

研究报告

苯乙酮转化为(S)- α -苯乙醇的工程菌构建贾振华¹ 刘昱¹ 李冉¹ 陈曦² 张红榴² 吴洽庆² 宋水山^{1*}

(1. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050051)

(2. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308)

摘要:【背景】(S)- α -苯乙醇是一种重要的药物合成中间体, 利用工程菌将苯乙酮转化为(S)- α -苯乙醇的方法具有立体选择性强、转化条件温和等优势, 该研究对未来绿色工业化生产有重要意义。【目的】构建能将苯乙酮转化为(S)- α -苯乙醇的工程菌并对其转化条件进行研究。【方法】分别从红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)中克隆得到羧基还原酶基因 *ReADH* 以及甲酸脱氢酶基因 *FDH*, 构建 pRSFDuet-*ReADH*-*FDH* (R1F2)和 pRSFDuet-*FDH*-*ReADH* (F1R2)两个共表达载体, 分别在大肠杆菌中表达。测定 R1F2 和 F1R2 中 *ReADH* 和 *FDH* 酶活性及其催化反应的最适反应条件。对利用全细胞转化苯乙酮为(S)- α -苯乙醇反应条件进行研究。【结果】构建了 R1F2 和 F1R2 两个共表达载体, 其中 R1F2 中 *ReADH* 和 *FDH* 的酶活性分别为 6.7 U/mL 和 7.6 U/mL, 对苯乙酮有更强的催化还原能力。R1F2 中 *ReADH* 和 *FDH* 的最适 pH 分别为 6.0 和 8.5, 最适温度分别为 40 °C 和 35 °C。R1F2 全细胞转化苯乙酮反应的最适 pH 和温度分别为 7.5 和 30 °C, 对高底物有较强耐受性, 对 400 mmol/L 苯乙酮转化率大于 98%, 产物(S)- α -苯乙醇的光学纯度大于 99%。【结论】研究获得的工程菌及其全细胞转化条件为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, 生物转化, (S)- α -苯乙醇

Construction of engineering bacteria for conversion of acetophenone to (S)- α -phenylethanolJIA Zhen-Hua¹ LIU Yu¹ LI Ran¹ CHEN Xi² ZHANG Hong-Liu²
WU Qia-Qing² SONG Shui-Shan^{1*}

(1. Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

(2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: [Background] (S)- α -phenylethanol is a kind of important pharmaceutical intermediate. Conversion of acetophenone into (S)- α -phenylethanol by engineering bacteria has the advantages of strong stereoselectivity and mild transformation conditions. The study of this synthetic method is of

Foundation item: Research Foundation of Hebei Academy of Sciences (161307)

***Corresponding author:** Tel: 86-311-83999012; E-mail: shuishans620@163.com

Received: February 06, 2018; **Accepted:** August 02, 2018; **Published online** (www.cnki.net): August 10, 2018

基金项目: 河北省科学院项目(161307)

***通信作者:** Tel: 86-311-83999012; E-mail: shuishans620@163.com

收稿日期: 2018-02-06; **接受日期:** 2018-08-02; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-08-10

great significance for the future green industrial production. **[Objective]** Construction of engineering bacteria capable of transforming acetophenone into (S)- α -phenylethanol, and the study on its transformation conditions. **[Methods]** *ReADH* gene encoding carbonyl reductase and *FDH* gene encoding formate dehydrogenase were cloned from *Rhodococcus erythropolis* and *Candida boidinii*, respectively. The constructed pRSFDuet-ReADH-FDH (R1F2) and pRSFDuet-FDH-ReADH (F1R2) were transformed into *Escherichia coli*, respectively. The enzymatic assay of ReADH and FDH were analyzed. The optimized transformation conditions to produce (S)- α -phenylethanol were tested. **[Results]** The enzyme activity of ReADH and FDH in R1F2 were 6.7 U/mL and 7.6 U/mL, respectively. R1F2 had higher catalytic activity than F1R2. The optimum pH of ReADH and FDH were 6.0 and 8.5, respectively. The optimum temperature of the ReADH and FDH were 40 °C and 35 °C, respectively. The optimum pH and temperature for the reaction of acetophenone catalyzed by R1F2 is 7.5 and 30 °C. R1F2 co-expression strain could catalyze the reduction of acetophenone with high substrate concentration, the conversion of 400 mmol/L acetophenone was over 98%, and the *e.e.* of (S)- α -phenylethanol value was over 99%. **[Conclusion]** Conversion of acetophenone into (S)- α -phenylethanol by engineered strain has a good prospect for industrial application.

