

• 工业生物技术 •

一种来源于红螺菌科细菌新型卤醇脱卤酶的克隆表达及其酶学性质鉴定

徐纹静, 陈志, 陈磊, 林金萍, 魏东芝

华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237

徐纹静, 陈志, 陈磊, 等. 一种来源于红螺菌科细菌新型卤醇脱卤酶的克隆表达及其酶学性质鉴定. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1298-1311.

Xu WJ, Chen Z, Chen L, et al. Expression and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Rhodospirillaceae* bacterium. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1298-1311.

摘要: 作为一类多功能生物催化剂, 卤醇脱卤酶在手性 β -取代醇和环氧化合物合成应用方面备受关注。目前催化功能较为清楚的卤醇脱卤酶不足 40 种, 且绝大部分催化性能并不能满足科学研究和实际应用的要求, 因此挖掘并鉴定更多的卤醇脱卤酶具有重要意义。本文克隆表达了来源于红螺菌科细菌 *Rhodospirillaceae* bacterium 中一个假定卤醇脱卤酶 (HHDH-Ra) 并对其催化特性以及酶学性质进行研究。将 HHDH-Ra 基因克隆到表达宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 结果显示目的蛋白为可溶性表达。底物特异性研究显示 HHDH-Ra 对 1,3-二氯-2-丙醇 (1,3-DCP) 和 4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (CHBE) 具有良好的特异性。以 1,3-DCP 为反应底物获得 HHDH-Ra 的最适 pH 和最适温度分别为 8.0 和 30 °C。pH 稳定性结果显示 HHDH-Ra 在 pH 6.0–8.0 具有较好的稳定性且经过 100 h 处理以后仍能保持 70% 左右的酶活。温度稳定性结果显示 HHDH-Ra 在 30 °C、40 °C 条件下的半衰期为 60 h, 且当温度提高到 50 °C 时, 该酶的半衰期仍有 20 h, 远高于已报道的酶。因此, 来源于 *Rhodospirillaceae* bacterium 新型卤醇脱卤酶具有较好的温度、pH 稳定性以及催化活性, 在合成关键化学、医药中间体中具有一定的应用潜力。

关键词: 卤醇脱卤酶, β -取代醇, 1,3-二氯-2-丙醇, (S/R)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯

Expression and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Rhodospirillaceae* bacterium

Wenjing Xu, Zhi Chen, Lei Chen, Jinping Lin, and Dongzhi Wei

School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: As a class of multifunctional biocatalysts, halohydrin dehalogenases are of great interest for the synthesis of chiral β -substituted alcohols and epoxides. There are less than 40 halohydrin dehalogenases with relatively clear catalytic functions, and most of them do not meet the requirements of scientific research and practical applications. Therefore, it is of great

Received: November 9, 2020; **Accepted:** February 19, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Shanghai, China (No. 19ZR1412700).

Corresponding author: Jinping Lin. E-mail: Jinping_1123@163.com

上海市自然科学基金 (No. 19ZR1412700) 资助。

significance to excavate and identify more halohydrin dehalogenases. In the present study, a putative halohydrin dehalogenase (HHDH-Ra) from Rhodospirillaceae bacterium was expressed and its enzymatic properties were investigated. The HHDH-Ra gene was cloned into the expression host *Escherichia coli* BL21(DE3) and the target protein was shown to be soluble. Substrate specificity studies showed that HHDH-Ra possesses excellent specificity for 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) and ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate (CHBE). The optimum pH and temperature for HHDH-Ra with 1,3-DCP as the reaction substrate were 8.0 and 30 °C, respectively. HHDH-Ra was stable at pH 6.0–8.0 and maintained about 70% of its original activity after 100 h of treatment. The thermal stability results revealed that HHDH-Ra has a half-life of 60 h at 30 °C and 40 °C. When the temperature is increased to 50 °C, the enzyme still has a half-life of 20 h, which is much higher than that of the reported enzymes. To sum up, the novel halohydrin dehalogenase from Rhodospirillaceae bacterium possesses good temperature and pH stability as well as catalytic activity, and shows the potential to be used in the synthesis of chemical and pharmaceutical intermediates.

Keywords: halohydrin dehalogenases, β -substituted alcohol, 1,3-dichloro-2-propanol, (*R/S*)-ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate

卤醇脱卤酶 (Halohydrin dehalogenase, HHDH), 也称卤醇-卤化氢裂解酶, 可通过相邻羟基和卤素分子进行亲核取代, 催化卤代醇底物的可逆反应, 脱卤形成相应的环氧化物和卤化氢 (图 1)。此外, 卤醇脱卤酶还可以利用不同的带负电的亲核试剂, 例如 NO_2^- 、 N_3^- 、 CN^- 、 OCN^- , 催化环氧化物的不可逆开环反应, 形成新的 C-C、C-N 或 C-O 键 (图 2)。因此, 卤醇脱卤酶不仅广泛应用于环境中卤代醇类污染物的降解, 而且还

用于制备环氧化合物和 β -取代醇等重要的手性药物、农药化学品及有机化学品合成中间体^[1-2]。

由于来源于有机合成的卤代醇容易成为环境污染物质^[3-4], 因此建立一个可靠有效的降解途径^[1]

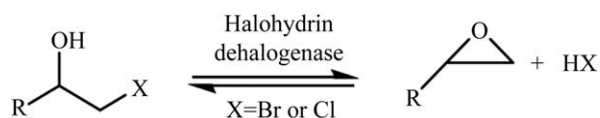


图 1 卤醇脱卤酶催化环氧化物成环反应^[1]

Fig 1 Epoxide ring-closure by halohydrin dehalogenase^[1].

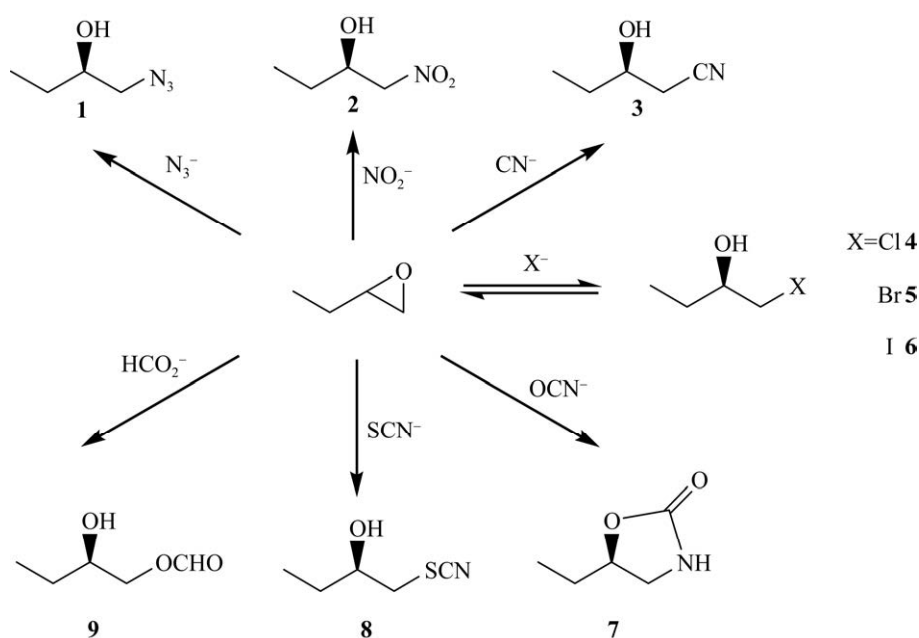


图 2 卤醇脱卤酶催化环氧化物开环反应^[1]

Fig 2 Catalytic scope of halohydrin dehalogenase in epoxide ring-opening^[1].

