



(S)-羧基还原酶 II 与葡萄糖脱氢酶共催化高效合成(S)-苯乙二醇

姜佳伟, 张荣珍*, 周晓天, 李坤鹏, 李静, 李尧慧, 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, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】通过优化获得最佳酶活配比, 设计近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011的(S)-羧基还原酶 II 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) YX-1葡萄糖脱氢酶在大肠杆菌中的共表达体系, 实现重组菌高效催化2-羟基苯乙酮, 合成(S)-苯乙二醇。【方法】分别从重组大肠杆菌中纯化了(S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶, 研究了2种酶共催化2-羟基苯乙酮的最佳酶活比例, 最适催化温度和pH, 由此构建(S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶的共表达体系。【结果】(S)-羧基还原酶 II 的比酶活力为1.3 U/mg, 葡萄糖脱氢酶的比酶活力为13.5 U/mg。在总酶活力为1 U时, (S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶共催化体系中, 确定了2种酶的最佳比例在1 : 1到5 : 1 (U/U)之间, 最适反应温度为30 °C, pH为7.0。在此基础上构建了(S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶基因比为1 : 1的共表达体系, 共表达重组菌破碎上清液中(S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶酶活分别为0.76 U/mg和0.73 U/mg, 两者的酶活比例为1 : 1。在上述确定的最适催化条件下, 其催化10 g/L 2-羟基苯乙酮, 产物(S)-苯乙二醇的光学纯度和得率均高达99%以上。与仅含有(S)-羧基还原酶 II 的重组大肠杆菌相比, 共表达体系转化产物(S)-苯乙二醇的得率明显提高, 且转化时间由原来的24 h缩短为13 h。【结论】通过确定(S)-羧基还原酶 II 和葡萄糖脱氢酶最佳酶活配比, 为构建手性催化的靶酶和辅酶再生酶共表达体系, 为实现手性化合物的高效制备提供了研究基础。

关键词: (S)-羧基还原酶 II, 葡萄糖脱氢酶, (S)-苯乙二醇, 不对称还原, 双酶偶联体系

光学纯手性醇是一类重要的手性模块, 广泛应用于农药、制药及精细化工行业, 具有非常高的应用价值^[1-3]。如(S)-苯乙二醇不仅是合成杀虫剂的重要中间体, 也是液晶制备中不可缺少的手性添加剂。目前制备(S)-苯乙二醇主要有化学法和

生物法。化学合成(S)-苯乙二醇原材料和溶剂消耗大, 步骤繁琐, 反应条件苛刻, 产品光学纯度低, 且反应中需要添加有毒的手性催化剂和保护剂^[4-5]。而生物催化法反应条件温和, 催化过程具有高度的区域、化学和立体选择性, 逐渐成为了

基金项目: 国家自然科学基金(31370100); 江苏省自然科学基金(BK20131101); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51409B); 教育部新世纪优秀人才(NCET-13-0833); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(2015-SWYY-010)

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

收稿日期: 2016-01-09; 修回日期: 2016-03-03; 网络出版日期: 2016-05-05

国内外手性制备的主要发展趋势^[6-8]。

在所有催化手性制备的生物催化剂中，氧化还原酶能针对关键手性位点直接进行催化获得目的手性产物^[9-10]。然而氧化还原酶在催化手性合成过程中，需要辅酶NAD(P)(H)的参与，这些烟酰胺类辅酶价格昂贵、稳定性差、难以重复利用，导致手性合成成本高^[11-12]。

本实验室成功从近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)基因组中钓取了(S)-羰基还原酶II基因，于大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)菌株中高效表达。重组型(S)-羰基还原酶II在辅酶NADPH的参与下，催化2-羟基苯乙酮生成(S)-苯乙二醇，最适温度和pH分别为35 °C和6.0，在低于40 °C，pH在5.0-7.0条件下稳定性较好^[13]。同时从*Bacillus* sp. YX-1中成功筛选到葡萄糖脱氢酶，该酶不仅具有较宽广的底物谱，且具有很好的有机溶剂耐受性，可催化多种糖底物，用于辅酶循环再生，该酶催化葡萄糖的最适温度和pH分别为45 °C和8.0，在低于30 °C，pH在6.0-9.0条件下稳定性较好^[14]。本研究在上述研究

