

卤化酶催化机制及定向改造研究进展

牛欣越, 张郑宇*

武汉大学 药学院, 湖北 武汉 430062

牛欣越, 张郑宇. 卤化酶催化机制及定向改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1802-1823.

NIU Xinyue, ZHANG Zhengyu. Recent advances of halogenation mechanisms and halogenase engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1802-1823.

摘 要: 卤代化合物在农业化学、制药、材料等领域有着较高的应用价值, 但是传统的化学合成手段往往使用有毒试剂, 并可能引发环境污染问题。此外, 传统方法还面临区域选择性和立体选择性不足的挑战, 导致制备过程较为复杂。相比之下, 酶促卤化技术因其高效的催化性能、温和的反应条件以及出色的区域和立体选择性潜力, 被认为是绿色卤化工业中更具前景的选择。目前已经表征了多种卤化酶, 包括遵循亲电芳香取代机制的亚铁血红素依赖型卤过氧化物酶、钒依赖型卤过氧化物酶和黄素依赖型卤化酶, 遵循自由基机制的非血红素铁/ α -酮戊二酸依赖型卤化酶和遵循亲核机制的S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖型卤化酶。本文综述了各类卤化酶的关键活性位点与催化卤化机理, 以及一系列为了提高其应用价值而进行的酶工程改造, 最后简要讨论了其工业应用现状。作为一类有前景的生物催化剂, 卤化酶可以高效地实现酶促合成及化学酶法合成多种卤代化合物, 改善传统化学合成带来的环境污染问题, 深入理解其催化机制与改造研究在合成领域具有重要的价值。

关键词: 亲电卤化酶; 自由基卤化酶; 亲核卤化酶; 定向进化

Recent advances of halogenation mechanisms and halogenase engineering

NIU Xinyue, ZHANG Zhengyu*

School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Halogenated compounds are widely used in agricultural chemical, pharmaceutical, and material industries. The chemical synthesis of these compounds ordinarily needs harsh conditions and noxious reagents, generating harmful by-products and products lacking regioselectivity. Halogenase-catalyzed halogenation with high efficiency, mild reaction conditions, outstanding stereoselectivity, and environmental friendliness demonstrates a

*Corresponding author. E-mail: zhengyu.zhang@whu.edu.cn

Received: 2024-11-08; Accepted: 2025-01-06; Published online: 2025-01-07

promising prospect. Different types of halogenases have been characterized, including heme-dependent haloperoxidases, vanadium-dependent haloperoxidases, and flavin-dependent halogenases catalyzing electrophilic halogenation, non-heme iron/ α -ketoglutarate-dependent halogenases catalyzing radical halogenation, and S-adenosine-L-methionine-dependent halogenases catalyzing nucleophilic halogenation. This review outlines the catalytic mechanisms of various halogenases and the engineering modifications for application and briefs the industrial application status of these enzymes. Halogenases can efficiently achieve enzymatic as well as chemoenzymatic synthesis of a variety of halogenated compounds, and significantly ameliorate the environmental issues caused by traditional chemical synthesis. Relevant mechanism and engineering research hold important value in the field of synthesis.

Keywords: electrophilic halogenases; radical halogenases; nucleophilic halogenases; directed evolution

卤素取代基(F、Cl、Br 和 I)是一种可以改变天然化合物生物活性和物理化学性质的化学官能团^[1],其取代效果可以归因于碳-卤素键长、范德华半径在内的空间效应、电子效应、碳-卤素键的极性以及 pKa 值效应等^[2]。卤素原子对化合物代谢、氧化、热稳定性以及脂溶性等物理化学性质的影响具有潜在的应用价值,卤素的引入对分子生物活性的改变同样具有重要的应用前景。

近年来,卤代有机化合物广泛应用于农业化学、制药和材料等行业,是有机合成领域金属催化交叉偶联反应中重要的中间体^[3]。2010 年以来新推出的农业化学产品(除草剂、杀菌剂、杀虫剂和杀线虫剂)中,约 96%含有卤素原子^[4]。以 DuPont 公司生产的除草剂氯丙嘧啶酸为例,它通过靶向一组独特的植物生长素受体 cylindrical 起作用,对大多数阔叶杂草和灌木具有很高的活性,低剂量使用效果显著,其吡啶基团的 3 位氯原子对其除草活性至关重要:3 位氟或溴取代化合物活性较低,而无卤素类似物的活性显著降低^[5]。卤代有机化合物还表现出抗肿瘤^[6]、抗病毒^[7]、抑菌^[8]、抗炎^[9]、抗氧化^[10]、降血糖^[11]、降血脂^[12]、抗抑郁^[13]、调节激素水平^[14]等活性。2023 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的 55 种新药中,有 14 种含有氟原子,所占

有批准药物的 25%,如果不考虑生物制剂,这个比例达到了 37%^[15]。卤代有机化合物还可以应用于气体传感器^[16]、软材料^[17]、聚合物科学^[18]等材料科学领域。在有机半导体研究中,卤代化合物如八溴代的萘二酰亚胺(naphthalene diimides, NDI)和茈萘二酰亚胺(perylene diimide, PDI)用于构建 n 型有机场效应晶体管(organic field-effect transistors, OFETs),相对于无卤素类似物,其电子迁移率和空气稳定性显著提高^[19]。

在卤代有机化合物应用需求不断增加的情况下,传统化学合成法使用路易斯酸和有毒试剂^[20],存在反应条件苛刻、环境污染严重等问题,而且反应的区域选择性很差,会产生多种区域异构体和副产物,限制了反应效率。研究人员尝试通过改变 C-H 键的酸度来赋予选择性,或使用导向基团控制功能化位点,但底物的范围和获得区域异构体的种类会受到影响^[21]。与化学合成不同的是,酶促卤化在溶剂水中发生,反应条件温和,相对而言更加环境友好,且常具有催化高效性、高区域选择性和立体选择性。挖掘生物次级代谢中新的天然卤代化合物,开发卤化酶并对其进行定向改造,从而利用酶促反应将卤素加到天然或合成骨架上是比较有前景的选择。自然界存在着大量的卤代次生代谢产物。迄今为止,已报道了 5 000 多种卤化天然产物,其中大多来自海洋生物^[22],大

部分是氯代和溴代化合物,也存在 100 多种含碘天然化合物和 10 余种含氟天然化合物^[23]。天然卤代有机物的结构多样性离不开多种卤化酶的精细催化,近些年各类卤化酶的发现以及结构与机制的深入研究为有机卤代化合物的高效绿色合成奠定了坚实的基础。

首先得到表征的卤化酶是卤过氧化物酶(haloperoxidases, HPOs),除了在萘吡酮霉素生物合成途径中发现的钒依赖型卤过氧化物酶(vanadium haloperoxidases, VHPOs)^[24],这类酶往往显示出非常低的区域选择性^[25]。20 世纪 90 年代末研究人员发现了黄素依赖型卤化酶(flavin-dependent halogenases, FDHs),FDH 能够在底物的特定位置(即使从能量角度来看这个位置相对于其他位置明显不利)高区域选择性、立体选择性地对 C-H 卤化,包括吡啶^[26]、吡咯^[27]、酚类^[28]甚至未活化的烃类^[29]在内的多种底物都可以被 FDH 识别与结合。FDH 在区域选择性、立体选择性卤化中的优良表现以及底物骨架的多样性使得其被广泛地改造及应用^[30]。遵循自由基机制而非上述亲电反应的非血红素 Fe/ α -酮戊二酸依赖型卤化酶[nonheme iron- and α -ketoglutarate (α -KG)-dependent halogenases, NHFeHals]可以高区域选择性及立体选择性地卤化未活化的 sp³ 杂化碳中心,是脂肪族底物酶促卤化的有力工具^[31]。以往发现的卤化酶大多数催化氯化与溴化,还有少量碘化, S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosine-L-methionine, SAM)依赖型卤化酶的发现与表征填补了氟化酶的空白^[32]。本文对各类卤化酶的催化机制进行系统的描述,并结合关键活性区域综述这些生物催化剂在制备合成中的工程改造及应用潜力。

1 卤化酶的催化机制

向有机化合物分子中引入卤素(X)生成 C-X 键的反应称为卤化反应。生物体中催化卤化反应的酶根据其催化机制分为以下几类:遵循

亲电芳香取代机制的亚铁血红素依赖型卤过氧化物酶、钒依赖型卤过氧化物酶和黄素依赖型卤化酶,遵循自由基机制的非血红素 Fe/ α -KG 依赖型卤化酶和遵循亲核机制的 SAM 依赖型卤化酶^[31]。

1.1 亲电芳香取代机制

1.1.1 亚铁血红素依赖型卤过氧化物酶

1966 年 Hager 等^[33]第 1 次发现具有卤化功能的酶,即真菌 *Calariomyces fumago* 来源的氯过氧化物酶(chloroperoxidase, CPO),该酶以过氧化氢为电子受体,催化氯离子的氧化反应生成次氯酸。CPO 的晶体结构显示,血红素位于 CPO 的 N 端和 C 端结构域之间,其远端形成一个类似过氧化物酶的极性活性位点, Glu183 的侧链从远端螺旋 F 延伸,紧邻过氧化物结合位点(图 1B)^[34];静息状态的血红素与 H₂O₂ 反应时, Glu183 上的负电荷羧酸基团会接受来自过氧化物的质子并传递给离开的羟基,失去氢氧根后, Fe^{IV}-卟啉化合物形成;随后, Fe^{IV}-卟啉化合物通过 2 个电子氧化卤化物生成结合酶的卟啉-Fe^{III}-OX 中间体^[25](图 1A);血红素上方有 1 个小的通道,由 C、F 和 H 螺旋和 101-110、263-269 环区形成,连接蛋白表面与血红素远端侧,小分子底物可以由此通道进入活性中心,有较大侧链的底物将不能进入活性中心,只能与释放的次卤酸进行反应。

CPO 为亚铁血红素依赖型 HPOs,这类酶大部分为氯代和溴代过氧化物酶,只有极少数具有碘代或氟代活性。该类酶的催化共性是以过氧化氢和卤化物作为共底物,游离的次卤酸盐作为卤化物种对芳香性和富含电子的底物进行卤化。自 CPO 发现以来,在植物、细菌、真菌、动物中都鉴定到了类似的 HPOs,其中,从哺乳动物中鉴定到的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)^[37]、乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)^[38]、嗜酸性粒细胞过氧化物酶(eosinophil peroxidase, EPO)^[39]、甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, TPO)^[40]和过氧

物酶(peroxidasin, PXDN)^[41]等 HPOs 的血红素辅基与蛋白质共价连接,这与之前的发现有所不同。

除 PXDN 外,其他几种酶的结构均已得到精确的表征^[35,42-44],它们都有含血红素活性中心的过氧化物酶结构域以及与 CPO 类似的通往活性中心的底物扩散通道,不同的是血红素基团通过酯键与蛋白主体共价结合,导致血红素取向的弯曲(图 1C);此外,血红素远端保守的

组氨酸以类似于细胞色素 c 过氧化物酶的机制参与催化。MPO 可以通过酶结合的血红素-Fe^{III}-OX 中间体直接与小分子牛磺酸反应,而较大的底物无法接触到血红素中间体,只能在活性位点外与自由扩散的次卤酸[hypohalous acids, HOX (X=Cl, Br, F, I)]反应^[36](图 1D)。这类亚铁血红素依赖型卤过氧化物酶没有严格的底物结合位点,且存在自由扩散的 HOX,仍类似于化学合成,缺乏区域特异性与立体选择性。

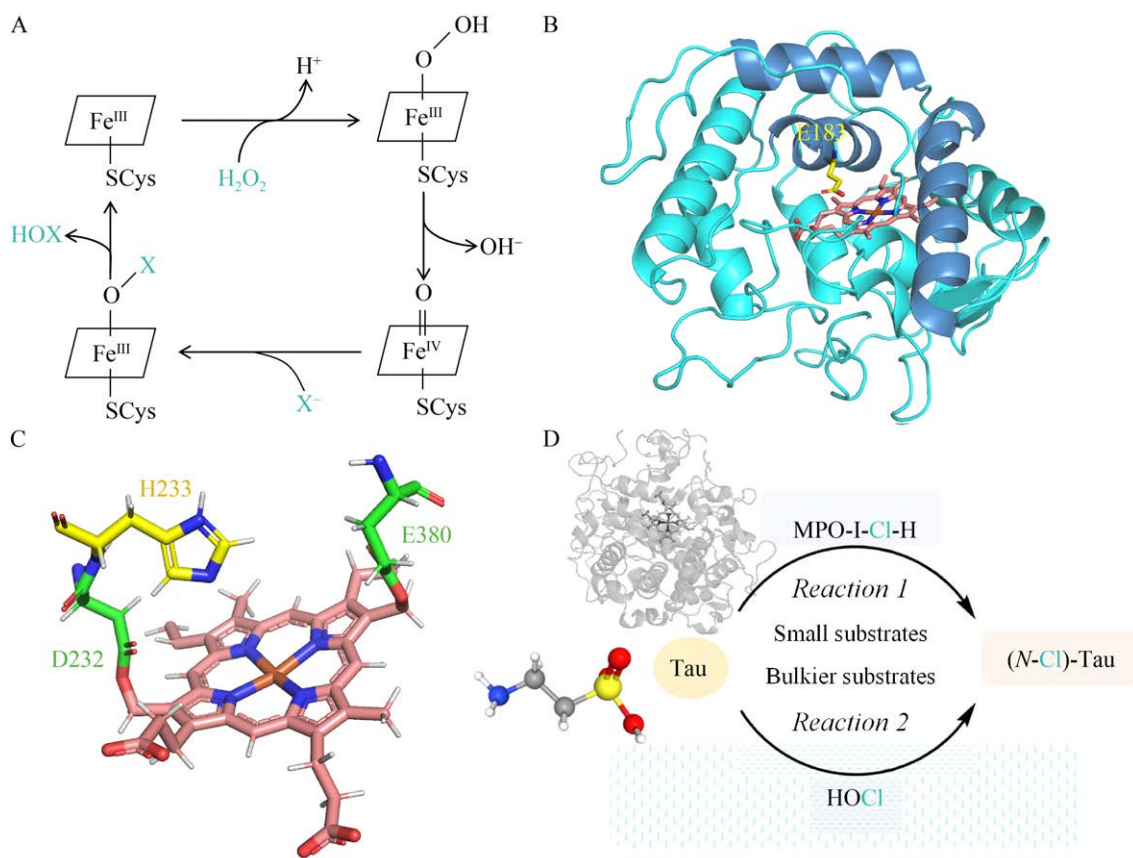


图 1 HPOs 的催化机制与结构特征^[25,34-36]

A: HPOs 的催化机制示意图。B: CPO 的晶体结构(PDB 登录号: 1CPO)。蛋白主体显示为蓝绿色,小分子底物进入活性中心的通道用深蓝色标出,红色杆状显示的为血红素。C: EPO 的活性中心(PDB 登录号: 8OGI)。红色杆状显示的为血红素。D: MPO 催化不同大小底物卤化的 2 种途径。

Figure 1 Mechanism and structures of HPOs^[25,34-36]. A: The mechanism of HPOs. B: Crystal structure of CPO (PDB ID: 1CPO). The protein is shown in turquoise, the channel for small molecule substrates entering the active center is outlined in dark blue, and the heme group is represented by red sticks. C: Active center of EPO (PDB ID: 8OGI). The heme group is shown in red stick. D: Two pathways for MPO-catalyzed halogenation of substrates with different sizes.

