

· 综述 ·

多功能氧化酶莨菪碱 6 β -羟化酶的研究进展

陈曦^{1,2*}, 吴洽庆^{1,2}, 朱敦明^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

陈曦, 吴洽庆, 朱敦明. 多功能氧化酶莨菪碱 6 β -羟化酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2786-2796.

CHEN Xi, WU Qiaqing, ZHU Dunming. Research progress of the multifunctional oxidase scopolamine 6 β -hydroxylase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2786-2796.

摘要: 2-酮戊二酸/Fe²⁺依赖的双加氧酶能够实现复杂结构化合物 sp³ 杂化 C-H 键的官能化反应, 并且反应条件温和, 对底物具有高度的区域和立体选择性。莨菪碱 6 β -羟化酶(hyoscyamine 6 β -hydroxylase, H6H)属于此类双加氧酶, 是催化合成东莨菪碱的最后两步的关键酶, 能够依次实现莨菪碱的 6 β -羟化和 6,7 位的环氧化反应。本文介绍了莨菪碱 6 β -羟化酶催化机制、底物谱和应用进展, 对该酶转化不同结构特点底物的羟化、环氧化等反应的潜在能力进行了评估, 为后续对酶的设计改造和应用研究提供理论基础。

关键词: 2-酮戊二酸/Fe²⁺依赖的双加氧酶; 莨菪碱 6 β -羟化酶; 催化机制; 底物谱

Research progress of the multifunctional oxidase scopolamine 6 β -hydroxylase

CHEN Xi^{1,2*}, WU Qiaqing^{1,2}, ZHU Dunming^{1,2}

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: 2-ketoglutarate (2-KG)/Fe²⁺-dependent dioxygenases can catalyze the highly specific regio- and stereoselective functionalization of C(sp³)-H bond of complex compounds under mild reaction conditions. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H), a member of these dioxygenases, catalyzes two consecutive oxidation reactions in the synthesis of scopolamine. The first reaction is the hydroxylation of hyoscyamine to 6 β -hydroxyhyoscyamine and the second is epoxidation of 6 β -hydroxyhyoscyamine. This paper introduces the catalytic mechanism, substrate scope, and

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102000).

*Corresponding author. E-mail: chen_x@tib.cas.cn

Received: 2024-02-18; Accepted: 2024-05-29; Published online: 2024-05-31

application of H6H and evaluates the possibility of this enzyme as a biocatalyst for the functionalization of C(sp³)-H bond in complex compounds with different structural characteristics *via* hydroxylation or epoxidation, providing a theoretical basis for modification and application of this enzyme.

Keywords: 2-ketoglutarate/Fe²⁺-dependent dioxygenase; hyoscyamine 6 β -hydroxylase; catalytic mechanism; substrate scope

Sp³ 杂化 C-H 键是常见的高键能化学键, 具有很强的反应惰性, 在温和条件下将 C-H 键活化是有机合成中极具挑战性的一类反应。随着生物技术的发展, 生物催化实现 sp³ 杂化 C-H 键活化的报道越来越多, 不同于化学催化, 生物催化反应往往能够在温和的反应条件下实现复杂结构化合物 sp³ 杂化 C-H 键的区域和立体专一性官能化反应, 但是生物催化剂具有高度底物专一性的特点, 使得生物催化反应的底物结构普适性较差^[1-3]。随着生物信息学、酶结构预测、定向进化以及机器学习等技术的快速发展, 生物催化剂的来源更为丰富, 生物催化剂被改造为适用于不同天然底物结构化合物的报道也越来越多, 生物催化技术的应用范围日益广泛^[4-9]。

2-酮戊二酸/Fe²⁺依赖双加氧酶(EC 1.14.11.X), 参与了丰富多样的次级代谢物的合成, 能够实现 sp³ 杂化 C-H 键羟化、卤化、环化、去饱和、环氧化和差向异构等一系列的转化反应^[10]。在 2-酮戊二酸/Fe²⁺依赖双加氧酶家族中, 莨菪碱 6 β -羟化酶(hyoscyamine 6 β -hydroxylase, H6H,

EC 1.14.11.11)是少数能够实现多种催化反应类型的酶, 其催化的天然转化反应如图 1 所示, 首先催化 L-莨菪碱的 6 位羟化生成山莨菪碱(6 β -hydroxyhyoscyamine), 随后催化山莨菪碱形成具有环氧结构的东莨菪碱(scopolamine)。H6H 是托品烷类生物碱合成途径中的最后一个酶, 也是限速酶, 主要与东莨菪碱的生物合成相关。本文综述了该酶的发现、催化机理、底物谱及在合成应用上的进展, 以期探讨该酶发展成为一类在 C-H 键官能化方面潜在的多功能酶催化剂的可能性。

1 莨菪碱 6 β -羟化酶(H6H)的发现及来源

莨菪碱 6 β -羟化酶是在托品烷类生物碱生物合成途径的解析过程中被发现的, Hashimoto 等^[11]最早从茄科植物天仙子(*Hyoscyamus niger* L.)根部的培养液中分离了 HnH6H, 通过转化反应确定了其催化莨菪碱羟化为山莨菪碱的功

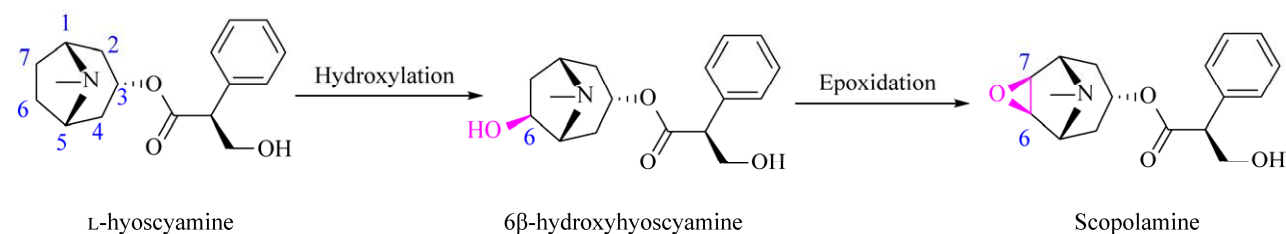


图 1 莨菪碱 6 β -羟化酶催化的莨菪碱的转化反应

Figure 1 Hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) catalyzed the oxidation reaction of hyoscyamine.

