

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-091

## 卤化酶在生物催化中的应用：机制解析、定向进化和绿色制造的进展

王明鹏<sup>1,2,3</sup>, 陈蕾<sup>1,2</sup>, 赵一冉<sup>1</sup>, 张祎慙<sup>1</sup>, 郑琪帆<sup>1</sup>, 刘馨阳<sup>1</sup>, 王毅学<sup>1</sup>, 王钦宏<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> 曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273100; <sup>2</sup> 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津 300308; <sup>3</sup> 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308)

**摘要:** 有机卤化物在医药和农业领域应用广泛, 但其化学合成过程污染严重。卤化酶是实现化合物卤素修饰及功能改善的重要工具。与化学合成不同, 卤化酶可以实现有机结构特定位置的精准卤化, 并且反应条件温和, 避免了苛刻反应条件以及有毒试剂的使用, 其催化反应的过程符合绿色化学要求。本文综述了卤化酶在生物合成中的最新研究进展及其在工业生产中的潜在应用。首先, 简要回顾了卤化酶的分类、结构特征及催化机制的研究现状, 并介绍了相关领域的最新进展; 其次, 总结了近年来通过基因组挖掘、定向进化和合成生物学等技术发掘新酶资源、优化酶催化性能及扩展酶应用范围的策略; 然后探讨了工程化卤化酶在药物、农药及其他生物活性物质合成中的具体应用案例; 最后讨论了在机器学习迅速发展的背景下, 卤化酶研究的未来发展趋势。

**关键词:** 卤化酶; 生物合成; 有机卤化物; 酶工程; 定向进化

中图分类号: Q55 文献标志码: A

## Halogenases in biocatalysis: advances in mechanism elucidation, directed evolution, and green manufacturing

WANG Mingpeng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Lei<sup>1,2</sup>, ZHAO Yiran<sup>1</sup>, ZHANG Yimin<sup>1</sup>, ZHENG Qifan<sup>1</sup>, LIU Xinyang<sup>1</sup>,  
WANG Yixue<sup>1</sup>, WANG Qinrong<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273100, Shandong, China; <sup>2</sup> State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; <sup>3</sup> National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** Organic halides, which serve as critical structural motifs in pharmaceuticals, agrochemicals, and advanced materials, are typically synthesized using energy-intensive processes that involve toxic reagents and generate hazardous waste. In contrast, halogenases-nature's biocatalytic tools-catalyze regio- and stereoselective halogenation under environmentally benign conditions, offering a paradigm shift towards sustainable chemistry. This review systematically

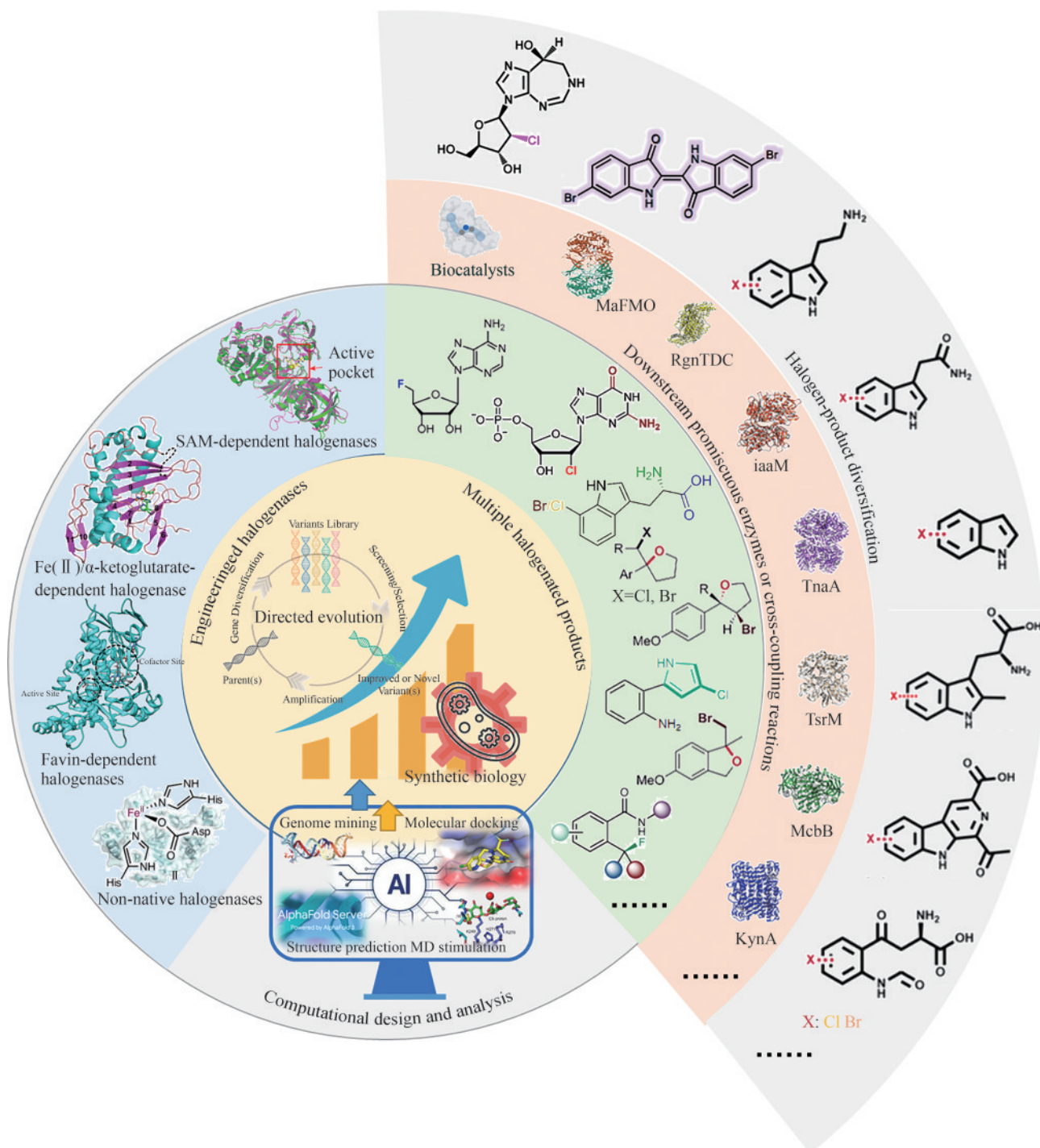
收稿日期: 2024-12-03 修回日期: 2025-04-14

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2103300, 2024YFA0918000); 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2023QC030); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2023MB039)

引用本文: 王明鹏, 陈蕾, 赵一冉, 张祎慙, 郑琪帆, 刘馨阳, 王毅学, 王钦宏. 卤化酶在生物催化中的应用: 机制解析、定向进化和绿色制造的进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 728-763

Citation: WANG Mingpeng, CHEN Lei, ZHAO Yiran, ZHANG Yimin, ZHENG Qifan, LIU Xinyang, WANG Yixue, WANG Qinrong. Halogenases in biocatalysis: advances in mechanism elucidation, directed evolution, and green manufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 728-763

consolidates recent breakthroughs in halogenase research, emphasizing mechanistic insights, engineering innovations, and scalable industrial applications. Halogenases are mechanistically classified into three major families: flavin-dependent enzymes that mediate electrophilic halogenation through transient hypohalous acid intermediates; non-heme iron/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent oxygenases that drive radical-based halogenation pathways; and *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent enzymes that facilitate rare nucleophilic halogenation. Cutting-edge structural biology techniques, enhanced by computational simulations, have elucidated dynamic substrate-enzyme interactions and transient catalytic states, facilitating the rational design of halogenases with tailored reactivity. The integration of bioinformatics tools



with high-throughput screening platforms has concurrently accelerated the discovery of novel halogenases from underexplored microbial niches, revealing unprecedented catalytic diversity. To bridge natural enzymatic capabilities with industrial demands, interdisciplinary strategies are being deployed: Directed evolution optimizes activity and stability under non-native conditions; computational protein design rebuilds substrate-binding pockets for non-canonical substrates; and synthetic biology frameworks reconstruct halogenation pathways in engineered microbial hosts. These efforts collectively expand the biocatalytic toolbox, enabling precise halogenation of complex scaffolds, including aromatic systems, aliphatic chains, and heterocycles. In industrial contexts, enzymatic halogenation is gaining traction for synthesizing high-value compounds, ranging from antibiotic derivatives and antitumor agents to crop protection molecules, while circumventing the traditional reliance on heavy metal catalysts, extreme temperatures, and halogenated solvents. Emerging applications further extend to the functionalization of biomaterials and fine chemicals, underscoring the versatility of halogenases. Future advancements will likely harness machine learning algorithms to decode sequence-activity landscapes and predict multi-enzyme cascades for tandem halogenation-functional group interconversions. Such developments are in line with global sustainability agendas, positioning halogenases as key biocatalysts in the transition towards circular chemical economies. This review highlights the convergence of enzymology, systems biology, and green chemistry in unlocking the full potential of halogenases, paving the way for next-generation biomanufacturing.

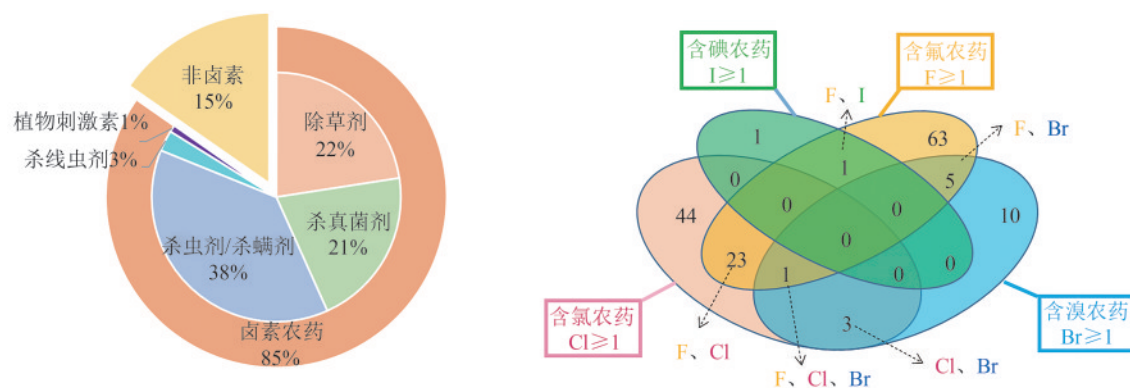
**Keywords:** halogenase; biosynthesis; organichalide; enzyme engineering; directed evolution

有机卤化物具有独特的生化活性，在农化和制药领域具有巨大的商业价值<sup>[1-4]</sup>（图1）。卤化反应也是现代药物研发中最为常见的重要手段之一<sup>[3]</sup>。卤素基团的引入可以显著改变分子的物理化学性质，包括电荷分布和空间构型等，进而影响药物分子的稳定性、亲和力及体内代谢途径，最终实现其在药效、存储和生物利用度等方面的综合改善<sup>[4-6]</sup>。然而，化学卤化反应大多依赖于有毒试剂（如溴水、氯气、*N*-溴代琥珀酰亚胺等）、贵金属催化剂（铑Rh、钯Pd、铂Pt等）和严苛的反应条件（高温、强酸、有机环境等），涉及高能耗、重污染及过量碳排放问题，与可持续发展的理念不符<sup>[7-12]</sup>。由于卤化试剂的强反应性，生产过程难以保障底物分子特定位置的精准卤化，除了目标产物外还会产生的大量副产品和废物。这就需要额外的、烦琐的分离纯化步骤，导致成本显著增加。目前，化学卤化工艺因其选择性差、环境污染重等劣势而饱受诟病，亟需开发替代工艺<sup>[13]</sup>。

目前，已发现的卤化天然产物多达10 662种（<https://dnp.chemnetbase.com/>，截止到2024年7月），其来源包括细菌、真菌、植物以及动物在

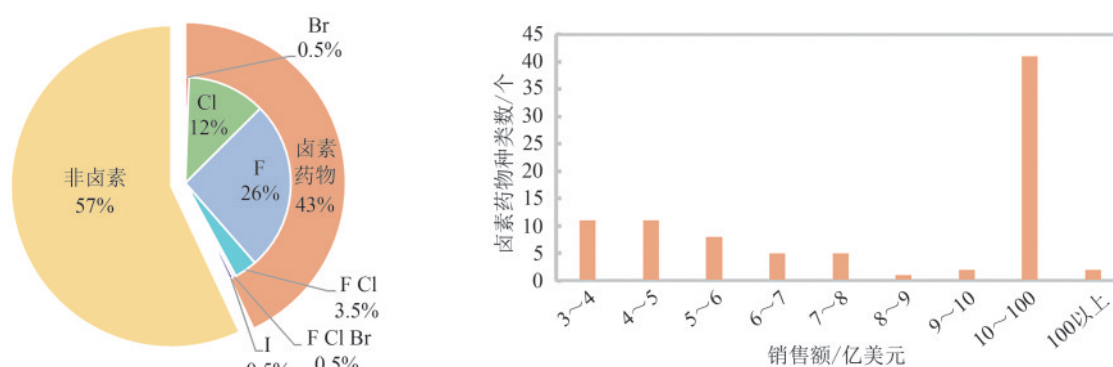
内的几乎所有生物类型。如此丰富的有机卤化物提示自然界中广泛存在生物卤化过程及其催化酶——卤化酶（halogenase）。卤化酶通过催化卤素基团与各种有机骨架（如烯烃、脂肪族、芳香环、杂环等）的特殊取代反应，在复杂分子合成的关键步骤中引入卤素，形成多种重要活性产物，例如抗生素、天然产物和激素等<sup>[14]</sup>（图2）。与化学卤化相比，酶促卤化过程具有反应温和、原子经济性高、区域和立体选择性好等潜在优势，是一种更有效、更环保的途径，也是卤化合成领域未来发展的重要趋势<sup>[1, 4, 15]</sup>。此外，卤化酶结合其他生化反应，尤其是过渡金属介导的交叉偶联反应（cross-coupling reaction），可以合成更多具有新颖结构的化合物，使得复杂有机框架的构建更加高效和灵活<sup>[4]</sup>。卤化酶靶向生成的C—X适用于分子标记、不对称合成、生物正交反应以及后期位点选择性修饰等多种场景<sup>[1, 4, 16-18]</sup>（图2）。因此，卤化酶作为一种高效、清洁的生物催化剂，可为新型生物-化学一体化合成路线提供便捷工具。

在过去的二十年里，有关卤化酶的分类鉴定、工程改造或应用开发的研究文章出现爆炸式增长。近年来，随着基因测序、蛋白质工程、计算酶学



(a) 2014—2024年已上市含卤素农药占比统计

(a) Statistics on the proportion of halogen-containing pesticides marketed from 2014 to 2024



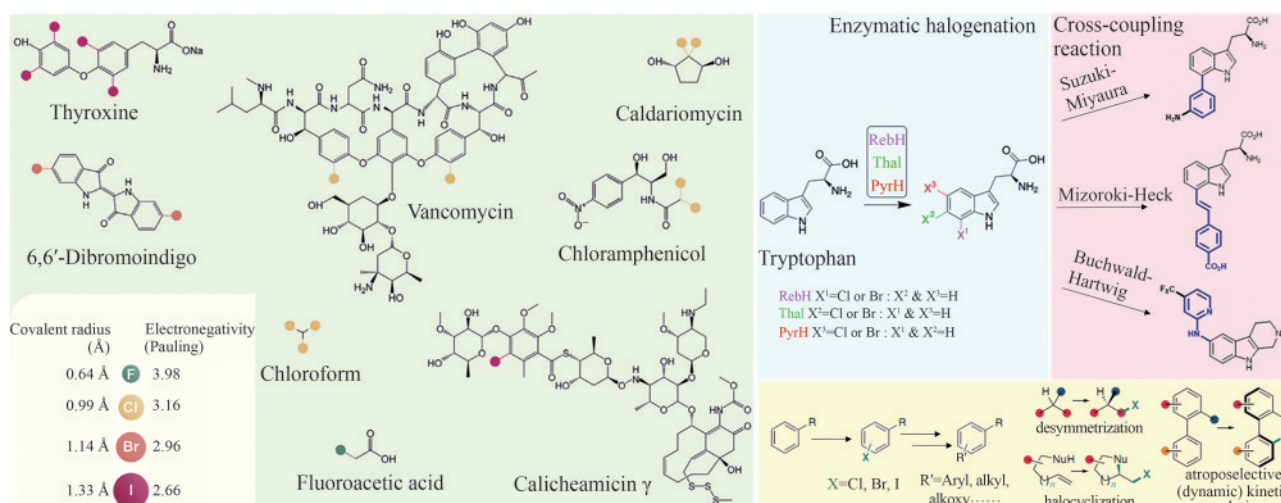
(b) 2023年销量TOP200小分子药物中卤素药物占比统计

(b) Statistics on the proportion of halogen-containing small molecule drugs among the top 200 best-selling drugs in 2023

图1 卤素是农药和医药产品中最常见和最重要的改性基团

(数据来源于 [http://www.bcpepesticidecompendium.org/index\\_new\\_frame.html](http://www.bcpepesticidecompendium.org/index_new_frame.html), <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> 以及 <https://sites.arizona.edu/njardarson-lab/top200-posters/>)

**Fig. 1** Halogens represent the most prevalent and crucial modification groups in both pesticides and pharmaceutical products (Data are obtained from [http://www.bcpepesticidecompendium.org/index\\_new\\_frame.html](http://www.bcpepesticidecompendium.org/index_new_frame.html), <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> and <https://sites.arizona.edu/njardarson-lab/top200-posters/>)

图2 卤化天然产物举例及卤化酶在合成领域中的作用<sup>[4, 12, 15-16]</sup>**Fig. 2** Examples of halogenated natural products and the role of halogenases in molecular synthesis<sup>[4,12,15-16]</sup>

(1 Å=0.1 nm)

以及合成生物技术的不断进步,人们已在卤化酶资源挖掘和性能优化方面取得了显著进展,开发了一系列极具实际生产潜力的工程卤化酶,参与多种重要的生物转化、分子合成以及制备反应。已有多篇优秀的综述<sup>[1, 4, 17-25]</sup>对卤化酶前期研究进展进行了详细归纳和总结,涉及结构基础解析,催化机制揭示,优化改造策略以及应用案例等内容,为该领域的研究者提供了重要理论指导。然而,现阶段卤化酶的相关研究仍面临诸多问题和挑战。生物卤化机制研究不够深入,酶催化过程中涉及的关键细节仍未揭示清楚,比如黄素依赖型卤化酶(flavin-dependent halogenase, FDH)的催化模式,目前存在两种假说:一种认为酶分子内部形成的次卤酸(HOX)与活性位点Lys的氨基以共价键结合形成中间体<sup>[26]</sup>;另一种认为HOX与Lys以氢键配位形成相对松散的过渡态,而不形成中间体<sup>[27]</sup>。因此,卤化酶研究仍需大量科研工作者的共同努力,在取得新成果的同时,及时总结现有问题并不断反思,以此指导未来工作,从而实现卤化酶工具的高效催化和广泛应用。此外,机器学习(machine learning, ML)、人工智能(artificial intelligence, AI)等新兴技术为卤化酶研

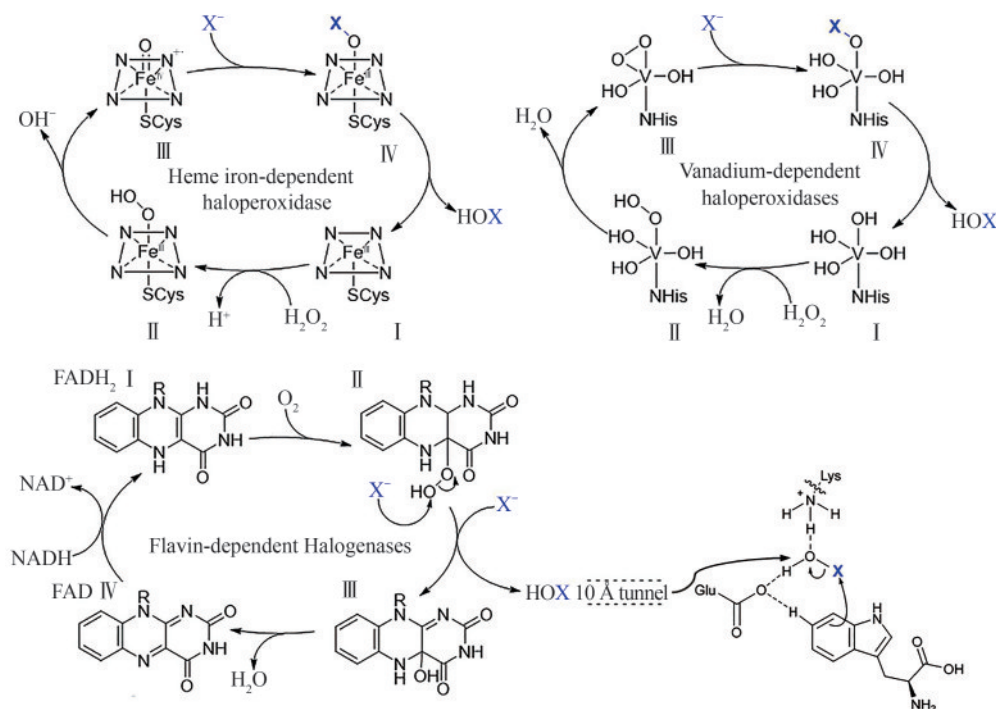
究带来了新的发展机遇。本综述结合近三年出现的新工具、新技术、新策略,重点介绍卤化酶在资源挖掘、构效关系、修饰策略及应用前景等方面的最新进展,归纳总结新视角、新理论、新方向,对前期研究中待解决的问题或未详尽阐明的理论进行必要的补充和修正,以期为今后的研究提供有益启发和参考。

## 1 卤化酶分类、鉴定与资源挖掘

### 1.1 卤化酶的分类

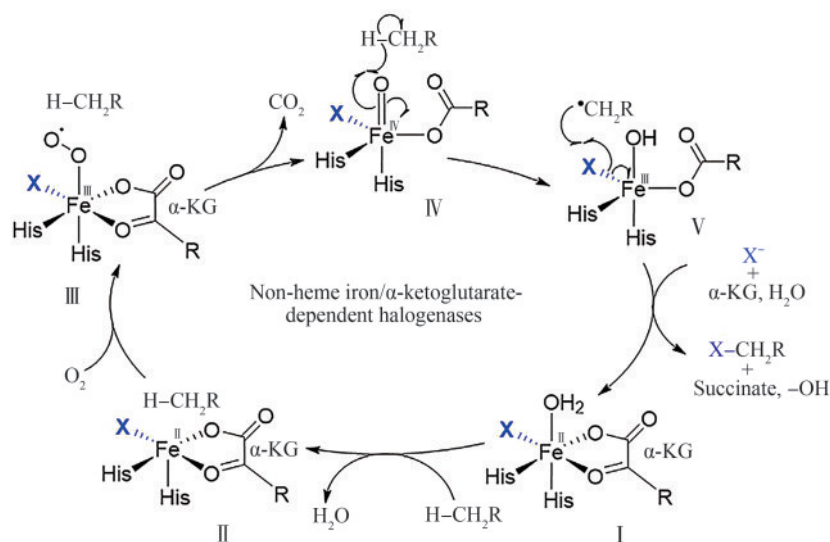
1959年, Shaw和Hager从真菌*Caldariomyces fumago*中发现了第一个卤化过氧化物酶<sup>[28]</sup>。随着科学技术的不断进步,科学家们利用基因组测序、蛋白质工程和生物信息学等技术成功地分离并鉴定出一系列具有重要生物学功能的卤化酶,并深入研究了其催化机制和结构特征<sup>[1, 4, 17-25]</sup>。由于催化机制不同,卤化酶可以分为三大类,并可根据其催化所需辅因子种类进一步细分。