的基础上，成功调控手性合成的靶酶(S)-羰基还原酶II和辅酶循环的葡萄糖脱氢酶的最佳配比，在此基础上，构建了双酶偶联的共表达体系，该体系能高效催化10 g/L 2-羟基苯乙酮的不对称还原反应，生成(S)-苯乙二醇，产物的手性纯度和得率均高达99%以上。

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。

1.1.2 主要试剂和仪器：*Taq* DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶、IPTG均购于TaKaRa生物有限公司。质粒提取试剂盒和DNA回收试剂盒购于OMEGA BIO-TEK。DNA Marker购于天根生化科技有限公司。引物由上海睿迪生物科技有限公司合成。2-羟基苯乙酮、(R)和(S)-苯乙二醇购于TCI(日本)公司；辅酶NADP(H)购于上海索来宝公司；其余试剂均为国产分析纯。酶

表1. 菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids

Strains and plasmids	Application	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5a	Host for cloning target gene	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for target gene expression	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-SCR11	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-SCR11	This lab ^[13]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-GDH	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-GDH	This lab ^[14]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/S-SD-AS-G	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-S-SD-AS-G	This study
Plasmids		
pMD19-T	The plasmid for target gene cloning	Invitrogen
pET-28a	The plasmid for target gene expression	Invitrogen
pET-SCR11	pET-28a containing SCR11	This lab
pET-GDH	pET-28a containing GDH	This lab
pET-S-SD-AS-G	pET-28a containing SCR11, SD-AS sequence and GDH	This study

标仪购自美国Thermo公司; 超声破碎仪VCX750购自美国Sonic公司; AKTA蛋白纯化仪和镍离子亲和层析柱及Superdex-200凝胶柱购自美国GE公司; 高效液相色谱仪Agilent 1100购自美国安捷伦公司, 液相手性柱Chiralcel OB-H (4.6 mm×250 mm) 购自日本Daicel公司。

1.2 菌体的培养及蛋白表达

将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-SCR_{II} 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-GDH 接种到含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养 8 h 后, 转接到 1 L 相同培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 向培养基中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 17 °C 诱导培养 14 h 后, 收集菌体。菌体裂解液用于 SDS-PAGE 分析, 检测目标蛋白 (S)-羰基还原酶 II (SCR_{II}) 和葡萄糖脱氢酶 (GDH) 的表达。

1.3 蛋白纯化

分别称取 10 g 湿菌体 *E. coli* BL21/pET-SCR_{II} 和 *E. coli* BL21/pET-GDH, 重悬于 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 于冰浴中超声破碎细胞 (工作 1 s, 间隔 3 s, 工作时间 20 min), 4 °C 条件下, 12000×g 离心 40 min, 收集上清液作为粗酶液。利用镍离子亲和层析柱和 Superdex-200 凝胶柱 2 个纯化步骤, 对 SCR_{II} 和 GDH 进行纯化, 具体方法参考文献 [15]。纯酶液超滤脱盐后用于酶活力测定。

1.4 酶活力的测定

由于 SCR_{II} 和 GDH 催化的反应生成 NAD(P)(H), 导致 340 nm 处吸光值的变化。SCR_{II} 酶活测定: 总反应体积 100 μL, 分别加入终浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (pH 6.0)、0.5 mmol/L 的 NADPH 和 5.0 mmol/L 的 2-羟基苯乙酮, 35 °C 保温 2 min, 加入适量纯酶液后开始扫描 340 nm 处吸光值的变化。GDH 酶活测定: 总反应体积 100 μL, 分别加入终浓度为 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0)、

2.0 mmol/L 的 NADP⁺ 及 0.1 mol/L 的 D-葡萄糖, 35 °C 保温 2 min, 加入适量纯酶液后开始扫描 340 nm 处吸光值的变化。蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白 BSA 为标准品。酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟催化生成 1 μmol 的 NAD(P)(H) 的酶量定义为 1 个酶活单位。

酶活的计算公式为: 酶活(U) = $\frac{EW \times V \times 10^3}{6220 \times 0.3}$

比活的计算公式: 比活(U/mg) = $\frac{\text{酶活(U)}}{\text{蛋白量(mg)}}$

其中, EW: 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化; V: 反应液的体积 (mL); 6220: 摩尔消光系数 [L/(mol×cm)]; 0.3: 光程距离 (cm)。

