

## (R)-专一性羧基还原酶与甲酸脱氢酶基因 在大肠杆菌中的共表达

孙莹, 张荣珍, 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】通过研究(R)-专一性羧基还原酶和甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达, 解决较高底物浓度下不对称转化反应的辅酶限制性问题。【方法】分别以近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)基因组为模板, 采用 PCR 方法扩增得到(R)-专一性羧基还原酶基因(*rcr*)和甲酸脱氢酶基因(*fdh*), 克隆到共表达载体 pETDuet<sup>TM</sup>-1 中进行表达。共表达质粒 pETDuet-*rcr-fdh* 转化稀有密码子优化型菌株 *E. coli* Rosetta, 获得重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh*。【结果】在 30 °C 条件下, 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 8 h 后, SDS-PAGE 结果表明(R)-专一性羧基还原酶和甲酸脱氢酶均有明显的表达, 其相对分子质量分别为 37 kDa 和 40 kDa。以高浓度(6 g/L)2-羟基苯乙酮为底物时, 0.1 g 重组菌细胞催化产生(R)-苯基乙二醇, 产物光学纯度为 100% e.e., 产率为 85.9%。与无甲酸脱氢酶参与辅酶再生循环的重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr* 相比, 产物光学纯度和产率分别提高了 1.3 和 2.7 倍。【讨论】该重组菌的构建为基因工程法生物合成(R)-苯基乙二醇的工业应用奠定了基础。

**关键词:** 羧基还原酶; 甲酸脱氢酶; 共表达; 辅酶再生; 不对称还原

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1629-05

手性化合物在医药、农药、激素、食品添加剂等精细化工品的生产上得到了越来越广泛的应用<sup>[1]</sup>, 如光学纯苯基乙二醇不仅是液晶材料中不可缺少的重要手性添加剂, 而且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<sup>[2]</sup>。氧化还原酶催化的不对称还原反应常用于手性化合物的制备, 这类反应需要辅酶作为反应过程中氢或电子的传递体, 常用辅酶有尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>, NADH)和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>, NADPH)。辅酶一般不太稳定, 价格昂贵, 且不能用一般的合成物质替代。辅酶的循环是氧化还原酶工业化大规模生产的瓶颈因素, 多年来人们一直在致力于辅酶再生平台技

术的研究与开发<sup>[3]</sup>。

甲酸脱氢酶(FDH)被广泛应用于 NADH 的循环再生, 它使甲酸氧化生成 CO<sub>2</sub>, 同时使氧化态辅酶 NAD<sup>+</sup> 还原为 NADH。工业化应用的实例是 Degussa 公司利用亮氨酸脱氢酶(LeuDH)催化三甲基丙酮酸不对称还原合成 L-叔亮氨酸, 使用 FDH 再生辅酶 NADH, 该产物的转化率为 74%<sup>[4]</sup>。黄志华等通过在 *K. pneumoniae* 菌株中构建 NADH 再生系统使 1,3-丙二醇的产量提高 12.5%<sup>[5]</sup>。Manzocchi 等利用 Baker's 酵母不对称还原 2-羟基苯乙酮得到(R)-苯基乙二醇, 产物光学纯度 92%, 产率 85%, 但底物浓度只有 0.6 g/L<sup>[6]</sup>。Weckbecker 等人将嘧啶核苷转氢酶、醇脱

基金项目: 国家“973 项目”(2003CB716008); 国家“863 计划”(2007AA02Z200, 2006AA020104); 国家自然科学基金项目(20776060); 新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0498)

\*通讯作者。Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: bioseanmailto:@yahoo.com.cn

作者简介: 孙莹(1984-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: sunyfamily.1984@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-28; 修回日期: 2008-08-28

氢酶和甲酸脱氢酶共表达来生产(R)-苯乙醇<sup>[7]</sup>。Hyungdon 等报道由ε-转氨酶、醇脱氢酶和葡萄糖脱氢酶组成的耦联体系转化生产(R)-苯乙醇<sup>[8]</sup>。

