

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12): 1593–1599; 4 December 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140573

(S)-羧基还原酶 II 于酿酒酵母孢子中表达与功能

梁宏博, 张荣珍*, 徐岩, 周晓天, 姜佳伟, 李尧慧, 高晓东, 中西秀树

江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】使近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis* CCTCC M203011) 的 (S)-羧基还原酶 II 表达并包埋于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AN120) 孢子中, 实现了重组酶高效催化生产 (S)-苯基乙二醇的转化过程。

【方法】采用 PCR 扩增技术, 从近平滑假丝酵母基因组中克隆 (S)-羧基还原酶 II 基因, 于酿酒酵母 AN120 中表达, 以醋酸钾为唯一碳源诱导培养产生孢子, 包埋 (S)-羧基还原酶 II。以该孢子为生物催化剂, 2-羟基苯乙酮为底物进行生物转化反应, 经 HPLC 分析, 计算产物的光学纯度和得率。考察了孢子催化转化反应的最适温度和 pH 值, 温度和 pH 稳定性以及多批次使用性能。【结果】在最适反应温度 40 °C 和 pH6.0 条件下, 10% (W/V) 子囊孢子催化 6 g/L 2-羟基苯乙酮, 产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度和得率均高达 99% 以上。与重组大肠杆菌相比较, 重组孢子合成 (S)-苯基乙二醇的得率由 89.7% 提高到 99.0%, 反应时间由 48 h 缩短为 4 h; 连续使用 10 批次后, 其催化产物的光学纯度几乎不变, 得率保持在 85% 以上。【结论】该研究首次实现了氧化还原酶在酵母孢子内的异源表达, 为手性化合物的高效制备奠定了坚实的研究基础。

关键词: (S)-羧基还原酶 II, 酿酒酵母孢子, 蛋白表达, 不对称转化, (S)-苯基乙二醇

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1593-07

羧基还原酶来源广泛, 从低等生物至高等动植物中均有分布^[1-3], 是一种具有高度化学、区域和立体选择性的生物催化剂, 常用于催化合成不同类型的手性化合物^[4-5]。这些手性化合物是制备具有光学活性的医药、农药和功能材料等不可缺少的中间体^[6-8]。如来源于近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis* CCTCC M203011) 的 (S)-羧基还原酶 II^[9] 能催化 2-羟基苯乙酮, 生成产物 (S)-苯基乙二醇, 该化合物是液晶材料中不可缺少的手性添加剂^[15]。随着基因工程技术的发展, 研究者往往通过异源表达的方法获得重组体系, 用于手性化合物的

催化合成, 提高生物转化的效率。如耿亚维等^[9] 在大肠杆菌构建的重组 (S)-羧基还原酶 II, 在最适条件 (35 °C 和 pH5.5) 下, 催化 6 g/L 2-羟基苯乙酮, 获得产物 (S)-苯基乙二醇, 产物的光学纯度和产率高达 99.1% e. e. 和 89.7%。

大肠杆菌作为表达系统存在一些致命的弱点, 如菌种安全性和蛋白翻译后无法修饰等, 限制了其工业应用的潜力^[4]。与大肠杆菌相比, 酿酒酵母以其安全、有利蛋白表达调控等优势逐渐成为最具潜力的基因表达宿主^[10-11]。酿酒酵母细胞在营养匮乏时产生孢子, 形成具有 4 层网状膜结构的子囊孢

基金项目: 国家自然科学基金 (31370100); 江苏省自然科学基金 (BK20131101); 教育部新世纪优秀人才资助项目 (NCET-13-0833)

* 通信作者。Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

作者简介: 梁宏博 (1990-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学和生物催化研究。E-mail: hongboliang09@gmail.com

收稿日期: 2015-05-02; 修回日期: 2015-06-16

子,可以抵御外界不良环境^[12]。同时子孢子的网状结构只允许小分子物质进出子孢子,而外源大分子被拦截在孢子外,为孢子内酶提供一个相对独立,几乎无外酶干扰的催化反应内环境。因而酵母孢子是一种极具潜力的酶固定化载体。如施礼兵等^[16]成功利用酵母孢子固定化技术包埋了 α -半乳糖苷酶,当重组孢子在较高温度下(40–45 °C)不仅较好地提高了酶活,且显著提升了酶对pH的耐受性。

