

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(6):783-788; 4 June 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 定点突变改变近平滑假丝酵母 SCR II 催化苯乙酮衍生物底物谱

张波涛, 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】通过定点突变技术, 改变近平滑假丝酵母短链羰基还原酶 II (SCR II) 催化苯乙酮衍生物的功能, 为数种手性芳香醇的生产提供一种高效、安全的新型制备方法。【方法】通过氨基酸序列和蛋白结构比对的方法, 选择 SCR II 的底物结合域中关键氨基酸位点 E228 实施突变, 构建相应的突变株 *Escherichia coli* BL21/pET28a-E228S; 以苯乙酮衍生物为底物, 对突变株的酶活和生物转化功能进行了分析。【结果】酶活测定结果表明: 突变株 *E. coli* BL21/pET28a-E228S 催化原始底物 2-羟基苯乙酮的酶活仅为原始酶活的 25% 左右; 而催化苯乙酮、4'-甲基苯乙酮、4'-氯苯乙酮的酶活是突变前的 7-20 倍。突变株 *E. coli* BL21/pET28a-E228S 生物转化 2-羟基苯乙酮, 获得产物 (S)-苯基乙二酮的得率不超过 10%, 而以苯乙酮、4'-甲基苯乙酮、4'-氯苯乙酮为底物时, 生物转化产物光学纯度维持在 99%, 得率高达 80% 以上。【结论】对底物结合域中的关键氨基酸实施突变, 提高了 SCR II 催化苯乙酮衍生物的底物广谱性, 拓展了该酶的生物功能, 为理性改造短链羰基还原酶的不对称还原催化功能和手性芳香醇的制备提供了新型途径。

**关键词:** 定点突变, 短链羰基还原酶 II, 苯乙酮衍生物, 生物转化, 手性醇

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 06-0783-06

光学活性醇是许多重要手性药物和精细化化工产品合成中的关键手性砌块<sup>[1-2]</sup>, 尤其芳香基类手性醇, 更是一种理想药物中间体和高附加值化学品的前体物质<sup>[3-4]</sup>。例如 (R)-2'-氯-苯乙醇是合成手性药物 L-氯丙那林的重要中间体<sup>[5]</sup>, (R)-3'-羟甲基-4'-羟基-苯乙醇是合成手性药物 (R)-沙丁胺醇不可缺少的前体<sup>[6]</sup>。在所有制备方法中, 生物法由于具有反应条件温和、高效、绿色环保等强大优势, 已成为手性芳香醇制备的主要发展趋势<sup>[7]</sup>。

随着基因工程和蛋白质工程技术的迅猛发展,

对已知酶的关键氨基酸进行定点突变<sup>[8]</sup>, 大大加快了生物催化剂的改造进程。如 Zhu 等对来源于 *Sporobolomyces salmonicolor* 的羰基还原酶 Q245 进行饱和突变, 以 4'-甲氧基苯乙酮为底物进行筛选, 不仅改变了产物的构型, 且有效提高了产物的光学纯度<sup>[9]</sup>。Heiss 等将 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的次级醇脱氢酶 (SADH) 295 位的半胱氨酸突变为丙氨酸, 改变了 SADH 的立体选择性并拓宽了酶催化的底物谱<sup>[10]</sup>。

本实验室的前期工作中, 已成功地从近平滑假

**基金项目:** 国家“973 项目”(2009CB724706); 国家“863 计划”(2007AA02Z226); 国家自然科学基金项目(31070059); 新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0498); 江南大学自主科研计划面上项目(JUSR21121)

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

**作者简介:** 张波涛(1986-), 男, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: zhangbotao1986@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-12-31; **修回日期:** 2011-03-01

丝酵母 (*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011 克隆获得两个短链羧基还原酶(二者氨基酸同源性约为 85%)基因,进一步研究发现这 2 种酶 SCR 和 SCR II 均能将 2-羟基苯乙酮生物转化为产物(S)-苯基乙二醇,但后者的生物催化效率远远高于前者<sup>[11-12]</sup>。本研究根据两种羧基还原酶的氨基酸序列和蛋白结构的比对结果<sup>[13-14]</sup>,对底物催化域中的第 228 位的谷氨酸实施定点突变,以数种苯乙酮的衍生物为底物进行筛选,研究了突变体的生物催化功能,为已知酶的理性改造提供了新型研究手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:**大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21 (DE3) 购自 Invitrogen 公司。重组质粒 pET28a-*scr* II<sup>[12]</sup> 为本实验室构建;克隆质粒 pMD19-T、表达质粒 pET28a 购自 Invitrogen 公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

