博士学位论文

论文题目：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

**作者姓名**  薛 锋 **指导教师**  郑裕国 **教授**

**柳志强 教授**  **学科专业**  **生物化工** **所在学院 生物与环境工程学院**

**提交日期**2015 年 12 月

DISCOVERY AND ENGINEERING OF KEY ENZYMES IN CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF CHIRAL EPICHLOROHYDRIN FROM GLYCEROL

Submitted to

Zhejiang University of Technology for Doctoral Degree

*Written* by Xue Feng *Majoring in*

Biochemical Engineering

*Supervised by* Professor Zheng Yuguo Professor Liu Zhiqiang

College of Biological and Environmental Engineering Zhejiang University of Technology

December, 2015

I

**浙江工业大学**

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文 不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得浙江 工业大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究做出 重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

作者签名：日期：年月日

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文 被查阅和借阅。本人授权浙江工业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存 和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在\_ \_年解密后适用本授权书。

2、不保密□。

（请在以上相应方框内打“√”）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 作者签名：  导师签名： | 日期：  日期： | 年  年 | 月  月 | 日  日 |
|  | II |  |  |  |

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

摘 要

手性环氧氯丙烷（ECH）是一种非常重要的的三碳手性药物合成中间体，用于合成降血脂类药物阿托伐他汀、芳氧丙胺醇类β-肾上腺素阻断剂、减肥药左旋肉碱和抗生素海藻唑啉等多种药物，在医药、农药和精细化工等领域有着广泛的应用。由于目前生物柴油副产物甘油的大量增加，甘油价格大幅度降低，将甘油转化为手性ECH工艺成为未来甘油生物炼制的主要发展方向之一。手性ECH的制备方法主要有化学法和生物法。生物法由于其具有立体选择性高、酶源广泛、生产成本低及环境友好等优点，已成为当前不对称制备手性ECH的重要方法之一。酶法拆分主要包括环氧化物水解酶和卤醇脱卤酶不对称拆分外消旋ECH。生物催化1, 3-二氯-2-丙醇（1,3-DCP）的不对称脱卤因其理论收率达100%，是绿色高效制备手性ECH的优先途径。本文以制备手性ECH这一重要平台化合物为目标，着眼于挖掘和分子改造新型卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶。

本文通过传统土壤筛选、基因组狩猎和数据库挖掘等方法获得了

7个卤醇脱卤酶，在大肠杆菌中过量表达，筛选出四种催化性能较优

的卤醇脱卤酶。确定4种卤醇脱卤酶最适反应温度为40-50˚C，最适

pH为10.0.4种卤醇脱卤酶底物谱广，不仅能催化潜手性卤代醇不对称脱卤制备手性环氧化物，还可以不对称拆分外消旋卤代醇制备手性环氧化物。HHDHIs和HHDHTm对4-氯-3-羟基丁酸乙酯（CHBE）也表现出较高的催化活性。在pH 10.0条件下，20-100 mM底物浓度

I

范围内，HHDHSg催化1,3-DCP制备(*S*) -ECH的立体选择性最高，(*S*) -ECH的对映体过量值（ee）和收率在83.4-84.9%和56.2-85.9%之间。而HHDHIs表现出相反的选择性，产物(*R*) -ECH的ee值和收率在30.2-58.6%和38.9-73.5%之间。利用卤醇脱卤酶催化(*S*) -CHBE合成(*R*) -HN，50 g/L HHDHTm湿细胞催化100 g/L (*S*) -CHBE的转化率和收率分别达到92.8%和89.2%.10 g/L HHDHIs湿细胞催化150 g/L (*S*) -CHBE的转化率和收率分别达到95.4%和90.4%；65 g/L HHDHIs湿细胞催化300 g/L (*S*) -CHBE 的转化率和收率分别达到94.5%和

89.3%。

以拆分ECH合成（*S*）-ECH为目标，采用两种策略从实验室筛选保藏的2株菌株中克隆得到3个*R*-环氧化物水解酶基因，并将3种环氧化物水解酶基因在大肠杆菌中进行异源表达，筛选获得对映体选择性最优的环氧化物水解酶AmEH。利用亲和层析技术分离纯化

AmEH获得纯酶，对其酶学性质进行表征，其最适温度35°C，最适pH 8.0. AmEH具有较广的底物谱，对多种环氧化物表现出催化活性和较好的立体选择性，取代基的类型、大小和位置影响酶的酶活和立体选择性。AmEH 对ECH 表现出良好的立体选择性（*E*=12.9），在64 mM的底物浓度下，(*S*) -ECH的收率和ee值分别达到21.5%和> 99%。

利用定点突变技术对卤醇脱卤酶进行理性或半理性分子改造研究。通过构建定点饱和突变文库，并利用pH 指示剂显色结合手性

GC分析，从中筛选获得HheC立体选择性提高的最优突变体P175S/W249P，在pH 8.0条件下，其催化1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee值从5.2%提高到95.3%; HHDHSg的最优突变体为V137I，其催化1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee值从84.6%提高到91.8%；对HHDHTm进行分子改造，筛选获得突变体为N183L，催化合成(*S*) -ECH的ee

II

值从40.2%提高到70.2%。通过同源建模和分子对接分析了突变体产物ee值提高的机理，即在活性催化中心，氧负离子亲核进攻被氯取代的2个碳原子的空间位阻大小不同，导致生成的*S*-构型和*R*-构型的生成量不等，空间阻力大小相差越大，产物的ee值就越高。卤醇脱卤酶突变体用于催化合成手性ECH，在pH 10.0条件下，20-100 mM底物浓度范围内，突变体P175S/W249P催化合成的产物ee和收率分别在90.4-92.7%和58.0-91.4%之间。突变体V137I催化合成的产物

ee和收率分别在87.2-91.5%和48.2-90.7%之间。

利用同源建模和分子对接等技术，分析可能影响AmEH立体选择性的氨基酸残基，确定突变位点。结合基于ECH的96孔板高通量筛选模型及手性GC分析的策略，筛选定点饱和突变文库。筛选获得最优突变体W182F/ S207V/N240D，其酶活及对映体选择率是原始酶的约1.7和7.0倍。对突变前后对映选择性提高的机理进行分析，结果表明：突变体亲核进攻天冬氨酸中的氧原子与被进攻的两个构型碳原子之间的距离差值越大，环氧化物水解酶的对映选择性越高。最优突变体的△*d*从原始酶的0.3Å提高到1.1Å。最优突变体催化75-450 mM ECH，获得的（*S*）-ECH的ee> 99%，收率在45.8%-40.5%之间。

为提高手性ECH的ee值，利用分子生物学手段成功构建卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶在大肠杆菌中的双酶共表达偶联和双酶单表达偶联系统，并成功应用于合成手性ECH。在探究双酶游离细胞偶联催化性能的基础上，对卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶进行初步固定化探索，实现双酶偶联连续化操作，显示出良好的合成手性环氧化物和卤代醇的应用潜力。

关键词：卤醇脱卤酶； 环氧化物水解酶； 手性环氧氯丙烷； 立体选择性； 饱和突变； 双酶体系

III

DISCOVERY AND ENGINEERING OF KEY ENZYME IN CHEMOENZYMATIC SYNTHESIS OF CHIRAL EPICHLOROHYDRIN FROM GLYCEROL

Abstract

Enantiopure epichlorohydrin (ECH) is recognized as a versatile chiral C3 platform compounds and has practical applications in the synthesis of atorvastatin, β-adrenergic blocking agents, L-carnitine, and trehalostatin. Glycerol, as one of the by-products of biodiesel production, has become an inexpensive and renewable material. Researchers showed a surge of interest in using glycerol as renewable feedstock to produce functional chemicals. In fact, much effort had already been devoted to enantiopure ECH, which include chemical and biological routes. Biological methods for enantiopure ECH preparation have been paid much attention with respect to high enantioselectivity, extensive enzyme sources, low production costs and green environmental protection. Biocatalytic transformations include epoxide hydrolase (EH) mediated kinetic resolution and non-hydrolytic enantioselective ring opening by halohydrin dehalogenases (HHDHs). As an efficient and straightforward access to chiral ECH, biocatalytic asymmetric dehalogenation of prochiral 1,3-dichloro-2-propanol (DCP) is particularly attractive since 100% of the starting material can be converted to product, in contrast to a resolution approach where 50% of raw material is unused. This research was focused on the screening and molecular engineering of novel

IV

HHDHs and EHs for the synthesis of chiral ECH.

Seven HHDHs were discovered by traditional screening, genome hunting and data mining. In the screening of seven *E. coli* strains overexpressing recombinant HHDHs, four HHDHs were identified with capability of higher catalytic activities and enantioselectivities for producing chiral ECH and purified to homogeneity. They showed an optimal temperature of 40-50˚C, while all of them exhibited the highest activity at pH 10.0. All four enzymes were active with most of chlorinated and brominated C2 and C3 vicinal halohydrins tested. They could catalyze the asymmetric dehalogenation of prochiral halohydrin to chiral epoxides and the enantioselectivity that HHDH display when catalyzing ring-closure reactions makes them promising biocatalysts for the production of optically active epoxides. HHDHIs and HHDHTm showed high activity toward ethyl (*S*) -4-chloro-3-hydroxybutyrate (CHBE).

HHDHSg exhibited highest enantioselectivity toward 1,3-DCP than other HHDHs. Asymmetric conversions of 20-100 mM 1,3-DCP with recombinant *E. coli* overexpressing HHDHSg afforded (*S*) -ECH in 83.4-84.9% enantiomeric excess (ee) and 56.2-85.9% yield. (*R*) -ECH was enantioselectively biotransformed by HHDHIs from the 20-100 mM 1,3-DCP with about 38.9-73.5% yield and 30.2-58.6% ee. Further, we explored the potential of HHDHTm to catalyze the synthesis of optically pure (*R*) -HN, which can be applied as an intermediate in the production of cholesterol-lowering drugs of the statin type. With 100 g/L (*S*) -CHBE and 50 g/L recombinant *E. coli* cells harboring the HHDHTm, the conversion and yield reached 92.8% and 89.2%. With 300 g/L of (*S*) -CHBE and 65 g/L recombinant *E. coli* cells harboring the HHDHIs, the reaction was formed (*R*) -HN in 94.5% conversion and 89.3% yield.

This research was focused on systhesis of (*S*) -ECH by kinetic

# V

Resolution of ECH using epoxide hydrolase. Two new strains were successfully isolated from soil samples, which were proven to be useful in enantioselective resolution of ECH to produce (*S*) -ECH. Three EHs from the two strains were discovered. AmEH showed the highest enantioselectivity and was purified to homogeneity by a Ni-NTA column. Its basic catalytic properties were investigated. AmEH showed its optimum pH and temperature at 8.0 and 35°C, respectively. Moreover, this AmEH showed broad substrates specificity toward epoxides.

Nevertheless, among these substrates there are significant differences in activity and enantioselectivity. The purified AmEH showed an enantioselective hydrolysis toward monosubstituted epoxides at C-1 position with bulky ring such as styrene oxide and benzyl glycidyl ether and with aliphatic chains such as ECH. There were marked differences in enantioselectivity with methyl position, a general trend can be found that the ee value increases as the methyl on the phenyl ring is shifted from the para- to the ortho-position. Enantiopure (*S*) -ECH could be obtained with enantiomeric excess (ee) of> 99% and yield of 21.5% (*E* value of 12.9) from 64 mM (*R*, *S*) -ECH.

The site-saturation mutagenesis technique was employed to improve the enantioselectivity of HHDHs toward 1,3-DCP. The three-dimensional homology model of HHDHs were generated, and series key residues were suggested to play critical roles in enantioselectivity by modeling and docking. The saturation mutagenesis libraries were screened using the high-throughput colorimetric activity assay on a 96-well plate format and chiral GC. The best HheC mutant (P175S/W249P) displayed greatly improved the ee of (*S*) -ECH from 5.2% to 95.3% in the catalyzed dehalogenation of 1,3-DCP at pH 8.0. The best HHDHSg mutant (V137I) displayed greatly improved the ee of (*S*) -ECH from 84.6% to 91.8%. The HHDHTm mutant (N183L) displayed greatly improved the ee of (*S*) -ECH

VI

From 40.2% to 70.2%. Modeling and docking studies demonstrated that the enhanced enantioselectivity is caused by the decreasing steric hindrance of one of halogen-bearing carbon atom of 1,3-DCP, resulting in asymmetric dehalogenation. Reactions of 20-100 mM 1,3-DCP with HheC mutant (P175S/W249P) afforded (*S*) -ECH in 90.4-92.7% ee and 58.0-91.4% yield. Reactions of 20-100 mM 1,3-DCP with HHDHSg mutant (V137I) afforded (*S*) -ECH in 87.2-91.5% ee and 48.2-90.7% yield.

Subsequently, to improve the enantioselectivity and activity of AmEH, we used a protein engineering approach that involves building a homology model of AmEH, library generation based on the model, screening for AmEH activity and higher enantioselectivity. The best mutant VDF (W182F/S207V/N240D) has 7-fold enhanced enantioselectivity toward racemic ECH, with the enantiomeric ratio value (*E* value) preferring (*R*) -ECH increased from 12.9 of wild-type to 90.0, as well as 1.7-fold improved activity. Modeling and docking studies demonstrated that the enhanced enantioselectivity is caused by increasing the through-space distance, *d*, between the attacking O-atom of Asp181

And the epoxide C-atom. In the mutant VDF, the △*d* value was increased

From 0.3Åto 1.1. Furthermore, we successfully applied the created recombinant *E. coli* whole cells expressing variant VDF in the kinetic resolution of racemic ECH. Enantiopure (*S*) -ECH could be obtained with an enantiopurity of> 99% *ee* and a yield of 40.5-45.8% from 75- 450 mM racemic ECH, which is better than other reported EHs.

To increase the optical purity of chiral ECH, Two-enzyme systems were constructed and applied for the efficient synthesis of chiral ECH. Firstly, HHDH was coexpressed with EH, respectively on two different styles. Higher ee of (*S*) -ECH was observed by using two-plasmids coexpression system, and higher ee of (*R*) -ECH was obtained by using *E.*

VII

*Coli* harboring a coexpression plasmid. Secondly, a practical, two-pot, two-step catalytic method is successfully constructed for conversion of 1,3-DCP to chiral ECH in> 99% ee. This suggests that the stepwise procedure is more effective than" one pot" conversion, since higher optical purity of chiral ECH was obtained. The study on immobilized bienzyme system has been carried out on the basis of immobilized HHDH and immobilized EH. Biosynthesis of chiral ECH with immobilized enzyme coupled HHDH and EH allowed us to re-use the enzyme for an extended period of time, enables easier separation of the catalyst from the product and achieve continuous operation. It also shows good potential for synthesis of other chiral epoxides and halohydrins.

KEY WORDS: halohydrin dehalogenase; Epoxide hydrolase; Enantiopure epichlorohydrin; Enantioselectivity; Saturation mutagenesis; Two-enzyme system

VIII

目 录

[摘 要](#_Toc686881028) 3

[Abstract](#_Toc686881029) 4

[V](#_Toc686881030) 4

[第一章 绪论](#_Toc686881031) 11

[1.1 环氧氯丙烷概述](#_Toc686881032) 11

[1.2 手性ECH的合成方法](#_Toc686881033) 12

[1.2.1 化学法合成手性ECH](#_Toc686881034) 12

[1.2.2 Th物酶法合成手性ECH](#_Toc686881035) 12

[1.2.2.1 氯过氧化物酶催化3-氯丙烯的不对称合成手性ECH](#_Toc686881036) 12

[1.2.2.2 酶法合成手性2,3-DCP制备手性ECH](#_Toc686881037) 13

[1.2.2.3 卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH](#_Toc686881038) 14

[1.2.2.4 卤醇脱卤酶催化拆分外消旋ECH制备手性ECH](#_Toc686881039) 14

[1.2.2.5 环氧化物水解酶催化拆分外消旋](#_Toc686881040)**[ECH](#_Toc686881040)**[制备手性ECH](#_Toc686881040) 15

[1.3 环氧化物水解酶](#_Toc686881041) 15

[1.3.1 环氧化物水解酶的结构及催化机理](#_Toc686881042) 16

[1.3.2 环氧化物水解酶的应用](#_Toc686881043) 17

[1.3.3 环氧化物水解酶的开发](#_Toc686881044) 21

[1.3.4 环氧化物水解酶的分子改造](#_Toc686881045) 21

[1.3.4.1 环氧化物水解酶的高通量筛选方法](#_Toc686881046) 21

[1.3.4.2 环氧化物水解酶的理性设计](#_Toc686881047) 21

[1.3.4.3 环氧化物水解酶的半理性设计](#_Toc686881048) 21

[1.3.4.4 环氧化物水解酶的定向进化](#_Toc686881049) 21

[1.4 卤醇脱卤酶](#_Toc686881050) 22

[1.4.1 卤醇脱卤酶的结构和催化机理](#_Toc686881051) 22

[1.4.2 卤醇脱卤酶的筛选与克隆](#_Toc686881052) 22

[1.4.3 卤醇脱卤酶的应用](#_Toc686881053) 22

[1.4.3.1 合成手性环氧化物](#_Toc686881054) 22

[1.4.3.2 合成手性β取代醇](#_Toc686881055) 22

[1.4.4 卤醇脱卤酶的分子改造](#_Toc686881056) 23

[1.4.4.1 卤醇脱卤酶的高通量筛选方法](#_Toc686881057) 23

[1.4.4.2 卤醇脱卤酶的定向进化](#_Toc686881058) 23

[1.4.4.3 卤醇脱卤酶的理性或半理性设计](#_Toc686881059) 23

[1.5 本论文的研究研究目的及意义](#_Toc686881060) 23

[1.6 本论文的主要研究内容](#_Toc686881061) 24

[第二章 卤醇脱卤酶的挖掘与表征](#_Toc686881062) 24

[2.1 引言](#_Toc686881063) 24

[2.2 实验材料](#_Toc686881064) 24

[2.2.1 主要设备与仪器](#_Toc686881065) 24

[2.2.2 菌株与质粒](#_Toc686881066) 25

[2.2.3 酶与试剂](#_Toc686881067) 26

[2.2.4 引物](#_Toc686881068) 27

[2.3 实验方法](#_Toc686881069) 27

[2.3.1 培养基及常用试剂配制](#_Toc686881070) 27

[2.3.2 产卤醇脱卤酶菌株的筛选与鉴定](#_Toc686881071) 28

[2.3.3 基本分子Th物学方法](#_Toc686881072) 28

[2.3.4 卤醇脱卤酶基因的克隆](#_Toc686881073) 28

[2.3.4.1 卤醇脱卤酶HheAAm的克隆](#_Toc686881074) 28

[2.3.4.2 卤醇脱卤酶HHDHTm的克隆](#_Toc686881075) 28

[2.3.4.3 其它卤醇脱卤酶基因的获得](#_Toc686881076) 29

[2.3.5 卤醇脱卤酶大肠杆菌表达载体和工程菌的构建](#_Toc686881077) 29

[2.3.6 卤醇脱卤酶的诱导表达](#_Toc686881078) 29

[2.3.7 氨基酸序列比对与系统进化分析](#_Toc686881079) 29

[2.3.8 卤醇脱卤酶的分离纯化](#_Toc686881080) 29

[2.3.8.1 含His-Tag 标签的卤醇脱卤酶的分离纯化](#_Toc686881081) 29

[2.3.8.2 其它卤醇脱卤酶的分离纯化](#_Toc686881082) 29

[2.3.9 卤醇脱卤酶酶学性质表征](#_Toc686881083) 29

[2.3.10 卤醇脱卤酶酶活测定](#_Toc686881084) 29

[2.3.11 分析方法](#_Toc686881085) 29

[2.3.11.1 非手性检测方法](#_Toc686881086) 29

[2.3.11.2 手性检测方法](#_Toc686881087) 29

[2.3.12 卤醇脱卤酶催化1,3-DCP合成手性ECH](#_Toc686881088) 29

[2.3.13 卤醇脱卤酶催化(](#_Toc686881089)*[S](#_Toc686881089)*[)-CHBE合成(](#_Toc686881089)*[R](#_Toc686881089)*[)-HN](#_Toc686881089) 30

[2.4 结果与讨论](#_Toc686881090) 30

[2.4.1 产卤醇脱卤酶的筛选及鉴定](#_Toc686881091) 30

[2.4.2 HheAAm 基因的克隆与序列分析](#_Toc686881092) 30

[2.4.3 HHDHTm的基因的克隆与序列分析](#_Toc686881093) 30

[2.4.4 其它卤醇脱卤酶的克隆与序列分析](#_Toc686881094) 30

[2.4.5 卤醇脱卤酶进化分析](#_Toc686881095) 32

[2.4.6 卤醇脱卤酶的表达](#_Toc686881096) 33

[2.4.7 重组卤醇脱卤酶的筛选](#_Toc686881097) 33

[2.4.8 重组卤醇脱卤酶的分离纯化](#_Toc686881098) 33

[2.4.9 卤醇脱卤酶的酶学性质研究](#_Toc686881099) 35

[2.4.9.1 pH对卤醇脱卤酶酶活及立体选择性的影响](#_Toc686881100) 35

[2.4.9.2 温度对卤醇脱卤酶酶活及立体选择性的影响](#_Toc686881101) 38

[2.4.9.3 金属离子和化学试剂对酶活的影响](#_Toc686881102) 41

[2.4.9.4 卤醇脱卤酶底物谱研究](#_Toc686881103) 43

[2.4.10 卤醇脱卤酶催化1,3-DCP合成手性ECH](#_Toc686881104) 46

[2.4.11 卤醇脱卤酶催化拆分ECH合成手性ECH](#_Toc686881105) 47

[2.4.12 卤醇脱卤酶催化(](#_Toc686881106)*[S](#_Toc686881106)*[)-CHBE合成(](#_Toc686881106)*[R](#_Toc686881106)*[)-HN](#_Toc686881106) 48

[2.5 本章小结](#_Toc686881107) 50

[51](#_Toc686881108) 51

[第三章 环氧化物水解酶的挖掘与表征](#_Toc686881109) 51

[3.1 引言](#_Toc686881110) 51

[3.2 实验材料](#_Toc686881111) 51

[3.2.1 菌株及质粒](#_Toc686881112) 51

[3.2.2 酶与试剂](#_Toc686881113) 51

[3.2.3 主要仪器](#_Toc686881114) 51

[3.2.4 引物](#_Toc686881115) 51

[3.3 实验方法](#_Toc686881116) 52

[3.3.1 培养基](#_Toc686881117) 52

[3.3.2 基因组DNA的提取](#_Toc686881118) 52

[3.3.3 基本分子Th物学方法](#_Toc686881119) 52

[3.3.4 环氧化物水解酶基因克隆](#_Toc686881120) 53

[3.3.4.1 环氧化物水解酶AmEH基因的克隆](#_Toc686881121) 53

[3.3.4.2 环氧化物水解酶AmEH工程菌的构建](#_Toc686881122) 53

[3.3.4.3 环氧化物水解酶PlEH基因的克隆](#_Toc686881123) 53

[3.3.5 重组环氧化物水解酶的诱导表达](#_Toc686881124) 53

[3.3.6 重组环氧化物水解酶的分离纯化](#_Toc686881125) 53

[3.3.7 分析方法](#_Toc686881126) 53

[3.3.8 环氧化物水解酶酶活测定](#_Toc686881127) 53

[3.3.9 重组环氧化物水解酶酶学性质表征](#_Toc686881128) 53

[3.3.10 重组细胞催化拆分合成手性ECH的研究](#_Toc686881129) 53

[3.4 结果与讨论](#_Toc686881130) 53

[3.4.1 AmEH基因的克隆及序列分析](#_Toc686881131) 53

[3.4.2 AmEH在大肠杆菌中的异源表达](#_Toc686881132) 54

[3.4.3 PlEH1和PlEH2基因克隆与序列分析](#_Toc686881133) 54

[3.4.4 PlEH1和PlEH2的诱导表达](#_Toc686881134) 54

[3.3.5 重组环氧化物水解酶的筛选](#_Toc686881135) 55

[3.4.6 重组环氧化物水解酶分离纯化](#_Toc686881136) 56

[3.4.7 环氧化物水解酶酶学性质研究](#_Toc686881137) 56

[3.4.7.1 pH对AmEH酶活及稳定性的影响](#_Toc686881138) 56

[3.4.7.2 温度对AmEH酶活及稳定性的影响](#_Toc686881139) 58

[3.4.7.3 金属离子和化学试剂对酶活力的影响](#_Toc686881140) 59

[3.4.7.4 底物特异性和对映选择性](#_Toc686881141) 61

[3.4.7.5 动力学参数](#_Toc686881142) 62

[3.4.8 环氧化物水解酶拆分外消旋ECH](#_Toc686881143) 63

[3.5 本章小结](#_Toc686881144) 63

[70](#_Toc686881145) 64

[第四章 卤醇脱卤酶立体选择性的分子改造研究](#_Toc686881146) 64

[4.1 引言](#_Toc686881147) 64

[4.2 材料](#_Toc686881148) 64

[4.2.1 菌株与质粒](#_Toc686881149) 64

[4.2.2 酶与试剂](#_Toc686881150) 64

[4.2.3 主要仪器](#_Toc686881151) 64

[4.2.4 引物](#_Toc686881152) 64

[4.3 实验方法](#_Toc686881153) 69

[4.3.1 同源建模](#_Toc686881154) 69

[4.3.2 分子对接](#_Toc686881155) 69

[4.3.3 饱和突变文库的构建](#_Toc686881156) 69

[4.3.4 高通量筛选模型的建立与突变文库的筛选](#_Toc686881157) 69

[4.3.5 卤醇脱卤酶和卤醇脱卤酶突变体的表达与分离纯化](#_Toc686881158) 69

[4.3.6 酶活测定](#_Toc686881159) 69

[4.3.7 酶的动力学参数测定](#_Toc686881160) 69

[4.3.8 分析方法](#_Toc686881161) 69

[4.3.9 突变体全细胞催化1,3-DCP合成手性ECH](#_Toc686881162) 69

[4.4 结果与讨论](#_Toc686881163) 69

[4.4.1 卤醇脱卤酶同源建模](#_Toc686881164) 70

[4.4.2 卤醇脱卤酶突变位点的选择](#_Toc686881165) 70

[4.4.2.1 HheC立体选择性突变位点的选择](#_Toc686881166) 70

[4.4.3 突变文库的构建及筛选](#_Toc686881167) 71

[4.4.4 卤醇脱卤酶及其突变体的分离纯化](#_Toc686881168) 72

[4.4.5 动力学参数的测定](#_Toc686881169) 75

[4.4.6 分子模拟对接研究](#_Toc686881170) 76

[4.4.7 突变体催化1,3-DCP不对称脱卤](#_Toc686881171) 76

[4.5 本章小结](#_Toc686881172) 77

[87](#_Toc686881173) 78

[第五章 环氧化物水解酶立体选择性及活性的](#_Toc686881174) 78

[5.1 引言](#_Toc686881175) 79

[5.2 材料](#_Toc686881176) 79

[5.2.1 菌株与质粒](#_Toc686881177) 79

[5.2.2 酶与试剂](#_Toc686881178) 79

[5.2.3 主要仪器](#_Toc686881179) 79

[5.2.4 引物](#_Toc686881180) 79

[5.3 方法](#_Toc686881181) 80

[5.3.1 同源建模](#_Toc686881182) 80

[5.3.2 分子对接](#_Toc686881183) 80

[5.3.3 饱和突变文库的构建](#_Toc686881184) 80

[5.3.4 高通量筛选模型的建立与突变文库的筛选](#_Toc686881185) 80

[5.3.5 AmEH及其突变体的表达与分离纯化](#_Toc686881186) 81

[5.3.6 酶活测定](#_Toc686881187) 81

[5.3.7 分析方法](#_Toc686881188) 81

[5.3.8 酶动力学参数测定](#_Toc686881189) 81

[5.3.9 全细胞催化拆分ECH](#_Toc686881190) 81

[5.4 结果与分析](#_Toc686881191) 81

[5.4.1 环氧化物水解酶同源建模与结构分析](#_Toc686881192) 81

[5.4.2 分子对接与突变位点的选择](#_Toc686881193) 81

[5.4.3 突变文库的构建与筛选](#_Toc686881194) 82

[5.4.4 AmEH及其和突变体的纯化](#_Toc686881195) 83

[5.4.5 动力学参数的测定](#_Toc686881196) 83

[5.4.6 分子模拟对接研究](#_Toc686881197) 85

[5.4.7 突变体拆分外消旋ECH](#_Toc686881198) 87

[Reference](#_Toc686881199) 91

[5.5 本章小结](#_Toc686881200) 92

[102](#_Toc686881201) 93

[第六章 双酶体系的构建](#_Toc686881202) 93

[6.1 引言](#_Toc686881203) 93

[6.2 实验材料](#_Toc686881204) 93

[6.2.1 菌株与质粒](#_Toc686881205) 93

[6.2.2 酶与试剂](#_Toc686881206) 93

[6.2.3 主要设备及仪器](#_Toc686881207) 93

[6.2.4 引物](#_Toc686881208) 93

[6.3 实验方法](#_Toc686881209) 95

[6.3.1 共表达质粒的构建](#_Toc686881210) 95

[6.3.2 定点突变方法](#_Toc686881211) 97

[6.3.3 重组菌的培养](#_Toc686881212) 97

[6.3.4 重组菌催化1,3-DCP合成手性ECH](#_Toc686881213) 97

[6.3.5 卤醇脱卤酶的固定化](#_Toc686881214) 97

[6.3.6 环氧化物水解酶的固定化](#_Toc686881215) 97

[6.4 结果与讨论](#_Toc686881216) 97

[6.4.1 基因串联共表达系统的构建](#_Toc686881217) 98

[6.4.2 双质粒共表达系统的构建](#_Toc686881218) 98

[6.4.3 双酶体系催化1,3-DCP合成手性ECH](#_Toc686881219) 98

[6.4.3.1 HheC(P175S/W249P)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系](#_Toc686881220) 98

[6.4.3.2 HHDHSg(V137I)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系](#_Toc686881221) 99

[6.4.3.3 HHDHIs和ADEH双酶体系](#_Toc686881222) 100

[6.4.4 固定化酶偶联催化合成手性ECH](#_Toc686881223) 102

[6.5 本章小结](#_Toc686881224) 102

[114](#_Toc686881225) 103

[第七章 结论与展望](#_Toc686881226) 103

[7.1 结论](#_Toc686881227) 103

[7.2 展望](#_Toc686881228) 103

[参考文献](#_Toc686881229) 104

[129](#_Toc686881230) 109

[131](#_Toc686881231) 111

v

英文缩略词及中文对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| (*S*)-CHBE | Ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate | （*S*）-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 |
| ECH | Epichlorohydrin | 环氧氯丙烷 |
| HN | Ethyl (*R*)-4-cyano-3-hydroxybutyate | （*R*）-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯 |
| Kan | Kanamycin | 卡那霉素 |
| EH | Epoxide hydrolase | 环氧化物水解酶 |
| HHDH | Halohydrin dehalogenase | 卤醇脱卤酶 |
| GC | Gas Chromatography | 气相色谱 |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool | 序列局部比对查询 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| dNTP | Deoxynucleotide triphosphate | 四种脱氧核糖核苷酸 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| GC | Gas chromatography | 气相色谱 |
| IPTG | isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside | 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 |
| kb | Kilo-base pair | 千碱基对 |
| kD | kilodalton | 千道尔顿 |
| LB | Luria-Bertani broth | LB 培养基 |
| NCBI | National Center For Biotechnology  Information | 美国生物技术信息中心 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| ORF | Open reading frame | 开放性阅读框 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| PDB | Protein Data Bank | 蛋白质数据库 |
| pI | Isoelectric point | 等电点 |

vi

# 第一章 绪论

## 1.1 环氧氯丙烷概述

环氧氯丙烷（Epichlorohydrin, 简称ECH）是一种重要的有机合成中间体和精细化工产品。其化学名称为3-氯-1, 2-环氧丙烷（3-chloro-1,2-epoxypropane），

别名表氯醇[[1,](#_bookmark159) [2]](#_bookmark160)。ECH分子中含有一个手性碳原子，故其具有一对光学异构体，其结构式如图1-1所示。手性环氧氯丙烷是一种非常重要的的三碳手性药物合成中间体，用于制备降血脂类药物阿托伐他汀、芳氧丙胺醇类β-肾上腺素阻断剂、减肥药左旋肉碱、抗生素海藻唑啉等多种药物，在医药、农药和精细化工等领域有极为广泛的应用[[3-5]](#_bookmark161)。

Cl

O

Cl

O

(*S*) -ECH (*R*) -ECH

图1-1 手性环氧氯丙烷的分子结构式

Fig. 1-1 The molecular structure of chiral ECH

F

Ph

O

N

Ph NH

H

O N

\*

O O

**O**

**Cl**

**\***

O

OH OH OH O N

\*

OH

atorvastatin (anti-cholesterol) H

O

(*S*) -viloxazine (anti-depressive)

O

(*S*) -bisoprolol (β-blocker)

OH O

Cl

N+

OH

Cl L-carnithine (food supplement)

N

H O

Dov-102,677(anti-addictive)

HN

OH H

O N O

(*S*) -carvedilol (b-blocker)

图1-2 手性环氧氯丙烷的用途

Fig. 1-2 The application of chiral ECH.

1

## 1.2 手性ECH的合成方法

ECH生产方法主要有氯丙烯法、醋酸丙烯酯法和甘油氯化皂化法[[6,](#_bookmark162) [7]](#_bookmark163)，前两种方法存在石油资源消耗大，高能耗，高成本，高污染等问题。随着世界范围内生物柴油的规模化的生产和利用，其副产物甘油的有效利用成为研究热点，甘油法工艺将成为未来ECH生产技术的主要发展方向。手性ECH的合成方法主要分为化学法和生物法两大类。化学法主要包括不对称合成法和化学拆分法两种，其中手性ECH的不对称合成是通过手性起始原料来制备手性ECH；化学拆分法是利用具有手性结构的催化剂来立体选择性水解其中一种对映体来获得手性ECH。生物法则是通过微生物或酶的生物催化的途径来制备手性ECH。

### 1.2.1 化学法合成手性ECH

1978年Baldwin等以甘露醇为原料，通过有机合成的方法首次合成了手性

ECH，但收率仅27%, 并且反应过程复杂[[8]](#_bookmark164)。1995年，Jacobsen等利用不对称环氧化的催化剂Cr-Salen和Co-Salen拆分外消旋ECH，得到ee> 97%，收率大于40%的手性ECH[[9]](#_bookmark165).2003年，Kim等人利用配基BF4替代OAc基团制成Salen

（Co-BF4）催化剂用于外消旋ECH的水解拆分，获得ee值大于99%，收率为

44%的手性ECH [[10]](#_bookmark166)。此后，又经过多年的发展，Salen催化剂由单核发展到双核，再发展到现在的聚合Salen催化剂。双核或聚合Salen催化剂相比于单核催化剂，其稳定性大大增加，可回收重复利用，催化效率也有所提高，但是催化剂的制备较复杂，制造成本明显增加[[11-13]](#_bookmark167). Kwon等将Salen（Co）催化剂与BF4和PF6负离子结合生成聚合型催化剂并用于催化外消旋ECH的水解，最终可获得ee值99%，产率43%的手性ECH，该催化剂被回收和重复利用7次后，催化剂的活性几乎没有损失[[14]](#_bookmark168)。中科院上海有机化学研究所丁奎岭等开发的催化剂Bissalen-CoX活性比通用的Jacobsen Salen-Co催化剂高1-2个数量级，实施后工业生产1吨光学纯ECH的催化剂用量由原来的25 kg降为0.8 kg，光学纯ECH收率达到47%以上，比使用原有技术的产率提高3-4%[[15]](#_bookmark169)。总体化学法所使用的催化剂价格昂贵，并且重金属污染环境，规模化生产必然产生诸多问题。因此，利用生物法制备手性ECH的工艺路线符合环境友好，可持续的特点，具有广阔的前景。

2

Co(III) salen complexes

Cl

O

Cl O

Cl O

OH

+ Cl OH

OH

+ Cl OH

图1-3 Co(III) salen 催化剂拆分外消旋ECH的工艺路线

Fig. 1-3 The resolution process ECH by Co(III) salen complexes

### 1.2.2 Th物酶法合成手性ECH

#### 1.2.2.1 氯过氧化物酶催化3-氯丙烯的不对称合成手性ECH

氯过氧化物酶（Chloroperoxidase, EC 1.11.1.10, 简称CPO）其具有广泛的底物适应性和多样化的催化性能，可以催化单加氧、环氧化、过氧化、羟基化等一序列反应，尤其在烯烃的环氧化、炔烃的羟基化方面表现出较高的立体选择性[[16]](#_bookmark170)。氯过氧化物酶的催化下3-氯丙烯可与过氧化物（一般为H2O2）反应生成ECH（图1-4）[[17]](#_bookmark171)。吴金跃等人以3-氯丙烯为原料，叔丁基过氧化氢为氧源，利用氯过氧化物酶催化氧化反应合成手性ECH，（*R*）-ECH的ee值为97.5%，收率可达67.3%[[18]](#_bookmark172)。虽然该方法合成手性ECH的理论收率可达100%，但是其工业化的前景受到氧源价格、酶源和酶活性及稳定性、产物ee值偏低等因素的限制。

Cl

Cl

O

H2C CH CH2

Chloroperoxidase

H2O2

图1-4 氯过氧化物酶催化3-氯丙烯合成手性ECH

Fig. 1-4 Production of chiral ECH by chloroperoxidase from 3-chloropropene.

