

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-028

非特异性过加氧酶 (UPO) 的研究综述

赖铭元, 韦健, 许建和, 郁惠蕾

(华东理工大学, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 未活化的C—H键选择性插入活性氧是目前有机合成面临的最具挑战性之一。真菌非特异性过加氧酶(UPO)是一类高度糖基化的硫代血红素酶,催化的反应包括正构烷烃中未活化的C—H键的羟基化、烯烃和芳烃的环氧化、含杂原子(N、S)化合物的氧化、醚裂解、N-脱烷基化、脱酰化和酚类的单电子氧化。UPO以H₂O₂为氧供体与电子受体,不需要任何辅因子,是目前最具发展潜力的氧化酶之一。然而,UPO的异源表达困难与选择性差的问题仍限制着UPO的发展。近两年,通过信号肽改造或更换的方法在UPO的异源表达方面取得了重要突破,对UPO结构功能关系的深入研究以及蛋白结构预测算法的发展也将助力UPO的分子改造,为解决UPO选择性差的问题奠定基础。本文聚焦于UPO的异源表达、选择性问题和H₂O₂原位再生,综述了UPO的最新发展以及存在的技术瓶颈,并对解决这些瓶颈问题的方案做出展望。

关键词: 非特异性过加氧酶; 未活化C—H键; 氧化反应; 异源表达; 选择性

中图分类号: Q814 **文献标志码:** A

Review of research on unspecific peroxygenases (UPOs)

LAI Mingyuan, WEI Jian, XU Jianhe, YU Huilei

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The selective insertion of oxygen species through unactivated C—H bonds is one of the most challenging tasks in organic synthesis. Fungal unspecific peroxygenases (UPOs) are a class of highly glycosylated thioheme enzymes that catalyze reactions including hydroxylation of unactivated C—H bonds in n-alkanes, epoxidation of alkenes and aromatics, oxidation of heteroatom (N, S) compounds, ether cleavage, N-dealkylation, deacylation and one-electron oxidation of phenols. As one of the most promising oxidases in synthetic chemistry, UPOs use H₂O₂ as the oxygen donor and the electron acceptor, and do not require cofactors other than heme. This paper reviews the classification and development process of UPOs, and focuses on the heterologous expression, selectivity engineering and H₂O₂ *in situ* regeneration of UPOs. Since the first discovery of UPOs from *Agrocybe aegerita* in 2004, UPOs have attracted much attention due to the advantages described above. However, the difficulties of heterologous expression and poor selectivity of UPOs still limit their development. The difficulty of heterologous expression makes it hard to

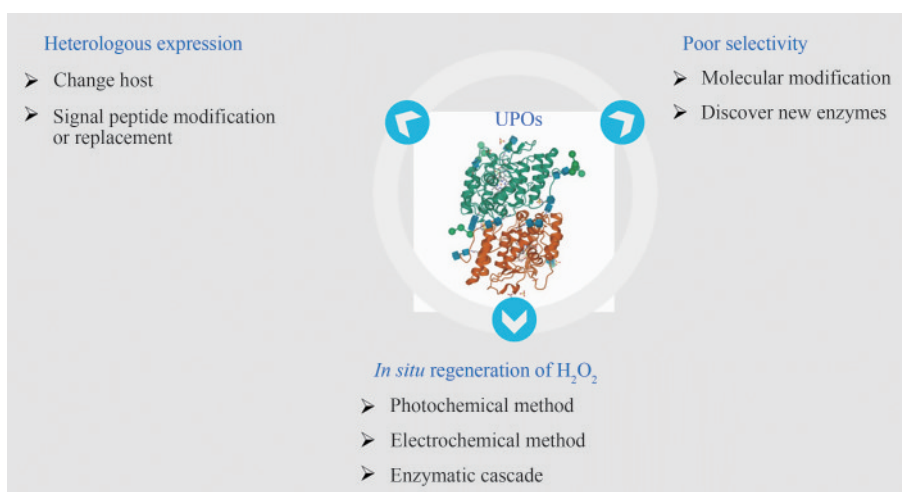
收稿日期: 2022-05-16 修回日期: 2022-07-07

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905000)

引用本文: 赖铭元, 韦健, 许建和, 郁惠蕾. 非特异性过加氧酶(UPO)的研究综述[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1235-1249

Citation: LAI Mingyuan, WEI Jian, XU Jianhe, YU Huilei. Review of research on unspecific peroxygenases (UPOs)[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1235-1249

mine new variants of UPOs, and native UPOs are difficult to be characterized and applied in biocatalysis due to the slow growth rate of their hosts. In the past two years, important breakthroughs have been made in the heterologous expression of UPOs through the modification or replacement of signal peptides, revealing the important role of signal peptides in this process. However, the specific role of signal peptides in the secretory expression and three-dimensional structure formation of UPOs remain elusive. With the in-depth research on the mechanism of signal peptides affecting the heterologous expression of UPOs and the development of artificial intelligence (AI) algorithms, the combination of genome mining and signal peptide prediction will be the key for discovering new UPOs. The poor selectivity of UPOs also hinders the development and application of UPOs. This paper reviews different types of reactions that UPOs catalyze, and reveals the problem that UPOs have broad substrate range but poor selectivity. In-depth research on the structure-function relationship of UPOs and the development of protein structure prediction algorithms will help the engineering of UPOs and lay a foundation for solving the problem of poor substrate selectivity. This paper also compares several methods for the *in situ* regeneration of H_2O_2 , and concluded that the multi-enzyme cascade method is the most economical and practical method for the *in situ* regeneration of H_2O_2 .



Keywords: unspecific peroxygenase(UPO); unactivated C—H bond; oxidation reaction; heterologous expression; selectivity

1 引言

氧化还原酶催化的氧化还原反应为绝大多数的生物提供了生长代谢所必需的能量与物质，而这些氧化还原酶也为有机合成提供了新选择。相较于以昂贵的过渡金属作为催化剂插入活性氧，酶催化反应具有立体选择性和区域选择性高、绿色环保等优点。

根据催化的反应类型以及辅因子依赖型，氧化还原酶可分为氧化酶 (EC 1.x.3.x)、过氧化物酶

(EC 1.11.1.x)、过加氧酶 (EC 1.11.2.1)、单加氧酶 (EC 1.13.12.x) 与双加氧酶 (EC 1.13.11.x、EC 1.14.11.x、EC 1.14.12.x)^[1]。这些氧化还原酶通常以血红素、黄素或者是金属离子作为辅因子，其依赖的电子受体也有所不同。氧化酶中，含铜氧化酶以 O_2 作为电子受体，黄素氧化酶以 O_2 与 Fe^{3+} 、醌等氧化剂作为电子受体；含血红素的过氧化物酶与过加氧酶以 H_2O_2 为电子受体；单加氧酶与双加氧酶以 O_2 作为电子受体 (表 1)^[2]。与过氧化物酶不同，过加氧酶以 H_2O_2 为电子受体与氧供体，

表1 氧化还原酶分类

Tab. 1 Classification of oxidoreductases (according to the webpage Enzyme Nomenclature of the NC-IUBMB <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC1/>)

名称	编号	辅因子	电子受体	催化作用
氧化酶	EC 1.x.3.x	金属离子(Cu等) 黄素	O ₂ O ₂ 、Fe ³⁺ 、醌等	将电子从底物或辅因子转移到分子氧上
过氧化物酶	EC 1.11.1.x	血红素	H ₂ O ₂	催化两个电子从底物转移到H ₂ O ₂
过加氧酶	EC 1.11.2.1	血红素	H ₂ O ₂	催化氧原子从H ₂ O ₂ 转移到底物上
单加氧酶	EC 1.13.12.x	血红素、黄素等	O ₂	催化1个氧原子从O ₂ 转移到底物中
双加氧酶	EC 1.13.11.x EC 1.14.11.x EC 1.14.12.x	黄素、金属离子等	O ₂	催化2个氧原子从O ₂ 转移到底物中

选择性地将H₂O₂上的氧加到底物上，而过氧化物酶基本不催化底物加氧反应 [例外：氯过氧化物酶 (chloride peroxidase, EC 1.11.1.10) 具有过加氧酶活性]。