(1) 亲电卤化酶[图3(a)] 催化卤素与底物的亲电结合,包括无辅因子卤素过氧化物酶



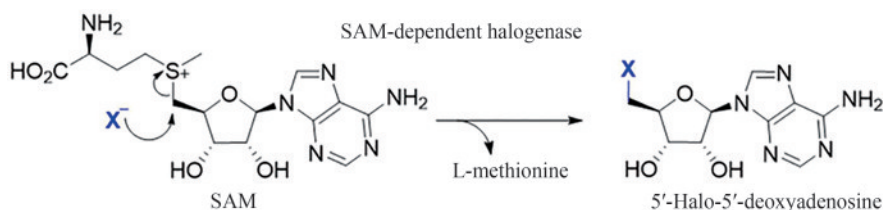
(a) 亲电卤化酶生成次卤酸进而介导卤化的反应机制

(a) General scheme for halogenation reactions employing hypohalous acid generated by electrophilic halogenases



(b) 自由基卤化酶的反应机制

(b) The mechanism of free radical halogenases



(c) 亲核卤化酶的反应机制

(c) General scheme for nucleophilic halogenases

图3 不同类型卤化酶的辅因子及催化机制 [1, 4, 17-25]

Fig. 3 Cofactors and catalytic mechanisms of various halogenase types<sup>[1,4,17-25]</sup>

(haloperoxidase, HPO)、钒依赖型卤化酶 (vanadium-dependent haloperoxidases, VHPO)、血红素铁依赖型卤化酶 (heme iron-dependent haloperoxidase, HHPO) 以及黄素依赖型卤化酶 (FDH)。

(2) 自由基卤化酶 [图3(b)] 催化卤素对游离或连接特定载体底物的自由基攻击, 多为非血红素铁/ $\alpha$ -酮戊二酸依赖型卤化酶 (non-heme iron/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent halogenase, NHFe/ $\alpha$ KGH), 成员包括 BesD、WelO5 等。

(3) 亲核卤化酶 [图3(c)] 催化 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 和卤化物通过双分子亲核取代反应 ( $S_N2$ ) 产生 5'-氟/氯脱氧腺苷 (5'-FDA/5'-CIDA) 和 L-甲硫氨酸 (L-Met), 典型代表包括氟酶 (fluorinase, FIA) 和氯酶 (chlorinase)。目前, 发现及研究最多的卤化酶为亲电卤化酶, 其次是自由基卤化酶, 而亲核卤化酶仍然是最罕见的。

尽管许多卤化酶已被鉴定并在不同宿主中实现异源表达, 但其催化的底物范围较窄, 主要局限于与天然底物结构相似的富电子化合物。这使得卤化酶难以催化多样的非天然底物, 限制了其在多种合成路径中的应用。因此, 探索卤化酶家族中的序列多样性, 分离和鉴定新型卤化酶, 并扩展已知卤化酶的种类和数量, 将显著促进其在化学合成中的应用。

## 1.2 新型卤化酶的发现和鉴定

### 1.2.1 基因组挖掘卤化酶编码序列

近年来, 基因组测序、组装及解读等相关技术的快速发展, 为目标蛋白的挖掘提供了丰富的数据来源。特别是宏基因组数据的爆炸式增长使科学家们能够利用计算模型来系统解析自然界中的基因多样性, 从而成功发现潜在的新型卤化

酶<sup>[29]</sup>。Gkotsi等<sup>[30]</sup>利用Fx.Px.Sx.G序列作为探针从噬藻体Syn10基因组中识别并鉴定出偏好催化碘取代反应的卤化酶VirX1。随后,证实该酶具有较宽泛的底物范围,能够催化32种结构及电子性质不同的苯环化合物。Smith等<sup>[31]</sup>从海绵宏基因组中分离的黄素依赖型卤化酶KrmI偏好催化L-5-羟色氨酸(5HTP)而非色氨酸。与已知的色氨酸卤化酶相比,KrmI的底物范围更广,可以催化一系列含吲哚环的底物,包括血清素。上述酶天然的杂泛性可省去多轮人工诱变进化过程,为后续进一步酶工程改造提供更优越的起点。Neubauer等<sup>[32]</sup>对海洋宏基因组的研究发现了卤化酶BrvH,即使在氯过量的情况下,它也更倾向于催化吲哚的溴取代而不是氯取代。Lavecchia等<sup>[33]</sup>对大型藻类及其表面附着微生物的宏基因组进行综合分析,发现了一系列从未报道过与有机卤素代谢有关的细菌群(如Caulobacterales、Geminiococcales、Granulosicoccales和Microtrichales),以及多种与有机卤化物的生物合成相关的基因。

Fisher等<sup>[34]</sup>对黄素依赖型卤化酶进行全家族范围的基因组挖掘,使用已知卤化酶RebH的保守

区域作为查询序列,在UniProt序列数据库中进行BLAST搜索,共获得3975个匹配结果,从中挑选并合成了128个假定FDH基因,高通量筛选了其中87种可溶性表达的FDH对62种底物及2种卤素的大于2万个催化反应;发现39种新的活性卤化酶可选择性地进行后期C—H官能化。挖掘得到的卤化酶1-F08和1-F11比之前报道的FDH更具优势,成功实现几种大分子化合物的位点选择性卤化(图4)。尽管1-F11源自拟南芥根际微生物组中的一种中温型*Sphingomonas*菌种,但其热稳定性 $[T_m=(66.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}]$ 与经过三轮定向进化后的RebH突变体3-LSR $[T_m=(69.5 \pm 0.4)^\circ\text{C}]$ 相当。这些结果显著扩展了可用于生物催化的FDH范围,并为不同应用的持续迭代基因组挖掘提供了指导。

近年来,通过基因组挖掘新发现的黄素依赖型卤化酶总结于表1。这些新酶的发现不仅有助于揭示卤化反应的生物学机制,还为合成生物学提供了新的工具,以满足特定分子设计的需求。此外,基因组来源的卤化酶也为后续应用扩展提供了更好的工程化起点。

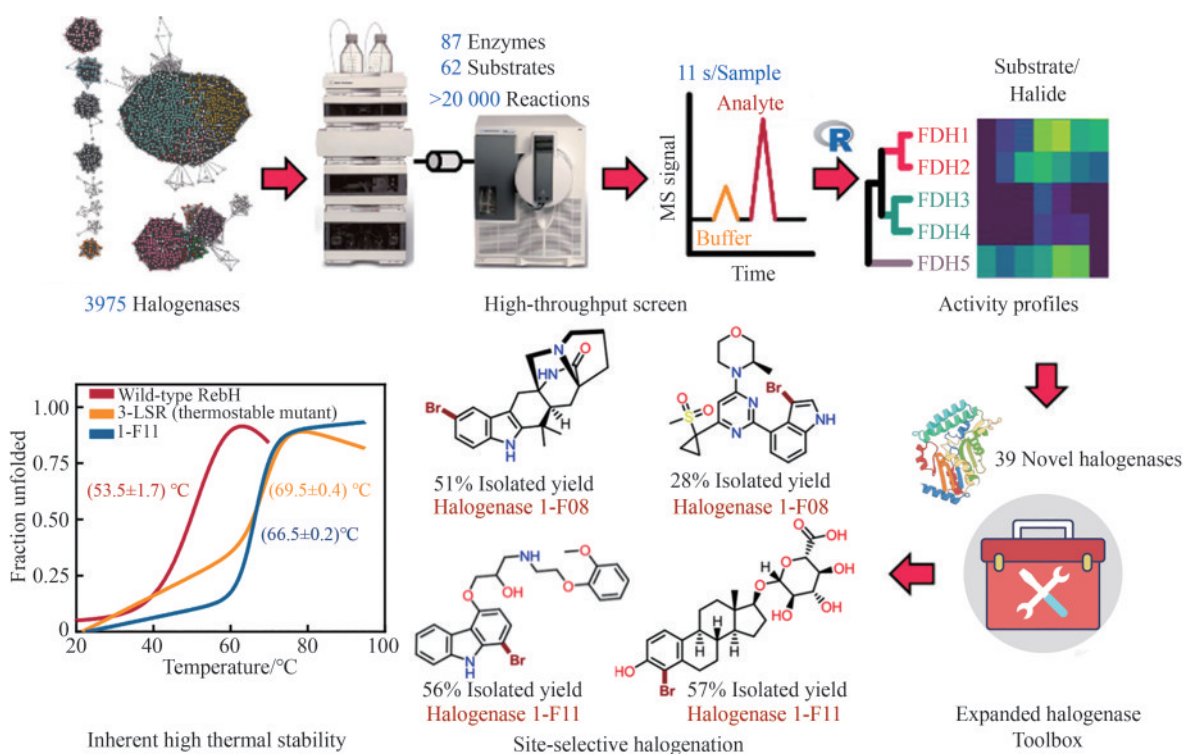
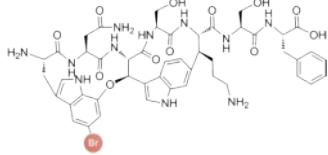
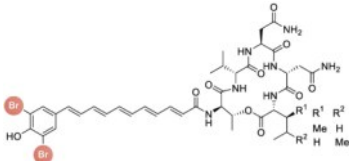
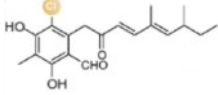
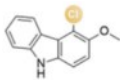
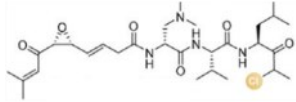
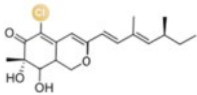
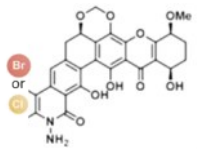
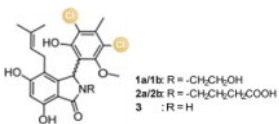
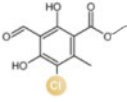
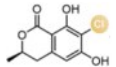


图4 基因组挖掘卤化酶工作流程及应用示例<sup>[34]</sup>

Fig. 4 Workflow of genome mining for halogenases and their application<sup>[34]</sup>

表1 基因组挖掘发现的卤化酶实例

Table 1 Examples of halogenase discovered by genome mining

名称	来源	同源蛋白(相似性百分比)	产物	功能	参考文献
DarH	藤黄紫假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	YpdA (<27%)	溴化达罗巴汀 	抗生素	[35]
AltN	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain T11g65	Bmp2	溴化或双溴变色素 	抗生素	[36]
ScIC	无刺蜜蜂青霉菌 <i>Penicillium meliponae</i>	AclH (63%)	核丛青霉素中间产物 	中间代谢物	[37]
ChlCz9	图巴塔哈链霉菌 <i>Streptomyces tubbatahanensis</i> sp. nov.	来自 <i>Streptomyces diacarni</i> 的 黄素依赖型氧化还原酶(95.1%)	氯代咪唑生物碱 	抗生素	[38]
SzoI	黏细菌 <i>Sandaracinus</i> sp. MSr10575	未提及	桑达拉唑类 Sandarazol 	防御性化合物， 毒素	[39]
LutA	塔拉霉属 <i>Talaromyces</i> sp.	GedL (56.7%)	氯化阿扎菲酮类 		[40]
OrfA	溶瘤链霉菌 <i>Streptomyces tumemacerans</i> JCM5050	XanH (35%) LlpH (34%)	卤化白真菌素 	抗生素	[41]
PtlK	杜鹃花拟盘多毛孢菌 <i>Pestalotiopsis rhododendri</i> LF-19-12	GedL (51%)	氯化二苯甲酮衍生物 	抗生素	[42]
DnHal	黑囊基地衣属 <i>Dirinaria</i> sp.	RadH (65%)	氯化赤星衣酸甲酯 	中间代谢物， 有机合成骨架	[43]
Tal-halo	嗜松塔拉霉菌 <i>Talaromyces pinophilus</i> LD-7	RadH (56%)	氯化异香豆素 	中间代谢物， 有机合成骨架	[44]

此外,非血红素铁/ $\alpha$ -酮戊二酸依赖型卤化酶家族也增添了新成员 AdeV 和 CtNTH,分别催化 2'-脱氧腺苷-5'-单磷酸 (dAMP) 和 2'-脱氧鸟苷-5'-单磷酸 (dGMP) 的氯化<sup>[45-46]</sup>。这些核苷酸卤化酶的发现扩大了卤化酶家族可催化底物的范围。Baumgartner 和 McKinnie<sup>[47]</sup> 报道第一个以吩嗪酮为底物的新型卤化酶 LvcH,属于 VHPO 家族。

### 1.2.2 机器学习指导未表征卤化酶的分类

随着 DNA 测序技术的发展,特别是基因组学和宏基因组学工具的发展,人们发现了大量的蛋白质序列。然而,目前科学家只对蛋白质序列总量的 0.3% (约 50 万) 进行过研究,其中有明确实验证据支持的序列占比不足 20% (<19.4%)<sup>[48-50]</sup>。另外,蛋白质功能注释高度依赖于计算模型的运行方式。一项大规模的蛋白质功能注释关键评估 (CAFA) 研究发现,使用现有计算工具自动注释的酶中有 40% 是不正确的<sup>[50]</sup>。因此,在有限的实验数据基础上对未知或未表征酶进行准确功能注释预测,对于蛋白质序列数据分析处理和应用至关重要。为了突破已有方法的局限性 (表 2),赵惠民团队<sup>[51]</sup> 开发了一种基于对比学习的机器学习模型 CLEAN (Contrastive Learning-enabled Enzyme Annotation)。在 CLEAN 的任务中,具有相同酶分类编号 (EC, enzyme commission, 指示酶催化何种反应的 ID 代码) 的氨基酸序列具有较小的欧氏距离,反映了功能相似性。CLEAN 基于 UniProt 的高质量数据库进行训练,输入氨基酸序列,随后计算对比输入样本间的欧式距离,就可得到 EC 可能性排序列表。为了验证 CLEAN 的准确性和稳健性,针对 UniProt 数据库中样本有限、研究不足的卤化酶数据集,使用 CLEAN 及其他六种最先进的注释工具 (ProteInfer、BLASTp、DeepEC、DEEPre、

COFACTOR 和 ECPred) 对 36 种未完全注释的卤化酶的 EC 编号进行重新分配,结合实验验证结果,综合表明 CLEAN (预测精度 86.7%~100%) 在酶功能预测任务中比其他工具 (例如,DeepEC 中约 11.1%,ProteInfer 中 11.1%~61.1%) 更具优越性。此外,所有预测工具中只有 CLEAN 成功将原本功能注释不准确甚至相互矛盾的卤化酶 MJ1651 (EC 3.13.1.8) 和 TTHA0338 (EC 3.13.1.8) 精准区分,并准确识别 SsFIA 多功能酶具备三种催化能力 (EC 2.5.1.63, EC 2.5.1.94 和 EC 3.13.1.8)。结果表明,CLEAN 能够高效处理低相似性序列、数据不平衡及混杂酶等复杂数据集,预测准确率显著提升并兼具抗噪性和纠错能力,为酶功能注释提供高精度、强鲁棒性的计算工具。此外,该项工作证实了机器学习等 AI 技术在卤化酶识别、分类、鉴定方面的高效性和准确性,具有巨大应用潜力。

### 1.2.3 卤素消耗辅助揭示隐秘卤化反应

隐秘卤化 (cryptic halogenation) 是指生物合成途径中卤素原子短暂引入前体分子,经后续酶促修饰 (如环化、醚化) 后生成无显著卤素特征的复杂天然产物的过程<sup>[52]</sup>。此类反应的关键特征在于卤化步骤被后续修饰所掩盖,导致终产物中卤素信号缺失。典型隐秘卤化产物通常是非卤化的且修饰基团多样,包括环丙烷<sup>[53-54]</sup>、联苯基<sup>[55]</sup>、末端炔基<sup>[56]</sup> 和对位环芳基<sup>[57-58]</sup>,其结构多样性远超传统卤代天然产物。

由于隐秘卤化产物的卤素特征峰在质谱分析中难以识别,传统基于卤素同位素峰或碎片离子的检测方法面临挑战。针对此问题,Glasser 等<sup>[59]</sup> 提出一种新型策略:通过监测微生物培养液中卤素离子 (如  $\text{Cl}^-$ ) 的异常消耗,结合非靶向代谢组学筛选潜在卤化产物 (图 5)。以蓝细菌 *Nostoc*

表 2 CLEAN 算法框架的独特性及优越性

Table 2 The uniqueness and superiority of the CLEAN algorithm framework

对比维度	传统模型 (如 DeepEC/BLASTp)	CLEAN
学习范式	多标签分类 (直接映射 EC 编号) 或序列比对	对比学习构建功能嵌入空间 (正、负样本对, 损失函数)
功能相似性建模	依赖序列相似性 (BLASTp) 或标签概率 (DeepEC)	通过欧氏距离直接量化功能关联性
数据依赖性	需大量标注数据,对稀有类别泛化能力差	弱化标签依赖,利用功能相似性推断稀疏类别表征
处理混杂酶的能力	多标签分类易产生矛盾预测	嵌入空间支持同一序列靠近多个功能簇
功能层级关系捕捉	需人工设计规则 (如 EC 层级约束)	嵌入空间自然体现 EC 编号层级 (主类→亚类)
预训练策略	无或基于浅层特征 (如 $k$ -mer 频率)	自监督预训练 (掩码语言建模) + EC 层级知识注入

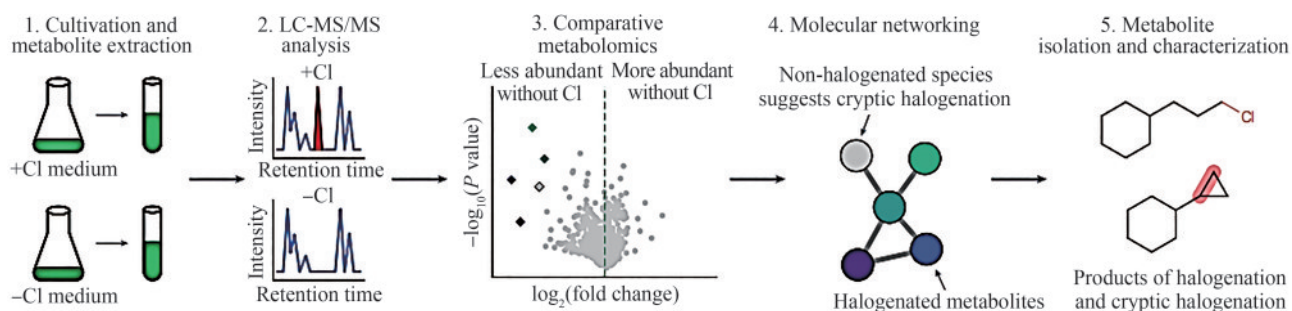


图5 利用氯离子消耗揭示隐秘卤化反应工作流程<sup>[59]</sup>

Fig. 5 Overview of the chloride depletion workflow for revealing cryptic halogenation<sup>[59]</sup>

*punctiforme* ATCC 29133 为例, 对比其在富 Cl<sup>-</sup> 与缺 Cl<sup>-</sup> 培养条件下的代谢组, 成功鉴定出一类氯化糖脂化合物 nostochlorosides。该类分子含古洛糖单元及醚键结构, 其生物合成基因簇 *ngl* 包含两个关键酶编码基因 *nglC* 和 *nglO*, 分别负责 Cl<sup>-</sup> 引入及糖基醚化。进一步实验表明, 将卤素消耗信号替换为特定金属离子 (如 Cu<sup>2+</sup>) 或氨基酸 (如酪氨酸) 的消耗监测, 可扩展此策略用于识别其他修饰类型的前体衍生化合物。这一方法突破了传统卤化产物鉴定的局限性, 为隐秘卤化反应及其功能酶的发现提供了高效工具。

#### 1.2.4 可视化生物传感器指示色氨酸卤化反应

与 HPLC、MS 和 NMR 等上机检测方法相比, 荧光信号能够实现快速、高通量、可视化检测从而提高筛选效率。Reed 等<sup>[60]</sup> 利用特异性识别卤化色氨酸的工程化色氨酸抑制蛋白 (TrpR5/TrpR6) 与绿色荧光蛋白报告基因结合, 建立了以荧光强度响应胞内卤化色氨酸生成的生物传感器系统。该传感器能够实现位点选择性色氨酸卤化酶的高效、特异识别, 将来可以用于色氨酸卤化酶的可视化验证及现有酶工程正向突变体的规模化筛选。此外, 研究者重构了传感器基因线路以响应卤化色氨酸的消耗, 筛选能够转化卤化色氨酸的下游酶及其突变体。该项研究为其他类型卤化酶高通量筛选方法的开发提供了参考和启发。

## 2 卤化酶结构与催化机制

卤化酶通常由一个或多个亚基组成, 具有特定的活性中心结构。它们可以催化不同类型的卤

化反应, 如亲电卤化反应、自由基卤化反应、亲核卤化反应等。卤化酶的反应机理和底物特异性受到氨基酸序列、空间结构等因素的影响。本文分别以亲电、自由基和亲核卤化酶中的典型代表为例, 重点介绍卤化酶结构与功能之间的相互关系。

### 2.1 黄素依赖型卤化酶 (FDH) 的结构特征与催化机制

从荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 中分离的色氨酸 7-卤化酶 PrnA 是 FDH 家族的第一个成员, 其 X 射线单晶结构也是首个被解析和发表的<sup>[61]</sup>。此后, 更多 FDH 被鉴定并解析, 关键结构特征逐渐显现<sup>[4, 17, 22-23]</sup>。现有的 FDH 可以根据蛋白亚基的数量分为单体 (CmlS、Mpy16、PltM)、二聚体 (PrnA、RebH、Thal) 和三聚体 (VirX1) 卤化酶。在结构上, FDH 大多由两个亚结构域组成, 形态上呈现为方盒区和棱锥区 [图 6(a)]。其中, 结合黄素辅因子的方盒区高度保守, 而与底物结合相关的棱锥区则变化多样 [图 6(a)]。FDH 的结构多样性使其适用于多种底物, 比如 PltM 偏好卤化酚类和苯胺化合物<sup>[62]</sup>, Bmp2 特异性地将溴转移到吡咯类底物上<sup>[63]</sup>, 而 CmlS 主要催化脂肪族底物<sup>[64]</sup>。这些例子证明了自然界中结构决定功能的普遍规律。

