

· 综 述 ·

2-卤代酸脱卤酶研究进展

王亚月¹, 薛松², 周庆峰¹, 裴冬丽¹

1 商丘师范学院 生物与食品学院, 河南 商丘 476000

2 中国科学院大连化学物理研究所 生物技术部, 辽宁 大连 116023

王亚月, 薛松, 周庆峰, 等. 2-卤代酸脱卤酶研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(5): 868–878.

Wang YY, Xue S, Zhou QF, et al. Recent progress in 2-haloacid dehalogenases. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 868–878.

摘 要: 2-卤代酸脱卤酶 (EC 3.8.1.X) 催化 2-卤代酸脱卤水解形成相应的 2-羟基酸。该类酶不仅能够降解环境中的卤代污染物, 而且具有宽广底物谱和高效手性拆分特性, 因而在环保和手性中间体的绿色合成中具有广阔应用前景。目前已经对多种 2-卤代酸脱卤酶进行生化特性表征, 并对酶分子三维结构及催化机制进行了深入研究。文中从 2-卤代酸脱卤酶的来源、蛋白质结构与催化反应机制、催化特性及应用方面等研究取得的新进展进行综述, 并展望了 2-卤代酸脱卤酶的进一步研究方向。

关键词: 2-卤代酸脱卤酶, 蛋白结构, 催化机制, 应用

Recent progress in 2-haloacid dehalogenases

Yayue Wang¹, Song Xue², Qingfeng Zhou¹, and Dongli Pei¹

1 College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan, China

2 Laboratory of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

Abstract: 2-Haloacid dehalogenases (EC 3.8.1.X) catalyze the hydrolytic dehalogenation of 2-haloacids, releasing halogen ions and producing corresponding 2-hydroxyacids. The enzymes not only degrade xenobiotic halogenated pollutants, but also show wide substrate profile and astonishing efficiency for enantiomer resolution, making them valuable in environmental protection and the green synthesis of optically pure chiral compounds. A variety of 2-haloacid dehalogenases have been biochemically characterized so far. Further studies have been made in protein crystal structures and catalytic mechanisms. Here, we review the recent progresses of 2-haloacid dehalogenases in their source, protein structures, reaction mechanisms, catalytic properties and application. We also suggest further research directions for 2-haloacid dehalogenase.

Keywords: 2-haloacid dehalogenases, protein structure, catalytic mechanism, application

Received: August 18, 2019; **Accepted:** October 15, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31571997), Key Scientific Research Projects in Universities of Henan Province (No. 20A180024), Research Project of Shangqiu Normal University (No. 700144).

Corresponding author: Dongli Pei. Tel/Fax: +86-370-3157770; E-mail: peidongli@126.com

国家自然科学基金 (No. 31571997), 河南省高等学校重点科研项目 (No. 20A180024), 商丘师范学院校级科研启动基金 (No. 700144) 资助。

网络出版时间: 2019-10-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191024.1602.005.html>

有机卤代物因其优良的热传导性、绝缘性、耐热性、亲油性及生物活性等特点而被广泛应用于工、农、医等生产领域,给社会发展带来巨大的经济效益^[1-3]。然而,由于大量生产和不当使用,越来越多的卤代物被排放到环境各处而逐渐恶化生态环境。加之卤代物的化学性能非常稳定,导致其在天然条件下难以被降解,因此在环境中的积累越来越多,进而可通过食物链浓缩、累积于生物体中,呈现“致癌、致畸、致突变”效应,极大地威胁着人类健康,已成为全世界关注的问题^[4]。

微生物作为自然界中主要分解者,将复杂的有机物转化为简单的化合物,从而保持生命元素的循环往复。生长在有机卤代物污染环境中的微生物具有潜在的转化这些化合物的能力,即其细胞内应存在催化脱卤作用的酶,这类酶被称为脱卤酶。其中 2-卤代酸脱卤酶是催化 2-卤代酸脱卤水解形成相应 2-羟基酸的一类水解型脱卤酶(图 1),不仅能够以一种低能耗途径降解环境中的有毒污染物,而且底物谱广,催化效率高,并具有高效手性拆分特性,可用于获得光学纯 2-卤代物和 2-羟基取代物,因而在环境修复与手性化学品的绿色制造领域具有巨大应用价值。文中将从酶的来源与分类、酶分子结构与催化机制、催化特性及应用进展对 2-卤代酸脱卤酶进行详述。

1 2-卤代酸脱卤酶来源与分类

2-卤代酸脱卤酶产生菌广泛存在于自然界的各种环境中,早在 20 世纪 80 年代后期就已经被发现报道,随后越来越多的酶相继被发掘。目前分离

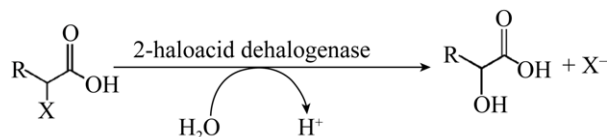


图 1 2-卤代酸脱卤酶催化反应式

Fig. 1 Dehalogenation catalyzed by 2-haloacid dehalogenase^[2].

获得的 2-卤代酸脱卤微生物已遍布于原核生物和真菌,其中原核生物包括假单胞菌属 *Pseudomonas*^[5]、土壤杆菌属 *Agrobacterium*^[6]、固氮菌属 *Azotobacter*^[7]、根瘤菌属 *Rhizobium*^[8]、莫拉克斯氏菌属 *Moraxella*^[9]、硫化叶菌属 *Sulfolobus*^[10]、黄杆菌属 *Xanthobacter*^[11]、副球菌属 *Paracoccus*^[12]、产碱杆菌属 *Alcaligenes*^[13]、伯克霍尔德菌属 *Burkholderia*^[14]、火球菌属 *Pyrococcus*^[15]、甲基杆菌属 *Methylobacterium*^[2]、冷单胞菌属 *Psychromonas*^[16]、红杆菌属 *Rhodobacteraceae*^[11]、假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*^[17]、副球孢子菌属 *Paracoccidioides*^[18]、克雷白氏杆菌属 *Klebsiella*^[19]、杆菌属 *Ancylobacter*^[20]、芽孢杆菌属 *Bacillus*^[21]与嗜冷单胞菌 *Psychromonas*^[22];真菌包括绿僵菌属 *Metarhizium*、镰刀菌 *Fusarium* 与白僵菌 *Beauveria*^[23],其中假单胞菌属所占比例最高。从分离环境上讲,大多数脱卤微生物分离自陆生环境,仅有少数来自于海洋环境^[1,5,12,16,24-25]。由于海洋环境高压、高盐、低温及寡营养等独特性质,被认为是生命活动的极端环境,因此生活在这一特殊环境中的微生物,在基因组成和生态功能上表现出多样性和特异性^[26]。相应地,微生物生理生化特征与胞内酶也表现出多样性和特异性,是发现新酶的重要源泉。

