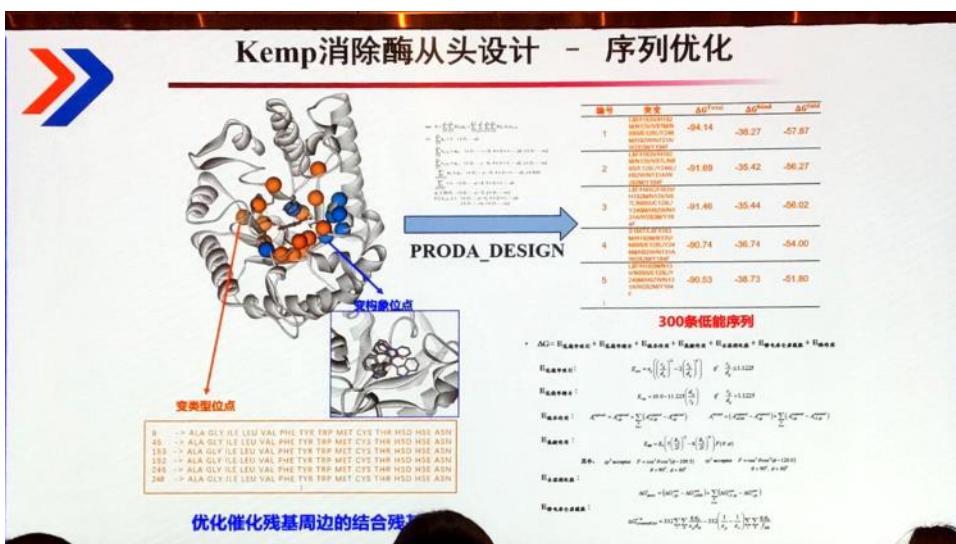
- AS结构域是催化口袋重要组成部分，对其柔性区域进行重点分析



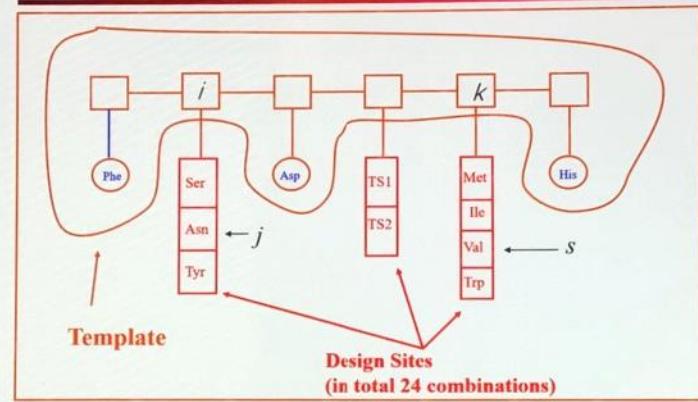
### 3.4 立体选择性提高分子机制解析



### Kemp消除酶从头设计 - 序列优化



## 蛋白质设计问题



- 蛋白质设计问题的氨基酸序列空间是 $20^n$ ，其中n是序列长度。这是一个天文数字。
- 多点突变的效果是非加和性的，因此饱和突变的策略往往事倍功半。

# 第十四届-21-朱玉山

2023年8月20日 星期日 13:36

## 第十四届-21同25

### 预组织活性位点理论

$\Delta G_{\text{sol}} \cong \langle \Delta V_{Q\mu} \rangle + \langle \Delta V_{\mu\mu} \rangle \cong \frac{1}{2} \langle \Delta V_{Q\mu} \rangle$

Enzymes have a preorganized dipolar environment that does not have to pay the reorganization energy for stabilizing the relevant transition states. Apparently, the catalytic power of enzymes is stored in their folding energy in the form of the preorganized polar environment.

Warshel, A., Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites, *J Biol Chem*, 1998, 273: 27035-27038. (the Preorganization concept)

### 活性位点设计 – 理论酶模型

A theozyme for ester hydrolysis. Transition states for (a) acylation and deacylation ( $R' = \text{Me}$ ) (transition state for acylation;  $R = \text{H}$ , transition state for deacylation), and for (b) an alternative 'double proton transfer' acylation pathway are shown in the box. The general reaction is shown above. Theozyme groups (tartaric acid, water and imidazole) are shown in bold. (See text for full details.)

Theozyme is a theoretical enzyme constructed by computing the optimal geometry for transition-state stabilization by functional groups. It is created in order to permit quantitative assessment of catalytic function.

Tantillo, Chen, and Houk, Theozymes and compuzymes: Theoretical models for biological catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 2: 743-750.

(the Theozyme concept)

### 催化非天然反应的新酶设计

非天然反应  $\xrightarrow{\text{Kemp消除}}$  催化非天然反应的新酶设计

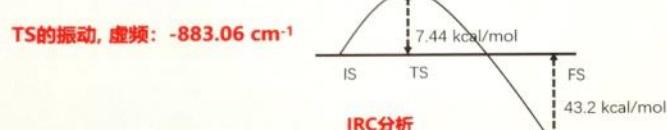
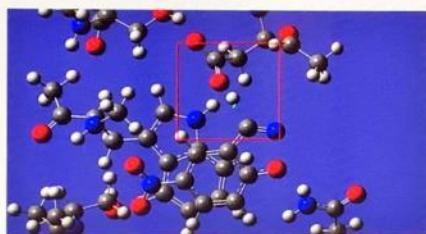
活性位点模型 I

活性位点模型 II

本研究提出的预组织活性位点模型

Rothlisberger, Baker\* et al. *Nature* 2008, 453: 190

催化非天然反应的新酶设计 - 过渡态



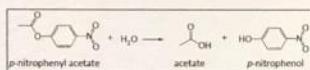
## 蛋白质结构数据库



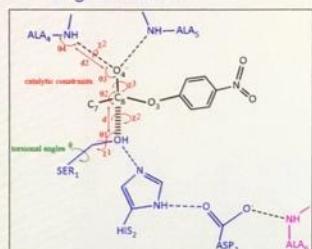
200,000 晶体结构

200, 000,000 预测结构

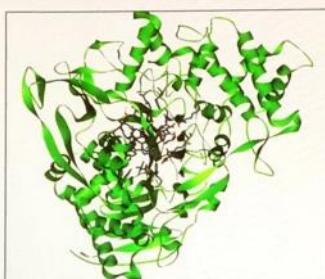
## 活性位点匹配问题



## Target Reaction



## Transition State

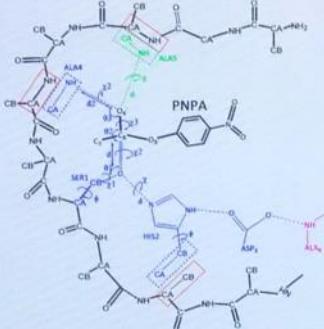


**Problem Statement:** Given  $m$  design sites in a scaffold and  $n$  catalytic residues, find the best attachment of the  $n$  residues in the scaffold which satisfy the catalytic geometrical constraints between the TS and the catalytic residues.

CC 20



## 活性位点匹配算法



### PRODA\_MATCH 算法模块

```

for(i = 0; i < n; i++){
    min RMSD =  $\sqrt{\frac{d_{CA}^2 + d_{CB}^2}{2}}$ 
    s. t.  $E(\chi, \theta, d) < E^U$ 
           $\chi^L \leq \chi \leq \chi^U$ 
           $\theta^L \leq \theta \leq \theta^U$ 
           $d^L \leq d \leq d^U$ 
}

```

$O(nm)$

PRODA-MATCH算法实现了在蛋白骨架上匹配预组织活性位点，匹配精度达到亚埃，  
匹配速度可以实现对蛋白质结构数据库的全搜索。Protein Science, 2011.



## 蛋白质设计问题的计算复杂性

- $E_0$  Self-energy of template.
- $E(i_j, i_j)$  Interaction between template and rotamer  $\{i_j\}$ .
- $E(i_j, k_s)$  Interaction between rotamers  $\{i_j\}$  and  $\{k_s\}$ .

$$E^{GMEC} = \min_{\{\text{all sequences}\}} \left\{ E_0 + \sum_{i=1}^p E(i_j, i_j) + \sum_{i=1}^{p-1} \sum_{k=i+1}^p E(i_j, k_s) \right\}$$

Optimal rotamer assignment  $\{i_j\}$  = Final sequence.

NP-hard complexity. ( Pierce and Windree, Protein Eng, 2002)  
NP-complete to approximate. ( Chazelle et al., INFORMS J Comput, 2004)



## PRODA的能量函数

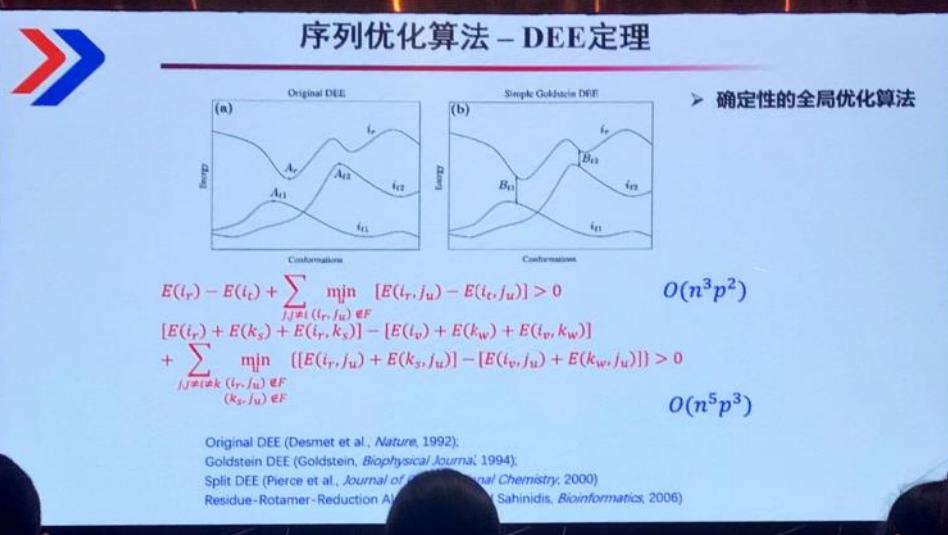
➢ pairwise-decomposable

$$\Delta G = E_{vdw\_attrr} + E_{vdw\_rep} + E_{Hydrophobic} + E_{HB} + E_{desolv} + E_{screenedCoul} + E_{entropy}$$

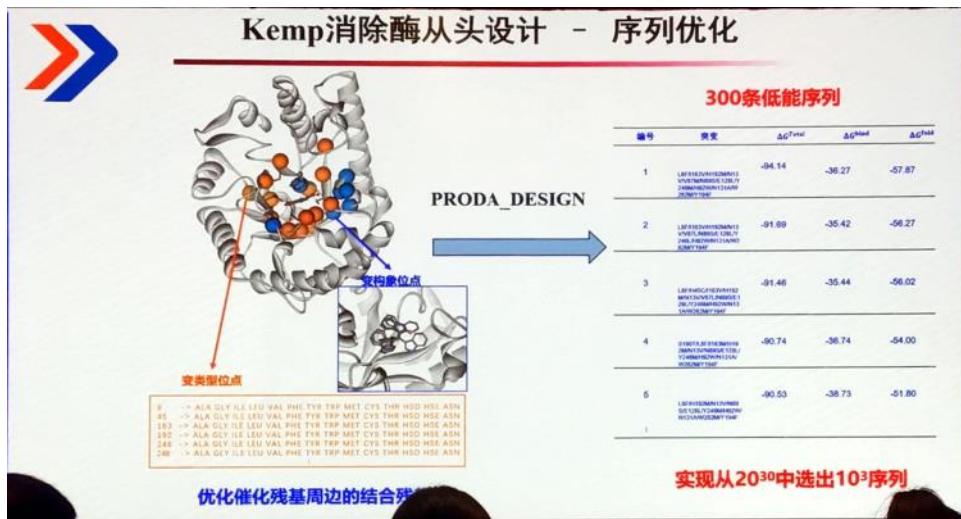
$$\begin{aligned}
 E_{attr} &= \epsilon_{ij} \left( \left( \frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^12 - 2 \left( \frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 \right) & \text{if } \frac{r_{ij}}{d_{ij}} \leq 1.1225 \\
 E_{rep} &= 10.0 - 11.225 \left( \frac{d_{ij}}{r_{ij}} \right) & \text{if } \frac{r_{ij}}{d_{ij}} > 1.1225 \\
 A_{ij}^{exposed} &= A_{ij}^{exposed} + \sum_{k \neq j} (A_{ijk}^{exposed} - A_{ikj}^{exposed}) & A_i^{buried} = (A_{i,123}^{exposed} - A_{i,12}^{exposed}) + \sum_{j \neq 1,2,3} (A_{ij}^{exposed} - A_{i,j}^{exposed}) \\
 E_{ij} &= E_1 \left( 5 \left( \frac{R_i}{D} \right)^12 - 6 \left( \frac{R_i}{D} \right)^6 \right) F(\theta, \varphi) & \text{sp}^1 \text{ acceptor: } F = \cos^2 \theta \cos^2(\phi - 109.5^\circ) \\
 & & \theta > 90^\circ, \phi > 60^\circ \\
 & & \text{sp}^1 \text{ acceptor: } F = \cos^2 \theta \cos^2(\phi - 120.0^\circ) \\
 & & \theta > 90^\circ, \phi > 60^\circ
 \end{aligned}$$

- [1] Tian, Huang, Zhu. *J. Mol. Model.* 2015;21:1–14.  
[2] Kuhliman, Baker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10383–10388.  
[3] Mackerell, Bashford, Bellott et al. *J Phys Chem B* 1998;102:3586–3616.  
[4] Zhang, Zeng, Wingreen. *Proteins* 2004;57:565–576.  
[5] Eisenhaber, Linzaad, Argos, Sander, Scharf. *J Comput Chem* 1995;16:273–284.  
[6] Dahiyat, Benjamin, Mayo. *Protein Sci* 1997;6:1333–1337.  
[7] Vedani, Dunitz. *J Am Chem Soc* 1997;119:7652–7658.

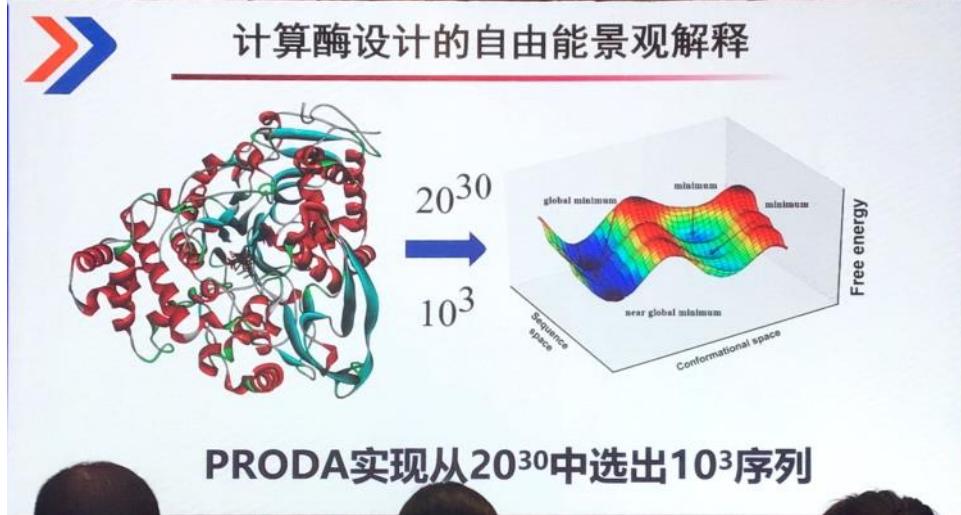
## 序列优化算法 – DEE定理



## Kemp消除酶从头设计 – 序列优化

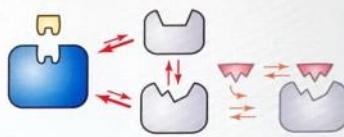
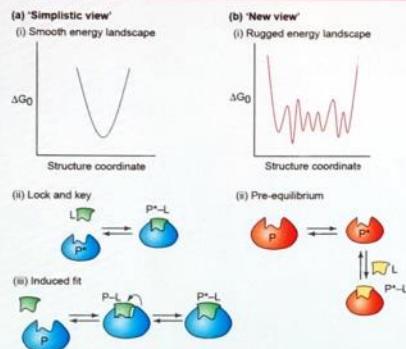


## 计算酶设计的自由能景观解释





## New View on Enzyme Catalysis



- 通过高通量MD筛选具有最高的催化结合构象分布的序列
- 将序列数从 $10^3$ 降到<50 (实验验证)

James LC and Tawfik DS, Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited, *Trends Biochem Sci.*, 2003, 28: 361-368. (the "New View" on Enzyme Catalysis)

### 计算酶设计平台 - PRODA

PRODA (PROtein Design Algorithmic package)，具备独立知识产权的酶计算设计程序，由10多万行的C/C++源代码构成，由朱玉山团队自2004年开发以来，历经15年不断地发展与完善。

完整的计算酶从头设计和再设计能力

四大模块

PRODA

实现功能

蛋白口袋搜索

活性位点模型的匹配和骨架筛选

底物过渡态放置

基于结构的折叠能和结合能的计算

氨基酸序列的优化与选择

新酶分子开发

活性及选择性改造

稳定性改良

静态结构模块

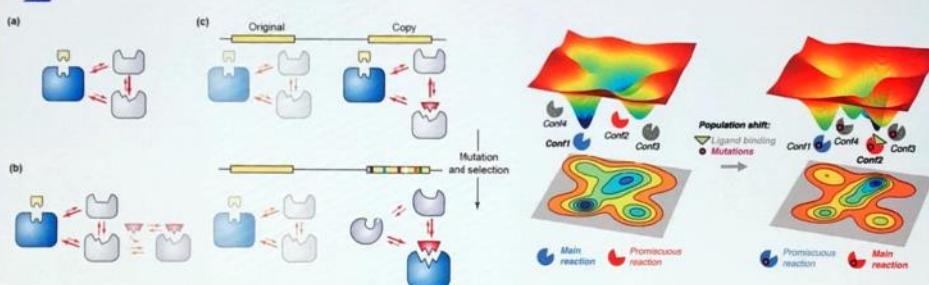
生成转子的模块

能量计算模块

算法模块



## New View on Enzyme Design

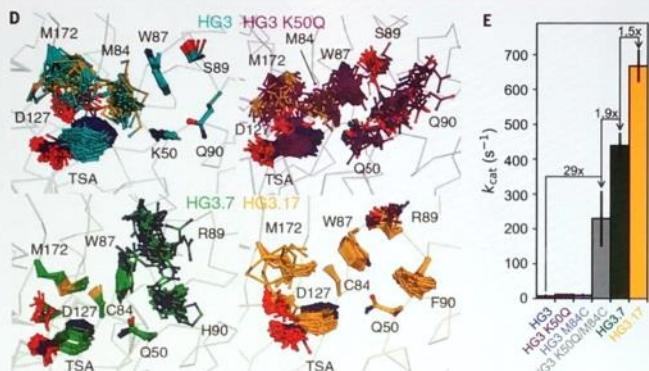


- Schematic representation of the population shift induced by ligand binding and/or by the introduction of mutations in the enzyme free energy landscape.

Osuna\*, et al., Role of conformational dynamics in the evolution of novel enzyme function, *Chem Commun*, 2008, 24: 6622-6634.



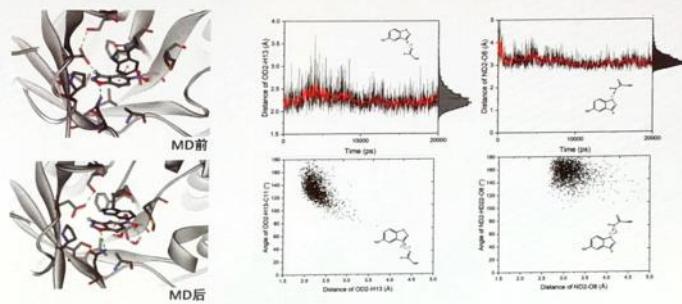
## Kemp消除酶从头设计 - 定向进化



Wen, Hilvert\*, et al., How directed evolution reshapes the energy landscape in an enzyme to boost its activity, *Nature*, 2020, 370: 1442-1446.