1.5 不对称还原反应及其检测

在 1 mL 的缓冲液中, 加入 10 mg 的 2-羟基苯乙酮, 20 mg 的葡萄糖, 2 mmol/L 的 NADPH 和总量为 1 U 的纯酶 SCR_{II} 和 GDH, 于 30 °C、200 r/min 下反应, 每隔 0.5 h 取样。离心取上清反应液用 2 mL 乙酸乙酯萃取; 萃取液经 HPLC 分析, 流动相: 正己烷: 异丙醇 = 9:1; 柱流量: 0.4 mL/min; 柱温: 38 °C; 可变波长扫描紫外检测器 (VWD), 检测波长为 215 nm。根据峰面积计算产物 (S)-苯乙二醇的光学纯度及产率^[16]。

1.6 SCR_{II}和GDH共催化的最佳比例分析

将纯化后的 SCR_{II} 和 GDH, 按照酶活比例 1:20–50:1, 进行双酶催化 2-羟基苯乙酮, 计算产物 (S)-苯乙二醇的光学纯度和得率, 以确定 SCR_{II} 和 GDH 共催化合成 (S)-苯乙二醇的最佳比例。

1.7 温度和pH对双酶共催化转化(S)-苯乙二醇的影响

为测定双酶共催化 2-羟基苯乙酮的最适温度, 分别让其在 20–60 °C、200 r/min 反应, 计算产物 (S)-苯乙二醇的光学纯度和得率, 确定最适反应温度。最适反应 pH 的确定: 在最适温度条件下, 缓冲液分别为 0.1 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液

(pH 5.0–5.5); 0.1 mol/L的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(pH 6.0–7.0); 0.1 mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 7.5–8.0)时, 计算在各pH条件下产物(S)-苯乙二醇的光学纯度和得率, 确定最适反应pH。

1.8 双酶共表达体系的构建

根据1.2.5中确定SCR II和GDH高效催化(S)-苯乙二醇的最佳配比, 设计了SCR II基因更靠近启动子, GDH基因远离启动子, 为了加快核苷酸的转录过程, 在2个基因之间插入了SD-AS序列, 构建了2种酶的共表达重组大肠杆菌。具体方法: 采用重叠延伸PCR的方法, 利用表2中的引物SCR II_F和Co_R及Co_F和GDH_R, 以质粒pET-SCR II和pET-GDH为模板, 分别扩增出共表达基因序列的前、后半段序列; 两片段经过退火重叠连接后于72 °C在DNA聚合酶的作用下延伸至完整

的双链; 以上一轮获得的完整双链DNA为模板, 利用两侧引物SCR II_F和GDH_R经过PCR获得共表达基因S-SD-AS-G。将2个基因重新连接到表达载体pET-28a上, 并转化到*E. coli* BL21(DE3)的感受态中, 经过酶切和DNA测序验证, 获得重组菌*E. coli* BL21(DE3)/S-SD-AS-G。

1.9 双酶共表达体系的生物催化

重组菌*E. coli* BL21(DE3)/S-SD-AS-G于37 °C条件下培养8 h, 加入终浓度0.1 mmol/L IPTG进行诱导, 继续培养14 h后, 收集菌体。将收集的菌体在4 °C条件下, 12000×g离心10 min, 去上清液, 用生理盐水洗涤菌体3次, 再在相同条件下离心即获得湿菌体, 称取0.1 g的湿菌体用于生物转化反应。

在1 mL的PBS缓冲液(pH 7.0)中, 加入10 mg

表2. 构建共表达体系所需的引物

Table 2. Primers used in construction of co-expression system

Primers	Sequences (5'→3')
Co_R	CGGATACATGGTATATCTCCTTCCTATGGACAAGTGTAACCACCATCGAC
Co_F	TGTCCATAGGAAGGAGATATACCATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTC
SCR II_F	ATCCTGCTAGCATGGGCGAAATCGAATCTTATTGC (<i>Nhe</i> I)
GDH_R	TGACTCTCGAGACCGCGCCTGCCTG (<i>Xho</i> I)

The sequence of SD-AS is bold; the restriction endonuclease sites are underlined.