Primers	Sequence (5'→3')
E228S_R	TGCTCTTACTAAGAAAATCAGA
E228S_F	TGTTAGTAAAGACATGAAAGC
<i>scr</i> II_F	ATCGGATCCATGGGCGAAATCGAATCTTATTGC ( <i>Bam</i> H I)
<i>scr</i> II_R	TGACTCTCGACTGGACAAGTGTAAACCACCATCGAC ( <i>Xho</i> I)

Note: the mutated bases are bold; the restriction endonuclease sites are underlined.

**1.1.2 试剂与仪器:**PCR 所用试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、低分子质量标准蛋白购于大连宝生物有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;苯乙酮衍生物及其对应的手性醇购自 Sigma 公司;流动相正己烷、异丙醇购自上海甘宁公司;高效液相色谱仪 HP1100 购自美国 Agilent 公司;液相手性柱 Chiralcel OB-H (250 mm  $\times$  4.6 mm) 购自日本 Daicel 公司;超声破碎仪 VCX750 购自美国 Sonic 公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 突变位点的选择

前期研究已经成功克隆得到两种同源基因 *scr* 和 *scr* II,并于 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行了高效表达,研究发现 2 种重组酶均能生物转化 2-羟基苯乙酮,产生(S)-苯基乙二醇,但是后者的催化效率要优于前者。进一步的氨基酸序列和蛋白结构比对发现<sup>[11-14]</sup>:两者的差异在于底物结合域  $\beta$ F 和  $\alpha$ FG 之间的第 228 位的氨基酸不同(图 1),因而选择此氨基酸位点进行定点突变。

### 1.3 突变基因的获取及克隆

采用重叠延伸 PCR 的方法,以质粒 pET28a-*scr* II 为模板,分别以 *scr* II\_F 和 E228S\_R、*scr* II\_R 和 E228S\_F 为引物,扩增出突变基因的前半段和后半段序列;在 Taq DNA Polymerase 的作用下,纯化后的 PCR 产物经退火连接,于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,获得完整的双链,作为下一轮 PCR 的模板;以 *scr* II\_F 和 *scr* II\_R 为引物,上一轮 PCR 获得的双链 DNA 为模板,PCR 扩增获得突变基因 E228S 全长序列;纯化后的 E228S 基因与 pMD19-T 载体通过 TA 互补连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,经蓝白

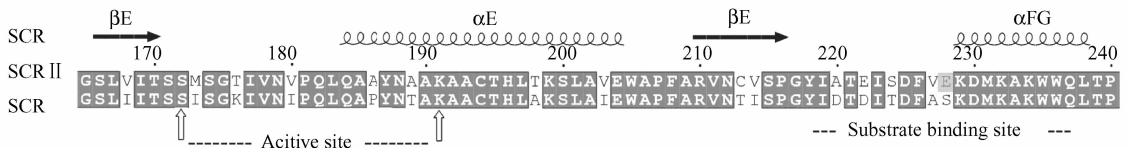


图 1 SCR II 和 SCR 部分氨基酸序列比对结果

Fig. 1 Alignment of partial amino acids between SCR II and SCR.

斑筛选和酶切验证,获得重组质粒 T-E228S。重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

### 1.4 突变株的构建

利用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 分别对 T-E228S 和 pET28a 进行酶切,胶回收和纯化酶切产

物,线性化的 pET28a 载体和 E228S 基因片段在连接酶 Ligase 的作用下,于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h,连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,经 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板抗性筛选,菌落 PCR 和 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切验证,获得阳性重组菌株 *E. coli*

BL21/pET28a-E228S。

### 1.5 重组蛋白的诱导表达

挑取阳性单菌落接种于 4 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 振荡培养过夜。取 1 mL 培养液转接于 50 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 时, 向培养物中加至终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 30 $^{\circ}\text{C}$  诱导培养 8 h, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心收集菌体。少部分菌体用于 SDS-PAGE 电泳检测目标蛋白的表达, 另外部分菌

