

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(1):60-66; 4 January 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一种新型(S)-羰基还原酶的克隆及其功能表达

耿亚维, 张荣珍, 王珊珊, 徐岩*

(江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】从近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis* CCTCC M203011) 基因组中钓取新型(S)-羰基还原酶基因 (*scr II*), 对其生物转化手性醇的功能进行了验证。【方法】采用 PCR 的方法, 从 *C. parapsilosis* 基因组中扩增出一段可能的羰基还原酶基因 *scr II*。以构建的重组菌 *Escherichia coli* BL21/pET28a-*scr II* 为生物催化剂, 2-羟基苯乙酮为底物进行催化反应, 经 HPLC 分析, 计算终产物的光学纯度和产率, 确定了转化反应的最适温度和 pH 值。【结果】*scr II* 基因全长为 840 bp, 编码 279 个氨基酸, 与已报道的(S)-羰基还原酶基因 *scr* 的一致性为 85%。氨基酸序列分析表明 SCR II 具有典型短链醇脱氢酶的功能域: 辅酶结合区域 Thr40-Gly41-(X)₃-Gly45-X-Gly47 和催化三联体结构 Ser172-(X)_n-Tyr187-(X)₃-Lys191。在 30°C, 0.1 mmol/L IPTG 的诱导下, (S)-羰基还原酶 (SCR II) 在 *E. coli* 中过量表达。以 10% (w/v) 的重组菌为催化剂, 高浓度 (6 g/L) 2-羟基苯乙酮为底物, 在最适反应温度 35°C 和 pH 5.5 的条件下, 转化产物(S)-苯基乙二醇的光学纯度高达 99.1% e. e., 产率为 89.6%。与(S)-羰基还原酶 SCR 相比较, 底物浓度提高了一倍, 产物的光学纯度和产率分别提高了 10% 和 28%。【结论】采用分子克隆技术分离出新型羰基还原酶 SCR II 的编码基因, 该酶的发现为手性醇的高效制备奠定了坚实的研究基础。

关键词: 短链羰基还原酶; 基因克隆; 表达; (S)-苯基乙二醇; 生物转化

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 01-0060-07

羰基还原酶来源广泛, 在酵母、细菌和高等动植物等均有分布^[1-3], 是一种具有高度的化学、区域和立体选择性的生物催化剂, 常用于生物转化合成具有光学活性的不同种类的手性化合物^[4-5]。手性醇是一种重要的手性模块化合物, 如光学纯苯基乙二醇是液晶材料中不可缺少的手性添加剂, 也是制备具有光学活性的医药、农药和功能材料的重要中间体^[6-8]。

据报道仅有少数种类的真菌或酶能催化 2-羟基苯乙酮, 产生不同空间构型的苯基乙二醇。Bakers' yeast^[9] 和 *Geotrichum* sp.^[10] 能将低浓度的

2-羟基苯乙酮分别还原为(R)-和(S)-苯基乙二醇。来源于近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011 的(R)-和(S)-羟基还原酶能催化 2-羟基苯乙酮产生不同立体构型的苯基乙二醇^[11]。但多数已报道的不对称还原反应中, 酶催化的底物浓度和终产物的光学纯度都较低。尽管研究者也试图通过构建基因工程菌来增加目标蛋白的表达量以促进转化反应, 但是效果不显著。吕腾飞等^[12] 采用过量表达(S)-羰基还原酶 SCR 的重组菌制备(S)-苯基乙二醇, 底物 2-羟基苯乙酮的浓度只有 3 g/L, 产物的光学纯度也仅为 91%。因而新功能

基金项目: 国家“973”项目 (2009CB724706); 国家“863 计划” (2007AA02Z200); 国家自然科学基金项目 (20776060); 长江学者创新团队计划 (IRT0532)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

作者简介: 耿亚维 (1986-) 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: gengyawei1516@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-07-21; 修回日期: 2009-09-11