分必要。卤醇脱卤酶可催化邻卤醇脱卤反应的特性使其在环境污染治理领域具有重要的应用前景。Bastos 等利用卤醇脱卤酶实现对底物 1,3-DCP 降解效果达到 $3.1 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})^{[5]}$; Yonetani 等利用微生物节杆菌 *Arthrobacter* sp. strain PY1 实现了对 1,3-DCP 降解效果达到 $23.8 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})^{[6]}$ 。早在 1968 年, Castro 首次以 2,3-二溴丙醇作为唯一碳源筛选得到的黄杆菌 *Flavobacterium* sp. 菌株, 并在该菌中发现了卤醇脱卤酶, 该菌通过两步脱卤反应将 2,3-二溴丙醇分解为甘油^[7], 此后, 研究者相继在多种微生物中筛选得到可以降解邻卤醇的卤醇脱卤酶^[6,8], 并提出了卤醇脱卤酶相关的卤代醇降解路径。

目前研究最多的卤醇脱卤酶主要包括 HheA、HheB、HheC 三类, 虽然它们之间的氨基酸序列一致性低于 33%, 但它们却具有高度相似的高级结构, 并且都是以同源四聚体形式行使功能。每个单体显示为典型的 β/α Rossmann 折叠^[9], 这也是短链脱氢酶/还原酶家族 (SDR) 的保守特征。在系统进化关系上, 卤醇脱卤酶属于短链脱氢酶/还原酶 SDR 超家族, 与 SDR 家族成员具有一定的序列相似性, 在结构上卤醇脱卤酶含有高度保守的催化三联体 Ser-Tyr-Arg, 而 SDR 家族具有保守的催化三联体 Ser-Tyr-Lys^[10-15]。此外, 卤醇脱卤酶缺失了 SDR 家族中富含 Gly 的辅因子结合区域, 进而进化为一个空间较为广阔的卤素原子结合口袋。

在底物特异性方面, HheC 类酶对短链邻卤醇 (C2-C3) 具有较高的催化活性, 对不同的芳香族或脂肪族化合物也具有较高的立体选择性, 一般表现为 *R* 型偏好。HheA 和 HheB 类酶偏好催化较长链的邻卤醇 (C4-C6) 的反应, 但具有较低的立体选择性, 尤其是野生型的 HheA 卤醇脱卤酶对底物的立体选择性较差, 在动力学拆分实例中, HheA 表现出极低的对 *S* 型底物的立体选择性, 晶体结构表明这可能与 HheA 的相对宽敞的底物结

合口袋有关^[16]。目前, HheC 类卤醇脱卤酶研究最为广泛, 正是因其对大部分的卤代醇及环氧化物有较高的活性, 且表现出良好的立体选择性, 因此, HheC 在一些化学合成及药物手性侧链的合成中发挥着重要的作用。

由于目前催化功能较为清楚的卤醇脱卤酶不足 40 种, 且其中绝大部分酶的催化性能并不能满足科学研究和实际应用的要求, 因此挖掘并鉴定更多的卤醇脱卤酶具有重要意义。本文通过对来源于红螺菌 *Rhodospirillaceae* bacterium 中的一个假定卤醇脱卤酶进行克隆表达, 对其催化特性以及酶学性质进行研究, 为卤醇脱卤酶的进一步工业化应用奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株以及相关试剂

本实验所用质粒 pET28a 来自本实验室保存, 所用菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 均购于天根生化科技有限公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。所用催化底物 1,3-二氯-2-丙醇 (1,3-DCP)、(*S/R*)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (*S/R*-CHBE) 等均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器

气相色谱仪 7820A 购自 Agilent 公司; 气相色谱柱 HP-5 购自 Agilent 公司; 超声破碎仪 SB-5200D 购自宁波新芝生物科技有限公司; 高压匀浆机 UH-06 购自美国 Union Biotech。

1.2 HHDH-Ra 序列的生物信息学分析

在对 *Rhodospirillaceae* bacterium OCH5-H10 基因组数据进行分析时, 发现其中的一个假定蛋白 (WP-082752032.1) 与 SDR 家族的氧化还原酶具有较高的氨基酸序列一致性, 但又具有卤醇脱卤酶家族保守的催化三联体序列特征, 将该蛋白命名为 HHDH-Ra。采用 ExPASy

(<https://www.expasy.org/>) 在线软件对 HHDH-Ra 的碱基序列及对应的氨基酸序列、分子量大小以及等电点进行分析; 通过从 NCBI 数据库中获得其他卤醇脱卤酶的氨基酸序列, 运用 ClustalX 软件对这些序列进行比对分析; 以系统进化树作为研究各物种间演化关系的有效手段, 通过一种类似树状分支的图形, 直观看出来被研究对象之间的亲缘关系, 通过 MEGA 软件对比序列分析结果, 构建 HHDH-Ra 与目前已知的卤醇脱卤酶之间的系统进化树。

1.3 目的基因合成和目的蛋白表达纯化

目的基因合成: 对 HHDH-Ra 的原始基因序列进行了针对 *E. coli* 中表达的密码子的优化, 在 C 端加上 6×His 标签, 目的基因由上海桑尼生物有限公司合成。

目的蛋白的表达纯化: 将目的基因构建至 pET-28a 载体上, 重组质粒再转化至宿主 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 经过核酸电泳验证条带正确后, 重组质粒则视为转化成功。将转化成功的单克隆接种于装有 5 mL, 含有卡那霉素抗生素 (终浓度为 50 μg/mL) 的 LB 液体培养基的试管中, 并放置于 37 °C 的恒温摇床中培养过夜。后以 2.5% 的接种量转接于 200 mL 摇瓶中, 37 °C 振荡培养。当菌液 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 并将摇瓶置于 25 °C、175 r/min 条件下诱导培养 12–16 h。培养结束后, 收集菌液于离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min, 所获菌体沉淀用生理盐水洗涤重悬, 离心后弃掉上清重复洗涤一次, 收集菌体。