1.1.2 钒依赖型卤过氧化物酶

1984年,第1个VHPO AnI从瘤状囊叶藻(*Ascophyllum nodosum*)中得到分离,该酶不含血红素,铁和其他金属离子的添加不会影响其活性^[45],它可以氧化碘化物,反应有钒存在时也能够氧化溴化物和硫氰酸盐,此外,透析产生的脱辅基酶活性会显著下降,而使用含有钒酸盐的缓冲液进行反应,脱辅基酶活性可以逐渐恢复^[46]。这些都说明作为VHPO的辅基,钒酸盐的结合对酶的催化活性是必要的。与亚铁血红素依赖型卤过氧化物酶不同,VHPO催化中心的金属价态在卤化过程中并没有变化,所以对氧化失活不敏感。许多VHPO酶还具有极高的热稳定性,能抵抗高浓度的有机溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等,并且在浓硫酸胍或SDS溶液中依然能够保持较高的活性,如珊瑚藻(*Corallina officinalis*)中发现的钒依赖型溴过氧化物酶(vanadium-dependent bromoperoxidases, CoVBPO),红藻VHPOs的高稳定性可能是其高度对称多聚体中的强相互作用维持的^[47]。不同于亚铁血红素依赖型HPOs以及在藻类、真菌和其他细菌中发现的其他VHPOs,来自链霉菌的NapH1基因编码的钒依赖型氯过氧化物酶(vanadium-dependent chloroperoxidases, VCPO)在萘吡酮霉素生物合成中催化一类具有高区域和立体选择性的氯化环化反应^[48]。以上这些特性都展现出VHPOs广阔的应用前景。

NapH1及其同源蛋白NapH3的高分辨率晶体结构在2022年被报道^[49],NapH1为同源二聚体,每个单体由N端螺旋束、C端螺旋束和约100个残基组成的环状连接区域组成,C端螺旋12通过H494与钒酸盐配位,螺旋偶极相互作用帮助其结合,钒酸盐辅基进一步通过与K372、R379和R488之间的电荷相互作用得到稳定,这些活性位点的特征在VHPOs中高度保守(图2C);NapH1的K324向钒酸盐辅基和螺旋12上的S427延伸。K324突变体可以催化生成次溴酸盐,但无法催化naphthomevalin的氯

或溴环化,这表明K324对立体特异性氯化至关重要;S427A突变体表现出降低的次溴酸盐生成活性,说明S427和钒酸盐之间的氢键对卤化物氧化很重要;K324和S427在所有来自链霉菌生物合成途径、催化对映选择性卤化反应的VHPO酶中是保守的,而其他的VHPOs的结构表征中都缺少赖氨酸残基,并且1个保守的组氨酸取代了S427的位置。

密度泛函理论(density functional theory, DFT)计算显示,过氧化氢插入钒酸盐活性中心后形成钒-羟过氧中间体,卤化物直接从该中间体转移 OH^+ ,形成酶结合的次卤酸复合物,然后释放(图2A)^[51]。Gérard等^[50]具体解析了不等弯孢(*Curvularia inaequalis*)来源的钒依赖型卤过氧化物酶(vanadium-dependent chloroperoxidases from *Curvularia inaequalis*, CiVCPO)通过HOX中间体对吡啶衍生物进行卤化的过程(图2D),甲基苯并吡啶与CiVCPO结合的 K_D 值 $[(0.66 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}]$ 证明了底物与酶的强结合;分子对接显示甲基苯并吡啶在距离钒酸盐辅基活性位点11.2 Å的小而开放的口袋中与CiVCPO结合,这个距离意味着活性位点形成的HOX中间体不需要运输就能直接与底物反应;500 ns的分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟显示底物在结合口袋内有一定的流动性,靠近通道末端钒酸盐辅因子所在的位置;DFT计算表明卤素转移反应对极性环境和局部电场强度和方向敏感,在CiVCPO中已发现这样的电场,并且其与C-X键对齐,这可以降低卤素转移能障;此外,活性实验表明HOX不能直接在溶液中卤化吡啶衍生物。

1.1.3 黄素依赖型卤化酶

20世纪90年代,Kirner等^[52]在荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的硝吡咯菌素pyrrolnitrin的合成途径鉴定到了PrnA,这是第1个鉴定出的具有明确体外活性的FDHs,研究人员从粗提物中各种不同的辅酶因子中筛选出

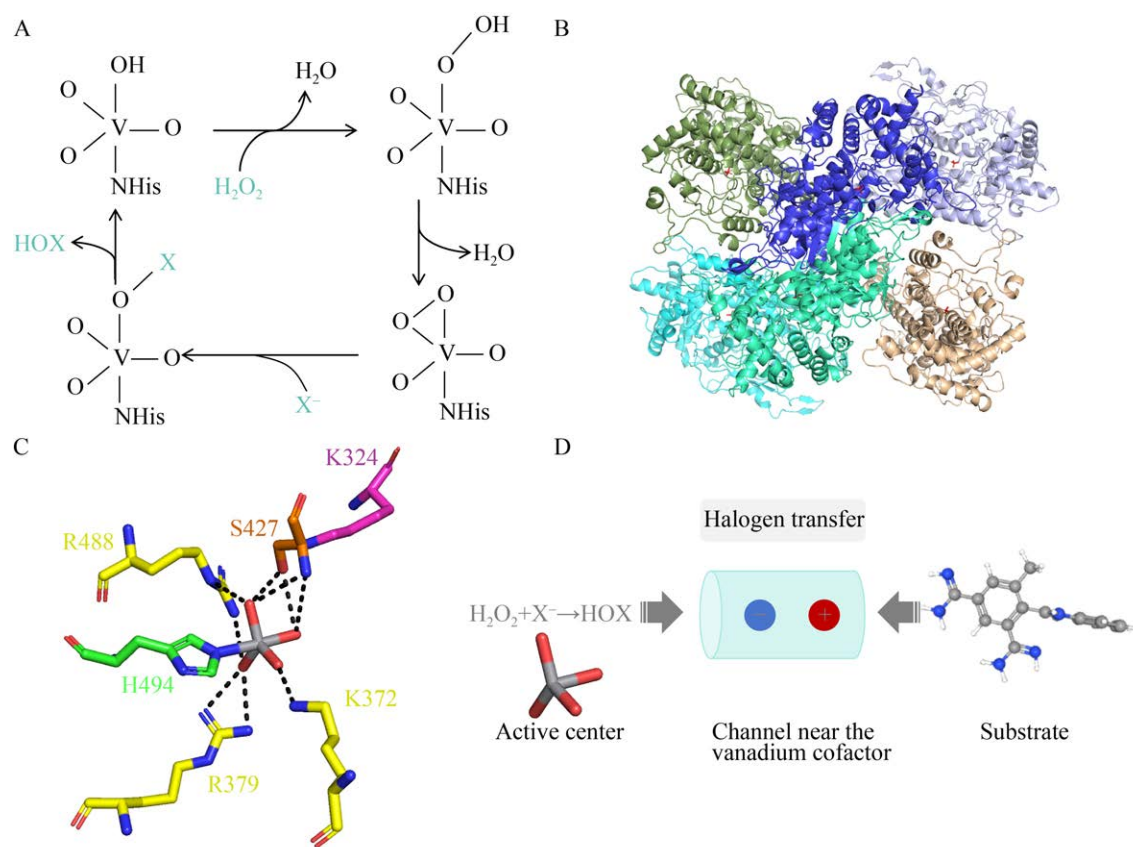


图2 VHPOs的催化机制与结构特征^[25,47,49-50]

A: VHPOs的催化机制示意图。B: CoVBPO六聚体(PDB登录号: 1QHB)。每个单体分别显示为翠绿色、蓝绿色、军绿色、深蓝色、浅蓝色和燕麦色。C: NapH1的活性中心(PDB登录号: 3W36)。钒辅因子显示为灰色杆状。D: CiVCPO卤化底物的示意图。Figure 2 Mechanism and structures of VHPOs^[25,47,49-50]. A: The mechanism of VHPOs. B: CoVBPO hexamer (PDB ID: 1QHB). Each monomer is shown in distinct colors: emerald green, teal, army green, navy blue, light blue, and oatmeal. C: Active center of NapH1 (PDB ID: 3W36). The vanadium cofactor is shown in grey sticks. D: Diagram of CiVCPO halogenating substrates.

能够恢复PrnA色氨酸7位氯化活性的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)。PrnA的结构已得到清晰的表征,二聚体蛋白的每个单体由N端的黄素依赖型单加氧酶类似的“盒子”状黄素结合结构域和C端的“金字塔”状的底物结合域(图3B)组成,氯离子被结合在FAD的对面,靠近通往色氨酸的通道入口,它对黄素过氧化物进行亲核攻击,生成羟基化FAD和次氯酸(HOCl),HOCl形成后进入1个10 Å的通道,向色氨酸移动(图3A),Lys79位于黄素和色氨酸结合位点之间,距离色氨酸上的氯化位点约4 Å,在已知和预测的黄素依赖

型卤化酶中保守,其突变体酶活性完全丧失^[26]。参与蝴蝶霉素生物合成的RebH和PrnA具有55%的序列同源性,同样催化色氨酸的C7位置发生氯化,二者的结构也高度相似^[54]。

关于HOCl是否直接氯化色氨酸吲哚环的争论,之前由于关键活性位点赖氨酸残基的作用尚不明确,Yeh等^[55]提出存在中间体Lys79-εNH-Cl于C7处对吲哚环进行亲电芳香取代的假说。2022年Barker等^[56]采用MD模拟和DFT计算的方法研究了机制1(HOCl直接氯化底物)和机制2(在底物氯化之前形成氯赖氨酸中间体)的合理性,事实上,机制2可以被排

除, 因为无论对于哪一种质子化状态, 其能垒都显著高于机制 1。

FDHs 根据底物特征被分为 2 类: 一类催化游离小分子底物上的氯化反应, 如 RebH 和 PrnA, 另一类作用于通过柔性磷泛酰巯基连接到载体蛋白上的底物, 如 PltA^[27] 和 SgcC3^[57]。第一类 FDHs 中, RebH 和 PrnA 是色氨酸-7-卤化酶, ThaI 和 BorH 是色氨酸-6-卤化酶, PyrH 是色氨酸-5-卤化酶^[58-60]。晶体结构显示, 吡啶的 C-5、C-6、C-7 与保守赖氨酸残基的靠近导

致了卤化的区域选择性。第二类 FDHs 显示出完全不同的底物结合结构域。PltA 的 C 端结构域封闭了位于结合 FAD 约 10 Å 远的 Lys73, 可以选择性地阻止吡咯-2-羧酸盐这种小分子底物的结合和卤化, 较大的吡咯基-S-PltL 偶联底物不能通过 FAD 结合位置进入, 又不存在其他通往卤化位点的通道, 所以需要相应的构象变化(如 C 端结构域的移动)打开通往卤化位点的通道, 从而允许载体蛋白连接的吡咯基部分的进入^[27]。与之类似的是, CmlS C 端的 21 个残基

