

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :381 - 388; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140304

微生物卤代烷烃脱卤酶研究进展

李安章^{1,2}, 邵宗泽^{1*}

¹国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005

²广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

摘要: 卤代烷烃脱卤酶是降解卤代脂肪族化合物的关键酶类, 在各种地理环境中的不同微生物中广泛存在, 在生物降解和工业生产等方面具有重要的应用价值。目前已经生化鉴定了 20 个卤代烷烃脱卤酶。近些年来对这些酶的酶学特征、蛋白质结构和系统进化进行了详细的研究。同时, 为满足应用实践的需求还对卤代烷烃脱卤酶进行了蛋白质工程改造研究。本文将对卤代烷烃脱卤酶研究的一些新的进展进行综述。

关键词: 生物降解, 卤代化合物, 卤代烷烃脱卤酶, HLD

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2015)04-0381-08

化工工业生产了大量的卤代有机物, 它们普遍具有环境毒性, 化学性质一般比较稳定, 难以被快速降解, 由于各种原因被释放到环境中, 是土壤、地下水和地表水中的常见持久性污染物。

自然界也存在数量众多的天然产生的卤代有机物。截至 2012 年, 已发现超过 5000 种天然含卤有机物^[1]。海洋环境富含卤素, 是生物产生的含卤有机物的最大来源地。数量庞大的海藻、海绵、珊瑚、被囊类动物、海洋细菌和其他海洋生命合成了大量的含卤有机物。而陆地植物、真菌、地衣、细菌、昆虫、一些高等动物甚至人类也被发现能合成复杂多样的含卤有机物。除生物合成外, 自然界的活动例如火山、森林大火、其他地热过程也会产生多种卤代有机物^[2]。

细菌来源的催化脱卤反应的酶多种多样, 脱卤机制也各不相同, 有还原性脱卤、氧化分解脱卤、水解脱卤、硫解脱卤、分子间置换脱卤、脱卤化氢反应、

水合脱卤等。脱卤反应一般是卤代有机物矿化过程中的起始步骤和关键步骤。脱卤往往会降低卤代脂肪族化合物的毒性^[3]。卤代烷烃脱卤酶采用的是水解脱卤机制, 其反应过程不需要氧气、能量或辅酶/辅基, 代表了生物减毒和生物降解的一条简单路线, 具有重要的环境价值和生物技术意义。本文将从酶学特征、蛋白质结构、多样性和系统发育等方面对细菌卤代烷烃脱卤酶进行综述。

1 卤代烷烃脱卤酶的底物范围与酶活特征

卤代烷烃脱卤酶 (Haloalkane dehalogenase, HLD, EC 3. 8. 1. 5) 采用水解型脱卤机制催化卤代脂肪族化合物的碳-卤键的断裂, 生成对应的醇、卤素离子和一个质子^[4]。目前经过生化鉴定的 HLD 共有 20 个, 全部来自于细菌, 包括 DadA、DadB、DhlA、

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41176154); 海洋公益性项目 (201005032)

* 通信作者。Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 李安章 (1984 -), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 研究方向为海洋环境微生物。E-mail: anzhangl@163.com

收稿日期: 2014-06-13; **修回日期:** 2014-10-02

DhaA、LinB 及 DbjA 等 (表 1)。它们的底物范围普遍比较广,一般包括氯代、溴代和碘代的不同链长的烷烃、环烷烃、烯烃、羧酸、醇、醚、腈、酮、酯、环二烯、环氧化物和卤代氨基化合物等^[5-8]。不同的 HLD 的底物范围、底物特异性和酶活特征差别较大。影响 HLD 酶学特征的因素包括活性位点空腔的空间构象、底物进出通道的大小和结构、蛋白质表面电荷分布、蛋白质在水相溶液中的稳定性和蛋白质动力学等^[5]。Koudelakova 等根据 HLD 的底物选择性和

整体酶活特征将 HLD 分为 4 个酶活特征亚家族,提出 HLD 的整体酶活按照 LinB/DbjA > Dh1A/DhaA/DbeA/DmbA > DatA/DmbC/DrbA 的顺序排列,认为 LinB 和 DbjA 是已鉴定的 HLD 成员中整体酶活最高的两个^[6]。本课题组最近对来自于 *Alcanivorax dieselolei* B-5 中的 2 个卤代烷烃脱卤酶 DadA 和 DadB 进行了生化鉴定,发现 DadB 具有比 LinB 和 DbjA 更高的整体酶活^[9-11]。