将诱导表达后收集的菌体 0.8 g, 用 40 mL 20 mmol/L、pH 8.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬菌体, 菌悬液置于冰浴中超声破碎细胞 (200 W, 超声 5 s, 间歇 5 s, 循环 99 次), 8 000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 得到粗酶液。取诱导菌破碎后的上清和沉淀悬浮液各 30 μL, 加入 6×上样缓冲液 6 μL, 煮沸 10 min, SDS-PAGE 电泳检测目的酶

的表达情况。同时, 利用 HisTrapHP 柱进行目的蛋白纯化, 用 25 mL 平衡缓冲液和含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液冲洗柱子, 再用梯度为 100 mmol/L、200 mmol/L、500 mmol/L 咪唑进行梯度洗脱, 收集 500 mmol/L 咪唑的洗脱峰。所得纯酶用超滤管 (截留分子量: 30 kDa) 浓缩, 缓冲脱盐后, 纯酶用 SDS-PAGE 验证纯度, 并于 -20 °C 保存用于后续的酶学性质检测。

1.4 酶学性质测定

1.4.1 酶活测定方法的建立

酶活单位 (U) 定义为: 在 30 °C、pH 8.0 的条件下, 在 1 min 内产生 1 μmol 产物所需要的酶量定义为 1 U。

比色法的原理是基于卤醇脱卤酶在脱卤反应中, 产生的 H^+ 会使反应体系中的 pH 降低, 从而引起检测体系中酸碱指示剂产生颜色的变化。参考汤丽霞等发表的文献方法^[17], 对检测体系组成和检测方法进行修正, 建立适合 HHDH-Ra 的酶活测定方法, 即: 在 96 孔板中加入 150 μL 含有 0.001% 苯酚红的 HEPES (6 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液, 再加入 50 μL 催化反应液, 在波长 559 nm 下, 测定指示剂的吸光值。酶反应体系为: 500 μL 反应体积, 加入 10 mmol/L 卤代醇底物以及纯化的酶 200 μg, 20 mmol/L、pH 8.0 的 PBS 缓冲液补足至 500 μL, 30 °C、200 r/min 振荡反应 30 min, 加入 2 mol/L 盐酸终止反应, 取样用比色法测定酶活。

1.4.2 HHDH-Ra 底物特异性研究

基于卤醇脱卤酶对卤代醇的催化特性, 考察了纯化后的 HHDH-Ra 对 6 种卤代醇的催化活性。检测体系组成: 在 500 μL 的反应体系中, 加入 10 mmol/L 卤代醇底物以及纯化的酶 200 μg, 20 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液补足至 500 μL。反应在 2 mL EP 管中进行, 30 °C、200 r/min 振荡反应 30 min, 用比色法测定酶活。

1.4.3 最适 pH 的测定

将酶活测定方法中的 pH 缓冲液改为不同 pH 的

缓冲液, 其中 pH 5.0–6.5 采用 100 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制, pH 6.5–8.5 采用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液配制, pH 8.5–10.0 采用 100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制, 其他条件不变, 以 1,3-DCP 为底物, 测定纯化的酶 HHDH-Ra 在不同 pH 下反应 30 min 时的酶活, 每组平行测 3 次。以所测的不同反应 pH 下最高酶活为 100% (对照), 其他 pH 条件下所测酶活以对照酶活的百分比表示, 绘制酶反应最适 pH 曲线。

1.4.4 最适温度的测定

将酶活标准测定方法中的温度改为 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、50 °C, 其他条件不变, 测定 HHDH-Ra 分别在上述温度下的酶活, 每组平行测 3 次。以所测的不同温度下的最高酶活为 100% (对照), 其他温度条件下所测酶活以对照酶活的百分比表示, 制作酶的最适温度曲线。

1.4.5 pH 稳定性测定

将纯化后的目的蛋白置于 4 °C 条件下保存, 每隔一段时间取样, 按标准检测方法检测酶活, 以初始 0 h 测得的酶活为 100% (对照), 计算不同时间点取样的残余酶活的相对百分比, 制作 pH 稳定性曲线。

1.4.6 温度稳定性测定

将纯化的目的蛋白与 20 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液按体积比 1:1 混匀, 分别置于 4 °C、30 °C、40 °C、50 °C 条件下孵育, 每隔一段时间取样, 按标准检测方法检测酶活。以不同温度下最初的酶活为 100% (对照), 计算残余酶活的相对百分比, 制作温度稳定性曲线。

1.4.7 不同底物浓度对 HHDH-Ra 催化反应影响

催化反应体系: 总体积为 500 μ L, 分别加入 10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L、60 mmol/L 的 1,3-DCP 或 R-CHBE, 加入适量纯化好的酶, 用 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 8.0) 补齐至 500 μ L, 在 30 °C、200 r/min 振荡反应, 定时取样, 用乙酸乙酯萃取, 检测底物转化率。

气相检测条件为: 采用 Agilent GC-7820A 系统, 色谱柱为 HP-5 (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m), 分流比为 20:1, 载气为氮气, 进样口和检测器的温度分别为 220 °C 和 230 °C, 进样量 1 μ L。1,3-二氯-2-丙醇 (1 a) 的色谱条件: 初始 50 °C 保留 1 min, 10 °C/min 程序升温至 100 °C, 保留 3 min; R-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (2 a): 初始 80 °C, 保留 2 min, 20 °C/min, 升温至 160 °C, 保留 3 min。

2 结果与分析

2.1 卤醇脱卤酶序列比对及分析

2.1.1 HHDH-Ra 序列分析

HHDH-Ra 基因序列全长 735 bp, 共编码 244 个氨基酸, ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 在线软件预测其蛋白分子质量为 27 kDa, 等电点 (pI) 为 8.91。分析显示构成 HHDH-Ra 蛋白的氨基酸中丙氨酸数量最多, 占 16% (mol/mol)。目前研究较多的卤醇脱卤酶主要被分为 HheA、HheB、HheC 三类。同一类卤醇脱卤酶之间的蛋白序列同源性达到 91%–98%, 但不同类型的序列同源性则低于 38%。HHDH-Ra 与这 3 类卤醇脱卤酶的序列一致性在 34%–36% 之间。通过序列比对发现 HHDH-Ra 具有卤醇脱卤酶保守的催化三联体 Ser136-Tyr149-Arg153 (图 3)。

随着生物信息学技术的发展和越来越多基因组数据的公开, 卤醇脱卤酶的数量不断增加, 卤醇脱卤酶家族类型已由原来的 A、B、C 三大类, 增加到 G 类^[18]。但是研究发现即使是同一类型的卤醇脱卤酶, 它们之间的序列一致性也比较低。如表 1 所示, 将 HHDH-Ra 与不同类别的卤醇脱卤酶的序列进行比对, 发现 HHDH-Ra 与上述 A-G 类的卤醇脱卤酶之间的序列一致性相对较低, 与 A 类酶中的 Hhe-A8 (*Alphaproteobacterium* strain) 具有最高的氨基酸序列一致性, 为 50%。HHDH-Ra 与 B 类酶比较, 与 HheB (*Corynebacterium* sp.)