## Kemp消除酶从头设计 - 长时间MD分析



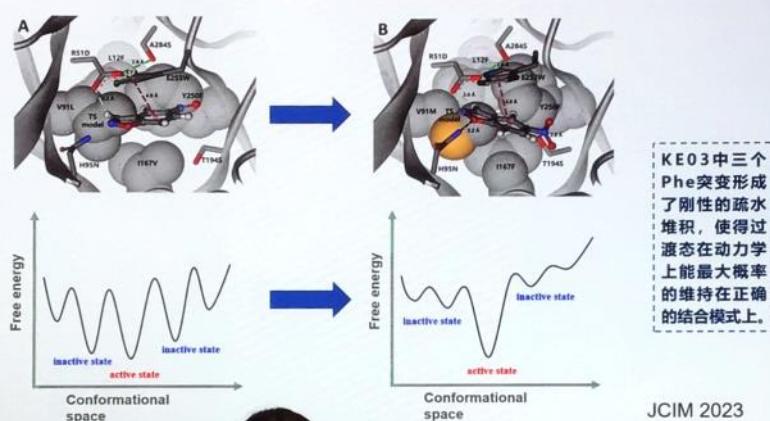
- 通过长时间MD分析找到影响催化结合构象取样的区域；
- 通过计算酶再设计使得催化结合构象成为最大概率分布。

JCIM 2023

## 长时间md分析

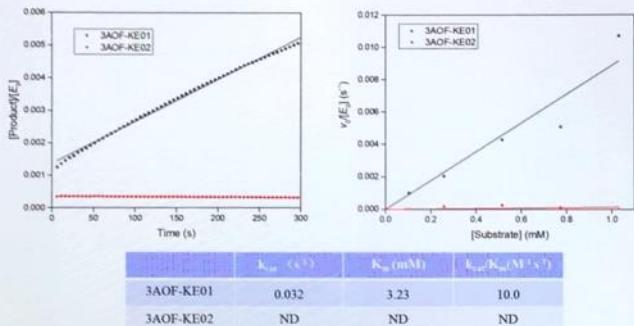


## 基于最大概率分布的计算酶设计



JCIM 2023

## Kemp消除酶从头设计 - 实验验证



利用我们的计算酶设计平台PRODA，结合量化计算及分子动力学模拟，我们在完全惰性的蛋白骨架3AOF上一次性引入17个突变位点，从头设计出了可以催化Kemp消除反应的新酶分子。

EMT-2022



## 结论与展望

- 在蛋白质结构预测技术取得突破以后，基于蛋白结构的计算酶设计方法已经发展成为一种通用、有效的酶工程技术。在提高酶的稳定性、催化活性、选择性等方面都已被大量案例验证。
- 计算酶设计已经针对多个模型反应从头设计了人工酶，现在的重点是针对工业反应能否从头设计出人工酶？
- “生物合成”对“化学合成”的替代已经是大势所趋，主要瓶颈依然是非天然途径找不到酶。

# 第十四届-22-韩蕊蕊

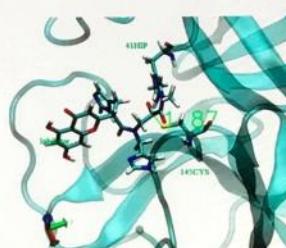
2023年8月20日 星期日 13:53

## Molecular dynamics simulations



### Molecular dynamics (MD) simulations

- Powerful tool, widely used (Nobel Prize, 2013)
- Simulate physical movements of atoms and molecules by Newton's equations of motion
- Qualitatively and quantitatively analyze conformational changes related to its function
- Still cannot reach long-time scale



Tang et al., Biomolecules, 2022

2

## Trajectory analysis methods



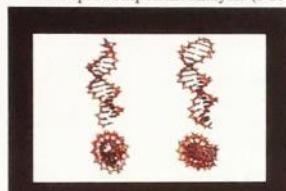
- Doesn't need to get exact trajectories (robust system)
- High-dimensional data of trajectory (many atoms, many time points), but meaningful projection dimension is low
- Trajectory analysis methods may retrieve long-time information of protein functions and mechanisms:
  - Protein allosteric regulation
  - Protein folding/unfolding
  - Large-scale motion of enzyme domains
  - Influence of ligand binding / mutation to large conformation

3

## Trajectory analysis methods

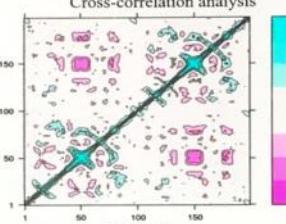


Principal component analysis (PCA)



Linear decoupling  
Principal components (PCs)

Cross-correlation analysis



Atomic/residue fluctuations correlated with one another

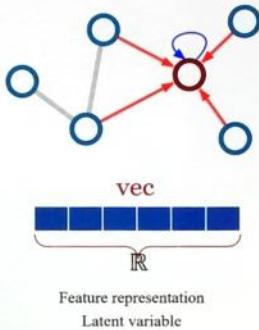
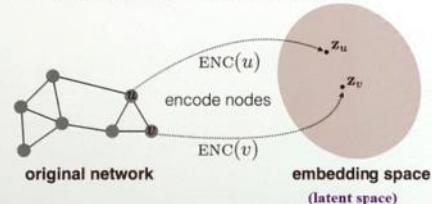
Near-equilibrium, linear relationships may be limited

4

## Graph neural network (GNN)



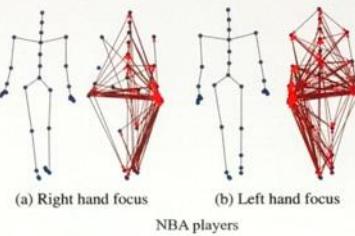
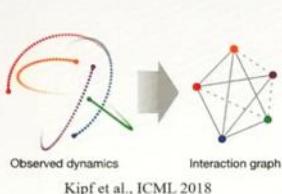
- Encode nodes: graph topology & node features
- Similarity in the embedding space approximates similarity in the original network.
- Aggregating neighborhood: sharing weights



5

network的一些知识迅速装备到大脑好耶

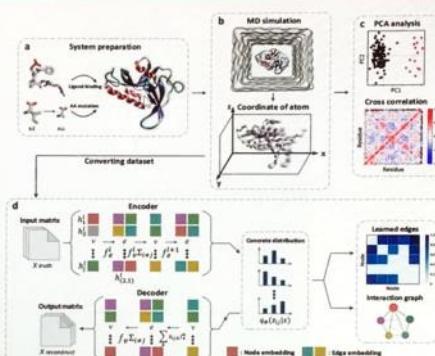
## Neural Relational Inference (NRI)



- Unsupervised model to infer interactions while simultaneously learning dynamics purely from observational data.
- Find interpretable structure and predict complex dynamics

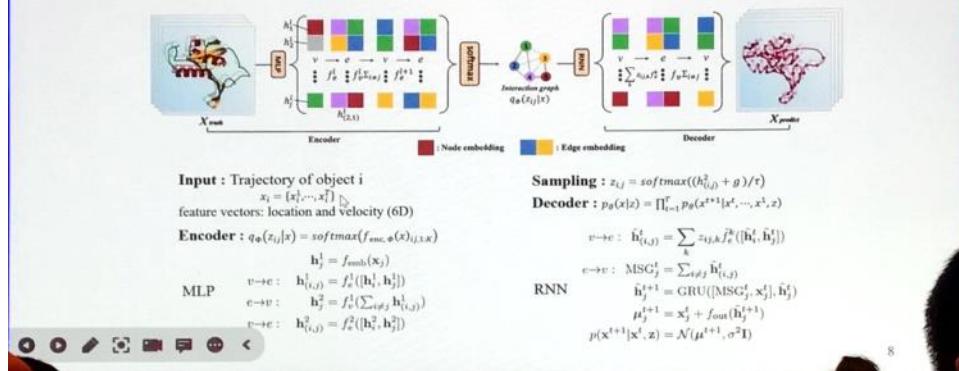
6

## Application of NRI model in biological system



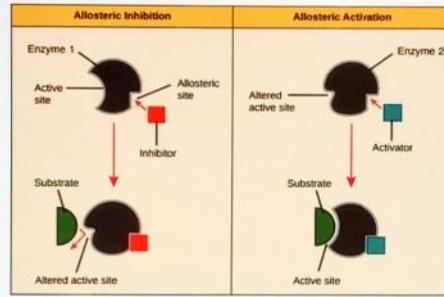
7

## NRIMD model



8

## What's a allostery?



Allostery in protein molecules is defined by their response to external stimuli on distal site(s).

Nonlinear correlations are essential in long-range signal transmitting.

Unknown mechanism  
Unknown pathway

9

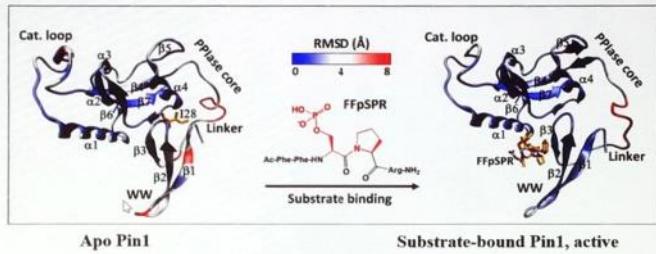
## Allostery case studies



- Pathways that mediate inter-domain allosteric regulation in Pin1
- Effect of G93A amyotrophic lateral sclerosis-linked mutation on SOD1
- Mechanism of oncogenic mutations activating MEK1

10

## Inter-domain allosteric regulation in Pin1



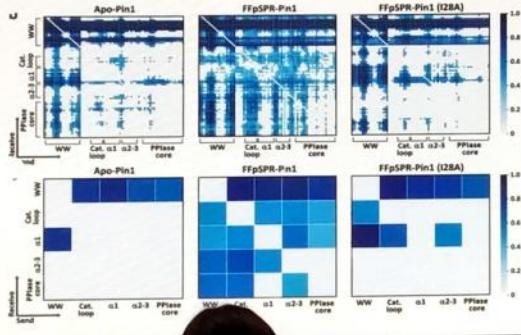
- Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
- Regulates cell proliferation, immune responses, drug target
- I28A weakens inter-domain interactions, reduce catalytic activity

■ L2A weakens inter-domain interactions, reduce catalytic activity

[View Details](#) | [Edit](#) | [Delete](#)

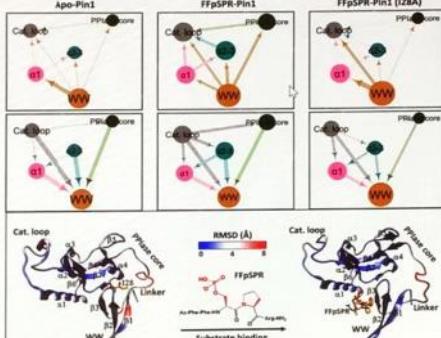
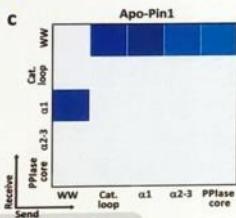
11

## Change of domain communications upon binding and mutation in Pin1



- 17 -

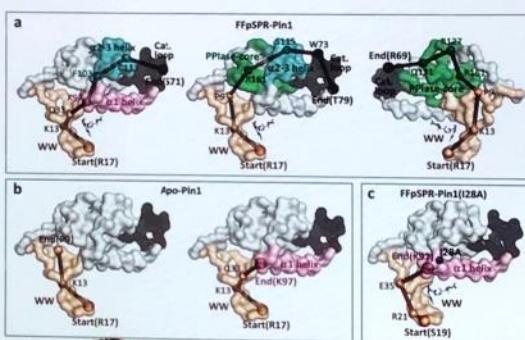
## Change of domain communication upon binding and mutation in Pin1



13

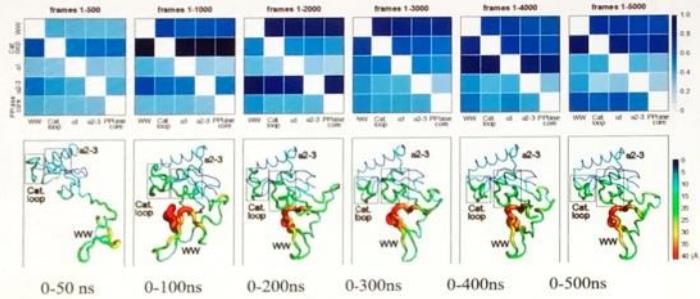
## Inter-domain allosteric communication pathways obtained from shortest pathway calculation

shortest pathway  
using Dijkstra's  
algorithm



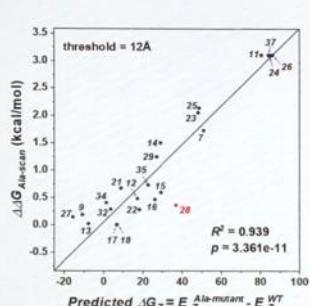
14

## Distribution of learned edges of different timesteps for FFPSPR bound Pin1

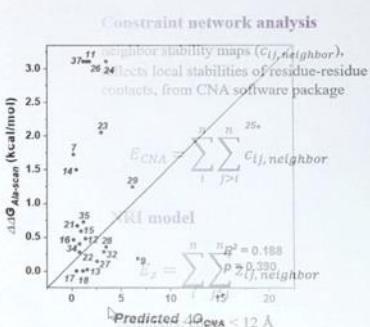


15

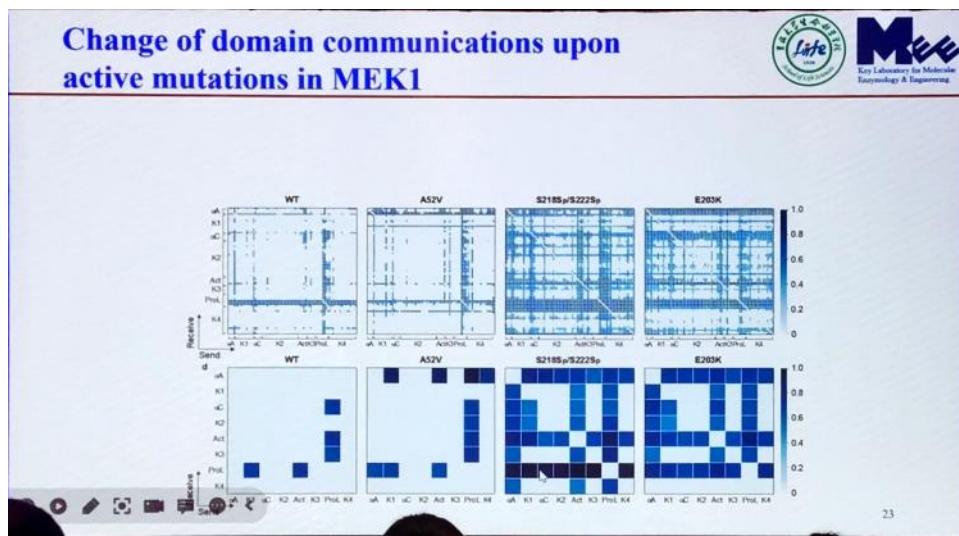
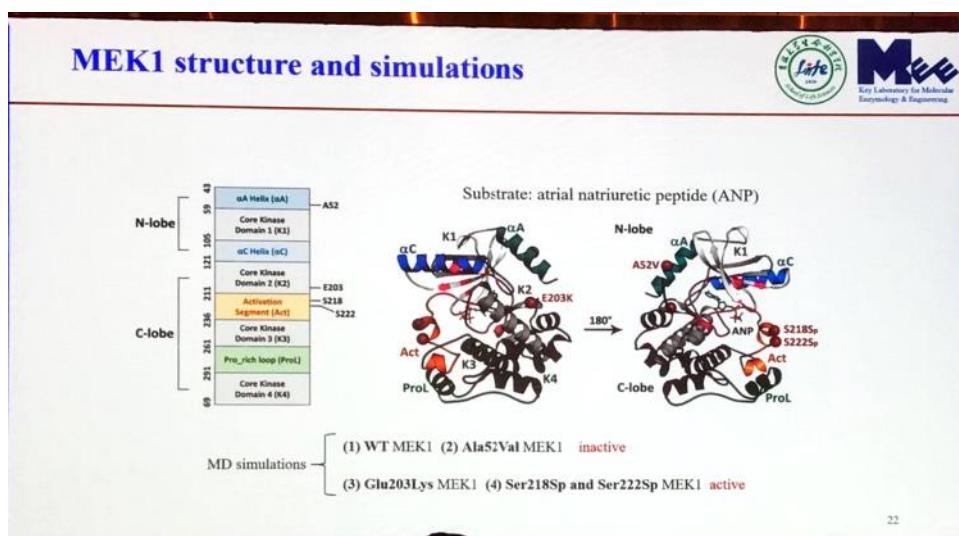
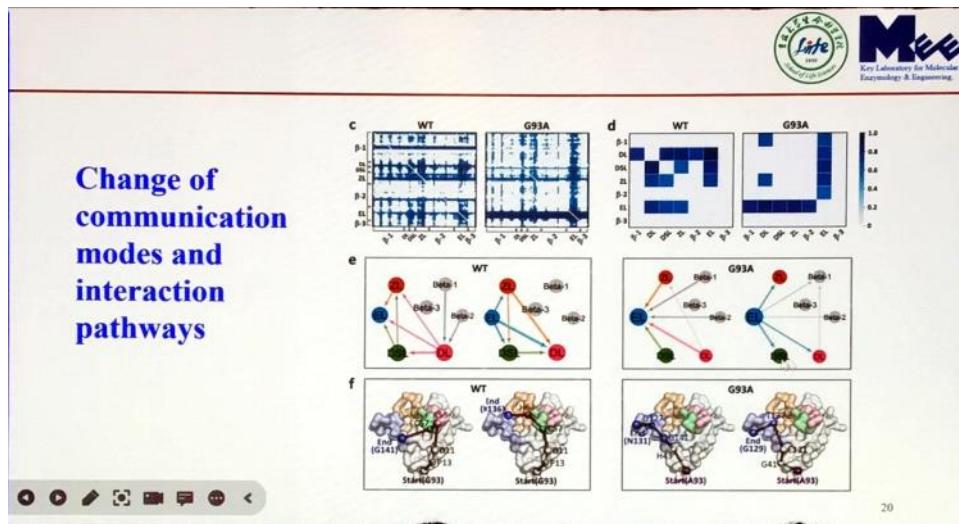
## Prediction of free energy change



NRI model



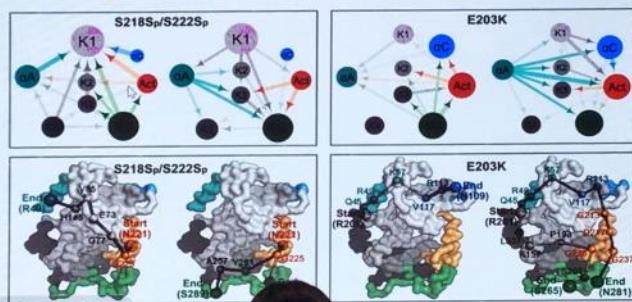
constraint network analysis



## 2. NRIMD Model > 2.2 allosteric case studies

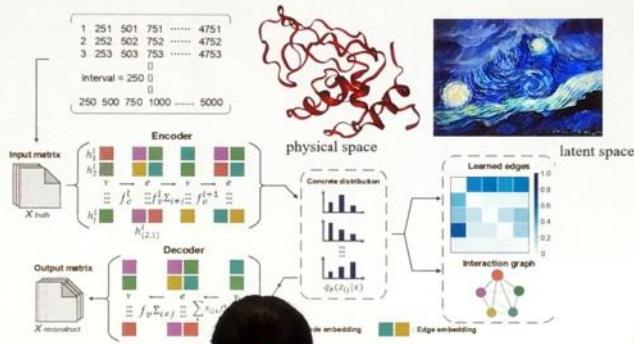


### Change of communication modes and interaction pathways



24

### NRI representations in latent space



25

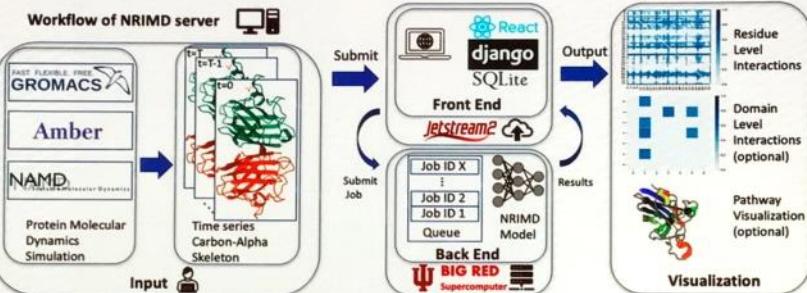
### Summary



- The first attempt to use GNN to analyze MD simulations
- The NRI model can effectively generate the interaction graphs related to protein's slow-motion through an embedding of reconstructing MD trajectories.
- Accurate estimate for free energy change scores
- Shortest pathways between the allosteric site and the active site in the interaction graphs can reveal the pathways mediating allosteric communications (to predict allosteric effect changes)
- Also useful for studying other long-range, long-time interactions in MD simulations (e.g., pinpointed function-related driving residues in the conformational transition of amyloid β-peptide).

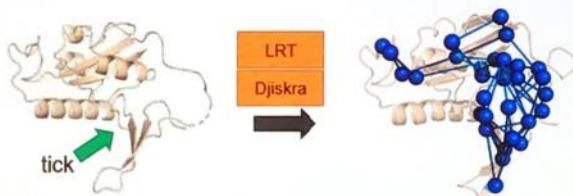
26

## Overview of webserver deployment



28

## Perturbation Response Scanning



- use the spherical algorithm to generate 100 unit forces to ensure isotropic perturbations
- use linear response theory (LRT) to screen the associated residues
- use the Djiskra algorithm to list the shortest paths

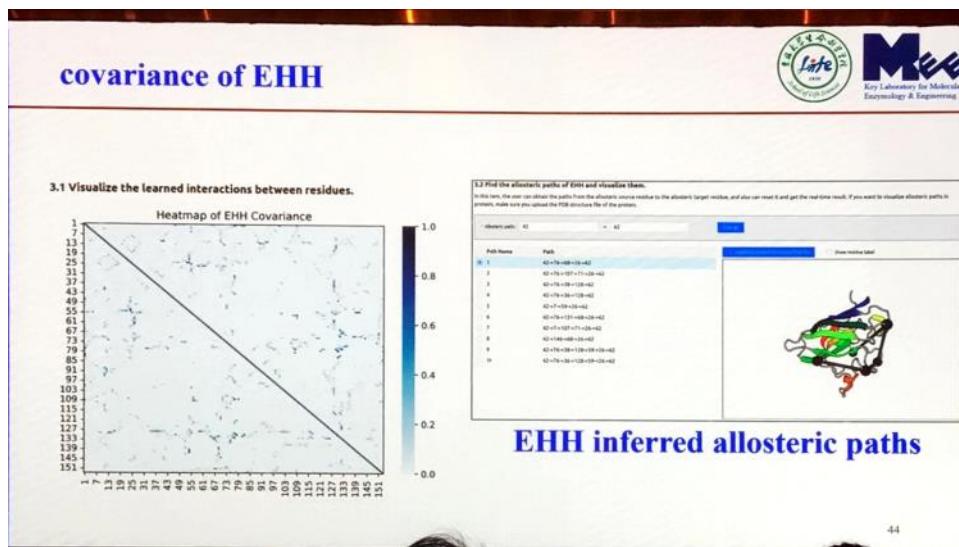
34

## Website Homepage



<http://nrimd.luddy.iupui.edu/>

37



### 3. NRIMD Web

#### Summary

- NRIMD is the **first webserver** to analyze long-range protein interactions.
- Users will have an **easier access** to deep learning-based trajectory analysis compared to traditional local projects.
- With the powerful core backend and the optimization of algorithms, the server can training **large trajectory** data compared to the previous work.
- NRIMD provides users with **interactive results** to highlight key residue interactions, domain interactions, and redefine allosteric pathways.
- Provide a one-stop service for obtaining **diversified results**, not only to train NRIMD deep learning models, but also to run other popular protein allosteric analysis tools.
- NRIMD will become a powerful tool for rational design of antibodies and enzymes based on target proteins.

Nrimd

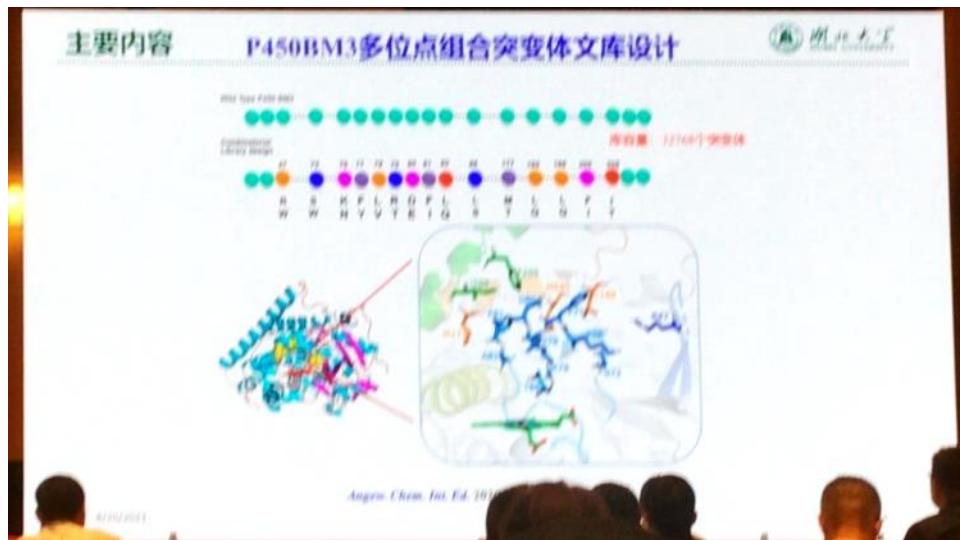
#### Future work

- Regular updates to incorporate more excellent and novel analytical methods for long-range protein interactions
- Since computing resources currently support one GPU per task, we will also deploy NRIMD on servers that are more powerful in support of parallel computing to facilitate model training and inference
- Optimize the algorithm so that NRIMD can run larger proteins without sampling and directly calculate the original protein trajectory to ensure the authenticity and accuracy of the results.