表 1. 目前已经经过生化鉴定的卤代烷烃脱卤酶
Table 1. The HLDs biochemically characterized so far

Accession number	HLD	Organism	Reference
YP_006820866	DadA	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	[10]
YP_006819020	DadB	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	[10]
AAA88691	Dh1A	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10	[12]
AAC15838	DhaA	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 13064	[13]
P51698	LinB	<i>Spinghobium japonicum</i> UT26	[14]
AJ314789	DhmA	<i>Mycobacterium avium</i> N85	[15]
NP_767727	DbjA	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	[8]
NP_106032	DmlA	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	[8]
AJ784272	DmbA	<i>Mycobacterium bovis</i> 5033/66	[16]
AJ784273	DmbB	<i>Mycobacterium bovis</i> 5033/66	[16]
AM696288	DmbC	<i>Mycobacterium bovis</i> 5033/66	[16]
AM696289	DrbA	<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1	[17]
AB478945	DatA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	[18]
ZP_01908831	DppA	<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	[19]
BAJ23986	DbeA	<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA94	[5]
YP_580518	DpcA	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	[20]
AAT70109	DmmA	marine themetagenomic DNA	[21]
AAL17946	DmsA	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC700084	[5]
YP_510562	Jann2620	<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	[22]
NP_825956	Sav4779	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	[22]

2 HLD 的结构与功能

2.1 HLD 的结构特征

HLD 是一种紧凑的球蛋白,与环氧化物水解酶 (EC 3.3.2.3)、卤过氧化物酶 (EC 1.11.1.10)、脯氨酸亚氨基肽酶 (EC 3.4.11.5) 等同属于 α/β -水解酶超家族。HLD 的三维结构由 α/β -水解酶核心结构域和覆盖于其上的帽子结构域构成 (图 1)。

核心结构域在 HLD 家族甚至在整体 α/β -水解酶超家族之中都保持着严格的序列保守性和结构保守性^[23-24]。帽子结构域参与形成活性位点空腔,其组成元件和排布方式的不同会导致活性位点空腔及

进出通道的大小和形状方面的不同^[21-25],会影响底物特异性^[6,25,26]和手性选择性^[7]。帽子结构域的 N 端部分具有高度可变性,会影响到酶的底物特异性,在对不同异生物质底物的适应性进化中起了重要作用^[27]。

2.2 HLD 的底物进出通道

HLD 具有 2 个相邻的底物进出通道 (主通道和狭槽通道),联通着疏水的活性位点和外围溶剂,实现了底物、产物、配基在活性位点和周围环境之间的交换^[19,24-25,28]。组成进出通道的一组残基具有高度可变性,为 HLD 进化成具有新的底物特异性的酶提供了结构学基础^[24]。同时,底物进出通道也是 HLD 结构中最有柔韧性的部分,能展现出与功能相适应的相关的运动^[24-28]。底物进出通道对 HLD 的