所有已知的 FDH 都需要 FADH<sub>2</sub> 作为辅助因子 [图 6(b)]。FDH 的辅因子结合口袋和催化口袋分别开口于方盒区的两侧, 而两个功能口袋一般通过包埋在酶内部的隧道相连, 隧道长度约为 10 Å。FADH<sub>2</sub> 结合在酶的特异位点 (GxGxxG) 上, 并与氧气反应生成黄素过氧化氢中间体 (FAD<sub>C4a-OOH</sub>):

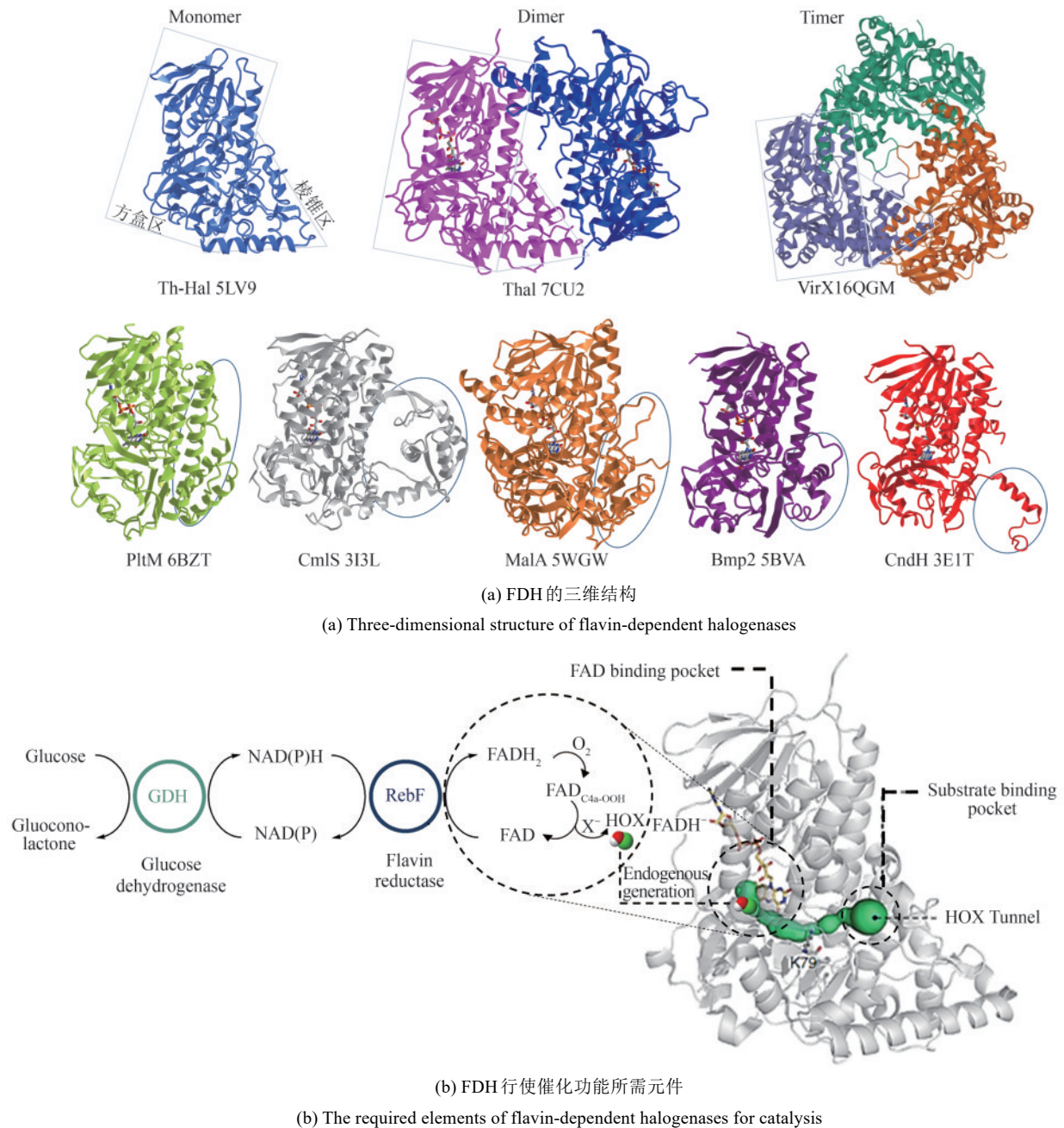


图6 黄素依赖型卤化酶的典型结构及催化元件

Fig. 6 The typical structure and catalytic elements of flavin-dependent halogenases

随后， $FAD_{C4a-OOH}$ 与卤素离子 $X^-$ 反应，形成次卤酸(HOX)；HOX经过10 Å的连通隧道转移至酶催化口袋，由高度保守的活性位点赖氨酸(如PrnA-K79, RebH-K79, BrvH-K83, RadH-K74)的氨基进一步极化O—X键，并通过氢键作用将其引导至底物，催化卤化反应进行<sup>[4, 17, 22-23]</sup>。

然而，外源黄素还原酶的需求导致FDH催化体系复杂化，显著增加了反应成本。值得关注的

是，自然界微生物资源中存在单组分卤化酶(single-component FDH, ScFDH)，这类酶通过单一蛋白整合还原酶与卤化酶的双重功能，可自主完成黄素再生与卤素转移的偶联反应。目前发现两种ScFDH：一种是从海洋细菌*Pseudoalteromonas leteviolacea*中分离得到的Bmp5<sup>[65]</sup>；另一种是从水生细菌*Aetokthonos hydrillicola*中分离的AetF<sup>[66]</sup>。这两种酶都是单体，与之前研究的FDH

存在显著的结构差异。与常见的方盒-金字塔结构不同，Bmp5和AetF的结构轮廓类似于澳洲大陆<sup>[67-68]</sup>（图7）。如图7所示，Bmp5和AetF底部存在被随机卷曲基序环绕的较大空腔，允许NADPH和FADH<sub>2</sub>进入并与酶结合。Bmp5和AetF的轮廓及内部功能区域高度重叠，包括活性位点（Bmp5-K277，AetF-K258），显示了ScFDH的一般结构特征。最近，Tenebro等<sup>[38]</sup>报道了ScFDH家族的新成员ChlCz9（UNT00659.1），分离自链霉菌*Streptomyces tubbatahanensis*。然而，根据氨基酸序列比对和AlphaFold建模，笔者发现ChlCz9的预测结构与Bmp5和AetF显著不同，但与PltM高度相似（图7）。序列比对结果也显示ChlCz9缺乏结合NADP的基本元件。因此，需要进一步通过直接活性测定或高分辨率晶体结构分析，确认ChlCz9是否为新型ScFDH。

FDH的催化机制一直存在争议。已有实验和理论研究分别支持HOX对底物的直接卤化<sup>[27]</sup>（机制1）或在底物卤化之前形成Lys-NH<sub>2</sub>Cl<sup>+</sup>（或Lys-NHCl）中间体<sup>[26]</sup>（机制2）。最近，Barker等<sup>[69]</sup>

以色氨酸卤化酶PrnA为研究对象，利用密度泛函理论（DFT）和分子动力学（MD）模拟探讨了这两种机制。研究者从HOCl与色氨酸在酶活性位点的结合稳定性入手，最终计算并比较了机制1和机制2的能量分布。通过计算模拟活性位点Lys79和Glu346的全部四种质子化状态，表明状态A（质子化的Lys79和去质子化的Glu346）对于HOCl稳定结合于活性位点是必需的，也是这两种机制催化过程中最可能的一种质子化状态。DFT计算显示，质子化状态A也是机制1的优选状态，因为Lys79与HOCl之间的强氢键增强了HOCl的反应性，使其能够对由HOCl解离形成的羟基进行质子化，同时Glu346的羧酸根则稳定形成的Wheland中间体并随即对其去质子化（图8）。此外，四种质子化状态下，机制2的能量屏障均显著高于机制1，因此可以排除机制2。这些计算为FDH中HOX对底物直接卤化而非形成赖氨酸中间体的催化机制提供了证据，并揭示了Lys79和Glu346这两个关键残基在初始结合底物及卤化反应过程中的双重作用。

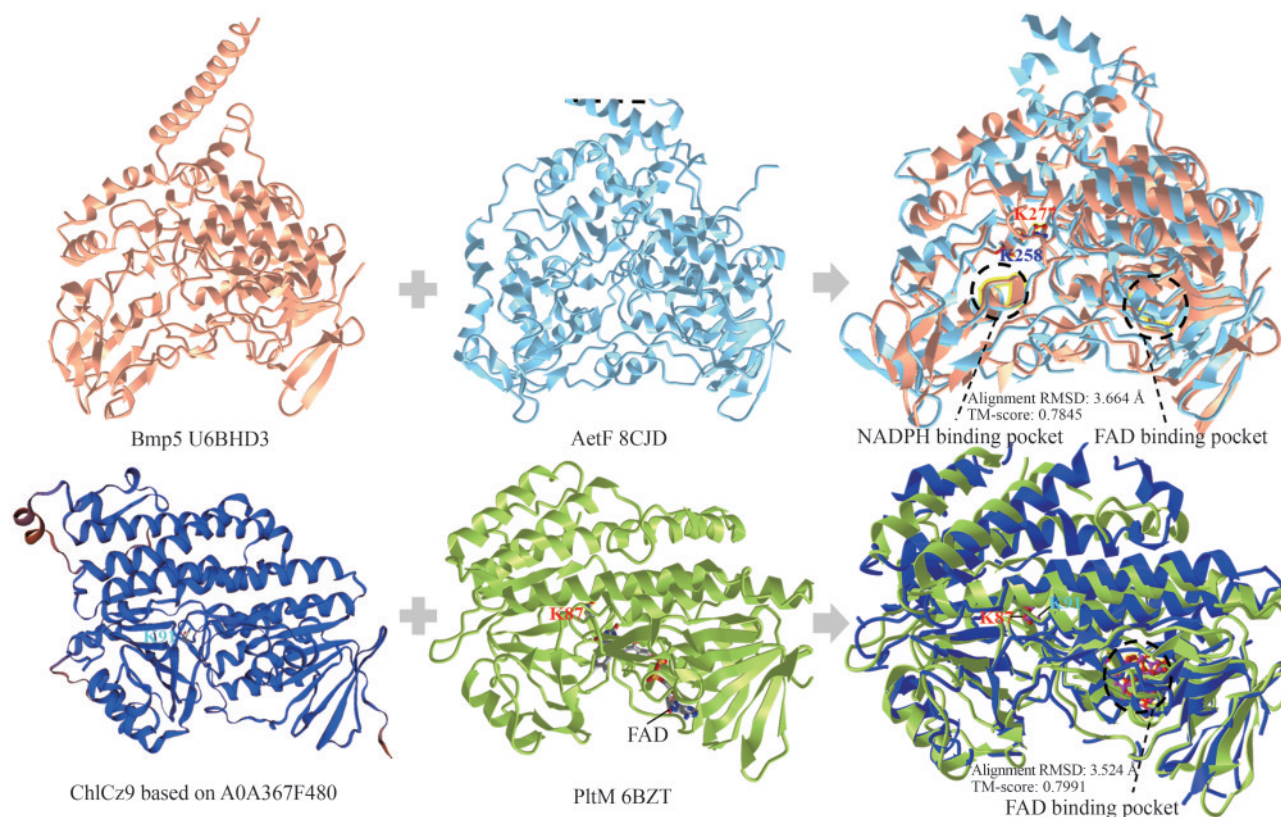


图7 ScFDH的典型结构

Fig. 7 The typical structure of single-component flavin-dependent halogenases

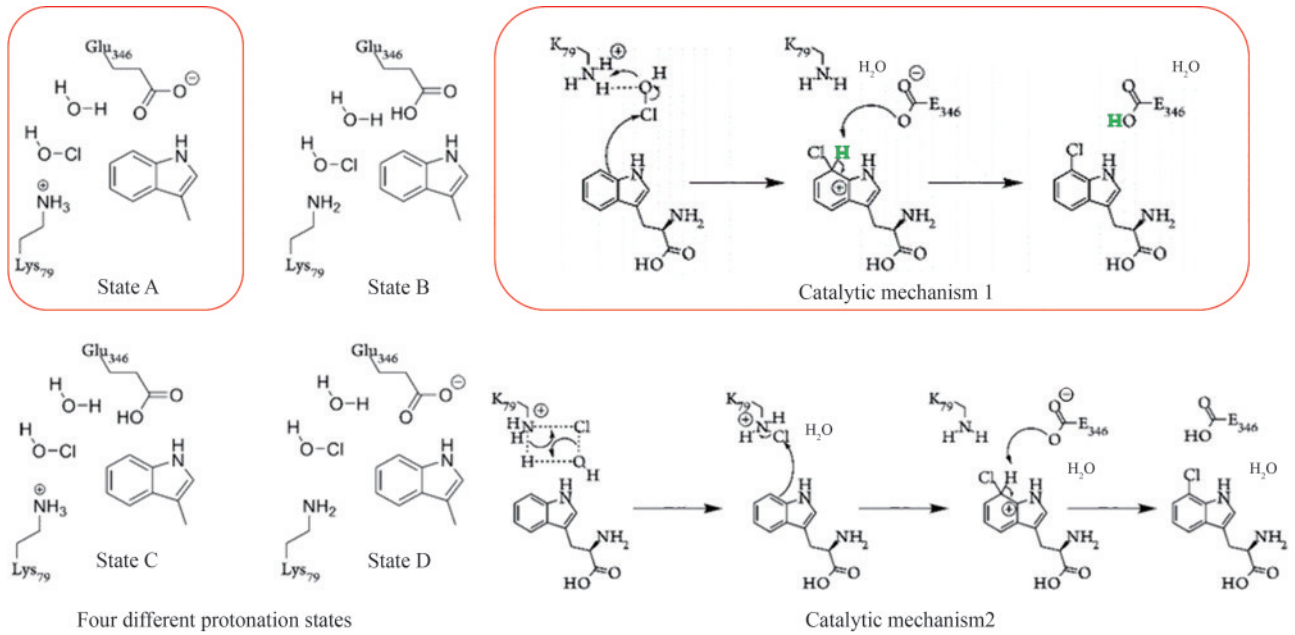


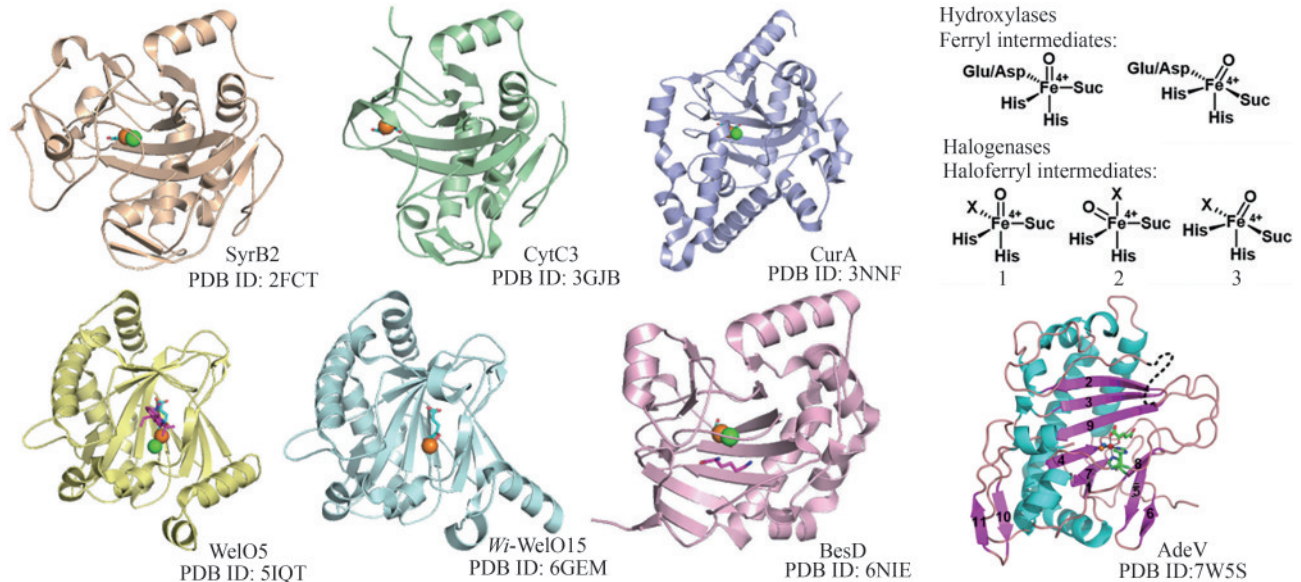
图8 通过计算模拟提出的PrnA的催化机制<sup>[69]</sup>

Fig. 8 The proposed catalytic mechanism of PrnA through calculational analysis and simulation<sup>[69]</sup>

## 2.2 NHFe/ $\alpha$ KG 依赖型卤化酶的结构特征及催化机制

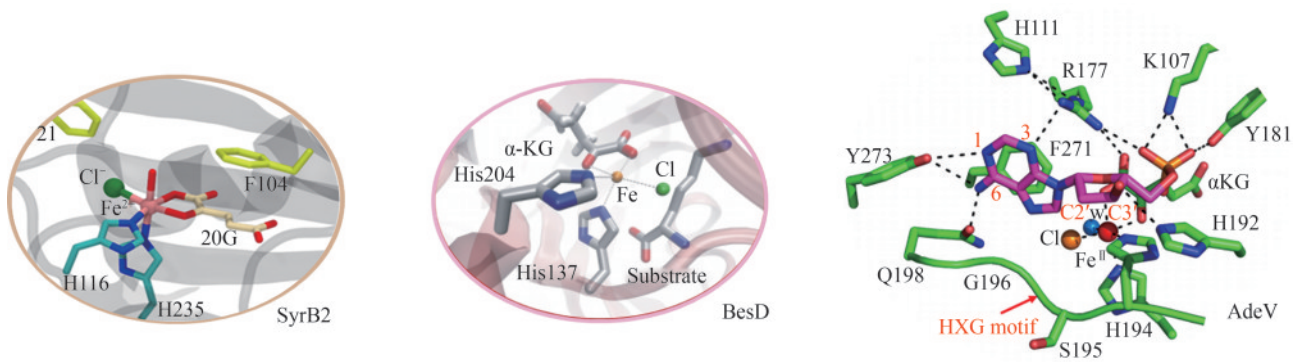
NHFe/ $\alpha$ KG 依赖型卤化酶 (NHFe/ $\alpha$ KGH) 通常具有 Fe/ $\alpha$ KG 依赖型加氧酶超家族典型的  $\beta$ -三明治果冻卷拓扑结构 [图9(a)], 催化中心由两个组氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸以及 Fe 共同配位组成 [图9(b)]. 与同属超家族的羟化酶相比, 卤化酶中 Fe

的配位环境缺少羧酸配体 (天冬氨酸/谷氨酸), 而是被非极性氨基酸如丙氨酸或甘氨酸所替代<sup>[25]</sup>. 这种氨基酸的替换使卤化酶能够有效容纳与 Fe 配位的卤素阴离子, 是卤化反应的结构基础. 最近, 研究者发现了一种新型核苷酸卤化酶 AdeV 并解析其晶体结构<sup>[45, 70]</sup>. 尽管 AdeV 与已知 NHFe/ $\alpha$ KGHs 的序列相似性较低, 但其三维结构与催化中心的



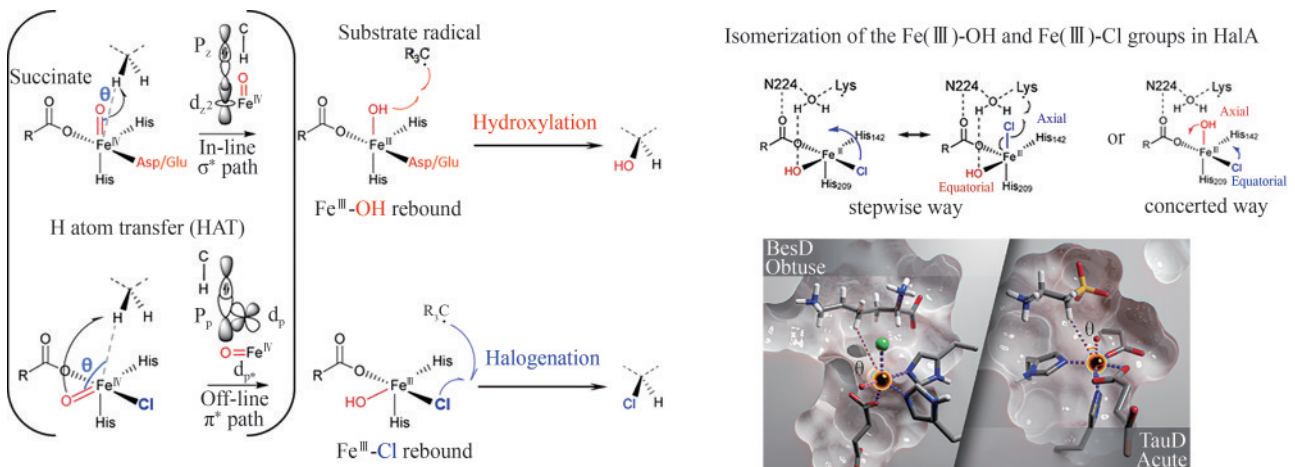
(a) NHFe/ $\alpha$ KG 依赖型卤化酶三维结构

(a) Three-dimensional structure of NHFe/ $\alpha$ KG-dependent halogenases



(b) NHFe/αKG 依赖型卤化酶催化中心

(b) The catalytic center of NHFe/αKG-dependent halogenases



(c) NHFe/αKG 依赖型酶催化机制及活性中心结构

(c) The catalytic mechanism and active center structure of NHFe/αKG-dependent enzymes

图9 NHFe/αKG 依赖型卤化酶的典型结构<sup>[25, 70-76]</sup>Fig. 9 The typical structure of NHFe/αKGs<sup>[25,70-76]</sup>

局部结构依然具有保守性。

研究表明, Fe/αKG 依赖型羟化酶和卤化酶的催化机制非常相似<sup>[73-75]</sup>。一旦 αKG、Fe 和底物结合到酶上, 就会触发构象变化 (BesD 中 E119 残基起关键作用<sup>[76]</sup>), 促进 O<sub>2</sub> 与 Fe 中心配位, 随后 α-KG 氧化脱羧驱动 O—O 键断裂, 生成关键中间体 Fe(IV)=O。该中间体通过氢原子转移 (HAT) 形成 Fe(III)—OH 和底物自由基, 此后反应路径显著分化 [图9(c)]。在羟化酶中, 结合在 Fe 上的羟基会直接回弹并与底物自由基结合, 生成羟基化产物。而卤化酶通过次级配位层 (secondary coordination sphere, SCS) 残基氢键网络的定向作用, 引起 Fe 配位球的构象转变<sup>[77]</sup> (分步或协同的方式发生), 使卤素配体优先接近底物自由基, 从而主导卤化反应, 尽管也会通过羟基回弹生成少