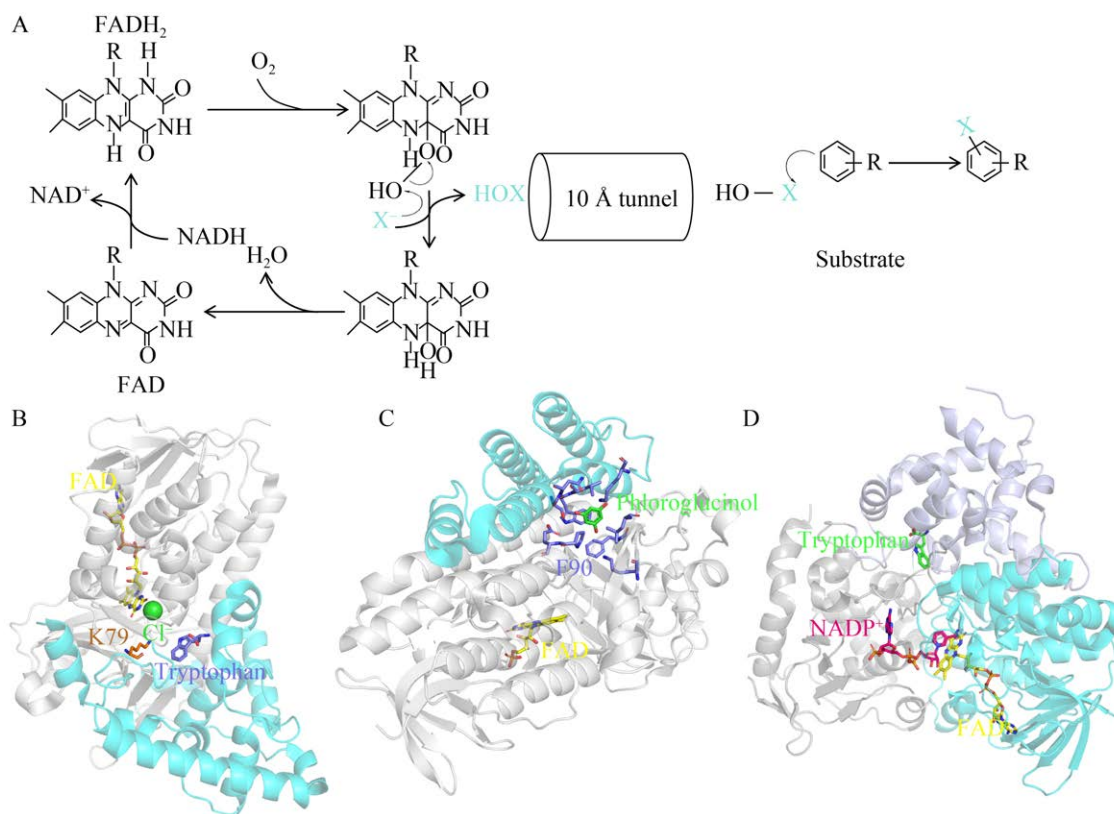


图3 FDHs 的催化机制与结构特征^[23,26,28,53]

A: FDHs 的催化机制示意图。B: PrnA 的晶体结构(PDB 登录号: 2AQJ)。N 端结构域显示为灰色, C 端结构域显示为蓝绿色。C: PltM 的晶体结构(PDB 登录号: 6BZA)。C 端螺旋显示为蓝绿色, 与底物结合相关的残基显示为深蓝色杆状。D: AetF 的晶体结构(PDB 登录号: 8JZ3)。灰色、蓝绿色、深蓝色分别为 NADP⁺、FAD、底物结合结构域。

Figure 3 Mechanism and structures of FDHs^[23,26,28,53]. A: The mechanism of FDHs. B: Crystal structure of PrnA (PDB ID: 2AQJ). N-terminal domain is shown in gray and C-terminal domain shown in teal. C: Crystal structure of PltM (PDB ID: 6BZA). C-terminal helix is shown in teal, and blue sticks representing residues associated with substrate binding. D: Crystal structure of AetF (PDB ID: 8JZ3). Binding domains of NADP⁺, FAD, and substrate are shown in gray, teal, and blue.

构成了 1 个随机卷曲, 小分子底物进入卤化活性位点的通道被其阻挡^[29]。PltM 的底物结合口袋则表现出更独有的特征, 该酶可以氯化、溴化以及碘化广泛的具有电子供体基团的苯基化合物, 即使某个羟基被中等电子吸引基团(如醛、酮和羧酸)取代也不影响其活性, 底物的苯环与 Phe90 几乎正交堆叠, 该残基可能有助于定向底物进行卤化(图 3C), 由于底物结合位点足够大并且相对靠近蛋白质表面, 允许更大的底物如白藜芦醇、儿茶素等进入, 并且可以容纳二碘化, 但因为仍受到 C 端区域螺旋的限制, 只能添加最多 2 个卤素^[28]。

以往发现的所有的 FDHs 都属于双组分体系, 需要额外的黄素还原酶来再生 FAD, 近年来发现的 Bmp5^[61]、AoiQ^[62]、AetF^[53]等单组分 FDH 在单个多肽链中同时具有卤化酶和还原酶活性, 可以简化反应过程并提高卤化效率(图 3D)。AetF 从蓝藻(*Aetokthonos hydrillicola*)中分离出来, 催化 L-色氨酸在 C5 和 C7 上连续溴化, 生成 5-溴色氨酸和 5,7-二溴-L-色氨酸, 且 AetF 可以使用 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等多种卤素进行卤化, AetF 还可以通过去对称化、非对映选择性卤化和卤环化催化对映选择性卤化反应^[53]。虽然血红素和钒依赖的 HPOs 也可以催化底物的卤环化反应, 但通常会产生外消旋体混合物, 因为反应利用的是酶产生的游离 HOX^[63]。AetF 对芳香族化合物和杂环化合物都具有较高的活性, 对其结构的表征表明 AetF 广泛的底物谱可能归因于较大的底物结合口袋, 底物识别残基与 5-Br-Trp 之间的相互作用网络对 AetF 的二溴化活性至关重要^[64]。

1.2 自由基机制

目前所有已知的自由基酶促卤化反应都是由 NHFeHals 催化的^[23]。1998 年, Sitachitta 等^[65]在巨大鞘丝藻(*Calothrix magnifica*)来源的巴布酰胺的生物合成途径中首次发现卤化酶的自由基机制。Vaillancourt 等^[66]纯化出的来自丁香霉素生物合成途径的 SyrB2 共价连接在 SyrB1 硫

醇化结构域的磷酸盐臂上, 且在 O_2 、 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)和氯离子存在下氯化 L-Thr-SyrB1 为 4-Cl-L-Thr-SyrB1, 这为 NHFeHals 的脂肪族卤化酶活性提供了直接证据。

SyrB2 的结构展现为反平行 β “三明治”或杯状折叠, 这是 NHFeHals 的共同特征。 α -KG 的双齿结合及精氨酸与苏氨酸的氢键相互作用在 NHFeHals 中保守, 仅 α -KG 结合的 SyrB2 有 2 个通道通向活性位点, 遮盖活性位点的环区具有一定的流动性, 一旦铁和氯离子结合, 2 个环区和 1 个 β -发夹的移动就会使蛋白质围绕活性位点闭合; apo 状态的 SyrB2 铁配位点被 2 个组氨酸、1 个氯离子、 α -KG 和 1 个水分子占据(图 4B), 氯离子位于由 Ala 118、Phe 121 和 Ser 231 组成的疏水口袋中, Ala 118 在空间上留出了氯离子结合铁的位置, 对卤化活性很重要, 该残基在 NHFeHals 中高度保守, α -KG 通过 C5 羧酸与 Thr 113、Arg 248 和 Trp 145 之间的氢键固定在活性位点, Arg 254 位于 α -KG 上方 2.9 Å 处, 可能有助于定位 C1 羧酸; SyrB2 的底物 L-Thr 连接在 SyrB1 蛋白的磷酸泛酰巯基乙胺臂上, 通过 α -KG 上方的狭窄通道进入活性位点, 从铁到通道边缘的距离约为 17 Å, 与伸展的磷酸泛酰巯基乙胺臂的长度(约 20 Å)相近, L-Thr-SyrB1 的结合会导致 SyrB2 活性位点结合的水被氧气替代, 氧气进入铁中心后, α -KG 氧化脱羧, 形成高能量的 $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-oxo}$ 中间体^[69]。铁穆斯堡尔光谱鉴定实验验证了 SyrB2 同源蛋白 CytC3 的 $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-oxo}$ 中间体在氢原子提取过程中的关键作用^[70], 该中间体会从底物中提取 1 个氢原子, 随后产生的底物烷基自由基与氯原子结合, 生成氯化的 L-Thr-S-SyrB1 并再生还原性的 Fe^{II} 中心(图 4A)。

使用自由基卤化机制, NHFeHals 可以区域选择性地未活化的脂肪族碳上卤化底物。在发现 WelO5 之前, 所有的自由基卤化酶都需要与载体蛋白的磷酸泛酰巯基乙胺臂共价连接,

包括 CytC3^[70]、BarB1^[71]、BarB2^[72]、CmaB^[73]、KthP^[74]、HctB^[75]等。WelO5^[67]、AmbO5^[77]、SaDAH^[78]、BesD^[68]等独立型 NHFeHals 的表征揭示了这些自由基卤化酶结合游离分子的机制。

来自 Welwitindolinone 生物合成途径的 WelO5 可以催化生物碱 12-表-费歇尔吲哚 U (12-*epi*-fischerindole U) 的脂肪碳原子 C13 氯化生成 12-表-费歇尔吲哚 G^[67]。WelO5 的结合口袋以疏水性氨基酸为主,与底物的大尺寸和疏水性相符(图 4C); WelO5 特有的结构是 1 个 C 端外部 α -螺旋,底物结合后它会移动 9 Å 的距离盖住活性位点,此时 C13 距离 Fe^{II} 活性中心仅 4.5 Å,其 pro-R 氢原子正对 Fe^{II},与反应的立体选择性一致;氧气结合后 Ser189 会与铁周围配体发生相互作用,它被突变为 Ala 后产生了羟基化产物,这是因为只有配体重排发生,侧链的氢键限制含氧基团靠近 C13,才能抑制羟基化并保证卤素配体的顺式转移^[67]。量子力学/分子力学 (quantum mechanics/molecular mechanics, QM/MM) 计算表明 O₂ 结合后 Ser189 通过氢键将 Fe^{IV}=O 结构引导为相对于 His164、氯离子和铁原子组成的平面的赤道构象而非轴向构象,五配位的 HO-Fe^{III}-Cl 复合物形成时羟基配体仍然维持赤道构象,因此相对于氯配体,距离轴向的底物自由基更远,这种构象可以解释野生型 WelO5 极高的氯化选择性和 WelO5_S189A 突变体的羟化活性^[79]。

独立型 NHFeHals 除了卤化生物碱,也可以卤化小分子氨基酸和核苷。BesD 催化 L-赖氨酸 γ 位氯化,它有 1 个小且含多个氢键的极性口袋,这些氢键作用于赖氨酸的羧基(H134、W238、R74)和胺基(E120、N219、T221、D140),对应其游离、极性的赖氨酸底物,而非与蛋白质结合的氨基酸或大的疏水吲哚环(图 4D); His134 高度保守,它与赖氨酸的羧基形成氢键,负责定位赖氨酸与铁中心复合物,其突变导致羟基化明显多于卤化; Asn219 可能通过氢键定向 α -KG,以使氧气结合位点远离底物;在类似

于 WelO5 的 α 螺旋盖子的结构中, W238 位于结合的赖氨酸上方,形成疏水相互作用并关闭活性位点,将赖氨酸固定在活性位点进行催化^[68]。DFT 计算表明, BesD 采取与天然反应氯化相同的机制催化赖氨酸的溴化和叠氮化,氢原子提取仍然是速率决定步骤,且引入的不同卤素配体对反应速率影响不大,这意味着 BesD 催化卤化能够扩展到其他卤素离子^[80]。

AdeV 催化游离核苷类底物 2'-脱氧腺苷单磷酸(2'-deoxyadenosine monophosphate, 2'-dAMP) 氯化生成 Cl-2'-dAMP,其底物结合口袋是 1 个长而窄的亲水通道,空间上正好容纳 2'-dAMP 及其类似物, AdeV 无法氯化喷司他丁、脱氧腺苷(2'-deoxyadenosine, 2'-dA)等,事实上喷司他丁与 AdeV/Fe^{II}/Cl/ α -KG 复合物对接时以与 2'-dAMP 相似的结合模式结合到底物结合口袋,推测 AdeV 对喷司他丁失去活性可能是由于七元环与 F271 之间的平行 π 堆叠相互作用的减弱, 2'-dAMP 的磷酸基团对其结合到底物结合口袋至关重要,而 2'-dA 缺乏磷酸基团,无法被 AdeV 识别^[81]。

1.3 亲核机制

第一个发现也是研究最深入的亲核卤化酶是来自卡特利链霉菌(*Streptomyces cattleya*) 的 5'-氟-5'-脱氧腺苷合成酶(5'-fluoro-5'-deoxyadenosine synthase, 5'-FDAS)。5'-FDAS 催化 F⁻ 对 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM) 的亲核攻击,生成 5'-氟-5'-脱氧腺苷(5'-fluoro-5'-deoxyadenosine, 5'-FDA) 和 L-甲硫氨酸(图 5A), 5'-FDAS 在 SAM 的 C5 碳上以反式立体化学生成 5'-FDA,符合亲核取代(SN2)机制^[83]。5'-FDAS 还可以催化氯化^[84]。

F⁻ 的完全脱水需要大约 400 kJ/mol 的能量,这对酶来说是非常高的活化能, 5'-FDAS 通过降低氟的水合作用焓催化氟化, F⁻ 原子位于由 Phe 156 至 Ser 158 的主链和 Phe 156、Tyr 77、Thr 80 和 Ser 158 的侧链组成的口袋中,从产物结构的氟甲基推断, F⁻ 通过与 S158 的羟基和酰

胺基团形成氢键与酶发生极性接触, 以此降低脱水的自由能(图 5C); SAM 结合在 1 个单体的 C 端结构域和邻近单体的 N 端结构域之间的界面上, 其结合后与蛋白质之间广泛的氢键和范德华力会推动结构域闭合, 形成包埋的结合位点(图 5B), 且 SAM 以一种高能构象结合, 核