本实验室分别从 *Candida parapsilosis* 和 *Candida boidinii* 克隆出(R)-专一性羧基还原酶基因 *rcr* 与甲酸脱氢酶基因 *fdh* , 利用两个基因在 *E. coli* Rosetta 宿主细胞中的共表达来实现两个酶系的耦联。重组微生物转化结果表明, 无任何外加辅酶的条件下, 以 6 g/L

2-羟基苯乙酮为底物转化效率得到了明显提高。与前期的研究相比<sup>[13]</sup>, 菌体对底物浓度的耐受性由原来的 0.5 g/L 提高到了 6 g/L。该研究通过解决辅酶限制性的问题实现了较高底物浓度下的高效不对称转化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 表 1 为研究中所用菌株和质粒。

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

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Candida parapsilosis</i>	Source of <i>rcr</i> gene	This lab
<i>Candida boidinii</i>	Source of <i>fdh</i> gene	This lab
<i>E. coli</i> DH5a	Host of T- <i>fdh</i> and T- <i>rcr</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21	Host of pETDuet- <i>rcr</i> - <i>fdh</i>	This study
<i>E. coli</i> Rosetta	Host of pETDuet- <i>rcr</i> - <i>fdh</i>	This study
Plasmids		
pMD19-T	Amp <sup>r</sup> *, 2692bp	TaKaRa Co.
T- <i>rcr</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>rcr</i> gene in pMD19-T Simple, 3.7 kb	This study
T- <i>fdh</i>	1.1 kb DNA fragment with <i>fdh</i> gene in pMD19-T Simple, 3.8 kb	This study
pETDuet <sup>TM</sup> -1	Amp <sup>r</sup> , two multiple cloning sites (MCS), 5420 bp	Novagen Co.
pETDuet- <i>rcr</i>	1 kb DNA fragment with <i>rcr</i> gene in pETDuet <sup>TM</sup> -1, 6.4 kb	This study
pETDuet- <i>rcr</i> - <i>fdh</i>	1.1 kb DNA fragment with <i>fdh</i> gene in pETDuet- <i>rcr</i> , 7.4 kb	This study

\*Amp<sup>r</sup> ≤ 50 mg/L Amp.

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶、X-Gal、IPTG、200 bp DNA Ladder Marker、1 kb DNA Ladder Marker 购于大连宝生物公司, 基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购于北京天根生化科技有限公司, Plasmid Mini Kit 购于 OMEGA BIO-TEK。2-羟基苯乙酮为本实验合成, 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, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, NaCl 0.1 g/L, pH7.0; LB 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; 蓝白斑筛选平板: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 琼脂粉 15 g/L, X-Gal 4 g/L, IPTG 2.4 g/L, pH7.2。以上 LB 液体与固体培养基使用前加氨苄青霉素或氯霉素至终浓度为 50 mg/L 和 34 mg/L。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

分别将 *Candida parapsilosis* 和 *Candida boidinii* 接种于酵母发酵培养基中, 30、150 r/min 培养 48 h, 总 DNA 的提取参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说

明书方法 (北京天根生化科技有限公司)。

### 1.3 *rcr* 和 *fdh* 基因的克隆

根据大肠杆菌密码子优化的原则<sup>[9]</sup>, 对 *C. parapsilosis* 的 *rcr* 基因序列进行部分改造。引物设计如下(下划线为酶切位点): Rcr-F1: 5'-ATCGCATATG-TCAATTCCATCAAGCCAGTACGGATTCGTATTCA-ATAAGCAATCAGGACTTAAGTTGCGT-3 (*Nde*), Rcr-F2: 5'-GCATTGCGTGAAATTCGTATCTTG-3, Rcr-R1: 5'-CAAGATACGAATTCACGCAATGC-3, Rcr-R2: 5'-T GACTCTCGAGCTATGGATTA AAAACA-ACCGACCTTCATAAGCATTGTTACGCAA-3 (*Xho*)。