的2-羟基苯乙酮, 20 mg的葡萄糖, 2 mmol/L的NADPH和0.1 g的*E. coli* BL21(DE3)/S-SD-AS-G湿菌体, 于30 °C、200 r/min下反应12 h, 离心取上清反应液用2 mL乙酸乙酯萃取; 萃取液经HPLC分析, 计算产物(S)-苯乙二醇的光学纯度及产率。

2 结果和分析

2.1 SCR II和GDH纯化及二者酶活比较

按照1.3中的方法, 将N端带有组氨酸标签的SCR II和GDH分别进行纯化。经SDS-PAGE检测,

纯化后蛋白分子大小分别为35 kDa和30 kDa左右(图1)。取少量的SCR II催化2-羟基苯乙酮进行酶活测定, 其比活力为1.3 U/mg。GDH催化底物葡萄糖的酶活力为13.5 U/mg。GDH的比酶活约为SCR II的10倍左右。

2.2 SCR II和GDH催化转化(S)-苯乙二醇的最佳酶活比例

取总酶活为1 U的纯酶SCR II和GDH的混合酶液, 混合比例从1 : 20–50 : 1 (U/U), 于30 °C、pH 6.5条件下, 催化10 g/L的2-羟基苯乙酮, 计算

转化产物(*S*)-苯乙二醇的光学纯度和产率。结果如图2所示, 当SCR II:GDH小于1:1时, 随着SCR II的比例增加, 产物(*S*)-苯乙二醇得率也随之增加; 当SCR II:GDH之间的比例在1:1到5:1之间时, 产物(*S*)-苯乙二醇得率保持在96.3%以上;

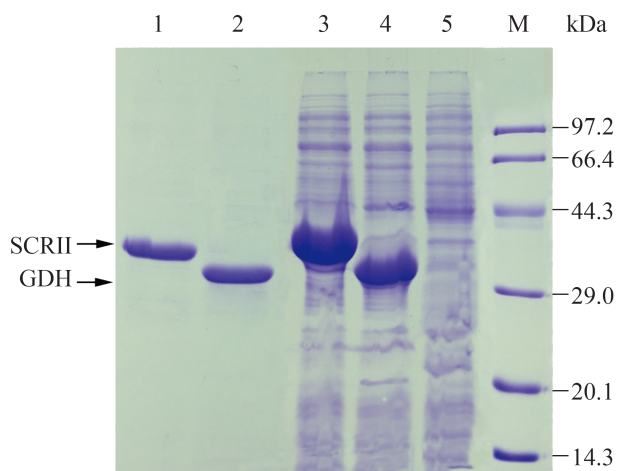


图 1. SCR II和GDH蛋白纯化SDS-PAGE分析图

Figure 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified SCR II and GDH. M: protein molecular weight markers; 1: purified SCR II; 2: purified GDH; 3: cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/pET-SCR II induced by 0.1 mmol/L IPTG; 4: cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/pET-GDH induced by 0.1 mmol/L IPTG; 5: cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a.

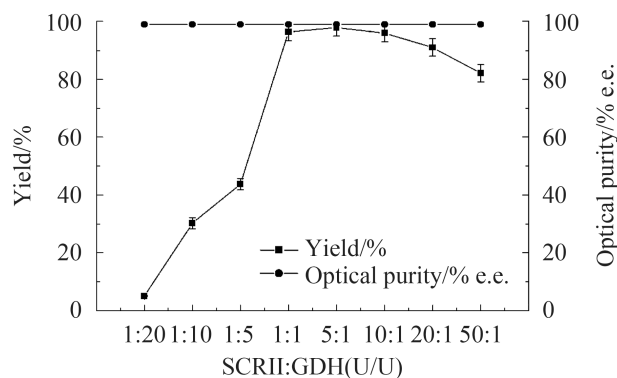


图 2. 不同酶活配比的SCR II和GDH催化转化(*S*)-苯乙二醇

Figure 2. Biotransformation of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by the various ratio of SCR II and GDH.