糖环的 C2-O2 和 C3-O3 键呈现扭转角 1° 的重叠构象; 推断 F 原子在 SAM 之前与 5'-FDAS 结合, SAM 结合时完成脱水, 产生亲核的 F^- , F^- 对齐 SAM 的 C-S 键, 由 T80 或 SAM 的正电荷硫原子稳定, SAM 的 O3 与 Ser 158 的羟基形成氢键, 引导脱水的 F 定向发生 SN2 反应^[82]。

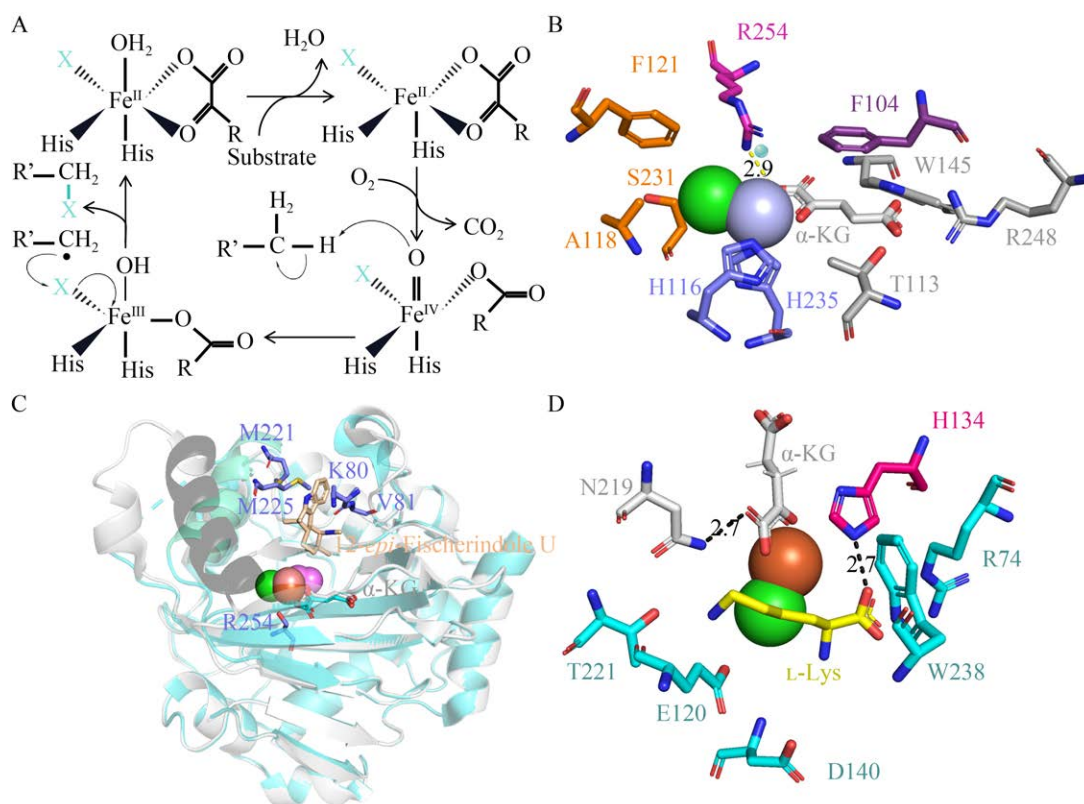


图 4 NHFeHals 的催化机制与结构特征^[31,66-68] A: NHFeHals 的催化机制示意图。B: SyrB2 的活性位点(PDB 登录号: 2FCT)。铁显示为深蓝色, 氯离子显示为绿色, 水显示为天蓝色。C: apo 状态的 WelO5 (PDB 登录号: 5IQS, 显示为灰色)及其结合 12-*epi*-Fischerindole U 后(PDB 登录号: 5IQV, 显示为蓝绿色)的晶体结构叠加。底物结合后深灰色螺旋移动到湖绿色的位置, apo 及 holo 蛋白的铁分别显示为浅红色与深红色, 氯离子显示为绿色, 一氧化氮显示为紫色。D: BesD 的活性位点(PDB 登录号: 6NIE)。铁显示为红色, 氯离子显示为绿色。

Figure 4 Mechanism and structures of NHFeHals^[31,66-68]. A: The mechanism of NHFeHals. B: Active site of SyrB2 (PDB ID: 2FCT). Iron is shown in dark blue, chloride ion is shown in green, and water is shown in sky blue. C: Overlay of apo WelO5 (PDB ID: 5IQS, displayed in gray) and WelO5 with 12-*epi*-Fischerindole U (PDB ID: 5IQV, displayed in teal). Upon substrate binding, the dark gray helix moves to a turquoise position. The iron in the apo and holo protein displayed in light and dark red. Chloride ion is shown in green, and nitric oxide shown in purple. D: Active site of BesD (PDB ID: 6NIE). Iron is shown in red, and chloride ion is shown in green.

同样采取亲核机制的 SalL 氯化 SAM 生成 5'-氯-5'-脱氧腺苷和 L-甲硫氨酸, 该酶不能利用氟化物^[85]。基于密度泛函紧束缚近似 3/分子力学(density functional tight binding 3/molecular mechanics, DFTB3/MM)计算的平均力势表明, SalL 催化氟化的能垒比氯化高 13.5 kcal/mol^[86]。SalL 的晶体结构显示出与 5'-FDAS 相同的单体折叠和溶液中的三聚体状态, 但甘氨酸取代了 5'-FDAS 中的 S158, 导致脱水能力的降低, 从而无法处理氟化物, 同时它还导致了卤化物结合口袋的扩大, 这与 SalL 识别更大离子半径(氯离子, 1.67 Å; 溴离子, 1.82 Å; 碘离子, 2.06 Å; 氟离子, 1.19 Å)卤素的活性相符^[82]。QM/MM 计算表明 SalL 催化氯化的机制在于活性位点提供的过渡态的静电稳定而非脱溶剂化^[87]。此外, C1A1 的晶体结构说明它和

SalL 迥异的氯化活性可能与保守精氨酸的侧链构象差异有关^[88]。

2 卤化酶的工程改造

卤化酶功能以及结构已得到清晰的表征, 是非常有前景的生物催化剂, 但其应用仍然局限于分析和半制备规模, 主要是由于酶产量低、稳定性差、对非天然底物催化效率受限, 此外, 因为卤化酶对于其自然宿主的生存或生长并非必需, 所以其活性的进化压力很小。因此, 大多数天然来源的卤化酶只有经过酶工程改造才能够广泛应用于生物合成。

2.1 提高卤化酶的产量、稳定性与反应性

首先, 作为工业反应中的生物催化剂, 卤化酶应当展现出良好的产量、稳定性与反应性。黄素依赖型卤化酶 RebH 与 GroEL/ES 的共

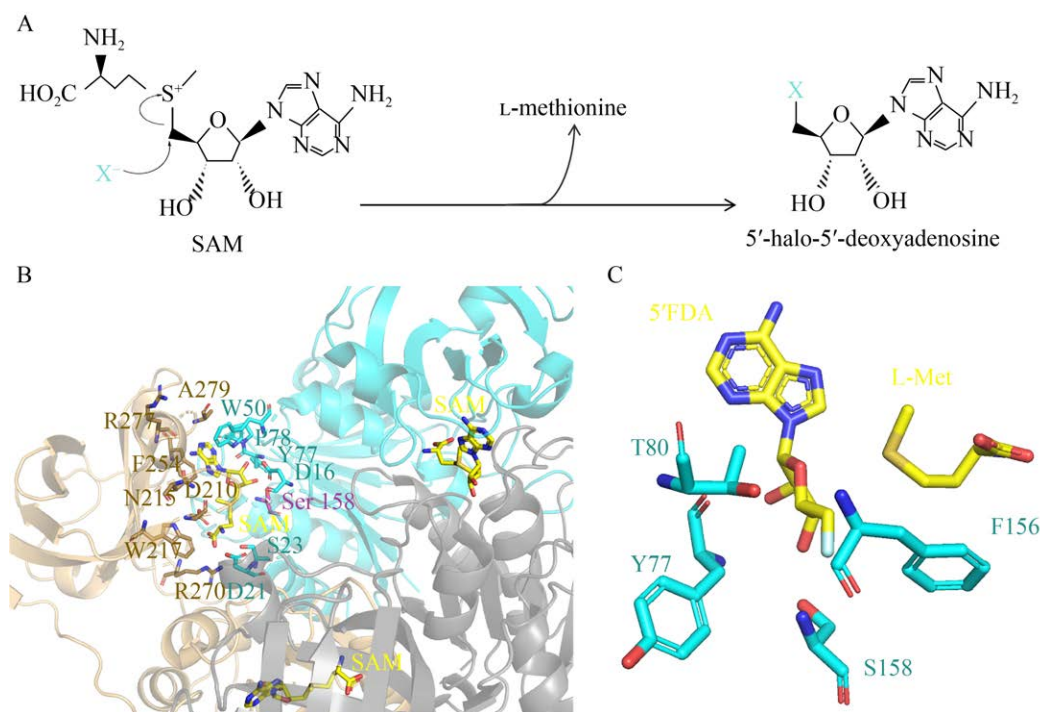


图5 SAM 依赖型卤化酶的催化机制与结构特征^[82] A: SAM 依赖型卤化酶的催化机制示意图。B: 5'-FDAS 的 SAM 结合位点(PDB 登录号: 1RQP)。3 个单体分别显示为香槟金、深灰色和蓝绿色。C: 5'-FDAS 的底物结合位点(PDB 登录号: 1RQR)。

Figure 5 Mechanism and structures of SAM-dependent halogenases^[82]. A: The mechanism of SAM-dependent halogenases. B: SAM-binding site of 5'-FDAS (PDB ID: 1RQP). Three monomers are shown in champagne gold, dark gray, and teal. C: Substrate-binding site of 5'-FDAS (PDB ID: 1RQR).

表达使得其产量从 15 mg/L 增加到 111 mg/L, 黄素还原酶 RebF 与 MBP 标签的融合使其产量从 3 mg/L 增加到 33 mg/L, 这些改造后的酶显示出与野生型类似的酶促反应动力学, 并且以上策略可以应用于各类 FDHs, 以用于制备规模的芳香底物的区域选择性卤化^[89]。

将卤化酶固定在固体载体上可以提高其在工业应用中的稳定性和可重复利用性, 固定化策略通过定制化设计适配不同尺寸的蛋白质, 有效减少酶浸出, 同时维持高效的反应物与产物传质效率^[90]。交联酶聚集体 (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs) 方法可以将粗酶的固定化、纯化和稳定化合并为 1 个步骤, 避免了酶产品中惰性载体的存在^[91], 并显著改善酶的 pH 稳定性、热稳定性、储存稳定性和可重复使用性^[92]。

被广泛应用于酶工程的是模拟自然进化过程的定向进化技术, 该方法通过突变体库筛选的迭代循环定向选择所需特定突变体^[93]。Lewis 团队^[94]采用易错 PCR (error-prone PCR, epPCR) 技术构建多代的随机突变, 进行色氨酸卤化反应与热筛选, 发现了 RebH 突变体 3-LSR (S130L, N166S, Q494R), 3-LSR T_m 值 18 °C 的增幅表明酶的热稳定性显著提高, 且 3-LSR 催化反应可以在 40 °C 持续 30 h, 而同样的温度下野生型 RebH 反应开始后数小时内就开始沉淀为非活性聚集体; 此外, RebH N470S 突变体的氯化产率是野生型的 2.5 倍^[95]。Besse 等^[96]受到热稳定的 Thal 突变体倾向于在溶液中形成二聚体的启发, 设计了 1 个通过二硫键共价连接, 且在二聚体界面引入 2 个半胱氨酸残基的 Thal 突变体 Thal CC, 其热稳定性显著提高。

同时, 开发新的卤化酶也是很有前景的途径, Lingkon 等^[57]发现色氨酸-6 卤化酶 BorH 具有广泛的底物谱, 能够氯化 and 溴化各种带有或者不带有吲哚基团的芳香底物, 其最佳反应温度为 45 °C, 高于大多数其他野生型卤化酶的热参数, 在 100 mg 规模使用 0.2 mol% 的 BorH 对色氨酸进行氯化, 粗产量达到了 52%, 表明

使用 BorH/BorF 进行工业规模的生物转化是可行的。

2.2 改造卤化酶的区域选择性

精确的区域选择性控制对于卤代有机化合物的工业合成十分关键。色氨酸-7-卤化酶 PrnA 的突变体 F103A 可以催化产生 7 位和 5 位 2:1 比例氯代的混合产物^[97], 该研究将酶底物结合口袋的大的芳香族氨基酸残基突变为丙氨酸, 利用结构导向的位点定向突变首次改变了卤化酶的区域选择性。类似的方法被用来改变 PrnA 对 2-氨基苯甲酸的位点选择性, 使得 5 位卤代优先于 3 位卤代 (从野生型的 84:16 变为 38:62)^[98]。Lee 等^[99]从链霉菌中分离出一种新的色氨酸 6-卤化酶 SatH, 它在全细胞反应系统中的溴化能力优于先前报道的所有色氨酸卤化酶, 通过基于结构的蛋白质突变研究, 揭示了 SatH 中的 A78/V79 和 PyrH 中的 G77/I78 是决定色氨酸 6-和 5-卤化酶区域选择性差异的关键残基, 将 A/V 残基替换为 G/I 残基改变了 SatH 的区域选择性 (5 位 63%, 6 位 37%)。