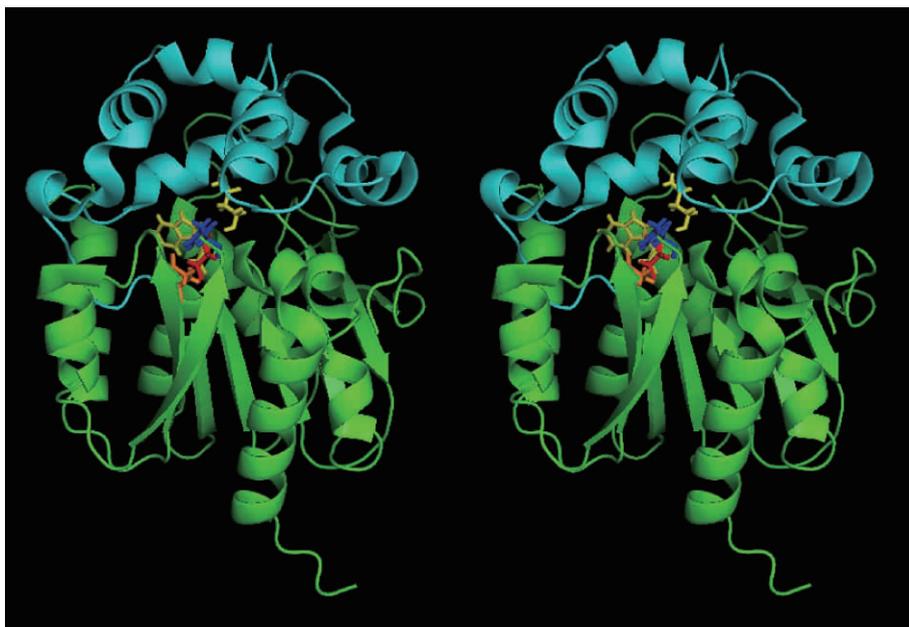


图 1. LinB 的三维结构^[24]

Figure 1. Three-dimensional structure of LinB (stereo view). This picture is modified according to 1MJ5 (PDB code)^[24]. The green and cyan elements respectively constitute the main domain and the cap domain. The yellow, red, orange and blue represent the halide-binding residues, the nucleophilic residue, the acid residue and the base residue, respectively.

底物特异性和酶活具有重要的影响,是重要的进化位点和蛋白质工程改造的目标位点^[25-26,29]。

2.3 HLD 的酶活性位点

HLD 的活性位点位于核心结构域和帽子结构域之间(图 1)。HLD 的水解型脱卤活性的实现需要催化五联体^[4]。尽管催化五联体残基在酶的一级序列中的位置和种类不同,具有亚家族特异性,但是在已解析的 7 个 HLD 的晶体结构中,催化五联体却具有一致的拓扑结构,位于疏水的空腔内,通过通道与外面相连接,构成活性位点口袋和底物进出通道。具有大的活性位点的 HLD 一般表现出非常广泛的底物特异性^[7,25],偏爱较大的底物^[6,21]。

碱性催化残基 His 的咪唑环上方的空间是 1 个在能量上有利的非特异性结合位点。水分子、卤素离子或其他分子都可以在此处与催化残基结合^[21,24,30]。由于这个位置同时也是底物结合位点^[30],所以水分子似乎竞争性地阻碍了底物在活性位点处的定位和结合^[24-30]。重要的工业产物和环境污染物质 1,2-二氯乙烷和 1,2-二氯丙烷与水分子的竞争能力较弱,导致了 LinB 和 DhaA 对这 2 个底物的转化率较低^[29-30]。在 DhaA 的底物进出通道开口处引入大的带芳香族侧链的残基后,其主通道

变窄,活性位点不容易被水分子占据,反应中间复合物的稳定性提高,对 1,2-多卤代的乙烷和丙烷的脱卤活性也就提高了^[29]。另外,L177 位于 LinB 的主通道的开口处,其侧链直接伸向活性位点通道,在此处引入小的、非极性的氨基酸,则这些突变体的底物选择性和酶活特征也往往发生改变^[26]。系统发育分析表明,LinB 的 L177 位置在 HLD 序列中是高度可变的,代表了对不同底物的进化和适应机制^[23]。

3 HLD 的多样性

HLD 在自然界各种地理位置和不同生境中的很多种属的微生物中广泛存在。在 NCBI 的 nr 数据库(2012.11.25 版)中,使用 17 个已经经过生化鉴定的 HLD 进行 PSI-BLAST 搜索,再使用蛋白质聚类分析软件 CLANS 聚类,结合多重序列比对分析催化五联体残基,最终从超过 110 个属的微生物物种中发现了 421 条 HLD 序列。HLD 在变形菌门、放线菌门、浮霉菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、黏胶球形菌门、疣微菌门、螺旋菌门、厚壁菌门和古菌的盐杆菌纲等原核生物中广泛存在。真菌和一些低等动物也含有推定的 HLD 序列。这些含 HLD 序列的物种几乎遍