2-卤代酸脱卤酶可以依据序列保守性和立体选择性进行分类^[27]。根据其底物选择性和产物构型,可分为 4 种(表 1),包括 D-2-卤代酸脱卤酶(D-DEX)、L-2-卤代酸脱卤酶(L-DEX)、构型翻转型 DL-2-卤代酸脱卤酶(DL-DEXi)和构型保留型 DL-2-卤代酸脱卤酶(DL-DEXr)。根据氨基酸序列同源性,2-卤代酸脱卤酶又可以被分为 Group I 与 Group II 两类酶。Group I 类酶包括 D-DEX 与 DL-DEX; Group II 类酶仅包括 L-DEX。在本综述中,采用第一种分类方法。

表 1 2-卤代酸脱卤酶的种类

Table 1 Types of 2-haloacid dehalogenases

Types EC number	Reaction
L-2-haloacid dehalogenase EC 3.8.1.2	L-2-haloacid + H ₂ O → D-2-hydroxyacid + halide ion
D-2-haloacid dehalogenase EC 3.8.1.9	D-2-haloacid + H ₂ O → L-2-hydroxyacid + halide ion
DL-2-haloacid dehalogenase EC 3.8.1.10 (Conformation inversion)	L-2-haloacid + H ₂ O → D-2-hydroxyacid + halide ion D-2-haloacid + H ₂ O → L-2-hydroxyacid + halide ion
DL-2-haloacid dehalogenase EC 3.8.1.11 (Conformation retention)	L-2-haloacid + H ₂ O → L-2-hydroxyacid + halide ion D-2-haloacid + H ₂ O → D-2-hydroxyacid + halide ion

2 2-卤代酸脱卤酶结构特征和催化特性

2-卤代酸脱卤酶结构的多样性决定了其功能多样性,不同类型 2-卤代酸脱卤酶在结构和催化机理上也有所不同。

2.1 L-DEX

2.1.1 结构特征和催化机理

L-DEX 酶类专一性地作用于 L-2-卤代酸产生 D-2-羟基酸,在自然界中普遍存在,是目前研究最为透彻的一类 2-卤代酸脱卤酶^[23,28-29]。至今已解析多种来源的 L-DEX 及其与底物复合物的三维结构,如来自于假单胞菌 *Pseudomonas* sp. strain YL 的 L-DEX YL^[30],自养黄杆菌 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 的 DhIB^[31],掘越氏火球菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 的 PH0459^[15],洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* MBA4 的 DehIVa^[32],硫化叶菌 *Sulfolobus tokodaii* 的 DehSft^[33]与红杆菌 *Rhodobacteraceae* 的 DehRhb^[11]。L-DEX 是 $\alpha\beta$ 类型水解酶,但并不属于 $\alpha\beta$ 水解酶折叠家族。其含有典型的 Rossmann-fold-like 核心域:6 股 β -sheets 以 321456 的顺序平行排列,由

5 股 α -helices 连接 β -sheets 形成的 3 层 $\alpha\beta$ 折叠单元构成三明治结构域^[30,34-35]。不同于 $\alpha\beta$ 水解酶折叠家族典型的结构域,即 8 股 β -strands 以 12435678 的顺序排列,且 β 2-strands 反平行于其他链,从第 3 股链开始,两条链之间由 α -helix 连接,形成 $\beta/\alpha/\beta$ 单元,第一个 α -helix 和最后一个 α -helix 位于 β -sheet 的一侧,其余 α -helix 位于另一侧^[36]。其中除了 PH0459 晶体结构为单体,其他 L-DEX 晶体结构均为二聚体。除 DhIB 由一个核心结构域、两个亚结构域组成外,其他 L-DEX 都是由一个核心结构域与一个亚结构域构成,活性位点位于两个结构域间(图 2)。通过 X-射线晶体衍射、O¹⁸ 同位素标记、液质联用、定点突变及量子力学/分子力学(QM/MM) 计算等技术研究,发现 L-DEX 的脱卤反应属于 S_N2 亲核取代反应,其活性中心天冬氨酸残基的羧酸基团为亲核试剂,攻击 L-2-卤代酸的 C2 原子,形成一个酯中间体,中间产物在由 His/Glu (DehRhb 中) 或 Asn/Ser (DehIVa 中) 或 Lys (L-DEX YL 中) 活化的水分子的进攻下水解,离去的卤素离子主要在 Arg 或 Asn 或 Phe 的辅助下稳定(图 3),而卤素离子受体数量愈多,酶分子

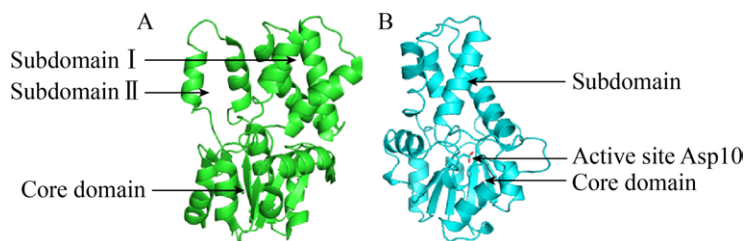


图 2 L-DEX 晶体结构 (A: 来自 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 的 DhIB^[31]; B: 来自 *Pseudomonas* sp. strain YL 的 L-DEX YL^[30])

Fig. 2 Crystal structure of L-DEX. (A) DhIB from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10^[31]. (B) L-DEX YL from *Pseudomonas* sp. strain YL^[30].