在前期研究基础上^[9],本研究将(S)-羧基还原酶II基因 $scrII$ 克隆到酿酒酵母中,通过限制培养条件,诱导酿酒酵母产生子孢子,将 $scrII$ 酶系包埋在孢子内。研究结果表明重组型孢子具有非常好的催化性能和稳定性。与重组大肠杆菌和酵母细胞体

系相比较,在催化相同浓度底物2-羟基苯乙酮(6 g/L),催化产物(S)-苯基乙二醇的光学纯度和得率均高达99.0%以上,反应时间由原来的48 h缩短为4 h;反应的温度和pH范围也大幅度拓宽;该孢子反复使用10个批次后,产物的光学纯度几乎不变,得率能够维持在85%以上。这种新型异源蛋白表达与酶固定化策略为手性化合物的工业化制备奠定了坚实的研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:表1为本研究中使用的菌株和质粒。

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 $scrII$ gene	This lab
<i>Escherichia coli</i> JM109	Host of T- $scrII$	This study
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AN120	Host of pRS424-TEFpr- $scrII$, $MAT\alpha/MATa$ ARG4/arg4-Nsp1 his3 Δ SK/his3 Δ SK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3	This study
Plasmids		
pMD19-T	¹ Amp ^r , 2692 bp	TaKaRa
T- $scrII$	0.84 kb DNA fragment with $scrII$ gene in pMD19-T, 4.1 kb	This study
pRS424-TEF	¹ Amp ^r , 5800 bp	This lab
pRS424-TEFpr- $scrII$	0.84 kb DNA fragment with $scrII$ gene in pRS424-TEFpr, 6.4 kb	This study

¹ Amp^r \leq 100 mg/L.

1.1.2 主要试剂:PCR所用试剂、T4 DNA Ligase、限制性内切酶Xho I和Pst I购于大连(宝)生物有限公司,质粒提取试剂盒购于Omega Bio-Tek,PCR产物纯化试剂盒及胶回收试剂盒购于Bioer Technology Co. Ltd.,2-羟基苯乙酮购于TCI(上海)化成工业发展有限公司,辅酶NADPH购于北京索莱宝科技有限公司,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基:(1)酵母培养基(YPD, g/L):葡萄糖20,酵母膏10,蛋白胨20, pH7.0;(2)LB液培养基(g/L):蛋白胨10,酵母膏5,蛋白胨10, pH7.2; LB固体培养基:在液体培养基的基础上加琼脂粉20 g/L; LB液体和固体培养基使用前加入氨苄青霉素至终浓度100 mg/L;(3)SD-Trp筛选平板(g/L):氨基酸干粉混合物10,葡萄糖20, YNB 20, 琼脂粉20;(4)YPACE液培养基(g/L):醋酸钾20,酵母膏

10,蛋白胨20;产孢液体培养基:醋酸钾20 g/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^[13]报道的方法。质粒提取依照试剂盒说明书的方法操作。

1.3 克隆 $scrII$ 基因

以 $scrII$ 序列为模板,通过DNAMAN软件设计引物如下(下划线为酶切位点):SCR_F:5'-TGCACTGCAGATGCACCACCACCACCACCACGGCGAAATCGAATCTTATTGCA-3' (Pst I); SCR_R:5'-CCGCTCGAGCTATGGACAAGTGT-3' (Xho I)。以近平滑假丝酵母基因组为模板,PCR扩增 $scrII$,条件为:98 °C 1 min;98 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 1 min,30次循环;72 °C 10 min。PCR产物经胶回收纯化后,与pMD19-T在16 °C下连接5 h,连接产物转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109感受态细胞,涂布

氨苄青霉素抗性平板进行筛选阳性克隆, 提取质粒获得重组质粒 T-scrII。

1.4 表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Pst* I 分别对载体 pRS424-TEFpr 和质粒 T-scrII 做双酶切处理, 酶切产物分别进行胶回收, 将酶切回收后的基因和线性载体于 16 °C 下连接过夜, 连接产物转化感受态细胞 *E. coli* JM109, 涂布氨苄青霉素抗性平板培养, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养 (37 °C, 200 r/min), 提取质粒进行双酶切验证后送至上海生工进行 DNA 测序, 得到阳性克隆 *E. coli* JM109/pRS424-TEFpr-scrII 并保藏菌株。