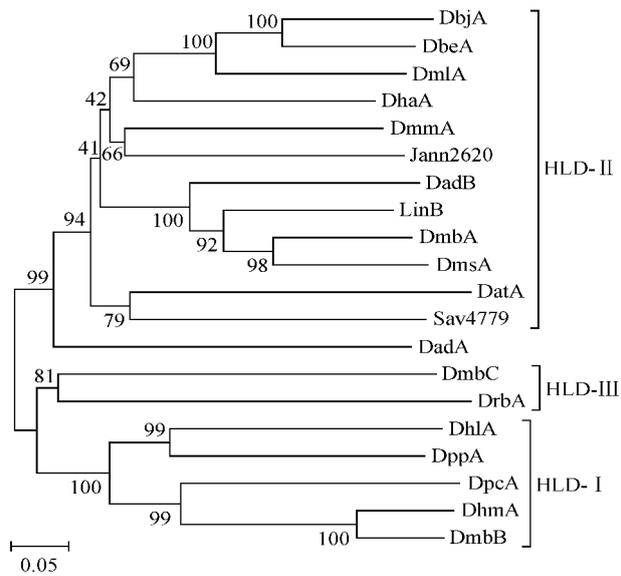


图 3. 已鉴定的 HLD 的系统发育分析

Figure 3. Phylogenetic analysis of identified HLDs. This NJ tree was constructed by MEGA 5.05. Statistical confidence of the tree was estimated by bootstrap (1000 replicates). The three subfamilies (HLD-I, HLD-II and HLD-III) were classified by Chovancova et al^[23].

的相似性和复杂的系统发育关系。Chovancova 等发现, HLD-II 中特征性的催化残基 Glu 的重排发生在 HLD-II 亚家族从 HLD-I 和 HLD-III 的祖先中分化出来之后, 远远早于工业革命^[23]。此外, 在很多不同的种属中发现了相似性差别很大的亚家族成员, 推测催化五联体的改变一定是早于很多种属的物种分化^[3]。

HLD 的蛋白质系统发育树与来源物种的物种发生树之间的不匹配, 以及在很多基因组中存在超过 1 个 HLD 基因的现象都说明 HLD 在进化过程中存在水平转移现象, 也许还有基因的多重复制^[23]。从分离自不同的地理区域或者用不同的底物富集得到的宿主菌中, 经常发现高度相似或相同的 HLD 序列^[3-4, 33]。HLD 在不同种属之间或同一种属内部的不同物种之间的水平转移已有多次报道。*R. rhodochrous* NCIMB 13064 中的质粒 pRTL1 上的一段 1-氯丁烷降解基因簇(含 *dhaA* 基因)被发现转移到了 *Pseudomonas pavonaceae* 170 和 *Mycobacterium* sp. strain GP1 中^[34]。质粒 pRTL1 对 *dhaA* 降解单元在不同物种基因组中的移动起了重要作用, 并且还可以介导本来位于质粒上的 *dhaA* 降解单元整合进细菌基因组内。从全球不同的地理位置分离到的

6 株能利用卤代烷烃的 *Rhodococcus* 属的菌株都含有 1 个高度保守的、编码卤代烷烃代谢的相关酶类的基因簇。其中的 *dhaA* 基因(100% 相似度)比来源菌的 16S rRNA 基因序列具有更少的序列差异性。推测它们来自于 1 个共同的祖先, 通过最近才发生的水平转移分散到世界范围内的这些菌株中^[33]。另一个常见的 HLD 基因 *dhla* 能够在转座酶的帮助下从 *X. autotrophicus* GJ10 水平转移到 *X. flavus* UE-45 中^[35]。海鲷致病菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 中的 1 个质粒上发现了 1 个转座子结构, 其中含有 *linB* 基因且能编码具有活性的脱卤酶^[36]。HLD 基因或基因簇的水平转移能够帮助受体菌迅速从现存的含有卤代烷烃降解基因的供体菌中获得相关的 DNA 片段以建立底物降解途径。参与污染物生物降解的基因的水平转移可能在分解代谢途径的传播、进化和微生物群落对不同的环境污染物的适应方面起了重要作用^[34]。在超过 20 多个属的物种中, 存在 2 个或更多的 HLD。*Shewanella frigidimarina* 含有 3 个 HLD 基因, 其中 2 个显示出 77% 的序列相似性。这暗示, 除了亚功能化和对不同底物的适应性之外, 基因重复及随后发生的基因分化可能也在 HLD 的进化过程中起着作用^[23]。*M. tuberculosis* 中甚至含有 3 个不同的 HLD, 都具有脱卤活性, 分别属于 HLD-I、HLD-II 和 HLD-III 三个不同的亚家族^[16, 17]。在某些细菌中存在多个 HLD 的现象可能是基因重复和各自独立的基因水平转移共同造成的。