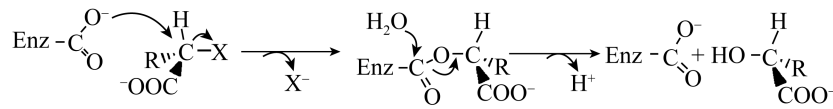


图3 L-DEX 催化机制^[32]

Fig. 3 Reaction mechanism of L-DEX^[32].

愈是可以裂解更强的 C-X 键^[37-38]。

2.1.2 L-DEX 催化特性

L-DEX 的来源比较广泛,如陆生和海洋环境,不同生境来源的 L-DEX 在酶学特性上既有相同点又表现出差异。如 L-DEX 对氯代与溴代底物表现出高的催化活性,对 D-2-卤代酸无降解能力,不能催化氟代与 C3 位置取代卤代酸的脱卤反应;除了具有催化长链卤代酸脱卤特性之外,多数 L-DEX 仅对于碳链长度为 2 和 3 的卤代酸表现出高的催化活性,而对于碳链更长的底物的催化活性很低^[5,11-12,39]。但在底物特异性上不尽相同,如 L-DEX YL 对 L-2-氯丙酸的催化转化比氯乙酸好,而来源于芽孢杆菌 *Bacillus strain I37c* 菌株的 L-DEX 则更偏好于氯乙酸^[39-40]。L-DEX 最适反应 pH 偏碱性范围,在 pH 9-11 之间,L-DEX 亚基分子量为 25 000-28 000 Da 等。但这类脱卤酶在天然状态下,其分子量不尽相同,分别有单聚体、二聚体和四聚体^[5,11-12,39]。对来源于不同细菌的脱卤酶,其对温度耐受性也不一致。如陆生来源的恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 产生的 L-DEX 最适反应温度为 30-45 °C,55 °C 孵育 15 min 后,酶活性为原来的 50%,热稳定性差;从海冰界面 (-10 °C) 分离的嗜冷单胞菌 *Psychromonas ingrahamii* (Pin) 菌株具有嗜冷特性,最低生长温度 -12 °C,其产生的 L-DEX Pin 最适反应温度为 45 °C,熔解温度为 85 °C。L-DEX Pin 具有嗜冷酶与嗜热酶特征,与嗜中温酶相比,该酶具有更多疏水表面和更多盐桥^[16]。海洋来源的 *Rhodobacteraceae* 产生的 DehRhb 最适反应温度为 55 °C,60 °C 条件下孵育 1 h 后,活性仍保留在 45% 左右,表现出适度热稳定性,另外,其催化关键氨基酸为 His183 和 Glu21,

不同于陆生来源的 L-DEX,可能是以一种新的催化机制进行脱卤^[22]。可见,通过利用海洋环境及其他极端环境资源可以开发更多新型天然脱卤酶,为认识其结构、催化机理及催化特性提供新知识,同时为 L-DEX 及其他酶类的定向改造提供理性指导。

2.2 DL-DEX

2.2.1 结构特征和催化机理

DL-DEX 酶类可同时催化 2-卤代酸的两个对映体脱卤反应,水解产生相应的 2-羟基酸。根据产物的构型分为构型翻转型 (DL-DEXi) 与构型保留型 (DL-DEXr)。

DL-DEXi 酶类催化底物脱卤时,C2 原子构型翻转,产物构型与底物构型相反。目前已报道的 DL-DEXi 包括分离自 *Pseudomonas sp. 113* 的 DL-DEX 113^[41]、*Pseudomonas putida* PP3 的 DehI^[42] 与甲基杆菌 *Methylobacterium sp. CPA1* 的 DL-DEX Mb^[43]。其中后两者晶体结构已知,DL-DEXi 为全 α -helix 类型蛋白,与 L-DEX 及水解酶中的其他折叠超家族在结构上并没有同源性。如图 4 所示,为 DehI 结构图,其晶体结构为二聚体 (图 4A),每个单体的 N-端 (残基 1-130) 与 C-端 (166-296) 序列具有 16% 的同源性,构成了一个 pseudo-dimer,活性中心位于每个单体的 pseudo-dimer 交界面处,可结合 D-型与 L-型底物^[27] (图 4B)。DL-DEXi 催化机制也不同于 L-DEX,其通过活化水分子直接攻击 2-卤代酸的 C2 原子,断裂 C-X 键,释放卤素离子,脱卤过程并不涉及共价酯中间体的形成 (图 5)^[41]。保守的 Asp 与 Asn 可能负责水分子的活化,然而并没有相关的实验证据。

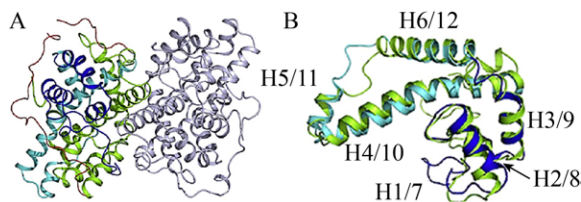


图4 来自于 *Pseudomonas putida* PP3 的 DehI 晶体结构^[42] (A: DehI 二聚体结构; B: DehI 单体 N-端与 C-端重复结构叠合, α -helix 在图中标出)

Fig. 4 Crystal structure of DehI from *Pseudomonas putida* PP3^[42]. (A) Ribbon representation of DehI dimer. (B) Image of the superposed N- and C-terminal repeats of DehI. The α -helices are labelled.

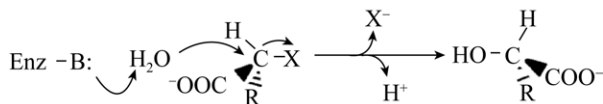


图5 L-DEXi 脱卤反应机理^[41]

Fig. 5 Reaction mechanism of DL-DEXi^[41].