#### 1.2.2.2 酶法合成手性2,3-DCP制备手性ECH

1.2.2.2.1卤醇脱卤酶拆分外消旋2,3-DCP

卤醇脱卤酶催化邻卤醇脱卤表现出较高的立体选择性。1992年，日本Kasai等筛选到两株产卤醇脱卤酶的微生物菌株：产杆碱菌（*Alcaligenes* sp. DS-K-S38）和假单胞菌（*Pseudomonas* sp. OS-K-29）[[19,](#_bookmark173) [20](#_bookmark174)]。它们能选择性降解外消旋2,3-二氯-1-丙醇（2,3-DCP）中的一种对映体，从而获得光学纯的手性2,3-DCP，再对其进行碱处理可获得ee值达99.5%以上的（*R*）-ECH和（*S*）-ECH（图1-5）。Spelberg等利用卤醇脱卤酶HheC拆分外消旋2, 3-DCP，（*S*）-2, 3-DCP的ee值大于99%，收率高达49.5%[[21]](#_bookmark175)。由此可见，通过此方法合成的ECH的光学纯度非常高，但是卤醇

3

脱卤酶对2,3-DCP的活力普遍偏低。另外外消旋2,3-DCP的价格较高，手性2, 3-DCP的价格也高于手性ECH的价格，致使该条线路缺乏经济效率。

*Alcaligenes*. sp. DS-K-38 Cl

Cl OH

Halohydrin dehalogenase

Cl O

Cl

Cl OH

(*R*) -2,3-DCP (*S*) -ECH

Cl

(*R, S*) -2,3-DCP

Cl

*Pseudomanas.* sp. OS-K-29

OH

Cl O

(*S*) -2,3-DCP (*R*) -ECH

图1-5 卤醇脱卤酶拆分(*R, S*) -2,3-DCP及合成手性ECH

Fig. 1-5 Bioresolution of(*R, S*) -2,3-DCP by HHDH and synthesis of chiral ECH

1.2.2.2.1卤烷脱卤酶不对称脱卤催化三氯丙烷合成手性2, 3-DCP

卤代烷烃脱卤酶（Haloalkane dehalogenase, HLD）通过催化卤代脂肪族化合物的碳-卤键的水解断裂，产生对应的醇和氯化氢。目前经过功能鉴定的HLD共20个，全部来自于细菌，包括DadA、DhlA、DadB、DbjA、DhaA和LinB。

HLD具有较宽的底物谱，可以作用于不同链长的氯代、溴代和碘代烷烃、烯烃、环烷烃和卤代氨基化合物[[22]](#_bookmark176)。Janssen对来源于*Rhodococcus rhodochrous*的卤烷脱卤酶（DhaA）进行分子改造，得到的卤烷脱卤酶突变体可以立体选择性催化1, 2, 3-三氯丙烷脱卤合成手性2, 3-DCP。其中突变体r5-97S可以催化3-氯丙烷合成（*S*）-2, 3-DCP，其ee可以达到97%。突变体r5-90R可以催化3-氯丙烷合成（*R*）-2, 3-DCP，其ee可以达到90% [[3]](#_bookmark161)。

Cl

Cl OH

Haloalkane dehalogenase

Cl O

Cl

Cl Cl

(*R*) -2,3-DCP (*S*) -ECH

Cl

TCP

Cl OH

Cl O

(*S*) -2,3-DCP (*R*) -ECH

图1-6 卤烷脱卤酶催化1, 2,3-氯丙烷不对称脱卤合成手性2, 3-DCP

Fig. 1-6 Asymmetric conversions of 1,2,3-trichloropropane for synthesis of chiral 2,3-DCP

By haloalkane dehalogenase

#### 1.2.2.3 卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH

卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成手性ECH理论收率可以达到100%，是目前研

4

究最活跃的合成路线（图1-7）。Assis等从野生菌*Arthrobacter erithii* H10a中分离纯化获得卤醇脱卤酶DehA，其可以催化1, 3-DCP一步脱卤合成ee最高可达

89.3%的（*R*）-ECH[[23]](#_bookmark177). Tetsuji等从*Corynebacterium* sp. N-1074中的分离纯化获得卤醇脱卤酶Ia和Ib，其中Ib同样能高效催化1, 3-DCP合成（*R*）-ECH。反应初始阶段（*R*）-ECH的ee值最大可达90%，但随着反应进行ee值不断下降至零[[24](#_bookmark178)]。卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP一步脱卤合成手性ECH存在几个关键问题需要解决：（1）卤醇脱卤酶催化的卤醇脱卤反应是一个可逆反应，脱卤和卤化在一定程度时会达到平衡，致使卤醇的脱卤反应不能彻底完成。当体系环氧产物和氯离子浓度增加平衡更倾向于朝逆反应方向进行，致使环氧化物的ee值逐渐降低。（2）卤醇脱卤酶可以使手性环氧氯丙烷发生消旋作用，同样会使得产物ee下降。（3）此反应中产物ECH对卤醇脱卤酶表现出较强的抑制作用。

Cl

O

OH

Cl Cl

(*S*) -ECH

1,3-DCP

Cl

O

(*R*) -ECH

Halohydrin dehalogenase

图1-7 卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH

Fig. 1-7 Asymmetric conversions of 1,3-DCP for synthesis of ECH by HHDH

#### 1.2.2.4 卤醇脱卤酶催化拆分外消旋ECH制备手性ECH

在非自然亲核试剂的介导下，卤醇脱卤酶可以立体选择性的催化环氧化物的开环反应。因此在亲核试剂的介导下，卤醇脱卤酶可以选择性拆分外消旋ECH合成手性ECH和光学纯的β-取代醇，反应方程如图1-8所示。ECH为短链小分子环氧化物，据文献报道，卤醇脱卤酶HheA和HheB对短链环氧化物立体选择

性较差，而卤醇脱卤酶HheC对其具有较高立体选择性。Spelberg等以N3为亲核试剂，利用卤醇脱卤酶HheC催化拆分外消旋ECH，获得ee> 99%的(*R*) -ECH，对映选择率（*E*）达到21[[25]](#_bookmark179)。Jin等以NO2-作为亲核试剂，HheC催化12.8 mM 外

-

消旋ECH合成(*R*) -ECH，其收率为41%，ee> 99%[[26]](#_bookmark180). 卤醇脱卤酶介导的ECH 拆

分反应的立体选择性受到亲核试剂种类的影响。例如，Assis等利用卤醇脱卤酶

DehA拆分外消旋的ECH，以Cl-为亲核试剂时，可获得ee为63.6%的（*S*）-ECH，

5

以Br-为亲核试剂时，则可获得ee为87.4%的（*R*）-ECH[[23](#_bookmark177)]。该方法获得的手性ECH选择性高，但是当浓度增加后，其收率有明显的下降。并且存在产物抑制和亲核试剂对酶的毒害作用，难于实现工业化。

Halohydrin dehalogenase

Cl

O

Nu

Cl O

(*S*) -ECH

OH

+ Nu Cl

OH

Cl O



(*R*) -ECH

+ Nu Cl

图1-8 卤醇脱卤酶拆分外消旋ECH合成手性ECH

Fig. 1-8 Synthesis of chiral epichlorohydrin by resolution of racemic ECH with HHDH

#### 1.2.2.5 环氧化物水解酶催化拆分外消旋**ECH**制备手性ECH

环氧化物水解酶是一类能立体选择性地催化外消旋环氧化合物水解生成手性环氧化物和相应邻二醇的酶[[27]](#_bookmark181)。利用环氧化物水解酶催化外消旋ECH选择性水解是合成手性ECH最主要的途径之一，其催化过程如图1-9所示。

Epoxide hydrolase H2O

Cl

O

Cl O

(*S*) -ECH

OH

+ HO Cl

OH

Cl O



(*R*) -ECH

+ HO Cl

图1-9 环氧化物水解酶拆分外消旋ECH合成手性ECH

Fig. 1-9 Synthesis of chiral ECH by resolution of racemic ECH with EHs.

迄今为止，环氧化物水解酶已被广泛应用于各类手性环氧化物的生产和制备中。单取代型环氧化物是现代环氧化物水解酶研究领域的一个难点，由于其空间位阻极小，给手性识别带来困难。Choi等利用*A. niger*在环己烷-水（*V*环己烷：*V* 水

=98:2)微水相体系中拆分ECH，得到ee> 99%，收率为20%的(*S*) -ECH[[28]](#_bookmark182).2004年，Kim等利用含有粘红酵母（*Rhodotorula glutinis*）环氧化物水解酶基因的重组毕赤酵母中（*Pichia pastoris*）细胞拆分外消旋ECH，得到ee> 99%，收率为26%的(*R*) -ECH[[29]](#_bookmark183).2007年，Lee等人利用胶红酵母（*R. glutinis*）环氧化物水解酶在正十二烷-水(含2.5% (v/v))微水相体系催化拆分20 mM外消旋ECH, 得到ee值为

99%的(*R*) -ECH，收率为28.5%[[30]](#_bookmark184).2010年Woo等人将来源于*Novosphingobium*

6

*aromaticivorans*的环氧化物水解酶在*E. coli*中进行重组表达，利用重组细胞拆分制备（*S*）-ECH，当底物浓度50 mM时，产物ee值高达99.99%，收率最高为

20.7%[[31]](#_bookmark185).2011年，Liu等利用红冬孢酵母(*Rhodosporidium toruloides*)环氧化物水解酶，在水相体系中催化外消旋ECH得到ee和收率分别为为99%和18%的(*R*) -ECH[[32]](#_bookmark186).2012年，Jin等从筛选到一株产环氧化物水解酶的黑曲霉(*Aspergillus niger* ZJB-09173)，在环己烷双相体系中，该菌株能拆分153.6 mM

ECH得到ee值为98%，收率为18.5% (*S*) -ECH [[33]](#_bookmark187)。2013年，Jin等人合成了来自于*A. radiobacter*AD1的环氧化物水解酶的突变体基因，构建了高效表达环氧化物水解酶的重组大肠杆菌，然后利用重组细胞在pH 8.0, 30°C下拆分25.6 mM外消旋ECH, (*R*) -ECH的ee值≥99%，收率最高达42.7%。通过底物的一次性投加，底物浓度最大可达320 mM；若通过底物连续流加的方式，底物浓度最大

达448 mM；若采用两相反应体系，底物浓度可提高至512 mM [[34]](#_bookmark188)。环氧水解酶拆分外消旋ECH具有高活力、高立体选择性、不需要金属离子和辅酶等优点，受到广泛关注。但是环氧化物水解酶仍存在一些不足：环氧化物水解酶的*E*值普遍偏低，拆分得到的手性ECH收率低，同时环氧化物水解酶底物耐受性差、温度稳定性差等因素制约了该酶的工业化应用。

## 1.3 环氧化物水解酶

环氧化物水解酶(Epoxide hydrolase, EH, EC 3.3.2.3)能够立体选择性地催化外消旋环氧化物的水解，生成相应的1,2-二醇和光学活性的环氧化物[[35-37]](#_bookmark189)，广泛存在于几乎所有生物体。1976年Hammock等发现在哺乳动物体内外源性毒性环氧化物的代谢过程中，环氧化物水解酶起着重要的作用[[38]](#_bookmark190)。环氧化物水解酶的主要生理功能包括：在微生物体内参与微生物环氧类碳源的代谢，在植物和昆虫体内参与含环氧类信号分子的代谢与调控及在哺乳动物体内降解具有潜在毒性的环氧化物等[[39]](#_bookmark191)。通常按照各类环氧化物水解酶的底物特异性差异及在细胞内分布区域的不同，将其分为5类[[40]](#_bookmark192)：①微体环氧化物水解酶（microsomal epoxide hydrolase, mEH）；②可溶性环氧化物水解酶（soluble epoxide hydrolase, sEH）；

③胆固醇环氧化物水解酶（cholesterol epoxide hydrolase）④白三烯A4环氧化物水解酶（leukotriene A4 epoxide hydrolase）；⑤Hepoxilin环氧化物水解酶。其中，微生物环氧化物水解酶来源广泛，获得方便，且具有很高的立体选择性，在手性环氧化物和手性二醇的合成中具有巨大的应用潜力。

7

### 1.3.1 环氧化物水解酶的结构及催化机理

目前已知的环氧化物水解酶根据其催化机理的不同可将其分为α/β水解酶类

EHs、柠檬烯环氧化物水解酶类和白三烯A4环氧化物水解酶类。其中目前发现的环氧化物水解酶大部分属于α/β折叠水解酶家族，包括核心结构和帽子结构两个功能性的结构域[[41-45]](#_bookmark193)，其中核心结构是由8个β*-*折叠片组成的区域，帽子结构由5个α-螺旋组成的区域。环氧化物水解酶氨基酸序列保守区域主要有：（1）催化三联体D/D或E/H；（2）H-G-X-P motif, X代表任意氨基酸残基，常见的为Trp或Phe等氨基酸残基；（3）A/G/V-G/H/F-D-W/F/I/Y-G-G/A motif；（4）至少一个帮助开环的Y。

α/β折叠水解酶家族催化环氧化物的水解大致可分为两步催化机制[[46]](#_bookmark195)：第一步，Asp残基作为亲核试剂进攻环氧化物上的碳原子，与底物形成共价酯中间体；第二步，在另一Asp残基/Glu残基的辅助下，His的咪唑环夺取水分子中的质子从而活化水分子，被活化的水分子水解酯中间体，生成产物邻二醇（图1-10）。水解过程中邻近酯中间体的两个主链氨基酸组成的氧洞对羰基氧的所形成的氧负离子起着稳定作用，另外来自帽子结构域的保守的Tyr与环氧底物中的氧原子形成氢键，起着固定环氧底物和协助开环的作用[45]。

Tyr215

Tyr152

O O

Tyr215

Tyr152

O O



Tyr215

Tyr152

O O



H H H H



O O O O

H H

O OH

Asp107 O

H

O

Step1

Asp

O

107

H

O

Step 2

HO

Asp107 O

H H

N N N

N

H

Asp246 O O

His275

N His275

H

Asp246 O

O

N His275

H

Asp246 O

O

图1-10 环氧化物水解酶催化机制

Fig. 1-10 Catalytic mechanism of EH

2003年，Arand等人解析了来自于*Rhodococcus erythropolis* DCL14的柠檬烯1,2-环氧水解酶（LEH）的晶体结构[[47]](#_bookmark196)。LEH类环氧化物水解酶是具有一个由

4个α-螺旋和6个β-折叠所组成α/β桶状结构，桶的内侧形成一个深入蛋白内部

8

的底物结合口袋，其催化中心是由Asp101、Asp132和Arg99残基组成。不同于α/β折叠水解酶，LEH通过酸催化单步协同反应完成水解：在Asn55和Tyr53的辅助下，Asp132夺取H2O中的一个质子，形成的氢氧根负离子亲核进攻环氧碳原子导致环氧开环，与此同时Asp101将质子传递给环氧氧原子，反应完成后

Asp132再将质子通过Arg99传递给Asp101，使酶保持反应初始状态[45]。由此可以看出在整个反应过程中，并没有涉及到环氧底物与酶的中间体状态，因此LEH类环氧化物水解酶有可能接受水以外的其他亲核试剂实现环氧开环，生成除二醇以外的其它产物[[48]](#_bookmark197)。

2001年，Thunnissen等人解析得到了来源于人的白三烯A4水解酶晶体结构

[[49]](#_bookmark198). 白三烯A4水解酶结构属于α-α超螺旋折叠，由N端结构域、C端结构域和催化结构域三部分组成。催化结构域包含一个锌离子结合位点，同时具有白三烯

A4水解酶和氨基肽酶活性。白三烯A4水解酶催化水解反应时，配位结合于His295、

His299和Glu318的Zn2+作为Lwies酸介导环氧开环，产生的C6碳正离子由白三烯中的共轭三烯传递至C12，随后从Asp375活化的水分子中夺取羟基完成水解反应[45]。

### 1.3.2 环氧化物水解酶的应用

目前对环氧化物水解酶在合成中的应用研究主要是催化生成光学活性的环氧化物和二醇[[50-52]](#_bookmark199)。光学活性环氧化物至少含有一个手性碳，通过不同亲核试剂选择性开环和官能团转换等反应，可以合成许多重要的手性化合物中间体[[53]](#_bookmark200)。

Botes等人用来源于*Rhodotorula araucariae* CBS 6031的环氧化物水解酶水解拆分1, 2-环氧辛烷，可获得ee值大于98%，收率大于42%的（*S*）-1,2-环氧辛烷。若单取代基中含有苯环或类似苯环的基团（如吡啶），则酶的选择性会有明显的提高[[54]](#_bookmark201)。Genzel等通过Y215F突变提高了ArEH的对2-吡啶环氧乙烷的对映选择性，以34.5%的收率合成了（*R*）-2-吡啶环氧乙烷（> 99% ee）。利用重组AnEH作为催化剂，Genzel等直接以纯底物1-氯-2-(2, 4-二氟苯基) -2, 3-环氧丙烷作为两相反应的有机相，使反应体系中底物浓度达500 g/L，以2850 g L-1d-1时空产物完成了拆分反应，(*S*) -1-氯-2-（2,4-二氟苯基）-2, 3-环氧丙烷的收率为41.5%[[55]](#_bookmark202). (*S*) -苯基缩水甘油醚类衍生物是普萘洛尔、美托洛尔等肾上腺素阻断剂药物合成的重要前体。许建和等利用巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）ECU 1001优先水解(*R*) -苯基缩水甘油醚类衍生物，残留(*S*) -型底物的ee 值达99.5%以上，收率达

9

44%[[56]](#_bookmark203). (*S*) -布洛芬合成中最关键的一步是通过环氧化物水解酶的对映选择性水解，实现4-异丁基-α-甲基苯乙烯氧化物由消旋体向（*S*）-型对映体的转化。Cleij等人利用黑曲霉环氧化物水解酶对该底物进行转化，对映体选择率20[[57](#_bookmark204)]。吡咯类抗真菌剂D0870是一种对口腔-食道念珠菌有特效的药物，其合成过程中最关键的是前体物（*S*）-型2-(2,4-二氟苯基) -3-氯-1,2-环氧丙烷的获得。Monfort等人利用黑曲霉环氧化物水解酶水解拆分外消旋的2-(2,4-二氟苯基) -3-氯-1, 2-环氧丙烷，获得ee值为99.9%，收率为41.5%的（*S*）-型2-(2, 4-二氟苯基) -3-氯-1, 2-环氧丙烷[[58]](#_bookmark205)。王云ft等人在*E. coli*中重组表达顺式-环氧琥珀酸水解酶，用于生物催化制备L-(+) -酒石酸，底物总浓度达3 M，在15 m3搅拌釜式反应器中进行了中试规模放大，时空产率可达450g L-1d-1[[59]](#_bookmark206). Yildirim等人将环氧化物水解酶AnEH通过形成希夫碱固定化到载体Eupergit C250L上，并用戊二醛进行交联。固定化后

AnEH对底物氧化苯乙烯表现出高于游离酶2.5倍的对映选择性和稳定性，对1 M氧化苯乙烯的动力学拆分获得了99% ee与41%的收率的（*S*）-氧化苯乙烯，且固定化酶重复使用5次后仍能保留90%以上的活性，具有很高的工业应用潜力[[60]](#_bookmark207)。

Kong等人通过半饱和突变对环氧化物水解酶*Bm*EH的活性位点结构进行突变，成功地提高了*Bm*EH催化一系列大位阻芳基缩水甘油醚类环氧底物的催化活性

（图 1-11）[[61]](#_bookmark208)。突变体 *Bm*EHF182T 成功应用于普萘洛尔的合成前体萘基缩水甘油醚（NGE）的合成。在异丙醚/异辛烷/缓冲液组成的（32.5/17.5/50）两相体系中， 5 g DCW/L 的 *Bm*EHF128T 整细胞高效催化 100 g/Ltotal *rac*-NGE 水解拆分，催化剂的转化数达 70,000。此外，由于水解产物 NPD 在两相反应体系中的低溶解性， 水解产生的(*R*)-NPD 可随着反应进行从反应体系中持续析出，有助于改善(*R*)-NPD 的光学纯度(> 99.5% ee)和简化反应后的分离纯化过程。在最优条件下， 拆分反应的产物(*S*)-NGE (99% ee)与(*R*)-NPD 的时空产率分别达到了136 g L−1 d−1 和 139 g L−1 d−1。从(*S*)-NGE 和(*R*)-NPD 出发，最终分别以 31.4%和 44.8%的摩尔收率，合成得到(*R*)-和(*S*)-普萘洛尔。

10

O O

R

BmEH

Buffer, RT

O H O

+

R

H

O OH

OH

R

*rac*-epoxide (*rac*-a)

R=H (1a)

R=2-OMe (2a)

R=2-Et (3a)

R=2-Allyl (4a) R=2-Allyoxyl (5a) R=2-Cyano (6a)

*S*-epoxide (*S*-a) *R*-1,2-diol (*R*-b)

O

O

O

N

O

O

R=3-Me (7a) R=2,3-Me2 (8a)

9a N

S N

10a

图 1-11 BmEH突变体水解拆分芳基缩水甘油醚类环氧底物

Fig. 1-11 Typical epoxide substrates chosen to assay variants of the epoxide hydrolase

BmEH in hydrolysis

2013年Wu等人将来源于*Sphingomonas* sp. HXN-200的环氧化物水解酶

（SpEH）在*E. coli*中进行重组表达，并将其应用于苯基环氧类环氧化物和内消旋环氧化物的拆分（图1-12）。SpEH催化100-200 mM不同取代基的苯基环氧底物，最后剩余*S*构型的环氧底物的ee值在98%-99.5%之间，收率达37.6-46.5%。同时SpEH可以催化1, 2-环氧环戊烷，环乙烯氧化物和N-苄氧羰基-3, 4-环氧环戊烷获得ee（86-93%），收率（90-99%）的(*R*, *R*) -邻位反式二醇，并已达到克级规模制备。在正己烷和水（1:1）组成的两相体系，利用重组SpEH作为催化剂，催化1 M苯基环氧乙烷，(*S*) -苯基环氧乙烷最终浓度可以达到（51g/L有机相）。

O

+H2O

O

*E. coli* SpEH +

OH \* O

\*

HO

\*

N

\* O OH

*E. coli* SpEH \* OH

\*

\*

+

+H2O

N N

R 1: R=H

R R

(*S*) -1: R=H

CO2Ph

CO2Ph

CO2Ph

2: R=2-Cl

3: R=3-Cl

4: R=4-Cl

5: R=3-F

6: R=4-F

7: R=3-Br

*E. coli* SpEH

O

n

+H2O

(*S*) -2: R=2-Cl

(*S*) -3: R=3-Cl

(*S*) -4: R=4-Cl

(*S*) -5: R=3-F

(*S*) -6: R=4-F

(*S*) -7: R=3-Br OH

OH

(+/-) -8 (-) -8

O

O

*E. coli* SpEH

+H2O

N N

n CO2CH2Ph

CO2CH2Ph

9: n=1

10: n=2

(1*R*,2*R*) -12: n=1

(1*R*,2*R*) -13: n=2

11 (3*R*,3*R*) -14

图1-12 重组SpEH 催化拆分苯基环氧类环氧化物和内消旋环氧化物

Fig. 1-12 Enantioselective hydrolysis of racemic and meso-epoxides with recombinant*E. coli*

(SpEH) expressing EH from *Sphingomonas* sp. HXN-200

手性醇特别是手性芳基邻二醇是许多具有特殊功能的药物、农药和信息素的

11

重要中间体。近年来手性芳基邻二醇类化合物的合成与应用研究引起了人们的广泛关注。光学活性芳基邻二醇的制备，可以从外消旋的芳基环氧化物开始，经环氧水解酶催化开环得到。Furstoss等利用固定化*A. niger*粗酶选择性地水解对硝基氧化苯乙烯并结合酸水解的方法合成*R*型二醇，用于合成降血压药物*R*-Nifénalol，最终产物ee和收率为99%和58% [[62]](#_bookmark209). Xu等首次在绿豆中发现两种新的环氧水解酶（mbEHs A和mbEHs B），两种酶分别作用于（*R*）-构型底物环氧乙烷环的β-位和（*S*）-构型底物环氧乙烷环的α-位，能催化消旋芳基环氧乙烷的对映体汇聚性水解合成理论收率达100%的（*R*）-芳基邻二醇[[63]](#_bookmark210)。Cao等将来自于*Solanum tuberosun*的环氧化物水解酶（S*t*EH）和*A. radiobacter* AD1的环氧化物水解酶（EchA-I219F）耦合同步水解拆分外消旋的苯基环氧乙烷，可以对映汇聚水解合成99%收率和98%ee的（*R*）-苯基乙二醇（图1-13）[[64]](#_bookmark211)。

虽然近年已开发了多个具有工业应用潜力的环氧化物水解酶应用项目，但对于不同的目标底物仍存在催化活力低、底物溶解度限制、底物的毒害和产物的抑制、生物催化剂操作稳定性差、产品提取过程繁琐等一系列可能存在的问题，等待研究人员解决。

OH

OH OH

OH

+

O OH

\* StEH OH

EchA-I219F

OH OH

OH OH

+

图1-13 EchA-I219F或和StEH催化外消旋苯基环氧乙烷对映体选择性水解

Fig. 1-13 Enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxides hy EchA-I219F or/ and StEH

### 1.3.3 环氧化物水解酶的开发

环氧化物水解酶来源广泛，微生物易于培养且极具多样性，是环氧化物水解酶的主要来源。自上世纪90年代起，国内外陆续从陆地和海洋中发现了大量的产环氧化物水解酶的细菌、真菌，其中许多环氧化物酶能够立体选择性水解环氧化合物。最初的筛选主要是从已保藏的微生物菌株中筛选能够有效降解烯烃的菌

12

株（能水解由此产生的环氧中间体）或能耐受环氧化物毒性的菌株，从而再进一步检测其环氧化物水解酶活性[45]。而以环氧化合物作为唯一碳源对采集样品进行富集培养筛选或逐步提高环氧化合物浓度进行驯化筛选，可针对特定环氧底物从自然界中广泛筛选环氧化物水解酶产生菌株。至今为止已有发现的产环氧化物水解酶微生物菌株主要来自于*Rhodococcus*、*Rhodosporidium*、*Agrobacterium* 、

*Aspergillus*、*Bacillus*、*Corynebacterium*、*Beauveria*、*Pseudomonas*、*Rhodotorula*、

*Streptomyces*、*Trichosporon*等属[[65-69]](#_bookmark212)，此外也从绿豆、拟南芥、马铃薯、大豆等植物资源中发现了具有应用潜力的环氧化物水解酶[[63,](#_bookmark210) [70-73]](#_bookmark215)。但是由于野生菌中可能同时含有多种不同性能的环氧化物水解酶并且其环氧化物水解酶的表达量很低，因此存在产酶活力低及对映体选择性不高等问题。对产酶野生菌进行产酶条件优化或者进行酶的分离纯化不仅耗时而且效果不明显。

随着生物信息学的发展、基因序列信息的积累以及基因工程技术的进步，快速获得新的环氧化物水解酶基因已成为可能。许多经典的环氧化物水解酶如来源于*A. niger*、*A. radiobacter*、*R. glutinis*和*S. tuberosum*的环氧化物水解酶基因都已被克隆并重组表达[[32,](#_bookmark186) [67,](#_bookmark213) [74,](#_bookmark216) [75]](#_bookmark217)。随着基因组测序技术的进步，急剧增加的基因组序列信息为新酶的挖掘带来了前所未有的机遇，基因数据挖掘技术已成为当下快速开发新酶的有力手段。通常可采用两种方法：基因组狩猎法（Genome hunting）和数据库挖掘法（Data mining）。基因组狩猎法是针对某一微生物的全基因组序列进行生物信息学分析，预测开发阅读框，通过搜索及比对获得候选酶基因。如许建和等利用巨大芽孢杆菌QMB1551 的基因组序列信息，预测巨大芽孢杆菌

ECU1001的环氧化物水解酶序列，从中克隆得到了环氧化物水解酶基因序列，并在大肠杆菌中异源表达[[76]](#_bookmark218)。Kumar等人根据*Cupriavidus metallidurams*-CH34基因组预测的环氧化物酶基因成功克隆得到环氧化物酶基因，然后在大肠杆菌中异源表达[[77]](#_bookmark219)。Seunaha等人根据*C. crescentus*基因组预测的环氧化物水解酶基因序列，克隆得到了对苯基环氧乙烷有活性的重组环氧化物水解酶[[78](#_bookmark220)]。Woo等人根据*N. aromaticivorans*的基因组信息，成功克隆表达了环氧化物水解酶基因，并应用拆分环氧氯丙烷[[79]](#_bookmark221)。数据库挖掘法是利用已知的酶序列作为探针，在整个公共基因数据库中挖掘同源序列，经过序列分析，获得候选酶基因。相比基因组狩猎法而言，该方法所涉及资源更广，不再局限于单个特定微生物的基因组挖掘。该方法的局限在于必须有已知酶序列作为探针，因而通常被用以寻找可催化常见

13

底物的酶。

### 1.3.4 环氧化物水解酶的分子改造

现代分子生物学、基因组学、微生物学等学科的发展为我们提供了新的技术手段，使我们一方面从自然界中获得丰富的新酶源，另一方面能够对现有酶利用定向进化或理性设计方法进行分子改造，从而获得适用于工业应用的、具有优良性能的工程酶。随着环氧化物水解酶晶体结构的解析和结构功能关系的深入研究，结合高效饱和突变技术和环氧化物水解酶活性和选择性的高通量筛选方法，通过分子定向进化与理性设计获得高活性和高对映选择性的环氧化物水解酶已成为该领域的研究的主要方向[[45,](#_bookmark194) [80-83]](#_bookmark222)。

#### 1.3.4.1 环氧化物水解酶的高通量筛选方法

环氧化物水解酶酶活快速检测方法大都是基于底物或者产物与显色试剂的反应，根据颜色变化判断底物或产物的变化来定性检测或比色法定量检测环氧化物水解酶活。已有多篇文献总结了环氧水解酶的高通量筛选方法[[45,](#_bookmark194) [69,](#_bookmark214) [84]](#_bookmark223)，主要包括：1）紫外可见光分光光度法（UV/VIS），该法虽然快速简便，但是灵敏度并不高，而且适用范围相对窄，仅用于在一定波长范围内有比较高吸收值的环氧化物；2）通过NaIO4 氧化二醇形成醛或酮，然后结合荧光光度法或分光光度法测定醛或酮的生成量来计算酶的活性；该方法直接检测产物生成量，降低了测定酶活过程中可能出现的假阳性现象，并且检测快速方便、应用潜力大[[85,](#_bookmark224) [86]](#_bookmark225)；3）NBP (4-对硝基苄基嘧啶)法，NBP能与环氧化物反应生成紫色染料，可在600 nm处进行检测；该方法灵敏度比较高，可用于酶或细胞的酶活检测[[87]](#_bookmark226)；4) Reetz等建立了一种利用电喷雾电离质谱（ESI-MS）高通量法测定环氧化物水解酶的对映选择性的方法，以1: 1混合的*R*-型环氧化物与氘代*S*-型环氧化物作为底物，反应后由于*R*-和*S*-构型的底物或产物的荷质比各不相同，因此可以根据其质谱分析结果确定环氧底物和产物二醇的ee值，从而确定对映选择性[[88]](#_bookmark227)；5）van

Loo建立了一种环氧化物水解酶活性平板筛选方法，以番红O为指示剂，在含有1, 2-环氧丁烷的琼脂平板上对分子定向进化改造的产环氧化物水解酶菌株进行筛选，根据菌落颜色挑选活性菌株（有活性的为红色，无活性的有透明圈）[[89]](#_bookmark228)。

#### 1.3.4.2 环氧化物水解酶的理性设计

酶的理性设计是建立在人们对酶结构-功能的关系以及催化机理的了解的基础上，对选定的位点进行突变，从而优化酶分子的各种性质。近年来，随着结构

14

生物学、分子动力学模拟、蛋白质折叠机制等领域的发展，理性设计得到更广泛的应用。酶的理性设计已经在许多领域取得成功，对于提高酶的催化活力，改变酶分子的底物特异性、提高稳定性都有成功的例子。随着酶的分离纯化和结构测定技术的发展，多个来源于不同生物的环氧化物水解酶的晶体结构已被解析，近年来关于通过定点突变对环氧化物水解酶进行理性设计改造的报道也逐渐增多。

Rink等人根据ArEH的结构信息，将其中保守的参与环氧开环和环氧底物结合的两个Tyr中的一个突变为Phe后，突变酶对芳香类环氧化合物的对映选择性提高了2-5倍[[90,](#_bookmark229) [91]](#_bookmark230)。Thomaeu等根据土豆环氧化物水解酶StEH的晶体结构以及定点突变、稳态动力学等实验结果鉴定了StEH中质子传递链及关键残基，相关的突变Y149F和H153F破坏了质子传递链中蛋白质-水的氢键作用，突变酶对反式二苯乙烯氧化物的对映选择性提高了30倍，然而突变酶的稳定性却显著下降。此外，对于StEH中核心结构域与盖子结构域之间的盐桥进行改造的突变体K179Q、

E215Q、R236K和R236Q，导致酶的稳定性及其对底物2-甲基苯乙烯氧化物的位置选择性发生改变[[92]](#_bookmark231)。Choi等通过同源建模方法模拟了*Mugil cephalus*环氧化物水解酶的结构，根据结构设计的三点突变体F193Y/W200L/E378D对苯乙烯氧化物的催化活性提高了35倍[[93]](#_bookmark232)。冯红等同样利用同源建模的方法模拟了*Phanerochaete chrysosporium*环氧化物水解酶的三维结构，并通过分子对接分析了酶与底物苯乙烯氧化物的结合方式，据此针对其活性位点周围残基的突变

W106I使其对映选择性发生了翻转，E值由10.5（*R*）转变为2.6(*S*)[[94]](#_bookmark233)。许建和等根据获得的BmEH的晶体结构信息，对酶热点位置Met145和Phe128进行定点突变，最佳单点突变体对芳基缩水甘油醚类环氧底物的活力提高了达6-430倍[[61]](#_bookmark208)。

Loo等对来源于*A. radiobacter*的环氧化物水解酶（EchA）的Phe108进行定点突变，突变体F108C对2, 3-环氧丁烷催化活性提高了7倍，F108A对环氧环己烷催化活性提高150倍[[95]](#_bookmark234)。

#### 1.3.4.3 环氧化物水解酶的半理性设计

酶分子中对催化功能具有重要作用的氨基酸残基只有少数。定向进化对整个蛋白质序列进行突变，造成了大部分突变为无效突变，筛选突变体要浪费大量精力和时间。酶的半合理设计途径可以结合定向进化与理性设计的优点，将随机突变的目标集中在少数特异性位点上，有效降低突变库的容量，从而提高获得阳性

15

结果的可能性。

Reetz等开发了一种半理性设计方法-组合活性位点饱和突变（Combinatorial Active-site Saturation Testing, CASTing），与单点突变相比获得阳性突变体的机率更高，同时跟分子定向进化相比突变库规模大大缩小[[96]](#_bookmark235)。Reetz等利用该方法对

AnEH对映体选择性的进行半理性分子改造，最终将突变体的*E*值由从原始酶的

4.6提高到115[[97]](#_bookmark236)。另外该团队对来自*R. erythropolis* DCL 14柠檬烯环氧化物水解酶进行CASTing改造，获得了具有相反立体选择性的突变体，并被成功应用于内消旋环氧化物的去消旋化[[98]](#_bookmark237)。Kotik等也利用组合饱和突变方法对来自于*A. niger* M200环氧化物水解酶进行对映会聚水解能力的分子改造，经过5轮反复饱和突变，获得的最优的酶突变体催化苯乙烯氧化物或对氯苯乙烯氧化物完全水解合成对应醇产物的ee值达70%，将此突变体与原始环氧化物水解酶串联水解底物，产物ee值最高可达到88-91%[[99]](#_bookmark238)。

#### 1.3.4.4 环氧化物水解酶的定向进化

酶的定向进化是指在不需要事先了解酶的结构信息和催化机制的条件下，通过易错PCR随机突变或者DNA重组等进化策略对酶基因进行分子改造，利用高通量筛选方法筛选获得理想生物催化剂。定向进化还可以通过突变位点和功能上发生相应变化的关系来探索酶的结构-功能关系和催化机理，从而进一步指导酶的分子改造。

Reetz等利用分子定向进化手段对AnEH的对映选择性进行了改造，利用易错PCR 结合ESI-MS 高通量筛选方法，筛选获得了最优突变 体

A217V/K332E/A390E与原始酶相比对苯基缩水甘油醚的选择性（*E*值）从4.5提高到了10.8[[88]](#_bookmark227)。2011年Reetz等利用定向进化策略对AnEH的酶基因的表达效率进行改造，利用LacZα作为报告蛋白的蓝色菌落筛选方法，从突变库中筛选到最优突变体的表达效率比原始酶提高了近50倍[[100]](#_bookmark239)。van Loo等利用易错PCR 和

DNA重组的方法对ArEH进行了分子改造，采用在琼脂平板上加入指示剂番茄红O的方法对获得的40000个突变体进行初步筛选，获得8827个活性突变体，再利用分光光度法测定针对底物*p*NPGE（对硝基苯基缩水甘油醚）的环氧化物水解酶的对映选择性，最终筛选获得的最优突变体的对映选择性是原始酶的13 倍

[[89]](#_bookmark228).2005年Rui等对ArEH的F108、L190、I219、D235和C248五个位点进行

16

了饱和突变和DNA重组，并利用高通量方法对突变酶催化底物1,2-环氧己烯、苯乙烯氧化物和环氧丙烷的活性和对映选择性进行筛选。其中，L190位点突变体L190Y和L190F对底物消旋苯乙烯氧化物的活力提高了2.7和4.8倍。突变体

I219F对苯乙烯氧化物的酶活和对映选择性分别提高了2倍和5倍。此外，三突变体F108L/I219L/C248I对于底物1, 2-环氧己烯和环氧丙烷的催化活性分别提高了2倍和10倍[[101]](#_bookmark240)。

## 1.4 卤醇脱卤酶

卤醇脱卤酶（Halohydrin dehalogenase, EC 4.5.1. X, 简称HHDH），也叫卤醇卤化氢裂解酶，通过分子内亲核取代机制催化邻卤醇脱卤形成环氧化物和卤化氢，是自然界微生物降解有机卤化合物的关键酶之一。同时卤醇脱卤酶也能高效催化脱卤反应的逆反应，在这一方面它们可以接受不同亲核试剂的进攻而介导环氧化物的开环[[102]](#_bookmark241)。自然界中大部分有机卤代醇类化合物都是致癌或者高诱变物质，并且自我降解能力差，卤醇脱卤酶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[[103]](#_bookmark242)。同时卤醇脱卤酶作为生物催化剂在精细化学品的合成应用方面也备受关注，它可以催化卤代醇和环氧化物合成手性药物、农药以及其他有机化学品的关键手性中间体[[104,](#_bookmark243) [105]](#_bookmark244)。

### 1.4.1 卤醇脱卤酶的结构和催化机理

卤醇脱卤酶与依赖于NAD(P) H的短链脱氢酶/还原酶家族(SDR)具有一定的进化相关性，并且具有相似的保守序列。SDR 家族是一类依赖NAD（H）或

NADP（H）并在功能上具有多样性的一组酶类，主要催化糖、醇、氨基酸、类固醇、碳氢化合物及异生物质的氧化还原反应[[104]](#_bookmark243)。SDR家族拥有保守的催化三联体结构（Tyr-Ser-Lys），Ser和Tyr可以与底物分子形成氢键并提供质子，Lys残基为催化反应提供碱性环境。卤醇脱卤酶与SDR家族具有相似的催化三联体结构，都具有Ser和Tyr残基，SDR家族中的Lys位置在卤醇脱卤酶中被Arg所取代。卤醇脱卤酶Ser-Tyr-Arg残基组成催化反应的活性中心，催化机理如图1-14[[104]](#_bookmark243)：保守的Ser132残基通过氢键与卤代醇结合，起到稳定底物的作用。Arg149可以降低Tyr145的pKa值，Tyr145从卤代醇羟基中夺取一个质子H+，失去一个质子后的羟基上的氧负离子作为亲核试剂，进攻邻位被卤素取代的碳原子，从而释放出卤素离子，同时形成环氧化物[[106-108]](#_bookmark245)。在开环的反应中，外加的亲核试剂进攻

17

β碳原子，同时，Tyr145为氧原子提供一个质子，使其开环，形成相应的β-取代醇（图1-14）[[109]](#_bookmark246)。







图1-14 卤醇脱卤酶的催化机制

Fig. 1-14 Reaction mechanism of HHDH

### 1.4.2 卤醇脱卤酶的筛选与克隆

1968年Castro等首次以2,3-二溴丙醇为限制性碳源从土壤中筛选得到卤醇脱卤酶产生菌-黄杆菌（*Flavobaterium* sp.）[[104]](#_bookmark243)。之后利用卤代醇化合物作为唯一碳源对采集的样品进行富集培养筛选，至今为止已筛选获得多种产卤代醇降解菌株，卤醇脱卤酶在是微生物降解卤代醇途径中关键的酶之一[[110](#_bookmark247)]。其中包括放射形土壤杆菌（*A. radiobacter*）AD1、棒状杆菌（*Corynebacterium* sp.）N-1074、节杆菌（*Arthrobacter* sp.）、*Arthrobacter erithii* H10a、*Mycobacterium* sp. GP1 和

18

*Pseudomonas putida* DSM 437等[[23,](#_bookmark177) [111-114](#_bookmark248)]。2014年以前，从筛选出的野生菌中克隆表征的卤醇脱卤酶只有6种，根据其序列同源性分为HheA、HheB、HheC三类[[106]](#_bookmark245)。这三类卤醇脱卤酶组内同源性较高，但组间同源性比较低。三类酶卤代醇类底物具有不同的立体选择性和催化活性，HheA和HheB类酶适用于催化较长链的邻卤醇（C5, C6）的反应，其中HheA具有一定的*S*型偏好，而HheC类酶对短链邻卤醇（C2, C3）具有较高的催化活性，一般表现*R*型偏好。同时，它能在多种亲核试剂的介导下，高选择性地拆分环氧化物。

利用传统的从土壤筛选微生物的方法寻找特定化合物起催化作用且活力高、选择性好的卤醇脱卤酶，需要耗费较多精力和时间。随着生物信息学和基因组测序技术的飞速发展，公共生物数据库中基因和基因组数据迅速增长，在这些庞大的基因数据库中包括着大量的工业酶资源，因此基于已知卤醇脱卤酶基因序列的基因数据库挖掘法正引起人们的日益关注。该法实际上是以已知的卤醇脱卤酶基因序列作为探针去搜索数据库中结构和功能类似的同源酶的编码序列。DB

Jassen等以卤醇脱卤酶HheC、HheB和HheA的基因序列作为探针，经序列比对和保守区域分析从数据库中搜索得到了31个卤醇脱卤酶疑似序列，分别对这些基因序列进行克隆表达，并对其进行功能验证和进化分析。成功挖掘到了大量新型卤醇脱卤酶[[115]](#_bookmark249)。

### 1.4.3 卤醇脱卤酶的应用

#### 1.4.3.1 合成手性环氧化物

卤醇脱卤酶可以催化邻卤醇碳-卤键的断裂合成光学纯的环氧化合物。一方面卤醇脱卤酶可以通过动力学拆分外消旋的卤代醇合成手性卤代醇和环氧化合物[[104,](#_bookmark243) [116-119]](#_bookmark250)，其中光学纯的邻卤醇是合成光学纯的环氧化物的前体。例如Spelberg等利用卤醇脱卤酶HheC催化2-氯-2-苯基乙醇进行脱卤反应，生成（*S*）*-*2-氯-2-苯基乙醇和（*R*）-苯基环氧乙烷[[21]](#_bookmark175)；卤醇脱卤酶还可以催化潜手性卤代醇一步脱卤直接合成理论收率接近100%的手性环氧化物。如Assis等利用卤醇脱卤酶DehA催化1, 3-DCP一步脱卤合成ee最高可达89.3%的（*R*）-ECH[22]. Tetsuji等以HheB为催化剂，催化1, 3-DCP一步脱卤生成（*R*）-ECH[23]。在亲核试剂介导下，卤醇脱卤酶也可以催化外消旋环氧化物拆分合成手性环氧化物。Jin等利用HheC，在NO2-亲核试剂的作用下，拆分外消旋ECH合成（*R*）-ECH，其ee> 99%，收率达到

19

41%[[26]](#_bookmark180)。

#### 1.4.3.2 合成手性β取代醇

卤醇脱卤酶催化多功能性主要体现在能接受不同的亲核试剂催化环氧化合物开环。在环氧化合物开环反应中，卤醇脱卤酶可以高选择性地催化不同的非自然亲核试剂所介导的反应。因此，可以通过立体选择性拆分合成多种具有光学纯的β-取代醇[[104,](#_bookmark243) [120-122]](#_bookmark251)。阿托伐他汀主要由母核和手性侧链组成，其中手性侧链是药物降血脂功能的关键部位。针对手性侧链的合成，有多步反应，其中*R*-4-氰基

-3-羟基丁酸乙酯（HN）的合成非常关键。现有化学合成法产物收率低、产品品质低、合成成本高。Codexis公司改造HheC最为成功的科学家，该公司利用蛋白质序列-活性相关性（ProSAR）驱动的蛋白质定向进化策略对HheC进行了改造，经过18轮的突变，得到了一株活力非常高的突变株，其催化（*S*）-4-氯-3-羟基

丁酸乙酯（CHBE）的活力是野生型酶的约4000倍[[123]](#_bookmark253)。最近，该公司报道了一条由4-氯-乙酰乙酸乙酯（COBE）出发，利用3种酶的连续催化，合成HN的途径[[124]](#_bookmark254)。首先，COBE在羰基还原酶的作用下生成（*S*）-CHBE，其中的羰基还原酶也是经过定向进化的，同时利用葡萄糖脱氢酶以葡萄糖为底物进行辅酶的再生，最后（*S*）-CHBE在HheC突变体的催化下合成HN，其转化过程如图1-15所示。在羰基还原的过程中，底物浓度为160 g/L，酶量为0.9 g/L，反应8 h后，产物的产率达96%, ee值大于99.5%；在脱卤酶反应过程中，底物浓度为140 g/L，酶量为1.2 g/L，反应5 h，产率为92%, ee值大于99.5%。相比化学合成，酶法合成产物收率提高1倍，总生产成本降低20%左右。ATS-5国际市场约2000吨，如果全部使用酶法合成，将节约原料3000吨。高品质AST-5同时提高下游产品收率，为行业带来更大效益。卤醇脱卤酶还可以和其他酶进行耦合合成手性醇。

2009年Schrittwieser等人将羰基还原酶和卤醇脱卤酶进行偶联反应合成β取代醇，产物收率达到80%以上，ee值大于99%[[120]](#_bookmark251)。杨立荣等偶联氧化还原酶系统和卤醇脱卤酶从β-酮腈出发合成手性β-羟基腈。底物的转化率可以达到99%，产物羟基腈的ee也可达到99%[[121]](#_bookmark252)。朱敦明等为了进一步降低生产成本，采用卤醇脱卤酶与腈水解酶偶联，实现了（*S*）-4-氯-3-羟基丁酸乙酯（A4）一锅法制备EHG。通过分批补料的方式，起始底物A4累积浓度达到200 g/L可完全转化，转化时间不超过8小时。同时构建了卤醇脱卤酶与腈水解酶的共表达工程菌，A4累积

20

浓度达到100 g/L[[125]](#_bookmark255)。

O O KRED

Cl O

NADPH NADP

OH O

Cl O

H+ Cl+

O

O

HHDH

+HCN

O HHDH

OH O

NC O

Na+-gluconate

GDH

glucose

图1-19 卤醇脱卤酶催化(*S*) -CHBE合成HN

Fig. 1-19 Bioconversion of(*S*) -CHBE to HN by HHDH

### 1.4.4 卤醇脱卤酶的分子改造

卤醇脱卤酶的应用价值凸显了对其进行改造研究的必要。蛋白质的理性改造，非理性改造以及它们相结合的半理性改造和分子模拟等手段已用于酶的催化活

性、稳定性及立体选择性的改造，从而使其成为理想的生物催化剂[[126-129]](#_bookmark256)。

#### 1.4.4.1 卤醇脱卤酶的高通量筛选方法

卤醇脱卤酶在催化邻卤醇形成环氧化物的同时，会释放1分子的H+，可以通过检测反应体系中H+的浓度来对酶的活性进行测定[[130]](#_bookmark259)。该方法是通过96孔板高量筛选具有卤醇脱卤酶活性的微生物，是基于卤代醇在卤醇脱卤酶的作用下催化碳-卤键断裂释放的质子和卤离子使含有pH指示剂的弱缓冲液中的pH下降，从而引起pH指示剂的颜色的变化，因此可以从缓冲液体系颜色的变化定性或定量卤醇脱卤酶的活性。这种基于pH变化的高通量检测方法与其他化学检测或者气相检测方法相比，能够快速检测脱卤反应，同时使用微孔板可一次性检测大量的样品，并且使用价格低廉且无毒的试剂，也适用于检测其他脱卤酶如卤烷脱卤酶的催化反应活性，但是这种方法的精确度不高，在筛选过程中容易出现假阳性菌株。汤丽霞等以苯酚红作为显色剂，以2 mM HEPES为缓冲液，建立了快速筛选脱卤酶活性的显色方法[129]。另外一种方法是对卤醇脱卤酶脱卤反应中生成的卤离子进行定量，Hg(SCN) 2 溶液中加入卤离子，Hg2+和卤离子相互作用生成沉淀，而分离出的SCN-可以与Fe3+生成有色络合物（1 h内稳定），通过在460 nm下测定该络合物的吸光值来对脱卤反应生成的卤离子进行定量[[131]](#_bookmark260)，反应原理如下：

2Cl-+ Hg(SCN) 2 HgCl2 + 2SCN- SCN- +Fe3+ Fe(SCN) 2+

#### 1.4.4.2 卤醇脱卤酶的定向进化

21

卤醇脱卤酶的分子改造主要可分为非理性设计，理性设计和二者相结合的半理性方法。ProSAR方法是一种使用计算机对已有突变体进行统计和预测突变组合的效果的理性方法。Fox等利用多种定向进化策略对HheC进行分子改造构建突变库，同时将ProSAR方法应用于分析来多种卤醇脱卤酶突变体文库中良性突变，经过几轮叠加筛选最终得到的最优突变体催化ECHB合成阿托伐他汀中间体HN的活性提高了近4000倍[[123]](#_bookmark253)。

#### 1.4.4.3 卤醇脱卤酶的理性或半理性设计

汤丽霞等对HheA催化活性位点附近中的三个“热点” 残基：Val136，Leu141和Asn178进行定点饱和突变，获得多个催化活性和立体选择性提高的良性突变体。其中最优突变体HheAN178A对（*S*）*-*2-氯-1-苯乙醇的立体偏好性比野生型提高了100倍以上，同时对底物2-氯-1-苯乙醇催化脱卤活性也提高了近5倍。对苯基环氧乙烷Cβ开环反应的*S*型底物立体偏好性比野生型酶提高了50倍以上

[[129]](#_bookmark258). 汤丽霞对HheC 进行迭代饱和突变，经过2 轮饱和突变，突变体

（T134V/L142M, L142F/N176H, P84V/F86P/T134A/N176A）表现出不同的立体选择性。双突变体对2-氯-1-苯乙醇的*R-*立体选择性提高了2倍，活力没有明显的损失。突变体P84V/F86P/T134A/N176A实现了立体选择性的翻转(从野生型酶*E*R =65变化到*E*S =101，对（*S*）-2-氯-苯乙醇的催化效率提高了100倍[[127](#_bookmark257)]。DB

Janssen等对HheC突变体再进行单点突变，得到的突变体T134A的氰基开环活力提高了11倍[[132]](#_bookmark261)。

## 1.5 本论文的研究研究目的及意义

ECH是含有一个手性碳原子的手性化合物，是一种具有重要价值的手性合成子，被广泛应用于阿伐他汀侧链关键中间体（*S*）-4-氯-3-羟基丁酸乙酯、β-肾上腺素阻断药物阿替洛尔、麻醉剂巴氯芬和减肥药左旋肉碱等众多手性药物的合成制备过程中。

地球上有限的化石类资源趋于衰竭，可再生的生物资源的开发日益受到人们关注，生物基化工原料的开发利用是新的发展方向之一。廉价的甘油原料为甘油法生产手性环氧氯丙烷提供了难得的发展机遇。传统的甘油法合成手性环氧氯丙烷工艺，手性是在催化剂和加热条件下，甘油和氯化氢反应得到二氯丙醇，二氯丙醇经无机碱皂化可以制备环氧氯丙烷，然后通过金属催化剂拆分获得手性环氧

22

氯丙烷单体。但传统化学法合成的条件相对苛刻，金属催化剂和有机氯化物对环境存在较为严重的污染，并且手性环氧氯丙烷的收率低于50%。生物合成法制备手性环氧化物反应条件温和、专业性强、对环境污染小、同时手性ECH的理论收率大于50%，具有原子经济效应，与“可持续发展”、“绿色化学”、“环境友好制造”等工业发展的目标相符。以甘油出发酶法合成手性环氧氯丙烷包括甘油的生物卤化、卤醇脱卤酶催化二氯丙醇生物脱卤合成手性环氧氯丙烷或外消旋环氧氯丙烷、以及外消旋环氧氯丙烷的酶法拆分。由于甘油生物卤化中卤化酶的缺乏，完全依靠酶法催化合成手性环氧氯丙烷难以实现，因此本课题希望通过化学酶法相结合的方法手性环氧氯丙烷，采用化学加卤，解决生物加卤的难题；生物酶法不对称脱离或拆分可弥补化学拆分成本高，污染重，原子经济性差等缺点，从而具有广阔的应用前景。

甘油化学卤化技术相对成熟，化学酶法路线关键问题还是卤醇脱卤酶和环氧

化物水解酶的开发和应用。但至今报道并进行催化应用研究的卤醇脱卤酶较少，特别是能够不对称催化1, 3-DCP脱卤合成手性ECH的更为少见。另外虽然已有不少环氧化物水解酶选择性拆分ECH的报导，但目前仅有少数EHs能够优先水解（*R*）-ECH，而且对映选择性并不高，限制了其制备规模应用。为从源头解决生物催化中酶的来源问题，本研究致力于开发新型且催化性能优异的卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶，并在此基础上构建高效的手性ECH的合成工艺，为工业应用奠定基础。

## 1.6 本论文的主要研究内容

本论文以挖掘新型卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶为研究目标，并在此基础上通过分子改造提高酶的立体选择性和活力，推动该酶在手性合成环氧氯丙烷中的应用，主要从以下几个方面进行研究：

（1）采用多种策略挖掘新型性能优良的卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶并进行催化性能研究；

（2）卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶的立体选择性分子改造研究；

（3）构建卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶双酶体系。

23

# 第二章 卤醇脱卤酶的挖掘与表征

## 2.1 引言

卤醇脱卤酶是一类通过分子内亲核取代机制催化邻卤醇转化为环氧化物的脱卤酶，可以高效高选择地催化环氧化物和邻卤醇之间的转化，因而可以用来合成具有光学纯的环氧化物及β-取代醇等化合物。近年，已从多种微生物中发现了卤醇脱卤酶，部分卤醇脱卤酶的基因已被克隆并在大肠杆菌中表达，获得产酶活力较高的基因工程菌，并应用于催化形成环氧化合物及β-取代醇[[115,](#_bookmark249) [133,](#_bookmark262) [134]](#_bookmark263)。

目前发现并研究的卤醇脱卤酶的数目很少，催化性能优异的酶更是寥寥无几。无法真正应用于工业生产。因此，开发新型且具有应用潜力的卤醇脱卤酶一直是卤醇脱卤酶的重点研究方向之一。传统新型卤醇脱卤酶的获得是从土壤或者菌种库中筛选获得对于特定卤代醇底物具有所需催化活性和立体选择性的微生物，再通过生物分离纯化技术分离得到卤醇脱卤酶，通过蛋白测序获得该酶的C端和多肽序列，进而获得所需的卤醇脱卤酶。在后基因组时代不断增长的生物信息给新酶的开发带来了前所未有的机遇。将生物信息学和分子生物学技术相结合用以开发新型的生物催化剂已成为生物催化领域的研究热点[[115,](#_bookmark249) [135]](#_bookmark264)。庞大的数据库中具有大量的卤醇脱卤酶资源，一种较为有效快速的策略是以已经报道的能够催化1, 3-DCP脱卤合成ECH的酶的序列作为探针序列，在基因组数据库中进行序列比对。根据条件可以适当限定基因来源，选择序列一致性在一定范围内的酶，将潜在的目标酶数量大大减少，最后确定出一批可以用来克隆表达的卤醇脱卤酶。

本章试图通过多种策略挖掘卤醇脱卤酶基因，并在大肠杆菌中进行高效表达，再以1, 3-DCP作为目标底物对卤醇脱卤酶进行催化功能筛选，通过比较其立体选择性和催化活力，筛选出性能优异的目标酶。

## 2.2 实验材料

### 2.2.1 主要设备与仪器

本章所用的仪器设备见表2-1

24

表2-1 仪器设备

Table 2-1 Main equipments used in this chapter

| 仪器名称 | 型号 | 生产商 |
| --- | --- | --- |
| PCR 仪 | Tprofessional | Biometra |
| 凝胶成像系统 | GelDoc | Bio-Rad |
| 电泳系统 | PowerPac Basic | Bio-Rad |
| 高压蒸汽灭菌锅 | MLS-3780 | 上海博讯 |
| 小型高速离心机 | 5451R | Eppendorf |
| 超速低温离心机 | Avanti J-E | Beckman |
| 超净工作台 | VD-850 | 苏州净化 |
| 生化培养箱 | BPMJ-70F | 上海一恒 |
| 恒温摇床 | DHZ-052DR | 上海博彩 |
| 恒温水浴摇床 | TS-110X50 | 上海天呈 |
| 恒温振荡器 | Thermomixer compact | Eppendorf |
| 气相色谱 | GC-14C | Shimdazu |
| 微量移液器 | Research Plus | Eppendorf |

### 2.2.2 菌株与质粒

本章实验涉及的菌株和质粒

表2-2 实验涉及菌株和质粒

Table 2-2 List of strains and plasmids used in this chapter

| 菌株或质粒 | 用途 | 来源 |
| --- | --- | --- |
| Agromyces mediolanus ZJB1203 | 基因来源菌株 | 实验室筛选鉴定保藏 |
| Tistrella mobilis ZJB1405 | 基因来源菌株 | 实验室筛选鉴定保藏 |
| E. coli JM109 | 克隆宿主 | 本实验室保藏 |
| E. coli BL21(DE3) | 表达宿主 | 本实验室保藏 |
| pGEM-T | 用于 T/A 克隆 | Promega |
| pET-28(+) | 表达质粒，T7 lac 启动子，卡那抗性，His Tag 融合标签 | Novagen |

### 2.2.3 酶与试剂

本章所用的分子生物学工具酶、试剂盒及其它生化试剂见表2-3。

25

表2-3 试验所用酶与试剂

Table 2-3 Enzymes and reagents used in this chapter

| 酶/试剂 | 来源 |
| --- | --- |
| Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、LA-Taq DNA 聚合酶 | Takara |
| DNA 胶回收、质粒抽提、PCR 产物纯化试剂盒 | Axygen |
| T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Nco I、Hind III、Nde I、Not I、  Xho I、EcoR I、Xba I | Fermetens |
| 氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) | Sigma |
| 基因组提取试剂盒 | MPBio |
| 酵母提取物、蛋白胨 | Oxoid |

### 2.2.4 引物

本章所使用的PCR引物见表2-4

表2-4 本章所用引物

Table 2-4 Primers in this chapter

| 引物名称 | 引物序列（5‟-3‟） | 目的 |
| --- | --- | --- |
| AmF1 | ATGMGNATCGCCCTCGTGACTC | HheAAm  基因扩增 |
| AmR1 | TTAGGGCAGATAGCCACCG |
| AmF2 | CGCCATATGCGCATCGCCCTCGTGACTC | HheAAm  基因表达 |
| AmR2 | CCGCTCGAG TTAGGGCAGATAGCCACCG |
| TmF3 | CGCCATATGATGCCTGTCACCGACACCGC ´ | HHDHTm 基因扩增与表达 |
| TmR3 | ATTTGCGGCCGC TTACGGCCAGCCGCCGGTG |

M=A/C，N=A/G/C/T，下划线部分为限制性内切酶酶切位点

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 培养基及常用试剂配制

LB培养基（g/L）：进口蛋白胨10，进口酵母粉5，NaCl 10，LB固体培养基中含2%琼脂。高压灭菌条件为121°C，20 min。

*Agromyces mediolanus* ZJB120203菌株液体培养基(g/L): 甘油10.0，蛋白胨5.0，酵母粉10.0，(NH4) 2SO4 1.0, K2HPO4 1.0，Na2HPO4·2H2O 1.0，NaH2PO4·12H2O 2.0, MgSO4·7H2O 0.5, FeSO4·7H2O 0.01, CaCO3 1.0, pH自然；

其固体培养基（g/L）：牛肉膏3.0，蛋白胨10.0，NaCl 5.0，琼脂15.0-20.0, pH

自然。

26

*Tistrella mobilis* ZJB1405菌株液体培养基（g/L）：牛肉膏5.0，蛋白胨10.0，NaCl 5.0, pH 7.2-7.4. 固体培养基含2%琼脂。

卡那霉素（kanamycin）溶液（50 mg/mL）：称取0.5 g卡那霉素固体，溶解定容于10 mL双蒸水中，用0.22μm滤头过滤除菌后分装于1.5 mL离心管中，

-20°C长期保存。

异丙基-β-D-半乳糖苷（IPTG, 0.12 g/mL）：称取1.2 g IPTG固体，溶解定容于10 mL双蒸水中，用0.22 μm 滤头过滤除菌后分装于1.5 mL离心管中，

-20°C长期保存。

SDS-PAGE蛋白电泳相关buffer：

丙烯酰胺储备液：丙烯酰胺29.2 g，甲叉双丙烯酰胺0.8 g，加蒸馏水至100

mL，用滤纸过滤后于棕色试剂瓶4°C 存放。

1.5 mol/L分离胶缓冲液(pH 8.8): 18.15 Tris 碱，用1 mol/L HCl调节pH

至8.8，加水至100 mL，4°C保存。

0.5 mol/L浓缩胶缓冲液(pH 6.8): 6 gTris，用1 mol/L HCl调节pH至6.8，加水至100 mL，4°C保存。

12%分离胶的配制：蒸馏水3.5 mL，30%丙烯酰胺储备液4 mL，分离胶缓

冲液2.5 mL, 10% SDS 0.1 mL, 10%过硫酸铵0.1 mL, TEMED 0.004 mL。

5%浓缩胶的配制：蒸馏水2.3 mL，30%丙烯酰胺储备液0.67 mL，浓缩胶

缓冲液1.0 mL, 10% SDS 0.04 mL, 10%过硫酸铵0.04 mL, TEMED 0.005 mL. Tris-甘氨酸电泳缓冲液：6 g Tris碱，28.8 g甘氨酸，2 g SDS，加水至2 L. 蛋白电泳染色液：考马斯亮蓝R-250 1 g，甲醇450 mL，冰醋酸100 mL，

用水定容到1 L，室温长期保存。

蛋白电泳脱色液：甲醇200 mL，冰醋酸200 mL，蒸馏水1600 mL.10% SDS溶液：10 g SDS，加水定容至100 mL，完全溶解后室温存放。

10%过硫酸铵溶液：0.1 g过硫酸铵，加1 mL蒸馏水溶解。

DNA电泳相关buffer：

50×TAE溶液：Tris 242 g，Na2EDTA·2H2O 37.2 g，冰醋酸57.1 mL，用双蒸

水定容到1 L，室温保存备用。

### 2.3.2 产卤醇脱卤酶菌株的筛选与鉴定

从不同的环境中采集的样品，利用1, 3-DCP或（*S*）-CHBE为唯一碳源，以溴

27

百里香酚蓝为pH指示剂。进行两轮富集筛选培养，筛选卤醇脱卤酶产生菌。通过反复筛选，分离得到卤醇脱卤酶产生菌。再结合生理生化和分子生物学的方法对菌株进行鉴定确定种属。

### 2.3.3 基本分子Th物学方法

酶切、连接、感受态细胞的制备、转化、琼脂糖凝胶电泳等分子生物学基本操作均参照《分子克隆实验指南》（第三版）进行[[136]](#_bookmark265)；质粒提取、PCR产物纯化、

DNA切胶回收等均参照Axygen的试剂盒使用说明书操作。

### 2.3.4 卤醇脱卤酶基因的克隆

#### 2.3.4.1 卤醇脱卤酶HheAAm的克隆

利用硫酸铵沉淀和离子交换等分离纯化手段从壤霉菌（*A. mediolanus*

ZJB120203）菌株中分离纯化得到脱卤酶蛋白，经过N端序列测序和肽指纹图谱分析，发现该酶与*Arthrobacter* sp. AD2和*Corynebacterium* sp. N-1074的Haloalcohol Dehalogenase HheA存在高同源性。参考同源基因设计引物，利用聚合酶链式反应（PCR）技术，在简并引物AmF1和AmR1的作用下以来源于*A. mediolanus* ZJB120203菌株中的总基因组DNA为模板克隆卤醇脱卤酶基因片段。

PCR反应体系（总体积100μL）：10×*Taq* DNA Polymerase Buffer 10μL（Mg2+），引物AmF1、引物AmR1各0.5μL (50μM)，dNTP mixture 0.5μL（10 mM），

DNA模板1μL, *Taq* DNA Polymerase 1μL, *dd*H2O 86.5μL. PCR扩增步骤为：94°C预变性3 min，94°C 30 s，60°C 30 s，72°C 1.5 min进行30个循环，于72°C延伸10 min，终止温度为8°C。取10μL PCR反应液用0.9%琼脂糖凝胶电泳检测，其余部分与T载体相连。送样测序验证并利用软件对测序结果进行分析。设计引物AmF2和引物AmR2，并分别在引物AmF2和AmR2中引入了*Nde* I和*Xho* I限制性酶切位点。在引物AmF2和AmR2的引发下，利用高保真*Pfu* DNA聚合酶（fermentas）进行扩增，获得卤醇脱卤酶基因片段，胶回收后利用*Taq* DNA

Polymerase加尾后与T载体相连，并测序验证。

#### 2.3.4.2 卤醇脱卤酶HHDHTm的克隆

根据Genbank中收录预测的*T. mobilis* KA081020-065中halohydrin epoxidase A基因序列设计PCR引物。引物AmF3（下划线为*Nde* I 酶切位点），引物AmR3（下划线为*Not* I酶切位点）。然后以*T. mobilis* ZJB1405的基因组DNA为模板，利用PCR技术进行基因扩增，获得卤醇脱卤酶全长基因序列。PCR 反

28

应体系（总体积100μL）：10×*Pfu* DNA Polymerase Buffer 10μL(Mg2+)，引物

AmF3和AmR3各0.5μL (50μM)，dNTP mixture 0.5μL(10 mM)，DNA模板1μL, *Pfu* DNA Polymerase 1μL, *dd*H2O 86.5μL. PCR反应条件同2.3.4.1，取10 μL PCR 反应液用0.9%琼脂糖凝胶电泳检测。其余部分利用*Taq* DNA

Polymerase加尾后与T载体相连。送样测序验证并利用软件对测序结果进行分析。

#### 2.3.4.3 其它卤醇脱卤酶基因的获得

利用已报道的卤醇脱卤酶和已克隆的卤醇脱卤酶序列作为探针，在整个基因数据库中挖掘同源序列，获得候选酶基因。设计在大肠杆菌密码子偏好性合成基因，并在两端引入*Xba* I和*Xho* I酶切位点，交由上海旭冠生物技术有限公司合成。

### 2.3.5 卤醇脱卤酶大肠杆菌表达载体和工程菌的构建

将连接到T载体上含有目标卤醇脱卤酶基因的质粒进行37°C限制性内切酶双酶切6-8 h，经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段。将酶切好的卤醇脱卤酶基因片段分别与同样限制性内切酶处理的表达载体pET28b(+)质粒用T4DNA连接酶于16°C连接构建表达质粒pET28b-HHDH, 热激法转入大肠杆菌*E. coli* BL21感受态细胞中，得到重组卤醇脱卤酶工程菌*E. coli* BL21(pET28b-HHDH)。

### 2.3.6 卤醇脱卤酶的诱导表达

重组卤醇脱卤酶工程菌*E. coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDH，接种至含终浓度50 mg/L硫酸卡那霉素的LB培养基中，37˚C振荡培养过夜，按1%（v/v）的接种量接入装有100 mL LB培养基的500 mL三角瓶中，置37˚C、180 rpm摇床振荡培养，当培养液的OD600达到0.6-0.8时，加入终浓度为0.5 mM的IPTG作为诱导剂，28°C诱导10 h，离心收集细胞（即湿菌体），-20°C保存。

### 2.3.7 氨基酸序列比对与系统进化分析

利用NCBI中BLAST软件在线比对目的序列，采用CLUSTALX（版本1.8）软件对所有的序列进行比对，转换生成ALN 文件，利用ESPript

（[http: //espript. ibcp. fr/ESPript/cgi-bin/ESPript. cgi](http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)）对多重序列进行着色[[137]](#_bookmark266)。

对42个卤醇脱卤酶（包括本章获得的七个卤醇脱卤酶）的氨基酸序列构建系统进化树。利用CLUSTALX（版本1.8）软件对所有的序列进行比对，参数设置为缺省。利用MEGA 5软件构建系统进化树，参数设置：最小进化法及泊松

29

相关性模型。

### 2.3.8 卤醇脱卤酶的分离纯化

#### 2.3.8.1 含His-Tag 标签的卤醇脱卤酶的分离纯化

利用Ni-NTA纯化目标蛋白，具体纯化方法：按每克湿菌体/10 mL缓冲液（20 mM Na2HPO4-NaH2PO4, pH 8.0）的比例充分悬浮离心收集的菌体。置于冰浴中超声破碎细胞15 min，离心收集上清液，0.45μm的滤膜过滤备用。先用5个柱体积的超纯水清洗Ni-NTA柱。再用10个柱体积的平衡缓冲液(20 mM Na2HPO4-NaH2PO4, 500 mM NaCl, 20 mM咪唑, pH 8.0)，清洗Ni-NTA柱。以1 mL/min的流速上样粗酶液。然后以10倍柱体积的平衡缓冲液洗脱除去未吸附的酶蛋白，再以洗脱缓冲液洗脱（20 mM Na2HPO4-NaH2PO4, 500 mM NaCl, 500

mM咪唑，pH 8.0），收集目标蛋白。酶液在磷酸液缓冲液（20 mM Na2HPO4-NaH2PO4, pH 8.0）中冰浴透析2次，SDS-PAGE检测蛋白纯度[[138]](#_bookmark267)。蛋白质的浓度采用Bradford的方法检测，以牛血清白蛋白BSA为对照[[139]](#_bookmark268)。

#### 2.3.8.2 其它卤醇脱卤酶的分离纯化

按每克湿菌体/10 mL缓冲液（20 mM Na2HPO4-NaH2PO4, pH 8.0）的比例充分悬浮离心收集的菌体。置于冰水浴中超声破碎细胞15 min，离心收集上清液即为待纯化粗酶液。纯化方法如下。

A. 硫酸铵分级沉淀

上清酶液中慢慢加入硫酸铵固体粉末使其饱和度达到20%-60%，不断搅拌，放置半小时后离心收集沉淀。测定各级饱和度下沉淀酶活。根据测定结果选择合适的饱和度分离纯化目标蛋白。

B. 疏水色谱层析

硫酸铵分级沉淀获得的目标蛋白溶解于含一定硫酸铵的磷酸盐中（pH 8.0, 20 mM），上样于Phenyl Sepharose 6 Fast Flow柱，平衡后进行线性洗脱（硫酸铵浓度由1-0 M），水洗，收集有活性蛋白组分，透析过夜，SDS-PAGE测定其蛋白纯度。蛋白质的浓度采用Bradford的方法检测，以牛血清白蛋白BSA为对照。

### 2.3.9 卤醇脱卤酶酶学性质表征

纯化后卤醇脱卤酶，以1, 3-DCP为底物考察不同温度、pH对卤醇脱卤酶活力、稳定性及选择性的影响，金属离子和化学试剂对酶活的影响，并考察酶的底物特异性。

30

### 2.3.10 卤醇脱卤酶酶活测定

卤醇脱卤酶酶活测定采用气相色谱进行测定，以卤代醇为底物。测酶活体系：20 mM卤代醇，合适浓度的酶液，100 mM pH 8.0磷酸盐缓冲液或者pH 10.0甘氨酸-NaOH缓冲液。在2 mL EP管中，35˚C 500 rpm振荡器反应一定时间，加入含有内标物的乙酸乙酯的进行萃取15 min，取有机相无水硫酸钠干燥后，进行

气相检测。酶活单位（U）定义为：在35˚C、pH 8.0条件下，在1 min内催化卤代醇生成1µmol环氧产物所需要的酶量定义为1U。

### 2.3.11 分析方法

#### 2.3.11.1 非手性检测方法

2, 3-DCP，1, 3-DCP，2, 3-二溴-1-丙醇，2-溴乙醇，1, 3-二溴-2-丙醇（1,3-DBP） 和3-氯-1, 2-丙二醇的分析方法：采用Agilent GC-7890A系统，色谱柱类型：HP-5色谱柱，色谱条件：柱温90˚C，进样口和检测器的温度分别为230˚C和250˚C. 1-溴-2-丙醇的分析方法：采用Agilent GC-7890A系统，色谱柱类型：HP-5

色谱柱，色谱条件：柱温60˚C，进样口和检测器的温度分别为230˚C和250˚C. 4-氯-3-羟基丁腈的分析方法：采用Agilent GC-7890A系统，色谱柱类型：

HP-5色谱柱，色谱条件：60˚C保留4 min, 20˚C /min程序升温至160˚C，保留1 min，进样口和检测器的温度分别为230˚C和250˚C。

4-氯-3-羟基丁酸乙酯（CHBE）和4-氰基-3-羟基丁酸乙酯(HN)的分析方法：采用Agilent GC-7890A系统，色谱柱类型：HP-5色谱柱，色谱条件：120˚C保留4 min, 20˚C /min程序升温至180˚C，保留2 min。，进样口和检测器的温度分别为230˚C和250˚C。

#### 2.3.11.2 手性检测方法

手性ECH和环氧溴丙烷（EBH）分析方法：采用GC-14C系统，色谱柱类型：BGB-175毛细管柱；色谱条件：柱温90˚C，进样室温度220˚C, FID检测器220˚C。

手性苯基环氧乙烷的分析方法：采用GC-14C系统，色谱柱类型：BGB-175毛细管柱；色谱条件：柱温100˚C，进样室温度220˚C, FID检测器220˚C。

4-氯-3-羟基丁腈的分析方法：采用GC-14C系统，色谱柱类型：BGB-174毛细管柱；色谱条件：柱温60˚C保持4 min, 20˚C/min程序升温至160˚C，保持2 min，进样口温度230˚C, FID检测器250˚C。

31

CHBE和（*R*）-HN的分析方法：采用GC-14C系统，色谱柱类型：BGB-174毛细管柱；色谱条件：柱温160˚C，进样室温度220˚C, FID检测器220˚C。

采用Chen等人的方法计算底物、产物的对映体过量值[[140]](#_bookmark269)。

### 2.3.12 卤醇脱卤酶催化1,3-DCP合成手性ECH

以重组卤醇脱卤酶*E. coli* BL21/pET28b-HHDHSg、*E. coli* BL21/pET28b-HHDHIs和*E. coli* BL21/pET28b-HHDHTm湿菌体作为转化用酶，以1,3-DCP为底物催化合成手性ECH. 转化体系：10 mL Gly-NaOH缓冲液（0.1M, pH 10.0）中，加入20-100 mM 1,3-DCP，菌体量20-40 g/L，置于35˚C, 150 rpm水浴摇床反应，定时取样乙酸乙酯萃取，GC检测产物收率和ee值。

### 2.3.13 卤醇脱卤酶催化(*S*) -CHBE合成(*R*) -HN

以重组卤醇脱卤酶*E. coli* BL21/pET28b-HHDHIs和*E. coli* BL21/pET28b-HHDHTm湿菌体作为转化用酶，以(*S*) -CHBE为底物，进行转化反应制备(*R*) -HN. 转化体系组成及转化操作如下：向100 mL烧瓶中加入30 mL 100

mM磷酸盐缓冲液溶液(pH 7.5)，加入一定量湿菌体，利用恒定pH/电位滴定仪流加NaCN调节pH至7.5，向体系中加入一定浓度的（*S*）-CHBE，用NaCN控制pH在7.8，反应间隔取样，用2倍体积的乙酸乙酯萃取，气相检测（*R*）-HN含量和ee值。

## 2.4 结果与讨论

### 2.4.1 产卤醇脱卤酶的筛选及鉴定

通过富集分离反复筛选，分离得到2株卤醇脱卤酶产生菌。基于形态、生理生化特征和16S rDNA序列及系统发育学分析等方面的鉴定，确定该菌为壤霉菌和运动替斯崔纳菌，拟命名为壤霉菌（*Agromyces mediolanus*）ZJB120203和运动替斯崔纳菌（*Tistrella mobilis*）ZJB1405，两株菌株已保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC No: M 2012299和CCTCC No: M 2014187。

### 2.4.2 HheAAm 基因的克隆与序列分析

以来自于*Arthrobacter* sp. AD2和*Corynebacterium* sp. N-1074的的卤醇脱卤酶基因设计引物，利用PCR技术以来源于*A. mediolanus* ZJB120203菌株中的总基因组DNA 为模板克隆出卤醇脱卤酶基因（GenBank accession no.

KC292224）。基因全长735 bp，编码244氨基酸，蛋白预测pI值5.3，预测分

32

子量为26.5 kDa. 序列比对如图2-1所示：HheAAm与HheAAD2和HheA的同源性都为97%. HheAAm的催化三联体为Ser134，Tyr147，Arg151.



图2-1 Hhe AAm与Hhe AAD2和Hhe A的多重序列比对

Fig. 2-1 Amino acid sequences alignment of halohydrin dehalogenases from *Corynebacterium* sp. strain N-1074 (HheA, Genbank accession no. BAA14361), *Arthrobacter* sp. AD2 (HheAAD2, GenBank accession no. AAK92100), *A. mediolanus* ZJB120203 (HheAAm). The amino acid residues those conserved in all sequences are all labeled in red. The catalytic triad (Ser134, Tyr147, Arg151) are marked in green.

### 2.4.3 HHDHTm的基因的克隆与序列分析

根据Genbank中收录预测的*T. mobilis* KA081020-065中halohydrin epoxidase

A基因序列设计PCR引物。以*T. mobilis* ZJB1405的基因组DNA为模板PCR扩增，获得一条完整的卤醇脱卤酶全长基因序列（GeneBank accession no.

AFK51877），碱基序列全长747 bp，编码248个氨基酸。蛋白预测pI值5.63，预测分子量为26.2 kDa.，其与来自于*Ralstonia* sp. GA3-3的预测halohydrin epoxidase A蛋白的同源性为48%. 序列同源分析如图2-2所示，与已报道的卤醇脱卤酶HheA和HheAAD2的同源性为38%，与HheC和HalB的同源性分别为

34%和32%，与HheBGP1和HheB的同源性为30%. 其催化三联体为Ser139, Tyr152

和Arg156 .

33



图2-2 HHDHTm与其它卤醇脱卤酶的多重序列比对

Fig. 2-2 Amino acid sequences alignment of halohydrin dehalogenases from *Corynebacterium* sp. strain N-1074 (Hhe A, Genbank accession no. BAA14361), *Arthrobacter* sp. AD2 (Hhe AAD2, GenBank accession no. AAK92100), *A. mediolanus* ZJB120203 ( Hhe AAm, Genbank accession no. KC292224), Hhe C from *A. radiobater* AD1 (GenBank accession no. AAK92099), Hal B from *A. tumefaciens* (GenBank accession no. AAD34609), Hhe BGP1 from *Mycobacterium* sp. GP1 (GenBank accession no. AAK73175), Hhe B from *Corynebacterium* sp. N-1074 (GenBank accession no. BAA14362) and *T. mobilis* ZJB1405 (HHDHTm, this paper). The amino acid residues that are conserved in all sequences are all labeled in red. The catalytic triad (Ser139, Tyr152 and Arg156) are marked in blue.

### 2.4.4 其它卤醇脱卤酶的克隆与序列分析

以文献报道的卤醇脱卤酶HheB、HheC和已克隆的HHDHTm的氨基酸序列作为探针，在NCBI数据库搜索同源氨基酸序列，表2-5列出了通过数据挖掘方法获得的五个酶的基本信息，这些酶与已报道的卤醇脱卤酶的同源性都在50%以下，分子量在25-28 kDa之间。我们利用NCBI的CDS-保守性结构域预测服

34

务器（CDS-Conserved–Domains -prediction-server）对我们实验获得蛋白质进行保守性结构域分析结果显示，五个获得蛋白中都预测出了卤醇脱卤酶的保守的结构域haloalcohol\_DH\_SDR\_c-like和fabG这两个结构域。同时通过序列比对发现该短链脱氢酶、3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶、水解蛋白具有与卤醇脱卤酶相同的催化三联体(„Ser-x(12) -Tyr-x(3) -Arg)和一些关键的保守序列（图2-3），推测该这些蛋白为卤醇脱卤酶[[115]](#_bookmark249)。根据NCBI公布疑似卤醇脱卤酶的基因序列，以及在大肠杆菌异源表达的密码子偏好性，设计合成基因，并在两端引入*Xba* I和*Xho* I酶切位点交送基因合成公司合成，获得目的基因。

表2-5 数据库挖掘所得卤醇脱卤酶

Table 2-5 Putative halohydrin dehalogenases selected from NCBI database

| Enzyme | Defintion (NCBI) | Source | Genbank accession | Size (bp) | Protein Identities |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HHDHSg | Hypothetical protein | Sneathiella  glossodoripedis | WP\_025899379 | 732 | 44%a |
| HHDHBe | 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein]  reductase | Bacterium Ec32 | CDO61292 | 732 | 40%a |
| HHDHAp1 | Hypothetical protein | alpha  proteobacterium  Mf 1.05b.01 | WP\_029639308 | 762 | 34%a |
| HHDHAp2 | Short-chain dehydrogenase/reductase | alpha  proteobacterium  MA2 | GAK44072 | 735 | 39%a |
| HHDHIs | Short-chain dehydrogenase | Idiomarina  salinarum | KFZ32061 | 684 | 45%b |

AHomology comparison to HHDHTm, bHomology comparison to HheB

35



图2-3 卤醇脱卤酶多重序列比对

Fig. 2-3 Amino acid sequences alignment of halohydrin dehalogenases.

Hhe AAD2 from *Arthrobacter* sp. AD2 (GenBank no. AAK92100), Hhe AAm from *A. mediolanus* ZJB120203 (Genbank no. KC292224), Hhe C from *A. radiobater* AD1 (GenBank no. AAK92099), HHDHTm from *T. mobilis* ZJB1405 (GeneBank no. AFK51877), HHDHSg from *S. glossodoripedis* (Genbank No. WP\_037493663), HHDHIs from *I. salinarum* (Genbank No. KFZ32061.1), HHDHBe from bacterium Ec32 (Genbank No. CDO61292.1), HHDHAp1 from *alpha proteobacterium* Mf (Genbank No. WP\_038278968.1), HHDHAp2 from *alpha proteobacterium* MA2 (GenBank: GAK44072.1), and The amino acid residues that are conserved in all sequences are all labeled in red. The catalytic triad (Ser, Tyr and Arg) are marked in blue.

### 2.4.5 卤醇脱卤酶进化分析

截止到目前已报道并进行功能验证的卤醇脱卤酶共35个，加上本文获得的

7个卤醇脱卤酶，共42个卤醇脱卤酶，对其进行系统进化分析。利用MEGA 5软件使用最小进化的方法构建系统进化树，（图2-4）。进化分析结果显示42个卤醇脱卤酶可以分为四个大簇，其中本论文获得的HHDHAp1, HHDHAp2，HHDHBe，，

HHDHTm, HHDHSg和HheAAm位于同一个大簇，HheAAm与HheA和HheAAD2

位于同一小族，三者同源性比较高，HHDHTm与HheC比较靠近，可能二者具有

36

比较相似的功能，HHDHAp2, HHDHBe，HHDHAp1, HHDHSg和HHDHPl进化关系比较接近，它们有可能具有相似的催化特性。HHDHIs与HheD14、HheD10进化关系比较近，明显属于另外一大族，推测其可能与HheD14、HheD10等具有相似的功能，与其它6种卤醇脱卤酶可能具有比较明显的功能差异。



图2-4 卤醇脱卤酶进化分析

Fig. 2-4 Minimum evolution phylogram of previously known and novel HHDH enzymes. Phylogenetic trees were constructed with all 42 HHDH sequences.

### 2.4.6 卤醇脱卤酶的表达

目标蛋白的基因被克隆到pET-28b(+)质粒，将重组表达质粒转化到*E. coli*

BL21(DE3)感受态细胞中，在含有50 mg/L硫酸卡那霉素的LB平板上对阳性重组体进行筛选，挑取单克隆，菌落PCR验证阳性克隆。获得阳性重组*E. coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDH。七株重组菌经IPTG诱导培养，离心收集湿菌体，细胞超声破碎，SDS-PAGE分析蛋白表达情况，如图所示2-5所示，所有卤醇脱

37

卤酶都能够在大肠杆菌异源表达，且大小与理论值相符。除HHDHAp1部分以包涵体存在，其余六种卤醇脱卤酶均为可溶性表达。



a

b



c

d

e

f

图2-5 卤醇脱卤酶重组诱导表达及分离纯化电泳图

Fig. 2-5 SDS-PAGE analysis the expression and purification of 7 halohydrin dehalogenases.

A: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced E. coli BL21(DE3) / pET28b; lane 2:

Uninduced E. coli BL21(DE3) / pET28b-HheAAm; lane 3: E. coli BL21(DE3) / pET28b-HheAAm induced by IPTG; lane 3: the purified HheAAm. b: lane M, molecular weight mark, lane 1:

Uninduced E. coli BL21(DE3) /pET28b-HHDHTm; lane 2: E. coli BL21(DE3) / pET28b- HHDHTm

38

Induced by IPTG; lane 3: soluble fraction of cell extract; Lane 5, the purified HHDHTm; c: lane M, molecular weight mark; lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDHSg; lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pET28b- HHDHSg induced by IPTG; lane 3: soluble fraction of cell extract; lane 4:

Ammonium sulfate precipitate; lane 5: phenyl sepharose pool. d: lane M, molecular weight mark; lane 1: phenyl sepharose pool, lane 2: ammonium sulfate precipitate; lane 3: soluble fraction of cell extract; lane 4: *E. coli* BL21(DE3) / pET28b- HHDHIs induced by IPTG; lane 5: uninduced *E.*

*Coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDHIs; e: lane M, molecular weight mark; lane 1: uninduced *E. coli*

BL21(DE3) /pET28b-HHDHBe; lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pET28b- HHDHBe induced by IPTG; lane 3: soluble fraction of cell extract; f: lane M, molecular weight mark; uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDHAp1; lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pET28b- HHDHAp1 induced by IPTG; lane 3: soluble fraction of cell extract; lane 4: precipitation of cell extract; lane 5: uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28b-HHDHAp2; lane 6: *E. coli* BL21(DE3) / pET28b-HHDHAp2 induced by IPTG; lane 7: soluble fraction of cell extract; lane 8: precipitation of cell extract

### 2.4.7 重组卤醇脱卤酶的筛选

以1, 3-DCP为目标底物对获得的七种重组卤醇脱卤酶和实验室保藏的卤醇脱卤酶HheC进行活性和选择性筛选。以不含目的片段的*E. coli* BL21 (pET28b)破碎上清为空白对照。结果见表2-6，七种重组卤醇脱卤酶对1, 3-DCP具有催化活性。其中HHDHTm、HHDHIs、HHDHSg、HHDHBe和HheC的催化活性较高，其余几种对1, 3-DCP的活力较低。同时获得的卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP时表现出不同的立体选择性。四种卤醇脱卤酶能够不对称催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH，其中HHDHSg的选择性最高，生成的产物（*S*）-ECH的ee值可以达到85.5%。而HHDHIS表现出相反的催化选择性，能够不对称催化1, 3-DCP合成（*R*）-ECH，但产物ee值只有41.6%。根据其活力和选择性的测定数据，后续论文主要研究HHDHTm、HHDHBe、HHDHIs和HHDHSg的酶学性质和催化性能。

### 2.4.8 重组卤醇脱卤酶的分离纯化

pET28b质粒上带有His-Tag融合标签，因此表达的目的蛋白C端带有六个组氨酸残基，从而可以根据组氨酸与Ni的特异性结合采用Ni-NTA亲和柱分离纯化重组蛋白。HHDHTm和HHDHBe分别经镍柱纯化后，得到相应的纯酶。但是HHDHIs和HHDHSg加了His-Tag融合标签酶活明显下降。因此采用分级硫酸铵沉淀、疏水色谱纯化得到纯的卤醇脱卤酶。由SDS-PAGE分析（图2-5），卤醇脱卤酶的亚基大小分别约为27、25、26和26 kDa，这与几个卤醇脱卤酶的预测分子量相一致。

39

表2-6 重组卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成环氧氯丙烷

Table 2-6 Biotransformation of 1,3-DCP to ECH by HHDHs

| Enzyme | 1,3-DCP  (mM) | pH | Time | Conversion (%) | Absolute  configuration | Ee (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HheAAm | 20 | 8.0 | 60 min | 5.2 | - | - |
| HHDHTm | 20 | 8.0 | 0.5 min | 42.1 | S | 40.1 |
| HHDHBe | 20 | 8.0 | 2 min | 30.5 | S | 17.4 |
| HHDHIs | 20 | 8.0 | 1 min | 25.6 | R | 41.6 |
| HHDHSg | 20 | 8.0 | 1 min | 20.4 | S | 85.5 |
| HHDHAp1 | 20 | 8.0 | 20 min | 19.3 | S | 16.6 |
| HHDHAp2 | 20 | 8.0 | 20 min | 42.4 | - | - |
| HheC | 20 | 8.0 | 3 min | 45 | - | - |

“-" The ECH was racemic.

### 2.4.9 卤醇脱卤酶的酶学性质研究

#### 2.4.9.1 pH对卤醇脱卤酶酶活及立体选择性的影响

反应体系的pH值可以影响酶活性部位基团、底物及酶-底物复合物等的离子化状态，因而不仅对酶活力的影响极为显著，而且还可以影响酶对不同底物的选择性。分别配制三种缓冲体系磷酸盐缓冲液（pH 6.0-8.0），Tris-SO4缓冲液（pH 7.0-9.0），甘氨酸-NaOH（8.0-11.0），以1, 3-DCP为底物，考察四种卤醇脱卤酶在不同pH下的活性。结果如图2-6所示，缓冲液pH对四种卤醇脱卤酶的催化活性影响比较显著，其最适pH在10.0左右，与文献已经报道的卤醇脱卤酶的最适pH不同（8.0-9.0）[108]，当缓冲液pH低于10.0时，酶活随着pH的降低而下降，当pH为6.0时，酶活都已降到最大酶活的20%以下，当pH高于10.0时，酶活下降虽不明显，但高pH下，1, 3-DCP自我环化的速率明显加快，不利于脱卤反应的控制。同时考察了酶在不同缓冲体系中pH稳定性，处理2 h后，测定残余的酶活，计算相对酶活。结果如图2-7所示HHDHSg, HHDHIs和HHDHTm在pH 7.0-8.0之间稳定性较好，而HHDHBe在碱性条件下（pH10.0左右）表现出更好的稳定性。pH稳定性最好的是HHDHSg, pH 7.0下条件下处理2 h后，残余活力仍达90%，而且随着pH的上升，其活力下降幅度也不明显。

40

Na HPO -NaH PO buffer

2 4 2 4

Tris-SO buffer

4

Glycine-NaOH buffer

100 100

Na HPO -NaH PO buffer

2 4 2 4

Tris-SO buffer

4

Glycine-NaOH buffer

80 80

60 60

Relative activity (%)

Relative activity (%)

40 40

20 20

0

6 7 8 9 10 11

pH

0

6 7 8 9 10 11

pH

HHDHTm HHDHSg

Na HPO -NaH PO buffer

2 4 2 4

Tris-SO buffer

4

Glycine-NaOH buffer

100 100

Na HPO -NaH PO buffer

2 4 2 4

Tris-SO buffer

4

Glycine-NaOH buffer

80 80

Relative activity (%)

60 60

Relative activity (%)

40 40

20 20

0

6 7 8 9 10 11

pH

0

6 7 8 9 10 11

pH

HHDHBe HHDHIs

图2-6 pH对卤醇脱卤酶酶活的影响

Fig. 2-6 Effects of pH on activity of HHDHs

HHDH HHDH HHDH

HHDH

Tm

Sg Is

BE

100

80

60

Relative activity (%)

40

20

0

6 7 8 9 10 11

pH

图2-7 pH对卤醇脱卤酶稳定性的影响

Fig 2-7 Effects of pH on stability of HHDHs

41

表2-7 pH对卤醇脱卤酶对映选择性及转化率的影响

Table 2-7 Effects of pH on the HHDHs enantioselectivity and conversionrates

| Enzyme | 1,3-DCP (mM) | pH | Conversion (%) | Ee (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 40 | 8.0 | 45.9 | 41.5/S |
| HHDHTm | 40 | 9.0 | 83.4 | 45.7/S |
|  | 40 | 10.0 | 97.2 | 60.5/S |
|  | 40 | 8.0 | 35.7 | 87.3/S |
| HHDHSg | 40 | 9.0 | 71.6 | 81.9/S |
|  | 40 | 10.0 | 92.4 | 84.5/S |
|  | 40 | 8.0 | 22.7 | 16.6/S |
| HHDHBe | 40 | 9.0 | 74.6 | 20.8/S |
|  | 40 | 10.0 | 96.4 | 26.3/S |
|  | 40 | 8.0 | 31.6 | 20.5/R |
| HHDHIs | 40 | 9.0 | 46.7 | 48.5/R |
|  | 40 | 10.0 | 89.3 | 57.1/R |

本节还考察了缓冲液初始pH对卤醇脱卤酶立体选择性和底物1,3-DCP转化率的影响，由表2-7可知，四种卤醇脱卤酶在初始pH 10.0时，底物1,3-DCP的转化率最高，同时HHDHTm、HHDHBe和HHDHIs在pH10.0时产物的ee最高，在pH 10.0时，HHDHTm和HHDHBe 催化1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee达到60.5%和26.3%, HHDHIs催化1,3-DCP合成(*R*) -ECH的ee值为57.1%. 当pH下降时，其产物的ee值下降比较明显。而HHDHSg催化1,3-DCP合成(*S*) -ECH，在初始

pH为8.0时，产物的ee值最高达到了87.3%，并且与前面三个卤醇脱卤酶相比，

pH的变化对其产物ee值的影响不大。影响手性ECH的ee值的因素很多，第一：当pH较高时脱卤活性比较高，随着脱卤的进行pH的下降，溶液中氯离子的生成，又会产生可逆反应；第二：1, 3-DCP也可以自我环化形成外消旋ECH；第三：实验中我们发现卤醇脱卤酶在无负离子亲核试剂存在下，也可以使得手性ECH发生消旋作用。因此后期可以通过提高1, 3-DCP不对称脱卤的选择性，降低逆反应的催化活性及卤醇脱卤酶对手性ECH消旋活性来提高产物的ee值。

#### 2.4.9.2 温度对卤醇脱卤酶酶活及立体选择性的影响

温度对酶的影响作用具有两面性，一方面酶反应的速度随着温度的增加而提高；另一方面温度过高会引起酶蛋白变性而使活力下降。本节考查了四种卤醇脱卤酶在不同反应温度（20-65˚C）下的催化活性。温度对卤醇脱卤酶活力的影响

42

2-8（a）所示，卤醇脱卤酶的最适温度基本在40-50˚C之间，温度继续升高活力下降比较明显，HHDHSg、HHDHTm、HHDHIs和HHDHBe的最适温度分别为50˚C、45˚C、45˚C和40˚C，和目前文献报道的卤醇脱卤酶的最适反应温度（45-55˚C）相符[43, 110, 111]。实验还考察了四种卤醇脱卤酶在相同的缓冲体系中不同温度下保温1 h后残余活力。由图2-8（b）可知四种卤醇脱卤酶中HHDHTm的温度稳定性较好，55˚C保温1 h，残余酶活仍有80%以上。HHDHIs的稳定性最差，在相对较低的温度（40˚C）保温1 h，酶活就损失一半。HHDHSg虽低于45˚C时比较稳定，但高于45˚C失活较快，50˚C保温1 h，酶活损失了一半，甚至在60˚C基本失活。同时也考察了温度对卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成手性ECH的ee值和转化率的影响。由表2-8可知，随着温度的提高，底物的转化率有所增加，但温度对产物的ee值影响并不明显，温度对产物ee值的影响，主要是随着温度上升，1, 3-DCP自我环化的速率提高，从而引起产物ee的降低。

表2-8 温度对卤醇脱卤酶对映体选择性和转化率的影响

Table 2-8 Effects of temperature on the HHDHs enantioselectivity andconversions rates

| Enzyme | 1,3-DCP (mM) | Temperature (°C) | Conversion (%) | Ee (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| HHDHTm | 40 | 20 | 95.3 | 61.3/S |
|  | 40 | 30 | 96.4 | 60.7/S |
|  | 40 | 40 | 98.1 | 60.5/S |
| HHDHSg | 40 | 20 | 90.7 | 85.7/S |
|  | 40 | 30 | 91.6 | 84.9/S |
|  | 40 | 40 | 93.5 | 84.5/S |
| HHDHBe | 40 | 20 | 89.7 | 28.6/S |
|  | 40 | 30 | 90.6 | 27.8/S |
|  | 40 | 40 | 92.4 | 26.3/S |
| HHDHIs | 40 | 20 | 87.3 | 60.5/R |
|  | 40 | 30 | 89.7 | 58.5/R |
|  | 40 | 40 | 90.3 | 57.1/R |

43

HHDH HHDH

HHDH

HHDH

Tm

Sg Is

Be

a 110

100

90

Relative activity (%)

80

70

60

50

40

20 30 40 50 60 70

T (oC)

HHDH

HHDH

HHDH HHDH

Tm

Sg

Is Be

b

100

80

60

Relative activity (%)

40

20

0

20 30 40 50 60 70

T (oC)

图2-8 温度对卤醇脱卤酶活性及稳定性的影响

Fig. 2-8 Effects of temperature on activity (a) and thermostability (b) of HHDHs.

#### 2.4.9.3 金属离子和化学试剂对酶活的影响

酶促反应受多种金属离子的调节，金属离子可以影响底物与酶活性部位的结合、通过自身氧化态调节氧化还原反应以及通过静电稳定或屏蔽负电荷等途径参加酶的催化反应。考察了不同种类金属离子、表面活性剂及EDTA对卤醇脱卤酶催化活性的影响，结果如表2-9所示，和文献报道的一致，Ag+和Hg2+对四种卤醇脱卤酶都有明显的抑制作用[108]，Cu2+对卤醇脱卤酶酶活有一定的抑制作用，其它金属离子对酶活影响不大。表面活性剂对酶活有一定的促进作用。加入1 mM

EDTA对酶活几乎无影响，说明卤醇脱卤酶不属于金属酶。

44

表2-9 各种金属离子和化学试剂对卤醇脱卤酶活性的影响

Table 2-9 Effects of metal ions and chemical agents on HHDHs activity

Relative activity (%)

| Reagent | Concentration |  | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | HHDHSg | HHDHIs | HHDHBe | HHDHTm |
| Control |  | 100 | 100 | 100 | 100 |
| EDTA | 1mM | 98.3±2.1 | 98.7±1.7 | 99.1±0.8 | 98.5±1.8 |
| AgNO3 | 1 mM | 24.2±1.7 | 16.3±2. 3 | 12.4±2. 4 | 10.4±1.5 |
| HgCl2 | 1 mM | 17.8±2.8 | 10.5±3.4 | 14.7±2. 0 | 8.5±1.5 |
| CuSO4 | 1 mM | 89.5±3.9 | 84.2±1.7 | 82.1±2. 4 | 80.6±2.7 |
| ZnSO4 | 1 mM | 95.7±2.4 | 92.1±1.4 | 93.5±1.5 | 92.7±2. 2 |
| CaCl2 | 1 mM | 97.2±1.6 | 94.6±2.1 | 96.4±1.6 | 95.3±2. 3 |
| MgSO4 | 1 mM | 101.1±1.1 | 95.6±1.8 | 98.7±2. 5 | 97.2±2. 7 |
| Tween 20 | 1% (v/v) | 104.2±1.5 | 103.4±2. 2 | 98.7±2. 4 | 99.5±2. 5 |
| Tween 80 | 1% (v/v) | 110.7±3.4 | 108.6±2. 7 | 109.6±2. 8 | 112.4±2. 0 |
| Trinton  X-100 | 1% (v/v) | 102.5±1.2 | 104.5±1.7 | 106.7±1.9 | 104.5±2.3 |

The enzyme activity was measured under the standard conditions using 1,3-DCP as substrate after incubating the enzyme with different metal ions and chemical agents at 35°C for 20 min. The activity in the absence of metal ions was recorded as 100%.

#### 2.4.9.4 卤醇脱卤酶底物谱研究

以四种卤醇脱卤酶的纯酶为催化剂，考察了其对11种卤代醇的催化活性和六种卤代醇的立体选择性，以及在亲核试剂介导下，催化外消旋ECH和苯基环氧乙烷的拆分立体选择性。由表2-10可以看出，卤醇脱卤酶对α位卤代醇的活性比β位卤代醇的催化活性高，HHDHTm、HHDHSg、HHDHBe催化溴代醇的活性明显高于卤代醇，而HHDHIs催化1, 3-DBP的活性低于1, 3-DCP。四种卤醇脱卤酶对1, 3-DCP表现出较高的催化活性，其中HHDHTm> HHDHIs> HHDHSg>

HHDHBe。同时可以看出HHDHIs和HHDHTm对底物CHBE表现出了较好的催化活性，后续可以考察其用于催化（*S*）-CHBE合成（*R*）-HN的应用潜力。

考察了四种卤醇脱卤酶不对称催化潜手性卤代醇和催化拆分外消旋卤代醇的立体选择性。由表2-11 可知，HHDHSg、HHDHTm 和HHDHBe 催化潜手性

45

1,3-DCP和1,3-DBP生成*S*构型的ECH和EBH，催化拆分外消旋2,3-DCP 和

2,3-DBP生成*S*构型的ECH和EBH. HHDHSg催化合成手性环氧化物的ee最高，但对于外消旋2,3-EBH, HHDHTm的催化选择性高于HHDHSg. HHDHIs的立体选择性与其他三种不同，其催化大部分卤代醇合成*R*构型的环氧化物。四种卤醇脱卤酶对于2-氯苯乙醇的催化选择性都比较低。对于外消旋CHBE，四种卤醇脱卤酶都优先拆分*R*构型，生成*R*-型环氧化物。在亲核试剂的作用下，卤醇脱卤酶催化环氧化物拆分，生成手性环氧化物。HHDHSg催化拆分外消旋ECH生成（*R*）-ECH的ee值可以达到99%, HHDHIs催化拆分外消旋ECH生成（*S*）-ECH 的

ee值可以达到99%。而其他两种卤醇脱卤酶催化拆分的选择性很低，对于苯基环氧乙烷，其拆分选择性普遍很低。

表2-10 四种卤醇脱卤酶的底物特异性研究

Table 2-10 Substrate specificity of HHDHs

Enzyme

Substrate

HHDHTm HHDHIs HHDHBe HHDHSg

| 1,3-Dichloro-2-propanol | 100 | 100 | 100 | 100 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2,3-Dichloro-propanol | 0.05 | ND | ND | 1.4 |
| 3-Chloro-1,2-propanediol | 17.5 | 26.8 | 14.1 | 10.8 |
| 2-Chloroethanol | 1.9 | 4.5 | 2.5 | 0.9 |
| 1,3-Dibromo-2-propanol | 385.9 | 81.5 | 310.6 | 214.7 |
| 2,3-Dibromo-propanol | 3.3 | 18.6 | 34.5 | 17.5 |
| 2-Bromoethanol | 13.7 | 27.8 | 85.8 | 40.5 |
| 1-Chloro-2-propanol | 44.37 | 17.2 | 10.6 | 7.5 |
| 2-Chloro-1-phenyethanol | 8.26 | 5.5 | 2.5 | ND |
| 4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile | 26.5 | 54.3 | 14.7 | 4.13 |
| 4-Chloro-3-hydroxybutyrate | 21.93 | 110.5 | 24.5 | 14.6 |

Dehalogenation reaction toward halohydrins was performed in 100 mM sodium phosphate buffer with pH 8.0 at 35°C. The activities of HHDHTm, HHDHIs, HHDHSg and HHDHBe toward 1,3-DCP, corresponding to 72.7, 60.2, 46.3 and 41.1μmol/min/mg, were taken as 100%. ND: the activities toward the substrate were too low to determined.

46

表2-11 四种卤醇脱卤酶的立体选择性

Table 2-11 Enantioselectivity of the HHDHs with six halogenated substrates

ee(%) /configuration

Substrate HHDHTm HHDHSg HHDHBe HHDHIs

| 1,3-Dichloro-2-propanol | 60.2/(S) | 85.6/(S) | 26.1/(S) | 57.0/(R) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2,3-Dichloro-propanol | 46.9/(S) | - | - | - |
| 1,3-Dibromo-2-propanol | 49.7/(S) | 71.2/(S) | - | 29.5/(R) |
| 2,3-Dibromo-propanol | 90.2/(S) | 83.3/(S) | 48.6/(S) | 4.5/(R) |
| 2-Chloro-1-phenyethanol | 32.6/(R) | - | 8.2/(S) | 19.9/(S) |
| Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate | 50.6/(R) | 84.1/(R) | 10.1/(R) | 5.2/(R) |
| Epichlorohydrin | 4.2/(R) | 99/(R) | 14.5/(R) | 99/(S) |
| Styrene oxide | 7.1/(S) | 5.2/(S) | - | - |

**“-":** The epoxide was almost racemic

### 2.4.10 卤醇脱卤酶催化1,3-DCP合成手性ECH

本节考察了HHDHTm、HHDHIs和HHDHSg重组卤醇脱卤酶细胞催化不同浓度的1, 3-DCP合成手性ECH的收率和ee值。由表2-12可知，三种卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成手性ECH的ee值和收率随着底物浓度增加而下降。特别是

HHDHTm和HHDHIs产物ee值的下降速度比较明显，HHDHTm催化1,3-DCP合成手性ECH时，20 mM时(*S*) -ECH的ee值可以达到61.7%，而100 mM时下降至29.8%，相应的产物收率也从76.6%下降到41.7%. HHDHIs催化1,3-DCP合成(*R*) -ECH，20 mM时(*R*) -ECH的ee值可以达到58.6%，而100 mM时(*R*) -ECH 的

ee值只有30.2%，收率也从73.5%下降到38.9%. HHDHSg催化合成（*S*）-ECH，随着底物浓度增加，产物ee值变化不明显，基本是在80%以上，但是产物的收率还是随着底物浓度增加而下降，从85.9%下降到56.2%。从卤醇脱卤酶催化合成手性ECH反应进程来看，底物浓度从20-100 mM时，卤醇脱卤酶的初始酶活没有受到底物浓度的影响，但是高浓度下底物的转化率在下降，说明酶活受到产物的抑制，所以较高浓度时不能完全转化。产物ee下降有多方面的原因，如前面所述，底物浓度不断增加导致反应体系中氯离子浓度不断上升和pH不断下降，生成的环氧氯丙烷在氯离子的作用下，会发生开环反应；同时手性ECH溶液即使没有氯离子的存在，在卤醇脱卤酶作用下也会发生消旋反应。这些因素导致了产物的ee随着底物浓度增加而不断下降。我们也尝试了在整个脱卤反应中维持缓冲液的pH不变，但如控制的pH过高（pH 10.0），1, 3-DCP自我环化比例增加，

47

产物ee还是下降，如pH过低也会发生可逆反应（pH8.0），所以要想解决产物抑制和产物ee值偏低的问题，还是需要从酶本身着手，对酶进行分子改造，改变酶的催化特性。

表2-12 卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH

Table 2-12 Transformation of 1,3-DCP into chiral ECH catalyzed by HHDHs

|  | HHDHTm | | HHDHSg | | HHDHIs | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1,3-DCP  Concentration (mM) | Analytical yield (%) | (S)-ECH  (Ee %) | Analytical yield (%) | (S)-ECH  (Ee %) | Analytical yield (%) | (R)-ECH  (Ee %) |
| 20 | 76.6 | 61.7 | 85.9 | 84.2 | 73.5 | 58.6 |
| 40 | 75.4 | 60.2 | 82.5 | 84.7 | 72.1 | 57.3 |
| 60 | 66.2 | 50.4 | 67.4 | 84.4 | 64.2 | 42.3 |
| 80 | 47.5 | 33.3 | 59.8 | 84.9 | 48.6 | 34.8 |
| 100 | 41.7 | 29.8 | 56.2 | 83.4 | 38.9 | 30.2 |

### 2.4.11 卤醇脱卤酶催化拆分ECH合成手性ECH

卤醇脱卤酶的多功能性还体现在可以催化接受不同种类亲核试剂所介导的环氧化物的开环反应。本实验考察了不同pH和亲核试剂对HHDHSg和HHDHIs拆分ECH的影响。由表2-13可知，HHDHSg表现出与其他已报道的卤醇脱卤酶不同的催化特性，文献报道的卤醇脱卤酶催化ECH选择性开环的最适pH为酸性条件[[26,](#_bookmark180) [141]](#_bookmark270)，而HHDHSg在pH 8.0时拆分效果最好。四种亲核试剂中N3是最好的拆分剂，在N3-离子的介导下，拆分40 mM ECH, （*R*）-ECH的收率可以达到

-

18.7%。当Br-作为拆试剂时，pH 8.0生成产物的构型多为*S*-构型，当pH下降后，则生成的产物多为*R*-构型。而表2-14是HHDHIs催化拆分的结果，由表可知，HHDHIs的拆分选择性刚好和HHDHSg的拆分选择性相反，而且和大多数文献报道的一样，HHDHIs是在酸性条件下（pH 5-6）表现出较好的拆分效果，同样N3-也是最好的拆分剂，pH 5.0的条件下，(*S*) -ECH的收率为17.6%。

48

表2-13 HHDHSg催化拆分ECH

Table 2-13 Kinetic resolution of racemicECH catalyzed by HHDHSg

PH 5 pH 6 pH 7 pH 8

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Yield(%) | ee (%) | Yield(%) | ee(%) | Yield(%) | ee(%) | Yield(%) | ee (%) |
| Br- | - | <10/*R* | 21.8 | 61.5/*R* | - | <10/*R* | 35.4 | 28.5/S |
| Cl- | - | - | - | - | - | - | 32.2 | 37.5/*R* |
| -  N3 | - | - | - | - | 14.2 | 99/*R* | 18.7 | 99/*R* |
| -  NO2 | - | <10/*R* | 29.1 | 74.9/*R* | 12.5 | 99/*R* | 16.7 | 99/*R* |

Nucleophile

“-": The ECH was almost racemic.

表2-14 HHDHIs催化拆分ECH

Table 2-14 Kinetic resolution of racemicECH catalyzed by HHDHIs

PH 5 pH 6 pH 7 pH 8

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Yield(%) | ee (%) | Yield(%) | ee (%) | Yield(%) | ee(%) | Yield(%) | ee (%) |
| Br- | 5.9 | 56.7/*S* | 5.2 | 48.4/*S* | - | - | - | - |
| Cl- | 6.7 | 82.7/*S* | 7.1 | 80.9/*S* | - | - | - | - |
| -  N3 | 17.6 | 99/*S* | 13.6 | 99/*S* | 18.4 | 50/*S* | - | - |

Nucleophile

NO2 33.3 51.4/*S* 40.5 12.8/*S* - - - -

-

“-": The ECH was almost racemic.

### 2.4.12 卤醇脱卤酶催化(*S*) -CHBE合成(*R*) -HN

（*R*）-HN是合成阿托伐他汀的关键手性中间体，经过比较发现利用卤醇脱卤酶催化（*S*）-CHBE先脱卤后加氰基来生产（*R*）-HN是一条非常具有工业化潜力的合成路线。研究发现HHDHTm和HHDHIs对CHBE表现出较高催化活性。由表2-15可以看出，两个卤醇脱卤酶能够很好地应用于催化（*S*）-CHBE合成（*R*）-HN。对于HHDHTm，当底物浓度为100 g/L，湿菌体10 g/L，反应10 h时，产率为85.9%。

当菌体量提高到50 g/L，只需5.8 h，产物的收率可以达到89.2%。但是可以看出在相同的菌体量下，底物浓度从50 g/L提高到100 g/L时，实现90%以上转化所需时间大大延长，而且反应前期比较快，后期比较慢。说明该反应具有明显的产物抑制。当使用HHDHIs作为催化剂时，同样的菌体浓度和底物浓度下，100g/L底物浓度，只需反应2.5 h，产物收率可以达到93.7%，所需时间只有HHDHTm的1/4。当底物浓度为150 g/L时，反应也只需4.5 h，而且增加菌体量，底物300

49

g/L也可以很好地转化，表明HHDHIs 的应用潜力要优于HHDHTm。国外学者也对卤醇脱卤酶合成HN进行了研究，其中Codexis公司的成果最为突出，他们利用定向进化的方法对来源于*A. radiobacter* AD1的卤醇脱卤酶HheC进行了改造，最终实现了在底物浓度为140 g/L的催化过程，其酶量为1.2 g/L（为粗酶冻干粉），反应5 h，产率为92%[98,99]。与之相比，HHDHIs的催化效能和时空产率可以媲美HheC突变体，是目前发现的野生型卤醇脱卤酶催化效率最高的，后期还可以通过定向改造进一步提高其酶活，减少菌体使用量，降低生产成本和分离成本。

表2-15 重组卤醇脱卤酶催化(S) -CHBE合成(R) -HN Table 2-15 Biocatalysis of production of (R) -HN by HHDHs

| Enzyme | Wet cell (g/L) | Substrate loading  (g/L) | Reaction Time (h) | Conversion (%) | Yield(%) | ee(%) | Space-time yield(gproductL-  1d-1) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HHDHTm | 10 | 50 | 1.5 | 96.4 | 92.2 | 99.0 | 737.6 |
| HHDHTm | 10 | 100 | 10 | 92.5 | 85.8 | 99.0 | 205.9 |
| HHDHTm | 50 | 100 | 5.8 | 92.8 | 89.2 | 99.0 | 369.1 |
| HHDHIs | 10 | 100 | 2.5 | 96.5 | 93.7 | 99.0 | 899.5 |
| HHDHIs | 10 | 150 | 4.5 | 95.4 | 90.4 | 99.0 | 723.2 |
| HHDHIs | 40 | 200 | 5.3 | 95.7 | 91.2 | 99.0 | 825.9 |
| HHDHIs | 65 | 300 | 4.5 | 94.5 | 89.3 | 99.0 | 1428.8 |

## 2.5 本章小结

通过传统土壤筛选、基因组狩猎和数据库挖掘等方法获得了七种候选卤醇脱卤酶基因，并将七种卤醇脱卤酶基因与表达载体相连，在大肠杆菌中进行诱导表达，七种卤醇脱卤酶只有HHDHAp1存在部分包涵体，其余均能可溶性表达。

以1, 3-DCP为模式底物对七种卤醇脱卤酶进行功能筛选，发现七种卤醇脱卤

酶都能催化1, 3-DCP合成ECH，其中HHDHTm、HHDHSg、HHDHIs和HHDHBe表现出较高的催化活性和一定的催化选择性。七种重组卤醇脱卤酶中HHDHTm的催化活性最高，而HHDHSg的对映选择性最高。

对四种卤醇脱卤酶进行分离纯化得到相应的纯酶，对其催化性质进行了表征，并讨论了温度、pH和金属离子等对酶活力和稳定性的影响。四种卤醇脱卤酶均在40-50˚C之间具有最高的催化活性，温度对其立体选择性的影响较小。四种卤

50

醇脱卤酶的最适pH均为10.0，pH的变化可以明显影响酶的对映选择性和底物的转化率。EDTA对四种卤醇脱卤酶酶活都没有影响，而Ag+和Hg2+对4种酶都有非常明显的抑制作用，表面活性剂对酶活都有一定的促进作用。

四种卤醇脱卤酶都具有较广的底物谱，对多种卤代醇都具有催化活性和立体选择性，能催化潜手性卤代醇合成手性环氧化物，也可以不对称拆分外消旋卤代醇合成手性环氧化物，HHDHIs和HHDHTm对CHBE的催化活性较高。

四种卤醇脱卤酶工程菌催化1, 3-DCP合成手性ECH，在pH 10.0条件下，

20-100 mM底物浓度范围内，HHDHSg催化1,3-DCP制备(*S*) -ECH的立体选择性最高，产物(*S*) -ECH的ee值和收率在83.4-84.9%和56.2-85.9%之间。而HHDHIs表现出相反的选择性，产物(*R*) -ECH的ee值和收率在30.2-58.6%和38.9-73.5%之间。

卤醇脱卤酶催化拆分ECH合成手性ECH, pH 8.0条件下，HHDHSg在N3-的介导下催化拆分合成(*R*) -ECH的收率和ee值分别为18.7%和99%. 在pH 5.0条件下，HHDHIs在N3-介导下催化拆分合成(*S*) -ECH的收率和ee值分别为17.6%和99%. 卤醇脱卤酶催化(*S*) -CHBE合成(*R*) -HN反应，50 g/L HHDHTm湿细胞催化100 g/L (*S*) -CHBE的转化率和收率分别达到92.8%和89.2%.10 g/L HHDHIs湿细胞催化150 g/L(*S*) -CHBE的转化率和收率分别达到95.4%和90.4%；65 g/L

HHDHIs湿细胞催化300 g/L(*S*) -CHBE的转化率和收率分别达到94.5%和89.3%。

# 51

# 第三章 环氧化物水解酶的挖掘与表征

## 3.1 引言

环氧化物水解酶可用于催化外消旋环氧化物的对映选择性水解，获得高附加值的手性合成中间体-光学纯的环氧化物或者邻位二醇。ECH是一类单取代型环氧化物，其化学性质活泼，极易水解。利用环氧化物水解酶拆分获得手性ECH的研究已有文献报道[29-34]。但是ECH特殊的化学结构给手性识别带来困难，所以高对映选择性新型环氧化物水解酶的获得一直是生物法合成ECH的瓶颈。

环氧化物水解酶广泛存在于各种动植物、昆虫和微生物中，与动植物来源的环氧化物水解酶相比，微生物所产环氧化物水解酶因其不需要辅酶，来源广泛、且对多种底物具有优良的催化活性、高对映选择性和区域选择性，使其成为极具发展潜力的制备手性环氧化物和二醇的的酶催化剂来源。目前已从自然环境中筛选获得大量产环氧化物水解酶的微生物，其中许多微生物中环氧化物水解酶基因被成功克隆并实现了异源表达，部分重组环氧化物水解酶对外消旋ECH表现出良好的催化活性和对映体选择性。鉴于不同来源的环氧化物水解酶对不同环氧化合物的催化活性和对映选择性均有一定的差异，因此通过对微生物资源的进一步

“挖掘”，寻找对特定环氧底物具有更高活性和对映体选择性的新型环氧化物水解酶，构建重组菌，仍然是目前环氧化物水解酶研究的主要方向之一。

新型环氧化物水解酶的发现经历了从传统筛选到数据库基因挖掘的历程。生物信息学的不断发展也为我们提供了大量的数据资源，相比于传统筛选，基因数据挖掘技术虽快速高效，但有一定盲目性。传统筛选是从自然环境中通过利用目标底物作为限制性基质进行富集驯化筛选，其目标明确，在筛选到能够催化目标反应的菌株后，一般经过目标酶的分离纯化、蛋白测序、基因克隆及异源表达等程序，但操作繁琐，周期较长。但是因为环氧化物水解酶具有较好的同源性，可以根据环氧化物水解酶的保守序列设计简并引物进行克隆，或者根据同一属内的已知的环氧化物水解酶基因设计引物进行克隆，这样可以达到事半功倍的效果。

本实验室在前期研究中已经挖掘到对外消旋ECH表现出*S*-选择性的环氧化

52

物水解酶，但有关*R*-选择性环氧化物水解酶的国内外文献报道较少。本章试图以外消旋ECH为目标底物从土壤中筛选得到的产*R*-环氧化物水解酶菌株入手，采用多种克隆策略获得环氧化物水解酶基因，在此基础上，将酶在大肠杆菌中进行异源表达，分离纯化获得纯酶，并考察其酶学性质，筛选到性能优异的新型环氧化物水解酶。

## 3.2 实验材料

### 3.2.1 菌株及质粒

壤霉菌（*Agromyces mediolanus* ZJB120203）和食清洁剂细小棒 菌

（*Parvibaculum lavamentivorans* ZJB14001）菌株为本实验室从土壤样品中筛选得到，现保藏于中国典型微生物菌种保藏中心，保藏编号分别为：CCTCC No: M 2012299和CCTCC M NO：2014373。其他克隆和表达载体、克隆和表达宿主同第二章表2-2。

### 3.2.2 酶与试剂

本研究所用的分子生物学工具酶、试剂盒及其生化试剂见表第二章表2-3。

### 3.2.3 主要仪器

本研究所用的主要仪器见第二章表2-1。

### 3.2.4 引物

本章所使用的PCR引物见表3-1

表3-1 本章所用引物

Table 3-1 Primers in this chapter

| 引物名称 | 引物序列（5‟-3‟） | 目的 |
| --- | --- | --- |
| AmEHF1 | YKSCAYGGYTGGCCMGG-3´ | 简并引物 |
| AmEHR1 | SARYGCRGCAAAGTGTCC |  |
| AmEHF2 | ATGACCGCGGTGAGTCCCAC | 全长克隆引物 |
| AmEHR2 | TCATTGTTCATTTCCTCTCAATTGG |  |
| AmEHF3 | CGCCATATGACCGCGGTGAGTCCCAC | 表达引物 |
| AmEHR3 | ATTTGCGGCCGCTCATTGTTCATTTCCTCTCATTGG | |
| PlEH1F | CATATGTCTCACCGCATCATCCC | PlEH1 扩增引物 |
| PlEH1R | GCGGCCGCTCATTTACCCGTCTTCTCCTGAC |  |
| PlEH2F | CATATGACCGCGACGACGCCTG | PlEH2 扩增引物 |
| PlEH2R | GCGGCCGCTCAGCCCTTTACCTGCTTCACG |  |

53

S=G/C, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, W=A/T, N=A/G/C/T. 下划线部分为限制性内切酶酶切位点。

## 3.3 实验方法

### 3.3.1 培养基

LB液体培养基（g/L）：进口酵母粉5.0，进口蛋白胨10.0，NaCl 10.0, pH

7.0，LB固体培养基中含2%琼脂。

A. *mediolanus* ZJB120203菌株液体培养基（g/L）：甘油10.0，蛋白胨5.0，酵母粉10.0，(NH4) 2SO4 1.0, K2HPO4 1.0, Na2HPO4·2H2O 1.0, NaH2PO4·12H2O 2.0, MgSO4·7H2O 0.5, FeSO4·7H2O 0.01, CaCO3 1.0, pH自然；其固体培养基

（g/L）：牛肉膏3.0，蛋白胨10.0，NaCl 5.0，琼脂15.0-20.0, pH自然。

*P. lavamentivorans* ZJB14001菌株发酵培养基（g/L）：NaCl 5.0，蛋白胨10.0，CaCl2 0.02, pH自然；固体培养基为在液体培养基中加入2%的琼脂。

### 3.3.2 基因组DNA的提取

从保藏的壤霉菌或食清洁剂细小棒菌试管斜面上，用接种环挑取少量菌体在固体培养基平板上划线，倒置于30˚C恒温培养。挑取菌落接入液体培养基中。30˚C 180 rpm培养48 h和120 h，10000×*g*离心5 min收集菌体，然后使用天根生化公司的细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA，操作流程按照说明书进行。取5μL提取的基因组DNA进行琼脂糖(0.9%)凝胶电泳，检验提取结果。

### 3.3.3 基本分子Th物学方法

方法同第二章2.3.3。

### 3.3.4 环氧化物水解酶基因克隆

#### 3.3.4.1 环氧化物水解酶AmEH基因的克隆

以*A. mediolanus* ZJB120203基因组DNA为模板，根据环氧化物水解酶保守序列（HGWPG和GHFAALE）设计简并引物AmEHF1和引物AmEHR1的进行

PCR扩增，PCR反应体系（总体积100μL）：10×*Taq* DNA Polymerase Buffer 10μL(Mg2+)，引物AmEHF1和AmEHR1各0.5μL(50μM)，dNTP mixture 0.5μL

（10 mM），DNA模板1μL, *Taq* DNA 聚合酶1μL，无核酸水86.5μL. PCR反应条件为：94˚C预变性3 min, 94˚C 30 s，60˚C 30 s，72˚C 1.5 min进行30个循环，最后72˚C延伸10 min，终止温度为8˚C. PCR产物胶回收后连接T 载

54

体，转化*E. coli* JM109，测序鉴定。

利用软件分析测序结果，设计全长PCR引物，以该基因组DNA为模板，在引物AmEHF2和引物AmEHR2的作用下进行PCR扩增。PCR反应体系（总体积100μL）：10×*Pfu* DNA Polymerase Buffer 10μL，引物AmEHF3和AmEHF4各0.5μL(50μM)，dNTP mixture 0.5μL(10 mM)，DNA模板1μL, *Pfu* DNA Polymerase 1μL，无核酸水86.5μL. PCR反应条件同前。PCR产物胶回收纯化后经*Taq* DNA聚合酶处理后与T载体相连，热激转化*E. coli* JM109感受态，测序鉴定。

#### 3.3.4.2 环氧化物水解酶AmEH工程菌的构建

根据AmEH基因全长序列设计表达引物AmEHF3和引物AmEHR3，并在引物中引入了*Nde* I和*Not* I限制性酶切位点。在引物AmEHF3和引物AmEHR3的引发下，利用高保真*Pfu* DNA聚合酶（fermentas）进行PCR扩增，产物胶回收纯化后与T载体相连。利用*Nde* I和*Not* I限制性内切酶（fermentas）对含目的基因T载体进行双酶切，与同样限制性内切酶处理的表达载体pET28a按5:1的摩尔比进行混合，加入T4 DNA连接酶16˚C连接过夜，构建环氧化物水解酶

AmEH的重组表达质粒pET28a-AmEH，将构建的胞内表达质粒pET28a-AmEH热激转化至感受态细胞*E. coli* BL21(DE3)中，即得重组的*E. coli* BL21/pET28a-AmEH

#### 3.3.4.3 环氧化物水解酶PlEH基因的克隆

以*P. lavamentivorans* ZJB14001的基因组DNA为模板，以NCBI中其全基因组中预测的环氧化物水解酶基因序列设计引物（基因的上游引物含*Nde* I限制性酶切位点，下游引物含*Not* I限制性酶切位点）进行PCR扩增。PCR反应体系（总体积100μL）：10×*Pfu* DNA Polymerase Buffer 10μL, dNTP mixture 0.5μL（10

mM），克隆引物PlEH1F或PlEH2F、引物PlEH1R或PlEH2R各0.5μL（50μM），

DNA模板1μL, *Pfu* DNA Polymerase 1μL，无核酸水86.5μL. PCR反应条件为同3.3.4.1，扩增后的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后，胶回收后与T载体相连，利用*Nde* I和*Not* I限制性内切酶对含目的基因的T载体进行进行双酶切，与同样限制性内切酶处理的表达载体pET28a按5:1的摩尔比进行混合，加入T4

DNA 连接酶16 ˚C 连接过夜，构建环氧化物水解酶PlEH 的重组表达质粒

pET28a-PlEH。将构建的胞内表达质粒pET28a-PlEH热激转化至感受态细胞*E.*

55

*coli* BL21(DE3)中，即得重组的*E. coli* BL21/pET28a-PlEH

### 3.3.5 重组环氧化物水解酶的诱导表达

含有胞内表达重组质粒pET28a-EH的重组*E. coli* BL21/pET28a-EH接种至含有50μg/mL卡那霉素抗性的LB液体培养基，在37˚C培养12 h，再以1%接种量（v/v）接种到新鲜的含有50μg/mL卡那霉素抗性的LB液体培养基中37˚C培养至菌体浓度OD600约0.6-0.8左右，再向LB液体培养基加入终浓度为0.5 mM的IPTG, 28˚C诱导培养10 h后，将培养液在4˚C、10000×*g*离心10 min，弃去上清液，收集沉淀，即获得含有重组环氧化物水解酶的湿菌体。

### 3.3.6 重组环氧化物水解酶的分离纯化

利用Ni-NTA纯化目标蛋白，具体纯化方法同第二章2.3.8。

### 3.3.7 分析方法

分析方法同第二章2.3.11。

### 3.3.8 环氧化物水解酶酶活测定

环氧化物水解酶酶活测定采用气相色谱进行测定，以外消旋ECH为底物为例。测活体系：10 mL体系，40 mM 外消旋ECH，合适浓度的酶液，100 mM pH

8.0磷酸盐缓冲液。30˚C 150 rpm振荡器反应一定时间，加入含有内标物氯代正己烷的乙酸乙酯进行萃取15 min，取有机相无水硫酸钠干燥后，进行气相检测。酶活单位（U）定义为：在30˚C、pH 8.0条件下，在1 min内催化ECH水解所需要的酶量定义为1 U。

### 3.3.9 重组环氧化物水解酶酶学性质表征

重组环氧化物水解酶纯化后，以外消旋的ECH为底物，考察不同温度、不同pH对环氧化物水解酶活力和稳定性的影响，不同金属离子和化学试剂对环氧化物水解酶酶活的影响，环氧化物水解酶的底物特异性、选择性以及酶动力学性能。

### 3.3.10 重组细胞催化拆分合成手性ECH的研究

于10 mL反应体系（100 mM磷酸盐缓冲液，pH 8.0）中，加入一定量的重组菌湿细胞和不同浓度的ECH，置于30˚C, 150 rpm摇床上反应一定时间，取500

μL反应液，用乙酸乙酯萃取，有机相经无水硫酸钠干燥过夜后，采用气相色谱测定转化率和对映选择性。

56

## 3.4 结果与讨论

### 3.4.1 AmEH基因的克隆及序列分析

迄今已报道的部分环氧化物水解酶的基因序列有AnEH (GeneBank accession no. XP\_001397530.1, *A. niger* CBS 513.88), RgEH (GeneBank accession no. AAF64646, *R. glutinis* CIMW 147), RtEH (GeneBank accession no. AAO67343, *R. toruloides* CBS 0349), PsEH ( GeneBank accession no. WP\_008367728, *Pseudomonas* sp. M47T1) ADEH ( GeneBank accession no. CAA73331, *A. radiobacter* AD1)，其氨基酸序列比对结果如图3-1所示。星号标出的区域是保守区域。因此本章利用保守区域设计简并引物获取部分序列，引物如表3-1所示，利用简并引物进行PCR获得环氧化物水解酶基因的部分序列。琼脂糖凝胶电泳检测发现在750 bp处，有明显条带（图3-2）. 将条带胶回收后与T载体成功连接后，送样测序。对测序结果进行分析表明：简并PCR获得的产物序列大小为799

bp，经比对发现其与来自于节杆菌(*Arthrobacter* sp. JBH1)的环氧化物水解酶基因中间序列的同源性达到98%，根据同源性最高的环氧化物水解酶基因序列为参考设计引物，以来源于*A. mediolanus* ZJB120203菌株的总基因组DNA为模板进行

PCR，克隆长约1.2 kb（如图3-2b）的环氧化物水解酶基因片段。将该片段连接到T载体上后，送样测序，并利用软件对测序结果进行分析，该序列含有一个长为1167 bp的开放阅读框。编码388个氨基酸，将AmEH基因序列提交到GenBank数据库，登陆号为JX467176. 在线软件ExPASy预测其等电点为4.8，蛋白分子量为42.9 kDa. 序列分析发现其与来自于*Arthrobacter* sp. JBH1预测环氧化物水解酶氨基酸序列(GeneBank accession no. AFI98637)同源性达99%，与来自于*Sphingomonas* sp*.* KC8 (ZP\_09141165), *N. aromaticivorans* DSM 12444 (YP\_497537), *R. toruloides* CBS 0349 (AAF64646), *R. glutinis* CIMW 147 (AAF64646), *A. niger* M200 (ABF21120), and *A. radiobacter* AD1 (CAA73331)的环氧化物水解酶的同源性分别为43%、39%、34%、34%、31%和31%（如图3-3）。通过序列比对可以推测AmEH的催化三联体分别为Asp181, His362和Glu336（绿色标记），起着固定底物结合位置和辅助环氧开环作用的为Tyr308和Tyr239（粉色标记），含有关键的保守序列Sm-X-Nu-X-Sm-Sm motif (GGDWGS)和HGW[O] P。

57



图3-1 环氧化物水解酶多序列比对结果

Fig 3-1 Multiple sequences alignment of epoxide hydrolases



a



b

图3-2 简并引物PCR（a）和全序列PCR（b）琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3-2 PCR amplification of the consensus sequence and the full length of AmEH

58



图3-3 AmEH与同源酶的序列比对

Fig. 3-3 Multiple alignments of amino acid sequences of EHs. The protein accession numbers are:

*A. mediolanus* ZJB120203 (AmEH, this paper), *Arthrobacter* sp. JBH1 (AsEH, AFI98637), *Sphingomonas* sp. KC8 (SsEH, ZP\_09141165), *N. aromaticivorans* DSM 12444 (NaEH, YP\_497537), *R. glutinis* CIMW 147 (RgEH, AAF64646), *R. toruloides* CBS 0349 (RtEH, AAO67343), *A. niger* M200 (AnEH, ABF21120), and *A. radiobacter* AD1 (AD1EH, CAA73331). The amino acid residues that are conserved in all sequences are all labeled in red. The catalytic triad (Asp181, His362 and Glu336) and the two tyrosines (Tyr308 and Tyr239) are marked in green and pink, respectively. The oxyanion hole of active site motif is marked by blue triangles.

### 3.4.2 AmEH在大肠杆菌中的异源表达

工程菌*E. coli* BL21(DE3) /pET28a-AmEH在28˚C下经IPTG诱导培养10 h后，收集菌体，将获得的菌体超声破碎，离心。SDS-PAGE分析可以看出，工程菌经诱导后在43 kDa附近出现明显条带，预测值相符，而作为对照的未诱导菌没有该条带，说明经过诱导重组菌成功表达目的蛋白，且重组蛋白基本存在于上

59

清。



图3-4 AmEH的表达与分离纯化SDS-PAGE分析

Fig. 3-4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of AmEH

Lane M, molecular weight mark; Lane 1, *E. coli* BL21(DE3) /pET28a; Lane 2, uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28a-AmEH; Lane 3, *E. coli* BL21(DE3) /pET28a-AmEH induced by IPTG; Lane 4, soluble fraction of BL21(DE3) /pET28a-AmEH induced by IPTG; Lane 5, the purified AmEH.

### 3.4.3 PlEH1和PlEH2基因克隆与序列分析

从已公布的*P. lavamentivorans*菌基因组序列着手，挑选出预测的环氧化物水解酶基因，以此设计引物进行PCR，从实验室筛选保藏的*P. lavamentivorans* ZJB14001菌株的基因组中克隆出PlEH1基因（GeneBank accession no. WP\_012110639）和PlEH2基因（GeneBank accession no. WP\_012110640.1）。PlEH1序列含有一个长为1224 bp的开放阅读框，编码407个氨基酸。在线软件预测其等电点为5.15，分子量为46.5 kDa. PlEH2序列含有一个长为1191 bp的开放阅读框，编码396个氨基酸，在线软件预测其等电点为6.03，分子量为44.2

kDa. PlEH1与PlEH2, AmEH，AnEH，RtEH同源性分别为39.6%，41.5%，29.9%和31.2%, PlEH2与AmEH，AnEH，RtEH的同源性分别为38.4%，29.0%，29.5%. 通过序列比对可以推测PlEH1和PlEH2的催化三联体分别为Asp187, His377, Asp 336和Asp184, His373, Glu 346，起着固定底物结合位置和辅助环氧开环作用的Tyr321, Tyr247和Tyr317，Tyr243，含有关键的保守序列Sm-X-Nu-X-Sm-Sm motif (GGDWGS)和HGW[O] P 。

60



图3-5 PlEH1和PlEH2与同源酶的序列比对

Fig. 3-5 Multiple alignments of amino acid sequences of EHs. The amino acid residues that are conserved in all sequences are all labeled in red. The catalytic triad (Asp187, His377 and Asp 336) and (Asp184, His373 and Glu346) are marked marked by pink triangles. The tyrosines (Tyr321 and Tyr247) and (Tyr317 and Tyr243) are marked by blue triangles. The oxyanion hole of active site motif is marked by brown stars.

### 3.4.4 PlEH1和PlEH2的诱导表达

工程菌*E. coli* BL21(DE3) /pET28a-PlEH1和工程菌*E. coli* BL21(DE3) / pET28a-PlEH2在28˚C下经IPTG诱导培养10 h后，离心收集菌体，将获得的菌体超声破碎，离心。SDS-PAGE分析可以看到，工程菌经诱导后在47和44 kDa附近出现明显条带，大小与预测得相符，而作为对照的未诱导菌没有该条带，说明经过诱导重组菌成功表达目的蛋白，PlEH2重组蛋白基本存在于上清，而PlEH1部分以不溶性的包涵体存在。

61



图3-6 PlEH1和PlEH2的表达SDS-PAGE分析

Fig. 3-6 SDS-PAGE analysis of the expression of PlEH1 and PlEH2

Lane M, protein molecular weight marker; lane 1, uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28a- PlEH1; lane 2, *E. coli* BL21(DE3) /pET28a-PlEH1 induced by IPTG; lane 3, supernatant of the cell extract; lane 4, precipitation of cell extract; lane 5, uninduced *E. coli* BL21(DE3) /pET28a- PlEH2; lane 6:

*E. coli* BL21(DE3) /pET28a-PlEH2 induced by IPTG; Lane 7: supernatant of the cell extract; lane 8, precipitation of cell extract.

### 3.3.5 重组环氧化物水解酶的筛选

考察了三种环氧化物水解酶催化拆分ECH的水解反应，比较这三种酶的催化活力、立体选择性和底物耐受性。三种环氧化物水解酶都优先水解（*R*）-ECH，其中PlEH2的酶活力最高，但其立体选择性不如AmEH。综合考虑这三种酶的催化活力和立体选择性，本论文选择立体选择性比较高的AmEH作为进一步研究的对象。

表3-2 三种环氧化物水解酶催化拆分外消旋环氧氯丙烷的比较

Table 3-2 Comparison of ECH resolution between AmEH, PlEH1 and PlEH2

| Enzyme | ECH conc.  (mM) | Cat.conc  (g/L) | Time (min) | Ees (%)/abs.conf. | Yield (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 50 | 40 | 35 | >99.0/S | 22.3 |
| AmEH | 150 | 40 | 80 | >99.0/S | 16.3 |
| 300 | 80 | 40 | >99.0/S | 16.2 |
|  | 50 | 50 | 120 | 5.0/S | ND |
| PlEH1 | 150 | 50 | 120 | 4.6/S | ND |
| 300 | 50 | 240 | 4.0/S | ND |
|  | 50 | 4 | 2 | >99.0/S | 12.5 |
| PlEH2 | 150 | 4 | 5 | >99.0/S | 8.6 |
| 300 | 8 | 12 | >99.0/S | 4.2 |

ND: not determined

62

### 3.4.6 重组环氧化物水解酶分离纯化

pET28a质粒上带有His-tag融合标签，因此表达的AmEH的N端带有6个组氨酸残基，因此AmEH采用Ni-NTA亲和柱分离纯化后，得到了相应的纯酶，SDS-PAGE电泳图如图3-4所示。

### 3.4.7 环氧化物水解酶酶学性质研究

#### 3.4.7.1 pH对AmEH酶活及稳定性的影响

反应介质的pH可以影响酶的活性及选择性，这可能是由于反应介质的pH改变引起酶活性位点的立体构象变化。本节考察了不同pH值（4.0-10.0）对AmEH酶活力的影响，如图3-7所示，AmEH的最适pH为8.0，pH 6.0-9.0之间仍保持了80%以上的活力，低于6.0或大于10.0酶活迅速下降。同时考察了AmEH 的

pH稳定性，将纯酶保存于不同pH的缓冲液中（pH 4.0-10.0）, 4˚C放置0.5 h，测定剩余活力，结果如图3-7所示，在pH 6.0-9.0条件下稳定性较好。当pH<6.0和pH>9.0时活力损失较大，pH 4.0条件下残余酶活仅为初始酶活的10%左右。圆二色谱仪（CD）通过测量蛋白质等生物大分子的圆二色光谱从而分析生物大分子的二级结构信息[[142,](#_bookmark271) [143]](#_bookmark272)。CD紫外区段（190-240 nm）图谱包含了生物大分子主链构象的信息。α-螺旋构象的CD谱在222 nm、208 nm处呈负峰，在190 nm附件有一正峰。β-折叠构象的CD谱，在217-218 nm处有一负峰，在195-198 nm处有一强的正峰。无规则卷曲构象的CD谱在198 nm附近有一负峰，在220 nm附件有一小而宽的正峰。通过CD分析，不同pH下的AmEH的二级结构，可以发现当pH在6.0-9.0时，其二级结构变化不大，但是当pH为5.0时其二级结构变化比较明显，这进一步验证了该酶在pH 6.0-9.0条件下酶活和稳定性较好，而小于6.0时活力和稳定性较低。



Citric acid-Na HPO buffer

2 4

Na HPO -NaH PO buffer

2 4 2 4

Na B O .10H O-H BO buffer

2 4 7 2 3 3

Glycine-NaOH buffer

a 100

80

60

Relative activity(%)

40

20

0

3 4 5 6

637 8 9 10 11

**pH**

b

100

80

Relative activity(%)

60

40

20

0



4 5 6 7 8 9 10

pH

c

100

80 pH 5



60

40

20

CD(mdeg)

0

-20

-40

-60

-80

-100

PH 6

PH 7

PH 8

PH 9

200 250 300 350 400

Wavelength(nm)

图3-7 pH对环氧化物水解酶酶活及稳定性的影响

Fig. 3-7 Effects of pH on activity(a) and stability (b) of the purified AmEH.

The activities were determined in standard conditions with 0.1 M in different buffers with pH varying from 4.0 to 10.0. The remaining activity was assayed under the enzyme assay condition after the purified recombinant enzyme had been incubated at 30°C for 30 min in 0.1 M different buffer. The enzyme activity obtained in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) was taken as 100%. The results are means±SD from three independent determinations. The CD spectra of AmEH were collected in triplicate at wavelengths from 190 to 350 nm with a scan speed of 20 nm/min (color figure online) (c).

#### 3.4.7.2 温度对AmEH酶活及稳定性的影响

酶的催化反应速率与温度有关。如图3-8a所示，随着温度的升高，环氧化物水解酶的酶活呈先上升再下降的趋势，其最适温度为35°C，40°C以后酶活迅

64

速下降，50°C时仅为35°C时的10%左右。将纯酶置于磷酸盐缓冲液中（20 mM, pH 8.0），分别在不同温度下保温1 h， 测定剩余活力，由图3-8a和3-8b可以看出温度越高，酶越不稳定，30°C的半衰期为56 h, 35°C的半衰期为45.6 h。通过

CD分析不同温度下，环氧化物水解酶的二级结构的变化，可以发现温度在10-40°C范围内，结构变化不明显，当温度大于50°C时，二级结构有了明显变化，酶蛋白开始变性失活。

a

100

80

60

Relative activity(%)

40

20

0

15 20 25 30 35 40 45 50 55

T(oC)

b

5.0

4.5

4.0

3.5

3.0

Ln(RA)

2.5

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Time(h)

65

c



10 oC

20 oC

30 oC

40 oC

50 oC

60 oC

70 oC

20



0

MRE(deg.cm2.dmol-1)



-20



-40



-60



-80

180 200 220 240 260 280 300 320 340 360

wavelength(nm)

图3-8 温度对环氧化物水解酶酶活及稳定性的影响

Fig. 3-8 Effects of temperature on the activity (◆) and stability (◇) of the purified AmEH (a). Assays were performed at various temperatures under the enzyme assay condition. The remaining activity was assayed under the enzyme assay conditions after the purified recombinant enzyme had been placed at indicated temperature for 1 h with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0). The results are means±SD from three independent determinations. The CD spectra of EH were collected in triplicate at wavelengths from 190 to 350 nm with a scan speed of 20 nm/min (color figure online) (b).

#### 3.4.7.3 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

考察了不同金属离子和金属螯合剂EDTA对环氧化物水解酶的活力影响。在反应体系中加入不同种类的金属离子，结果见表3-3，研究发现只有Ca2+和

Mg2+对环氧化物水解酶有轻微的激活作用。其他离子都表现出抑制作用，特别是Ag+, Hg2+和Cu2+显著抑制酶活性。另外加入5 mM的EDTA对活力几乎没有影响，说明环氧化物水解酶AmEH并不是一个金属酶。

66

表3-3 不同金属离子和化学试剂对环氧化物水解酶活力的影响

Table 3-3 Effects of metal ions and chemical agents on AmEH activity

| Reagent | Concentration | Relative activity (%)a |
| --- | --- | --- |
| None |  | 100 |
| EDTA-Na2 | 5 mM | 98.5±1. 3 |
| CoCl2 | 1 mM | 75.8±2.3 |
| NiCl2 | 1 mM | 52.6±1.7 |
| FeCl3 | 1 mM | 87.3±2.0 |
| BaCl2 | 1 mM | 53.8±0.9 |
| CaCl2 | 1 mM | 103.7±2.4 |
| MgCl2 | 1 mM | 102.6±1.2 |
| MnSO4 | 1 mM | 89.2±2.8 |
| ZnSO4 | 1 mM | 68.5±2.1 |
| AgNO3 | 1 mM | 13.7±1.8 |
| HgCl2 | 1 mM | 0 |
| CuSO4 | 1 mM | 19.2±3.1 |
| Triton-X100 | 2% (v/v) | 110.3±1.2 |
| Tween 80 | 2% (v/v) | 120.6±2.5 |
| DMSO | 2% (v/v) | 90.2±3.7 |

AThe enzyme activity was measured under the standard conditions using ECH as substrate after incubating the enzyme with different metal ions and chemical agents at 30°C for 30 min. The activity in the absence of metal ions was recorded as 100%.

#### 3.4.7.4 底物特异性和对映选择性

以AmEH纯酶为催化剂，考察了其对12种环氧化物的催化活性和对映选择性。如表3-4所示，AmEH对表中所有环氧化物都具有催化活性。对单取代的环氧化物的催化活性要明显高于双取代环氧化物。对苄基缩水甘油醚类底物的催化活性和选择性受到苯环上取代基的位置的影响而有所变化，当苯环无取代基时催化活性和对映选择性最高，当邻位、间位和对位被甲基取代后，酶活力和立体选择性随着取代位置不同而变化（邻位>间位>对位）。脂肪族环氧化物取代基的链长对酶活影响也比较明显，酶对化合物11的活力只有ECH的14.5%。双取代环氧化物的取代基大小也会影响酶的催化选择性和活力，由表可知酶对化合物7的催化活力和选择性明显高于化合物8和9，其剩余底物的ee值可达95.7%。与目前所报道的环氧化物水解酶比较，AmEH所表现出的立体选择性也是比较少见的，对于ECH它能优先水解(*R*) -ECH生成(*S*) -ECH，而对于苯基环氧乙烷它能选择性

67

地优先水解（*S*）-苯基环氧乙烷合成ee> 99%的(*R*) -环氧苯基乙烷，AmEH水解苯基环氧乙烷合成(*R*) -苯基环氧乙烷的工作有待于后续进一步研究。

表3-4 环氧化物水解酶AmEH催化不同环氧化物

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Serial  number | Substrates | | | Relative activity  (%)a | Absolute  configurationb | ee (%) |
| 1 |  | Cl O | Epichlorohydrin | 100 | *S* | >99.0 |
|  |  | O |  |  |  |  |
| 2 |  |  | Styrene oxide | 43.3 | *R* | >99.0 |
| 3 |  | O  O | Benzyl glycidyl ether | 84.9 | *S* | >99.0 |
| 4 |  | O  O | *Rac*-m-benzyl glycidyl ether | 54.9 | *S* | 88.4 |
| 5 |  | O  O | *Rac*-p-benzyl glycidyl ether | 41.2 | *S* | 47 |
| 6 |  | O  O | *Rac*-o-benzyl  glycidyl ether | 35.8 | *S* | 91.1 |
| 7 |  | O  OH | 3-Phenylglcidol | 51.1 | (*R*,*R*) | 95.7 |
| 8 |  | O  COOMe | Methyl-3-phenyl glycidate | 17.8 | (*R*,*S*) | 11.5 |
| 9 |  | O  COOEt | Ethyl-3-phenyl glycidate | 8.6 | (*R,S*) | 9.4 |
| 10 |  | O | Cyclohexene oxide | 15.8 | - | *meso* |
| 11 |  | O  O | Allyl glycidyl ether | 89.6 | n.d.c | n.d. |
|  |  | O |  |  |  |  |
| 12 |  |  | 1,2-Epoxyoctane | 14.5 | n.d. | n.d. |

Table 3-4 Comparison of the enzyme activity and enantioselectivity of AmEH toward various epoxide substrates

AValue are expressed as percentage of the activity measure with ECH taken as 100%; bAbsolute configuration, meaning the configuration of remaining epoxide after reaction; cNot determined.

#### 3.4.7.5 动力学参数

酶促反应动力学的研究有助于寻找有利的反应条件，最大限度地提升酶催化反应的效率。在以上研究的基础上，我们对该反应的动力学参数进行了测定。由米氏(Michaelis-Menten)方程，即

68

两边取倒数可得

*V* *Vm* [*S* ]

*Km*[*S* ]

(式3-1)

1 *Km* 11

*V* V max *S**V* max

(式3-2)

实验测定了不同的底物浓度下的反应初速度，并用Lineweaver-Burk双倒数法做图，即以1/V与1/[S]作图时，其较低浓度下的点经拟合后交于x轴上的点即为-1/*Km*，与y轴的交点即为1/*Vmax*，经计算求得（*R*）-ECH最大反应速率*Vmax=*35.62 μmol·min-1·m g-1，米氏常数*Km*=56.6 mM. （*S*）-ECH 最大反应速率

*Vmax=*7.90，米氏常数*Km*=161.4.

表3-5 AmEH的动力学参数

Table 3-5 Kinetic parameters of hydrolysis of(*S*) -and (*R*) -ECH with AmEH

| Substrate | Km (mM) | Vmax (μmolmin-1mg-1) | Kcat (s-1) | Kcat/Km (mM-1s-1) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| (R)-ECH | 56.6 | 35.62 | 25.74 | 0.453 |
| (S)-ECH | 161.4 | 7.90 | 5.71 | 0.035 |

### 3.4.8 环氧化物水解酶拆分外消旋ECH

以重组环氧化物水解酶纯酶为催化剂，考察其催化64 mM外消旋ECH的反应进程。如图3-9所示，反应35 min后（*R*）-ECH完全被水解，（*S*）-ECH的最终收率为21.5% (理论收率50%)，ee值大于99%，对映体选择率（*E*）为12.9，略优于文献报道的环氧化物水解酶NaEH的立体选择性[[31]](#_bookmark185)。

(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*(%)

35 120

30 100

25

80

Concentration(mM)

20

*ee*(%)

60

15

40

10

5 20

0 0

0 5 10 15 20 25 30 35 40

Time(min)

图3-9 环氧化物水解酶拆分64 mM外消旋ECH反应进程

Fig. 3-9 Enantioselective resolution of 64 mM racemic ECH by the purified AmEH

69

## 3.5 本章小结

以拆分外消旋的ECH为目标反应，采用两种策略从实验室筛选保藏的2株菌株中克隆得到3个环氧化物水解酶基因，并将3种环氧化物水解酶基因分别在大肠杆菌中进行表达。其中AmEH和PlEH2为可溶性表达，而PlEH1部分可溶性表达。

3种环氧化物水解酶对外消旋ECH都表现出*R*-选择性，其中PlEH2的酶活最高，而AmEH的对映选择性最优。对AmEH进行分离纯化获得纯酶，对其酶学性质进行了表征。其最适温度35°C，最适pH 8.0，在低温条件下和pH 6.0-9.0范围内稳定性较好。Ag+, Hg2+和Cu2+对酶活有明显的抑制作用。EDTA对酶活没有影响，AmEH具有较广的底物谱，对多种环氧化物表现出催化活性和较好的立体选择性，取代基的类型、大小和位置影响酶的酶活和立体选择性。

AmEH对ECH表现出良好的立体选择性（*E*=12.9），在64 mM的底物浓度下，(*S*) -ECH的收率和ee值分别达到21.5%和> 99%。

# 70

# 第四章 卤醇脱卤酶立体选择性的分子改造研究

## 4.1 引言

近年来，酶作为催化剂进行生物催化和转化，已成为合成手性药物和精细化学品等的重要工具。但是天然酶催化活性、选择性和稳定性等方面的局限性限制了其在工业生产中的应用，因此，利用相对简单的方法对天然酶进行改造就显得非常有研究意义和应用前景。酶催化性能的改变可以通过定向进化或者理性设计来实现。在特定的酶进行分子改造过程中，选用哪一种突变方法取决于对酶的结构和功能的了解程度和是否具有高效的筛选方法。随着PDB数据库中酶蛋白质晶体结构数量的不断增加和酶蛋白质三维结构模型预测软件的不断发展，理性设计或者半理性设计变得更加快速有效，而被广泛应用。同时，新的基因突变技术和新的高通量筛选方法的不断发展，将使定向进化技术更好的应用于酶的催化特性的改造，增加了创造新功能酶的可能性。

手性ECH是一种重要的手性合成子和医药中间体，在手性药物及精细化工合成领域具有十分重要的应用前景。传统的化学与生物拆分法手性产物的收率低于50%。通过前述研究，我们获得了能够催化1, 3-DCP一步脱卤合成手性ECH的卤醇脱卤酶，其最高理论收率可以达到100%。但是研究结果表明，筛选到的卤醇脱卤醇催化合成的手性ECH的ee都比较低，最高的HHDHSg的ee值也只有80%以上，无法满足实际要求。卤醇脱卤酶HheC的晶体结构已经被解析，其催化卤代醇的脱卤反应机制及关键氨基酸位点已有文献报道，因此本文首先尝试选择一种相对简单、高效的策略-结构指导的定点饱和突变技术，对卤醇脱卤酶

HheC进行定向改造，以提高其催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH的立体选择性。

同时以HheC晶体结构为模板，利用同源建模软件对其他卤醇脱卤酶进行同源建模，构建其他卤醇脱卤酶的晶体结构模型。通过分析结构-功能关系（利用预测结构分析了酶的活性位点以及可能影响其催化性质的关键氨基酸位点，并对一些关键位点进行研究）确定可能影响其催化立体选择性的关键氨基酸位点，然后针对这些位点进行定点饱和突变，并从卤醇脱卤酶的饱和突变文库中筛选立体

71

选择性提高的突变体，并进一步对卤醇脱卤酶突变体的催化性质进行研究，测定动力学参数；在此基础上对卤醇脱卤酶结构和立体选择性之间的相互关系进行初步的探讨。

## 4.2 材料

### 4.2.1 菌株与质粒

第二章构建的pET28b-HHDH，以及实验室保藏的pET28b-HheC作为亲本，宿主*E. coli* BL21(DE3)用于定点饱和突变库的构建。

### 4.2.2 酶与试剂

构建定点饱和突变用的PrimeSTAR HS DNA聚合酶为Takara产品，*Dpn* I

购于Fermentas, 其它分子生物学工具酶、试剂盒及其它生化试剂见第二章表2-3。

### 4.2.3 主要仪器

见第二章表2-1。

### 4.2.4 引物

本章使用的PCR引物见表4-1。

表4-1 本章所用的引物

Table 4-1 Primers in this chapter

| 酶 | 引物名称 | 引物序列 (5‟-3‟) |
| --- | --- | --- |
|  | F12NF | GTAAAGCATNNSGGTGGCATGGGCTCTG |
|  | F12NR | CATGCCACCSNNATGCTTTACGTTAGTCAC |
|  | P175NF | GCGATCGGTNNSAACTACCTGCACTCTG |
|  | P175NR | CAGGTAGTTSNNACCGATCGCGAAAACCG |
|  | N176NF | ATCGGTCCGNNSTACCTGCACTCTGAAGACAG |
|  | N176NR | GTGCAGGTASNNTCGGACCGATCGCGAAAAC |
|  | Y177NF | GGTCCGAACNNSCTGCACTCTGAAGACAGC |
|  | Y177NR | AGAGTGCAGSNNGTTCGGACCGATCAGG |
|  | L178NF | CCGAACTACNNSCACTCTGAAGACAGCCC |
| HheC | L178NR | TTCAGAGTGSNNGTAGTTCGGACCGATCG |
|  | Y185NF | GACAGCCCGNNSTTCTACCCGACCGAACC |
|  | Y185NR | CGGGTAGAASNNCGGGCTGTCTTCAGAG |
|  | F186NF | AGCCCGTACNNSTACCCGACCGAACCGTG |
|  | F186NR | GGTCGGGTASNNGTACGGGCTGTCTTCAGAG |
|  | Y187NF | CCGTACTTCNNSCCGACCGAACCGTGG |
|  | Y187NR | TTCGGTCGGSNNGAAGTACGGGCTGTCTTC |
|  | W249NF | ATCGAACGTNNSCCGGGTATGCCGGAACTC |
|  | W249NR | CATACCCGGSNNACGTTCGATCATCGGGAAG |
|  | W249PF | ATCGAACGTCCGCCGGGTATGCCGGAAC |

72

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | W249PR | CATACCCGGCGGACGTTCGATCATCGGGAAG |
|  | V137NF | AGCTCCGCCNNSCCGAAGCACGGTCTGCC |
|  | V137NR | GTGCTTCGGSNNGGCGGAGCTCACGAACAG |
|  | N179NF | CTGGCCCCGNNSTTCATTGAAAGCCCGACCTAC |
|  | N179NR | TTCAATGAASNNCGGGGCCAGTGCGTTAAC |
| HHDHSg | W242NF | GCTGGCGGTNNSGCCTAACTCGAGCACCAC |
| W242NR | GAGTTAGGCSNNACCGCCAGCGAAATACAG |
|  | Y186NF | AGCCCGACCNNSTTCCCGAAAGAACTGCTGG |
|  | Y186NR | TTTCGGGAASNNGGTCGGGCTTTCAATGAAG |
|  | F15NF | GCTACCCACNNSCTGGGCAAACCGGGTATTAC |
|  | F15NR | TTTGCCCAGSNNGTGGGTAGCGTCGGTAACC |
|  | T183NF | GTGGCTCCGNNSTTTCTGTACTCTGAAACTTAC |
|  | T183NR | AGTACAGAAASNNCGGAGCCACTGCGTTAAC |
|  | P182NF | AACGCAGTGGCTNNSAACTTTCTGTACTCTGAAAC |
|  | P182NR | ACAGAAAGTTSNNAGCCACTGCGTTAACACG |
|  | F184NF | GGCTCCGCTCNNSCTGTACTCTGAAACTTACTAC |
| HHDHTm | F184NR | AGTACAGSNNGAGCGGAGCCACTGCG |
| 141NF | TACCTCCGCGNNSCCGCGTCGTCCGTACC |
|  | 141NR | ACGACGCGGSNNCGCGGAGGTAACCATCAC |
|  | W247NF | ACGGGTGGTNNSCCGTAACTCGAGCACCAC |
|  | W247NR | GAGTTACGGSNNACCACCCGTGAAGCCAAC |
|  | Y19NF | GCGACTAAANNSGCCGGTGCGCCGAC |
|  | Y19NR | CGCACCGGCSNNTTTAGTCGCATTAGTAACCAG |
|  | Q160NF | GCTATCGCTNNSAACTTCGTTGACAACCCGAC |
|  | Q160NR | AACGAAGTTSNNAGCGATAGCGTTGATCTGG |
|  | N161NF | ATCGCTCAGNNSTTCGTTGACAACCCGAC |
| HHDHIs | N161NR | GTCAACGAASNNCTGAGCGATAGCGTTG |
| F162NF | GCTCAGAACNNSGTTGACAACCCGACCTAC |
|  | F162NR | GTTGTCAACSNNGTTCTGAGCGATAGCGATAG |
|  | Y168NF | AACCCGACCNNSTTCCCGGCTGAAGTTC |
|  | Y168NR | AGCCGGGAASNNGGTCGGGTTGTCAACG |
|  | F169NF | CCGACCTACNNSCCGGCTGAAGTTCAGTC |
|  | F169NR | TTCAGCCGGSNNGTAGGTCGGGTTGTCAAC |
|  | W224NF | ACCGGTGGTNNSATCAACCGTTAACTCGAGC |
|  | W224NR | ACGGTTGATSNNACCACCGGTAACCGGG |

N stands for A, T, G or C; S stands for G or C

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 同源建模

以HheC的晶体结构为模板，利用Discovery Studio 2.1 (Accelrys Software, San Diego, CA, USA) 中的Modeller 模块进行同源建模[[144]](#_bookmark273)；生成的模型利用

73

CHARMM27力场进行分子力学优化，利用ProCheck程序对优化后的模型进行质量评估[[145]](#_bookmark274)；得到的模型被用做后续的结构分析和分子对接等研究。分子模型的显示和作图使用软件PyMOL 1.2rl。

### 4.3.2 分子对接

为了更好地合理解释突变后对映选择性提高的机理，利用获得的同源建模模型为受体，以1, 3-DCP为配体，利用AutoDockTools 1.5.2中的Autodock 4.0进行分子对接研究[[146]](#_bookmark275)。采用半柔性对接方式，设置催化三联体为柔性残基。利用拉马克遗传算法进行计算每次得到10个可能的对接构象[[147]](#_bookmark276)。

### 4.3.3 饱和突变文库的构建

对选择的突变位点进行定点饱和突变，建立突变文库。定点饱和突变参照

Chronopoulou等的方法实施[[148]](#_bookmark277)。针对拟突变的位点设计和合成相应的引物（表2-1），以全质粒（pET28b-HHDH）或携带更高选择性的突变体编码基因的pET28b质粒为模板进行全质粒PCR扩增。PCR扩增体系为：PCR扩增体系为：5×PS Buffer 10μL, dNTP (2.5mM each) 4μL，突变引物F和R各0.5μL，质粒pET28b-HHDH 0.5μL，PrimeSTAR DNA聚合酶0.5μL，补水至50μL. PCR条件为98˚C预变性2 min, 27个循环：98˚C 10 s, 55-65˚C 10 s，72˚C 6 min 30 s，最后72˚C 10 min. 经0.9%琼脂糖凝胶电泳分析PCR为阳性后，取PCR产物20μL，加入1μL *Dpn* I，37˚C酶切3 h去除模板质粒DNA, 65˚C灭活10 min，采用热激法转化感受态细胞*E. coli* BL21(DE3)，涂布于含卡那霉素（50μg/mL）的LB平板，37˚C培养过夜，获得饱和突变体库。

### 4.3.4 高通量筛选模型的建立与突变文库的筛选

以1, 3-DCP为底物，以酚酞或溴百里香酚蓝为指示剂，以突变前的工程菌细胞为阳性参照，以含有pET28b空质粒细胞为阴性对照，在96孔板上初筛卤醇脱卤酶活性菌。诱导表达：构建的突变库中的单克隆分别接种在96孔培养板中

（装有1 mL含有卡那霉素的LB, 37˚C, 150 rpm培养至OD600约0.6，加入终浓度为0.1 mM的IPTG, 28˚C诱导10 h。96孔板离心机上4000×*g*离心15 min，弃上清，加入pH 8.0磷酸盐缓冲液重悬洗涤，离心。在96孔板中加入200 μL反应液（pH10.0 Gly-NaOH缓冲液，含酚酞指示剂和1,3-DCP）或者（pH 8.0磷酸盐缓冲液，含溴百里香酚蓝显色剂），反应相同时间，根据反应体系颜色变化和变化速度，确定卤醇脱卤酶的活性。有活性的菌株再进行复筛，接种到摇瓶培

74

养，诱导表达，利用重组细胞催化1, 3-DCP不对称脱卤反应，手性气相检测手性

ECH的ee值。

### 4.3.5 卤醇脱卤酶和卤醇脱卤酶突变体的表达与分离纯化

卤醇脱卤酶及突变体的表达方法见第二章2.3.8，卤醇脱卤酶HheC及其突变体采用亲和层析分离纯化，其他卤醇脱卤酶及突变体的纯化方法见第二章2.3.8。

### 4.3.6 酶活测定

卤醇脱卤酶及其突变体纯酶和大肠杆菌全细胞的酶活测定方法见第二章

2.3.10.

### 4.3.7 酶的动力学参数测定

卤醇脱卤酶及其突变体的动力学参数测定反应体系（10 mL）: Na2HPO4-NaH2PO4缓冲液（100 mM, pH 8.0），10-100 mM 1,3-DCP和一定量的纯酶，35˚C, 150 rpm进行反应。测定不同底物浓度下卤醇脱卤酶的反应初速度。利用Lineweaver-Burk双倒数作图法，分别求得最大反应速度（*V*max）和米氏常数（*K*m）等动力学参数。

### 4.3.8 分析方法

底物和产物分析方法见第二章2.3.11。

### 4.3.9 突变体全细胞催化1,3-DCP合成手性ECH

利用含重组卤醇脱卤酶突变体的大肠杆菌细胞为催化剂催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH。反应体系（30 mL）：湿细胞（20-40 g/L）, 20-100 mM 1,3-DCP, 35˚C, 150 rpm, 300 rpm条件下反应。定时取样，等体积乙酸乙酯萃取后手性气相检测

## 4.4 结果与讨论

### 4.4.1 卤醇脱卤酶同源建模

目前仅有卤醇脱卤酶HheC和HheA的晶体结构得到解析，本论文筛选克隆获得的卤醇脱卤酶在催化性能上更接近于HheC，而且与HheC和HheA同源性比较接近，所以选用HheC的晶体结构作为建模的模板。通过Modeller进行同源建模，用Procheck软件对每个模型的立体化学质量进行评价，选取其中得分最高的模型。用Ramachandran图对模型进行评估（图4-1），得到了相对高质量的结构模型（图4-2）。HHDHSg模型评估结果表明：92.3% 位于最适区域，6.7%位

75

于允许区域，1.0%位于一般允许区域，没有残基位于不允许区域。HHDHTm模型评估结果表明：90.0%位于最适区域，7.7%位于允许区域，1.9%位于一般允许区域，0.5%位于不允许区域。HHDHIs模型评估结果表明：90.0% 位于最适区域，

8.5%位于允许区域，1.5%位于一般允许区域，没有残基位于不允许区域。



a

b

c

图4-1 卤醇脱卤酶模型的Ramachandran 图

Fig. 4-1 Ramachandran plot for 3-D structure of HHDH by ProCheck.

A: HHDHSg, B: HHDHTm, C: HHDHIs

76



a

b





c

图4-2 卤醇脱卤酶的同源建模结构

Fig 4-2 The overall 3-D structure of HHDHs obtained by homology modeling. a: HHDHSg, b: HHDHTm, c: HHDHIs

### 4.4.2 卤醇脱卤酶突变位点的选择

#### 4.4.2.1 HheC立体选择性突变位点的选择

卤醇脱卤酶HheC催化邻卤醇与环氧化物的相互转化，其催化机制已经得到

77

深入研究[[149,](#_bookmark278) [150]](#_bookmark279)。卤醇脱卤酶HheC以四聚体形式行使功能，其活性位点由4 条



a

Loop区构成，包括P84-Loop, W139-Loop, Y187-Loop和相对亚基C未端的W249-Loop。这些区域具有很大的柔性。其中Y187-Loop环中氨基酸175-188形成的环在脱卤催化过程中发生构象的变化，利于卤离子的释放，最近的量子化学实验表明它参与了酶催化的立体选择性及区域选择性的调节[[151]](#_bookmark280)。另外有文献报道W249和Phe12在卤醇脱卤酶催化过程中也起着重要的作用[[152]](#_bookmark281)，所以我们选择以上位点作为突变位点。对于其他卤醇脱卤酶，根据3D建模分析选择催化口袋范围附近的比较保守的，同时通过序列比对推测可能和卤离子的结合相关的氨基酸进行饱和突变。如HHDHSg选择Phe15, Asn179，Val137, Tyr186和Trp242；以及HHDHTm选择Tyr19, Ser141，Pro182，Asn183，Phe184，Trp247, HHDHIs选择Gln160, Asn161，Phe162，Tyr168, Phe169和Trp224。



b

78



c

d



图4-3 卤醇脱卤酶突变位点选择

Fig 4-3 The mutant site of HHDHs. a: HheC b: HHDHSg c: HHDHTm d: HHDHIs

### 4.4.3 突变文库的构建及筛选

依次对选择的突变位点进行定点饱和突变，每个位点挑取约200个克隆进行活性筛选，剔除假阳性突变体，然后再进行对映选择性的筛选。经HheC饱和突变文库筛选，在Phe12、Asn176、Tyr177、Leu178、Tyr185、Phe186和Tyr187位点突变没有筛选到对映选择性提高的阳性突变体，且大部分突变体活力都有明显降低。而对Pro175和Trp249突变位点饱和突变文库进行筛选时，发现有对映选择性提高的克隆子，且Pro175位点突变体对映选择性明显提高，其催化1, 3-DCP合成的（*S*）-ECH的ee从5%提高到89%。经测序测定，P175位点挑取的阳性克隆均为P175S, Trp249位点突变体为W249P，在此基础上将这两个阳性突变体进行叠加突变，得到最优突变体P175S/W249P，其催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH的ee可以达到95%左右。

79

对HHDHSg的Val137, Asn179、Trp242、Tyr186和Phe15等突变体库筛选研究发现，绝大部分突变体对映选择性和活力都明显下降。只有对Val137饱和突变文库进行筛选时，筛选到一些阳性突变，经测序为V137I和V137F。突变体

V137I催化1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee达到92.3%. 而突变体V137F催化1,3-DCP

合成(*S*) -ECH的ee可以达到94%，但是酶活极低，20 mM 1,3-DCP转化率不到

10%。

对HHDHTm突变位点进行筛选时，未筛选到对映选择性明显提高的阳性克隆。只有突变体N183L，其产物ee从41.5%提高到70.6%，但其酶活有明显的下降。在对HHDHIs突变文库进行筛选时，未能筛选到阳性突变体。

HheC HHDH

HHDH

Sg

Tm

100

80

60

(*S*)-ECH ee(%)

40

20

0

图4-4 卤醇脱卤酶及其突变体催化合成(*S*)-ECH

Fig. 4-4 Asymmetric conversions of 1,3-DCP by the HHDH wt and mutants

Dehalogenation reaction toward 20 mM 1,3-DCP was performed in 100 mM sodium phosphate buffer with pH 8.0 at 35°C

### 4.4.4 卤醇脱卤酶及其突变体的分离纯化

分别对HheC突变体P175S、W249P、P175S/W249P，HHDHSg突变体V137I和HHDHTm N183L进行诱导表达和分离纯化。SDS-PAGE结果如图4-5所示，通过分离纯化得到了电泳纯的酶蛋白，同时突变体的表达量、蛋白分子大小与野生型没有明显差异，说明这些突变并没有影响外源蛋白在大肠杆菌中的表达。

测定了纯化后的卤醇脱卤酶及其突变体催化潜手性卤代醇1, 3-DCP 和

1,3-DBP合成手性环氧化物活性和选择性。如表4-2所示，当反应pH为8.0时，

80

与原始HheC相比，突变体P175S对1, 3-DCP的催化活性从原始的34.7 U/mg提高到43.9 U/mg，产物（*S*）-ECH的ee值从5.2%提高到89.3%。底物浓度为20 mM时，产物的收率从43.8%提高到90.9%，突变体W249P对酶活和选择性的提高不明显，但当两点进行叠加时，突变体P175S/W249P催化合成（*S*）-ECH的ee值和收率达95.3%和93.7%。对于1, 3-DBP，原始HheC催化1, 3-DBP脱卤基本没有选择性，而突变体P175S对其选择性的提高并不明显，（*S*）-环氧溴丙烷ee值只有24.0%，但是双突变体的产物ee值达到71.4%。相比原始HHDHSg突变体V137I催化潜手性卤代醇的酶活有一定程度的降低，对1, 3-DCP和1, 3-DBP的催化活力分别从从43.1 U/mg和87.6 U/mg下降到33.7 U/mg和70.2 U/mg，但（*S*）-ECH和（*S*）-环氧溴丙烷的ee值和收率分别提高到了91.8%、87.4%和94.0%、90.4%。突变体HHDHTm N183L催化合成手性环氧化物的ee值有了一定程度的提高，但是酶活大大降低，对1, 3-DCP和1, 3-DBP的酶活从69.3 U/mg和106.6 U/mg下降到

1.4 U/mg和2.9 U/mg。



a

b

c

图4-5 卤醇脱卤酶及其突变体的纯化结果

Fig. 4-5 SDS-PAGE of purified HHDHs WT and mutants.

A: lane M, molecular weight mark, lane 1, the purified HheC; lane 2, the purified HheC W249P; Lane 3, the purified HheC P175S; lane 4, the purified HheC P175S/W249P; b: lane M, molecular weight mark, lane 1, the purified HHDHSg, lane 2, the purified HHDHSg V137I; c: lane 1, the purified HHDHTm, lane 2, the purified HHDHTm N183L

81

表4-2 卤醇脱卤酶及其突变体纯酶对潜手性卤代醇的活性和选择性

Table 4-2 Specific activity andenantioselectivity of wild-type HHDHs and their mutants

| Halohydrin | Enzyme | Specific activitya | Ee epoxide(%) | Analytical yield(%)b |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1,3-DCP | WT | 34.7 | 5.2/S | 43.8 |
|  | W249P | 24.3 | 10.4/S | 36.2 |
|  | P175S | 43.9 | 89.3/S | 90.9 |
|  | P175S/W249P | 40.6 | 95.3/S | 93.7 |
| HheC |  |  |  |  |
| 1,3-DBP | WT | 22.7 | - | 71.3 |
|  | W249P | 19.5 | - | 68.4 |
|  | P175S | 38.7 | 24.0/S | 64.8 |
|  | P175S/W249P | 31.2 | 71.4/S | 81.1 |
| 1,3-DCP | WT | 43.1 | 84.6/S | 85.3 |
|  | V137I | 33.7 | 91.8/S | 87.4 |
| HHDHSg |  |  |  |  |
| 1,3-DBP | WT | 87.6 | 78.1/S | 89.8 |
|  | V137I | 70.2 | 94.0/S | 90.4 |
| 1,3-DCP | WT | 69.3 | 40.2/S | 65.1 |
| HHDHTm | N183L | 1.4 | 70.2/S | 43.3 |
| 1,3-DBP | WT | 106.6 | 42.8/S | 66.4 |
|  | N183L | 2.9 | 60.2/S | 48.7 |

AIn Na2HPO4-NaH2PO4, pH 8.0, substrate concentration 20 mM, activity inμmol/min/mg

B The maximum analytical yield is 100%

C" -" The epoxide was racemic.

### 4.4.5 动力学参数的测定

在10 mL反应体系，pH 8.0, 35˚C, 150 rpm条件下测定了卤醇脱卤酶及其突变体的动力学参数*K*m、*V*max和*k*cat等，结果见表4-3, HheC突变体P175S/W249P的*K*m值为，20.8 mM较原始HheC略微下降，表明其亲和力提高，同时其催化活力也略微提高。HHDHSg突变体V137I的*K*m也略低于HHDHSg，其*k*cat值15.6 s-1低于原始酶的21.4 s-1. HHDHTm突变体N183L的*k*cat较原始酶下降非常明显，从32.35 s-1下降到0.83 s-1. *k*cat/*K*m从2.23 mM-1s-1下降到0.03 mM-1s-1.

82

表4-3 卤醇脱卤酶及其突变体对1, 3-DCP的动力学常数

Table 4-3 Kinetics constants of the HHDHs and mutants with 1,3-DCPa.

| Enzyme | Km (mM) | Vmax  (μmolmin-1mg-1) | Kcat (s-1) | kcat/Km  (mM-1s-1) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| HHDHTm | 14.52 | 74.1 | 32.35 | 2.23 |
| N183L | 28.61 | 1.9 | 0.83 | 0.03 |
| HheC | 24.32 | 36.5 | 14.8 | 0.61 |
| P175S/W249P | 20.8 | 42.7 | 17.3 | 0.83 |
| HHDHSg | 28.27 | 49.2 | 21.4 | 0.76 |
| V137I | 34.56 | 35.8 | 15.6 | 0.45 |

AReactions were performed in 0.1 M Na2HPO4-NaH2PO4 at pH 8.0 and substrate concentration was varied in range 10-100 mM.

### 4.4.6 分子模拟对接研究

以HheC晶体结构为模板，通过同源建模构建突变体的结构，分析突变前后结构的细微变化，并对突变体和配体1, 3-DCP进行分子对接研究，用于分析和阐明突变体较野生型酶立体选择性提高的机理。卤醇脱卤酶HheC的Ser132-Tyr145-Arg149残基组成催化反应的活性中心，保守的Ser132残基通过氢键与底物1, 3-DCP结合，稳定底物的作用。Arg149可以降低Tyr145的pKa值，

Tyr145从底物羟基中夺取一个质子H+，失去质子的底物上的氧原子作为亲核试剂，进攻邻位被卤素取代的碳原子，从而释放出卤素离子，同时形成环氧化物。

尽管目前卤醇脱卤酶HheC的催化脱卤的机制已经明确，但是对于卤醇脱卤酶催化潜手性卤代醇不对称脱卤的合成手性环氧化物机制仍无文献报道。卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP脱卤属于分子内亲核反应（SN2反应），1, 3-DCP上的C原子与一个电负性强稳定的氯离子相连，氧负离子从氯离子离去基团的正后方进攻碳原子，C-Cl的断裂与新的C-O键的形成是同时的。如果底物是含有手性碳，往往会导致产物的构型与底物刚好相反，发生构型翻转，如2, 3-二氯-1-丙醇[21]，但是1, 3-DCP是潜手性物质，对称结构，在对称的环境中发生脱卤反应生成消旋的

ECH是消旋，如化学法催化1, 3-DCP脱卤时，两个氯离子离去的机率均等，所以生成的ECH是消旋体。如果底物1, 3-DCP周围环境不对称，亲核试剂在进攻过程中，由于一边亲核进攻方向空间位阻较小，一边亲核进攻方向空间位阻较大，显然亲核试剂更易于去进攻阻力小的一个C，从而产生的ECH的两种构型不相等。

83

当卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成ECH时，在酶催化三联体的作用下催化1, 3-DCP脱卤，当发生氧负离子进攻与氯相连的碳原子时，可能由于两边的碳原子附近的空间位阻效应不一致，导致两边的氯离子离去的速率不平等，从而生成的（*R*）-ECH和（*S*）-ECH不等量，这样就可能发生不对称脱卤合成手性的ECH。将卤醇脱卤酶及其突变体与1, 3-DCP进行对接后的结果如图4-6所示。从HheC和突变体P175S/W249P与1, 3-DCP对接的结果来看，Ser132和1, 3-DCP间形成的氢键的长度没有变化。1, 3-DCP和Tyr145之间的氢键长度（1.92Å）比HheC中的（1.98Å）略短。同时从对接的图来看，HheC中氧负离子进攻1, 3-DCP中连接氯的两个碳的方向上位阻相差不大，Phe186对内侧的C的位阻比外侧略大，在内侧Cl离去方向Pro175也有一定的位阻。所以O-进攻外侧C的机率相对更大，所以产物（*S*）-ECH构型生成量>(*R*) -ECH。而突变体P175S/W249P，氧负离子进攻外侧C方向的位阻明显大于内侧C方向的位阻。外侧C受到Trp139和Phe186的位阻效应比较明显，所以氧负离子更易进攻内侧C原子，从而使得生成的(*S*) -ECH的ee值有了很大的提高。

而从HHDHSg和其突变体V137I的对接图同样可以看出，未突变前氧负离子进攻内侧碳原子受到Pro178、Phe15和Tyr186的位阻影响比较明显，而外侧C原子只有Tyr186产生一定的空间位阻，所以HHDHSg催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH的ee值可以达到80%以上，明显大于HheC。当137位点Val突变成Ile后，氧负离子进攻内侧碳原子内侧C原子受到Pro178和Tyr186的位阻更大，而外侧C原子的位阻更小，从而引起了产物ee值的提高。

从HHDHTm和突变体HHDHTm N183L与1, 3-DCP的对接结果来看，突变后Ser139与1, 3-DCP和Tyr152与1, 3-DCP之间的氢键长度明显变长，分别从1.92和1.91Å变为2.21和2.71Å，这也可以进一步说明突变后酶活明显下降的原因。另一方面可以看出，HHDHTm中氢键的长度最短，同时两侧碳的位阻也较小，这可能也是HHDHTm催化1, 3-DCP脱卤时活力比其它脱卤酶高的原因。HHDHTm突变体N183L对接图中，内侧C原子受到Tyr190的空间位阻影响，比外侧C原子更难亲核进攻，所以产物ECH的ee值有了一定程度的提高。

84



HheC P175S/W249P



HHDHSg HHDHSgV137I



HHDHTm HHDHTm N183L

图4-6 卤醇脱卤酶及突变体与1, 3-DCP分子对接

Fig. 4-6 Docking of 1,3-DCP to the binding pocket of wt and mutant HHDHs

85

### 4.4.7 突变体催化1,3-DCP不对称脱卤

以表达HheC突变体P175S/W249P和HHDHSg突变体V137I重组大肠杆菌为全细胞催化剂，考察了卤醇脱卤酶突变体不对称催化1, 3-DCP 脱卤合成手性

ECH的效果，结果见表4-4，突变后产物的ee值和收率均有明显的提高。当底物浓度为20 mM，pH 10.0时，HheC突变体P175S/W249P催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH的收率和ee值分别为91.4%和92.7%。而HHDHSg催化合成的（*S*）-ECH的ee值和收率为91.5%和90.7%，比HheC突变体P175S/W249P略低。当底物浓度从20 mM增加到100 mM时产物的ee有一定程度的下降，前者下降的速率要低于后者。当底物浓度100 mM时，突变体P175S/W249P和V137I催化脱卤合成的（*S*）-ECH的ee值有90.4%和87.2%，但是产物的收率只有58.0%和48.2%，这主要还是因为高浓度产物对酶的抑制作用，以及可逆反应的发生，使得底物的转化率下降。

表4-4 卤醇脱卤酶突变体催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH

Table 4-4 Synthesis of (S)-ECH from 1,3-DCP using HheC mutants (P175S/W249P) or HHDHSg(V137I)

| Enzyme | 1,3-DCP concentration  (mM) | Analytical yield(%)a | (S)-ECH (ee %) |
| --- | --- | --- | --- |
| HheC(P175S/W249P) | 20 | 91.4 | 92.7 |
|  | 40 | 90.2 | 92.1 |
|  | 80 | 64.9 | 91.3 |
|  | 100 | 58.0 | 90.4 |
| HHDHSg(V137I) | 20 | 90.7 | 91.5 |
|  | 40 | 86.5 | 90.8 |
|  | 80 | 60.2 | 89.2 |
|  | 100 | 48.2 | 87.2 |

AThe maxiumum analytical yield is 100%. 100 mM Gly-NaOH (pH 10.0), 35°C

## 4.5 本章小结

以HheC为模板，利用定点饱和突变技术构建多点饱和突变文库，筛选到了突变体P175S和W249P，并进行叠加突变获得最优突变体P175S/W249P，在pH

8.0条件下，催化20 mM 1,3-DCP合成（*S*）-ECH的ee值达95.3%，收率达93.7%。以HHDHSg为突变模板，构建多位点饱和突变文库，筛选到突变体V137I，

在pH 8.0条件下，其催化20 mM 1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee值从84.6%提高到

86

91.8%。

通过同源建模和分子对接分析了突变体催化1, 3-DCP合成手性ECH对映选择性提高的机理，即在活性催化中心，氧负离子亲核进攻被氯取代的2个碳原子的空间位阻大小不同，导致生成的*S*-构型和*R*-构型的生成量不相等。空间阻力大小相差越大，产物的ee值就越高。

将突变获得的突变体工程菌细胞用于催化合成手性ECH，在pH10.0条件下，20-100 mM底物浓度范围内，突变体P175S/W249P催化合成的产物ee和收率分别在90.4-92.7%和58.0-91.4%之间，突变体V137I催化合成的产物ee和收率分别在87.2-91.5%和48.2-90.7%之间。

# 87

# 第五章 环氧化物水解酶立体选择性及活性的

分子改造研究

## 5.1 引言

环氧化物水解酶立体选择性拆分在有机合成中的应用的关键是发现高效的环氧化物水解酶。但是对于非天然底物ECH，前期从壤霉菌克隆获得的*R*-环氧化物水解酶，它的立体选择性却不尽人意。提高酶的立体选择性的方法很多，除酶的化学修饰，添加有机溶剂与表面活性剂，酶的固定化，优化反应条件等传统的方法外[[153-158]](#_bookmark282)，对酶蛋白本身进行分子改造已成为一种广泛使用的策略[[159-165]](#_bookmark283)。近十多年来，环氧化物水解酶的立体选择性的基因工程改造取得了可喜的进展

[66-69]。环氧化物水解酶的定向进化不需要事先了解酶的空间结构和催化机制，直

接通过易错PCR, DNA改组等随机突变策略结合定向选择或筛选方法对酶进行分子改造以提高酶的立体选择性；随着对环氧化物水解酶结构功能关系的更深入理解，则可以利用同源环氧化物水解酶的晶体结构为模板进行同源建模和分子对接分析预测影响环氧化物水解酶立体选择性的氨基酸位点，并对选择的位点进行定点饱和突变，建立突变文库，然后通过定向筛选获得高催化活性和高立体选择性的的突变环氧化物水解酶。因此本章选择相对简单的、高效的结构指导的定点饱和突变技术，对环氧化物水解酶AmEH进行分子改造，以其提高其对环氧化物水解酶的立体选择性。

## 5.2 材料

### 5.2.1 菌株与质粒

第三章构建的pET28a-AmEH作为亲本，宿主*E. coli* BL21(DE3)用于定点饱和突变体库的构建。

### 5.2.2 酶与试剂

构建定点饱和突变用的PrimeSTAR HS DNA聚合酶为Takara产品，*Dpn* I

购自Fermentas。其他分子生物学工具酶、试剂盒及其它生化试剂见第二章表2-3。

88

### 5.2.3 主要仪器

见第二章表2-1

### 5.2.4 引物

本章使用的PCR引物见表5-1

表5-1 本章所用引物

Table 5-1 Oligonucleotide sequences used in this study

| 引物 | 引物序列(5‟-3‟) |
| --- | --- |
| N240F | AGGGTGCGTATNNSAGTCTGCAGTCGACGAAG |
| N240R | ACTGCAGACTSNNATACGCACCCTCGCGC |
| R338F | CCGCCGAAATTNNSCGACCGCCGGCCGAG |
| R338R | CCGGCGGTCGSNNAATTTCGGCGGGGAATCG |
| R313F | CCGAACGAGCGNNSGAAGGGTGGACTTTTCCTC |
| R313R | AGTCCACCCTTCSNNCGCTCGTTCGGCGTAC |
| S233F | AACCAGGAATGGNNSGCGCGCGAGGGTGCG |
| S233R | CCCTCGCGCGCSNNCCATTCCTGGTTCGCAC |
| S207F | TTAACTACAGCNNSGTACAGCCCAGCATGATC |
| S207R | TGGGCTGTACSNNGCTGTAGTTAAGGTGCAG |
| F318F | AAGGGTGGACTNNSCCTCCGGGCGAGATC |
| F318R | GCCCGGAGGSNNAGTCCACCCTTCCCGC |
| W182F | AGGGCGGCGACNNSGGTTCTACCGTCCTCACC |
| W182R | ACGGTAGAACCSNNGTCGCCGCCCTGCCC |
| W182F | AGGGCGGCGACTTTGGTTCTACCGTCCTCACC |
| W182R | ACGGTAGAACCAAAGTCGCCGCCCTGCCC |
| N240F | AGGGTGCGTATGACAGTCTGCAGTCGACG |
| N240R | ACTGCAGACTGTCATACGCACCCTCGCG |

N stands for A, T, G or C; S stands for C or G

## 5.3 方法

### 5.3.1 同源建模

通过BLAST搜索PDB蛋白数据库，选择同源性最高的（36%）来自于*Streptomyces carzinostaticus*的环氧化物水解酶(PDB accession no. 4i19)的晶体结构作为模板，利用Discovery studio 2.1（Accelrys Software, San Diego, CA, USA）中的MODELER模块进行同源建模，利用Procheck程序对模型进行质量评估；得到的模型被用作后续的结构分析和分子对接等研究。分子模型的显示和作图使用软件PyMol 1.2 rl。

89

### 5.3.2 分子对接

为了更好地选择突变位点和合理解释突变后活力和选择性提高的机理，以同源建模模型为受体，以手性ECH为配体。利用AutoDockTools 1.5.2中的Autodock

4.0模板进行分子对接研究。采用半柔性对接方式，设置催化三联体中的天冬氨酸和酪氨酸为柔性残基，调整其质子化状态及旋转状态。采用拉克遗传算法进行计算每次得到的10个可能的对接对象。

### 5.3.3 饱和突变文库的构建

对选择的突变位点进行定点饱和突变，建立突变文库。定点饱和突变参照

Chronopoulou等的方法进行。根据要突变的位点设计和合成相应的引物，以全质粒为模板进行全质粒PCR扩增。PCR扩增体系为：5×PS buffer 10μl, dNTP(2.5 mM each) 4μL，正反向突变引物各0.5μL，模板0.5μL，PrimeSTAR DNA聚合酶0.5μL，补水至50μL. PCR条件为98˚C 预变性2 min, 25 个循环：98˚C 10

s，65˚C 10 s, 72˚C 6 min，最后72˚C 10 min. 经0.9%琼脂糖凝胶电泳分析PCR为阳性后，取PCR溶液20μL，加入1μL *Dpn* I, 37˚C酶切3 h去除作为模板的质粒DNA, 65˚C灭活10 min，立即转化感受态细胞*E. coli* BL21(DE3)，涂布含卡那霉素（50 mg/L）的LB平板，37˚C培养12-16 h。

### 5.3.4 高通量筛选模型的建立与突变文库的筛选

环氧化物能与4-（对硝基苄基）吡啶(NBP)反应，生成的中间体经碱化可产生蓝色或紫色化合物。为了快速有效的筛选阳性突变体，参考Cedrone等提出的方法基础上进行改进[64, 65]，建立基于外消旋ECH为底物的高通量筛选方法。以突变前的工程菌细胞为阳性参考，以含有空的pET28a载体的工程菌细胞为阴性对照。在96孔板上初筛有环氧化物水解酶活性的菌株，剔除无活性或者活性比较低的菌株。然后再通过气相检测其对映选择性。（1）诱导表达：上述构建的突变库中的单克隆分别接种到2.2 mL 96 孔培养板（装有1 mL加有卡那霉素的LB），37°C, 150 rpm培养至OD600 0.6左右，加入终浓度为0.1 mM的IPTG，28°C诱导10 h。96孔板离心机上4000×*g*，离心15 min，弃上清，加入200μL磷酸盐缓冲液（pH 8.0, 50 mM）重悬菌体。（2）初筛：取出25μL与25μL磷酸盐混合加入新的96孔板（含有5 mM 的环氧氯丙烷底物）。然后于30 °C 摇床反应

20 min，然后加入25μL含有100 mM 4-（对硝基苄基）吡啶的乙二醇和乙醇的混

合物（v/v, 4:1），80°C 反应20 min. 依次加入50μL 乙醇和25μL K2CO3，根

90

据颜色变化可以判断剩余的ECH的量，活力越低颜色越深。

### 5.3.5 AmEH及其突变体的表达与分离纯化

表达与纯化方法同第三章3.3.6。

### 5.3.6 酶活测定

环氧化物水解酶及其突变体纯酶和全细胞的酶活测定方法见第三章3.3.8。

### 5.3.7 分析方法

同第二章2.3.11。

### 5.3.8 酶动力学参数测定

酶的动力学参数测定反应体系组成为（10 mL）：磷酸盐缓冲液（200 mM, pH8.0）10-200 mM ECH和一定量的纯酶。30˚C, 150 rpm条件下进行水解反应，测定反应速率，利用Lineweaver-Burk作图法求出*K*m、*V*max等动力学参数，然后利用公式*k*cat=Vmax/[E]求出*k*cat.

### 5.3.9 全细胞催化拆分ECH

以表达AmEH或其突变体的重组大肠杆菌细胞为催化剂拆分ECH, 30 mL反应体系：加入一定量的湿细胞和一定浓度的ECH, 30˚C 300 rpm条件下反应，定时取样GC检测。

## 5.4 结果与分析

### 5.4.1 环氧化物水解酶同源建模与结构分析

以来源于*Streptomyces carzinostaticus*的环氧化物水解酶(PDB accession no.

4i19）的晶体结构作为模板，利用Modeler对AmEH进行同源建模，利用ProCheck程序对优化后的模型进行质量评估（图5-1），得到了高质量的AmEH结构（图5-2）。模型评估结果表明，最适区域占93.5%, 4.9 %位于允许区域，0.6 %位于

一般允许区域，不允许区域的氨基酸残基占0.9%，且这三个氨基酸（Ile34, Arg311, Ser146）都远离活性位点。

91



图5-1 ProCheck对模型评估的Ramachandran plot

Fig. 5-1 Ramachandran plot for 3-D strcture of AmEH by ProCheck.

通过与其他已解析晶体结构的α/β水解酶类环氧水解酶进行序列比对及结构比对，可以确定AmEH的催化三联体为Asp181, His362和Glu336，与底物结合与活化相关的两个保守的酪氨酸残基分别为Tyr308和Tyr239，氧洞氨基酸残基为Trp104。活性中心位于帽子结构域与催化结构域之间，其中催化三联体来自于催化结构域，而底物结合氨基酸位于帽子结构域。从序列比对结果来看（图3-3），催化三联体及底物结合氨基酸在该环氧化物水解酶家族中严格保守，氧洞氨基酸由于主要以主链氨基起作用，因此并非完全保守。



图5-2 AmEH的同源建模结构

Fig. 5-2 Homology protein model of AmEH

### 5.4.2 分子对接与突变位点的选择

利用软件Autodock 4.0进行AmEH与(*R*) -ECH和(*S*) -ECH的分子对接，图

92

5-3显示了（*R*）-ECH和（*S*）-ECH在模型中的结合方式，由图5-3可以看出，Tyr308将环氧环上的氧原子进行质子化，为环氧化物的开环水解提供了可能。研究表明，酶的催化效率取决于亲核试剂/亲电试剂形成易于进攻构象(near attack conformation, NACs)的机率。NAC是指在达到所研究反应的过滤态之前，几何上必须形成的基态结构[161]。Bruice等在研究环氧化物水解酶的催化机制时发现，亲核进攻天冬氨酸中的氧原子与被进攻的碳原子之间的距离（*d*值），距离越短越利于亲核进攻[166]。从亲核进攻天冬氨酸中的氧原子通过被进攻的碳原子到环氧乙烷环上的氧原子形成的角度（α1），以及从亲核进攻天冬氨酸中的氧原子通过被进攻的碳原子到另一个碳原子所形成的角度（α2），角度越大越容易有效的定位。分子对接研究发现，α1R=125.0˚C，α2R=118.8˚C, *d*R=3.5Å，而α1S=94.3˚C，α2S=88.3˚C，*d*S=3.8Å，由此可以看出天冬氨酸更易进攻*R*-构型上的碳原子，所以环氧化物水解酶AmEH优先水解*R*-ECH。同时以建模对接的模型进行HotSpot

Wizard分析，识别其中的功能性氨基酸位点，再选择催化活性中心附近的位点进行定点饱和突变。最终选择的突变位点有：Trp182, Ser207, Ser233, Asn240，

Arg313, Phe318 和Arg338（图5-4）。



图5-3 AmEH与(*R*) -ECH和(*S*) -ECH的分子对接

Fig. 5-3 (*R*) -ECH and (*S*) -ECH docking into the active site of the enzyme

93



图5-4 突变位点的选择

Fig. 5-4 Sites for mutant were chosen as described in the text

### 5.4.3 突变文库的构建与筛选

依次对分子对接选择的突变位点进行饱和突变，每个位点挑取约300个克隆进行高通量筛选（图5-5）。阳性突变体进行重新培养获得的重组细胞用于水解拆分ECH，气相检测剩余底物的ee值，及（*R*）-ECH的ee> 99%时的收率（图5-6）。在筛选Arg338、Ser233、Phe318和Arg313饱和突变文库时，没有发现对映选择性有明显提高的突变体。但是在Trp182、Ser207和Asn240进行饱和突变时，筛选出一些阳性突变体。紧邻催化三联体之一的Asp的氨基酸不是非常保守的，但常见的是Trp[[79,](#_bookmark221) 167]，文献报道将来自于*A. radiobacter* AD1的水解酶的紧邻Asp的Phe突变成Trp，酶的立体选择性有了明显的降低[[95]](#_bookmark234)，本文对Trp182位点进行饱和突变，筛选到突变体W182F提高了酶的立体选择性。Ser207离催化活性中心大概8.3Å，筛选其突变文库时，获得活性和选择性都有明显提高的S207V和S207T两个阳性突变体。Asn240紧邻保守Tyr239残基，对其进行饱和突变后，筛选到一些活性和选择性显著提高的阳性突变体，经测序为N240D，N240V，

N240W，由图5-6可以看出Asn240对活性和选择性的影响明显高于前两个位点。在此基础上进行阳性突变的叠加，结果表明双突变体W182F/S207V、S207V/N240D和W182F/S207T，和以及三突变体W182F/S207V/N240D的立体选择性都有明显的提高。而双突变体W182F/N24D 和三突变体

W182F/S207V/N240W 活性和对映选择性明显降低。最优突变体 为

94

W182F/S207V/N240D，其拆分64 mM ECH制备(*S*) -ECH的收率达到40%以上，收率提高了2倍多。



图5-5 高通量筛选示意图

Fig. 5-5 Activity screening of the site-saturation library for ECH in 96-well plates using NBP assay

(*S*)-ECH

50

40

30

20

Yield(%)

10

0

Mutants

图5-6 AmEH及其突变体催化合成(*S*) -ECH

Fig. 5-6 Kinetic resolution of wt AmEH and mutants toward racemic ECH

### 5.4.4 AmEH及其和突变体的纯化

AmEH突变体的表达纯化过程基本与野生型蛋白相同。用Ni-NTA柱纯化后的，得到电泳纯的环氧化物水解酶纯酶（图5-7）。对纯化后环氧化物水解酶及其突变体的酶活及对映选择性进行了测定（表5-2）。W182F 突变提高了酶的活性和选择性，突变酶催化ECH的对映选择率（*E*）从12.9提高到16.9。S207V突变体催化ECH的酶活和*E*分别提高到了38.9 U/mg和20.3，N240D突变不仅使得酶活提高了2.4倍，其对映选择率（*E*）也从12.9提高到21.4，是原来的1.7倍，。是最有益的单突变体。将有益单突变点进行叠加获得了有效的双突变和三

95

突变体。由表可以看出双突变体S207V/N240D（VD）叠加效果最明显，酶活和

*E*分别为原始酶的2.8倍和3.7倍。而三突变体W182F/S207V/N240D（VDF）相对S207V/N240D酶活从69.0 U/mg下降到42.6 U/mg，但是其*E*明显提高，是原始酶的7倍左右。

表 5-2 AmEH及其突变体催化环氧氯丙烷的酶活及立体选择性

Table 5-2 Specific activities and enantioselectivities of wt AmEH and mutants toward racemic ECH

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (U/mg) |  | | |
| Wild-type | 24.6 | 1.0 | 12.9 | 1.0 |
| W182F | 26.1 | 1.1 | 16.9 | 1.3 |
| S207V | 38.9 | 1.6 | 20.3 | 1.6 |
| N240D | 59.7 | 2.4 | 21.4 | 1.7 |
| W182F/S207V | 30.1 | 1.2 | 28.5 | 2.2 |
| VD | 69.0 | 2.8 | 48.1 | 3.7 |
| VDF | 42.6 | 1.7 | 90.0 | 7.0 |

Racemic ECH Enantioselectivity Enzyme

Specific activity

Fold *E*-valuea Fold

A *E* values are calculated from the *k*cat/*K*m values for the separate enantiomers.



图5-7 AmEH突变体分离纯化SDS-PAGE分析

Fig. 5-7 SDS-PAGE analysis of the purified wt AmEH and its mutants.

Lane 1: the purified wild-type AmEH; Lane 2: the purified mutant W182F; Lane 3: the purified mutant S207V; Lane 4: the purified mutant N240D; Lane 5: the purified mutant W182F/S207V; Lane 6: the purified mutant VD; Lane 7: the purified mutant VDF; Lane M: protein marker.

96

### 5.4.5 动力学参数的测定

在10 mL反应体系中，pH 8.0, 30˚C, 150 rpm条件下测定了环氧化物水解酶AmEH及其突变体的动力学参数*K*m、Vmax和*k*cat等，从表5-3可以看出，对映选择性的提高主要源自于突变体对*R*-ECH *k*cat值的提高和*S*-ECH *k*cat的降低。而突变体对两种构型的*Km*的变化没有明显的趋势，对于*S*-构型有略微的下降，而*R*-构型的底物有一定程度的提高。

表5-3 AmEH及其突变体对*R*-和*S*-环氧氯丙烷的动力学常数

Table 5-3 Kinetic analysis of the selected mutants of AmEH towards enantiopure ECH

|  |  | S-ECH |  |  | R-ECH |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Enzyme | Km  (mM) | kcat  (s-1) | kcat/Km  (mM-1s-1) |  | kcat  (s-1) | kcat/Km  (mM-1s-1) |
|  | Km (mM) |
| WT | 161.4 | 5.7 | 3.5×10 -2 | 56.6 | 25.7 | 4.5×10 -1 |
| W182F | 130.7 | 4.2 | 3.2×10 -2 | 48.3 | 26.1 | 5.4×10 -1 |
| S207V | 108.8 | 3.5 | 3.2×10 -2 | 62.6 | 40.7 | 6.5×10 -1 |
| N240D | 141.8 | 4.9 | 3.5×10 -2 | 87.3 | 65.2 | 7.5×10 -1 |
| W182F/ S207V | 137.1 | 2.7 | 2.0×10 -2 | 52.1 | 29.7 | 5.7×10 -1 |
| VD | 134.0 | 2.1 | 1.6×10 -2 | 98.7 | 76.0 | 7.7×10 -1 |
| VDF | 105.1 | 1.1 | 1.0×10 -2 | 48.8 | 43.7 | 9.0×10 -1 |

### 5.4.6 分子模拟对接研究

通过同源建模构建了突变体的结构模型，分析突变后结构的细微变化，并对突变体和配体（*R*）-ECH和（*S*）-ECH进行分子对接研究，用于分析和阐明突变体较野生型酶活力和选择性明显提高的机理。Bruice等人在研究EH时，从距离和角度考察了形成亲核试剂形成易于进攻构象所需要的条件：即较短的进攻距离（*d* value）和较大的角度（α1和α2），选择突变体N240D、S207V/N240D和W182F/S207V/N240D与ECH单一构型ECH进行分子对接（图5-8），从对接结果来看，突变体与两个构型之间*d*值和角度的变化符合NACs假说，分析原始AmEH和突变体与单一构型之间△*d*值的变化可以发现，△*d*值越大，环氧化物水解酶催化ECH的对映选择率越高，由表5-4可以看出，野生型酶与两个构型之间的△*d*只有0.3Å，而最优三突变体W182F/S207V/N240D与两个构型之间的

97



△*d*增大到1.1，而且与*R*-构型对接图中，α1R=142.0˚C，α2R=136.8˚C，比野生型酶增大，而α1S=55.2˚C，α2S=64.7˚C比野生型酶减少。这些因素导致突变体对两种构型的活力差异越明显。虽然，分子对接分析的结果与实验结果相符，但是建模获得的晶体模型的可信度和对接的准确性还有待进一步商榷。要想全面准确的了解其催化机制，还需要得到AmEH的晶体结构和更准确的分子动态模拟。





图5-8 AmEH突变体与(*R*) -ECH和(*S*) -ECH分子对接

Fig. 5-8 Docking of (*R*) -ECH and (*S*) -ECH to the binding pocket of mutant AmEHs. (a) Variant N240D docked with (*R*) -ECH and (*S*) -ECH; (b) Variant VD docked with (*R*) -ECH and (*S*) -ECH;

(C) Variant VDF docked with (*R*) -ECH and (*S*) -ECH.

98

表5-4 分子对接实验结果

Table 5-4 Results of docking experiments

| mutant | DR-ECH a | ds-ECH | α1R [deg]b | α2R [deg]b | α1S [deg]b | α2S [deg]b |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| WT | 3.5 | 3.8 | 125.0 | 118.8 | 94.3 | 88.3 |
| N240D | 3.2 | 3.9 | 121.0 | 118.3 | 69.9 | 63.9 |
| VD | 3.2 | 4.1 | 137.9 | 112.7 | 82.9 | 62.8 |
| VDF | 3.3 | 4.4 | 142.0 | 136.8 | 55.2 | 64.7 |

A *d*, the distance between the Asp181 oxygen and the attacked epoxide carbon;

Bα1, the angle from Asp181 oxygen *via* the attacked epoxide carbon to the epoxide oxygen;α2, the angle Asp181 oxygen *via* the attacked epoxide carbon to the other epoxide carbon.

### 5.4.7 突变体拆分外消旋ECH

以最优表达突变体 W182F/S207V/N240D 重组大肠杆菌为全细胞催化剂，考察了突变体 VDF 选择性水解拆分 75-450 mM ECH 的效果，反应进程曲线如图5-9。由表可以看出，在 75-450 mM 浓度范围内，改变催化剂的量，反应一定时间后都可以得到 ee>99%的(*S*)-ECH，随着底物浓度的增加，产物的收率有略微的下降，从 45.8%下降到 40.5%，和其它报道拆分 ECH 合成(*S*)-ECH 的环氧化物水解酶比较，AmEH 突变体的对映选择性最高。高底物浓度耐受性的环氧化物水解酶是衡量其是否可以工业应用潜力的标志，因此还考察了 500 mM 底物浓度下， 突变体催化外消旋 ECH 拆分性能，但是酶浓度不断增加的情况下，外消旋 ECH 都未能实现完全拆分，ee 值最高达 90.1%。而双突变体 S207V/N240D 可以在更高的底物浓度下完成拆分，当底物浓度达 750 mM 时，双突变体拆分可以获得ee>99%，但收率只有 21.3%。

(*R*)-ECH

*ee*(%)

(*S*)-ECH

40

35 100

30 80

Concentration (mM)

25

60

*ee*(%)

20

15 40

10

20

5

0 0

0 5 10 15 20 25 30

Time (min)

80 100

70

(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*(%)

60 80

Concentration (mM)

50

60

*ee*%

40

30 40

20

20

10

0 0

0 10 20 30 40 50 60 70 80

Time (min)

99

(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*%

80

70 100

60 80

Concentration (mM)

50

60

40

*ee*%

30 40

20

20

10

0 0

0 5 10 15 20 25 30 35 40

Time (min)

160

140

120

Concentration (mM)

100

80

60

40

20

0

100

80

60

40

20

0

0 20 40 60 80 100

(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*%

Time (min)

160

140

120

Concentration (mM)

100

80

60

40

20

0

0 10 20 30 40 50

Time (min)

100



(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*%

80

60

40

20

0

250

200

150

*ee*%

Concentration (mM)

100

50

0

100



(*S*)-ECH

(*R*)-ECH

*ee*%

80

60

*ee*%

40

20

0

0 20 40 60 80 100

Time (min)

图5-9 AmEH突变体催化拆分环氧氯丙烷进程曲线

Fig. 5-9 Enantioselective hydrolysis of racemic ECH by the recombinant mutant VDF. The reaction was performed at 30°C in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 75-450 mM ECH and 4.5-13.5 g dcw/L recombinant *E. coli*. Samples were removed at time intervals, the ECH concentration and the optical purity of the (*S*) -ECH were determined by chiral GC.

100

表 5-5 突变体VDF和其他EHs催化拆分环氧氯丙烷效果比较

Table 5-5 The comparison of kinetic resolution of known EHs toward racemic ECH

EH source

ECH

Conc (mM)

Temperature

pH ee(%)

(oC)

Reaction medium

organic

Final yielda (%)

Reference

*Aspergillus niger* 60 27 7.5 100/(*S*)

solvents

20.0 28

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Novosphingobium.* | 50 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 20.7 | 31 |
| *aromaticivorans* | buffers | | | | | | |
| *Novosphingobium.* | aqueous | | | | | | |
| *aromaticivorans* |  |  |  |  | buffers |  |  |
| *Aspergillus niger* | 64 | 30 | 8.0 | 98.0/(*S*) | organic | 17.5 | 33 |
|  |  |  |  |  | solvents |  |  |
| *Agromyces mediolanus* | 64 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 21.5 | This study |
| (AmEH) |  |  |  |  | buffers |  |  |
| Mutant AmEH | 75 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 45.8 | This study |
| (VDF) |  |  |  |  | buffers |  |  |
|  | 150 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 44.1 | This study |
|  |  |  |  |  | buffers |  |  |
|  | 300 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 43.7 | This study |
|  |  |  |  |  | buffers |  |  |
|  | 450 | 30 | 8.0 | >99.0/(*S*) | aqueous | 40.5 | This study |
|  |  |  |  |  | buffers |  |  |

250 30 8.0> 99.0/(*S*) 17.3 31

A The final yield of (*S*) -ECH was determined by GC.

## 5.5 本章小结

利用同源建模和分子对接等技术，以环氧化物水解酶4i19晶体结构为模板构建AmEH的3D结构，分析可能影响其选择性的氨基酸残基，确定突变位点。结合基于ECH的96孔板高通量筛选模型及手性气相分析的策略，筛选定点饱和突变文库。

构建定点饱和突变库，并从中筛选到立体选择性提高的突变体W182F、

S207V、N240D、S207V/N240D、W182F/ S207V及W182F/ S207V/N240D. 最优

突变体W182F/S207V/N240D的酶活及对映体选择率是原始酶的约1.7和7.0倍。通过同源建模和分子对接分析了突变后对映选择性提高的机理。突变体亲核

101

进攻天冬氨酸中的氧原子与被进攻的ECH两个构型碳原子之间的距离差值越大，环氧化物水解酶的对映选择性越高。最优突变体的△*d* 从原始酶的0.3Å提高到

1.1Å。

最优突变体催化75-450 mM外消旋ECH，获得的(*S*) -ECH的ee> 99%，收率在45.8%-40.5%之间。

# 102

# 第六章 双酶体系的构建

## 6.1 引言

多酶催化反应体系生物催化方向最活跃的研究领域之一，其越来越多的应用于需多步单酶催化完成的生物合成反应中，以提高反应的总收率、产物的ee值，减少原料消耗和缩短反应时间。但是由于多酶体系的复杂性，要求满足多个酶的催化反应条件，限制了多酶协同催化体系的发展，因此研究多酶协同催化及其相关的应用，已经成为化学、生物、生命科学等多学科交叉领域共同关注的方向。

全细胞水平的双酶偶联包括单菌共表达双酶偶联及双酶单表达偶联两种模式。相比于前者，后者可以根据双酶的酶活调节两者比例，但是后者因为底物、产物分别进出两个催化剂细胞而导致传质阻力增大，反应效率较前者低。大肠杆菌共表达系统通常包括多基因串联共系统和多质粒共表达系统[168]。多基因串联共表达系统就是将多个酶基因克隆于同一共表达载体，外源酶基因含有各自的翻译起始及终止信号，各基因虽以相同mRNA进行转录，却能独立翻译。利用这种翻译偶联策略，可以成功构建单一质粒介导的多基因共表达系统，实现了相关基因在大肠杆菌中的非融合的可溶性表达。多质粒系统中，通常将多个外源基因分别克隆至不同抗性的载体中，然后将多个表达载体共同转化至同一宿主同时添加不同种类抗生素进行抗性筛选。

本章节利用基因克隆技术实现了卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶在大肠杆菌中的共表达偶联及单表达偶联，并成功应用于制备手性ECH。

ee<99% ee> 99%

OH

Cl Cl卤醇脱卤酶

Cl O *R*-环氧化物水解酶Cl O

## 6.2 实验材料

### 6.2.1 菌株与质粒

Cl O *S*-环氧化物水解酶

图6-1 双酶偶联体系

Fig. 6-1 Double enzyme coupling system

Cl O

pCDFDuet-1共表达载体，购于Novagen，链霉素抗性，T7启动子。其他

103

克隆和表达载体、克隆和表达宿主同第二章表2-2。

### 6.2.2 酶与试剂

酶与试剂见第二章表2-3。

### 6.2.3 主要设备及仪器

本章所用设备及仪器见第二章表2-1

### 6.2.4 引物

本章所使用的PCR引物见表6-1

表6-1 本章所用引物

Table 6-1 Primers in this chapter

| 引物名称 | 引物序列（5‟-3‟） | 目的 |
| --- | --- | --- |
| HheC-GF | CCATGGCTTCTACCGCTATTGTG | 酶切位点更换 |
| HheC-GR | GCGGCCGCTTATTCCGGCATACCCGGC |  |
| EH-GF | CGCCATATGACCGCGGTGAGTCCCAC | 酶切位点更换 |
| EH-GR | CGGCTCGAGTCATTGTTCATTTCCTCTCAATTGG |  |
| AmEH351F | AGCGGATGTTTCGGCTTGAGCGCTTCACAGATATG | 117 位碱基置换 |
| AmEH351R | CATATCTGTGAAGCGCTCAAGCCGAAACATCCGCTC |  |
| Sg504F | ACTGGGTCGCCACGGTATTCAGGTTAACGCAC | 168 位碱基置换 |
| Sg504R | CTGAATACCGTGGCGACCCAGTTCTTTG |  |
| Sg-GF | CCCATGGGCCTGAACAATAAAATCATCCTG | 共表达引物 |
| Sg-GR | TTGCGGCCGCTTAGGCCCAACCGCCAG |  |
| Is1F | AACCGTTAAGCGGAGCACCACCACCACC | 酶切位点替换 |
| Is1R | GTGGTGCTCCGCTTAACGGTTGATCCAACC |  |
| Is2F | CGTTAAGCGGCCGCCCACCACCACCACCAC | 酶切位点替换 |
| Is2R | GTGGTGGTGGGCGGCCGCTTAACGGTTGATC |  |
| ADEHF | AGGAGATATCATATGGGTACCATTCGTCGTC | 酶切位点替换 |
| ADEHR | GGTACCCATATGATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC |  |
| Is118F | ATGGGTTCTGGAGCTGCTCTGCGTGGTATG | 118 位碱基置换 |
| Is118R | CAGAGCAGCTCCAGAACCCATCAGCAGG |  |
| ADEHterF | GCCTTCCGCTAAGAGTCTGGTAAAGAAACC | 加终止密码子 |
| ADEHterR | ACCAGACTCTTAGCGGAAGGCCGTTTTG |  |

## 6.3 实验方法

### 6.3.1 共表达质粒的构建

采用了两种共表达的策略，第一种为基因串联共表达系统，即将卤醇脱卤酶

104

和环氧化物水解酶基因同时连接到共表达载体pCDFDuet-1上，质粒构建步骤见图6-2。



f1 origin

*Xho*I

f1 origin

Hhe C mut

*Xho* I

HHDHSg mut

f1 origin

Kan

*Not* I

AmEH mut

Kan

*Nco* I

Kan

*Xba* I

*N*

pET28b-Hhe C (P175S/W249P)

pET28b-HHDHSg (V137I)

pET28a-AmEH-mut

ori

lacI

ori

lacI

ori

lacI

HHDHSg mut

*Nco* I

LacI

*Not* I

*Nde* I

AmEH mut

AmEH mut

pCDFDuet-HHDH -mut-AmEH-mut

Sg

*Xho* I

CDFori

*De* I

Sm



Hhe C mut

*Nco* I

Lac I *Not* I

*Nde* I

pCDFDuet-Hhe C-mut-AmEH-mut

*Xho* I

CDFori

Sm



f1 origin

*Xho* I

*Xho* I

HHDHIs

Kan

*Xba* I

f1 origin

Kan

ADEH

*Nco* I

pET28b-HHDHIs

pET28b-ADEH

ori

lacI

ori

lac I

HHDHIs

*Nco* I

lac I

*Not* I

*Nde* I

pCDFDuet-HHDHIs-ADEH

*Xho* I

ADEH

CDFori

Sm

图6-2 基因串联质粒构建图

Fig 6-2 Construction of coexpression plasmids

105

第二种为双质粒共表达系统，即将卤醇脱卤酶基因连接到表达载体pCDFDuet-1上，然后将构建好的载体与含有环氧化物水解酶基因的pET28a载体，通过热激法一同转化到宿主*E. coli*BL21中。质粒构建步骤见图6-3。



f1 origin

ac I

Hhe C mut Lac I

HHDHSg mut

AmEH

Kan

*Not* I

*Not* I

pCDFDuet-HheC-mut

pCDFDuet-HHDHSg-mut

pET28a-AmEH-mut

ori

CDFori

Sm

CDFori

Sm

lac I

*Nco* I

L

*Nco* I

*Not* I

mut

*Nde* I



*Nco* I

*Xho* I

HHDHIs

Lac I

f1 origin

Kan

ADEH

*Not* I

*N*

pCDFDuet-HHDHIs pET28b-ADEH

ori

Sm

CDFori

lac I

*co* I

图6-3 双质粒共表达系统构建图

Fig 6-3 Construction of two-plasmids coexpression system

### 6.3.2 定点突变方法

由于在构建共表达质粒过程中需要通过定点突变方法对酶切位点进行置换，及某些碱基进行同义突变，定点突变方法同第四章4.3.3。

106

### 6.3.3 重组菌的培养

将含重组质粒pCDFDuet-HheC-mut-AmEH-mut、pCDFDuet-HHDHSg-mut- AmEH-mut和pCDFDuet-HHDHIs-ADEH重组*E. coli* BL21接种到含50 mg/L链霉素的LB培养基培养；双质粒共表达重组菌用含双抗的LB培养基（50 mg/L卡那霉素和链霉素）培养。单质粒卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶重组菌接种到含50 mg/L卡那霉素的LB培养基培养。将重组菌37˚C, 150 rpm培养过夜后，按

1%接种量接至含相应抗生素的新鲜LB摇瓶中，37˚C, 150 rpm培养至OD600 为

0.6-0.8时，加入诱导剂IPTG（终浓度为0.5 mM）, 28˚C诱导一定时间后离心收集菌体，磷酸盐缓冲液洗涤两遍，备用。

### 6.3.4 重组菌催化1,3-DCP合成手性ECH

称取湿菌体细胞0.2-0.5 g，用10 mL Gly-NaOH缓冲液（100 mM, pH 10.0）悬浮，加入一定量的底物1,3-DCP(20-100 mM), 35˚C, 150 rpm摇床反应一定时间后取样，乙酸乙酯萃取，手性GC检测产物ee值及收率。检测条件见第二章2.3.11。

### 6.3.5 卤醇脱卤酶的固定化

取4 g重组HheC (P175S/W249P) 湿菌体溶解在30 mL，pH 8.0的20 mM 磷

酸盐缓冲液中，超声破碎20 min，离心后取上清。在0.1 M，pH 8.0磷酸盐缓冲液中，加入上清粗酶液和环氧树脂ES-103B, 25˚C水浴摇床振荡24 h，取出载体用蒸馏水冲洗后放入20 mL，pH 8.5, 3.0 M的Gly-NaOH水溶液中，25˚C水浴摇床振荡16 h，最后将全部载体用蒸馏水冲洗，抽滤，得到固定化卤醇脱卤酶。

### 6.3.6 环氧化物水解酶的固定化

将4 g环氧化物水解酶AmEH（W182F/S207V/N240D）湿菌体溶解于30 mL纯水，再加入0.18 g硅藻土，置于磁力搅拌器上混匀；添加0.9 mL 5%（m/v）聚乙烯亚胺溶液于30 mL混合液中，交联1 h（按体积比3%添加）；随后加入0.3 mL 25%（m/v）的戊二醛溶液继续交联1 h（按体积比1%添加），真空抽滤得到固定化细胞，得到固定化环氧化物水解酶。

## 6.4 结果与讨论

### 6.4.1 基因串联共表达系统的构建

带有各自独立启动子的多个表达基因构建于一个载体上，可同时表达出不同

107

的酶蛋白。这种方式简便、可靠，是目前最常用共表达的构建方式。将构建好的

3种共表达菌株分别进行诱导培养，所得菌体进行SDS-PAGE电泳分析蛋白表达情况，结果如图6-4所示。重组菌*E. coli* BL21 (pCDFDuet-HheC-mut-AmEH-mut) 、

*E. coli* BL21 (pCDFDuet-HHDHSg-mut-AmEH-mut)和*E. coli* BL21 (pCDFDuet-HHDHIs-ADEH)经过诱导表达后，明显出现了两条目的蛋白条带，表明基因串联共表达系统构建成功，但是共表达系统蛋白的表达量明显低于单基因质粒表达体系，而且各个蛋白基因表达水平都有所差异。含共表达质粒(pCDFDuet-HheC-mut-AmEH-mut)和(pCDFDuet-HHDHSg-mut-AmEH-mut)重组菌诱导表达后，卤醇脱卤酶的表达水平要明显高于环氧化物水解酶。而共表达质粒(pCDFDuet-HHDHIs-ADEH)重组菌经诱导后，环氧化物水解酶ADEH的表达水平明显高于卤醇脱卤酶HHDHIs。说明同一内部启动子占据载体上有限的克隆空间和存在启动子间的干扰现象，影响同一串联基因相互间的表达，另外基因表达的水平除和基因的在载体的位置有关也和基因本身有关。



a



b



c

图6-4 基因串联共表达系统蛋白表达电泳图

Fig. 6-4 SDS-PAGE analysis of halohydrin dehalogenase and epoxide hydrolase coexpressed in*E. coli.*

A: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HheC-mut-

AmEH-mut; lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HheC-mut-AmEH-mut induced by IPTG; b: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HHDHSg-mut

-AmEH-mut, lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HHDHSg-mut-AmEH-mut induced by IPTG; c: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HHDHIs

-ADEH, lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / pCDFDuet-HHDHIs-ADEH induced by IPTG;

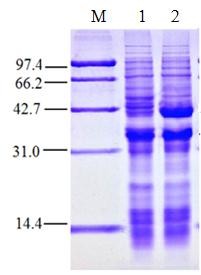
108

### 6.4.2 双质粒共表达系统的构建

分别将构建好的表达双质粒通过热激法一同转化到同一宿主*E. coli* BL21中，将阳性克隆接种于含双抗LB培养基中，经IPTG诱导培养后，SDS-PAGE分析表达情况。由图6-5可知，3种双质粒表达都出现了明显两条目的蛋白表达条带，而且双质粒表达系统中双酶的表达量，特别是环氧化物水解酶的表达量明显高于基因串联基因共表达系统，说明在双质粒重组菌细胞繁殖过程中未出现质粒丢失，双质粒共表达系统表达效果较好。



a



c

b

图6-5 双质粒共表达系统蛋白表达图

Fig. 6-5 SDS-PAGE analysis of two-plasmids coexpression system in*E. coli*

A: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) / (pCDFDuet-HheC-mut

/pET28a-AmEH-mut); lane 2: *E. coli* BL21(DE3) /(pCDFDuet-HheC-mut/pET28a-AmEH-mut) induced by IPTG; b: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3)

/( pCDFDuet-HHDHSg-mut/pET28a-AmEH-mut), lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / ( pCDFDuet- HHDHSg-mut/pET28a-AmEH-mut) induced by IPTG; c: lane M, molecular weight mark, lane 1: uninduced *E. coli* BL21(DE3) / (pCDFDuet-HHDHIs/pET28b-ADEH), lane 2: *E. coli* BL21(DE3) / (pCDFDuet-HHDHIs/pET28b-ADEH) induced by IPTG;

### 6.4.3 双酶体系催化1,3-DCP合成手性ECH

#### 6.4.3.1 HheC(P175S/W249P)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系

将构建好的共表达系统，在相同条件下经诱导培养后，以重组菌细胞作为催化剂催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH，底物浓度20-100 mM，反应一定时间取样，GC分析手性ECH的ee值和收率。从表6-2可以看出，两种共表达系统与单一卤醇脱卤酶催化脱卤合成手性ECH相比，产物的ee值明显提高，双

109

质粒表达系统的催化效果要明显好于基因串联共表达系统。当底物浓度为20 mM时，基因串联共表达系统反应最终（*S*）-ECH的ee值达到99.2%，收率达到87.3%。在双质粒表达系统中，（*S*）-ECH的ee和收率分别为99.3%和91.4%。在两个表达系统中，当底物浓度增加时，产物的ee值和收率随着底物浓度的增加而下降，当底物浓度达到100 mM时，基因串联系统的产物的ee值和收率只有91.4%和

51.2%。双质粒系统产物的ee值和收率也只有93.2%和52.1%。从共表达的结果可以看出，双酶共表达时虽然由于*R*-环氧化物水解酶水解产物中微量的（*R*）-ECH，使得（*S*）-ECH的ee值比单一卤醇脱卤酶催化合成时ee值有所提高，但只有低浓度时产物ee值能达到99%，浓度增加时，产物ee值不能完全达到99%。主要原因一方面由于底物浓度增加，底物不能完全转化，(*R*) -ECH一边水解，卤醇脱卤酶一边催化1, 3-DCP生成微量（*R*）-ECH；另一方面底物浓度增加时，生成的氯离子浓度增加，pH下降，导致逆反应速率增加；另外在卤醇脱卤酶的存在下，手性ECH也能产生自消旋的现象。因此为了避免卤醇脱卤酶的影响，考察了两步法双酶偶联体系催化1, 3-DCP合成手性ECH的效果，从表6-2可以看出，两步法催化由于没有卤醇脱卤酶的干扰，最终产物的ee值都能达99%，产物的收率在双质粒系统的基础上略有提高。

表6-2 HheC(P175S/W249P)和AmEH(W182F/S207V/N240D)双酶体系催化1,3-DCP合成

(*S*) -ECH

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Method 1 | | Method 2 | | Method 3 | |
| 1,3-DCP  concentration (mM) | Analytical yield(%) | (*S*)-ECH  (ee %) | Analytical yield(%) | (*S*)-ECH  (ee %) | Analytical yield(%) | (*S*)-ECH  (ee %) |
| 20 | 91.4 | 99.3 | 87.3 | 99.2 | 91.2 | 99.9 |
| 40 | 90.2 | 97.5 | 83 | 96.1 | 89.6 | 99.9 |
| 60 | 69.0 | 95.2 | 64.9 | 95.5 | 72.4 | 99.9 |
| 80 | 58.9 | 94.1 | 58.0 | 94.3 | 61.4 | 99.9 |
| 100 | 52.1 | 93.2 | 51.2 | 91.4 | 54.2 | 99.9 |

Table 6-2 Our study offered a potential method to produce (*S*) -ECH from 1,3-DCP by two-step biocatalysis using HheC (P175S/W249P) and AmEH (W182F/S207V/N240D)

AOne-pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH via cascade biocatalysis with the resting cells of *E. coli* (pCDFDuet-HheC-mut and pET28a-AmEH-mut).

BOne-Pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH via cascade biocatalysis with the

Resting cells of *E. coli* (pCDFDuet-HheC-mut-AmEH-mut).

CEnantioselective cascade conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH using *E. coli* (pET28b-HheC-mut)

110

And *E. coli* (pET28a-AmEH mut) in two reaction vessel.

#### 6.4.3.2 HHDHSg(V137I)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系

HHDHSg(V137I)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系催化1,3-DCP 合

成（*S*）-ECH的结果如表6-3所示。双质粒表达系统催化效率同样优于基因串联共表达系统，当底物浓度为20 mM时，双质粒表达系统催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH的收率和ee值为99.0%和82.5%。基因串联系统的产物收率和ee值分别为81.2%和95.2%。产物的收率和ee 值要逊于HheC (P175S/W249P)和AmEH

（W182F/S207V/N240D）双酶体系。当底物浓度增加时，产物的收率和ee值也都随着底物浓度的增加而下降。当底物浓度为100 mM时，双质粒系统生成产物的ee值和收率为93.1%和50.4%。基因串联体系产物的ee值和收率为90.1%和49.3%。同时也考察两步法催化1, 3-DCP合成（*S*）-ECH的效果，和上述两步法一致的是产物的ee值都达到了99%。

表6-3 HHDHSg (V137I)和AmEH (W182F/S207V/N240D)双酶体系催化1,3-DCP合成

(*S*) -ECH

Table 6-3 Our study offered a potential method to produce(S) -ECH from 1,3-DCP by two-step biocatalysis using HHDHSg (V137I) and AmEH (W182F/S207V/N240D)

| 1,3-DCP  Concentration (mM) | Method 1 | | Method 2 | | Method 3 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Analytical  yield(%) | (S)-ECH  (Ee %) | Analytical  yield(%) | (S)-ECH  (Ee %) | Analytical  yield(%) | (S)-ECH  (Ee %) |
| 20 | 82.5 | 99.0 | 81.2 | 95.2 | 82.7 | 99.9 |
| 40 | 74.8 | 96.5 | 72.5 | 91.4 | 73.4 | 99.9 |
| 60 | 65.2 | 95.0 | 64.9 | 91.0 | 65.8 | 99.9 |
| 80 | 57.1 | 93.6 | 56.2 | 90.3 | 57.7 | 99.9 |
| 100 | 50.4 | 93.1 | 49.3 | 90.1 | 51.6 | 99.9 |

AOne-pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH via cascade biocatalysis with the resting cells of *E. coli* (pCDFDuet-HHDHSg-mut and pET28a-AmEH-mut).

BOne-Pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH via cascade biocatalysis with the

Resting cells of *E. coli*(pCDFDuet-HHDHSg-mut-AmEH-mut).

CEnantioselective cascade conversion of 1,3-DCP to (*S*) -ECH using *E. coli* (pET28b-HheC-mut) and *E. coli* (pET28a-AmEH-mut) in two reaction vessel.

#### 6.4.3.3 HHDHIs和ADEH双酶体系

由于HHDHIs和ADEH的选择性与上述卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶选择性刚好相反，本章还考察了两者共表达的催化效果。由于不管是基因串联表达系统还是双质粒表达系统，环氧化物水解酶的表达量都远远高于卤醇脱卤酶，同时

111

HHDHIs对映选择性偏低的问题，最后产物（*R*）-ECH的收率都很低。双质粒表达系统产物不同浓度下，产物的ee值都小于99%，收率最高只有16.6%。基因串联表达系统，产物的ee值比双质粒系统更高，底物浓度低于60 mM时，产物的

ee值可以达到99%。双酶两步法催化反应，通过调整两者的比例，产物（*R*）-ECH的ee值都可以达到99%。当底物浓度为20 mM时，(*R*) -ECH的收率为48.6%，底物浓度增加收率也在不断下降，最后100 mM时产物收率只有19.3%。

表6-4 HHDHIs 和ADEH双酶体系催化1,3-DCP合成(*R*) -ECH

Table 6-4 Our study offered a potential method to produce(R) -ECH from 1,3-DCP by two-step biocatalysis using HHDHIs and ADEH

| 1,3-DCP  Concentration (mM) | Method 1 | | Method 2 | | Method 3 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Analytical  yield(%) | (R)-ECH  (Ee %) | Analytical  yield(%) | (R)-ECH  (Ee %) | Analytical  yield(%) | (R)-ECH  (Ee %) |
| 20 | 16.6 | 97.8 | 15.1 | 99.9 | 48.6 | 99.9 |
| 40 | 11.7 | 97.2 | 11.5 | 99.9 | 40.2 | 99.9 |
| 60 | 9.5 | 92.5 | 10.3 | 99.9 | 30.4 | 99.9 |
| 80 | 8.4 | 90.8 | 8.9 | 91.5 | 23.1 | 99.9 |
| 100 | 7.1 | 89.2 | 6.2 | 86.4 | 19.3 | 99.9 |

AOne-pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*R*) -ECH via cascade biocatalysis with the resting cells of *E. coli* (pCDFDuet-HHDHIs and pET28a-ADEH).

BOne-Pot enantioselective conversion of 1,3-DCP to (*R*) -ECH via cascade biocatalysis with the

Resting cells of *E. coli* (pCDFDuet-HHDHIs-ADEH).

CEnantioselective cascade conversion of 1,3-DCP to (*R*) -ECH using *E. coli* (HHDHIs) and *E. coli*

(ADEH) in two reaction vessel.

### 6.4.4 固定化酶偶联催化合成手性ECH

由以上实验看出，卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶双酶共表达虽培养操作方便，但是双酶催化1, 3-DCP这种特殊底物时，因为卤醇脱卤酶特异的酶催化特性（氯离子存在下可逆反应及卤醇脱卤酶对手性ECH的消旋作用）使双酶一锅法催化效果不如双酶两锅法。由于游离卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶不能重复利用，因此本节尝试对双酶进行固定，一方面提高其操作稳定性和使用批次，另一方面使产物易于分离[169, 170]。采用实验方法中的固定化方法固定双酶，并构建双酶偶联反应的体系（图6-6）。通过研究发现卤醇脱卤酶HheC(P175S/W249P)固定化后酶活有一定程度的损失，但是对其立体选择性没有影响，同时操作稳定性大大增强。固定化卤醇脱卤酶用于催化40 mM 1,3-DCP合成（*S*）-ECH，使用10批后，固定化酶残余酶活仍有85%以上，产物的ee值和收率还都保持在90%左右。环

112

氧化物水解酶AmEH(W182F/S207V/N240D)固定化后，虽酶活降低，但是对立体选择性影响甚微。固定化环氧化物水解酶拆分40 mM外消旋ECH，产物ee值> 99%和收率保持在40%以上，使用5批后固定化酶酶活保持在80%以上。利用固定化卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶双酶偶联催化1, 3-DCP合成(*S*) -ECH，在第一个反应器里催化1, 3-DCP合成手性ECH，由于酶和底物本身的特性，产物的ee值未能达到99%，我们将反应液迅速移到含固定化环氧化物水解酶的反应器中，水解剩余的(*R*) -ECH，产物的ee值达到99%，再将反应液移出，固定化酶重复利用。本实验室正在尝试不同的反应系统使双酶偶联，发挥两者最大的催化能力，积极探索解除卤醇脱卤酶产物抑制的解决方法。另外我们还可以将双酶体系应该于其他卤代醇的脱卤及环氧化物水解反应（如2-氯-1-苯乙醇），拓宽其应用范围，同时也可以将卤醇脱卤酶或环氧化物水解酶与其它酶（比如腈水解酶、醇脱氢酶、单加氧酶等）进行偶联反应合成其他有价值的手性中间体。



图6-6 固定化酶偶联反应示意图

Fig. 6-6 Schematic diagram of coupling reaction using [immobilized HHDH](https://www.baidu.com/link?url=Wjqlu43fvRhVEWUqxHBO6eCVMf4jTf6Hw54wyHFtUng_iVUyDRh3G22AG1EgU6Ke8fG97uxJ0VUUSLxnlVlNPhrdXU_9ESmFykt5Is5iff8W0TNwXbbKXiYDMw12jKD4&amp;wd&amp;eqid=d0599abb0006b9c50000000455fa228a) and EH.

## 6.5 本章小结

本章利用分子生物学手段成功实现了卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶在大肠杆菌中的双酶共表达。分别构建了两种共表达系统：基因串联共表达系统和双质粒表达系统。不同的共表达系统中两种酶蛋白的表达效果存在差异，基因串联共表达系统中环氧化物水解酶的表达量明显低于双质粒共表达系统，双质粒系统中卤醇脱卤酶的表达量除了HHDHSg，其他都比基因串联系统的高。

通过全细胞催化1, 3-DCP合成手性ECH反应比较，合成（*S*）-ECH时，基因

串联共表达系统催化效果低于双质粒系统，合成（*R*）-ECH时，双质粒系统的催化

113

效果低于基因串联共表达系统。而双酶共表达系统的虽操作方便，但其催化效果不如双酶单表达两步偶联催化。HheC(P175S/W249P)和AmEH(W182F/S207V/ N240D)双酶最优体系催化20-100 mM 1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee> 99%，收率在54.2-91.2%之间。HHDHSgV137I和AmEH(W182F/S207V/N240D)双酶最优体系催化20-100 mM 1,3-DCP合成(*S*) -ECH的ee> 99%，收率在51.6-82.7%之间。HHDHIs

和ADEH双酶最优体系催化合成20-100 mM 1,3-DCP合成(*R*) -ECH的ee> 99%，收率分别在19.3-48.6%之间。

在前面探究双酶游离细胞偶联催化性能的基础上，对卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶进行固定化，增加酶的操作稳定性，实现双酶偶联连续化操作，显示出很好的合成手性环氧化物和卤代醇的应用潜力。

# 114

# 第七章 结论与展望

## 7.1 结论

本文依托生物催化及蛋白质分子改造实验平台，以甘油化学酶法制备手性环氧氯丙烷（ECH）为研究目标，着重开展新型且催化性能优异的卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶的开发。论文主要结论如下：

以催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH为目标反应，通过传统土壤筛选、基因组狩猎和数据库挖掘等方法获得七个卤醇脱卤酶，发现其中四种卤醇脱卤酶对1, 3-DCP具有较高的催化活性和一定的立体选择性，并进一步研究其酶学性质及催化性能。利用卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP合成手性ECH，在pH 10.0条件下，20-100 mM底物浓度范围内，HHDHSg催化1, 3-DCP制备（*S*）-ECH的立体选择性最高，（*S*）-ECH的ee值和收率在83.4-84.9%和56.2-85.9%之间；而HHDHIs表现出相反的选择性，产物（*R*）-ECH的ee值和收率在30.2-58.6%和38.9-73.5%之间。

以拆分ECH合成（*S*）-ECH为目标，从实验室筛选保藏的2株菌株中克隆得到三个*R*-环氧化物水解酶基因，并在大肠杆菌中进行了异源表达，发现AmEH的对映选择性最优，系统研究了该酶的酶学性质及催化性能。AmEH催化64 mM

ECH水解拆分的*E*=12.9, (*S*) -ECH的收率和ee值分别达到21.5%和> 99%。

在此基础上利用定点突变技术对两种酶进行理性或半理性分子改造，最终提高了卤醇脱卤酶催化1, 3-DCP不对称脱卤合成手性ECH的立体选择性和环氧化物水解酶AmEH拆分ECH的立体选择性。获得的卤醇脱卤酶突变体用于催化合成手性ECH 的ee 值可达到90%以上，环氧化物水解酶最优突变 体

W182F/S207V/N240D的酶活及对映体选择率是原始酶的约1.7和7.0倍。

最后提出了双酶偶联的研究思路，利用分子生物学技术实现卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶在大肠杆菌中双酶共表达偶联和单表达偶联，并成功应用于制备手性ECH，进一步提高了酶催化1, 3-DCP合成手性ECH的ee值。

115

## 7.2 展望

本论文着重于研究卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶的开发、改造及在手性环氧氯丙烷的合成中的应用，虽然解决了一些问题，但仍有诸多不足之处有待进一步改善或提高，可以从以下几个方面进行开展：

目前有晶体结构报道的卤醇脱卤酶只有HheA和HheC，本论文中新挖掘的卤醇脱卤酶在催化特性上有别于HheA和HheC，下一步可以解析卤醇脱卤酶的晶体结构，开展分子水平研究，为深入研究卤醇脱卤酶的性质奠定基础，解析其立体选择性的机制；再运用蛋白质工程技术对酶有针对性的进行分子改造。

本论文初步研究了卤醇脱卤酶和环氧化物水解酶的底物谱，可以进一步拓宽底物谱，更准确地了解酶和底物之间的相互作用关系，及底物的结构与酶的立体选择性之间的关系。

本研究获得的卤醇脱卤酶虽然相比文献报道，催化活性高，分子改造后催化1, 3-DCP不对称脱卤的选择性有了明显的提高，但是和其他卤醇脱卤酶一样存在严重的产物抑制及其他副反应，可以从酶的结构研究入手，探讨耐受高浓度底物和产物的酶结构基础和普遍规律，研究氯离子和环氧氯丙烷抑制机理，希望从分子层面上通过对酶的理性或者非理性改造解除抑制。

本研究获得的环氧化物水解酶经改造后选择性大大提高，酶活虽有提高，但还相对比较低，后续可以进一步提高其酶活，并通过分子改造提高酶的高底物浓度的耐受性。

卤醇脱卤酶可以在亲核试剂的作用下，先脱卤后拆分形成有价值的各种手性

β-取代醇，后续可以研究新获得的卤醇脱卤酶在此类化合物合成中的应用。

不同酶组合在一起，形成有价值的链式反应，可以将卤醇脱卤酶或环氧化物水解酶和其它酶（如醇脱氢酶、腈水解酶和单加氧酶）进行偶联，催化合成有价值的手性化合物。

考虑将膜反应器应用到生物催化反应过程中，特别是采用渗透蒸发膜可以除去反应中产物ECH，推动整个反应平衡向产物生成的方向移动。

寻找更为有效的固定化方法，提高催化剂的操作稳定性，构建可实现连续生产的生物反应器，提高催化剂的催化效率和过程的时空产率。

116

参考文献

[1] 王新龙. 环氧氯丙烷生成技术进展及发展建议[J]. 化学工业及工程技术, 2006, 27(1): 46-48.

[2] 李双庆, 范新川. 我国环氧氯丙烷市场趋势探讨[J]. 化学工业, 2013, 31(12): 28-31.

[3] van Leeuwen JGE, Wijma HJ, Floor RJ, et al. Directed evolution strategies for enantiocomplementary haloalkane dehalogenases: from chemical waste to enantiopure building blocks[J]. ChembioChem, 2012, 13: 137-148.

[4] 卢定强, 涂清波, 凌岫泉, 等. 手性环氧氯丙烷的制备及其药物应用[J]. 有机化学, 2009, 29(8): 1209-1216.

[5] Kabat MM, Daniewski AR, Burger W. A convenient synthesis of *R*-(-) -carnitine from*R*-(-) -epichlorohydrin[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 1997, 8(16): 2663-2665.

[6] Nakagawa T, Kogae. Method for preparing epichlorohydrins[P]. Japan: JP 6344574, 1988.

[7] 戴祖贵, 张永强, 刘易, 等. 环氧氯丙烷合成的研究进展[J]. 石油化工, 2008, 37(7): 738-743.

[8] Baldwin JJ, Mensler RK, Arison BH, et al. Synthesis of *R*- and *S*-epichlorohydrin[J]. Journal of Organic Chemistry, 1978, 43(25): 4876-4878.

[9] Jacobsen EN, Kakiuchi F, Konsler RG, et al. Enantioselective catalytic ring opening of epoxides with carboxylic acids [J]. Tetrahedron Letters, 1997, 38(5): 773-776.

[10] Kim GJ, Lee H, Kim SJ. Catalytic activity and recyclability of new enantioselective chiral Co-salen complexes in the hydrolytic kinetic resolution of epichlorohydrine[J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(25): 5005-5008.

[11] Kureshy RI, Khan NH, Abdi SHR, et al. Simultaneous production of chirally enriched epoxides and 1, 2-diols from racemic epoxides via hydrolytic kinetic resolution(HKR)[J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2002, 179(1-2): 73-77.

[12] Kureshy RI, Singh S, khan NUH, et al. Improved catalytic activity of homochiral dimeric cobalt-salen complex in hydrohytic kinetic resolution of terminal racemic epoxides[J]. Chirality, 2005, 17(9): 590-594.

[13] Annis DA, Jacobsen EN. Polymer-supported chiral Co(salen) complexes: Synthetic applications and mechanistic investigations in the hydrolytic kinetic resolution of terminal epoxides[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(17): 4147-4154.

[14] Kwon MA, Kim GJ. Synthesis of polymeric salen complexes and application in the enantioselective hydrolytic kinetic resolution of epoxides as catalysts[J]. Catalysis Today, 2003, 87(1-4): 145-151.

[15] 丁奎玲, 张志鹏, 张如周, 等. 桥链双希夫碱-钴络合物及其合成方法和用途[P]. 中

117

国, CN: 101967165, 2011-02-09.

[16] Lin H, Liu JY, Wang HB, et al. Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: A comparative review[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2011, 72(3-4): 77-89.

[17] Hager LP, Lakner FJ, Basavapathruni A. Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 1998, 5: 95-101.

[18] 吴金跃, 蒋育澄, 胡满成, 等. 手性环氧氯丙烷的CPO酶催化不对称合成[J]. 中国科学, 2010, 40(8): 1018-1024.

[19] Kasai N, Tsujimura K, Unoura K, et al. Isolation of (*S*) -2, 3-dichloro-1-propanol assimilating bacterium, its characterization, and its use in preparation of (*R*) -2, 3-dichloro-1-propanol and (*S*) -epichlorohydrin[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1992, 10: 37-43.

[20] Kasai N, Tsujimura K, Unoura K, et al. Preparation of (*S*) -2, 3-dichloro-1-propanol by *Pseudomonas* sp. and its use in the synthesis of (*R*) -Epichlorohydrin[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1992, 9: 97-101.

[21] Spelberg JHL, Vlieg JETV, Bosma T, et al. A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 1999(15), 10: 2863-2870.

[22] Koudelakova T, Bidmanova S, Dvorak P, et al. Haloalkane dehalogenases: Biotechnological applications[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(1): 32-35.

[23] Assis HMS, Sallis PJ, Bull AT, et al. Biochemical characterization of a haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter erithii* H10a[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(7): 568-574.

[24] Nakamura T, Nagasawa T, Yu FJ, et al. Characterization of a novel enantioselective halohydrin hydrogen-halide-lyase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(4): 1297-1301.

[25] Spelberg JHL, Tang LX, van Gelder M, et al. Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 2002, 13(10): 1083-1089.

[26] Jin HX, Hu ZC, Liu ZQ, et al. Nitrite-mediated synthesis of chiral epichlorohydrin using halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2012, 59(3): 170-177.

[27] Choi WJ, Choi CY. Production of chiral epoxides: Epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2005, 10: 167-179.

[28] Choi WJ, Lee EY, Yoon SJ, et al. Biocatalytic production of chiral epichlorohydrin in organic solvents[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(3): 339-341.

[29] Kim HS, Lee JH, Park S, et al. Biocatalytic preparation of chiral epichlorohydrins using recombinant *Pichia pastoris* expressing epoxide hydrolase of *Rhodotorula glutinis*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2004, 9(1): 62-64.118

[30] Lee EY. Enantioselective hydrolysis of epichlorohydrin in organic solvents using recombinant epoxide hydrolase[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2007, 13: 159-162.

[31] Woo JH, Hwang YO, Kang JH, et al. Enantioselective hydrolysis of racemic epichlorohydrin using an epoxide hydrolase from *Novosphingobium aromaticivorans*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(3): 295-297.

[32] Liu ZQ, Zhang LP, Cheng F, et al. Characterization of a newly synthesized epoxide hydrolase and its application in racemic resolution of (*R*, *S*) -epichlorohydrin[J]. Catalysis Communications, 2011, 16: 133-139.

[33] Jin HX, Hu ZC, Zheng YG. Enantioselective hydrolysis of epichlorohydrin using whole *Aspergillus niger* ZJB-09173 cells in organic solvents[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(4): 695-702.

[34] Jin HX, Liu ZQ, Hu ZC, et al. Biosynthesis of (*R*) -epichlorohydrin at high substrate concentration by kinetic resolution of racemic epichlorohydrin with a recombinant epoxide hydrolase [J]. Engineering in Life Sciences, 2013, 13(4): 385-392.

[35] Widersten M, Gurell A, Lindberg D. Structure-function relationships of epoxide hydrolases and their potential use in biocatalysis[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2010, 1800(3): 316-326.

[36] Kotik M, Archelas A, Wohlgemuth R. Epoxide Hydrolases and their application in organic synthesis[J]. Current Organic Chemistry, 2012, 16(4): 451-482.

[37] Choi WJ. Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(2): 239-247.

[38] Hammock B D, Gill S S, Stamoudis V, et al. Soluble mammalian epoxide hydratase: action on juvenile hormone and other terpenoid epoxides[J]. Biochemistry Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1976, 53: 263-265.

[39] Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: Mechanisms, inhibitor designs, and biological roles[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005, 45: 311-333.

[40] Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology[J]. Chemico-Biological Interactions, 2000, 129(1-2): 41-59.

[41] Nardini M, Ridder IS, Rozeboom HJ, et al. The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1-An enzyme to detoxify harmful epoxides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(21): 14579-14586.

[42] Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD, et al. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(19): 10637-10642.

[43] Zou JY, Hallberg BM, Bergfors T, et al. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at

1.8 angstrom resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases[J]. Structure with Folding & Design, 2000, 8(2):

119

111-122.

[44] Armstrong RN, Cassidy CS. New structural and chemical insight into the catalytic mechanism of epoxide hydrolases[J]. Drug Metabolism Reviews, 2000, 32(3-4): 327-328.

[45] 孔旭东, 郁惠蕾, 周佳海, 等. 环氧水解酶的结构基础及新酶开发[J]. Th物加工过程, 2013, 11(1): 77-84.

[46] Arand M, Cronin A, Adamska M, et al. Epoxide hydrolases: Structure, function, mechanism, and assay[J]. Methods in Enzymology, 2005, 400: 569-588.

[47] Arand M, Hallberg BM, Zou JY, et al. Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1, 2-epoxide hydrolase reveals a novel active site[J]. Embo Journal 2003, 22(11): 2583-2592.

[48] Mischitz M, Faber K. Asymmetric opening of an epoxide by azide catalyzed by an immobilized enzyme preparation from *Rhodococcus* sp. [J]. Tetrahedron Letters, 1994, 35: 81-84.

[49] Thunnissen MM, Nordlund P, Haeggstrom JZ. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation[J]. Nature Structural Biology, 2001, 8(2): 131-135.

[50] Archelas A, Furstoss R. Synthetic applications of epoxide hydrolase[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(2): 112-119.

[51] Lee EY. Enantioconvergent hydrolysis of racemic epoxides for production of enantiopure epoxides and vicinal diols using epoxide hydrolases[J]. Korea Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 22: 123-128.

[52] Grulich M, Marsalek J, Kyslik P, et al. Production, enrichment and immobilization of a metagenome-derived epoxide hydrolase[J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 526-532.

[53] Hwang S, Choi CY, Lee EY. Bio- and chemo-catalytic preparations of chiral epoxides[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2010, 16(1): 1-6.

[54] Botes AL, Weijers CAGM, Botes PJ, et al. Enantioselectivities of yeast epoxide hydrolases for 1, 2-epoxides[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 1999, 10: 3327-3336.

[55] Genzel Y, Archelas A, Spelberg JHL, et al. Microbiological tansformations. Part 48: Enantioselective biohydrolysis of 2-, 3- and 4-pyridyloxirane at high substrate concentration using the *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolase and its Tyr215Phe mutant[J]. Tetrahedron, 2001, 57: 2775-2779.

[56] Tang YF, Xu JH, Ye Q, Schulze B. Biocatalytic preparation of (*S*) -phenyl glycidyl ether using newly isolated *Bacillus megaterium* ECU1001. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2001, 13: 61-68.

[57] Cleij M, Archelas A, Furstoss R. Microbiological transformations 43. Epoxide hydrolases as tools for the synthesis of enantiopure alpha-methylstyrene oxides: A new and efficient synthesis of (*S*) -ibuprofen[J]. Journal of Organic Chemistry, 1999, 64: 5029-5035.

[58] Monfort N, Archelas A, Furstoss R. Enzymatic transformations. Part 53: Epoxide

120

Hydrolase-catalysed resolution of key synthons for azole antifungal agents[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 2002,13: 2399-2401.

[59] Wang ZQ, Wang YS, Shi H, et al. Improvement of the production efficiency of L-(+) -tartaric Acid by heterogeneous whole-cell bioconversion[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172: 3989-4001.

[60] Yildirim D, Tukel SS, Alptekin O, et al. Immobilized *Aspergillus niger* epoxide hydrolases: Cost-effective biocatalysts for the prepation of enantiopure styrene oxide, propylene oxide and epichlorohydrin[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2013, 88: 84-90.

[61] Kong XD, Ma Q, Zhou JH, et al. A smart library of epoxide hydrolase variants and the top hits for synthesis of (*S*) -beta-blocker precursors[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2014, 53: 6641-6644.

[62] Karboune S, Archelas A, Furstoss R, et al. Immobilization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* onto DEAE-cellulose: enzymatic properties and application for the enantioselective resolution of a racemic epoxide[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2005, 32(5): 175-183.

[63] Xu W, Xu JH, Pan J, et al. Enantioconvergent hydrolysis of styrene epoxides by newly discovered epoxide hydrolases in mung bean[J]. Organic Letters, 2006, 8(8): 1737-1740.

[64] Cao L, Lee JT, Chen W, et al. Enantioconvergent production of (*R*) -1-phenyl-1, 2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(3): 522-529.

[65] van der Werf MJ, Orru RVA, Overkamp KM, et al. Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1, 2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14: an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 380-385.

[66] Weijers CAGM. Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by*Rhodotorula glutinis*[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 1997, 8(4): 639-647.

[67] Spelberg JHL, Rink R, Kellogg RM, et al. Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 1998, 9(3): 459-466.

[68] Jin H, Li ZY. Enantioselective hydrolysis of o-nitrostyrene oxide by whole cells of *Aspergillus niger* CGMCC 0496[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66: 1123-1125.

[69] Smit MS, Labuschagne M. Diversity of epoxide hydrolase biocatalysts[J]. Current Organic Chemistry, 2006, 10(10): 1145-1161.

[70] Bellevik S, Zhang JM, Meijer J. *Brassica napu*s soluble epoxide hydrolase (BNSEH1) - Cloning and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. European Journal of Biochemistry, 2002, 269: 5295-5302.

[71] Arahira M, Nong VH, Udaka K, et al. Purification, molecular cloning and ethylene-inducible

121

Expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267: 2649-2657.

[72] Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, et al. Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from Potato[J]. Plant Journal, 1994, 6(2): 251-258.

[73] Zhu QQ, He WH, Kong XD, et al. Heterologous overexpression of *Vigna radiata* epoxide hydrolase in *Escherichia coli* and its catalytic performance in enantioconvergent hydrolysis of p-nitrostyrene oxide into (*R*) -p-nitrophenyl glycol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 207-218.

[74] Arand M, Hemmer H, Durk H, et al. Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase[J]. Biochemical Journal, 1999, 344: 273-280.

[75] Monterde MI, Lombard M, Archelas A, et al. Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase[J]. Tetrahedron-Asymmetry, 2004, 15: 2801-2805.

[76] Zhao J, Chu YY, Li AT, et al. An unusual (*R*) -selective epoxide hydrolase with high activity for facile preparation of enantiopure glycidyl ethers[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011, 353(9): 1510-1518.

[77] Kumar R, Wani SI, Chauhan NS, et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Cupriavidus metallidurans*-CH34[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 79(1): 49-59.

[78] Hwang S, Hyun H, Lee B, et al. Screening from the genome databases: Novel epoxide hydrolase from *Caulobacter crescentus*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16: 32-36.

[79] Woo JH, Kang JH, Kang S, et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Novosphingobium aromaticivorans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(5): 873-881.

[80] Lee EY, Shuler ML. Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98: 318-327.

[81] Luo Q, Yao Y, Han WW, et al. Homology modeling of a novel epoxide hydrolase (EH) from *Aspergillus niger* SQ-6: structure-activity relationship in expoxides inhibiting EH activity[J]. Journal of Molecular Modeling, 2009, 15: 1125-1132.

[82] Jochens H, Hesseler M, Stiba K, et al. Protein engineering of alpha/beta-hydrolase fold enzymes[J]. ChemBioChem, 2011, 12(10): 1508-1517.

[83] Kotik M, Archelas A, Famerova V, et al. Laboratory evolution of an epoxide hydrolase - Towards an enantioconvergent biocatalyst[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 156(1): 1-10.

[84] Arand M, Cronin A, Adamska M, et al. Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay. Phase Ii Conjugation Enzymes and Transport Systems, 2005, 400: 569-588.122

[85] Mateo C, Archelas A, Furstoss R. A spectrophotometric assay for measuring and detecting an epoxide hydrolase activity[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 314(1): 135-141.

[86] Cedrone F, Bhatnagar T, Baratti JC. Colorimetric assays for quantitative analysis and screening of epoxide hydrolase activity[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(23-24): 1921-1927.

[87] Zocher F, Enzelberger MM, Bornscheuer UT, et al. A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity[J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 391(3): 345-351.

[88] Reetz MT, Torre C, Eipper A, et al. Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution[J]. Organic Letters, 2004, 6(2): 177-180.

[89] van Loo B, Spelberg JHL, Kingma J, et al. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(7): 981-990.

[90] Nardini M, Rick RB, Janssen DB, et al. Structure and mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2001, 11(21): 1035-1042.

[91] Rink R, Spelberg JHL, Pieters RJ, et al. Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(32): 7417-7418.

[92] Thomaeus A, Naworyta A, Mowbray SL, et al. Removal of distal protein-water hydrogen bonds in a plant epoxide hydrolase increases catalytic turnover but decreases thermostability[J]. Protein Science, 2008, 17(7): 1275-1284.

[93] Choi SH, Kim HS, Lee EY. Comparative homology modeling-inspired protein engineering for improvement of catalytic activity of *Mugil cephalus* epoxide hydrolase[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(10): 1617-1624.

[94] Zhang LF, Wu JM, Feng H. Homology modelling and site-directed mutagenesis studies of the epoxide hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Biochemistry, 2011, 149(6): 673-684.

[95] van Loo B, Kingma J, Heyman G, et al. Improved enantioselective conversion of styrene epoxides and meso-epoxides through epoxide hydrolases with a mutated nucleophile-flanking residue[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(3): 145-153.

[96] Reetz MT, Wang LW, Bocola M. Directed evolution of enantioselective enzymes: Iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2006, 45(8): 2494-2494.

[97] Reetz MT, Bocola M, Wang LW, et al. Directed evolution of an enantioselective epoxide hydrolase: Uncovering the source of enantioselectivity at each evolutionary stage[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(21): 7334-7343.

[98] Zheng HB, Reetz MT. Manipulating the stereoselectivity of limonene epoxide hydrolase by

123

Directed evolution based on iterative saturation mutagenesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(44):15744-15751.

[99] Matsumoto K, Tanaka Y, Watanabe T, et al. Directed evolution and structural analysis of NADPH-dependent acetoacetyl coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6134-6139.

[100] Reetz MT, Zheng HB. Manipulating the expression rate and enantioselectivity of an epoxide hydrolase by using directed evolution[J]. ChemBioChem, 2011, 12(10): 1529-1535.

[101] Rui LY, Cao L, Chen W, et al. Protein engineering of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 for enhanced activity and enantioselective production of (*R*) -1-phenylethane-1, 2-diol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3995-4003.

[102] Dijoux GH, Elenkov MM, lutje Spelberg JH, et al. Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening[J]. ChemBiolChem, 2008, 9(7): 1048-1051.

[103] Kalogeris K, Antzoulatos O, Mamma D, et al. Application of different processes for the biodegradation of 1, 3-dichloro-2-propanol by the bacterium *Pseudomonas putida* DSM 437[J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2007, 21(3): 297-305.

[104] 郑楷, 汤丽霞. 多功能生物催化剂-卤醇脱卤酶的研究进展[J]. 化工学报2008, 59(12): 2071-2077.

[105] Majeric-Elenkov M, Hauer B, Janssen DB. Enantioselective ring opening of epoxides with cyanide catalysed by halohydrin dehalogenases: a new approach to non-racemicβ-hydroxy nitriles[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2006, 348(4-5): 579-585.

[106] Vlieg JETV, Tang LX, Spelberg JHL, et al. Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(17): 5058-5066.

[107] de Jong RM, Rozeboom HJ, Kalk KH, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of an enantioselective halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacte*r AD1[J]. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2002, 58(1): 176-178.

[108] You ZY, Liu ZQ, Zheng YG. Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 9-21.

[109] de Jong RM, Tiesinga JJ, Villa A, et al. Structural basis for the enantioselectivity of an epoxide ring opening reaction catalyzed by haloalcohol dehalogenase HheC[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(38): 13338-13343.

[110] Castro CE, Bartnicki EW. Biodehalogenation. Epoxiation of halohydrins, epoxide opening, and transhalogenation by a *Flavobacterium* sp[J]. Biochemistry, 1968, 7(9): 3213-3218.

[111] Vandenwijngaard AJ, Reuvekamp PT, Janssen DB. Purification and characterization of

124

Haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain Ad2[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(1): 124-129.

[112] Nagasawa T, Nakamura T, Yu F, et al. Purification and characterization of halohydrin hydrogenhalide lyase from a recombinant *Escherichia. coli* containing the gene from a *Corynebacterium* sp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 36(4): 478-482.

[113] van den Wijingaard AJ, Janssen DB, Witholt B. Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment[J]. Journal of general and microbiology, 1989, 135(8): 2199-2208.

[114] Mamma D, Papadopoulou E, Petroutsos D, et al. Removal of 1, 3-dichloro2-propanol and 3-chloro-1, 2-propanediol by the whole cell system of *Pseudomonas putida* DSM 437. Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2006, 41(3): 303-313.

[115] Schallmey M, Koopmeiners J, Wells E, et al. Expanding the Halohydrin dehalogenase enzyme family: identification of novel enzymes by database mining[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(23): 7303-7315.

[116] Jerphagnon T, Haak R, Berthiol F, et al. Ruthenacycles and iridacycles as catalysts for asymmetric transfer hydrogenation and racemisation[J]. Topics in Catalysis, 2010, 53(15-18): 1002-1008.

[117] Haak RM, Tarabiono C, Janssen DB, et al. Synthesis of enantiopure chloroalcohols by enzymatic kinetic resolution[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2007, 5(20): 318-323.

[118] Seisser B, Lavandera I, Faber K, et al. Stereo-complementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007, 349(8-9): 1399-1404.

[119] Zou SP, Zheng YG, Du EH, et al. Enhancement of (*S*) -2, 3-dichloro-1-propanol production by recombinant whole-cell biocatalyst in n-heptane-aqueous biphasic system[J] Journal of Biotechnology, 2014, 188: 42-47.

[120] Schrittwieser JH, Lavandera I, Seisser B, et al. Biocatalytic cascade for the synthesis of enantiopure beta-azidoalcohols and beta-hydroxynitriles[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2009, 14: 2293-2298.

[121] Chen SY, Yang CX, Wu JP, et al. Multi-enzymatic biosynthesis of chiral beta-hydroxy nitriles through co-expression of oxidoreductase and halohydrin Dehalogenase[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2013, 355: 3179-3190.

[122] Elenkov MM, Tang LX, Hauer B, et al. Sequential kinetic resolution catalyzed by halohydrin dehalogenase[J]. Organic Letters, 2006, 8(19): 4227-4229.

[123] Fox RJ, Davis SC, Mundorff EC, et al. Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25: 338-344.

[124] Ma SK, Gruber J, Davis C, et al. A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate[J]. Green Chemistry, 2010, 12: 81-86.125

[125] Yao PY, Wang L, Yuan J, et al. Efficient biosynthesis of ethyl (*R*) -3-hydroxyglutarate through a One-Pot bienzymatic cascade of halohydrin dehalogenase and nitrilase[J]. ChemcatChem, 2015, 7: 1438-1444.

[126] Wang X, Han SQ, Yang ZJ, et al. Improvement of the thermostability and activity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by engineering C-terminal amino acids[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 212: 92-98.

[127] Guo C, Chen YP, Zheng Y, et al. Exploring the enantioselective mechanism of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by iterative saturation mutagenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81: 2919-2926.

[128] Schallmey M, Floor RJ, Hauer B, et al. Biocatalytic and structural properties of a highly engineered halohydrin dehalogenase[J]. ChembioChem, 2013, 14: 870-881.

[129] Tang LX, Zhu XC, Zheng HY, et al. Key residues for controlling enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2, revealed by structure-guided directed evolution[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78: 2631-2637.

[130] Tang LX, Li Y, Wang XO. A high-throughput colorimetric assay for screening halohydrin dehalogenase saturation mutagenesis libraries[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 147: 164-168.

[131] Iwasaki I, Utsumi S, Ozawa T. New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1952, 25: 226.

[132] Schallmey M, Jekel P, Tang LX, et al. A single point mutation enhances hydroxynitrile synthesis by halohydrin dehalogenase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 70: 50-57.

[133] Hu D, Ye HH, Wu MC, et al. Chemoenzymatic preparation of (*S*) -p-nitrostyrene oxide from p-nitrophenacyl bromide by recombinant *Escherichia coli* cells expressing a novel halohydrin dehalogenase[J]. Catalysis Communications, 2015, 69: 72-75.

[134] Wan NW, Liu ZQ, Huang K, et al. Synthesis of ethyl (*R*) -4-cyano-3-hydroxybutyrate in high concentration using a novel halohydrin dehalogenase HHDH-PL from *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1[J]. Rsc Advances, 2014, 4: 64027-64031.

[135] 李春秀, 许建和. 后基因组时代工业酶资源的挖掘和应用[J]. 生物产业技术, 2011, 1: 40-49.

[136] Sambrock J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn[M]. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 2011.

[137] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: W320-W324.

[138] UK L. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.

[139] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976,

126

72(1-2): 248-252.

[140] Chen CS, Fujimoto Y, Girdaukas G, et al. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers[J]. Journal of the American Chemical Society, 1982, 104(25): 7294-7299.

[141] Spelberg JHL, Tang LX, Kellogg RM, et ak. Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(7): 1095-1102.

[142] Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, et al. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra[J]. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2012, 80(2): 374-381.

[143] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2876-2890.

[144] Fiser A, Sali A. MODELLER: Generation and refinement of homology-based protein structure models[J]. Macromolecular Crystallography, Pt D, 2003, 374(374): 461-491.

[145] Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, et al. Procheck-a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. journal of Applied Crystallography, 1993, 26(2): 283-291.

[146] Shiina I, Ono K, Nakata K. Non-enzymatic dynamic kinetic resolution of racemic alpha-arylalkanoic acids: an advanced asymmetric synthesis of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)[J]. Catalysis Science & Technology, 2012, 2: 2200-2205.

[147] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. Journal of Computational Chemistry, 1998, 19(14): 1639-1662.

[148] Chronopoulou EG, Labrou NE. Site-saturation mutagenesis: a powerful tool for structure-based design of combinatorial mutation libraries[J]. Current protocols in protein science, New York 2011: 2661-26610.

[149] Tang LX, Spelberg JHL, Fraaije MW, et al. Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*[J]. Biochemistry, 2003, 42(18): 5378-5386.

[150] de Jong RM, Kalk KH, Tang L, 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]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 4051-4056.

[151] Tang LX, Pazmino DET, Fraaije MW, et al. Improved catalytic properties of halohydrin dehalogenase by modification of the halide-binding site[J]. Biochemistry, 2005, 44(17): 6609-6618.

[152] Tang LX, van Merode AEJ, Spelberg JHL, et al. Steady-state kinetics and tryptophan fluorescence properties of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*. Roles of W139 and W249 in the active site and halide-induced conformational change[J].

127

Biochemistry, 2003, 42(47): 14057-14065.

[153] Hassani L. Chemical modification of horseradish peroxidase with carboxylic anhydrides: Effect of negative charge and hydrophilicity of the modifiers on thermal stability[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2012, 80(4): 15-19.

[154] Tann CM, Qi DF, Disterfano MD. Enzyme design by chemical modification of protein scaffolds[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(6): 696-704.

[155] Godoy CA, de las Rivas B, Filice M, et al. Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(4): 534-541.

[156] Theil F. Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives[J]. Tetrahedron, 2000, 56(19): 2905-2919.

[157] Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, et al. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(2): 242-250.

[158] Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia A, Fernandez-Lafuente R, et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011, 353(16): 2885-2904.

[159] Liu X, Bastian S, Snow CD, et al. Structure-guided engineering of *Lactococcus lactis* alcohol dehydrogenase LlAdhA for improved conversion of isobutyraldehyde to isobutanol[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 164(2): 188-195.

[160] Zhou C, Ye JT, Xue YF, et al. Directed evolution and structural analysis of alkaline pectate lyase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp. strain N16-5 to improve its thermostability for efficient ramie degumming[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5714-5723.

[161] Koudelakova T, Chaloupkova R, Brezovsky J, et al. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2013, 52(7): 1959-1963.

[162] Kotik M, Zhao W, Lacazio G, et al. Directed evolution of metagenome-derived epoxide hydrolase for improved enantioselectivity and enantioconvergence[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2013, 91(3): 44-51.

[163] Bottcher D, Bornscheuer UT. Protein engineering of microbial enzymes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(3): 274-282.

[164] Lutz S. Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(6): 734-743.

[165] Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture[J]. Science, 2010, 329(5989): 305-309.

[166] Schiott B, Bruice TC. Reaction mechanism of soluble epoxide hydrolase: Insights from

128

Molecular dynamics simulations[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(49): 14558-14570.

[167] Visser H, Vreugdenhil S, de Bont JAM, et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase-encoding gene from *Rhodotorude glutinis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(4): 415-419.

[168] 何漳华, 王洋, 赵珺, 等. 一种多基因串联共表达载体的构建[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(1): 40-45.

[169] Yildirim D, Tukel SS, Alagoz D, et al. Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49(6-7): 555-559.

[170] Yildirim D, Tukel SS, Alagoz D, et al. Efficient immobilization of epoxide hydrolase onto florisil for enantioselective resolution of racemic styrene oxide[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(6): S379-S380.

# 129

攻博博士期间发表论文与专利

1. **Xue F,** Liu ZQ, Wan NW, Zhu HQ, Zheng YG. Engineering the epoxide hydrolase from *Agromyces mediolanus* for enhanced enantioselectivity and activity in the kinetic resolution of racemic epichlorohydrin[J]. Rsc Advance, 2015, 5: 31525-31532.

2. **Xue F,** Liu ZQ, Wan NW, Zheng YG. Purification, gene cloning, and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Agromyces mediolanus* ZJB120203[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174: 352-364.

3. **Xue F**, Liu ZQ, Zou SP, Wan NW, Zhu WY, Zhu Q, Zheng YG. A novel enantioselective epoxide hydrolase from *Agromyces mediolanus* ZJB120203: Cloning, characterization and application [J]. Process Biochemistry, 2014, 49: 409–417.

4. **Xue F,** Liu ZQ, Wang YJ, Wan NW, Zheng YG. Biochemical characterization and biosynthetic application of a halohydrin dehalogenase from *Tistrella mobilis* ZJB1405[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 115: 105–112.

5. **Xue F,** Liu ZQ, Wang YJ, Zhu HQ, Wan NW, Zheng YG. Efficient synthesis of (*S*) -epichlorohydrin in high yield by cascade biocatalysis with halohydrin dehalogenase and epoxide hydrolase mutants[J]. Catalysis Communications, 2015, 72: 147-149.

6. **Xue F,** Liu ZQ, Zheng YG. Enzymatic production of ethyl (*R*) -4-cyano-3-hydroxybutyrate by a high substrate concentration tolerable halohydrin dehalogenase from *Idiomarina salinarum.* In preparation

7. Wang YJ, **Xue F,** Wu YF, Xue YP, Zheng YG. Development of macrolide lactone antibiotic brefeldin A fermentation process with *Eupenicillium brefeldianum* ZJB082702[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 114(3): 262-267.

8. Wang YJ, Wu YF, **Xue F,** Wu ZX, Xue YP, Zheng YG. Isolation of brefeldin A from *Eupenicillium brefeldiannum* broth using macroporous resin adsorption chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 895-896: 146-153.

9. Wan NW, Liu ZQ, **Xue F**, Huang K, Tang LJ, Zheng YG. An efficient high-throughput screening assay for rapid directed evolution of halohydrin dehalogenase for preparation ofβ-substituted alcohols[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 4019-4029.

10. Wan NW, Liu ZQ, **Xue F**, Shen ZY, Zheng YG. A one-step biocatalytic process for (*S*) -4-chloro-3-hydroxy-butyronitrile using halohydrin dehalogenase: a chiral building block for atorvastatin[J]. ChemCatChem, 2015, 7: 2446-2450.

11. Wan NW, Liu ZQ, **Xue F**, Zheng YG. A halohydrin dehalogenase-based gas chromatograph method for determination of azide and cyanide in the water[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 214: 27-32.

12. Wan NW, Liu ZQ, Huang K, Shen ZY, **Xue F**, Zheng YG, Shen YC. Synthesis of ethyl

130

(*R*) -4-cyano-3-hydroxybutyrate in high concentration using a novel halohydrin dehalogenase HHDH-PL from *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1[J]. RSC Advance, 2014, 4: 64027-64031.

13. 吴烨飞，王亚军，**薛锋**，郑裕国，沈寅初. *Eupenicillium brefeldianum* CCTCCM208113

发酵液中布雷菲德菌素A分离纯化工艺的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37（12）：

905-909.

14. 吴植献， 王亚军， 陈 玮， **薛 锋**， 万南微， 郑裕国. 新型 7-O-(芳基氨基甲酸酯) -布雷菲德菌素 A 的合成及其抗肿瘤活性[J]. 合成化学, 2015, 23(1)： 7-12.

15. 郑裕国， **薛锋**， 柳志强， 万南微， 高爱存， 沈寅初. 卤醇脱卤酶、编码基因、载体、菌株及应用[P]. CN102978193 B, 2014-07-02. （已授权）

16 郑裕国， **薛锋**， 柳志强， 邹树平， 胡忠策， 沈寅初. 环氧化物水解酶基因、编码酶、载体、工程菌及应用[P]. CN102978220 B, 2014-07-02. （已授权）

17. 柳志强， 郑裕国， **薛锋**， 王亚军， 万南微， 窦宾贤， 沈寅初. 运动替斯崔纳菌、卤醇脱卤酶、基因、载体、重组菌及其应用[P]. CN104263713A, 2014-08-29.

18. 柳志强， 郑裕国， **薛锋**， 朱杭芹， 王亚军， 沈寅初. 一种重组卤醇脱卤酶、突变体、工程菌及其应用[P]. CN201510097830.5, 2015-03-05.

19. 柳志强， 郑裕国， **薛锋**， 朱杭芹， 王亚军， 沈寅初. 重组卤醇脱卤酶、编码基因、载体、工程菌及其应用 [P]. CN201510136155.2, 2015-03-26.

20. 柳志强， 郑裕国， **薛锋**， 朱杭芹， 王亚军， 沈寅初. 一种环氧化物水解酶突变体、工程菌及其应用[P]. CN201510098037.7, 2015-03-05.

21. 郑裕国，王亚军，吴烨飞，**薛锋**，吴植献，沈寅初. 一种从发酵液中分离提取高纯度布雷菲德菌素A的方法[P]. CN201110370278.4, 2015-03-04.（已授权）

# 131

致 谢

四年多的博士研究生生涯转眼即逝，在这四年中，我憧憬过、拼博过，有过困惑也有过领悟。本论文是我这几年学习和工作的总结，是在郑裕国教授和柳志强教授共同指导和帮助下完成的。值此论文完成之际，谨对导师郑裕国教授四年来的严格要求、谆谆教诲及辛勤栽培表示最诚挚的谢意！导师严谨的科学态度、渊博的学术知识、敏锐的科学洞察力、诲人不倦的敬业精神、精益求精的工作作风为我点亮了科研道路上的启明灯；光明磊落、虚怀若谷的处世哲学更是郑老师留给我的宝贵财富。

本论文自始至终也得到了柳志强教授热情的帮助，从论文选题、实验设计、结果分析以及论文写作等方面给予了大力的支持和有益的指导和建议。柳老师渊博的专业知识、严谨的治学态度、一丝不苟的工作作风以及对待学生认真负责的态度深深地感染和激励着我，使我终生受益。

本论文的完成也得到了实验室各位老师的关心和指导。衷心地感谢王亚军、郑仁朝、薛亚平教授，邹书平副教授，徐建妙、郑建永高工，张晓健讲师的热心关心和帮助。感谢生物工程研究所其他老师在工作学习上给予的指导和帮助。

感谢生物工程研究所黎晓军、林赛君、陈翔、阮礼涛、罗希、吴哲明、万南微、黄建峰、林善、张新红、吕胜芝、徐哲、张琴、丁旭、朱杭芹、朱津、余道福、窦宾贤、胡忠良、王志才、顾凯等各位师兄弟姐妹，诸位的大力协作和帮助是完成本文的重要保障，愿我们兄弟姐妹般的情谊永存。

感谢家人对我学习和生活的关心、理解与支持，感谢他们的无私奉献，是他们给了我前进的动力！值此论文完成之际，谨向所有给予我关心和帮助的亲人和朋友致以最诚挚的感谢！

最后，向参加本论文评阅和答辩的专家、教授致以最诚挚的谢意！

薛 锋

2015年12月于工大梦溪村

132