5 HLD 的功能和应用

最初的几个 HLD 主要是从生活在被卤代脂肪族化合物污染的环境中的一些菌株中分离得到的, 被发现参与这些重要环境污染物的生物降解途径, 使宿主细菌能利用卤代化合物作为唯一的碳源和能量来源^[12-14]。另外, 自然界存在大量的已知代谢途径没有利用的 HLD 序列。在很多分支杆菌、根瘤菌、冷杆菌等从未报道过具有卤代化合物降解能力或相关代谢途径的细菌中也鉴定出了有活性的 HLD^[8, 15-17, 18, 20]。但至今未报道过某 HLD 在其天然宿主内参与某种天然卤代化合物的代谢。

HLD 在环境治理和生物技术方面具有重要应用前景。除了环境污染物的生物降解^[37]之外, 最近

报道的一些 HLD 应用还包括,构建生物感应器以用于原位检测环境中的卤代污染物^[38]、利用某些 HLD 的良好对映选择性来合成光学纯度的化合物^[39]、利用携带或融合了荧光材料的 HLD 与某些细胞器上的底物基团特异性结合而进行细胞成像^[40]、利用 HLD 标签促进外源蛋白在大肠杆菌中的表达量并提高可溶性表达效率^[41]、将融合了癌细胞识别肽的突变体 HLD 特异性地结合在具有底物“手臂”的纳米材料上用于开发肿瘤诊断和治疗技术^[42]等。HLD 还是蛋白质工程研究的诱人目标,已经报道了很多使用体外技术如蛋白质设计和定向进化技术等试图改进或提高 HLD 的催化特征和底物特异性的尝试^[7,29]。另外,HLD 已成为对酶的催化反应中的分子原理进行电脑计算模拟研究(in silico study)的重要模型系统^[28]。

6 展望

虽然目前已经生化鉴定了 20 个 HLD,且对这个酶家族的底物特异性和酶活特征进行了系统的统计学分析,但这些已鉴定的 HLD 在酶活和特异性方面仍然不是最优的,仍然有必要去发现新的 HLD,并进行系统的生化鉴定。另一方面,随着 HLD 序列资源的发现与结构功能的深入研究,通过蛋白质工程改造获得具备独特的底物选择性或高酶活的 HLD 也是完全可行的。

此外,HLD 在自然界中对天然底物的转化也是值得深入研究的课题。HLD 对广泛分布的卤代化合物的代谢能力是其在很多微生物尤其是寡营养细菌中扩散和传播的原因之一,最终为这些微生物提供了额外的、候补的底物来源。HLD 作为研究环境中的降解酶的演化和分布、微生物获得和执行新的降解途径等方面的模型系统,将为研究微生物与环境的相互作用和卤代化合物的代谢提供线索。

参考文献

- [1] Gribble GW. Occurrence of halogenated alkaloids. *The Alkaloids*, 2012, 71: 1-465.
- [2] Gribble GW. The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere*, 2003, 52(2): 289-297.
- [3] Janssen DB, Dinkla IJ, Poelarends GJ, Terpstra P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1868-1882.
- [4] Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8: 150-159.
- [5] Chovancova E. Bioinformatic analysis and design of haloalkane dehalogenases. PhD Thesis of Masaryk University, 2011.
- [6] Koudelakova T, Chovancova E, Brezovsky J, Monincova M, Fortova A, Jarkovsky J, Damborsky J. Substrate specificity of haloalkane dehalogenases. *Biochemical Journal*, 2011, 435(2): 345-354.
- [7] Prokop Z, Sato Y, Brezovsky J, Mozga T, Chaloupkova R, Koudelakova T, Jerabek P, Stepankova V, Natsume R, van Leeuwen JG, Janssen DB, Florian J, Nagata Y, Senda T, Damborsky J. Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(35): 6111-6115.
- [8] Sato Y, Monincova M, Chaloupkova R, Prokop Z, Ohtsubo Y, Minamisawa K, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y. Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4372-4379.
- [9] Li A, Shao Z. Biochemical characterization of a haloalkane dehalogenase DadB from *Alcanivorax dieselolei* B-5. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89144.
- [10] 李安章. 食烷菌属中的卤代烷烃脱卤酶的生化鉴定和系统发育分析. 厦门大学博士学位论文, 2013.
- [11] Li A, Shao Z. Degradation of halogenated compounds and the haloalkane dehalogenase DadA in *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(9): 1063-1072 (in Chinese).
李安章, 邵宗泽. 柴油食烷菌 B-5 及其卤代烷烃脱卤酶 DadA 对卤代化合物的降解. *微生物学报*, 2014, 54(9): 1063-1072.
- [12] Keuning S, Janssen DB, Witholt B. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163(2): 635-639.
- [13] Curragh H, Orla Flynn, Michael J L, Thomas M. Stafford, John T. G. Hamilton, Harper DB. Haloalkane degradation and assimilation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology*, 1994, 140: 1433-1442.
- [14] Nagata Y, Miyauchi K, Damborsky J, Manova K,

- Ansorgova A, Takagi M. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (9) : 3707-3710.
- [15] Jesenska A, Bartos M, Czernekova V, Rychlik I, Pavlik I, Damborsky J. Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene *dhmA* from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (8) : 3724-3730.
- [16] Jesenska A, Pavlova M, Strouhal M, Chaloupkova R, Tesinska I, Monincova M, Prokop Z, Bartos M, Pavlik I, Rychlik I, Mobius P, Nagata Y, Damborsky J. Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11) : 6736-6745.
- [17] Jesenska A, Monincova M, Koudelakova T, Hasan K, Chaloupkova R, Prokop Z, Geerlof A, Damborsky J. Biochemical characterization of haloalkane dehalogenases DrbA and DmbC, representatives of a novel subfamily. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (15) : 5157-5160.
- [18] Hasan K, Fortova A, Koudelakova T, Chaloupkova R, Ishitsuka M, Nagata Y, Damborsky J, Prokop Z. Biochemical characteristics of the novel haloalkane dehalogenase DatA, isolated from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (5) : 1881-1884.
- [19] Hesseler M, Bogdanovic X, Hidalgo A, Berenguer J, Palm GJ, Hinrichs W, Bornscheuer UT. Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91 (4) : 1049-1060.
- [20] Drienovska I, Chovancova E, Koudelakova T, Damborsky J, Chaloupkova R. Biochemical characterization of a novel haloalkane dehalogenase from a cold-adapted bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (14) : 4995-4998.
- [21] Gehret JJ, Gu L, Geders TW, Brown WC, Gerwick L, Gerwick WH, Sherman DH, Smith JL. Structure and activity of DmmA, a marine haloalkane dehalogenase. *Protein Science*, 2012, 21 : 239-248.
- [22] Chan WY, Wong M, Guthrie J, Savchenko AV, Yakunin AF, Pai EF, Edwards EA. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3 (1) : 107-120.
- [23] Chovancova E, Kosinski J, Bujnicki JM, Damborsky J. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins*, 2007, 67 (2) : 305-316.
- [24] Oakley AJ, Klvana M, Otyepka M, Nagata Y, Wilce MC, Damborsky J. Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 Å resolution: dynamics of catalytic residues. *Biochemistry*, 2004, 43 (4) : 870-878.
- [25] Marek J, Vevodova J, Smatanova IK, Nagata Y, Svensson LA, Newman J, Takagi M, Damborsky J. Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry*, 2000, 39 (46) : 14082-14086.
- [26] Chaloupkova R, Sykorova J, Prokop Z, Jesenska A, Monincova M, Pavlova M, Tsuda M, Nagata Y, Damborsky J. Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (52) : 52622-52628.
- [27] Pikkemaat MG, Janssen DB. Generating segmental mutations in haloalkane dehalogenase: a novel part in the directed evolution toolbox. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (8) : E35-35.
- [28] Otyepka M, Damborsky J. Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains. *Protein science : a Publication of the Protein Society*, 2002, 11 (5) : 1206-1217.
- [29] Pavlova M, Klvana M, Prokop Z, Chaloupkova R, Banas P, Otyepka M, Wade RC, Tsuda M, Nagata Y, Damborsky J. Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5 (10) : 727-733.
- [30] Oakley AJ, Prokop Z, Bohac M, Kmunicek J, Jedlicka T, Monincova M, Kuta-Smatanova I, Nagata Y, Damborsky J, Wilce MC. Exploring the structure and activity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: evidence for product- and water-mediated inhibition. *Biochemistry*, 2002, 41 (15) : 4847-4855.
- [31] Kotik M, Faměrová V. Sequence diversity in haloalkane dehalogenases, as revealed by PCR using family-specific primers. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 88 (2) : 212-217.
- [32] Laternus F. Marine macroalgae in polar regions as natural sources for volatile organohalogenes. *Environmental Science and Pollution Research*, 2001, 8 (2) : 103-108.