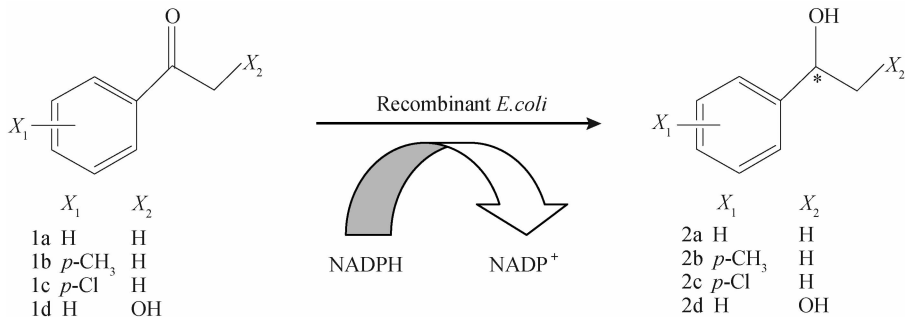


图 2 重组大肠杆菌催化苯乙酮衍生物的反应模式图

Fig. 2 Schematic bioreduction of acetophenone derivatives with recombinant *E. coli* cells.

### 1.7 重组突变株不对称还原苯乙酮衍生物

在苯基乙二醇检测方法的基础上<sup>[16]</sup>, 通过调节柱温、改变流速、调整流动相比比例, 或使用其他类型的色谱柱建立消旋苯乙醇衍生物的分选条件, 用于苯乙醇衍生物的检测(表 2)。在 2 mL 的 0.2 mol/L

体经生理盐水洗涤 2 次后用于酶活测定和不对称转化实验。

### 1.6 重组酶活力测定

称取 0.2 g 湿菌体, 加入适量 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 悬浮细胞, 于冰浴中进行超声波细胞破碎 (工作 1 s, 间隔 3 s, 工作时间 3 min)。4 $^{\circ}\text{C}$  条件下 12000 r/min 离心 30 min 收集上清液作为粗酶液, 以苯乙酮衍生物 (图 2) 为底物检测重组酶活。酶活测定方法参见聂尧等方法<sup>[15]</sup>, 每分钟催化氧化 1  $\mu\text{mol}$  NADPH 的酶量定义为 1 个酶活单位。

的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中, 加入 0.2 g 湿菌体和 2 mg 的底物 (1a-1c), 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中反应 12 h, 离心去除菌体, 取上清液用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取, 采用相应的高效液相色谱 (HPLC) 检测方法 (表 2), 根据峰面积算出产物得率和光学纯度。

表 2 产物的检测方法

Table 2 Analytical methods of corresponding productions

Alcohols <sup>a</sup>	Chiral column	Mobile phase/ hexane: isopropanol	Column temperature/ $^{\circ}\text{C}$	Flow rate/ (mL/min)	Peak time	
					$t_R$ /min	$t_S$ /min
2a	Chiralcel OB-H	9:1	25	0.6	13.8	10.8
2b	Chiralcel OB-H	9:1	25	0.4	18.7	16.5
2c	Chiralcel OB-H	98:2	25	0.8	19.5	22.1
2d	Chiralcel OB-H	9:1	38	0.4	19.5	23.5

<sup>a</sup> Alcohols were present in Fig. 2.

## 2 结果

### 2.1 突变株的构建

采用重叠延伸 PCR 的方法, 扩增出 2 段完整的突变基因, 纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单克隆培养后提取质粒, 双酶切结果表明突变基因 E228S 已

插入到 pMD19-T 的克隆位点。线性化的突变基因 E228S 与 pET-28a 载体经粘性末端连接, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经菌液 PCR 鉴定 (图 3), 获得阳性克隆 *E. coli* BL21/pET28a-E228S, 测序结果进一步证实突变位点的插入位置与预期结果一致。

### 2.2 突变蛋白的诱导表达

菌体培养到  $OD_{600}$  0.6 - 0.8 时, 经 IPTG 诱导后

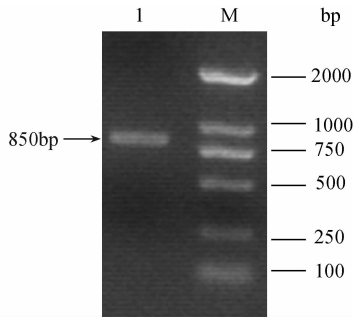


图3 菌液 PCR 鉴定重组子

Fig. 3 The identification of positive colonies by PCR method. 1. *E. coli* BL21/pET28a-E228S; M. DNA Maker.