Keywords: Carbonyl reductase, Formate dehydrogenase, Co-expression, Biotransformation, (S)- α -phenylethanol

(S)- α -苯乙醇是一种用于合成多类药物的手性中间体。它作为免疫增强剂左旋咪唑、治疗哮喘的药物(S)-异丙肾上腺素、抗抑郁药物取舍林等药物合成的前体,具有很高的应用价值^[1-3]。羰基还原酶是生物合成(S)- α -苯乙醇中的一种关键酶,存在于酵母、细菌和高等动植物中^[4-6]。该酶具有高度的化学、区域和立体选择性,常用于手性化合物的生物合成^[7-8]。

羰基还原酶在催化反应中通常需要辅酶 NAD(P)H 的参与,但是这类辅酶价格昂贵,以还原酶与氧化酶共表达为主的辅酶再生方法成为降低反应成本的有效途径^[9-11]。例如在 L-叔亮氨酸的合成中,利用甲酸脱氢酶实现了辅酶的循环利用^[12-13];葡萄糖脱氢酶也被应用于辅酶再生,并用于 1-苯基-2-甲氨基丙酮转化为 D-伪麻黄碱的合成^[14]。

目前对微生物制备(S)- α -苯乙醇的研究较少,有研究者从土壤中筛选到具有转化能力的菌株^[15],未见到利用基因工程手段将关键酶基因高效表达获得目标物的研究。本研究分别从红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)中克隆得到羰基还原酶基因

(*ReADH*)和甲酸脱氢酶基因(*FDH*),构建了 ReADH 与 FDH 的共表达菌株,研究其酶学性质并对全细胞转化法制备(S)- α -苯乙醇的条件进行了摸索,以期(S)- α -苯乙醇的绿色工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3), 美国英杰生命技术有限公司; pRSFDuet-1、pET28a-ReADH、pET21d-FDH 由本实验室保藏。

1.2 主要试剂和仪器

KOD Plus DNA 聚合酶, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、蛋白分子量标准, 赛默飞世尔科技有限公司; Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit、Cycle-Pure Kit, Omega Bio-Tek 公司; ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司。

Mastercycler nexus GSX1 梯度 PCR 仪, 艾本德股份公司; PowerPac Basic[™] 型电泳仪, 伯乐公司; SpectraMax[®] M2 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 高效液相色谱 1200, 安捷伦科

技有限公司。

1.3 共表达工程菌的构建

以实验室构建的质粒 pET28a-ReADH 及 pET21d-FDH 为模板, 利用设计的 *ReADH*、*FDH* 基因引物(表 1)进行 PCR 扩增, 使其序列两端分别带有 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点, 分别连入 pRSFDuet-1 第一个读码框。PCR 反应体系(50 μ L): KOD Plus DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 1 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各 1.5 μ L, 模板 DNA 0.2 μ L, 超纯水 33.8 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。*ReADH*、*FDH* 连入 pRSFDuet-1 第二个读码框的方法参照南京诺唯赞生物科技有限公司的 One Step Cloning Kit 使用说明书。重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态, 通过菌液 PCR 鉴定阳性转化子并测序验证。测序正确的重组载体分别命名为 pRSFDuet-ReADH-FDH (R1F2)和 pRSFDuet-FDH-ReADH (F1R2)并转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态。

1.4 共表达工程菌的重组表达

挑取含有 R1F2 和 F1R2 重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3)单菌落, 接种至 LB 液体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素)中, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。以 0.1%的接种量转接到 800 mL LB 液体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 置于 3 L 摇瓶中 37 $^{\circ}$ C

培养至 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导 12 h, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。按菌体浓度 100 mg/mL 将菌体重悬于磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5), 置于冰水浴中, 超声波功率为 200 W 进行细胞破碎, 此为全细胞破碎液。将全细胞破碎液 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清即为粗酶液。分别收集全细胞破碎液及粗酶液进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 酶活性测定及酶学性质

ReADH 反应体系: 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.5), 10 mmol/L 苯乙酮, 0.5 mmol/L NADH 及 10 μ L 粗酶液, 总体积为 200 μ L。粗酶液加入不含 NADH 的反应体系, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 加入 NADH 起始反应, 利用紫外分光光度计在 340 nm 处测定其 1 min 吸光值的变化。*FDH* 反应体系: 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.5), 20 mmol/L 甲酸钠, 0.5 mmol/L NAD⁺ 及 10 μ L 粗酶液, 总体积为 200 μ L。粗酶液加入不含 NAD⁺ 的反应体系, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 加入 NAD⁺ 起始反应, 利用紫外分光光度计在 340 nm 处测定其 1 min 吸光值的变化。酶活性定义: 在上述条件下, 1 min 催化生成 1 μ mol NAD(H)的酶量定义为 1 个酶活力单位。