DL-DEXr 酶类与 DL-DEXi 催化产物构型变换相反,其催化底物脱卤后,生成的产物构型与底物构型相同。目前可供参考的 DL-DEXr 是来自于 *Pseudomonas putida* PP3 菌株,然而该类酶序列信息仍是未知,反应机理也仍未解析^[44]。由于 DL-DEXr 对 *N*-乙马来酰亚胺与 *p*-对氯汞苯甲酸等巯基破坏试剂高度敏感,因此推测 DL-DEXr 的巯基基团参与催化反应,在脱卤时可能涉及硫酯中间体的形成。如图 6 所示,酶与底物作用,底物 C2 构型翻转,释放卤素离子,形成酶-底物硫酯中间体,中间体在水分子的进攻下水解,同时 C2 原子构型发生第二次翻转,生成与底物相同构型的产物,但目前还没有直接的实验证据来支持^[44]。

2.2.2 DL-DEX 催化特性

目前已分离鉴定的 DL-DEX 较少,在酶学特性表征方面的研究也较少,目前已报道的 DL-DEXi 多偏好于 L-型底物,如分离自 *Pseudomonas putida* PP3 的 DehI^[42,45]、分离自根瘤菌 *Rhizobium* sp. RC1 的 DehE^[46]、分离自 *Pseudomonas* sp. 113 的 DL-DEX 113^[45]与来自于木糖氧化产碱杆菌 *Alcaligenes*

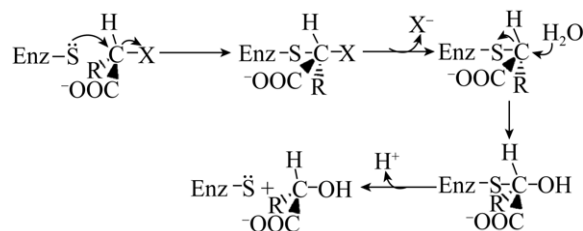


图6 DL-DEXr 涉及 C2-构型保留的可能催化机理^[44]
Fig. 6 Possible mechanism of DL-DEXr involving the retention of C2-configuration of the substrate^[44].

xylosoxidans ssp. *denitrificans* DhIIV 的 DL-DEX ABIV^[47], 其中 DehI、DehE、DL-DEX 113 与 DL-DEX 113 对 L-型底物与 D-型底物的催化活性之比分别是 1.2、1.6、1.4 与 1.1。DL-DEXi 对碳链长度在 2–5 的卤代酸有降解能力,而且能够降解 3-氯乙酸。DL-DEXi 包括单体与二聚体,除了 DL-DEX YL 为单体以外,目前报道酶分子多为同源二聚体,亚基分子量为 26 000–36 000 Da^[38]。最适反应 pH 范围为 9.5 左右,最适反应温度为 30–40 °C^[45-46,48]。催化转化底物和产物构型保持一致的 DL-DEXr,对巯基抑制剂比较敏感,对碳链长度为 2–4 个碳原子的卤代酸有降解能力^[44]。

2.3 D-DEX

2.3.1 结构特征和催化机理

D-DEX 酶类是专一性地催化 D-2-卤代酸脱卤水解产生 L-2-羟基酸的一类酶。目前仅有 4 种天然来源的 D-DEX 的一级结构信息可供参考利用,包括来自于根瘤菌 *Rhizobium* sp. RC1 的 DehD^[49]、来自于土壤杆菌 *Agrobacterium* sp. strain NHG3 的 DehII^[50]、来自于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* AJ1 的 HadD AJ1^[51]及来自于假单胞菌 *Pseudomonas* sp. ZJU26 的 DehDIV-R^[52], 其中 HadD AJ1 与 DehDIV-R 间序列 D 同源性最高为 89%,而 HadD AJ1 与 DehD 和 DehII NHG3 间的同源性相对较低,分别为 22.2%和 32.6%。作者曾对 HadD AJ1 结构与催化机制进行深入研究,解析晶体结构发现 HadD AJ1 与 DL-DEXi 结构相同,都是全 α -helix 蛋白,不同于 L-DEX 的 α/β 折叠结

构。HadD AJ1 每个单体均由 2 个氨基酸序列同源性为 20% 的重复构成 (图 7), 2 个重复折叠分别由 N-端 α -helix 1-6 与 C-端 α -helix 7-12 组成, 中间由 1 个包含 33 个氨基酸且含有 1 个 3_{10} -helix η_1 的 linker 连接 (图 7B)。每个重复的前 3 个 helices 形成了 1 个 three-helix-bundle, 后 3 个 helices 以 three-helix-triangular 排布 (图 7A)。两个重复折叠通过 α_6/α_{12} 与 α_4/α_{10} 残基间的范德华力、盐键、氢键与疏水相互作用稳定。在空间上, 螺旋 α_4 与 α_{10} 彼此平行排列, α_6 与 α_{12} 相互交叉在他们中间的凸起处^[53]。这种结构上内在的重复对称折叠在很多蛋白中发现, 可能是由蛋白质进化中一些遗传过程如域的融合与裂变及基因复制等改变引起^[54]。

如图 8 所示, 对 HadD AJ1 催化机理研究表明 D-DEX 酶类的脱卤反应是由水分子直接介导, 反应过程中没有酯中间体的形成。其中, D205 为关键催化残基, D205 在 N131 的辅助下共同参与水分子的活化, 活化的水分子从正后方进攻底物 C2 原子, 断裂 C-X 键, 卤素离子离去, 同时活化的水分子羟基与底物 C2 原子键合, 形成 L-型乳酸^[53]。

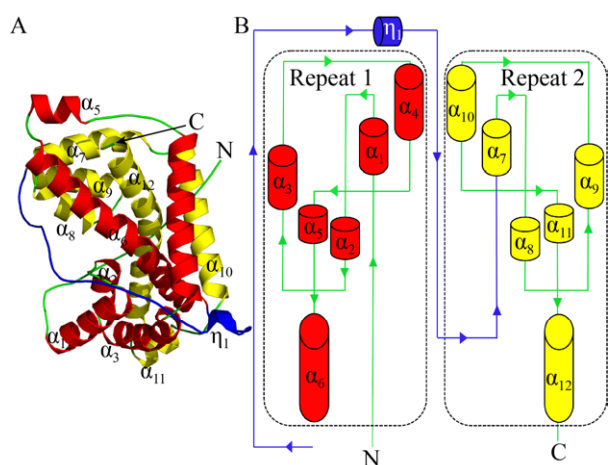


图 7 HadD AJ1 单体结构 (A: HadD AJ1 单体飘带结构图, 两个重复基序 repeat 1 ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) 和 repeat 2 ($\alpha 7$ - $\alpha 12$) 由 linker ($\eta 1$) 连接; B: HadD AJ1 单体折叠的拓扑结构) Fig. 7 HadD AJ1 monomer. (A) Ribbon representation of monomeric HadD AJ1 composed of repeat 1 ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), repeat 2 ($\alpha 7$ - $\alpha 12$) and a linker ($\eta 1$). (B) Topological model of HadD AJ1 fold.