能。随后, 研究人员分别在茄科植物山莨菪 (*Anisodus tanguticus*)^[12]、中国传统中药三分三 (*Anisodus acutangulus*)、茄科西班牙安达卢西亚颠茄 (*Atropa baetica* Willk)^[13]、颠茄 (*Atropa belladonna*)^[14]、茄科洋金花 (*Datura metel*)^[15] 和红花木曼陀罗 (*Brugmansia sanguinea*)^[16] 中发现了 *h6h* 基因并且确定了其氧化莨菪碱为山莨菪碱的催化性能。另外还在草本曼陀罗属植物内生真菌中发现了 *h6h* 基因, 该基因与植物的 *h6h* 基因序列完全一致^[17]。

2 莨菪碱 6 β -羟化酶的结构及反应机制

对已经确定功能的莨菪碱 6 β -羟化酶进行

氨基酸序列比对, 结果如图 2 所示, 不同来源的 H6H 氨基酸序列一致性较高, 且均具有 His-X-Asp/Glu-Xn-His 的保守序列, 此保守序列是与金属离子配位的特征序列^[18]。目前 PDB 数据库中仅有两个不同来源的 H6H 晶体结构: 来源于 *D. metel* 的 *DmH6H* (PDB ID: 6TTM, 6TTN, 6TTO)^[19] 和来源于 *A. belladonna* 的 *AbH6H* (*AbH6H* 与金属离子和化合物的复合物晶体结构 PDB ID: 8CV8, 8CV9, 8CVA-H), 这两个酶的晶体结构中均有部分氨基酸残基缺失。本课题组利用 AlphaFold2^[20] 预测了 *AbH6H* 的蛋白质结构, 并与 PDB 中的晶体结构进行了比较(图 3A)。*AbH6H* 具有 2-酮戊二酸/亚铁离子依赖双加氧酶特征的由双链 β 片层折叠构成的桶状结构, 由晶

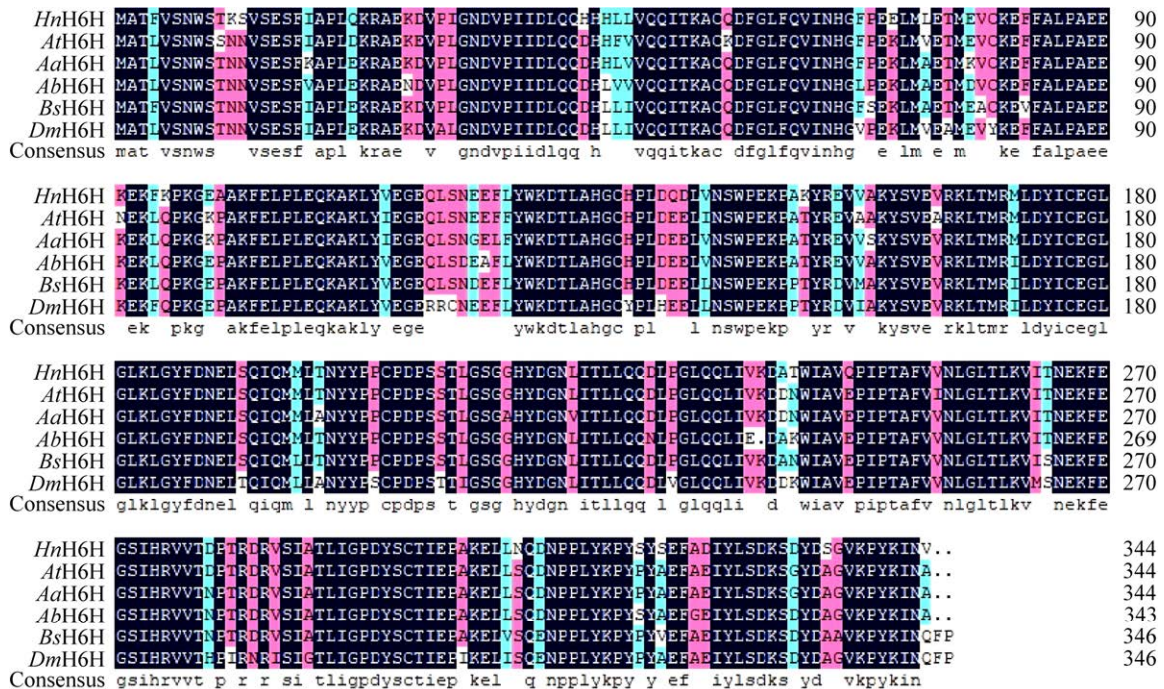


图 2 不同来源的 H6H 氨基酸序列比对

Figure 2 Alignment of amino acid sequences of H6Hs from different sources. *HmH6H*: H6H protein of *Hyoscyamus niger* L., GenBank accession number: ABG89397.1; *AtH6H*: H6H protein of *Anisodus tanguticus*, GenBank accession number: AAQ75700.1; *AaH6H*: H6H protein of *Anisodus acutangulus*, GenBank accession number: KAK4375688.1; *AbH6H*: H6H protein of *Atropa belladonna*, GenBank accession number: AEN79443.1; *BsH6H*: H6H protein of *Brugmansia sanguinea*, GenBank accession number: ALD59773.1; *DmH6H*: H6H protein of *Datura metel*, GenBank accession number: AAQ04302.1.