培养8 h, SDS-PAGE 结果显示:与不含目的基因的对照(*E. coli* BL21/pET28a)相比,重组突变蛋白与野生型蛋白在*E. coli*中均获得高效表达,蛋白条带大小约为33 kDa(图4),稍微大于蛋白分子的理论计算值(30 kDa),这是由于重组蛋白的C、N端各含有一个6×Histidine 标签所致。

### 2.3 重组突变蛋白的酶活力测定

以数种苯乙酮衍生物为底物,对突变株*E. coli* BL21/pET28a-E228S 和出发菌株*E. coli* BL21/

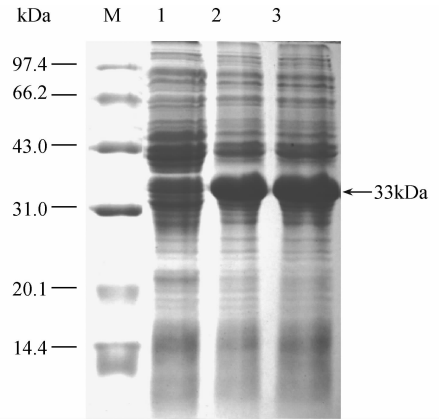


图4 突变蛋白的诱导表达

Fig. 4 Expression of recombinant mutated proteins.

1. *E. coli* BL21/pET28a; 2. *E. coli* BL21/pET28a-scr II; 3. *E. coli* BL21/pET28a-E228S; M. Protein molecular weight marker.

pET28a-scr II 细胞上清液的还原酶活力进行测定,结果表明突变株*E. coli* BL21/pET28a-E228S 催化原始底物2-羟基苯乙酮的酶活仅为出发菌株酶活的25%左右,而催化底物苯乙酮、4'-甲基苯乙酮、4'-氯苯乙酮的酶活分别是出发菌株酶活的7-20倍(表3)。

表3 突变株的酶活测定

Table 3 Specific activities of SCR II and its mutants with acetophenone derivatives as the substrates

Enzymes	Specific activities for substrates <sup>a</sup> /U·mg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>			
	1a	1b	1c	1d
SCR II	0.011 ± 0.001	0.042 ± 0.003	0.030 ± 0.001	0.574 ± 0.012
E228S	0.243 ± 0.008	0.286 ± 0.010	0.313 ± 0.007	0.146 ± 0.004

<sup>a</sup> Substrates were present in Fig. 2. <sup>b</sup> 1 U·mg<sup>-1</sup> was defined as 1 μmol of NADPH converted in one minute by 1 mg of protein

### 2.4 突变株不对称还原苯乙酮衍生物

重组菌株不对称转化苯乙酮衍生物的结果(表4)表明出发菌株*E. coli* BL21/pET28a-scr II对2-羟基苯乙酮有很好催化效果,并且具有很强的底物专一性,而对其它苯乙酮衍生物的催化效率很低。突变菌株*E. coli* BL21/pET28a-E228S 催化原始底物2-羟基苯乙酮,转化产物(S)-苯基乙二醇的得率仅为7%左

右,而不对称还原其它苯乙酮衍生物(苯乙酮、4'-甲基苯乙酮、4'-氯苯乙酮)的产物光学纯度≥99%,得率高达80%以上。酶活测定和生物转化结果表明短链羧基还原酶SCR II中第228位的谷氨酸与酶催化底物的特异性密切相关,该位点的突变导致其生物催化功能发生变化,主要表现为酶催化底物的专一性减弱,而催化原始底物衍生物的能力显著增强。

表4 突变株不对称还原苯乙酮衍生物

Table 4 Asymmetric reduction of acetophenone derivatives catalyzed by SCR II and its mutants