- [33] Poelarends GJ, Zandstra M, Bosma T, Kulakov LA, Larkin MJ, Marchesi JR, Weightman AJ, Janssen DB. Haloalkane-utilizing *Rhodococcus* strains isolated from geographically distinct locations possess a highly conserved gene cluster encoding haloalkane catabolism. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (10) : 2725-2731.
- [34] Poelarends GJ, Kulakov LA, Larkin MJ, van Hylckama Vlieg JET, Janssen DB. Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1, 3-dichloropropene- and 1, 2-dibromoethane-degradative pathways. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (8) : 2191-2199.
- [35] Song JS, Lee DH, Lee K, Kim CK. Genetic organization of the *dhla* gene encoding 1,2-dichloroethane dechlorinase from *Xanthobacter flavus* UE15. *Journal of Microbiology - Seoul*, 2004, 42 (3) : 188-193.
- [36] Balado M, Lemos ML, Osorio CR. Genetic characterization of pPHDP60, a novel conjugative plasmid from the marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Plasmid*, 2013, 70 (1) : 154-159.
- [37] Stucki G, Thueer M. Experiences of a large-scale application of 1, 2-dichloroethane degrading microorganisms for groundwater treatment. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29 (9) : 2339-2345.
- [38] Bidmanova S, Chaloupkova R, Damborsky J, Prokop Z. Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398 (5) : 1891-1898.
- [39] Szymański W, Westerbeek A, Janssen DB, Feringa BL. A simple enantioconvergent and chemoenzymatic synthesis of optically active α -substituted amides. *Angewandte Chemie*, 2011, 123 (45) : 10900-10903.
- [40] Martincová E, Voleman L, Najdová V, De Napoli M, Eshar S, Gualdrón M, Hopp CS, Sanin DE, Tembo DL, Van Tyne D. Live imaging of mitochondria and hydrogenosomes by HaloTag technology. *PLoS One*, 2012, 7 (4) : e36314.
- [41] Peterson SN, Kwon K. The HaloTag: Improving soluble expression and applications in protein functional analysis. *Current Chemical Genomics*, 2012, Suppl 1-M2 : 8-17.
- [42] Mazzucchelli S, Colombo M, Verderio P, Rozek E, Andreatta F, Galbiati E, Tortora P, Corsi F, Prosperi D. Orientation-controlled conjugation of haloalkane dehalogenase fused homing peptides to multifunctional nanoparticles for the specific recognition of cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 125 (11) : 3203-3207.

Research progress of microbial haloalkane dehalogenase – A review

Anzhang Li^{1,2}, Zongze Shao^{1*}

¹Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, the Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, Fujian Province, China

²Guangdong Provincial Microbial Culture Collection and Application Key Laboratory, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

Abstract: Haloalkane dehalogenases are key enzymes for biodegradation of halogenated aliphatic compounds, widely distributed in various microbial species of wide geographical distributions, and of significance in practical application such as bioremediation and industrial biocatalysis. Twenty haloalkane dehalogenases have been biochemically characterized so far. In recent years, progresses have been made in the enzymatic characteristics, protein structures, and phylogenetic diversity. We reviewed the progresses of haloalkane dehalogenase in structure and function, diversity and application potential.

Keywords: biodegradation, halogenated compounds, haloalkane dehalogenase, HLD

(本文责编:张丽丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41176154) and by the Public Welfare Project of SOA (201005032)

* Corresponding author. Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

Received: 13 June 2014/Revised: 2 October 2014