酶活性计算公式:

$$\text{酶活(U/mL)} = EW \times V_1 \times 10^3 / (6.22 \times 0.5 \times V_2)$$

其中, EW : 1 min 内 340 nm 处吸光值的变化; V_1 : 反应液体积; V_2 : 粗酶液体积。

最适 pH 测定。将 1.5 所述反应体系的缓冲液分别换成 50 mmol/L 柠檬酸/柠檬酸钠(pH 3.0–6.5)、50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾(pH 6.0–8.0)、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5–9.0)、50 mmol/L 甘氨酸/氢氧化钠(pH 8.5–10.5), 分别测定共表达菌株中表达的 *ReADH* 和 *FDH* 的酶活性, 以酶活性达到最高时作为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活性。每个处理重复 3 次。

表 1 *ReADH* 和 *FDH* 基因克隆的引物

Table 1 Primers of *ReADH* and *FDH* gene clones

名称	引物序列
Primers	Primers sequence (5'→3')
ReADH-F	ATCATG <u>CCATGG</u> GCATGAAGGCAATCCAGTACACGAG
ReADH-R	AAATATGCGGCCGCCTACAGACCAGGGACCACAACCG
FDH-F	ATCATG <u>CCATGG</u> GCAAAATCGTTCTGGTTCT
FDH-R	AAATATGCGGCCGCCTATTATTTTGTCTGTGTTTGCCG

注: 添加的酶切位点为横线处标出。

Note: The added enzyme site was marked by lines.

最适温度测定。将上所述反应体系分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 °C 测定共表达菌株中表达的 ReADH 与 FDH 的酶活性, 以酶活性达到最高时作为 100%, 计算不同温度下的相对酶活性。每个处理重复 3 次。

1.6 苯乙酮不对称还原反应及高效液相色谱检测

苯乙酮反应体系: 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.5)中加入终浓度 100 mmol/L 苯乙酮(10% DMSO 助溶), 0.5 mg/mL NAD^+ , 300 mmol/L 甲酸钠, ReADH 酶活为 1 U/mL 的共表达菌 R1F2 或 F1R2 全细胞, 总体积为 1 mL。30 °C、200 r/min 反应 24 h。取 1 mL 反应液加入等体积乙酸乙酯萃取, 涡旋振荡 3 min, 14 000 r/min 离心 2 min。收集上层有机相风干后复溶于等体积 90%正己烷和 10%异丙醇混合溶液中, 涡旋振荡后过 0.22 μm 有机膜, 用高效液相色谱(HPLC)检测。

HPLC 检测使用 CHIRALCEL[®] OD-H 柱子, 流动相为 90%正己烷+10%异丙醇, 流速: 0.8 mL/min, 柱温: 30 °C, 可变波长扫描紫外检测器(VWD)检测波长为 220 nm。根据峰面积计算苯乙酮的转化率及产物(S)- α -苯乙醇的光学纯度。

1.7 共表达菌株的转化条件

1.7.1 转化反应的最适 pH

将 1.6 所述反应体系中的缓冲液分别换成柠檬酸/柠檬酸钠(pH 3.0–6.5)、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl (pH 7.5–9.0)、甘氨酸/氢氧化钠(pH 8.5–10.5)。反应 2 h 后, 利用 HPLC 检测各 pH 下苯乙酮的转化率, 以转化率最高点作为 100%, 计算不同 pH 下的相对转化率, 确定其反应最适 pH 值。每个处理重复 3 次。

1.7.2 转化反应的最适温度

将 1.6 所述反应体分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 °C 水浴 2 h。利用 HPLC

检测各温度下苯乙酮的转化率, 以转化率最高点作为 100%, 计算不同温度下的相对转化率, 确定其反应最适温度。每个处理重复 3 次

1.7.3 底物浓度耐受性

将 1.6 所述反应体系中的苯乙酮浓度分别设为 100、200、400、500 mmol/L, 并将反应体系扩大至 50 mL。在反应第 2、4、6、8、12、24、36 h 取样, 利用 HPLC 检测并计算苯乙酮转化率。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 共表达菌株的构建及验证

ReADH 和 *FDH* 基因开放阅读框大小分别为 1 047 bp 和 1 101 bp。将 *ReADH* 和 *FDH* 基因按不同顺序分别连入 pRSFDuet-1 共表达载体的 2 个读码框中, 载体构建示意图如图 1 所示。将构建好的重组质粒转入 *E. coli* DH5 α 克隆菌株, 对阳性菌落进行菌液 PCR 鉴定, 扩增得到 2 200 bp 左右的片段(图 2), 将测序正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3)进行诱导表达。