酶或新型催化剂的开发显得尤为重要^[13-15]。本研究从近平滑假丝酵母的基因组出发,采用分子克隆技术分离出一段新型的羰基还原酶基因 *scr II*,以该基因构建的重组大肠杆菌为生物催化剂,转化高浓度的底物 2-羟基苯乙酮(6 g/L),获得光学纯度高达 99.1% 的(S)-苯基乙二醇,转化产率为 89.6%。这一新型生物催化剂的发现不仅可以较好地满足

工业上手性化合物制备的需求,而且为不对称合成反应的催化机制奠定了研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:见表 1。

表 1 实验菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Candida parapsilosis</i>	Source of <i>scr II</i> gene	This lab
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of T- <i>scr II</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Host of pET28a- <i>scr II</i>	This study
Plasmids		
pMD19-T	¹ Amp ^r , 2692 bp	TaKaRa Co.
T- <i>scr II</i>	0.84 kb DNA fragment with <i>scr II</i> gene in pMD19-T, 4.1 kb	This study
pET28a	² Km ^r , 5369 bp	Novagen Co.
pET28a- <i>scr II</i>	0.84 kb DNA fragment with <i>scr II</i> gene in pET28a, 6.2 kb	This study

1 Amp^r \leq 50 mg/L. 2 Km^r \leq 50 mg/L

1.1.2 主要试剂: *Taq* DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Xho I* 和 *BamH I*、IPTG 购于大连(宝)生物工程公司,DNA Marker 购于上海博彩生物科技有限公司,质粒提取试剂盒购于 OMEGA BIO-TEK,胶回收试剂盒购于北京博大泰克生物基因技术有限公司,2-羟基苯乙酮购于 TCI(上海)化成工业发展有限公司,引物由上海赛百盛基因技术有限公司(SBS)合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 酵母培养基:葡萄糖 40 g/L,酵母膏 5 g/L,(NH₄)₂HPO₄ 13 g/L,KH₂PO₄ 7 g/L,ZnSO₄·7H₂O 0.8 g/L,NaCl 0.1 g/L,pH7.0;LB 液培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH7.2;LB 固体培养基:在液体培养基的基础上加琼脂粉 15 g/L;蓝白斑筛选平板:在 LB 固体培养基的基础上加 X-Gal 4 g/L,IPTG 2.4 g/L;除酵母培养基外,其余培养基使用前加入氨苄青霉素或卡那霉素至终浓度 50 mg/L。

1.2 基因组 DNA 和质粒的提取

C. parapsilosis 基因组提取参考王海燕等报道的方法^[16]。质粒提取按试剂盒提供的方法进行。

1.3 *scr II* 基因的克隆

以已报道的 *scr* 基因为出发序列(DQ675534),与 *C. Parapsilosis* 基因组序列(http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/c_parapsilosis)比

对,发现一段 *scr* 的同源序列,二者的相似性高达 85%,利用 DNAMAN 软件设计引物如下(下划线为酶切位点):SCR II _F: 5'-ATCGGATCCATGGGCGAA-ATCGAATCTTATTGC-3' (*BamH I*);SCR II _R: 5'-TGA CTCTCGAGTGGACAA-GTGTAAACCACCATCGAC-3' (*Xho I*)。

以近平滑假丝酵母基因组为模板,采用 PCR 的方法来扩增 *scr II* 基因,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。取 3 μ L 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物经过胶回收纯化之后,与 pMD19-T 在 16 $^{\circ}$ C 下连接 8 h,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选和酶切验证获得阳性质粒 T-*scr II*。

1.4 表达载体的构建和目的基因的表达

用限制性内切酶 *BamH I* 和 *Xho I* 分别对载体 pET28a 和质粒 T-*scr II* 进行消化,将 *scr II* 基因与线性化载体片段连接,连接产物转化感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3),涂布卡那霉素(50 mg/L)抗性平板,经酶切和 DNA 测序验证,筛选获得阳性克隆 *E. coli* BL21/ pET28a-*scr II*。挑取单菌落接种于含同样抗性的 LB 液体培养基中,当菌体培养的 OD₆₀₀ 值达到 0.6-0.8 时,加入 0.1 mmol/L IPTG,30 $^{\circ}$ C 诱导 6 h。全菌蛋白提取物经 SDS-PAGE 检测。离心收集菌体,经过生理盐水洗涤 2 次之后用于生物转化。