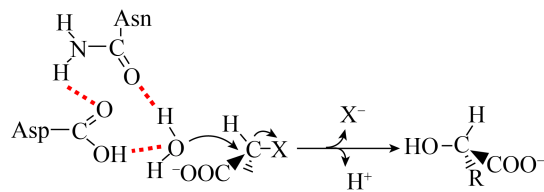


图 8 D-DEX 催化机理

Fig. 8 Reaction mechanism of D-DEX.

2-卤代酸脱卤酶中, D-DEX 与 DL-DEXi 氨基酸序列间具有较高同源性, 结构上亦是如此, 并且两者催化脱卤都是由水分子直接介导, 不同于 L-DEX 由酶-底物酯中间体介导的脱卤反应, 进一步揭示了 D-DEX 与 DL-DEXi 在进化上有着密切联系。

2.3.2 D-DEX 催化特性

目前对 D-DEX 酶类的研究相对较少, 这可能与发现的产 D-DEX 的细菌种类较少有关。通过对 DehD 与 HadD AJ1 生化酶学特性的表征, 发现 D-DEX 酶类偏好于催化碳链长度在 2-4 个碳原子的 D-2-氯代及溴代酸脱卤, 对溴代底物的催化活性高于对氯代底物的催化活性^[51,55]。不同来源的酶作用于相同底物的 K_m 值相差较大, 如 DehD、HadD AJ1 与 DehDIV-R 催化 D-2-氯丙酸脱卤的 K_m 值分别为 0.06 mmol/L、2.2 mmol/L 与 2.2 mmol/L。与 HadD AJ1 和 DehDIV-R 相比, DehD 对卤代底物表现出更高的亲和力, 而 HadD AJ1 与 DehDIV-R 相同的 K_m 值可能归因于其高度的序列相似性^[51-52,55]。在溶液中, D-DEX 的存在状态也有所不同, DehD 以同源二聚体形式存在, 而 HadD AJ1 以同源四聚体形式存在。D-DEX 酶类最适反应 pH 在 9.0-10.0 之间, 当 pH 在 8.0-10.0 范围之外时, 酶活力迅速下降, 如 HadD AJ1 仅表现出低于 50% 的催化活性。与 L-DEX 相比, D-DEX 酶类呈现嗜中温特性, 最适反应温度 50-60 °C, 其热稳定性较差, 酶分子在 30-40 °C 范围内比较稳定, 高于 40 °C 时, 随着温度的升高, 酶活性迅速丢失^[51-52,55]。

3 2-卤代酸脱卤酶的应用

2-卤代酸脱卤酶可以通过水解脱卤机制脱去有机卤代羧酸中的卤素,在脱卤过程中可以不需另加还原力即可以一条简单的途径进行生物减毒,在有机卤化物污染的环境中起到生物修复的作用;同时,卤代酸脱卤酶还可以高度立体选择性地催化脱卤反应,用于获得小分子的手性羧酸与卤代酸,这些小分子有机酸通常是农药、医药及化工合成的中间体,因而,该类酶在环境修复及化工合成等领域有着广泛的用途和巨大的经济价值^[35,56-57],主要体现在以下三方面。

1) 环境治理。卤代羧酸如 2-氯丙酸和 2,2-二氯丙酸被广泛用作合成农药和医药的中间体,尤其是手性纯 2-氯丙酸是合成很多手性药物的前体^[58]。但这些卤代酸的大量使用和生产过程中的不当处置使得它们同时成为了常见的有机氯环境污染物。同时卤代酸也是某些卤代物如 1,2-二氯乙烷和杀虫剂六六六降解的中间产物,由于环境中这类污染物的降解而导致了环境中对应卤代酸的污染。这些化合物的积累造成了严重的环境问题并威胁着人类健康。2-卤代酸脱卤酶可以催化 2-氯丙酸和 2,2-二氯丙酸脱卤降解为无毒的羧酸,在环境治理方面具有重要应用价值。

2) 化工合成领域。脱卤酶的手性选择性使其在化工合成领域备受青睐,化学法合成光学纯化合物常常会涉及到刺激性有毒试剂,得到的光学纯度低且产率不高,而利用酶作为生物催化剂不仅反应条件温和,对环境友好且产率高,可获得高度光学纯的手性化合物^[16]。如 L-2-氯丙酸是合成除草剂和杀虫剂的重要前体, D-DEX 可选择性水解外消旋 2-氯丙酸,即水解 D-2-氯丙酸而不水解 L-2-氯丙酸,分离就可以得到高对映体纯度的 L-2-氯丙酸^[59]。帝国化学工业公司 (Imperial Chemical Industries) 也早已在工业中应用 HadD AJ1 拆分消旋 2-氯丙酸获得具有光学活性的 L-2-氯丙酸,作为农药和消炎药的合成前体,现已成为手性氯丙酸

的主要生产方法^[60-61]。英国 Astrazeneca 公司使用 D-DEX 拆分 *rac*-CPA 获得 L-2-氯丙酸,对映体纯度高于 90%,该方法也适用于生产其他短链手性 α -卤代酸,规模可高于 1 000 t/年^[27]。此外, D-2-氯丙酸也是一种重要的化工原料,可以直接用来合成多种医药中间体,尤其可以用于合成营养药 L-丙氨酰-L-谷酰胺、抗结核病药物硫乳霉素,利用 L-DEX 拆分消旋 2-氯丙酸即可获得对映体纯度的 D-2-氯丙酸^[62]。D-乳酸是农药化工领域中一个重要的手性中间体,可用于合成芳香丙酸类除草剂;同时, D-乳酸在医药方面也有广泛用途,可用于纳米粒子或纳米纤维用作药物载体,以及用于合成重要的手性药物中间体,如 D-乳酸甲酯等^[63]。解桂秋等曾对来源于嗜热古菌 L-DEX 催化转化消旋 2-氯丙酸生产 D-乳酸的反应条件进行研究,通过对底物浓度、缓冲液浓度以及酶浓度等反应条件进行优化,实现以 0.5 mol/L 2-氯丙酸为底物制备 D-乳酸^[64]。

3) 农业生产领域。广谱除草剂如单氯乙酸与 2-氯丙酸可以有效地除去多种杂草,但不幸的是,这些除草剂同时可以除去有经济价值的农作物,因此其使用会给农业经济带来大量损失,而构建具有抗除草剂性能的农作物可以避免这些损失。这就需要向农作物中引入编码脱卤酶的基因。如 Mohamed 等将 D-2-卤代酸脱卤酶 *dehD* 基因导入烟草中作为一个选择性标签,构建的转基因烟草 *Nicotiana benthamiana* 具有抗单氯乙酸的活性^[65]。另外,脱卤酶还可用于构建生物感应器,原位检测环境中的有机卤代污染物^[66]。如在脱卤酶上融合荧光材料用于细胞成像^[67],将融合癌细胞识别肽的脱卤酶连接到多功能的纳米颗粒上用于新的肿瘤诊断和治疗技术的开发等^[68]。

4 展望

虽然目前已经发现多种 2-卤代酸脱卤酶,并且对 L-DEX、DL-DEX_i 与 D-DEX 三类酶的结构

信息和催化机制均有所了解,但对 DL-DEXr 的研究却仅是停留在酶学性质表征水平,这进一步限制了其应用,因此仍需要对其结构与催化机制进行深入研究。另外,多数 2-卤代酸脱卤酶仅对碳链长度小于 4 个碳原子的卤代酸表现出高催化活性,而对于长链卤代酸仅表现出较弱甚至无催化活性;同时,2-卤代酸脱卤酶对有机溶剂较低的耐受性也限制了其底物谱范围。另外,为了获得对映体纯的手性产物,化学酶促收敛工艺常用于卤代酸脱卤酶的对映体拆分中,然而在下流分离过程中,酶促反应步骤与化学水解所需的高温与极端 pH 不兼容,因此仍然有必要挖掘新型 2-卤代酸脱卤酶。

酶的立体选择性也是一直备受关注的问题,2-卤代酸脱卤酶家族成员表现出典型的立体选择性,但目前对该类酶立体选择性机制的认识也十分有限。Kondo 等通过 QM/MM 与碎片分子轨道计算方法研究 L-DEX 对映体选择性机制,证实 L-DEX 与 D-型底物结合过程中高的活化能垒阻止了酶作用于 D-型底物,然而目前仍不清楚在空间结构上,酶分子是如何调控其对手性底物的选择性的^[69]。作者通过对 D-DEX 的立体选择性机制的研究,发现活性口袋入口处残基 Leu288 通过空间位阻作用控制 L-型底物进入酶活性中心,调控着酶的立体选择性。L288 到 I 的突变使酶催化 L-型底物,相比于 L288 旋转受阻的异丙基, I288 侧链乙基可自由旋转,使 L-型底物进入酶活性中心^[70]。对于 DL-DEXr 与 DL-DEXi 如何催化手性底物脱卤这一问题仍不清楚。

生物催化剂的立体选择性使其在光学纯化合物的制备中具有重要的应用价值,是绿色化学研究的重要领域之一。一种理想的工业生物催化剂应该同时具有高催化活性和专一的立体选择性,而探索脱卤酶活性与立体选择性的分子调控机制是人工定制高活性与高立体选择性酶的前提和基础。因此,为了定向调控酶不对称催化反应进行的方向与程度,获得高光学纯度的、具有特殊结构的目标产物,有必要对 2-卤代酸脱卤酶的立体选择性催化

机制进行深入研究。

REFERENCES

- [1] Novak HR, Sayer C, Isupov MN, et al. Marine *Rhodobacteraceae* L-haloacid dehalogenase contains a novel His/Glu dyad that could activate the catalytic water. *FEBS J*, 2013, 280(7): 1664–1680.
- [2] Kurihara T, Esaki N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications. *Chem Rec*, 2008, 8(2): 67–74.
- [3] Jeschke P. The unique role of halogen substituents in the design of modern agrochemicals. *Pest Manag Sci*, 2010, 66(1): 10–27.
- [4] Rai AR, Singh RP, Srivastava AK, et al. Structure prediction and evolution of a halo-acid dehalogenase of *Burkholderia mallei*. *Bioinformatics*, 2012, 8(22): 1111–1113.
- [5] Zhang JY, Cao XP, Xin YJ, et al. Purification and characterization of a dehalogenase from *Pseudomonas stutzeri* DEH130 isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(10): 1791–1799.
- [6] Köhler R, Brokamp A, Schwarze R, et al. Characteristics and DNA-sequence of a cryptic haloalkanoic acid dehalogenase from *Agrobacterium tumefaciens* RS5. *Curr Microbiol*, 1998, 36(2): 96–101.
- [7] Diez A, Prieto MI, Alvarez MJ, et al. Purification and properties of a high-affinity L-2-haloacid dehalogenase from *Azotobacter* sp. strain RC26. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 23(5): 279–282.
- [8] Leigh JA, Skinner AJ, Cooper RA. Partial purification, stereospecificity and stoichiometry of three dehalogenases from a *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol Lett*, 1988, 49(3): 353–356.
- [9] Kawasaki H, Tone N, Tonomura K. Purification and properties of haloacetate halohydrolyase specified by plasmid from *Moraxella* sp. strain B. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(1): 35–42.
- [10] Xu S, Oin SB, Pan XM. Thermal and conformational stability of Ssh10b protein from archaeon *Sulfolobus shibatae*. *Biochem J*, 2004, 382(2): 433–440.
- [11] van der Ploeg J, van Hall G, Janssen DB.