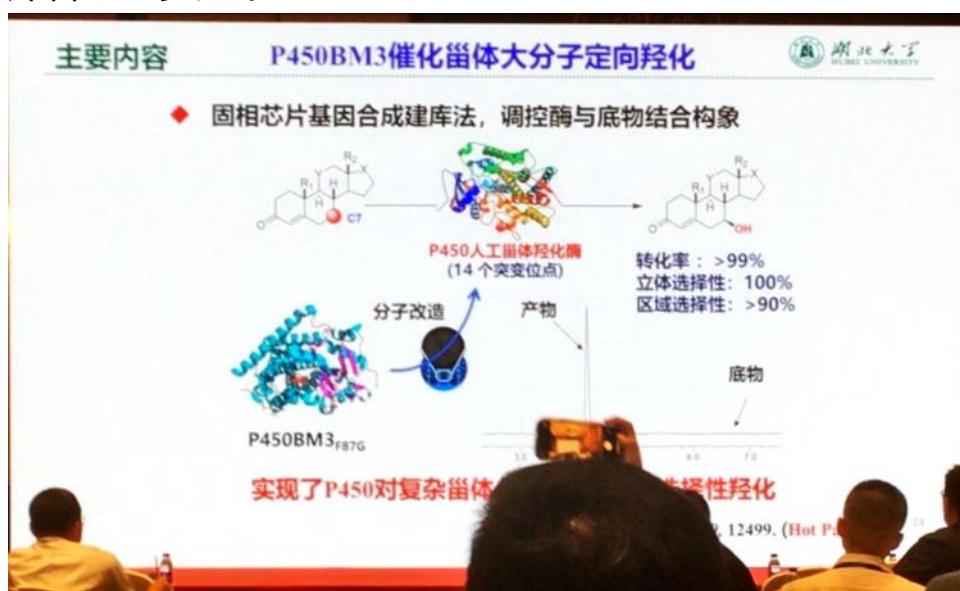
# 第十四届-23-李倩

2023年8月20日 星期日 14:18

p450



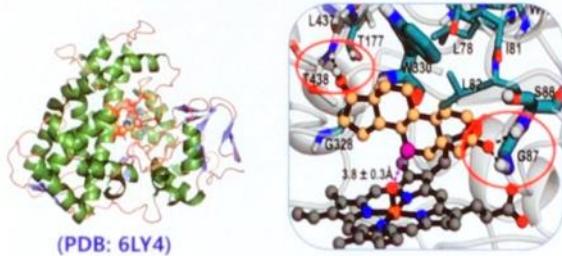
库容量30多万个



## 主要内容

### P450BM3催化甾体大分子定向羟化

#### ◆ P450人工甾体羟化酶构效关系解析



氨基酸(T438/S88/G87)与底物羰基和羟基的极性相互作用

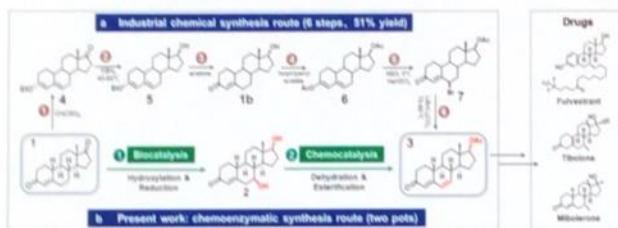
使甾体C7位的C-H键处在最可能羟化的位置

6/20/2023

2

## 主要内容

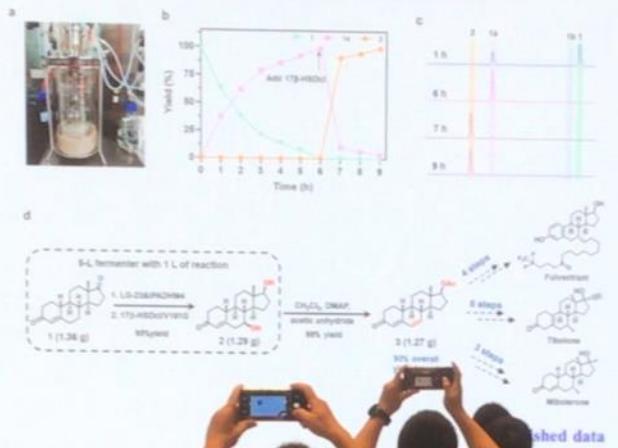
### 化学酶法合成甾体药物脱氢诺龙醋酸酯



脱氢诺龙醋酸酯是合成甾体药物氟维司群和替勃龙的关键中间体

## 主要内容

### 化学酶法合成甾体药物克级制备



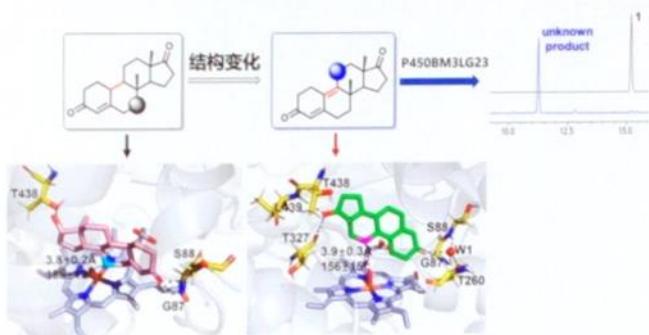
## 主要内容

## 同行评价

6/20/2023

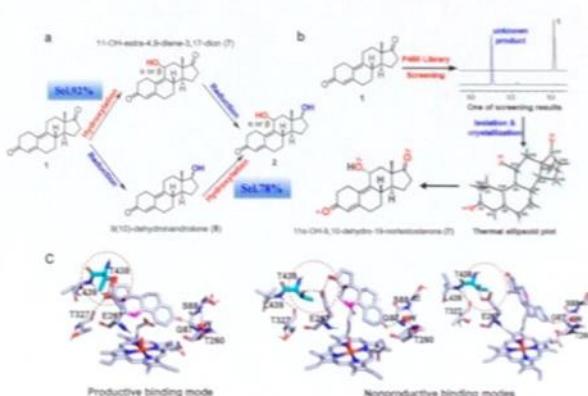
## 主要内容

### P450BM3催化甾体C11定向羟化



## 主要内容

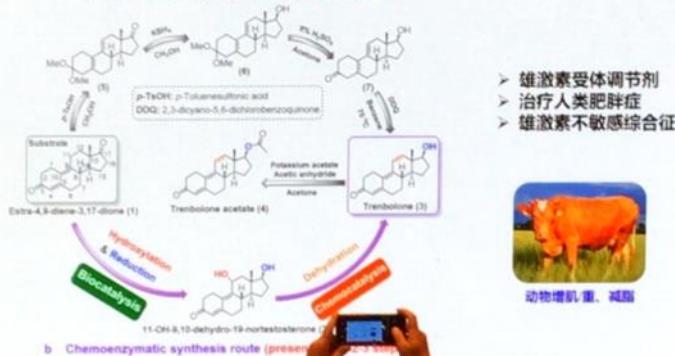
### P450BM3LG23的分子改造



## 主要内容

### 化学酶法合成甾体药物群勃龙设计

a Industrial chemical synthesis route (4-5 steps)



- > 雄激素受体调节剂
- > 治疗人类肥胖症
- > 雄激素不敏感综合征



b Chemoenzymatic synthesis route (presented by Prof. Li Aitao)

她对药物的作用是很care的

## 总结

### 1. 分子改造

- 基于计算机辅助设计
- 非PCR固相基因合成

### 2. 酶元件创制

P450催化非天然  
甾体分子C7  
选择性羟化

### P450结构与活性、选择性相互关系

2. 酶元件创制  
P450催化非天然  
甾体分子C11  
选择性羟化

### 3. 化学品合成

功能化学品生物合  
成体系构建  
(多种甾体药物  
及其中间体)

甾体药物生物合成系统创建思路、策略和思路

有用的

## Acknowledgement

湖北大学李爱涛团队

### 合作者:

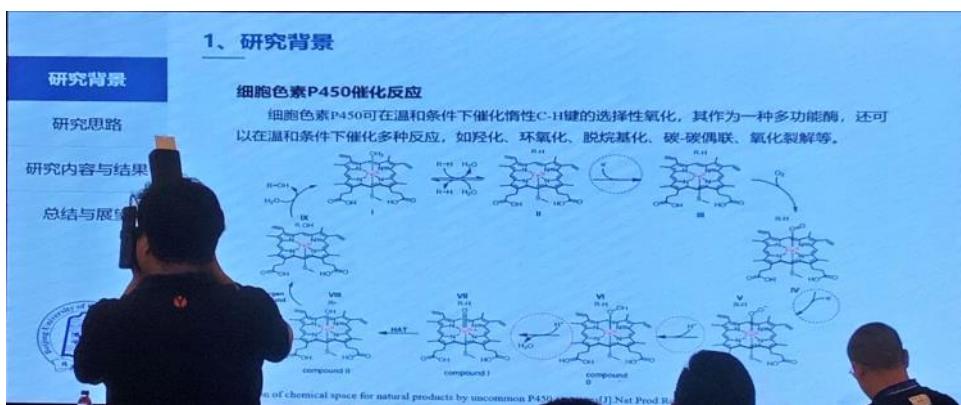
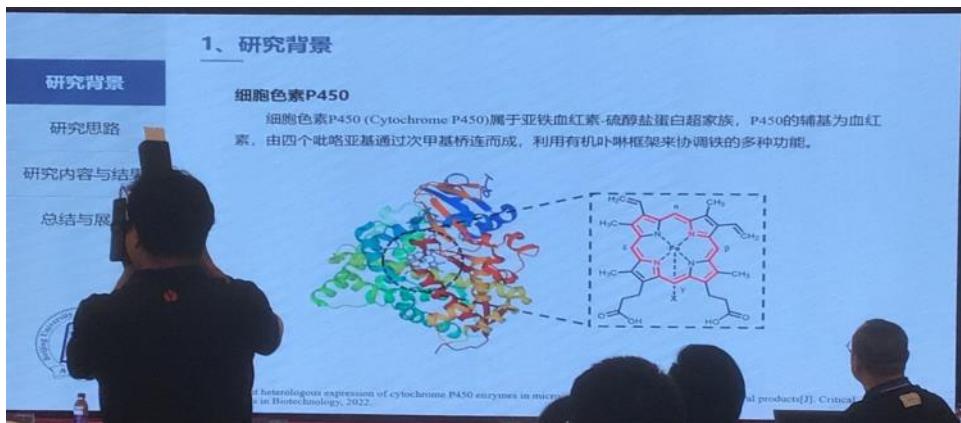
Manfred T. Reetz  
许建和 教授  
郁惠雷 教授  
周佳海 研究员  
王斌举 教授  
郭瑞庭 教授



中华人民共和国科学技术部  
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China

# 第十四届-24-高梓涵

2023年8月20日 星期日 14:34



## 1、研究背景

**研究背景**

**研究思路**

**研究内容与结果**

**总结与展望**

**细胞色素P450催化反应**

细胞色素P450可在温和条件下催化惰性C-H键的选择性氧化，其作为一种多功能酶，还可以在温和条件下催化多种反应，如羟化、环氧化、脱烷基化、碳-碳偶联、氧化裂解等。

**Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions**

## 1、研究背景

**研究背景**

**研究思路**

**研究内容与结果**

**总结与展望**

**细胞色素P450催化新反应类型**

P450包含的铁血红素能与活性化学前体（如重氮或叠氮化合物）反应，分别生成铁碳双键或铁侧双键中间体，介导卡宾和乃春插入C-H键，包括电子未活化的C(sp<sup>3</sup>)-H键。

- ◆ 卡宾转移到芳基位C-H键
- ◆ 高选择性功能化C(sp<sup>3</sup>)-H和C(sp<sup>2</sup>)-H键
- ◆ 分子内芳基位C-H键胺
- ◆ 对映选择性块丙基伯胺化

[1] Enzymatic assembly of carbon-carbon bonds via iron-catalysed C-H bond activation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61, 2119.  
[2] Chemodivergent Cyp(3)-H and Cyp(2)-H cyanomethylation using P450 2D1. *J Am Chem Soc*, 2023, 145, 219.  
[3] Enantioselective, intermolecular benzylic C-H amination catalyzed by P450 2D1. *Angew Chem Platform for Primary Amination of 1-Aryl-2-alkyl*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62, 2119.

## 1、研究背景

**研究背景**

**研究思路**

**研究内容与结果**

**总结与展望**

**黄酮类化合物**

- ◆ 黄酮是植物代谢产物，结构由具有芳基部分的苯二氢吡喃-4-1核和伴随的C2位置的立体中心组成。
- ◆ 具有多种生物学特性，如抗氧化、抗诱变活性和良好的抗肿瘤、抗炎特性。根据使用目的对其进行改造以增强水溶性或药物活性获得的衍生物，在药物化学中获得了广泛的应用。

[1] Catalytic enantioselective synthesis of flavanones and chromanones. *J Am Chem Soc*, 2007, 129, 12007.  
[2] Structure-function relationships of inhibition of human cytochrome P450 2D6 by flavonoids. *Environ Health Perspect*, 2010, 118, 1007.

## 2、研究思路

**研究背景**

**研究思路**

**研究内容与结果**

**总结与展望**

**01 酶的优势**

使用酶催化合成手性化合物具有操作简单、高立体选择性、绿色环保等优点

**02 P450催化特性**

催化卡宾转移的非天然反应的特性，进行C-H插入

**03 设计底物**

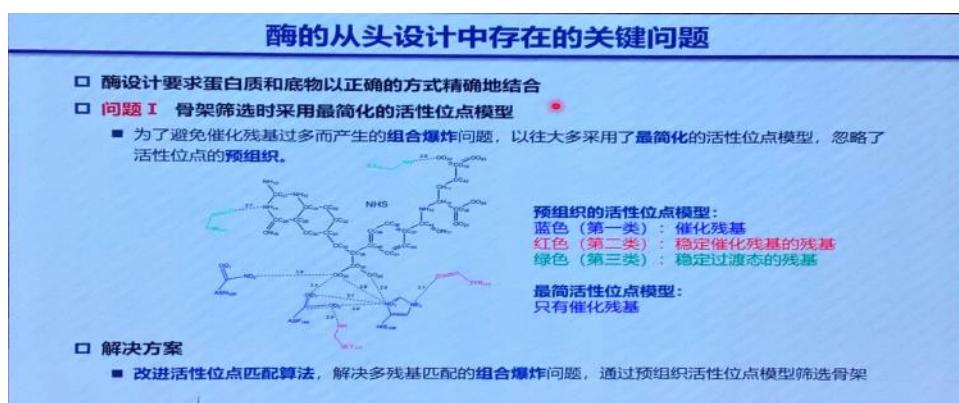
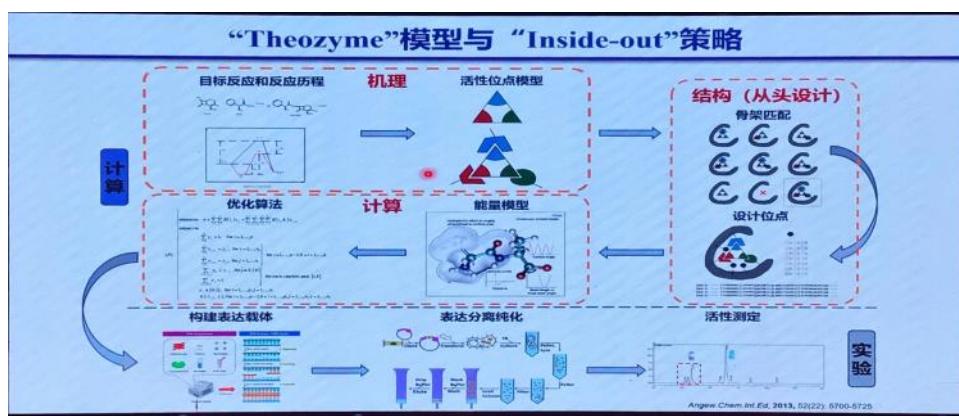
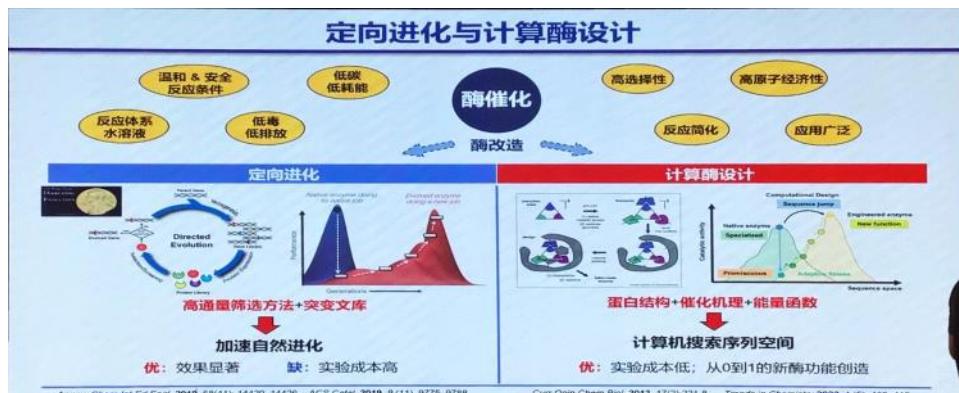
设计能够生成卡宾的前体化合物，如含有重氮基团的化合物

**04 酶的筛选与进化**

筛选有活性的P450变体，通过分子模拟等手段研究酶“杂泛性”催化机制

# 第十四届-25-张军

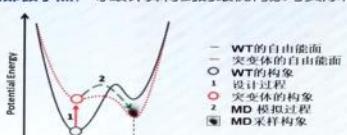
2023年8月20日 星期日 15:17



## 酶的从头设计中存在的关键问题

### □ 问题II 实际结合模式与设计存在偏差

- 原因①：以往再设计时，采用随机优化算法来优化体系自由能，求解速度快，但通常只能得到次优序列。
- 原因②：能量计算的建模方法本身存在缺陷，如使用了隐式水模型、离散的侧链构象、刚性骨架，以及可能产生多局部极小点，导致计算得到的最优构象与实际存在偏差。



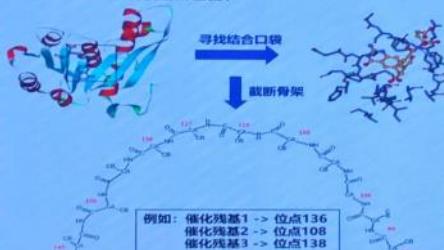
### □ 解决方案

- ①采用基于确定性全局优化算法的ProdaDesign对序列进行再设计
- ②结合MD模拟对酶的实际结合模式进行预测，筛除假阳性结果

## 活性位点匹配问题

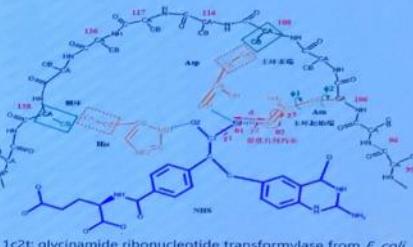
### 任务I

- ✓ 挑选蛋白骨架，找到结合口袋以及口袋中用于安装催化残基的所有位点组合；



### 任务II

- ✓ 确定催化残基侧链的构象和过渡态小分子的位置；
- ✓ 使催化残基和过渡态小分子之间满足催化约束



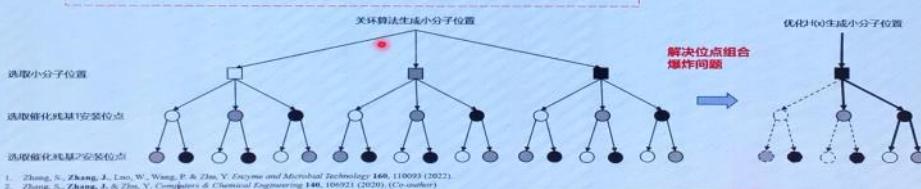
## ProdaMatch位点匹配算法：启发式搜索算法

### □ ProdaMatch算法求解流程



### □ 等价为树搜索问题

- 策略：根据评估函数  $F(x) = G(x) + H(x)$  进行减枝
- 复杂度： $O(C \times M)$ ,  $C$  为离散的小分子位置数目,  $M$  为催化残基数目

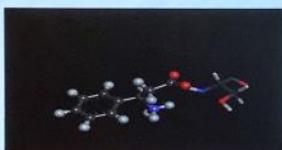


## 评估函数

### 建立位点选择评估函数

- 几何惩罚函数  

$$geometry\_penalty = \sum_{i=(d',\theta',\theta'')} \log \left( \frac{1 - e^{-k(i-\bar{i})}}{b} \right)$$
- 根据离散采样自适应地生成参数



### 对已安装位点的打分

- 碰撞能量
- 催化约束惩罚

$$G_i(x) = \sum_i energy\_score_i + \sum_j constraint\_score_j$$

### 对未安装位点的打分

- 几何惩罚
- 拟球碰撞能量
- 与骨架的催化约束惩罚

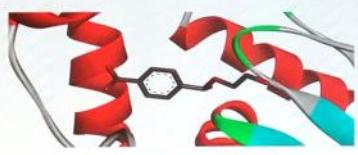
$$H_k(x) = \min \sum_{i=p, q} h_k(x, s_k), \text{ s.t. } s_p \neq s_q \text{ for } 1 \leq p < q \leq n$$

$$h_k(x, s) = geometry\_penalty + energy\_penalty + constraint\_score_{bs}$$

## ProdaDesign模块

### ➤ PRODA氨基酸序列多目标优化

能量分项:  $AG = E_{LJVDWard} + E_{LJresVDWRep} + E_{HIB} + E_{desolv} + E_{SC} + E_{hydrophobic} + E_{entropy}$   
酶-配体体系总能量 ( $AG^{Syst}$ ) = 折叠能 ( $\Delta G^{Fold}$ ) + 结合能 ( $\Delta G^{Bind}$ )



[活性口袋中的底物分子]

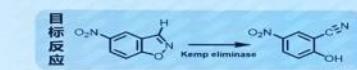
结合能( $\Delta G^{Bind}$ )  
酶与底物结合所需能量  
反映酶与配体间的专一性结合情况  
结合能越低底物与酶越容易结合

折叠能( $\Delta G^{Fold}$ )  
反映了酶三维结构的稳定性

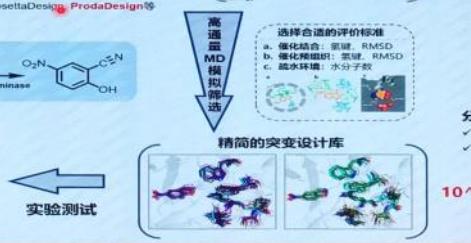


组合优化

## 基于MD模拟辅助计算酶设计的方法改造活性口袋



实验测试



计算酶设计的缺陷:

- ✓ 刚性骨架
- ✓ 隐式水模型
- ✓ 离散的残基构象

假阳性序列!