1.5 不对称还原反应及其检测

在 1 mL 的缓冲液中,加入 6 mg 的 2-羟基苯乙酮和 0.1 g (10%) 的湿菌体或适量的重组蛋白,于 30°C,150 r/min 下反应 48 h (湿菌体) 或 8 h (重组蛋白)。离心取上清反应液用 2 mL 乙酸乙酯萃取;萃取液经 HPLC 分析,根据峰面积计算产物(S)-苯基乙二醇的光学纯度(*e. e.* 值)及产率^[11]。

1.6 目标蛋白的纯化

纯化过程全部在 4°C 下进行,离心收集的重组菌溶于 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中,超声破碎后,离心取上清液,即为粗酶液。粗酶液按美国通用公司的 HisTrap HP affinity column 亲和层析方法进行纯化,纯酶液超滤浓缩后用于后续实验。酶活测定方法参考聂尧等^[18]的方法。

1.7 转化反应最适 pH 值的选择

在 1.5 所述的反应体系中,选择不同 pH(4.5 - 9)的缓冲液,反应结束后,经乙酸乙酯萃取和 HPLC 分析,计算产物(S)-苯基乙二醇的光学纯度 % *e. e.* 值及产率。

1.8 转化反应最适温度的选择

在确定了最适反应 pH 后,在 1.5 中所述的反应条件下,选择反应温度为 20°C - 45°C,反应结束后,经乙酸乙酯萃取和 HPLC 分析,计算产物(S)-苯基乙二醇的光学纯度 % *e. e.* 值及产率。

1.9 基因测序及蛋白序列分析

将构建的重组质粒送至上海生工测序,测序结果采用 DNAMAN 软件(美国 Lynnon Biosoft 公司)进行分析。

2 结果

2.1 *scr II* 基因的克隆与重组质粒的构建

以近平滑假丝酵母基因组为模板,SCR II_F 和 SCR II_R 为引物,采用 PCR 的方法扩增获得了该基因。纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体相连接,经酶切鉴定,获得重组质粒 T-*scr II*。T-*scr II* 和 pET28a 载体分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,产生粘性末端,用 T4 DNA Ligase 将两者进行连接,酶切验证获得阳性重组表达质粒 pET28a-*scr II*。DNA 测序结果表明 *scr II* 阅读框长度为 837 bp,编码 279 个氨基酸,与 *scr* 一致性为 85%。

2.2 SCR II 氨基酸序列分析

将 *scr II* 编码的 279 个氨基酸与蛋白数据库(Protein Data Base, PDB)中蛋白序列进行比对(图 1),发现该酶与 *C. parapsilosis* 的羰基还原酶 SCR 一致性最高(85%),与 *Bacillus anthracis* 羰基还原酶、*Thermotoga maritima* 葡萄糖酸脱氢酶的一致性分别为 36% 和 32%。进一步分析表明 SCR II 序列中含有典型性短链脱氢酶的 2 个功能域^[17]:辅酶结合保守序列 Thr40-Gly41-(X)₃-Gly45-X-Gly47 和催