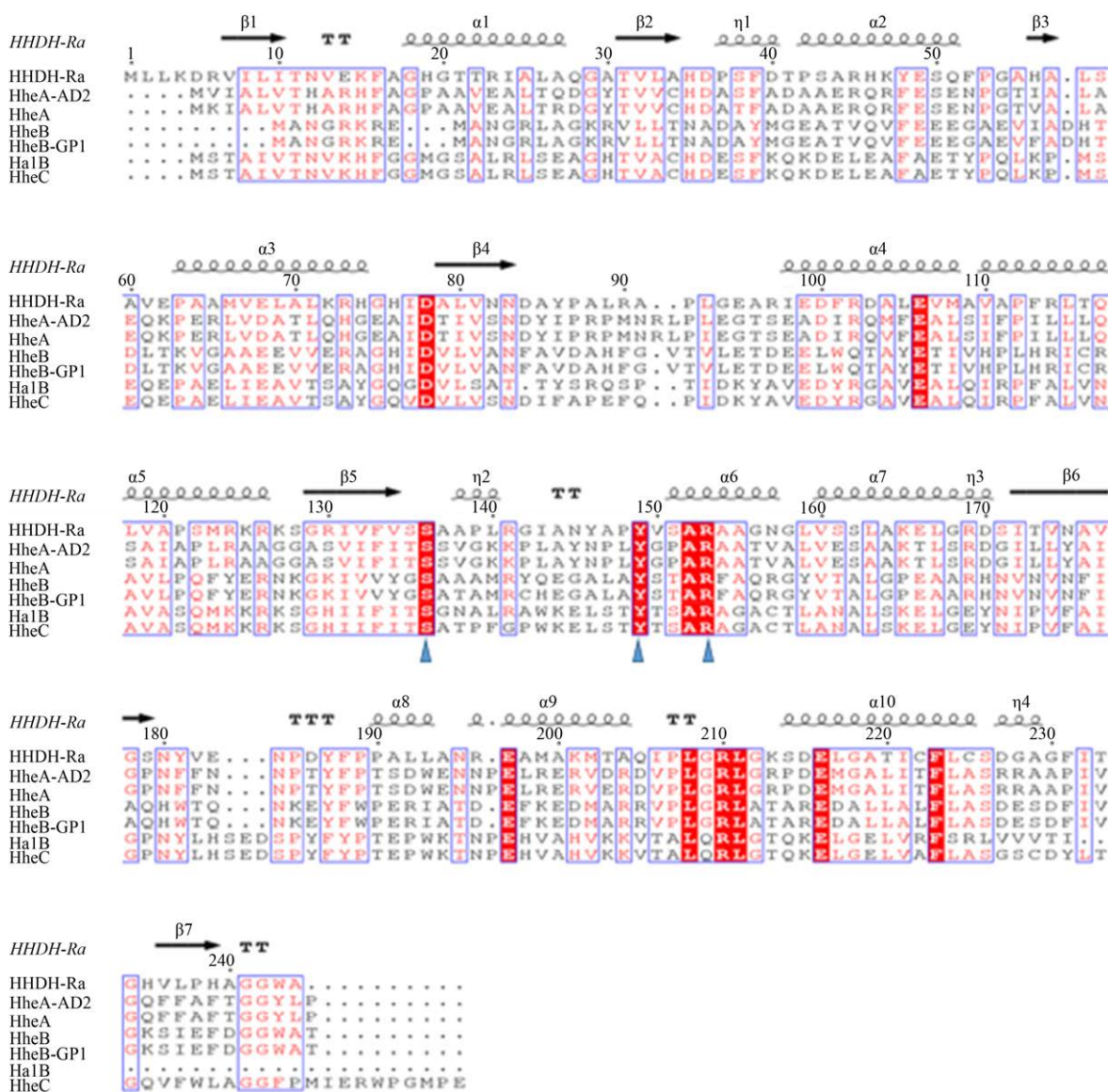


图3 HHDH-Ra 与其他卤醇脱卤酶序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of HHDH-Ra with known HHDHs. The conserved catalytic residues (Ser136, Tyr149 and Arg153) are marked with black triangle. Similar residues are framed in black area.

序列一致性最高, 为 36%; 目前 D 类酶发现数量最多, 有 18 个, 而 HHDH-Ra 与所有 D 类酶序列一致性都较低, 与 D10 (*Limnohabitans* sp. strain Rim28) 序列一致性最高, 仅为 37%。HHDH-Ra 与 HheC、E、F、G 类酶的序列一致性也低于 36%。由此推测 HHDH-Ra 可能不属于已有的卤醇脱卤酶类型, 而是一种新的卤醇脱卤酶。

2.1.2 进化树分析

将 HHDH-Ra 与表 1 中的卤醇脱卤酶进行系统进化分析, 利用 MEGA 5 软件构建系统进化树 (图 4)。结果显示, HHDH-Ra 与 A 类卤醇脱卤酶进化关系比较近, 其中与来源于 *Alphaproteobacterium* strain Mf 1.05b.01 的 HheA-A8 (WP_029639308) 亲缘关系最近。

表 1

Table 1

Category I	Subtypes									
	HheA	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	HHDH-Ra
HheA	100									
A2	97	100								
A3	33	34	100							
A4	99	98	33	100						
A5	40	38	39	39	100					
A6	34	33	49	33	40	100				
A7	39	37	54	72	41	51	100			
A8	36	32	63	32	34	51	49	100		
A9	34	32	71	32	39	51	48	58	100	
HHDH-Ra	34	35	45	34	39	43	45	50	44	100
Category II	Subtypes									
HheB	100									
HheB-GP1	98	100								
B3	49	49	100							
B4	55	54	73	100						
B5	58	58	62	67	100					
B6	58	58	58	63	68	100				
B7	54	58	69	74	68	58	100			
HHDH-Ra	36	35	32	34	33	29	30	100		

(待续)

(续表 1)

		Subtypes																	
		D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	
Category III	HheD	100																	
	D2	69	100																
	D3	76	66	100															
	D4	70	83	66	100														
	D5	67	62	68	65	100													
	D6	70	68	68	63	63	100												
	D7	78	68	73	69	67	71	100											
	D8	66	61	67	63	98	62	65	100										
	D9	66	63	66	62	86	63	64	86	100									
	D10	65	66	63	66	59	69	65	60	62	100								
	D11	75	69	68	72	61	69	71	61	60	67	100							
	D12	71	64	64	66	62	66	68	62	63	79	70	100						
	D13	66	65	65	59	70	64	64	58	79	68	65	100						
	D14	68	94	65	83	62	66	67	62	65	70	63	64	100					
	D15	78	66	71	67	62	68	71	61	62	69	65	65	65	100				
	D16	75	66	66	68	65	65	73	67	66	69	64	65	65	71	100			
	D17	76	68	69	64	66	74	74	63	62	73	66	64	68	73	74	100		
	D18	76	68	74	69	67	74	74	63	65	74	66	64	68	73	74	98	100	
	HHDH-Ra	35	32	27	32	34	33	32	34	37	32	34	35	32	32	33	36	36	
Category IV	HheE	E2	E3	E4	E5	HHDH-Ra													
	HheE	100																	
	E2	47	100																
	E3	48	47	100															
	E4	50	46	67	100														
	E5	52	50	46	45	100													
	HHDH-Ra	32	35	31	21	23	100												
Category V	HheC	HalB	HheF	HheG															
	HHDH-Ra	36	35	34	24														