- Characterization of the haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and sequencing of the *dhlB* gene. *J Bacteriol*, 1991, 173(24): 7925–7933.
- [12] Zhang JY, Xin YJ, Cao XP, et al. Purification and characterization of 2-haloacid dehalogenase from marine bacterium *Paracoccus* sp. DEH99, isolated from marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *J Ocean Univ China*, 2014, 13(1): 91–96.
- [13] Hill KE, Marchesi JR, Weightman AJ, et al. Investigation of two evolutionarily unrelated halocarboxylic acid dehalogenase gene families. *J Bacteriol*, 1999, 181(8): 2535–2547.
- [14] Tsang JSH, Sam L. Cloning and characterization of a cryptic haloacid dehalogenase from *Burkholderia cepacia* MBA4. *J Bacteriol*, 1999, 181(19): 6003–6009.
- [15] Arai R, Kukimoto-Niino M, Kuroishi C, et al. Crystal structure of the probable haloacid dehalogenase PH0459 from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Protein Sci*, 2006, 15(2): 373–377.
- [16] Novak HR, Sayer C, Panning J, et al. Characterisation of an l-haloacid dehalogenase from the marine *Psychrophile psychromonas* ingrahamii with potential industrial application. *Mar Biotechnol*, 2013, 15(6): 695–705.
- [17] Liao L, Sun X, Zeng YX, et al. A new L-haloacid dehalogenase from the Arctic psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. BSW20308. *Polar Biol*, 2015, 38(8): 1161–1169.
- [18] Satpathy R, Konkimalla VS, Ratha J. *In-silico* gene co-expression network analysis in *Paracoccidioides brasiliensis* with reference to haloacid dehalogenase superfamily hydrolase gene. *J Pharm Bioallied Sci*, 2015, 7(3): 212–217.
- [19] Tahya CY, Ratnaningsih E. Cloning and sequencing of haloacid dehalogenase gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1. *Procedia Chem*, 2015, 16: 121–128.
- [20] Kumar A, Pillay B, Olaniran AO. L-2-haloacid dehalogenase from *Ancylobacter aquaticus* UV5: sequence determination and structure prediction. *Int J Biol Macromol*, 2016, 83: 216–225.
- [21] Ratnaningsih E, Idris I. Cloning and expression of haloacid dehalogenase gene from *Bacillus cereus* IndB1. *Indonesian J Biotech*, 2018, 22(2): 55–60.
- [22] Novak H, Littlechild J. 4-Marine enzymes with applications for biosynthesis of fine chemicals// Trincone A, ed. *Marine Enzymes for Biocatalysis*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013: 89–106.
- [23] Satpathy R, Konkimalla VSB, Ratha J. In silico phylogenetic analysis and molecular modelling study of 2-haloalkanoic acid dehalogenase enzymes from bacterial and fungal origin. *Adv Bioinformatics*, 2016, 2016: 8701201.
- [24] Khosrowabadi E, Huyop F. Screening and characterization of several 2,2-dichloropropionic acid-degrading bacteria isolated from marine sediment of danga bay and east coast of singapore island. *Bioremediat J*, 2014, 18(1): 20–27.
- [25] Horisaki T, Yoshida E, Sumiya K, et al. Isolation and characterization of monochloroacetic acid-degrading bacteria. *J Gen Appl Microbiol*, 2011, 57(5): 277–284.
- [26] Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar Drugs*, 2010, 8(6): 1920–1934.
- [27] Schober M, Faber K. Inverting hydrolases and their use in enantioconvergent biotransformations. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(8): 468–478.
- [28] Wang YY, Cao XP, Feng YB, et al. Environment-induced conformational and functional changes of l-2-haloacid dehalogenase. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(5): 491–496.
- [29] Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, et al. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 2000, 405(6787): 647–655.
- [30] Hisano T, Hata Y, Fujii T, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. *Proteins*, 1996, 24(4): 520–522.
- [31] Ridder IS, Rozeboom HJ, Kalk KH, et al. Three-dimensional structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 complexed with the substrate-analogue formate. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 33015–33022.
- [32] Schmidberger JW, Wilce JA, Tsang JSH, et al. Crystal structures of the substrate free-enzyme, and reaction intermediate of the HAD superfamily member, haloacid dehalogenase dehiva from *Burkholderia cepacia* MBA4. *J Mol Biol*, 2007, 368(3): 706–717.
- [33] Rye C, Isupov M, Lebedev A, et al. Biochemical and structural studies of a L-haloacid dehalogenase from