2.2 重组蛋白的诱导表达

将 2 株工程菌 R1F2、F1R2 分别培养并诱导表达, 取全细胞破碎液及粗酶液进行 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, 这 2 株工程菌均有胞内可溶性蛋白表达, 其大小为 42 kD。因 ReADH 与 FDH 分子量相差不大, 因此在 SDS-PAGE 结果中没有分离出 2 条明显的蛋白条带。由图 3 结果也可知, 菌株 F1R2 表达的蛋白量较少。

2.3 ReADH 和 FDH 的酶学性质

2.3.1 ReADH 和 FDH 的催化活性

为了检测工程菌表达的 ReADH 和 FDH 是否具有酶活性, 将诱导后的工程菌 R1F2 和 F1R2 分别重悬至菌体浓度为 100 mg/mL, 超声破壁后测定粗酶液酶活性, 结果表明 ReADH 和 FDH 均有催化活性, 且 R1F2 中 2 种酶催化活性较高(表 2)。

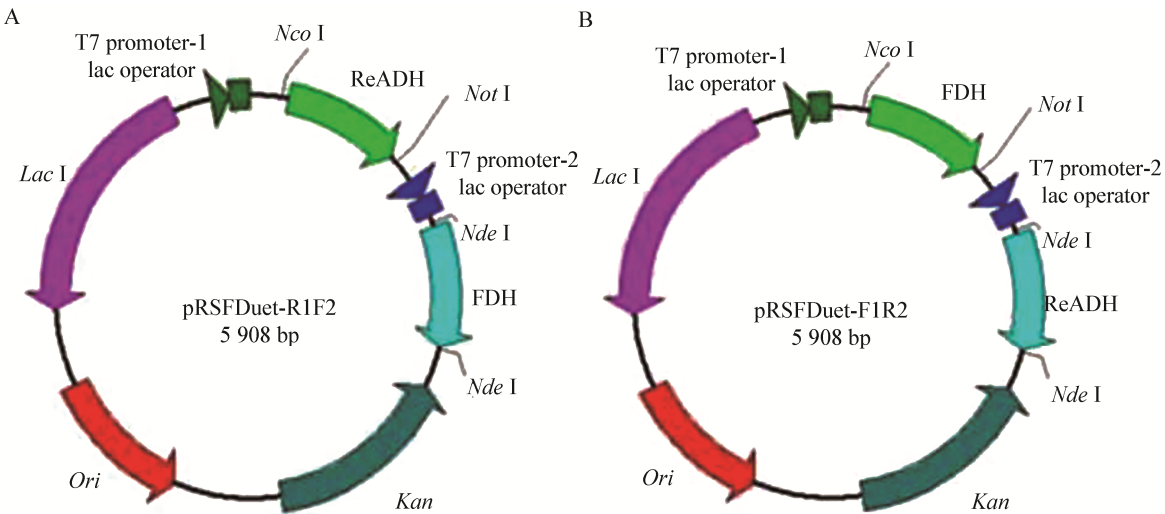


图 1 共表达载体构建示意图
Figure 1 Sketch map of co-expression vector
Note: A: pRSFDuet-ReADH-FDH; B: pRSFDuet-FDH-ReADH.

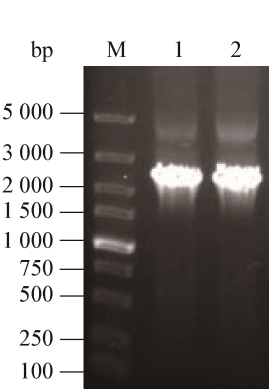


图 2 共表达载体菌液 PCR 验证
Figure 2 PCR verification of co-expression vector
注: M: DL2000 分子量标准; 1: R1F2 菌液 PCR 产物; 2: F1R2 菌液 PCR 产物。
Note: M: DL2000 DNA marker; 1: PCR production of R1F2; 2: PCR production of F1R2.

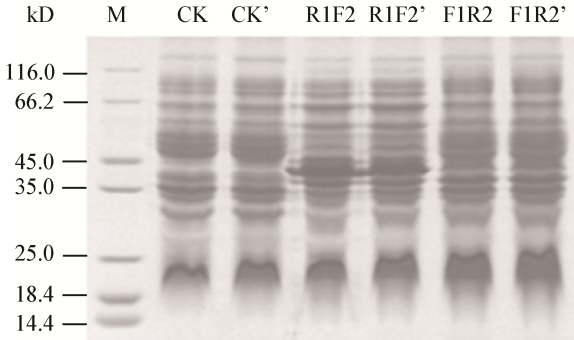


图 3 共表达菌株 R1F2、F1R2 蛋白表达 SDS-PAGE 分析图
Figure 3 SDS-PAGE analysis of co-expression strain R1F2 and F1R2

注: M: 蛋白分子量标准; CK: 未经 IPTG 诱导工程菌全细胞破碎液; R1F2、F1R2: 经 IPTG 诱导工程菌全细胞破碎液; CK'、R1F2'、F1R2': 经 IPTG 诱导工程菌粗酶液。
Note: M: Molecular weight protein marker; CK: Whole-cell extracts of engineered strain without IPTG; R1F2, F1R2: Whole-cell extracts of engineered strain induced by IPTG; CK', R1F2', F1R2': Cell-free extracts of engineered strain induced by IPTG.