分子动力学(MD) 模拟:

- ✓ 显式水模型
- ✓ 连续的残基构象

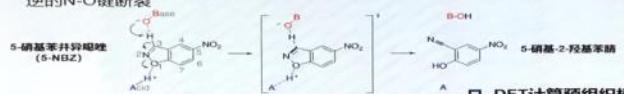
10^2以内

## 大佬讲思路

### 催化Kemp消除的活性位点模型

#### □ Kemp消除反应—非天然酶促反应

- 由苯并吡啶及其衍生物开环生成水杨腈的反应
- 决定步在于碳氢键的断裂过程，通过广义催化碱 (Asp127) 夺质子，导致不可逆的N-O键断裂



作为模型反应的优点:

- ① 反应机理较为明确
- ② 测活过程简单 (可见光色谱)
- ③ 不存在天然酶催化该类型反应
- ④ 已有设计成功的实例，便于进行比较

#### □ DFT计算预组织模型的过渡态结构

#### □ 构建预组织活性位点模型

催化残基: ASN1, ASP2

协助预组织的残基: ALA4, SER5

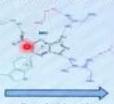
结合过渡态的残基: SER9, TRP6



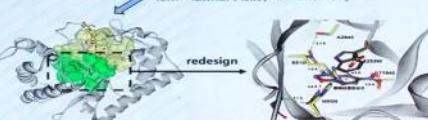
## 大规模蛋白质骨架库筛选

#### □ 在惰性骨架上引入活性位点模型

- 构建包含约17000个蛋白质结构的骨架库
- 根据碰撞能量、催化约束满足情况、活性位点催化碱包埋情况对匹配结果进行排序和筛选



PDB	催化约束	碰撞能量	溶剂可及相对表面积
4QMD	0.71	27.02	0.00
1XLS	0.86	25.49	0.00
3AOF	0.86	26.37	0.00
4Q7Q	0.73	27.63	0.02
3C84	0.74	27.26	0.02
2SWG	0.99	26.37	0.04
3HSI	0.83	26.85	0.06
4CZK	0.96	22.32	0.07
2VHD	0.74	26.46	0.08
UFRX	0.53	21.66	0.09



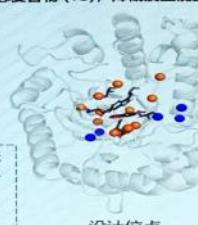
## 3AOF骨架口袋第一轮设计

### □ 设计策略

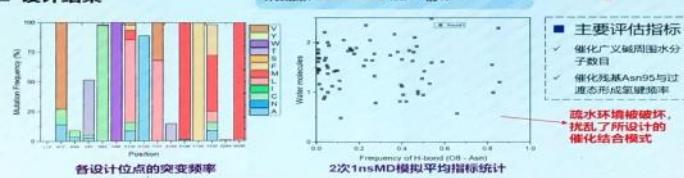
- 变类型位点: 8 A以内朝向的口袋的位点 (13个)
- 变构位点: 12 A以内朝向的口袋的位点 (5个)

催化残基	设计位点	变类型位点	只变构位点
Asp51, Asn95, Ser194, Trp253, Ser284	Leu12, Asn17, His49, Val91, Asn93, His96, Glu132, Asn135, Ile167, His196, Tyr198, Tyr250, Trp286		Ile54, Phe130, Ala136, Thr170, Trp173

### □ 设计关键 稳定酶过渡态复合物 (TS), 降低反应能垒



### □ 设计结果



## 3AOF骨架口袋第二轮设计

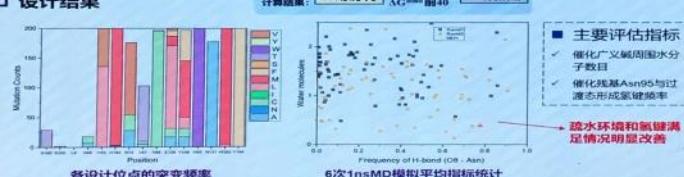
### □ 设计策略

- 策略 I: 对位于活性位点周边的位点, 限制其集中突变为同一位点
- 策略 II: 对于外围的设计位点, 根据MD指标固定为最有益的突变类型

催化残基	设计位点	变类型位点	只变构位点
Asp51, Asn95, Ser194, Trp253, Ser284	Asn17, His49, Val91, Asn93, His96, Glu132, Asn135, Ile167, His196, Tyr198, Tyr250, Trp286		Ile54, Phe130, Ala136, Thr170, Trp173

更改设计策略, 改变序列搜索空间, 使突变更集中于活性位点附近的设计位点

### □ 设计结果



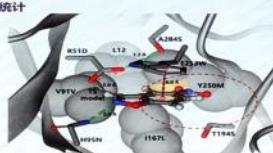
## 3AOF骨架口袋第二轮设计——进一步MD模拟分析

### □ 长时间MD模拟统计



### □ 统计结合模式分析

根据20 ns MD模拟, 发现过渡态的结合模式不正确, 原因在于硝基位置出现一处空穴

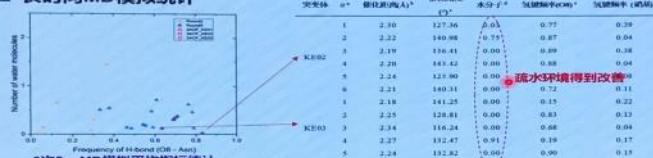


设计策略

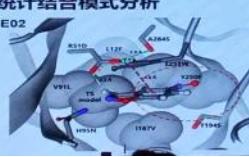
- 将Leu12强制突变为Phe, 通过空间位阻排除错误结合模式
- 同时针对His49, Val91, Ile167, Tyr250重新设计, 增强疏水堆积

## 3AOF骨架口袋第三轮设计——进一步MD模拟分析

### □ 长时间MD模拟统计



### □ 统计结合模式分析



6次20nsMD模拟平均指标统计



KE03中三个Phe形成了刚性的疏水堆积, 使得过渡态能维持在正确的结合模式上

## 实验结果验证计算设计

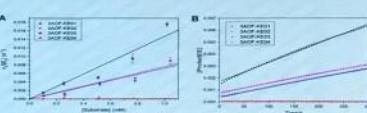
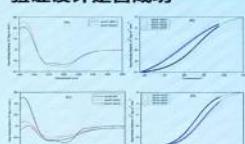
### □ 实验测活

- 根据米氏动力学测定对底物的反应动力学参数

Design	$K_m$ (M)	$K_m$ (mM)	$K_m/K_m$ (M <sup>-1</sup> )	$K_m/K_m$	T <sub>m</sub> (°C)
WT	ND	ND	ND	ND	92
KE01	0.011 ± 0.001	1.402 ± 0.078	7.626 ± 0.529	1.03 × 10 <sup>4</sup>	72.6 ± 0.6
KE02	0.012 ± 0.003	1.281 ± 0.573	9.534 ± 1.699	1.03 × 10 <sup>4</sup>	61.8 ± 1.2
KE03	0.033 ± 0.011	2.33 ± 0.456	14.04 ± 1.93	2.84 × 10 <sup>4</sup>	70.5 ± 1.5
KE03-D57A	ND	ND	ND	ND	77.3 ± 1.2

17点突变 从0到1!

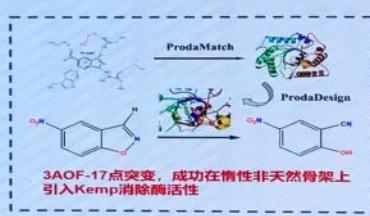
### □ 验证设计是否成功



- 在KE03的基础上敲除催化残基Asp51 (突变为Ala)，活性完全丧失
- SDS-PAGE电泳测定分子量，以确定蛋白质正确表达
- 圆二色光谱测定二级结构含量和T<sub>m</sub>，以确定蛋白质正确折叠

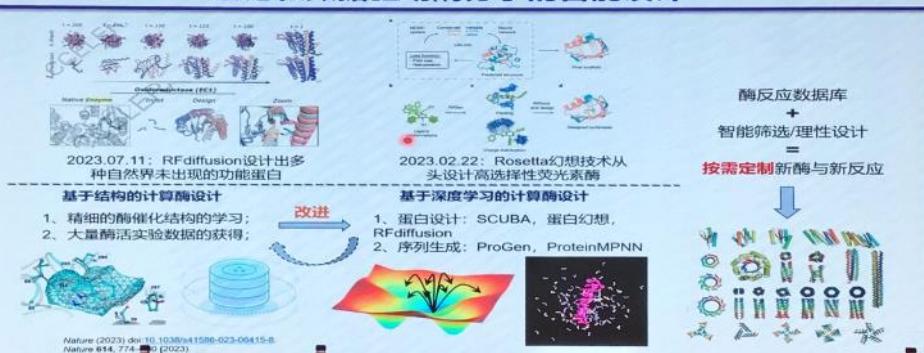
## 研究小结

1. ProdaMatch匹配算法能够处理具有多个活性位点的复杂模型的匹配问题，通过建立复杂预组织模型，能够满足酶催化反应用于残基位点和底物之间精确的构象要求；
2. 基于Proda的算法框架具备酶的从头设计和再设计的完整开发能力，仅实验测试4个突变体就实现了Kemp消除反应的酶从头设计，具有较高的准确性；
3. 通过高通量MD模拟辅助酶设计筛选，能够大幅降低突变设计库的通量，并排除酶设计中错误的结合构象，提升酶设计的成功率。



Zhang et al. Enzyme Microb. Technol., 2022

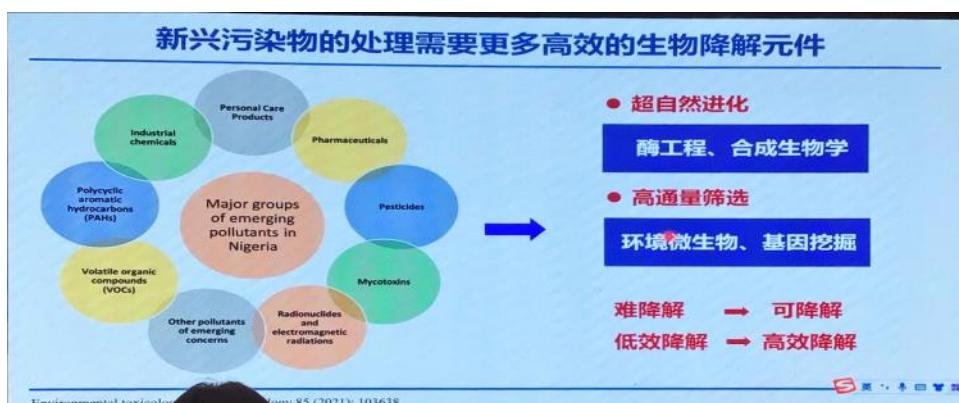
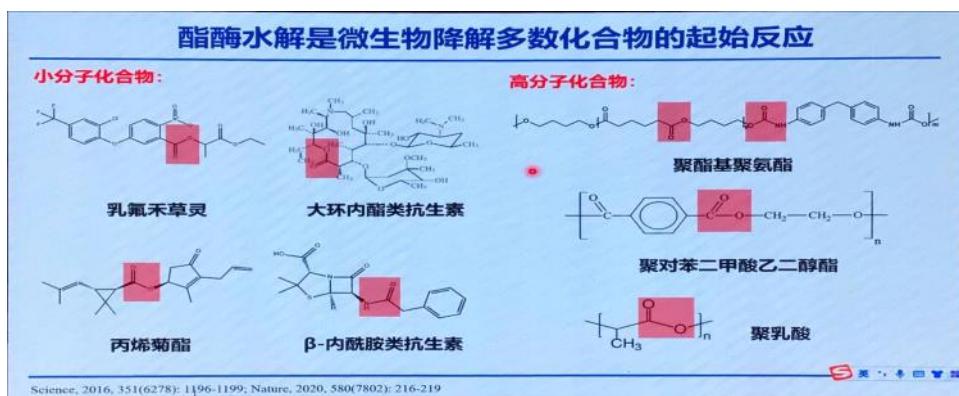
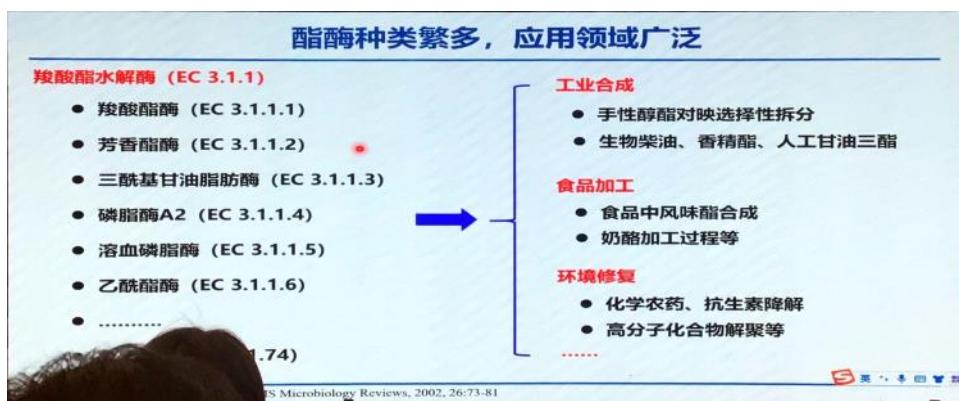
## 理论和数据驱动酶分子的智能设计

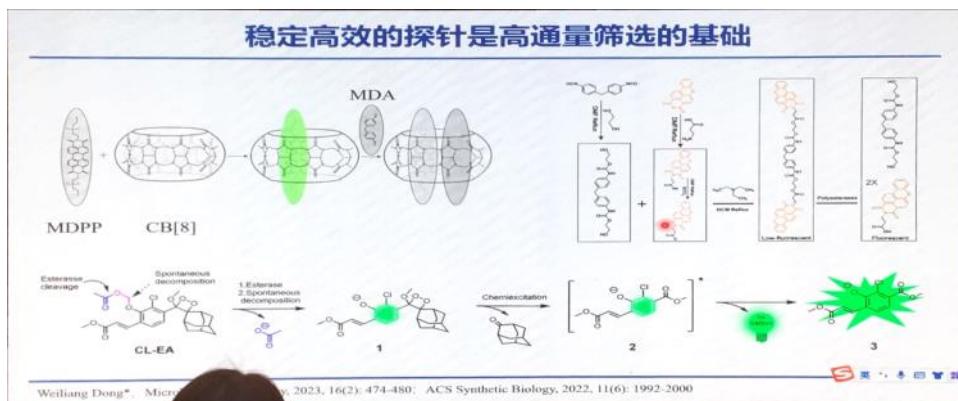
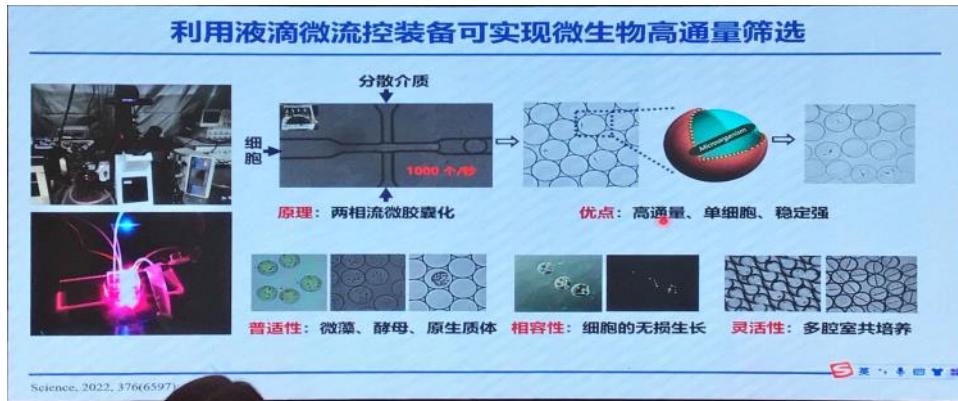


# 第十四届-26-董维亮

2023年8月20日 星期日 15:34

## 踏实的科研工程师



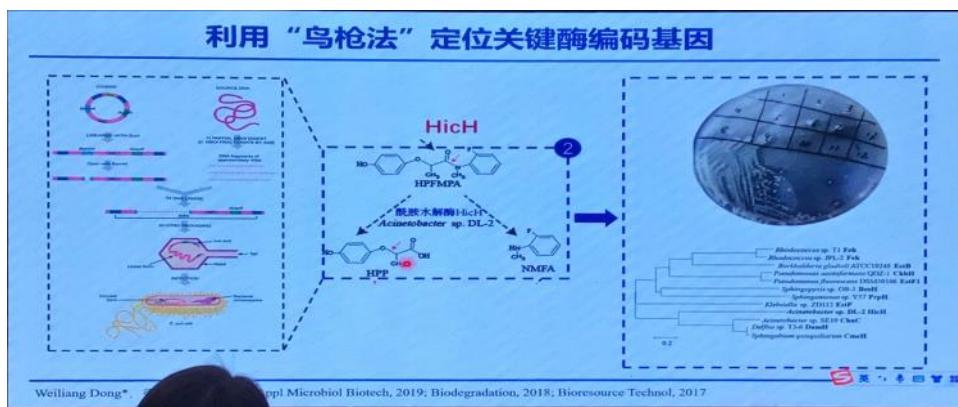


**筛选高效降解含酯键化合物的微生物菌种资源**

污染物类型	代表菌株
化学农药	<i>Comamonas testosteronei</i> W1 <i>Fusarium</i> sp. CS-3 <i>Pigmentiphaga</i> sp. DL-8 <i>Acinetobacter</i> sp. DL-2 <i>Sphingobacterium</i> sp. DL-4 <i>Rhodococcus</i> sp. T3-1 <i>Mucilaginibacter yixingensis</i> sp. nov.
聚酯类塑料	<i>Cladosporium</i> sp. P7 <i>Delftia</i> sp. WL-3 <i>Bacillus</i> sp. PU-5
天然大分子	<i>Escherichia</i> sp. R8 <i>Lysimbeccus</i> sp. L3 <i>Brevundimonas</i> sp. L5 <i>Taeniella mepensis</i> gen. nov., sp. nov. <i>Clostridium</i> sp. strain NJ4 <i>Clostridium beijerinckii</i> NA002 <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. MS <i>Clostridium pasteurianum</i> CT7

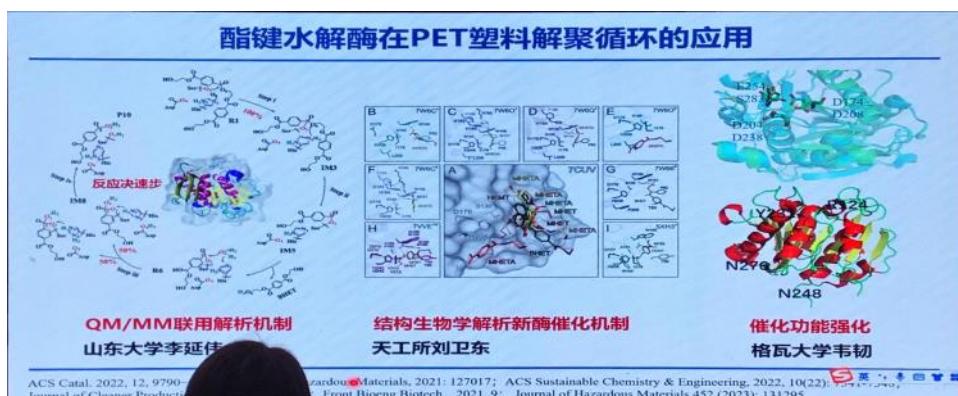
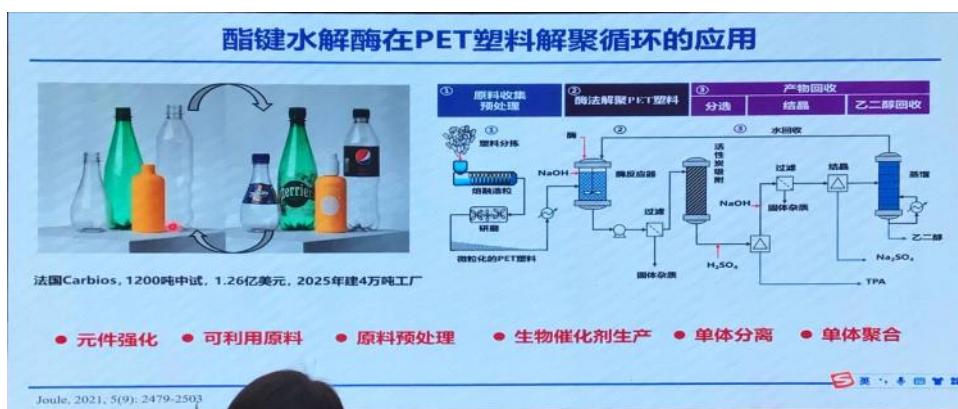
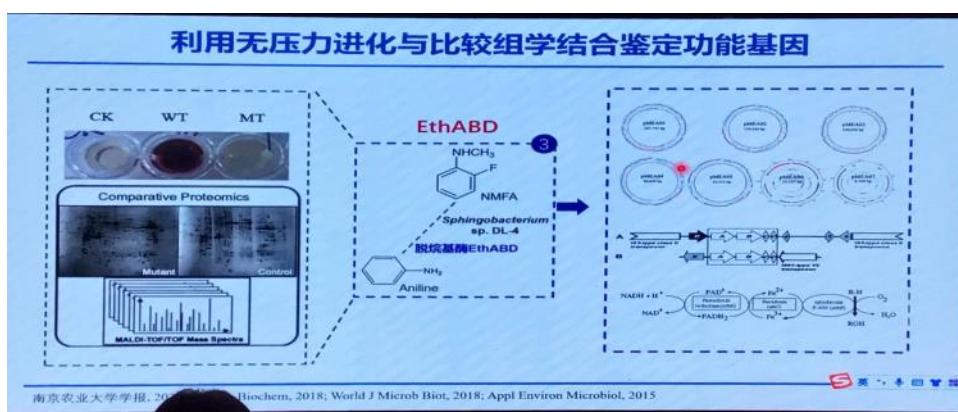
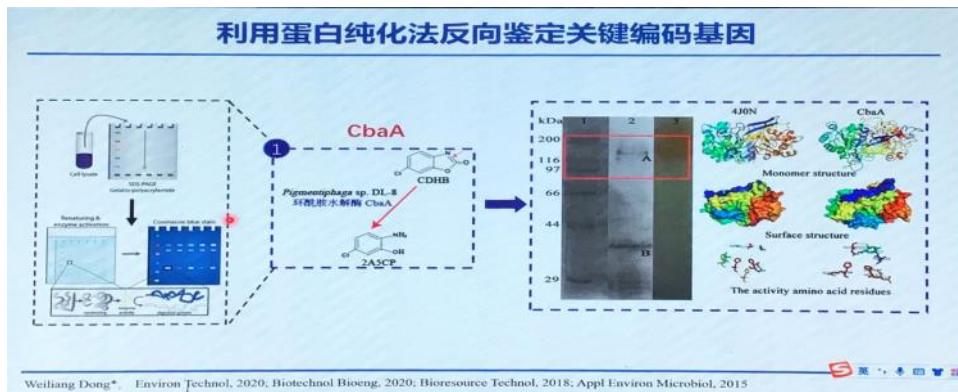
国家微生物资源平台  
农业微生物资源平台  
参建单位

Agricultural Microbial Resource Protection and Germplasm Innovation and Utilization Center of Jiangsu Province  
江苏省农科院



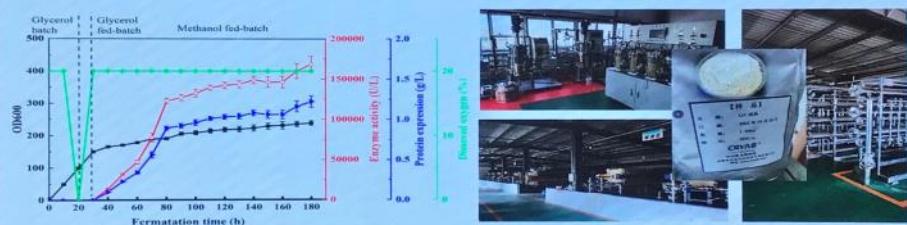
鸟枪法基因挖掘  
真菌做不了，有内含子

# 诱导性的酶不行 统一基因簇的没法用



## 酯键水解酶在PET塑料解聚循环的应用

- 完成PET解聚酶的规模化制备以及制剂化（固体酶制剂和液体酶制剂）



基因拷贝数优化

分子伴侣共表达

翻译起始活性调控

发酵条件优化

Weiliang Dong et al., Int J Biol Macromol 2021, 188: 568-575

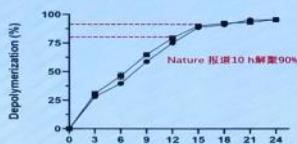
## 酯键水解酶在PET塑料解聚循环的应用

- 完成百公斤级废弃PET瓶片的连续化预处理工艺



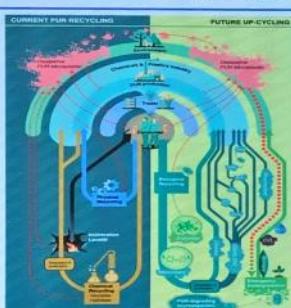
## 酯键水解酶在PET塑料解聚循环的应用

- 建立了50L体系酶解工艺体系，目标是月处理吨级PET



宋一平 李四清

## 酯键水解酶在聚氨酯塑料解聚循环的应用



### 使用量巨大

- 2021年，占全球塑料产量的5.5%
- 2020年，我国废弃量近千万吨，多被填埋和焚烧

### 单体结构多样

- 多种硬段(多元醇)和软段(异氰酸酯)
- 多元醇包括聚酯型和聚醚型
- 异氰酸酯主要使用的为MDI和TDI

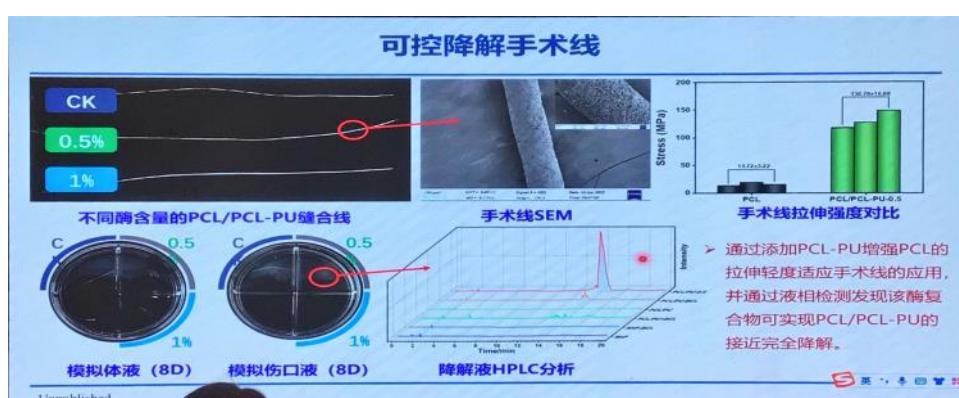
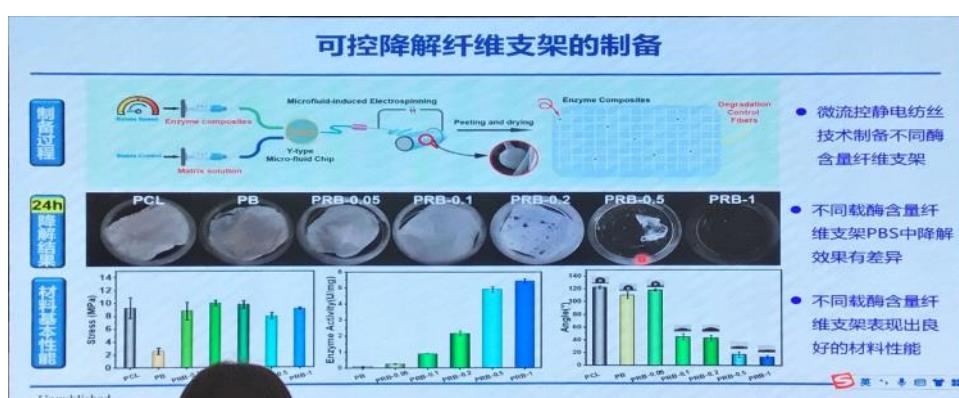
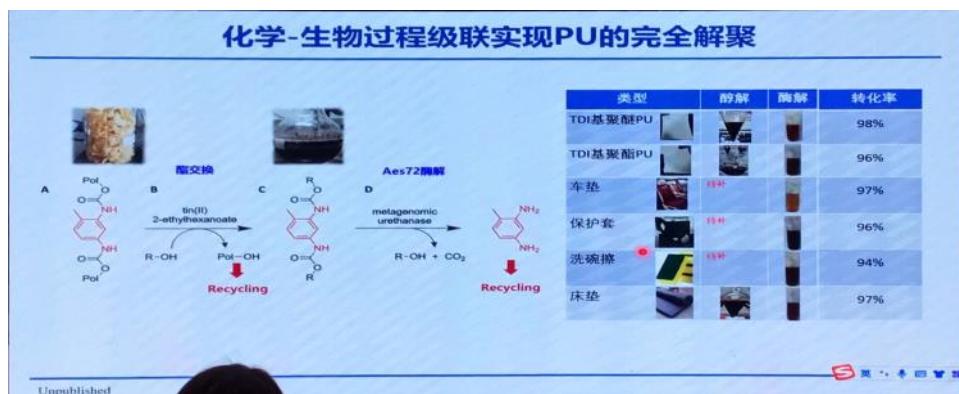
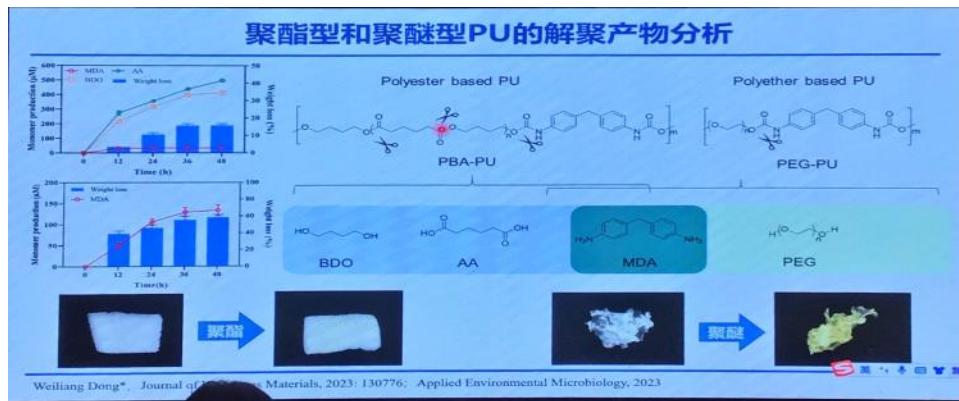
### 应用领域广

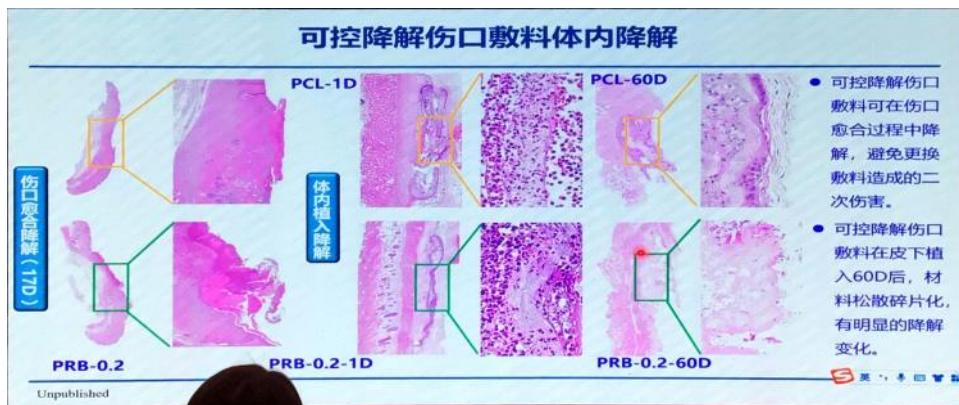
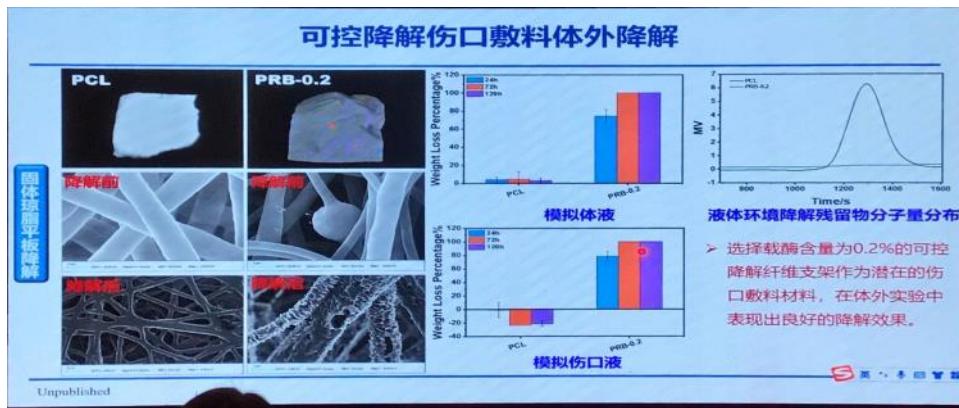
- 热固性泡沫用于家居和建筑等，占比近70%
- 热塑性弹性体、涂料等

生物酶法回收技术的新靶标，目前尚无有效的生物元件

Jiawei Liu, Weiliang Dong\*, Min Jiang\*, et al., Biotechnology Advances 48 (2021) 107730

宋一平 李四清

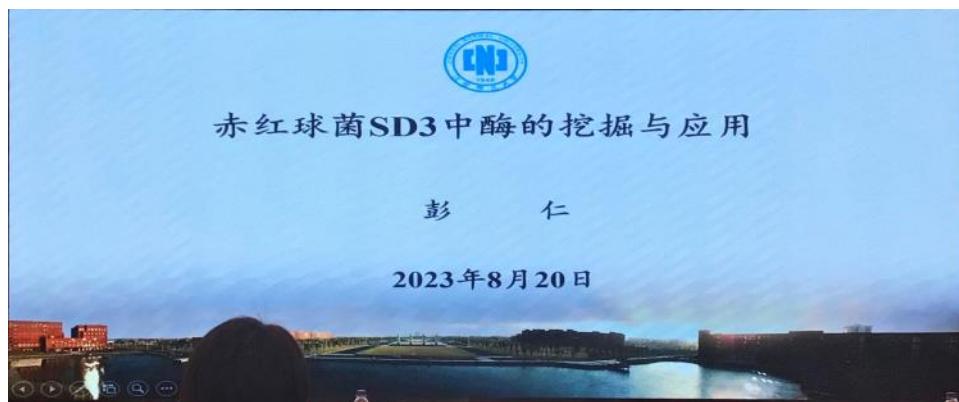




# 第十四届-27-彭仁

2023年8月20日 星期日 15:57

谦逊的童心的



Part1 Part 2 Part 3 Part 4 1.2 有机溶剂耐受微生物

菌株	降解能力	作者和年份
<i>R. erythropolis</i> UPV-1	1.78g/L, 100% phenol	A. Hidalgo et al. 2001
<b><i>R. ruber SD3</i></b>	<b>1.5g/L, 99.8% phenol, 3 d</b>	<b>Ren Peng et al. 2013</b>
<i>R. rhodochrous</i> BX2	0.8g/L, 100% acetonitrile , 24 h	Chunyan Li et al. 2013
<i>R. sp.</i> CMGCZ	0.5g/L, 99.3% (Fla), 7 d	Rifat Zubair Ahmed et al. 2016
<i>R. sp.</i> FUM94	271μM, 68.8% DBT	Somayeh Khosravinia et al. 2017
<i>R. rhodochrous</i> IEGM 107	0.5g/L, 100%DHA, 7 d	Kseniya M. Cheremnykh et al. 2018
<i>R. ruber</i> YC-YT1	100 mg/L, 100% DEHP, 3 d	Ting Yang et al. 2018

赤红球菌讲解苯酚效果不错





01

代谢途径

02

分子伴侣

03

外排泵和囊泡运输

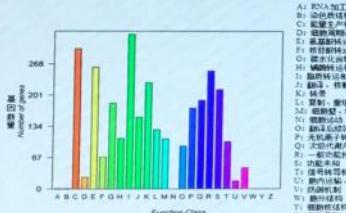
04

细胞膜的成分

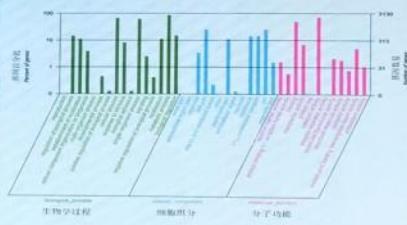
*Rhodococcus ruber SD3*

基因预测信息统计表

项目	数值
基因数量	5120
基因总长度(bp)	4933602
基因平均长度(bp)	963.59
基因密度(kb)	0.95
基因区GC含量(%)	70.88
基因/基因组(%)	91.93

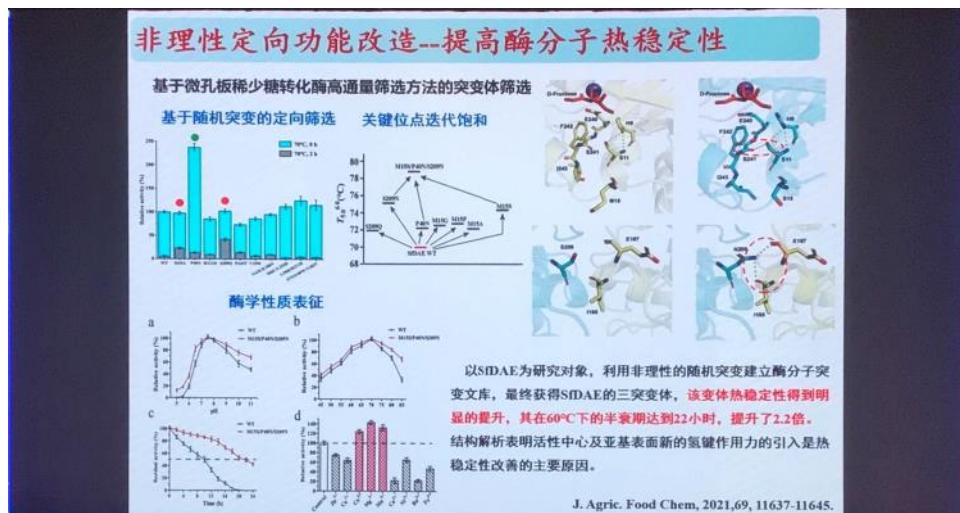
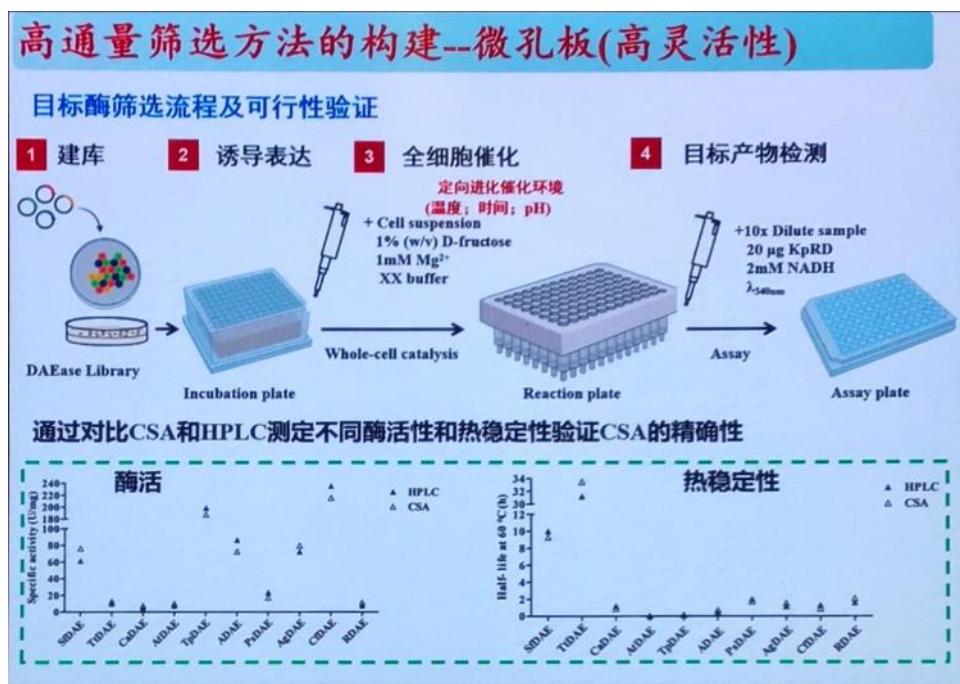
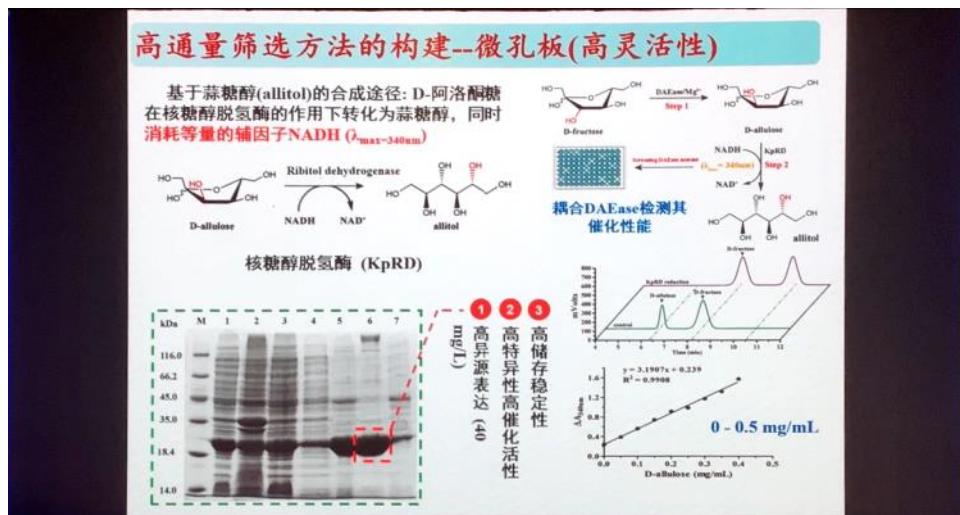


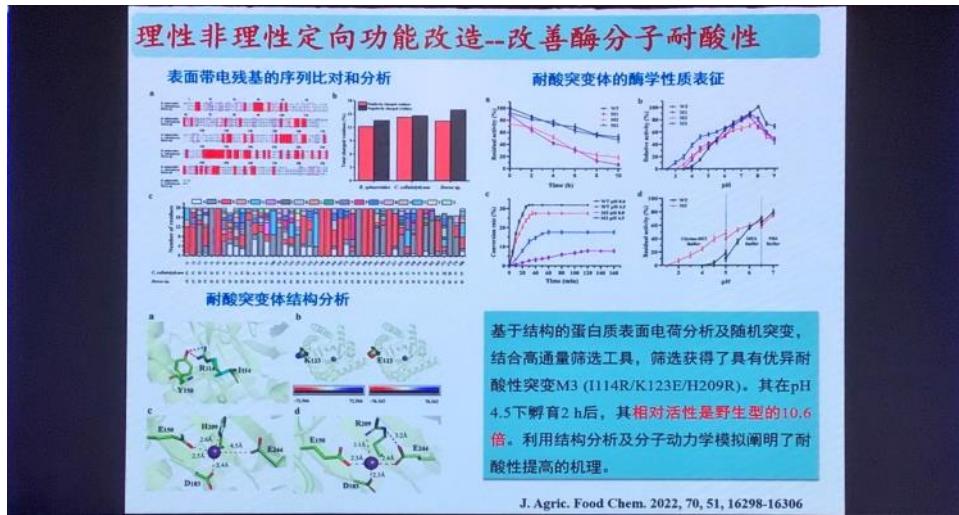
- A: RNA加工和降解
- B: 信号转导和力学
- C: 细胞壁
- D: 细胞周期调节、细胞分裂、染色体分配
- E: 核苷酸代谢
- F: 碳代谢
- G: 氮代谢
- H: 基本生命过程和代谢
- I: 磷酸盐代谢
- J: 脂肪酸代谢
- K: 酶活性中心
- L: 重复、重叠和冗余
- M: 核酸代谢、翻译、修补核酸生物合成
- N: 蛋白质
- O: 蛋白质折叠、蛋白酶体、伴侣
- P: 蛋白质运输、膜转运蛋白
- Q: 大孢子形成/孢子的生物合成、休眠和代谢
- R: 其他未知功能
- S: 功能未分类
- T: 信号转导机制
- U: 分子运输
- V: 分子运输和囊泡运输
- W: 脂类代谢
- Z: 未知功能