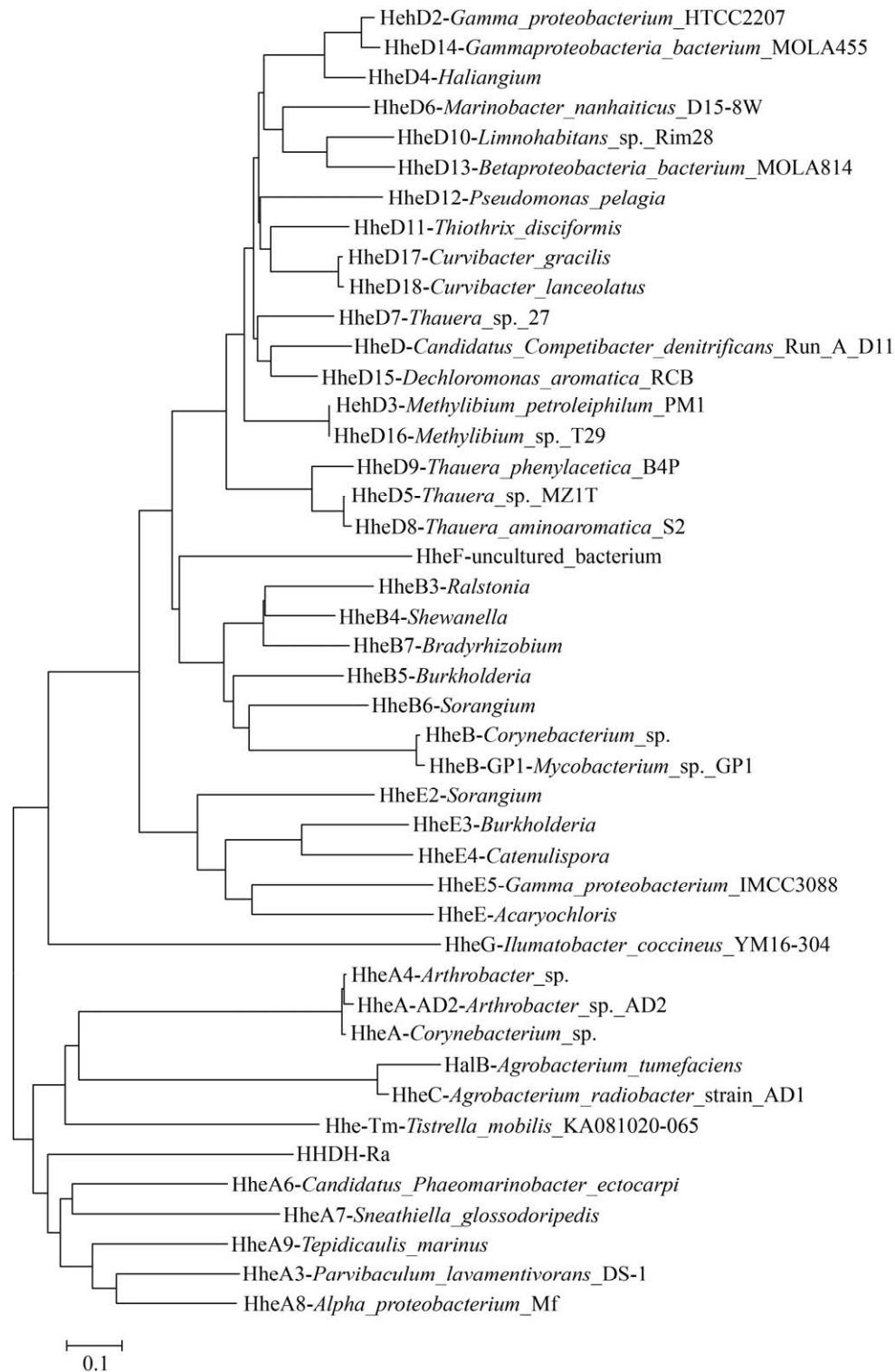


图 4 卤醇脱卤酶家族系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of the HHDHs family.

2.2 HHDH-Ra 的表达与纯化

将全基因合成的 HHDH-Ra 基因序列构建重组质粒 pET-28a, 再将阳性重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 表达宿主中进行表达, Ni-NTA 纯化得到高纯度的目的蛋白。HHDH-Ra 的表达及纯化结果如图 5 所示, 目的蛋白大小为 27 kDa, 符合预期。HHDH-Ra 在 *E. coli* BL21(DE3) 中可溶性表达良好。纯化后的蛋白样品为单一条带, 经灰度扫描可知其纯度大于 95%。

2.3 HHDH-Ra 酶的最适 pH

反应介质的 pH 是影响酶活性的一个关键因素, 不同的 pH 可以影响肽链上氨基酸的解离状态, 进而影响酶的结构、催化活性及稳定性。通过测定 HHDH-Ra 酶在不同 pH 缓冲溶液中的酶活, 以 30 °C 条件下测得的酶活为 100%, 计算相对活力。结果如图 6A 所示, 在 pH 5.5–8.0 范围内, 相对活力随 pH 的增加不断提高, 但在 pH 在 8.0–10.0 之间, 相对活力随 pH 的增加不断降低, 可见 pH 8.0 为 HHDH-Ra 最适反应 pH。此外, 过酸 (pH 5.5) 及过碱 (pH 10.0) 的反应条件不适合 HHDH-Ra 酶催化反应的进行。

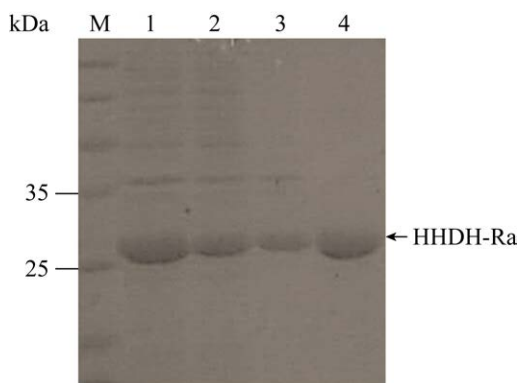


图 5 HHDH-Ra 蛋白在 *E. coli* BL 21 中表达及纯化蛋白电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of HHDH-Ra in *E. coli* BL 21. M: marker; Lane 1: whole-cell of *E. coli* expressing HHDH-Ra; Lane 2: crude extract of *E. coli* expressing HHDH-Ra; Lane 3: precipitate of *E. coli* expressing HHDH-Ra; Lane 4: purified enzyme.