量羟化产物。MD 模拟表明, 底物定位角度呈现显著差异: 羟化酶 TauD 偏好氧-铁-氢呈锐角, 由 Asp94 等残基稳定; 卤化酶 BesD 则倾向维持钝角, 依赖 His127 等残基<sup>[73]</sup>。此外, 卤化酶 (如 BesD、HalB、HalD) 通过 C 端底物结合盖的构象变化 (如螺旋-片层转换) 精确调控底物构象, 决定氯化位点 (如 C4 或 C5) 及底物链长选择性 (赖氨酸 vs 鸟氨酸)。定点突变及 MD 模拟表明, 结合盖区关键残基 (如 HalB 的 Met246 和 HalD 的 Trp254) 通过立体效应主导底物定位<sup>[78]</sup>。这些发现揭示了 SCS 微环境对 Fe/αKG 依赖型酶反应选择性的精确调控机制, 为后续理性设计提供分子基础。

Kulik 及其研究小组<sup>[79]</sup> 的计算工作详细描述了底物进入 SyrB2 活性位点所需的蛋白质间相互作用。当苏氨酸被非天然氨基酸底物 (如 α-氨基丁

酸或正缬氨酸) 替代时, SyrB2主要催化羟化反应。这些研究表明, SyrB2与苏氨酸及其他氨基酸底物的相互作用对卤化/羟化反应的结果具有重要影响。尽管对SyrB2中的底物-蛋白相互作用进行了研究, 但尚不清楚Fe中心SCS, 即与Fe中心各配体相互作用的氨基酸残基如何影响SyrB2和其他卤化酶的催化结果。Wilson等<sup>[71]</sup>通过生信分析发现, 与SyrB2同源性较高的卤化酶中121位氨基酸残基为高度保守的苯丙氨酸, 而羟化酶中则多为氧化还原性质活泼的酪氨酸。随后, 将SyrB2催化中心SCS中的苯丙氨酸替换为酪氨酸(F121Y和F104Y), 作为监测活性中心Cl-Fe配位方式的空间约束探针。通过分子动力学模拟以及实验证明, 仅有F121Y突变体的酪氨酸在催化过程中与Fe(IV)=O反应形成DOPA, 并导致SyrB2卤化功能丧失, 而F104Y则没有。根据两突变体SCS中酪氨酸残基与Fe(IV)=O各配体之间的距离计算结果, 确认了SyrB2卤化过程中Fe(IV)=O唯一的

活性构象, 即轴向Fe(IV)-Cl。

Zhang等<sup>[80]</sup>系统研究了独立型NHFe/ $\alpha$ KGHs家族典型成员BesD的催化机制(图10)。量子力学/分子力学(QM/MM)计算与MD模拟结果表明轴向配位的Fe(IV)=O主导底物C-H键的活化过程。氢原子转移(HAT)导致质子从底物C-H键迁移至Fe(IV)=O中心, 伴随底物自由基和Fe(III)-OH中间体的形成。值得注意的是, 轴向Fe(III)-OH与底物间的空间位阻显著提高了Cl配体回弹反应的活化能( $\Delta G=33.5$  kcal/mol, 1 kcal=4185.85 J)。为克服这一能垒, Fe(III)-OH需经历从轴向到赤道位点的构象重排, 该异构化过程有效消除了自由基与金属中心的空间排斥作用( $\Delta G$ 降至13.3 kcal/mol), 使底物自由基得以顺利接近Cl配体完成卤化反应。此外, SCS内的Asn219残基对Fe(III)-OH的构象转换至关重要。N219A突变体的QM/MM研究表明, 当Asn219与琥珀酸的氢键相互作用被破坏时, 琥珀酸与

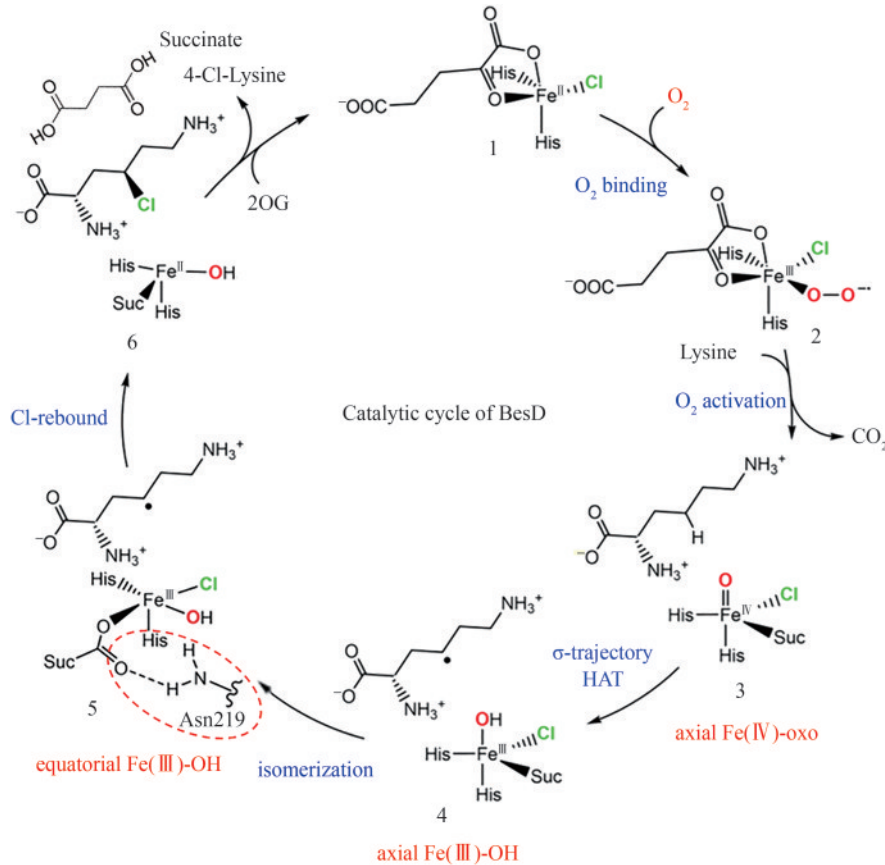


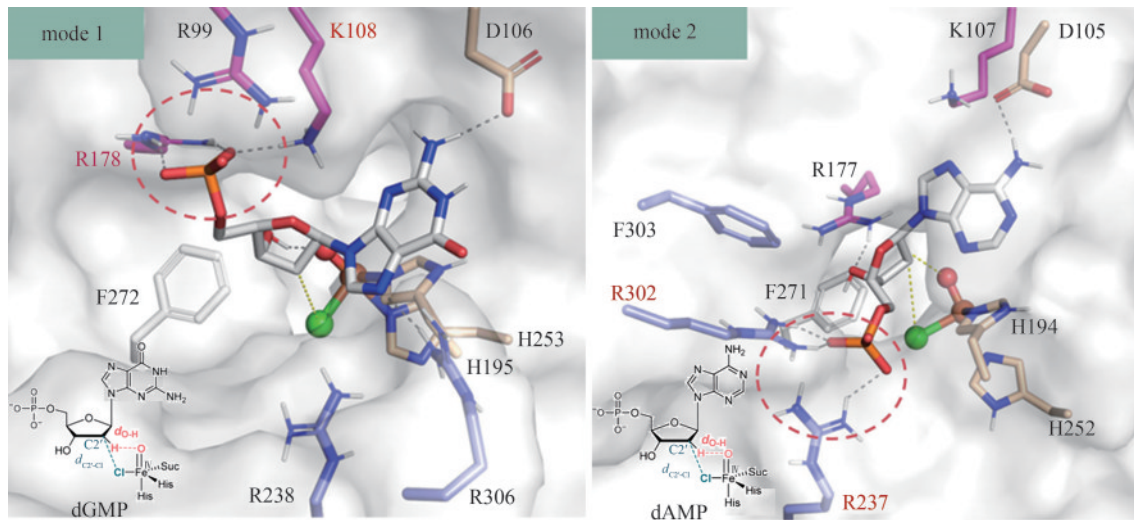
图10 通过计算模拟提出的BesD卤化酶催化机制<sup>[80]</sup>

Fig. 10 The proposed catalytic mechanism of BesD through calculational analysis and simulation<sup>[80]</sup>

Fe(III)-OH 呈现双齿配位模式，导致轴向 Fe(III)-OH 无法完成赤道构象转变 ( $\Delta G$  增加至 27.3 kcal/mol)。上述结果强调了 SCS 影响 Fe 催化中心构象变化的重要性，也对其他  $\text{NHFe}/\alpha\text{KGH}$  催化的 C-H 功能化反应具有启示意义。

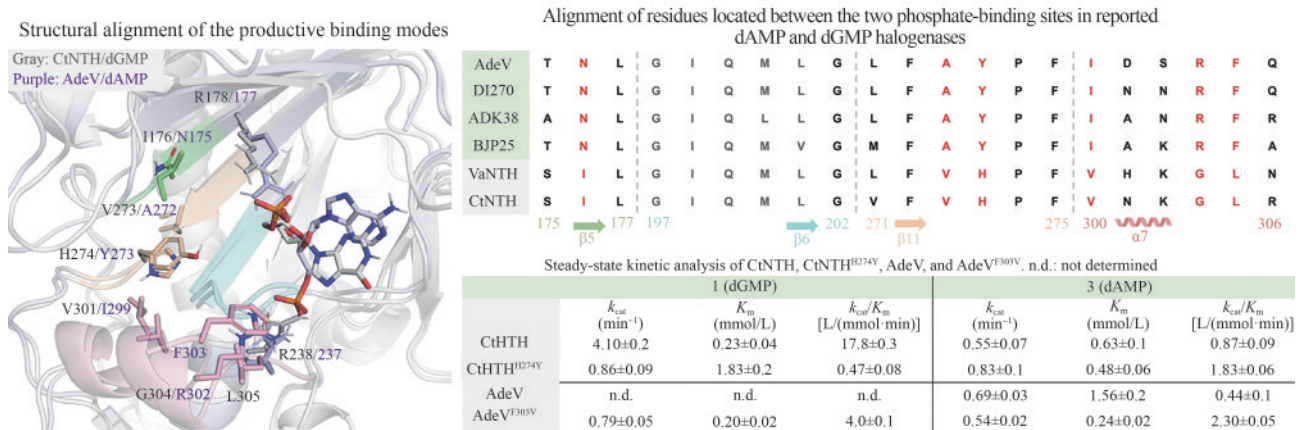
C2' 位卤化修饰作为提升核苷酸类似物药物性质的关键策略，其酶催化实现途径备受关注。近期研究利用腺苷卤化酶 AdeV 实现了 2'-脱氧腺苷-5'-单磷酸 (dAMP) C2' 位的直接卤化<sup>[45, 70]</sup>，但该酶底物谱狭窄限制了其应用拓展。为突破这一瓶颈，Ni 等<sup>[46]</sup> 通过进化基因组学筛选获得新型 2'-脱氧鸟苷-5'-单磷酸 (dGMP) 卤化酶 CtNTH 与 VaNTH，

其催化活性较 AdeV 提升 43 倍。尽管 CtNTH 与 AdeV 序列同源性达 51%，两者却呈现显著底物偏好性差异。分子动力学模拟表明，核苷酸卤化酶的底物特异性由催化口袋中 5'-磷酸基团结合模式决定，而非传统认知的碱基结合残基：CtNTH 优先采用 mode 1 结合 dGMP 的磷酸基团，而 AdeV 倾向 mode 2 适配 dAMP [图 11(a)]。通过工程化磷酸结合位点 SCS 范围内的关键残基，成功实现了底物选择性的定向切换及酶动力学参数转变 [图 11(b)]。结构及动力学分析揭示，SCS 通过调控磷酸结合位点模式（如氢键网络重构及静电势调整）精确控制底物取向。该研究不仅拓展了核



(a) MD 模拟提出核苷酸卤化酶与底物的结合模式

(a) The proposed binding modes of nucleotide halogenases and substrates by MD simulation



(b) 针对 CtNTH 和 AdeV 的核苷酸特异性的工程化改造

(b) Engineering of nucleotide specificity for CtNTH and AdeV

图 11 新型核苷酸卤化酶作用模式及工程改造策略<sup>[46]</sup>

Fig. 11 The action mode and engineering strategies of novel nucleotide halogenase<sup>[46]</sup>

苷酸卤化酶资源库，更为此类酶的理性设计改造提供了分子机制指导。

### 2.3 新型铜依赖型卤化酶ApnU的结构特征与催化

近期，唐奕课题组<sup>[81]</sup>从 *Penicillium oxalicum* 中鉴定并表征了自由基卤化酶家族中的首个铜依赖型成员 ApnU。该酶的活性中心采用  $\text{Cu}^{2+}$  取代传统的  $\text{Fe}^{2+}$  辅因子，通过独特的金属配位结构和自由基介导机制实现  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  的迭代卤化（图 12）。在结构特征方面，ApnU 含有两个 HXXHC 保守基序，形成一个由四个组氨酸侧链构成的平面位点（尺寸约  $5.4 \text{ \AA} \times 6.1 \text{ \AA}$ ）及两个半胱氨酸组成的铜结合位点，与  $\text{NHFeHal}$  的活性中心结构呈显著差异。功能研究表明，ApnU 严格依赖  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{O}_2$  以及抗坏血酸作为辅因子，能够催化天然底物 atpenin B (1) 在 C5' 位  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  进行氯化反应，生成单氯 (2)、二氯 (3) 和三氯产物 (4)，同时通过氢原子抽取机制产生脱氯副产物 (5)。实验数据显示，ApnU 的催化活性受  $\text{NaCl}$  浓度显著影响：当  $\text{NaCl}$  浓度为  $50 \text{ mmol/L}$  时氯化效率达到峰值，而在  $\text{NaCl}$  缺失条件下反应转向脱氢途径，这表明卤素配位在  $\text{C-H}$  键活化中起关键作用。与  $\text{NHFeHal}$  相比，ApnU 表现出显著抑制羟基回弹副反应的能力，从而提升了卤代选择性，这一机制差异可能与金属中心的氧化还原特性相关。此外，ApnU 展现出独特的广谱卤素兼容性，不仅能催化  $\text{Cl}^-$ ，还能利用  $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{SCN}^-$  及  $\text{SeCN}^-$  对天然底物（包括非天然底物 DIF-3）进行  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  官能化修饰，生成相应的单卤取代产物。基于软硬酸碱理论， $\text{Cu}^{2+}$  活性中心的较软特性使其能够高效结合较软的配体（如硫和碘），这一特性赋予 ApnU 催化  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  碘化、硫氰化和硒氰化的独特能力，突破了  $\text{NHFeHal}$  仅能催化硬性卤素 ( $\text{Cl}^-/\text{Br}^-$ ) 的限制，实现了  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  的多样化修饰及软性卤素的高效利用。ApnU 的发现不仅深化了对卤化酶金属依赖性的理解，更为复杂天然产物及药物中间体的生物合成提供了一种新型工具酶。

力，从而提升了卤代选择性，这一机制差异可能与金属中心的氧化还原特性相关。此外，ApnU 展现出独特的广谱卤素兼容性，不仅能催化  $\text{Cl}^-$ ，还能利用  $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{SCN}^-$  及  $\text{SeCN}^-$  对天然底物（包括非天然底物 DIF-3）进行  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  官能化修饰，生成相应的单卤取代产物。基于软硬酸碱理论， $\text{Cu}^{2+}$  活性中心的较软特性使其能够高效结合较软的配体（如硫和碘），这一特性赋予 ApnU 催化  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  碘化、硫氰化和硒氰化的独特能力，突破了  $\text{NHFeHal}$  仅能催化硬性卤素 ( $\text{Cl}^-/\text{Br}^-$ ) 的限制，实现了  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  的多样化修饰及软性卤素的高效利用。ApnU 的发现不仅深化了对卤化酶金属依赖性的理解，更为复杂天然产物及药物中间体的生物合成提供了一种新型工具酶。

### 2.4 SAM 依赖型卤化酶的结构特征与催化机制

2002 年，O'Hagan 团队<sup>[82]</sup>首次从土壤细菌 *Streptomyces cattleya* 中分离鉴定出天然氟化酶  $\text{FIA}^{\text{Scat}}$  (EC 2.5.1.63)，标志着 SAM 依赖性卤化酶研究的开端。该酶通过  $\text{S}_\text{N}2$  机制介导 F 对 SAM-C5' 位的亲核取代，生成 5'-氟-5'-脱氧腺苷 (5'-FDA)，故被命名为 5'-氟-5'-脱氧腺苷合酶 (5'-FDAS)。

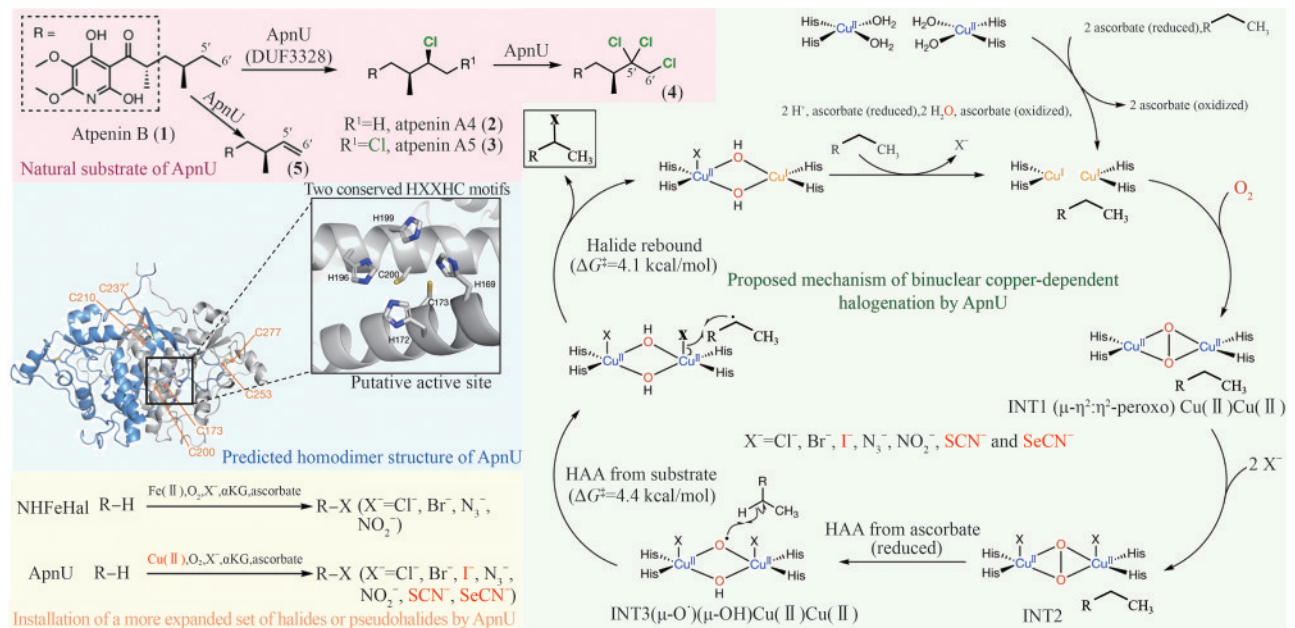


图 12 铜依赖型卤化酶 ApnU 的结构功能及催化机制<sup>[81]</sup>

Fig.12 The structural, function and catalytic mechanism of copper-dependent halogenase ApnU<sup>[81]</sup>

2004年解析的FIA<sup>Scat</sup>晶体结构 (PDB ID: 1RQP) 显示<sup>[83]</sup>, 其单体由N端Rossmann样结构域和C端 $\beta$ -折叠结构域组成, 生理状态下通过三聚体堆叠形成活性六聚体: 催化口袋位于相邻单体N-C端界面, 由末端残基构成包围SAM底物或5'-FDA产物的动态催化微环境 [图13(a)]。源自海洋细菌*Salinispora tropica*的氯酶SalL与FIA<sup>Scat</sup>序列同源性为35%, 虽具有相似折叠构象 [图13(b)] 及催化机制, 但其卤素选择性与FIA<sup>Scat</sup>显著不同: SalL催化Cl<sup>-</sup>与SAM发生取代反应生成5'-CIDA<sup>[84-85]</sup>。早期研究<sup>[86-87]</sup>推测FIA特有的23残基loop (SalL中缺失) 可能通过构象调控影响卤素选择性 [图13(b)], 但最新证据表明催化口袋关键残基起决定性作用。例如, 古菌来源的氟酶FIA<sup>PlatU</sup>虽缺乏该loop, 其氟化效率 ( $k_{cat}=0.41 \text{ min}^{-1}$ ) 却显著优于典型氟酶FIA<sup>MA37</sup> ( $k_{cat}=0.16 \text{ min}^{-1}$ ) 和FIA<sup>Skin</sup> ( $k_{cat}=0.22 \text{ min}^{-1}$ )<sup>[88]</sup>; 而SalL的Y70A/C/S/T/G突变体均表现出氟化活性<sup>[89]</sup>。与卤素选择性类似, FIA对底物腺嘌呤环C2'位修饰也具有选择性耐受: 当H被NH-甲基、NH-丙基、NH-丁基或O-丁基取代时仍保留催化活性, 但被叠氮基和硫醚基取代则活性完全丧失<sup>[90]</sup>。QM/MM分析表明, 催化口袋N278残基和A279主链酰胺能够分别与腺嘌呤C2'位的NH和O取代基形成有利氢键, 从而保留了氟化活性。此外, 基因组挖掘以及突变实验证实催化口袋W50/F50保守残基对于FIA的氟化活性至关重要<sup>[91]</sup> [图13(c)]。这些发现表明, 催化口袋内关键氨基酸的静电微环境及空间排布 (而非loop区域的间接调控) 是影响氟/氯酶底物选择性的核心结构基础<sup>[92]</sup>。