表 2 ReADH 和 FDH 的催化活性
Table 2 The enzyme activity of ReADH and FDH

菌株 Strains	湿重 Wet weight (g)	羧基还原酶 ReADH 活性 Activity of carbonyl reductase ReADH (U/mL)	甲酸脱氢酶 FDH 活性 Activity of formate dehydrogenase FDH (U/mL)
CK	2.31	0.1	<0.01
Coexpression strain R1F2	3.22	6.7	7.60
Coexpression strain F1R2	3.68	2.1	3.10

注: CK: 转 pRSFDuet-1 空载体菌株。
Note: CK: pRSFDuet-1 empty vector strain.

2.3.2 pH 对 ReADH 和 FDH 酶活性的影响

为了检测 ReADH 和 FDH 酶活性是否受反应体系中 pH 变化的影响, 在不同 pH 缓冲液中测定了 R1F2 粗酶液中 ReADH 和 FDH 的酶活性, 发现 pH 对 ReADH 和 FDH 的酶活性影响很大, 其中 ReADH 的最适 pH 为 6.0, FDH 的最适 pH 为 8.5 (图 4)。

2.3.3 温度对 ReADH 和 FDH 酶活性的影响

在不同反应温度下检测 R1F2 粗酶液中 ReADH 和 FDH 的酶活性, 发现 ReADH 的最适反应温度为 40 °C, FDH 的最适反应温度为 35 °C。当温度 >60 °C 时, ReADH 和 FDH 基本失去酶活性(图 5)。

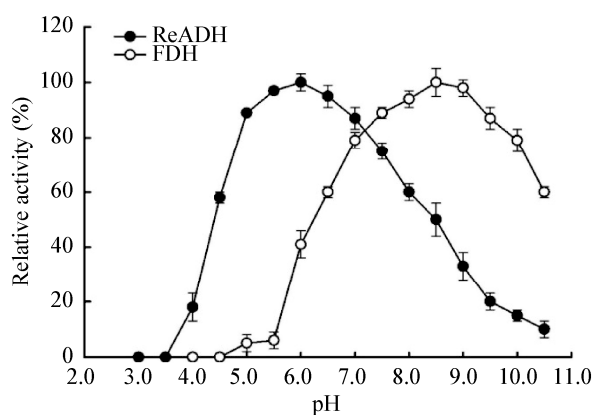


图 4 pH 对 R1F2 中 ReADH 和 FDH 酶活性的影响
Figure 4 Effects of pH on the enzyme activity of ReADH and FDH in R1F2

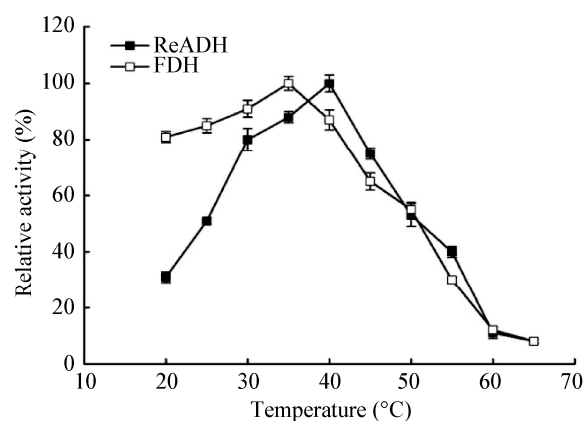


图 5 温度对 R1F2 中 ReADH 和 FDH 酶活性的影响
Figure 5 Effects of temperature on the enzyme activity of ReADH and FDH in R1F2

2.4 全细胞转化与产物检测

根据表 2 结果计算反应体系中 R1F2 和 F1R2 全细胞的添加量, 反应 24 h 后利用 HPLC 检测 R1F2 和 F1R2 的反应液, 结果如图 6 所示, 在 6.620 min 出现底物峰为苯乙酮, 8.594 min 时出现产物峰为(S)- α -苯乙醇。根据峰面积计算苯乙酮转化率及光化学纯度 *e.e.* 值(表 3), 结果表明共表达菌株 R1F2 对苯乙酮的转化效果较好, 转化率 >96% 且 *e.e.* 值 >99%, 使用该共表达菌株进行苯乙酮转化条件的研究。