体结构和 AlphaFold2 预测的 *AbH6H* 结构对比可以看出, 两种方式获得的酶结构中 α 螺旋和 β 片层的重合度很高, loop 区域的重合度较低, 晶体结构中缺失的部分集中在 loop 区域。

在酶结构中, 氨基酸残基 H217 负责与亚铁离子配位, 在催化过程中起关键作用, 以 H217 为坐标原点, 利用 PyMOL (Caver 3.0)^[21] 分析底物在 *AbH6H* 中的进出通道。如图 3B 所

示, 紫色标记的氨基酸结构, 包括氨基酸残基 P96-K110 的 loop 结构、E116-L120 的 β 片层结构、Y320-K330 的 α 螺旋结构对形成的通道有直接的影响。基于之前的研究^[22], 底物进出通道对酶的底物谱具有很大影响, 因此对 H6H 的改造可以选择与形成进出通道的这 3 个结构区域。

如图 4 所示, *AbH6H* 的酶活性中心可以分成两个区域, 一个区域是 2-酮戊二酸所在的与

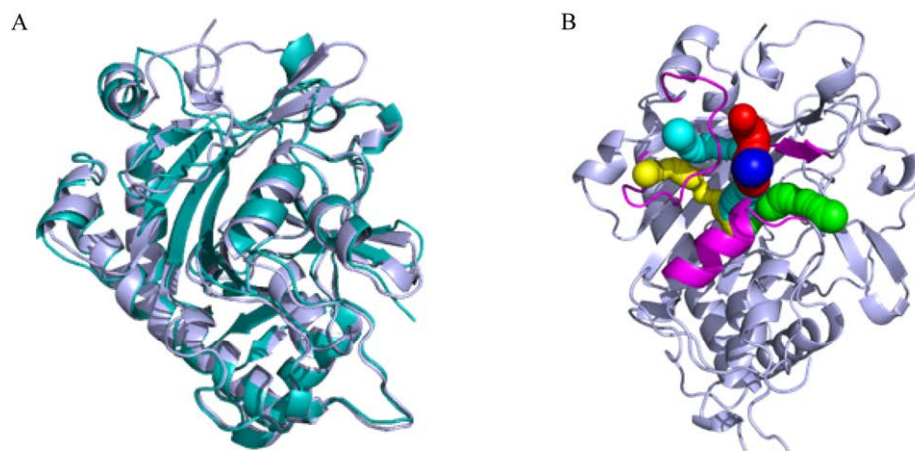


图 3 *AbH6H* 的结构分析 A: *AbH6H* 的晶体结构(PDB ID: 8CV8)与 AlphaFold2 预测结构(浅蓝色)对比. B: *AbH6H*(浅蓝色)进出通道分析. 与进出通道形成相关的氨基酸标记为紫色, 形成的通道分别标记为黄色、青色、红色、蓝色和绿色。

Figure 3 Structure analysis of *AbH6H*. A: Structure comparison of *AbH6H* from PDB data (teal blue, PDB ID: 8CV8) and from AlphaFold2 (light blue) using the Alignment/Superposition plugin of PyMOL. B: Tunnel analysis of *AbH6H* (light blue). The amino acid residues related with the formation of the tunnel were marked with purple, and the tunnels were marked with yellow, cyan, red, blue and green, respectively.

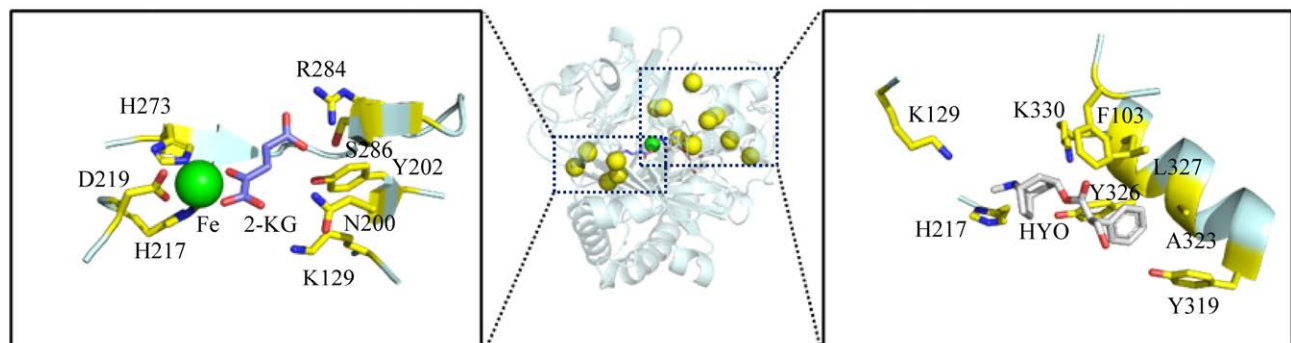


图 4 2-酮戊二酸、亚铁离子和底物莨菪碱与酶活性中心氨基酸残基的相互作用

Figure 4 The interaction of the amino acid residues with 2-KG, Fe^{2+} and hyoscyamine.