Ketones <sup>a</sup>	<i>E. coli</i> BL21/pET28a-scr II			<i>E. coli</i> BL21/pET28a-E228S		
	Yield/% <sup>b</sup>	Optical purity/% <sup>b</sup>	Absolute configuration <sup>c</sup>	Yield/% <sup>b</sup>	Optical purity/% <sup>b</sup>	Absolute configuration <sup>c</sup>
1a	3.2 ± 0.1	99.2 ± 0.1	R	80.4 ± 0.3	99.2 ± 0.3	R
1b	7.3 ± 0.1	99.3 ± 0.2	R	84.5 ± 0.4	99.1 ± 0.1	R
1c	13.1 ± 0.3	99.0 ± 0.1	R	88.7 ± 0.6	99.3 ± 0.1	R
1d	86.8 ± 0.5	99.1 ± 0.3	S	7.2 ± 0.1	99.2 ± 0.2	S

<sup>a</sup> Ketones were showed in Fig. 2. <sup>b</sup> Yield and Optical purity were measured by chiral HPLC. <sup>c</sup> The absolute configuration of predominant product alcohol was determined by comparing the retention time with that of standard samples.

### 3 讨论

基于生物信息学和酶蛋白的构效关系, 定点突变改造酶技术已日益成为生物催化领域中重要研究手段。本研究从两种酶蛋白(SCR 和 SCR II)氨基酸序列、催化功能<sup>[11-12]</sup>和蛋白结构<sup>[13]</sup>出发, 发现底物结合域中的氨基酸位点 E228 很可能对酶催化功能起着关键作用。研究结果表明突变株 *E. coli* BL21/pET28a-E228S 不对称还原苯乙酮、4'-甲基苯乙酮、4'-氯苯乙酮, 生成相应的 *R* 型醇的光学纯度  $\geq 99\%$ , 产物的得率高达 80% 以上。这可能是由于第 228 位谷氨酸突变为丝氨酸后, 氨基酸的亲水性下降, 有利于促进疏水性底物和酶蛋白的结合, 使得二者的结合更牢固, 从而加快反应的速率<sup>[17-18]</sup>。此外, 研究发现苯乙酮对位的取代基性质与产物的得率密切相关, 当苯环对位取代基是吸电子基团时, 如  $-Cl$  和  $-CH_3$ , 能加快酶催化底物的反应速率, 产物得率获得提高<sup>[19-20]</sup>。

本研究基于选择性区域氨基酸突变技术, 研究了底物催化区域中关键位点 E228 对酶催化功能的影响。克服了天然酶的先天不足, 成功地改造了 SCR II 的生物催化功能, 理性拓宽了该酶催化的底物谱, 不仅为定点突变创造新型羰基还原酶种类, 丰富生物催化剂的多样性提供了新型研究手段, 同时也为数种手性芳香醇的高效、安全制备奠定了较好的研究基础。

### 参考文献

- [1] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (6817): 258-268.
- [2] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299 (5613): 1694-1697.
- [3] Zhu DM, Yang Y, Hua L. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reductase from *Candida magnoliae* with anti-prelog enantioselectivity. *Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71 (11): 4202-4205.
- [4] Kurbanoglu EB, Zilbeyaz K, Kurbanoglu NI, Kilic H. Enantioselective reduction of substituted acetophenones by *Aspergillus niger*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, 18 (10): 1159-1162.
- [5] Srebnik M, Ramachandran PV, Brown HC. A Highly Enantioselective synthesis of both optical isomers of tomoxetine, fluoxetine, and nisoxetine. *Journal of Organic Chemistry*, 1988, 53 (13): 2916-1920.
- [6] Soriano-Ursua MA, Correa-Basurto J, Valencia-Hernandez I, Amezcua-Gutierrez MA, Padilla-Martinez II, Trujillo-Ferrara JG. Synthesis and in vitro evaluation of (*R*)-4-(2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl) phenyl hydrogen phenylboronate: A novel salbutamol derivative with high intrinsic efficacy on the  $\beta_2$  adrenoceptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20 (19): 5623-5629.
- [7] Kaluzna WA, Matsuda T, Sewell AK, Stewart JD. Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126 (40): 12827-12832.
- [8] Rosell A, Valencia E, Ochoa WF, Fita I, Pares X, Farres J. Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (42): 40573-40580.
- [9] Zhu DM, Yang Y, Majkowicz S, Pan THY, Kantardjieff K, Hua L. Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via substrate-enzyme docking-guided point mutation. *Organic Letters*, 2007, 10 (4): 525-528.
- [10] Heiss C, Laivenieks M, Zeikus JG, Phillips RS. 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.
- [11] Nie Y, Xu Y, Mu XQ, Wang HY, Yang M, Xiao R. 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.
- [12] 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功能表达. *微生物学报(Chinese Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (1): 60-66.
- [13] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Bartlam M, Xu Y, Zhang XC, Rao ZH. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Science*, 2008, 17 (8): 1412-1423.
- [14] 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.
- [15] Nie Y, Xu Y, Wang HY, Xu N, Xiao R, Sun ZH. Complementary selectivity to (*S*)-1-phenyl-1, 2-ethanediol-forming *Candida parapsilosis* by expressing its carbonyl reductase in *Escherichia coli* for (*R*)-specific reduction of 2-hydroxyacetophenone. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, 26 (3): 210-219.
- [16] Nie Y, Xu Y, Yang M, Mu XQ. A novel NADH-