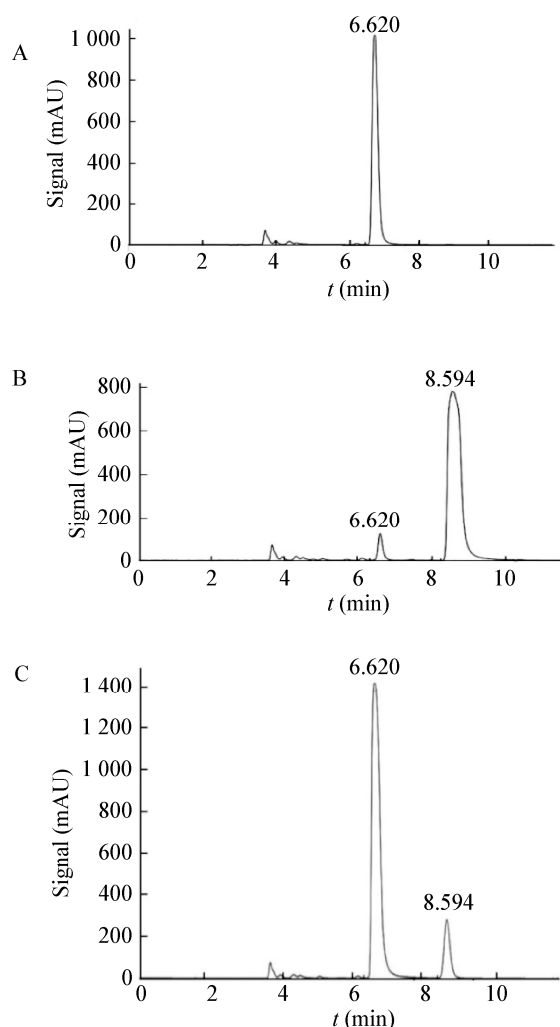


图 6 HPLC 检测共表达菌株反应液
Figure 6 HPLC detection of the reaction mixture of co-expression strains

注: A: 空载体菌株反应液; B: R1F2 反应液; C: F1R2 反应液。
Note: A: Reaction mixture of empty vector strain; B: Reaction mixture of R1F2; C: Reaction mixture of F1R2.

表 3 共表达菌株对苯乙酮的转化结果

Table 3 Results of acetophenone catalysis by co-expression strain

菌株	转化率	(S)- α -苯乙醇光化学纯度
Strains	Conversion (%)	e.e. of (S)- α -phenylethanol (%)
Coexpression strain R1F2	96.6	>99.0
Coexpression strain F1R2	34.1	>99.0

2.5 全细胞转化条件

2.5.1 不同 pH 下苯乙酮的转化率

因串联表达的 2 个酶最适 pH 相差较大, 为确定全细胞转化苯乙酮反应的最适 pH, 将 R1F2 全细胞在不同 pH 条件下进行反应, 检测到 R1F2 对苯乙酮的转化率达到最高时的 pH 为 7.5 (图 7)。

2.5.2 不同温度下苯乙酮的转化率

为确定温度对全细胞转化苯乙酮反应的影响, 将 R1F2 全细胞反应体系置于不同温度条件下反应, 测定结果表明, 在 20–30 °C 时苯乙酮的转化率逐渐增加, 当温度超过 30 °C 时苯乙酮转化率开始下降。利用全细胞转化苯乙酮为(S)- α -苯乙醇的最适温度为 30 °C (图 8)。

2.5.3 底物浓度耐受性

在 50 mL 反应体系中分别加入浓度为 100、200、400、500 mmol/L 的苯乙酮, 检测反应不同时间时 R1F2 对苯乙酮的转化率(图 9)。结果表明, 底物浓度分别为 100、200 mmol/L 时, 反应 12 h 转化率达 99%; 底物浓度为 400 mmol/L 时, 反应