金属离子的配位区域，氨基酸残基 H217、D219、H273 和 2-酮戊二酸在酶活性中心固定亚铁离子，2-酮戊二酸的末端羧基伸向了由氨基酸残基 K129、N200、Y202、S286 和 R284 构成的亲水区；另一个区域是底物莨菪碱的结合区，底物莨菪碱的苯基取代基团与氨基酸残基 Y319 和 Y326 存在 π - π 相互作用，与氨基酸残基 A323 和 L327 存在疏水相互作用，莨菪碱的羟甲基取代基团附近没有氨基酸残基，莨菪碱的脂肪环分别与氨基酸残基 F103、K330 和 K129 存在相互作用，莨菪碱的酯基与 F103 具有相互作用，莨菪碱的氮甲基分别与氨基酸残基 K129 和 H217 存在相互作用。

虽然多数文献中报道第一步羟化反应发生在 6 位^[23-24]，但是随着对 H6H 催化机制的深入研究，发现第一步反应还有少量 7 位羟化产物生成^[25]。如图 5 所示，此步羟基化反应与其他

类型 2-酮戊二酸/亚铁离子依赖酶催化机制相似^[26]。在酶的活性中心亚铁离子与两个组氨酸和 2-酮戊二酸的两个氧原子形成 4 个配位作用，天冬氨酸或谷氨酸与亚铁离子形成第 5 个配位作用，第 6 个配位位点被水占据。加入底物后，底物分子将第 6 个配位位点的水分子挤出，O₂ 进入配位位点，随后 2 价亚铁离子与 O₂、2-酮戊二酸反应，2-酮戊二酸脱羧释放出 CO₂，2 价亚铁离子形成强氧化 4 价 Fe=O ferrel 中间体，强氧化态中间体从莨菪碱底物的 6 位碳氢键中攫取氢自由基产生底物碳自由基和三价铁-羟基中间体，铁氧键断裂，羟基自由基与底物自由基结合，形成 6 β -OH 莨菪碱 (Product 1)，第一步羟化反应结束。随后，6 β -OH 莨菪碱作为底物进入酶活性中心，在 O₂、2-酮戊二酸存在下，H6H 再次在酶活性中心形成强氧化 4 价 Fe=O ferrel 中间体，6 β -OH

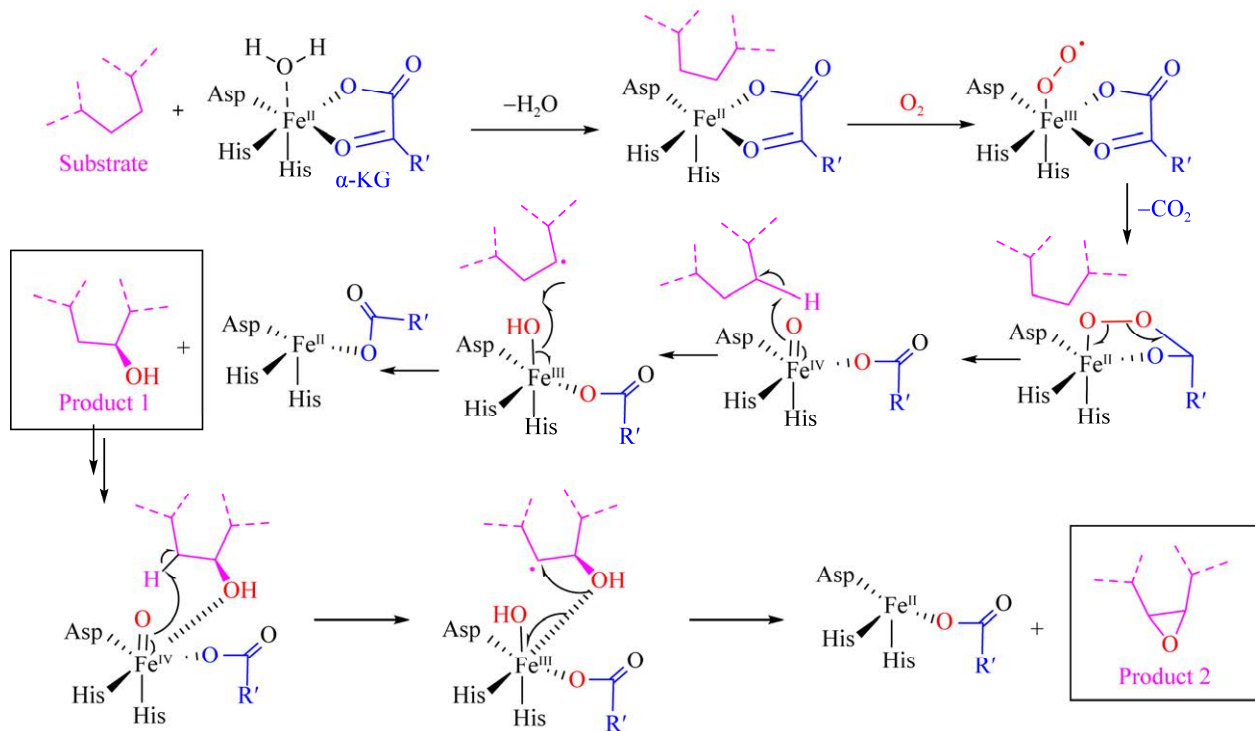


图 5 莨菪碱 6 β -羟化酶的催化机制

Figure 5 Catalytic mechanism of hyoscyamine 6 β -hydroxylase.