根据已经报道的 *C. boidinii* 的 *fdh* 基因序列 (Accession No. AJ011046), 利用 DNAMAN 软件设计引物如下: Fdh-F: 5'-CCACCGAATTCATGAAGAC-TAGTC-3 (*EcoR*) Fdh-R: 5'-TGACTGCGGCCGC-TTATTCTTATCGTGTTTAC-3 (*Not*)。所有引物由北京赛百盛基因技术有限公司(SBS)合成。考虑到大肠杆菌密码子的偏爱性, 将 *rcr* 基因中编码精氨酸的密码子 AGA 或 CGA 替换为 CGT 进行引物设计。密码子优化后的 *rcr* 基因用 SOE-PCR 方法<sup>[10, 11]</sup>合成。

具体步骤为: 先由 Rcr-F1 和 Rcr-R1 以及 Rcr-F2 和 Rcr-R2 两对引物于 61 (循环 1~5), 57 (循环 6~10) 和 53 (循环 11~35) 退火温度扩增 *rcr* cDNA 模板, 扩增产物用凝胶电泳纯化后得到 *rcr* 上游和下游 cDNA 片段, 两片段经退火重叠连接, 两端单链于 72°C 用 *Taq* DNA Polymerase 延伸 10 min 补成双链, 并用作下一轮 PCR 的模板。PCR 扩增用 Rcr-F1 和 Rcr-R2 引物按上述退火温度循环 30 次。*rcr* 和 *fdh* 基因 PCR 扩增条件为: 94 3 min; 94 1 min、55 1 min、72 1 min, 30 个循环; 72 10 min。取 5  $\mu$ L 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物的纯化、与 pMD19-T 连接、质粒的提取均按照产品使用说明书进行, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 采用蓝白斑筛选和酶切鉴定方法获得重组质粒 T-*rcr* 和 T-*fdh*。基因测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

#### 1.4 表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Nde* 和 *Xho* 分别对载体 pETDuet<sup>TM</sup>-1 和重组质粒 T-*rcr* 进行消化, 将 *rcr* 基因与线性化载体片段连接, 获得阳性克隆, 构建载体 pETDuet-*rcr*。再采用 *EcoR* 和 *Not* 分别对质粒 T-*fdh* 和 pETDuet-*rcr* 进行双酶切, 将 *fdh* 基因片段插入 pETDuet-*rcr* 中, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 最终构建表达质粒 pETDuet-*rcr*-*fdh* (图 1)。

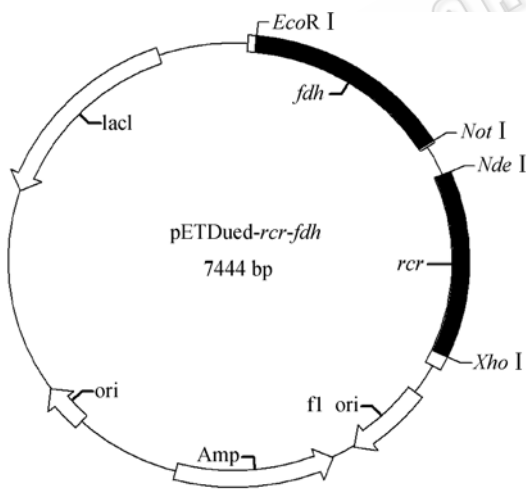


图1 表达载体 pETDuet-*r-cr-fdh* 的构建

Fig. 1 construction of expression vector pETDuet-*r-cr-fdh*.

#### 1.5 基因的共表达

将重组质粒 pETDuet-*r-cr-fdh* 转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 菌株, 分别涂布抗性平板 (氨苄青霉素 50 mg/L) 和双抗平板 (氨

苄青霉素 50 mg/L、氯霉素 34 mg/L), 从平板上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  $OD_{600}$  值达到 0.6 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 30 诱导表达 8 h, 同时取诱导前的菌体做阴性对照。全菌蛋白提取物经 SDS-PAGE 检测蛋白表达。

#### 1.6 重组菌不对称还原反应及其检测

在 1 mL 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 加入 6 mg 2-羟基苯乙酮、4.5 mg 甲酸钠和 0.1 g 湿菌体, 30 摇床反应 48 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, 根据峰面积计算得到产物 (R)-苯乙二醇光学纯度 % e.e. 值及产率。