1.5 重组质粒转化酵母细胞和产生孢子

提取重组质粒 pRS424-TEFpr-scrII 待用, 于 YPD 液体培养基中培养酵母 AN120 (30 °C, 200 r/min) 至 $OD_{600} = 1.0$, 离心收集菌体转移至无菌的 1.5 mL 离心管中, 用 ddH₂O 洗涤 2 次。使用 100 μL 缓冲液 (2 mol/L LiAc 10 μL, 1 mol/L DTT 10 μL, 50% PEG 80 μL) 悬浮菌体, 加入 1.5 μL 重组质粒 pRS424-TEFpr-scrII, 45 °C 温浴 30 min 后涂布 SD-Trp 平板, 待长出单菌落后挑取单菌落用 YPD 液体培养基培养。

YPD 液体培养基培养至 $OD_{600} = 1.0$ 时, 以 1% 接种量转接至 1 L 的 YPACE 液体培养基中, 于 30 °C, 200 r/min 培养 24 h。无菌离心菌体, 去除培养基后用产孢培养基重悬菌体, 继续培养 2-3 d, 镜检产孢程度。离心收集菌体后用少量 PBS 缓冲液 (pH6.0) 重悬菌体, 在 37 °C 用裂解酶 Lyticase 处理菌体, 再用超声细胞破碎仪破碎菌体, 显微镜镜检至 90% 以上孢子处于游离状态即可。离心收集孢子并用缓冲液洗涤 2 次之后用于生物转化。

1.6 不对称还原反应及其产物检测

在 1 mL 磷酸钠缓冲液 (pH5.5) 中, 加入 6 mg 的 2-羟基苯乙酮和等摩尔量的辅酶 NADPH, 0.1 g (10%, W/V) 的孢子, 于 35 °C, 200 r/min 下反应 5 h。离心取上清并用 2 倍体积乙酸乙酯萃取, 吸取上层清液过有机滤膜后装入样品瓶中。样品经 HPLC 分析, 依据标准曲线及峰面积计算产物的光学纯度和产率^[14]。同时, 用相同方法培育未转入重组质粒的酿酒酵母 AN120, 所得野生型孢子采用同样方法配制反应体系进行生物转化, 作为负对照组。

1.7 重组孢子的最适反应温度与温度稳定性

如 1.6 中所述配制反应体系, 在不同温度 (20-80 °C) 下进行生物转化, 反应结束后同 1.6 所述处理样品进行检测。

分别在 1 mL 缓冲液 (pH6.0) 中加入 0.1 g 孢子, 置于不同温度 (20-80 °C) 下保温 1 h, 离心弃上清后, 同 1.6 所述配制反应体系, 在 20 °C, pH6.0 条件下进行生物转化反应。

1.8 重组孢子的最适反应 pH 与 pH 稳定性

如 1.6 所述反应体系, 反应温度为 40 °C, 在不同 pH 缓冲液 (pH5.0-9.0) 中进行生物转化, 反应结束后, 同 1.6 所述处理样品进行检测。

分别在不同 pH 缓冲液 (pH5.0-9.0) 中加入 0.1 g 孢子, 置于 4 °C 环境下 24 h, 离心弃上清后, 同 1.6 所述配制反应体系, 在 20 °C, pH6.0 条件下进行生物转化反应。

1.9 重组孢子的多批次性能

如 1.6 所述配制反应体系 (pH6.0), 于 30 °C、200 r/min 下反应 4 h 后同 1.6 所述处理样品并进行检测。离心得到的沉淀用 ddH₂O 洗涤 2 次重复上一步, 重复 10 次。

2 结果

2.1 重组质粒构建及孢子培育

以近平滑假丝酵母基因组为模板, SCR_F 和 SCR_R 为引物, 通过 PCR 扩增 *scrII*, 产物经胶回收纯化后与 pMD19-T 连接, 构建 T-scrII。将 T-scrII 和 pRS424-TEFpr 分别进行双酶切处理, 胶回收后于 16 °C 连接, 连接产物经过 PCR 与双酶切验证, 获得重组质粒 pRS424-TEFpr-scrII。重组质粒经上海生工测序, 基因测定序列与目的基因 *scrII* 序列的同源性为 100%。