莨菪碱的羟基与铁离子存在相互作用，强氧化态中间体从 6 β -OH 莨菪碱的 7 位碳氢键中攫取氢自由基产生底物碳自由基和 3 价铁羟基中间体，值得注意的是，由于 6 β -OH 莨菪碱的羟基与铁离子存在相互作用，随后发生的不是 3 价铁-羟基中间体的铁氧键断裂，而是 6 β -OH 莨菪碱的 6 位羟基与铁离子的键断裂，氧自由基与碳自由基结合，形成环氧化的山莨菪碱 (Product 2)。为了验证第二步反应的催化机制， $^{18}\text{O}_2$ 作为底物氧化获得的 6 β -OH 莨菪碱和东莨菪碱中的氧原子均是同位素 ^{18}O ，表明第二步的反应不是按照羟化-脱水反应进行的，而是直接攫取 *exo*-7 位的氢原子后形成碳自由基，

随后形成具有环氧结构东莨菪碱，多个不同来源 H6H 的 $^{18}\text{O}_2$ 同位素反应均证明了此机制^[14,23]。

3 莨菪碱 6 β -羟化酶的底物谱

H6H 的底物谱与其他 2-酮戊二酸/亚铁离子依赖的羟化酶^[27-32]、卤化酶^[22,32-33]比较而言，是较为宽泛的(图 6)。如将 H6H 转化天然底物莨菪碱(a)的活力定为 100%，当底物的羟甲基基团去除后(b)，H6H 能保持 81% 的活力，但是在此基础上，将苯乙酸酯改为苯甲酸酯(c)或者是苯丙酸酯(d)后，H6H 对这 2 个底物完全丧失了催化活力。氮原子的存在对于酶活具有决定性的影响，如果仅将氮原子的甲基去

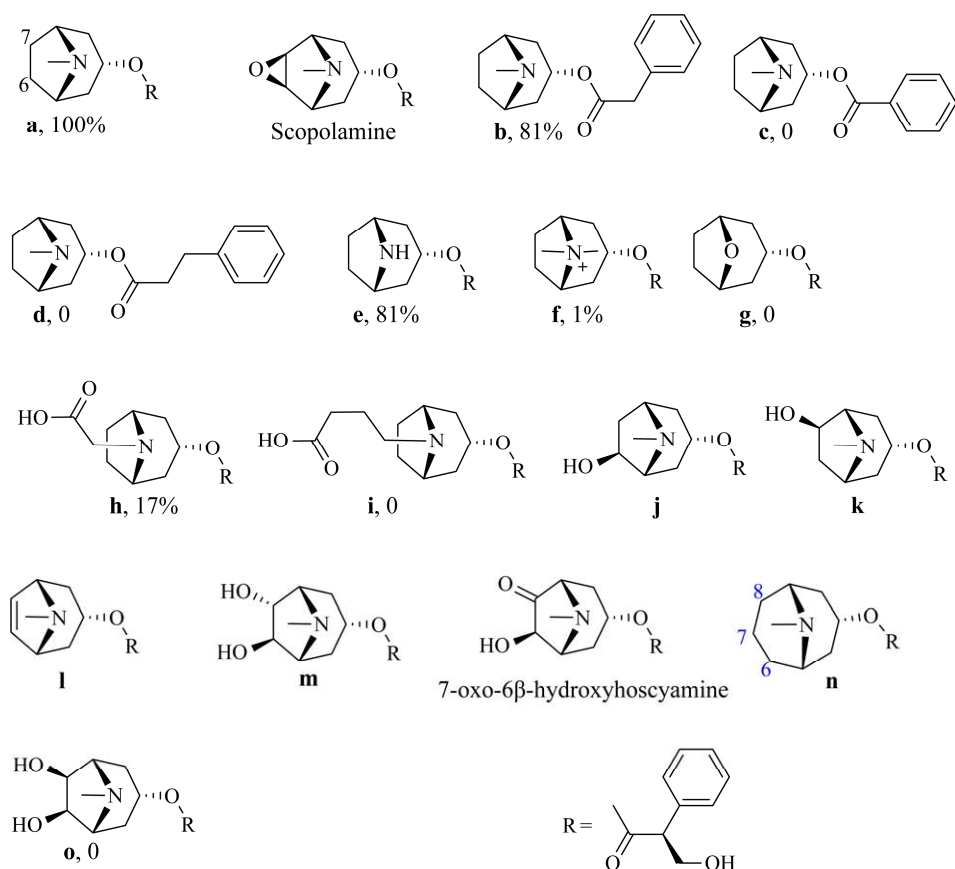


图 6 H6H 底物及相应的催化产物 莨菪碱及其类似物 a-o

Figure 6 H6H substrates and corresponding catalytic products. Hyoscyamine and its analogues a-o.

除后(e), H6H能保持81%的活力;进一步甲基化后(f), 酶的活力急剧下降, 仅保留1%的活力; 若将氮原子更改为氧原子(g), H6H丧失了对该底物的活力; 如果将氮原子的甲基取代基团更改为乙酸基(h), H6H能够保持17%的活力, 但是进一步使用长链的取代基团时(i), H6H会对该底物失去活力^[14,19]。H6H对6 β -OH莨菪碱(j)、7 β -OH莨菪碱(k)和6,7-脱氢莨菪碱(l)都具有反应活力, 产物均为东莨菪碱; 6 β ,7 α -diOH莨菪碱(m)也是H6H的底物, 产物为7-酮-6 β -OH莨菪碱(7-oxo-6-hydroxyhyoscyamine)。除了莨菪碱的结构, 当底物结构拓展到八元环时(n), H6H对此底物同样具有转化能力, 产物为6位、7位和8位的单羟基或双羟基的产物(n)^[34]。H6H对6 β ,7 β -diOH莨菪碱(o)没有反应活性, 再次证明了在H6H的催化过程中, 没有经过双羟化途径。