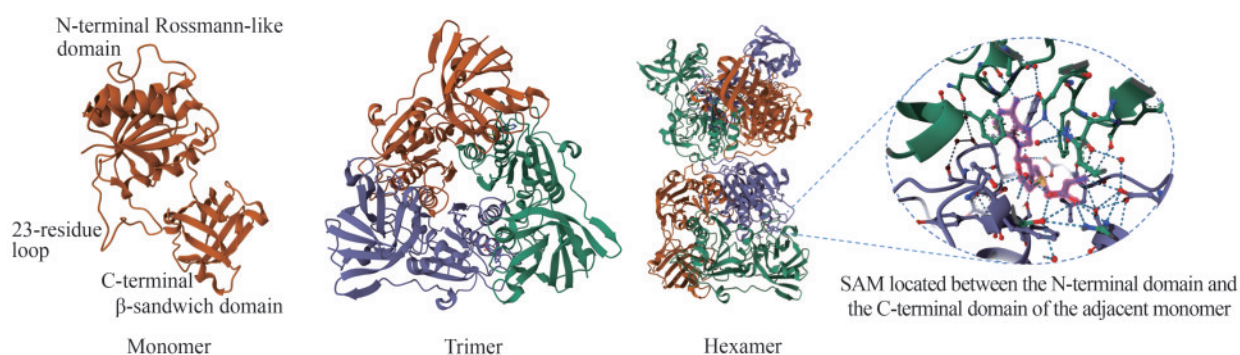
### 3 卤化酶理性设计与改造

研究人员持续发现新的卤化酶, 但现有酶在活性、底物特异性和立体选择性方面存在诸多限制, 难以满足工业需求。因此, 亟需通过人工改造提升其性能。传统的非理性突变方法虽然能够产生多样的变体, 但难以预测其对酶活性和选择性的影响, 且筛选效率较低。为此, 研究者开始结合理性设计与定向进化策略, 通过结构和功能分析精确定位少数关键氨基酸, 以优化卤化酶性能。此外, 利用计算机模拟和高通量筛选等技术, 可以进一步加速卤化酶的进化, 包括优化酶的活性和底物特异性, 同时扩展其对非天然底物的催化能力。

#### 3.1 理性设计提升天然卤化酶综合性能

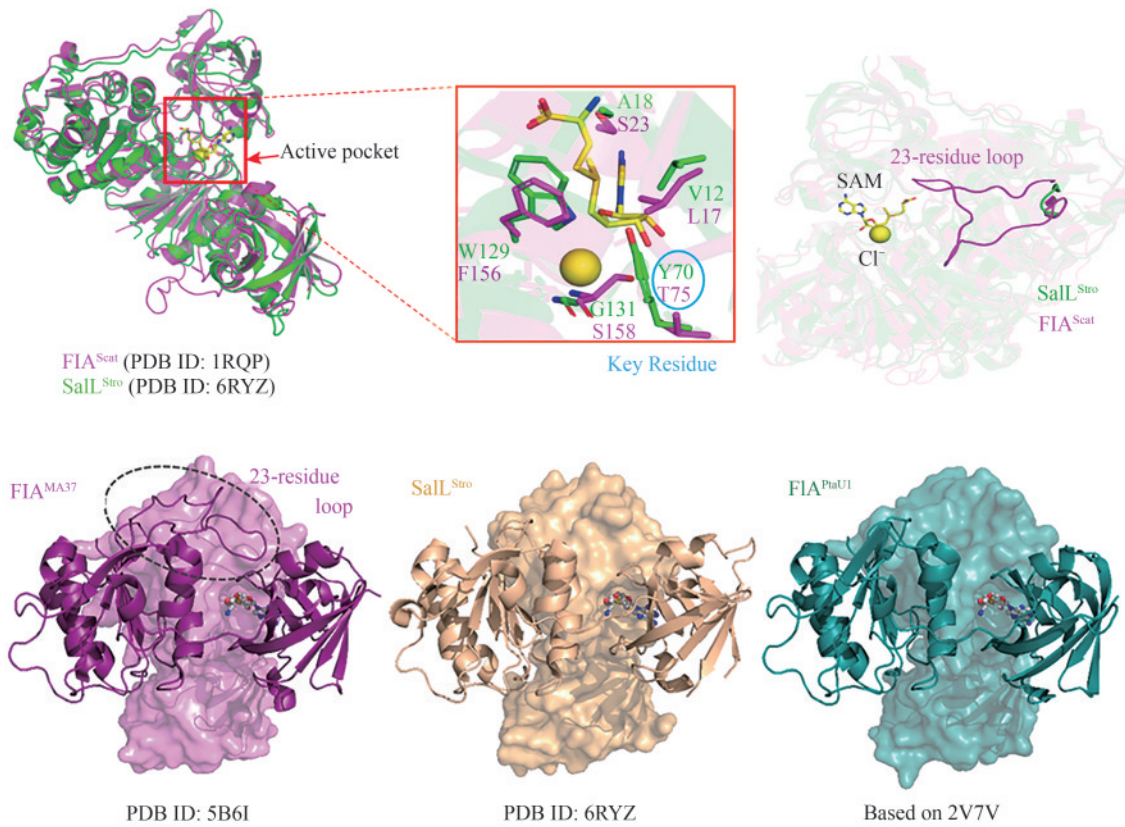
##### 3.1.1 多酶融合提高辅因子再生效率

根据FDH催化机制可知, HOX的生成及转运效率是影响酶催化性能的关键因素。目前, HOX的生成严重依赖辅因子循环再生, 涉及两种外源酶、三种反应以及四种辅酶因子的相互转化, 反应过程复杂 [图6(b)]。为提高HOX生成效率, Liu等<sup>[93]</sup>构建了一个辅酶自给自足的三酶融合体, 并成功应用于L-色氨酸的连续卤化。首先, 鉴定并选择来自*Streptomyces pratensis*的高选择性卤化酶SpFDH。然后, 采用基因融合技术, 将SpFDH与葡萄糖脱氢酶(GDH)和黄素还原酶(FR)融合, 形成了一个三酶融合体, 实现辅酶自给自足, 6-氯色氨酸产率提高了1.46倍。随后, 作者团队还开发了一种将三酶融合体固定化并连接到连续催



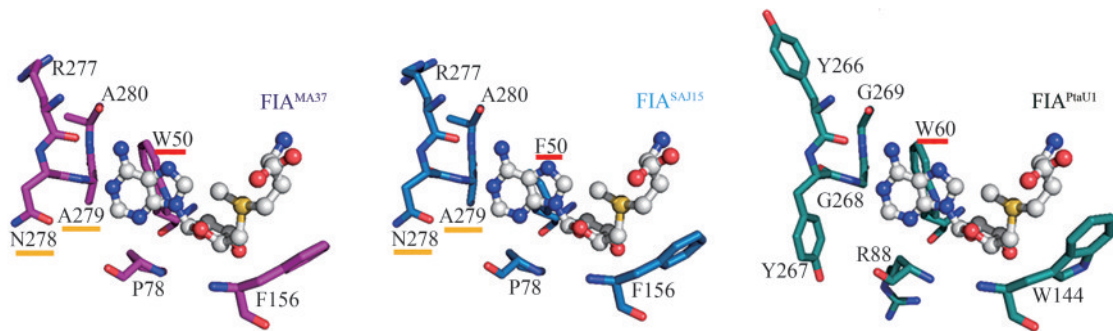
(a) SAM依赖型卤化酶FIA<sup>Scat</sup>三维结构以及催化口袋

(a) The three-dimensional structure and catalytic pocket of the SAM-dependent halogenase FIA<sup>Scat</sup>



(b) 不同 FIA 与氯酶 SalL 的结构对比

(b) Comparison of structures of different FIAs and the chlorinase SalL



(c) 不同来源 FIA 催化口袋关键残基

(红线表示对氟化活性至关重要的残基;黄线表示能与腺嘌呤 C2' 位点修饰基团形成氢键的残基)

(c) The key residues in the catalytic pockets of FIAs from different sources

(The red lines denote the residues essential for fluorination activity; the yellow lines indicate the residues capable of forming hydrogen bonds with the modification groups at the C2' position of adenine.)

图 13 SAM 依赖型卤化酶的典型结构<sup>[84-91]</sup>Fig. 13 The typical structure SAM-dependent halogenase<sup>[84-91]</sup>

化装置上的连续卤化生物工艺, 反应 12 h 后 6-氯色氨酸转化率可达 97.6%。该研究为多酶级联催化制备卤代色氨酸提供了一种简明策略。

### 3.1.2 隧道工程改善酶催化性能

蛋白分子内的隧道是小分子、水分子和离子的潜在运输途径, 在多种蛋白质执行功能过程中

起着重要作用<sup>[94]</sup>。最近, 有报道提到 FDH 内部 10 Å 的隧道区域是以往被忽略的重要功能区, 其氨基酸组成影响 HOX 的转运效率, 可能是 FDH 活力低下的又一重要原因<sup>[95]</sup>。Prakinec 团队<sup>[96]</sup> 近期针对 Thal 蛋白的催化开展系统性研究。通过定向改造 Thal 蛋白内部 10 Å 隧道区域瓶颈处的关键氨

基酸 [图 14(a)], 获得突变体 V82I, 其催化活性 ( $k_{\text{cat}}/K_M$  比值 45 °C 下提升 4 倍) 与热稳定性 ( $T_m$  升高 12 °C) 均显著提升 [图 14(b)]. MD 模拟揭示突变引入的疏水相互作用引发双重效应: ① 调控通道动力学并重构水分子网络, 有效抑制 HOX 泄漏 (HOBr 在隧道停留时间显著延长); ② 诱导 357~360 位点 loop 区构象重排 (8 ns 时与野生型差异显著) [图 14(a)]. 底物谱拓展实验表明, V82I 对具有药用价值的氧吡啶化合物 (3) 的亲合力接近天然底物, 并可高效催化羟基喹啉 (4)、酚类 (6、7) 及芳香醛 (8) 的卤化反应 [图 14(b)]. 该研究证实, 结合计算模拟与实验验证, 可深入解析卤化酶动态催化机制, 为理性设计多功能酶催化剂提供新范式。

### 3.1.3 催化口袋重塑改变底物偏好性

野生型 ActF 可以催化 L-色氨酸的 C5 单溴化 (5-Br-Trp, 43%) 和 C5, C7 二溴化 (5, 7-diBr-Trp, 57%)。Dai 等<sup>[97]</sup> 以晶体结构为指导, 定向改造 ActF 催化口袋, 从而改变了底物偏好性。突变体 D516A 和 S523A 的主要产物仅为单溴化的 5-Br-Trp (95%~98%)。结构分析和生化实验表明, ActF 的杂泛性和二溴化能力可归因于宽敞的底物结合口袋。此外, 底物识别残基与 5-Br-Trp 之间高度调控的相互作用网络对 ActF 的二溴化活性至关重要。这些结果首次揭示了 ScFDH 的催化机理, 为后续 FDH 高效酶工程改造提供了依据。

Jiang 等<sup>[89]</sup> 通过多序列比对及丙氨酸扫描证实 Tyr70 是调控卤素选择性的关键残基。位点饱和实验显示 Y70A/C/S/T/G 突变体均获得氟化功能 (其中 Y70T/W129F 双突变体使 5'-FDA 产量提升 76%)。量子力学/分子力学 (QM/MM) 计算表明, 突变体通过缩短 F 与 SAM-C5' 的亲核距离 ( $\Delta d \approx 0.67 \text{ \AA}$ ) 及降低反应能垒 ( $\Delta G^\ddagger$  由 38.0 kcal/mol 降至 12.0 kcal/mol) 实现氟化功能。值得注意的是, 引入 FIA 中氟离子结合关键残基 Ser158 的突变体 G131S 未表现活性, 提示 SaIL 的卤素选择性主要由 Tyr70 等催化口袋残基的静电微环境调控。

### 3.1.4 二硫化工程增强酶热稳定性

为了扩大卤化酶的应用范围, 需要在稳定性方面进行改进。先前对色氨酸 6-卤化酶 Thal 的研究表明, 耐高温的 Thal 变体倾向于在溶液中形成

二聚体, 而野生型则以单体形式存在。Besse 等<sup>[98]</sup> 利用在线工具 Disulfide by Design 2.0 设计了以二硫键共价连接的 Thal 二聚体变体。与野生型相比, 在二聚体界面引入两个半胱氨酸残基 (Val384C, Ala440C) 形成的突变体 Thal CC 的热稳定性 ( $\Delta T_{50} = 15.7 \text{ K}$ ) 显著提高, 并且催化活性及特异性均未受影响。此外, 通过将同源突变引入色氨酸 5-卤化酶 PyrH, 其热稳定性也进一步增强。因此, 二硫化工程作为一种简单、高效的策略在未来卤化酶改造领域具有广泛应用前景。

近年来, 新的天然卤化酶及其工程化策略不断被发现和开发, 代表了卤化酶改造领域的最新研究进展 (表 3)<sup>[81, 99-103]</sup>。

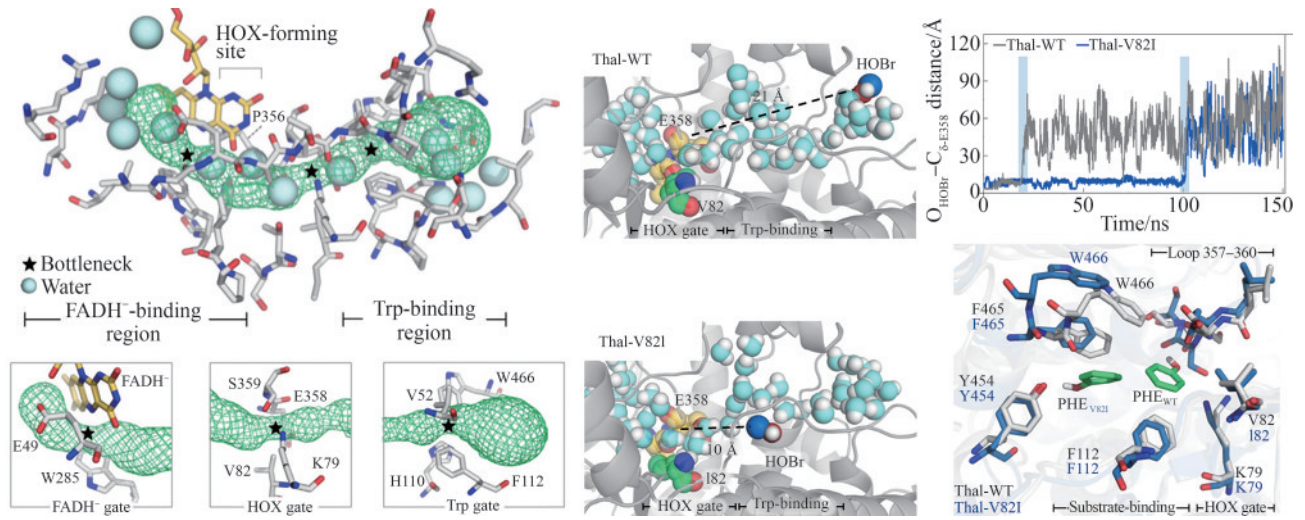
## 3.2 定向进化增强非天然卤化酶卤化活性

### 3.2.1 黄素依赖型单加氧酶催化 C—I 形成

为扩展酶促卤化反应边界, Prakinec 等<sup>[104]</sup> 探索了 FDH 亚家族之外的黄素依赖型单加氧酶潜在的卤化性能。通过液相质谱和停流光谱技术对反应中间体及终产物进行检测, 结果表明一部分单加氧酶 (脱卤酶 HadA、荧光素酶 Lux、对羟基苯乙酸羟化酶 HPAH) 可以生成  $\text{FAD}_{\text{C4a-OOH}}$  并与卤素离子反应产生 HOX, 而吡喃糖 2-氧化酶 (P2O) 和黄素还原酶则通过生成的  $\text{H}_2\text{O}_2$  将卤素离子氧化产生 HOX。虽然, HadA、Lux 和 HPAH 分子内形成 HOX 的机制与天然 FDH 类似, 并以 Thal 为模板对各自催化口袋的关键残基进行替换, 但最终并未检测到卤化产物。所有测试的黄素依赖酶中, 只有 P2O 能够以化学氧化的方式形成 HOX 并生成有机卤化物, 尤其是碘化产物。非天然卤化酶与 Thal 的结构对比分析表明, 催化口袋的形状大小及电势分布是影响卤化反应的关键因素。该项工作是一次大胆的尝试, 黄素依赖型单加氧酶可以作为进一步酶工程的起点, 通过调控活性位点微环境, 实现非天然卤化酶的选择性亲电卤化, 从而为生物卤化提供了新的酶促催化平台。

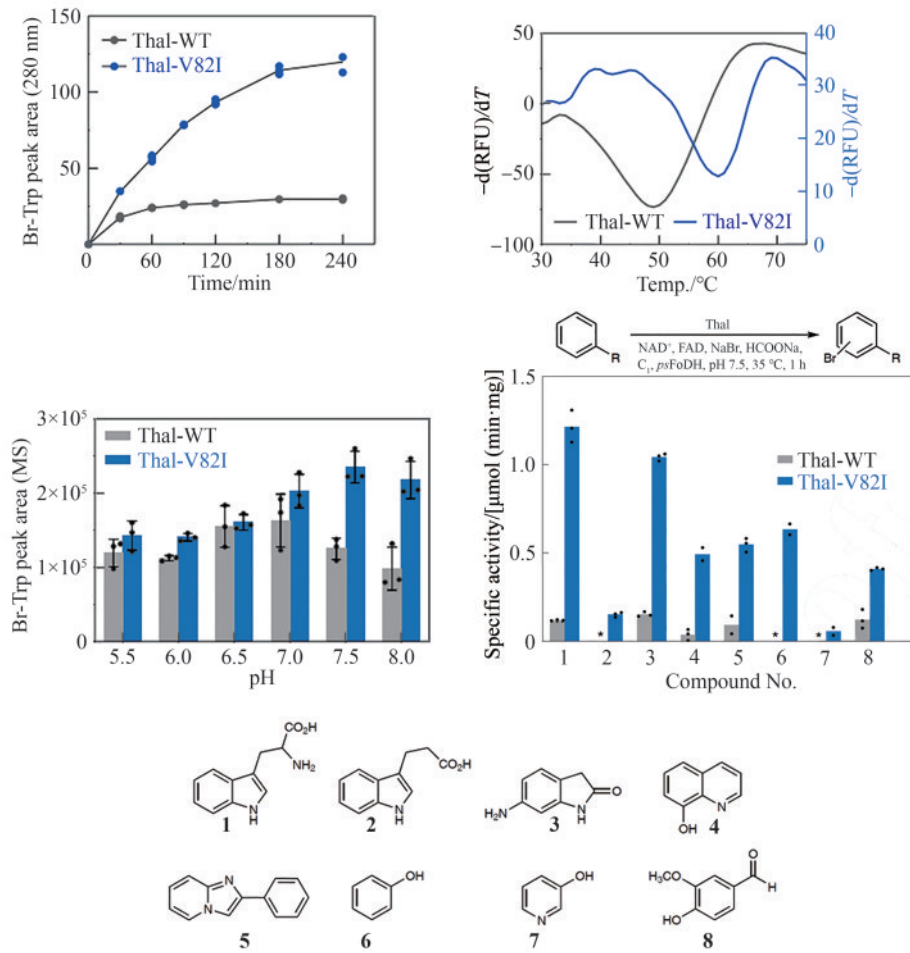
### 3.2.2 非血红素铁金属酶催化 C—F 形成

近年来, 合成有机氟化物的方法取得了显著进展, 但现有的酶促 C—F 键形成方法仅限于亲



(a) Thal隧道瓶颈识别以及MD模拟揭示Thal-V82I突变体结构变化

(a) Tunnel bottleneck identification of Thal and MD simulation reveal structural changes in the Thal-V82I mutant



(b) Thal-V82I突变体催化性能大幅提升

(b) The catalytic performance of the Thal-V82I mutant has been significantly enhanced

图14 隧道工程改善Thal卤化酶的催化性能<sup>[96]</sup>Fig. 14 Tunnel engineering enhances the catalytic performance of Thal halogenase<sup>[96]</sup>

表3 近年来天然卤化酶工程改造的典型实例

Table 3 Typical engineering cases of natural halogenase in recent years

改造策略	技术路线	典型研究案例	酶活改变	动力学参数	文献
反应条件优化	可溶性表达系统； 温度/pH优化	PnC 在最适条件下实现 1 h 内对天然底物的 100% 转化生成氨基吡咯菌素 (APRN)，显著优于化学合成方法 (10% 转化率，副产物大量积累)	>600 倍	$K_M = (14.40 \pm 1.20) \mu\text{mol/L}$ $k_{\text{cat}} = (1.66 \pm 0.02) \text{min}^{-1}$	[99]
定向进化	底物结合口袋及 C 端帽状 区域关键残基定点突变	多位点卤化酶 FasV 通过定点突变实现对底物特异性和区域选择性的可控催化	未提及	$K_M: (24.1 \pm 14.2) \sim (205.9 \pm 124.5) \mu\text{mol/L}$ $k_{\text{cat}}: (11.3 \pm 2.4) \times 10^{-2} \sim (67.2 \pm 25.0) \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$	[100]
计算辅助	序列比对；分子对接； MD 模拟；定点突变	核苷酸卤化酶 C <sub>1</sub> NTH 通过工程化磷酸结合位点关键残基簇 (H247Y)，成功实现底物选择性的定向切换	38 倍	$K_M = (0.23 \pm 0.04) \text{mmol/L}$ $k_{\text{cat}} = (4.1 \pm 0.2) \text{min}^{-1}$	[81]
光催化辅助因子再生	蓝光照射光催化蛋白质内 部氧化型 FAD 还原再生； 时间分辨紫外-可见光谱	W281F 突变使 P <sub>1</sub> mH 的量子转化效率提升 41%，光还原速率接近游离 FADox 的 57.5%，为光催化应用提供了优化方向	未提及	未提及	[101]
机器学习辅助理性设计	智能文库设计； ML 指导虚拟筛选	ML 指导下筛选的 WelO5* VLA 突变体催化大环内酯类非天然底物，TTN 提高 300 倍以上，	>62 倍	$K_M = (0.44 \pm 0.03) \text{mmol/L}$ $k_{\text{cat}} = (1.96 \pm 0.51) \text{min}^{-1}$	[102]
多酶自组装	三酶组装元件构建； 自组装纳米簇 (TESNC)； 固定化	与游离酶相比，TESNC 表现出更高的热稳定性和转化效率，6-Cl-L-Trp 产量增加 2.1 倍；且固定化 TESNC 后，6-Cl-L-Trp 产量进一步提高 4.2 倍	2 倍	$K_M = (42.88 \pm 12.22) \mu\text{mol/L}$ $k_{\text{cat}} = (0.64 \pm 0.03) \text{min}^{-1}$	[103]

核氟化物取代。目前，细菌和古细菌中发现的氟化酶是唯一能将 F 引入有机底物的天然酶<sup>[1, 4, 17]</sup>。虽然已有大量研究致力于天然氟化酶的改造，但其催化活性提升及底物范围扩展十分有限。开发新型酶促反应以形成 C—F 键仍是生物催化和合成生物学中的重要挑战。此外，催化对映选择性 C(sp<sup>3</sup>)—H 氟化仍然是合成化学中的难题<sup>[105-106]</sup>，尽管发现了多种非血红素铁卤化酶促进 C(sp<sup>3</sup>)—H 卤化反应<sup>[4, 107]</sup>，但将其转化为氟化酶的努力尚未成功。