当SCR II:GDH之间的比例大于5:1时, 产物得率出现下降的趋势。

2.3 双酶体系共催化转化(*S*)-苯乙二醇的最适温度和pH

在SCR II和GDH配比为1:1的条件下, 利用SCR II和GDH双酶共催化2-羟基苯乙酮的不对称还原反应。结果如图3和4所示, 在20–30 °C时, 酶活配比为1:1的SCR II和GDH生物转化产物(*S*)-苯

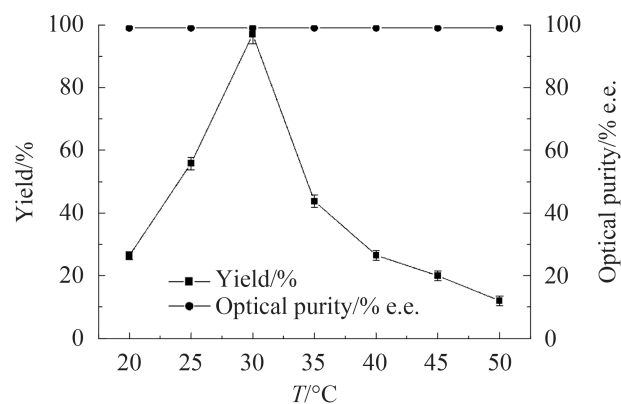


图 3. 温度对SCR II和GDH共催化转化(*S*)-苯乙二醇的影响

Figure 3. Effects of temperature on the biotransformation of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by SCR II and GDH.

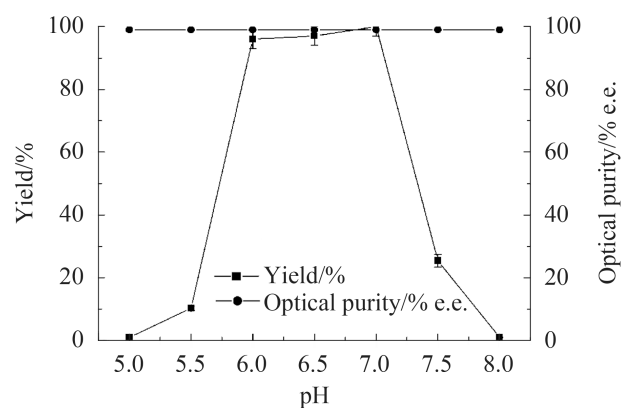


图 4. pH对SCR II和GDH共催化转化(*S*)-苯乙二醇的影响

Figure 4. Effects of pH on the biotransformation of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by SCR II and GDH.

乙二醇得率随着温度的升高而提高, 而30–50 °C时, 产物(S)-苯乙二醇得率随着温度的升高而降低。在30 °C时, 产物的得率达到最高值, 为99.1%。当pH 5.0–7.0的条件下, 产物(S)-苯乙二醇得率随着pH的升高而提高, 而pH 7.0–8.0时, 产物得率随着pH的升高而降低。在pH 7.0时, 产物得率达到最大值, 为99.6%。

2.4 SCRII和GDH共表达体系的构建与双酶表达

按照1.2.7所述方法构建了SCRII和GDH的共表达质粒pET-S-SD-AS-G, 转化到*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞, 经过酶切和DNA测序验证, 获得阳性克隆*E. coli* BL21(DE3)/pET-S-SD-AS-G。

E. coli BL21(DE3)/pET-S-SD-AS-G经0.1 mmol/L的IPTG于17 °C诱导14 h后, 收集菌体, 菌体裂解液经SDS-PAGE分析。结果表明: 与不含目的基因的对照菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a相比, 共

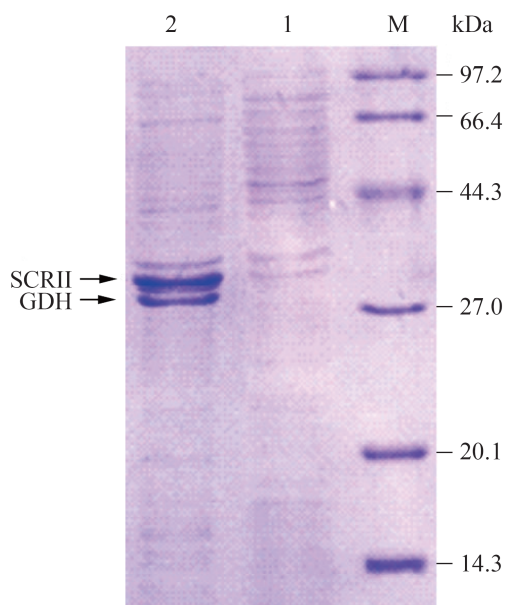


图 5. 共表达体系中表达产物的SDS-PAGE分析

Figure 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell-free extracts in co-expression system. M: protein molecular weight markers; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-S-SD-AS-G.