4 莨菪碱 6 β -羟化酶的表达、酶活及改造

目前H6H均是植物来源, 在微生物如在大肠杆菌中表达存在一定困难, H6H在大肠杆菌中的融合表达是实现其可溶表达的途径之一, 将HnH6H与麦芽糖结合蛋白在大肠杆菌中进行异源融合表达, 纯化后的HnH6H V_{\max} 为(0.081 \pm 0.005) nmol/(s·mg) (表1); 带有His-tag标签的AtH6H可以在大肠杆菌BL21trxB(DE3)中可溶表达, AtH6H是目前报道H6H中活力最高的, 为(11.100 \pm 0.500) nmol/(s·mg) (表1); BcH6H与trx-tag融合后, 可以在大肠杆菌Origami中可溶表达^[36]; BsH6H与SUMO和His-tag融合可以在大肠杆菌BL21(DE3)中可溶表达^[16]。表1中列出了已经报道的H6H催化活性, H6H的第一步羟化反应活力是第二步环氧化反应活力

表1 已报道的H6H对莨菪碱以及6 β -羟化产物的活力

Table 1 The activity of H6H on hyoscyamine and 6 β -hydroxyhyoscyamine

Enzymes	V_{\max} nmol/(s·mg) for hyoscyamine	V_{\max} nmol/(s·mg) for 6 β -hydroxyhyoscyamine
HnH6H	0.081 \pm 0.005	(1.900 \pm 0.100) \times 10 ⁻³
AtH6H ^[12]	11.100 \pm 0.500	4.200 \pm 0.300
AbH6H ^[14]	1.170 \pm 0.080	(3.360 \pm 0.140) \times 10 ⁻³
DmH6H ^[15]	0.021	- ^a
AaH6H ^[35]	0.280 \pm 0.010	-
AaH6H S14P/K97A ^[35]	1.250 \pm 0.020	-
BsH6H ^[16]	1.000	0.030

^a: Not detected.

的约几十倍, 因此在利用H6H转化过程中, 羟化产物的占比较高^[37-40]。

关于H6H改造的研究较少, 目前仅有来源于Anisodus acutangulus的AaH6H通过工程改造提高其对天然底物莨菪碱的酶活力, 采用随机突变手段构建突变文库后, 筛选获得了比活力提高4.4倍的双突变S14P/K97A(表1)^[35]。这两个突变位点位于酶结构中的loop区域, 可能在催化过程中对酶的构象变化有影响, 进而提高了对底物的催化活力。对这个loop区域的突变有望改变该酶的底物结合口袋, 扩展其底物适应性。

5 莨菪碱 6 β -羟化酶的应用

H6H催化的反应是生物合成东莨菪碱的最后两步反应, 也是决速步骤, 在相关植物的毛状根中过表达H6H等限速酶可以提高植物代合成东莨菪碱能力。植物毛状根生长迅速、遗传性质较为稳定、不受环境因素影响, 为提高东莨菪碱的含量提供了新方法^[41]。

在颠茄的毛状根中异源表达HnH6H后, 终产物东莨菪碱的产量相较于野生型提高了约

5 倍^[42]。如表 2 所示, 在埃及莨菪(*Hyoscyamus muticus* L.)中异源表达 *HnH6H* 后, 合成的东莨菪碱的含量能够达到 9.8 mg/g (干重), 培养液中的含量达到 17 mg/L, 相较于野生型提高了 100 倍以上^[43]; 将 *HnH6H* 的基因在赛莨菪(*Scopolia parviflora*)中表达后, 东莨菪碱的含量较野生型提高了 3 倍, 达到 8.1 mg/g (干重)^[44]; 将 *HnH6H* 的基因在颠茄(*Atropa baetica*)中过表达后, 东莨菪碱的含量较野生型提高了 9 倍, 达到 5.6 mg/g (干重)^[45]; 在颠茄中同时导入上游限速酶基因 N-甲基转移酶(*pmt*)和 *h6h* 基因, 东莨菪碱的含量较野生型提高了 7.3 倍, 达到 1.2 mg/g (干重)^[46]。东莨菪碱生物合成途径中, *H6H* 催化反应是限速步骤, 在毛状根中过表达 *H6H* 可以有效提高东莨菪碱的产量。

在植物中利用简单的培养基获得东莨菪碱非常具有吸引力, 但是该方法时间过长, 产物浓度低, 分离纯化的成本也会相应增加。而以较为廉价的莨菪碱作为底物, 在 *H6H* 催化下合成东莨菪碱, 可以作为获得东莨菪碱的手段之一。Cao 等^[40]报道在 3 L 反应体系中, 利用异源表达 *h6h* 基因的大肠杆菌作为生物催化剂, 底物浓度为 500 mg/L, 莨菪碱的转化率达到到了 97%。Minoia 等^[47]利用戊二醛固定化或者是吸附/解吸附的策略可以实现 *H6H* 的循环利用, 降低了催化剂成本, 为体外合成东莨菪碱提供了新的策略。

表 2 莨菪碱 6 β -羟化酶的应用

Table 2 The application of *H6H*

Enzymes	The species which produce scopolamine	Content (dry weight, mg/g)
<i>HnH6H</i>	<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	9.8
<i>HnH6H</i>	<i>Scopolia parviflora</i>	8.1
<i>HnH6H</i>	<i>Atropa baetica</i>	5.6
<i>SpH6H</i> , <i>PMT</i>	<i>Scopolia parviflora</i>	1.2