# 第十四届-28-秦慧民

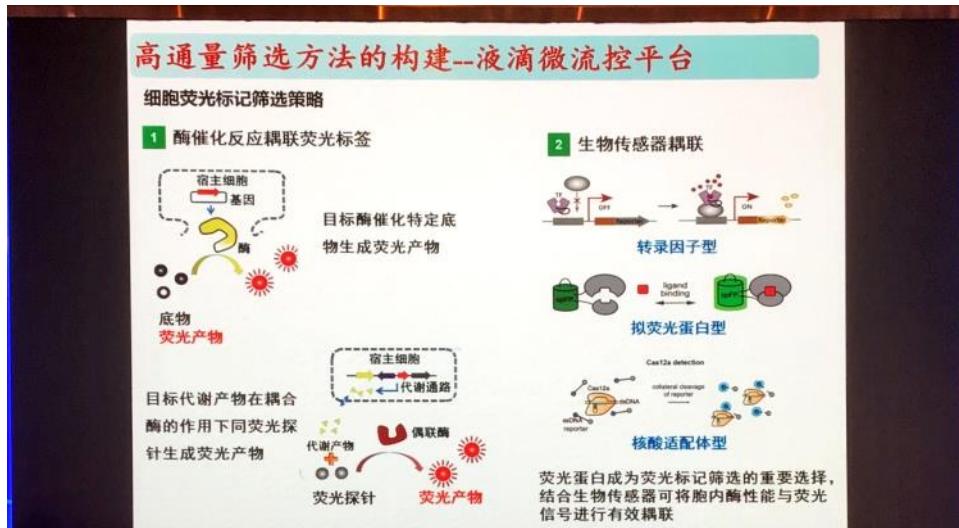
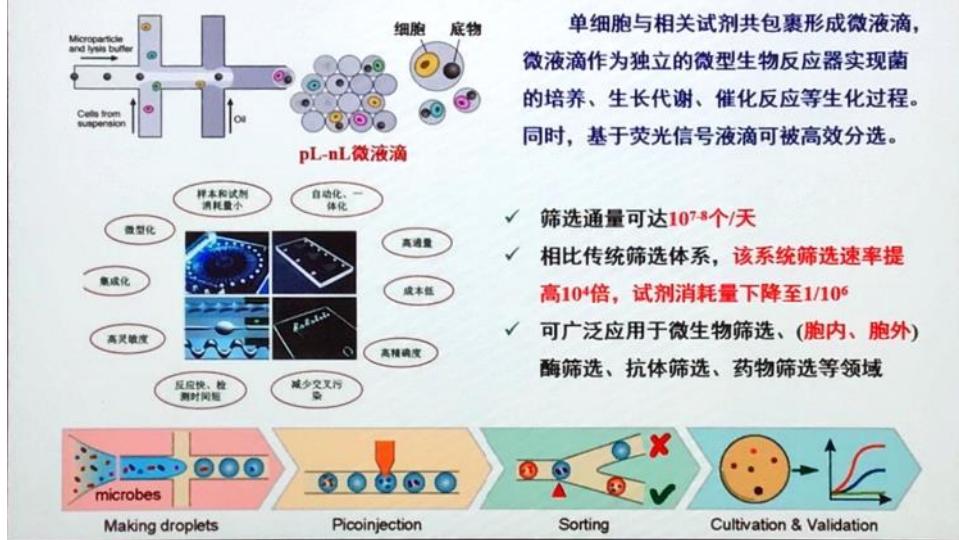
2023年8月20日 星期日 16:08

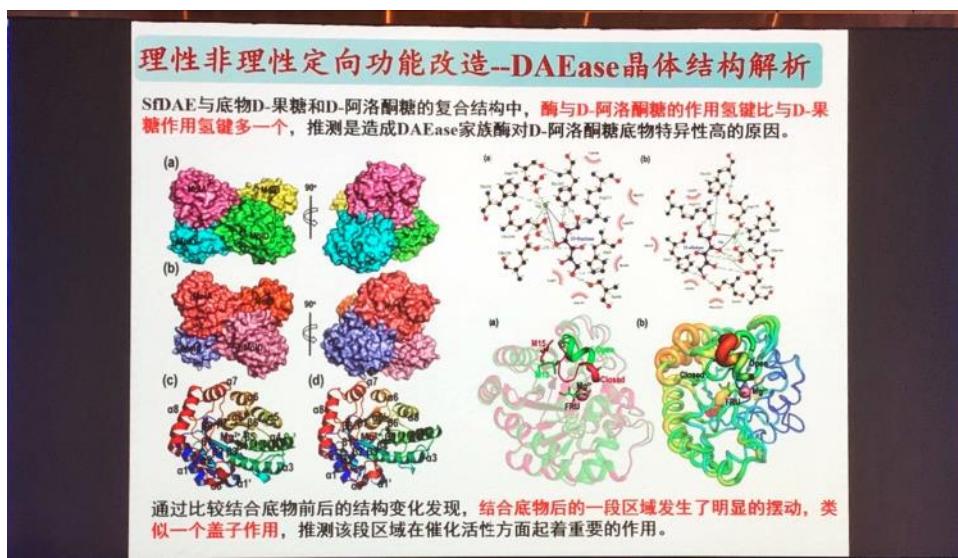
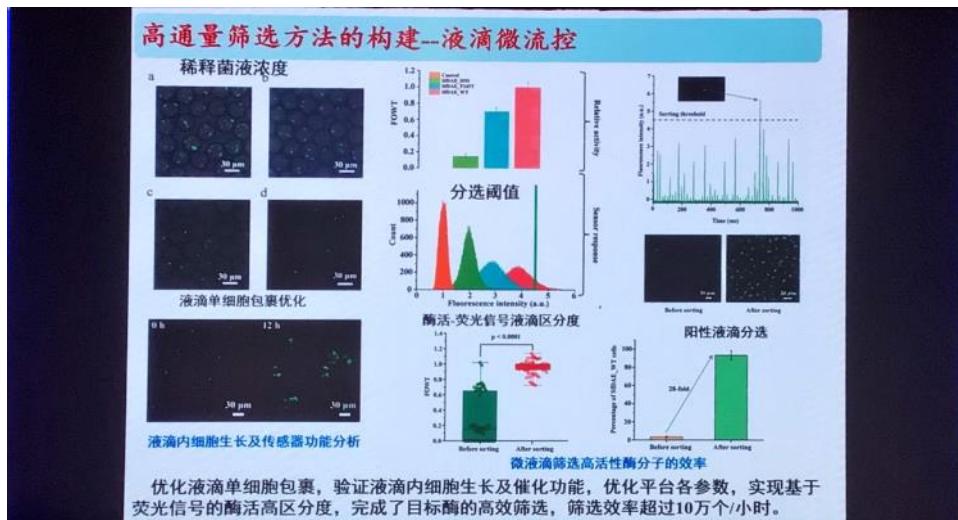
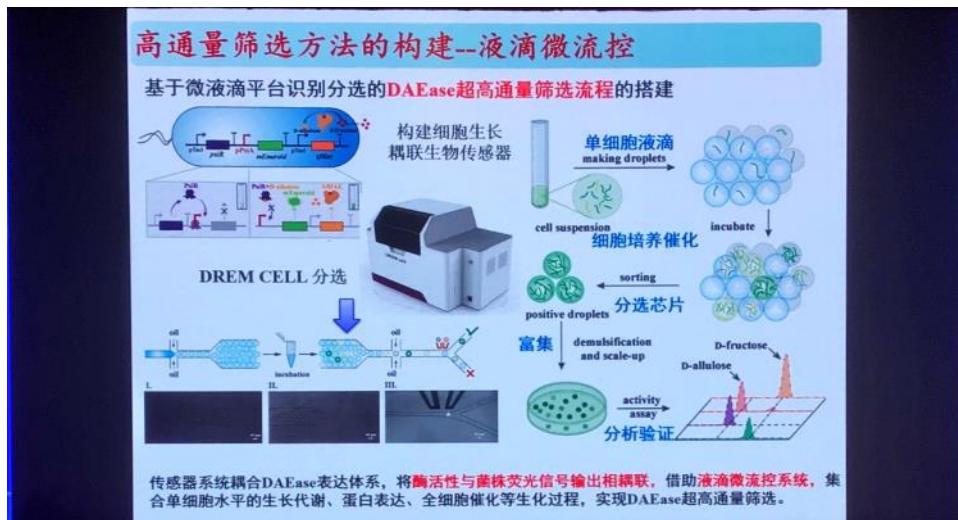


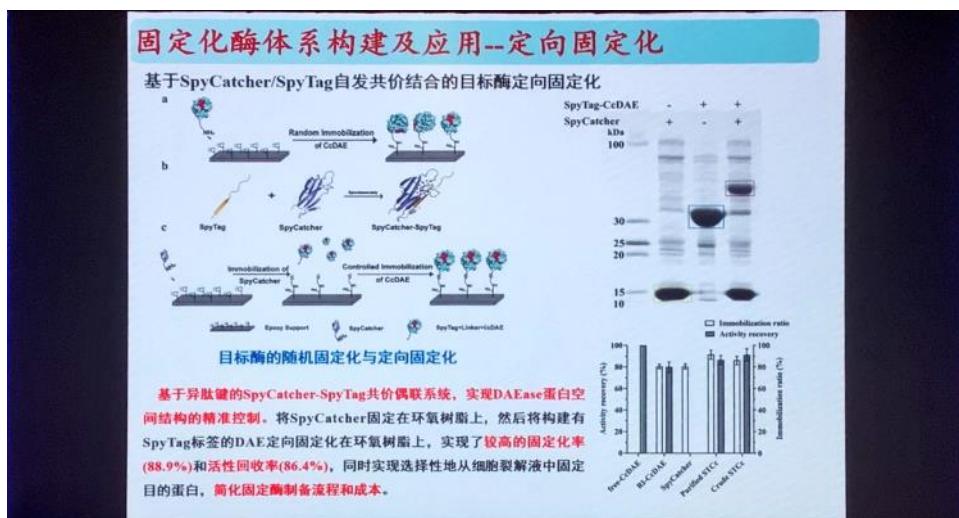
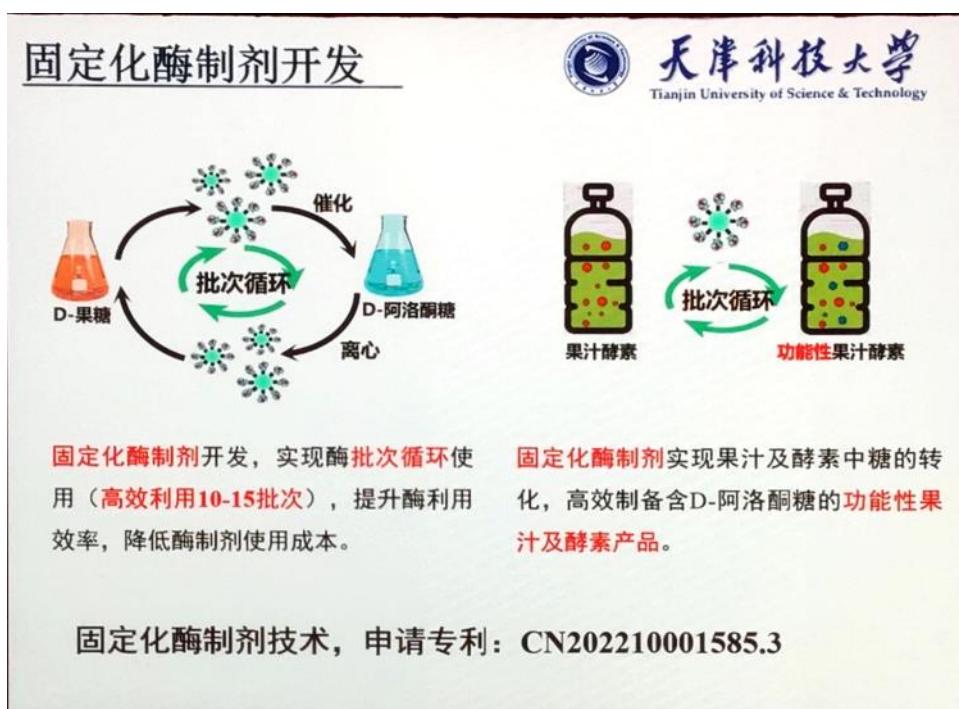
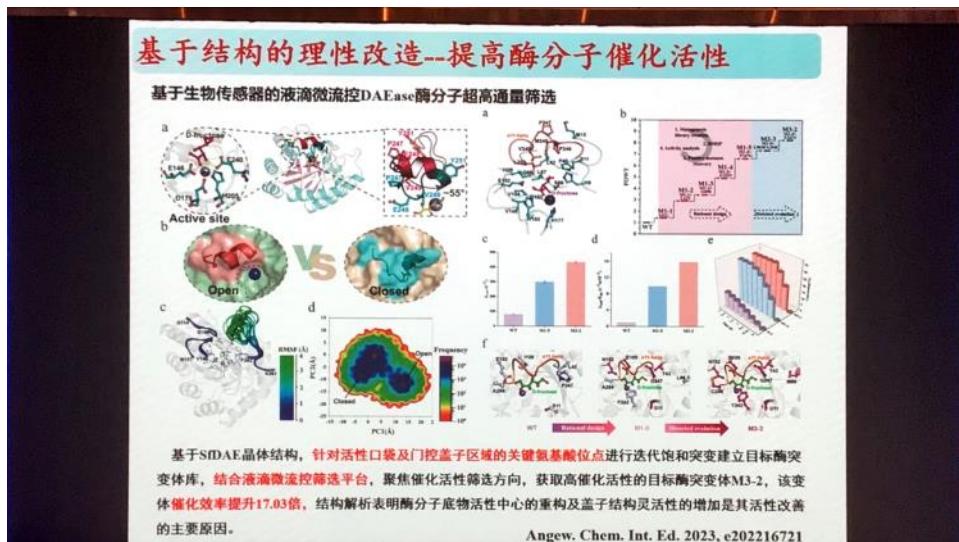


## 高通量筛选方法的构建--液滴微流控平台(高效性)

筛选通量是影响进化效率的决定性因素之一，液滴微流控分选(FADS)+荧光信号：强强联合，筛选通量 $>10^{7.8}/d$ ，为超高通量筛选提供可能。

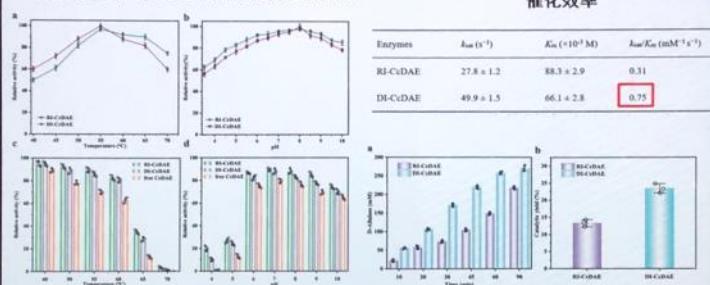






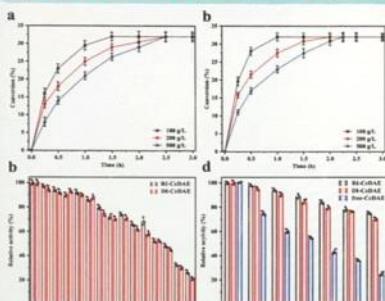
## 固定化酶体系构建及应用--定向固定化

目标酶随机固定与定向固定催化性能分析

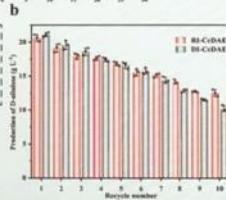


两种酶的固定化策略减缓了温度、pH对CcDAE的活性的影响，并提高了CcDAE的热稳定性和pH稳定性；基于对D-阿洛酮糖催化合成功能对比表明DI-CcDAE(定向固定)的催化效率更高。同时，RI-CcDAE(随机固定)和DI-CcDAE对D-阿洛酮糖的动力学参数也表明DI-CcDAE具有更好的催化效果。

## 固定化酶体系构建及应用--定向固定化



以500 g/L高浓度的D-果糖为底物，利用固定化酶催化，最终转化率都达到30%。在循环经过7个循环反应或是存放25天后，仍保持了80%的初始活性，表明了其在工业生产中的巨大应用潜力。

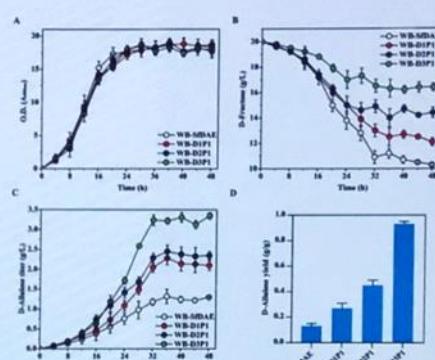
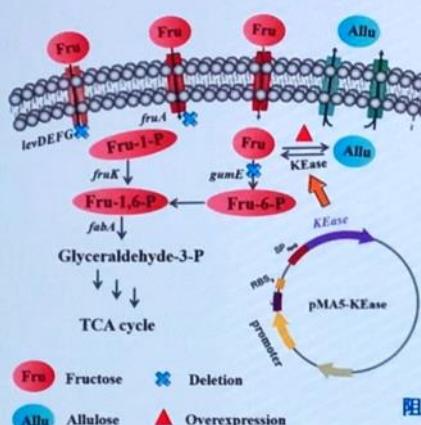


以混合酶素为固定化酶催化转化的对象，固定化酶能够有效地将酵素中的D-果糖转化为D-阿洛酮糖。RI-CcDAE和DI-CcDAE被重复使用了10个循环，循环使用性能良好。

Food Chem. 2022, 401, 134199.

## 微生物高效转化体系构建

目标酶底盘工程菌株构建



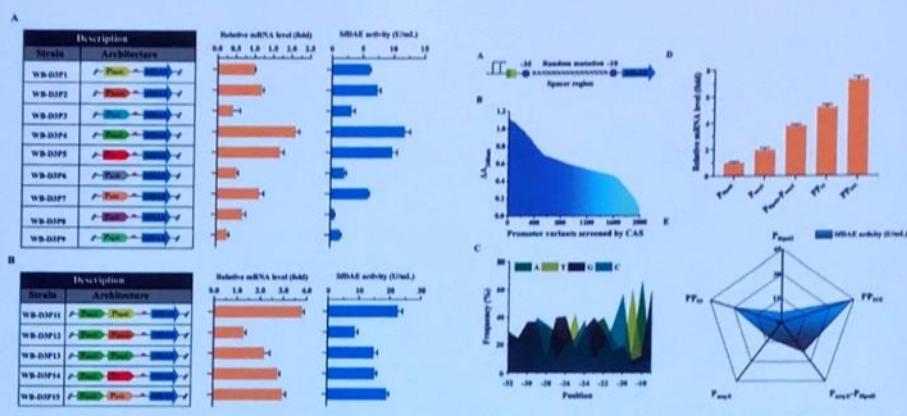
阻断D-果糖消耗途径以改变碳代谢通量

以枯草芽孢杆菌(GRAS菌株)作为出发菌株，构建目标酶高效表达工程菌：1.改造原始菌株代谢途径，控制底物代谢流向，专一化产物合成；2.引入目标酶表达系统，实现菌株目标产物功能化生产。

J. Agric. Food Chem. 2022, 70, 13935-13944.

## 微生物高效转化体系构建

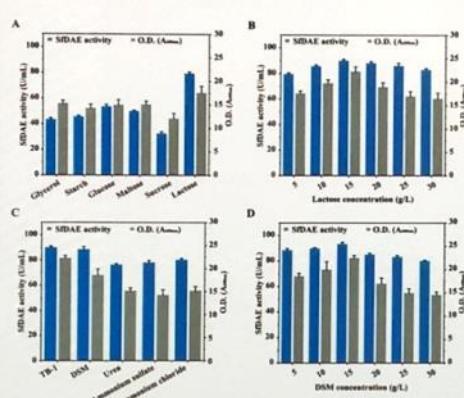
目标酶表达系统调控元件优化



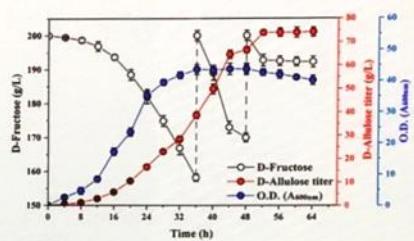
目标酶表达系统调控元件多维度优化，通过组装最优启动子及优化启动子-35/-10间隔区，最大程度发挥底盘工程菌高效表达目标酶的潜力。实现酶活力最大化，摇瓶水平酶活力达到 $22.7\text{ U}/\text{mL}$ 。