这些例子表明卤化酶的区域选择性可以改变, 但观察到的选择性较低, 定向进化的策略不仅可以用来产生具有更高活性和稳定性的系列突变体, 还可以有效改变卤化酶的区域选择性。Moritzer 等^[57]改造的 Thal-RebH5 突变体实现了 L-Trp 卤化的区域选择性调控, 氯化 and 溴化位点从 C6 改变为 C7。Lewis 团队^[95]结合 epPCR 及质谱筛选氘代探针底物上选择性的改变, 发现了特异性对吲哚氮原子邻位、间位和对位进行氯化的 RebH 突变体 0S、8F 和 10S。总之, 通过基于结构的理性工程和随机突变结合高通量筛选几乎完全实现了对非天然底物如 3-吲哚丙酸和色胺以及天然底物色氨酸的卤化区域选择。

2.3 扩展卤化酶的卤素类型

当前的卤化酶研究主要集中在氯化 and 溴化上, 碘化酶 and 氟化酶的报道较少。从蓝藻病毒中分离出的新型黄素依赖型病毒卤化酶 VirX1 能

够对多种底物进行区域选择性卤化,且更倾向于碘化底物而非溴化、氯化^[100],对这种碘偏好性机制的研究将有利于碘化酶的进一步开发。

Jiang 等^[101]对氯酶 SalL 进行改造使其具有氟酶功能,丙氨酸扫描发现残基 Tyr70 对于这一转化过程至关重要,位点饱和诱变试验表明 Y70A/C/S/T/G 均表现出明显的氟化活性,并且与 Y70T 单突变体相比,Y70T/W129F 双突变体催化生成 5'-FDA 的产量增加了 76%;QM/MM 计算显示,Y70T 与 Y70T/W129F 突变体口袋周围的静电势在不断增加,这可能有助于带负电荷卤素离子的结合;Y70T 和 Y70T/W129F 突变体活性口袋变小也增加了体积较小的氟原子发生反应的概率。

此外,将氟化与其他反应结合也是可行的策略。Yu 等^[102]设计并合成了氟乙基硒代腺苷-L-硒代蛋氨酸(fluoroethyl Se-adenosyl-L-selenomethionine, FEt-SeAM),创建了卤代甲基转移酶(halide methyltransferase, HMT)及其突变体与甲基转移酶的级联反应,氟乙基化了多个 O-、N-、S-和 C-亲核试剂,对于 DnrK 和 NovO 等不易识别 FEt-SeAM 的甲基转移酶,可以通过突变 SAM 结合口袋中的保守疏水残基为更小的氨基酸提高其活性。Li 等^[103]开发了一种光酶促氢氟烷基化反应,将含氟基团整合到烯烃中,这种方法利用含氟单元与酶之间的相互作用实现立体控制,通过酶促氢原子转移在含氟基团的 β 、 γ 或 δ 位置实现高对映选择性。

2024 年研究人员基于新催化机制的酶促不对称氟化反应,发现来自绿色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)的(S)-2-羟基丙磷酸酯环氧化酶[(S)-2-hydroxypropylphosphonate epoxidase, SvHppE]能够催化不对称氟转移反应,通过定向进化得到了能够以 30%产率和 96.5:3.5 对映比的催化效率生成目标氟化产物的 SvHppE_N134W_E141D_Y102C 三突变体,该突变体可以接受多种 N-氟酰胺衍生物作为底物并将其转化为相应的氟化产物,该研究表明非血红素铁

酶中的铁-氟中间体能够与碳自由基反应生成碳-氟键^[104]。

2.4 扩大卤化酶的底物谱

通过工程改造扩大卤化酶的底物范围对非天然底物的酶促卤化具有重要意义。独立型 NHFeHals HalD 的口袋较小,由 I250、I253 和 W254 组成,导致 HalD 偏好于催化短链的鸟氨酸而非赖氨酸。与之相对,HalB 的底物结合口袋由 M246、M249 和 F250 组成,可以容纳赖氨酸,将 HalD 的 W254 突变为苯丙氨酸后,该酶对赖氨酸的 K_m 值下降到原来的 1/10, k_{cat} 值明显提高^[105]。Sana 等^[106]以 RebH 的突变体 3-LSR 为亲本筛选得到 M1 和 M2 这 2 个突变体,它们对吡啶-5-羧酸、5-溴吡啶、5-氯吡啶、5-氟吡啶、吡啶-6-羧酸、7-溴-5-甲基吡啶等一系列吡啶衍生物的溴化与氯化活性都很高。此外,RebH 的突变体 3-SS (G112S、N470S)和 4-V (G112S、N470S、A442V)能够卤化分子更大的底物,4-V 可以催化育亨宾这种吡啶类生物碱的单氯化,且转化水平足以进行制备性规模的卤化^[107]。Shepherd 等^[98]利用结构导向的突变扩展了色氨酸卤化酶 PrnA 和 PyrH 的生物催化范围,使得这些酶能够卤化一系列新的芳香族底物,包括常用的染料、香料、药物工业的中间体邻氨基苯甲酸。

“底物漫步”策略也可以有效扩展卤化酶的可接受底物范围。Lewis 团队^[108]利用液相色谱-质谱联用技术检测了色氨酸卤化酶 RebH、Thal、工程化 RebH 突变体(0K、4V、6TL 和 10S)对 93 种化合物的反应活性,结果表明 RebH 能够卤化其中 67%的化合物,包括胺、醇、酯、酰胺、磺胺、腈、硫醚、吡啶、吡咯、喹诺酮和唑类,Thal 和 6TL 也可以卤化 40%左右的化合物,10S 和 0K 转化率超过 1%的化合物只有 23%–24%,4V 具有最广谱的底物范围,这些卤化过程大多数具有高度的区域选择性。

Sana 等^[109]利用改造的卤化酶在体外卤化了一系列肽和蛋白质的 C 端,他们筛选得到了

最优底物 HaloTryp 标签, 即包含(G/S) GW 基序的肽, 结合理性设计的 PyrH-Q160N 突变体, HaloTryp 标签促进了几种模型蛋白的位点特异性卤化(转化率 40%–90%)。将卤化酶的底物范围扩展到肽和蛋白质, 将有助于高度调控合成后或者表达后的卤代, 可能会引入新的物理化学性质, 在改变蛋白/多肽类药物的细胞透性方面具有很好的应用价值。

C2'-卤化是增强核苷类似物类药物活性的重要修饰, AdaV 可以催化 dAMP 的 C2'-卤化, dGMP 卤化酶 VaNTH 和 CtNTH 的发现扩大了核苷卤化酶的催化范围。次级配位层残基通过调节结合模式赋予核苷卤化酶核苷酸特异性, Ni 等^[110]通过突变改变了一系列核苷卤化酶的底物特异性。

2.5 增强卤化酶的对映选择性

卤化酶对映选择性的研究和改造有利于在工业合成中引入相应的对映选择性转化和级联反应。RebH 突变体 4-V 对带有大的叔丁基的 4,4'-亚甲基二苯胺表现出高对映选择性, 但对其他底物(包括甲基和丙基取代的亚甲基二苯胺)的对映选择性都较低, Lewis 团队^[111]基于亚甲基二苯胺在酶活性位点结合的对映构建了 1 组 4-V 的突变体, 改善了较小取代基底物的对映选择性, 这显示出氨基酸结合口袋突变对去对称化活性和对映选择性的影响。在制备规模利用 RebH 突变体 3-T (W455R, N467S, S469G, S467T)对带有多种取代基的 3-(3-氨基苯基)-2-喹唑啉-4(3H)-酮进行卤化, 产率范围为 17%–92%, 并且几乎所有产物都表现出高对映选择性^[112]。这种顺式选择性卤化的高对映选择性表明, 经工程改造的 FDHs 可以容纳卤化位点周边非典型的底物空间取向。

与其他 FDHs 很不同的是, AetF 还可以利用 NaI 实现催化剂控制的 C–H 碘化和对映选择性环碘醚化, 以良好的产率和高对映选择性得到四氢呋喃, 因其同时具有卤化酶和还原酶活性, AetF 在简化对映选择性生物催化卤化方面

具有很高的应用潜力, 其对缺乏电子底物的活性使得苯乙烯底物的卤环化也成为可能^[113]。

2.6 其他开发卤化酶的尝试

基于不同的机制, 可以改造其他类型的酶使之具有卤化活性。Jiang 等^[114]对海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 中的 SAM 依赖型羟甲基腺苷转移酶 (SAM-dependent hydroxymethyladenosyltransferase, HATase) 进行突变 (W8L/V71T) 将其转化为卤素酶, M1、M2 和 M4 突变体分别催化氯化、溴化和碘化, M4 突变体保留了 HATase 的热稳定性, 可以在 80 °C 催化碘化反应, QM/MM 计算表明这些突变体中卤离子的定位使其可以对 SAM 的 C5 位进行亲核攻击, 从而赋予了卤代能力。此外, 将 Fe/α-KG 依赖型羟化酶的非极性残基 V225 突变为天冬酰胺可以倍增其卤化活性, 但 D144G/V225N 突变体的活性和选择性都很低, 使用非定向的基于文库的方法结合荧光筛选引入其他 12 个突变后, Neugebauer 等^[115]获得了自由基卤化酶 Chi-14, 其活性与野生型卤化酶相当, 并在卤化选择性上有所提高。

很有意思的是, 将卤化酶整合到其他生物合成途径可以增加所得产物的多样性与产量。最早的报道是将编码不同区域选择性的色氨酸卤化酶的基因与编码蝴蝶霉素和星形孢菌素生物合成的基因簇进行组合重构, 得到一系列不同区域异构的氯代的吡啶唑化合物^[116]。由东方拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*) 产生的糖肽类抗生素氯东方菌素 A (A82846B) 是半合成抗生素奥利万星的前体, 但是在 A82846B 的工业生产过程中会产生 2 种主要杂质 A82846A (63.6%) 和 A82846C (12%), 它们的结构与 A82846B (24.4%) 相似, Wang 等^[117]将 A82846B 和万古霉素合成途径中编码卤化酶的基因 *chal* 整合到 *A. orientalis* SIPI18099 中, 结果表明增加 *chal* 基因的拷贝数可以使 A82846B 的比例得到提高, 并且在扩大的工业生产规模中, 含有 3 个 *chal* 基因拷贝的重组菌株 *A. orientalis*

chal-3 中 A82846A 和 C 的比例分别降低到 11.6%和 0.2%，A82846B 的产量(2.2 g/L)比原先的 780 mg/L 提高了 2.8 倍。

3 卤化酶的应用

聚焦于催化机制及工程改造的卤化酶研究为卤代有机化合物的绿色合成提供了丰富的酶工具。近年来手性环氧氯丙烷(epichlorohydrin, ECH)合成工艺的优化体现了酶促生物合成替代传统有机化学合成的可行性。ECH 在药物化学领域有着广泛的应用,但其化学合成工艺中高温及强酸的使用会造成环境不友好问题,且手性拆分过程的理论产率小于 50%^[118-119]。2010 年 Wu 等^[120]利用 CPO 催化 3-氯丙烯发生氧化反应合成(R)-ECH,首次实现了 ECH 的酶促生物合成,产率为 67.3%, *e.e.*值高达 97.5%。将卤化酶整合到 2 组分或 3 组分生物或化学催化系统中可以实现药物的一锅法克级规模合成,为工业应用提供了可行方案。郑裕国团队^[121]设计了依次利用卤化酶、卤醇脱卤酶、环氧化物水解酶实现甘油氯化、1,3-二氯-2-丙醇脱卤环化、环氧氯丙烷水解拆分,最终合成光学纯 R 或 S 型 ECH 的 3 步生物催化法,致力于解决原有化学合成中强酸高温氯化、贵金属催化剂拆分等过程造成的“三废”排放及能耗问题,但目前只实现了利用卤醇脱卤酶 HheC 突变体 P175S/W249P 与环氧化物水解酶 AmEH 突变体 W182F/S207V/N240D 双酶串联催化合成(S)-环氧氯丙烷技术,因为国内外目前尚无甘油的生物催化氯化的报道,该课题组为此建立了大型卤化酶库以进行甘油氯化酶的鉴定表征及改造研究。

将酶促卤化与交叉偶联反应相结合也是有机化合物骨架搭建的有力方案。钯催化的交叉偶联反应在温和条件下与广谱的有机卤化物和亲核试剂形成碳-碳和碳-杂原子键,是制药工业中最常用的反应之一,通常使用混合的有机/水相碱溶剂^[122-123]。为了实现酶促卤化与合成多样

化有效的结合,需要探索水相的反应系统。Crowe 等^[124]开发了一系列水相条件,使得游离的色氨酸、肽和天然产物能够进行铃木反应、赫克反应、菌头偶合反应及布赫瓦尔德-哈特维希反应。Latham 等^[125]将 FDH 催化区域选择性碳-氢键活化与钯催化的铃木-宫浦交叉偶联反应相结合,实现了多个芳香骨架(苯甲酰胺、异喹啉和吲哚)的区域选择性芳基化(在此之前这些反应无法单独使用化学催化或生物催化方法实现),该研究使用 CLEAs 进一步提高了酶的催化效率,并采用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)膜隔开 CLEA 固定化的 PyrH、RebH、RadH、SttH 与钯催化剂,实现了生物催化剂的有效循环利用,提高了整体产率,并有效降低了所需钯负载量。与之类似,Craven 等^[126]将 FDH 催化的卤化反应与钯催化的氰化反应结合,使用无毒的氰化钾作为氰化源,通过一锅法催化过程将腈基添加到芳基骨架的特定位置,卤化反应的转化率达到 93%,氰化反应的转化率大于 99%,后续与腈水合酶进行级联反应,区域选择性地以 80%的产率(1.98 g)生成酰胺。因此,采用 FDH-氰化-腈水合酶级联策略可以实现吲哚以至于更复杂的药物骨架克级规模的酰胺化合成。