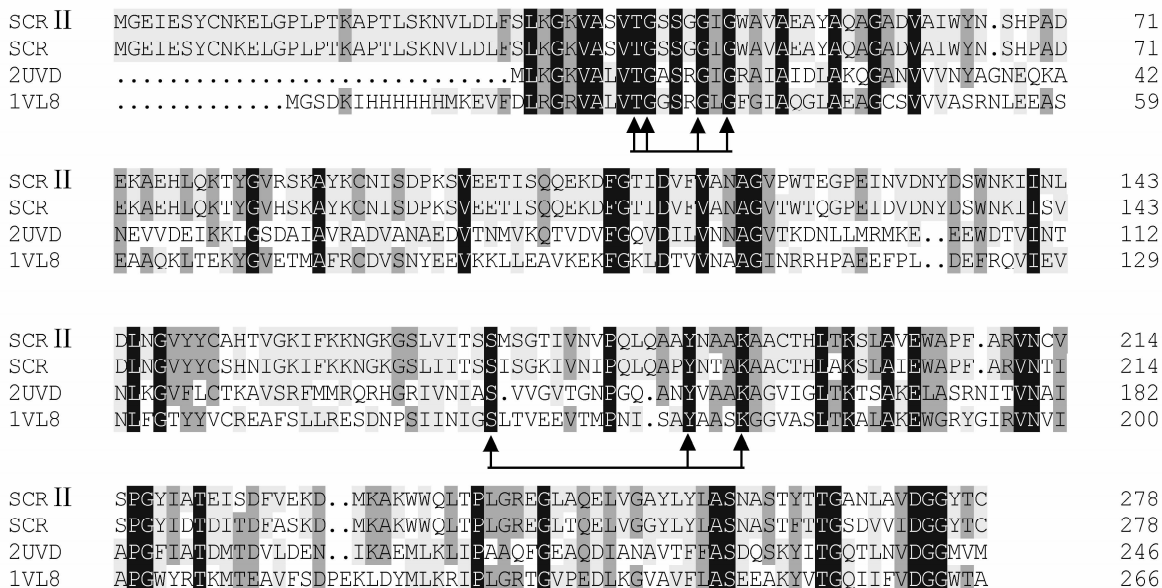


图 1 SCR II 和典型性短链脱氢酶的氨基酸序列比对结果(箭头所指为保守功能域序列)

Fig.1 Amino acid sequence alignment of SCR II with other typical short-chain dehydrogenases. A novel carbonyl reductase from *C. parapsilosis* (SCR II), carbonyl reductase from *C. parapsilosis* (Protein Data Bank accession codes:3CTM), 3-oxoacyl-(Acyl carrier protein) reductase from *Bacillus anthracis* (2UVD), gluconate 5-dehydrogenase from *Thermotoga maritima* (1VL8). Gaps in the aligned sequences are indicated by dots.

化三元结构 Ser172-(X)_n-Tyr187-(X)₃-Lys191 (X 为任意氨基酸), 表明 SCR II 属于短链醇脱氢酶家族。

2.3 SCR II 蛋白表达

将重组质粒 pET28a-scr II 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 其阳性菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-scr II 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 分析结果显示 SCR II 酶蛋白在大肠杆菌中获得高效表达, 其蛋白分子质量大小约为 33 kDa (图 2), 比理论计算的分子量 (30 kDa) 偏大, 表明 pET28a 的两个 6 × Histidine 的标签成功融合于目标蛋白 SCR II 的 N 和 C 端。

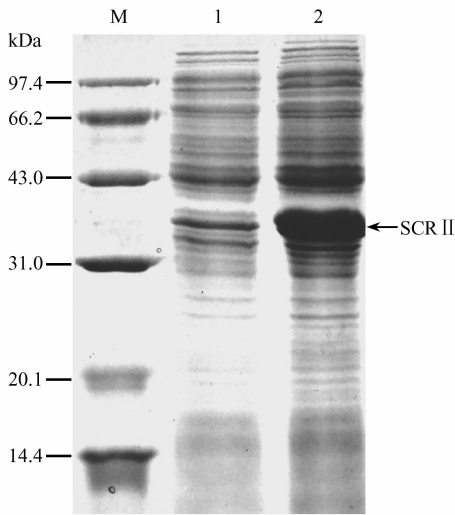


图 2 重组蛋白诱导表达结果

Fig. 2 Expression of recombinant SCR II in *E. coli* BL21 (DE3)

M: Protein Marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-scr II before induction; 2. *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-scr II after induction with 0.1 mmol/L IPTG.