## 2 结果和分析

### 2.1 *rcr* 基因与 *fdh* 基因的获取

以近平滑假丝酵母基因组为模板, 分别以 Rcr-F1 和 Rcr-R1 以及 Rcr-F2 和 Rcr-R2 两对引物进行 PCR 扩增获得目的基因 *rcr* 的前半段 (约 800 bp) 和后半段 (约 200 bp), 然后用 SOE-PCR 的方法将两段基因进行连接。用连接产物作模板, 以 Rcr-F1 和 Rcr-R2 为引物进行第三轮 PCR 反应, 获得全长基因 *rcr*。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析其大小为 1.0 kb, 与前期报道一致。从博伊丁假丝酵母基因组 DNA 中, 扩增出一条约 1.1 kb 的特异性条带, 与文献 [12] 报道一致。

### 2.2 *rcr* 基因与 *fdh* 基因的克隆

将 *rcr* 和 *fdh* 的 PCR 产物进行 DNA 凝胶回收和试剂盒纯化后, 用 T4 连接酶酶连, 分别构建到 pMD19-T 载体中, 转化大肠杆菌的感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 利用 Amp<sup>r</sup> 筛选得到阳性重组子 T-*rcr* 和 T-*fdh*。重组质粒经酶切验证和 DNA 测序确证阳性重组子中分别插入 *rcr* 和 *fdh* 片段。其中 *fdh* 序列与已报导的 *C. boidinii* 甲酸脱氢酶 (Gene ID: AJ011046) 核苷酸序列的相似性为 100%。

### 2.3 pETDuet-*r-cr-fdh* 表达重组质粒的构建与鉴定

将重组质粒 T-*rcr* 和 pETDuet<sup>TM</sup>-1 载体分别用 *Nde* 和 *Xho* 双酶切, 产生粘性末端, DNA 凝胶回收和纯化后, 用 T4 DNA Ligase 将两者进行连接。获得阳性重组子 pETDuet-*r-cr*, 经酶切验证。将重组质粒 pETDuet-*r-cr* 和 T-*fdh* 分别用 *EcoR* 和 *Not* 双酶切, 然后将 *fdh* 基因构建到重组质粒 pETDuet-*r-cr*, 利用 Amp<sup>r</sup> 筛选得到阳性重组子 pETDuet-*r-cr-fdh*, 酶切验证 (图略) 确认阳性重组子中同时插入了 *rcr* 和 *fdh* 基因片段。

## 2.4 (R)-专一性羧基还原酶和甲酸脱氢酶在大肠杆菌中的共表达

将重组质粒 pETDuet-*rcr-fdh* 分别转化 *E. coli* BL21 和密码子优化型菌株 *E. coli* Rosetta 的感受态细胞,分别利用 Amp<sup>r</sup> 抗性、Amp<sup>r</sup> 和 Chl<sup>r</sup> 的双抗性平板筛选,提取质粒经酶切验证获得阳性的表达菌株。当菌体培养的 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6 时,加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导共表达(R)-专一性羧基还原酶(rCR)和甲酸脱氢酶(FDH)8 h后,将重组菌细胞与 5×样品缓冲液混合煮沸 6 min,离心取上清 10 μL 作 SDS-PAGE 分析,结果显示 *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-fdh* 中分别有相对分子质量大小约为 37 kDa、40 kDa 的蛋白得到表达(图2)而 *E. coli* BL21/ pETDuet-*rcr-fdh* 几乎没有表达。

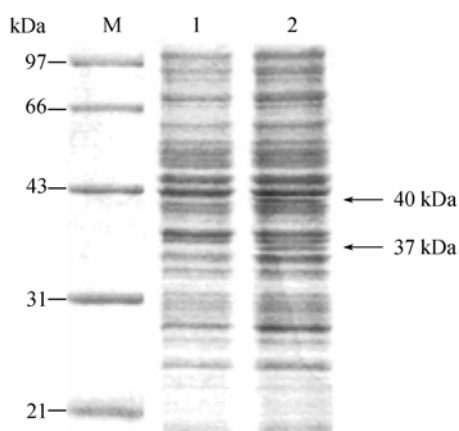


图2 重组蛋白诱导表达结果

Fig. 2 Expression of rCR and FDH proteins in *E. coli* Rosetta (DE3). M. Protein Marker; 1. *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-fdh* before induction; 2. *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-fdh* after induction with 1 mmol/L IPTG.