代谢工程结合共培养方法可以实现结构多样化的卤代色氨酸衍生物的从头高效合成。通过使用人工烟酰胺辅助因子,或构建葡萄糖脱氢酶、黄素还原酶和 FDH 三酶融合体系,可以解决大肠杆菌天然黄素还原酶表达不足的问题,帮助辅因子再平衡,从而进行连续化卤化^[127-128]。Reed 等^[129]从去除降解机制、去除反馈调节、生物合成途径酶的过表达等思路出发改造得到菌株 sKR-Trp4,该菌株在含有低浓度葡萄糖的最小规模培养基中培养 24 h 后,能够产生超过 200 mg/L 的色氨酸。热稳定性较好的分别表现 5、6、7 位卤化活性的 XsHal、Thal 和 RebH 被转化到 *E. coli* sKR-Trp4 菌株,所得到的卤代色氨酸的产量高达 0.3–0.7 g/L,即使

与生长培养基中的残留氯化物存在竞争, 这些菌株对溴色氨酸的选择性也高达 96%; 研究人员还发现 RgnTDC、iaaM、TnaA、KynA 和 McbB 等 5 种酶能够将卤代色氨酸转化为相应的下游产物, RgnTDC 和 iaaM 能够转化所有位置的卤代色氨酸, 其余几种酶的多功能性稍差, 利用这些下游酶对不同卤化底物的混杂性可以创造不同的卤化色氨酸衍生物; 由于卤代色氨酸分子合成后会分泌出胞外, 该课题组利用共培养方法将卤化色氨酸过量生产菌株与下游转化菌株结合, 实现了从头合成超过 26 种不同的卤代化合物, 其中有 6 种全新的化合物, 还有 15 种化合物首次得到合成。

此外, 卤化酶的催化活性值得深入挖掘, 具有很高的应用潜力。事实上, 除了碳-卤素(C-X)键, VHPOs 还可以催化氮-卤素(N-X)键的形成, Sharma 等^[130]发现 VHPO 可以区域选择性地卤化一系列取代的苯甲脒盐酸盐产生相应的 N'-卤代苯甲脒亚胺, 反应能够达到克级规模, 且不影响产率(91%)的同时催化剂负载量可以减少到 0.002 5 mol%。其中, 小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)来源的 VBPO 催化盐酸苄脒的 N-溴化反应, 该反应还可以应用于非自然生物催化氮-氮键的形成, 相应的 N-酰基苯甲脒高产率和化学选择性地生成对应的 1,2,4-恶二唑, 这种方法的合成潜力在杜氏肌营养不良症药物阿塔鲁伦的化学酶合成中得到了进一步的证明。

4 展望

自 1959 年首次发现卤化酶以来, 随着生物合成途径的解析、宏基因组学的发展与酶工程技术的创新, 卤化酶在规模合成中的应用显示出不凡的前景, 它可以减少有毒试剂及副产物的排放和金属催化剂的使用, 包括 FDHs 在内的大量卤化酶可以对多种类型的底物进行区域选择性卤化, 少数酶还可以催化对映选择性卤环化反应^[131], 卤代有机化合物的绿色生物合成

成为可能。近些年开发的与天然产物和生物分子相容的水相交叉偶联反应系统促进了一系列相对高效、环保的化学酶法合成策略^[126]。Younes 等^[63]对 CiVCPO 参与的化学酶法催化卤代内酯化及卤代醚化与已建立的化学合成方法进行半定量比较发现, 产量相当时, 在催化剂用量、溶剂的环境友好性、副产物毒性等方面, 化学酶合成都要优于纯化学合成。此外, 将卤化酶整合到生物合成途径或化学酶级联反应中还可以产生结构及活性多样化的化合物组合。然而, 化学酶合成仍有一些不足与受限之处: 酶的底物范围仍然较窄; 卤素利用具有偏好性, 能催化碘化和氟化的酶较为稀有; 目前没有合成方法能够直接对不活泼 C-H 键进行多卤化, 现有的多卤化方法通常作用于 π 键或活化的 C-H 键, 很少能够实现对卤化程度的化学选择性控制; 在制药工程和农业化学领域, 许多底物在水中的溶解度很低。为了适应这些底物, 不得不进化出耐受有机溶剂的卤化酶。

许多研究集中于通过理性或随机突变改造卤化酶。通过生物化学、晶体学等方法对卤化酶分子特征、空间结构和氨基酸残基功能进行表征可以指导其理性设计, 构建人工随机突变体文库并进行多轮筛选的定向进化技术对于获得稳定性更好、选择性和作用范围更广泛的卤化酶突变体也至关重要。同时, 机器学习方法能够给出可靠的预测, 有效地缩短筛选进程。2022 年报道的分子动力学/易于进攻构象(molecular dynamics/near attack conformations, MD/NACs)模型可以预测卤化酶突变体对不同底物的位点选择性^[132]。Büchler 等^[133]利用算法辅助的酶进化方法改造出可以卤化非天然底物索拉芬 A 的 WelO5 (与 WelO5 有 95% 的序列同源性, 仅 15 个氨基酸不同)突变体。反应条件的变化也可以改变酶的催化性质, Wilson 等^[134]尝试通过改变 α -KG 辅因子用量和酶的负载量实现 SyrB2 对非天然底物 α -氨基丁酸单/双/三氯化比例的调控, 提出了选择性多卤化的可行

方案。人工卤化酶的研究有力地扩大了非天然反应的催化范围,但还需要解决区域选择性问题^[135]。采用宏基因组学的手段进行基因组挖掘以发现新型卤化酶也在不断进行, Lewis 团队^[136]开发的序列相似性网络(sequence-similarity networks, SSNs)为卤化酶基因组挖掘工作提供了指导,通过 SSNs 选择序列,随后使用探针底物进行高通量活性检测与质谱筛选的策略可以有力地加速卤化酶的开发。针对新型卤化酶进行卤素-酶-底物复合物结构研究、MD 模拟、QM/MM 计算和光谱学研究^[137]可能会揭示更多关键机制,并最终帮助进一步改进卤化酶的功能以满足实际应用。

作者贡献声明

牛欣越:初稿写作、稿件润色修改;张郑宇:监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BROWN S, O'CONNOR SE. Halogenase engineering for the generation of new natural product analogues[J]. *Chembiochem*, 2015, 16(15): 2129-2135.
- [2] JESCHKE P. The unique role of halogen substituents in the design of modern agrochemicals[J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(1): 10-27.
- [3] LATHAM J, BRANDENBURGER E, SHEPHERD SA, MENON BRK, MICKLEFIELD J. Development of halogenase enzymes for use in synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 232-269.
- [4] JESCHKE P. Latest generation of halogen-containing pesticides[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(6): 1053-1066.
- [5] CLAUS JS, FINKELSTEIN BL. Pyrimidine Carboxylic acids, Aminocyclopyrachlor, in *Modern Crop Protection Compounds*[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- [6] USAMI Y, MIZOBUCHI Y, IJIN M, YAMADA T, MORITA M, MIZUKI K, YONEYAMA H, HARUSAWA S. Synthesis of 6-halo-substituted pericosine A and an evaluation of their antitumor and antiglycosidase activities[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(7): 438.
- [7] SERNA-ARBELÁEZ MS, GARCÍA-CÁRCAMO V, RINCÓN-TABARES DS, GUERRA D, LOAIZA-CANO V, MARTINEZ-GUTIERREZ M, PEREAÑEZ JA, PASTRANA-RESTREPO M, GALEANO E, ZAPATA W. *In vitro* and *in silico* antiviral activity of di-halogenated compounds derived from L-tyrosine against human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(10): 8173-8200.
- [8] HURTOVÁ M, KÁŇOVÁ K, DOBIASOVÁ S, HOLASOVÁ K, ČÁKOVÁ D, HOANG L, BIEDERMANN D, KUZMA M, CVAČKA J, KŘEN V, VIKTOROVÁ J, VALENTOVÁ K. Selectively halogenated flavonolignans-preparation and antibacterial activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15121.
- [9] WU YJ, HUANG TY, HUANG CY, LIN CC, WANG WL, HUANG HC, LIU SY V, CHAO CH, SHEU JH. Anti-inflammatory halogenated monoterpenes from the red *Alga Portieria hornemannii*[J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(9): 493.
- [10] WONG KW, TEH SS, LAW KP, ISMAIL IS, SATO K, MASE N, MAH SH. Synthesis of benzylated amine-substituted xanthone derivatives and their antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. *Archiv Der Pharmazie*, 2023, 356(1): e2200418.
- [11] MATHUR V, ALAM O, SIDDIQUI N, JHA M, MANAITHIYA A, BAWA S, SHARMA N, ALSHEHRI S, ALAM P, SHAKEEL F. Insight into structure activity relationship of DPP-4 inhibitors for development of antidiabetic agents[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5860.
- [12] LI L, YANG CF, QIAO XH, YANG XX, ZHANG JY, CUI MH, LI ZW, TIAN AR, LI XH, ZOU XC, LI YR, HE WH, CHEN Y, HE XH. Regulation of exercise ability and glycolipid metabolism by synthetic SR9009 analogues as new REV-ERB- α agonists[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2024, 111: 117845.
- [13] 夏训明. 抗抑郁症药 Lexapro (escitalopram) 专利到期首个仿制药获准上市[J]. *广东药学院学报*, 2012, 28(2): 116.
- [14] XIA XM. The patent of antidepressant Lexapro (escitalopram) expired, and the first generic drug was approved for marketing[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2012, 28(2): 116 (in Chinese).
- [15] 鹿冬梅, 杨沿浪, 王金宝, 童昌军, 高潮清, 周健美. 西那卡塞联合骨化三醇对 MHD 尿毒症继发甲状旁腺功能亢进患者矿物质及骨代谢的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(8): 965-970.
- [16] LU DM, YANG YL, WANG JB, TONG CJ, GAO CQ, ZHOU JM. Effect of cinacalcet combined with calcitriol on the minerals and bone metabolism of secondary hyperparathyroidism in patients with MHD[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2019, 44(8): 965-970 (in Chinese).
- [17] deLa TORRE BG, ALBERICIO F. The pharmaceutical industry in 2023: an analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules[J]. *Molecules*, 2024, 29(3): 585.
- [18] McCOY DE, FEO T, HARVEY TA, PRUM RO. Structural absorption by barbule microstructures of super black bird of paradise feathers[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1.
- [19] TEPPER R, BODE DS, GEITNER R, JÄGER DM, GÖRLS DH, VITZ DJ, DIETZEK PB, SCHMITT PM, POPP PJ, HAGER DMD, SCHUBERT PUS. Polymeric

- halogen-bond-based donor systems showing self-healing behavior in thin films[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 4047-4051.
- [18] VÄLIMÄKI S, GUSTAVSSON L, BEYEH NK, LINKO V, KOSTIAINEN MA. Halogen-bond-mediated self-assembly of polymer-resorcinarene complexes[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2019, 40(14): e1900158.
- [19] NOWAK-KRÓL A, SHOYAMA K, STOLTE M, WÜRTNER F. Naphthalene and perylene diimides-better alternatives to fullerenes for organic electronics?[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(98): 13763-13772.
- [20] 武师宇, 汪金秀, 李师翁, 刘光琇, 张威. 黄素依赖型卤化酶及其应用研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2938-2953.
WU SY, WANG JX, LI SW, LIU GX, ZHANG W. Flavin-dependent halogenases and their applications[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2938-2953 (in Chinese).
- [21] MA HS, YU TY, CHI LX, HUANG C, LI XW, ZHANG R, DENG C. Recent advances in theoretical studies on transition-metal-catalyzed regioselective C-H functionalization of indoles[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2022, 28(9): 267.
- [22] BARBOSA F, PINTO E, KIJJOA A, PINTO M, SOUSA E. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(1): 106005.
- [23] LUDEWIG H, MOLYNEUX S, FERRINHO S, GUO K, LYNCH R, GKOTSI DS, GOSS RJ. Halogenases: structures and functions[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 65: 51-60.
- [24] MURRAY LAM, McKINNIE SMK, PEPPER HP, ERNI R, MILES ZD, CRUICKSHANK MC, LÓPEZ-PÉREZ B, MOORE BS, GEORGE JH. Total synthesis establishes the biosynthetic pathway to the naphterpin and marinone natural products[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(34): 11009-11014.
- [25] GKOTSI DS, DHALIWAL J, McLACHLAN MM, MULHOLAND KR, GOSS RJ. Halogenases: powerful tools for biocatalysis (mechanisms applications and scope)[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 43: 119-126.
- [26] DONG CJ, FLECK S, UNVERSUCHT S, HAUPT C, van PÉE KH, NAISMITH JH. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination[J]. *Science*, 2005, 309(5744): 2216-2219.
- [27] PANG AH, GARNEAU-TSODIKOVA S, TSODIKOV OV. Crystal structure of halogenase PltA from the pyoluteorin biosynthetic pathway[J]. *Journal of Structural Biology*, 2015, 192(3): 349-357.
- [28] MORI S, PANG AH, THAMBAN CHANDRIKA N, GARNEAU-TSODIKOVA S, TSODIKOV OV. Unusual substrate and halide versatility of phenolic halogenase PltM[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1255.
- [29] PODZELINSKA K, LATIMER R, BHATTACHARYA A, VINING LC, ZECHEL DL, JIA ZC. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(1): 316-331.
- [30] PAYNE JT, ANDORFER MC, LEWIS JC. Engineering flavin-dependent halogenases[J]. *Methods in Enzymology*, 2016, 575: 93-126.
- [31] 王汇滨, 车昌丽, 游松. Fe/α-酮戊二酸依赖型卤化酶在绿色卤化反应中的研究进展[J]. *合成生物学*, 2022, 3(3): 545-566.
WANG HB, CHE CL, YOU S. Recent advances of enzymatic synthesis of organohalogenes catalyzed by Fe/αKG-dependent halogenases[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 3(3): 545-566 (in Chinese).
- [32] SOOKLAL SA, de KONING C, BRADY D, RUMBOLD K. Identification and characterisation of a fluorinase from *Actinopolyspora mزابensis*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 166: 105508.
- [33] HAGER LP, MORRIS DR, BROWN FS, EBERWEIN H. Chloroperoxidase. II. utilization of halogen anions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(8): 1769-1777.
- [34] SUNDARAMOORTHY M, TERNER J, POULOS TL. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase: cytochrome P450 functional hybrid[J]. *Structure*, 1995, 3(12): 1367-1377.
- [35] PFANZAGL V, GRUBER-GRÜNWALD C, LEITGEB U, FURTMÜLLER PG, OBINGER C. Posttranslational modification and heme cavity architecture of human eosinophil peroxidase—insights from first crystal structure and biochemical characterization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(12): 105402.
- [36] RAMOS DR, VICTORIA GARCÍA M, CANLE L M, ARTURO SANTABALLA J, FURTMÜLLER PG, OBINGER C. Myeloperoxidase-catalyzed taurine chlorination: initial versus equilibrium rate[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 466(2): 221-233.
- [37] VALADEZ-COSMES P, RAFTOPOULOU S, MIHALIC ZN, MARSCHE G, KARGL J. Myeloperoxidase: growing importance in cancer pathogenesis and potential drug target[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022, 236: 108052.
- [38] MAGACZ M, ALATORRE-SANTAMARÍA S, KĘDZIORA K, KLASA K, MAMICA P, PEPASIŃSKA W, LEBIECKA M, KOŚCIELNIAK D, PAMUŁA E, KRZYŚCIAK W. Modified lactoperoxidase system as a promising anticaries agent: *in vitro* studies on *Streptococcus mutans* biofilms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12136.
- [39] ZHANG D, YANG XP, WANG TL, JI XM, WU XJ. Advances in organic fluorescent probes for bromide ions, hypobromous acid and related eosinophil peroxidase—a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1244: 340626.
- [40] SINGH E, GUPTA A, SINGH P, JAIN M, MUTHUKUMARAN J, SINGH RP, SINGH AK. Exploring mammalian heme peroxidases: a comprehensive review on the structure and function of myeloperoxidase, lactoperoxidase, eosinophil peroxidase, thyroid peroxidase and peroxidasin[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2024, 761: 110155.