6 展望

目前莨菪碱 6 β -羟化酶的研究集中在如何提高其在植物中的总催化活力, 从而提高植物合成东莨菪碱的能力。该酶有 2 个优势: (1) 酶的催化机制和底物谱的研究表明, 与研究较多的氨基酸羟化酶不同, 莨菪碱 6 β -羟化酶底物的极性偏小, 能够耐受在天然底物结构上的变动, 具有转化极性较小化合物的可能性; (2) 莨菪碱 6 β -羟化酶催化的反应类型多, 可以实现莨菪碱的羟化反应, 以及进一步实现羟化产物的环化反应, 不仅如此, 该酶还可以实现碳碳双键的环氧化反应。莨菪碱 6 β -羟化酶是一类具有潜在催化能力的多功能生物催化剂, 通过对其工程改造, 有望实现更多底物类型 sp³ 杂化 C-H 键区域和立体专一性官能化, 目前本课题组正在开展相关的研究工作。

REFERENCES

- [1] SCHNEPEL C, SEWALD N. Enzymatic halogenation: a timely strategy for regioselective C-H activation[J]. *Chemistry*, 2017, 23(50): 12064-12086.
- [2] BÜCHLER J, PAPADOPOULOU A, BULLER R. Recent advances in flavin-dependent halogenase biocatalysis: sourcing, engineering, and application[J]. *Catalysts*, 2019, 9(12): 1030.
- [3] ROMERO E, JONES BS, HOGG BN, RUÉ CASAMAJO A, HAYES MA, FLITSCH SL, TURNER NJ, SCHNEPEL C. Enzymatic late-stage modifications: better late than never[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2021, 60(31): 16824-16855.
- [4] WU S, SNAJDROVA R, MOORE JC, BALDENIUS K, BORNSCHEUER UT. Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2021, 60(1): 88-119.
- [5] DAVIDI D, LONGO LM, JABŁOŃSKA J, MIŁO R, TAWFIK DS. A bird's-eye view of enzyme evolution: chemical, physicochemical, and physiological

- considerations[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(18): 8786-8797.
- [6] REETZ MT. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2011, 50(1): 138-174.
- [7] STROHMEIER GA, PICHLER H, MAY O, GRUBER-KHADJAWI M. Application of designed enzymes in organic synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(7): 4141-4164.
- [8] QU G, LI A, ACEVEDO-ROCHA CG, SUN ZT, REETZ MT. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2020, 59(32): 13204-13231.
- [9] ROCHA RA, SPEIGHT RE, SCOTT C. Engineering enzyme properties for improved biocatalytic processes in batch and continuous flow[J]. *Organic Process Research & Development*, 2022, 26(7): 1914-1924.
- [10] WOJDYLA Z, BOROWSKI T. Properties of the reactants and their interactions within and with the enzyme binding cavity determine reaction selectivities. The case of Fe(II)/2-oxoglutarate dependent enzymes[J]. *Chemistry*, 2022, 28(18): e202104106.
- [11] HASHIMOTO T, YAMADA Y. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures[J]. *Plant Physiology*, 1986, 81(2): 619-625.
- [12] LIU T, ZHU P, CHENG KD, MENG C, HE HX. Molecular cloning, expression and characterization of hyoscyamine 6 β -hydroxylase from hairy roots of *Anisodus tanguticus*[J]. *Planta Medica*, 2005, 71(3): 249-253.
- [13] EL JABER-VAZDEKIS N, GONZÁLEZ C, RAVELO AG, ZÁRATE R. Cloning, characterization and analysis of expression profiles of a cDNA encoding a hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) from *Atropa baetica* Willk[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2009, 47(1): 20-25.
- [14] LI J, van BELKUM MJ, VEDERAS JC. Functional characterization of recombinant hyoscyamine 6 β -hydroxylase from *Atropa belladonna*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20(14): 4356-4363.
- [15] PRAMOD KK, SINGH S, JAYABASKARAN C. Biochemical and structural characterization of recombinant hyoscyamine 6 β -hydroxylase from *Datura metel* L.[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2010, 48(12): 966-970.
- [16] FISCHER C, KWON M, RO D-K, van BELKUM MJ, VEDERAS JC. Isolation, expression and biochemical characterization of recombinant hyoscyamine-6 β -hydroxylase from *Brugmansia sanguinea*-tuning the scopolamine production[J]. *MedChemComm*, 2018, 9(5): 888-892.
- [17] NAIK T, VANITHA SC, RAJVANSHI PK, CHANDRIKA M, KAMALRAJ S, JAYABASKARAN C. Novel microbial sources of tropane alkaloids: first report of production by endophytic fungi isolated from *Datura metel* L.[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(2): 206-212.
- [18] TIMMINS A, de VISSER SP. A comparative review on the catalytic mechanism of nonheme iron hydroxylases and halogenases[J]. *Catalysts*, 2018, 8(8): 314.
- [19] KLUZA A, WOJDYLA Z, MRUGALA B, KURPIEWSKA K, POREBSKI PJ, NIEDZIALKOWSKA E, MINOR W, WEISS MS, BOROWSKI T. Regioselectivity of hyoscyamine 6 β -hydroxylase-catalysed hydroxylation as revealed by high-resolution structural information and QM/MM calculations[J]. *Dalton Transactions*, 2020, 49(14): 4454-4469.
- [20] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [21] WAGNER JR, SØRENSEN J, HENSLEY N, WONG C, ZHU C, PERISON T, AMARO RE. POVME 3.0: software for mapping binding pocket flexibility[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017, 13(9): 4584-4592.
- [22] ZHU Q, LIU X. Characterization of non-heme iron aliphatic halogenase WelO5* from *Hapalosiphon welwitschii* IC-52-3: identification of a minimal protein sequence motif that confers enzymatic chlorination specificity in the biosynthesis of welwitindolelinones[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2017, 13: 1168-1173.