## 2.5 重组菌不对称还原反应

以 2-羟基苯乙酮和甲酸钠为底物,取 0.1 g 湿重的重组菌进行全细胞生物转化试验,结果见表 2。转化结果表明,*E. coli* Rosetta(DE3)菌株自身具有一定的转化能力,当底物浓度为 6 g/L 时,其产物的摩尔

表 2 重组菌转化结果

Table 2 Asymmetric conversion by recombinant

strain/plasmid	optical purity /(% e.e.)	Yield/%	sodium formate
<i>E. coli</i> Rosetta/pETDuet <sup>TM</sup> -1	3.8	2.5	-
	4.1	2.4	+
<i>E. coli</i> Rosetta/pETDuet- <i>rcr</i>	76.9	31.8	-
	75.8	31.5	+
<i>E. coli</i> Rosetta/pETDuet- <i>rcr-fdh</i>	78.4	32.3	-
	100	85.9	+

“+” add 4.5 g/L sodium formate; “-” Without adding sodium formate.

产率为 2.4%。不添加甲酸钠时,重组菌 *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-fdh* 转化 2-羟基苯乙酮生成产物(R)-苯基乙二醇的光学纯度只有 78.4%,产率只有 32.3%,当加入甲酸钠时,重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* 进行不对称还原反应生成产物(R)-苯基乙二醇的光学纯度达 100% e.e.,产率达 85.9%。

## 3 讨论

本文根据大肠杆菌喜爱的密码子使用原则,对(R)-专一性羧基还原酶基因 *rcr* 中的 5 个精氨酸编码的稀有密码子进行了优化改造。将(R)-专一性羧基还原酶基因和甲酸脱氢酶基因克隆到含有两个串连 lac 启动子,两个多克隆位点,可同时表达两个目的基因的表达载体 pETDuet<sup>TM</sup>-1 中,同时选择能够较好表达稀有密码子的宿主细胞 *E. coli* Rosetta,实现了两个酶基因在大肠杆菌中的高效共表达。重组菌的生物转化试验结果表明,当底物 2-羟基苯乙酮的浓度提高至 6 g/L 时,无甲酸脱氢酶(FDH)参与辅酶再生循环的重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr* 的不对称还原反应产物光学纯度和产率都较低,分别为 76.9%和 31.8%。前期的研究结果也表明产物(R)-苯基乙二醇光学纯度和产率均随着底物浓度的增加而降低<sup>[14]</sup>。当甲酸脱氢酶基因 *fdh* 与(R)-专一性羧基还原酶基因 *rcr* 共表达时,在相同菌体浓度(0.1 g/mL)条件下,其重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* 不对称还原反应产物的 e.e. 值由原来的 72%左右提高到 100%,产率由原来的 58%左右提高到 85.9%。与许娜等实验研究结果<sup>[13]</sup>相比,在保持相同转化效率的条件下,底物浓度由原来的 0.5 g/L 提高到 6 g/L。这表明在不对称还原 2-羟基苯乙酮的反应中,甲酸脱氢酶较好地参与了辅酶 NADH 的再生循环,解决了高浓度底物下辅酶限制性问题的,因而大大促进了生物转化反应,提高了转化效率。