- the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Extremophiles*, 2009, 13(1): 179–190.
- [34] Poelarends GJ, Whitman CP. 8. 04-Mechanistic and structural studies of microbial dehalogenases: how nature cleaves a carbon–halogen bond//Liu HW, Mander L, eds. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier, 2010: 89–123.
- [35] Zhang CC, Allen KN, Dunaway-Mariano D. Mechanism of substrate recognition and catalysis of the haloalkanoic acid dehalogenase family member α -phosphoglucomutase. *Biochemistry*, 2018, 57(30): 4504–4517.
- [36] Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(2): 150–159.
- [37] Kurihara T. A mechanistic analysis of enzymatic degradation of organohalogen compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(2): 189–198.
- [38] Kondo H, Nakamura T, Tanaka S. A significant role of Arg41 residue in the enzymatic reaction of haloacid dehalogenase I-DEX YL studied by QM/MM method. *J Mol Catal B Enzym*, 2014, 110: 23–31.
- [39] Liu JQ, Kurihara T, Hasan AK, et al. Purification and characterization of thermostable and nonthermostable 2-haloacid dehalogenases with different stereospecificities from *Pseudomonas* sp. strain YL. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(7): 2389–2393.
- [40] Chiba Y, Yoshida T, Ito N, et al. Isolation of a bacterium possessing a haloacid dehalogenase from a marine sediment core. *Microbes Environ*, 2009, 24(3): 276–279.
- [41] Nardi-Dei V, Kurihara T, Park C, et al. DL-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. 113 is a new class of dehalogenase catalyzing hydrolytic dehalogenation *not* involving enzyme-substrate ester intermediate. *J Biol Chem*, 1999, 274(30): 20977–20981.
- [42] Schmidberger JW, Wilce JA, Weightman AJ, et al. The crystal structure of DehI reveals a new α -haloacid dehalogenase fold and active-site mechanism. *J Mol Biol*, 2008, 378(1): 284–294.
- [43] Siwek A, Omi R, Hirotsu K, et al. Binding modes of DL-2-haloacid dehalogenase revealed by crystallography, modeling and isotope effects studies. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 540(1/2): 26–32.
- [44] Weightman AJ, Weightman AL, Slater JH. Stereospecificity of 2-monochloropropionate dehalogenation by the two dehalogenases of *Pseudomonas putida* PP3: evidence for two different dehalogenation mechanisms. *J Gen Microbiol*, 1982, 128(8): 1755–1762.
- [45] Park C, Kurihara T, Yoshimura T, et al. A new DL-2-haloacid dehalogenase acting on 2-haloacid amides: purification, characterization, and mechanism. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 23(2/6): 329–336.
- [46] Haziyanin T, Hamid TA, Hamid AAA, et al. A review on non-stereospecific haloalkanoic acid dehalogenases. *Afr J Biotechnol*, 2013, 10(48): 9725–9736.
- [47] Brokamp A, Happe B, Schmidt FRJ. Cloning and nucleotide sequence of a D, L-haloalkanoic acid dehalogenase encoding gene from *Alcaligenes xylooxidans* ssp. *denitrificans* ABIV. *Biodegradation*, 1997, 7(5): 383–396.
- [48] Leigh JA, Skinner AJ, Cooper RA. Isolation and partial characterisation of dehalogenase-deficient mutants of a *Rhizobium* sp. *FEMS Microbiol Lett*, 1986, 36(2/3): 163–166.
- [49] Sudi IY, Hamid AAA, Shamsir MS, et al. Insights into the stereospecificity of the D-specific dehalogenase from *Rhizobium* sp. RC1 toward D- and L-2-chloropropionate. *Biotechnol Biotec Equip*, 2014, 28(4): 608–615.
- [50] Higgins TP, Hope SJ, Effendi AJ, et al. Biochemical and molecular characterisation of the 2,3-dichloro-1-propanol dehalogenase and stereospecific haloalkanoic dehalogenases from a versatile *Agrobacterium* sp. *Biodegradation*, 2005, 16(5): 485–492.
- [51] Smith JM, Harrison K, Colby J. Purification and characterization of D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(5): 881–886.
- [52] Tong CD, Wu JP, Yang LR, et al. Crystal structural analysis of DehDIV-R by X-ray crystallography. *China Biotechnol*, 2018, 38(8): 19–25 (in Chinese). 童超迪, 吴坚平, 杨立荣, 等. X射线衍射晶体法解析脱卤酶 DehDIV-R 结构的研究. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(8): 19–25.
- [53] Wang YY, Feng YB, Cao XP, et al. Insights into the molecular mechanism of dehalogenation catalyzed by

- D-2-haloacid dehalogenase from crystal structures. *Sci Rep*, 2018, 8: 1454.
- [54] Blaber M, Lee J, Longo LM. Emergence of symmetric protein architecture from a simple peptide motif: evolutionary models. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(23): 3999–4006.
- [55] Huyop F, Sudi IY. D-specific dehalogenases, a review. *Biotechnol Biotech Equip*, 2012, 26(2): 2817–2822.
- [56] Bommarius AS. Biocatalysis: A status report. *Annu Rev Chem Biomol*, 2015, 6(1): 319–345.
- [57] Tanokura M, Miyakawa T, Guan LJ, et al. Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(9): 1391–1401.
- [58] Wen H, Bian QH, Wang M, et al. Synthesis and application of optical purity 2-chloropropionic acid in chiral pesticides. *Chin J Pest*, 2004, 43(8): 363–366 (in Chinese).
文辉, 边庆花, 王敏, 等. 光学纯 2-氯丙酸及其酯的合成与在手性农药中的应用. *农药*, 2004, 43(8): 363–366.
- [59] Gong YH, Ma SM, Wang YF, et al. Characterization of a novel deep-sea microbial esterase EstC10 and its use in the generation of (*R*)-methyl-2-chloropropionate. *J Ocean Limnol*, 2018, 36(2): 473–482.
- [60] Parker K, Colby J. Immobilization of the D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *Biodegradation*, 1995, 6(3): 191–201.
- [61] Taylor SC. D-2-haloalkanoic acid halohydrolyase: US, 4758518. 1988-07-19.
- [62] Breuer M, Ditrich K, Habicher T, et al. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Edit*, 2004, 43(7): 788–824.
- [63] Martinez FAC, Balciunas EM, Salgado JM, et al. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends Food Sci Technol*, 2013, 30(1): 70–83.
- [64] Xie GQ, Pan D, He WL, et al. Application of L-2-haloacid dehalogenase from thermophilic *Archaea Sulfolobus tokodaii* in the production of D-lactic acid. *Chem J Chin Univ*, 2015, 36(4): 698–703 (in Chinese).
解桂秋, 潘东, 何文龙, 等. 嗜热古细菌 *Sulfolobus tokodaii* 脱卤酶在 D-乳酸生产中的应用. *高等学校化学学报*, 2015, 36(4): 698–703.
- [65] Mohamed E, Rahiman FA, Wahab RA, et al. A plant transformation vector containing the gene *dehd* for the development of cultivars resistant to monochloroacetic acid. *J Anim Plant Sci*, 2016, 26(4): 1133–1139.
- [66] Bidmanova S, Chaloupkova R, Damborsky J, et al. Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(5): 1891–1898.
- [67] Martinová E, Voleman L, Najdová V, et al. Live imaging of mitochondria and hydrogenosomes by halotag technology. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36314.
- [68] Mazzucchelli S, Colombo M, Verderio P, et al. Orientation-controlled conjugation of haloalkane dehalogenase fused homing peptides to multifunctional nanoparticles for the specific recognition of cancer cells. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52(11): 3121–3125.
- [69] Kondo H, Fujimoto KJ, Tanaka S, et al. Theoretical prediction and experimental verification on enantioselectivity of haloacid dehalogenase I-DEX YL with chloropropionate. *Chem Phys Lett*, 2015, 623: 101–107.
- [70] Feng YB, Wang YY, Chu HY, et al. Stereoselective catalysis controlled by a native leucine or variant isoleucine wing-gatekeeper in 2-haloacid dehalogenase. *FEBS Lett*, 2019, 593(3): 308–318.

(本文责编 郝丽芳)