表达菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET-S-SD-AS-G出现了2条明显的蛋白条带, 其分子量分别为35 kDa和30 kDa, 与SCRII和GDH单酶大小一致(图5), 取少量的细胞破碎上清液进行酶活测定, SCRII催化底物2-羟基苯乙酮比活力为0.76 U/mg, GDH催化底物葡萄糖的酶活力为0.73 U/mg, 表明共表达体系中SCRII和GDH酶活比例大约为1 : 1。

2.5 共表达体系催化转化(S)-苯乙二醇

以重组菌*E. coli* BL21 (DE3)/pET-S-SD-AS-G为生物催化剂, 催化2-羟基苯乙酮(10 g/L)的不对称还原反应, 检测产物(S)-苯乙二醇的光学纯度和得率, 结果如图6所示。在整个生物转化反应过程中, 产物(S)-苯乙二醇光学纯度始终维持在99%以上, 反应13 h后, 底物2-羟基苯乙酮基本被完全消耗, 产物(S)-苯乙二醇的得率高达99%以上。与仅含有SCRII单酶的重组大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)/pET-SCRII相比, 生物转化的2-羟基苯乙酮的底物浓度提高了近2倍, 产物得率由89.6%提高到99%以上。转化时间相比原来的24 h缩短了一半左右^[13]。

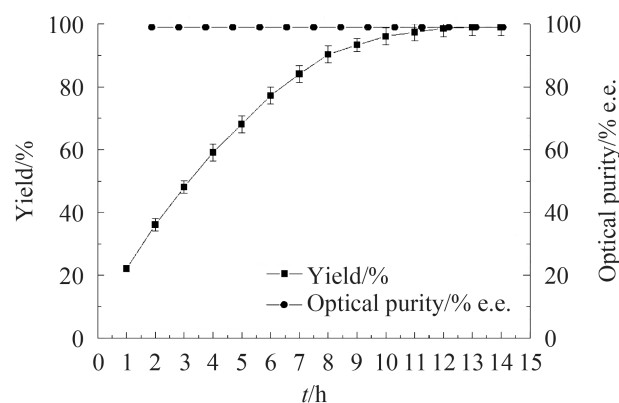


图 6. *E. coli* BL21 (DE3)/pET-S-SD-AS-G催化转化(S)-苯乙二醇的时间曲线

Figure 6. Time course of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol biotransformation catalyzed by *E. coli* BL21(DE3)/pET-S-SD-AS-G.

3 讨论

前期研究结果表明重组型(S)-羰基还原酶II在辅酶NADPH的参与下, 催化2-羟基苯乙酮的不对称还原反应, 生成(S)-苯乙二醇^[13]。但随着底物2-羟基苯乙酮浓度的增加, 辅酶将成为手性催化的限制性因素^[17]。构建手性催化的靶酶与辅酶再生循环相关酶的偶联体系是实现高效低成本手性制备的一种有效手段。来自芽孢杆菌属的葡萄糖脱氢酶具有广底物催化谱, 稳定性高, 有机溶剂耐受性好, 可用于NADPH和NADH 2种辅酶的循环^[18-19]。

本研究将*Bacillus* sp. YX-1葡萄糖脱氢酶作为辅酶再生循环酶, 引入到(S)-羰基还原酶II催化(S)-苯乙二醇的代谢途径中, 构建一个高效催化的共表达体系。但是葡萄糖脱氢酶比酶活是(S)-羰基还原酶II的十倍左右。因而在设计共表达体系前, 分别对2种酶先进行纯化处理, 然后确定二者的一个最佳催化酶活的配比, 以及二者共催化过程中的最佳催化条件, 如温度和pH等。研究发现催化手性合成的靶酶和辅酶再生循环的酶共催化的酶活比例在1:1到5:1(U/U)之间, 最适温度和pH分别为30 °C和7.0, pH介于2个单酶本征最适pH之间, 而温度更靠近SCR II的最适温度, 产物(S)-苯乙二醇得率均高于96%, 根据上述研究结果, 可以选择(S)-羰基还原酶II和葡萄糖脱氢酶基因个数比为1:1, 构建共表达体系*E. coli* BL21 (DE3)/pET-S-SD-AS-G。由于SCR II更靠近启动子使得诱导表达后SCR II的表达量明显高于GDH, 经酶活测定, 共表达重组菌破碎上清液中SCR II比酶活为0.76 U/mg, GDH比酶活为0.73 U/mg, 两者总酶活力接近1:1, 处在最佳的酶活配比范围内, 有利于催化2-羟基苯乙酮。采用全细胞在最适反应温度30 °C、pH 7.0的条件下, 催化10 g/L 2-羟基苯乙酮, 产物(S)-苯乙二醇的光学纯度和得率均高达99%以上。由于SCR II是催化合成手性产