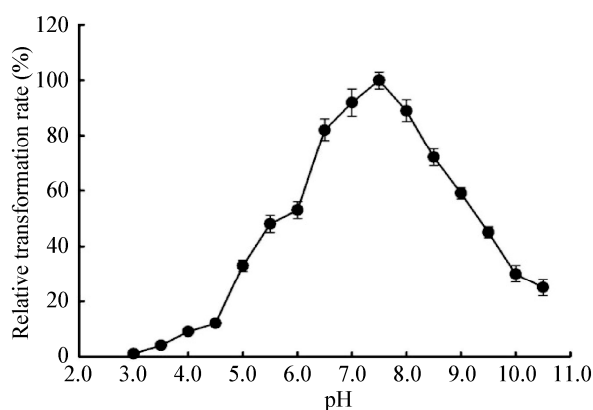


图 7 pH 对苯乙酮转化反应的影响

Figure 7 Effects of pH on the biotransformation of acetophenone

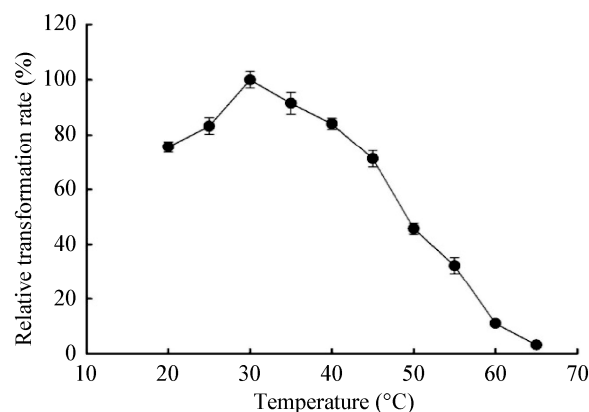


图 8 温度对苯乙酮转化反应的影响

Figure 8 Effects of temperature on the biotransformation of acetophenone

24 h 产物含量为 385 mmol/L, 对底物的转化率可达 98%; 当底物浓度为 500 mmol/L 时, 反应 36 h 产物含量为 425 mmol/L, 对底物的转化率为 85%。综合上述结果并结合生产实际考虑, 苯乙酮浓度为 400 mmol/L, 反应 24 h 的反应条件较为理想。

3 讨论与结论

羰基还原酶与辅酶再生循环相关酶的共表达体系已成为降低生物合成成本的一种有效手段, 被广泛应用于醇类手性化合物的合成。孙莹等从近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC

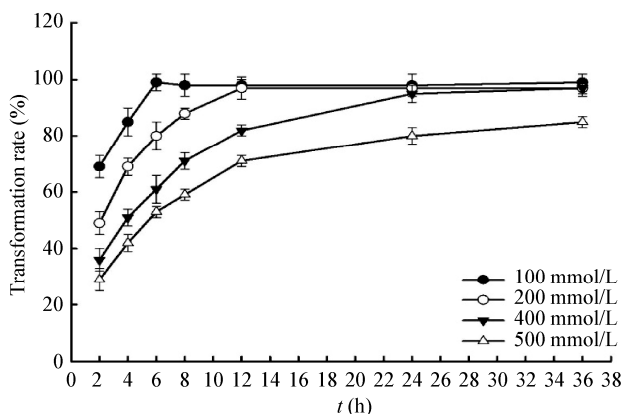


图 9 底物浓度对苯乙酮转化反应的影响

Figure 9 Effects of substrate concentration on the biotransformation of acetophenone

M203011)中克隆得到(R)-羰基还原酶基因 *RCR*, 并与甲酸脱氢酶基因 *FDH* 共表达, 用于(R)-苯基乙醇的合成^[16]。随后, 姜佳伟等从近平滑假丝酵母中克隆得到(S)-羰基还原酶基因 *SCR*, 并与葡萄糖脱氢酶基因 *ADH* 共表达用于合成(S)-苯基乙醇, 底物转化率和产物光学纯度均大于 99%^[17]。前期有关于酶共表达体系用于合成(R)-苯乙醇的报道, Weckbecker 等将嘧啶核苷转氢酶基因 *PNT*、醇脱氢酶基因 *ADH* 和甲酸脱氢酶基因 *FDH* 共表达, 可使 66% 苯乙酮转化为(R)-苯乙醇^[18]。Yun 等将 ϵ -转氨酶、醇脱氢酶和葡萄糖脱氢酶组成的共表达体系可将 50% α -甲基苄胺转化为(R)-苯乙醇, 光学纯度大于 99%^[19]。目前未有关于酶共表达体系用于合成(S)- α -苯乙醇的报道。