最近，有两个研究组利用定向进化手段分别不同的非血红素铁金属酶中实现了铁催化自由基氟转移反应，即在同一底物分子内将 N—F 键转化为高对映体选择性的 C(sp<sup>3</sup>)—F 键<sup>[108-109]</sup>。虽然，植物来源的 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 (ACCO) 与链霉菌来源的 S-2-羟基丙基磷酸酯环氧酶 (SvHppE) 在序列和结构上具有显著差异，但二者的 Fe 催化中心及与各配体的相互作用使其各自具有初始微弱的氟基转移能力。经过定向进化及反

应条件优化后，六突变体 ACCO<sub>CHF</sub> 和三突变体 SvHppE-Fluor 的氟化性能进一步提升，化学选择性及对映选择性显著改善，能够将多种结构类似底物转化为一系列高对映体选择性的有机氟化物产品 (图 15)。此外，研究者提出了新型酶促 C(sp<sup>3</sup>)—H 氟化反应机制，即氧化还原性质活泼的金属氟基配合物捕获碳中心自由基形成 C—F 键。DFT 计算和 MD 模拟结果显示，N—F 键激活是整个反应的限速步骤，并且在过量 NaN<sub>3</sub> 存在条件下 SvHppE-Fluor 仍强烈偏好催化氟基转移可归因于碳中心自由基与 Fe(III)—F 中间体接近的空间取向和自由基回弹步骤较低的活化能垒。定向进化的非血红素铁氟化酶为手性有机氟化物的生物合成提供了重要工具。金属介导的自由基氟转移作为生物催化 C—F 键形成的一种新机制，也将促进对其他金属酶的工程改造，以实现新型氟化反应。

### 3.2.3 SAM 依赖型羟化酶催化 C—X 形成

Jiang 等<sup>[110]</sup> 从嗜热菌 *Thermotoga martima*

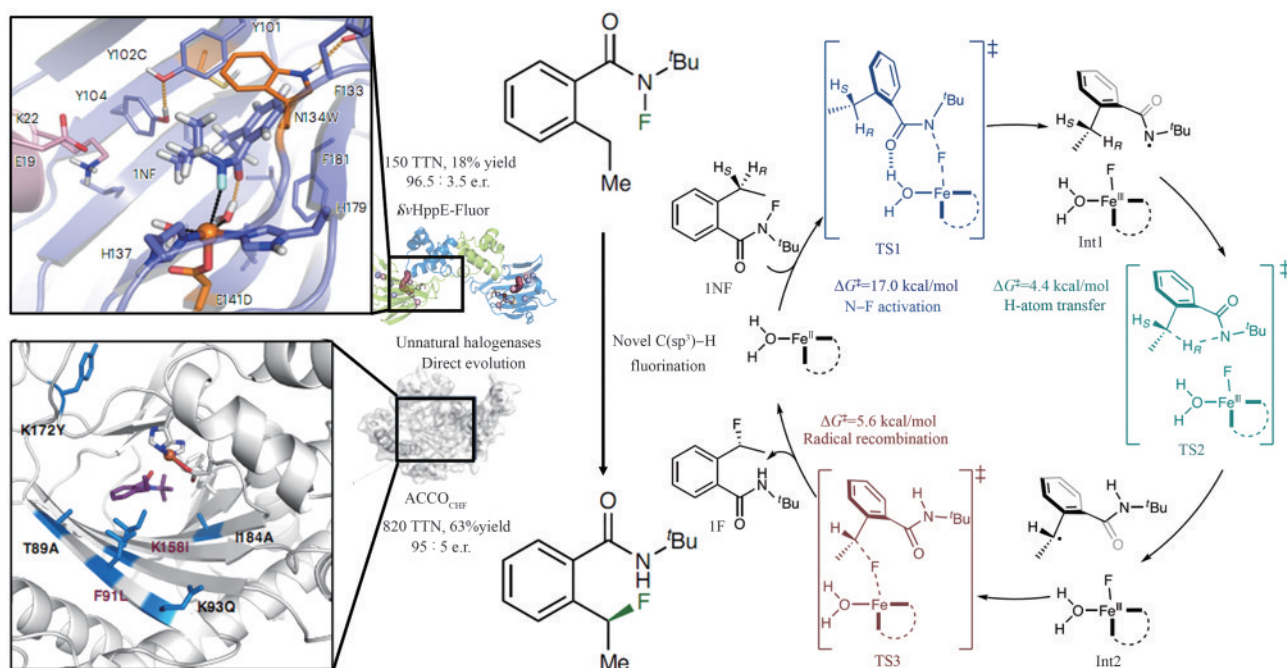


图 15 定向进化提高非血红素铁氧化酶的氟化活性<sup>[108-109]</sup>

Fig. 15 Directed evolution enhances the fluorination activity of non-heme iron oxidase<sup>[108-109]</sup>

MSB8 中纯化得到一种 SAM 依赖的羟基腺苷转移酶 HATase，并通过定点突变 (W8L/V71T) 将其转化为卤化酶。随后，经进一步组合诱变获得了分别对 Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup> 和 I<sup>-</sup> 具有偏好催化活性的突变体 M1、M2 和 M4。其中，M4 突变体在 80 °C 的碘化反应中保持了野生型 HATase 的热稳定性，超过了天然卤化酶 SalL。QM/MM 显示，改变各突变体中活性位点的疏水微环境对不同卤素离子的亲核攻击角度产生微妙的影响，从而导致卤素离子的偏好性。该研究揭示了非天然卤化酶对不同卤素偏好的机制，为今后将羟化酶转化为卤化酶的工程设计提供了新的思路。

### 3.2.4 人工金属酶催化 C—Cl 形成

Yu 等<sup>[111]</sup> 报道了一种人工合成的镍氯酶 (ANCCase)，该酶通过在链霉亲和素 (Sav) 蛋白中锚定与生物素结合的镍基辅因子而获得。所得到的 ANCCase 在多种 C(sp<sup>3</sup>)—H 底物的氯化反应中表现出良好的催化活性。在 X 射线晶体学的指导下，对 ANCCase 中的 Sav 与 Ni 结合区域进行定点突变，其氯化活性得到了显著提高。这一方法为有机中间体的后期功能化提供了新的可能性，并为酶促氯化策略提供了有力补充。

## 4 卤化酶在生物-化学合成中的应用

卤化酶则具备高度的专一性和选择性，可在温和条件下定向引入卤素基团，减少副反应，提高产率和纯度，为有机卤化物的合成提供了替代方案。此外，利用合成生物学手段将卤化酶引入酿酒酵母等工程微生物体系<sup>[112]</sup>，通过下游反应进一步改造修饰卤化中间产物，能够形成结构更为复杂的化合物，已成为分子合成领域新的发展趋势。

### 4.1 卤化酶促进药物前体的合成

Reed 等<sup>[113]</sup> 利用卤化酶偶联下游通路，通过代谢工程和共培养合成体系，安全高效地生成具有工业应用前景的卤化分子。首先研究团队通过不同温度下的色氨酸饲喂试验评估一系列卤化酶在大肠杆菌胞内的卤化特性，包括稳定性、对氯和溴的偏好性等。基于在 30 °C 具有优越的转化能力以及多样化的取代位置/卤素种类选择性，选择了分别卤化色氨酸 C5、C6、C7 位的卤化酶 XsHal、Thal 和 RebH。随后，通过代谢工程策略成功构建了一株高产色氨酸的菌株 (*E. coli* sKR-Trp4)，并

分别引入上述选择的卤化酶形成三种能够产生不同取代位卤化色氨酸的菌株。最后，将卤化色氨酸高产菌株（300~700 mg/L）和表达下游酶的菌株以模块化共培养方式组合，以葡萄糖为底物首次合成了26种不同的卤化分子，其中15种是首次从头生物合成的（图16，绿色及红色框出），6种是全新的天然产物（图16，红色框出）。卤化产物种类包括新型 $\beta$ -咔啉，药物前体4-氯和4-溴-犬尿氨酸，植物激素前体，以及其他药物相关的前体分子，如色胺和吲哚类化合物。该生物催化平台展示了一种生物-化学组合的方法，以新型合成方式生产多种与工业领域相关的卤化物，为后续更多应用打开了大门。

氨基吡咯菌素（APRN）是一种天然卤代苯基吡咯衍生物（HPD），具有很强的抗真菌和抗寄生虫活性，应用前景广阔。Putri等<sup>[114]</sup>在谷氨酸棒状杆菌中构建了多酶级联催化体系，其中卤化酶RebH和PrnC分别选择性催化色氨酸C7位和吡咯环C3位的氯化，从而以葡萄糖为底物从头合成APRN，摇瓶发酵产量可达29.5 mg/L。通过计算建模和位点突变分析，Peh等<sup>[115]</sup>鉴定出吡咯环

化酶PrnC催化口袋中的三个位关键残基。单粒子冷冻电镜分析表明，PrnC在溶液中以二聚体形式存在。除了天然底物以外，PrnC能够选择性卤化结构多样的吡咯类杂环化合物，还可用于杀真菌剂氟咯菌腈的结构类似物的化学-酶促合成。7-氯-4-二甲基烯丙基-L-色氨酸（7-Cl-4-Pren-Trp）片段是克里诺霉素（krisinomycin）的关键组分，对其抗菌活性至关重要。Mowzoon-Mogharrabi等<sup>[116]</sup>报道了一种色氨酸先经C4异戊烯基化再被卤化酶催化C7氯化合成7-Cl-4-Pren-Trp的合成顺序，为克里诺霉素等大环酯肽类物质的生物合成机制提供了重要线索。单萜类吲哚生物碱（MIA）是由大型植物产生的一类天然产物，具有治疗包括癌症、疟疾和高血压等症的潜力。卤化MIA显示出更好的药物性能。然而，新型卤化MIA的合成仍然是一个挑战。Bradley等<sup>[117]</sup>构建了一个在酿酒酵母中从头合成两种MIA [蛇纹石素（serpentine），鸭脚木碱（alstonine）]的平台，并利用该平台系统地探索重构MIA途径生产卤化MIA的生物催化潜力。通过工艺优化和卤化酶的异源表达，实现了从头合成氯化鸭脚木碱。随后，该团队评估了

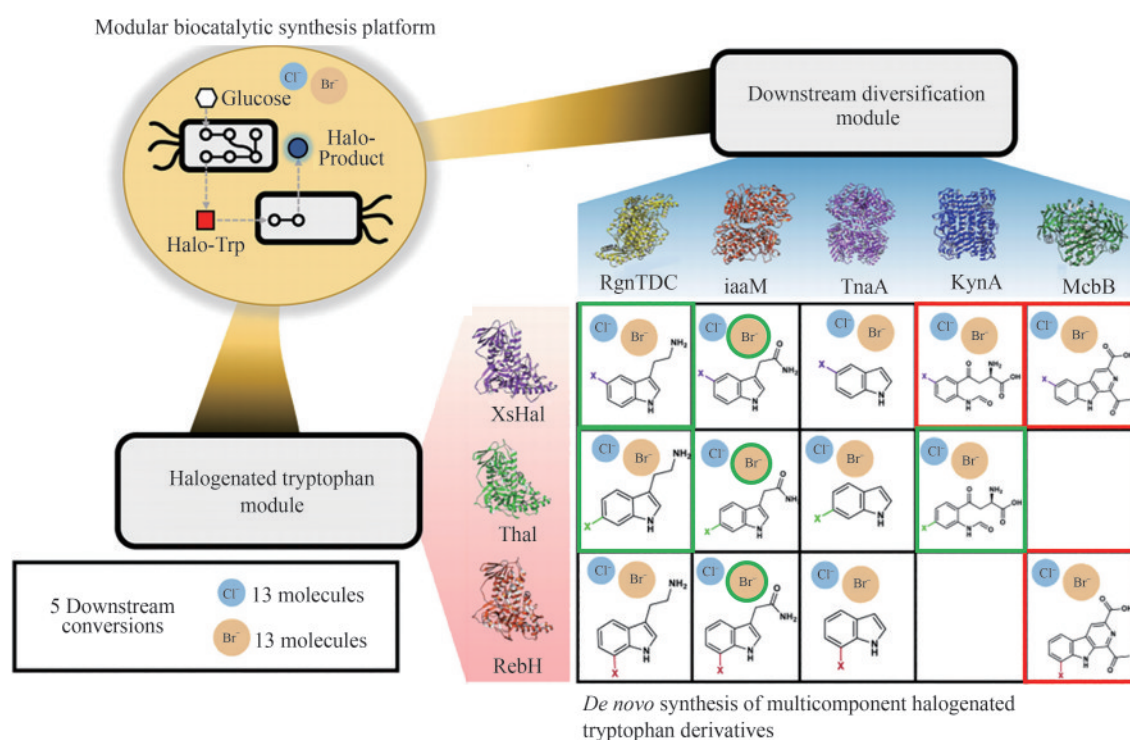


图16 卤化色氨酸衍生物生物催化合成平台<sup>[113]</sup>

Fig. 16 Biocatalytic synthesis platform for halogenated tryptophan derivatives<sup>[113]</sup>

8种色氨酸卤化酶在酿酒酵母中的表达情况，并与生物合成途径共表达从而实现7-氯罗芙素从头合成。

#### 4.2 卤化酶扩展靛蓝染料种类

靛蓝(indigo)是一种天然染料,广泛用于食品、医药和印染工业。通过在靛蓝吡啶环的不同位置添加卤素,可以生成多种有色卤化靛蓝衍生物。其中,提尔紫(Tyrian purple,主要由6,6'-dibromoindigo组成),又称帝王紫,是一种从海螺中提取的古老染料,近期被发现具有生物相容性半导体特性,商业价值可观。然而,由于其生物合成途径不明和区域选择性溴化困难,规模化生产受到限制。为此,Lee等<sup>[118]</sup>设计了一种多酶级联催化系统,利用色氨酸6-卤化酶SttH、色氨酸酶TnaA和黄素单加氧酶MaFMO在大肠杆菌中生产提尔紫。他们通过优化三种酶的催化过程,建立了连续的双细胞反应系统,将色氨酸的溴化与吡啶生成步骤分开,成功获得315.0 mg/L提尔紫,色氨酸转化率为60%。尽管如此,当前的生产方法存在体系复杂、耗时长、成本高等问题,规模化生产仍面临巨大挑战。最近,罗小舟研究团队<sup>[119]</sup>提出了一种简化的一锅法工艺,利用 $\lambda$ pL/pR-cl857热诱导体系分时控制色氨酸优先溴化而非脱羧形成吡啶,从而减少靛蓝副产物的生成。最终,通过优化发酵工艺获得44.5 mg/L提尔紫,转化率达42%。此外,Yi等<sup>[120]</sup>通过序列比对从*Pseudoalteromonas nigrifaciens*中鉴定出一种新型色氨酸6-卤化酶,与SttH的序列匹配度达87%,命名为SttH-nig02。随后将SttH-nig02转入大肠杆菌并建立全细胞催化系统生产卤化靛蓝,最高转化率达32%。新型卤化酶的挖掘与应用有望进一步释放酶促合成卤化靛蓝类染料的潜力。

#### 4.3 卤化酶辅助蛋白质多功能修饰

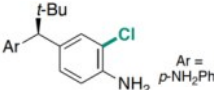
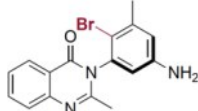
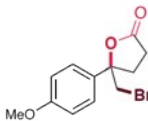
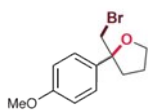
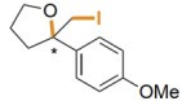
生物正交反应为蛋白修饰提供了灵活且高效的工具,可有效改变蛋白质的功能和性质,并拓展其在生物、化学、医学和材料科学中的应用。卤化酶能够特异性地将卤素原子引入蛋白质,实现精准标记,为后续的改造和修饰提供了明确的

靶点。Montua等<sup>[121]</sup>采用半理性蛋白工程方法获得了色氨酸卤化酶突变体Thal-E461A-N54A-Y454C,能够高效地溴化C端含有色氨酸残基的肽段,其中四肽YNIW的溴化效率最高,将其命名为BromoTrp标签。利用大肠杆菌共表达溴化酶和连接BromoTrp的目标蛋白,通过优化培养和纯化步骤即可实现制备规模的蛋白翻译后溴化。随后,溴标记蛋白在37℃条件下耦联钌纳米颗粒催化的Suzuki-Miyaura反应转变为苯环标记蛋白。该研究证实酶促卤化与过渡金属催化交叉偶联的结合为蛋白修饰提供了一种可行的方法。Guo等<sup>[122]</sup>利用卤化酶异源表达和遗传密码扩展技术成功开发了一种完全自主的大肠杆菌菌株。该菌株能够高效且准确地对色氨酸进行氯化 and 溴化,并将卤化色氨酸整合到目标蛋白中。该研究为合成多种卤化色氨酸的工程蛋白提供了通用平台,扩展了蛋白修饰所用生物正交反应的选择范围。Saha等<sup>[123]</sup>利用核糖体翻译后修饰卤化酶SrpI与Sonogashira反应偶联,在体外实现了肽链的区域选择性溴化标记转化为末端炔标记。该结果表明全新的化学手柄被引入到核糖体肽,包括但不限于末端炔,还可以通过炔叠氮点击化学进一步多样化。肽链中色氨酸特定位置的体外溴化过程无需基因密码的扩展和肽链上其他反应手柄的钝化,凸显了卤化酶在蛋白修饰化学中的便捷性和适用性。

#### 4.4 卤化酶合成多种化工产品及中间体

Lewis课题组一直致力于FDH的定向进化及其在合成应用方面的研究。在过去的几年里,该研究小组针对RebH卤化酶构建了一系列突变体<sup>[124]</sup>,并确定改造后的RebH可以催化包括去对称化反应、阻转选择性卤化和卤代环化反应在内的对映选择性反应(表4),其多样化的卤化产物为后续复杂分子的有机合成提供了丰富的骨架结构<sup>[125-127]</sup>。最近该组研究了单组分黄素依赖的卤化酶ActF的催化性能<sup>[128]</sup>。该酶不仅能选择性地对多种芳香族底物进行位点选择性的溴化和碘化,还能实现含有侧链羧酸或醇取代基的苯乙烯的对映选择性溴内酯化和碘醚化<sup>[129]</sup>。进一步研究表明,ActF能够

表4 FDH催化对映体选择性反应研究实例<sup>[125-127]</sup>Table 4 Examples of FDHs catalyzing enantioselective reactions<sup>[125-127]</sup>

卤化酶	动力学参数	产物	对映体催化类型	对映体比率
RebH 4V	未提及		去对称化反应	99:1
RebH 3-T	$K_M$ : 0.002 mmol/L $k_{cat}$ : 0.03 min <sup>-1</sup>		阻转选择性卤化	>99.5:0.5
RebH 4V+S	$K_M$ : 0.47 mmol/L $k_{cat}$ : 0.36 min <sup>-1</sup>		卤代环化反应	96:4
RebH 4PL	未提及		卤代环化反应	91:9
AetF	未提及		卤代环化反应	99:1

催化多种1,1-二取代苯乙烯的卤化,通常具有较高的立体选择性<sup>[130]</sup>。此外,AetF还能卤化末端炔烃,尽管其催化效率低于JamD和MCE9<sup>[131]</sup>。通过突变体活性测试和氘同位素效应分析,研究支持了AetF通过共价催化机制实现炔烃卤化的假说。这些发现显著拓展了FDH催化的适用范围,并揭示了AetF在生物催化中的独特功能。

多卤化官能团在天然产物和药物中具有广泛存在,但选择性多卤化非活化C—H键仍面临挑战。NHFe/ $\alpha$ KGH为解决这一问题提供了新思路。Wilson等<sup>[132]</sup>利用SyrB2酶催化非天然底物 $\alpha$ -氨基丁酸(Aba)的卤化,成功合成了单氯、二氯和三氯产物。特别值得注意的是,三氯产物的产量达到前所未有的数量级。这项研究还证实了SyrB2在多溴化反应中的应用潜力,并揭示了底物C—C键在催化位点的转动自由度对控制卤化程度的关键作用。这些结果表明,NHFe/ $\alpha$ KGH在多位点C—H功能化方面具有重要应用前景。

非特异性过氧酶(UPO)因其高稳定性和高活性,已成为选择性氧化反应领域的重要工具。与之结构相似的氯过氧化物酶(CPO)提示了UPO可能具有卤化功能。Barber等<sup>[133]</sup>研究证明,

通过调节pH值可控制UPO的卤化或氧化选择性。在pH 3.0和6.0条件下,分别实现了芳香化合物(如百里香酚)的溴化和氧化。该系统在100 mg制备规模下实现了60%~72%的溴化产物收率。在4-乙基苯甲醚的溴化-氧合级联反应中,通过中途调节pH值(从3.0调整至6.0),成功合成了溴化-氧合产物1-(3-溴-4-甲氧基苯基)乙醇和3-溴-4-甲氧基苯乙酮,总转化率达到82%。

#### 4.5 卤化酶在工业合成中的应用潜力

制药企业在工业生物催化技术发展表现出强烈的前瞻性。早在2017年,诺华公司(Novartis AG)和先正达公司(Syngenta AG)便与苏黎世应用科学大学生物催化能力中心(CCBIO)展开合作,共同探索卤化酶工程改造在农业化学品及药物分子骨架卤化中的应用潜力<sup>[134]</sup>。近年来,酶促卤化技术的研发已成为化工、印染、农化等各个领域的关键技术需求。通过持续的基础研究积累,卤化酶技术取得了显著进展,部分研究成果展现出良好的工业化应用前景,相关技术的具体应用案例及关键数据分析如表5所示。

表5 近期卤化酶潜在工业化应用案例及关键数据

卤化酶	技术路线	生产工艺或优化策略	生产规模	产品种类及产量	文献
RebH	异源共表达色氨酸酶/卤化酶/脱羧酶; 谷氨酸棒状杆菌底盘	补料分批发酵	2 L	7-溴色胺: 0.36 g/L	[135]
RebH 3-LSR	偶联 L-氨基酸脱氨酶(L-AAD) 构建 FAD/FADH <sub>2</sub> 再生系统	纯酶或全细胞催化的 7-氯色氨酸和吲哚丙酮酸(IPA)的联合生产	5L	7-Cl-Trp: 170 mg/L IPA: 193 mg/L	[136]
Thal	构建具有磷酸基脱氢酶和黄素还原酶活性的双功能融合酶用于 FAD 辅酶再生; 共表达融合酶、卤化酶及双加氧酶; 多酶固定化	在单次培养条件下, 高效实现一锅式固定化酶级联反应, 用于大规模连续生产神经药物前药 L-4-氯犬尿氨酸(L-4-Cl-Kyn)及其非天然类似物 L-4-溴犬尿氨酸(L-4-Br-Kyn)	2.5 L	L-4-Cl-Kyn: 701 mg L-4-Br-Kyn: 805 mg	[137]
RebH	卤化酶催化的卤代反应与钼催化的氰化反应相结合以及随后与腈水合酶或腈水解酶进行级联反应	生物-化学交叉偶联催化用于区域选择性碳氢键官能化以合成腈、酰胺和羧酸等基团, 实现药物分子的克级制备	30 mL~1 L	芳酰胺类化合物 <b>8a</b> : 1.98g	[127]
PrnA					
SttH					
PyrH					
WeiO5*及其突变体	算法辅助的理性设计与改造	异源表达卤化酶; 细胞裂解液催化广谱抗真菌剂索拉芬 A (sorafenin A) 等大环内酯类化合物的卤化	2 L	氯化索拉芬 <b>2a</b> (总转化数): 91.8±22.0	[102]