物的关键酶, 具有高度的立体选择性, 产物的手性纯度与酶催化反应的初始速度相关^[20], 因而无论是单酶还是共表达体系催化2-羟基苯乙酮时, 转化产物(S)-苯乙二醇的光学纯度均维持在99%以上。Zhou等^[21]研究了(R)-羰基还原酶和葡萄糖脱氢酶的共表达体系, 通过二者的蛋白表达量优化, 使双酶的功能趋于平衡, 最终实现了手性产物(R)-苯乙二醇的高效合成。Li等^[22]研究了短乳杆菌醇脱氢酶和甲酸脱氢酶的共表达体系, 通过两者的连接顺序和连接肽的优化, 实现了产物苯乙二醇合成过程中, 底物苯乙酮转化率高达85%以上, 产物光学纯度高于95%。本研究中, 在单酶条件下实施优化, 通过在共表达体系中设计酶基因个数配比, 更具有针对性。与单酶的重组大肠杆菌相比较, 该共表达体系催化(S)-苯乙二醇的转化过程中, 不仅底物浓度提高了近2倍, 产物得率由89.6%提高到99%以上, 更为重要的是转化时间相比原来的24 h缩短为13 h^[13]。后续的研究将进一步优化催化手性合成的靶酶SCR II和用于辅酶循环的酶GDH的基因个数, 适当提高SCR II的基因比例, 进一步提高手性催化的效率。

参考文献

- [1] Du PX, Wei P, Lou WY, Zong MH. Biocatalytic anti-Prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter pasteurianus* GIM1. 158. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 84.
- [2] Ni Y, Xu JH. Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1279-1288.
- [3] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(2): 66-73.
- [4] Balagam B, Mitra R, Richardson DE. Osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation by carbon dioxide-activated hydrogen peroxide and *N*-methylmorpholine. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(6): 1071-1075.
- [5] Choi DS, Han SS, Kwueon EK, Choi HY, Hwang SH, Park YS,

- Song CE. New mono-quarternized bis-*cinchona* alkaloid ligands for asymmetric dihydroxylation of olefins in aqueous medium: unprecedented high enantioselectivity and recyclability. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2006, 348(18): 2560–2564.
- [6] Nie Y, Xiao R, Xu Y, Montelione GT. Novel anti-Prelog stereospecific carbonyl reductases from *Candida parapsilosis* for asymmetric reduction of prochiral ketones. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2011, 9(11): 4070–4078.
- [7] Tian X, Zheng GW, Li CX, Wang ZL, Xu JH. Enantioselective production of (*S*)-1-phenyl-1, 2-ethanediol from dicarboxyesters by recombinant *Bacillus subtilis* esterase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73(1/4): 80–84.
- [8] Zhu DM, Yang Y, Majkowicz S, Pan THY, Kantardjiev K, Hua L. Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via substrate-enzyme docking-guided point mutation. *Organic Letters*, 2008, 10(4): 525–528.
- [9] Müller M, Katzberg M, Bertau M, Hummel W. Highly efficient and stereoselective biosynthesis of (2*S*, 5*S*)-hexanediol with a dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(7): 1540–1550.
- [10] 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.
- [11] Betancor L, Berne C, Luckarift HR, Spain JC. Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system. *Chemical Communications*, 2006, (34): 3640–3642.
- [12] Liu WF, Wang P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(4): 369–384.
- [13] Geng YW, Zhang RZ, Wang SS, Xu Y. 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.
- [14] Zhang BT, Zhang RZ, Wang L, Xu Y. Gene cloning and characterization of a solvent-resistant glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. YX-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(6): 561–568. (in Chinese).
张波涛, 张荣珍, 王磊, 徐岩. 芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)YX-1耐有机溶剂葡萄糖脱氢酶的基因克隆与酶学性质. *微生物学报*, 2013, 53(6): 561–568.
- [15] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Bartlam M, Xu Y, Zhang XJC, Rao ZH. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Science*, 2008, 17(8): 1412–1423.
- [16] 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* CCTCC M203011. *Organic Process Research & Development*, 2004, 8(2): 246–251.
- [17] Zhao HM, van der Donk WA. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(6): 583–589.
- [18] Xu ZN, Jing KJ, Liu Y, Cen PL. High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(1): 83–90.
- [19] Zhang W, O'Connor K, Wang DIC, Li Z. Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 687–694.
- [20] Zhang RZ, Geng YW, Xu Y, Zhang WC, Wang SS, Xiao R. Carbonyl reductase SCRII 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.
- [21] Zhou XT, Zhang RZ, Xu Y, Liang HB, Jiang JW, Xiao R. Coupled (*R*)-carbonyl reductase and glucose dehydrogenase catalyzes (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol biosynthesis with excellent stereochemical selectivity. *Process Biochemistry*, 2015, 50(11): 1807–1813.
- [22] Li BJ, Li YX, Bai DM, Zhang X, Yang HY, Wang J, Liu G, Yue JJ, Ling Y, Zhou DS, Chen HP. Whole-cell biotransformation systems for reduction of prochiral carbonyl compounds to chiral alcohol in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6750.

Efficient biosynthesis of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by (*S*)-carbonyl reductase II and glucose dehydrogenase

Jiawei Jiang, Rongzhen Zhang^{*}, Xiaotian Zhou, Kunpeng Li, Jing Li, Yaohui Li, Yan Xu

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

Abstract: [Objective] To realize efficient biosynthesis of 2-hydroxyacetophenone to (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol, we designed a co-expression system containing *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 (*S*)-carbonyl reductase II (SCR II) and *Bacillus* sp. YX-1 glucose dehydrogenase (GDH) in *Escherichia coli* BL21(DE3), based on the optimal ratio between the specific activities of the two enzymes. [Methods] The enzymes SCR II and GDH were purified from their corresponding recombinant *E. coli* strains. When the purified SCR II and GDH were used for the reduction of 2-hydroxyacetophenone to (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol, the optimal ratio between their specific activities, the optimal temperature and pH were determined. Based on above results, a co-expression system *E. coli* BL21(DE3)/S-SD-AS-G harboring SCR II and GDH was constructed. [Results] SCR II and GDH exhibited specific activities of 1.3 U/mg and 13.5 U/mg. When the total enzyme activity was 1 U, the optimal ratio of their activities is between 1:1 and 5:1, and the optimal temperature and pH are 30 °C and 7.0, respectively. So we designed a co-expression system *E. coli* BL21/S-SD-AS-G, in which the ratio of the SCR II and GDH genes is 1:1. The specific activities of SCR II and GDH are 0.76 U/mg and 0.73 U/mg in the cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/S-SD-AS-G, respectively. The ratio between SCR II and GDH activity is 1:1. Under the optimal conditions, the system showed excellent performance to produce (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol with an optical purity and a yield both over 99% during the reduction of 2-hydroxyacetophenone. With respect to the recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET-SCR II, the co-expression system obviously improved the yield of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol and reduced biotransformation time from 24 h to 13 h. [Conclusion] This work provides the research foundation on the construction of a co-expression system containing a target chiral catalyst and a cofactor-regeneration enzyme for efficient chiral biosynthesis based on the optimal ratio of SCR II and GDH activities.

Keywords: (*S*)-carbonyl reductase II, glucose dehydrogenase, (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol, asymmetric reductase, enzyme-coupling system

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370100), by the Jiangsu Province Basic Research Program (BK20131101), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51409B), by the Chinese New Century Excellent Talents Project of Chinese Ministry of Education (NCET-13-0833), by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06) and by the Program for Advanced Talents within Six Industries of Jiangsu Province (2015-SWYY-010)

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

Received: 9 January 2016; Revised: 3 March 2016; Published online: 5 May 2016