2.4 HHDH-Ra 酶的反应最适温度

温度同样是影响酶反应的一个关键因素, 提高温度可提高酶促反应速率, 但又会加速酶蛋白的变性。基于此, 测定不同温度下 HHDH-Ra 催化 1,3-DCP 的活性。结果如图 6B 所示, 其中 30 °C 为 HHDH-Ra 酶反应最适温度, 在 20 °C 条件下, 相对酶活较低, 只有 40%; 而在 25–50 °C 条件下, 相对酶活都可以保持在 80% 以上, 可见 HHDH-Ra 酶能在比较宽泛的温度范围内使用, 特别是在较高温度下 (40–50 °C) 都可保持较高的酶活性。

2.5 HHDH-Ra 酶的 pH 稳定性

酶的 pH 稳定性是影响酶实际应用的一个重要指标, 将 HHDH-Ra 酶分别置于 pH 5.0–10.0 的 PBS 缓冲液中, 4 °C 放置, 每隔一段时间取样, 测定其残余酶活, 以初始加入的酶活为 100%, 计算相对活力。由图 6C 可知, HHDH-Ra 在 pH 6.0–8.0 都具有较好的稳定性, 100 h 以后仍能保持 70% 左右的酶活, 半衰期超出 100 h, 而 HHDH-Ra 在 pH 5.0 和 pH 10.0 中稳定性较差, 但半衰期仍达到 30 h。考虑到 HHDH-Ra 最适 pH 为 8.0, 而该酶在 pH 8.0 时也非常稳定, 因此 HHDH-Ra 实际应用时建议将反应体系的 pH 设置为 8.0。

2.6 HHDH-Ra 酶的温度稳定性

酶的温度稳定性是影响酶实际应用的另一个重要指标, 按照 1.4.1 中酶活测定方法, 将 HHDH-Ra 酶溶于 pH 8.0 的 PBS 缓冲液中, 分别于 4 °C、30 °C、40 °C、50 °C 静置保存, 每隔一段时间取样, 测定其残余酶活, 以初始加入的酶活为 100%, 计算相对活力。如图 6D 所示, 温度越高, 酶的稳定性越差。HHDH-Ra 在 4 °C 的环境中最稳定, 100 h 时仍具有 60% 以上的活力。HHDH-Ra 在 30 °C、40 °C 条件下的半衰期为 60 h。当温度提高到 50 °C 时, 该酶的半衰期仍有 20 h。在较高温度下 HHDH-Ra 比已报道的绝大多数卤醇脱卤酶具有更高的稳定性。目前, 文献报道的卤

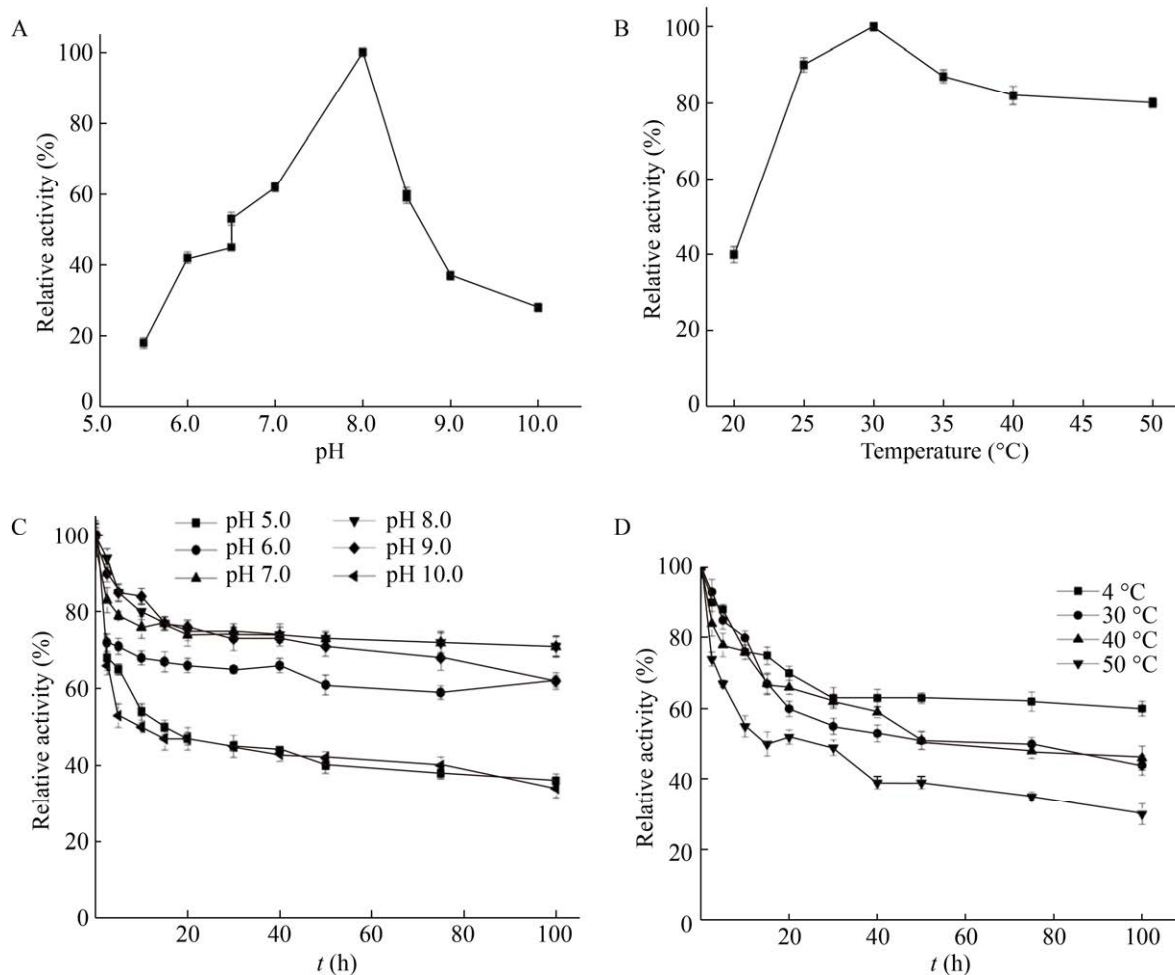


图 6 pH (A) 和温度 (B) 对 HHDH-Ra 酶活力的影响以及不同 pH (C) 和温度 (D) 酶的耐受性分析

Fig. 6 Effect of reaction pH (A) and temperature (B) on the activity of HHDH-Ra and determination of pH (C) and thermal (D) stability of the purified HHDH-Ra.

醇脱卤酶在较高温度下大多不稳定, 如卤醇脱卤酶 HHDHsG (*S. glossodoripedis*) 和 HHDHIs (*I. salinarum*), 其中 HHDHIs 在 40 °C 下保温 1 h, 酶活就损失一半, HHDHsG 虽在低于 45 °C 时比较稳定, 但高于 45 °C 失活较快, 50 °C 保温 1 h, 酶活损失一半^[19]。考虑到 HHDH-Ra 在 30–50 °C 范围内都表现较高的活性 (图 6A), 而且此范围内亦表现出良好的温度稳定性, 说明该酶作为催化剂在实际应用时可适应比较宽的温度范围, 且能耐受较高的反应温度, 因而具有一定的应用潜能。

2.7 HHDH-Ra 底物特异性研究

基于文献报道, 卤醇脱卤酶能够催化的底物通常为邻卤醇。本研究选择了 6 种卤醇脱卤酶的典型底物, 采用 1.4.1 中建立的比色法测定了 HHDH-Ra 对这 6 种卤代醇的酶活, 结果如表 2 所示。HHDH-Ra 酶对 1,3-二氯-2-丙醇 (1 a)、(R/S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (2 a/2 b) 具有催化活性, 其中对底物 (R)-CHBE (2 a) 的活性最高, 其次是 (S)-CHBE (2 b)。HHDH-Ra 对 1-氯-2-甲基-2-丙醇 (3 a)、2-氯-1-苯乙醇 (4 a) 以及 3-氯-1,2-丙二醇 (5 a) 检测不到脱卤活性。

表 2 HHDH-Ra 底物特异性

Table 2 Substrates specificity of HHDH-Ra

	Substrate	Enzyme activity (U/mg)
1 a	1,3-dichloro-2-propanol	0.23
2 a	<i>R</i> -ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate	0.41
2 b	<i>S</i> -ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate	0.34
3 a	1-chloro-2-methylpropan-2-ol	n.d
4 a	<i>Rac</i> -2-chloro-1-phenylethanol	n.d
5 a	<i>Rac</i> -3-chloropropane-1,2-diol	n.d

n.d: not detected.

2.8 HHDH-Ra 催化 1,3-DCP 的脱卤反应

实验考察了 HHDH-Ra 催化不同浓度 1,3-DCP 的反应过程,结果如图 7 所示。尽管在反应的前 2 h,底物浓度为 10 mmol/L 和 20 mmol/L 时的反应速率基本相同,但整体而言,底物转化率随着底物浓度的提高而下降,说明 1,3-DCP 对 HHDH-Ra 具有显著的抑制效应。在底物浓度分别为 10、20、40、60 mmol/L 时,底物转化率在前 2 h 反应较快,此后底物转化率下降明显。对于底物浓度为 10 mmol/L 的反应,6 h 以后底物转化率趋于平缓,此时底物转化率为 80%;底物浓度高于 10 mmol/L 的反应,反应进行到 4 h 后基本停止,此时的转化率分别为 55%、30%和 10%。

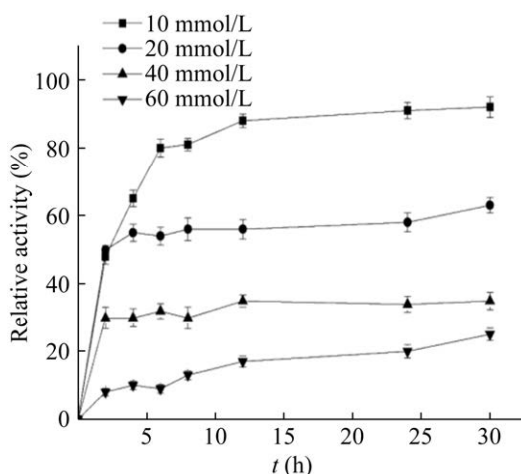


图 7 不同 1,3-DCP 浓度对 HHDH-Ra 催化反应的影响
Fig. 7 Effect of different 1,3-DCP concentration on dehalogenation catalyzed by HHDH-Ra.

除了底物抑制以外,实验还考察了产物 ECH 是否会对 HHDH-Ra 产生抑制。将 HHDH-Ra 酶与不同浓度的产物 ECH 在 30 °C 条件下共同孵育 1 h 和 2 h 后,测定残余酶活,结果如图 8 所示。当反应体系中存在 5 mmol/L 的 ECH 时,就会对 HHDH-Ra 酶活产生抑制,且随着 ECH 浓度的提高抑制效应加强,当酶与 10 mmol/L 的 ECH 孵育 1 h, HHDH-Ra 的残余酶活只有 50%左右,此外,产物抑制会随着时间延长而增强。此外,在考察 HHDH-Ra 催化 1,3-DCP 的反应过程时发现,在反应进行 2 h 以后,反应液中有明显的白色絮状物出现,推测可能是随着时间延长,产物逐渐积累导致酶蛋白变性失活。产物抑制现象也发生在其他卤醇脱卤酶催化 1,3-DCP 生成 ECH 的反应过程中。例如卤醇脱卤酶 HHDHTm (*T. mobilis* ZJB1405) 和 HHDHIs (*I. salinarum*) 催化 1,3-DCP 合成 ECH 时,发现产物的收率随着底物浓度增加而下降,当底物由 20 mmol/L 增至 100 mmol/L 时,产物收率从 70%降至 30%,因此当酶活受到产物抑制时,较高浓度底物不能完全转化^[19]。

2.9 HHDH-Ra 催化 (R)-CHBE 的脱卤反应

以 (R)-CHBE 为底物时,实验考察了不同底物浓度对 HHDH-Ra 催化反应的影响,结果如图 9 所示。与 1,3-DCP 为底物时的催化过程不同的

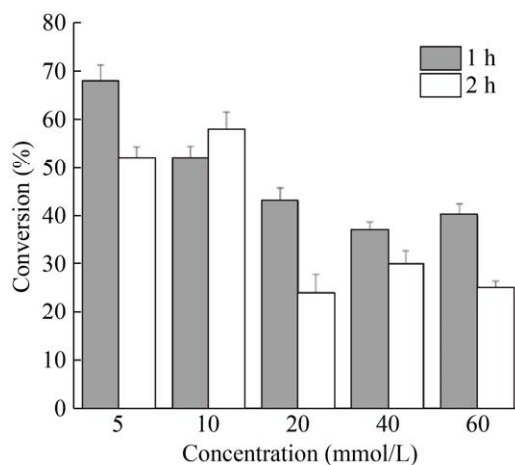


图 8 ECH 对 HHDH-Ra 的影响
Fig. 8 Effect of ECH on activity of HHDH-Ra.

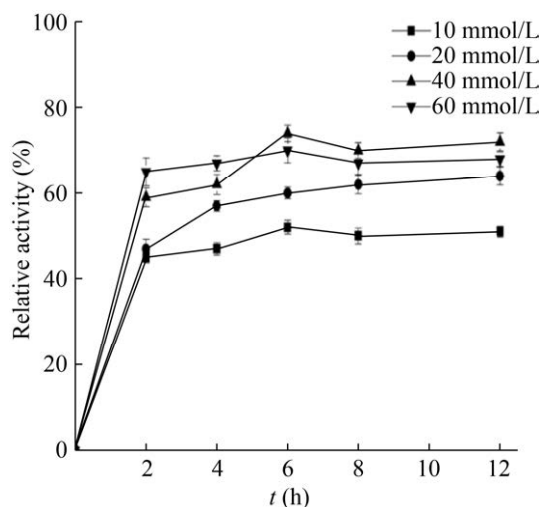


图9 不同R-CHBE浓度对HHDH-Ra催化反应的影响
Fig. 9 Effect of different R-CHBE concentration on dehalogenation catalyzed by HHDH-Ra.

是,在所测定的底物浓度范围(10–60 mmol/L)内,底物转化率随着底物浓度的增加而不同程度地提高,说明(R)-CHBE对HHDH-Ra的抑制不如1,3-DCP显著。但同样存在前2 h反应速率快、此后底物转化显著下降并趋于平缓的现象,由此推测生成的产物对HHDH-Ra的活性产生了抑制^[20]。在本实验中,同样观察到在反应2 h以后,反应液中出现明显的白色絮状物,这也再次说明HHDH-Ra在产物存在情况下,蛋白会变性失活。而蛋白的变性失活导致反应体系中的有活性的酶大幅度减少,这样导致催化反应基本在2 h以后无法进行。因而出现了图10所示的现象,即随着反应体系中产物的积累,抑制效应逐渐加剧,从而导致反应进行到一定时间后底物转化率基本不变(反应减缓或停止)。在后续实验中,考虑采用两相体系或者是在蛋白稳定性方面进行相关改造以降低底物(产物)抑制效应。

3 结论

通过氨基酸序列比对、进化树分析,推测来源于*Rhodospirillaceae bacterium* OCH5-H10的假定蛋白HHDH-Ra(WP-082752032.1)是一个新型

的卤醇脱卤酶。HHDH-Ra与目前已知的所有卤醇脱卤酶的氨基酸一致性都相对较低,在25%–40%之间,最高为50%。HHDH-Ra与其他卤醇脱卤酶亲缘性低。

HHDH-Ra的酶学性质研究表明该卤醇脱卤酶基因能够在*E. coli*中可溶表达。底物特异性研究表明HHDH-Ra能够催化1,3-DCP和(R/S)-CHBE的脱卤反应。酶学性质研究显示HHDH-Ra反应最适pH为8.0,最适温度为30℃。HHDH-Ra在pH 6.0–8.0都具有较好的稳定性,100 h以后仍能保持70%左右的酶活。HHDH-Ra具有较高的温度稳定性,该酶在4℃的环境中最稳定,100 h时仍具有60%以上的活力,在30–40℃条件下半衰期仍达到60 h。本研究可能进一步丰富了卤醇脱卤酶的分类,同时良好的稳定性和催化活性显示其进一步的工业化应用前景。

REFERENCES

- [1] Hasnaoui-Dijoux G, Majerić Elenkov M, Lutje Spelberg JH, et al. Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening. *Chem Bio Chem*, 2008, 9(7): 1048-1051.
- [2] Lutje Spelberg JH, Tang LX, van Gelder M, et al. Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, 13(10): 1083-1089.
- [3] 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 (in Chinese).
- [4] 王雷, 袁京, 姚培圆, 等. 一种来源于运动替斯崔纳菌 KA081020-065 的新型卤醇脱卤酶的表达纯化及性质分析. *生物工程学报*, 2015, 31(5): 659-669.
Wang L, Yuan J, Yao P, et al. Expression and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Tistrella mobilis* KA081020-065. *Chin J*

- Biotech, 2015, 31(5): 659-669 (in Chinese).
- [5] Bastos F, Bessa J, Pacheco CC, et al. Enrichment of microbial cultures able to degrade 1,3-dichloro-2-propanol: a comparison between batch and continuous methods. *Biodegradation*, 2002, 13(3): 211-220.
- [6] Yonetani R, Ikatsu H, Miyake-Nakayama C, et al. Isolation and characterization of a 1,3-dichloro-2-propanol-degrading bacterium. *J Health Sci*, 2004, 50(6): 605-612.
- [7] Castro CE, Bartnicki EW. Biodehalogenation. Epoxidation of halohydrins, epoxide opening, and transhalogenation by a *Flavobacterium* species. *Biochemistry*, 1968, 7(9): 3213-3218.
- [8] Poelarends GJ, van Hylckama Vlieg JE, Marchesi JR, et al. Degradation of 1,2-dibromoethane by *Mycobacterium* sp. strain GP1. *J Bacteriol*, 1999, 181(7): 2050-2058.
- [9] Nakamura T, Nagasawa T, Yu F, et al. Characterization of a novel enantioselective halohydrin hydrogen-halide-lyase. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(4): 1297-1301.
- [10] van Hylckama Vlieg JE, Tang L, Lutje Spelberg JH, et al. Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases. *J Bacteriol*, 2001, 183(17): 5058-5066.
- [11] Wilckens T. Short chain dehydrogenases/reductases(sdr). US, 2005.
- [12] Ghosh D, Sawicki M, Pletnev V, et al. Porcine carbonyl reductase: structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 18457-18463.
- [13] Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem*, 2002, 269(18): 4409-4417.
- [14] Oppermann U, Filling C, Hult M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem-Biol Interactions*, 2003, 143/144: 247-253.
- [15] Jörnvall H, Höög JO, Persson B. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett*, 1999, 445(2/3): 261-264.
- [16] de Jong RM, Kalk KH, Tang LX, et al. The X-ray structure of the haloalcohol dehalogenase HheA from *Arthrobacter* sp. strain AD2: insight into enantioselectivity and halide binding in the haloalcohol dehalogenase family. *J Bacteriol*, 2006, 188(11): 4051-4056.
- [17] Tang LX, Li Y, Wang X. A high-throughput colorimetric assay for screening halohydrin dehalogenase saturation mutagenesis libraries. *J Biotechnol*, 2010, 147(3/4): 164-168.
- [18] Schallmeyer M, Koopmeiners J, Wells E, et al. Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: identification of novel enzymes by database mining. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(23): 7303-7315.
- [19] 薛锋. 甘油化学酶法合成光学纯环氧氯丙烷关键酶的挖掘与改造[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015. Xue F. Discovery and engineering of key enzyme in chemoenzymatic synthesis of chiral epichlorohydrin from glycerol[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [20] Yang H, Zhang X, Ma Z, et al. Expression, purification and characterization of catalase from *Corynebacterium glutamicum*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2020, 36(8): 1568-1577.

(本文责编 陈宏宇)