本研究通过构建(R)-专一性羧基还原酶基因和甲酸脱氢酶基因的共表达质粒,利用甲酸脱氢酶实现 NADH 的循环再生,不仅实现了目标酶的生物转化功能,而且生物转化时不需要额外添加昂贵的辅酶,因而大大降低了产物的制备成本。更重要的是由于这两个基因表达后的酶比例适当,实现了较高底物浓度下的高效转化,最终获得了光学纯度为 100%的产物,为手性化合物(R)-苯基乙二醇的工业化生产奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (1): 258–268.
- [2] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, *et al.* Resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51: 544–550.
- [3] 张玉彬. 生物催化的手性合成. 北京: 化学工业出版社, 2001: 170–176.
- [4] Andreas L, Murillo VF. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10 (6): 595–603.
- [5] 黄志华, 张延平, 曹竹安, 等. 甲酸脱氢酶在 *Klebsiella pneumoniae* 中的表达和功能分析, 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47 (1): 64–68.
- [6] Manzocchi A, Fiechi A. Stereochemically controlled bakers' yeast-mediated reductions: synthesis of (S)-(+)-1,2-propanediol and (S)-(-)-1,3-butanediol, 1-benzyl ethers. *Synthesis*, 1987: 1007–1009.
- [7] Weekbecker A, Hummel W. Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 1739–1744.
- [8] Yun H, Yang YH, Cho BK, *et al.* Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (R)-1-phenylethanol and (R)- $\alpha$ -methylbenzylamine from racemic  $\alpha$ -methylbenzylamine using  $\epsilon$ -transaminase/ alcohol dehydrogenase/glucose dehydrogenase coupling reaction [J]. *Bionotechnology Letters*, 2003, 25: 809–814.
- [9] Karlin S, Mrázek J, Campbell AM, *et al.* Codon usages in different gene classes of the *Escherichia coli* genome. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(6): 1341–1355.
- [10] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*, 1989, 77(1): 51–59.
- [11] 刘永明, Oberkofler H, Patsch W. RT-PCR 法测定脂肪组织解偶联蛋白 mRNA 表达水平的探讨, 广西医科大学学报(*Journal of Guangxi Medical University*), 1999, 16(3): 242–244.
- [12] Sakai Y, Murdanoto AP, Konishi T, *et al.* Regulation of the formate dehydrogenase gene, FDH1, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an FDH1-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *Bacteriol*, 1997, 179(14): 4480–4485.
- [13] 许娜, 王海燕, 聂尧, 等. 近平滑假丝酵母(R)-专一性羧基还原酶基因的克隆与表达, 微生物学通报(*Microbiology*), 2006, 33(4): 112–118.
- [14] 聂尧, 徐岩, 王海燕, 等. 重组大肠杆菌不对称还原 2-羟基苯乙酮合成(R)-苯基乙二醇, 化工进展(*Chemical Industry and Engineering Progress*), 2006, 25: 1231–1235.

## Co-expression of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* and (R)-specific carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 in *Escherichia coli*

Ying Sun, Rongzhen Zhang, Yan Xu\*

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

**Abstract:** [Objective] To overcome coenzyme restriction in the asymmetric reduction at high substrate concentration, we constructed a recombinant *Escherichia coli* with (R)-specificity carbonyl reductase coupled with formate dehydrogenase for cofactor regeneration. [Methods] The R-carbonyl reductase gene (*rcr*) and formate dehydrogenase gene (*fdh*) were amplified from *Candida parapsilosis* and *Candida boidinii* genomes by PCR technique respectively. Then the purified PCR products were inserted into a co-expression vector pETDuet<sup>TM</sup>-1 to construct plasmid pETDuet-*rcr-fdh*. The positive plasmid was transformed into codon optimized *E. coli* Rosetta, and a recombinant strain *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* was obtained. [Results] SDS-PAGE analysis showed that two enzymes were expressed simultaneously. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (1 mmol/L) induced at 30 °C the expression of both proteins encoded by *rcr* and *fdh* genes with the molecular weights of 37 kDa and 40 kDa. The biotransformation experiments were done using 2-hydroxyacetophenone and sodium formate as substrates. When the concentration of 2-hydroxyacetophenone was 6 g/L, the (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol was produced with the high optical purity of 100% enantiomeric excess and a yield of 85.9%. Compared with the recombinant strain *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr* without *fdh* gene for cofactor regeneration, the optical purity and yield of product from the asymmetric reduction of 2-hydroxyacetophenone by *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* were increased by 1.3 and 2.7 times, respectively. [Conclusion] This method supplied a foundation for biosynthesis of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol for the cofactor regeneration by genetic engineering.

**Keywords:** R-carbonyl reductase (rCR); formate dehydrogenase (FDH); co-expression; cofactor regeneration; asymmetric reduction

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716008), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z226 and 2006AA020104), the National Natural Science Foundation of China (20776060) and the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0498)

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

Received: 28 May 2008/ Revised: 28 August 2008