- [23] HASHIMOTO T, KOHNO J, YAMADA Y. Epoxidation *in vivo* of hyoscyamine to scopolamine does not involve a dehydration step[J]. *Plant Physiology*, 1987, 84(1): 144-147.
- [24] HASHIMOTO T, YAMADA Y. Purification and characterization of hyoscyamine 6 β -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 164(2): 277-285.
- [25] USHIMARU R, RUSZCZYCKY MW, LIU HW. Changes in regioselectivity of H atom abstraction during the hydroxylation and cyclization reactions catalyzed by hyoscyamine 6 β -hydroxylase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(2): 1062-1066.
- [26] MARTINEZ S, HAUSINGER RP. Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(34): 20702-20711.
- [27] SHIBASAKI T, SAKURAI W, HASEGAWA A, UOSAKI Y, MORI H, YOSHIDA M, OZAKI A. Substrate selectivities of proline hydroxylases[J]. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40(28): 5227-5230.
- [28] KLEIN C, HÜTTEL W. A simple procedure for selective hydroxylation of L-proline and L-pipecolic acid with recombinantly expressed proline hydroxylases[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353(8): 1375-1383.
- [29] SMIRNOV SV, SOKOLOV PM, KODERA T, SUGIYAMA M, HIBI M, SHIMIZU S, YOKOZEKI K, OGAWA J. A novel family of bacterial dioxygenases that catalyse the hydroxylation of free L-amino acids[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 331(2): 97-104.
- [30] JING X, LIU H, NIE Y, XU Y. Advances in Fe(II)/2-ketoglutarate-dependent dioxygenase-mediated C-H bond oxidation for regioselective and stereoselective hydroxyl amino acid synthesis: from structural insights into practical applications[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2021, 1(3): 275-290.
- [31] ZWICK CR III, RENATA H. Overview of amino acid modifications by iron- and α -ketoglutarate-dependent enzymes[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(7): 4853-4865.
- [32] PAPAPOPOULOU A, MEYER F, BULLER RM. Engineering Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent halogenases and desaturases[J]. *Biochemistry*, 2023, 62(2): 229-240.
- [33] NEUGEBAUER ME, SUMIDA KH, PELTON JG, McMURRY JL, MARCHAND JA, CHANG MCY. A family of radical halogenases for the engineering of amino-acid-based products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15: 1009-1016.
- [34] USHIMARU R, RUSZCZYCKY MW, CHANG WC, YAN F, LIU YN, LIU HW. Substrate conformation correlates with the outcome of hyoscyamine 6 β -hydroxylase catalyzed oxidation reactions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(24): 7433-7436.
- [35] CAO YD, HE YC, LI H, KAI GY, XU JH, YU HL. Efficient biosynthesis of rare natural product scopolamine using *E. coli* cells expressing a S14P/K97A mutant of hyoscyamine 6 β -hydroxylase AaH6H[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 211: 123-129.
- [36] CARDILLO AB, PERASSOLO M, SARTUQUI M, RODRÍGUEZ TALOU J, GIULIETTI AM. Production of tropane alkaloids by biotransformation using recombinant *Escherichia coli* whole cells[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 125: 180-189.
- [37] YUN DJ, HASHIMOTO T, YAMADA Y. Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(24): 11799-11803.
- [38] HASHIMOTO T, MATSUDA J, YAMADA Y. Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 β -hydroxylase[J]. *FEBS Letters*, 1993, 329(1/2): 35-39.
- [39] HÄKKINEN ST, MOYANO E, CUSIDÓ RM, PALAZÓN J, PIÑOL MT, OKSMAN-CALDENTHEY KM. Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 β -hydroxylase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(420): 2611-2618.
- [40] CARDILLO AB, TALOU JR, GIULIETTI AM. Expression of *Brugmansia candida* Hyoscyamine 6beta-Hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst[J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 17.
- [41] LUDWIG-MÜLLER J, JAHN L, LIPPERT A,

- PÜSCHEL J, WALTER A. Improvement of hairy root cultures and plants by changing biosynthetic pathways leading to pharmaceutical metabolites: strategies and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(6): 1168-1179.
- [42] HASHIMOTO T, YUN DJ, YAMADA Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures[J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(3): 713-718.
- [43] JOUHIKAINEN K, LINDGREN L, JOKELAINEN T, HILTUNEN R, TEERI TH, OKSMAN-CALDENTY KM. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering[J]. *Planta*, 1999, 208(4): 545-551.
- [44] KANG YM, LEE OS, JUNG HY, KANG SM, LEE BH, KARIGAR C, PRASAD T, BAHK JD, CHOI MS. Overexpression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase (h6h) gene and enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* hairy root lines[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 15(1): 91-98.
- [45] ZÁRATE R, EL JABER-VAZDEKIS N, MEDINA B, RAVELO ÁG. Tailoring tropane alkaloid accumulation in transgenic hairy roots of *Atropa baetica* by over-expressing the gene encoding hyoscyamine 6 β -hydroxylase[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(16): 1271-1277.
- [46] WANG X, CHEN M, YANG C, LIU X, ZHANG L, LAN X, TANG K, LIAO Z. Enhancing the scopolamine production in transgenic plants of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and h6h genes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 143(4): 309-315.
- [47] MINOIA JM, VILLANUEVA ME, COPELLO GJ, RODRÍGUEZ TALOU J, CARDILLO AB. Recycling of hyoscyamine 6 β -hydroxylase for the *in vitro* production of anisodamine and scopolamine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3459-3478.

(本文责编 陈宏宇)