- [41] CHENG GJ, SHI RZ. Mammalian peroxidase (PXD): from physiology to pathology[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2022, 182: 100-107.
- [42] ZENG J, FENNA RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 226(1): 185-207.
- [43] SINGH AK, SINGH N, SHARMA S, SINGH SB, KAUR P, BHUSHAN A, SRINIVASAN A, SINGH TP. Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 376(4): 1060-1075.
- [44] BAKER S, MIGUEL RN, THOMAS D, POWELL M, FURMANIAK J, SMITH BR. Cryo-electron microscopy structures of human thyroid peroxidase (TPO) in complex with TPO antibodies[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2023, 70(3): e220149.
- [45] WEYAND M, HECHT HJ, VILTER H, SCHOMBURG D. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a vanadium-dependent peroxidase from *Ascomphyllum nodosum*[J]. Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography, 1996, 52(Pt 4): 864-865.
- [46] WISCHANG D, RADLOW M, SCHULZ H, VILTER H, VIEHWEGER L, ALTMAYER MO, KEGLER C, HERRMANN J, MÜLLER R, GAILLARD F, DELAGE L, LEBLANC C, HARTUNG J. Molecular cloning, structure, and reactivity of the second bromoperoxidase from *Ascomphyllum nodosum*[J]. Bioorganic Chemistry, 2012, 44: 25-34.
- [47] LEBLANC C, VILTER H, FOURNIER JB, DELAGE L, POTIN P, REBUFFET E, MICHEL G, SOLARI PL, FEITERS MC, CZJZEK M. Vanadium haloperoxidases: from the discovery 30 years ago to X-ray crystallographic and V K-edge absorption spectroscopic studies[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2015, 301: 134-146.
- [48] BERNHARDT P, OKINO T, WINTER JM, MIYANAGA A, MOORE BS. A stereoselective vanadium-dependent chloroperoxidase in bacterial antibiotic biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(12): 4268-4270.
- [49] CHEN PYT, ADAK S, CHEKAN JR, LISCOMBE DK, MIYANAGA A, BERNHARDT P, DIETHELM S, FIELDING EN, GEORGE JH, MILES ZD, MURRAY LAM, STEELE TS, WINTER JM, NOEL JP, MOORE BS. Structural basis of stereospecific vanadium-dependent haloperoxidase family enzymes in napyradiomycin biosynthesis[J]. Biochemistry, 2022, 61(17): 1844-1852.
- [50] GÉRARD EF, MOKKAWES T, JOHANNISSEN LO, WARWICKER J, SPIESS RR, BLANFORD CF, HAY S, HEYES DJ, de VISSER SP. How is substrate halogenation triggered by the vanadium haloperoxidase from *Curvularia inaequalis*?[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(12): 8247-8261.
- [51] MUBARAK MQE, GÉRARD EF, BLANFORD CF, HAY S, de VISSER SP. How do vanadium chloroperoxidases generate hypochlorite from hydrogen peroxide and chloride? a computational study[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(23): 14067-14079.
- [52] KIRNER S, HAMMER PE, HILL DS, ALTMANN A, FISCHER I, WEISLO LJ, LANAHAHAN M, VAN PÉE KH, LIGON JM. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of bacteriology, 1998, 180(7):1939-1943.
- [53] JIANG YH, SNODGRASS HM, ZUBI YS, ROOF CV, GUAN YF, MONDAL D, HONEYCUTT NH, LEE JW, LEWIS RD, MARTINEZ CA, LEWIS JC. The single-component flavin reductase/flavin-dependent halogenase AetF is a versatile catalyst for selective bromination and iodination of arenes and olefins[J]. Angewandte Chemie (International Edition), 2022, 61(51): e202214610.
- [54] BITTO E, HUANG Y, BINGMAN CA, SINGH S, THORSON JS, JR PHILLIPS GN. The structure of flavin-dependent tryptophan 7-halogenase RebH[J]. Proteins, 2008, 70(1): 289-293.
- [55] YE H, BLASIAK LC, KOGLIN A, DRENNAN CL, WALSH CT. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases[J]. Biochemistry, 2007, 46(5): 1284-1292.
- [56] BARKER RD, YU YQ, de MARIA L, JOHANNISSEN LO, SCRUTTON NS. Mechanism of action of flavin-dependent halogenases[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(24): 15352-15360.
- [57] BLASIAK LC, DRENNAN CL. Structural perspective on enzymatic halogenation[J]. Accounts of Chemical Research, 2009, 42(1): 147-155.
- [58] MORITZER AC, MINGES H, PRIOR T, FRESE M, SEWALD N, NIEMANN HH. Structure-based switch of regioselectivity in the flavin-dependent tryptophan 6-halogenase Thal[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(7): 2529-2542.
- [59] LINGKON K, BELLIZZI JJ 3rd. Structure and activity of the thermophilic tryptophan-6 halogenase BorH[J]. ChemBiochem, 2020, 21(8): 1121-1128.
- [60] ZHU XF, de LAURENTIS W, LEANG K, HERRMANN J, IHLEFELD K, van PÉE KH, NAISMITH JH. Structural insights into regioselectivity in the enzymatic chlorination of tryptophan[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 391(1): 74-85.
- [61] AGARWAL V, EL GAMAL AA, YAMANAKA K, POTH D, KERSTEN RD, SCHORN M, ALLEN EE, MOORE BS. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(8): 640-647.
- [62] LIU MT, OHASHI M, HUNG YS, SCHERLACH K, WATANABE K, HERTWECK C, TANG Y. AoiQ catalyzes geminal dichlorination of 1,3-diketone natural products[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(19): 7267-7271.
- [63] YOUNES SHH, TIEVES F, LAN DM, WANG YH, SÜSS P, BRUNDIEK H, WEVER R, HOLLMANN F. Chemoenzymatic halocyclization of γ,δ -unsaturated carboxylic acids and alcohols[J]. ChemSusChem, 2020, 13(1): 97-101.
- [64] DAI LH, LI H, DAI S, ZHANG QS, ZHENG HB, HU YM, GUO RT, CHEN CC. Structural and functional insights into the self-sufficient flavin-dependent halogenase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 260: 129312.
- [65] SITACHITTA N, ROSSI J, ROBERTS MA, GERWICK WH, FLETCHER MD, WILLIS CL. Biosynthesis of the marine cyanobacterial metabolite barbamide. 1. origin of the trichloromethyl group[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998,

- 120(28): 7131-7132.
- [66] VAILLANCOURT FH, YIN J, WALSH CT. SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme Fe^{II} alpha-ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(29): 10111-10116.
- [67] MITCHELL AJ, ZHU Q, MAGGIOLO AO, ANANTH NR, HILLWIG ML, LIU XY, BOAL AK. Structural basis for halogenation by iron- and 2-oxo-glutarate-dependent enzyme WelO5[J]. Nature Chemical Biology, 2016, 12(8): 636-640.
- [68] NEUGEBAUER ME, SUMIDA KH, PELTON JG, McMURRY JL, MARCHAND JA, CHANG MCY. A family of radical halogenases for the engineering of amino-acid-based products[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(10): 1009-1016.
- [69] BLASIAK LC, VAILLANCOURT FH, WALSH CT, DRENNAN CL. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis[J]. Nature, 2006, 440(7082): 368-371.
- [70] WONG C, FUJIMORI DG, WALSH CT, DRENNAN CL. Structural analysis of an open active site conformation of nonheme iron halogenase CytC3[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(13): 4872-4879.
- [71] GALONIĆ DP, VAILLANCOURT FH, WALSH CT. Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(12): 3900-3901.
- [72] FLATT PM, O'CONNELL SJ, McPHAIL KL, ZELLER G, WILLIS CL, SHERMAN DH, GERWICK WH. Characterization of the initial enzymatic steps of barbamide biosynthesis[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(6): 938-944.
- [73] VAILLANCOURT FH, YE H, VOSBURG DA, O'CONNOR SE, WALSH CT. Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis[J]. Nature, 2005, 436(7054): 1191-1194.
- [74] JIANG W, HEEMSTRA JR Jr, FORSETH RR, NEUMANN CS, MANAVIAZAR S, SCHROEDER FC, HALE KJ, WALSH CT. Biosynthetic chlorination of the piperazate residue in kutzneride biosynthesis by KthP[J]. Biochemistry, 2011, 50(27): 6063-6072.
- [75] PRATTER SM, IVKOVIC J, BIRNER-GRUENBERGER R, BREINBAUER R, ZANGGER K, STRAGANZ GD. More than just a halogenase: modification of fatty acyl moieties by a trifunctional metal enzyme[J]. Chembiochem, 2014, 15(4): 567-574.
- [76] HILLWIG ML, LIU XY. A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(11): 921-923.
- [77] HILLWIG ML, ZHU Q, ITTIAMORNKUL K, LIU XY. Discovery of a promiscuous non-heme iron halogenase in ambiguine alkaloid biogenesis: implication for an evolvable enzyme family for late-stage halogenation of aliphatic carbons in small molecules[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(19): 5780-5784.
- [78] KIM CY, MITCHELL AJ, GLINKERMAN CM, LI FS, PLUSKAL T, WENG JK. The chloroalkaloid (-)-acutumine is biosynthesized via a Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent halogenase in Menispermaceae plants[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1867.
- [79] ZHANG X, WANG ZK, GAO J, LIU WJ. Chlorination versus hydroxylation selectivity mediated by the non-heme iron halogenase WelO5[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2020, 22(16): 8699-8712.
- [80] LI RN, CHEN SL. Mechanism for the halogenation and azidation of lysine catalyzed by non-heme iron BesD enzyme[J]. Chemistry, an Asian Journal, 2022, 17(17): e202200438.
- [81] ZHAO CH, YAN S, LI Q, ZHU HC, ZHONG ZY, YE Y, DENG ZX, ZHANG YH. An Fe²⁺- and α -ketoglutarate-dependent halogenase acts on nucleotide substrates[J]. Angewandte Chemie (International Edition), 2020, 59(24): 9478-9484.
- [82] DONG CJ, HUANG FL, DENG H, SCHAFFRATH C, SPENCER JB, O'HAGAN D, NAISMITH JH. Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme[J]. Nature, 2004, 427(6974): 561-565.
- [83] SANADA M, MIYANO T, IWADARE S, WILLIAMSON JM, ARISON BH, SMITH JL, DOUGLAS AW, LIESCH JM, INAMINE E. Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by the thienamycin producer, *Streptomyces Cattleja*[J]. Journal of Antibiotics, 1986, 39(2): 259-265.
- [84] EUSTÁQUIO AS, POJER F, NOEL JP, MOORE BS. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase[J]. Nature Chemical Biology, 2008, 4(1): 69-74.
- [85] BEER LL, MOORE BS. Biosynthetic convergence of salinosporamides A and B in the marine actinomycete *Salinispora tropica*[J]. Organic Letters, 2007, 9(5): 845-848.
- [86] PEREIRA PRM, de O ARAÚJO J, SILVA JRA, ALVES CN, LAMEIRA J, LIMA AH. Exploring chloride selectivity and halogenase regioselectivity of the SalL enzyme through quantum mechanical/molecular mechanical modeling[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2020, 60(2): 738-746.
- [87] ARAÚJO E, LIMA AH, LAMEIRA J. Catalysis by solvation rather than the desolvation effect: exploring the catalytic efficiency of SAM-dependent chlorinase[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19(32): 21350-21356.
- [88] MIAO Y, YU J, OUYANG ZQ, SUN HH, LI Y. Crystal structure of ClA1, a type of chlorinase from soil bacteria[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 530(1): 42-46.
- [89] PAYNE JT, ANDORFER MC, LEWIS JC. Regioselective arene halogenation using the FAD-dependent halogenase RebH[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2013, 52(20): 5271-5274.
- [90] ZHU QQ, ZHENG YL, ZHANG ZJ, CHEN Y. Enzyme immobilization on covalent organic framework supports[J]. Nature Protocols, 2023, 18(10): 3080-3125.
- [91] LIU ZY, SMITH SR. Cross-linked enzyme aggregate (CLEA) preparation from waste activated sludge[J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 1902.
- [92] ZHU CH, MOU MJ, YANG LL, JIANG ZD, ZHENG MJ, LI ZP, HONG T, NI H, LI QB, YANG YF, ZHU