## 微生物高效转化体系构建

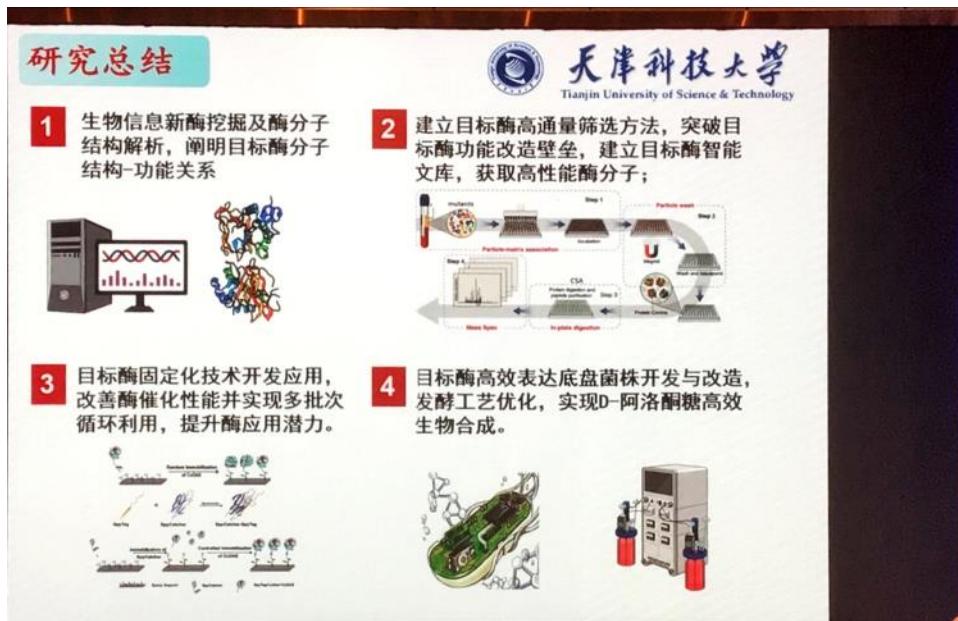
发酵条件优化



### 分批补料发酵生产D-阿洛酮糖

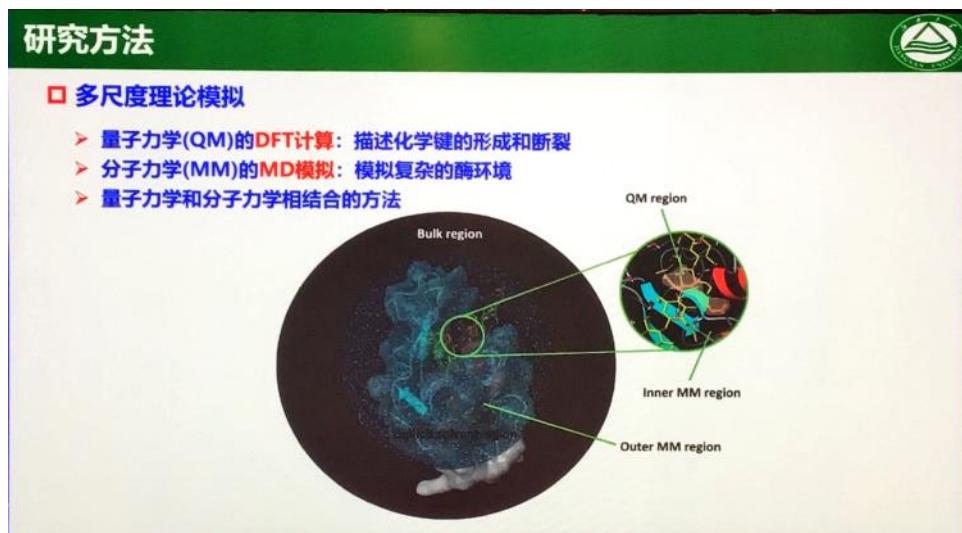
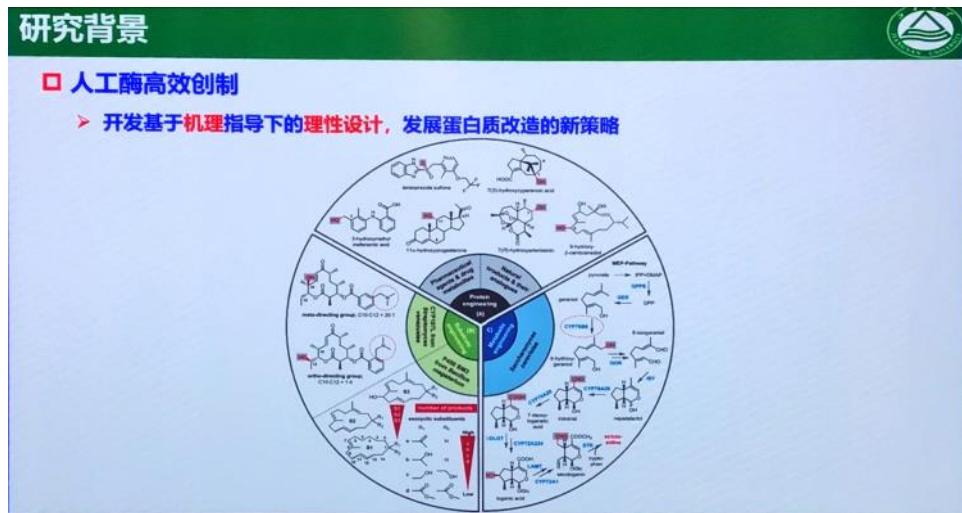


在摇瓶水平上对发酵条件进行优化，在5 L的生物反应器中利用最优底质菌株WB-D3PPS1E发酵生产D-阿洛酮糖，发酵64 h后消耗79.6 g/L D-果糖，D-阿洛酮糖效价达到74.2 g/L，D-阿洛酮糖的比产率为0.93 g/g，表明消耗的D-果糖几乎全部被有效利用合成D-阿洛酮糖。

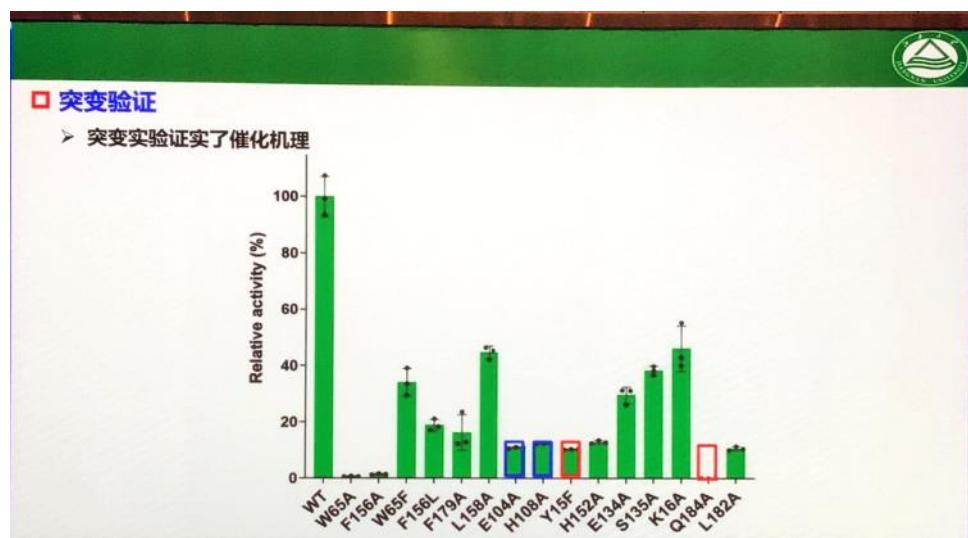
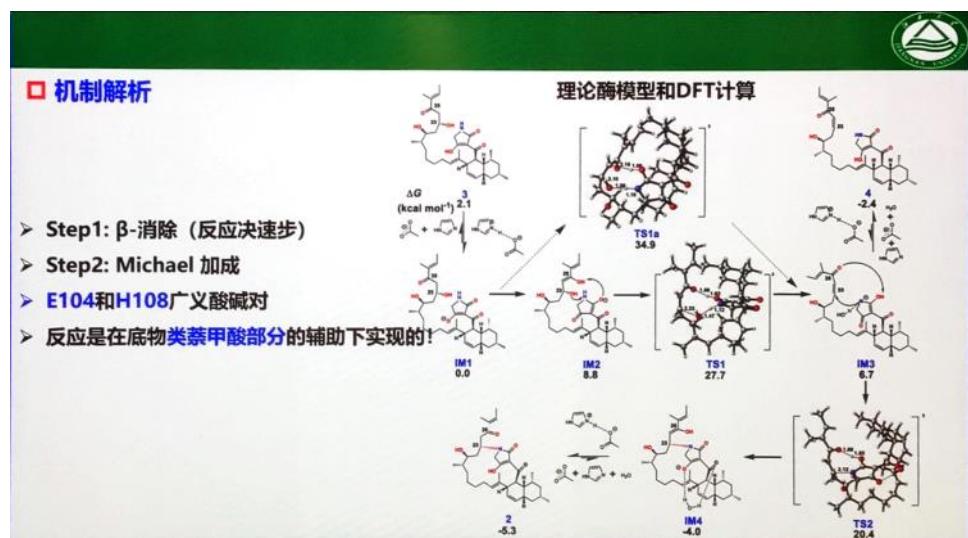
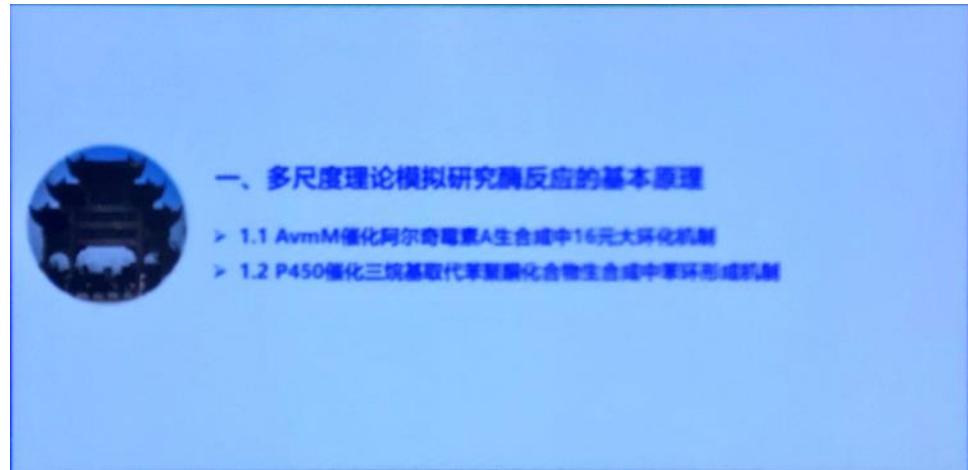


# 第十四届-29-魏婉清

2023年8月20日 星期日 16:23



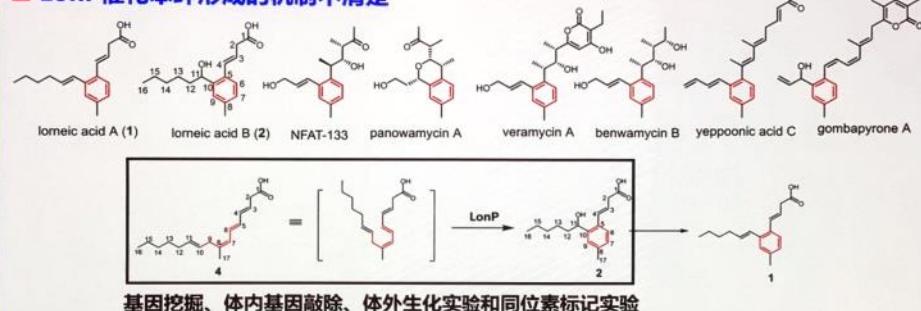
- 
- 一、多尺度理论模拟研究酶反应的基本原理
  - 二、多尺度理论模拟揭示酶选择性的调控机制
  - 三、多尺度理论模拟开发酶理性设计和改造策略



## 1.2 P450催化三烷基取代苯聚酮化合物生合成中苯环形成机制



### □ LonP催化苯环形成的机制不清楚

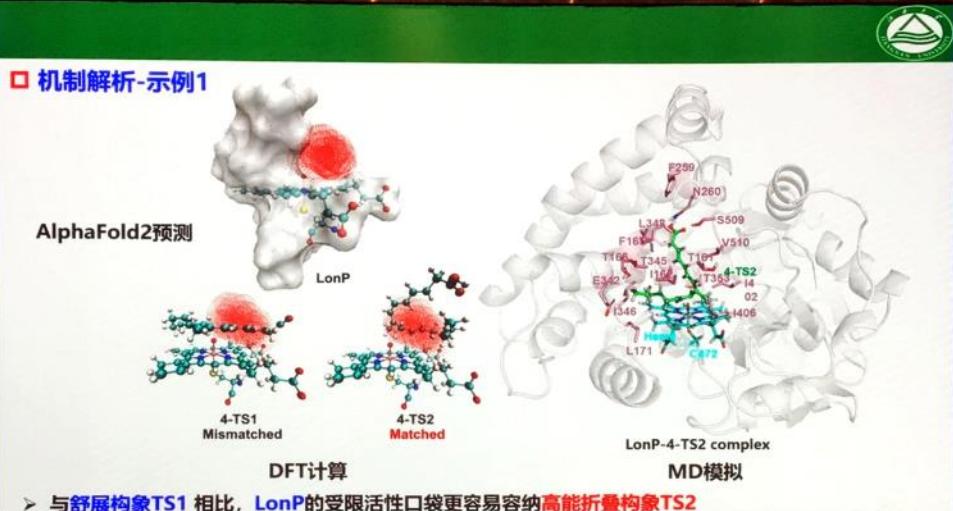
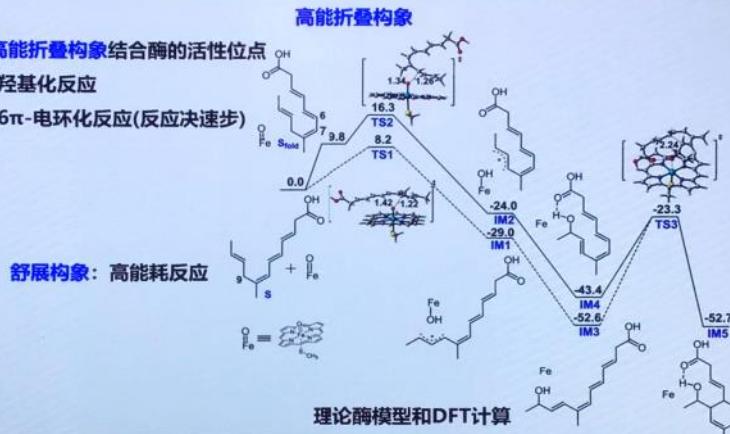


基因挖掘、体内基因敲除、体外生化实验和同位素标记实验

与南大戈惠明、焦瑞华课题组合作  
Yang, Y. M.\*; Zhao, E. J.\*; Wei, W.\*; Xu, Z. F.; Shi, J.; Wu, X.; Zhang, B.; Igarashi, Y.; Jiao, R. H.\*; Liang, Y.\*; Tan, R. X.; Ge, H. M.\* *Angew. Chem. Int. Ed.* 2023, 62, e202214026.

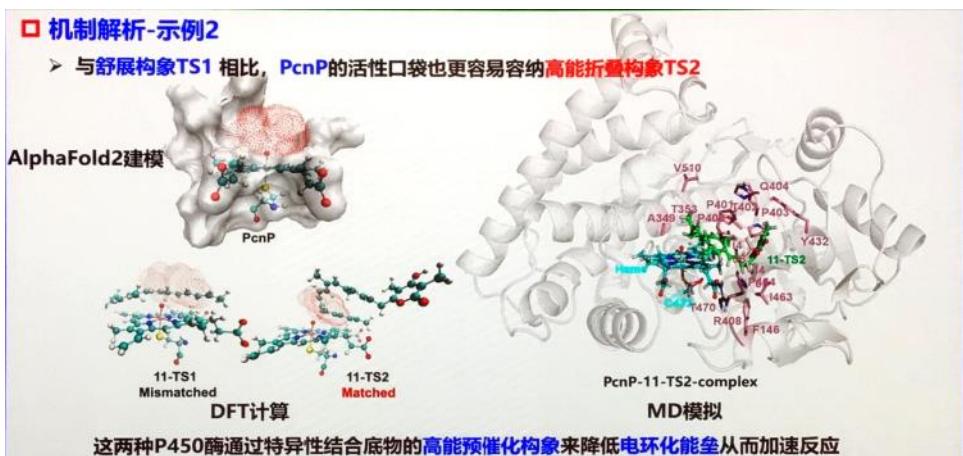
### □ 机制解析

- 底物以高能折叠构象结合酶的活性位点
- Step1: 羟基化反应
- Step2: 6π-电环化反应(反应决速步)



### □ 机制解析-示例2

- 与舒展构象TS1相比, PcnP的活性口袋也更容易容纳高能折叠构象TS2



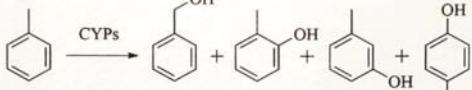


## 二、多尺度理论模拟揭示酶选择性的调控机制

- 2.1 P450催化甲苯羟基化的位点选择性机制
- 2.2 BcmB控制的关环选择性机制

### □ P450BM3催化甲苯羟基化的位点选择性机制不清楚

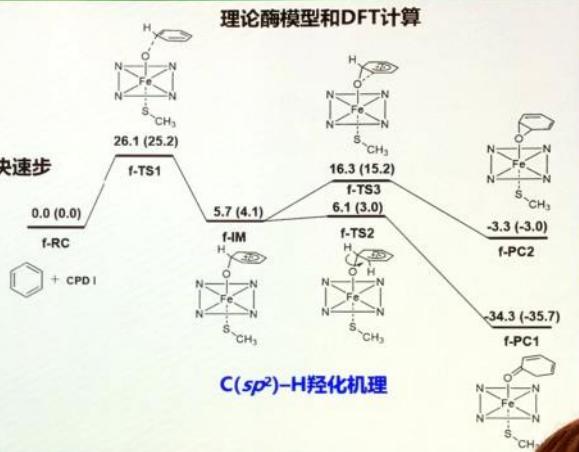
- 不同亚型、不同突变体P450在甲苯羟基化的位点选择性有很大差异

	Toluene	BA	o-cresol	m-cresol	p-cresol
CYPs in rat liver <sup>3</sup>	69	15	—	16	
CYP2E1 <sup>4-6</sup>	88-91	—	—	9-12	
P450BM3 WT <sup>9</sup>	{ 2 }	98 { }	—	—	
P450BM3 + decoy <sup>11-13</sup>	2-3	94-96	—	2-3	
P450BM3 variant KT5 <sup>9</sup>	{ 95 }	5 { }	—	—	

Wu, X., Chen, Y., Wang, X., Wei, W.\*; Liang, Y.\* J. Org. Chem. 2021, 86, 13768.

### □ 反应机制解析

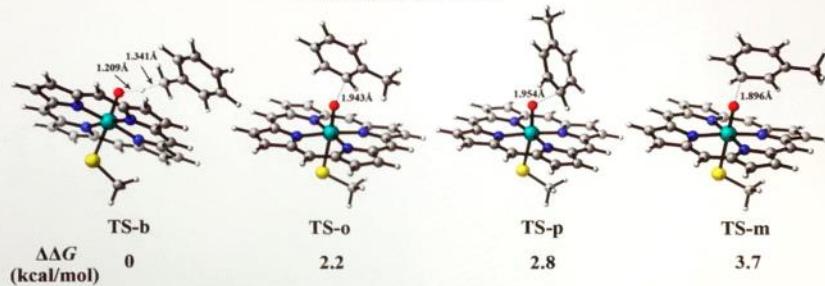
- C(sp<sup>3</sup>)-H羟基化机理:  
拔氢回弹机制，拔氢是决速步；
- C(sp<sup>2</sup>)-H羟基化机理:  
氧进攻和质子迁移机制，氧进攻是决速步



### □ 位点选择性机制解析

- 底物固有的反应活性: 苯甲位(b) > 邻位(o) > 对位(p) > 间位(m)

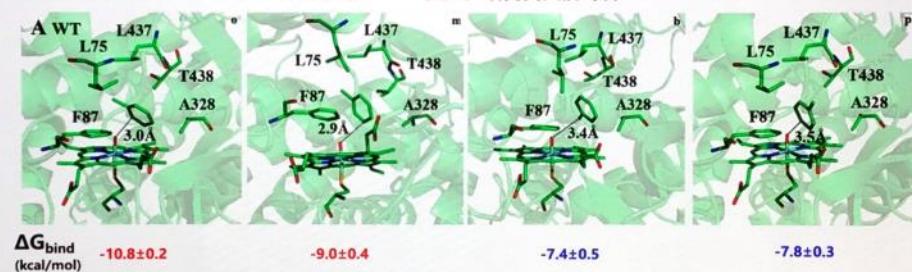
#### 理论酶模型和DFT计算



## □ 位点选择性机制解析

➢ WT的结合自由能: 邻位 > 苯甲位

分子对接、MD模拟和结合自由能计算

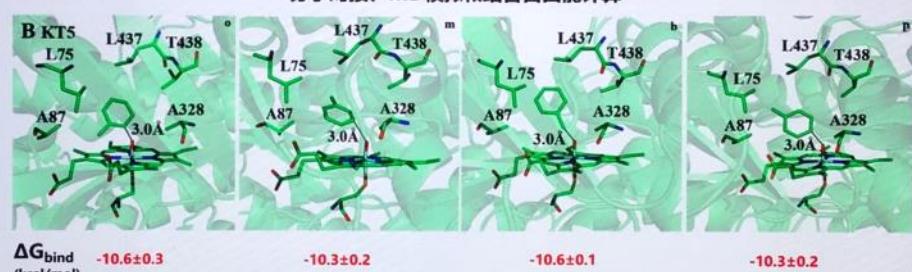


$\Delta G_{bind}(\text{邻位}) - \Delta G_{bind}(\text{苯甲位}) = -3.0$   $\Delta\Delta G(\text{邻位}) - \Delta\Delta G(\text{苯甲位}) = 2.2$  WT以邻位选择性为主

## □ 位点选择性机制解析

➢ KT5的结合自由能: 邻位 ≈ 苯甲位

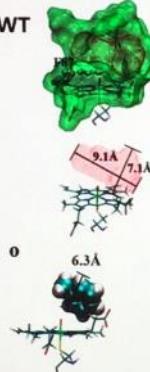
分子对接、MD模拟和结合自由能计算



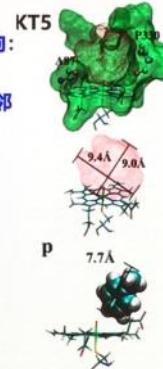
$\Delta G_{bind}(\text{邻位}) - \Delta G_{bind}(\text{苯甲位}) \approx 0$   $\Delta\Delta G(\text{邻位}) - \Delta\Delta G(\text{苯甲位}) = 2.2$  KT5以苯甲位选择性为主

## □ 位点选择性机制解析

WT



➢ WT受限的空间取向:  
容纳邻位和间位;  
间位能量最高, 以邻位选择性为主



➢ KT5的大口袋: 容纳  
四种取向;  
苯甲位能量最低, 以  
苯甲位选择性为主

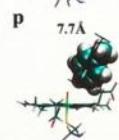
o



m



p



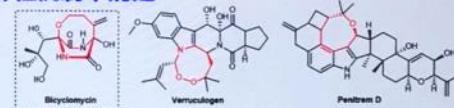
b



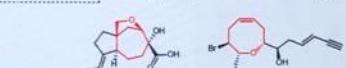
底物固有的反应活性和酶催化口袋的取向尺寸共同决定了位点选择性

## □ BcmB在双环毒素合成中的关环选择性机制不清楚

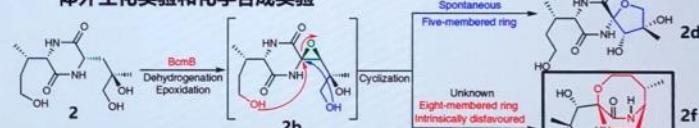
➢ 化学合成: 跨环张力和熵效应导致中环(8–10环)的构建成为挑战



➢ 生物合成: 八元氧杂环的构筑由酶催化,  
存在八元环和五元环关环竞争的现象, 但  
关环选择性机制不清楚



体外生化实验和化学合成实验

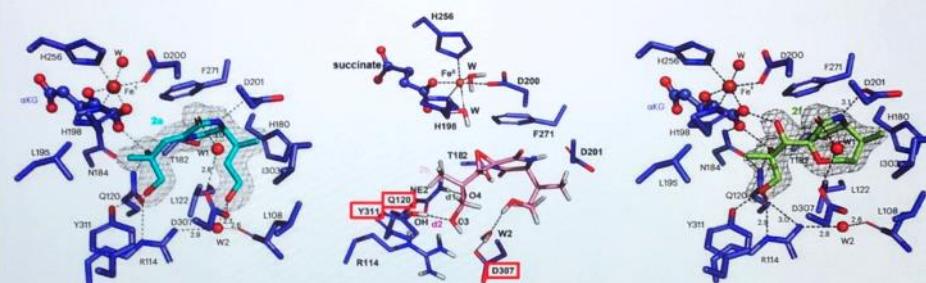


与上海有机所唐功利、深研院周佳海课题组合作

He, J.-B., Wu, L., Wei, W., Meng, S., Liu, Z.-T., Wu, X., Pan, X.-H., Yang, S., Liang, Y., Zhou, J., Tang, G., \* Nat. Catal. 2023, 6, 637.