选择性氧化未活化的C—H键是有机合成梦寐以求的反应之一^[3]，目前罕有化学法能实现该步骤。细胞色素P450单加氧酶(P450s)是少数能催化未活化C—H键氧化的氧化酶之一^[4-5]，但是存在着稳定性差、底物负载量低及辅因子依赖等缺点^[6]，导致其极难应用于工业生产。非特异性过加氧酶(unspecific peroxygenase, UPO)的蛋白结构与P450s相似，都含有半胱氨酸配体配位的血红素辅基，这也使得UPO与P450s的催化机制类似。与P450s相比，UPO不催化氧分子的还原活化，而是直接利用过氧化氢形成具有催化活性的氧-铁基阳离子自由基配合物，因此，UPO不需要昂贵的NAD(P)H提供还原力^[7]。总而言之，UPO理论上具有与P450s同样的催化特性，而不依赖于烟酰胺辅因子的还原力和复杂的电子传递链，因此，UPO具有很好的应用潜力。

2 UPO的发现和分类

UPO是一类高度糖基化的硫代血红素酶，归类于血红素硫酸盐过加氧酶(HTP)超家族^[8]。同亚类的还有5种酶，即髓过氧化物酶(EC 1.11.2.2, Cl⁻ + H₂O₂ + H⁺ = HClO + H₂O)^[9]、脂肪酸过加氧酶(EC 1.11.2.3, fatty acid + H₂O₂ = 3-or 2-hydroxy fatty acid + H₂O)^[10]、植物种子过加氧酶

(EC 1.11.2.4, R¹H + R²OOH = R¹OH + R²OH)^[11]、3-甲基-L-酪氨酸过加氧酶(EC 1.11.2.5, 3-methyl-L-tyrosine + H₂O₂ = 3-hydroxy-5-methyl-L-tyrosine + H₂O)^[12]和L-酪氨酸过加氧酶(EC 1.11.2.6, L-tyrosine + H₂O₂ = L-dopa + H₂O)^[13]。

2004年，Ullrich等^[14]首次于*Agrocybe aegerita* (一种食用蘑菇)中发现UPO，其表现出与氯过氧化物酶(*CfuCPO*)^[15-17]相似的催化活性，因此将其命名为卤素过加氧酶(haloperoxidase peroxygenase)^[18]。进一步研究发现该卤素过加氧酶基本无法对底物进行卤化，但是对芳香族底物具有明显的环氧化与羟化作用，因此改名为*AaeAPO* (*agrocybe aegerita* aromatic peroxygenase)^[19]。随着对其催化底物谱的测定，发现*AaeAPO*的活性并不局限于芳香族化合物，而对杂环和脂肪族底物都具有过加氧酶活性。因此，在2011年，过氧化氢依赖型单加氧酶最终被命名为非特异性过加氧酶(unspecific peroxygenase, UPO, EC 1.11.2.1.)，已发现这类酶催化的反应包括羟基化、环氧化、脱烷基化、芳构化、硫氧化、氮氧化、脱氯和卤化物氧化^[20]。

目前发现的UPO基本来源于真菌，NCBI等数据库中收录的UPO序列超过4000条。Muniba Faiza等^[21]搭建了一个在线数据库(upobase.bioinformaticsreview.com)，包含从800多个真菌基因组中挖掘的1948个过加氧酶编码蛋白序列。这个数据库提供了关于每个序列的分类和基序等信息，并具有对UPO序列分析的同源性搜索等功能。

根据UPO的蛋白质大小，目前将其分为两类：短链过加氧酶(I类)与长链过加氧酶(II类)^[22]。

短链过加氧酶平均大小在 29 kDa 左右, 长链过加氧酶平均大小在 44 kDa 左右。这两类 UPO 在活性位点上也存在差异, 短链过加氧酶以一个保守的组氨酸作为电荷稳定剂, 而在长链过加氧酶中, 作为电荷稳定剂的则是一个精氨酸。I 类和 II 类的 UPO 中分别存在 -PCP-EHD-E 和 -PCP-EGD-R-E 的保守氨基酸, 在不属于 *AaeUPO* 亚群的长链 UPO 中, 其保守序列可能有所偏差^[23]。

3 UPO 的异源表达

由于 UPO 的高度糖基化, 它们易溶于水且在水环境中相当稳定, 但同时也说明了 UPO 需要进行复杂的修饰, 其中包括糖基化、二硫键桥的形成、N 端和 C 端序列的切割以及辅基的结合^[24], 这导致异源功能性表达成为阻碍 UPO 研究和应用的瓶颈。

目前解决 UPO 异源表达问题往往需要更换合适的异源表达宿主, 或对 UPO 特别是其信号肽进行分子改造。

原核宿主并不适合 UPO 的功能性表达。Zong 等^[25]报道了 *CfuCPO* 在大肠杆菌中的表达, 发现非糖基化酶分泌到外周质中, 超过 90% 的 *CfuCPO* 为包涵体, 只有在高压下 (207 MPa) 经过冗长的重新折叠过程才能获得活性全酶, 收率仅为 5%, 这说明了恢复糖基化酶活性的难度之大。Carro 等^[26]对野生型 *MroUPO* 进行密码子优化, 使用乳糖自诱导培养基进行诱导培养, 成功在大肠杆菌中表达 *MroUPO*。Linde 等^[27-28]在大肠杆菌中异源表达来源于 *Collariella virescens* 和 *Daldinia caldariorum* 的 UPO。但是大肠杆菌无法对 UPO 进行糖基化修饰, 而糖基化对 UPO 活性影响很大, 同时还会影响 UPO 的水溶性与 pH 稳定性。*MroUPO* 去糖基化之后, 对 NBD (5-nitro-1,3-benzodioxole, 5-硝基-1,3-苯并二氧戊环) 的氧化活性下降约 80%, 而 *CgUPO* 则是对 NBD 完全失去氧化活性, *TteUPO* 和 *MthUPO* 对 NBD 的氧化活性也严重受损^[29]。所以, UPO 作为一种高度糖基化的酶, 要研究以大肠杆菌为宿主表达 UPO, 首先要研究如何恢复非糖基化 UPO 的活性。

近年来的研究主要集中于构建真菌异源表达

系统。2014 年, Molina 等^[30]通过 5 轮进化, 引入 9 个突变 (其中 5 个突变在信号肽, 其余 4 个在 UPO 蛋白), *AaeUPO* 突变进化体 PADA-I 成功在酿酒酵母中实现功能性表达, 总活性提高了 3250 倍, 并首次提出信号肽对 UPO 的异源表达至关重要。Molina 等又以毕赤酵母为表达系统成功表达了 PADA-I, 使毕赤酵母表达的 *AaeUPO* 蛋白含量从最初的 0.007 mg/L 显著提高到 217 mg/L^[31]。

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 也是较为成熟的异源表达模式菌株。与酵母相比, 米曲霉与 UPO 部分原宿主 (霉菌) 亲缘关系更加接近, 因此, 米曲霉也被尝试应用于 UPO 的异源表达。Novozymes 公司成功在米曲霉中异源表达来源于 *Coprinopsis cinerea* 的 *CciUPO*^[32-33] 和来源于 *Humicola insolens* 的 *HinUPO*^[34-35]。

可喜的是, 2021 年, Pascal Püllmann 等^[29, 36]通过更换信号肽与启动子的方法成功在酿酒酵母与毕赤酵母表达了 *TteUPO* 等 7 条 UPO。同年, Miguel Alcalde 等^[37]将 *PabUPO* 信号肽更换为 PADA-I 的信号肽, 并对 *PabUPO* 进行分子改造, 成功将 *PabUPO* 在酿酒酵母中的表达量提高至 14.1 mg/L。这些进展证明了信号肽对 UPO 的异源表达具有的重要影响, 为突破 UPO 异源表达这一瓶颈作出了重要贡献, 为 UPO 的深入研究奠定了重要基础。同时, 无细胞蛋白表达系统也为难以异源表达的 UPO 的表达提供了新选择。2022 年, Schramm 等^[38]以真菌裂解物为原料, 在无细胞体系中成功合成了野生型 *AaeUPO*。目前已成功异源表达的 UPO 见表 2。

4 UPO 的蛋白结构与催化机制解析

目前已报道的 UPO 的蛋白结构共有 3 种。2013 年, Piontek 等^[42]报道了第一个来源于 *Agrocybe aegerita* 的非特异性过加氧酶的晶体结构 (*AaeUPO*, PDB 2yor)。2016 年, 该团队解析了来源于 *Marasmius rotula* 的 *MroUPO* 的晶体结构 (PDB 5FUJ)。2021 年, Laura Rotilio 等^[40]解析了来源于 *Hypoxylon* sp. EC38 的 UPO (*HspUPO*, PDB 7o1r) 的晶体结构。

UPO 的活性位点含有半胱氨酸配体配位的血

表2 已成功异源表达的UPO

Tab. 2 UPO that have been successfully heterologously expressed

UPO	来源	异源表达宿主	方法
MroUPO	<i>M. rotula</i>	<i>E. coli</i>	原序列, 自诱导培养基 ^[26]
DcaUPO	<i>D. caldariorum</i>	<i>E. coli</i>	原序列 ^[27]
CviUPO	<i>C. virescens</i>	<i>E. coli</i>	原序列 ^[27]
HinUPO	<i>H. insolens</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	原序列 ^[34]
CciUPO	<i>C. cinerea</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	原序列 ^[32]
PviUPO	<i>P. virgatula</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	原序列 ^[34]
ThyUPO	<i>T. hyrcaniae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	原序列 ^[34]
LfuUPO	<i>C. fumago</i>	<i>Aspergillus niger</i>	原序列 ^[39]
AaeUPO (wild-type)	<i>A. aegerita</i>	无细胞	无细胞蛋白表达系统 ^[38]
AaeUPO (PADA1)	<i>A. aegerita</i>	<i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	信号肽改造 ^[30-31]
MroUPO	<i>M. rotula</i>	<i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[29]
CglUPO	<i>C. globosum</i>	<i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[29]
MthUPO	<i>M. thermophila</i>	<i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[29, 36]
TteUPO	<i>T. terrestris</i>	<i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[29, 36]
PabUPO	<i>P. aberdarensis</i>	<i>S. Cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[37]
MfeUPO	<i>M. fergusii</i>	<i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[36]
MhiUPO	<i>M. hinnulea</i>	<i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[36]
DcaUPO	<i>D. caldariorum</i>	<i>P. pastoris</i>	更换信号肽 ^[36]
HspUPO	<i>Hypoxyton sp</i>	<i>P. pastoris</i>	原序列 ^[40]
AniUPO	<i>Aspergillus niger</i>	<i>P. pastoris</i>	信号肽预测 ^[41]
CabUPO 1	<i>C. aberdarensis</i>	<i>P. pastoris</i>	信号肽预测 ^[41]
CabUPO 2	<i>C. aberdarensis</i>	<i>P. pastoris</i>	信号肽预测 ^[41]

血红素卟啉环。半胱氨酸与两个侧翼脯氨酸残基形成的高度保守序列PCP (Pro-Cys-Pro) 基序几乎存在于所有的UPO^[43], 是巯基(硫酸盐、Cys-SH)完美暴露于血红素卟啉环中铁离子的关键^[23]。而在细胞色素P450单加氧酶中, 例如Phe和Leu等疏水氨基酸取代了PCP基序^[44]。在UPO中, 镁离子与来自血红素丙酸、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)和丝氨酸(Ser)的三个羧基和一个羟基配位, 稳定了处于活性状态下的卟啉环体系^[45]。血红素上面含有一个基态的水分子, 当催化循环开始时, H₂O₂首先取代血红素上的基态水分子形成中间体(Step a, 血红素-Fe³⁺-H₂O₂, Compound 0), 再重排生成强氧化性关键中间体氧-铁阳离子自由基络合物(Step b, 血红素-Fe⁴⁺=O, Compound 1), 该中间体从底物中获取一个电子和一个质子, 生成质子化化合物氢氧化铁配合物和底物自由基(R•)(位于活性中心附近), 它们迅速重组形成羟基化产物(R-OH)-铁酶复合物

(Step c, Compound 2)。然后, 产物复合物随着羟基化产物的释放而解离, 水分子与血红素铁配位, 再次开始催化循环(Step d)(图1)^[46]。

血红素通道的结构与UPO的底物特异性、立体选择性和区域选择性相关。不同UPO的通道尺寸、几何形状和氨基酸种类可能存在很大差异。2018年, 第一个由酿酒酵母表达的AaeUPO突变进化体PADA-I的结构被解析^[47], 分辨率为1.5 Å。与野生型相比, PADA-I突变进化体有着更宽的血红素通道, 展示出不同的底物特异性。Benjumea等^[28]比较了CviUPO与同样来源于子囊菌的毛壳菌科(chactomiaceae family of ascomycetes)的CglUPO活性中心的氨基酸残基的区别及其催化脂肪酸区域选择性的差异。分别将CviUPO 88位与158位的苯丙氨酸和苏氨酸突变为与CglUPO相同的亮氨酸(F88L突变体)和苯丙氨酸(T158F突变体), 发现F88L突变体显著拓宽了CviUPO的血红素通道, 提高了油酸与亚油酸环氧化产物: 羟基化产物的比

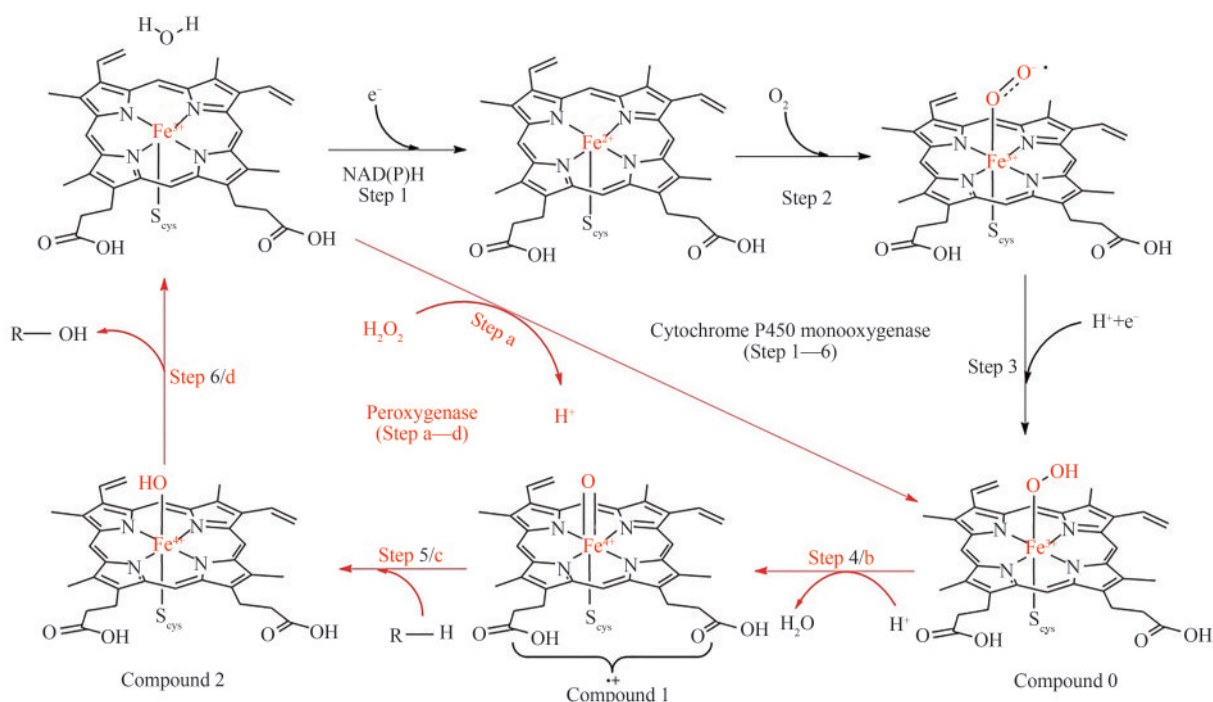


图1 硫代血红素酶的氧化机理

[细胞色素 P450 单加氧酶氧化过程包含 6 个步骤 (Step 1-6), 且需要 NAD(P)H 与 O_2 的参与。UPO 氧化机理以红色线条表示 (Step a-d), UPO 不催化分子氧的还原活化, 而是直接利用过氧化氢形成具有催化活性的氧-铁基阳离子自由基配合物, 因此不依赖于昂贵的 NAD(P)H 以及拥有更为简洁的电子传递链]

Fig. 1 Mechanism of thioheme-catalyzed oxidation

[The process of cytochrome P450 monooxygenase catalyzation consists of six steps and requires the participation of NAD(P)H and O_2 (Steps 1-6). The catalytic oxidation of UPO is indicated by red lines (Steps a-d). UPO do not catalyze the reduction and activation of molecular oxygen, but directly use hydrogen peroxide to form catalytically active ferric oxide groups, so it does not rely on the expensive NAD(P)H and has a more concise electron transport chain.]

例, 突变后比例与 *CgI*UPO 相近; 而在 158 位引入苯丙氨酸则是使通道变得更狭窄, 限制了油酸的环氧化。Carro 等^[26] 使用计算机 (adaptive-PELE 软件^[48]) 模拟脂肪酸进入 *Aae*UPO、*Cci*UPO 和 *Mro*UPO 的过程以及与活性位点的相互作用, 分析这三个 UPO 催化脂肪酸区域选择性不同的原因, 最终聚焦于血红素通道的构象。作者以 *Mro*UPO I153F/S156F 突变体实验验证了血红素通道影响 UPO 区域选择性的假设, 发现 I153F/S156F 突变体引入两个苯丙氨酸, 显著缩小了底物通道的尺寸, 可以有效阻碍底物油酸以折叠的方式进入活性中心, 而是形成更多的末端氧化产物。

5 UPO 的底物谱

UPO 可以催化的反应包括正构烷烃中未活化

的 C—H 键的羟基化、烯烃和芳烃的环氧化、含杂原子 (N、S) 化合物的氧化、乙醚裂解、*N*-脱烷基化、脱酰化和酚类的单电子氧化。目前已证明 UPO 可氧化 400 多种化合物^[46]。

5.1 烷烃和脂肪酸的氧化

未活化 C—H 键的氧化需要更高的活化能, 是目前有机合成中最具挑战性的反应之一。UPO 氧化直 (支) 链烷烃主要生成 2-羟基化与 3-羟基化产物 (图 2), 这与烷烃结构有关 [图 3(a)~(c)]^[49]; 氧化环烷烃主要生成羟基化产物, 羟基化产物往往会在 UPO 的作用下进一步过氧化生成酮, 这与所用的 UPO 种类相关。例如, *Mro*UPO 氧化环己烷生成的羟基化产物与酮的比例接近 1:1 [图 3(d)], 而 *Aae*UPO 氧化环己烷则主要生成羟基化产物, 过氧化反应并不明显^[50]。UPO 氧化脂肪族产物与底物的链长相关, *Aae*UPO 氧化 C_{20} 长链脂肪酸主要生

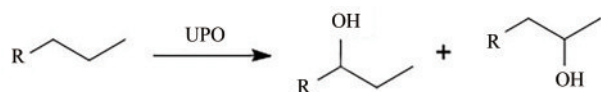


图2 UPO氧化烷烃反应通式

Fig. 2 The general formula for the oxidation of alkanes by UPO

成 $\omega 1$ 和 $\omega 2$ 羟基化产物[图3(e)]^[51], 羟化产物往往会在UPO的作用下过氧化生成相应的醛和羧酸^[33]。与AaeUPO不同, MroUPO对脂肪酸 α 位碳原子具有活性, 将其氧化为 α -羰基后发生脱羧反应缩短脂肪酸(脱去1个碳原子)[图3(f)]^[52]。2022年, Olmedo等^[53]发现AaeUPO、CciUPO同样可以催化脂肪酸碳链缩短(脱去2个碳原子)[图3(g)]。

5.2 烯烃的氧化

UPO氧化烯烃C=C双键通常会生成羟基化与环氧化两种产物(图4), 而这两种产物的比例与烯烃的结构和UPO的种类有关^[54]。碳碳双键位于C链中间时更倾向于生成环氧化产物, 而烯丙位C

原子位于C链末端时基本只生成环氧化产物[图5(a)~(c)]。顺反异构体所引起的空间位阻差异也会严重影响氧化效率, 同一条件下, AaeUPO氧化顺-2-丁烯和反-2-丁烯生成环氧化产物产率相差2倍以上^[54][图5(d)]。

5.3 芳烃的氧化

UPO对芳香族的羟基化往往会存在一个环氧化的中间体, 而后部分重排生成羟基化产物(图6、图7)^[55-57]。酚类产物会进一步在UPO的作用下过氧化生成苯氧基自由基, 而添加抗坏血酸等还原剂可以有效地避免这一副反应的发生^[56]。

5.4 含杂原子化合物的氧化

UPO还能够将H₂O₂的氧转移到有机杂原子上, 如硫原子、氮原子和溴原子(图8)。例如, 芳烃硫醚的硫原子被AaeUPO氧化, 形成相应的亚砷和砷(图9)^[58]。

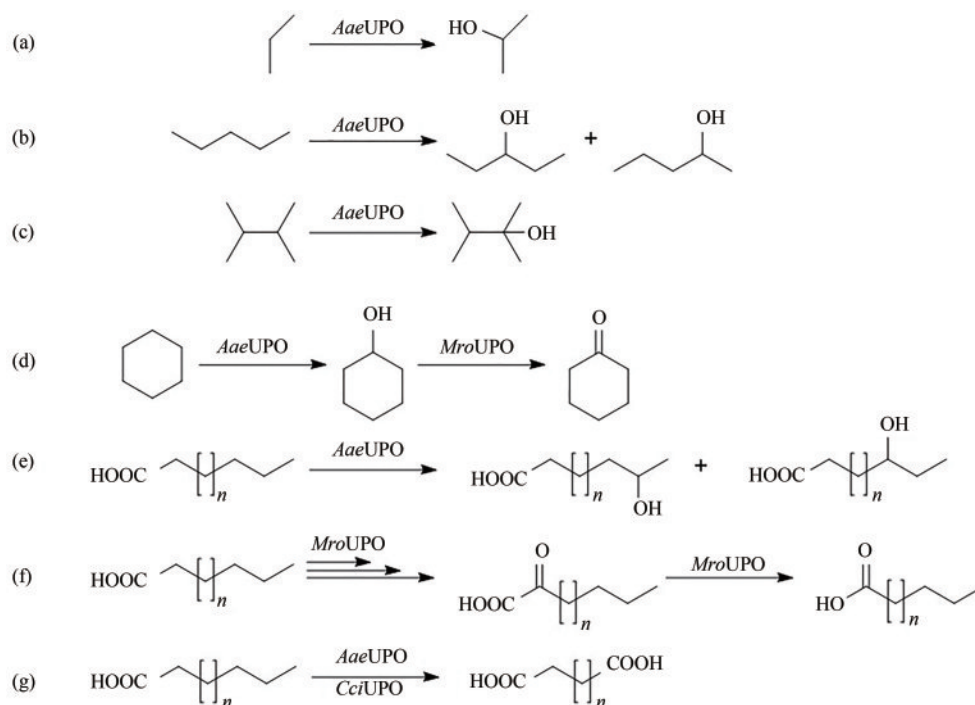


图3 UPO氧化不同烷烃与脂肪酸

(a)~(d) AaeUPO氧化直链(支链)烷烃、环烷烃; (e) AaeUPO羟基化脂肪酸; (f) MroUPO氧化脂肪酸发生脱羧反应;
(g) AaeUPO、CciUPO催化脂肪酸碳链缩短(脱去2个碳原子)

Fig. 3 Oxidation of alkanes and fatty acids by UPO

(a)~(d) AaeUPO oxidizes linear (branched) alkanes and cycloalkanes; (e) AaeUPO hydroxylates fatty acids;
(f) MroUPO oxidizes fatty acids for decarboxylation; (g) AaeUPO/CciUPO catalyze fatty acid carbon chain shortening (removal of two carbon atom)

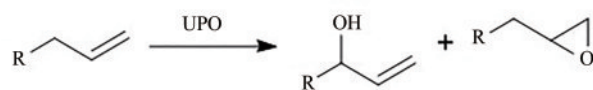


图4 UPO氧化烯烃反应通式

Fig. 4 The general formula for the oxidation of olefin by UPO

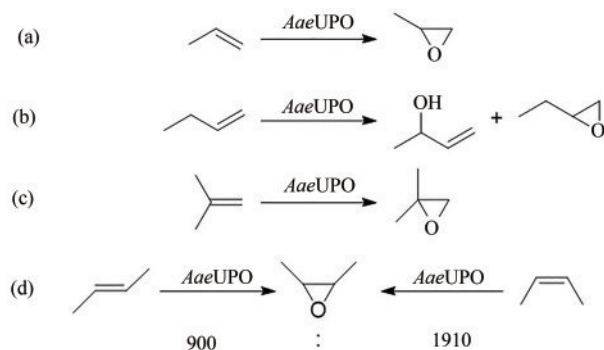


图5 UPO氧化不同烯烃

(a)~(d) *AaeUPO* 氧化不同烯烃, 烯烃结构的不同会影响羟化产物与环氧化产物的比例

Fig. 5 Oxidation of Olefins by UPO

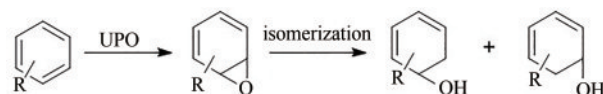
(a)~(d) *AaeUPO* oxidizes different olefins, and the difference in olefin structure will affect the ratio of hydroxylation products to epoxidation products

图6 UPO氧化芳烃反应通式

Fig. 6 General formula for the oxidation of aromatic hydrocarbons by UPO

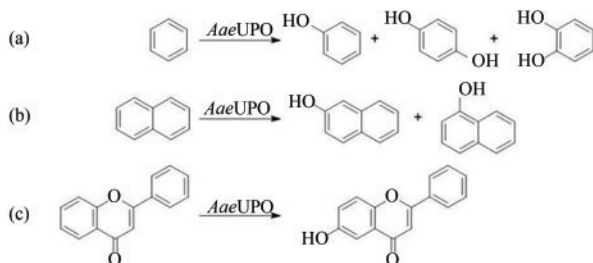


图7 UPO氧化不同芳烃化合物

(a) *AaeUPO* 氧化苯^[56]; (b) *AaeUPO* 氧化萘^[55]; (c) *AaeUPO* 氧化黄酮^[57]

Fig. 7 Oxidation of aromatic hydrocarbons by UPO

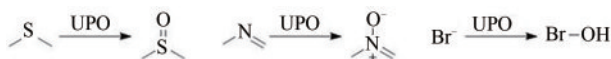
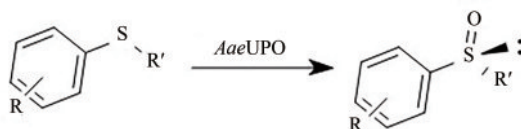
(a) *AaeUPO* oxidized benzene^[56]; (b) *AaeUPO* oxidized naphthalene^[55]; (c) *AaeUPO* oxidized flavonoids^[57]

图8 UPO氧化含S、N或Br原子的化合物

Fig. 8 Oxidation of compounds containing S, N or Br by UPO

图9 *AaeUPO* 氧化芳烃硫醚^[58]Fig. 9 Oxidation of aryl alkyl sulfides by *AaeUPO*^[58]

5.5 裂解反应

UPO催化的裂解反应包括醚和胺的C链断裂,首先生成不稳定半缩醛和半胺,分别脱去1个水分子并形成醇、酚和醛以及伯(或仲)胺和醛^[59]。四氢呋喃在*Aae*UPO作用下生成开环产物4-羟基丁醇[图10(a)]^[59],5-硝基-1,3-苯并二氧戊环(NBD)在UPO作用下脱烷基化生成甲酸和4-硝基邻苯二酚[图10(b)]^[60]。4-硝基邻苯二酚在酸性条件下呈黄色,在425 nm处有特征吸收峰,可依据构建测定UPO活性的高通量方法。*Aae*UPO在药物西地那非的*N*-甲基哌嗪环处区域选择性地催化*N*-脱烷基化[图10(c)]^[61-62]。这也可以看作是烷基羟基化的特殊反应,因为反应初始阶段在相邻的亚甲基(或甲基)上会发生羟基化反应^[63]。UPO通常会先攻击活化的C—H键,所以脱烷基化反应一般选择性较高,一般会脱去杂原子的 α 位碳原子。

5.6 UPO的选择性问题

UPO底物谱广泛,但是野生型UPO通常面临选择性差的问题。例如,CH₃—或—CH₂—基团的羟基化经常伴随着过氧化。最初形成的(手性)

醇会被进一步氧化成相应的酮、醛或羧酸^[50],UPO的过氧化能力也被用于咪喃二羧酸的合成(图11)^[64]。在活化的C—H键(苄基或烯丙基)的羟基化反应中经常产生环氧化产物^[54]。UPO的选择性同时还受底物空间位阻影响,*Aae*UPO催化的苄基C—H键羟基化具有高度的区域选择性和立体选择性,然而,立体选择性随着底物侧链位阻的增加而显著降低^[65],空间位阻影响选择性还体现在对烷烃、烯烃^[54]与脂肪酸^[26]的反应中。此外,芳烃羟基化产物苯酚往往会在UPO催化下产生苯氧自由基,并自发聚合^[66]。

目前解决UPO选择性差问题的方法主要有更换UPO种类和分子改造。底物羟基化的选择性在不同UPO之间可能会有显著差异。例如,*Aae*UPO催化维生素D选择性很差,但是*Cci*UPO催化维生素D基本只生成25位碳原子的羟基化产物^[67]。Lucas等认为是血红素通道与活性中心空腔的大小不同影响了底物的摆动自由度,最终导致选择性的不同。如前所述,血红素通道的结构、大小与UPO的底物特异性、立体选择性和区域选择性相关,目前针对UPO的选择性的分子改造也基本聚焦于血红素通道,相关案例说明也列举于前述第4部分。

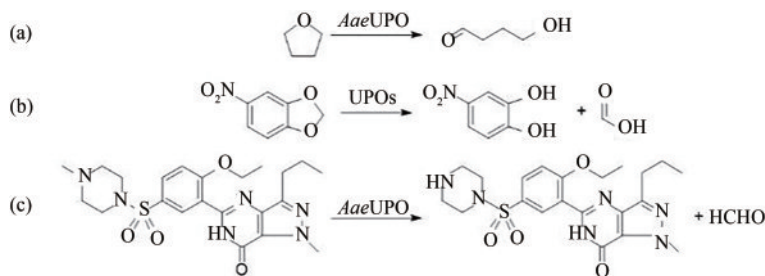


图10 UPO催化裂解反应

- (a) *Aae*UPO催化四氢呋喃发生开环反应; (b) 5-硝基-1,3-苯并二氧戊环(NBD)在UPO作用下脱烷基化生成甲酸和4-硝基邻苯二酚; (c) *Aae*UPO选择性地催化药物西地那非的*N*-甲基哌嗪环*N*-脱烷基化

Fig. 10 UPO catalyzes the cleavage reaction

- (a) *Aae*UPO catalyzed the ring-opening reaction of tetrahydrofuran; (b) 5-nitro-1,3-benzodioxole (NBD) was dealkylated under the action of UPO to form formic acid and 4-nitrocatechol; (c) *Aae*UPO selectively catalyzes the *N*-dealkylation of the *N*-methylpiperazine ring of the drug sildenafil



图11 *Aae*UPO氧化5-羟甲基糠醛(HMF)生成咪喃二羧酸(FDCA)

Fig. 11 Oxidation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Aae*UPO to 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA)

6 H₂O₂原位再生

UPO不依赖辅因子提供还原力，而是直接利用H₂O₂形成具有催化活性的氧-铁基阳离子自由基配合物。但是UPO对H₂O₂极为敏感，适量的H₂O₂可以提高UPO的催化效率，但是H₂O₂浓度过高会形成过氧铁，破坏血红素活性中心^[68]。通过H₂O₂传感器与H₂O₂补料系统结合自动补加H₂O₂似乎是一个不错的选择，但对设备要求较高。H₂O₂的原位再生是目前研究的热点，包括光化学法、电化学法和酶级联催化法等。

6.1 光化学法

光催化剂将O₂还原成H₂O₂，UPO利用H₂O₂行使氧化功能。Zhang等^[69]通过水溶性光催化剂Au-TiO₂介导的光催化水氧化反应与AaeUPO氧化反应相结合（图12），实现了烃类在可见光驱动下的氧化，但是该再生系统在时空效率方面存在不足。Willot等^[70]提出了一种基于波长互补光敏剂组合的光催化系统，通过光催化体系耦合甲酸脱氢酶

原位生成H₂O₂，然而该系统还远未达到预期适用性。Yuan等^[71]使用有机光催化剂水溶性的蒽醌磺酸盐（SAS）驱动CfuUPO催化的卤化反应和AaeUPO催化的氧化反应，但是反应混合物中存在的大部分SAS处于闲置状态。总体而言，光化学法需要昂贵的化学催化剂，而且可能对人类和环境有潜在的有害影响，同时光化学法通常涉及紫外光的使用，而紫外光对UPO并不友好^[72]。

6.2 电化学法

电化学法还原氧分子是原位再生H₂O₂最清洁的选择之一（图13）^[73]，但是需要额外的设备，价格昂贵，所以暂未广泛使用。气体扩散电极（GDEs）法是常见的用于电化学原位生成H₂O₂的方法^[74]。GDEs体系含有固、液、气三相，其优点是O₂扩散到液体界面并与催化剂接触的传质限制更少，有助于降低电位^[75]。Choi等^[76]使用单壁碳纳米管（SWNT）光电极在低电位下高效原位生成H₂O₂，以促进AaeUPO催化乙苯转化为R-1-苯乙

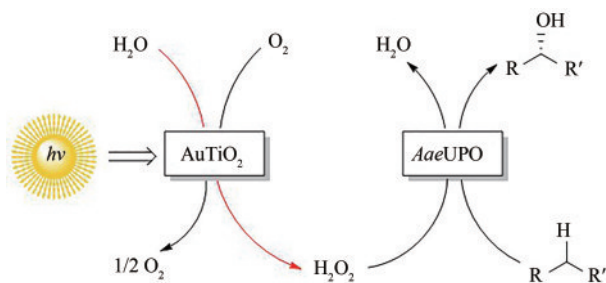


图12 Au-TiO₂介导的光催化水氧化反应原位生成H₂O₂驱动AaeUPO催化氧化反应

Fig. 12 Au-TiO₂-mediated photocatalytic water oxidation to generate H₂O₂ *in situ* for driving AaeUPO-catalyzed oxidation reaction

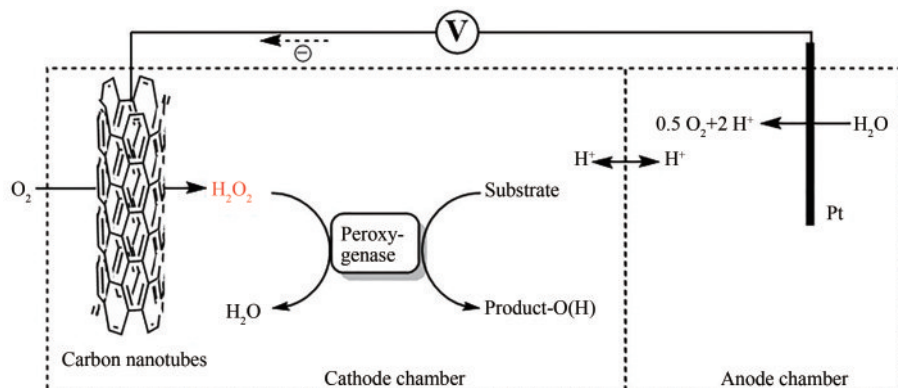


图13 电化学法原位生成H₂O₂驱动过加氧酶催化氧化反应的过程

Fig. 13 *In situ* generation of H₂O₂ by electrochemical method to drive peroxygenase-catalyzed oxidation

醇，其不需要牺牲电子供体，避免了副产物的积累。Subastian等^[77]用氧化碳纳米管(oCNTs)包覆GDE的方法原位生成 H_2O_2 ，相比于未修饰的电极，在相等的产物生成速率下，oCNTs修饰的电极可以将电位降低100 mV，但仍存在 H_2O_2 生成效率较低等问题。

6.3 酶级联催化法

酶级联催化法即通过氧化酶将 O_2 还原成 H_2O_2 ，以供给UPO进行氧化反应。葡萄糖氧化酶(GOx)系统^[78]是原位生成 H_2O_2 的典型，然而GOx系统产生的废物较多。Yan等^[79]提出了醇氧化酶(AOx)和甲醛歧化酶(FDM)的酶级联反应，该反应将甲醇过氧化为甲酸，同时生成两个当量的 H_2O_2 ，然后甲酸在甲酸脱氢酶(CbFDH)和3-羟基苯甲酸-6-羟化酶(Rj3HB6H)的作用下产生 H_2O_2 ，实现甲醇的三重氧化。该级联反应虽然无副产物的产生，但是存在步骤过多等问题。Florian等^[80]构建了甲酸氧化酶(AoFOx)-AaeUPO偶联系统原位生成 H_2O_2 (图14)，能有效催化乙苯烯丙位羟化，但仍存在着热稳定性差的问题，且最适pH在3~4之间，不利于部分底物的催化，需要进一步优化。

酶级联催化法相比于其他两种方法具有显著的优势，比如不需要光与电、减少对专用设备的需求、对环境的影响小、催化条件均一，具有广泛的应用潜力^[81]。但是酶级联催化法需要表达、纯化额外的酶，反应过程也需要进一步的优化。

7 总结与展望

UPO以其广泛的底物谱和强大的氧化能力使

其成为氧化酶中新星。UPO蛋白结构与P450s相似，理论上拥有与P450s同样的催化特性，而且UPO直接利用 H_2O_2 作为氧供体与电子受体，不依赖昂贵的辅因子且拥有更为简洁的电子传递链。Karich等^[82]研究发现UPO能够氧化40种被列为EPA(U.S. Environmental Protection Agency)重点控制污染物中的35种，包括氯苯及其衍生物、卤代联苯醚、硝基芳香族化合物、多环芳烃(PAH)和邻苯二甲酸衍生物。通过比较UPO与P450s和DIOx(双加氧酶)等氧化酶对这40种有机化合物的活性，Karich等认为UPO不仅补充了P450s对一些底物的活性，而且还可能可以在胞外催化单电子氧化，从而对木质素和腐殖质进行降解。同时，对于P450s而言，高达90%的还原当量都会在“解偶联”反应(氧困境)^[6]中损失，导致反应成本的升高与反应效率的降低，这也是阻碍P450s工业化应用的瓶颈之一。总而言之，UPO作为一种胞外分泌的硫代血红素酶，可以对P450的活性做补充，而且更加稳定、不需要昂贵的辅因子。所以，UPO有极大的潜力在有机合成领域发挥更加重要的作用。

自2004年发现第一个UPO(即AaeUPO)到2020年，UPO的研究发展较为缓慢，活性与选择性的研究基本局限于AaeUPO与MroUPO等少数几个UPO，异源表达困难与选择性差的问题始终阻碍着UPO的研究与工业化应用。而自2021年起，新型UPO的异源表达取得重大突破，成功异源表达的UPO数量呈爆发式增长，为UPO的研究提供了新酶源。这些成功异源表达的案例基本都与信号肽有关，这为今后的异源表达研究提供了重要参考价值。然而，Püllmann等^[29]虽然成功将17条

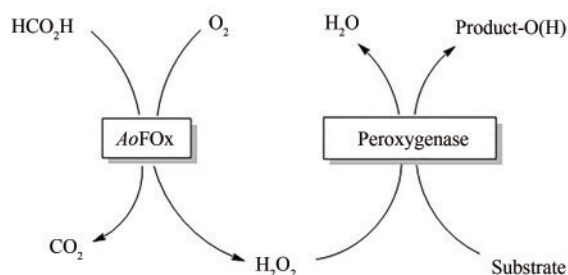


图14 甲酸氧化酶(AoFOx)-过加氧酶偶联系统原位生成 H_2O_2

Fig. 14 In situ generation of H_2O_2 by a formate oxidase (AoFOx)-peroxygenase coupled system

信号肽与8条UPO进行匹配,但遗憾的是未能找出规律,目前预测一个适合UPO异源表达的信号肽仍然具有挑战性。Püllmann等构建的模块化的“Golden Gate”系统可以对信号肽与UPO进行快速组装,基于该系统可以进一步开发信号肽-UPO高通量组装系统,从而高效地将信号肽与UPO进行匹配。而随着对信号肽影响UPO异源表达机制的深入研究,以及AI算法的发展,在数据库中挖掘新酶源与信号肽预测相结合将是发掘UPO新酶源的重要手段。

过去十年内,由于酶源的匮乏和异源表达的困难,UPO结构功能关系研究进展缓慢,已解析的蛋白晶体结构仅有*AaeUPO*、*MroUPO*、*HspUPO*和*AaeUPO*突变进化体PADA-I。随着近两年来成功异源表达UPO的突破性进展,以及AlphaFold 2^[83]等蛋白结构预测算法的发展^[84],UPO结构功能关系的解析和分子改造必将取得突破性进展,这也为UPO成为更重要的氧化酶工具奠定了基础。

UPO的H₂O₂耐受性差也是限制UPO工业化应用的瓶颈之一。通过分子改造提高UPO对H₂O₂的耐受性无疑是最好的选择,高浓度的H₂O₂可以提高UPO的催化速率。同时,H₂O₂的原位再生可以保证UPO能够持续稳定的催化反应。H₂O₂的光化学法和电化学法原位再生受限于设备与材料,成本高昂,而酶级联催化法对设备、材料、环境等因素要求低,是目前最具潜力的H₂O₂原位再生的方法。Florian等^[80]构建的甲酸氧化酶(*AoFOx*)-*AaeUPO*偶联系统可以有效的原位再生H₂O₂,驱动*AaeUPO*氧化乙苯。进一步对*AoFOx*进行定向进化可以提高其热稳定性以及改变其最适反应条件,使其与UPO的反应环境更加契合。

参 考 文 献

- [1] GYGLI G, VAN BERKEL W J H. Oxizymes for biotechnology[J]. *Current Biotechnology*, 2015, 4(2): 100-110.
- [2] MARTÍNEZ A T, RUIZ-DUEÑAS F J, CAMARERO S, et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(6): 815-831.
- [3] YAMAGUCHI J, YAMAGUCHI A D, ITAMI K. C—H bond functionalization: emerging synthetic tools for natural products and pharmaceuticals[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2012, 51(36): 8960-9009.
- [4] ZHANG R K, HUANG X Y, ARNOLD F H. Selective C-H bond functionalization with engineered heme proteins: new tools to generate complexity [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 67-75.
- [5] BATHE U, TISSIER A. Cytochrome P450 enzymes: a driving force of plant diterpene diversity[J]. *Phytochemistry*, 2019, 161: 149-162.
- [6] HOLTSMANN D, HOLLMANN F. The oxygen dilemma: a severe challenge for the application of monooxygenases? [J]. *ChemBioChem*, 2016, 17(15): 1391-1398.
- [7] WANG Y H, LAN D M, DURRANI R, et al. Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 37: 1-9.
- [8] HOFRIECHTER M, ULLRICH R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(3): 276-288.
- [9] KLEBANOFF S J. Myeloperoxidase: friend and foe[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, 77(5): 598-625.
- [10] LEE D S, YAMADA A, SUGIMOTO H, et al. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*: crystallographic, spectroscopic, and mutational studies[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 9761-9767.
- [11] HANANO A, BURCKLEN M, FLENET M, et al. Plant seed peroxxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(44): 33140-33151.
- [12] TANG M C, FU C Y, TANG G L. Characterization of SfmD as a heme peroxidase that catalyzes the regioselective hydroxylation of 3-methyltyrosine to 3-hydroxy-5-methyltyrosine in safamycin A biosynthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(7): 5112-5121.
- [13] CONNOR K L, COLABROY K L, GERRATANA B. A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(41): 8926-8936.
- [14] ULLRICH R, NÜSKE J, SCHEIBNER K, et al. Novel haloperoxidase from the *Agroclybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4575-4581.
- [15] MORRIS D R, HAGER L P. Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein[J]. *The Journal of Bi-*

- ological Chemistry, 1966, 241(8): 1763-1768.
- [16] MANOJ K M, HAGER L P. Chloroperoxidase, a janus enzyme[J]. Biochemistry, 2008, 47(9): 2997-3003.
- [17] SANFILIPPO C, NICOLOSI G. Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the oxidation of cyclic conjugated dienes[J]. Cheminform, 2003, 13(17): 1889-1892.
- [18] KLUGE M G, ULLRICH R, SCHEIBNER K, et al. Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(6): 1473-1478.
- [19] ULLRICH R, HOFRICHTER M. The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene[J]. FEBS Letters, 2005, 579(27): 6247-6250.
- [20] HOFRICHTER M, ULLRICH R. Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 19: 116-125.
- [21] FAIZA M, LAN D M, HUANG S F, et al. UPObase: an online database of unspecific peroxygenases[J]. Database-the Journal of Biological Databases and Curation, 2019, 2019(8): baz122.
- [22] KELLNER H, LUIS P, PECYNA M J, et al. Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95557.
- [23] HOFRICHTER M, KELLNER H, PECYNA M J, et al. Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome p450 properties[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015, 851: 341-368.
- [24] KENIGSBURG P, FANG G H, HAGER L P. Post-translational modifications of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987, 254(2): 409-415.
- [25] ZONG Q, OSMULSKI P A, HAGER L P. High-pressure-assisted reconstitution of recombinant chloroperoxidase[J]. Biochemistry, 1995, 34(38): 12420-12425.
- [26] CARRO J, GONZÁLEZ-BENJUMEA A, FERNÁNDEZ-FUEYO E, et al. Modulating fatty acid epoxidation vs hydroxylation in a fungal peroxygenase[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(7): 6234-6242.
- [27] LINDE D, OLMEDO A, GONZÁLEZ-BENJUMEA A, et al. Two new unspecific peroxygenases from heterologous expression of fungal genes in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(7): e02899-e02819.
- [28] GONZÁLEZ-BENJUMEA A, CARRO J, RENAU-MÍNGUEZ C, et al. Fatty acid epoxidation by *Collariella virescens* peroxygenase and heme-channel variants[J]. Catalysis Science & Technology, 2020, 10(3): 717-725.
- [29] PÜLLMANN P, KNORRSCHIEDT A, MÜNCH J, et al. A modular two yeast species secretion system for the production and preparative application of unspecific peroxygenases[J]. Communications Biology, 2021, 4: 562.
- [30] MOLINA-ESPEJA P, GARCIA-RUIZ E, GONZALEZ-PEREZ D, et al. Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(11): 3496-3507.
- [31] MOLINA-ESPEJA P, MA S, MATE D M, et al. Tandem-yeast expression system for engineering and producing unspecific peroxygenase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 73/74: 29-33.
- [32] PECYNA M, SCHNORR K M, ULLRICH R, et al. Fungal peroxygenases and methods of application. WO/2008/119780[P]. 2008-09-10.
- [33] BABOT E D, DEL RÍO J C, KALUM L, et al. Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2013, 110(9): 2323-2332.
- [34] LUND H, KALUM L, HOFRICHTER M. US Pat.,9908860B2 [P], 2018.
- [35] ARANDA C, MUNICOY M, GUALLAR V, et al. Selective synthesis of 4-hydroxyisophorone and 4-ketoisophorone by fungal peroxygenases[J]. Catalysis Science & Technology, 2019, 9(6): 1398-1405.
- [36] PÜLLMANN P, WEISSENBORN M J. Improving the heterologous production of fungal peroxygenases through an episomal pichia pastoris promoter and signal peptide shuffling system[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1360-1372.
- [37] GOMEZ DE SANTOS P, HOANG M D, KIEBIST J, et al. Functional expression of two unusual acidic peroxygenases from *Candolleomyces aberdarensis* in yeasts by adopting evolved secretion mutations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(19): e0087821.
- [38] SCHRAMM M, FRIEDRICH S, SCHMIDTKE K U, et al. Cell-free protein synthesis with fungal lysates for the rapid production of unspecific peroxygenases[J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 284.
- [39] CONESA A, VAN DE VELDE F, VAN RANTWIJK F, et al. Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(21): 17635-17640.
- [40] ROTILIO L, SWOBODA A, EBNER K, et al. Structural and biochemical studies enlighten the unspecific peroxygenase from *Hypoxylon* sp. EC38 as an efficient oxidative biocatalyst[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(18): 11511-11525.
- [41] BORMANN S, KELLNER H, HERMES J, et al. Broadening the biocatalytic toolbox-screening and expression of new un-

- specific peroxygenases[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 223.
- [42] PIONTEK K, STRITTMATTER E, ULLRICH R, et al. Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: Cytochrome P450 functionality with benefits[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(48): 34767-34776.
- [43] PECYNA M J, ULLRICH R, BITTNER B, et al. Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(5): 885-897.
- [44] LEWIS D F V, ITO Y. Cytochrome P450 structure and function: an evolutionary perspective[M]//*Issues in Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008: 3-45.
- [45] PIONTEK K, ULLRICH R, LIERS C, et al. Crystallization of a 45 kDa peroxygenase/peroxidase from the mushroom *Agrocybe aegerita* and structure determination by SAD utilizing only the haem iron[J]. *Acta Crystallographica Section F*, 2010, 66(6): 693-698.
- [46] HOFRICHTER M, KELLNER H, HERZOG R, et al. Fungal peroxygenases: a phylogenetically old superfamily of heme enzymes with promiscuity for oxygen transfer reactions[M]. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, 2020, 369-403.
- [47] RAMIREZ-ESCUADERO M, MOLINA-ESPEJA P, GOMEZ DE SANTOS P, et al. Structural insights into the substrate promiscuity of a laboratory-evolved peroxygenase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(12): 3259-3268.
- [48] LECINA D, GILABERT J F, GUALLAR V. Adaptive simulations, towards interactive protein-ligand modeling[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8466.
- [49] PETER S, KINNE M, WANG X S, et al. Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(19): 3667-3675.
- [50] PETER S, KARICH A, ULLRICH R, et al. Enzymatic one-pot conversion of cyclohexane into cyclohexanone: comparison of four fungal peroxygenases[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 103: 47-51.
- [51] GUTIÉRREZ A, BABOT E D, ULLRICH R, et al. Regioselective oxygenation of fatty acids, fatty alcohols and other aliphatic compounds by a basidiomycete heme-thiolate peroxidase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 514(1/2): 33-43.
- [52] OLMEDO A, RÍO J C D, KIEBIST J, et al. Fatty acid chain shortening by a fungal peroxygenase[J]. *Chemistry*, 2017, 23(67): 16985-16989.
- [53] OLMEDO A, ULLRICH R, HOFRICHTER M, et al. Novel fatty acid chain-shortening by fungal peroxygenases yielding 2C-shorter dicarboxylic acids[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 744.
- [54] PETER S, KINNE M, ULLRICH R, et al. Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2013, 52(6/7): 370-376.
- [55] KLUGE M, ULLRICH R, DOLGE C, et al. Hydroxylation of naphthalene by aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 81(6): 1071-1076.
- [56] KARICH A, KLUGE M, ULLRICH R, et al. Benzene oxygenation and oxidation by the peroxygenase of *Agrocybe aegerita*[J]. *AMB Express*, 2013, 3(1): 5.
- [57] BARKOVÁ K, KINNE M, ULLRICH R, et al. Regioselective hydroxylation of diverse flavonoids by an aromatic peroxygenase[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(26): 4874-4878.
- [58] BASSANINI I, FERRANDI E E, VANONI M, et al. Peroxygenase-catalyzed enantioselective sulfoxidations[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017, 2017(47): 7186-7189.
- [59] KINNE M, PORAJ-KOBIELSKA M, RALPH S A, et al. Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(43): 29343-29349.
- [60] PORAJ-KOBIELSKA M, KINNE M, ULLRICH R, et al. A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(1): 327-329.
- [61] PORAJ-KOBIELSKA M, KINNE M, ULLRICH R, et al. Preparation of human drug metabolites using fungal peroxygenases[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82(7): 789-796.
- [62] HYLAND R, ROE E G H, JONES B C, et al. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 51(3): 239-248.
- [63] ARANDA E, KINNE M, KLUGE M, et al. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(6): 1057-1066.
- [64] CARRO J, FERREIRA P, RODRÍGUEZ L, et al. 5-hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxygenase[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(16): 3218-3229.
- [65] KLUGE M, ULLRICH R, SCHEIBNER K, et al. Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxygenase of *Agrocybe aegerita*[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(2): 440-446.
- [66] ULLRICH R, HOFRICHTER M. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(3): 271-293.

- [67] LUCAS F, BABOT E D, CAÑELLAS M, et al. Molecular determinants for selective C25-hydroxylation of vitamins D₂ and D₃ by fungal peroxygenases[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2016, 6(1): 288-295.
- [68] BORMANN S, GOMEZ BARAIBAR A, NI Y, et al. Specific oxyfunctionalisations catalysed by peroxygenases: Opportunities, challenges and solutions[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2015, 5(4): 2038-2052.
- [69] ZHANG W Y, FERNÁNDEZ-FUEYO E, NI Y, et al. Selective aerobic oxidation reactions using a combination of photocatalytic water oxidation and enzymatic oxyfunctionalizations[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1(1): 55-62.
- [70] WILLOT S J P, FERNÁNDEZ-FUEYO E, TIEVES F, et al. Expanding the spectrum of light-driven peroxygenase reactions[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(2): 890-894.
- [71] YUAN B, MAHOR D, FEI Q, et al. Water-soluble anthraquinone photocatalysts enable methanol-driven enzymatic halogenation and hydroxylation reactions[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(15): 8277-8284.
- [72] WAPSHOTT-STEHLI H L, GRUNDEN A M. *In situ* H₂O₂ generation methods in the context of enzyme biocatalysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 145: 109744.
- [73] HOLTSMANN D, KRIEG T, GETREY L, et al. Electroenzymatic process to overcome enzyme instabilities[J]. *Catalysis Communications*, 2014, 51: 82-85.
- [74] GUILLET N, ROUÉ L, MARCOTTE S, et al. Electrogeneration of hydrogen peroxide in acid medium using pyrolyzed cobalt-based catalysts: Influence of the cobalt content on the electrode performance[J]. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2006, 36(8): 863-870.
- [75] SAHA M S, NISHIKI Y, FURUTA T, et al. Electrolytic synthesis of peroxyacetic acid using *in situ* generated hydrogen peroxide on gas diffusion electrodes[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2004, 151(9): D93.
- [76] CHOI D S, NI Y, FERNÁNDEZ-FUEYO E, et al. Photoelectroenzymatic oxyfunctionalization on flavin-hybridized carbon nanotube electrode platform[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(3): 1563-1567.
- [77] BORMANN S, VAN SCHIE M M C H, DE ALMEIDA T P, et al. H₂O₂ production at low overpotentials for electroenzymatic halogenation reactions[J]. *ChemSusChem*, 2019, 12(21): 4759-4763.
- [78] NGUYEN L T, YANG K L. Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2017, 100: 52-59.
- [79] NI Y, FERNÁNDEZ-FUEYO E, BARAIBAR A G, et al. Peroxygenase-catalyzed oxyfunctionalization reactions promoted by the complete oxidation of methanol[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(2): 798-801.
- [80] TIEVES F, WILLOT S J P, VAN SCHIE M M C H, et al. Formate oxidase (FO_x) from *Aspergillus oryzae*: one catalyst enables diverse H₂O₂-dependent biocatalytic oxidation reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(23): 7873-7877.
- [81] VAITHYANATHAN V K, RAVI S, LEDUC R, et al. Utilization of biosolids for glucose oxidase production: a potential bio-fenton reagent for advanced oxidation process for removal of pharmaceutically active compounds[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 271: 110995.
- [82] KARICH A, ULLRICH R, SCHEIBNER K, et al. Fungal un-specific peroxygenases oxidize the majority of organic EPA priority pollutants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1463.
- [83] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [84] 卞佳豪, 杨广宇. 人工智能辅助的蛋白质工程[J]. *合成生物学*, 2022, 3(3): 429-444.
- BIAN J H, YANG G Y. Artificial intelligence-assisted protein engineering[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(3): 429-444.



通讯作者: 郁惠蕾(1980—),女,博士,教授。研究方向为:(1)新酶基因挖掘和理性设计方法开;(2)新型萜类羟化酶的发现和分子改造;(3)非天然硫醚单加氧酶的进化和应用;(4)系统生物催化合成重要精细化学品
E-mail: huileiyu@ecust.edu.cn



第一作者: 赖铭元(1997—),男,博士研究生。研究方向为新酶挖掘与分子改造
E-mail: y30200594@mail.ecust.edu.cn