- YB. Enzymatic hydrolysates of κ -carrageenan by κ -carrageenase-CLEA immobilized on amine-modified ZIF-8 confer hypolipidemic activity in HepG2 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 252: 126401.
- [93] 祁延萍, 朱晋, 张凯, 刘彤, 王雅婕. 定向进化在蛋白质工程中的应用研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1081-1108.
- QI YP, ZHU J, ZHANG K, LIU T, WANG YJ. Recent development of directed evolution in protein engineering[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1081-1108 (in Chinese).
- [94] POOR CB, ANDORFER MC, LEWIS JC. Improving the stability and catalyst lifetime of the halogenase RebH by directed evolution[J]. ChemBioChem, 2014, 15(9): 1286-1289.
- [95] ANDORFER MC, PARK HJ, VERGARA-COLL J, LEWIS JC. Directed evolution of RebH for catalyst-controlled halogenation of indole C-H bonds[J]. Chemical Science, 2016, 7(6): 3720-3729.
- [96] BESSE C, NIEMANN HH, SEWALD N. Increasing the stability of flavin-dependent halogenases by disulfide engineering[J]. ChemBioChem, 2024, 25(1): e202300700.
- [97] LANG A, POLNICK S, NICKE T, WILLIAM P, PATALLO EP, NAISMITH JH, VAN PÉE KH. Changing the regioselectivity of the tryptophan 7-halogenase PrnA by site-directed mutagenesis[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2011, 50(13): 2951-2953.
- [98] SHEPHERD SA, KARTHIKEYAN C, LATHAM J, STRUCK AW, THOMPSON ML, MENON BRK, STYLES MQ, LEVY C, LEYS D, MICKLEFIELD J. Extending the biocatalytic scope of regiocomplementary flavin-dependent halogenase enzymes[J]. Chemical Science, 2015, 6(6): 3454-3460.
- [99] LEE J, KIM J, KIM H, KIM EJ, JEONG HJ, CHOI KY, KIM BG. Characterization of a tryptophan 6-halogenase from *Streptomyces albus* and its regioselectivity determinants[J]. ChemBioChem, 2020, 21(10): 1446-1452.
- [100] GKOTSI DS, LUDEWIG H, SHARMA SV, CONNOLLY JA, DHALIWAL J, WANG YP, UNSWORTH WP, TAYLOR RJK, McLACHLAN MMW, SHANAHAN S, NAISMITH JH, GOSS RJM. A marine viral halogenase that iodates diverse substrates[J]. Nature Chemistry, 2019, 11(12): 1091-1097.
- [101] JIANG YX, YAO MD, NIU HR, WANG WR, HE JL, QIAO B, LI BZ, DONG M, XIAO WH, YUAN YJ. Enzyme engineering renders chlorinase the activity of fluorinase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(2): 1203-1212.
- [102] YU NH, ZHAO HM, WANG WR, DONG M. Enzymatic fluoroethylation by a fluoroethyl selenium analogue of S-adenosylmethionine[J]. ACS Catalysis, 2024, 14(8): 6211-6216.
- [103] LI ML, YUAN YJ, HARRISON W, ZHANG ZY, ZHAO HM. Asymmetric photoenzymatic incorporation of fluorinated motifs into olefins[J]. Science, 2024, 385(6707): 416-421.
- [104] ZHAO Q, CHEN ZH, SOLER J, CHEN XH, RUI JY, JI NT, YU QE, YANG YF, GARCIA-BORRÁS M, HUANG XY. Engineering non-haem iron enzymes for enantioselective C(sp³)-F bond formation via radical fluorine transfer[J]. Nature Synthesis, 2024, 3(8): 958-966.
- [105] KISSMAN EN, NEUGEBAUER ME, SUMIDA KH, SWENSON CV, SAMBOLD NA, MARCHAND JA, MILLAR DC, CHANG MCY. Biocatalytic control of site-selectivity and chain length-selectivity in radical amino acid halogenases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(12): e2214512120.
- [106] SANA B, HO T, KANNAN S, KE D, LI EHY, SEAYAD J, VERMA CS, DUONG HA, GHADDESSY FJ. Engineered RebH halogenase variants demonstrating a specificity switch from tryptophan towards novel indole compounds[J]. ChemBioChem, 2021, 22(18): 2791-2798.
- [107] PAYNE JT, POOR CB, LEWIS JC. Directed evolution of RebH for site-selective halogenation of large biologically active molecules[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(14): 4226-4230.
- [108] ANDORFER MC, GROB JE, HAJDIN CE, CHAEL JR, SIUTI P, LILLY J, TAN KL, LEWIS JC. Understanding flavin-dependent halogenase reactivity via substrate activity profiling[J]. ACS Catalysis, 2017, 7(3): 1897-1904.
- [109] SANA B, KE D, LI EHY, HO T, SEAYAD J, DUONG HA, GHADDESSY FJ. Halogenation of peptides and proteins using engineered tryptophan halogenase enzymes[J]. Biomolecules, 2022, 12(12): 1841.
- [110] NI J, ZHUANG JY, SHI YM, CHIANG YC, CHENG GJ. Discovery and substrate specificity engineering of nucleotide halogenases[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 5254.
- [111] PAYNE JT, BUTKOVICH PH, GU YF, KUNZE KN, PARK HJ, WANG DS, LEWIS JC. Enantioselective desymmetrization of methylenedianilines via enzyme-catalyzed remote halogenation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(2): 546-549.
- [112] SNODGRASS HM, MONDAL D, LEWIS JC. Directed evolution of flavin-dependent halogenases for site- and atroposelective halogenation of 3-aryl-4(3H)-quinazolinones via kinetic or dynamic kinetic resolution[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(36): 16676-16682.
- [113] JIANG YH, LEWIS JC. Asymmetric catalysis by flavin-dependent halogenases[J]. Chirality, 2023, 35(8): 452-460.
- [114] JIANG YX, YAO MD, FENG JQ, NIU HR, QIAO B, LI BZ, WANG BJ, XIAO WH, DONG M, YUAN YJ. Molecular insights into converting hydroxide adenosyltransferase into halogenase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(22): 12685-12695.
- [115] NEUGEBAUER ME, KISSMAN EN, MARCHAND JA, PELTON JG, SAMBOLD NA, MILLAR DC, CHANG MCY. Reaction pathway engineering converts a radical hydroxylase into a halogenase[J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(2): 171-179.
- [116] SALAS JA, MENDEZ C. Indolocarbazole antitumour compounds by combinatorial biosynthesis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(2): 152-160.

- [117] WANG WY, YANG SB, WU YJ, SHEN XF, CHEN SX. Enhancement of A82846B yield and proportion by overexpressing the halogenase gene in *Amycolatopsis orientalis* SIP118099[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(13): 5635-5643.
- [118] FERNÁNDEZ-ROMERO AM, MAESTRELLI F, GARCÍA-GIL S, TALERO E, MURA P, RABASCO AM, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ ML. Preparation, characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity of epichlorohydrin- β -cyclodextrin/curcumin binary systems embedded in a pluronic[®]/hyaluronate hydrogel[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13566.
- [119] MUSTAFA FS, ŞANLI-TÜRK G, GÜRAN M, ODEH F, ALSHAER W, BUQAIN RA, GAZI M. Fabrication of a novel nontoxic trichlorophenol-epichlorohydrin-based compound with high antimicrobial activity and thermal stability[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2020, 55(13): 1469-1474.
- [120] WU JY, LIU C, JIANG YC, HU MC, LI SN, ZHAI QG. Synthesis of chiral epichlorohydrin by chloroperoxidase-catalyzed epoxidation of 3-chloropropene in the presence of an ionic liquid as co-solvent[J]. Catalysis Communications, 2010, 11(8): 727-731.
- [121] 张晓健, 郑裕国. 甘油原料转化生产手性环氧氯丙烷关键酶的开发[J]. 生物产业技术, 2017(6): 65-72.
- [121] ZHANG XJ, ZHENG YG. Research and development on key enzymes for biosynthesis of chiral epichlorohydrin using glycerol[J]. Biotechnology & Business, 2017(6): 65-72 (in Chinese).
- [122] CHEN EFW, LI CJ. Palladium-catalysed Tsuji-Trost-type vinyl epoxide cross-coupling with umpolung hydrazones[J]. Chemical Science, 2024, 15(45): 18943-18951.
- [123] PALIO L, BRU F, RUGGIERO T, BOURDA L, van HECKE K, CAZIN C, NOLAN SP. The role of the stabilizing/leaving group in palladium catalysed cross-coupling reactions[J]. Dalton Transactions, 2024, 53(44): 18013-18020.
- [124] CROWE C, MOLYNEUX S, SHARMA SV, ZHANG Y, GKOTSI DS, CONNARIS H, GOSS RJM. Halogenases: a palette of emerging opportunities for synthetic biology-synthetic chemistry and C-H functionalisation[J]. Chemical Society Reviews, 2021, 50(17): 9443-9481.
- [125] LATHAM J, HENRY JM, SHARIF HH, MENON BRK, SHEPHERD SA, GREANEY MF, MICKLEFIELD J. Integrated catalysis opens new arylation pathways via regiodivergent enzymatic C-H activation[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11873.
- [126] CRAVEN EJ, LATHAM J, SHEPHERD SA, KHAN I, DIAZ-RODRIGUEZ A, GREANEY MF, MICKLEFIELD J. Programmable late-stage C-H bond functionalization enabled by integration of enzymes with chemocatalysis[J]. Nature Catalysis, 2021, 4: 385-394.
- [127] QI SY, TAN ZT, NA Q, ZHANG XW, XU MJ, ZHUANG W, LI M, YING HJ, OUYANG PK, ZHU CJ. Constructing a multienzyme cascade redox-neutral system for the synthesis of halogenated indoles[J]. Chemical Communications, 2022, 58(40): 6016-6019.
- [128] LIU HY, QIAN F, ZHANG HM, GUI Q, WANG YW, WANG P. Tri-enzyme fusion of tryptophan halogenase achieves a concise strategy for coenzyme self-sufficiency and the continuous halogenation of L-tryptophan[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(4): e2300557.
- [129] REED KB, BROOKS SM, WELLS J, BLAKE KJ, ZHAO MY, PLACIDO K, D'OELSCHITZ S, TRIVEDI A, GADHIYAR S, ALPER HS. A modular and synthetic biosynthesis platform for *de novo* production of diverse halogenated tryptophan-derived molecules[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 3188.
- [130] SHARMA M, PATTON ZE, SHOEMAKER CR, BACSA J, BIEGASIEWICZ KF. N-halogenation by vanadium-dependent haloperoxidases enables 1,2,4-oxadiazole synthesis[J]. Angewandte Chemie (International Edition), 2024, 63(50): e202411387.
- [131] LEWIS JC. Identifying and engineering flavin dependent halogenases for selective biocatalysis[J]. Accounts of Chemical Research, 2024, 57(15): 2067-2079.
- [132] ANDORFER MC, EVANS D, YANG S, HE CQ, GIRLICH AM, VERGARA-COLL J, SUKUMAR N, HOUK KN, LEWIS JC. Analysis of laboratory-evolved flavin-dependent halogenases affords a computational model for predicting halogenase site selectivity[J]. Chem Catalysis, 2022, 2(10): 2658-2674.
- [133] BÜCHLER J, MALCA SH, PATSCH D, VOSS M, TURNER NJ, BORNSCHEUER UT, ALLEMANN O, Le CHAPELAIN C, LUMBROSO A, LOISELEUR O, BULLER R. Algorithm-aided engineering of aliphatic halogenase WelO5* for the asymmetric late-stage functionalization of soraphens[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 371.
- [134] WILSON RH, CHATTERJEE S, SMITHWICK ER, DAMODARAN AR, BHAGI-DAMODARAN A. Controllable multi-halogenation of a non-native substrate by SyrB2 iron halogenase[J/OL]. bioRxiv, 2024, <https://doi.org/10.1021/acscatal.4c02816>.
- [135] YU K, ZHANG KL, JAKOB RP, MAIER T, WARD TR. An artificial nickel chlorinase based on the biotin-streptavidin technology[J]. Chemical Communications, 2024, 60(14): 1944-1947.
- [136] FISHER BF, SNODGRASS HM, JONES KA, ANDORFER MC, LEWIS JC. Site-selective C-H halogenation using flavin-dependent halogenases identified via family-wide activity profiling[J]. ACS Central Science, 2019, 5(11): 1844-1856.
- [137] SCHROEDER L, DIEPOLD N, GÄFE S, NIEMANN HH, KOTTKE T. Coupling and regulation mechanisms of the flavin-dependent halogenase PyrH observed by infrared difference spectroscopy[J]. Journal of Biological Chemistry, 2024, 300(4): 107210.