## □ 结构解析

➤ 获得BcmB-环氧中间体复合物的结构模型，发现关键残基(D307、Q120和Y311)



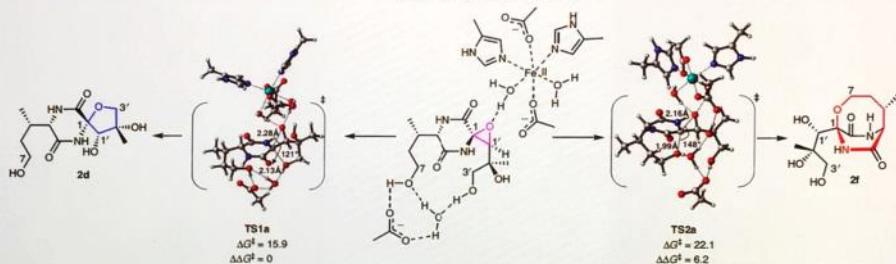
BcmB-烯烃中间体复合物晶体结构 BcmB-环氧中间体复合物MD结构 BcmB-环状产物复合物晶体结构

## □ 关环选择性机制解析

➤ Fe(II)-H<sub>2</sub>O复合物作为广义酸活化环氧

➤ D307作为广义碱增强羟基亲核性

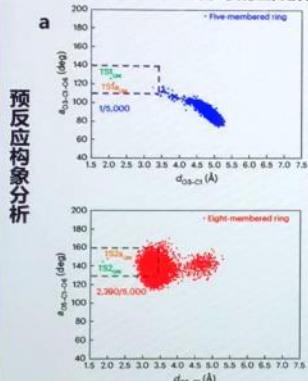
理论酶模型和DFT计算



固有的关环选择性：五元化 > 酶促八元氧杂环

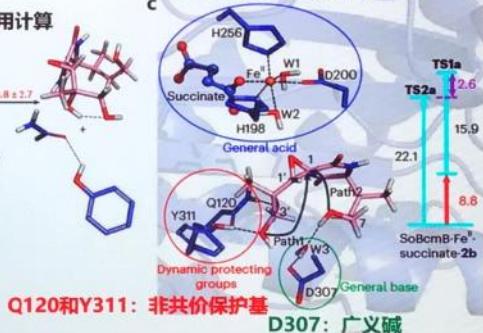
## □ 关环选择性机制解析

➤ Q120和Y311介导的氢键作用作为非共价保护基



BcmB酶促八元环的起源：

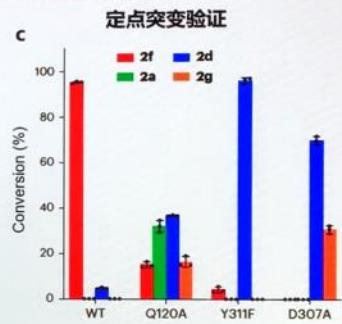
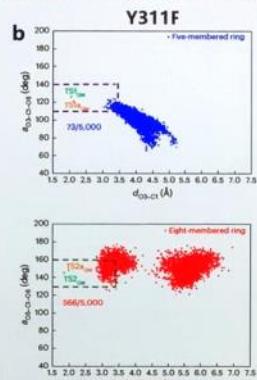
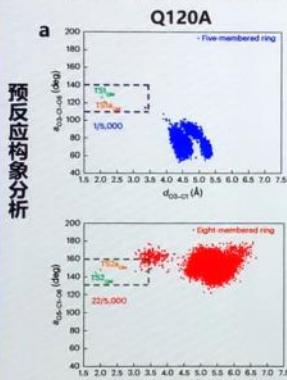
Fe(II)-H<sub>2</sub>O复合物：广义酸

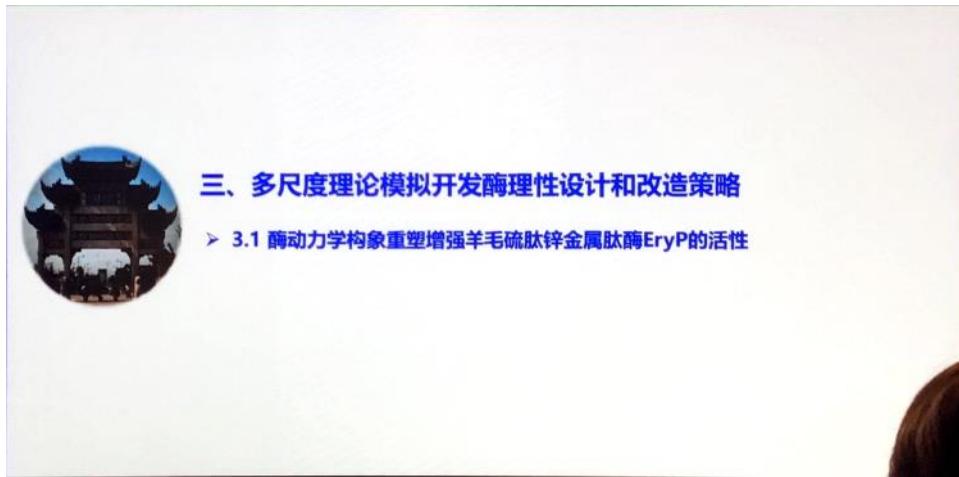


Q120和Y311：非共价保护基  
D307：广义碱

## □ 关环选择性机制解析

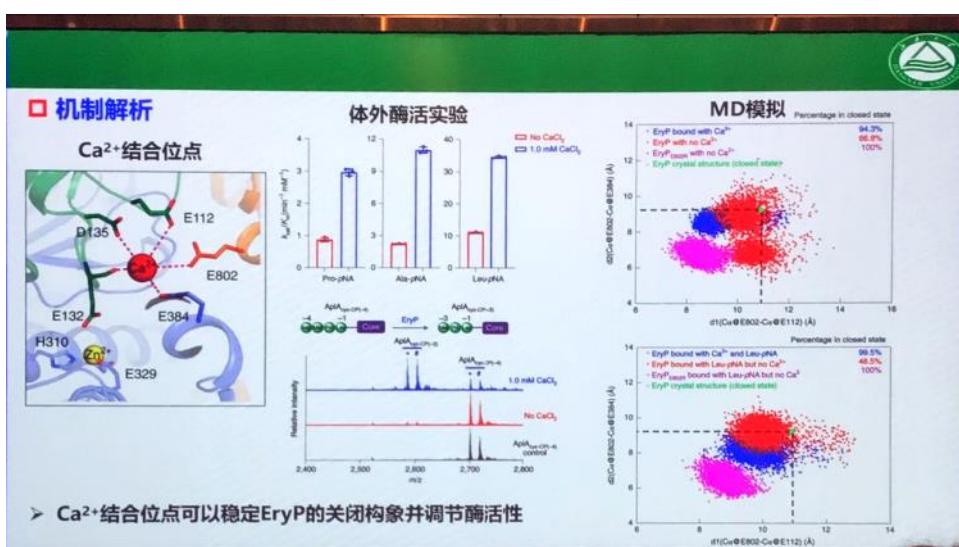
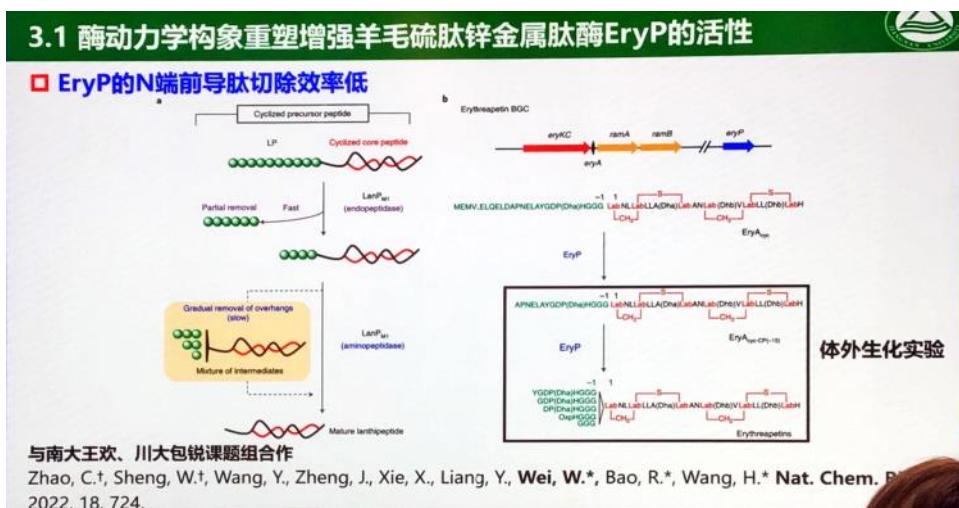
➤ 预反应构象分析与定点突变实验相互验证，并证实了关环选择性的调控机制





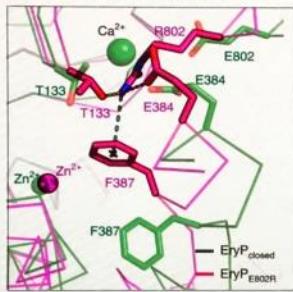
### 三、多尺度理论模拟开发酶理性设计和改造策略

#### ➢ 3.1 酶动力学构象重塑增强羊毛硫肽锌金属肽酶EryP的活性



## □ 改造策略和效果

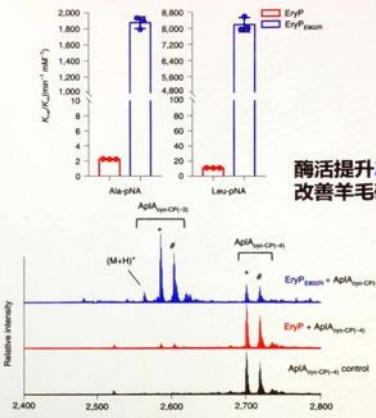
EryP<sub>E802R</sub>晶体结构



引入盐桥相互作用

➤ 重塑酶动力学构象提高酶活

体外酶活实验



酶活提升2-3个数量级，改善羊毛硫肽的成熟速率

感谢博士导师谢代前教授、马晶教授、周燕子副教授！

感谢合作导师梁勇教授！

感谢合作者戈惠明教授、王欢教授、唐功利研究员和周佳海研究员！

感谢团队负责人刘立明教授、吴静教授，其他成员陈修来教授、

高聪副研究员、宋伟副研究员和李晓敏副教授！

感谢相关基金的支持！

# 第十四届-30-张鲁嘉

2023年8月20日 星期日 16:40



## 个人简介

中国食品学会酶制剂分会理事/上海市生物工程学会青年委员

2016.11-至今 华东师范大学/化学与分子工程学院  
纽约大学(上海)理论与计算化学中心

2016.09-2019.01 美国加州理工学院/生物技术与工程系/博士后

2004.11-2016.10 华东理工大学/生物工程学院/讲师

2014.03 华东理工大学/生物化学与分子生物学/博士学位



## 主要研究方向

### 工业酶分子的结构机制解析、理性设计及应用开发

结构认知及理论计算 ↔ 机制解析 ↔ 理性设计 ↔ 工业应用

a. 结构解析 b. 动力学模拟



c. 量化计算 d. 整合及编程



➤ 底物谱  
➤ 底物特异性  
➤ 副产物  
➤ 催化活力  
➤ 热稳定性  
➤ 有机溶剂耐受



## 复杂生物体系催化的量子精度动态机制及设计原则



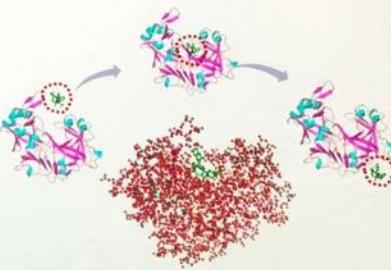
2018诺贝尔化学奖

“酶分子的定向进化”  
拉开了天然酶分子改造的大幕

进一步发展：

酶分子的精准设计

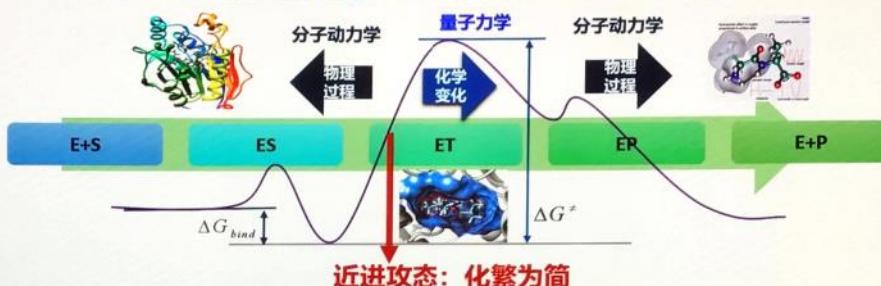
定向进化技术基础



体系庞大、过程复杂、计算困难

### 理论基础

#### 传统计算设计策略的困难：复杂体系的动态过程计算量太大



提出：从实际需求的工业性能出发，不再去纠结复杂中间过程

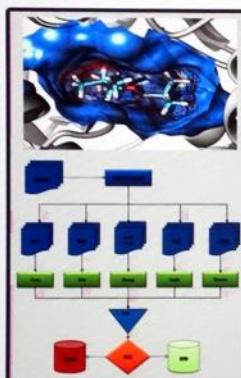
寻找控制工业性能形成的核心构象，以此为基础开展计算设计

### 工欲善其事，必先利期器



## 底物筛选系统

Lujia · Lab



成功建立三个筛选因子打分函数，预测准确率为92.7%

收集整理出了96个已知活性的分子用于测试  
每个分子都进行了100轮的限制性对接，以保证结果的可重现性  
总的准确性接近 93%

	Substrate	Non-substrate	Total	Correct
Substrate	57	3	60	95.0%
Non-substrate	4	32	36	88.9%
Total	61	35	96	
Correct	93.4%	91.4%		92.7%

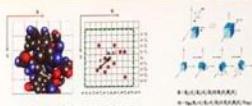
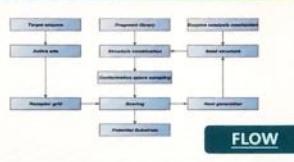
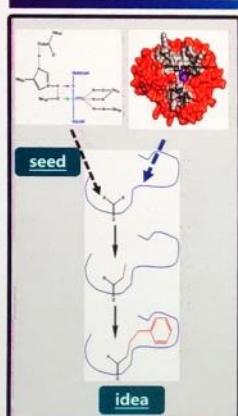
$$Score = \left\{ \sqrt{\frac{D_1^2}{w_1} + \frac{D_2^2}{w_2} + \frac{[1 - \cos(T)]^2}{w_3}} - w_4 \right\} \times w_5$$



Tao Xu, Lujia Zhang, Xuedong Wang, Dongzhi Wei\*, Tianbi Li. Structure-based substrate screening for an enzyme. BMC Bioinformatics. 2009,10(257):1-7

## 底物生长系统

Lujia · Lab



### METHOD

#### Test of Nit6803



18 verified substrates were grown

#### Test of lipase CALB



12 grown were proved by our experiments

#### Test of Gox0644



9 verified substrates were grown

Zhiqiang Yao, Shuiqin Jiang, Lujia Zhang\*, Bei Gao, Xiao He, John Z. H. Zhang, Dongzhi Wei\*. Cris: A novel fragment-based algorithm of de novo substrate prediction for enzymes. Protein Science. 2018,27:1526-1534

## 研究目标的转变

Lujia · Lab

### 底物筛选

<http://lujialab.org.cn/software/>

针对同一个酶，筛选可能的底物分子

给定酶结构

配体库预处理+限制性对接

Next ligand

数据收集+打分函数

pass

底物分子库

previous

now

### 酶突变筛选

针对某一底物，筛选高催化活性的酶突变

给定底物分子

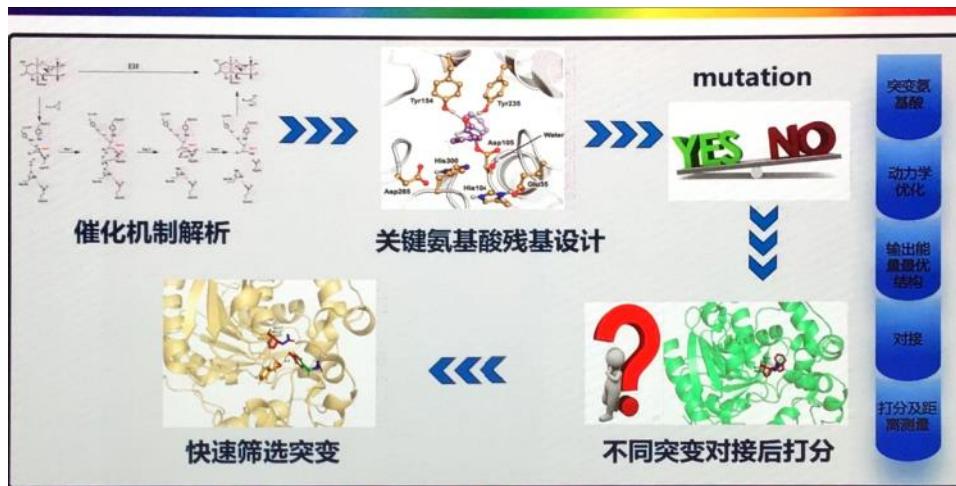
蛋白结构及活性口袋

设置突变点

对接+打分

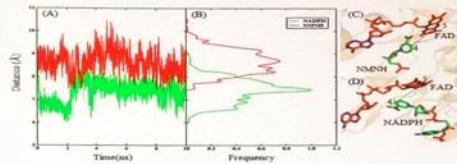
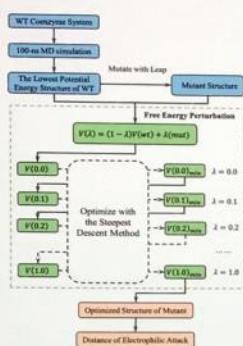
最优突变






## 基于P450 电子传递核心模型的NMNH特异识别利用

Lujia · Lab



### 软件辅助快速筛选

酶号	IC50 <sub>μM</sub>	V <sub>max</sub> (nmol min⁻¹)	K <sub>m</sub> (nmol / 10⁴)	K <sub>cat</sub> (nmol / min / 10⁴)
WT	341.07	3.914021	3214123	403044.31
SURO	132.57	3.914021	2134223	403044.31
Q114W	179.32	3.914021	2134223	3.3040.71
HN101d	219.83	3.914021	1721420	54.4546.86
HN101e	200.21	200.940.78	24474232	82.1440.34

P450BM3对细胞色素c的催化活性及动力学参数

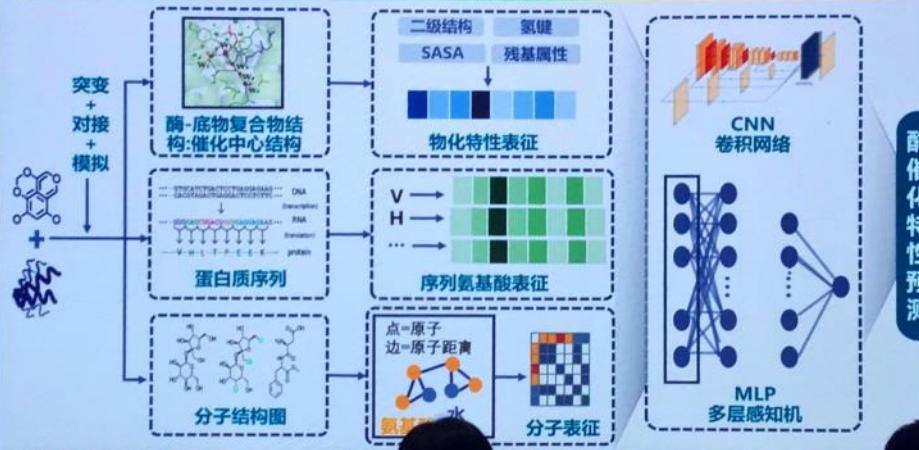
酶号	IC50 <sub>μM</sub>	V <sub>max</sub> (nmol min⁻¹)	K <sub>m</sub> (nmol / 10⁴)	K <sub>cat</sub> (nmol / min / 10⁴)
WT	1228.51	259.4373	35.483.27	45.883.18
Q114W	2096.4	313.93.2	26.291.24	50.228.47
HN101d	1834.2	273.93.2	28.931.98	43.708.00
HN101e	2297.5	344.23.08	23.973.23	54.918.89

P450-CYP116B46对细胞色素c的催化活性及动力学参数

基于提出的电子传递模型，分别对P450BM3和P450-CYP116B46的CPR辅因子结合域理性设计，分别实现了两种P450对非天然辅酶NMNH的特异性识别和高效利用。

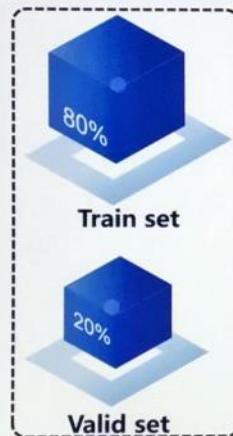
## 基于人工智能设计流程图

Lujia · Lab



## 催化特性预测模型训练

Lujia · Lab



### 模型训练损失值变化趋势可视化

### 模型评估

$R^2: 0.78$   
 $MAE: 0.34$   
 $RMSE: 0.28$

PDB ID	Mutation	D1	D2	D3	ddG
SURO	H144E/W117P	7.82	8.69	11.96	-4.99
SURO	H144E/W117A	6.65	7.47	4.98	-4.85
SURO	H144E/W117S	5.18	5.56	4.93	-5.38

基于搜集的435条突变数据对模型进行训练，使用5UPC蛋白对模型性能进行测试

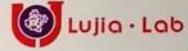


ECNU

NYU 上海 纽约大学

SHANGHAI

THANK  
S  
[www.lujialab.org.cn](http://www.lujialab.org.cn)



Lujia · Lab

Ljzhang@chem.ecnu.edu.cn ; Ljzhang@nyu.edu



国家科技管理信息系统公共服务平台  
National Science and Technology Information System, Public Service Platform

项目名称：新蛋白质元件人工设计合成及应用  
所属专项：合成生物学  
指南方向：4.2 新蛋白质元件人工设计合成及应用

项目管理专业机构：中国生物技术发展中心

课题分解	序号	课题名称	承担单位	负责人
	01	新蛋白质元件设计的智能算法研究	天津大学	唐继军
	02	蛋白质功能的精确的分子机理研究	华东师范大学	张鲁嘉
	03	新蛋白质元件从头设计合成及改造	湖北大学	江正兵
	04	蛋白质元件在化合物生物合成中的应用	浙江工业大学	金利群



软件系统：张传玺博士 cxzhangbio@163.com