重组质粒转入酵母 AN120 后, 培养重组酵母菌至 $OD_{600} = 1.0$ 时, 以 2% KAc 重悬菌体, 继续培养 2-3 d, 镜检产孢程度。显微镜镜检结果表明酵母孢子培育成功 (图 1)。

2.2 重组孢子的不对称转化功能验证

以 10% (W/V) 的重组孢子为催化剂, 6 g/L 的 2-羟基苯乙酮为底物, 添加等摩尔量的 NADPH, 在 35 °C、pH5.5 的条件下进行反应, 每隔 1 h 取样分析。结果显示 (图 2), 重组孢子催化转化底物 2-羟

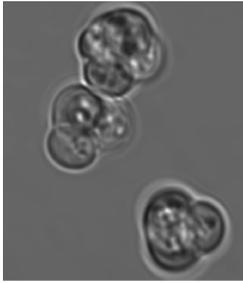


图 1. 子囊孢子照片 (1000 ×)

Figure 1. Microscopy images of ascospore (1000 ×).

基苯乙酮产生 (*S*)-苯基乙二醇。在反应的起始阶段,随着反应时间的增加,产物 (*S*)-苯基乙二醇的产率逐步提高,5 h 后趋于平衡。此时,产物的光学纯度和得率分别为 98.7% e. e. 和 91.2%。而野生型孢子对底物 2-羟基苯乙酮几乎没有催化活性,表明目标酶于酿酒酵母孢子中成功表达。

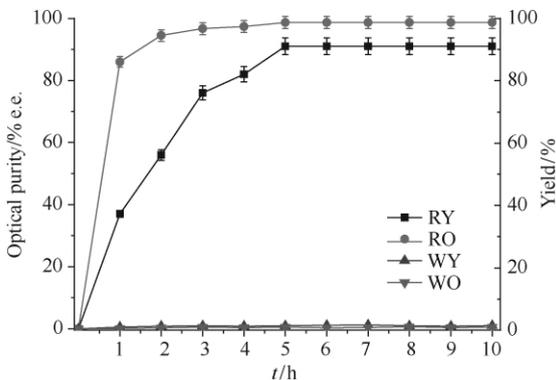


图 2. 重组孢子不对称转化反应过程曲线

Figure 2. Asymmetric bioreduction of 2-hydroxyacetophenone by recombinant spores. RY: Yield of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; RO: Optical purity of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; WY: Yield of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by wild type spores; WO: Optical purity of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by wild type spores.

2.3 温度对重组孢子催化转化反应的影响

生物转化结果表明,产物 (*S*)-苯基乙二醇的光学纯度和得率与温度相关。当温度从 20 °C 上升到 40 °C 时,产物的得率逐渐增加,当温度超过 40 °C,产物的得率开始下降。在最适温度 40 °C 条件下,产物的光学纯度和产率达到 99.1% e. e. 和 96.6% (图 3)。

2.4 pH 值对重组孢子催化转化反应的影响

采用最适反应温度 (40 °C) 进行生物转化反应 5 h 后,HPLC 分析产物 (*S*)-苯基乙二醇的光学纯度

和得率,研究发现当 pH 为 6.0 时,产物 (*S*)-苯基乙二醇的光学纯度和得率达到最大值,分别为 99.3% e. e. 和 99.0%。定时取样检测结果表明反应时间由 5 h 缩短为 4 h (图 4)。

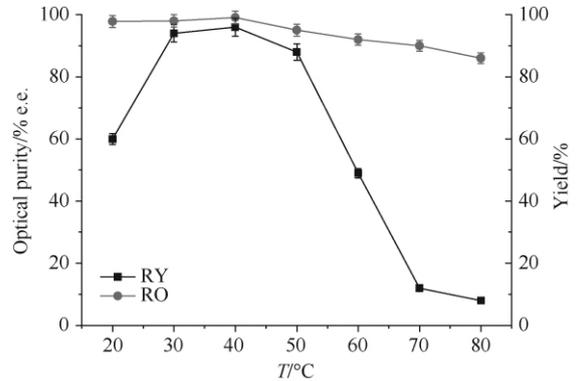


图 3. 温度对重组孢子生物转化反应的影响

Figure 3. Effects of temperature on biotransformation by recombinant spores. RY: Yield of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; RO: Optical purity of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores.

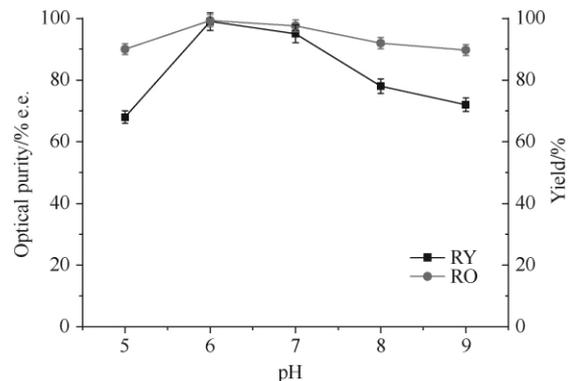


图 4. pH 对重组孢子生物转化反应的影响

Figure 4. Effects of pH on biotransformation by recombinant spores. RY: Yield of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; RO: Optical purity of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores.

2.5 重组孢子转化反应的温度和 pH 稳定性

当生物转化 4 h 后,经 HPLC 分析产物 (*S*)-苯基乙二醇的光学纯度和得率。结果显示,当重组孢子在 40 °C 条件下保温 1 h 后,转化生成产物 (*S*)-苯基乙二醇的光学纯度几乎不变,得率约为 90.0%。50 °C 条件下保温 1 h 后,产物的得率高于 60.0% (图 5-A)。表明重组孢子对温度具有较好的耐受性。重组孢子在极端条件下 (pH5.0 或 pH9.0) 放置 24 h 后再进行不对称转化,产物 (*S*)-苯基乙二醇

的光学纯度维持在 99% 以上, 得率为 86% 左右 (图 5-B)。

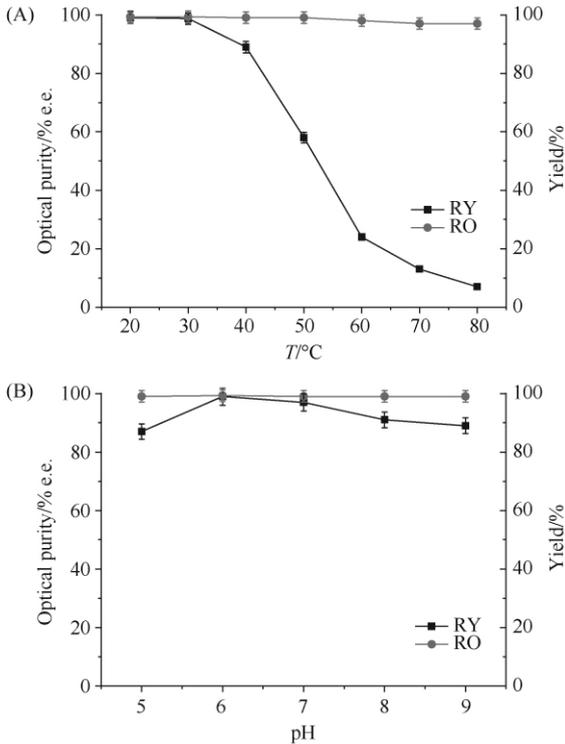


图 5. 重组孢子转化反应的温度 (A) 和 pH (B) 稳定性

Figure 5. The stability of recombinant spores at different temperatures (A) and pH values (B). RY: Yield of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; RO: Optical purity of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores.

2.6 多批次使用性能

由 2.5 中温度稳定性结果得知, 重组孢子长时间暴露于 40 °C 环境下重组孢子活性稍有下降, 因此批次实验中采用催化性能更稳定的 30 °C 作为反应温度。以 10% (W/V) 的重组孢子为催化剂, 6 g/L 的 2-羟基苯乙酮为底物, 添加等摩尔量的 NADPH, 在 30 °C、pH6.0 条件下反应 4 h。HPLC 分析产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度和得率。沉淀用 ddH₂O 洗涤 2 次后重复上面的步骤。重复使用 10 次后, 结果 (图 6) 表明, 孢子催化转化产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度为 99.1%, 产物的得率为 85.1%。

3 讨论

前期研究结果表明重组大肠杆菌 (S)-羧基还原酶 II 能不对称转化 2-羟基苯乙酮, 产生产物 (S)-苯基乙二醇^[9]。但生物转化产物的得率低于 90%,

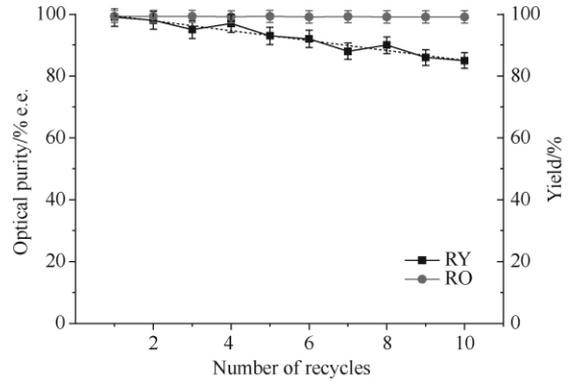


图 6. 重组孢子多批次转化反应性能

Figure 6. Biotransformation performance of recombinant spores in multi-batches. RY: Yield of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores; RO: Optical purity of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant spores.

且重组菌对外界环境耐受性较差, 难以实现多批次转化反应。酿酒酵母孢子是一种无毒无害、具有天然抗逆性的休眠体, 孢子膜为网状结构, 能保证小分子物质传质的情况下将大分子物质拦截在孢子外, 避免外源大分子对孢子内环境造成干扰, 是一种非常理想的固定化酶载体。

本研究采用新型蛋白表达与固定化方法, 以酿酒酵母为宿主表达 (S)-羧基还原酶 II, 通过加入醋酸钾作为唯一的能源物质进行酿酒酵母培养, 诱导细胞产生孢子, 将目标酶包埋于孢子内, 形成重组孢子。研究表明以 10% (W/V) 的重组孢子为生物催化剂, 催化 6 g/L 2-羟基苯乙酮, 在最适反应条件 (40 °C, pH6.0) 下转化产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度和得率均高达 99% 以上。与前期在大肠杆菌中表达时相比, 最适温度和 pH 均有不同程度改变, 这是由于目标酶在酵母中表达时蛋白折叠发生了变化导致。相比重组大肠杆菌体系, 重组孢子催化产物 (S)-苯基乙二醇的得率由 89.7% 提高至 99.0%, 反应时间由原来的 48 h 缩短为 4 h; 重组孢子在 50 °C 环境下催化生成 (S)-苯基乙二醇, 产物的光学纯度几乎不变, 得率仍维持在 85% 以上。在 pH5.0 或 pH9.0 条件下放置 24 h 后进行生物转化反应, 其转化产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度维持在 99% 以上, 得率仍高达 85% 以上; 表明重组孢子的转化反应具有很好的温度和 pH 耐受性。同时重组孢子具有很好的批次使用性能, 反复使用 10 个批次后, 其催化转化产物 (S)-苯基乙二醇的光学纯度高于 99%, 得率仍高达 85.2%。(S)-羧基还原酶 II

在孢子中的异源表达技术的开发为高效制备手性化合物提供了成功可靠的生物材料。重组酵母孢子固定化酶技术的发展,为手性化合物的高效制备奠定了坚实的基础。由于(S)-羰基还原酶 II 属于氧化还原酶,在催化手性转化反应的过程中,需要添加辅酶 NADPH,因此后期研究中可通过构建偶联体系,实现辅酶 NADPH 原位再生,进一步降低手性化合物的制备成本,提高生物转化效率。