dependent carbonyl reductase with unusual stereoselectivity for (*R*)-specific reduction from an (*S*)-1-phenyl-1, 2-ethanediol producing micro-organism; purification and characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44 (5): 555-562.

- [17] Musa MM, Ziegelmann-Fjeld KI, Vieile C, Zeikus JG, Phillips RS. Asymmetric reduction and oxidation of aromatic ketones and alcohols using W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Journal of Organic Chemistry*, 2007, 72 (1): 30-34.
- [18] Royer SF, Haslett L, Crennell SJ, Hough DW, Danson

MJ, Bull SD. Structurally informed site-directed mutagenesis of a stereochemically promiscuous aldolase to afford stereochemically complementary biocatalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132 (33): 11753-11758.

- [19] Salvi NA, Chattopadhyay S. Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones. *Tetrahedron*, 2001, 57 (14): 2833-2839.
- [20] Homann MJ, Vail RB, Previte E, Tamarez M, Morgan B, Dodds DR, Zaks A. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Tetrahedron*, 2004, 60 (3): 789-797.

## Broader substrate specificity of *Candida parapsilosis* SCR II for catalyzing acetophenone derivatives by site-directed mutagenesis

Botao Zhang, Rongzhen Zhang, Shanshan Wang, Yan Xu \*

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

**Abstract:** [ **Objective** ] The function for catalyzing acetophenone derivatives of short-chain carbonyl reductase II (SCR II) from *Candida parapsilosis* was modified by site-directed mutagenesis. [ **Methods** ] An important site (E228) was selected for mutagenesis through amino acid sequence and protein structure alignment, and the corresponding variant E228S was constructed in *E. coli*. Using the acetophenone derivatives as substrates, we determined specific activities and biotransformation function of the variant. [ **Results** ] The specific activity of the variant E228S was reduced to 25% of the wild type for 2-hydroxyacetophenone reduction. However, it increased approximately 7-20 times for acetophenone, 4'-methylacetophenone and 4'-chloroacetophenone. The biotransformation results showed that the variant catalyzed the transformation of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol in a yield of less than 10%, while exhibited excellent performance to afford (*R*)-1-phenylethanol, (*R*)-1-(4-methylphenyl) ethanol and (*R*)-1-(4-chlorophenyl) ethanol from acetophenone, 4'-methylacetophenone and 4'-chloroacetophenone with high optical purity of 99% in a yield of above 80%. [ **Conclusion** ] We broadened the substrate specificity and catalytic function of SCR II by replacement of the critical amino acid (E228) inside the substrate binding pocket, which provided a novel approach for rational modification of short-chain carbonyl reductases, making it as a potential tool for asymmetric reduction and chiral alcohol preparation.

**Keywords:** site-directed mutagenesis, short-chain carbonyl reductase II, acetophenone derivatives, biotransformation, chiral alcohols

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program) (2009CB724706), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (863 Program) (2007AA02Z226), by the National Natural Science Foundation of China (31070059), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0498) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP21121)

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

Received: 31 December 2010 / Revised: 1 March 2011