## 5 总结与展望

当前, 卤化酶研究领域已取得许多显著进展(图 17), 包括酶库容量的不断增长, 催化性能的持续改善, 反应机制的逐步揭示以及应用范围的大幅扩展, 在药物合成、染料制备及有机化工等领域展现出独特潜力。

然而, 现阶段卤化酶的实际应用仍面临多重瓶颈, 主要体现在以下四方面:

① 催化多样性不足。天然卤化酶的底物谱系存在显著局限性, 尤以氟化酶最为突出: SAM 依赖型 FIA 仅催化特定腺苷衍生物<sup>[83-92]</sup>, 人工改造的

Fe 依赖型卤化酶虽实现部分对映选择性, 但其催化范围仍局限于同一底物内的位点转换<sup>[108-109]</sup>。酶促 C—F 键合成的核心挑战源于需同时克服氟离子去溶剂化与高能过渡态形成的能量壁垒, 以及精确调控底物攻击路径的立体化学约束, 这些因素共同限制了其广谱催化能力。

② 催化机制动态解析薄弱。自由基卤化酶的金属中心动态行为(如 Fe 配位几何翻转时序)缺乏高精度表征手段<sup>[70-76]</sup>。现有研究多基于静态结构推测催化过程, 活性中心微环境(氢键网络、静电势分布)在反应各阶段的动态协同规律尚未明确。



图 17 卤化酶研究领域代表性研究进展

Fig. 17 Representative research progress in the field of halogenase research

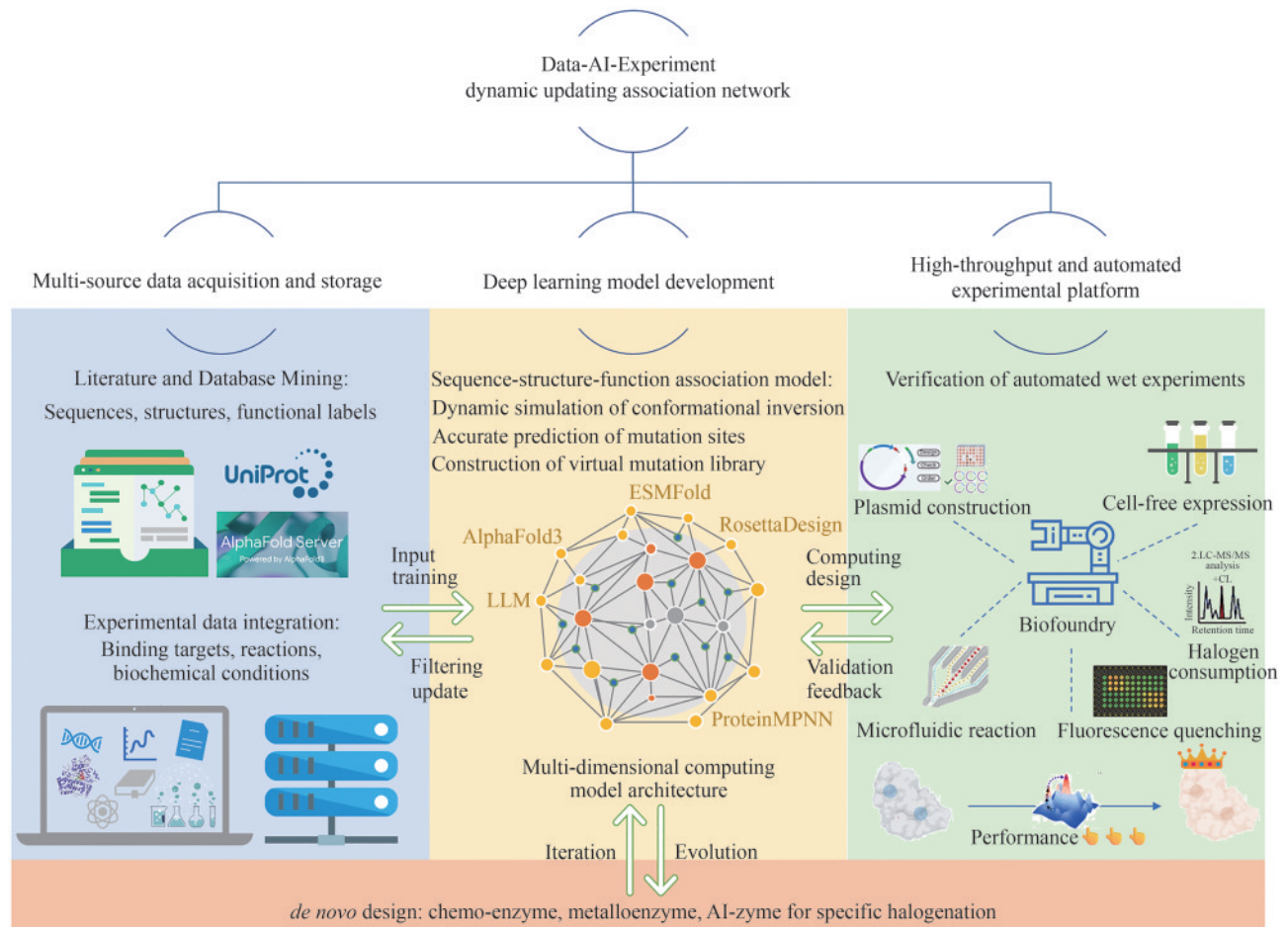
③ 辅酶再生效率限制。黄素依赖型卤化酶的FAD/FADH<sub>2</sub>循环效率低下，成为级联反应的限速步骤<sup>[61-69]</sup>。传统融合酶策略受电子传递损耗制约<sup>[93, 101, 136-137]</sup>，而新型光电/电化学再生体系与卤化酶的匹配度仍有待验证。

④ 工业化应用适配性挑战。生物来源的卤化酶在非生理条件下（高底物浓度、有机溶剂、极端pH）易发生不可逆失活，现有固定化策略虽提升热稳定性，但传质阻力导致活性大幅衰减<sup>[103, 137]</sup>，难以满足可持续生产需求。

传统酶工程策略（如定向进化、理性设计）受限于机理认知不足与实验通量限制，难以系统性解决上述挑战。近年来，AI/ML技术的快速发展为卤化酶研究提供了全新范式。通过整合多维度数据（序列、结构、反应）与先进算法，AI/ML技术有望突破传统经验驱动的研究局限，推动卤

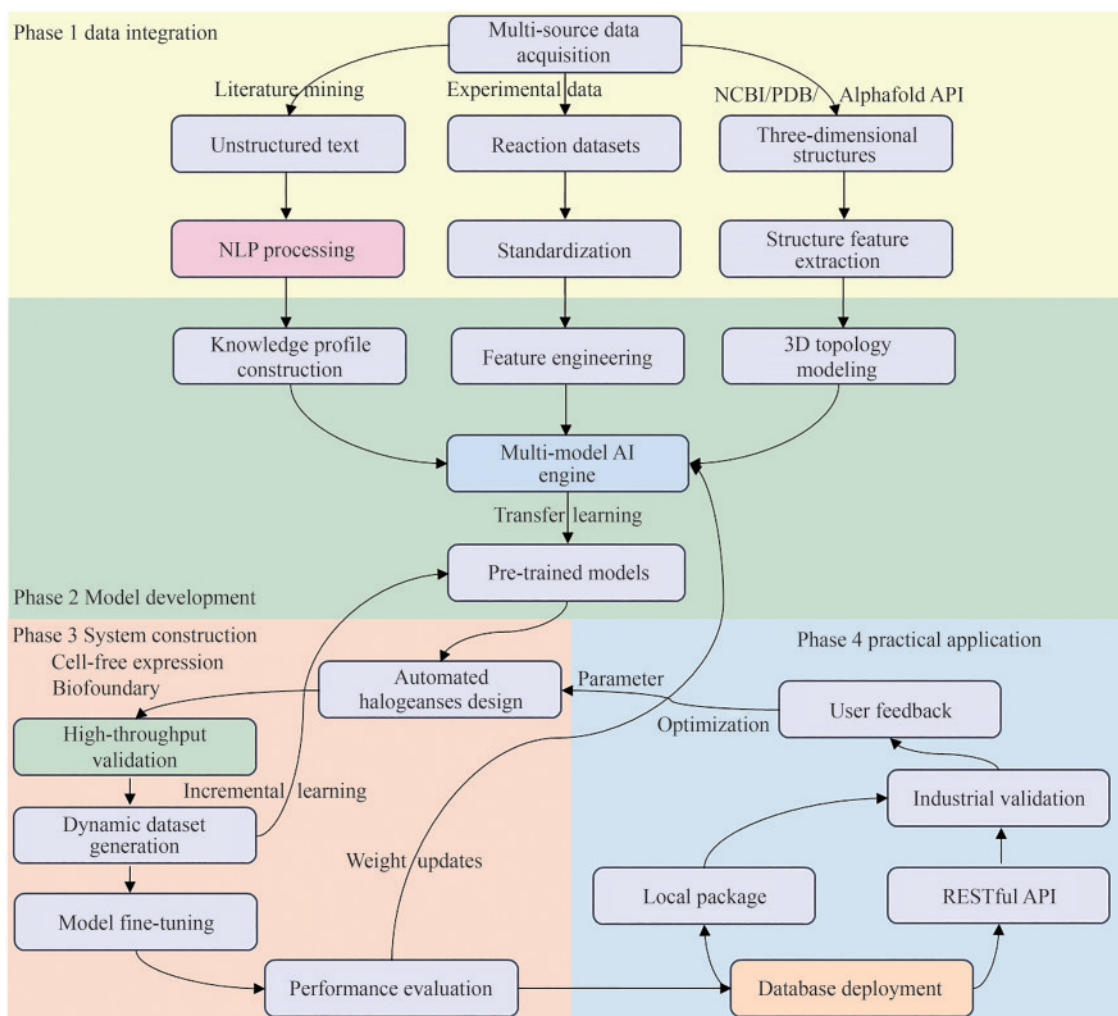
化酶研究进入新阶段，实现从基因挖掘、结构设计到工业适配的全链条智能化改造。结合当下发展趋势<sup>[143-156]</sup>，本文提出一种基于AI/ML的多模态计算框架[图18(a)]，旨在通过跨学科大数据的整合、处理与分析<sup>[157-161]</sup>，为卤化酶的理性设计与功能优化提供系统性支持：

(1) 卤化酶基因智能挖掘 AI/ML技术通过整合大规模基因组数据与生物信息学方法，正在革新卤化酶基因资源的开发模式[图18(b)]。基于深度学习的预训练模型高效识别天然产物生物合成基因簇（BGC）中的保守序列特征（如铜结合基序HXXHC、FADH<sub>2</sub>结合基序GxGxxG等），精准定位潜在卤化酶基因位点。针对氟/碘化酶稀缺性问题<sup>[23, 30, 89-91]</sup>，迁移学习策略通过共享氟化酶与碘化酶的序列-结构-功能特征，构建卤素特异性分类模型，提升新型C—F/C—I键催化酶的筛选效



(a) 人工智能驱动的卤化酶进化平台

(a) AI-driven halogenase evolution platform



(b) 建立AI核心的卤化酶进化数据库的一般策略

(b) General strategy for establishing an AI-centric database for halogenase evolution

图 18 AI/ML 驱动卤化酶智能进化<sup>[143-161]</sup>Fig. 18 AI/ML drives the intelligent evolution of halogenase<sup>[143-161]</sup>

率。未来需开发跨物种基因表达谱的对比学习框架，解析底物结合域的演化规律，为卤化酶多样性挖掘提供新范式。

(2) 动态机制的多尺度解析 AI/ML 技术通过融合多模态数据与计算模拟，突破传统静态表征的局限性。基于强化学习的动态路径反演框架，可整合原位光谱数据（如 X 射线吸收近边结构、表面增强拉曼光谱、快速动力学停流光谱等），实时重构催化中间体的纳秒级演变轨迹。图神经网络（GNN）通过分析 MD 轨迹与 QM/MM 能量曲面，揭示活性中心配体的协同构象变化（如 Fe-His 键长波动）。进一步结合量子化学驱动的深度势能模型，实现 C—X 键形成的临界几何参数（攻击角

度、能垒阈值、静电强度等）的精确解析，为广谱催化位点的理性设计提供理论支撑。

(3) 卤化酶定向进化与从头设计 AI/ML 技术通过生成式设计与多目标优化策略，推动卤化酶工程从经验驱动迈向理性设计范式。基于深度学习的蛋白质生成模型（如 LigandMPNN、RFDiffusionAA 及 AlphaFold3 等）围绕预设催化过渡态构建功能性酶骨架<sup>[143, 153-154, 156]</sup>，突破天然底物限制。蛋白质语言模型（如 ProteinMPNN）通过序列-结构映射关系优化活性口袋的拓扑构型<sup>[155]</sup>，提升底物结合特异性与催化效率。此外，多目标优化算法通过平衡酶稳定性、底物谱兼容性及其催化活性等竞争性参数，指导全局最优突变组合的筛选。未来需

开发基于主动学习的适应性进化框架，与 RosettaMatch、Combs、Riff-Diff 等从头设计算法对接<sup>[157]</sup>，动态探索酶适应度景观的高活性区域，实现催化功能的精准定制及从头设计。

(4) 工业催化系统的适配性优化 AI/ML 技术为卤化酶的工业应用提供系统性解决方案。基于机器学习的耐受性预测模型通过分析残基理化性质（如溶剂可及性、氢键网络密度），筛选耐受极端反应条件（高 pH、有机溶剂）的酶突变体。强化学习算法通过动态调节 pH、温度及底物流速，优化连续流反应器的过程控制精度。多酶级联路径的智能规划工具整合代谢通量分析与过渡态能垒评估，自主生成高效催化序列组合。此外，AI 驱动的界面设计策略可优化酶固定化载体的电荷互补性，提升传质效率与操作稳定性，为规模化生产奠定基础。最终，跨学科数据平台通过整合序列-结构-动力学-工艺参数，构建标准化训练集，推动卤化酶设计从经验驱动向“预测-验证”范式的转型。

综上所述，ML 和 AI 从数据层面深入解析卤化酶的结构信息和催化机制，并结合先进实验技术，共同推动卤化酶的“智能进化”以及多元卤化衍生产品的“智能合成”，将成为卤化酶研究领域最具潜力的发展方向之一。卤化酶广阔的应用前景已经显现，未来有望在新药研发、化学品制造、生物材料创制等领域发挥日益重要的作用。这需要化学、生物学、工程学、计算机科学等多个学科的通力合作。因此，相关科研人员应及时掌握该领域的新概念、新算法和新成果，加强合作，促进学科交叉，共同应对可持续发展带来的机遇和挑战。

## 参 考 文 献

- [1] LATHAM J, BRANDENBURGER E, SHEPHERD S A, et al. Development of halogenase enzymes for use in synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 232-269.
- [2] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [3] XU Z J, YANG Z, LIU Y T, et al. Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014, 54(1): 69-78.
- [4] CROWE C, MOLYNEUX S, SHARMA S V, et al. Halogenases: a palette of emerging opportunities for synthetic biology-synthetic chemistry and C—H functionalisation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(17): 9443-9481.
- [5] SUN C H, MA B D, LI G J, et al. Engineering the substrate specificity of a P450 dimerase enables the collective biosynthesis of heterodimeric tryptophan-containing diketopiperazines[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(25): e202304994.
- [6] YAN X L, ZHANG J, TAN H Q, et al. A pair of atypical KAS III homologues with initiation and elongation functions program the polyketide biosynthesis in asukamycin[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(19): e202200879.
- [7] CHRÉTIEN J M, ZAMMATTIO F, LE GROGNEC E, et al. Polymer-supported organotin reagents for regioselective halogenation of aromatic amines[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70(7): 2870-2873.
- [8] INKPEN M S, DU S R, DRIVER M, et al. Oxidative purification of halogenated ferrocenes[J]. *Dalton Transactions*, 2013, 42(8): 2813-2816.
- [9] CANTILLO D, KAPPE C O. Halogenation of organic compounds using continuous flow and microreactor technology [J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2017, 2(1): 7-19.
- [10] HENDERSON S H, WEST R A, WARD S E, et al. Metal-free selective mono-halodecarboxylation of heteroarenes under mild conditions[J]. *Royal Society Open Science*, 2018, 5(6): 180333.
- [11] PAUNOVIĆ V, PÉREZ-RAMÍREZ J. Catalytic halogenation of methane: a dream reaction with practical scope? [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(17): 4515-4530.
- [12] BERGER G, FRANGVILLE P, MEYER F. Halogen bonding for molecular recognition: new developments in materials and biological sciences[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(37): 4970-4981.
- [13] MINGES H, SEWALD N. Recent advances in synthetic application and engineering of halogenases[J]. *ChemCatChem*, 2020, 12(18): 4450-4470.
- [14] CROS A, ALFARO-ESPINOZA G, DE MARIA A, et al. Synthetic metabolism for biohalogenation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 74: 180-193.
- [15] SENN H M. Insights into enzymatic halogenation from computational studies[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2014, 2: 98.
- [16] RUIZ-CASTILLO P, BUCHWALD S L. Applications of palladium-catalyzed C—N cross-coupling reactions[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(19): 12564-12649.
- [17] MENON B R K, RICHMOND D, MENON N. Halogenases for biosynthetic pathway engineering: toward new routes to

- naturals and non-naturals[J]. *Catalysis Reviews*, 2022, 64(3): 533-591.
- [18] JIANG Y H, LEWIS J C. Asymmetric catalysis by flavin-dependent halogenases[J]. *Chirality*, 2023, 35(8): 452-460.
- [19] ANDORFER M C, LEWIS J C. Understanding and improving the activity of flavin-dependent halogenases *via* random and targeted mutagenesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2018, 87: 159-185.
- [20] BÜCHLER J, PAPADOPOULOU A, BULLER R. Recent advances in flavin-dependent halogenase biocatalysis: sourcing, engineering, and application[J]. *Catalysts*, 2019, 9(12): 1030.
- [21] ZENG J, ZHAN J X. Chlorinated natural products and related halogenases[J]. *Israel Journal of Chemistry*, 2019, 59(5): 387-402.
- [22] COCHEREAU B, MESLET-CLADIÈRE L, POUCHUS Y F, et al. Halogenation in fungi: what do we know and what remains to be discovered?[J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3157.
- [23] LUDEWIG H, MOLYNEUX S, FERRINHO S, et al. Halogenases: structures and functions[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 65: 51-60.
- [24] 郑哲麟, 胡文达, 何亚文. 微生物卤化酶及其应用研究进展[J]. *微生物前沿*, 2020, 9(4): 141-155.  
ZHENG Z L, HU W D, HE Y W. Research progress in microbial halogenases and their industrial applications[J]. *Advances in Microbiology*, 2020, 9(4): 141-155.
- [25] 王汇滨, 车昌丽, 游松. Fe/α-酮戊二酸依赖型卤化酶在绿色卤化反应中的研究进展[J]. *合成生物学*, 2022, 3(3): 545-566.  
WANG H B, CHE C L, YOU S. Recent advances of enzymatic synthesis of organohalogen catalyzed by Fe/αKG-dependent halogenases[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(3): 545-566.
- [26] YEH E, BLASIAK L C, KOGLIN A, et al. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(5): 1284-1292.
- [27] FLECK S, PATALLO E, ZHU X F, et al. New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(49): 9533-9536.
- [28] SHAW P D, HAGER L P. Biological chlorination. IV. peroxidative nature of enzymatic chlorination [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1959, 81(24): 6527-6528.
- [29] JEON J, LEE J, JUNG S M, et al. Genomic determinants encode the reactivity and regioselectivity of flavin-dependent halogenases in bacterial genomes and metagenomes[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e00053-21.
- [30] GKOTSI D S, LUDEWIG H, SHARMA S V, et al. A marine viral halogenase that iodates diverse substrates[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(12): 1091-1097.
- [31] SMITH D R M, URIA A R, HELFRICH E J N, et al. An unusual flavin-dependent halogenase from the metagenome of the marine sponge *Theonella swinhoei* WA[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(5): 1281-1287.
- [32] NEUBAUER P R, PIENKNY S, WESSJOHANN L, et al. Predicting the substrate scope of the flavin-dependent halogenase BrvH[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(22): 3282-3288.
- [33] LAVECCHIA A, FOSSO B, ENGELEN A H, et al. Macroalgal microbiomes unveil a valuable genetic resource for halogen metabolism[J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): 47.
- [34] FISHER B F, SNODGRASS H M, JONES K A, et al. Site-selective C—H halogenation using flavin-dependent halogenases identified *via* family-wide activity profiling[J]. *ACS Central Science*, 2019, 5(11): 1844-1856.
- [35] BÖHRINGER N, KRAMER J C, DE LA MORA E, et al. Genome- and metabolome-guided discovery of marine BamA inhibitors revealed a dedicated darobactin halogenase[J]. *Cell Chemical Biology*, 2023, 30(8): 943-952.e7.
- [36] REN Y X, LIU R Y, ZHENG Y F, et al. Biosynthetic mechanism of the yellow pigments in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain T1lg65[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(2): e01779-23.
- [37] SOUSA T F, DE ARAÚJO JÚNIOR M B, PERES E G, et al. Discovery of dual PKS involved in sclerotiorin biosynthesis in *Penicillium meliponae* using genome mining and gene knockout[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(2): 75.
- [38] TENEBRO C P, TRONO D J V L, BALIDA L A P, et al. Synergy between genome mining, metabolomics, and bioinformatics uncovers antibacterial chlorinated carbazole alkaloids and their biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tubbatahanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Sulu Sea, Philippines[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e03661-22.
- [39] PANTER F, BADER C D, MÜLLER R. The sandarazols are cryptic and structurally unique plasmid-encoded toxins from a rare myxobacterium[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(15): 8081-8088.
- [40] HUANG X L, LI D, LONG B, et al. Activation of a silent gene cluster from the endophytic fungus *Talaromyces* sp. uncovers cryptic azaphilone metabolites[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(28): 15801-15810.
- [41] WANG Z C, LO I W, LIN K H, et al. Genetic and biochemical characterization of halogenation and drug transportation genes encoded in the albofungin biosynthetic gene cluster[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(17): e00806-22.
- [42] LUO M N, WANG M Y, CHANG S S, et al. Halogenase-targeted genome mining leads to the discovery of (±) pestalachlorides A1a, A2a, and their atropisomers[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(10): 1304.
- [43] HASAN N S, LING J G, ABU BAKAR M F, et al. The