参考文献

- [1] Forrest GL, Gonzalez B. Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129 (1/2) : 21-40.
- [2] Nakamura K, Yamanaka R, Matsuda T, Harada T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2003, 14 (18) : 2659-2681.
- [3] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S. 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, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299 (5613) : 1694-1697.
- [5] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (6817) : 258-268.
- [6] Cao L, Lee J, Chen W, Wood TK. 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] Carey JS, Laffan D, Thomson C, Williams MT. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4 (12) : 2337-2347.
- [8] Lee K, Gibson DT. 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] Geng YW, Zhang RZ, Wang SS, Yan X. Gene cloning and expression of a novel (S)-specific carbonyl reductase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (1) : 60-66. (in Chinese)
- 耿亚维, 张荣珍, 王珊珊, 徐岩. 一种新型(S)-羰基还原酶的克隆及其功能表达. *微生物学报*, 2010, 50 (1) : 60-66.
- [10] Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Inoue H, Murakami K, Takimura O, Sawayama S. Expression of protein engineered NADP plus-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81 (2) : 243-255.
- [11] Kwak GH, Kim JR, Kim HY. Expression, subcellular localization, and antioxidant role of mammalian methionine sulfoxide reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 2009, 42 (2) : 113-118.
- [12] Kupiec M, Byers B, Esposito R, Mitchell A. Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* // Pringle JR, Broach JR, Jones EW. *The Molecular and Cell Biology of the Yeast Saccharomyces*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 889-1036.
- [13] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, Xu Y. 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.
- [14] Nie Y, Xu Y, Mu XQ. Highly enantioselective conversion of racemic 1-phenyl-1, 2-ethanediol by stereoinversion involving a novel cofactor-dependent oxidoreduction system of *Candida parapsilosis* CCTCCM 203011. *Organic Process Research & Development*, 2004, 8 (2) : 246-251.
- [15] Zhang RZ, Geng YW, Xu Y, Zhang WC, Wang SS, Xiao R. Carbonyl reductase SCR II from *Candida parapsilosis* catalyzes anti-Prelog reaction to (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol with absolute stereochemical selectivity. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2) : 483-489.
- [16] Shi LB, Li ZJ, Tachikawa H, Gao XD, Nakanishi H. Use of yeast spores for microencapsulation of enzymes. *Applied & Environmental Microbiology*, 2014, 80 (15) : 4502-4510.

Expression and functions of (S)-carbonyl reductase II in *Saccharomyces cerevisiae* spores

Hongbo Liang, Rongzhen Zhang^{*}, Yan Xu, Xiaotian Zhou, Jiawei Jiang, Yaohui Li, Xiaodong Gao, Nakanishi Hideki

School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To realize efficient biotransformation of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by recombinant (S)-carbonyl reductase II, we expressed (S)-carbonyl reductase II from *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 and embedded it in the spores of *Saccharomyces cerevisiae* AN120. [Methods] (S)-carbonyl reductase II gene was cloned from *C. parapsilosis* genome and expressed in *S. cerevisiae* AN120 by PCR amplification. When cultured with potassium acetate as the sole carbon source, the yeast spores were produced, and embedded the recombinant (S)-carbonyl reductase II. Using 10% W/V spores as biocatalysts, 6 g/L 2-hydroxyacetophenone as substrate, the biotransformation was carried out and the optical purity and yield of products were analyzed by HPLC. During the biotransformation of 2-hydroxyacetophenone to (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol, the optimal temperature and pH, stability and reusability of the recombinant spores were determined. [Results] The recombinant yeast spores showed excellent performance to give (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol with a high optical purity of 99.3% and a high yield of 99.0% at the optimal temperature (40 °C) and pH (6.0). Compared with the recombinant *Escherichia coli*, the spores improved the yield of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol from 89.7% to 99.0%, and shortened the biotransformation duration from 48 h to 4 h. After being reused for 10 times, the recombinant spores biotransformed (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol with a stable optical purity of about 99% and a yield over 85%. [Conclusion] The heterologous expression of oxidoreductases was first realized in yeast spores, which laid a solid foundation for efficient preparation of chiral compounds.

Keywords: (S)-carbonyl reductase II, *Saccharomyces cerevisiae* spore, protein expression, asymmetric transformation, (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370100), by the National Science Foundation of Jiangsu Province (BK20131101) and by the Program for New Century Excellent Talents in Universities (NCET-13-0833)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 2 May 2015 / Revised: 16 June 2015