本研究分别从红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) 和博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 中克隆得到羰基还原酶基因 (*ReADH*) 和甲酸脱氢酶基因 (*FDH*), 以不同顺序串联于 pRSFDuet-1 载体中, 实现了两个酶的高效共表达, 可用于(S)- α -苯乙醇的合成。有研究表明, *ReADH* 为 NADH 依赖型^[20], 因此在辅酶再生循环中采用甲酸脱氢酶 *FDH* 进行共表达, 以稳定反应 pH, 降低副反应产物。*ReADH* 和 *FDH* 的酶活性测定结果表明, R1F2 中 *ReADH* 和 *FDH* 催化活性高于 F1R2, 这可能与活性测定使用的是粗酶液, 且两者目的蛋白表达量有差异有关。全细胞转化条件研究结果表明, 反应最适 pH 和温度分别为 7.5 和 30 °C, pH 介于两个酶体外活性最适 pH 之间, 温度与 *FDH* 体外活性最适温度接近; 在最适反应条件下, R1F2 菌株可以对较高浓度的苯乙酮进行转化, 反应 24 h 对 400 mmol/L 苯乙酮转化率大于 98%, 且(S)- α -苯乙醇的光化学纯度大于 99%, 该反应条件是否适用于(S)- α -苯乙醇的大量生产有待进一步验证。

对于工业应用而言, 实现 NAD⁺ 在催化反应中的循环利用对降低成本效果显著^[11]。本研究构建的共表达体系实现了 NADH 的再生并用于(S)- α -苯乙

醇的生物合成, 为工业化应用中酶促反应的连续进行提供了一个有效技术手段, 为后续建立大规模生产的工业化体系提供了参考。

REFERENCES

- [1] Du PX, Wei P, Lou WY, et al. Biocatalytic anti-Prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter pasteurianus* GIM1.158[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 84
- [2] Ni Y, Xu JH. Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1279-1288
- [3] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(2): 66-73
- [4] Forrest GL, Gonzalez B. Carbonyl reductase[J]. Chemico-Biological Interactions, 2000, 129(1/2): 21-40
- [5] 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[J]. Tetrahedron, 2006, 62(26): 6143-6149
- [6] 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[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(7): 1430-1436
- [7] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis[J]. Science, 2003, 299(5613): 1694-1697
- [8] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow[J]. Nature, 2001, 409(6817): 258-268
- [9] Betancor L, Berne C, Luckarift HR, et al. Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system[J]. Chemical Communications, 2006(34): 3640-3642
- [10] Liu WF, Wang P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(4): 369-384
- [11] Yu HL, Huang L, Ni Y, et al. Advances in synthesis of chiral alcohols by carbonyl bioreduction[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2013, 11(3): 71-82 (in Chinese)
郁惠蕾, 黄磊, 倪燕, 等. 羰基生物还原法合成手性醇的研究进展[J]. 生物加工过程, 2013, 11(3): 71-82
- [12] Bommarius AS, Schwarm M, Drauz K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1998, 5(1/4): 1-11
- [13] Bommarius AS, Drauz K, Hummel W, et al. Some new developments in reductive amination with cofactor regeneration[J]. Biocatalysis, 2009, 10(1/4): 37-47
- [14] Yuwen WG, Zhang L, Wang ZX, et al. Co-expression of glucose dehydrogenase and carbonyl reductase in *Escherichia coli* and its application in asymmetric synthesis of d- ψ -ephedrine[J]. Industrial Microbiology, 2010, 40(3): 19-24

- (in Chinese)
宇文伟刚, 张梁, 王正祥, 等. 羧基还原酶基因与葡萄糖脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达及其在不对称还原产麻黄碱中的初步应用[J]. 工业微生物, 2010, 40(3): 19-24
- [15] Li C, Qi NC, Peng G, et al. Screening and identification of *S*-phenylethanol-producing strain[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(2): 43-47 (in Chinese)
李成, 戚南昌, 彭果, 等. *S*-苯乙醇高产菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(2): 43-47
- [16] Sun Y, Zhang RZ, Xu Y. Co-expression of formate dehydrogenase form *Candida boidinii* and (*R*)- specific carbonyl reductase form *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(12): 1629-1633 (in Chinese)
孙莹, 张荣珍, 徐岩. (*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[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1629-1633
- [17] Jiang JW, Zhang RZ, Zhou XT, et al. Efficient biosynthesis of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by (*S*)-carbonyl reductase II and glucose dehydrogenase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(10): 1647-1655 (in Chinese)
姜佳伟, 张荣珍, 周晓天, 等. (*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[J]. 微生物学报, 2016, 56(10): 1647-1655
- [18] Weckbecker A, Hummel W. Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(22): 1739-1744
- [19] Yun HD, Yang YH, Cho BK, et al. Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (*R*)-1-phenylethanol and (*R*)- α -methylbenzylamine from racemic α -methylbenzylamine using ω -transaminase/alcohol dehydrogenase/glucose dehydrogenase coupling reaction[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(10): 809-814
- [20] Hummel W, Abokitse K, Drauz K, et al. Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: expression of an (*S*)-alcohol dehydrogenase in *E. coli* and studies on the synthetic potential of this biocatalyst[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2003, 345(1/2): 153-159

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>)的“文件下载”区下载专题刊申请表;填好后以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn。