



黄素依赖型卤化酶及其应用研究进展

武师宇¹, 汪金秀^{2,3}, 李师翁^{1,2*}, 刘光琇^{2,3}, 张威^{2,3}

1 兰州交通大学生物与制药工程学院, 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3 中国科学院西北生态环境资源研究院, 沙漠与沙漠化重点实验室, 甘肃 兰州 730000

武师宇, 汪金秀, 李师翁, 刘光琇, 张威. 黄素依赖型卤化酶及其应用研究进展. 微生物学报, 2022, 62(8): 2938–2953.

Wu Shiyu, Wang Jinxiu, Li Shiweng, Liu Guangxiu, Zhang Wei. Flavin-dependent halogenases and their applications. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2938–2953.

摘要: 卤化物是农业、制药业和化学工业的重要原料, 主要以化学法合成, 该法具有环境不友好和合成条件苛刻等劣势。天然卤化物生物合成途径的关键酶为卤化酶, 包括卤过氧化物酶(haloperoxidase, HPO)、 α -酮戊二酸依赖型卤化酶(α -ketoglutarate dependent halogenase, KG-Hal)、S-腺苷甲硫氨酸依赖型卤化酶(S-adenosylmethionine-dependent halogenase)和黄素依赖型卤化酶(flavin-dependent halogenase, FDH)。其中, 黄素依赖型卤化酶因其分布广泛、具有底物特异性和卤化位点选择性, 是最具开发潜力的卤化酶。因此, 本文对黄素依赖型卤化酶的结构、类型、催化机制及其应用研究进展进行综述, 对利用基因分析和基因筛选方法寻找新型黄素依赖型卤化酶进行了展望。本综述有助于拓展黄素依赖型卤化酶的类型及其催化机制的知识, 推动黄素依赖型卤化酶及其酶工程的研究, 为新型卤化物的合成提供技术思路。

关键词: 卤化酶; 黄素依赖型卤化酶; 催化机制; 卤化物; 生物合成

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0121100); 甘肃省科技计划(20JR5RA548)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFE0121100) and by the Science and Technology Plan of Gansu Province (20JR5RA548)

*Corresponding author. E-mail: Lishweng@mail.lzjtu.cn

Received: 17 December 2021; Revised: 2 March 2022; Published online: 18 March 2022

Flavin-dependent halogenases and their applications

WU Shiyu¹, WANG Jinxiu^{2,3}, LI Shiweng^{1,2*}, LIU Guangxiu^{2,3}, ZHANG Wei^{2,3}

1 School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Lanzhou 730000, Gansu, China

3 Key Laboratory of Desert and Desertification, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: Halides are important raw materials in agriculture, pharmaceutical industry, and chemical industry. They are mainly synthesized with chemical methods which, however, cause environmental pollution and have strict requirement for the reaction conditions. The key enzymes for the biosynthesis of natural halides are halogenases, including haloperoxidase (HPO), α -ketoglutarate dependent halogenase (KG-Hal), S-adenosylmethionine-dependent halogenase, and flavin-dependent halogenase (FDH). Among them, FDHs are the most promising halogenases owing to their wide distribution, substrate specificity, and halogenated regioselectivity. Therefore, we reviewed the structures, types, catalytic mechanisms, and applications of FDHs and summarized the use of gene analysis and gene screening to search for new FDHs. This review is expected to expand the knowledge of the types and catalytic mechanisms of FDHs, boost the research on FDHs and related enzyme engineering, and provide technical ideas for the synthesis of new halides.

Keywords: halogenase; flavin-dependent halogenase; catalytic mechanism; halide; biosynthesis

卤化物是农业、制药业和化学工业领域重要的原料化合物^[1], 27%的小分子药物和 80%以上的农用化学品都含有卤族元素^[2](图 1^[3])。然而, 卤化物传统化学合成法存在环境不友好、反应条件苛刻、使用路易斯酸^[4]和有毒试剂^[5]等问题。此外, 化学合成法无卤化位点选择性, 会导致许多副产物产生, 合成效率低下^[1]。而酶促生物合成反应条件温和, 反应过程具高选择性和特异性, 符合生态环境建设与发展战略, 是今后努力的方向。

生物体内卤化物的合成关键酶为卤化酶。根据 NCBI 数据库的报道, 迄今为止卤化酶大部分来源于细菌, 其次为真菌和病毒, 极少部分来自原生动物、古细菌及动植物。目前, 根据卤化酶辅因子不同可将其分为 4 类: 卤过氧化物酶(haloperoxidase, HPO)、 α -酮戊二酸依赖

型卤化酶(α -ketoglutarate dependent halogenase, KG-Hal)、S-腺苷甲硫氨酸依赖型卤化酶(S-adenosylmethionine-dependent halogenase)和黄素依赖型卤化酶(flavin-dependent halogenase, FDH)^[6]。研究表明, 卤化酶(如 HPOs 和 FDHs)多采用亲电卤化机制^[7], 少数卤化酶(如 KG-Hals)采用自由基卤化机制, 而采用亲核卤化机制的卤化酶(如 S-腺苷甲硫氨酸依赖型卤化酶)最为罕见^[8-9]。因此, 相较于 KG-Hals 和 S-腺苷甲硫氨酸依赖型卤化酶而言, HPOs 和 FDHs 的研究更为全面。但是, 由于 HPOs 在催化过程中会产生游离的次卤酸(HOX, X 包括 Cl、Br 和 I), 所以其在一定程度上缺乏卤化位点选择可控性^[10]。不过, 目前已有一些研究报道了具有卤化位点选择可控性的钒依赖型卤过氧化物酶(V-HPO)^[11-12], 但所有研究都没有给出

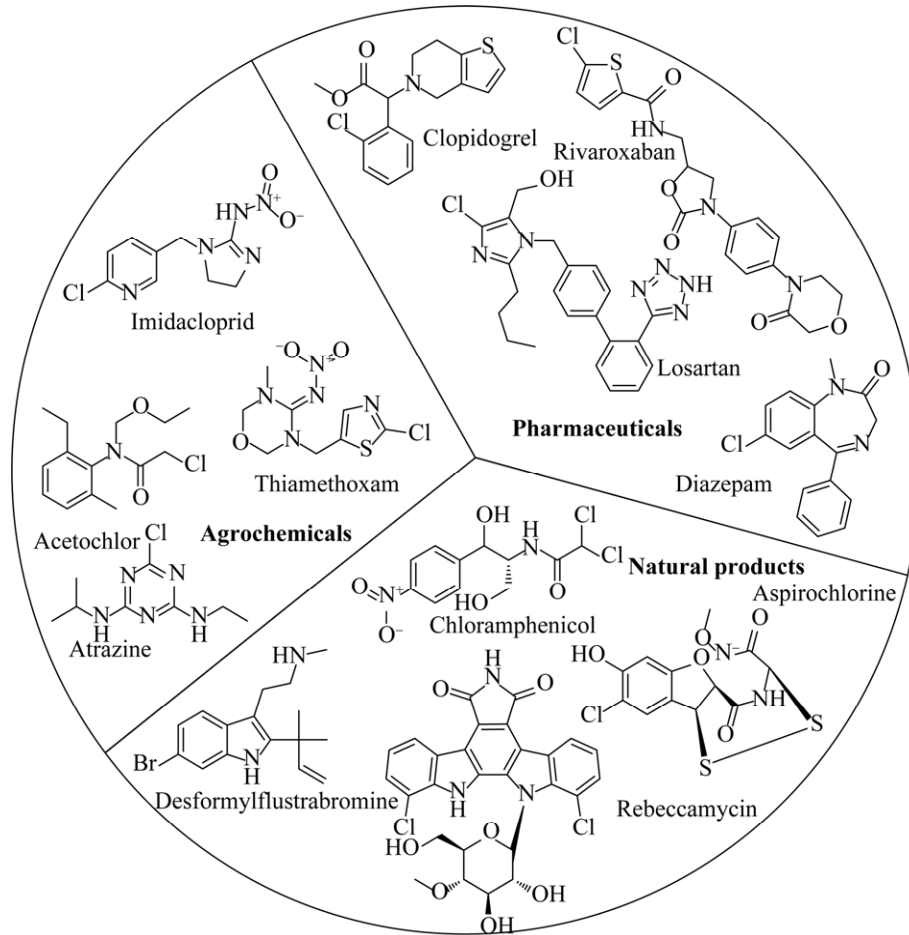


图 1 重要的农用药物、医用药物中的天然卤化产物^[3]

Figure 1 Important agrochemicals, pharmaceuticals and halogenated natural products^[3].

这种位点选择可控性的合理解释。因此，FDHs 因其分布广泛、底物特异性和卤化位点选择性更强，成为近年来该类酶的研究热点。

FDHs 属于黄素依赖型单加氧酶超家族，大多数属于双组分黄素依赖型单加氧酶系统，该系统包括黄素氧化还原酶和单加氧酶 2 种组分，其中黄素还原酶的作用是将还原的黄素提供给单加氧酶，而单加氧酶利用还原的黄素来激活分子氧^[13]。因此，大多数 FDHs 需要黄素还原酶先将黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)还原成还原性黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)后，再被分子氧氧化生成过氧黄素中间体，该中间体再与卤离子反应生成 HOX，而 HOX 必须通过酶中

一个长 10 Å 的隧道到达活性位点的保守赖氨酸残基处，并与之反应生成亲电卤化剂。最终，卤化产物由亲电卤化剂与底物反应生成(图 2A)。FDHs 催化反应的底物是富电子芳香族或烯醇基团^[14]，大多数 FDHs 在催化卤化反应过程中具有底物特异性和位点选择性，底物专一性较强，即每类 FDHs 对应催化一组底物(吡啶、吡咯、酚类和脂肪族化合物等)^[15](图 2B^[16])，只有少数 FDHs 具有宽泛的底物专一性，能够识别多种底物进行卤化反应^[17]。

近年来 FDHs 广泛应用于酶工程，同时为了提高其作为生物合成中工具酶的能力，研究者也在不断提高其稳定性并致力于拓宽其底物范围。

本文综述了 FDHs 的分类及作用机制, 并简要说明了 FDHs 在改善天然产物生物活性方面的应

用, 阐释了 FDHs 基因分析和基因筛选, 以期能够寻找更多结构新颖、生物功能独特的 FDHs。

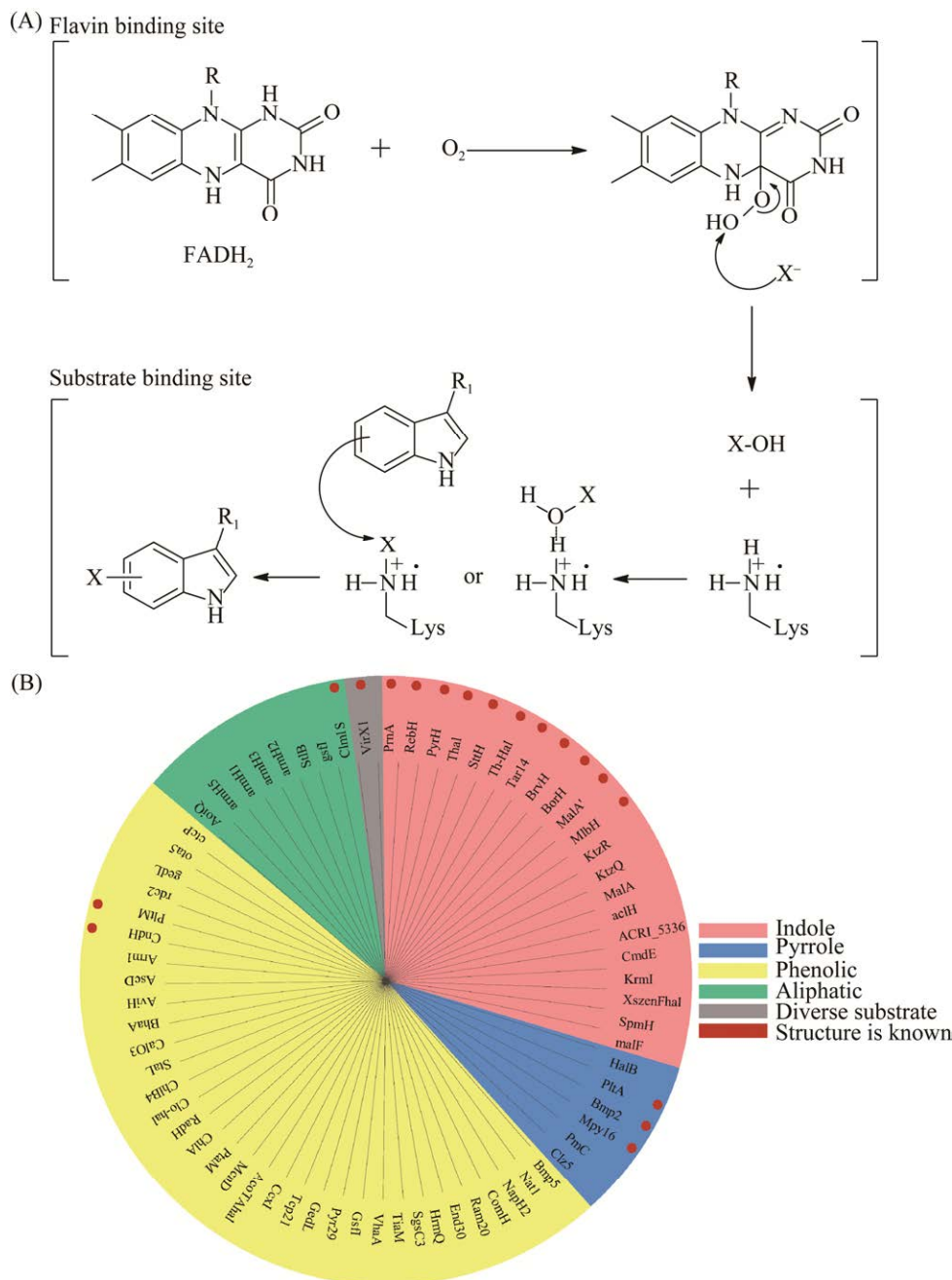


图 2 FDHs 的催化机制(A)及分类(B)^[16]

Figure 2 Catalytic mechanism (A) and classification (B) of FDHs^[16]. A: catalytic mechanisms of FDHs. FADH₂, reduced flavin adenine dinucleotide. B: the classification of FDHs which have been reviewed on the UniProt database (according to Phintha *et al.*^[13] and the updated data from UniProt database). The different colors indicate the substrate classification of FDHs (pink, indole FDHs; blue, pyrrole FDHs; yellow, phenolic FDHs; green, aliphatic FDHs; gray, FDHs that can use diverse substrates), and the red dots indicate that the 3D structure of enzyme has been reported in PDB.

1 FDHs 结构

所有 FDHs 的晶体结构都有 2 个独立结合域,即 N 端黄素结合域和 C 端底物结合域^[18](图 3A),黄素结合域保守,而底物结合域结构多样,表现出各种长度和折叠变化^[16],这也使得 FDHs 具有底物宽泛性。

1.1 黄素结合域

大部分 FDHs 的黄素结合域都有 2 个高度保守的特征序列 GxGxxG 和 WxWxIP^[15],它们是 FDHs 鉴定依据和发挥功能的重要基团。GxGxxG 协助黄素辅因子与酶结合, WxWxIP 可阻断黄素辅因子附近的底物结合,从而防止卤化酶失去催化卤化反应能力而只发挥单加氧酶作用^[19]。但研究发现并不是所有 FDHs 的黄素结合域都具有这 2 个保守序列,如 Agarwal 等^[20]在海洋交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* spp.)中发现的卤化酶 Bmp5 没有 WxWxIP 序列。此外,

GxGxxG 还负责卤离子的结合^[21]。卤离子结合位点在所有 FDHs 中都相对保守,但没有明确的保守残基与之对应,比如在荧光假单胞菌属(*Pseudomonas fluorescens*)的 PrnA 中氯离子与苏氨酸残基(T348)和甘氨酸残基(G349)的酰胺氮原子结合^[22],而 *P. fluorescens* BL915 的 PyrH 中氯离子则与苏氨酸残基(T365)结合^[21]。

1.2 底物结合域

FDHs 的多样性主要归因于其 C 端底物结合域结构多样^[16]。底物结合域可以分为催化区、 π -堆积区和骨架结合区^[23]。其中,催化区是 FDHs 的活性中心,普遍含有保守赖氨酸残基(图 3B),如白链霉菌属(*Streptomyces albogriseolus*)的 Thal 中的催化区保守赖氨酸残基为 K79^[23]、*P. fluorescens* Pf-5 的 PltA 和 PltM 中为 K73^[24]和 K87^[25],以及海洋蓝藻噬菌体 Syn10 的 VirX1 中为 K79^[17]。此外,以色氨酸(Trp)为底物的 FDHs 在其催化区还有保守谷氨酸残基(E358)^[23]。 π -堆

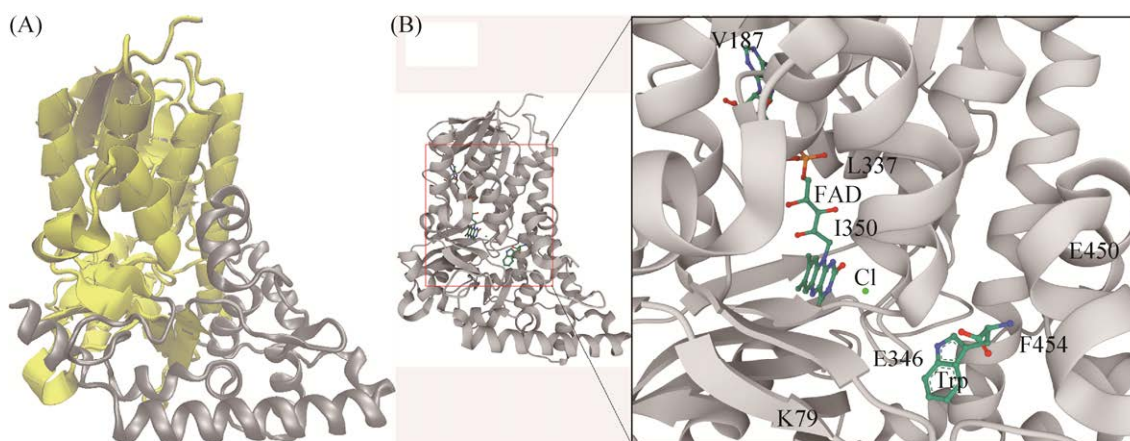


图 3 FDHs 的结构(A)和功能位点(B)示意图

Figure 3 Schematic diagram of FDHs structure (A) and functional sites (B). A: the picture shows the 3D structure of tryptophan halogenase PrnA (PDB ID: 2AQJ) with domains in different colors (FAD binding domain and substrate binding domain are colored yellow and grey respectively). B: cartoon representation of PrnA and magnification of the functional sites. The small molecules (FAD, Cl and tryptophan) binding with PrnA are depicted as spheres and sticks. The functional sites of PrnA are marked by corresponding amino acid residues and their locations. Val-187 (V187), Leu-337 (L337) and Ile-350 (I350) are the FAD binding sites. Lys-79 (K79), Glu-346 (E346), Phe-450 (F450) and Phe-454 (F454) are the L-tryptophan binding sites. K79 is the active site, which plays roles in guiding and activating HOCl.

积区的作用是固定需要结合的底物。而骨架结合区决定了 FDHs 与何种底物相结合, 其在未与底物结合的情况下构象十分多样, 如 Thal 中骨架结合区在未结合底物时部分结构松散无序^[22], 而 PltA 中皆为有序排列的二级结构^[24]。

2 FDHs 催化不同底物的机制

2.1 催化吲哚类化合物的 FDHs

该类 FDHs 大多数使用游离的吲哚类化合物(如 Trp、吲哚和前支链胺等)为底物, 少数如小双孢菌(*Microbispora* sp. ATCC PTA-5024)的 MlbH 只能以肽链中的 Trp 残基作为底物。以 Trp 为底物的 FDHs, 即 Trp 卤化酶研究最为充分^[26], 它可以催化 Trp 位点选择性卤化(图 4^[16]), 对来自 *P. fluorescens* 的 Trp 卤化酶 PrnA 催化机

制的深入研究表明, 其催化过程主要是 FADH₂ 与 O₂ 反应生成过氧黄素, 过氧黄素又与氯离子反应产生 HOCl 后, 由 HOCl 参与游离 Trp 亲电芳香取代^[22]。来自伦茨氏菌属(*Lentzea aerocolonigenes*)的 Trp 卤化酶 RebH 具有与 PrnA 类似的结构, 但其催化机制与 PrnA 不同, 其参与 Trp 亲电芳香取代的是 HOCl 与活性位点赖氨酸残基(K79)反应生成的赖氨酸氯胺^[27]。随后, 来自粗孢链霉菌属(*Streptomyces rugosporus*)的 PyrH^[21]、*S. albogriseolus* 的 ThaL^[23]、毒三素链霉菌属(*Streptomyces toxytricini*)的 SttH^[28]、黑紫色链霉菌属(*Streptomyces violaceusniger*)的 Tar14^[29]和聚球藻属(*Synechococcus elongatus* PCC 7942)的 BorH^[30]也被相继发现, 其催化机制较为相似, 只是催化 Trp 卤化位点有所不同。但是,

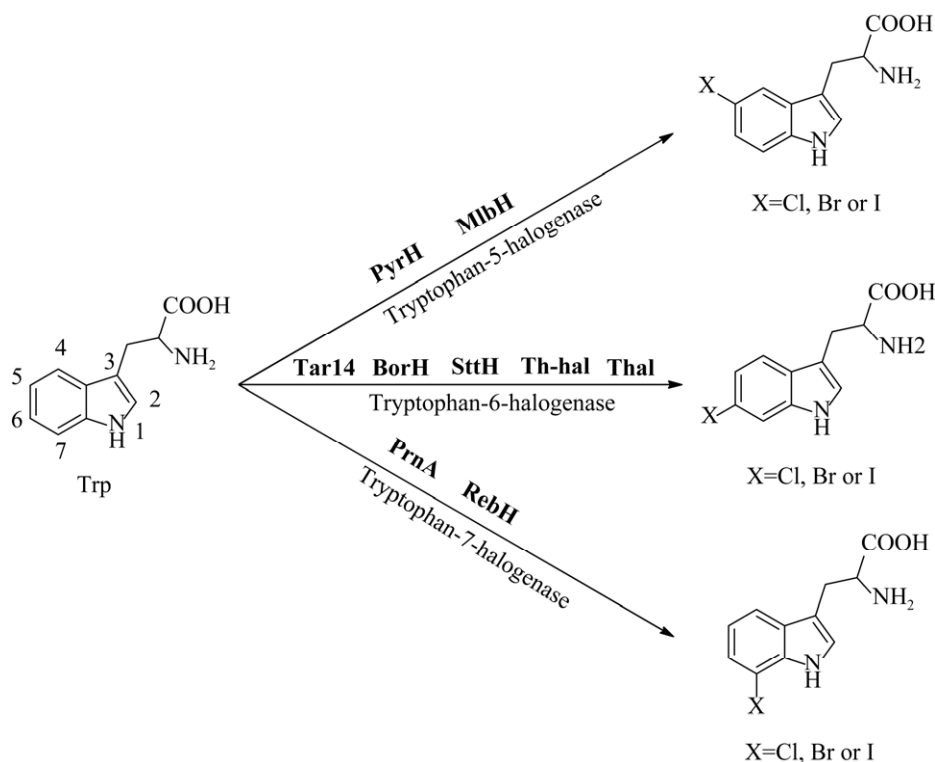


图 4 Trp 卤化酶位点选择性卤化^[16]

Figure 4 Regioselective halogenation of tryptophan halogenases^[16] (according to Phintha *et al.*^[16] and the updated data from UniProt database).

产物的卤化, 例如特布他林、非诺特罗、白藜芦醇和儿茶素等^[25]。CndH 又称为软骨绿素卤化酶, 负责软骨绿素生物合成途径中的卤化反应。目前尚无其体外酶促反应研究的相关报道, 推测其反应过程为: 第一步, CndH 的 FAD 须由两个电子还原为 FADH₂, 该过程可能依赖于 NAD(P)H 或 NAD(P)H 的某种还原酶^[38]; 第二步, O₂ 与黄素结合, 其中一个氧原子质子化, 产生亲电羟基; 第三步, 羟基与氯形成羟基氯化物, 羟基氯化物可以进入酶分子内部并到达卤化位点(K76), 而 O₂ 中未参与第二步反应的氧原子与质子形成 H₂O; 第四步, 羟基氯化物将 K76 转为氨基氯化物^[27], 随后这种氨基氯化物将芳香底物转化为 Wheland 复合体, 经去质子化形成卤化芳香产物^[22](图 6B^[36])。

2.4 催化脂肪族类化合物的 FDHs

目前唯一已知结构的脂肪族 FDH 是来自委内瑞拉链霉菌属(*Streptomyces venezuelae*)的 CmlS, 最初由 Pirace 等^[39]在氯霉素生物合成中发现, 是

少数几种可卤化烷基的酶之一。Podzelinska 等^[37]研究了 CmlS 晶体结构, 发现其 C 端为二级结构的有序排列, 且末端残基会阻止底物与活性位点结合, 这与 Buedenbender 等^[36]归纳的变体 A 类酶类似, 但其氨基酸序列又与 CndH 高度相似, 应属于变体 B 类酶。随后 Podzelinska 等^[37]对 CmlS 的底物进行推测, 由于 CmlS 的 C 端结构极大地限制了其与底物结合, 虽然氯霉素生物合成过程中涉及氨酰基中间体产生, 但是该中间体结构较大, 不能作为 CmlS 底物, 由此可以推测氯霉素合成中的卤化反应应当发生在中间体合成之前, 其底物应为简单的酰基化合物或其衍生物。此外, Pirace 等^[39]发现氯霉素生物合成操纵子编码一种 CmlK 酶, 该酶与酰基辅酶 A 合成酶具有序列同源性, 它与 CmlS 应是形成氯霉素上二氯乙酰基所必不可少的酶。因此, CmlS 可能直接卤化游离酰基(例如乙酸酯、乙酰乙酸酯或丙二酸酯)或卤化 CmlK 产生的辅酶 A 硫酯(图 7), 再经由后续酶作用最终形成氯霉素^[37]。

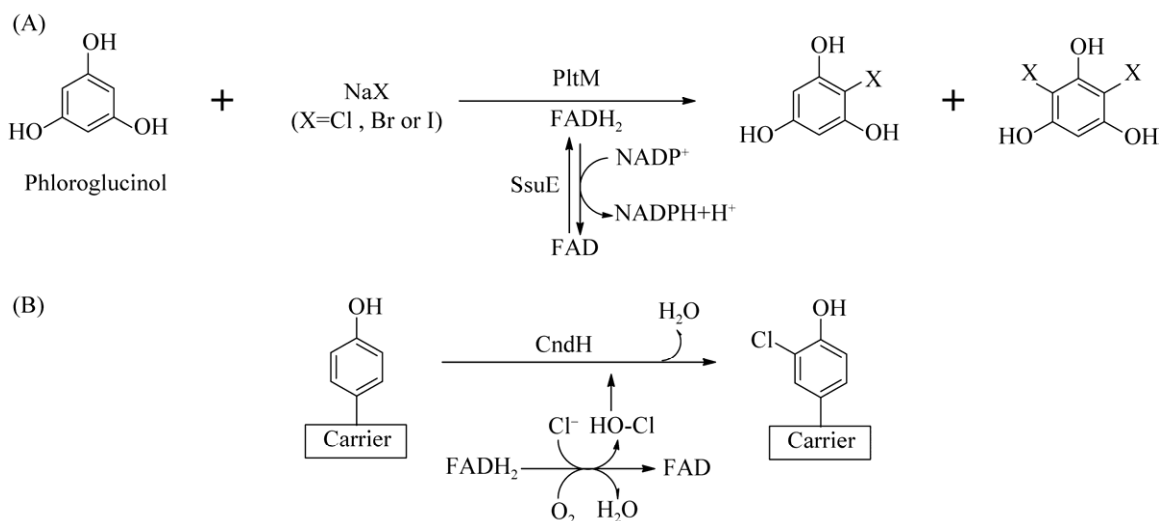


图 6 PltM 催化间苯三酚卤化(A)^[25]和 CndH 催化反应机制(B)^[36]

Figure 6 Halogenation of phloroglucinol catalyzed by PltM (A)^[25] and catalytic mechanism of CndH (B)^[36]. A: PltM catalyzes phloroglucinol to monohalotriphenol or polyhalotriphenol; B: the FAD of CndH is reduced to FADH₂ by an unknown mechanism and then modified by molecular oxygen resulting in the hydroxylation of a chloride anion bound near the flavin. The hydroxychloride produced diffuses through a tunnel to Lys-76, which facilitates halogenation. The halogenated chondrochloren precursor is most likely bound to a carrier. The structure of this precursor is not known.

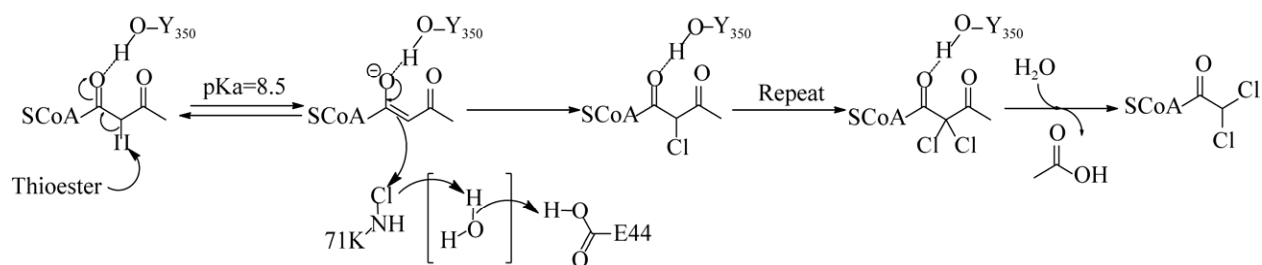


图 7 CmlS 的催化机制^[37]

Figure 7 Catalytic mechanism of CmlS^[37]. In the reaction of acetoacetyl-CoA and CmlS, Glu-44 (E44) of CmlS provides acid to neutralize the nitranion-leaving group of the chloramine intermediate ($\text{pK}_a^{\text{LG}} \approx 30$). Tyr-350 (Y350) of CmlS can stabilize enol intermediates.

2.5 催化其他化合物的 FDHs

采用生物信息学方法, Gkotsi 等^[17]在感染蓝藻的噬菌体(简称噬蓝体) Syn10 中发现了第一个能利用多种底物的卤化酶 VirX1。结构分析表明, 与典型 Trp 卤化酶相比, 其 C 端结构域没有用以关闭底物结合位点的 α -螺旋所形成的“盖”状结构, 因而其底物结合位点更为宽阔。此外, VirX1 还有一个额外的环状结构 (P432-Q442), 它通过 H 键影响黄素、底物和酶的三聚体结构, 进一步打开底物结合位点, 从而拥有更广泛的底物适应性^[17]。经过实验验证, VirX1 具有良好的溴化活性和碘化偏好性以及很强的底物宽泛性(图 8), 可以对普通化学合成方法不易碘化的底物进行碘化, 比如(聚)杂环、氮杂螺环或红菲咯啉^[17]。但是, 最近 Zhang 等^[40]发现 VirX1 表现的碘化能力可能是反应过程中产生的过氧化氢引起的化学碘化反应, 因此 VirX1 的碘化能力还有待进一步考证。目前 VirX1 催化机制并不清楚。

3 FDHs 的应用研究

卤化作用会对天然产物的生物活性产生影响, 因此, 将卤化酶引入到天然产物代谢途径中可能会改善天然产物的活性, 甚至会使一些

无生物活性的天然产物变为有活性^[41], 这为工业化生产有价值的卤化天然产物提供了可行性。目前, 对卤化酶的应用研究中 Trp 卤化酶的研究较为深入, 主要用于吲哚生物碱以及肽类抗生素的生产^[42](表 1)。

3.1 在吲哚生物碱合成中的应用

吲哚生物碱是一类含有吲哚结构的生物碱, 某些吲哚生物碱还包括异戊二烯基团, 因此被称为萜烯吲哚或赛洛甘宁色胺生物碱, 其生物化学前体多为 Trp^[43], 此外还包括吲哚和色胺等^[44]。吲哚生物碱类天然产物生物活性较好, 是药物的重要来源^[45], 但是其结构复杂, 人工合成难度较大, 因此研究者们将目光转向生物合成, 尤其是酶催化。Runguphan 等^[46]将来自 *S. rugosporus* LL-42D005 的 *PyrH* 与来自 *L. aerocolonigenes* 的 *RebH* 基因和黄素还原酶 *RebF* 基因整合到长春花(*Catharanthus roseus*) 毛状根细胞中, 产生了 5-Cl-Trp、7-Cl-Trp 以及 Br 代 Trp, 最终在细胞中经 Trp 脱羧酶以及其他反应得到可分离的卤化生物碱类似物。这项研究证明了卤化酶在有价值天然产物异源生物合成中的作用, 而这些天然产物通常具有潜在药用价值。然而, Trp 并不是许多天然吲哚生物碱的直接前体, 大约 3 000 种单萜吲哚生物碱的直接前体是色胺, 如果能在吲哚生物碱合成

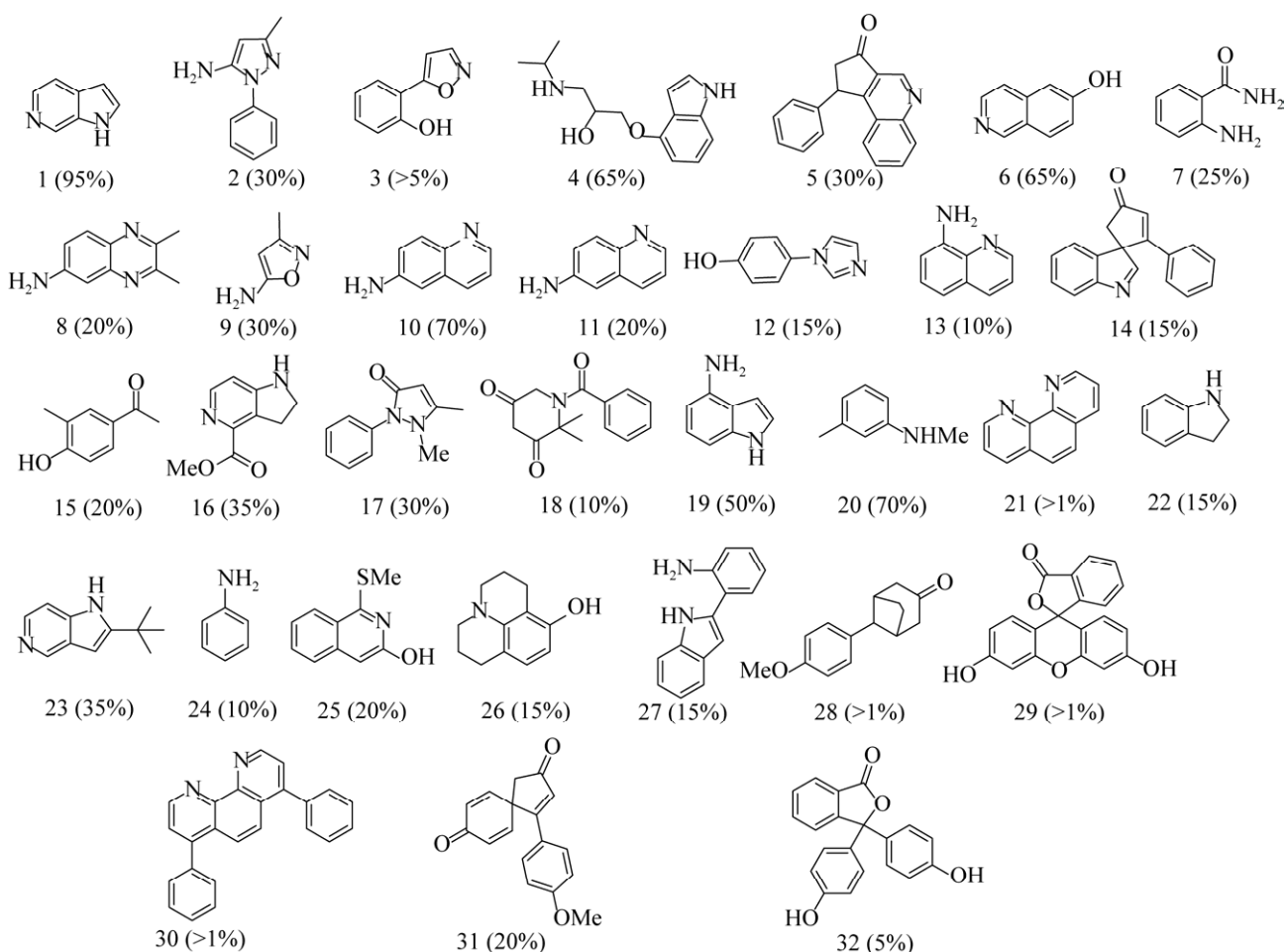


图 8 VirX1 的多种底物^[17]

Figure 8 Diverse substrate scope of VirX1^[17]. The conversion rate of the compound halogenated by VirX1 is in parentheses.

表 1 Trp 卤化酶的应用

Table 1 Applications of tryptophan halogenases

Compounds	Enzymes	References
Indole alkaloids	RebH	[46]
	RebH mutant (Y455W)	[47]
Precursor compounds of indole alkaloids (tryptophan and tryptamine)	RebH mutant (S2P/M71V/K145M/E423D/E461G/S130L/N166S/Q494R)	[48]
	RebH mutants (G112S/N470S; A442V)	[49]
	RebH mutants (I52H/L380F/F465C/N470S/Q494R/R509Q; I52M/S110P/S130L/N166S/L380F/S448P/Y455W; F465L/N470S/Q494R/R509Q; N470S)	[50]
	Bifunctional fusion enzymes (reductase RebF and halogenase RebH)	[51]
	PrnA mutant (F103A)	[52]
	PrnA mutant (E450K)	[53]
	ThaL mutant (V52I/V82I/S360T/G469S/S470N)	[23]
	ThaL mutant (S359G/K374L/I393V)	[54]
	The SttH mutant (L460F/P461E/P462T)	[28]
Peptide antibiotics	Bifunctional fusion enzymes (reductase Fre and halogenase XanH)	[55]
	PrnA	[60]

途径中绕过 Trp, 直接卤化色胺, 那么其合成效率将会大大提高^[47]。于是, Glenn 等^[47]将色胺特异性 RebH 突变体(Y455W)转化至 *C. roseus* 毛状根细胞中, 结果氯色胺的产量比使用 Trp 作为底物时增加了 3 倍, 且成功得到了卤化生物碱 12-chloro-19,20-dihydroakuammicine。

迄今为止, 已有多种 FDHs 及其突变体用于吲哚生物碱前体化合物的合成, 这为吲哚生物碱类药物工业化奠定了基础。Poor 等^[48]发现热稳定型 RebH 突变体(S2P/M71V/K145M/E423D/E461G/S130L/N166S/Q494R)可以卤化非天然底物甲基色胺和 tryptoline, 而 Payne 等^[49]发现的底物宽泛型 RebH 突变体(G112S/N470S; A442V)可以卤化三环色氨酸、大吲哚和咔唑。Andorfer 等^[50]发现 RebH 突变体(I52H/L380F/F465C/N470S/Q494R/R509Q; I52M/S110P/S130L/N166S/L380F/S448P/Y455W/F465L/N470S/Q494R/R509Q; N470S)可以定向卤化色胺的 5、6 或 7 位, 随后他们还发现了双功能融合酶系统——卤化酶 RebH 和黄素还原酶 RebF 可以增加体内 7-Cl-Trp 的产量^[51]。除 RebH 外, 来自 *P. fluorescens* 的 PrnA 和 *S. albogriseolus* 的 ThaL 也是应用于吲哚生物碱前体合成的常用酶。PrnA 突变体(F103A)可以氯化吲哚和色氨酸 2、3 和 5 位^[52], 而底物宽型 PrnA 突变体(E450K)能卤化多种苯胺, 且具有较强的卤化活性^[53]。Moritzer 等^[23]发现 ThaL 突变体(V52I/V82I/S360T/G469S/S470N)能卤化 Trp 的 6 和 7 位。Minges 等^[54]发现热稳定型 ThaL 突变体(S359G/K374L/I393V)在 25 °C 下可以高效卤化 Trp 的 6 位。此外, Shepherd 等^[28]发现来自 *S. toxytricini* 的 SttH 突变体(L460F/P461E/P462T)可以氯化 Trp 的 5 和 6 位。最近, Kong 等^[55]还发现双功能融合酶系统——来自黄灰链霉菌属(*Streptomyces flavogriseus*)的

XanH 和来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的黄素还原酶 Fre 能在体外高效卤化 Trp。2018 年 Fräbel 等^[56]在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中成功生产了一组卤化靛蓝前体, 为化石燃料资源合成提供了一种生物技术替代方案。他们将 3 种 Trp 卤化酶(RebH、SttH 和 PyrH)和细胞色素 P450 (2A6)突变体(L241C/N297Q)的基因与编码细菌 Trp 酶(TnaA)的基因相结合, 以吲哚代替 Trp 为底物, 使吲哚转化为卤代吲哚, 而卤代吲哚作为 P450 突变体的底物形成卤代吲哚氧基, 最终卤代吲哚氧基经植物糖基转移酶转化为卤代靛蓝^[56]。

虽然 FDHs 的使用使得吲哚生物碱前体化合物产量提高, 但是大部分吲哚生物碱的合成途径尚不够清晰, 许多代谢酶还未知。因此, 吲哚生物碱的生物合成研究还需进一步深入。

3.2 在肽类抗生素合成中的应用

肽类抗生素是一类广泛存在于自然界各种生物中的活性肽, 其具有抗菌、抗病毒、抗原虫、抑杀癌细胞以及调节免疫等作用, 有望成为继传统抗生素之后一类新的治疗药物^[57-58]。杀氯霉素(pacidamycin)是由天蓝淡红链霉菌(*Streptomyces coeruleorubidus* AB11383F-64)产生的一种尿嘧啶肽类抗生素, 其结构特殊, 具有较强的抗革兰氏阴性菌铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)活性^[59]。研究发现自然界并不存在天然的卤化尿嘧啶肽类抗生素, 但是 Roy 等^[60]发现杀氯霉素的合成酶对 Trp-7-卤化酶具有一定的亲和力, 于是他们将卤化酶基因 *prnA* 引入 *S. coeruleorubidus* 中, 这使得杀氯霉素的吲哚环 3 位发生氯化, 从而获得氯酸霉素(chloropacidamycin)。而氯化位点又易于发生其他取代反应, 这就便于对氯酸霉素进行进一步的改造, 使用温和的交联耦合方法即可合成结构多样的天然产物。

FDHs 卤化反应的位点选择性有助于获得所需的卤化天然产物。然而, 当底物位点选择特异性不高时, 就会导致生成不需要的卤化和未卤化化合物的混合物。因此, 还需改善 FDHs 位点选择性或控制其反应中间体转运, 增强 FDHs 合成卤化物的专一性, 以期获得更多次级代谢物的卤化类似物^[61]。

4 展望

随着时间的推移以及研究的深入, FDHs 已经成为具有开发潜力的卤化酶, 它的应用使绿色卤化合成和天然产物活性的改善成为可能。然而, FDHs 的酶工程尚在发展阶段, 依然有很多问题限制着它们的广泛应用, 这些限制因素包括: (1) 酶的热稳定性较差; (2) 酶的底物范围较窄; (3) FDHs 对卤素使用的偏好性, 如现有天然 FDHs 偏好使用 Cl 和 Br, 而能利用 I 和 F 的 FDHs 极为稀少。目前, 通过易错 PCR 可以获得热稳定性得以大大提高的卤化酶突变体, 交联酶体的构建也能够增强卤化酶的热稳定性。但是对于解决酶的底物范围较窄以及卤素使用偏好性等问题还寄希望于对已知 FDHs 的深入研究、分子改造和新型 FDHs 的发现。

目前, 大部分已知 FDHs 还缺少对它们的关键结构和催化机制的解析, 为继续深入研究已知的 FDHs, 应对以下方面予以关注: (1) 对酶、FAD 和底物三元复合体进行解析; (2) FDHs 活性中心保守赖氨酸残基的功能以及其如何与卤离子作用; (3) 卤化过程中中间体如何产生。

近年来, 宏基因组学的发展对 FDHs 进行基因分析和基因筛选, 为发现更多的 FDHs 基因资源提供了可能。以 FDHs 的 N 端保守特性设计简并引物, 直接对环境 DNA 样本进行基因筛选, 可以探索新的 FDHs。Hornung 等^[62]从 6 个以酚类或吡咯为底物的 FDHs 高度保守

区域推导出一对简并引物, 并对 550 株放线菌进行筛选, 发现 103 株菌具有潜在卤化酶基因, 随后又通过构建进化树对这些卤化酶基因进化关系进行了分析, 并对具有卤化酶基因的菌株发酵产物进行谱学分析, 最终筛得了全新的卤化物。Bayer 等^[63]通过已知序列的非 Trp 卤化酶设计了 FDHs 简并引物, 在加勒比海和地中海海绵中扩增出 36 个不同的 FDHs 基因片段, 经表达及后续分析, 发现其中 4 个 FDHs 与耐药蛋白和细菌细胞膜上的药物外排蛋白具有高度同源性。Xiang 等^[64]利用 Hornung 等^[62]设计的 FDHs 简并引物, 在土壤样本中筛选到一株具有 FDHs 基因的游动放线菌 *Actinoplanes* sp. HBDN08, 对其发酵产物进行分离并得到具有抗氧化活性和抗肿瘤活性的 3',8-dichlorogenistein 和 8-chlorogenistein。此外, 来自噬蓝体 Syn10 的具有多种底物特性的 VirX1 也是经基因筛选方法得到的^[17]。

虽然有许多研究者使用 Hornung 等^[62]设计的简并引物从自然界中找到潜在的 FDHs, 但是由于这对简并引物是基于酚类或吡咯 FDHs 序列推得的, 所以其对使用其他底物的 FDHs 的通用性和严谨程度还需考量。我们从 NCBI 数据库中选择了 19 个以吡咯、吡咯、酚类和脂肪族等为底物的 FDHs 序列(NCBI 登录号分别为: BorH: AGI62217.1; Thal: ABK79936.1; RebH: BAC15758.1; PrnA: AAB97504.1; PyrH: AAU95674.1; SttH: ADW94630.1; Tar14: AHH53512; BrvH: EDX81295.1; VirX1: AGH56623.1; MlbH: ETK34063.1; MalA: AGA37261.1; PltM: AAY92056.1; Bmp2: AKJ75108.1; CndH: CAQ43074.1; ComH: AAK81830; CalO3: AAM70353; CmlS: AAK08979.2; Mpy 16: AFP87533.1; PltA: AAD24884.1), 取前 300 个左右的氨基酸 N 段

保守序列进行比对,发现由 Hornung 等^[62]设计的这对简并引物在各类 FDHs 中具有较好的通用性和保守程度,可以用于发掘各类潜在的 FDHs,这也进一步说明了 FDHs 的 N 端保守性为筛选新的 FDHs 提供了可能。但是,对这 19 个 FDHs 氨基酸序列构建系统发育树(图 9),发现 FDHs 按类别聚集,表明不同种类底物的卤化酶序列之间存在差异,那么根据卤化酶的底物种类重新设计引物会使得筛选结果更为严谨。此外,在构建系统发育树时也追溯了酶的生境来源,发现不同生境来源的酶有聚类趋向,海洋来源的 FDHs 多为吡咯卤化酶和酚类卤化酶,土壤来源的 FDHs 多为吡咯卤化酶(图 9),我们推测这与酶的环境适应性有关。

土壤微生物是天然产物的重要来源,也是各

类 FDHs 的发掘场所,但随着对各类新药需求与日俱增,人们开始在不同生境中进行探索。目前,已经有越来越多的 FDHs 在海洋生境中经基因筛选得以发现^[32]。此外,沙漠、热泉、冰川、极地等极端环境也可能是新颖 FDHs 的来源,但目前研究相对较少,这可能与极端环境来源微生物难培养或未培养情况以及许多未知的影响因素相关。不过,生物信息学的发展为解决这些难题打开了突破口。利用 Antismash 以及 NCBI 中的蛋白分析,本实验室在分离自甘肃临泽沙漠的一株热丁香链霉菌 SPC6 (*Streptomyces thermolilacinus* SPC6)中预测到了化合物 streptochlorin 合成基因簇及其合成途径中的 FDH,经基因中断和基因敲除试验验证了推测结果,但该酶的催化机制尚待进一步研究。

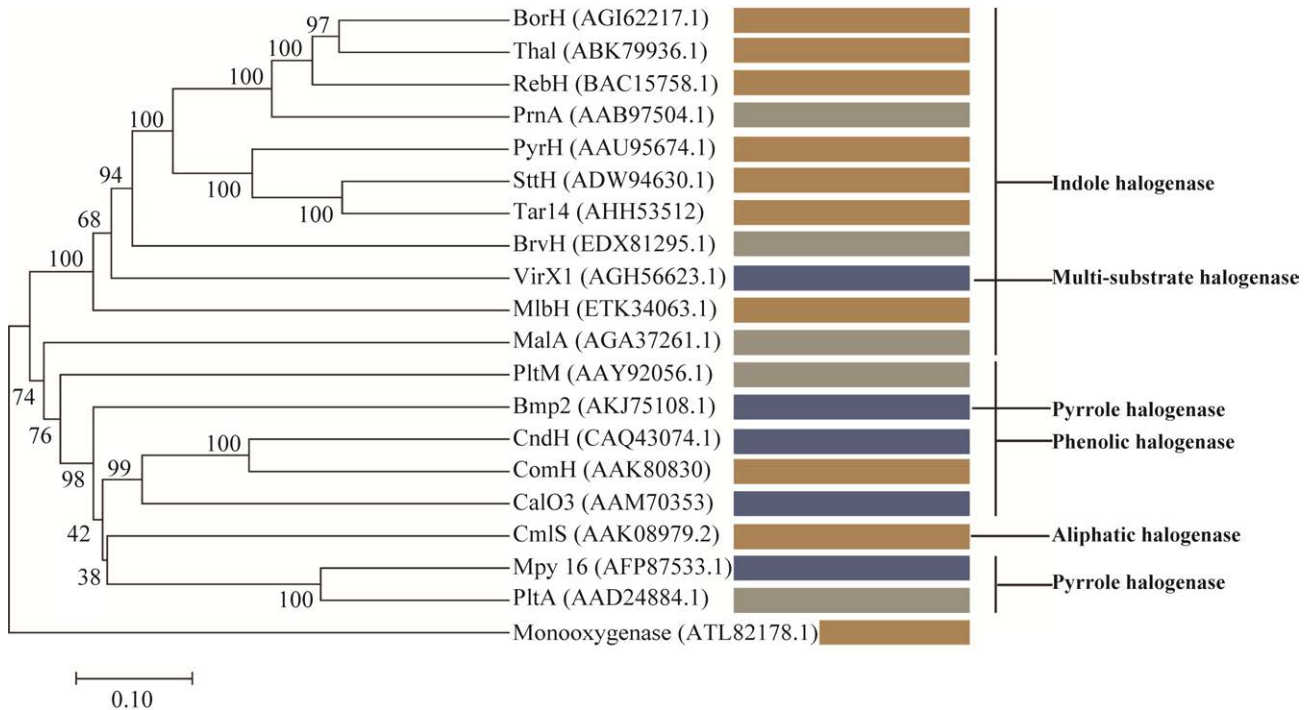


图 9 用 MEGA 7 构建的不同来源及不同类 FDHs 系统发育树

Figure 9 Phylogenetic trees of different sources and types of FDHs constructed using MEGA 7 inferred by the neighbor-joining method. The NCBI accession numbers of each FDHs is given in parentheses. The numbers at the tree branch points indicate the percent bootstrap support for 1 000 iterations. The scale represents evolutionary distance. Different colors indicate the source of the enzyme (brown: soil; blue: ocean; gray: widely available).

未来 FDHs 酶工程还需要更为深入的研究, 运用生物信息学结合传统生物化学、分子生物学以及酶学等方法, 将可以挖掘到更多新颖的 FDHs, 也有助于更全面地理解其结构和作用机制, 为 FDH 酶工程的进一步发展与应用奠定基础。

参考文献

- [1] Jeschke P. The unique role of halogen substituents in the design of modern agrochemicals. *Pest Management Science*, 2010, 66(1): 10–27.
- [2] Xu ZJ, Yang Z, Liu YT, Lu YX, Chen KX, Zhu WL. Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014, 54(1): 69–78.
- [3] Johannes B, Athena P, Rebecca B. Recent advances in flavin-dependent halogenase biocatalysis: sourcing, engineering, and application. *Catalysts*, 2019, 9(12): 1–21.
- [4] Neubauer PR, Blifernez-Klassen O, Pfaff L, Ismail M, Kruse O, Sewald N. Two novel, flavin-dependent halogenases from the bacterial consortia of *Botryococcus braunii* catalyze mono- and dibromination. *Catalysts*, 2021, 11(4): 1–20.
- [5] Phintha A, Prakinee K, Jaruwat A, Lawan N, Visitsatthawong S, Kantiwiriyanitch C, Songsungthong W, Trisrivirat D, Chenprakhon P, Mulholland A, Van Pée KH, Chitnumsub P, Chaiyen P. Dissecting the low catalytic capability of flavin-dependent halogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 1–16.
- [6] 郑哲麟, 胡文达, 何亚文. 微生物卤化酶及其应用研究进展. *微生物前沿*, 2020, 9(4): 141–155.
Zheng ZL, Hu WD, He YW. Research progress in microbial halogenases and their industrial applications. *Advances in Microbiology*, 2020, 9(4): 141–155. (in Chinese)
- [7] Gkotsi DS, Dhaliwal J, McLachlan MM, Mulholland KR, Goss RJ. Halogenases: powerful tools for biocatalysis (mechanisms applications and scope). *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 43: 119–126.
- [8] Dong C, Huang F, Deng H, Schaffrath C, Spencer JB, O'Hagan D, Naismith JH. Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme. *Nature*, 2004, 427(6974): 561–565.
- [9] Eustáquio AS, Pojer F, Noel JP, Moore BS. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(1): 69–74.
- [10] Van Pée KH, Patallo EP. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(6): 631–641.
- [11] Bernhardt P, Okino T, Winter JM, Miyanaga A, Moore BS. A stereoselective vanadium-dependent chloroperoxidase in bacterial antibiotic biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(12): 4268–4270.
- [12] Miles ZD, Diethelm S, Pepper HP, Huang DM, George JH, Moore BS. A unifying paradigm for naphthoquinone-based meroterpenoid (bio)synthesis. *Nature Chemistry*, 2017, 9(12): 1235–1242.
- [13] Agarwal V, Miles ZD, Winter JM, Eustáquio AS, El Gamal AA, Moore BS. Enzymatic halogenation and dehalogenation reactions: pervasive and mechanistically diverse. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5619–5674.
- [14] Robbins JM, Ellis HR. Investigations of two-component flavin-dependent monooxygenase systems. *Methods Enzymol*, 2019, 620: 399–422.
- [15] Latham J, Brandenburger E, Shepherd SA, Menon BRK, Micklefield J. Development of halogenase enzymes for use in synthesis. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 232–269.
- [16] Phintha A, Prakinee K, Chaiyen P. Structures, mechanisms and applications of flavin-dependent halogenases. *The Enzymes*, 2020, 47: 327–364.
- [17] Gkotsi DS, Ludewig H, Sharma SV, Connolly JA, Dhaliwal J, Wang Y, Unsworth WP, Taylor RJK, McLachlan MMW, Shanahan S, Naismith JH, Goss RJM. A marine viral halogenase that iodates diverse substrates. *Nature Chemistry*, 2019, 11(12): 1091–1097.
- [18] Ludewig H, Molyneux S, Ferrinho S, Guo K, Lynch R, Gkotsi DS, Goss RJM. Halogenases: structures and functions. *Structural Biology*, 2020, 65: 51–60.
- [19] Ismail M, Frese M, Patschkowski T, Ortseifen V, Niehaus K, Sewald N. Flavin-dependent halogenases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 prefer bromination over chlorination. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2475–2486.
- [20] Agarwal V, El Gamal AA, Yamanaka K, Poth D, Kersten RD, Schorn M, Allen EE, Moore BS. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria Vinayak. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(8): 640–647.
- [21] Zhu XF, De Laurentis W, Leang K, Herrmann J, Ihlefeld K, Van Pée KH, Naismith JH. Structural insights into regioselectivity in the enzymatic chlorination of tryptophan. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 391(1): 74–85.

- [22] Dong CJ, Flecks S, Unversucht S, Haupt C, Van Pée KH, Naismith JH. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 2005, 309(5744): 2216–2219.
- [23] Moritzer AC, Minges H, Prior T, Frese M, Sewald N, Niemann HH. Structure-based switch of regioselectivity in the flavin-dependent tryptophan 6-halogenase Thal. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(7): 2529–2542.
- [24] Pang AH, Garneau-Tsodikova S, Tsodikov OV. Crystal structure of halogenase PltA from the pyoluteorin biosynthetic pathway. *Journal of Structural Biology*, 2015, 192(3): 349–357.
- [25] Mori S, Pang AH, Thamban Chandrika N, Garneau-Tsodikova S, Tsodikov OV. Unusual substrate and halide versatility of phenolic halogenase PltM. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1–11.
- [26] Foulston LC, Bibb MJ. Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes. *PNAS*, 2010, 107(30): 13461–13466.
- [27] Yeh E, Blasiak LC, Koglin A, Drennan CL, Walsh CT. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry*, 2007, 46(5): 1284–1292.
- [28] Shepherd SA, Menon BRK, Fisk H, Struck AW, Levy C, Leys D, Micklefield J. A structure-guided switch in the regioselectivity of a tryptophan halogenase. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2016, 17(9): 821–824.
- [29] Luhavaya H, Sigrist R, Chekan JR, McKinnie SMK, Moore BS. Biosynthesis of 1-4-chlorokynurenine, an antidepressant prodrug and a non-proteinogenic amino acid found in lipopeptide antibiotics. *Angewandte Chemie International Ed in English*, 2019, 58(25): 8394–8399.
- [30] Zhang N, Chang YG, Tseng R, Ovchinnikov S, Schwarz R, LiWang A. Solution NMR structure of Se0862, a highly conserved cyanobacterial protein involved in biofilm formation. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2020, 29(11): 2274–2280.
- [31] Ortega MA, Cogan DP, Mukherjee S, Garg N, Li B, Thibodeaux GN, Maffioli SI, Donadio S, Sosio M, Escano J, Smith L, Nair SK, Van Der Donk WA. Two flavoenzymes catalyze the post-translational generation of 5-chlorotryptophan and 2-aminovinyl-cysteine during NAI-107 biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(2): 548–557.
- [32] Neubauer PR, Widmann C, Wibberg D, Schröder L, Frese M, Kottke T, Kalinowski J, Niemann HH, Sewald N. A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS One*, 2018, 13(5): 1–21.
- [33] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Howard-Jones AR. Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery. *Natural Product Reports*, 2006, 23(4): 517–531.
- [34] Gamal AE, Agarwal V, Diethelm S, Rahman I, Schorn MA, Sneed JM, Louie GV, Whalen KE, Mincer TJ, Noel JP, Paul VJ, Moore BS. Biosynthesis of coral settlement cue tetrabromopyrrole in marine bacteria by a uniquely adapted brominase-thioesterase enzyme pair. *PNAS*, 2016, 113(14): 3797–3802.
- [35] Dorrestein PC, Yeh E, Garneau-Tsodikova S, Kelleher NL, Walsh CT. Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *PNAS*, 2005, 102(39): 13843–13848.
- [36] Buedenbender S, Rachid S, Müller R, Schulz GE. Structure and action of the myxobacterial chondrochloren halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385(2): 520–530.
- [37] Podzelinska K, Latimer R, Bhattacharya A, Vining LC, Zechel DL, Jia ZC. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(1): 316–331.
- [38] Yeh E, Cole LJ, Barr EW, Bollinger JM, Ballou DP, Walsh CT. Flavin redox chemistry precedes substrate chlorination during the reaction of the flavin-dependent halogenase RebH. *Biochemistry*, 2006, 45(25): 7904–7912.
- [39] Pirace M, White RL, Vining LC. Biosynthesis of the dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation. *Microbiology*, 2004, 150(1): 85–94.
- [40] Zhang YY, Chen L, Chen HP, Huang TT, Shi Q, Wang XZ, Wang Y, Tang MC, Zhou NY, Lin SJ. Aryl C-H iodination: are there actual flavin-dependent iodinases in nature? *Science China Chemistry*, 2021, 64(10): 1730–1735.
- [41] Van Pée KH, Milbredt D, Patallo EP, Weichold V, Gajewi M. Application and modification of flavin-dependent halogenases. *Methods in Enzymology*, 2016, 575: 65–92.
- [42] Bradley SA, Zhang J, Jensen MK. Deploying microbial synthesis for halogenating and diversifying medicinal

- alkaloid scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 1–16.
- [43] Seigler DS. *Plant Secondary Metabolism*. 1rd ed. New York: Springer US, 2001: 1–14.
- [44] Wibowo JT, Ahmadi P, Rahmawati SI, Bayu A, Putra MY, Kijjoa A. Marine-derived indole alkaloids and their biological and pharmacological activities. *Marine Drugs*, 2021, 20(1): 1–39.
- [45] 杨璐, 黄荣康, 刘永祥, 程卯生. 活性天然产物合成策略: 基于色胺吡啶酰胺环化合成吲哚生物碱类天然产物. *中草药*, 2021, 52(17): 5139–5150.
- Yang L, Huang RK, Liu YX, Cheng MS. Synthetic strategies of bioactive natural products: synthesis of indole alkaloid natural products based on tandem cyclization of tryptamine-ynamides. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(17): 5139–5150. (in Chinese)
- [46] Runguphan W, Qu X, O'Connor SE. Integrating carbon-halogen bond formation into medicinal plant metabolism. *Nature*, 2010, 468(7322): 461–464.
- [47] Glenn WS, Nims E, O'Connor SE. Reengineering a tryptophan halogenase to preferentially chlorinate a direct alkaloid precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(48): 19346–19349.
- [48] Poor CB, Andorfer MC, Lewis JC. Improving the stability and catalyst lifetime of the halogenase RebH by directed evolution. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2014, 15(9): 1286–1289.
- [49] Payne JT, Poor CB, Lewis JC. Directed evolution of rebh for site-selective halogenation of large biologically active molecules. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2015, 54(14): 4226–4230.
- [50] Andorfer MC, Park HJ, Vergara-Coll J, Lewis JC. Directed evolution of RebH for catalyst-controlled halogenation of indole C-H bonds. *Chemical Science*, 2016, 7(6): 3720–3729.
- [51] Andorfer MC, Belsare KD, Girlich AM, Lewis JC. Aromatic halogenation by using bifunctional flavin reductase-halogenase fusion enzymes. *ChemBioChem*, 2017, 18(21): 2099–2103.
- [52] Lang A, Polnick S, Nicke T, William P, Patallo EP, Naismith JH, Van Pée KH. Changing the regioselectivity of the tryptophan 7-halogenase PrnA by site-directed mutagenesis. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2011, 50(13): 2951–2953.
- [53] Shepherd SA, Karthikeyan C, Latham J, Struck AW, Thompson ML, Menon BRK, Styles MQ, Levy C, Leys D, Micklefield J. Extending the biocatalytic scope of regiocomplementary flavin-dependent halogenase enzymes. *Chemical Science*, 2015, 6(6): 3454–3460.
- [54] Minges H, Schnepel C, Böttcher D, Weiß MS, Sproß J, Bornscheuer UT, Sewald N. Targeted enzyme engineering unveiled unexpected patterns of halogenase stabilization. *ChemCatChem*, 2020, 12(3): 818–831.
- [55] Kong LX, Wang Q, Deng ZX, You DL. Flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase XanH and engineering of multifunctional fusion halogenases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(18): 1–14.
- [56] Fräbel S, Wagner B, Krischke M, Schmidts V, Thiele CM, Staniek A, Warzecha H. Engineering of new-to-nature halogenated indigo precursors in plants. *Metabolic Engineering*, 2018, 46: 20–27.
- [57] Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(6): 1317–1323.
- [58] Lei J, Sun LC, Huang SY, Zhu CH, Li P, He J, MacKey V, Coy DH, He QY. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(7): 3919–3931.
- [59] Karwowski JP, Jackson M, Theriault RJ, Chen RH, Barlow GJ, Maus MLPacidamycins. A novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. I. Taxonomy of the producing organism and fermentation. *Journal of Antibiotics*, 1989, 42: 506–511.
- [60] Roy AD, Grüşchow S, Cairns N, Goss RJM. Gene expression enabling synthetic diversification of natural products: chemogenetic generation of pacidamycin analogs. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(35): 12243–12245.
- [61] Schnepel C, Sewald N. Enzymatic halogenation: a timely strategy for regioselective C–H activation. *Chemistry-a European Journal*, 2017, 23(50): 12064–12086.
- [62] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohlert SE, Holzenkämpfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Süßmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *Chembiochem*, 2007, 8(7): 757–766.
- [63] Bayer K, Scheuermayer M, Fieseler L, Hentschel U. Genomic mining for novel FADHs-dependent halogenases in marine sponge-associated microbial consortia. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(1): 63–72.
- [64] Xiang WS, Zhang J, Wang JD, Jiang L, Jiang B, Xiang ZD, Wang XJ. Isolation and identification of chlorinated genistein from *Actinoplanes* sp. HBDN08 with antioxidant and antitumor activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3): 1933–1938.

(本文责编 张晓丽)