- lichen flavin-dependent halogenase, DnHal: identification, heterologous expression and functional characterization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(11): 6708-6736.
- [44] REN M, LI Z, WANG Z X, et al. Antiviral chlorinated drimane meroterpenoids from the fungus *Talaromyces pinophilus* LD-7 and their biosynthetic pathway[J]. Journal of Natural Products, 2024, 87(8): 2034-2044.
- [45] ZHAO C H, YAN S, LI Q, et al. An Fe<sup>2+</sup>- and  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent halogenase acts on nucleotide substrates[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(24): 9478-9484.
- [46] NI J, ZHUANG J Y, SHI Y M, et al. Discovery and substrate specificity engineering of nucleotide halogenases[J]. Nature Communications, 2024, 15: 5254.
- [47] BAUMGARTNER J T, MCKINNIE S M K. Regioselective halogenation of lavanducyanin by a site-selective vanadium-dependent chloroperoxidase[J]. Organic Letters, 2024, 26(27): 5725-5730.
- [48] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49 (D1): D480-D489.
- [49] JIANG K, CHEN X, YAN X L, et al. An unusual aromatase/cyclase programs the formation of the phenyldimethylanthrone framework in anthrabenzoxocinones and fasamycin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2024, 121(11): e2321722121.
- [50] RADIVOJAC P, CLARK W T, ORON T R, et al. A large-scale evaluation of computational protein function prediction[J]. Nature Methods, 2013, 10(3): 221-227.
- [51] YU T H, CUI H Y, LI J C, et al. Enzyme function prediction using contrastive learning[J]. Science, 2023, 379(6639): 1358-1363.
- [52] ADAK S, MOORE B S. Cryptic halogenation reactions in natural product biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2021, 38(10): 1760-1774.
- [53] VAILLANCOURT F H, YEH E, VOSBURG D A, et al. Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis[J]. Nature, 2005, 436 (7054): 1191-1194.
- [54] GU L C, WANG B, KULKARNI A, et al. Metamorphic enzyme assembly in polyketide diversification[J]. Nature, 2009, 459(7247): 731-735.
- [55] YAMANAKA K, RYAN K S, GULDER T A M, et al. Flavoenzyme-catalyzed atropo-selective N, C-bipyrrole homocoupling in marinopyrrole biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(30): 12434-12437.
- [56] MARCHAND J A, NEUGEBAUER M E, ING M C, et al. Discovery of a pathway for terminal-alkyne amino acid biosynthesis[J]. Nature, 2019, 567(7748): 420-424.
- [57] NAKAMURA H, HAMER H A, SIRASANI G, et al. Cyliindrocyclophane biosynthesis involves functionalization of an unactivated carbon center[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(45): 18518-18521.
- [58] NAKAMURA H, SCHULTZ E E, BALSUS E P. A new strategy for aromatic ring alkylation in cyliindrocyclophane biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(8): 916-921.
- [59] GLASSER N R, CUI D T, RISSER D D, et al. Accelerating the discovery of alkyl halide-derived natural products using halide depletion[J]. Nature Chemistry, 2024, 16(2): 173-182.
- [60] REED K B, D'OELSCHITZ S, BROOKS S M, et al. Fluorescence-based screens for engineering enzymes linked to halogenated tryptophan[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13 (4): 1373-1381.
- [61] DONG C J, KOTZSCH A, DORWARD M, et al. Crystallization and X-ray diffraction of a halogenating enzyme, tryptophan 7-halogenase, from *Pseudomonas fluorescens*[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004, 60(8): 1438-1440.
- [62] MORI S, PANG A H, THAMBAN CHANDRIKA N, et al. Unusual substrate and halide versatility of phenolic halogenase PltM[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1255.
- [63] EL GAMAL A, AGARWAL V, DIETHELM S, et al. Biosynthesis of coral settlement cue tetrabromopyrrole in marine bacteria by a uniquely adapted brominase-thioesterase enzyme pair[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(14): 3797-3802.
- [64] PODZELINSKA K, LATIMER R, BHATTACHARYA A, et al. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 397(1): 316-331.
- [65] AGARWAL V, EL GAMAL A A, YAMANAKA K, et al. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(8): 640-647.
- [66] ADAK S, LUKOWSKI A L, SCHÄFER R J B, et al. From tryptophan to toxin: nature's convergent biosynthetic strategy to aetokthonotoxin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(7): 2861-2866.
- [67] MINGES H. Engineering of halogenases towards synthetic applications: increasing the thermostability and investigations on a marine brominase Bmp5[M/OL]. Wiesbaden: Springer Spektrum Wiesbaden, 2017[2024-12-01]. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-18410-0>.
- [68] GÄFFE S, NIEMANN H H. Structural basis of regioselective tryptophan dibromination by the single-component flavin-

- dependent halogenase ActF[J]. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 2023, 79(7): 596-609.
- [69] BARKER R D, YU Y Q, DE MARIA L, et al. Mechanism of action of flavin-dependent halogenases[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(24): 15352-15360.
- [70] DAI L H, ZHANG X, HU Y M, et al. Structural and functional insights into a nonheme iron- and  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent halogenase that catalyzes chlorination of nucleotide substrates [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(9): e02497-21.
- [71] WILSON R H, CHATTERJEE S, SMITHWICK E R, et al. Role of secondary coordination sphere residues in halogenation catalysis of non-heme iron enzymes[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(17): 10913-10924.
- [72] LI R N, CHEN S L. Mechanism for the halogenation and azidation of lysine catalyzed by non-heme iron BesD enzyme [J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2022, 17(17): e202200438.
- [73] KASTNER D W, NANDY A, MEHMOOD R, et al. Mechanistic insights into substrate positioning that distinguish non-heme Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent halogenases and hydroxylases[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(4): 2489-2501.
- [74] PAPADOPOULOU A, MEYER F, BULLER R M. Engineering Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent halogenases and desaturases [J]. *Biochemistry*, 2023, 62(2): 229-240.
- [75] ZWICK C R III, RENATA H. Overview of amino acid modifications by iron- and  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent enzymes [J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(7): 4853-4865.
- [76] SMITHWICK E R, WILSON R H, CHATTERJEE S, et al. Electrostatically regulated active site assembly governs reactivity in nonheme iron halogenases[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(20): 13743-13755.
- [77] KISSMAN E N, KIPOUROU I, SLATER J W, et al. Dynamic metal coordination controls chemoselectivity in radical halogenases[J]. *bioRxiv*, 2024: 2024.09.19.613983.
- [78] KISSMAN E N, NEUGEBAUER M E, SUMIDA K H, et al. Biocatalytic control of site-selectivity and chain length-selectivity in radical amino acid halogenases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(12): e2214512120.
- [79] KULIK H J, DRENNAN C L. Substrate placement influences reactivity in non-heme Fe(II) halogenases and hydroxylases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(16): 11233-11241.
- [80] ZHANG J Y, LI Y F, YUAN W L, et al. Conformational isomerization of the Fe(III)-OH species enables selective halogenation in carrier-protein-independent halogenase BesD and hydroxylase-evolved halogenase[J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(12): 9342-9353.
- [81] CHIANG C Y, OHASHI M, LE J, et al. Copper-dependent halogenase catalyses unactivated C-H bond functionalization [J]. *Nature*, 2025, 638(8049): 126-132.
- [82] O'HAGAN D, SCHAFFRATH C, COBB S L, et al. Biosynthesis of an organofluorine molecule[J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 279.
- [83] DONG C J, HUANG F L, DENG H, et al. Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme[J]. *Nature*, 2004, 427(6974): 561-565.
- [84] EUSTÁQUIO A S, POJER F, NOEL J P, et al. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(1): 69-74.
- [85] DENG H, O'HAGAN D. The fluorinase, the chlorinase and the duf-62 enzymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, 12(5): 582-592.
- [86] BUTLER A, SANDY M. Mechanistic considerations of halogenating enzymes[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 848-854.
- [87] O'HAGAN D, DENG H. Enzymatic fluorination and biotechnological developments of the fluorinase[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(2): 634-649.
- [88] PARDO I, BEDNAR D, CALERO P, et al. A nonconventional archaeal fluorinase identified by *in silico* mining for enhanced fluorine biocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(11): 6570-6577.
- [89] JIANG Y X, YAO M D, NIU H R, et al. Enzyme engineering renders chlorinase the activity of fluorinase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(2): 1203-1212.
- [90] LOWE P T, LÜDDECKE I, O'HAGAN D. Exploring fluorinase substrate tolerance at C-2 of SAM[J]. *ChemBioChem*, 2025, 26(1): e202400861.
- [91] HE K, YAN Y, FENG S T, et al. Two fluorinases prioritized from protein families of fluorinase, SAM-dependent chlorinase and hydroxide adenosyltransferase[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2025, 23(2): 318-322.
- [92] LIN Y Q, XUE W Q, LI H C, et al. Advances in enzymatic incorporation of small fluorine modules[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2024, 27(17): e202400003.
- [93] LIU H Y, QIAN F, ZHANG H M, et al. Tri-enzyme fusion of tryptophan halogenase achieves a concise strategy for coenzyme self-sufficiency and the continuous halogenation of L-tryptophan[J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(4): 2300557.
- [94] KOKKONEN P, BEDNAR D, PINTO G, et al. Engineering enzyme access tunnels[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107386.
- [95] PHINTHA A, PRAKINEE K, JARUWAT A, et al. Dissecting the low catalytic capability of flavin-dependent halogenases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100068.
- [96] PRAKINEE K, PHINTHA A, VISITSATTHAWONG S, et al. Mechanism-guided tunnel engineering to increase the efficiency of a flavin-dependent halogenase[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(6): 534-544.

- [97] DAI L H, LI H, DAI S, et al. Structural and functional insights into the self-sufficient flavin-dependent halogenase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 260: 129312.
- [98] BESSE C, NIEMANN H H, SEWALD N. Increasing the stability of flavin-dependent halogenases by disulfide engineering[J]. *ChemBioChem*, 2024, 25(1): e202300700.
- [99] GEBAUER J, PIETRUSZKA J, CLASSEN T. Expression and characterization of PrnC—a flavin-dependent halogenase from the pyrrolnitrin biosynthetic pathway of *Pseudomonas protegens* Pf-5[J]. *Frontiers in Catalysis*, 2023, 3: 1231765.
- [100] HU Y, PENG S Y, MA X Y, et al. Functional characterization and molecular basis of a multi-site halogenase in naphthacemycin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(7): e202418843.
- [101] DIEPOLD N, REESE F, PRIOR T, et al. Balance between photoreduction efficiency, cofactor affinity, and allosteric coupling of halogenase flavoenzymes[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2025, 24(1): 37-51.
- [102] BÜCHLER J, MALCA S H, PATSCH D, et al. Algorithm-aided engineering of aliphatic halogenase WelO5\* for the asymmetric late-stage functionalization of soraphens[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 371.
- [103] LIU H Y, NING P, QIAN F, et al. Protein scaffold-mediated multi-enzyme self-assembly and ordered co-immobilization of flavin-dependent halogenase-coenzyme cycle system for efficient biosynthesis of 6-Cl-L-Trp[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2025, 122(2): 395-404.
- [104] PRAKINEE K, LAWAN N, PHINTHA A, et al. On the mechanisms of hypohalous acid formation and electrophilic halogenation by non-native halogenases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(24): e202403858.
- [105] SZPERA R, MOSELEY D F J, SMITH L B, et al. The fluorination of C—H bonds: developments and perspectives[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(42): 14824-14848.
- [106] LEIBLER I N M, GANDHI S S, TEKLE-SMITH M A, et al. Strategies for nucleophilic C(sp<sup>3</sup>)-(radio)fluorination[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(18): 9928-9950.
- [107] HAYASHI T, LIGIBEL M, SAGER E, et al. Evolved aliphatic halogenases enable regiocomplementary C—H functionalization of a pharmaceutically relevant compound[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(51): 18535-18539.
- [108] ZHAO L P, MAI B K, CHENG L D, et al. Biocatalytic enantioselective C(sp<sup>3</sup>)-H fluorination enabled by directed evolution of non-haem iron enzymes[J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(8): 967-975.
- [109] ZHAO Q, CHEN Z H, SOLER J, et al. Engineering non-haem iron enzymes for enantioselective C(sp<sup>3</sup>)-F bond formation via radical fluorine transfer[J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(8): 958-966.
- [110] JIANG Y X, YAO M D, FENG J Q, et al. Molecular insights into converting hydroxide adenosyltransferase into halogenase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(22): 12685-12695.
- [111] YU K, ZHANG K L, JAKOB R P, et al. An artificial nickel chlorinase based on the biotin-streptavidin technology[J]. *Chemical Communications*, 2024, 60(14): 1944-1947.
- [112] MILNE N, SÁEZ-SÁEZ J, NIELSEN A M, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the *de novo* production of halogenated tryptophan and tryptamine derivatives[J]. *ChemistryOpen*, 2023, 12(4): e202200266.
- [113] REED K B, BROOKS S M, WELLS J, et al. A modular and synthetic biosynthesis platform for *de novo* production of diverse halogenated tryptophan-derived molecules[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 3188.
- [114] PUTRI V R M, JUNG M H, LEE J Y, et al. Fermentative aminopyrrolnitrin production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 147.
- [115] PEH G R, TAY T, TAN L L, et al. Site-selective chlorination of pyrrolic heterocycles by flavin dependent enzyme PrnC[J]. *Communications Chemistry*, 2024, 7: 7.
- [116] MOWZON-MOGHARRABI R, STOUT C N, RENATA H. Chemoenzymatic synthesis of 7-chloro-4-dimethylallyl-L-tryptophan, a fragment of krisynomycin[J]. *Tetrahedron*, 2024, 162: 134127.
- [117] BRADLEY S A, LEHKA B J, HANSSON F G, et al. Biosynthesis of natural and halogenated plant monoterpene indole alkaloids in yeast[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(12): 1551-1560.
- [118] LEE J C, KIM J W, SONG J E, et al. Production of Tyrian purple indigoid dye from tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(1): 104-112.
- [119] LI F F, CHEN Q, DENG H X, et al. One-pot selective biosynthesis of Tyrian purple in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 100-109.
- [120] YI B, LEE B W, YU K, et al. Production of halogenated indigo by *Escherichia coli* whole-cell conversion system with novel halogenase derived from *Pseudoalteromonas nigrifaciens*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2024, 29(5): 806-814.
- [121] MONTUA N, THYE P, HARTWIG P, et al. Enzymatic peptide and protein bromination: the BromoTrp tag[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(5): e202314961.
- [122] GUO Y M, CHENG L Q, HU Y, et al. Biosynthesis of halogenated tryptophans for protein engineering using genetic code expansion[J]. *ChemBioChem*, 2024, 25(20): e202400366.

- [123] SAHA N, VIDYA F N U, XIE R, et al. Halogenase-assisted alkyne/aryl bromide sonogashira coupling for ribosomally synthesized peptides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(44): 30009-30013.
- [124] PAYNE J T, POOR C B, LEWIS J C. Directed evolution of RebH for site-selective halogenation of large biologically active molecules[J]. *Angewandte Chemie*, 2015, 127(14): 4300-4304
- [125] MONDAL D, FISHER B F, JIANG Y H, et al. Flavin-dependent halogenases catalyze enantioselective olefin halocyclization[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3268.
- [126] SNODGRASS H M, MONDAL D, LEWIS J C. Directed evolution of flavin-dependent halogenases for site- and atroposelective halogenation of 3-aryl-4(3*H*)-quinazolinones *via* kinetic or dynamic kinetic resolution[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(36): 16676-16682.
- [127] CRAVEN E J, LATHAM J, SHEPHERD S A, et al. Programmable late-stage C—H bond functionalization enabled by integration of enzymes with chemocatalysis[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 385-394.
- [128] JIANG Y H, SNODGRASS H M, ZUBI Y S, et al. The single-component flavin reductase/flavin-dependent halogenase ActF is a versatile catalyst for selective bromination and iodination of arenes and olefins[J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 134(51): e202214610.
- [129] JIANG Y H, MONDAL D, LEWIS J C. Expanding the reactivity of flavin dependent halogenases toward olefins *via* enantioselective intramolecular haloetherification and chemoenzymatic oxidative rearrangements[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(21): 13501-13505.
- [130] JIANG Y H, KIM A, OLIVE C, et al. Selective C—H halogenation of alkenes and alkynes using flavin-dependent halogenases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(13): e202317860.
- [131] LUKOWSKI A L, HUBERT F M, NGO T E, et al. Enzymatic halogenation of terminal alkynes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(34): 18716-18721.
- [132] WILSON R H, CHATTERJEE S, SMITHWICK E R, et al. Controllable multi-halogenation of a non-native substrate by SyrB2 iron halogenase[J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(17): 13209-13218.
- [133] BARBER V, MIELKE T, CARTWRIGHT J, et al. Unspecific peroxygenase (UPO) can be tuned for oxygenation or halogenation activity by controlling the reaction pH[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2024, 30(40): e202401706.
- [134] BÜCHLER J, HEGARTY E, SCHROER K, et al. A collaborative journey towards the late-stage functionalization of added-value chemicals using engineered halogenases[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2023, 106(1): e202200128.
- [135] KERBS A, BURGARDT A, VELDMANN K H, et al. Fermentative production of halogenated tryptophan derivatives with *Corynebacterium glutamicum* overexpressing tryptophanase or decarboxylase genes[J]. *ChemBioChem*, 2022, 23(9): e202200007.
- [136] HOU Y, ZHAO W Y, DING X C, et al. Co-production of 7-chloro-tryptophan and indole pyruvic acid based on an efficient FAD/FADH<sub>2</sub> regeneration system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(15): 4873-4885.
- [137] MONTUA N, SEWALD N. Extended biocatalytic halogenation cascades involving a single-polypeptide regeneration system for diffusible FADH<sub>2</sub>[J]. *ChemBioChem*, 2023, 24(22): e202300478.
- [138] HILLWIG M L, LIU X Y. A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(11): 921-923.
- [139] AGARWAL V, MOORE B S. Enzymatic synthesis of polybrominated dioxins from the marine environment[J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(9): 1980-1984.
- [140] FRESE M, SEWALD N. Enzymatic halogenation of tryptophan on a gram scale[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(1): 298-301.
- [141] SHARMA S V, TONG X X, PUBILL-ULLDEMOLINS C, et al. Living GenoChemetics by hyphenating synthetic biology and synthetic chemistry *in vivo*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 229.
- [142] LIU M T, OHASHI M, HUNG Y S, et al. AoiQ catalyzes geminal dichlorination of 1,3-diketone natural products[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(19): 7267-7271.
- [143] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [144] WEI G Z, DUAN B R, ZHOU T P, et al. A nucleobase-driven P450 peroxidase system enables regio- and stereo-specific formation of C—C and C—N bonds[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(46): e2412890121.
- [145] BAEK M Y, ANISHCHENKO I, HUMPHREYS I R, et al. Efficient and accurate prediction of protein structure using RoseTTAFold2 [EB/OL]. *bioRxiv*, 2023: 2023.05.24.542179. (2023-05-25)[2024-12-01]. <https://doi.org/10.1101/2023.05.24.542179>.
- [146] ANISHCHENKO I, KIPNIS Y, KALVET I, et al. Modeling protein-small molecule conformational ensembles with ChemNet [EB/OL]. *bioRxiv*, 2024: 2024.09.25.614868. (2024-09-25)[2024-12-01]. <https://doi.org/10.1101/2024.09.25.614868>.
- [147] ZHANG Z X, SHEN W X, LIU Q, et al. Efficient generation of protein pockets with PocketGen[J]. *Nature Machine Intelligence*, 2024, 6(11): 1382-1395.
- [148] MUELLERS S N, ALLEN K N, WHITTY A. MEnTaT: a

- machine-learning approach for the identification of mutations to increase protein stability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(49): e2309884120.
- [149] WANG T, HE X H, LI M Y, et al. Ab initio characterization of protein molecular dynamics with AI<sup>2</sup>BMD[J]. Nature, 2024, 635(8040): 1019-1027.
- [150] KORTEMME T. *De novo* protein design-from new structures to programmable functions[J]. Cell, 2024, 187(3): 526-544.
- [151] YE H A H W, NORN C, KIPNIS Y, et al. *De novo* design of luciferases using deep learning[J]. Nature, 2023, 614(7949): 774-780.
- [152] WANG J, LISANZA S, JUERGENS D, et al. Scaffolding protein functional sites using deep learning[J]. Science, 2022, 377(6604): 387-394.
- [153] WATSON J L, JUERGENS D, BENNETT N R, et al. *De novo* design of protein structure and function with RFdiffusion[J]. Nature, 2023, 620(7976): 1089-1100.
- [154] KRISHNA R, WANG J, AHERN W, et al. Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom[J]. Science, 2024, 384(6693): eadl2528.
- [155] DAUPARAS J, ANISHCHENKO I, BENNETT N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN[J]. Science, 2022, 378(6615): 49-56.
- [156] DAUPARAS J, LEE G R, PECORARO R, et al. Atomic context-conditioned protein sequence design using LigandMPNN[J]. Nature Methods, 2025, 22: 717-723.
- [157] ZHOU J X, ZHANG B, LI G W, et al. An AI agent for fully automated multi-omic analyses[J]. Advanced Science, 2024, 11(44): 2407094.
- [158] MERLICEK L P, NEUMANN J, LEAR A, et al. AI.zymes-a modular platform for evolutionary enzyme design [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, 64(27): e202507031.
- [159] ZHANG Q, CHEN W Y, QIN M, et al. Integrating protein language models and automatic biofoundry for enhanced protein evolution[J]. Nature Communications, 2025, 16: 1553.
- [160] LANDWEHR G M, BOGART J W, MAGALHAES C, et al. Accelerated enzyme engineering by machine-learning guided cell-free expression[J]. Nature Communications, 2025, 16: 865.
- [161] HUANG H Z, SHI X G, LEI H Y, et al. ProtChat: an AI multi-agent for automated protein analysis leveraging GPT-4 and protein language model[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2025, 65(1): 62-70.



**通讯作者:** 王钦宏(1974—),男,研究员,博士生导师。研究方向为微生物的进化与代谢工程,高性能微生物细胞工厂构建,芳香族化学品工业化生产等。  
E-mail: wang\_qh@tib.cas.cn



**第一作者:** 王明鹏(1988—),男,博士后。研究方向为酶资源挖掘及定向进化。  
E-mail: qsdwmp2018@qfmu.edu.cn;  
wangmp@tib.cas.cn