2.4 重组大肠杆菌不对称生物转化

以 10% (w/v) 的重组大肠杆菌全细胞为生物催化剂, 6 g/L 的 2-羟基苯乙酮为底物, 在 30°C、pH 6.5 的条件下进行反应。结果 (图 3) 显示重组菌催化 2-羟基苯乙酮还原, 获得产物 (S)-苯基乙二醇, 说明 SCR II 对 2-羟基苯乙酮具有较好的立体选择性。对转化过程的数据进行了一维方差分析, 结果显示: 如图 4, 随着反应时间的延长, 产物 (S)-苯基乙二醇的产率逐步提高, 48 h 后趋于平衡。此时, 光学纯度和产率分别为 95% e.e. 和 76%。

2.5 目标蛋白的纯化及其生物功能的验证

重组菌经超声破碎得到粗酶液, 粗酶液经过 Ni 离子亲和层析 (图 5-A), 得到了目的蛋白。SDS-PAGE (图 5-B) 显示目的蛋白为单一条带, 蛋白纯度

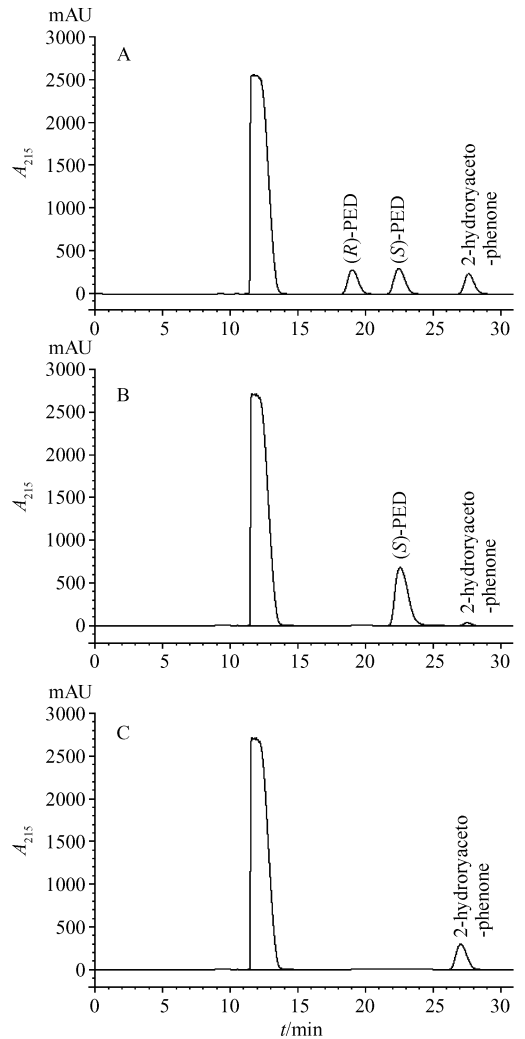


图 3 重组菌不对称还原 2-羟基苯乙酮

Fig. 3 Asymmetric reduction of 2-hydroxyacetophenone using recombinant *E. coli* whole cells. A: Retention times of standard samples are as follows: (R)-PED, 19.0 min, (S)-PED, 22.4 min; 2-hydroxyacetophenone, 27.1 min. B: Reaction products catalyzed by *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-scr II whole cells. C: Reaction products catalyzed by *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a whole cells. PED: 1-phenyl-1,2-ethanediol.

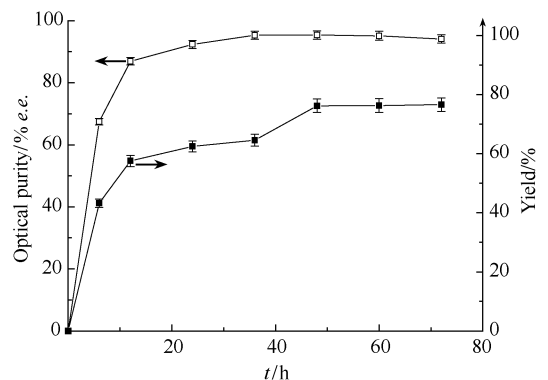


图 4 重组菌不对称转化反应的过程曲线

Fig. 4 Asymmetric bioreduction of 2-hydroxyacetophenone with the recombinant *E. coli* whole cells.

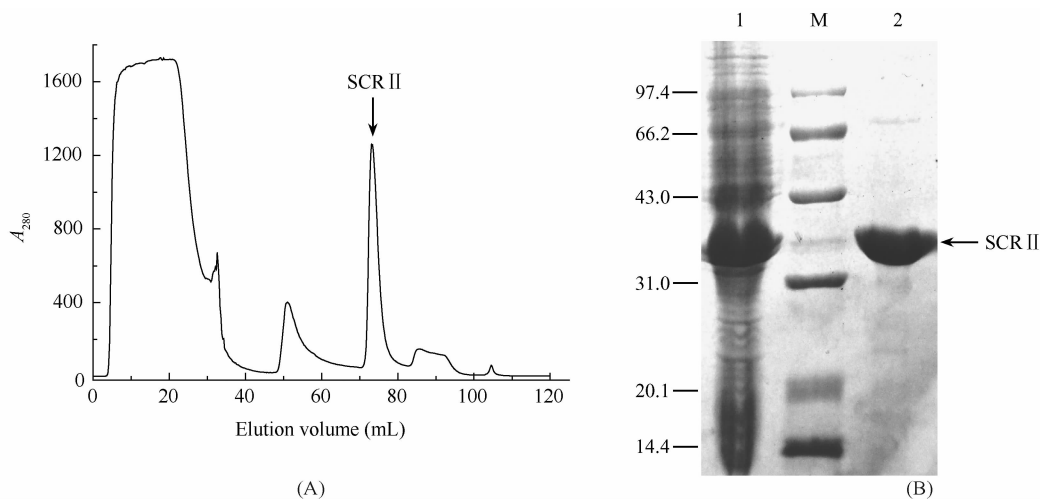


图5 SCR II 的镍柱亲和层析分离图谱 (A) 和 SDS-PAGE 检测结果 (B)

Fig. 5 Elution profile from HisTrap HP affinity column chromatography (A) and SDS-PAGE (B) of purified SCR II. M: Protein Marker; 1. Cell-free extract of *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-*scr* II; 2. Purified enzyme.

达到了电泳纯。以纯酶为催化剂,不对称还原 2-羟基苯乙酮得到光学纯度为 100% 的 (S)-苯基乙二醇,产率也达到了 96%。说明 SCR II 具有与野生酵母菌^[11]相同的生物功能。

2.6 pH 值对重组菌转化反应的影响

反应体系的起始 pH 值影响酶蛋白的构型及稳定性、酶的活性中心必需基团和底物的解离状态,从而影响酶的立体选择性和催化活性。一维方差分析显示不同的 pH 下,产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度显著不同,在 pH 5.5 时达到最高的 98.1% e.e.,而在 pH 5.5 到 7.5 之间产物产率差异相对不明显。因此,选择 5.5 为最适 pH 值 (图 6-A)。

2.7 温度对重组菌转化反应的影响

温度是酶促反应中的一个重要因素,在一定的范围内酶活随温度的升高而增加,而温度过高使酶失活。当温度从 20℃ 升至 35℃ 时,(S)-苯基乙二醇的光学纯度和产率逐渐增加,当温度超过 35℃,产物的光学纯度和产率开始下降。在最适温度 35℃ 反应条件下,产物的光学纯度和产率高达 99.1% e.e. 和 89.6% (图 6-B)。

3 讨论

前期研究结果表明近平滑假丝酵母能催化 2-羟基苯乙酮的不对称还原反应,获得产物 (S)-苯基乙二醇^[11,19]。本文从近平滑假丝酵母基因组中克隆出一种新型 (S)-羰基还原酶基因 *scr* II,该基因与已报道的 (S)-羰基还原酶基因 *scr* I 一致性为 85%。氨基酸序列分析结果显示 SCR II 包含典型性短链醇

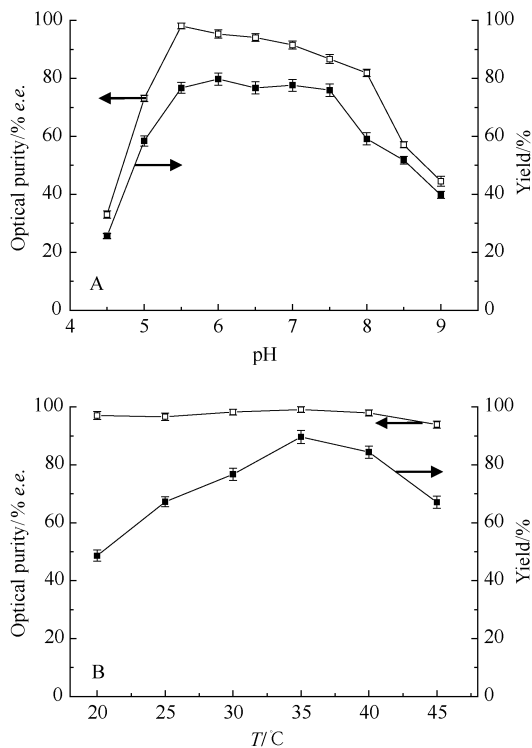


图6 pH (A) 和温度 (B) 对转化反应的影响

Fig. 6 Effects of pH (A) and temperature (B) on biotransformation reaction.

脱氢酶的两大功能域:辅酶结合域和催化三元区域,进一步证实 SCR II 是短链醇脱氢酶家族成员。通过构建该基因的重组菌 BL21 (DE3)/ pET28a-*scr* II,实现了 SCR II 在大肠杆菌中的高效表达。生物转化实验表明 SCR II 与 SCR^[18] 的催化功能和空间选择性相同,但二者的最适转化反应 pH 和转化效率具有明显差异。重组菌 BL21 (DE3)/ pET28a-*scr*

II 反应的最适 pH 为 5.5, 而中性环境非常适于 SCR 的转化反应。在最适反应条件下, 重组菌 BL21 (DE3)/pET28a-scr II 不对称还原高浓度的 2-羟基苯乙酮 (6 g/L), 获得光学纯度高达 99.1% *e. e.*、产率为 89.6% 的产物 (S)-苯基乙二醇。与含有 SCR 的重组菌相比, BL21 (DE3)/pET28a-scr II 催化反应的底物浓度不仅由 3 g/L 提高到了 6 g/L, 且产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度和产率分别提高了 10% 和 28%^[12]。表明 SCR II 具有更强的不对称还原 2-羟基苯乙酮合成 (S)-苯基乙二醇的能力。这种新型羰基还原酶 SCR II 的发现丰富了羰基还原酶的种类, 为高效制备手性醇提供了一种优良的生物催化剂, 而且为进一步研究短链羰基还原酶蛋白结构与催化功能之间的关系提供了新型研究材料。

参考文献

- [1] Forrest GL and Gonzalez B. Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129 (1-2): 21-40.
- [2] Ema T, Yagasaki H, Okita N, et al. Asymmetric reduction of ketones using recombinant *E. coli* cells that produce a versatile carbonyl reductase with high enantioselectivity and broad substrate specificity. *Tetrahedron*, 2006, 62 (26): 6143-6149.
- [3] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, et al. Molecular cloning and overexpression of the gene encoding an NADPH-dependent carbonyl reductase from *Candida magnoliae*, involved in stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64 (7): 1430-1436.
- [4] Schoemaker HE, Mink D and Wubbolts MG. Dispelling the myths-Biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299 (5613): 1694-1697.
- [5] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (1): 258-268.
- [6] Cao L, Lee JT, Chen W, et al. Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94 (3): 522-529.
- [7] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, et al. Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51: 544-550.
- [8] Lee K and Gibson D. Stereospecific dihydroxylation of the styrene vinyl group by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain NCIB 9816-4. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (11): 3353-3356.
- [9] Manzocchi A, Fiecchi A and Santaniello E. stereochemical control of bakers-yeast mediated reduction of a protected 2-hydroxy ketone. *Journal of Organic Chemistry*, 1988, 53 (18): 4405-4407.
- [10] Wei ZL, Lin GQ and Li ZY. Microbial transformation of 2-hydroxy and 2-acetoxy ketones with *Geotrichum sp.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, 8 (5): 1129-1137.
- [11] Nie Y, Xu Y and Mu X. Highly enantioselective conversion of racemic 1-phenyl-1,2-ethanediol by stereoinversion involving a novel cofactor-dependent oxidoreduction system of *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. *Organic Process Research & Development*, 2004, 8 (2): 246-251.
- [12] 吕腾飞, 徐岩, 穆晓清, 等. 木糖辅助底物对近平滑假丝酵母催化 (R,S)-苯基乙二醇不对称氧化还原合成 (S)-苯基乙二醇体系稳定性的促进作用. *催化学报 (Chinese Journal of Catalysis)*, 2007, 28 (05): 446-450.
- [13] Kamble AL, Soni P and Banerjee UC. Biocatalytic synthesis of S(-)-1-(1'-naphthyl) ethanol by a novel isolate of *Candida viswanathii*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2005, 35 (1-3): 1-6.
- [14] Kataoka M, Delacruz-Hidalgo ARG, Akond MA, et al. Gene cloning and overexpression of two conjugated polyketone reductases, novel aldo-keto reductase family enzymes, of *Candida parapsilosis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64 (3): 359-366.
- [15] Heiss C, Laivenieks M, Zeikus JG, et al. Mutation of cysteine-295 to alanine in secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* affects the enantioselectivity and substrate specificity of ketone reductions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, 9 (7): 1659-1666.
- [16] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35 (6): 603-609.
- [17] Jornvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain aldehyde dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 1995, 34 (18): 6003-6013.

- [18] Nie Y, Xu Y, Mu XQ, et al. Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (11): 3759-3764.
- [19] 羊明,徐岩,穆晓清,等 一种新的高立体选择性羰基还原酶的性质及分离. 化工进展 (*Chemical Industry and Engineering Progress*), 2006, 25 (09): 1082-1088.

Gene cloning and expression of a novel (S)-specific carbonyl reductase

Yawei Geng, Rongzhen Zhang, Shanshan Wang, Yan Xu*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [Objective] A novel (S)-specific carbonyl reductase gene (*scr II*) was cloned from the genome of *Candida parapsilosis* CCTCC M203011, and its catalytic function for the biotransformation of chiral alcohol was verified. [Methods] The possible carbonyl reductase gene *scr II* was amplified by PCR method from the *C. parapsilosis* genome. Using the recombinant *Escherichia coli* BL21/pET28a-*scr II* as the catalyst and 2-hydroxyacetophenone as the substrate, the biotransformation was carried out. The optical purity and yield of the final product were investigated by HPLC analysis. The optimal pH and temperature of the reaction were also determined. [Results] The gene *scr II* coded 279 amino acids with an open reading frame of 837 bp. It shared 85% identity with the reported gene *scr*. By analysis, SCR II contained two typical motifs of the short-chain carbonyl reductase including a Rossmann-fold Thr40-Gly41-(X)₃-Gly45-X-Gly47 and a conserved catalytic triad Ser172-(X)_n-Tyr187-(X)₃-Lys191. SDS-PAGE results showed that SCR II was overexpressed at 30°C after the induction of 0.1 mmol/L IPTG. When the concentration of 2-hydroxyacetophenone was 6 g/L, 10% (w/v) wet recombinant *E. coli* cells showed excellent performance to give (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol with high optical purity of 99.1% enantiomeric excess in a yield of 89.6% under the optimal conditions of pH 5.5 and 35°C. SCR II catalyzed the transformation of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol more efficiently than SCR. When compared with SCR, its substrate concentration was increased by two-fold, and the optical purity and yield of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol were improved by 10% and 28%, respectively. [Conclusion] The gene coding for novel carbonyl reductase SCR II was isolated using the molecular cloning technique and its discovery supplied a solid research foundation for chiral alcohol preparation efficiently.

Keywords: short-chain carbonyl reductase; gene cloning; expression; (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol; biotransformation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB724706), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z226), the National Natural Science Foundation of China (20776060), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0532)

* Corresponding author, Tel.: +86-510-85918201, Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

Received: 21 July 2009/Revised: 11 September 2009